

7. Viral Pnömoni Tanısında Laboratuvar

Uzm. Dr. Özgür APPAK, Prof. Dr. A. Arzu SAYINER

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZET

Solunum yolu virüsları, pnömoni olgularının yaklaşık %25'den sorumlu olup, bu oran çocuklarda ve bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde artmaktadır. Virüsler, tek başlarına enfeksiyon etkeni olabileceği gibi, diğer mikroorganizmalarla birlikte ko-enfeksiyon oluşturabilirler veya diğer mikroorganizma enfeksiyonlarına zemin hazırlayabilirler. Viral enfeksiyonlarının doğru tanımlanması, antibiyotiklerin gereksiz kullanımının önlenmesi, hastaların uygun tedavi alması, izolasyon önlemlerinin yerinde ve zamanında kullanılabilmesi açısından önemlidir. Klinik bulgular ve semptomlar patojene özgü olmadığı için etken ayrımının klinik olarak yapılması güçtür ve spesifik tanı sadece mikrobiyolojik testler ile mümkündür. Tanıda, virüs kültürü, antijen ve nükleik asit saptama testleri ile özgül antikor testleri kullanılabilir. Günümüzde ilk sırayı, sağladığı yüksek duyarlılık ve özgüllük ile nükleik asit testleri alırken, seçilmiş hastalarda kullanılmak koşulu ile antijen testleri ikinci sırada gelmektedir. Bu makalede tanı testleri, avantaj ve sınırlılıkları ile birlikte ele alınmıştır.

Solunum yolu virüsları, pnömoni olgularının yaklaşık %25'de etken olarak saptanmaktadır (1). Bu oran, çocuklarda ve immünsüprese bireylerde artmaktadır (2). Viral solunum yolu enfeksiyonları, hafif kendini sınırlayan üst solunum yolu hastalığından, ciddi veya ölümcül alt solunum yolu hastalıklarına kadar değişen klinik tablolara yol açabilir. Klinik bulgular ve semptomlar patojene özgü değildir, etken ayrımının klinik olarak yapılması güçtür ve spesifik tanı için mikrobiyolojik testler gereklidir. Solunum yolu viral enfeksiyonlarının doğru tanımlanması, antibiyotiklerin gereksiz kullanımının önlenmesi, hastaların doğru yönetilmesi, izolasyon önlemlerinin yerinde ve zamanında kullanılabilmesi açısından önemlidir. Virüsler, tek başlarına enfeksiyon etkeni olabileceği gibi, diğer mikroorganizmalarla birlikte ko-enfeksiyon oluşturabilirler veya diğer mikroorganizma enfeksiyonlarına zemin hazırlayabilirler.

Yaklaşık 20 yıl önce insanda sadece altı adet solunum virüsü [respiratuar sinsitiyal virüs (RSV), influenza

virus (INF), parainfluenza virüs (PIV) 1-3, rinovirüs (RV), insan koronavirüsleri (HCoV) OC43, 229E ve adenovirüs (AdV)] bilinmekte idi. Moleküler mikrobiyolojide yaşanan ilerlemeler ile insan metapnömovirüs (hMPV), yeni koronavirüsler (CoV), PIV-4 ve kültürü yapılamayan yeni rinovirüsler de bu listeye eklenmiştir (3). Coğrafi şartlara, mevsimlere ve yaş gruplarına göre değişmekle birlikte, INF A, INFB, RSV, PIVs, AdV, hMPV ve RV sık saptanan virüslerdir (4-6).

ÖNEMLİ SOLUNUM YOLU VİRÜSLERİ

1. İnfluenza Virüs

İnfluenza virüs, *Orthomyxoviridae* ailesinden, zarflı, segmentli, helikal simetrik, negatif polariteli tek iplikli bir RNA virüsüdür (7). İnsanları enfekte eden üç farklı türü vardır: INF A, B ve C. İnfluenza A, insanlar, domuzlar, atlar ve kuşlar dahil olmak üzere birden fazla türü, INF B sadece insanları, INF C domuz ve insanları enfekte ederek hastalığa neden olur. 2011 yılında influenza benzeri hastalığı olan bir domuzdan

izole edilerek tanımlanan INF D ise sadece sığırlarda hastalık yapmaktadır (8).

İnfluenza A virüsü yüzeyindeki hemaglutinin (HA) glikoproteininin 18, nöraminidaz (NA) glikoprotein ise 11 alt tipi bulunmaktadır. İnfluenza A virüsünün doğal rezervuarı olan su kuşları ve göçmen kuşlar 16 farklı HA ve dokuz farklı NA tipinin kombinasyonlarını barındıran virüslerle enfekte olabilmektedir. Yarasalarda H17N10 ve H18N11 alt türleri tanımlanmıştır. Potansiyel olarak 198 farklı INF A alt tipi kombinasyonu varken, bunların sadece %7'sinin insanları enfekte ettiği bildirilmiştir. Günümüzde insanlarda H1N1 ve H3N2 tiplerine sahip INF A virüsleri bulunmaktadır (9).

İnfluenza virüslerin segmentli RNA'ya sahip olması nedeniyle, iki farklı INF suşu aynı anda aynı hücreyi enfekte ettiğinde, RNA parçaları arasındaki yeniden düzenleme sonucunda tamamen farklı yeni bir suş oluşabilmektedir. Eğer meydana gelen özgün virüs aynı zamanda yüksek düzeyde enfeksiyöz ise tüm dünyayı etkileyen salgınlara (pandemi) neden olabilmektedir. Kuş ve domuz kaynaklı INF A virüslerindeki çeşitlilik nedeniyle bu virüslerin pandemik potansiyelini izlenmektedir. Virüslerin insanlarda yayılma potansiyeli ve neden olacağı hastalığın şiddeti öngörülerine dayalı olarak potansiyel pandemi riski değerlendirilmektedir. İzlenen influenza A suşları arasında H7N9 en yüksek risk skoruna sahip olmaktadır (10).

İnfluenza B virüsü mevsimsel grip etkenidir. Dolaşımda Yamagata ve Victoria olarak adlandırılan iki farklı soy bulunmaktadır. İnfluenza C virüsü ise, dolaşımda tek bir soy halinde bulunur ve sporadik enfeksiyonlara neden olmaktadır.

Günümüzde dünya çapında küresel influenza sürveyansı "Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)" kapsamında; 113 ülkede 144 ulusal influenza sürveyans merkezi, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ile işbirliği halinde influenza sürveyans çalışmalarını yürütmektedir. Ülkemizde de sentinel sürveyans, "İnfluenza Benzeri Hastalık Sürveyansı" biçiminde 2005 yılından bu yana sürdürülmektedir. Aralık 2015 tarihinden itibaren "Ağır Akut Solunum Yolu Enfeksiyonları Sürveyansı" uygulanmasına geçilmiştir. Sürveyans çalışmalarının amacı, influenza sezonunun izlemek, başlangıç ve bitiş zamanını tespit etmek, dolaşımdaki virüs suşlarını saptamak, antiviral ilaçlara karşı direnci değerlendirmek, aşılar da kullanılacak virüs tiplerini belirlemek, hastalığın şiddetini ve virüs suşları ile hastalık şiddeti arasındaki ilişkiyi belirlemek şeklinde sayılabilir (11,12).

Ülkemizde 2018-2019 sezonunda pozitif örneklerin %77.2'sinde INF A H3N2, %8,7'sinde INF A H1N1-pdm09 ve %13.4'de INF B saptanmıştır (13).

İnflenzaya karşı korunmada en etkili yöntem aşıdır. Aşı, her yıl yaygın olması beklenen suşları kapsayacak şekilde değiştirilmektedir. DSÖ, 2020-2021 yılı aşısında, belirlenen dört suşun (A/Hawaii/70/2019 (H1N1) pdm09, A/Hong Kong/45/2019 (H3N2), B/Washington/02/2019 (B/Victoria soyu), B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata soyu)) benzeri virüslerin bulunması gerektiğini bildirmiştir (14).

2. Rinovirus

Picornaviridae ailesinde Enterovirüs cinsine ait pozitif polariteli, tek sarmallı bir RNA virüsüdür. Rinoviruslar 160'dan fazla tipi barındıran üç türe ayrılır (RV-A, RV-B ve RV-C) (15). Çocuklarda ve yetişkinlerde yaygın olup, genellikle soğuk algınlığı, nezle olarak tanımlanan solunum yolu enfeksiyonlarına yol açarlar. Toplum kökenli pnömonilerin %4.9-30.6'sında RV'ler tespit edilmiştir (16). Yaşlı, hastanede yatan, bağışıklığı baskılanmış ve altta yatan kronik akciğer hastalığı olan hastalarda daha şiddetli enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Rinovirüsler, ABD'de Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin (CDC) Toplum Kaynaklı Pnömoni Etiyolojisi (EPIC) çalışmasında, toplum kökenli pnömoni ile hastaneye yatırılan hastaların üst solunum yolunda en sık saptanan patojen olarak bildirilmiştir. Öte yandan semptomatik pediatrik hastalarda sıklıkla diğer solunum virüsleri ile birlikte saptanması nedeniyle toplum kökenli pnömoni ile arasındaki nedensellik ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır (17,18). Rinovirus enfeksiyonu nedeniyle ölen hastalarda, RV viremi ile, şiddetli hastalık arasında korelasyon olabileceği öngörülmüştür. Özellikle RV-C'nin viremi ile yüksek oranda ilişkili olduğu ve viremi saptanmasının pediatrik pnömonide önemli bir tanısal gösterge olabileceği bildirilmiştir (19). Yetişkin hastalarda ise RV viremi ile klinik seyyir arasında net bir ilişki saptanamamıştır (20). Rinovirus enfeksiyonlarının özgül bir tedavisi yoktur, virüsün çok sayıda serotipinin varlığı ve immün yanıtın uzun süreli olmaması aşı geliştirme çabalarını olumsuz yönde etkilemektedir.

3. Respiratuar Sinsitiyal Virüs (RSV)

RSV, *Paramyxoviridae* ailesi, Pneumovirus cinsinde yer almaktadır. Yenidoğan ve küçük çocuklarda bronşiyolit ve pnömoni gibi alt solunum yolu enfeksiyonlarının en sık nedenidir (21). RSV enfeksiyonları 65 yaş ve üstü, kronik kalp veya akciğer hastalığı olan, bağışıklık sistemi zayıflamış yetişkinler için de cid-

di olabilmektedir. Her yıl ABD’de RSV enfeksiyonu nedeniyle 177.000’den fazla yaşlı yetişkinin hastaneye kaldırıldığı ve bunların da 14.000’in öldüğü, İngiltere’de ise yılda 18.000 kişinin hastaneye yattığı ve 8400 ölüm meydana geldiği tahmin edilmektedir (22,23). Yetişkinlerde alt solunum yolu enfeksiyonlarının %1-10’nunun, kronik hastalık ve transplantasyonu olan hastalarda ise %2-14’ünün RSV’ye bağlı olduğu gösterilmiştir (24). RSV için henüz lisanslı bir aşı bulunmamakla birlikte çalışmalar sürdürülmektedir (25). Pediyatrik hastalarda RSV’nin neden olduğu ciddi solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisi veya önlenmesi için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan iki antiviral ilaç bulunmakta olup, bunlar tedavi için aerosolize ribavirin ve profilaksi için palivizumab (Synagis®)’dir.

4. Metapnömovirüs

Kuş ve insan metapnömo virüsleri olmak üzere iki türden oluşurlar ve RSV’yi de içeren *Pneumoviridae* ailesinde yer alırlar. Zarflı, segmentsiz, negatif polariteli, tek sarmallı RNA virüsü olup, A ve B olarak iki alt gruba ayrılır (26). İlk defa 2001 yılında Hollanda’lı araştırmacılar tarafından tanımlanmasına rağmen, Kanada’da 1993 ile 2000 yılları arasında ve ABD’de 1976 ile 2001 yılları arasında toplanan örneklerde de hMPV tespit edilmiştir (27-30). Bu çalışmalar hMPV’nin yıllarca tespit edilmeden dolaşımında olduğunu göstermektedir. Yakın akrabası olan RSV gibi, hMPV enfeksiyonları asemptomatik olabildiği gibi hafif soğuk algınlığından ağır bronşiyolit ve pnömoniye kadar farklı klinik tablolara neden olabilmektedir. Yetişkin hMPV enfeksiyonları esas olarak yaşlıları ve kronik rahatsızlıkları olanları etkilemekte ve RSV enfeksiyonlarına benzer şekilde kardiyak ve pulmoner komplikasyonlara neden olabilmektedir. Spesifik antiviral tedavisi ve aşısı bulunmamaktadır.

5. Parainfluenza Virüs

Paramyxoviridae ailesinde yer alan negatif polariteli, tek sarmallı RNA virüsüdür. Dört serotipi vardır (PIV 1-4) ve mevsimsellikleri türe göre değişkenlik gösterir (7). Ilıman iklimlerde, PIV’ler altı ay ile altı yaş arasındaki çocuklarda iki yılda bir krup salgınlarına neden olmaktadır. PIV-2 enfeksiyonları PIV-1 ve PIV-3’den daha az olmak üzere her yıl özellikle sonbaharda görülür. PIV-3 enfeksiyonları genellikle ilkbahar ve yaz başında saptanır, PIV-1 ve PIV-2’nin görülmediği senelerde yıl boyunca ortaya çıkabilir. PIV-4 daha az sıklıkta tespit edildiği için mevsimsel özelliklerini karakterize edilememiştir (3). PIV, çocuklarda krup hastalığının önde gelen nedenlerinden

biridir. Sağlıklı yetişkinlerde genellikle asemptomatik veya hafif üst solunum yolu enfeksiyonları şeklinde görülür. Özellikle bağışıklığı baskılanmış veya yaşlı hastalarda ise yaşamı tehdit eden alt solunum yolu enfeksiyonları görülmektedir. Henüz spesifik bir antiviral tedavisi veya aşısı bulunmamakta, aşı çalışmaları devam etmektedir.

6. Koronavirüs

Coronaviridae ailesinin *Orthocoronavirinae* alt ailesinde yer alırlar. Pozitif polariteli, tek sarmallı, zarflı RNA virüsleridir. Genom boyutları 26 ila 32 kilobaz (kb) arasında değişen CoV’ler, RNA virüsleri içinde en büyük genoma sahiptirler. Genetik ve antijenik kriterlere göre alfa, beta, gamma ve delta-koronavirüs olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Alpha-CoV (HCoV-229E, HCoVNL-63) ve beta-CoV’ler (HCoV-OC43, HCoV-HKU-1, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV2) genellikle insanlarda solunum yolu hastalığına ve hayvanlarda gastroenteritlere neden olurken, gama ve delta-CoV kanatlılarda enfeksiyon oluşturmaktadır (31,32). SARS-CoV2, yeni nesil dizileme ile SARS-CoV ile %79 ve MERS-CoV ile %50 homoloji göstermektedir. Filogenetik analizler, SARS-CoV-2’yi beta-koronavirus cinsinin Sarbecovirus alt cinsi altına yerleştirmiştir (33,34).

SARS-CoV (2002), MERS-CoV (2012) ve halen devam eden pandemiyi tetikleyen SARS-CoV2, son 20 yılda önemli salgınlar meydana getirmişlerdir. SARS-CoV salgını sırasında yaklaşık 8098 SARS vakası rapor edildiği olup, ölüm oranı %10’dur. Ölüm oranı 60 yaş üstü popülasyonda %50’ye ulaşmıştır. SARS, özellikle Güneydoğu Asya ve Kanada’da da yüksek bir ekonomik çöküşe de neden olmuştur (35,36). SARS-CoV’un Çin at nalı yarasanın kaynaklandığı düşünülmektedir. MERS ilk olguları, 2012’de Suudi Arabistan’da saptanmıştır. DSÖ kayıtlarına göre küresel olarak toplam MERS-CoV vaka sayısı 2519 ve ölüm oranı %34,4’dür (37). MERS-CoV’un HKU4 ve HKU5 ile yüksek oranda ilişkili olduğu ve yarasalardan kaynaklandığı düşünülmektedir. İnsana bulaşmanın tek körgüçlü develer aracılığı ile olduğu saptanmıştır. SARS-CoV2 ise ilk olarak Çin’in Wuhan şehrinde saptanan pnömoni vakalarında 7 Ocak 2020’de tanımlanmıştır. Hastalık COVID-19, etken virüs ise SARS CoV’e yakın benzerliğinden dolayı SARS-CoV2 olarak isimlendirilmiştir (36,38). 11 Mart 2020 tarihinde DSÖ tarafından pandemi ilan edilmiştir. COVID-19’un doğrudan yarasalardan bulaşıp bulaşmadığı, ara konakçıların olup olmadığı halen araştırılmaktadır. Yılan, vizon, pangolin olası ara konakçı olarak ileri sürülmüştür (39,40).

7. Adenovirüs

İnsan adenovirüsleri, *Adenoviridae* ailesinin Mastadenovirüs cinsinde yer almakta olup, zarfsız, çift sarmallı DNA virüsleridir. Bugüne dek A'dan G'ye kadar (HAdVA-G) 7 türü ve 88 tipi tanımlanmıştır (41). Adenovirüsler birçok doku ve organı enfekte edebilirler. Solunum yollarında soğuk algınlığı, farenjit, faringo-konjunktival ateş, krup (larongeotrakeabronşit), bronşit, pnömoni ve boğmaca benzeri hastalık şeklinde klinik tablolar oluşturabilir. HAdV3,7, 11 ve 14, solunum yolu enfeksiyonlarında baskın olan tiplerdir. HAdV-11 ve HAdV-14 arası bir rekombinasyon olan HAdV-55, 2004'ten itibaren Türkiye'de, Singapur'da, Kore'de sporadik veya toplum kökenli pnömoni olgularında bildirilmiştir. HAdV-55'in diğer serotiplere (HAdV-3, 7 ve 14) kıyasla şiddetli pnömoni ile daha yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Adenovirüs tip 4 ve 7'ye karşı olan aşı ABD'de sadece askerlere uygulanmaktadır (3,42).

MİKROBİYOLOJİK TANI YÖNTEMLERİ

Tanı laboratuvarının birincil amacı, hastanın yararına olacak şekilde, doğru ve güvenilir sonuçları zamanında sağlamaktır. Bunun gerçekleşebilmesi, test istemi, numune alınması, taşıma, testler ve raporlama basamaklarının kalite süreçlerine uyması ile mümkündür. Bu süreçte numune kalitesi önemli olup, doğru yerden, yeterli miktarda ve doğru zamanda alındığında yararlı ve güvenilir sonuçlar üretilebilmektedir (3).

Virüs enfeksiyonları tanısında kullanılacak yöntemler: virüs kültürü, virüsün antijen veya nükleik asidinin saptanması, virüs antijenlerine yönelik antikorların araştırılmasıdır. Yaklaşık son 10 yılda moleküler yöntemlerdeki gelişmeler sayesinde daha hızlı ve doğru tanıya duyulan gereksinim doğrultusunda yeni yöntemler kullanıma girmiştir. Moleküler tekniklerde virüsün canlı izolasyonuna gerek olmaması, laboratuvar ve diğer personel üzerindeki biyogüvenlik riskini en aza indirmiş, hızlı tanı ile tedavinin doğru yönlendirilebilmesi sağlanabilmiştir (43).

Virüs Kültürü

Hücre kültürü viral solunum yolu hastalıklarının tanısında onlarca yıldır altın standart olarak değerlendirilmiştir. Virüs kültürü, tıpkı bakteri kültüründe olduğu gibi canlı virüsün saptanmasında, viral patogenezi çalışmalarında, aşı geliştirme süreçlerinde, genotipik değişikliklerin fenotipik etkilerini değerlendirmede, anti-viral ilaç çalışmalarında, yeni virüslerin araştırılmasında gerekli bir yöntemdir. Ancak zaman alıcı olması, iyi eğitilmiş personel ve özel do-

namımlı laboratuvar gerektirmesi, yüksek riskli virüsler için biyogüvenlik riskleri taşıması, bazı virüslerin hücre kültüründe üretilmemesi gibi faktörler rutin tanı kullanımında sıkıntılara yol açmaktadır. Bu nedenle günümüzde daha hızlı, duyarlı ve özgül olan nükleik asit amplifikasyon testleri (NAT) viroloji laboratuvarlarında kullanılan başlıca rutin tanı yöntemi haline gelmiştir. Ayrıca, yaşlı erişkinlerin solunum yollarındaki viral enfeksiyonlarda daha düşük viral yüklerin olması, viral kültürlerin duyarlılığını etkileyebilmektedir.

Tıbbi olarak önemli virüslerin tümü tek bir hücre kültürü hattında üretilmemektedir. Bu nedenle, laboratuvarın doğru seçimleri yapabilmesi, gerektiğinde birden çok hücre hattını kullanabilmesi için hangi virüslerden şüphelenildiği konusunda klinik bilgi verilmesi gerekmektedir. Geleneksel hücre kültürü yöntemleri yanı sıra, antijen tespitine dayalı, santrifüj basamakları içeren ve tanı süresini kısaltan "Shell Vial (SV)" hücre kültürü yöntemleri de kullanılmaktadır. "Shell vial" hücre kültürü yöntemiyle tespit edilebilecek viral patojenlerin sayısını arttırmak amacıyla R-mix (Diagnostic Hybrids, A.B.D.) gibi, iki farklı hücre tipi (vizon akciğer hücreleri ve insan adenokarsinom hücreleri) içeren özel tasarımı flakonlar kullanılabilir. Bu sayede influenza A/B, PIV 1-4, RSV ve adenovirüsler aynı kültürde tespit edilebilmektedir. "Shell vial" hücre kültürü ile geleneksel kültürün duyarlılığı ve özgüllüğü korunurken, etkenin saptanma süresi bir-iki güne düşürebilmektedir (44). Pandemi INF-A (H1N1) nedeniyle hastaneye yatırılan 18 yaş üstü hastalarda NAT, SV ve geleneksel hücre kültürü yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, ortalama tespit süreleri sırasıyla dört saat, 48 saat ve yedi gün olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada geleneksel ve SV kültürlerin, INF-A virüsünün saptanması için yararlı ancak zaman alıcı yöntem oldukları ve virüs alt türlerini ayırt etmek için ek testlerin gerektiği vurgulanmıştır (45).

Hücre kültürü, dezavantajlarına rağmen, SARS-CoV2 gibi yeni virüslerin tanı, tedavi, aşı çalışmaları ve bilimsel araştırmalarda önemli bir yöntem olmaya devam etmektedir. COVID-19 örneğinde olduğu gibi nötralizasyon antikor testlerinde, uzun süre PCR pozitifliği devam eden kişilerin özellikle sağlık çalışanlarının işe dönüş zamanlarının belirlenmesinde, izolasyon önlemlerinin sonlandırılmasına ilişkin verilerin toplanmasında, profilaktik veya tedavi edici bileşiklerin etkinliklerinin değerlendirilmesinde ve moleküler testler için pozitif kontrol eldesinde hücre kültürü yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir (46).

Antijen Testleri

Antijen testleri, viral enfeksiyonun varlığını gösteren spesifik bir viral antijeni saptayan immünolojik testlerdir. Herhangi hedefi veya bir sinyali amplifiye etmedikleri için, kültür veya NAT'dan daha az duyarlıdır. İnfluenza virüsleri ve RSV başta olmak üzere özellikle semptomlu hastalarda solunum virüslerinin tanısı için yaygın olarak kullanılmaktadır (47). Tüm yaş gruplarında INF A ve B testleri kullanılırken, RSV antijen testleri daha çok çocuk popülasyonlarında kullanılmaktadır (48). Antijen testleri nispeten ucuzdur ve genellikle özel laboratuvar koşulları gerektirmez. Kullanımda olan testlerin çoğu, yaklaşık 15-20 dakika içinde sonuçlanmakta, sonuçlar dijital okuma sistemleri veya göz ile değerlendirilmektedir.

İnfluenza tanısında üç dijital (BUDDI, Sofia INF A+B Fluorescence Immunoassay, BD Veritor System Flu A + B) ve bir geleneksel (SD Bioline INF Ag A/B) hızlı antijen testinin RT-PCR ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, duyarlılık INF-A için sırasıyla; %87.7, %94.5, %87.7, % 72.6, özgüllük %100, %97.7, %96.5 ve %100, INF-B için %81.7, %91.7, %81.7 ve %78.3, özgüllük ise sırasıyla %100, %95.3, %100 ve %100 bulunmuştur (49). İnfluenza tanısında farklı antijen testlerinin RT-PCR ile karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, duyarlılık INF-A için %53.9-74.2, INF-B için %71-82.5 arası saptanmış, özgüllük %100 olarak bulunmuştur (50). Her iki çalışmada da dijital okuma sistemli testlerin duyarlılığının daha yüksek olduğu vurgulanmıştır.

Belçika'da üç influenza sezonunda, solunum örneklerinde hızlı antijen testlerinden "Coris Infl A + B K-SeT" ve "BD Veritor Flu A+B"nin karşılaştırıldığı çalışmada, Veritor sisteminin duyarlılık ve negatif prediktif değeri daha yüksek iken, özgüllük ve pozitif prediktif değer Coris testinde daha yüksek saptanmıştır. Belçika ulusal influenza referans merkezi, 2014-2015 ve 2016-2017 grip sezonlarında ağırlıklı olarak INF-A (çoğu H3N2) ve az miktarda INF-B (çoğu Yamagata soyu) saptamış, 2015-2016 grip sezonunda ise INF-A (çoğu pdmH1N1) ve INF-B (çoğu Victoria soyu) eşit sıklıkta bildirmiştir. Bu dönemleri kapsayan çalışmada her iki test ile iyi performans elde edilmiş ve hastanın yaşının testler üzerine etkisinin olmadığı saptanmıştır (51).

İnfluenza ile ilgili 162 çalışmanın (130 hızlı antijen testi, 19 dijital immunassay ve 13 NAT) değerlendirildiği bir meta-analizde INF-A için duyarlılık sırasıyla %54.4, %80, %91.6, INF-B için %53.2, %76.8, %95.4, özgüllük ise her üç yöntem içinde > %98 ola-

rak tespit edilmiştir. Hem dijital hem de hızlı antijen testlerinin performansı çocuk hastalarda erişkin hastalara göre daha iyi iken, NAT testlerinde ise yaşın etkisi gözlemlenmemiştir. Özellikle yaşlı hastalarda geleneksel hızlı antijen testlerinin düşük duyarlılıkları nedeniyle kullanılmaması önerilmektedir (52).

RSV, antijen testlerinin sık kullanıldığı diğer bir viral solunum yolu enfeksiyonudur. "ImmuView RSV"antijen testi ve "Alere BinaxNOW RSV" kart testinin karşılaştırıldığı bir çalışmada 219 çocuk, 281 yetişkin hasta değerlendirilmiş ve antijen testlerinin duyarlılıkları %50'nin altında bildirilmiştir. Çocuklarda (< 6 yaş) ve boğaz sürüntüsü dışındaki sürüntü örneklerinde antijen testlerinin duyarlılıkları daha yüksek saptanmıştır. Antijen testlerinin duyarlılığı RT-PCR pozitif örneklerde değerlendirildiğinde RSV-A için %39-59, RSV-B için %2-19 olarak bulunmuştur. Özgüllük daha yüksek olup, her iki yaş grubunda > %93 olarak saptanmıştır. RSV antijen testlerinin düşük duyarlılıkları nedeniyle negatif sonuçların RSV RT-PCR ile doğrulanması önerilmektedir (53).

Dört farklı hızlı RSV antijen testinin (Alere Binax NOW, BD Veritor Sistem, SD RSV BIO LINE ve Humasis RSV) karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, RSV-A ve B için duyarlılık %61.3-67.5 arasında saptanmıştır. Duyarlılık, yaş gruplarına göre incelendiğinde 1 yaş altında dört antijen testin ortalaması %80.2, 10-65 yaşta %32.5 ve > 65 yaşta %48.2 olarak saptanmıştır. İleri yaşlarda viral titrenin daha düşük ve viral saçılımın daha kısa süreli olduğu, bu nedenle RSV hızlı antijen testlerinin pediatrik popülasyonda daha yararlı olacağı bildirilmiştir (54).

RSV hızlı antijen testlerini değerlendirilen bir meta-analizde, çalışmaların %83'ünün çocuk, %3'ünün erişkin hastalara ait olduğu belirlenmiştir. Testlerin duyarlılıkları ve özgüllükleri sırasıyla %80 ve %97 iken, çocuklarda duyarlılık (%81), yetişkinlere göre (%29) daha yüksek saptanmıştır. Testlerin duyarlılık hesaplamasında altın standart olarak RT-PCR kullanıldığında sonuç %74, immünfloresan testler kullanıldığında %88 bulunmuştur. Üretici firmaların muhtemelen RT-PCR testlerini referans standart olarak kullanmadıklarında testlerin duyarlılıklarını daha yüksek saptadıkları düşünülmektedir. Sonuç olarak bu çalışmada, RSV hızlı antijen testlerinin zayıf duyarlılıkları nedeniyle yetişkinlerde kullanımının engellenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (55).

Antijen testlerinin belli endikasyonlarda önem kazanmaya başladığı bir diğer enfeksiyon COVID-

19'dur. Hem DSÖ hem de FDA, SARS-CoV-2'yi tanımlayabilen antijen testleri için acil kullanım izni (EUA) ve yetkilendirmeler sağlamıştır. SARS-CoV-2 antijen testleri, diğer enfeksiyonlarda olduğu gibi RT-PCR'a göre daha az duyarlıdır. Ancak kısa sürede sonuç alınabilmesi, laboratuvarlar dışında hasta başında uygulanabilmesi ve bazı ülkelerde PCR testine göre nispeten ucuz olması nedeniyle özel koşullarda hastaların hızlı bir şekilde tanımlanması ve izolasyonu için kullanılmaktadır. SARS-CoV-2 hızlı antijen testleri en iyi performansı, viral yükün yüksek olduğu akut enfeksiyon döneminde göstermektedir [≤ 25 cycle threshold (Ct) değerleri ya da viral yük $> 1.000.000$ kopya/mL]. Bu nedenle pre-semptomatik ya da semptomların ilk beş gününde olan vakalarda çalışılması önerilmektedir. DSÖ bu testlerin için duyarlılık $\geq 80\%$, özgüllük $\geq 97\%$ olmasını, Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (ECDC) ise duyarlılık $\geq 90\%$, özgüllük $\geq 97\%$ olmasını önermektedir. RT-PCR sonuçları altın standart olarak kullanıldığında hızlı antijen testlerinin duyarlılıkları %29 (%95 CI 15.7-42.3) ile %93.9 (%95 CI 86.5-97.4), özgüllükleri %80.2 (%95 CI 71.1-86.7) ile %100 (%95 CI 98.8-100) arasında değiştiği saptanmıştır (56,57).

Dört hızlı COVID-19 antijen kitini karşılaştırıldığı bir çalışmada, Ct değerlerine göre altı gruba ayrılan 76 klinik örnek, daha sonra virüs izolasyonuna alınmıştır. Tüm hızlı antijen testleri düşük Ct yani yüksek viral yük değerlerine sahip örneklerde viral antijenleri başarılı şekilde tespit etmekte, ancak benzer Ct değerlerine sahip örneklerde bazı kitlerin pozitif, bazılarının negatif sonuç verdiği bildirilmektedir. Bu durumun, viral RNA ve protein içeriğinin örnekler arasında farklı olması veya bazı numunelerin hızlı antijen testleri için inhibitörler içermesi nedeniyle olabileceği vurgulanmaktadır. Virüsün izole edildiği birkaç örnekte ise tüm hızlı antijen testlerinin negatif olarak saptanması, bu testlerin bulaşıcı, SARS-CoV-2 saçan hastaların tümünü teşhis etmede başarısız olabileceğini göstermektedir. Dört hızlı antijen testinin duyarlılığının RT-qPCR'den daha düşük, ancak virüs izolasyonuna benzer olduğu saptanmıştır (58).

Antikor Testleri

Viral patojenlere karşı, sıvısal ve hücrel bağışık yanıt, mukozal ve sistemik olarak birlikte gelişmektedir. Ancak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında antikor yanıtlarının değerlendirilmesi mevcut yöntemler ve uygulama kolaylığı nedeniyle hücrel bağışık yanıtın değerlendirilmesinden daha yaygındır. Antikorların tespiti için klinik çeşitli serolojik

yöntemler uzun yıllardır kullanılmaktadır. Kompleman fiksasyon testi ve immüno difüzyon testi gibi bazı yöntemler aşamalı olarak kaldırılmış ve yerini daha hızlı, duyarlı, özgül, otomatize yöntemlere bırakmıştır. Günümüzde klinik viroloji laboratuvarlarında kullanılan antikor saptama yöntemleri; nötralizasyon, hemaglutinasyon inhibisyonu, floresan immünassay (IFA), enzim immünoassay (EIA veya ELISA) ve Western blot (WB) testleridir. Antikor testleri, virüsa, örnek alınma zamanına, hedeflenen immüno globulin (Ig) izotipine ve hastanın klinik öyküsüne bağlı olarak enfeksiyonun farklı tiplerini veya dönemlerini gösterir. Hastanın önceki enfeksiyonları veya aşuları ile bağışıklık durumu sonuçları etkiler. Antikor testleri genellikle, geçirilmiş enfeksiyonu saptamada, epidemiyolojik araştırmalarda veya nötralizan antikorların saptanması yolu ile aşı yanıtlarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (59).

Akut viral solunum enfeksiyonlarının tanısında antikor testleri sınırlı bir role sahiptir. Antikor testleri ile akut enfeksiyonu değerlendirmede iki yol izlenebilir:

- Akut ve konvelasan dönemde alınacak iki serum örneğinde özgül IgG titresinde anlamlı artışı göstermek,
- Özgül IgM antikorlarının saptamak.

Akut enfeksiyonlarda her zaman saptanabilir IgM yanıtının olmaması, bazı hastalarda IgM pozitifliğinin aylarca saptanabilmesi veya çapraz reaksiyonlara bağlı yalancı pozitiflikler testlerin duyarlılık ve özgüllüğünü etkilemekte, klinik yorumunu güçleştirmektedir. Multipleks antikor testi olan Pneumoslide IgM (Vir-cell, İspanya), insan serum/plazmasında, *Legionella pneumophila* serogrup 1, *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydomphila pneumoniae*, adenovirüs, solunum sinsityal virüs, influenza A, influenza B ve parainfluenza virüs 1, 2 ve 3 antikorlarını IFA ile tespit edilebilmektedir. Test prensibi numunedeki antikorların slayt yüzeyine adsorbe edilen antijen ile reaksiyonu esasına dayanır. Hindistan'da yapılan retrospektif bir çalışmada, Pneumoslide IgM testi ile *L. pneumophila* ve INF-B'nin sık rastlanan etkenler olduğu ve özellikle 0-5 yaş ile 60 yaş üzerinde daha fazla bulunduğu gösterilmiştir (60). Çin'de toplum kökenli pnömonili yetişkinlerde yapılan çalışmada ise, *M. pneumoniae* (18-24 yaş) en sık etken olarak saptanmıştır. Pneumoslide IgM testi, atipik pnömoni etkenlerini tanımlamasında kolay uygulanabilen, hızlı, uygun maliyetli bir test olarak değerlendirilmiştir (61).

COVID-19 tanısı için antikor testleri için rehberlerde üç endikasyon tanımlanmıştır;

- Moleküler tanı testi negatif ve semptom başlangıcından en az iki hafta geçmiş, yüksek klinik şüphesi olan hastaların değerlendirilmesi,
- Çocuklarda multisistem enflamatuvar sendromun değerlendirilmesi,
- Seroprevalans çalışmalarıdır (62).

Bağlanan antikoları ve nötralize edici antikoları tespit etmek üzere iki tür antikor testi vardır. İmmunokromatografi (lateral flow), ELISA, CIA (Kemilünisan immünassay) gibi yöntemlerde SARS CoV-2'nin saf-laştırılmış proteinleri kullanılarak bunlara özgü antikorlar saptanabilmektedir. Bu amaçla virüsün ana antijenik yapıları olan nükleokapsid (N) ve yüzeydeki "spike" (S) proteini veya bunun reseptöre bağlanan bölgesi (RBD) kullanılmaktadır. Seçilen antijene göre testin çapraz reaksiyon ve özgüllüğü değişebilmektedir. N proteini, farklı koronavirüsler arasında daha korunmuş bir bölgeyi temsil ederken, S proteini, özellikle de RBD bölgesi daha değişken ve mutasyonlara uğrayan bölgedir (63). Enfeksiyondan koruyucu etkisi olan nötralizan antikorlar, S antijenindeki epitoplara yönelik olup, bu bölgeleri antijen olarak kullanan ELISA testlerinin sonuçları nötralizan antikor sonuçları daha fazla paralellik göstermektedir (64).

Nötralizan antikoların saptanabilmesi için klasik olarak, virüsün replikasyonuna uygun bir hücre kültürü hattı ve virüsün kendisi gereklidir. Biyogüvenlik riskini azaltan ve daha kolay uygulanabilir yöntem arayışları sonucu pseudovirüs, saptanabilir olması için genetik olarak modifiye edilmiş virüs, tam virüs yerine genom içermeyen virüs benzeri partikül gibi farklı alternatifler geliştirilmiştir (65).

Nükleik Asit Testleri (NAT)

Nükleik asit testleri, yüksek duyarlılık ve özgüllük sağlamaları sayesinde solunum yolu patojenlerinin özellikle de virüslerinin tanısında "altın standart" olarak kabul edilmektedirler (66). NAT ile istenen her patojeni/patojenleri tekli veya çoklu şekilde araştırmak mümkündür. Az miktardaki patojen, canlı olmasa bile hızlı bir şekilde saptanabilir. NAT, kültür yöntemlerine göre antimikrobiyal kullanımından daha az etkilenir. Örneğin oseltamivir tedavisine başlanmasından sonra yaklaşık bir hafta daha influenza virüs RNA'sı RT-PCR (ters transkripsiyonlu polimeraz zincir reaksiyonu) ile saptanabilir. NAT ile virüsün belirlenmesi, genotiplendirilmesi ve ilaç direnci mutasyonlarının saptanması mümkündür.

NAT için farklı teknikler kullanılabilir. En yaygın kullanılan yöntem, bir DNA çoğaltma yöntemi olan

polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dir. PCR ile hedef DNA'nın yaklaşık 100-1000 bazlık bir parçası çoğaltılarak saptanır. PCR testlerinde üç temel basamak bulunmaktadır (67):

1. Numuneden nükleik asit eldesi (ekstraksiyon):

Otomatize veya manuel yöntemler kullanılarak, mikroorganizmanın parçalanması, nükleik asitlerin açığa çıkarılması, saflaştırılması ve konsantre edilmesi sağlanır.

2. **PCR basamağı:** Aranacak etkene spesifik primerler ve reaksiyonun gerçekleşmesini sağlayacak ısıya dayanıklı polimeraz enzimi, nükleotidler (dNTP), tampon solüsyon bir tüp /plak çukuru içinde birleştirilerek üzerine numuneden elde edilmiş nükleik asit eklenir. İzlenebilir (real-time) PCR yöntemi kullanılacak ise reaksiyonu izlemeyi sağlayacak boya veya işaretli prob da reaksiyona dahil edilir. Bu karışım DNA çoğalmasının gerçekleşmesini sağlayacak ısı döngülerini yöneten bir cihaza (termal-cycler) yüklenir. Aranacak etken bir RNA virüsü ise, amplifikasyon aşamasından önce ters transkripsiyon (reverse transcription, RT) ile RNA'dan komplementer DNA (cDNA) eldesi gerekir.

3. Amplifikasyon ürününün (amplikon) saptanması:

PCR'da çoğalma olup olmadığı, agaroz jel elektroforezi ve/veya prob ile saptama işlemleri uygulanarak belirlenir. İzlenebilir PCR yönteminde ise reaksiyon devam ederken saptama da yapılabildiği için ek bir işleme gerek yoktur. İzlenebilir PCR'da elde edilen sinyalin eşik değeri aştığı döngü sayısı "cycle threshold (Ct)" olarak tanımlanır. Örnekteki virüs miktarı fazla ise Ct değeri düşük, miktar az ise Ct değeri yüksek bulunur.

Başarılı bir NAT için örnek kalitesi, enfeksiyonun hangi döneminde alındığı, araştırılan etkenin epidemiyolojisi önemlidir. Viral pnömonilerde genellikle üst solunum yollarında (ÜSY) etkenin saptanması, alt solunum yolundaki enfeksiyon tanısı için yeterli kabul edilmektedir (68). Ancak COVID-19 örneğinde de görüldüğü gibi nazofarenjyal örneklerde etken bulunamasa bile balgam, BAL gibi enfeksiyon odagından alınan örneklerde etken saptanabilir (69). Bir diğer sorun da bocavirus veya rhinovirus gibi bazı etkenlerin ÜSY da bulunmasına rağmen, pnömoni etkeni kabul edilip edilmeyecekleri konusundaki belirsizliktir. NAT, sağladığı yüksek duyarlılık ile etken olmayan, ölü veya kolonizan mikroorganizmaları da saptayabilmektedir. Özellikle çocuklarda sağlıklı kontrol gruplarını dahil eden çalışmalarda, bazı vi-

rüsler kontrol grubunda da saptanabilmektedir (70). İnfluenza virüs, RSV, metapneumovirus gibi virüsler ise sıklıkla pnömoni etkeni olarak kabul edilmektedirler. Bu nedenle NAT sonuçlarının hasta ve virüs bazında yorumlanması gereklidir. Öncelikle aranacak etken/etkenlere karar vermek ve numunede bulunup bulunmadığını belirlemek gerekir. İkinci olarak da aranan virüs, numunede var ise, bunun enfeksiyon etkeni olup olmadığına karar verilmesi gerekir. Kontaminasyon veya kolonizasyon ile gerçek enfeksiyon etkenini ayırmada yardımcı olabilecek bir diğer parametre virüs miktarıdır. İzlenebilir PCR testlerinde uygun standartlar kullanıldığında viral yük belirlemek mümkündür. Ancak solunum yolu örneklerinin standart örnekler olmaması, örnek kalitesinin sonuçları etkileyebilmesi, enfeksiyonu belirlemede kullanılacak eşik değerlerin bilinmemesi, eşik değerlerin mikroorganizmalara göre farklılık gösterebilmesi gibi nedenlerle bugün için kantitatif sonuçların yorumu güçtür. Kantitasyonda yol gösterici bilimsel ve epidemiyolojik verilere gereksinim vardır.

Yöntemin özelliklerine göre değişmekle birlikte NAT'de yalancı negatiflik ve yalancı pozitiflik olasılığı vardır. PCR testlerinde yalancı negatiflik genellikle örnek ile ilişkili iken optimize edilmiş bir testte yalancı pozitiflik çok nadir olup, kontaminasyona bağlı gelişebilir.

Sendromik (multipleks) nükleik asid testleri: Tek bir örnekte, birden çok olası etkenin birlikte aranmasını mümkün kılan sendromik veya çoklu (multipleks) NAT panelleri tanıda büyük kolaylık sunmaktadır. Bu tür paneller, solunum sistemi enfeksiyonlarında da giderek daha çok kullanılmakta, patojenlerin tek tek test edilmesine kıyasla kısa sürede çok sayıda mikroorganizmanın taranmasına ve bu sayede doğru tanıya hızla ulaşılmasına olanak sağlamaktadır. Multipleks NAT panellerinin avantajları ve dezavantajları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Multipleks testler, sendromik tanı panelleri olarak da isimlendirilmektedir. Solunum yolu enfeksiyonları ve pnömoni panelleri olarak tasarlanmış ticari

testler bulunmaktadır. Bu testlerin, hedef patojen sayısı, süre, performans özellikleri, zorluk dereceleri vb açısından farkları bulunmaktadır. İkisi yerli olmak üzere üretici firmaların web sayfalarındaki bilgiler Tablo 2'de özetlenmiştir. Günümüzde mevcut testler ağırlıklı olarak virüslara yönelik olup, az sayıda ve rutin kültürlerde saptanamayacak bakteriler de bazı panellerde bulunmaktadır. Testlerin çoğu nazofarenjyal örnekler için valide edilmiş olmakla birlikte bazı testlerde BAL gibi alt solunum yolu örnekleri de çalışabilmektedir. Multipleks solunum virüs panellerinin, örneklerin biriktirilerek veya tek tek çalışılmasına uygun (hızlı testler) olanları bulunmaktadır. Tek örnek ile çalışılanlar, genellikle bir saat içinde sonuç verebilen hızlı testlerdir ancak hasta başı maliyet diğer testlerden daha yüksektir. Testlerin bazıları sınırlı sayıda bakteri için antimikrobiyal direnç genlerini de çalışabilmektedir.

Multipleks NAT kitlerinin duyarlılıkları %80-93, özgüllükleri %92-98 arasında bildirilmiş olup, mikroorganizmalara göre farklılık gösterebilmektedir (71,72). Testler arası uyumsuzluklar bazı patojenlerde daha sık gözlemlenmektedir. Adenovirüs, influenza B virüs, human metapneumovirus için uyumsuzluklar saptanmış, duyarlılıklar bazı testlerde %50'nin altına düşmüştür (72,73).

Multipleks testler, tek etken araştıran moleküler testlere göre pahalı olmakla birlikte, etkenin birden fazla test yerine tek test ile saptanmasının yararları bulunmaktadır. Tanının hızlı konması sayesinde hastanede yatış süresinde kısalma, izolasyon süresinde, radyolojik incelemelerin sayısında ve antimikrobiyal kullanım süresinde azalma, influenza için antiviral kullanımında artma sağlanabilmektedir (66,74,75). Maliyet etkinlik çalışmalarında çelişkili sonuçlar bildirilmekle birlikte erişkin yaş grubunda hasta yönetiminde en büyük fayda, influenza virüs pozitifliği durumunda olmaktadır (76). Birden çok etken için tek tek test yapılmasının gerektirdiği süre, emek ve masraf birlikte düşünüldüğünde multipleks NAT panelleri daha avantajlıdır. Bu tür testlerin maliyet et-

Tablo 1. Multipleks NAT panellerinin avantaj ve dezavantajları.

Avantajlar	Dezavantajlar
Etkenin hızlı ve kolay saptanması	Olası tüm patojenlerin kapsamaması
Klinikte öngörülemeyen veya tanı testleri rutin laboratuvar uygulamalarında bulunmayan patojenlerin saptanabilmesi	Tanı algoritmasında değişiklik yapılamaması
Kültür ve antijen testlerine göre daha yüksek duyarlılık sağlanabilmesi	Yüksek maliyet

Tablo 2. Solunum virüslerini saptamaya yönelik bazı ticari sendromik NAT kitlerinin özellikleri.

Üretici firma	BioMerieux	Luminex	Luminex	GenMark Dx	Qiagen	Siemens FastTrack	Bioeksan	Anatolia
Kit adı	FilmArray	Verigene RP Flex	Nx-TAG RPP	ePlex RP2	QIAstat-Dx	FTD RP 21	Biospeedy MX-24T**	Bosphore SARS CoV-2 RPP
Yaklaşık test süresi (saat)	1	2	4	2	1	3-4	2-3	2-3
Hedef sayısı	20	16	21	20	22	19	24	10
VİRÜS								
Adenovirus	x	x	x	x	x	x	x	x
SARS-CoV-2	x			x	x		x	x
MERS	x							
Cor HKU1	x		x	x	x	x	x	
Cor NL63	x		x	x	x	x	x	
Cor 229E	x		x	x	x	x	x	
Cor OC43	x		x	x	x	x	x	
H. bocavirus			x			x	x	
H. metapneumovirus	x	x	x	x	x	x	x	x
İnfluenza A virüs	x	x	x	x	x	x	x	x
İNF A alt tipleri*	x	x	x	x	x	x		
İnfluenza B virüs	x	x	x	x	x	x	x	x
PIV 1-4	x	x	x	x	x	x	x	x
RSV A/B	x	x	x	x	x	x	x	x
Rhinovirus/ enterovirus	x	x (rhinovirus)	x	x	x	x	x	x
H. parechovirus						x	x	
BAKTERİ								
<i>C. pneumoniae</i>	x		x	x	x		x	
<i>M. pneumoniae</i>	x		x	x	x	x	x	x
<i>L. pneumophila</i>			x				x	x
<i>B. pertusis</i>	x	x			x		x	
<i>B. parapertussis</i> ve/veya <i>B. bronchiseptica</i>	x	x						
<i>B. holmesii</i>		x						

* INFA-H1, H3, H1-2009 (bir veya birkaçı)

** Panelde ek olarak *H. influenzae* ve *S. pneumoniae* bulunmaktadır.

kin kullanımını sağlayabilmek için, enfeksiyonların toplumdaki prevalansı, hastanın klinik bulguları, test süresi ve test sonucunun verilecek kararlar üzerine etkisinin olup olmayacağı göz önüne alınmalıdır. Salgın dönemlerinde tek etkene yönelik NAT kullanımı daha ucuz ve hızlı sonuç sağlayabilir (77,78).

Alternatif olarak, fiyat avantajı sağlayan, izotermal amplifikasyon yapabilen böylece pahalı cihazlara gerek duymayan tekli veya çoklu virüs saptamada kullanılacak yöntemler (loop-mediated isothermal amplification) ve CRISPR/Cas sistemini kullanan hassas NAT teknolojileri geliştirilmektedir (79).

Ticari multipleks testlerin kısıtlılıklarından biri, incelenen patojenlerin isteğe göre değiştirilememesi, ihtiyaca göre bir algoritmanın yaratılamamasıdır. Ayrıca testin performansı her mikroorganizma için aynı olmayıp, duyarlılık etkene göre değişebilmektedir (80). Testlerin bazıları enterovirus ile rhinovirus ayırımını yapamamakta, yapanlarda da çapraz reaksiyonlar saptanabilmektedir. Multipleks testlerin kullanılması ile birlikte %10 kadar örnekte (çocuklarda daha yüksek) birden çok etken pozitif olarak bulunmuştur (6,81,82). Ko-enfeksiyonlar sıklıkla rinovirus ile bir diğer etkenin birlikteliği şeklinde görülmekte olup klinik önemi tartışmalıdır (72). Özellikle çocuklarda, bazı virüslerin (rinovirus, bocavirus vb.) asemptomatik kolonizasyon yapabileceği göstermiştir (83).

Testler olası tüm patojenleri kapsamamaktadır. Bu nedenle kapsam dışı kalan virüs (MERS, hanta virüs, vb.), bakteri ve mantar enfeksiyonları ek test yapılmaz ise atlanabilmektedir. Bu nedenle multipleks testlerin kullanımında hastanın klinik, laboratuvar bulguları ve epidemiyolojik veriler göz ardı edilmemelidir. Diğer yandan multipleks testler, 2014 yılındaki enterovirus D68 salgını örneğinde olduğu gibi öngörülemeyen enfeksiyonların/salgınların saptanmasını sağlayabilir (84). Multipleks testlerin sağladığı geniş panellerin yararlı olabileceği bir diğer grup immunosüpresif hastalardır (85,86). Üst solunum yolu örneklerinde negatif sonuç alınsa bile, kuvvetli klinik şüphe durumlarında alt solunum yolu örnekleri ile test tekrarı önerilir. Ancak bu tür hastalarda virüs ve/veya nükleik asid varlığının akut enfeksiyondan sonra da uzun süre devam edebileceği ve NAT'ın her zaman replike olabilen virüs anlamına gelmediği hatırlanmalı, sonuçlar hastanın kliniği ile birlikte yorumlanmalıdır. İmmünsüprese hastalarda klasik solunum yolu virüs panellerinde yer almayan herpes virüslerin (CMV, VZV vb.) reaktivasyonlarına bağlı pnömoniler de görülebileceği hatırlanmalıdır.

Dizi analizi yöntemleri: DNA dizileme ile virüslerin saptanması, genotiplendirilmesi, izolatlar arası ilişkinin incelenmesi, mutasyonların saptanması mümkündür (12,26). Klasik DNA dizileme yöntemi olan Sanger sekanslama veya yeni nesil sekanslama (YNS) yöntemleri kullanılabilir. Sanger ile ortamda %20 ve üzeri oranda bulunan mikroorganizmalar belirlenebilirken, YNS ile %1'in altındaki suşlar bile saptanabilmektedir. Tek bir virüsün tüm genomunun çıkarılması veya metagenomik YNS ile ortamdaki

tüm mikroorganizmaların belirlenmesi ve isimlendirilmesi mümkündür (87). Bu sayede mikrobiyom analizleri yapılabilmekte, yeni mikroorganizmalar tanımlanabilmektedir (88). YNS için farklı teknolojiler geliştirilmiştir. Dizilenecek nükleik asidi parçalara ayırma, işaretleme, sekanslama ve sonra bu parçaları birleştirerek anlamlandırma yapılabileceği gibi doğrudan uzun nükleik asidleri sekanslamaya dayalı yeni kuşak yöntemler kullanılabilir.

YNS için dizilemenin kendisi kadar, elde edilen verinin anlamlandırılmasını sağlayacak biyoinformatik analiz de önemlidir. Yöntemin tanı amacıyla kullanılabilmesi için detaylarının amaca göre tasarlanması, optimizasyonu ve kalite kontrolünün yapılması gereklidir. Yöntemin bileşenleri için çok sayıda alternatif bulunmakta ve seçilecek yol, mikroorganizmaların yanlış adlandırılmasına, saptanamamasına veya kontaminasyonlar sonucu hatalı yorumlara neden olabilmektedir (89). İdeal protokolü bulma çalışmaları devam etmektedir. Günümüzde yeni nesil dizi analizinin NAT'a göre daha pahalı, emek yoğun ve daha uzun süre alan bir yöntem olması nedeniyle rutin tanıdaki yeri kısıtlıdır, genellikle ikinci basamak olarak kullanılmaktadır. Uzun bir patojenler listesinin taranmasını gerektiren immünsüprese bireyler, yoğun bakım gerektiren hastalar gibi özel gruplarda YNS ile başarılı sonuçlar alınabilmektedir (90,91). Örnek başı maliyet, sekanslanan örnek sayısı arttıkça azalmaktadır.

PNÖMONİ PATOGENİZİNE VE TANISINA YENİ BİR BAKIŞ

Moleküler tekniklerdeki gelişmeler, steril olduğu düşünülen alt solunum yollarında da bazı mikroorganizmaların bulunabileceğini, diğer bir deyişle akciğer mikrobiyomunun varlığını göstermiştir (92,93). Günümüzde enfeksiyonun tek bir patojenik mikroorganizmaya bağlı olduğu görüşü sorgulanmakta, patogeneze mikroorganizmaların birbirleri ve konak ile ilişkilerindeki değişikliklerin önemli olabileceği öngörülmektedir. Yeni nesil dizileme yöntemleri sayesinde, pnömonide ve diğer pulmoner hastalıklarda akciğer ve barsak mikrobiyomunun rolü araştırılmaktadır (94). Mikrobiyom ve onun bir parçası olan virom çalışmaları, bu popülasyonlarda kültürü yapamayan ve klasik yöntemler ile saptanamayan bazı mikroorganizmaların varlığını göstermiştir. Pnömoni patogenezini anlamada ve tanıda daha komplike yöntemler ve analizler kullanılması, yeni belirteçlerin geliştirilmesi yönünde çalışmalar sürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Cavallazzi R, Ramirez JA. Influenza and viral pneumonia. *Clin Chest Med* 2018;39(4):703-721.
2. Aygün D, Erbek F, Kuşkuç M, et al. The epidemiologic and clinical features of viral agents among hospitalized children with lower respiratory tract infections. *Turk Pediatri Ars* 2020;55(2):166-173.
3. Loeffelholz MJ: *Clinical Virology Manuel*. In: Robinson C, Loeffelholz MJ, Pinsky BA, ed. *Respiratory Viruses*, 5rd ed. Washington DC: 2016: 257-276
4. Zhang D, He Z, Xu L, et al. Epidemiology characteristics of respiratory viruses found in children and adults with respiratory tract infections in southern China. *Int J Infect Dis* 2014; 25:159-64.
5. Arbefeville S, Ferrieri P. Epidemiologic analysis of respiratory viral infections mainly in hospitalized children and adults in Midwest University Medical Center after the implementation of a 14-virus multiplex nucleic acid amplification test. *Am J Clin Pathol*. 2017;147:43-49.
6. Appak Ö, Duman M, Belet N, Sayiner AA. Viral respiratory infections diagnosed by multiplex polymerase chain reaction in pediatric patients. *J Med Virol* 2019;91:731-737.
7. Knipe DM, Howley PM: *Fields Virology*. In: Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y, ed. *Orthomyxoviruses*, vol 1. 6rd ed. Philadelphia: 2013: 1188-1243
8. Asha K, Kumar B. Emerging influenza D virus threat: What We Know so Far! *J Clin Med* 2019;8:192.
9. Tong S, Zhu X, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2013;9(10):e1003657.
10. Bennett J.E., Dolin R., Blaser M.J: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. In: Levitt A, Messonnier N, Jernigan D, Uyeki TM, Braden CR, Rosenberg R, Khabbaz RF, ed. *Emerging and Reemerging Infectious Disease Threats*, 9rded. Philadelphia: 2020: 233-255
11. Mevsimsel Grip. 2019-2020 Haftalık İnfluenza Raporları. <https://grip.gov.tr/tr/haftalik-influenza-raporu/> (30.12.2020' de erişildi).
12. Guldemir D, Coskun-Ari FF, Altas AB, et al. Molecular characterization of the influenza A(H1N1)pdm09 isolates collected in the 2015-2016 season and comparison of HA mutations detected in Turkey since 2009. *J Med Virol*. 2019;91(12):2074-2082.
13. Mevsimsel Grip. 2019-2020 Haftalık İnfluenza Raporları. https://grip.gov.tr/depo/influenza-raporu/2018/InfluenzaGrip_Surveyans_Raporu_2019_21-39._hafta.pdf/ (30.12.2020' de erişildi).
14. https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2021_south/en/
15. McIntyre CL, Knowles NJ, Simmonds P. Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. *J Gen Virol* 2013;94:1791-1806.
16. Wang K, Xi W, Yang D, et al. Rhinovirus is associated with severe adult community-acquired pneumonia in China. *J Thorac Dis* 2017;9:4502-4511.
17. Jain S, Williams DJ, Arnold SR, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among US children. *N Engl J Med* 2015; 372:835-45.
18. Jain S, Self WH, Wunderink RG, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among US adults. *N Engl J Med* 2015; 373:415-27.
19. Lu X, Schneider E, Jain S, et al. Rhinovirus viremia in patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 2017;21:1104-1111.
20. Van Rijn AL, Claas EC, von dem Borne PA, et al. Rhinovirus viremia in adult patients with high viral load in bronchoalveolar lavages. *J Clin Virol* 2017;96:105-109.
21. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, et al. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 2005;352:1749-59.
22. Fleming DM, Taylor RJ, Lustig RL, et al. Modelling estimates of the burden of respiratory syncytial virus infection in adults and the elderly in the United Kingdom. *BMC Infect Dis* 2015;15:443.
23. Htar MTT, Yerramalla MS, Moisi JC, et al. The burden of respiratory syncytial virus in adults: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Infect*. 2020;148:e48.
24. Killikelly A, Tunis M, House A, et al. Overview of the respiratory syncytial virus vaccine candidate pipeline in Canada. *Can Commun Dis Rep*. 2020;46:56-61.
25. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7: 719-24.
26. Bayrakdar F, Kocabas CN, Altas AB, et al. Genetic variability human respiratory syncytial virus subgroups A and B in Turkey during six successive epidemic seasons, 2009-2015. *J Med Virol* 2018;90(3):456-463.
27. Peret TC, Boivin G, Li Y, et al. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis* 2002; 185: 1660-3.
28. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002; 186: 1330-4.
29. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004; 350: 443-50.
30. Yan Y, Chang L, Wang L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures *Rev Med Virol* 2020;e2106.
31. Bayrakdar F, Kocabas CN, Altas AB, et al. Genetic variability human respiratory syncytial virus subgroups A and B in Turkey during six successive epidemic seasons, 2009-2015. *J Med Virol* 2018;90(3):456-463.
32. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019;17:181-192.
33. Roujian L, Xiang Z, Juan L, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020; 395:565-74.
34. Malik YA. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol* 2020;42:3-11.
35. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol* 2015; 1282: 1-23.

36. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Infez Med*2020;28:174-184.
37. WHO: Disease Outbreak News: <https://www.who.int/csr/don/24-february-2020-mers-saudi-arabia/en/> (30.12.2020 tarihinde ulaşılmıştır).
38. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports. 21 January 2020. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/> (31.12.2020 tarihinde ulaşılmıştır)
39. Ji W, Wang W, Zhao X, et al. Homologous recombination within the spike glycoprotein of the newly identified coronavirus may boost cross-species transmission from snake to human. *J Med Virol*2020; 92: 433-40.
40. Cheng ZJ, Shan J. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. *Infection* 2020;48:155-163.
41. Dhingra A, Hage E, Ganzenmueller T, et al. Molecular evolution of human adenovirus (HAdV) species C. *Sci Rep* 2019; 9,1039.
42. Dingyu T, Huadong Z, Yangyang F, et al. Severe community-acquired pneumonia caused by human adenovirus in immunocompetent adults: A multicenter case series. *PLoS One*2016; 11: e0151199.
43. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology. In: Laboratory Diagnosis of Viral Diseases, 9rd ed. USA: 2020:396-402.*
44. Matthey S, Nicholson D, Ruhs S, et al. Rapid detection of respiratory viruses by shell vial culture and direct staining by using pooled and individual monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1992; 30:540-544.
45. López RP, Catalán P, Giannella M, et al. Comparison of real-time RT-PCR, shell vial culture, and conventional cell culture for the detection of the pandemic influenza A (H1N1) in hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;69:428-31.
46. Stelzer BS, Walker GJ, Aggarwal A, et al. Virus isolation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) for diagnostic and research purposes. *Pathology* 2020;52:760-763.
47. Duman M, Gençpınar P, Ozbek OA, Ozdemir D, Sayiner AA. Value of rapid antigen test for pandemic influenza A (H1N1) 2009 in the pediatric emergency department. *Pediatr Emerg Care* 2013;29(5):612-6.
48. Chartrand C, Tremblay N, Renaud C, et al. Diagnostic accuracy of rapid antigen detection tests for respiratory syncytial virus infection: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2015; 53:3738-3749.
49. Ryu SW, Suh IB, Ryu SM, et al. Comparison of three rapid influenza diagnostic tests with digital readout systems and one conventional rapid influenza diagnostic test. *J Clin Lab Anal* 2018;32:e22234.
50. Ryu SW, Lee JH, Kim J, et al. Comparison of two new generation influenza rapid diagnostic tests with instrument-based digital readout systems for influenza virus detection. *Br J Biomed Sci* 2016;73:115-120.
51. Vandamme S, Van Cleempoel S, Michiels M, et al. Comparison of the Coris Influa + B K-SeT® and BD Veritor Flu A + B® for rapid detection of influenza viruses in respiratory samples from 3 consecutive flu seasons in Belgium. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019;94:227-230.
52. Merckx J, Wali R, Schiller I, et al. Diagnostic accuracy of novel and traditional rapid tests for influenza infection compared with reverse transcriptase polymerase chain reaction: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2017; 167:394-409.
53. Franck KT, Schneider UV, Ma CMG, et al. Evaluation of immuview RSV antigen test (SSI siagnostica) and BinaxNOW RSV card (alere) for rapid detection of respiratory syncytial virus in retrospectively and prospectively collected respiratory samples. *J Med Virol*2020; 92:2992-2998.
54. Jung BK, Choi SH, Lee JH, et al. Performance evaluation of four rapid antigen tests for the detection of Respiratory syncytial virus. *J Med Virol* 2016;88:1720-4.
55. Chartrand C, Tremblay N, Renaud C, et al. Diagnostic accuracy of rapid antigen detection tests for respiratory syncytial virus infection: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2015;53:3738-3749.
56. https://www.who.int/diagnostics_laboratory/EUL/en (30.12.2020 tarihinde ulaşıldı)
57. European Centre for Disease Prevention and Control. Options for the use of rapid antigen tests for COVID-19 in the EU/EEA and the UK. 19 November 2020. ECDC: Stockholm; 2020
58. Yamayoshi S, Sakai TY, Koga M, et al. Comparison of rapid antigen tests for COVID-19. *Viruses* 2020;12:1420.
59. Loeffelholz MJ: *Clinical Virology Manuel. In: Robinson C, Loeffelholz MJ, Pinsky BA, ed. Respiratory Viruses, 5rd ed. Washington DC: 2016: 257-276*
60. Singh P, Malik S, Lal V. Seroprevalence of IgM antibody in atypical pneumonia causing pathogens by Pneumoslid, IFA. *Microbiol Res J Int* 2020; 30(6): 1-10.
61. Qin S, Zhang W, Chen F, et al. Antibodies against atypical pathogens and respiratory viruses detected by Pneumoslid IgM test in adults with community-acquired pneumonia in Guangzhou City. *J Clin Lab Anal.* 2020 Sep;34(9):e23419.
62. Hanson KE, Caliendo AM, Arias CA, et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19: Serologic testing. *Clin Infect Dis.* 2020;12:ciaa1343.
63. Chau CH, Strobe JD, Figg WD. COVID-19 Clinical diagnostics and testing technology. *Pharmacotherapy* 2020; 40: 857-68.
64. Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, et al. The RBD of the spike protein of SARS-group coronaviruses is a highly specific target of SARS-CoV-2 antibodies but not other pathogenic human and animal coronavirus antibodies. *Sci Immunol* 2020;5(48).
65. Focosi D, Maggi F, Mazzetti P, Pistello M. Viral infection neutralization tests: A focus on severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 with implications for convalescent plasma therapy. *Rev Med Virol* 2020;e2170.
66. Hanson KE, Azar MM, Banerjee R, et al. Diagnostics Committee of the Infectious Diseases Society of America (IDSA). Molecular testing for acute respiratory tract infections: clinical and diagnostic recommendations from the IDSA's Diagnostics Committee. *Clin Infect Dis* 2020; May 5:ciaa508.

67. Artika IM, Wiyatno A, Maroef CN. Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infect Genet Evol* 2020;81:104215
68. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, et al. Viral pneumonia. *Lancet* 2011;377:1264-1275.
69. Yoshii Y, Shimizu K, Morozumi M, et al. Identification of pathogens by comprehensive real-time PCR versus conventional methods in community-acquired pneumonia in Japanese adults. *Infect Dis (Lond)*. 2016; 48:782-8.
70. Phedin S, Lindstrand A, Hjelmgren A et al. Respiratory viruses associated with community-acquired pneumonia in children: matched case-control study. *Thorax* 2015; 70:847-85
71. Vos LM, Bruning AHL, Reitsma JB, et al. Rapid molecular tests for influenza, respiratory syncytial virus, and other respiratory viruses: a systematic review of diagnostic accuracy and clinical impact studies. *Clin Infect Dis* 2019; 69: 1243-53.
72. Ramanan P, Bryson AL, Binnicker MJ, et al. Syndromic panel-based testing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2018;31:e00024.
73. Chen JH, Lam HY, Yip CC, et al. Clinical evaluation of the new high-throughput Luminex NxTAG respiratory pathogen panel assay for multiplex respiratory pathogen detection. *J Clin Microbiol* 2016;54:1820-1825.
74. Rappo U, Schuetz AN, Jenkins SG, et al. Impact of early detection of respiratory viruses by multiplex PCR assay on clinical outcomes in adult patients. *J Clin Microbiol* 2016;54:2096-2103.
75. Brendish NJ, Malachira AK, Armstrong L, et al. Routine molecular point-of-care testing for respiratory viruses in adults presenting to hospital with acute respiratory illness (Res-POC): a pragmatic, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* 2017;5(5):401-11.
76. Hanson KE, Caliendo AM, Arias CA, et al. The Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19: Molecular diagnostic testing. *Clin Infect Dis* 202; Jan 22:ciab048.
77. Centers for Disease Control and Prevention. Algorithm to assist in the interpretation of influenza testing results and clinical decision-making during periods when influenza viruses are circulating in the community. <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/algorithm-results-circulating.htm>.
78. Pabbaraju K, Wong S, Lee B, et al. Comparison of a singleplex real-time RT-PCR assay and multiplex respiratory viral panel assay for detection of influenza "A" in respiratory specimens. *Influenza Other Respir Viruses* 2011;5(2):99-103.
79. Takayama, I., Semba, S., Yokono, K. et al. Clinical evaluation of fully automated molecular diagnostic system "Simprova" for influenza virus, respiratory syncytial virus, and human metapneumovirus. *Sci Rep* 2020;10,13496.
80. Doern CD, Lacey D, Huang R, Haag C. Evaluation and implementation of FilmArray version 1.7 for improved detection of adenovirus respiratory tract infection. *J Clin Microbiol* 2013;51:4036-4039.
81. Rodrigues CMC, Groves H. Community-acquired pneumonia in children: the challenges of microbial diagnosis. *J Clin Microbiol* 2018; 56: e01318-17
82. Harun A, Beyza E. Viral and Atypical Bacterial Respiratory Infections in a University Teaching Hospital. *Jpn J Infect Dis*. 2019 Sep 19;72(5):318-322.
83. Esposito S, Mencacci A, Cenci E, et al. Multiplex platforms for the identification of respiratory pathogens: Are they useful in pediatric clinical practice? *Front Cell Infect Microbiol* 2019; 9:196.
84. Midgley CM, Jackson MA, Selvarangan R, et al. Severe respiratory illness associated with enterovirus D68—Missouri and Illinois. *Morb Mortal Wkly Rep* 2014; 63: 798-799.
85. Campbell AP, Guthrie KA, Englund JA, et al. Clinical outcomes associated with respiratory virus detection before allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Clin Infect Dis* 2015; 61:192-202.
86. Green ML. Viral pneumonia in patients with hematopoietic cell transplantation and hematologic malignancies. *Clin Chest Med* 2017;38:295-305.
87. Bal, A., Pichon, M., Picard, C. et al. Quality control implementation for universal characterization of DNA and RNA viruses in clinical respiratory samples using single metagenomic next-generation sequencing workflow. *BMC Infect Dis* 2018;18: 537.
88. Kustin, T, Ling G, Sharabi S. et al. A method to identify respiratory virus infections in clinical samples using next-generation sequencing. *Sci Rep* 2019; 9,2606.
89. López-Labrador FX, Brown JR, Fischer N, et al. ESCV Network on next-generation sequencing. Recommendations for the introduction of metagenomic high-throughput sequencing in clinical virology, part I: Wet lab procedure. *J Clin Virol* 2021;134:104691.
90. Fang X, Mei Q, Fan X, et al. Value of metagenomic next-generation sequencing for the detection of pathogens in bronchoalveolar lavage fluid in ventilator-associated pneumonia patients. *Front Microbiol*. 2020;11:599756.
91. Zhang P, Chen Y, Li S, et al. Metagenomic next-generation sequencing for the clinical diagnosis and prognosis of acute respiratory distress syndrome caused by severe pneumonia: a retrospective study. *PeerJ*; 2020;8:e9623.
92. Wylie KM. The virome of the human respiratory tract. *Clin Chest Med* 2017;38:11-19.
93. Wypych TP, Wickramasinghe LC, Marsland BJ. The influence of the microbiome on respiratory health. *Nat Immunol* 2019; 20: 1279-1290.
94. Budden K, Gellatly S, Wood D, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat Rev Microbiol* 2017;15: 55-63.