

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İNFEKSİYON HASTALIKLARI ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**İNFLUENZA AŞISI YAPILAN BİREYLERDE AŞI-ANTİKOR
DÜZEYİ VE NFKB, JAK/STAT YOLAKLARI İLE İLİŞKİLİ GEN
EKSPRESYON PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. AKİDE ÇAKMAK ŞEN**

**DANIŞMAN
PROF. DR. HÜSEYİN TURGUT**

DENİZLİ-2021

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İNFEKSİYON HASTALIKLARI ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**İNFLUENZA AŞISI YAPILAN BİREYLERDE AŞI-ANTİKOR
DÜZEYİ VE NFKB, JAK/STAT YOLAKLARI İLE İLİŞKİLİ GEN
EKSPRESYON PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR AKİDE ÇAKMAK ŞEN**

**DANIŞMAN
PROF DR HÜSEYİN TURGUT**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 23.10.2019 tarih ve 2009TIPF017 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ-2021

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım ve vizitlerine katılmaktan mutluluk duyduğum hocam Sayın Prof. Dr. Hüseyin Turgut'a

Tezimin yapılmasında büyük emeği olan, pratikliğini örnek aldığım hocam Sayın Doç. Dr. Tuğba Sarı'ya

Asistanlık sürecimde almış olduğum teorik ve pratik eğitimlerde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, aile olarak her zaman desteklerini hissettiğim hocam Sayın Prof. Dr. Selda Sayın Kutlu ve hocam Sayın Doç. Dr. Murat Kutlu'ya

Nasihatları hep aklımda olacak olan hocam Sayın Öğr. Üyesi Dr. Suna Seçil Öztürk Deniz'e ve Sayın Öğr. Üyesi Dr Türkan Tüzün'e

Tezimin genetik bölümü çalışmalarında emeği olan sayın Dr. Öğr. Üyesi Onur Tokgün'e, Kubilay'a ve Büşra'ya

Tezimin tamamlanmasında geçen emeklerini hep hatırlayacağım Ege Karagür'e, Atalay Çelikyürek'e ve Aybike'ye

Asistanlığım boyunca birlikte pek çok şey paylaştığım, tez çalışmalarım sırasında yardımlarını benden esirgemeyen ve emeği geçen asistan arkadaşlarım çiçeği burnunda uzman Merve'ye, her konuda destek olan muhteşem üçlü Ece, Sevgi ve Firuze'ye, her daim arkamı toplayan Emine'ye, iş bitiriciğiyle Nurefşan'a, sessiz destekçim nahif Elif'e ve çalışkan Canan, Mehmet, Faruk'a

Çalışmayı ve disiplini öğrendiğim canım ailem annem, babam, abim ve kardeşime

Fakülte ve ihtisas sürecimde hep yanımda olan, desteği olmadan ne yapardım bilmiyorum dediğim canım eşim, oğlumun biricik babası Gürsel'e

Ve uzmanlık öncesi sınav sürecimi benimle birlikte yaşayan, doğumuna birkaç hafta kalan canım oğlum Göktürk Efe'me

Teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TARİHÇE	3
2.2. VIRÜS ÖZELLİKLERİ.....	4
2.2.1. Sınıflandırma	4
2.2.2. Yapısı	5
2.2.3. Replikasyon	6
2.2.4. Antijenik Varyasyon	7
2.3. EPİDEMİYOLOJİ	7
2.3. PATOGENEZ.....	8
2.4. HİSTOPATOLOJİ.....	9
2.4.1. Trakea ve Bronş Yalancı Çok Katlı Kolumnar Epitelindeki Değişiklikler	9
2.4.2. Mukus Bezlerindeki Değişiklikler	10
2.4.3. Bronşiyal Epiteldeki Değişiklikler	10
2.4.4. Diğer Histolojik Değişiklikler	10
2.4.5. İnfluenza Virüs Pnömonisi	10

2.6. VİRÜSE KARŞI GELİŞEN YANIT.....	11
2.6.1. Konak İmmun Yanıtı.....	11
2.7. KLİNİK BULGULAR.....	15
2.7.1. İnfluenza Komplikasyonları.....	15
2.8. TANI.....	18
2.8.1. Klinik Belirti ve Bulgular.....	18
2.8.2. Laboratuvar Tanı.....	20
2.9. TEDAVİ.....	21
2.9.1. Adamantanlar (M2 İnhibitörleri).....	21
2.9.2. Nöraminidaz İnhibitörleri.....	22
2.9.3. Selektif Endonükleaz İnhibitörü.....	23
2.9.4. Hangi Kesin veya Şüpheli İnfluenza Vakalarına Antiviral Tedavi Verelim?.....	23
2.9.5. Kimlere Antiviral Kemoprofilaksi Verelim?.....	23
2.9.6. Antiviral Doz ve Süreleri.....	24
2.10. KORUNMA.....	25
2.10.1. Mevcut Aşılar.....	25
2.10.2. Aşı Önerileri.....	29
2.10.3. Aşıya Karşı Gelişen İmmun Yanıt.....	30
2.10.4. İntramuskuler Protein Aşılar ile Gelişen İmmun Yanıt.....	35
2.10.5. Aşı Sonrası Antikor Gelişme ve Koruyuculuk Süresi.....	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	39
3.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ.....	39
3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ.....	39
3.3. ARAŞTIRMANIN ÖRNEKLEMİ.....	39
3.4. ETİK KURUL ONAYI.....	39

3.5. DAHİL EDİLME KRİTERLERİ	39
3.6. HARİÇ TUTMA KRİTERLERİ	39
3.7. ARAŞTIRMANIN YAPILDIĞI YER VE KATILIMCI SAYISI	40
3.8. KATILIMCILARIN ILI ve AŞI ÖYKÜSÜ	40
3.9. KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE SAKLANMASI.....	40
3.10. UYGULANAN AŞI ve İÇERİĞİ.....	40
3.11. YAN ETKİ İZLEMİ.....	40
3.12. GEN EKSPRESYON ANALİZİ.....	41
3.12.1. Rna İzolasyonu	41
3.12.2. RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi.....	41
3.12.3. Total RNA'nın cDNA'ya Çevrimi.....	41
3.12.4. Total RNA Örneklerinden Ekspresyon Analizi	42
3.13. AŞI ANTİKOR YANITININ ÖLÇÜLMESİ	43
3.13.1. Testin Uygulanışı	43
3.14. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	45
4. BULGULAR.....	46
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	60
7. KAYNAKLAR	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACIP	: Aşı Uygulamaları Danışma Komitesi
ADCC	: Antikor Bağımlı Hücrel Aracılı Sitotoksiste
ARDS	: Akut Solunum yetmezliği Sendromu
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
CC	: Hücre Kültürü
CDC	: Hastalık Korunma ve Kontrol Merkezleri
CPK	: Kreatinin Fosfokinaz
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	: Food and Drug Administration
H	: Hidrojen
HA	: Hemaglütinin
HAI	: Hemaglütinasyon inhibisyon
HD	: Yüksek Doz
IFN	: İnterferon
IIV	: İnaktif İnfluenza Aşısı
IG	: İmmunglobulin
IKB	: Nükleer Faktör Kappa B İnhibitörü
IL	: İnterlökin
IM	: İntramusküler
IRF	: İnterferon Düzenleyici Faktör
JAK	: Janus Kinaz
JNK	: c-Jun N-terminal Kinaz
LAIV	: Canlı Zayıflatılmış İntranazal İnfluenza Aşısı
MAPK	: Mitojenle Aktive olan Protein Kinaz
M1	: Matriks protein
M2	: Membran proteini
NA	: Nöraminidaz
NI	: Nöraminidaz inhibitörleri
NF κB	: Nükleer Faktör Kappa B
PAMP	: Patojenle İlişkili Moleküler Patern
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RIG	: Retinoik Asitle İndüklenebilir Gen
RIV	: Rekombinant İnfluenza Aşısı
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RSV	: Respiratuar sinsityal virüs
SA	: Sialik Asit

SARI	: Sentinel Ağır Akut Solunum Yolu Enfeksiyonları
STAT	: Signal transducers and activators of transcription
SA	: Sialik asit
TLR	: Toll Like Reseptör
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: İnfluenza virüs yapısı	6
Şekil 2: İnfluenza A virüs infeksiyonuna karşı doğal immun yanıt	13
Şekil 3: İnfluenza virüs ve NF-κB yolağı	32
Şekil 4: IL-6 ve sinyal yolağı.....	33
Şekil 5: JAK/STAT yolağı	35
Şekil 6: İnfluenza A'ya karşı antikor artışı olanların aşı öncesi ve sonrası antikor titrelerinin karşılaştırılması	47
Şekil 7: İnfluenza B'ye karşı antikor artışı olanların aşı öncesi ve sonrası antikor titrelerinin karşılaştırılması	48
Şekil 8: Aşı sonrası gen ekspresyonlarının log ₂ tabanında heatmap analizi.....	49
Şekil 9: Aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı olanların antikor artış yüzdesi (A), bu kişilerin gen ekspresyonlarının log ₂ tabanında heatmap analizi (B)	53
Şekil 10: Aşı sonrası influenza B'ye karşı antikor artışı olan hastaların antikor artış yüzdesi (A), bu kişilerin gen ekspresyonlarının log ₂ tabanında heatmap analizi (B)	53

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: İnfluenza A, B ve C virüslerinin farklı özellikleri	5
Tablo 2: İnfluenza A ve B tedavi/kemoprofilaksi antiviral ajan doz ve uygulama süreleri.....	24
Tablo 3: cDNA dönüşüm reaksiyonu koşulları.....	42
Tablo 4: mRNA RT-PZR koşulları	43
Tablo 5: Başvuran kişilerin demografik özellikleri	46
Tablo 6: Aşı öncesi ve sonrası antikor durumları	47
Tablo 7: Aşı sonrası gen ekspresyon ifadeleri	48
Tablo 8: Aşı sonrası influenza A ve/veya influenza B'ye karşı gelişen antikor artışının gen ekspresyonları ile karşılaştırılması.....	50
Tablo 9: İnfluenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı olanların olmayanlara göre gen ekspresyon ortalamalarının karşılaştırılması.....	51
Tablo 10: İnfluenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı olan ve olmayanların gen ekspresyonlarının yaşlara göre karşılaştırılması	52
Tablo 11: Aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı olan ve olmayanların gen ekspresyonlarının karşılaştırılması	54
Tablo 12: Aşı sonrası influenza B'ye karşı gelişen antikor artışı olan ve olmayanların gen ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	54
Tablo 13: İnfluenza antikor durumlarının cinsiyetlere göre karşılaştırılması	55
Tablo 14: İnfluenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı olan ve olmayanların gen ekspresyon analizlerinin cinsiyetlere göre karşılaştırılması	56
Tablo 15: Antikor durumlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması.....	57
Tablo 16: Antikor – meslek karşılaştırması	58
Tablo 17: Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor durumunun aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artış durumuna göre karşılaştırılması.....	58
Tablo 18: Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği olan ve olmayanların son 2 yılda aşı/ILI öyküsü.....	59

ÖZET

İnfluenza Aşısı Yapılan Bireylerde Aşı-antikor Düzeyi ve NFκB, JAK/STAT Yolakları ile İlişkili Gen Ekspresyon Profillerinin Araştırılması

Dr. Akide Çakmak Şen

Grip (influenza), influenza virüslerinin neden olduğu, akut, ciddi ve salgınlara yol açabilen bir enfeksiyon hastalığıdır. Hastalıktan korunmada en etkili yol influenzaya karşı bağışıklamadır. Aşılarından sonra gelişen hem humoral hem de hücresel yanıtın üzerinde genetik kontrolün etkisi henüz çok iyi bilinmemektedir. İnfluenza virüs enfeksiyonu sırasında NFκB, IL-6, JAK/STAT yolaklarının viral klirenste önemi bilinmektedir. Çalışmamızda influenza aşısına karşı gelişen antikor yanıtı ile gen ekspresyon yollarının (NFκB, IL-6, JAK/STAT) ilişkisinin araştırılması ve aşının koruyucu etkisinin artırılabilmesi amacıyla yeni çalışmalarda kullanılabilen bilgileri elde etmeyi amaçladık.

Çalışmamıza Aralık 2018 ve Ocak 2019 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Enfeksiyon hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği Aşı Polikliniği'ne başvuran, 18 yaş ve üzerindeki immün yetmezlik durumu olmayan ve/veya immünsupresif tedavi almayan, kan örneği vermeyi kabul eden hastalar dahil edildi. Hastalardan grip aşısı uygulamasının hemen öncesinde ve aşı sonrası 14. ve 45. günlerde kan örneği alındı. İnfluenza antikorlarının serum konsantrasyonları ELISA (Abcam, UK) kiti ile çalışıldı. NFκB, IL-6, JAK/STAT gen ekspresyon analizleri polimeraz zincir reaksiyonu ile çalışıldı.

Katılımcıların yaş ortalaması $40,2 \pm 15,7$ ve 30 (%69,7)'u 18-50 yaş aralığında, 13 (%30,2)'ü 50 yaşın üzerindedir. Katılımcıların 22 (%51,1)'si kadın, 21 (%48,8)'i erkekti. Katılımcıların antikor durumları incelendiğinde; aşı öncesi 34 kişide (%79) influenza A'ya karşı, ELISA kitinin pozitif sınır değerine göre antikor pozitifliği bulundu. Aşı sonrası 29 (%67,4) kişide influenza A veya B'den en az birine karşı antikor artışı saptandı. Bu 29 kişinin 26'sında (%89,7) STAT2, 19'unda (%65,5) JAK2 ve 18'inde (%62,1) IL-6 up regülasyonu saptandı. İnfluenza A veya B'den en az birine karşı antikor artışı olanların, olmayanlara göre gen ekspresyonlarının ortalamasının karşılaştırılmasında; STAT2, antikor artışı olanlarda 32,24; olmayanlarda 28,78 bulundu ($p=0,031$). JAK2, antikor artışı olanlarda 6,31; olmayanlarda 1,57 bulundu

(**p= 0,046**). İnfluenza A veya B'den en az birine karşı antikor artışı olan 29 kişinin JAK2 up regülasyonu olan 17'si (%89,5) 18-50 yaş arasındaydı (**p=0,03**). Bu kişilerden IL-6 up regülasyonu olan 17'si (%94,4) 18-50 yaş arasındaydı (**p=0,006**).

Aşı antikor yanıtı ile hücre içi sinyal yollarının anlamlı bir ilişkisi bulunmaktadır. Bu ve benzeri yolların gen ifadesi düzeyinde değerlendirilmesi kişilerin aşuya yanıtta farklılıklarını ortaya koyabilir. Yaş artışı ile birlikte ileri yaş bireylerde aşı antikor yanıtı belirgin olarak azalmaktadır. İleri yaş bireylerde aşı antikor yanıtının artırılması amacıyla bu yolların aktivasyonunu sağlayan adjuvanların geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılabilir. Bu çalışma sınırlı bir popülasyonda ve tek bir merkezde yapılmıştır. Daha büyük bir popülasyonda, daha fazla sayıda merkezde ve daha fazla gen düzeyinde bu sonuçları irdeleyen çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: İnfluenza aşısı, Aşı antikor yanıtı, Hücre içi sinyal yolları

ABSTRACT

Investigation of Vaccine-antibody Level and Gene Expression Profiles Associated with NFκB, JAK/STAT Pathways in Individuals Vaccinated Against Influenza

Dr. Akide Çakmak Şen

Influenza (influenza) is an acute, serious infectious disease caused by influenza viruses that can lead to epidemics. The most effective way to prevent the disease is immunization against influenza. The effect of genetic control on both humoral and cellular responses after vaccination is not well known yet. The importance of NFκB, IL-6, JAK/STAT pathways in viral clearance during influenza virus infection is known. In our study, we aimed to investigate the relationship between the antibody response to influenza vaccine and gene expression pathways (NFκB, IL-6, JAK/STAT) and to gain knowledge that can be used in new studies in order to increase the protective effect of the vaccine.

Our study included patients aged 18 years and older, who applied to Pamukkale University Hospital Infectious Diseases and Clinical Microbiology Clinic Vaccine Polyclinic between December 2018 and January 2019, who did not have immunodeficiency and/or did not receive immunosuppressive therapy, and accepted to give blood samples. Blood samples were taken from the patients just before the flu vaccine administration and on the 14th and 45th days after the vaccine. Serum concentrations of influenza antibodies were studied with the ELISA (Abcam, UK) kit. NFκB, IL-6, JAK/STAT gene expression analyzes were studied by polymerase chain reaction.

The mean age of the participants was 40.2 ± 15.7 years, 30 (69.7%) were between the ages of 18-50, and 13 (30.2%) were over 50 years old. 22 (51.1%) of the participants were female and 21 (48.8%) were male. When the antibody status of the participants is examined; Antibody positivity was found against influenza A in 34 people (79%) before vaccination, according to the positive cutoff value of the ELISA kit. After vaccination, an increase in antibodies against at least one of influenza A or B was detected in 29 (67.4%) individuals. Of these 29 individuals, in 26 patients (89.7%) STAT2, in 19 patients (65.5%) JAK2, and in 18 patients (62.1%) IL-6 up-

regulation were detected. In the comparison of the average of gene expressions of those who have increased antibodies to at least one of influenza A or B, compared to those who do not; STAT2 was 32.24 versus 28.78, respectively ($p=0.031$). Whereas JAK2 was 6.31 versus 1.57 respectively ($p=0.046$). Seventeen (89.5%) of 29 subjects with increased antibodies against influenza A or B, with JAK2 up-regulation, were between the ages of 18-50 ($p=0.03$). Seventeen (94.4%) of these individuals with IL-6 up-regulation were between the ages of 18-50 ($p=0.006$).

There is a significant relationship between vaccine antibody response and intracellular signaling pathways. Evaluation of these and other similar pathways at the level of gene expression may reveal differences in response to vaccines. With increasing age, vaccine antibody response decreases significantly in older individuals. In order to increase the vaccine antibody response in elderly individuals, studies can be conducted to develop adjuvants that activate these pathways. This study was conducted in a limited population and in a single center. Studies examining these results in a larger population, in more centers, and at more gene levels are needed.

Keywords: Influenza vaccine, Vaccine antibody response, Intracellular signaling pathways

1. GİRİŞ

Grip (influenza), influenza virüslerinin neden olduğu, akut, ciddi ve salgınlara yol açabilen bir infeksiyon hastalığıdır. Üç tip (A, B ve C) influenza virüsü tanımlanmış olup, influenza A bu tipler içerisinde en ağır seyirli olanıdır (1).

İnfluenza virüs infeksiyonları sonucunda pandemi ve epidemiler meydana gelmesi nedeniyle dünya çapında öneme sahiptir. İnfluenza epidemileri sırasında hastalık ile ilişkili morbidite ve mortalitede önemli bir artış olmaktadır. Her yıl dünya genelinde yaklaşık 1 milyar vaka sayısı, 3-5 milyon vakada ağır hastalık, 290.000-650.000 influenza ilişkili ölüm görülmektedir (2). Hastalığa bağlı harcamalar nedeniyle Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık yaklaşık 11.2 milyar \$ ekonomik kayıp olmaktadır (3). Okul çağındaki çocuklarda influenzaya bağlı okul günü kayıpları ve ailerinde iş gücü kaybı nedeniyle önemli tıbbi ve sosyoekonomik yükü bulunmaktadır (4).

Hastalık, özellikle ileri yaş bireyler, küçük çocuklar, gebeler, kronik hastalığı olanlarda (kardiyak, solunumsal, renal, hepatik, diyabet, obezite, uzun süreli aspirin kullanımı olan çocuk ve adolesanlar) ve immün yetmezliği olanlarda ağır seyretmekte ve bu gruplarda influenzaya bağlı ölüm oranları daha yüksektir (5).

Hastalıktan korunmada en etkili yol influenzaya karşı bağışıklamadır (6,7). İnflenzaya karşı koruyucu etkili aşı 1940 yılında geliştirilmiştir (6). Aşı, her yıl milyonlarca hastalığı ve influenzaya bağlı hastane başvurularını azaltmaktadır. 2019-2020 sezonunda aşı nedeniyle yaklaşık 7.5 milyon vakanın, 3.7 milyon hastane başvurusunun, 105.000 hastane yatışının ve 6.300 ölümün önlendiği düşünülmektedir (8). Aşı içeriğinde yer alan virüslerin dolaşımdaki virüslerle benzediği dönemlerde influenzaya bağlı hastane başvurularının %40-60 oranında azaldığı gösterilmiştir (9).

Virüs yüzeyinde yer alan glikoproteinlerdeki değişikliklerle meydana gelen antijenik drift ve shiftler nedeniyle aşı yıllık olarak önerilmektedir (10).

Aşının etkinliği, dolaşımdaki virüsle aşı içeriğindeki virüsün eşleşmesinin yanı sıra aşılana bireyin özelliklerine de bağlıdır. Aşıya karşı gelişen antikor yanıtı yaş, cinsiyet, altta yatan kronik hastalıklar (immün yetmezlik durumları, diyabet, kronik

böbrek hasarı, kronik karaciğer yetmezliği), kullanılan ilaçlar, beslenme durumu, obezite ve genetik faktörlerden etkilenmektedir (10–13).

Aşılardan sonra gelişen hem humoral hem de hücreyel yanıtın üzerinde genetik kontrolün etkisi henüz çok iyi bilinmemektedir. Virüsler ve aşilar aracılığıyla doğal bağışık yanıtta yer alan hücreler ve kazanılmış bağışıklık yanıtını sağlayan T ve B lenfositler uyarılmaktadır. Hücre içi sinyal yolakları doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtı arasında köprü işlevi görmektedir. İnfluenza virüs infeksiyonu sırasında NFκB, IL-6, JAK/STAT yolaklarının viral klirenste önemi bilinmektedir (14–16). Bu çalışmanın amacı influenza aşısına karşı gelişen antikor yanıtı ile gen ekspresyon yolaklarının (NFκB, IL-6, JAK/STAT) ilişkisinin araştırılması ve aşının koruyucu etkisinin artırılabilmesi amacıyla yeni çalışmalara yol gösterici olabilmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

‘İnfluenza’ kelimesi, İtalyanca ‘ yıldızlardan gelen gizli bir güç’ anlamına gelen bir kelimedenden türemiştir. Hastalığın en bilinen ismi ‘grip’ kelimesi Galya yerlilerinin dilinde bulaşmak anlamına gelen ‘ gripa’ kelimesinden köken almaktadır.

Grip salgını kayıtlara ilk defa Hipokrat döneminde geçirilmiştir (17). 1580 yılında görülen grip salgının tarihi kayıtlara geçen ilk pandemi olduğu düşünülmektedir (18).

1918-1919 yılları arasında görülen en büyük pandemide dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin H1N1 virüs ile infekte olduğu ve yaklaşık 50-100 milyon kişinin öldüğü düşünülmektedir (19,20). Bu salgın, 1918’de I. Dünya Savaşı sırasında Amerika Birleşik Devletleri askeri personelinde başlamış ve askeri kampların sürekli yer değiştirmesi nedeniyle pandemi haline gelmiştir. O dönem savaşa katılmayan İspanya’da savaş sansürü bulunmaması nedeniyle medyada yer almış ve bu nedenle İspanyol gribi olarak adlandırılmıştır. Osmanlı Devleti de dahil tüm dünyayı etkileyen bu salgının daha öncekilerden farkı, sağlıklı genç erişkinleri etkilemesi ve bu grupta yüksek ölüm oranları olmuştur (19,20).

1957-1958 yıllarında H2N2 virüsü Doğu Asya’da çıkmış ve Asya Gribi olarak adlandırılan yeni bir pandemiyi tetiklemiştir. Tahmini ölüm sayısı ABD’de 116.000, dünya çapında 1.1 milyon kişi olmuştur (21).

1968 yılında H3N2 kuş gribi virüsü ile yeni bir pandemi meydana gelmiştir. İlk olarak Hong Kong’da tespit edilen Hong Kong gribi olarak da adlandırılan bu pandemide tahmini ölüm sayısı ABD’de 100.000 ve dünya genelinde 1 milyon olmuştur. Ölüm, en çok 65 yaş üstü popülasyonda meydana gelmiş olup antijenik driftler nedeniyle H3N2 virüsü, mevsimsel influenza A virüsü olarak dünya çapında dolaşmaya ve ileri yaş grubunda ciddi hastalık oluşturmaya devam etmektedir (22,23).

İnsanlarda ilk defa 1997 yılında Hong Kong’da tanımlanan avian influenza (HPAI)A(H5N1) kuş gribi virüsü, esas olarak kuşlarda görülür ve kümes hayvanları için ölümcüldür (24). Tespit edildiği dönemden itibaren Afrika, Asya, Avrupa ve Orta

Doğu'da 50'den fazla ülkede kümes hayvanlarında salgın sırasında tespit edilmiştir. Bangladeş, Çin, Mısır, Hindistan, Endonezya ve Vietnam'ın içinde bulunduğu altı ülkede endemik kabul edilmektedir. 2003 yılında yeniden ortaya çıkmıştır. İnfekte kuşlarla uzun süreli ve yakın temas nedeniyle insanlara bulaş olmaktadır. İnsandan insana bulaş nadirdir (25). 2003-2006 yılları arasındaki salgında tüm dünyada 100 milyon üzerinde kümes hayvanı ölmüş ya da itlaf edilmiştir.

24 Nisan 2009'da yeni bir influenza A (H1N1) domuz gribi virüsü ortaya çıkmıştır. Virüs ilk olarak ABD'de saptanmış ve hızla tüm dünyaya yayılmıştır. Pandemiye yol açması nedeniyle influenza A(H1N1)pdm09 olarak adlandırılmıştır. Daha önce dolaşımda bulunan H1N1 virüsünden çok farklı olması nedeniyle, mevcut influenza aşılı çok az çapraz koruma sağlamıştır (26,27). Pandeminin devam ettiği bir yıl boyunca ABD'de yaklaşık 60.8 milyon vaka, 274.304 hastane yatışı ve 12.469 ölüm olduğu tahmin edilmiştir. Ek olarak, dünya genelinde yaklaşık 575 bin kişinin (H1N1)pdm09 virüsü nedeniyle öldüğü tahmin edilmiştir. 10 Ağustos 2010'da pandeminin sona erdiği bildirilmiştir. Ancak, influenza A(H1N1)pdm09 virüsü mevsimsel grip virüsü olarak dolaşımda görülmeye devam etmektedir (28).

İnfluenza A virüsü ilk defa 1933 yılında Smith ve arkadaşları tarafından gelinciklerden izole edilmiştir (29). İnfluenza B virüsü Francis tarafından 1939 yılında (30) ve influenza C virüsü Taylor tarafından 1950 yılında izole edilmiştir (31). 1941 yılında, Hirst tarafından virüsün ve spesifik antikorun ölçümü için basit ve ucuz bir yöntem olan hemagglütinasyon fenomeni bulunmuştur (32).

2.2. VİRÜS ÖZELLİKLERİ

2.2.1. Sınıflandırma

İnfluenza virüsleri, *Orthomyxoviridae* ailesinde yer alan zarflı RNA virüsleridir. Zarf yapısındaki nükleokapsid ve matriks proteinlerine göre influenza A, influenza B ve influenza C olmak üzere insanlarda hastalık etkeni olan üç antijenik tipi vardır (33).

Üç influenza türü arasında genetik organizasyon, yapı, konakçı aralığı, epidemiyoloji ve klinik özellikler bakımından önemli farklılıklar bulunmaktadır (Tablo 1). İnfluenza virüsleri için standart adlandırmada influenza tipi, ilk izole edildiği bölge, suş düzeni ve izolasyon yılı sırasıyla yazılır. Örneğin influenza A virüsü suş

A/Puerto Rico/8/34 olarak adlandırılır. İnfluenza virüsleri HA ve NA antijenlerine göre (H1N1 vb.) de adlandırılır (1).

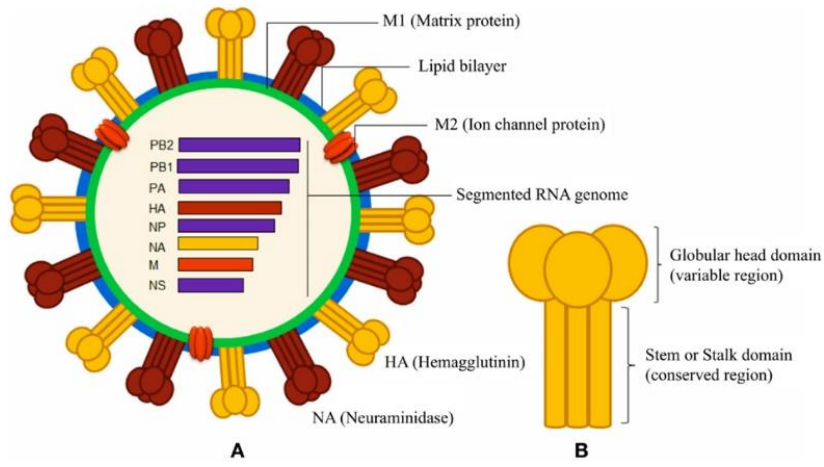
Tablo 1: İnfluenza A, B ve C virüslerinin farklı özellikleri(1)

	İnfluenza A	İnfluenza B	İnfluenza C
Gen segment sayısı	8	8	7
Protein sayı ve yapısı	10 M2	11 NB	9 HEF
Doğal konakçı	İnsan, domuz, at, kuşlar, deniz memelileri	İnsan	İnsan ve domuz
Epidemiyoloji	Antijenik şift ve drift	Yalnızca antijenik drift	Yalnızca antijenik drift
Klinik	Genç nüfusta yüksek mortaliteye neden olan büyük pandemiler	Genellikle yaşlılarda ve yüksek risklilerde ağır hastalık. Pandemiler görülmez	Mevsimsel olmayan hafif hastalık durumu

2.2.2. Yapısı

İnfluenza virüsleri, 80-120 nm çapında, zarflı, negatif polariteli, segmentli tek sarmallı RNA içeren; helikal yapıda virüslerdir. Virüsün RNA segmentleri nükleoprotein (NP) molekülleriyle çevrelenerek ribonükleoprotein yapısı meydana gelmektedir. Bu yapının ciral polimeraz proteinleri olan PB1, PB2 ve PA ile birleşmesi ile nükleokapsid yapısı oluşmaktadır. Nükleokapsid tabakanın iç katmanı M proteini M1 ve M2 bileşenlerini içermektedir. M2 proteinleri, HA ve NA ile birlikte yüzey yapılarını oluşturur (Şekil 1). Virüsün konak hücreye tutunmasını sağlayan HA,

virüsün majör antijenik yapısı olup antijenik çeşitliliğin en çok görüldüğü proteindir. Hemaglütinini inhibe eden ve solunum yollarında bulunan müsin, NA tarafından parçalanır. NA, virüsün hücreden çıkışında da rol alır. İnfluenza A viruslarında antijenik yapısı farklı 16 tip HA, 9 tip NA bulunmaktadır. Zarf yapısında yer alan matriks protein (M1) virion yapısının sağlanmasında önemli rol oynar. Mebran proteini (M2) iyon kanalı görevi görür ve antiviral ajanlardan olan adamantanların tutunma hedefidir. PB2, PB1, PA polimerazlar, viral mRNA transkripsiyonunda görev alır. PB2, baloxavir marboxil için bir hedeftir (33–35).



Şekil 1: influenza virüs yapısı (1)

2.2.3. Replikasyon

Hemaglütininin konak hücre yüzeyindeki sialik asit içeren reseptöre tutunur ve bir endozom içinde hücre içine alınır. M2 protein iyon kanalları, virion içine H⁺ iyonu geçişine neden olur ve virüsün zarftan ayrılarak sitoplazmaya geçişini sağlar (12). Viral genom polimeraz proteinlerden oluşan bir kompleksle birlikte nükleusa taşınır. RNA bağımlı RNA polimeraz ile replikasyon sağlanır. Sitoplazmaya salınımı sonrası hücre zarına ulaşan virion, konak hücre zarından HA, NA ve az miktarda M2 proteinini alarak zarf yapısını kazanır. NA zarf yapısında bulunan sialik asidi uzaklaştırarak virüsün infekte hücreden ayrılmasını sağlar (1,33,34).

2.2.4. Antijenik Varyasyon

2.2.4.1. Antijenik Drift

HA ve/veya NA yapısındaki minör antijenik değişiklikler nedeniyle meydana gelir ve yeni suşlar ortaya çıkar. Daha önce dolaşımında veya aşıda bulunan suşlara karşı gelişen antikolar yeni virüslere karşı koruma sağlamaz. Her yıl veya birkaç yılda bir meydana gelir. Bu durum epidemilere neden olmaktadır (1,33).

2.2.4.2. Antijenik Şift

HA ve/veya NA antijen yapısında öngürülemeyen aralıklarla meydana gelen majör değişiklikler nedeniyle yaygın hastalık ya da pandemiler meydana gelmektedir. Bu değişiklikler sadece influenza A virüste görülmekte ve yeni bir HxNx varyantı ortaya çıkmaktadır (1,33).

2.3. EPİDEMİYOLOJİ

Dünya genelinde her yıl yaklaşık 1 milyar vaka sayısı, 3-5 milyon vakada ağır hastalık, 290.000-650. 000 influenza ilişkili ölüm olduğu tahmin edilmektedir (2). İnfluenza epidemileri nedeniyle iş gücü ve üretim kaybı olmakta, okul devamsızlığı yaşanmaktadır. Toplum sağlığını önemli derecede etkilemesi nedeniyle, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 1952 yılından itibaren izlenmektedir. Çocuk yaş grubunda hastalığa yakalanma oranı, ileri yaş ve özel risk gruplarında ise influenzaya bağlı pnömoni komplikasyon sıklığı daha yüksektir (U şeklinde dalga) (1).

İnfluenza epidemilerinden sıklıkla influenza A(H3N2) sorumludur.

Yıllık olağan influenza aktivitesi sonbahar ve kış aylarında görülür (36). Epidemisi süresi beş-sekiz haftadır. İlk 3 hafta içinde tepe düzeye ulaşır. Epideminin ilk göstergesi çocuklarda solunum yolu infeksiyonu nedeniyle okul devamsızlıklarının artmasıdır. Erişkinlerde aynı nedenle işe gelememe görülür. Pnömoni olgularında ve pnömoniye bağlı ölümlerde artma daha geç saptanan bulgulardır (1).

1 Ocak 2019 ve 4 Nisan 2020 tarihleri arasında yaklaşık 56 milyon vaka sayısı, yaklaşık 740 bin yatış, yaklaşık 62 bin ölüm ve 195 pediatrik ölüm bildirilmiştir (37). 2020-2021 grip sezonunda bir önceki yıla göre vaka sayılarında ve mortalitede büyük oranda azalma olmasında, ülkeler tarafından SARS-CoV-2 virüs bulaşını azaltmak için uygulanan çeşitli hijyen ve fiziksel mesafe önlemleri rol oynamış olabilir (38).

2020-2021 grip sezonunda influenza A ve influenza B/Yamagata Lineage sıklıkla etken olarak saptanmıştır (38).

Ülkemizde de influenza hastalığının takibine yönelik sentinel sürveyans çalışması “ İnfluenza (Grip) Benzeri Hastalık Sürveyansı” ve “Sentinel Ağır Akut Solunum Yolu Enfeksiyonları (SARI) Sürveyansı” şeklinde yürütülmektedir (39). 2019-2020 grip sezonunda ülkemiz sürveyans raporu bilgilerine göre en sık görülen etkenler influenza A (H1N1) ve influenza B virüs olmuştur(40).

2.3. PATOGENEZ

İnfluenza virüsü, infekte bireyle doğrudan temas, kirlenmiş nesnelere temas ve virüs yüklü aerosollerin inhalasyonu yoluyla bulaşır (41).

İnfluenza virüsünün patojenitesi, viral proteinlerin işlevi ile doğal ve kazanılmış bağışıklık dahil olmak üzere konakçı immun yanıtına bağlıdır (42).

Virüs, sialik asit (SA) içeren solunum yolu ve alveolar epitel hücrelerini hedefler. Hemaglütinin konak hücre yüzeyindeki sialik asit içeren reseptöre tutunur ve bir endozom içinde hücre içine alınır. M2 protein iyon kanalları, virion içine H⁺ iyonu geçişine neden olur ve virüsün zarftan ayrılarak sitoplazmaya geçişini sağlar (12). Viral genom polimeraz proteinlerden oluşan bir kompleksle birlikte nükleusa taşınır. RNA bağımlı RNA polimeraz ile 4-6 saat içinde replikasyon sağlanır. Viral replikasyon inokulasyondan yaklaşık 48 saat sonra en yoğunudur. Viral replikasyonun yoğunluğu hastalık patogenezinde en önemli mekanizmadır. Virüs, bu hücrelerde nekroza yol açar. Sitoplazmaya salınımı sonrası hücre zarına ulaşan virion, konak hücre zarından HA, NA ve az miktarda M2 proteinini alarak zarf yapısını kazanır. NA zarf yapısında bulunan sialik asidi uzaklaştırarak virüsün infekte hücreden ayrılmasını sağlar (1,34).

Viral enfeksiyona immun reaksiyon sonucunda TNF- α , IL-6, IL-1 gibi proinflatuar sitokinlerin salınımı ve interferon (IFN) yanıtıyla sistemik semptomlar olan ateş, baş ağrısı ve miyalji gelişir (43).

Grip semptomları başlamadan 1 gün önce ve 5-7 gün sonrasına kadar bulaştırıcılık devam eder. Semptomların başlamasından sonraki 3-4 gün bulaştırıcılığın en yüksek olduğu dönemdir. Çocuklar ve bağışıklığı baskılı bireylerde

bulaştırıcılık 7 günden uzun sürebilir (41). Sağlıklı bireylerde, hastalık genellikle kendisini sınırlamaktadır.

İnfluenza A ve B infeksiyonları apoptoz yolu ile konakçı hücrenin ölümüne neden olur (44). Bronş epitel hücrelerinde nekroz ve siliyer aktivitenin bozulması, nötrofil ve makrofajların kemotaksis ve fagositoz fonksiyonlarının bozulması bakteriyel infeksiyon gelişimine zemin hazırlar. Kronik akciğer hastalığı, kardiyak hastalık, gebelik gibi komplikasyon gelişme ihtimali yüksek olan grupta primer viral pnömoni, sekonder bakteriyel pnömoni, hemorajik bronşit ve ölüm riski artar. Bu ciddi komplikasyonlar semptom başlangıcından yaklaşık 48 saat sonra gelişir (43).

Alveolar epitel hasarı ve gaz değişiminin bozulması sonucu akut solunum yetmezliği sendromu (ARDS) ve ölüme neden olur (45,46).

2.4. HİSTOPATOLOJİ

Akut influenzada larinks, trakea ve bronşlarda yaygın inflamasyon ve mukozal ödem görülür (47–49). Akut aşamada, trakea ve bronşların yalancı çok katlı kolumnar epitelinin multifokal yıkımı ve deskuamasyonu karakteristiktir. Genellikle epitelin sadece bazal tabakası kalır. Submukozada ödem ve tıkanıklık genellikle belirgindir. Ciddi vakalarda nekrotizan trakeobronşit, bronş mukozasında ülserasyon, yaygın hemoraji, aselüler hyalen membran oluşumu ve PMN' den fakir inflamasyon görülür (49).

2.4.1. Trakea ve Bronş Yalancı Çok Katlı Kolumnar Epitelindeki Değişiklikler

Erken aşamadaki değişiklikler üst solunum yolu epitelinin vakuolizasyon ve büzülmesiyle sitonekrozu içerir. Deskuamasyon sonrası bu hücreler luminal boşluğa dökülür. Nekrotik hücreler makrofajlar tarafından fagosite edilir. Bu yapısal değişiklikler düzensiz dağılım göstermekte olup epitel yer yer histolojik olarak normal görünümündedir. Son aşamada, epitelin deskuamasyona uğradığı alanlarda bazal membranı kaplayan incelmış bir bazal epitel tabakası görülmektedir. İnfeksiyonun erken aşamasında nötrofiller görülmemekte olup epitel hücre nekrozu meydana gelirse nötrofil göçü olmaktadır. Geç evrelerde bronş duvarının mononükleer hücreler tarafından infiltrasyonu görülür (50,51).

2.4.2. Mukus Bezlerindeki Değişiklikler

Trakeal ve bronşiyal mukus bezi epitel hücrelerinde sitonekroz ve deskuamasyon meydana gelir.

2.4.3. Bronşiyal Epiteldeki Değişiklikler

Küçük hava yollarındaki değişiklikler büyük hava yollarına benzerdir. Erken aşamada, epitel eritemlidir. Geç aşamada, epitel nekrozu meydana gelir. Epitel tabakasının kaybı sonrası bu bölgelerde hyalen membran oluşumu görülür. Bronş lümeninde nötrofilik eksuda bulunabilir. Fokal epitel nekrozu alanlarında bronşiyol duvarında nekroz, peribronşiyal hemoraji ve preibronşiyal pnömoni görülmektedir (50,51).

2.4.4. Diğer Histolojik Değişiklikler

Üst solunum yolu epitelinin influenza virüsle infeksiyonu sonucu vasküler konjesyon, hiperemi, ödem ve tunika propria ile submukozanın inflamatuvar hücrelerle infiltrasyonu görülür. Nötrofilik infiltrasyon sekonder bakteriyel infeksiyon durumunda görülmekte olup lenfosit, histiyosit ve plazma hücresinden zengin mononükleer hücreli infiltrasyon tunika propria ve submukozada görülür (51). Epitel rejenerasyonunun yaklaşık beş gün sonra başladığı görülmekte olup kronik süreçte skuamoz metaplazi ve interstisyel fibrozis gelişmektedir (52).

2.4.5. İnfluenza Virüs Pnömonisi

Şiddetli influenza virüs pnömilerinde tipik olarak kapiller ve küçük ven trombozu, interstisyel ödem ve inflamatuvar infiltrasyon, alveollerde hyalen membran birikimi, intraalveolar ödem ve/veya hemoraji, nekrotizan bronşit ve bronşiolite ek olarak diffüz alveolar hasar görülmektedir. Sonraki evrelerde diffüz alveolar hasar, fibrozis, epitelyal rejenerasyon ve skuamoz metaplazi görülmektedir (51).

Bronş ve bronşiyol epitellerinde olduğu gibi alveolar epitel hücreleri de influenza virüslerinin hedefidir. İnfeksiyonun erken döneminde alveollerde üç karakteristik değişiklik görülmektedir: kapiller tromboz, alveol duvarında fokal nekroz ve hyalen membran oluşumu (51).

Hücrelerde sitoplazmik vakuolizasyon ve nükleer piknozis görülür. Alveol boşluklarında makrofajlar tarafından fagosite edilmiş epitel hücresi görülür.

İnfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde alveolar hücreler tamamen kaybolur ve geç dönemde tip II alveolar hiperplazi görülür (50,51).

2.6. VİRÜSE KARŞI GELİŞEN YANIT

Virüsün vücutta çoğalmasını kısıtlayan en önemli faktör, kişinin korunma mekanizmalarıdır.

Viral infeksiyonlarda immün yanıt, mikroorganizmalar arasında ayırım yapmadan çalışan nonspesifik doğal bağışıklık ve etkenin moleküllerini tanıma sonrası ona özel gelişen ve bu etkenle her karşılaşmada güçlenen spesifik kazanılmış bağışıklık yanıtından oluşur (53).

2.6.1. Konak İmmün Yanıtı

İnfeksiyon sırasında, ilk savunma hattı konak doğal bağışıklık yanıtı tarafından sağlanır (54).

Fiziksel bariyerler (mukus, kollektinler), fagositer hücreler, sitokinler, interferonlar (IFN) ve IFN'ları indükleyen genler doğal bağışıklık yanıtını oluşturur. Kazanılmış bağışıklık yanıtı, etkenin yakalanmasını ve nötralizasyonunu sağlayan antijene özgü bellek hücreleriyle karakterize B ve T hücreleri aracılığıyla sağlanmaktadır. Humoral immün yanıt, influenza virüsü nötralize eden hemaglutininin spesifik antikorlar aracılığıyla sağlanmaktadır. Ayrıca infekte hücrelerin yüzeyindeki antikorlar, antikor bağımlı hücresel aracılıklı sitotoksiste (ADCC) ile kompleman sistemini aktive etmektedir. Virüse karşı nötralizan antikorlar savaşmakla birlikte, hücresel immünite ilk aşamada oldukça önemlidir (53).

İnfluenza virüs infeksiyonu sırasında yaklaşık 30 bin insan geni aktive olur. Bu genlerden en bilineni çift-sarmallı viral RNA (dsRNA), viral replikasyon için gerekli olup hücre içi sinyal yollarını tetikler (55). DsRNA tip I interferon (IFN) yanıtı ve İκB kinaz-nükleer-faktör-κB (IKK-NF) yolağı, c-Jun N-terminal kinaz (JNK), p38 MAP kinaz (MAPK) kaskadını içeren antiviral sitokinlerin ekspresyonunu aktive eder (56).

Doğal bağışıklık tepkisi, viral infeksiyona yanıtta hızlı olan ancak spesifik olmayan mekanizmadır. İnfeksiyon sırasında virüse ait patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP's), konak hücresinde retinoik asitle indüklenebilir gen-I proteini

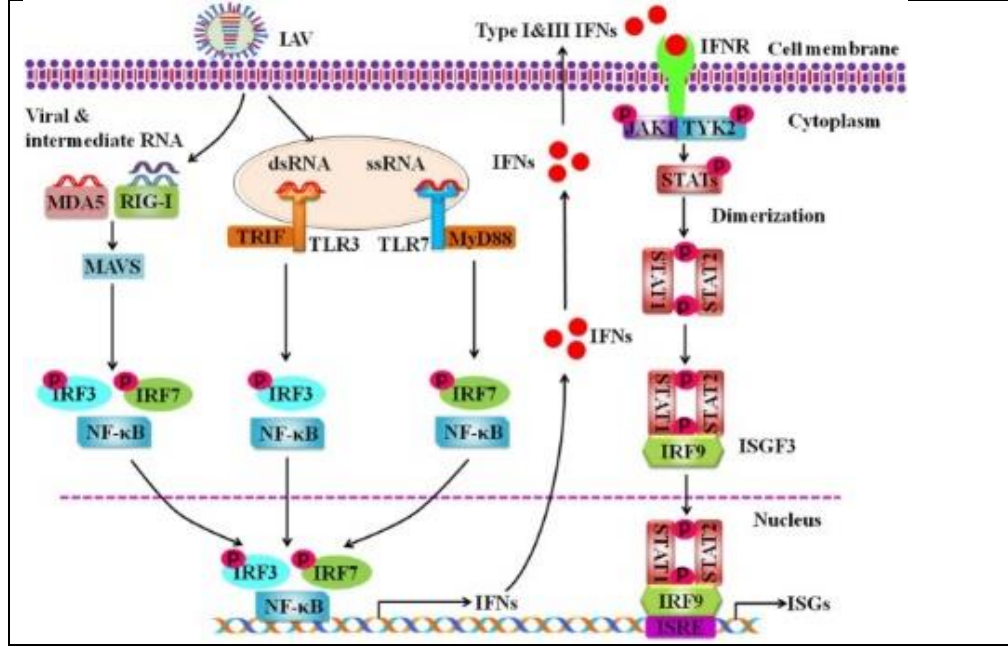
(RIG-I) ve toll like reseptör (TLR) tarafından tanınır, sitokinlerin ve antiviral moleküllerin üretimine neden olan sinyal aktivasyonuna yol açar (53,57). PAMP'ların tanınmasının ardından RIG-I etkinleştirilir ve kaspaz aktivasyonu meydana gelir. Hücre içinde interferon düzenleyici faktör 3 (IRF3), IRF7 ve nükleer faktör kappa hafif zincir (NF-κB) aktive olur ve çeşitli IFN'lar ve sitokin salınımı meydana gelir (58). Virüsün yapısal olmayan proteini-1 (NS-1)'in önemli bir in-vivo işlevi, antiviral tip-I IFN sistemini antagonize etmektir (59). NS1, transkripsiyon aktivatörleri [NF-κB, IRF3 and activating transcription factor 2 (ATF-2)/c-Jun] tarafından kontrol edilen (IFNβ1)'i kodlayan genin aktivasyonunu inhibe eder. (60–62).

Bununla birlikte, 20 yıldan daha uzun bir süre önce, influenza virüsü suşlarının IFNα ve IFN'yi indüklemeye kabiliyetlerinde farklılık gösterdiği ve bunun NS1 aktivitelerinden ziyade bireysel nöraminidaz aktiviteleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (63). Bir başka çalışmada, nöraminidazın, TGF-β'ya bağlı apoptozu indüklemek için, dönüştürücü büyüme faktörü-β'yı (TGFβ) latentten aktif forma dönüştürdüğü bulunmuştur (64). Diğer viral yüzey kaplama proteini, hemaglutinin, aynı zamanda hücrenin hem içinden hem de dışından sinyal yollarını uyarır: rekombinant hemaglutininin hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması, protein kinaz C (PKC) sinyalinin hızlı bir indüksiyonuna yol açarken, hücre içinde hemaglutininin aşırı ekspresyonu NF-κB aktivasyonuna yol açar (65–67).

İnfluenza virüsü enfeksiyonu sırasında NF-κB, IRF3 ve IRF7 gibi spesifik transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu sonucunda, nükleusta IFN ve proinflatuar sitokinleri (TNF, IL6, IL1β) kodlayan genlerde transkripsiyon meydana gelir (68). Sistemik semptomlar, tip I IFN, TNF ve interleükinler gibi potent sitokinlerin salınımıyla ilişkilendirilmiştir (69). Enfeksiyona karşı gelişen aşırı ve düzensiz sitokin yanıtının, H5N1 kliniğinde daha yüksek oranda görülen mortalite ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (70).

Virüs ile enfekte olan ve olmayan hücrelerde antiviral yanıtta tip I IFN (IFN-α, IFN-β) ve tip III IFN'lar önemli rol alır. Tip III IFN'lar Janus kinaz (JAK-STAT) sinyal yolağını aktive eder. Fosforillenen STAT1 ve STAT2, IRF9 ile IFN stimüle edici gen faktör 3 (ISGF3) kompleksini oluşturur. ISGF3 çok sayıda IFN gen transkripsiyonunu tetikler (Şekil 2) (68).

Çok işlevli bir protein olan yapısal olmayan protein-1 (NS1), tip I IFN üretimini ve sinyal yolağını baskılar (71) ayrıca kaspaz bağımlı bir mekanizma yoluyla solunum yolu epitel hücrelerinin apoptozunu tetikleyebilir (72).



Şekil 2: İnfluenza A virüs infeksiyonuna karşı doğal immün yanıt (53)

2.6.1.1. Sistemik Antikor Yanıtı

Viral infeksiyona karşı konak immün yanıtı ve viral patogenezele ilişkili influenza virüs tarafından kodlanan bazı önemli proteinler bulunmaktadır. Viral protein yapısında bulunan aminoasitlerdeki değişiklikler, bağışık yanıtı kaçışı sağlamakta ve hastalığın şiddetini belirlemektedir. Örneğin hemaglütinin, virüs yüzeyinde en çok bulunan glikoprotein olup konak hücreye bağlanma, hücresel füzyon ve hücreye girişten sorumludur. Ek olarak HA, B hücreleri tarafından üretilecek olan nötralizan antikorların üretimini tetikleyecek epitop bölgeleri içermektedir. Viral mutasyon ve rekombinasyon mekanizmalarının asıl belirleyicisi HA'nın epitoplardır. HA'nın yüksek değişkenliği, virüsün konak immün sisteminden kaçmasına ve mevsimsel epidemilere neden olmaktadır. HA'dan daha az bulunan nöraminidaz, sialik asidi yıkmakta, hücreler içinde yeni oluşan virionların hücreden salınımını ve virüslerin yayılımını kolaylaştırmaktadır. NA ayrıca SA reseptörlerine bağlanarak viral infeksiyonda ve HA aracılı membran füzyonunda önemli rol oynamaktadır.

Çok fonksiyonlu bir protein olan, yapısal olmayan protein-1 (NS1), konak doğal bağışıklık yanıtının önemli bir inhibitörüdür. Tip 1 IFN üretimini ve sinyalini baskılar. Ek olarak influenza virüs infeksiyonu sırasında hava yolu epitel hücrelerinin apoptozunu tetikleyebilir. Matriks proteini 2 (M2), viral endositozu takiben, pH'ı sağlamaktan sorumlu tetramerik protein kanallarını viral zarf boyunca oluşturmakta ve viral replikasyonu başlatmak için viral ribonükleoproteinlerin sitoplazmadan nükleusa transportuna yardım etmektedir.

T ve B hücreleri, influenza virüs infeksiyonuna karşı adaptif bağışıklıkta anahtar rol alır. CD8 T hücreleri, viral replikasyonu kısıtlamak ve virüsle infekte hücreleri öldürmek için sitokin ve efektör moleküller üreten sitotoksik T lenfositlere farklılaşır (73). Sitotoksik T lenfositler, virüsle infekte hücreyi hedef alan perforin ve granzim gibi molekülleri salgılar. Perforin hücre zarındaki porları hedef alarak granzimin pasif difüzyonla hücre içine geçerek apoptozisi indüklemesini sağlar. CD4 T lenfositler virüsle infekte epitel hücrelerine MHC II yoluyla bağlanır. CD4 T lenfositler tarafından eksprese edilen CD40 ligand gibi stimülatör ligandlar B hücre aktivasyonuna ve antikor üretimine katkıda bulunur (74). Virüs ile karşılaşma sonrası ilk olarak hemaglutinin ve nöraminidaz işlevini inhibe eden nötralize edici antikorlar salgınır (75). Bu sebeple influenza virüse karşı geliştirilen aşılarda nötralize edici antikor yanıtını indüklemek için saflaştırılmış HA ve NA antijenlerini içerir. Anti-NA, anti-HA aktivitesinden farklı olarak virüsü nötralize edemez, virüsün infekte hücrelerden atılımını azaltır (76,77). Bu proteinlerdeki antijenik değişimler (drift ve shift mutasyonu) nedeniyle aşı içeriği her yıl güncellenmeli ve aşı yıllık olarak uygulanmalıdır (10).

İnfluenza virüs infeksiyonunda HA ve NA glikoprotein yapılarının yanısıra yapısal M ve NP proteinlerine karşı da antikor gelişir.

Virüsle karşılaşmadan 2 hafta sonra IgM, IgA ve IgG yapısındaki antikorlar serumda tespit edilmeye başlar ve düzeyleri 4-7 haftada en yüksek seviyeye ulaşır (78). Antikor düzeyleri, yavaş bir şekilde düşmekle birlikte virüsle tekrarlayan karşılaşmalardan bağımsız olarak belirli bir seviyede kalır (78).

2.7. KLİNİK BULGULAR

İnfluenza semptomları, bir-iki günlük kısa bir inkübasyon süresi sonrası ani bir şekilde başlar (79). Titreme ile yükselen ateş, baş ağrısı, miyalji, halsizlik, iştahsızlık ve fotofobi en sık görülen semptomlardır (79,80). Laterale bakmakla ortaya çıkan göz ağrısı tipik bir bulgudur (81). Ateş 38°C'nin üzerinde olup sistemik semptomlarla birlikte genellikle üç gün sürer. En rahatsız edici semptomlarından olan miyalji ve baş ağrısının şiddeti, ateşin derecesine göre değişir. Başlangıç döneminde görülen kuru öksürük, şiddetli boğaz ağrısı, burun tıkanıklığı ve burun akıntısı gibi solunumsal yakınmalar nedeniyle diğer solunum yolu infeksiyonlarına benzemekle birlikte, sistemik semptomlar influenza kliniğinde çok belirgindir.

İleri yaş grubu bireylerde tipik semptomlar olmaksızın ateş yüksekliği, halsizlik, bilinç bulanıklığı görülebilir (80).

Başlangıç döneminde bulantı, kusma görülebilir. İshal ve karın ağrısı influenza B'de daha sık görülür ve genellikle çocuk yaş grubunda ortaya çıkar. Akut laringotrakeobronşit (krup) tablosu çocuk yaş grubunda karşımıza çıkar.

Ateş yüksekliği en önemli fizik muayene bulgusudur. Hastalar toksik görünümde, konjunktivalar hiperemik, cilt sıcak ve nemlidir. Seröz vasıfta burun akıntısı görülür. Farenks mukozası hiperemik olup eksuda gözlenmez. Çocuk yaş grubunda daha belirgin olmak üzere servikal lenfadenopati saptanabilir.

Öksürük, halsizlik, bitkinlikle seyreden ve bir-iki hafta süren nekahat dönemi sonrası klinik iyileşme gözlenir (79).

2.7.1. İnfluenza Komplikasyonları

Hastalık, genellikle genç ve sağlıklı bireylerde komplikasyon gelişmeden atlatılır. Bazı altta yatan durumlar veya risk faktörü varlığında komplikasyon gelişmesi durumunda en sık akciğer sorunları görülmektedir.

Komplikasyon gelişme ihtimalini arttırdığı bilinen risk faktörleri:

- <2 yaş, ≥ 65 yaş
- Astım
- Nörolojik ve nörogelişim kusurları

- Kan hastalıkları (orak hücreli anemi gibi)
- Kronik akciğer hastalığı (kronik obstrüktif akciğer hastalığı [KOAH] ve kistik fibroz gibi)
- Endokrin bozukluklar (diabetes mellitus gibi)
- Kalp hastalığı (doğuştan kalp hastalığı, konjestif kalp yetmezliği ve koroner arter hastalığı gibi)
- Böbrek hastalıkları
- Karaciğer bozuklukları
- Metabolik bozukluklar (kalıtsal metabolik bozukluklar ve mitokondriyal bozukluklar gibi)
- Vücut kitle indeksi [BMI] ≥ 40
- Uzun süreli aspirin veya salisilat içeren ilaçlar kullanan < 19 yaş
- Hastalık (HIV/AIDS'li bireyler veya lösemi gibi bazı kanserler)
- İlaçlar (kanser kemoterapisi veya radyasyon alanlar, kronik kortikosteroid kullanımı, T hücre depleksiyonu yapan ajan kullanımı)
- Geçirilmiş serebrovasküler hastalık (SVH) öyküsü (5)

Gripten yüksek risk altındaki diğer insanlar:

- Gebeliğin özellikle ikinci ve üçüncü trimesterleri ve doğum sonrası ilk iki hafta
- Bakım evlerinde ve diğer uzun süreli bakım tesislerinde yaşayan bireyler
- Bazı ırk ve etnik azınlık gruplarından kişiler (Non-Hispanik siyahi bireyler, Hispanik veya Latin bireyler ve Amerika Kızılderilileri veya Alaska yerlileri) (5).

2.7.1.1. Pulmoner Komplikasyonlar

En sık görülen influenza komplikasyonu pnömoni olup influenzaya bağlı ölümlerin en önemli nedenidir (81). Primer viral pnömoni veya sekonder bakteriyel pnömoni şeklinde görülebilir. Viral pnömoniye bakteriyel pnömoni eşlik edebilir. Altta yatan kronik kalp veya akciğer hastalığı olanlarda daha sık görülür. Gebeliğin 3. trimesterinde pulmoner kapiller hipertansiyon nedeniyle risk artar.

Primer viral pnömonide ateş, öksürük, nefes darlığı ve siyanozda hızlı bir artış görülür. Akciğer görüntülemesinde konsolidasyon görülmemekle birlikte mortalitesi yüksektir.

Sekonder bakteriyel pnömoni, influenzayı takiben ateşin tekrar yükselmesi, sekretuar öksürük, akciğer grafisinde konsolidasyon ile karşımıza çıkar. En sık *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* etken olarak solunum kültürlerinden izole edilir.

2.7.1.2. Nonpulmoner Komplikasyonlar

Miyozit, miyoglobinüri ve kreatinin fosfokinaz (CPK) düzeylerinde artış, sıklıkla çocuk yaş grubunda ve genellikle influenza B' nin klinik seyirinde görülür. Nadiren miyokardit, perikardit ve kardiyak tamponad gelişebilir, trombosit agregasyonuna bağlı olarak miyokard infarktüsü tetiklenebilir. Guillain Barré sendromu, transvers miyelit, ensefalit, polinörit, parotit ve daha çok çocuklarda Reye sendromu komplikasyonları bildirilmiştir.

2.7.1.3. 65 Yaş ve Üzeri Bireyler

Artan yaşla birlikte bağışıklık sistemindeki değişiklikler nedeniyle bu grup bireylerde, genç ve sağlıklı yetişkinlere göre influenzaya bağlı ciddi komplikasyon gelişme riski artmaktadır. İnflüzanın şiddeti mevsimlere göre farklılık gösterse de hastalık yükü en fazla bu grupta görülmektedir. İnfluenza ilişkili hastane yatışlarının %50-70'inin, ölümlerin % 70-80'inin bu grupta olduğu tahmin edilmektedir (82).

2.7.1.4. Gebeler ve Doğum Sonrası İlk İki Hafta

İnfluenza, bu grupta gebe olmayan kadınlara göre daha ağır seyretmektedir. İmmun sistem, kalp ve akciğerdeki değişiklikler komplikasyonlara yatkınlığı ve hastaneye yatış ihtimalini artırır. Hastalık semptomlarından olan yüksek ateş, bebekte nöral tüp gelişim anomalilerine neden olabilir (83).

2.7.1.5. Astım

Altta yatan astım nedeniyle hava yolları ödemli ve hassas olabilir. Bu bireylerde influenza virüs akciğer ve hava yollarında daha kolay inflamasyon gelişimine neden olmaktadır. İnflüanzaya bağlı astım semptomları kötüleşebilir, astım atakları tetiklenebilir. Pnömoni ve akut solunumsal hastalıklar gelişebilir. Çocuk yaş grubunda, influenzaya bağlı hastane yatışının en önemli nedeni astımdır (78).

2.7.1.6. Kronik Kalp Hastalığı

Kalp yetmezliği, hipertansif kalp hastalığı, pulmoner kalp hastalığı, kalp kapak hastalığı, kardiyal aritmiler, konjenital kalp hastalıklarını içeren bu grupta influenzaya bağlı akut koroner sendrom gibi ciddi komplikasyon gelişme riski çok yüksektir (84). İnfluenzaya bağlı hastane yatışlarının en az yarısında altta yatan kronik kalp hastalığı bulunmaktadır. bu grupta influenzaya bağlı akut koroner sendrom gelişme riskinin 6-8 kat arttığı gösterilmiştir (85,86).

2.7.1.7. Diyabet

Tip 1, tip 2 ve gestasyonel diyabet varlığında, kan şekeri kontrol altında olsa da hastane yatışı, ölüm gibi influenzaya bağlı ciddi komplikasyon riski yüksektir. İnfluenza nedeniyle hastaneye yatırılan hastaların yaklaşık %30'unda diyabet mevcuttur. İnfluenza kan şekeri kontrolünü zorlaştırabilir.

2.8. TANI

2.8.1. Klinik Belirti ve Bulgular

İnfluenza tanısı, mevsimsel epidemiyolojik veriler eşliğinde klinik bulgular ile konulmaktadır. Bir bölgede influenza virüs tespit edildiğinde, akut grip benzeri semptomları olan hastaların çoğunda etken influenzadır. İnfluenza salgını sırasında klinik bulgular ile tanı konulmasının duyarlılığı yaklaşık %80-%90'dır (87). İnfluenza tanısının laboratuvar olarak doğrulandığı bu çalışmada, vakalarda en önemli klinik öngördürücü semptomlar öksürük ve ateş olarak bulunmuştur (87). İnfluenzanın ayırıcı tanısında diğer grip benzeri semptomlar yapan viral, bakteriyel, fungal ve protozoal etkenler yer alır. Bunlardan en sık karşılaşılan etkenler *Streptococcus pneumoniae*, *Mikoplazma pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, rhinovirus, respiratuar sinsityal virüs (RSV), adenovirüs, metapneumovirus ve parainfluenza virüs tip 1 ve 3'dür.

İnfluenza ayırıcı tanısında en çok nezle dikkati çekmektedir. Nezle semptomları gribe göre daha hafif olup burun akıntısı veya tıkanıklığı daha sık görülür. Ateş, üşüme-titreme, öksürük, miyalji, baş ağrısı ve halsizlik gripte daha yaygın görülen belirtilerdir (88,89).

2.8.1.1. İnfluenza Vaka Tanımı

İnfluenza Vaka Yönetim Algoritması Sağlık Bakanlığı www.grip.gov.tr internet sayfasında güncel olarak yayınlanmaktadır.

2.8.1.1.1. Klinik Tanımlama

2.8.1.1.1.1. İnfluenza Benzeri Hastalık (IBH/ILI)

Ateş, kırgınlık, baş ağrısı, miyalji semptomlarından en az birine ek olarak öksürük, solunum sıkıntısı, boğaz ağrısından en az birinin olması (89)

2.8.1.1.1.2. Akut Solunum Yolu İnfeksiyonu (ARI)

Ani başlangıçlı öksürük, boğaz ağrısı, solunum sıkıntısı, burun akıntısından birinin olması ve bu durumun infeksiyona bağlı olduğunun düşünülmesi (89)

2.8.1.1.1.3. Ağır Akut Solunum Yolu İnfeksiyonu(SARI)

≥12 yaş, 10 gün içinde gelişen akut solunum yolu infeksiyonu (ARI-Akut Respiratory Infection) olan bir hastada: ateş, öksürük, hastaneye yatış gerekliliğinin olması

5-12 yaş: son yedi gün içerisinde gelişen ve hastane yatışına neden olan, ateş ve öksürük veya boğaz ağrısı, nefes darlığı, solunum güçlüğü

2 ay-5 yaş: öksürük, nefes darlığıyla birlikte solunum sayısının 1-5 yaş arasında 40/dk'nın üzerinde olması, 2-12 ay arasında 50/dk'nın üzerinde olması veya öksürük, solunum güçlüğü ile birlikte göğüste çekilme, retraksiyon, stridor, oral alamama, kusma, konvülsiyon, letarji, bilinç değişikliği olmasıdır (89).

2.8.1.1.2. Epidemiyolojik Kriterler

İnsandan insana bulaş: Laboratuvar tarafından doğrulanmış bir vaka ile temas

2.8.1.1.3. Laboratuvar Kriterleri

Klinik numunelerden influenza virüs izolasyonu, influenza virüs nükleik asit yapısının PCR ile saptanması, direkt floresan antikor (DFA) ile influenza virüs yapısına ait antijeninin gösterilmesi veya influenzaya özgü antikor yanıtının gösterilmesi.

2.8.1.1.4. Vaka Sınıflaması

Şüpheli Vaka: Klinik tanımlama ile uyumlu vaka

Olası Vaka: Klinik tanımlamaya ek olarak epidemiyolojik kriteri sağlayan vaka

Kesin Vaka:

- Klinik tanımlama ile uyumlu ve laboratuvar kriterlerinden en az biriyle doğrulanmış vaka

- Laboratuvar kriterlerinden biri ile doğrulanmış olası vaka (89).

2.8.2. Laboratuvar Tanı

İnfluenza infeksiyonunun kesin tanısı için mikrobiyolojik inceleme gerekmektedir. Solunum yolu örneklerinden hücre kültürü, moleküler teknikler (nükleik asit amplifikasyon testleri) veya antijen arama testleri kullanılarak virüsün gösterilmesi ile tanı konulabilir (90). Nükleik asit amplifikasyon testleri ve hücre kültürü “altın standart” olarak kabul edilmektedir (90). Tanıda en duyarlı testler nükleik asit amplifikasyon testleri (RTPCR)’dir (90). İnfluenza A izole edilen örneklerde alt tiplendirme yapılmalıdır (89).

2.8.2.1. Laboratuvar Testleri

2.8.2.1.1. Virüs izolasyonu

Virüs izolasyonu tanıda “altın standart” olarak kabul edilmektedir (90). Kültür üç günde sonuçlanmaktadır (91). Aşıda kullanılacak virüslerin belirlenmesini sağlar. Numune taşınmasında özel koşullara gereksinim duyulması ve üremenin zaman alması rutinde kullanımını sınırlandırmaktadır. İnfeksiyöz virüsle çalışılması biyogüvenlik riski taşımaktadır (89).

2.8.2.1.2. PCR Temelli Testler

Klinik laboratuvarlarda influenza infeksiyonunu tespit etmek için en sık kullanılan yöntemlerdir. Duyarlılıkları diğer testlere göre daha yüksektir (90). Ayrıca viriyonların canlılığını kaybettiği numunelerde tespiti izin verir. PCR yöntemi virüsün hızlı bir şekilde alt tiplenmesine izin verir. Bu nedenlerle, PCR temelli testler influenza tanı testinin altın standardı haline gelmiştir.

PCR testlerinin çalışma süresi yaklaşık 45-80 dakikadır. Bununla birlikte, numunelerin laboratuvara taşınması gerekir. Bu durum hasta yönetimi için yararlılıklarını sınırlayabilir. Bu nedenle, hızlı nükleik asit bazlı tespit yöntemlerini geliştirmek için büyük çaba sarf edilmiştir.

2.8.2.1.3. Hızlı Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri

Alternatif bir nükleik asit saptama yöntemi, bir termal döngüleyici gerektirmeyen izotermal amplifikasyondur. En sık kullanılan yaklaşım, döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) olmak üzere çeşitli izotermal amplifikasyon teknikleri geliştirilmiştir (90). Bu testler, PCR tabanlı testlerle aynı yüksek doğruluktadır ve 30 dakikadan daha kısa sürede sonuç verir (92). Kullanımlarının kolay olması ve laboratuvara taşınma zorunluluğu olmaması, bu testlerin avantajları olsa da maliyetleri oldukça pahalıdır ve testler genellikle diğer solunum yolu virüslerini tanımlayamazlar.

2.8.2.1.4. İnfluenza hızlı tanı testleri

Yaygın olarak “hızlı tanı” testleri olarak adlandırılan testler, solunum sekresyonlarında viral antijenin immünolojik olarak saptanmasına dayanır. Bu yaklaşımda, numune bir mukolitik ajan ile muamele edilir ve daha sonra görsel olarak okunan bir renk değişikliği açısından spesifik antikor ile test edilir. Tüm bu hızlı testlerin gerçekleştirilmesi nispeten basittir ve 30 dakika içinde sonuç alınabilir. Hücre kültürü ile karşılaştırıldığında testlerin duyarlılıkları %40-%80 olarak bulunmuştur. Küçük çocukların burun sekresyonlarında çok daha fazla miktarda virüs bulunması ve bu nedenle örneklerinde çok daha yüksek antijen konsantrasyonları olması nedeniyle, yetişkin ve ileri yaş hastalara göre testlerin duyarlılıkları daha yüksektir (93). Benzer şekilde, viral saçılımın en yüksek olduğu hastalık döneminde duyarlılık daha yüksektir. Bu tür testlerde her tür solunum yolu numunesi kullanılabilir de, nazofaringeal sürüntü ve aspiratlarda boğaz sürüntülerine veya gargaralara göre duyarlılığın daha iyi olduğu görülmektedir (94).

2.9. TEDAVİ

İnfluenzanın önlenmesi ve tedavisinde M2 inhibitörlerinden olan amantadin 1960’ ların ortasında, rimantidin 1993 yılında, nöraminidaz inhibitörlerinden (NI) olan zanamivir, oseltamivir ve peramivir son yıllarda onay almıştır (95). Yeni bir etki mekanizmasına sahip olan baloxavir, 2018 yılında onay almıştır (96).

2.9.1. Adamantanlar (M2 İnhibitörleri)

Amantadin ve rimantadin, influenza A virüsün M2 proteinine bağlanarak, iyon kanalı işlevine engel olur (97). Bu nedenle viral kapsitin soyunma aşaması ve pH’ya

bağımlı ribonükleoprotein yapımı engellenir. İnfluenza A infeksiyonunda kullanılmakta olup invitro testlerde influenza B ve C'yi inhibe ettiği dozların oral yolla hastaya verilmesi uygun değildir. Semptomların ilk 48 saati içerisinde amantadin veya rimantadin başlanması, hastalık süresini 24-48 saat kısaltmakta ve viral yayılımı azaltmaktadır (98).

Amantadin glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyonla değişmeden atılır. Rimantadin ise karaciğerde metabolize olarak, %10 oranında değişmeden idrar yoluyla atılmaktadır. Plazmaya kıyasla nazal sekresyonlarda konsantrasyonu amantadinin aynı, rimantadinin ise daha yüksektir (99).

Amantadin ve rimantadinin en önemli yan etkileri uykusuzluk, anksiyete, baş dönmesi ve konsantrasyon bozukluğu gibi santral sinir sistemi bulgularıdır. Bu yan etkiler ilacın bırakılması ile düzelir. Epilepsi hastalarında nöbet riskini artırır (98).

Tedavi sırasında dirençli virüsler ortaya çıkarak duyarlı kişilere bulaşması, bu grup ilaçların kullanımını sınırlandırmaktadır. İnfluenza A(H3N2) ve influenza A(H1N1)pdm09 gibi adamantanlara dirençli virüslerin prevalansında artış nedeniyle amantadin ve rimantadin günümüzde antiviral tedavi veya kemoprofilaksiste önerilememektedir (100).

2.9.2. Nöraminidaz İnhibitörleri

NA aktivitesini inhibe eden sialik asit analogu ilaçlardır. İnfluenza A ve influenza B'ye etkilidir. Bu ajanlar, akut komplike olmayan influenzada semptom başlangıcındaki ilk 48 saat içinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır.

Zanamivir, oral biyoyararlanımı çok azdır, inhalasyon için diskhaler ile uygulanmaktadır. Bronkospazma yol açabileceği için astımlı hastalarda kullanılmamalıdır. 7 yaş ve üzeri hastalarda kullanım için onay almıştır (101).

Oseltamivir, influenza A, B ve yeni patojenik kuş gribi viruslarına (H5N1, H7N7, H9N2) ve M2 inhibitör dirençli influenza suşlarına etkilidir. Oral emilimi iyidir. Bronkoalveolar sıvıda plazma düzeyinin %50'si oranında saptanır. En önemli yan etkisi bulantı ve kusmadır (102).

Peramivir, influenza A ve B tedavisinde parenteral olarak kullanılabilen antiviraldir. 2 yaş ve üzeri hastalarda, akut komplike olmamış influenza tedavisinde

semptomların ilk 48 saatinde kullanılmak üzere onay almıştır. İnfluenza kemoprofilaksisinde onayı yoktur (89). Böbrek yetmezliğinde oseltamivir ve peramivir dozlarının azaltılması önerilir.

2.9.3. Selektif Endonükleaz İnhibitörü

Baloxavir marboxil, influenza virüse etkili selektif endonükleaz inhibitörü yeni bir oral ön ilaçtır. mRNA sentezinin başlamasını inhibe ederek influenza virüsün çoğalmasını önler. İnfluenza A (H7N9 ve H5N1 dahil) ve influenza B virüslere etkilidir. Nöraminidaz inhibitörleri ile sinerjistik görünmekte ve oseltamivire dirençli influenza virüse etkilidir (35).

≥12 yaş bireylerde, akut komplike olmayan influenzada semptomların ilk 48 saatinde başlanmak üzere onaylanmıştır (103). Kalsiyum, magnezyum, demir, selenyum, çinko içeren gıdalarla birlikte uygulanmasından kaçınılmalıdır. Baloxavir marboxil, oral uygulama sonrası UGT1A3 ve CYP3A tarafından hidrolize edilerek aktif formu baloxavire dönüştürülür (35).

2.9.4. Hangi Kesin veya Şüpheli İnfluenza Vakalarına Antiviral Tedavi Verelim?

- Hastaneye yatırılan vakalar
- Ayaktan izlenmekle birlikte kliniği kötüleşenler
- <2 yaş çocuklar ve >65 yaş erişkinler
- Gebe olanlar veya doğum sonrası ilk 2 hafta kadınlar yüksek riskli bireyler olup antiviral tedavi en kısa sürede başlanmalıdır (104).
- Semptom başlangıcının ilk 2 gününde olan ayaktan hastalar
- Yüksek riskli bireyle aynı evde kalan semptomatik ayaktan hastalar
- Yüksek riskli bireylere bakım sağlayan semptomatik sağlık çalışanları gibi yüksek risk grubunda olmayan bireylere klinisyen kararına göre antiviral başlanabilir (104).

2.9.5. Kimlere Antiviral Kemoprofilaksi Verelim?

- İnfluenza aşısının kontrendike olduğu veya yapılamadığı veya etkinliğinin düşük olmasının beklendiği yüksek riskli bireylerde (3 ay ve üzeri çocuklar ve erişkinler) influenza sezonu boyunca,

• HSCT alıcıları gibi influenza ilişkili komplikasyonlar açısından yüksek riske sahip bireylerde influenza sezonu boyunca,

• Yüksek riskli bireylerle teması olan aşılanmamış bireylerde veya yüksek riskli bireylerde hemen influenza aşısı yapılması ve kısa süreli profilaksi başlanması temas sonrası ilk 48 saat içinde önerilir (104).

2.9.6. Antiviral Doz ve Süreleri

Tablo 2: İnfluenza A ve B tedavi/kemoprofilaksi antiviral ajan doz ve uygulama süreleri (100,104)

İnfluenza A ve B'ye etkili antiviral ajan	Doz ve Süre
Oseltamivir	
Tedavi	≥13yaş: 2*75 mg/gün, po, 5 gün 1-12 yaş ≤15 kg: 2*30 mg/gün, po, 5 gün >15 - 23 kg: 2*45 mg/gün, po, 5 gün >23 - 40 kg: 2*60 mg/gün, po, 5 gün >40 kg: 2*75 mg/gün, po, 5 gün 2 hf- 1 yaş: 2*3 mg/kg/gün, po, 5 gün
Kemoprofilaksi	1*75 mg/gün, po, 7 gün
Zanamivir	
Tedavi	2*10 mg/gün, inhalasyon, 5 gün
Kemoprofilaksi	1*10 mg/gün, inhalasyon, 7 gün
Peramivir	
Tedavi	>13 yaş: 1*600 mg/gün, IV, 1 gün CrCl 30-49 mL/dk: 1*200 mg IV CrCl 10-29 mL/dk: 1*100 mg IV 6 ay-12 yaş 2*12 mg/kg IV tek doz (maks 600 mg) Ay-2 yaş: CrCl < 50 mL/dk: veri yok 2-12 yaş - CrCl 30-49 mL/dk: 4 mg/kg IV 2-12 yaş - CrCl 10-29 mL/dk: 2 mg/kg IV
Baloxavir	
Tedavi ve kemoprofilaksi	40-80 kg: 1*40 mg/gün, po, 1 gün >80 kg: 1*80 mg/gün, po, 1 gün

2.10. KORUNMA

İnfluenza damlacık yoluyla bulaşan bir hastalıktır. Özellikle risk grubundaki bireylerin hasta kişilerle yakın temastan kaçınması, kış aylarında kalabalık ortamlarda bulunmaması gerekir. El yıkama gerekli bir uygulamadır. Hastalıktan korunmada ve hastalığa bağlı gelişebilecek komplikasyonları azaltmada en önemli yol, influenzaya karşı bağışıklamadır.

2.10.1. Mevcut Aşılar

İnfluenza virüsün keşfedilmesinden sonra aşı çalışmaları başladı ve koruyucu etkili inaktive aşı 1940 yılında geliştirildi (105). Embriyonlu tavuk yumurtasında üretilen tüm virüs partikülünü içeren formalinle inaktive edilmiş orijinal grip aşısı, 1945 yılında ruhsatlanmıştır. Split aşı teknolojisi 1960'larda tanıtılmıştır. Soğuğa adapte edilmiş aşı 1960 yılında lisanslanmıştır (106). Subünit aşilar ilk defa Birleşik Krallık'ta 1980'de lisanslanmıştır. Hücre kültürü temelli aşı 2001 yılında geliştirilmiştir. Dört antijen içeren quadrivalan aşı 2012 yılında lisanslanmıştır (107). Modern DNA teknolojisi ile üretilen aşı 2013'te onaylanmıştır (108,109).

Aşı ile hücreye tutunma ve girişte rol alan ve mevsimsel değişiklik gösteren hemaglütininlerin baş kısmına karşı antikor oluşturulması amaçlanır (110). İnfluenza aşılarının diğer aşılarla oranlara koruyuluğu, daha düşük ve daha kısa sürelidir. Mevsimsel grip aşılarının etkinliği % 10 ile % 60 arasında değişmektedir (111).

Günümüzde kullanımda olan grip aşıları

IIV: İnaktif influenza aşısı

- a: Adjuvan inaktif influenza aşısı için (aIIV4),
- cc: Hücre kültürü temelli inaktif influenza aşısı için (ccIIV4)
- HD: Yüksek doz inaktif influenza aşısı (HD-IIV4)
- SD: Standart doz inaktif influenza aşısı (SD-IIV4)

RIV: Rekominant influenza aşısı

LAIV: Canlı atenüe influenza aşısıdır.

Genetik yeniden sınıflandırmaya izin veren bölümlenmiş ortomiksovirus genomu, zayıflatılmış suşlardan diğer genleri korurken, yeni ortaya çıkan vahşi tip (wt)

virüslerin HA ve NA için genlerini içeren aşı suşlarını üretmek için kullanılmıştır. (112)

İnaktif influenza aşuları influenza virüsünün solventlerle işlemi sonucu elde edilen “split” ve deterjanlarla işlemi sonucu hazırlanan “subunit” aşuları mevsimsel gribi önlemek üzere dünyada ve ülkemizde kullanılmaktadır.

Mevsimsel grip aşısındaki influenza virüsleri, her yıl hangi virüslerin dolaşımında olduğunu gösteren sörveyans verilerine ve önümüzdeki sezonda hangi virüslerin dolaşımında bulunma olasılığının en yüksek olduğuna dair tahminlere göre seçilir (113). Kuzey Yarımküre için şubat ayında; Güney Yarımküre içinse eylül ayında aşı içeriği belirlenir (113). Avrupa ülkelerinin tamamına yakınında en çok kullanılan mevsimsel grip aşısı trivalan inaktif aşı olup, bu ülkelerin yaklaşık üçte birinde ek olarak quadrivalan inaktif aşı, adjuvanlı trivalan aşı ve canlı atenue aşı kullanılmaktadır (114).

2.10.1.1. İnaktif İnfluenza Aşuları(IIV)

2.10.1.1.1. Yumurtada Yetiştirilen İnaktif Aşular(IIV-3, IIV-4)

İnfluenza aşı aday virusu döllenmiş tavuk yumurtalarına enjekte edilir ve birkaç gün inkübe edilir. Virüs allantoik sıvıdan toplanır ve sükröz gradient yöntemi ile yüksek hızlı santifügasyon yöntemi veya kromatografi ile saflaştırılır. Saflaştırılan virüs, genellikle bir deterjan kullanılarak bölünür(split). Virüs, primer saflaştırma işleminden önce veya sonra formaldehitte inaktive edilir. Bu işlemler aşıda bulunan her bir suş için ayrı ayrı tekrarlanır ve son aşamada birleştirilir. Üretim süreci kalite testi, doldurma ve dağıtım ile devam eder (115).

Standart doz IIV, 6 ay ve üzeri bireylerde, HD-IIV 65 yaş ve üzeri bireylerde, MF59 içeren aIIV de 65 yaş ve üzeri bireylerde kullanım için onay almıştır (116,117).

İnaktive influenza aşılması sonrası en sık görülen yan etkiler injeksiyon bölgesinde ağrı ve hassasiyettir. Sistemik reaksiyonlar nadiren görülür (118). IIV ya da LAIV sonrası wheezing, anjioödem veya anafilaktik şok gibi aşırı duyarlılık reaksiyonu öyküsü olması durumunda aşı kontraendikedir (119). Yumurta proteini olan ovalbumin, aşı içerisinde çok az miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle yumurta alerjisi öyküsü aşı için bir kontrendikasyon oluşturmamaktadır ve hastanın 30 dakika

gözlenmesine gerek yoktur (120). Yumurtaya karşı ciddi alerjik reaksiyon öyküsü olması durumunda, ciddi alerjik durumları tanıyabilen ve yönetebilen bir sağlık uzmanının gözetimi altında veya hastaneye yatırılarak bireylerin aşılınması önerilmektedir (120).

2.10.1.1.2. Hücre Kültürü Kaynaklı İnaktif Aşılar(ccIIIV-4)

Hücre bazlı üretim, inaktive edilmiş aşıları üretmek için kullanılır. Aşı aday virüsleri, yumurta yerine memeli hücrelerine aşılınarak birkaç gün boyunca virüslerin çoğalmasına izin verilir. Diğer süreçler yumurta bazlı İİV ile benzerdir. Son olarak, FDA aşıları piyasaya sürülmeden ve gönderilmeden önce test eder ve onaylar (115).

Flucelvax Kuadrivalan, hücre bazlı olup tavuk yumurtası yerine memeli hücreleri (Madin-Darby Canine Kidney veya MDCK hücreleri) kökenli kültürde üretilen influenza virüslerinin kullanıldığı aşıdır. 4 yaş ve üzeri bireylerde lisanslanmıştır. Hücre kültürü teknolojisinin potansiyel bir avantajı, bir pandemi durumunda aşı üretim sürecinin daha hızlı başlatılmasına izin vermesidir (121).

Genel olarak hücre kültürü bazlı grip aşılarının, yumurtada üretilen inaktive grip aşıları ile benzer etkinlikte olduğu gösterilmiştir (122–124).

Yan etkileri, enjeksiyon bölgesinde ağrı ve eritem, baş ağrısı, yorgunluk, miyalji ve halsizliktir (125).

Kontrendikasyonları, aşı bileşenlerine veya herhangi bir influenza aşısına karşı hayatı tehdit edici ciddi alerjik reaksiyon öyküsü olmasıdır (119).

2.10.1.2. Rekombinant İnfluenza Aşısı (RIV)

Rekombinant teknoloji ile geliştirilen bu aşıların üretiminde yumurtada büyüyen aday bir aşı virüsü ve yumurtada üretim gerekmez. Yumurtaya gereksinim olmaması nedeniyle aşı üretimi çok daha hızlıdır ve pandemi süreçlerinde çok miktarda aşının üretilmesini sağlar. Rekombinant aşı yapmak için hemagglütinini kodlayan gen bölgesi bakulovirüsle birleştirilir. Bakulovirüsün rolü, HA antijeni üretmek için genetik bilginin konak hücreye taşınmasıdır. Yüzey glikoproteini olan hemagglütinin bu hücrelerden izole edilerek saflaştırılır ve daha sonra rekombinant grip aşısı olarak paketlenir (126).

Günümüzde mevcut olan tek RIV Flublok Kuadrivalan, 18 yaş ve üzeri kişilerde kullanım için lisanslanmıştır (127).

Yan etkileri, diğer injekte edilebilir aşular için bildirilenlere benzer şekilde injeksiyon bölgesinde ağrı ve hassasiyet, baş ağrısı, yorgunluk, kas ve eklem ağrılarıdır (128).

Kontrendikasyonları, aşı veya aşı bileşenlerine karşı hayatı tehdit edici ciddi alerjik reaksiyon öyküsü olmasıdır (125).

2.10.1.3. İntranazal Canlı-Zayıflatılmış Aşı (LAIV-4)

Canlı zayıflatılmış aşular, kısmen patojene karşı bağışıklık tepkisini taklit eden çeşitli bir bağışıklık tepkisi oluşturdukları için çiçek hastalığı, kızamık, çocuk felci gibi çeşitli viral hastalıklara karşı uzun bir başarı geçmişine sahiptir (129). İnfluenza virüsündeki sık antijenik değişiklikler, canlı viral aşının geliştirilmesinde önemli zorluk teşkil etmektedir. 2 ile 49 yaş arası, gebe olmayan ve sağlıklı bireylere uygulanabilmektedir (125).

Canlı zayıflatılmış grip aşısı (LAIV), başlangıç aşısı aday virüsleri canlıdır, ancak farklı bir üretim sürecinden geçen zayıflatılmış virüslerdir. Burun boşluğu sıcaklığının, alt solunum yollarına göre nispeten daha düşük olması nedeniyle aşı intranazal olarak uygulanmaktadır (108).

Yan etkileri, burun tıkanıklığı, burun akıntısı, boğaz ağrısı, baş ağrısı, miyalji ve küçük çocuklarda ateş yüksekliğidir (125).

Kontrendikasyonları:

- <2 yaş çocuklar
- ≥50 yaş erişkinler
- Herhangi bir influenza aşısı ile veya aşı içeriği ile anaflaksi gibi ciddi yan etki öyküsü
- Yumurta allerjisi
- Salisilat kullanmakta olan <19 yaş çocuk ve adolesanlar
- Gebe kadınlar
- HIV gibi immün yetmezlik durumları

- 2- 4 yaş arası çocuklarda altta yatan astım ya da son 12 ayda wheezing atağı geçirme
- Son 48 saat içinde influenzaya yönelik antiviral ilaç kullanımını (125).

2.10.2.Aşı Önerileri

Nadir nedenler dışında, 6 ay ve üzeri tüm bireyler yaş durumu ve altta yatan hastalık durumuna göre ACIP tarafından önerilen lisanslı, uygun bir influenza aşısı (IIV, RIV4 veya LAIV4) ile bağışıklanmalıdır (130). 6 ay-8 yaş arası çocuklara, aşı sezonu öncesi yıllarda 2 veya daha fazla doz trivalan ya da quadrivalan aşı yapılması durumunda yılda bir defa influenza aşısı yapılması yeterlidir. Önceki sezonlarda 2 doz aşı olmayan veya aşı durumu bilinmeyen bu yaş grubu çocuklara 4 hafta ara ile 2 doz influenza aşısı yapılması önerilmektedir (130).

Aşı tedariki sınırlı olduğunda, aşılama çabaları aşağıdaki gruplar üzerine odaklanmalıdır:

- 6 - 59 ay arasındaki tüm çocuklar;
- ≥ 50 yaşındaki tüm erişkinler;
- Kronik pulmoner (astım dahil), kardiyovasküler (izole hipertansiyon hariç), renal, hepatik, nörolojik, hematolojik veya metabolik bozuklukları (diabetes mellitus dahil) olanlar;
- Herhangi bir nedenden dolayı bağışıklığı baskılanmış kişiler (HIV ve ilaçlar dahil);
- Grip sezonunda gebe olan kadınlar;
- İnfluenza virüs enfeksiyonundan sonra Reye sendromu gelişme riski olabilecek aspirin veya salisilat içeren ilaçlar alan çocuk ve adolesanlar (6 ay ila 18 yaş arası);
- Huzurevi ve diğer uzun süreli bakım tesislerinde yaşayanlar;
- Morbid obez olanlar (yetişkinler için beden kitle indeksi ≥ 40)
- Sağlık çalışanları
- 59 ay ve daha küçük çocukların bakıcıları ve hane halkı temaslıları, özellikle 6 aydan küçük çocuklar ile temas edenler ve 50 yaş ve üzerindeki erişkinler

- İnfluenzaya bağlı artmış ciddi komplikasyon riski ile ilişkili tıbbi durumları olan kişilerin bakıcıları ve bu kişiler ile evde temas eden kişiler (130).

2.10.3. Aşıya Karşı Gelişen İmmun Yanıt

şılama sonrası immün yanıt iki bileşene bağlıdır. Virüsle karşılaşma sonrası olan yanıtlara benzer şekilde ilk savunma hattı doğuştan gelen hızlı ve spesifik olmayan yanıtıdır. Doğal bağışık yanıtta NK hücreler, dentritik hücreler ve makrofajlar yer alır. Kazanılmış bağışıklıkta ise dentritik hücreler gibi antijen sunan hücreler, T ve B lenfositler yer alır. T lenfositler, hücreyel immün yanıtta CD4 (helper) ve CD8 (sitotoksik) lenfositler olarak rol alır. CD4 T lenfositlerin Th1 lenfosit alt grubu hücreyel immün yanıtta rol alırken, Th2 alt grubu humoral immün yanıtta rol alır. B lenfositler CD+ T lenfositler aracılığıyla antijene spesifik antikor üretiminde rol alır. Antijen sunan hücreler, sınıf II major histocompatibility complex (MHC) içeren B lenfositlerle CD4 T lenfositler, MHC sınıf I taşıyan hücrelerle sitotoksik T lenfositler arasındaki etkileşimi sağlar (131). Sitokinler pek çok hücre tarafından salgılanır ve farklı hücrelerin aktivasyon ve dönüşümünü sağlar. CD4 T regülatör lenfositler kazanılmış bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde önemli rol alır (132).

Aşı yanıtını etkileyen faktörler arasında yaş, genetik özellikler, eşlik eden hastalıklar, kullanılan ilaçlar, beslenme durumu, hastalık etkeni ile daha önce karşılaşma gibi durumlar yer alır (10–13).

İnfluenza aşılarının laboratuvarında doğrulanmış hastalığa karşı hücreyel aracılı etkinliğini ölçmek için kullanılan bir başka yaklaşım, aşılama sonrası T hücrelerinden elde edilen IFN- γ , IL-10 ve sitolitik enzim granzim B oranını ölçmektir (133).

Genetik polimorfizmler (ve genetik olmayan faktörler) ile insan popülasyonunda influenza aşısına verilen immün yanıt arasındaki ilişkiler bildirilmiştir (10).

Bir aşıya serolojik yanıt, aşı içindeki HA miktarına, uygulanan doz sayısına ve uygulama yolu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (134). Konak genetik faktörleri, influenza virüs aşılmasına karşı antikor yanıtını düzenlemede rol alır.

2.10.3.1. Antikor yanıtını etkileyen genetik faktörler

Bazı çalışmalarda konak genetik özelliklerinin influenza aşısına karşı gelişen immün yanıtta etkisi gösterilmiştir (11,135,136).

Bağışıklık sistemi içindeki moleküler etkileşimlerde yer alan genlerden herhangi birinin polimorfizmi, aşılarla karşı etkili yanıtta bireyler arasında önemli farklara neden olur. HLA bölgeleri, insan genomunda yer alan ve antijen sunumu, aşı yanıtından sorumlu en önemli polimorfik bölgelerdir. Bir çalışmada aşı antikor titrelerinin daha düşük olduğu grupta HLA-DRB1*07 allelinin daha sık olduğu ve bu grupta HLA-DQB1*0603-9/14 allelinin daha az sıklıkta olduğu bulunmuştur (137). Bir başka çalışmada HLA-DRB1*04:01 ve HLA-DPB1*04:01 allelleri, yüksek titrede anti-HA antikorlu bulunan bireylerde daha sık saptanmıştır (138).

Aşılama sonrası influenza spesifik antikor yanıtında ilişkisi bulunan bir başka gen Single-genetic polymorphisms (SNPs)'dir.

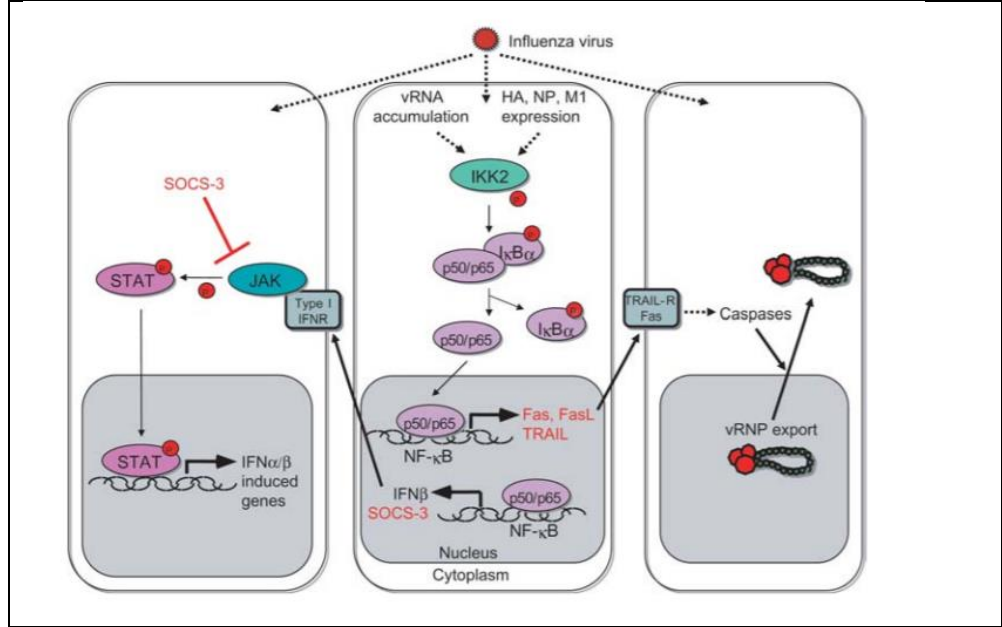
mRNA bazlı testlerle JAK-STAT1/2 ve JAK-STAT3 sinyal yollarının influenza, RSV, sarı humma, deng ateşi, rotavirüs infeksiyonu veya aşılmasında aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Klinik aşı çalışmalarında JAK-STAT1/2 yolağı aktivitesinin ölçümü sellüler immün yanıtı göstermede destek sağlamaktadır. JAK-STAT1/2 yolağı aktivitesi, viral infeksiyonlarda artmaktadır ve RSV ile karşılaştırıldığında influenzada daha fazla artmaktadır (139). NF- κ B doğal ve kazanılmış bağışıklıkta ve pek çok proinflamatuvar yolağın düzenlenmesinde önemlidir. Hücresel aracılı immüniteyi düzenleyen IL-6, T hücrelerinin efektör fonksiyonunu düzenlemede rol alır. İnfluenza virüse karşı aşının başarısında güçlü bir CD4 T lenfosit yanıtının gerekmesi nedeniyle IL-6'nın hücresel aracılı immüniteyi tetiklemesi çok önemlidir (140).

2.10.3.2. Virüs ve Aşı ile Karşılaşma Sonrası Hücre İçi Sinyal Yolları

2.10.3.2.1. NF- κ B yolağı

NF- κ B, DNA'ya doğrudan bağlanarak gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol alan bir transkripsiyon faktörüdür. Çeşitli sitokinlerin, kemokinlerin, hücre yüzey reseptörlerinin ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu düzenleyerek doğal bağışıklık yanıtında ve inflamasyonda merkezi rol almaktadır. Monosit-makrofajlar, B ve T lenfositler gibi hücrelerde eksprese edilir, sitokinler, kemokinler, sitokin reseptörleri, lökosit adezyon molekülleri gibi immün yanıtta etkili pek çok genin ekspresyonunu düzenleyici görevi bulunmaktadır. NF- κ B dinlenme durumundayken I κ B inhibitör proteinlerine bağlı olarak inaktif formdadır. Pro-inflamatuar sitokin

salınım sonrası (TNF- α , IL-1 β , IL-6) uyarılır. I κ B proteinleri inhibitör kapp B kinaz (I κ K) enzimi ile fosforillenir. Serbest kalan NF- κ B lokalizasyon sinyali ile nükleusa geçer (141,142). Nükleusta IL-6 promoter bölgesine bağlanan NF- κ B, IL-6 gen ekspresyonunu uyarır (Şekil 3) (143).



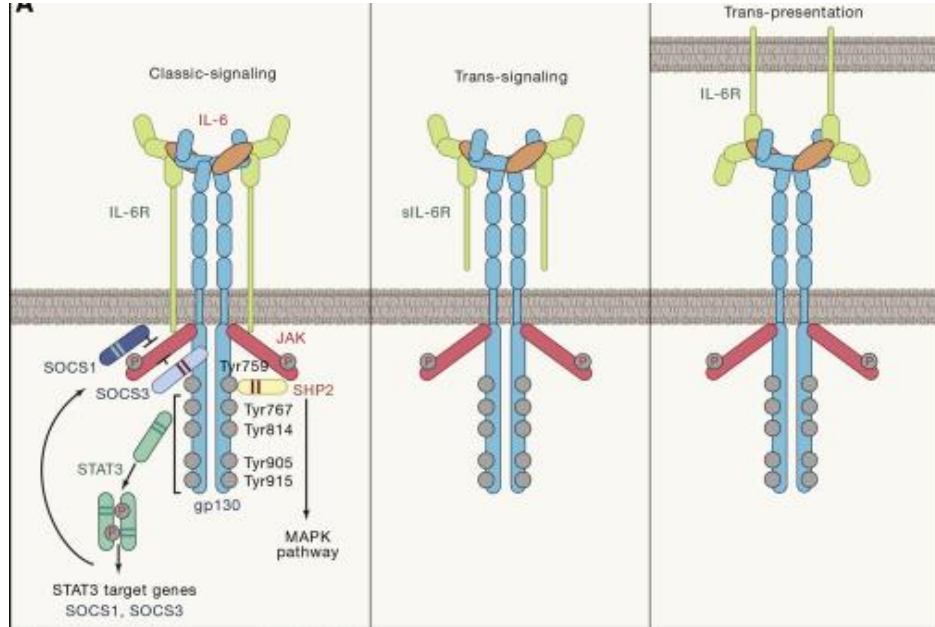
Şekil 3: İnfluenza virüs ve NF- κ B yolağı (14)

2.10.3.2.2. IL-6

IL-6 pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar bir sitokindir. Lenfositler, monosit-makrofajlar, dentritik hücreler ve çeşitli hücrelerde TNF-a, IL-1 β gibi uyarılara yanıt olarak üretilir. T ve B hücrelerinin farklılaşmasını, immünglobulin sentezini, akut faz reaktanlarının sentezini uyarmakta ve aynı zamanda doğal ve kazanılmış bağışık yanıt arasında bağlantı sağlamaktadır (15,144). IL-6, nötrofil aracılı mekanizma ile influzanın viral klirensini arttırmaktadır. IL-6 kaybı, influenza virüsün akciğerlerde persistansına ve bu yolla akciğer hasarına ve ölüme neden olmaktadır. Genetik veya çevresel faktörler IL-6 üretimini ya da sinyalini etkileyebilmektedir (16).

IL-6 sinyal yolağı, IL-6'nın IL-6R'ye ve gp130'a bağlanmasıyla başlar. IL-6R ekspresyonu hepatositler, monositler ve lenfositlerle sınırlı olmasına rağmen, gp130 tüm hücrelerde eksprese edilir. Bu nedenle IL-6'nın pleotropik etkisi bulunmaktadır. IL-6, reseptörüne bağlandığında JAK/STAT3 ve mitojenle aktive olan protein (MAP) kinaz yolu aktive olur. JAK, STAT3'ün fosforilasyonunu ve STAT3 homodimerlerinin oluşumunu aktive eder. Bu kompleks nükleusa geçerek akut faz reaktanları gibi IL-

6'ya yanıt veren genlerin ekspresyonunu uyarır. MAP kinaz aktivasyonu da çeşitli transkripsiyonel faktörleri uyarır. STAT3 daha sonra sitokin sinyal baskılayıcı (SOCS) 1 ve 3 ekspresyonunu artırır. SOCS1 direkt JAK'a bağlanarak, SOCS3 gp130'a bağlanarak döngüyü sonlandırır (Şekil 4) (72).



Şekil 4: IL-6 ve sinyal yolağı

2.10.3.2.3. JAK/STAT yolağı

Janus kinaz/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) sinyal yolağı IL-6 gibi sitokinlere ve büyüme faktörlerine yanıt olarak uyarılmaktadır. Hematopoez, immün hücre gelişimi, kök hücre yanıtı, organizmanın büyümesi, meme bezleri gelişimi için gereklidir. Ekstraselüler reseptör uyarımı sonrası intraselüler JAK'lar fosforile olur. Ardından fosforile JAK'lar STAT'ları fosforile eder. STAT'lar dimerler veya oligomerler halinde nükleusa geçerek transkripsiyonu düzenlerler (Şekil 5) (145).

Memeli hücrelerinde JAK ailesinin dört üyesini (JAK1-3 ve TYK2), STAT proteinlerinin 7'sini eksprese edilmektedir.

JAK1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 VE IL-21 gibi sitokinlerinlerin NK hücre gelişimi, maturasyonu ve fonksiyon kazanmasında sinyal iletiminde yer almaktadır.

JAK2, büyüme hormonu, eritropoietin ve IFN-II sinyal yolaklarında görev alır bu nedenle hematopoezde çok önemlidir. IL-2 sinyalleri, hem NK hem de T

hücrelerinde, JAK1/3 ve STAT1/3/5 yoluyla NK ve T hücre proliferasyonunu indükler ve NK hücre sitotoksitesitesini arttırır. IL-2 ayrıca NK hücrelerinde T hücrelerinden farklı olarak JAK2 ve STAT4'ü aktive eder. JAK2 TYK2 (Tirozin kinaz) ile birlikte IL-12 ailesi üyelerinin sinyal iletimine aracılık eder. IL-2 özellikle STAT4'ü, daha az miktarda STAT1/3/5'i uyarır.

JAK3, JAK1 ile birlikte IL-2/4/7/9/15/21'in sinyallerini taşıyarak STAT1/3/4/5/6 fosforilasyonuna neden olur. NK, B ve T lenfositlerin gelişiminde rol alır.

TYK2, IL-12 aracılı yolla STAT1, STAT3 VE STAT4 aktivasyonuna neden olur.

STAT1, IFN'lar tarafından aktive edilen baskın transkripsiyon faktörüdür. Tip II IFN'lar (IFN- γ) STAT1 homodimerizasyonunu, tip I IFN (IFN- $\alpha/\beta/\epsilon/\kappa/\omega$) ve tip III IFN (IFN- λ 1-3) ise STAT1, STAT3 ve IRF9'dan oluşan ISGF3 kompleks formasyonunun oluşumunu tetikler. STAT1, sinyallerini IL-6/10/12/21/27/35 sitokinlerinden alır.

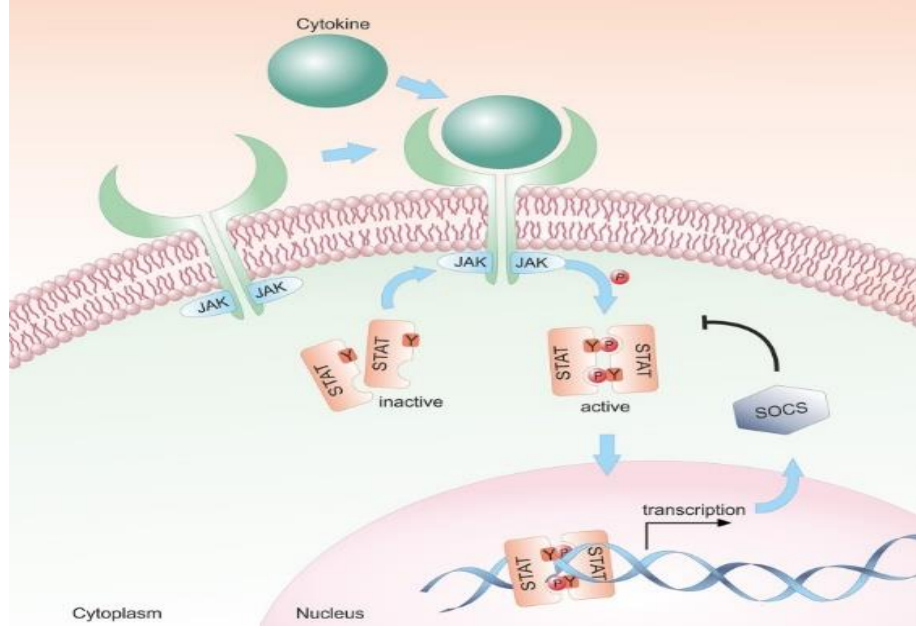
STAT2, STAT1 ve IRF9 ile birlikte IFN-I ve IFN3'e yanıt olarak etkinleştirilir. Bu nedenle antiviral savunma mekanizmasında önemli bir araçtır.

STAT3, NK hücre gelişiminde önemlidir.

STAT4, IL-12 sinyal yolağı ile aktive olur. NK ve doğal lenfoid hücrelerde (ILC1) IFN- γ üretimi için gereklidir.

STAT5A ve STAT5B, NK hücre gelişimi, maturasyonu ve döngüsünde ana düzenleyicidir.

STAT6, IL-4 ve IL-13 tarafından aktive edilir. Th2 polarizasyonunda ve allerjik inflamasyonda rol alır (146).



Şekil 5: JAK/STAT yolağı (146)

2.10.4. İntramuskuler Protein Aşılar ile Gelişen İmmun Yanıt

Aşılama sonrası sağlıklı bireylerin yaklaşık %90'ında serum HA antikor titresinde artış görülmektedir. Serum antikor titresi, aşılamadan 2-4 hafta sonra en yüksek seviyeye ulaşır ancak hızla düşer. Bir sonraki influenza sezonunda bazal seviyelere ulaşır (147). Erişkinlerde aşılama sonrası hemagglütinin spesifik plazma hücreleri, 2. gün artmaya başlayarak yaklaşık 7.-8. günlerde en yüksek seviyeye ulaşır (148).

CD4 T lenfosit yanıtını içeren sellüler yanıt genellikle IIV sonrası görülür (149). CD4 T lenfosit yanıtı ve antikor yanıtı arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır (150). IIV yapılan erişkinlerde aşılamadan 7 gün sonra HA spesifik CD8 T lenfosit artışı görülmektedir (151). HAI antikor seviyesindeki artışın genellikle aşı koruyuculuğu ile korele olduğu kabul edilse de ileri yaş gibi bazı popülasyonlarda hücresel yanıtın uyarılmasının koruma ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (152).

Daha önce aşılanmamış küçük çocuklarda genellikle iki doz aşından yaklaşık 4 hafta sonra serum antikor yanıtı gözlenir. İki doz aşı şemasını tamamlayan çocuklara daha sonraki sezonlarda bir doz aşı önerilir.

Genç erişkinlerle kıyaslandığında ileri yaş bireylerde korucu HA antikor titresi daha düşüktür. İleri yaş bireylerde dört kat yüksek doz (60 µg/HA) içeren aşının

uygulanması ile serum HA antikor titresinde artış gösterilmiştir (153). Yüksek doz aşı ABD'de 65 yaş üstü bireyler için onay almıştır.

MF59 adjuvanlı inaktive aşıların ileri yaş bireylerde aşı antikor yanıtını yaklaşık %50 arttırdığı bulunması (154) nedeniyle MF59 adjuvanlı mevsimsel inaktive aşı İtalya'da birkaç yıldır kullanılmaktadır. MF59 adjuvanlı standart doz inaktive aşının standart dozdaki inaktive aşıdan üstün (superior) olmadığı gösterilmekle birlikte aşağı (non-inferior) olmadığı gösterilmesi üzerine ABD'de lisans almıştır (155).

İmmünesupresif bireylerde, böbrek hastalığı olanlarda ve transplant alıcılarında aşuya verilen yanıt bozulmuştur. Antikor yanıtının en fazla olabilmesi için aşılanmanın, transplant öncesi, nötropenik olmayan dönemde yapılması ve bu bireylere yakın temaslıların da aşılanması gerekmektedir (156). HSCT yapılan otolog alıcılarda allojenik alıcılara göre daha iyi aşı yanıtı görülmektedir (157). Solid organ nakli alıcılarında da immün yanıt azalmaktadır. İmmünesupresyon amacıyla kullanılan mikofenolat da aşı yanıtını azaltmaktadır (158).

HIV infekte bireylerde influenza aşısına yanıt immünesupresyonun derecesi ile ilişkilidir (159).

2.10.4.1. İmmün Yanıt Göstergeleri

2.10.4.1.1. Etkinlik

Dolaşımdaki ile grip aşısındaki virüs bileşenlerinin iyi eşleşmemesi durumunda aşının etkinliği azalır (160).

Aşı etkinliği her yıl DSÖ tarafından izlenir. Aşı etkinliği, influenza aşısı yapılan bireylerde hastalık geçiren ve geçirmeyenlerin karşılaştırılmasıyla değerlendirilir. Aşı etkinliğini etkileyebilecek yaş, ırk ve altta yatan tıbbi durumlardaki farklılıkları hesaba katmak için istatistiksel yöntemler kullanılır. Dolaşan virüsler ile aşı virüsleri arasındaki eşleşme sezon öncesinde bilinmediğinden, tahminler yıllık olarak raporlanır ve genellikle sezon boyunca erken bir tahmin rapor edilir (160).

İnfluenza aşısı ile sezondaki influenza virüslerinin iyi eşleşmesi durumunda, 65 yaşın altındaki sağlıklı erişkinlerde influenza koruyuculuk oranının yaklaşık %60 oranında olduğu tahmin edilmektedir (161). Huzurevi ortamında etkinlik önemli ölçüde daha düşük, yaklaşık %20-40 olarak bulunmuştur (162).

2.10.5. Aşı Sonrası Antikor Gelişme ve Koruyuculuk Süresi

Bir aşı ile karşılaşma sonrası koruyucu antikorlar yaklaşık 2 haftada üretilmeye başlar. Antikorlar genellikle ilk 7-10 gün dolaşımında görülmez. Erken dönemde düşük affinite gösteren IgM, geç dönemde yüksek affinite gösteren IgG sınıfı antikorlar ortaya çıkar. IgM sınıfı antikorlar kompleman fiksasyonu ile lizis ve fagositozu sağlar. IgG titresi ikinci haftada yükselmeye başladıkça IgM titresi düşer. Antikor titresi 2-6 haftada en yüksek seviyeye ulaşır ve daha sonra düşmeye başlar. Nadiren ilk aşı sonrası antikor yanıtı oluşmayabilir. Aynı antijene ikinci kez maruz kalma sonrası artan bir hümmoral ve hüccresel yanıt gözlenir. Bu yanıt birincil yanıtla göre daha erken, genellikle 4-5 gün içinde meydana gelir (122).

Virüs inhibisyonunu sağlayan antikorlar nötralizan antikor olarak adlandırılır. İnfluenzada HA proteinine karşı gelişen antikorlar en güçlü nötralizan antikorlardır ve infeksiyon gelişmesini önler (163).

İnfluenza aşısı sonrası koruyucu titrede antikor düzeyi 14. günden itibaren tespit edilemeye başlar (147,164). Aşının koruyuculuğu yaklaşık 6-8 ay sürer(165).

2.10.5.1. Aşı antikor Yanıtının Ölçümü

Aşılarla karşı gelişen yanıt genellikle spesifik serum antikorlarının görünümü ve konsantrasyonu hesaplanarak ölçülür. Kızamık ve kızamıkçık gibi bazı viral aşılar için dolaşımdaki antikor miktarı klinik koruyuculuk ile ilişkilidir. Bununla birlikte aşıya karşı gelişen serokonversiyon bağışıklık yanıtının hümmoral parametresini gösterir. Ölçülebilir antikor yanıtının olmaması bireyin korunmasız olduğu anlamına gelmeyebilir (166). Bazı aşılar için dolaşımda minimum düzeyde bir antikor gereklidir (örn. 0.01 IU/ml tetanoz antitoksini). Bu fonksiyonel antikorların opsonofagositik aktivitesinin ölçümü aşı yanıtını izlemek için tercih edilir. Bu yöntem genellikle bakteriyel polisakkarit aşılara karşı bağışıklığın değerlendirilmesinde kullanılır (167).

2.10.5.1.1. Hemaglütinasyon İnhibisyon Testi (HAI)

Virüsün ve spesifik antikorun ölçümü için basit ve ucuz bir yöntem olan hemaglütinasyon fenomeni Hirst tarafından 1941 yılında bulundu (32). İnfluenza antijenlerinin eritrositlerle aglütine olması nedeniyle influenzada viral alt tiplerin belirlenmesini ayrıca infeksiyon veya aşılama sonrası antikor titresinin belirlenmesini

sağlar. Antihemaglutinin antikorlarının viral hemaglutininlere yapışarak virüsün eritrositlerle aglutinasyonunu engellemeye dayalı bir yöntemdir. Yöntem en az 1/160 titresinde antiserumlarla gerçekleştirilir. Hemaglutinasyonun tamamen inhibe olduğu en yüksek titre HAİ titresini olarak belirtilir (168). 1/32-1/40 HAİ titreleri genel olarak koruyucu titreler olarak kabul edilmektedir. Serumda bulunan nonspesifik inhibitörlerin yöntemin duyarlılığını etkilemesi dezavantajdır.

2.10.5.1.2. EIA

Antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak temeline dayanan kantitatif ölçüm yöntemidir. Serum ve orofarengal örneklerde IgM, IgA ve IgG yapıda antikorların saptanmasına olanak sağlar. HA spesifik antikorların kantitatif belirlenmesi avantajdır. HAI yöntemine göre daha hızlı, spesifik ve duyarlıdır. Nötralizan karakterdeki antihemaglutinin ve nöraminidaz antikorlara ek olarak nötralizan olmayan matriks ve nükleoprotein antikorları da saptamaktadır. Serum inhibitörlerinden etkilenmemektedir (169).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ

Araştırma prospektif klinik araştırmadır.

3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ

Pamukkale Üniversitesi Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Aşı Polikliniği

3.3. ARAŞTIRMANIN ÖRNEKLEMİ

Çalışmada belirlenen birey sayısı, benzer çalışmalardaki standart sapma verilerinden yola çıkarak G*Power 3.1 programı ile geniş etki büyüklüğünde ($d=0,9$), Tip 1 Hata (α) 0,05; araştırmanın gücü ($1-\beta$) 0,80 alınarak araştırma alınması gereken kişi sayısı en az 42 olarak hesaplanmıştır (170).

3.4. ETİK KURUL ONAYI

27.11.2018 tarihinde Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan etik açıdan onay alındı. Etik kurul sayı no: 60116787-020/81394

3.5. DAHİL EDİLME KRİTERLERİ

- 18 yaş ve üzeri
- İnfluenza aşısı yapılacak olan bireyler
- Çalışmaya katılmayı kabul eden ve onamı alınan bireyler

3.6. HARIÇ TUTMA KRİTERLERİ

- HIV/AIDS bireyler
- Soliter veya kemik iliğini infiltre eden tümör varlığı,
- Monoklonal antikor kullanımı,
- İki haftanın üzerinde kortikosteroid kullanımı,
- T hücre deplesyonu yapan ajan kullanımı,
- Gebelik veya emzirme,
- İnfluenza aşısı ile veya aşı bileşenlerine karşı ciddi alerjik reaksiyon öyküsü

3.7. ARAŞTIRMANIN YAPILDIĞI YER VE KATILIMCI SAYISI

2018 Aralık ve 2019 Ocak ayları arasında, Pamukkale Üniversitesi Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Aşı Polikliniği'ne başvuran 44 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

3.8. KATILIMCILARIN ILI ve AŞI ÖYKÜSÜ

Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcıların son 2 yıl içinde influenza aşı öyküleri ve sağlık bakanlığı grip vaka tanımına göre ILI öyküleri sorgulanmıştır.

3.9. KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE SAKLANMASI

Aşı öncesi antikor yanıtını değerlendirebilmek için düz tüpe 8-10 cc ve genetik testler için EDTA'lı tüpe 2 cc venöz kan örnekleri alındı.

Aşı sonrası gen ekspresyonlarını değerlendirebilmek amacıyla aşıdan sonraki 14. gün EDTA'lı tam kan örnekleri alındı. Testler çalışılana kadar örnekler -80°C deki derin dondurucuda saklandı.

Aşı sonrası antikor yanıtlarını değerlendirebilmek amacıyla aşı sonrası 45. gün düz tüpe venöz kan örnekleri toplanarak alınan venöz kanın santrifüj edilmesi sonrası serum kısmı ayrıldı. Serumlar çalışılana kadar -80°C deki derin dondurucuda saklandı.

3.10. UYGULANAN AŞI ve İÇERİĞİ

Kuzey Yarım Küre 2018-2019 influenza sezonu için DSÖ tavsiyesi Qadrivalan aşı içeriği:

- A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-like virüsü;
- A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)-like virüsü;
- B/Colorado/06/2017-like virüsü (B/Victoria/2/87 lineage);
- B/Phuket/073/2013-like virüsü (B/Yamagata/16/88 lineage) şeklindedir.

Yardımcı maddeler: yumurta, ovalbumin, neomycin, formaldehit ve octoxinol.

Her doz aşı 0.5 ml olarak intramuskuler (IM) olarak deltoid kasa uygulanmıştır.

3.11. YAN ETKİ İZLEMİ

Aşı sonrası, hastalar 30 dakika anafilaksi açısından gözlem altında tutuldu.

3.12. GEN EKSPRESYON ANALİZİ

3.12.1. Rna İzolasyonu

TRIZOL reaktifi kullanılarak izole edilen PBMC'lerden gerçekleştirildi. İzolasyon protokolü aşağıda belirtilen şekilde uygulandı:

- PBMC üzerine 1 mL TRIZOL reaktifi eklendi 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 200 µl kloroform eklendikten sonra vorteks yapıldı ve 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 12000 rpm de 15 dk 4°C' de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası oluşan en üst fazda bulunan RNA toplandı ve 500 µl izopropanol içeren yeni tüpe alındı.
- RNA ve izopropanol içeren tüp alt üst edilerek karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 12000 rpm de 10 dk 4°C' de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde döktü. Pelet üzerine %70 etanol eklendi ve vorteks yapıldı.
- RNA'nın degrade olmasını ve kırılmasını önlemek için düşük hızda (7500 rpm) 10 dk 4°C' de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası %70 etanol uzaklaştırıldı ve tüplerin kapakları açık bırakılarak RNA peleti kurumaya bırakıldı.
- Pelet miktarına bağlı olarak 20-25 µl RNaz içermeyen su eklendi.
- 60°C' de 10 dk bekletildi ve -80°C' de saklandı.

3.12.2. RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen RNA'lar kalite ve kantite açısından değerlendirilmek üzere konsantrasyonları Nanodrop ND-2000c cihazında ölçüldü. 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans alındı ve A260/A280 oranına göre RNA'nın saflığı belirlendi.

3. 12.3. Total RNA'nın cDNA'ya Çevrimi

Total RNA örnekleri Hi-Capacity cDNA Revers Transkripsiyon kiti (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) kullanılarak cDNA'ya çevrildi.

Tablo 3: cDNA dönüşüm reaksiyonu koşulları

Bileşen	Hacim
10x RT Solüsyonu	2 µl
25x dNTP karışımı	0.8 µl
10x RT random primer	2 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
Nükleaz içermeyen su	4.2 µl
Total hacim	10 µl

Hazırlanan 10 µl 'lik karışım üzerine 10 µl (1 µg) izolasyonu yapılan total RNA örneği eklenecek ve ardından reaksiyon karışımı PZR cihazında sırasıyla 25⁰C'de 10 dk, 37⁰C'de 120 dk ve 85⁰C'de 5 dk olacak şekilde reaksiyona tabi tutuldu. cDNA'ya dönüşen örnekler -20⁰C'de saklandı.

3.12.4. Total RNA Örneklerinden Ekspresyon Analizi

Aşı uygulanması sonrasında ifadesi artan yada azalan NfKb ve JAK/STAT yolağı ile ilişkili mRNA'ları saptamak amacıyla izolasyonu yapılan ve cDNA'ya dönüştürülen örnekler Kilogreen 2X (ABM) master karışımı kullanılarak Corbett Rotor-Gene 6000 cihazında analiz edildi. Reaksiyon karışımı hazırlanmadan önce cDNA örnekleri 1/5 oranında nükleaz içermeyen su kullanılarak dilüe edildi. Ardından reaksiyon karışımı 2 µl cDNA örneği, 10 µl KiloGreen 2X master mix, 0.3 µM ileri ve geri primerler ile total hacim 20 µl olacak şekilde hazırlandı. Sonuçların analizi için β-Aktin endojen kontrol olarak kullanıldı. STAT1, STAT2, JAK1, JAK2, IL6, NFκB genlerinin ekspresyon analizi yapıldı. Reaksiyon döngüsü aşağıda belirtildiği gibi her örnek için 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 4: mRNA RT-PZR koşulları

Segment	Döngü	Sıcaklık	Süre
1	1	95 ⁰ C	10 dk
2	40	95 ⁰ C	15 sn
		60 ⁰ C'	60 sn

3.13. AŞI ANTİKOR YANITININ ÖLÇÜLMESİ

İnfluenza antikor düzeyleri ELİSA (Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Analizi) yöntemi ile çalışıldı.

Serumda influenza A ve influenza B'ye karşı IgG antikor oluşumunu saptayan, mikrotitre pleytlerde çalışılan, Abcam firmasına ait 96 testlik ticari ELISA kiti kullanılmıştır. Bu kit, influenza A ve influenza B virüs antijenlerini içermektedir.

ELISA yönteminde Human anti-İnfluenza virüsü A ve B için ELISA kiti ile influenza virüsü A ve B antijenleri ile konjugat antikorlarının bağlanması için 96 oyuklu bir plaka önceden kaplanıp, kontroller veya test örnekleri kuyulara eklenip ve inkübe edildi. Yıkamanın ardından, sabitlenmiş influenza virüsü A ve B'ye özgü antikorlara bağlanan konjugat olarak horseradish peroxidase (HRP) işaretli anti-human IgG kullanıldı. Konjugatın bağlanmasıyla oluşan immünkompleks, tetrametilbenzidin-(TMB) substratının eklenmesiyle mavi renkli bir reaksiyon ürünü vererek görünür hale geldi. Bu ürünün yoğunluğu, örnekteki influenza virüsü A ve B IgG antikoru miktarıyla doğru orantılıdır. Reaksiyonu durdurmak için kullanılan sülfürik asit, sarı renk oluşumuna neden olur. Deney sonuçları test süresinin bitiminde 450 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometrede okundu.

3.13.1. Testin Uygulanışı

1. Kit prosedürlerine göre; çalışma öncesi tüm reaktifler ve serum örnekleri oda sıcaklığına getirildi.

2. Tüm kuyucuklara 100 µl serum test örnekleri veya kontroller eklendi. (substrat blank değeri için bir kuyucuk boş bırakıldı.)

3. Kuyucukların üzeri kitte mevcut olan plastik folyoyla kapatıldı.
4. 37°C’de 1 saat inkübe edildi.
5. Daha sonra kuyucuklardaki sıvı aspire edilip 300 µl yıkama solüsyonuyla 3 kez yıkandı.
6. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara 100 µl influenza virus A/B anti-IgG HRP konjugat solüsyonu koyuldu ve üzerleri plastik folyo ile kaplandı.
7. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
8. 5.basamak (yıkama) tekrar edildi.
9. Tüm kuyucuklara 100’er µl TMB substrat solüsyonu koyuldu.
10. Plate karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
11. Tüm kuyucuklara 100 µl stop solüsyonu eklendi.
12. Absorbans değeri, 30 dakika içinde spektrofotometrede 450 nm’de okundu.

Kit protokolü doğrultusunda aşağıda belirtilen formül uygulanarak deneysel olarak elde ettiğimiz negatif, pozitif, eşik değeri ve substrat standart değerleri istatistiksel olarak hesaplandığında aşılı yanıtı için antikor artışı değeri %7 olarak belirlenmiştir.

Hasta serum örneği absorbans değeri*10/eşik değeri = standart ünite

Eşik değeri: 10 standart ünite

Gri-zon: 9-11 standart ünite

Negatif: <9 standart ünite

Pozitif: >11 standart ünite

3.14. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler SPSS 17.0 paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik Testi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Ayrıca sürekli değişkenlerin arasındaki ilişkiler Spearman ya da Pearson korelasyon analizleriyle ve kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar ise Ki kare analizi ile incelendi. P değeri $<0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

Aşı uygulanan bireylerde mRNA Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu dataları karşılaştırmalı Ct yöntemi olan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analiz istatistik yöntemi ve basic student t testleri ile analiz edildi.

Heatmap analizleri ve antikör yanıtı grafikleri Graphpad Prism 9.2.0 programı kullanılarak analiz edildi. P değeri $<0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

2018 Aralık ve 2019 Ocak ayları arasında, Pamukkale Üniversitesi Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Aşı Polikliniği'ne influenza aşısı olmak üzere başvuran kişilerden, aşı sonrası kan örneklerinin toplanabildiği 44 kişi çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen katılımcılarda influenza aşısına bağlı anafilaksi veya ciddi bir yan etki gözlenmedi. Çalışmaya dahil edilen bir katılımcının RNA analizleri 260/280 nm de kalitatif ve kantitatif değerlendirildiğinde RNA kalitesi düşük bulundu. Bu nedenle değerlendirmeye 43 katılımcı dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilen katılımcıların yaş ortalaması $40,2 \pm 15,7$ olup, bunların 30'u (%69,7) 18-50 yaş aralığında, 13'ü (%30,2) 50 yaşın üzerindedir. Katılımcıların 22'si (%51,1) kadın, 21'i (%48,8) erkektir. Katılımcıların 26'sı (%60,4) sağlık çalışanı, 17'si (%39,5) diğer meslek gruplarındadır. Tablo 5'de başvuran kişilerin demografik özellikleri gösterilmiştir.

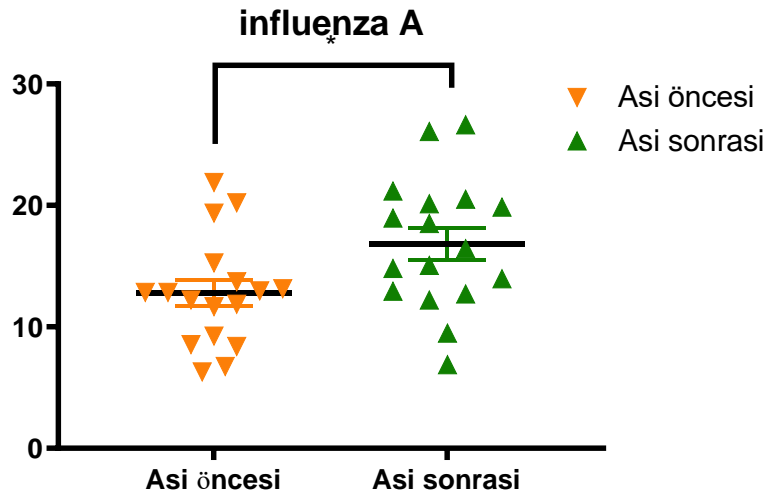
Tablo 5: Başvuran kişilerin demografik özellikleri

Demografik özellikler	
Erkek/Kadın (n, %)	21/22 (%48,8/%51,1)
Yaş (ort, min-maks)	40,2±15,7 (18-73)
18-50 yaş (n, %)	30 (%69,7)
50 yaş ve üzeri (n, %)	13 (%30,2)
Meslek	
Sağlık çalışanı (n, %)	26 (%60,4)
Diğer (n, %)	17 (%39,5)

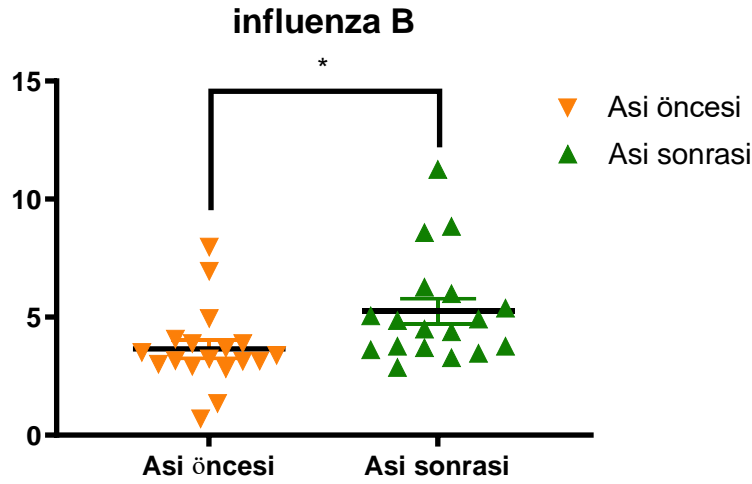
Katılımcıların antikor durumları incelendiğinde; aşı öncesi 34 kişide (%79) influenza A'ya karşı, 1 kişide (%2,3) influenza B'ye karşı ELISA kitinin pozitif sınır değerine göre antikor pozitifliği bulundu. Aşı sonrası ELISA kitine göre hesaplanan antikor titresinde artış, influenza A'ya karşı 17 (%39,5) kişide (Şekil 6), influenza B'ye karşı 18 (%41,8) kişide (Şekil 7), hem influenza A hem de influenza B'ye karşı 6 kişide (%13,9) bulundu. 29 (%67,4) katılımcıda influenza A ve/veya B'den herhangi birine karşı antikor artışı saptandı. Tablo 6'da katılımcıların antikor durumları gösterilmiştir.

Tablo 6: Aşı öncesi ve sonrası antikor durumları

	n / %
Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği	34 (%79)
Aşı öncesi influenza B'ye karşı antikor pozitifliği	1 (%2,3)
Aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı	17 (%39,5)
Aşı sonrası influenza B'ye karşı antikor artışı	18 (%41,8)
Aşı sonrası hem influenza A hem de influenza B'ye karşı antikor artışı	6 (%13,9)
Aşı sonrası influenza A ve/veya influenza B'ye karşı antikor artışı	29 (%67,4)



Şekil 6: İnfluenza A'ya karşı antikor artışı olanların aşı öncesi ve sonrası antikor titrelerinin karşılaştırılması ($p < 0,05$)

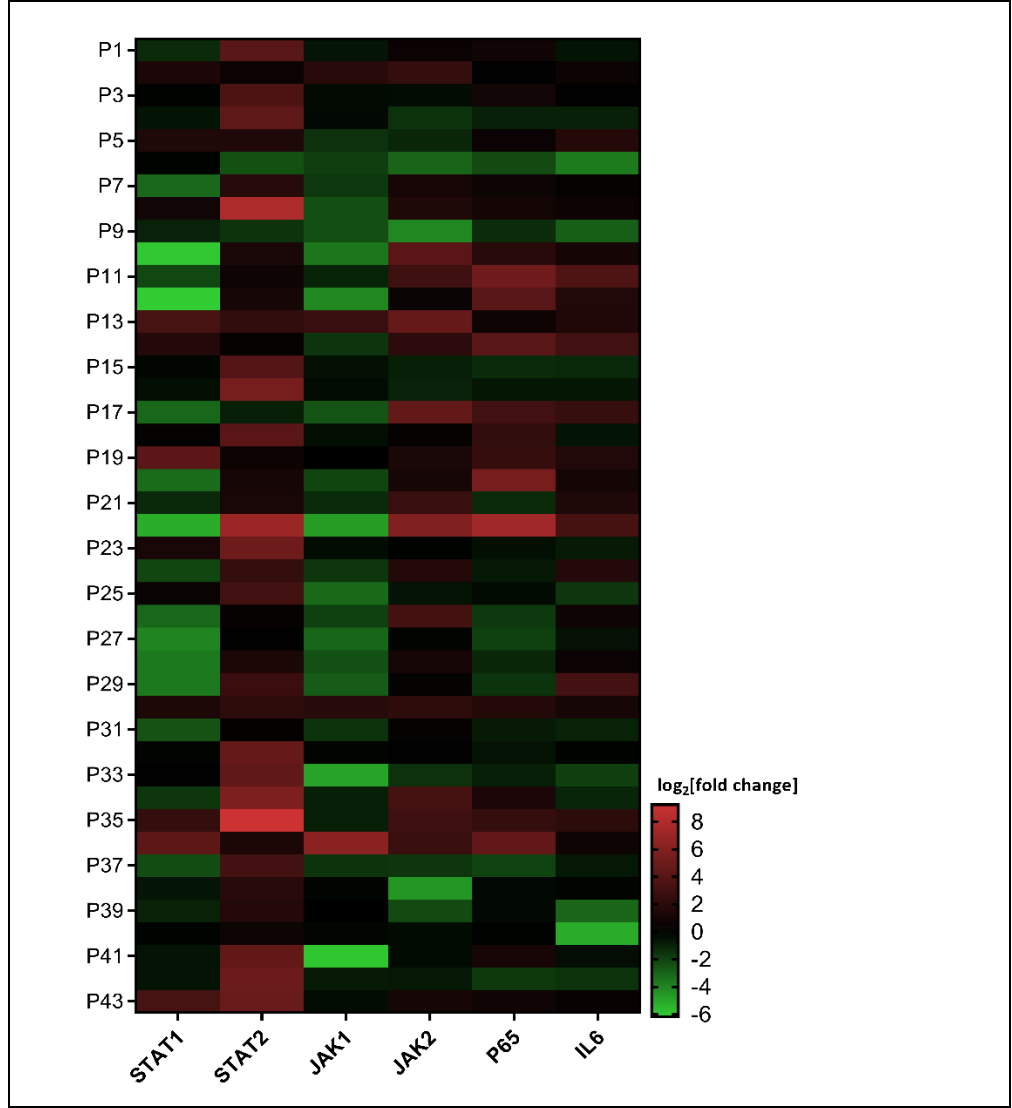


Şekil 7: İnfluenza B'ye karşı antikor artışı olanların aşı öncesi ve sonrası antikor titrelerinin karşılaştırılması ($p < 0,05$)

Katılımcıların gen ekspresyon ifadeleri incelendiğinde; STAT1 14 kişide (%32,6), STAT2 40 kişide (%93), JAK1 4 kişide (%9,3), JAK2 25 kişide (%58,1), NF- κ B 21 kişide (48,8), IL-6 23 kişide (%53,4) up regüle saptanmıştır. Tablo 7'de aşı sonrası gen ekspresyon ifadeleri karşılaştırılmıştır. Gen ifade değişimleri heatmap analizi ile şekil 8'de gösterilmiştir.

Tablo 7: Aşı sonrası gen ekspresyon ifadeleri

	Up regülasyon		Down regülasyon	
	n	n %	n	n %
STAT1	14	32,6	29	67,4
STAT2	40	93	3	7
JAK1	4	9,3	39	90,6
JAK2	25	58,1	18	41,9
NF-κB	21	48,8	22	51,1
IL-6	23	53,5	20	46,5



Şekil 8: Aşı sonrası gen ekspresyonlarının log₂ tabanında heatmap analizi ($p < 0,05$)

Çalışmaya dahil edilen kişilerden influenza A ve/veya B'den en az birine karşı antikor artışı olan 29 kişinin gen ekspresyon ifadeleri incelendiğinde; STAT1 9 kişide (%31), STAT2 26 kişide (%89,7), JAK1 3 kişide (%10,3), JAK2 19 kişide (%65,5), IL-6 18 kişide (%62,1) up regüle bulunmuştur. Tablo 8'de aşı sonrası influenza A ve/veya influenza B'ye karşı gelişen antikor artışı gen ekspresyonları ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 8: Aşı sonrası influenza A ve/veya influenza B'ye karşı gelişen antikor artışının gen ekspresyonları ile karşılaştırılması

Aşı sonrası influenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı						
		olan		olmayan		
Gen	Ekspresyon durumu	n	n %	n	n %	P değeri
STAT1	Up regülasyon	9	31	5	35,7	1
	Down regülasyon	20	69	9	64,3	
STAT2	Up regülasyon	26	89,7	14	100	0,539
	Down regülasyon	3	10,3	0	0	
JAK1	Up regülasyon	3	10,3	1	7,1	1
	Down regülasyon	26	89,7	13	92,9	
JAK2	Up regülasyon	19	65,5	6	42,9	0,279
	Down regülasyon	10	34,5	8	57,1	
NF-κB	Up regülasyon	14	48,3	7	50	1
	Down regülasyon	15	51,7	7	50	
IL6	Up regülasyon	18	62,1	5	35,7	0,195
	Down regülasyon	11	37,9	9	64,3	

Çalışmaya katılan kişilerden influenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı olanların, olmayanlara göre gen ekspresyonlarının ortalamasının karşılaştırılması; STAT1, antikor artışı olanlarda 2,28; olmayanlarda 1,49 bulunmuştur ($p=0,204$). STAT2, antikor artışı olanlarda 32,24; olmayanlarda 28,78 bulunmuştur ($p=0,031$). JAK1, antikor artışı olanlarda 3,26; grup 2'de 0,81 bulunmuştur ($p=0,062$). JAK2, antikor artışı olanlarda 6,31; olmayanlarda 1,57 bulunmuştur ($p=0,046$). NF-κB, antikor artışı olanlarda 9,75; olmayanlarda 3,62 bulunmuştur ($p=0,959$). IL-6, antikor artışı olanlarda 2,28; olmayanlarda 1,55 bulunmuştur ($p=0,108$). Mevcut veriler tablo 9'da incelenmiştir.

Tablo 9: İnfluenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı olanların olmayanlara göre gen ekspresyon ortalamalarının karşılaştırılması

	İnfluenza A ve/veya B'ye karşı artışı		p-mwu*
	olan (ortalama)	olmayan (ortalama)	
STAT1	2,28	1,49	0,204
STAT2	32,24	28,78	0,031
JAK1	3,26	0,81	0,062
JAK2	6,31	1,57	0,046
NF-κB	9,75	3,62	0,959
IL-6	2,28	1,55	0,108

*p değeri Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır

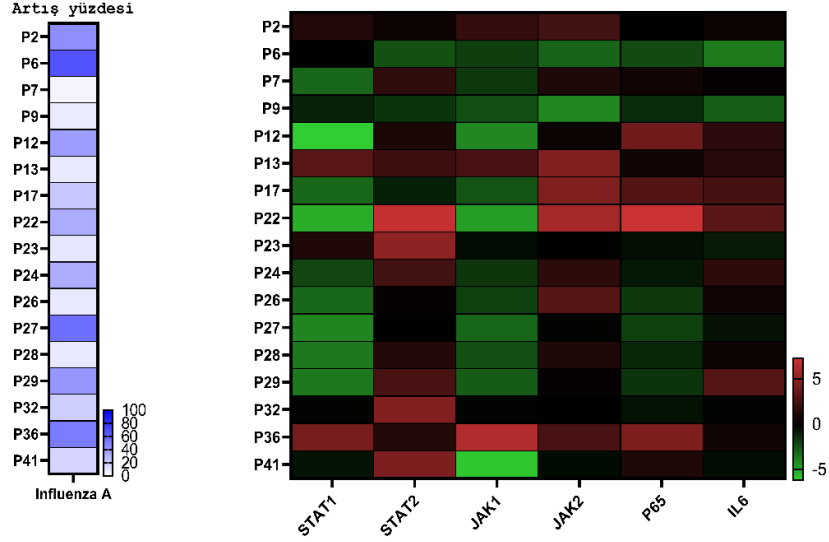
İnfluenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı olan kişilerin gen ekspresyonları yaşlara göre karşılaştırıldığında; STAT1 up regülasyonu olanların 7'si (%77,8), STAT2 up regülasyonu olanların 19'u (%73,1), JAK1 up regülasyonu olanların 3'ü (%100) JAK2 up regülasyonu olanların 17'si (%89,5), NF-κB up regülasyonu olanların %85,7'si, IL-6 up regülasyonu olanların 17'si (%94,4) 18-50 yaş aralığındaydı. Tablo 10'da influenza A veya B'ye karşı antikor artışı olan ve olmayanların gen ekspresyonlarının yaşlara göre karşılaştırılması incelenmiştir.

Tablo 10: İnfluenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı olan ve olmayanların gen ekspresyonlarının yaşlara göre karşılaştırılması

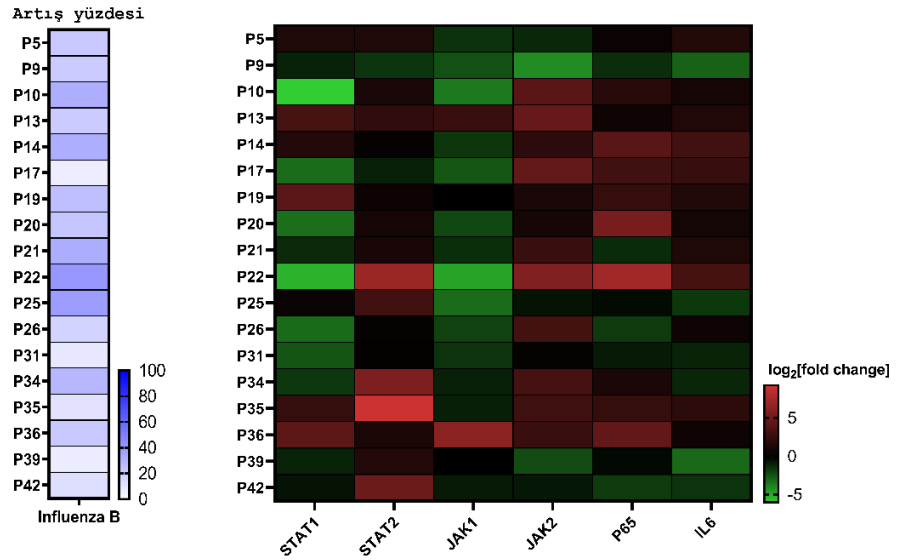
				Yaş				p
				18-50 yaş		50 yaş ve üstü		
				n	%	n	%	
İnfluenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı	Olan	STAT1	Up regülasyon	7	77,8	2	22,2	1
			Down regülasyon	15	75	5	25	
		STAT2	Up regülasyon	19	73,1	7	26,9	0,557
			Down regülasyon	3	100	0	0	
		JAK1	Up regülasyon	3	100	0	0	0,557
			Down regülasyon	19	73,1	7	26,9	
		JAK2	Up regülasyon	17	89,5	2	10,5	0,03
	Down regülasyon		5	50	5	50		
	NF-κB	Up regülasyon	12	85,7	2	14,3	0,39	
		Down regülasyon	10	66,7	5	33,3		
	IL-6	Up regülasyon	17	94,4	1	5,6	0,006	
		Down regülasyon	5	45,5	6	54,5		
	Olmayan	STAT1	Up regülasyon	3	60	2	40	1
			Down regülasyon	5	55,6	4	44,4	
STAT2		Up regülasyon	8	57,1	6	42,9	-	
		Down regülasyon	0	0	0	0		
JAK1		Up regülasyon	0	0	1	100	0,429	
		Down regülasyon	8	61,5	5	38,5		
JAK2		Up regülasyon	5	83,3	1	16,7	0,138	
		Down regülasyon	3	37,5	5	62,5		
P65		Up regülasyon	6	85,7	1	14,3	0,103	
		Down regülasyon	2	28,6	5	71,4		
IL6	Up regülasyon	4	80	1	20	0,301		
	Down regülasyon	4	44,4	5	55,6			

Aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı olanların gen ekspresyonlarının karşılaştırılması (Tablo 11); STAT1 up regülasyonu 4 kişide (%23,5), STAT2 up

regülasyonu 14 kişide (%82,4), JAK1 up regülasyonu 3 kişide (%17,6), JAK2 up regülasyonu 11 kişide (%64,7), NF- κ B up regülasyonu 7 kişide (%41,2), IL-6 up regülasyonu 11 kişide (%64,7) saptanmıştır. Şekil 9 (A)'da bu kişilerin antikor artış yüzdesi, şekil 9 (B)'de heatmap analizi gösterilmiştir.



Şekil 9: Aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı olanların antikor artış yüzdesi (A), bu kişilerin gen ekspresyonlarının log₂ tabanında heatmap analizi (B)



Şekil 10: Aşı sonrası influenza B'ye karşı antikor artışı olan hastaların antikor artış yüzdesi (A), bu kişilerin gen ekspresyonlarının log₂ tabanında heatmap analizi (B)

Tablo 11: Aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı olan ve olmayanların gen ekspresyonlarının karşılaştırılması

Aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı						
Gen	Ekspresyon durumu	olan		olmayan		p değeri
		n	n %	n	n %	
STAT1	Up regülasyon	4	23,5	10	38,5	0,491
	Down regülasyon	13	76,5	16	61,5	
STAT2	Up regülasyon	14	82,4	26	100	0,055
	Down regülasyon	3	17,6	0	0	
JAK1	Up regülasyon	3	17,6	1	3,8	0,284
	Down regülasyon	14	82,4	25	96,2	
JAK2	Up regülasyon	11	64,7	14	53,8	0,697
	Down regülasyon	6	35,3	12	46,2	
NF-κB	Up regülasyon	7	41,2	14	53,8	0,617
	Down regülasyon	10	58,8	12	46,2	
IL-6	Up regülasyon	11	64,7	12	46,2	0,379
	Down regülasyon	6	35,3	14	53,8	

Aşı sonrası influenza B'ye karşı antikor artışı olanların gen ekspresyonlarının karşılaştırılması (Tablo 12); STAT1 up regülasyonu 7 kişide (%38,9), STAT2 up regülasyonu 16 kişide (%88,9), JAK1 up regülasyonu 2 kişide (%11,1), JAK2 up regülasyonu 13 kişide (%72,2), NF-κB up regülasyonu 11 kişide (%61,1), IL-6 up regülasyonu 12 kişide (%66,7) saptanmıştır. Şekil 10 (A)'da bu kişilerin antikor artış yüzdesi, şekil 10 (B)'de heatmap analizi gösterilmiştir.

Tablo 12: Aşı sonrası influenza B'ye karşı gelişen antikor artışı olan ve olmayanların gen ekspresyonlarının karşılaştırılması

Aşı sonrası influenza B'ye karşı antikor artışı						
Gen	Ekspresyon durumu	olan		olmayan		p değeri
		n	n %	n	n %	
STAT1	Up regülasyon	7	38,9	7	28	0,673
	Down regülasyon	11	61,1	18	72	
STAT2	Up regülasyon	16	88,9	24	96	0,562
	Down regülasyon	2	11,1	1	4	
JAK1	Up regülasyon	2	11,1	2	8	1
	Down regülasyon	16	88,9	23	92	
JAK2	Up regülasyon	13	72,2	12	48	0,202
	Down regülasyon	5	27,8	13	52	
NF-κB	Up regülasyon	11	61,1	10	40	0,29
	Down regülasyon	7	38,9	15	60	
IL6	Up regülasyon	12	66,7	11	44	0,246
	Down regülasyon	6	33,3	14	56	

Aşı sonrası hem influenza A'ya karşı hem de influenza B'ye karşı antikor artışı olan 6 kişinin gen ekspresyon analizlerine bakıldığında; STAT2, JAK2 ve IL-6'da up regülasyon, STAT1, JAK1 ve NF-κB'de down regülasyon bulundu.

Antikor durumları cinsiyetlere göre karşılaştırıldığında; aşı öncesi influenza A'ya karşı antikoru pozitif olanlardan 19'u (%55,9) kadındı (p=0,281). Aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı olanların 9'u (%52,9) kadındı (p=1). Aşı sonrası influenza B'ye karşı antikor artışı olan kişilerin 10'u (55,6) erkekti. Aşı sonrası influenza A veya B'den en az birine karşı antikor artışı olanların 15'i (%51,7) erkekti (p=0,826). Tablo13'de antikor durumları cinsiyetlere göre karşılaştırılmıştır.

Tablo 13: İnfluenza antikor durumlarının cinsiyetlere göre karşılaştırılması

		Cinsiyet				p
		Kadın		Erkek		
		n	%	n	%	
Aşı öncesi influenza A'ya antikor pozitifliği	Olan	19	55,9	15	44,1	0,281
	Olmayan	3	33,3	6	66,7	
Aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı	Olan	9	52,9	8	47,1	1
	Olmayan	13	50	13	50	
Aşı sonrası influenza B'ye karşı antikor artışı	Olan	8	44,4	10	55,6	0,661
	Olmayan	14	56	11	44	
Aşı sonrası influenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı	Olan	14	48,3	15	51,7	0,826
	Olmayan	8	57,1	6	42,9	

İnfluenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı olan kişilerin gen ekspresyonları cinsiyetlere göre karşılaştırıldığında; STAT1 up regülasyonu olanların 5'i (%55,6), STAT2 up regülasyonu olanların 13'ü (%50), JAK1 up regülasyonu olanların 2'si (%66,7) kadındı. JAK2 up regülasyonu olanların 11'i (%57,9), NF-κB up regülasyonu olanların 10'u (%71,4), IL-6 up regülasyonu olanların 11'i (%66,7) erkekti. Tablo 14'de influenza A veya B'den en az birine karşı antikor durumunun gen ekspresyon analizleri cinsiyetlere göre karşılaştırılmıştır.

Tablo 14: İnfluenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı olan ve olmayanların gen ekspresyon analizlerinin cinsiyetlere göre karşılaştırılması

				Cinsiyet				p	
				Kadın		Erkek			
				n	%	n	%		
İnfluenza A ve/veya B'ye karşı antikor titesinde artış	olan	STAT1	Up regülasyon	5	55,6	4	44,4	0,7	
			Down regülasyon	9	45	11	55		
		STAT2	Up regülasyon	13	50	13	50	1	
			Down regülasyon	1	33,3	2	66,7		
		JAK1	Up regülasyon	2	66,7	1	33,3	0,598	
			Down regülasyon	12	46,2	14	53,8		
		JAK2	Up regülasyon	8	42,1	11	57,9	0,45	
			Down regülasyon	6	60	4	40		
		NF-κB	Up regülasyon	4	28,6	10	71,4	0,093	
			Down regülasyon	10	66,7	5	33,3		
		IL-6	Up regülasyon	7	38,9	11	61,1	0,264	
			Down regülasyon	7	63,6	4	36,4		
		olmayan	STAT1	Up regülasyon	2	40	3	60	0,58
				Down regülasyon	6	66,7	3	33,3	
STAT2	Up regülasyon		8	57,1	6	42,9	-		
	Down regülasyon		0	0	0	0			
JAK1	Up regülasyon		0	0	1	100	0,429		
	Down regülasyon		8	61,5	5	38,5			
JAK2	Up regülasyon		3	50	3	50	1		
	Down regülasyon		5	62,5	3	37,5			
NF-κB	Up regülasyon		4	57,1	3	42,9	1		
	Down regülasyon		4	57,1	3	42,9			
IL-6	Up regülasyon		2	40	3	60	0,58		
	Down regülasyon		6	66,7	3	33,3			

İnfluenza antikor durumlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması; aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği olanların 24'ü (%70,6), aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı olanların 14'ü (%82,4), aşı sonrası influenza B'ye karşı antikor artışı olanların 14'ü (%77,8), aşı sonrası influenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı olanların 22'si (%75,9) 18-50 yaş aralığında bulundu. Tablo 15'de antikor durumları yaş gruplarına göre karşılaştırılmıştır.

Tablo 15: Antikor durumlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması

		Yaş				P değeri
		18-50 yaş		50 yaş ve üzeri		
		n	n%	n	n%	
Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği	Olan	24	70,6	10	29,4	1
	Olmayan	6	66,7	3	33,3	
Aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı	Olan	14	82,4	3	17,6	0,266
	Olmayan	16	61,5	10	38,5	
Aşı sonrası influenza B'ye karşı antikor artışı	Olan	14	77,8	4	22,2	0,526
	Olmayan	16	64	9	36	
Aşı sonrası influenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı	Olan	22	75,9	7	24,1	1
	Olmayan	8	57,1	6	42,9	

İnfluenza antikor durumlarının mesleğe göre karşılaştırılması; aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği olanların 23'ü (%67,6), aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı olanların 10'u (%58,8), aşı sonrası influenza B'ye karşı antikor artışı olanların 11'i (%61,1), aşı sonrası influenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı olanların 17'si (%68,6) sağlık çalışanıydı. Antikor durumlarının mesleğe göre karşılaştırılması Tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 16: Antikor – meslek karşılaştırması

		Sağlık çalışanı		Diğer		p
		n	%	n	%	
Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği	Olan	23	67,6	11	32,4	0,122
	Olmayan	3	33,3	6	66,7	
Aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı	Olan	10	58,8	7	41,2	1
	Olmayan	16	61,5	10	38,5	
Aşı sonrası influenza B'ye karşı antikor artışı	Olan	11	61,1	7	38,9	1
	Olmayan	15	60	10	40	
Aşı sonrası influenza A ve/veya B'ye karşı antikor artışı	Olan	17	58,6	12	41,4	0,981
	Olmayan	9	64,3	5	35,7	

Aşı öncesi ve sonrası influenza A'ya karşı antikor durumlarının karşılaştırılması; influenza A'ya karşı antikor pozitifliği olan hastaların 12'sinde (%70,6) aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı bulunmuştur. Tablo 17'de aşı öncesi ve sonrası influenza A'ya karşı antikor durumları karşılaştırılmıştır.

Tablo 17: Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor durumunun aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artış durumuna göre karşılaştırılması

		Aşı sonrası influenza A'ya karşı antikor artışı				p
		Olan		Olmayan		
		n	%	n	%	
Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği	Olan	12	70,6	22	84,6	0,445
	Olmayan	5	29,4	4	15,4	

Tablo 18: Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği olan ve olmayanların son 2 yılda aşı/ILI öyküsü

Son 2 yılda		Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği				p
		Olan		Olmayan		
		n	%	n	%	
Aşı öyküsü	Olan	24	70,6%	4	44,4%	0,238
	Olmayan	10	29,4%	5	55,6%	
ILI öyküsü	Olan	13	38,2%	3	33,3%	1
	Olmayan	21	61,8%	6	66,7%	
Aşı ve/veya ILI öyküsü	Olan	33	97,1%	6	66,7%	0,024
	Olmayan	1	2,9%	3	33,3%	

Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği olanların 24'ünde (%70,6) aşı öyküsü, 13'ünde (%38,2) ILI öyküsü ve 33'ünde (%97,1) aşı ya da ILI öyküsünden en az biri mevcuttu (Tablo 18).

Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği olanlarla olmayanların aşı sonrası antikor titrelerindeki artış % karşılaştırıldığında sırasıyla %1,04 ve % 1,27 olarak bulunmuştur (p=0,296)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yüzyılda birçok infeksiyon hastalığının ve ölümlerin önlenmesi sağlayan aşılardan, başarısını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Örneğin standart aşı şemasına rağmen tamamen sağlıklı bireylerden %5-10'unda hepatit B, %2-10'unda kızamık aşısına immun yanıt oluşmamaktadır (171). Aşılarından sonra gelişen hem humoral hem de hücreli yanıtın üzerinde genetik kontrolün etkisi henüz çok iyi bilinmemektedir. İmmüngenetik çalışmalarda gösterilen single nükleotid polimorfizmler (SNPs) ve HLA sınıf I ve sınıf II, sitokinler, sitokin reseptörlerinde ve konjenital toll like reseptör (TLR) tepkileri aşılarla karşı farklı immun yanıtları kısmen açıklayabilir (135).

Çalışmamızda standart aşı, standart aşı uygulaması ile aşı antikor yanıtını etkileyebilecek çocuk yaş grubu, ileri yaş, gebelik, immunsuprese durum gibi faktörlerin olmadığı kişilerin genotipik özelliklerine göre aşı antikor yanıtlarını inceledik. İnfluenza için genetik polimorfizmler immun yanıtındaki varyasyonlara neden olmaktadır. Örneğin Utah'ta yapılan bir çalışmada influenza için ağır hastalığın genetik duyarlılık ile ilişkili olduğu bulunmuştur (172). Ancak grip aşılarda immun yanıtı etkileyip etkilemediğine dair az sayıda çalışma bulunmaktadır (152,173).

Temel olarak bağışıklık hücrelerinin hücreler arası sinyalleşme süreçleri, sitokinler, kemokinler ve hücre yüzeyi reseptörleri tarafından düzenlenir. Aşı yanıtının aşı antikor titresi, efektör B hücreleri, efektör T hücreleri, sitokinler ve interferon yanıtı ile değerlendirilir (11).

Genom düzeyinde transkripsiyonel analiz, viral infeksiyon mekanizmalarını ve aşılama konakçı yanıtını incelemek için yarar sağlamaktadır (174). NF-κB gibi anahtar düzenleyiciler ise birçok işlemi düzenler. Böyle bir ağ topolojisinin avantajı ise rasgele bir gendeki tek bir mutasyon ile total immun yanıt etkilenmez (11). JAK/STAT yolağı incelemeleri, aşı geliştirme çalışmalarında viral infeksiyonlarda hücreli bağışıklık tepkilerinin ölçülmesini sağlamaktadır (139). IL-6 sinyal yolağının JAK'ların fosforile olarak aktive olmasında büyük önemi bulunmaktadır. Hücre içi sinyal süreçleri farklı yollar tarafından yürütülür (örn TLR veya JAK/STAT). Gen düzenleyici ağlar hem hücre içi hem hücreler arası süreçleri kontrol eder. 2014 yılında yapılan bir çalışmada sarı humma aşısı yapılan 15 sağlıklı erişkinde 3. günde JAK-

STAT1 aktivitesinde büyük artış saptanmıştır (175). Biz de çalışmamızda influenza aşısı yapılan bireylerde JAK/STAT1/2, NFKB ve IL-6 yolaklarının gen ifadelerini değerlendirdik.

Literatürde influenza, hepatit B ve kızamık aşıları için yapılmış konak genetik faktörlerin immun cevaba etkisinin araştırıldığı birçok çalışmada farklı yöntemlerle antikor titresi ölçümleri yapılmıştır (176–178). Biz de çalışmamızda serum inhibitörlerinden etkilenmeyen ELISA yöntemi ile aşı antikor titresi ölçümünü tercih ettik (169).

Çalışmamızda ortalama yaş 40,2'ydi ve influenza aşısına karşı serokonversiyon gözlenen 29 kişinin çoğu (%75,9) genç yaş grubundaydı. Çok sayıda çalışmada yaşla birlikte humoral imunitenin azaldığı ve bu azalmanın B hücre yanıtındaki azalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (179–181). Çalışmamızda antikor serokonversiyonu olan kişilerin 50 yaş altı ve üstü kişilere göre karşılaştırılmasında, JAK2 ve IL-6 up regülasyon oranları %89,5 ve %94,4 ile 18-50 yaş grubunda anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır.

Literatürde trivalan influenza aşısı yapılan 60 yaş ve üzeri ileri yaş bireylerde influenza antikor titrelerinin aşının koruyuculuğunu tahmin etmek açısından güvenilir olmayabileceği, hücresel yanıtı ölçmek açısından T hücre yanıtlarının araştırılmasının aşı koruyuculuğu açısından daha iyi bir seçenek olabileceği bulunmuştur (179). Bizim çalışmamızdakine benzer şekilde bir başka çalışmada inaktif influenza aşısı yapılan ileri yaş bireylerde TNF-NF-κB yolak aktivasyonunu sağlayan ICOS+CD38+T helper hücrelerinin ileri yaşla birlikte arttığı ve bu artışın nötralize edici antikor üretimi ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (182). Bizim çalışmamızda da antikor serokonversiyonu olmayan 50 yaş üstü kişilerde STAT2'de belirgin Up regülasyon saptayarak antikor yanıtı olmasa da T hücre aracılı immun yanıtın geliştiğini düşünmekteyiz.

Bizim çalışmamızda aşı antikor yanıtı genç yaş grubunda daha yüksek bulunmuştu bununla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmadı. Aşı antikor yanıtları kadınlar ve erkeklerde birbirine yakın oranlarda bulundu. Çalışmamıza benzer şekilde yaş ve cinsiyete göre aşı antikor yanıtlarının araştırıldığı başka

çalışmalarda da influenza aşısı antikor yanıtı, yaşa ve cinsiyete göre bizim çalışmamızda olduğu gibi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (183,184).

Literatürde hem genç hem ileri yaşta kadınların influenza aşısı antikor yanıtlarının erkeklere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca yarım doz aşılama kadınların tam doz aşılama erkeklerle benzer antikor yanıtı oluşturdukları bildirilmiştir (185). Cinsiyet ilişkili steroid hormonlar immün hücrelerdeki (B hücreler, T hücreler) intersellüler reseptörlere direkt bağlanarak hormon duyarlı genlerin aktivasyonu ile enfeksiyon ve aşılar karşı gelişen immün yanıt üzerinde etkilidir (186). Literatürde testosteronun immünespresif etkisiyle ilgili yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (187). Testosteron düzeyi incelenen erkeklerde yapılan bir çalışmada testosteron düzeyi yüksek olanlarda lipid metabolizmasında yer alan gen ekspresyonunda artış olanlarda influenza aşısına antikor yanıtı düşük bulunmuştur (188). Çalışmamızda aşısı antikor yanıtları kadın ve erkek cinsiyetlere göre benzer oranlarda bulunmuştur.

Araştırmalarda aşısı sonrası serokonversiyon oranları oldukça farklı çıkmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalarda aşısı antikor yanıtı, influenza A için %18-%83 ve influenza B için %40-%44 olarak bulunmuştur (169,189–191). Aşısı sonrası serokonversiyon oranlarına baktığımızda çalışmamızda influenza A virüs subtipleri için %39,5 ve influenza B virüs soyları için literatürdeki çalışmalara benzer şekilde %41,8 bulunmuştur.

Bazı bireylerin aşısı öncesi düşük titrede de olsa koruyucu düzeyde antikora sahip olması, o kişilerin aynı influenza virüsleri ile daha önce karşılaştıklarını veya farklı influenza virüslerine karşı çapraz antikor ürettiklerini göstermektedir (192). Literatürde aşılama veya enfeksiyon sonrası influenza A'ya yönelik antikorların 18 aya kadar tespit edildiği gösterilmiştir (193). Bizim çalışmamızda da dahil edilen 43 kişinin 34'ünde (%79) aşısı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği saptanmıştır. Aşısı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği olanların 24'ünde (%70,6) aşısı öyküsü, 13'ünde (%38,2) ILI öyküsü ve 33'ünde (%97,1) aşısı ya da ILI öyküsünden en az biri mevcuttu. Sağlık çalışanlarımızın %88,4'ünde, diğer meslek gruplarından katılımcıların %64,7'sinde influenza A'ya karşı (H1N1 ve H3N2) antikor pozitifliği bulunmuştur. Sağlık çalışanlarının influenza virüsleri ile sık karşılaşması nedeniyle

oranın yüksek olduğunu düşünüyoruz. Bizim çalışmamıza benzer şekilde bir başka çalışmada da 53 sağlık çalışanı ve 29 poliklinik hastasının H1N1 IGG antikor düzeyi ELISA ile belirlenmiş. Antikor pozitiflik oranı sağlık çalışanlarında %43,3 ve poliklinik hastalarında %6,7 olduğu bildirilmiştir (183).

Aşılama öncesi antikor titresi daha yüksek olan bireylerin, aşılama öncesi ve sonrası titreleri arasında daha az farklılık görülmektedir (174,192). Biz de çalışmamızda aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği olanların olmayanlara göre aşı sonrası antikor titre artışının daha az olduğunu bulduk. Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği olanlarla olmayanların aşı sonrası antikor titrelerindeki artış % karşılaştırıldığında sırasıyla %1,04 ve % 1,27 olarak bulunmuştur

Daha önce yapılan influenza aşısı ve aşının çeşidinin de aşı antikor yanıtının titresini etkilediği ve bu yanıtın hafıza B hücrelerinden kaynaklandığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Aynı zamanda daha önce aşı ile karşılaşmak antikor tepkilerini azaltmaktadır (192,194,195). Bizim çalışmamızda ise daha önce influenza aşısı olanlarla olmayanların antikor titre artışları benzer oranlarda bulunmuştur. Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği olanların 24'ünde (%70,6) aşı öyküsü mevcuttu.

Çalışmamızda aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği olanların %55,9'u kadın %44,1'i erkekti. Aşı öncesi influenza A'ya karşı antikor pozitifliği cinsiyete, yaş gruplarına ve ortalama yaşa göre istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Cesur ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da aşı öncesi antikor pozitifliği cinsiyete ve yaşa göre istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (183). Tayland'da ileri yaş bireylerde yapılan bir çalışmada da bizim çalışmamıza benzer şekilde influenza A seroprevelansı cinsiyete göre farklı bulunmamıştır (196).

2011 yılında Teksas'ta yapılan 18-40 yaş arası 119 kişinin dahil edildiği bir çalışmada, IL-6, NFκβ ve JAK/STAT sinyal yollarının ilk 24 saatte belirgin up regüle olduğu ve 14, 28. günlerde ölçülen antikor serokonversiyonunun gen ekspresyonu ile güçlü bir şekilde korele olduğu saptanmıştır (174). Biz de çalışmamızda 14. günde aldığımız kanlarda gen ekspresyon yanıtlarını inceledik. Çalışmamızda influenza virüslerine antikor serokonversiyonu olan 29 kişinin hücre içi sinyal yolları ile ilişkili gen up regülasyon oranlarını, STAT2 için %89,7, JAK2 için

%65,5, IL-6 için %62,1 bulduk. Çalışmamızda gen kat ifade değişimlerinin ortalaması alındığında, serokonversiyon olan grupta serokonversiyon olmayan gruba göre JAK2 ve STAT2'nin kat ifade değişimleri istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p=0,031 ve p=0,046).

Çalışmamızdan farklı olarak 2008'de yapılan çok merkezli bir çalışmada, trivalan inaktif influenza aşılması sonrası serokonversiyon gözlenmesine rağmen JAK/STAT1/2 aktivitesinde artış saptanmamıştır. Canlı influenza aşısı sonrası antikor titreleri daha düşük olmasına rağmen JAK/STAT1/2 aktivitesinde belirgin artış bulunmuştur (197). Fakat çalışmamızda tek tip aşı kullanıldığı için böyle bir karşılaştırma yapmak mümkün olmamıştır.

ABD'de yapılan bir çalışmada influenza A/H7N7-A/H7N9 inaktive aşısı yapılanlarda antikor serokonversiyonu ve plazma IL-6 düzeyi belirlenmiş, aşıya serolojik yanıtla plazma IL-6 düzeyi arasında anlamlılık bulunmuştur (198). Biz çalışmamızda aşı sonrası IL-6 yolak aktivitesini değerlendirdik ve genç yaş popülasyonda IL-6 gen kat ifadesinin antikor yanıtı olan grupta daha yüksek olmasının anlamlı olduğunu bulduk. Ulaşabildiğimiz kadarıyla, influenza aşısı yapılanlarda IL-6 sinyal yolak aktivitesini inceleyen çalışmaya rastlayamadık.

Litaratürde başka çalışmalarda adjuvan kullanımının daha fazla sayıda yolağı daha erken ve daha fazla miktarda aktive ettiği gösterilmiştir(199,200).

2017 yılında yapılan adjuvanlı hepatit B aşılarının doğal bağışıklık tepkisine etkisini araştırdıkları çalışmada, AS01 ve AS03 adjuvanlı hepatit B aşısının uygulandığı bireylerde STAT1 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (194).

Bir başka çalışmada da aşıya karşı bağışık yanıtı arttırmak amacıyla NF-KB'yi indükleyen kinaz adjuvan olarak kullanmış ve NF-KB'nin spesifik aktivasyonu ile aşılardan etkinliğinin artırılabilceği öngörülmüştür (195). Bizim çalışmamızda bulmuş olduğumuz aşı antikor yanıtı olanlarda JAK2 ve STAT2 gen ifade kat sayısı anlamlılığı, bize aşı adjuvanı olarak bu yolakları indükleyen adjuvanların kullanılmasıyla aşılardan immun yanıtının artırılabilceğini düşündürmektedir.

İnfluenzaya karşı aşı yapılması, hastalıktan ve hastalığa bağlı gelişebilecek komplikasyonlardan yaklaşık %60 oranında korumaktadır. Ancak bir kısım hastada da ölçülebilir antikor saptanmamaktadır. Bizim çalışmamızda antikor yanıtı oluşumunu engelleyen altta yatan durumlar dışlanmıştır. Bununla birlikte antikor yanıtı olmayanlarda gen ekspresyonu olduğu görülmüştür. Bu da ölçülebilir antikor düzeyi olmasa bile gen ekspresyonunun olması aşı yanıtının olduğunu düşündürmüştür. Aşı antikor yanıtı ile hücre içi sinyal yollarının anlamlı bir ilişkisi bulunmaktadır. Aşı antikor yanıtı olanlarda JAK2 ve STAT2 gen ifade kat sayı anlamlılığı aşı antikor çalışmalarına ve yeni aşı çalışmalarının geliştirilmesine yol gösterici olabilir. Bu ve benzeri yolların gen ifadesi düzeyinde değerlendirilmesi kişilerin aşuya yanıtta farklılıklarını ortaya koyabilir.

Yaş artışı ile birlikte ileri yaş bireylerde aşı antikor yanıtı belirgin olarak azalmaktadır. Aşı polikliniğine başvuran ileri yaş bireyler için influenza aşılması fırsat olarak değerlendirilmeli ve aşılmasının yapılması gerekmektedir. Çalışmamızda antikor serokonversiyonu olan kişilerin 50 yaş altı ve üstü kişilere göre karşılaştırılmasında, JAK2 ve IL-6 up regülasyon oranları %89,5 ve %94,4 ile 18-50 yaş grubunda anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır. İleri yaş bireylerde aşı antikor yanıtının artırılması amacıyla bu yolların aktivasyonunu sağlayan adjuvanların geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılabilir.

Ülkemizde aşı antikor yanıtı ile ilişkili hücre içi sinyal yollarının değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma sınırlı bir popülasyonda ve tek bir merkezde yapılmıştır. Daha farklı coğrafi bölgelerde, daha büyük bir popülasyonda, daha fazla sayıda merkezde ve daha fazla gen düzeyinde bu sonuçları irdeleyen çalışmalara gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Treanor JJ. Influenza Viruses, Including Avian Influenza and Swine Influenza. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020. p. 2143-2168
2. Global_Influenza_Strategy_2019_2030_Summary_English.pdf [Internet]. [cited 2021 Aug 9]. Available from: https://www.who.int/influenza/Global_Influenza_Strategy_2019_2030_Summary_English.pdf
3. Putri WCWS, Muscatello DJ, Stockwell MS, Newall AT. Economic burden of seasonal influenza in the United States. *Vaccine*. 2018;36(27):3960–6.
4. CDC. Children & Influenza (Flu) [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [cited 2021 Aug 9]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/children.htm>
5. CDC. People at High Risk of Flu [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [cited 2021 Jun 19]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/index.htm>
6. Francis T, Salk JE, Pearson HE, Brown PN. Protective Effect Of Vaccination Against Induced Influenza A 1. *J Clin Invest*. 1945;24(4):536–46.
7. WHO | World Health Organization [Internet]. WHO. World Health Organization; [cited 2020 Nov 23]. Available from: <http://www.who.int/influenza/vaccines/use/en/>
8. CDC. Flu Vaccines Benefits [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [cited 2021 Aug 9]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/prevent/vaccine-benefits.htm>
9. Rondy M, El Omeiri N, Thompson MG, Levêque A, Moren A, Sullivan SG. Effectiveness of influenza vaccines in preventing severe influenza illness among adults: A systematic review and meta-analysis of test-negative design case-control studies. *J Infect*. 2017;75(5):381–94.
10. Lambkin R, Novelli P, Oxford J, Gelder C. Human genetics and responses to influenza vaccination: clinical implications. *Am J Pharmacogenomics*. 2004;4(5):293–8.
11. Linnik JE, Egli A. Impact of host genetic polymorphisms on vaccine induced antibody response. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(4):907–15.
12. Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM. Immunogenetics of Seasonal Influenza Vaccine Response. *Vaccine*. 2008;26(Suppl 4):D35–40.
13. Wen F, Guo J, Li Z, Huang S. Sex-specific patterns of gene expression following influenza vaccination. *Scientific Reports*. 2018;8(1):13517.

14. Ludwig S, Planz O. Influenza viruses and the NF-kappaB signaling pathway - towards a novel concept of antiviral therapy. *Biol Chem.* 2008;389(10):1307–12.
15. Akira S, Kishimoto T. IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection. *Immunol Rev.* 1992;127:25–50.
16. Dienz O, Rud JG, Eaton SM, Lanthier PA, Burg E, Drew A, et al. Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung. *Mucosal Immunol.* 2012;5(3):258–66.
17. Pappas G, Kiriaze IJ, Falagas ME. Insights into infectious disease in the era of Hippocrates. *International Journal of Infectious Diseases.* 2008;12(4):347–50.
18. Introduction to pandemic influenza | British Columbia Medical Journal [Internet]. [cited 2020 Aug 20]. Available from: <https://bcmj.org/articles/introduction-pandemic-influenza#3>
19. 1918 Pandemic (H1N1 virus) | Pandemic Influenza (Flu) | CDC [Internet]. 2020 [cited 2020 Aug 20]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/1918-pandemic-h1n1.html>
20. Mamelund S-E. Howard Phillips and David Killingray (eds.), *The Spanish Influenza Pandemic of 1918-19: New Perspectives*. Population and Development Review. 2004;30(2):362–5.
21. Langmuir AD. Epidemiology of Asian Influenza. *Am Rev Respir Dis.* 1961;83(2P2):2–14.
22. Cockburn WC, Delon PJ, Ferreira W. Origin and progress of the 1968-69 Hong Kong influenza epidemic. *Bull World Health Organ.* 1969;41(3-4-5):343–8.
23. Viboud C, Grais RF, Lafont BAP, Miller MA, Simonsen L. Multinational Impact of the 1968 Hong Kong Influenza Pandemic: Evidence for a Smoldering Pandemic. *The Journal of Infectious Diseases.* 2005;192(2):233–48.
24. Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet.* 1998;351(9101):472–7.
25. Highly Pathogenic Asian Avian Influenza A(H5N1) Virus | Avian Influenza (Flu) [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/h5n1-virus.htm>
26. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science.* 2009;325(5937):197–201.

27. Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, et al. Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *N Engl J Med*. 2009;361(20):1945–52.
28. CDC. 2009 H1N1 Pandemic [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2019 [cited 2021 Aug 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/2009-h1n1-pandemic.html>
29. Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP, Timbury MC. A Virus obtained from influenza patients. *Rev Med Virol*. 1995;5(4):187–91.
30. Francis T. A NEW TYPE OF VIRUS FROM EPIDEMIC INFLUENZA. *Science*. 1940;92(2392):405–8.
31. Taylor RM. A further note on 1233 influenza C virus. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1951;4(4):485–500.
32. Hirst GK. The Agglutination Of Red Cells By Allantoic Fluid Of Chick Embryos Infected With Influenza Virus. *Science*. 1941;94(2427):22–3.
33. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Orthomyxoviruses. In: *Medical Microbiology*. 9th ed. Elsevier; 2020. p. 490-499
34. Whittaker G, Bui M, Helenius A. The role of nuclear import and export in influenza virus infection. *Trends in Cell Biology*. 1996;6(2):67–71.
35. Heo Y-A. Baloxavir: First Global Approval. *Drugs*. 2018;78(6):693–7.
36. CDC. Flu Season [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [cited 2021 Sep 2]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/season/index.html>
37. Flu Season Numbers for 2020/21 | Health Hive [Internet]. [cited 2021 Jun 11]. Available from: <https://hive.rochesterregional.org/2020/01/flu-season-2020>
38. Weekly U.S. Influenza Surveillance Report | CDC [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 2]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/weekly/index.htm>
39. Müdür G, Kara DF. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. 2020;61.
40. Müdür - 2020 - T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü.pdf [Internet]. [cited 2021 Oct 14]. Available from: https://grip.gov.tr/depo/influenza-raporu/2020/Haftalk_nfluenzaGrip_Srveyans_Raporu_2020_9._hafta.pdf
41. CDC. How Flu Spreads [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2018 [cited 2021 Aug 11]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/about/disease/spread.htm>

42. Fukuyama S, Kawaoka Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(4):481–6.
43. Boktor SW, Hafner JW. Influenza. 2021 Jul 18. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 29083802.
44. Hinshaw VS, Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N, Evans D. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J Virol.* 1994;68(6):3667–73.
45. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature.* 2006;440(7083):435–6.
46. Herold S, Becker C, Ridge KM, Budinger GRS. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. *Eur Respir J.* 2015;45(5):1463–78.
47. Walsh JJ, Dietlein LF, Low FN, Burch GE, Mogabgab WJ. Bronchotracheal Response in Human Influenza: Type A, Asian Strain, as Studied by Light and Electron Microscopic Examination of Bronchoscopic Biopsies. *Arch Intern Med.* 1961;108(3):376–88.
48. Soderberg M, Hellstrom S, Lundgren R, Bergh A. Bronchial epithelium in humans recently recovering from respiratory infections caused by influenza or *Mycoplasma*. :6.
49. Oseasohn R, Adelson L, Kaji M. Clinicopathologic Study of Thirty-Three Fatal Cases of Asian Influenza. *N Engl J Med.* 1959;260(11):509–18.
50. Muir R. The pathology of influenza. by M. C. Winternitz, Isabel M. Wason, and Frank P. McNamara. New Haven: Yale University Press, 1920; Oxford: The Clarendon Press. *J Pathol.* 1922;25(2):279–80.
51. Taubenberger JK, Morens DM. The Pathology of Influenza Virus Infections. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:499–522.
52. King TE. Clinical Advances in the Diagnosis and Therapy of the Interstitial Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(3):268–79.
53. Chen X, Liu S, Goraya MU, Maarouf M, Huang S, Chen J-L. Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Front Immunol.* 2018;9:320.
54. Wei H, Wang S, Chen Q, Chen Y, Chi X, Zhang L, et al. Suppression of Interferon Lambda Signaling by SOCS-1 Results in Their Excessive Production during Influenza Virus Infection. *PLoS Pathog.* 2014;10(1):e1003845.

55. Majde JA. Viral double-stranded RNA, cytokines, and the flu. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20(3):259–72.
56. Kujime K, Hashimoto S, Gon Y, Shimizu K, Horie T. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Jun-NH₂-Terminal Kinase Regulate RANTES Production by Influenza Virus-Infected Human Bronchial Epithelial Cells. *The Journal of Immunology.* 2000;164(6):3222–8
57. Rehwinkel J, Tan CP, Goubau D, Schulz O, Pichlmair A, Bier K, et al. RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell.* 2010;140(3):397–408.
58. Hiscott J, Lin R, Nakhaei P, Paz S. MasterCARD: a priceless link to innate immunity. *Trends Mol Med.* 2006;12(2):53–6.
59. García-Sastre A. Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology.* 2001;279(2):375–84.
60. Ludwig S, Wang X, Ehrhardt C, Zheng H, Donelan N, Planz O, et al. The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol.* 2002;76(21):11166–71.
61. Wang X, Li M, Zheng H, Muster T, Palese P, Beg AA, et al. Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol.* 2000;74(24):11566–73.
62. Talon J, Horvath CM, Polley R, Basler CF, Muster T, Palese P, et al. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol.* 2000;74(17):7989–96.
63. Chomik M. Interferon induction by influenza virus: significance of neuraminidase. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1981;29(1):109–104.
64. Schultz-Cherry S, Hinshaw VS. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. *J Virol.* 1996;70(12):8624–9.
65. Callard RE, Smith CM. Histocompatibility requirements for T cell help in specific in vitro antibody responses to influenza virus by human blood lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1981;11(3):206–12.
66. Rott O, Charreire J, Semichon M, Bismuth G, Cash E. B cell superstimulatory influenza virus (H2-subtype) induces B cell proliferation by a PKC-activating, Ca(2+)-independent mechanism. *J Immunol.* 1995;154(5):2092–103.
67. Flory E, Kunz M, Scheller C, Jassoy C, Stauber R, Rapp UR, et al. Influenza virus-induced NF-kappaB-dependent gene expression is mediated by overexpression of viral proteins and involves oxidative radicals and activation of IkappaB kinase. *J Biol Chem.* 2000;275(12):8307–14.

68. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:513–45.
69. Hayden FG, Fritz R, Lobo MC, Alvord W, Strober W, Straus SE. Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense. *J Clin Invest.* 1998;101(3):643–9.
70. Peiris JSM, Yu WC, Leung CW, Cheung CY, Ng WF, Nicholls JM, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet.* 2004;363(9409):617–9.
71. Qian W, Wei X, Guo K, Li Y, Lin X, Zou Z, et al. The C-Terminal Effector Domain of Non-Structural Protein 1 of Influenza A Virus Blocks IFN- β Production by Targeting TNF Receptor-Associated Factor 3. *Front Immunol.* 2017;8:779.
72. Lam WY, Tang JW, Yeung ACM, Chiu LCM, Sung JJY, Chan PKS. Avian influenza virus A/HK/483/97(H5N1) NS1 protein induces apoptosis in human airway epithelial cells. *J Virol.* 2008;82(6):2741–51.
73. Kreijtz JHCM, Fouchier RAM, Rimmelzwaan GF. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Research.* 2011;162(1):19–30.
74. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4⁺ T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(2):136–48.
75. Krammer F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(6):383–97.
76. Ji S, Ed K. Independent variation in nature of hemagglutinin and neuraminidase antigens of influenza virus: distinctiveness of hemagglutinin antigen of Hong Kong-68 virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969;63(2):326–33.
77. Monto AS, Petrie JG, Cross RT, Johnson E, Liu M, Zhong W, et al. Antibody to Influenza Virus Neuraminidase: An Independent Correlate of Protection. *J Infect Dis.* 2015;212(8):1191–9.
78. Babu TM, Perera RAPM, Wu JT, Fitzgerald T, Nolan C, Cowling BJ, et al. Population Serologic Immunity to Human and Avian H2N2 Viruses in the United States and Hong Kong for Pandemic Risk Assessment. *J Infect Dis.* 2018;218(7):1054–60.
79. Clinical Signs and Symptoms of Influenza | CDC [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 13]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/professionals/acip/clinical.htm>
80. Cate TR. Clinical manifestations and consequences of influenza. *The American Journal of Medicine.* 1987;82(6):15–9.

81. Influenza (flu) - Symptoms and causes [Internet]. Mayo Clinic. [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/flu/symptoms-causes/syc-20351719>
82. Flu & People 65 Years and Older | CDC [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 14]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/65over.htm>
83. CDC. Flu & Pregnant Women [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [cited 2021 Aug 14]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/pregnant.htm>
84. CDC. Heart Disease & Stroke [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [cited 2021 Aug 14]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/heartdisease.htm>
85. Kwong JC, Schwartz KL, Campitelli MA, Chung H, Crowcroft NS, Karnauchow T, et al. Acute Myocardial Infarction after Laboratory-Confirmed Influenza Infection. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(4):345–53.
86. Chow EJ, Rolfes MA, O'Halloran A, Anderson EJ, Bennett NM, Billing L, et al. Acute Cardiovascular Events Associated With Influenza in Hospitalized Adults. *Ann Intern Med*. 2020;173(8):605–13.
87. Monto AS, Gravenstein S, Elliott M, Colopy M, Schweinle J. Clinical Signs and Symptoms Predicting Influenza Infection. *Arch Intern Med*. 2000;160(21):3243.
88. CDC. Cold Versus Flu [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cited 2021 Jun 30]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/symptoms/coldflu.htm>
89. Avci E. Pandemiik İinfluenza Ulusal Hazırlık Planı. :229.
90. Vemula SV, Zhao J, Liu J, Wang X, Biswas S, Hewlett I. Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. *Viruses* [Internet]. 2016 Apr 12 [cited 2021 Jun 30];8(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848591/>
91. Newton DW, Mellen CF, Baxter BD, Atmar RL, Menegus MA. Practical and Sensitive Screening Strategy for Detection of Influenza Virus. *J Clin Microbiol*. 2002;40(11):4353–6.
92. Bell J, Bonner A, Cohen DM, Birkhahn R, Yogeve R, Triner W, et al. Multicenter clinical evaluation of the novel Alere™ i Influenza A&B isothermal nucleic acid amplification test. *J Clin Virol*. 2014;61(1):81–6.
93. Cruz AT, Demmler-Harrison GJ, Caviness AC, Buffone GJ, Revell PA. Performance of a rapid influenza test in children during the H1N1 2009 influenza a outbreak. *Pediatrics*. 2010;125(3):e645-650.

94. Covalciuc KA, Webb KH, Carlson CA. Comparison of Four Clinical Specimen Types for Detection of Influenza A and B Viruses by Optical Immunoassay (FLU OIA Test) and Cell Culture Methods. *J Clin Microbiol.* 1999 ;37(12):3971–4.
95. Research C for BE and. FDA Information Regarding FluMist Quadrivalent Vaccine. FDA [Internet]. 2019 Apr 23 [cited 2020 Aug 21]; Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/fda-information-regarding-flumist-quadrivalent-vaccine>
96. Commissioner O of the. FDA approves new drug to treat influenza [Internet]. FDA. FDA; 2020 [cited 2021 May 28]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-drug-treat-influenza>
97. Takeda M, Pekosz A, Shuck K, Pinto LH, Lamb RA. Influenza A Virus M2 Ion Channel Activity Is Essential for Efficient Replication in Tissue Culture. *J Virol.* 2002;76(3):1391–9.
98. Chang C, Ramphul K. Amantadine. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cited 2020 Nov 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499953/>
99. Hayden FG, Minocha A, Spyker DA, Hoffman HE. Comparative single-dose pharmacokinetics of amantadine hydrochloride and rimantadine hydrochloride in young and elderly adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28(2):216–21.
100. CDC. Influenza Antiviral Medications: Clinician Summary [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [cited 2021 Jun 30]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm>
101. Research C for DE and. Relenza (zanamivir) Information. FDA [Internet]. 2018 Mar 11 [cited 2021 Aug 13]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/relenza-zanamivir-information>
102. McClellan K, Perry CM. Oseltamivir. *Drugs.* 2001;61(2):263–83.
103. Commissioner O of the. FDA Expands Approval of Influenza Treatment to Post-Exposure Prevention [Internet]. FDA. FDA; 2020 [cited 2021 Aug 13]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-expands-approval-influenza-treatment-post-exposure-prevention>
104. Uyeki TM, Bernstein HH, Bradley JS, Englund JA, File TM, Fry AM, et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America: 2018 Update on Diagnosis, Treatment, Chemoprophylaxis, and Institutional Outbreak Management of Seasonal Influenza. *Clinical Infectious Diseases.* 2019;68(6):e1–47.

105. Thomas Francis J. Protective Effect Of Vaccination Against Induced Influenza A. *Journal of Clinical Investigation*. 1945;24(4):536.
106. Maassab HF. Biologic and Immunologic Characteristics of Cold-Adapted Influenza Virus. *The Journal of Immunology*. 1969;102(3):728–32.
107. Commissioner O of the. Seasonal Flu (Influenza) and the FDA. FDA [Internet]. 2020 Oct 27 [cited 2020 Nov 18]; Available from: <https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/seasonal-flu-influenza-and-fda>
108. How Influenza (Flu) Vaccines Are Made | CDC [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 4]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/prevent/how-fluvaccine-made.htm>
109. Pérez Rubio A, Eiros JM. Cell culture-derived flu vaccine: Present and future. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14(8):1874–82.
110. Universal Influenza Vaccine Research | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases [Internet]. [cited 2020 Nov 20]. Available from: <http://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/universal-influenza-vaccine-research>
111. CDC Seasonal Flu Vaccine Effectiveness Studies | CDC [Internet]. 2020 [cited 2020 Nov 21]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/effectiveness-studies.htm>
112. Luke CJ, Lakdawala SS, Subbarao K. Influenza Vaccine—Live. In: Plotkin’s Vaccines. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018. p. 489-510
113. CDC. Selecting Viruses for the Seasonal Flu Vaccine [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cited 2020 Nov 19]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/prevent/vaccine-selection.htm>
114. Bossuyt N, Damme PV, Grammens T, Nadezhda V, Filipova R, Kaić B, et al. Seasonal influenza vaccination and antiviral use in EU/EEA Member States – Overview of vaccine recommendations for 2017–2018 and vaccination coverage rates for 2015–2016 and 2016–2017 influenza seasons. :54.
115. Gomez PL, Robinson JM. Vaccine Manufacturing. In: Plotkin’s Vaccines. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018. p. 51-60
116. Research C for BE and. FLUAD. FDA [Internet]. 2021 Jun 7 [cited 2021 Sep 6]; Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/fluad>
117. Research C for BE and. Fluzone Quadrivalent, Fluzone High-Dose Quadrivalent, Fluzone, Intradermal Quadrivalent, Fluzone Quadrivalent Southern Hemisphere. FDA [Internet]. 2021 Jun 7 [cited 2021 Sep 6]; Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/fluzone>

biologics/vaccines/fluzone-quadrivalent-fluzone-high-dose-quadrivalent-fluzone-intradermal-quadrivalent-fluzone

118. Nichol KL, Margolis KL, Lind A, Murdoch M, McFadden R, Hauge M, et al. Side effects associated with influenza vaccination in healthy working adults. A randomized, placebo-controlled trial. *Arch Intern Med.* 1996;156(14):1546–50.
119. CDC. Who Should and Who Should NOT Get Vaccinated [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cited 2020 Nov 23]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/prevent/whoshouldvax.htm>
120. CDC. Flu Vaccine and People with Egg Allergies [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cited 2020 Nov 17]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/prevent/egg-allergies.htm>
121. Cell-Based Flu Vaccines | CDC [Internet]. 2020 [cited 2020 Nov 17]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/prevent/cell-based.htm>
122. Treanor JJ, El Sahly H, King J, Graham I, Izikson R, Kohberger R, et al. Protective efficacy of a trivalent recombinant hemagglutinin protein vaccine (FluBlok®) against influenza in healthy adults: a randomized, placebo-controlled trial. *Vaccine.* 2011;29(44):7733–9.
123. Frey S, Vesikari T, Szymczakiewicz-Multanowska A, Lattanzi M, Izu A, Groth N, et al. Clinical efficacy of cell culture–derived and egg-derived inactivated subunit influenza vaccines in healthy adults. *Clin Infect Dis.* 2010;51(9):997–1004.
124. Barrett PN, Berezuk G, Fritsch S, Aichinger G, Hart MK, El-Amin W, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of a Vero-cell-culture-derived trivalent influenza vaccine: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2011;377(9767):751–9.
125. Seasonal Influenza Vaccine Safety: A Summary for Clinicians | CDC [Internet]. 2020 [cited 2021 May 20]. Available from: https://www.cdc.gov/flu/professionals/vaccination/vaccine_safety.htm
126. Influenza Vaccine Production and Design | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases [Internet]. [cited 2020 Nov 20]. Available from: <http://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/influenza-vaccine-production-and-design>
127. Research C for BE and. Flublok Quadrivalent. FDA [Internet]. 2020 Feb 7 [cited 2020 Nov 17]; Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/flublok-quadrivalent>
128. Recombinant Influenza (Flu) Vaccine | CDC [Internet]. 2020 [cited 2020 Nov 17]. Available from: https://www.cdc.gov/flu/prevent/qa_flublok-vaccine.htm

129. Dhillon S, Curran MP. Live attenuated measles, mumps, rubella, and varicella zoster virus vaccine (Priorix-Tetra). *Paediatr Drugs*. 2008;10(5):337–47.
130. Prevention and Control of Influenza Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) [Internet]. [cited 2020 Oct 29]. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5510a1.htm>
131. Krogsgaard M, Davis MM. How T cells “see” antigen. *Nat Immunol*. 2005;6(3):239–45.
132. O’Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med*. 2004;10(8):801–5.
133. Shahid Z, Kleppinger A, Gentleman B, Falsey AR, McElhaney JE. Clinical and immunologic predictors of influenza illness among vaccinated older adults. *Vaccine*. 2010;28(38):6145–51.
134. Mostow SR, Schoenbaum SC, Dowdle WR, Coleman MT, Kaye HS, Hierholzer JC. Studies on inactivated influenza vaccines. II. Effect of increasing dosage on antibody response and adverse reactions in man. *Am J Epidemiol*. 1970;92(4):248–56.
135. Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM, Smith DI. Heterogeneity in vaccine immune response: the role of immunogenetics and the emerging field of vaccinomics. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82(6):653–64.
136. Posteraro B, Pastorino R, Di Giannantonio P, Ianuale C, Amore R, Ricciardi W, et al. The link between genetic variation and variability in vaccine responses: systematic review and meta-analyses. *Vaccine*. 2014;32(15):1661–9.
137. Gelder CM, Lambkin R, Hart KW, Fleming D, Williams OM, Bunce M, et al. Associations between Human Leukocyte Antigens and Nonresponsiveness to Influenza Vaccine. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002;185(1):114–7.
138. Moss AJ, Gaughran FP, Karasu A, Gilbert AS, Mann AJ, Gelder CM, et al. Correlation between human leukocyte antigen class II alleles and HAI titers detected post-influenza vaccination. *PLoS One*. 2013;8(8):e71376.
139. Bouwman W, Verhaegh W, Holtzer L, van de Stolpe A. Measurement of Cellular Immune Response to Viral Infection and Vaccination. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Jul 2];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.575074/full>
140. Longhi MP, Wright K, Lauder SN, Nowell MA, Jones GW, Godkin AJ, et al. Interleukin-6 Is Crucial for Recall of Influenza-Specific Memory CD4+ T Cells. *PLOS Pathogens*. 2008;4(2):e1000006.

141. NFKB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histology and Histopathology*. 2007;(22):1387–98.
142. Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev*. 2006;210(1):171–86.
143. Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol*. 1990;10(5):2327–34.
144. Dienz O, Eaton SM, Bond JP, Neveu W, Moquin D, Noubade R, et al. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(1):69–78.
145. Harrison DA. The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(3):a011205.
146. 146. Gotthardt D, Trifinopoulos J, Sexl V, Putz EM. JAK/STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:2590.
147. Lerman SJ, Wright PF, Patil KD. Antibody decline in children following A/New Jersey/76 influenza virus immunization. *The Journal of Pediatrics*. 1980;96(2):271–4.
148. Cox RJ, Brokstad KA, Zuckerman MA, Wood JM, Haaheim LR, Oxford JS. An early humoral immune response in peripheral blood following parenteral inactivated influenza vaccination. *Vaccine*. 1994;12(11):993–9.
149. Danke NA, Kwok WW. HLA Class II-Restricted CD4+ T Cell Responses Directed Against Influenza Viral Antigens Postinfluenza Vaccination. *The Journal of Immunology*. 2003;171(6):3163–9.
150. Nayak JL, Fitzgerald TF, Richards KA, Yang H, Treanor JJ, Sant AJ. CD4+ T-Cell Expansion Predicts Neutralizing Antibody Responses to Monovalent, Inactivated 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Subtype H1N1 Vaccine. *J Infect Dis*. 2013;207(2):297–305.
151. Krnic EK, Gagro A, Drazenovic V, Kuzman I, Jeren T, Cecuk-Jelicic E, et al. Enumeration of Haemagglutinin-specific CD8+ T Cells after Influenza Vaccination Using MHC Class I Peptide Tetramers. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2008;67(1):86–94.
152. McElhaney JE, Xie D, Hager WD, Barry MB, Wang Y, Kleppinger A, et al. T Cell Responses Are Better Correlates of Vaccine Protection in the Elderly. *The Journal of Immunology*. 2006;176(10):6333–9.
153. Falsey AR, Treanor JJ, Tornieporth N, Capellan J, Gorse GJ. Randomized, Double-Blind Controlled Phase 3 Trial Comparing the Immunogenicity of

High-Dose and Standard-Dose Influenza Vaccine in Adults 65 Years of Age and Older. *The Journal of Infectious Diseases*. 2009;200(2):172–80.

154. Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine*. 2001;19(17):2673–80.
155. Frey SE, Reyes MRA-DL, Reynales H, Bermal NN, Nicolay U, Narasimhan V, et al. Comparison of the safety and immunogenicity of an MF59®-adjuvanted with a non-adjuvanted seasonal influenza vaccine in elderly subjects. *Vaccine*. 2014;32(39):5027–34.
156. Duchini A, Goss JA, Karpen S, Pockros PJ. Vaccinations for Adult Solid-Organ Transplant Recipients: Current Recommendations and Protocols. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(3):357–64.
157. Mohty B, Bel M, Vukicevic M, Nagy M, Levrat E, Meier S, et al. Graft-versus-host disease is the major determinant of humoral responses to the AS03-adjuvanted influenza A/09/H1N1 vaccine in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica*. 2011;96(6):896–904.
158. Salles MJC, Sens YAS, Boas LSV, Machado CM. Influenza virus vaccination in kidney transplant recipients: serum antibody response to different immunosuppressive drugs. *Clinical Transplantation*. 2010;24(1):E17–23.
159. Nelson KE. The Influence of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection on Antibody Responses to Influenza Vaccines. *Ann Intern Med*. 1988;109(5):383.
160. How Flu Vaccine Effectiveness and Efficacy are Measured | CDC [Internet]. 2019 [cited 2020 Nov 21]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/effectivenessqa.htm>
161. Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2012;12(1):36–44.
162. Patriarca PA, Arden NH, Koplan JP, Goodman RA. Prevention and Control of Type A Influenza Infections in Nursing Homes. *Ann Intern Med*. 1987;107(5):732–40.
163. Cheng L-W, Huang S-W, Huang L-M, Chang L-Y, Shao P-L, Kiang D, et al. Comparison of neutralizing and hemagglutination-inhibiting antibody responses for evaluating the seasonal influenza vaccine. *J Virol Methods*. 2012;182(1–2):43–9.
164. Gross PA, Russo C, Teplitzky M, Dran S, Cataruozolo P, Munk G. Time to peak serum antibody response to influenza vaccine in the elderly. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996;3(3):361–2.

165. Cate TR, Couch RB, Parker D, Baxter B. Reactogenicity, immunogenicity, and antibody persistence in adults given inactivated influenza virus vaccines - 1978. *Rev Infect Dis.* 1983;5(4):737–47.
166. Andrew T. Kroger, Larry K. Pickering, Alison Mawle, Alan R. Hinman and Walter A. Orenstein. Immunization. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020. p. 3771-3812
167. Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells | Clinical Diagnostic Laboratory Immunology [Internet]. [cited 2021 Aug 15]. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cdli.4.4.415-422.1997>
168. Jong JC, Palache AM, Beyer WEP, Rimmelzwaan GF, Boon ACM, Osterhaus ADME. Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus. *Dev Biol (Basel).* 2003;115:63–73.
169. Snyder MH, Banks S, Murphy BR. Determination of antibody response to influenza virus surface glycoproteins by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1988;26(10):2034–40.
170. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang A-G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods.* 2009;41(4):1149–60.
171. Sjogren MH. Prevention of hepatitis B in nonresponders to initial hepatitis B virus vaccination. *Am J Med.* 2005;118 Suppl 10A:34S-39S.
172. Albright FS, Orlando P, Pavia AT, Jackson GG, Cannon Albright LA. Evidence for a heritable predisposition to death due to influenza. *J Infect Dis.* 2008;197(1):18–24.
173. Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol.* 2004;59(1):1–15.
174. Bucasas KL, Franco LM, Shaw CA, Bray MS, Wells JM, Niño D, et al. Early Patterns of Gene Expression Correlate With the Humoral Immune Response to Influenza Vaccination in Humans. *J Infect Dis.* 2011;203(7):921–9.
175. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol.* 2009;10(1):116–25.
176. Franco LM, Bucasas KL, Wells JM, Niño D, Wang X, Zapata GE, et al. Integrative genomic analysis of the human immune response to influenza vaccination. *eLife* [Internet]. [cited 2020 Dec 6];2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3713456/>

177. Tan P-L, Jacobson RM, Poland GA, Jacobsen SJ, Pankratz VS. Twin studies of immunogenicity — determining the genetic contribution to vaccine failure. *Vaccine*. 2001;19(17):2434–9.
178. Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Vierkant RA, O’Byrne MM, Jacobson RM, Poland GA. The Association of CD46, SLAM and CD209 Cellular Receptor Gene SNPs with Variations in Measles Vaccine-Induced Immune Responses: A Replication Study and Examination of Novel Polymorphisms. *Hum Hered*. 2011;72(3):206–23.
179. Siegrist C-A, Aspinall R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):185–94.
180. Goodwin K, Viboud C, Simonsen L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: A quantitative review. *Vaccine*. 2006;24(8):1159–69.
181. Sasaki S, Sullivan M, Narvaez CF, Holmes TH, Furman D, Zheng N-Y, et al. Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies. *J Clin Invest*. 2011;121(8):3109–19.
182. Herati RS, Silva LV, Vella LA, Muselman A, Alanio C, Bengsch B, et al. Vaccine-induced ICOS+CD38+ circulating Tfh are sensitive biosensors of age-related changes in inflammatory pathways. *Cell Reports Medicine*. 2021;2(5):100262.
183. Cesur S, Irmak H, Çifci A, Kinikli S, Demiröz AP, Gençtürk ZB. Evaluation of The Seroprevalence of H1N1 IgG Antibodies Between Healthcare Workers and Outpatients. *Ortadoğu Tıp Dergisi*. 2016;8(1):7–11.
184. Çifci A, Erol Ö, Cesur S, Aksoy N, Kisa Ü. The comparison of pandemic H1N1 IgG levels between H1N1 influenza-vaccinated healthcare workers and unvaccinated healthcare workers. *Turk J Med Sci*. :4.
185. Engler RJM, Nelson MR, Klote MM, VanRaden MJ, Huang C-Y, Cox NJ, et al. Half- vs full-dose trivalent inactivated influenza vaccine (2004-2005): age, dose, and sex effects on immune responses. *Arch Intern Med*. 2008;168(22):2405–14.
186. Giefing-Kröll C, Berger P, Lepperdinger G, Grubeck-Loebenstien B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*. 2015;14(3):309–21.
187. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(10):626–38.
188. Furman D, Hejblum BP, Simon N, Jovic V, Dekker CL, Thiébaud R, et al. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for

- testosterone in the response to influenza vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(2):869–74.
189. Glück R, Mischler R, Finkel B, Que JU, Cryz SJ, Scarpa B. Immunogenicity of new virosome influenza vaccine in elderly people. *The Lancet*. 1994 J;344(8916):160–3.
 190. Powers DC, Belshe RB. Vaccine-induced antibodies to heterologous influenza A H1N1 viruses: effects of aging and “original antigenic sin.” *J Infect Dis*. 1994 May;169(5):1125–9.
 191. Sayan M, Yulu N, Genç S, Uçan ES. influenza virus aşısı ile aşılanmış bireylerde ELISA ile serokonversiyonun gösterilmesi. 2005;5.
 192. Sasaki S, He X-S, Holmes TH, Dekker CL, Kemble GW, Arvin AM, et al. Influence of prior influenza vaccination on antibody and B-cell responses. *PLoS One*. 2008;3(8):e2975.
 193. Skountzou I, Satyabhama L, Stavropoulou A, Ashraf Z, Esser ES, Vassilieva E, et al. Influenza Virus-Specific Neutralizing IgM Antibodies Persist for a Lifetime. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(11):1481–9.
 194. Gross PA, Sperber SJ, Donabedian A, Dran S, Morchel G, Cataruozolo P, et al. Paradoxical response to a novel influenza virus vaccine strain: the effect of prior immunization. *Vaccine*. 1999;17(18):2284–9.
 195. Cao J-Q, Jin P-F, Zeng Z-Z, Zhang L, Meng F-Y, Chu K, et al. Effects of Prior Influenza Exposure on Immunogenicity of Influenza Vaccine. *Open Forum Infectious Diseases*. 2020;ofaa181.
 196. Suntronwong N, Vichaiwattana P, Wongsrisang L, Klinfueng S, Korkong S, Thongmee T, et al. Prevalence of antibodies against seasonal influenza A and B viruses among older adults in rural Thailand: A cross-sectional study. *PLOS ONE*. 2021;16(8):e0256475.
 197. Nakaya HI, Wrammert J, Lee EK, Racioppi L, Marie-Kunze S, Haining WN, et al. Systems biology of vaccination for seasonal influenza in humans. *Nat Immunol*. 2011;12(8):786–95.
 198. El Sahly HM, Makedonas G, Corry D, Atmar RL, Bellamy A, Cross K, et al. An evaluation of cytokine and cellular immune responses to heterologous prime-boost vaccination with influenza A/H7N7-A/H7N9 inactivated vaccine. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2020;16(12):3138–45.
 199. Howard LM, Goll JB, Jensen TL, Hoek KL, Prasad N, Gelber CE, et al. AS03-Adjuvanted H5N1 Avian Influenza Vaccine Modulates Early Innate Immune Signatures in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Infect Dis*. 2019;219(11):1786–98.

200. Fang Y, Rowe T, Leon AJ, Banner D, Danesh A, Xu L, et al. Molecular Characterization of In Vivo Adjuvant Activity in Ferrets Vaccinated against Influenza Virus. *J Virol*. 2010;84(17):8369–88.
201. Burny W, Callegaro A, Bechtold V, Clement F, Delhaye S, Fissette L, et al. Different Adjuvants Induce Common Innate Pathways That Are Associated with Enhanced Adaptive Responses against a Model Antigen in Humans. *Front Immunol*. 2017;8:943.
202. Andreakos E, Williams RO, Wales J, Foxwell BM, Feldmann M. Activation of NF- κ B by the intracellular expression of NF- κ B-inducing kinase acts as a powerful vaccine adjuvant. *PNAS*. 2006;103(39):14459–64.