

İNFLUENZA VİRUS AŞISI İLE AŞILANMIŞ BİREYLERDE ELISA İLE SEROKONVERSİYONUN GÖSTERİLMESİ

ELISA FOR MONITORING SEROCONVERSION IN INDIVIDUALS VACCINATED WITH INFLUENZA VIRUS VACCINE

Murat SAYAN¹
Nuran YULUĞ¹

Sabahat GENÇ²

Ayşe YÜCE³

Eyüp Sabri UÇAN²

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir

¹ Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

² Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

³ İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anahtar Sözcükler: Influenza virus, Split Virion Aşı, serokonversiyon, ELISA, hemaglutinasyon inhibisyon testi

Keywords: Influenza virus, Split Virion Vaccine, serokonversiyon, ELISA, hemagglutination inhibition test

Geliş: 29 Temmuz 2004

Kabul: 13 Aralık 2004

ÖZET

İnfluenza virüsleri, dünyada yaygın epidemilere yol açabilmekte ve solunum yolları kökenli hastalıklarda önemli mortalite ve morbidite nedeni olabilmektedir. Bundan dolayı aşılama, virüsten korunmak için en iyi yöntem olarak gösterilmektedir. Bu çalışmanın amacı, influenza virüs aşılamasından sonra serokonversiyonun izlenmesinde ELISA'nın yerini saptamaktır. Çalışmada, 1994-95 influenza mevsimi öncesinde, kronik obstrüktif akciğer hastalıklı ve astımlı 50 hasta, trivalent influenza aşısı ile aşılandı. Aylar içindeki antihemaglutinin antikorlarının değişimi ELISA ile izlendi ve bu yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü hemaglutinasyon inhibisyon yöntemiyle karşılaştırıldı. IgG antikorlarının serokonversiyonu; altıncı ayda H₁N₁ subtipi için % 64, H₃N₂ subtipi için % 52, ve B tipi için %40 olarak saptandı ve ELISA'nın duyarlılığı %76 ve özgüllüğü %88 olarak belirlendi. Aşılamadan altı ay sonra, antihemaglutinin IgG antikorlarının artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.005). Sonuç olarak, aşılamadan, hastaların önemli bir kısmında, var olan hemaglutinasyon inhibisyon antikorlarını arttırdığı, ELISA'nın zaman almayan ve göreceli olarak duyarlı ve özgül bir yöntem olduğu, serokonversiyonu ve infeksiyonu izlemede kullanılabileceği düşünülmektedir.

SUMMARY

Influenza viruses can cause worldwide epidemics and are important causes of mortality and morbidity due to pulmonary diseases. The best method of prevention is to vaccinate people each year before the influenza season. The purpose of this study was to evaluate ELISA in determining seroconversion following vaccination against influenza virus. Prior to 1994-95 influenza season, 50 patients suffering from chronic obstructive pulmonary diseases and asthma were vaccinated with trivalent influenza split virion vaccine. To detect seroconversion, antihemagglutinin IgA, IgM and IgG responses and their differences with time were followed with ELISA and sensitivity and specificity of ELISA were compared with hemagglutination inhibition assay. Seroconversions of IgG were found to be 52 % for H₃N₂, 64 % for H₁N₁, and 40 % for B virus in the 6th month. Sensitivity was 76 %, specificity was 88 % in inhouse ELISA. A significant increase in antihemagglutinin IgG antibodies after vaccination was determined at the end of 6 months (p<0.005). As a result, vaccination with influenza virus vaccine caused an increase in the percentage of patients having preventive HI antibody levels. As ELISA is not time-consuming and has considerable sensitivity and specificity, it may be used for detection of seroconversion in vaccinees as well as for follow-up of influenza infection in the community.

GİRİŞ

Serolojik bir yöntem olan hemaglutinasyon inhibisyon (HAI) testi ilk defa Hirst (1941) tarafından tanımlanmış ve Salk (1944) tarafından modifiye edilmiştir (1). Yöntem, kimi pratik problemler barındırmakta birlikte, sıklıkla influenza virüsünün laboratuvar tanısında kullanılmaktadır. İnfluenza virüslerine duyarlı çeşitli canlılar, serumlarında testte yalancı pozitifliğe yol açacak ve yeni izolatların tanımlanmasını engelleyecek α -2 makroglobulin fraksiyonunda-nonspesifik inhibitörler içerirler. Ayrıca HAI yönteminde kullanılan eritrositler, aynı tür içinde farklı duyarlılığa sahip olabilmekte, diğer yandan testin değerlendirilmesindeki subjektif mekanizma hatalara yol açabilmektedir. Ancak yöntemin uygulama alanındaki basitliği, ekipman kolaylığı ve testin tekrarlanabilirliğinin yüksekliği önemli avantajları olarak göze çarpmaktadır (1, 2).

Her yıl influenza ve onun komplikasyonlarından dünyada 20 - 40 bin arasında ölüm olmaktadır. Bu aşamada aşılama, influenza morbidite ve mortalitesini azaltmada en iyi yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (3).

Türkiye'de influenza virion aşısı ile aşılama geniş çaplı kullanım alanına sahip değildir.

Öte yandan bu aşılanmanın sonuçları ya da aşığı karşı oluşan koruyucu antikor yanıt düzeyleri yeterince bilinmemektedir.

Araştırmada akciğer hastalıklı yaşlı bireylerde trivalan influenza split virion aşısına karşı serokonversiyonun gösterilmesi ve bu amaçla kullanılan HAI ve ELISA yöntemlerinin performans kriterleri açısından karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Göğüs Hastalıkları Kliniği'nde yatan, 40-75 yaş aralığında bulunan, kronik obstruktif akciğer hastalıklı (KOAH) ve astımlı 22 erkek ve 28 kadın hastada yapıldı.

Hastalar trivalan influenza split virion aşısı ile (Vaxigrip™ - Pasteur Merieux Connaught, Fransa) (aşı içeriği: A/Shangdong/9/93(H₃N₂), A/Texas/36/91(H₁N₁), B/Panama/45/0) aşılandı.

Hastalardan aşılama öncesi ile aşıdan 1 ve 6 ay sonra serum örnekleri toplandı, 10 µg/ml sodyum azit eklenerek -70° C'da çalışma gününe kadar saklandı.

Serum örnekleri HAI testine alınmadan önce nonspesifik inhibitörlerden arındırıldı ve bu amaçla önce tripsinize

(5µg/µl tripsin ile 56° C'da 30 dak. inkübasyon - Gurr® tamponu, pH: 6.8 - 1/10 serum dilüsyonunda) edildi, ardından 4°C'da hemadsorbsiyon işlemi uygulandı. Hemaglutinasyon inhibisyon testinde kullanılmak üzere kardiyak delme ile tavuk eritrositleri elde edildi ve modifiye Alsever solüsyonunda (pH: 6.1) tutuldu. Eritrositler fosfat tamponu ile yıkandı (pH: 7.2) ve fotometrik özellikte standart bir süspansiyon hazırlandı (1, 4). İnfluenza virus hemaglutinin antijenleri, Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü'nden sağlandı ve 4° C'da saklandı.

İnhibitörlerden arındırılmış serum örnekleri, yuvarlak tabanlı polistren mikrokuyucuklarda (Elkay Products Inc.-ABD) iki kat seri dilüsyona (1/10-1/1280) alındı. Testte hemaglutinin antijenleri dört hemaglutinasyon inhibisyon ünitesi kadar kullanıldı. Serum HAI titresi, hemaglutinasyonun tamamen önlendiği en yüksek serum dilüsyonu olarak belirlendi.

Test sonuçlarının geçerliliği, negatif ve pozitif referans test serumlarının kontrol olarak kullanılması ile sağlandı. Tüm örnekler hem HAI hem de ELISA ile aynı zamanda incelendi.

ELISA yönteminde düz tabanlı polistren mikrokuyucuklar (Elkay Products Inc.-ABD) hemaglutinin (10 µg/100 µl) antijenleri ile (karbonat tamponunda, pH: 9.6 / - 4° C bir gece inkübasyonda) kaplandı. Hasta serum örnekleri 1/100 dilüsyonda incelendi. Konjugat olarak anti-human IgG, IgA, IgM alkalin fosfat (Orion Diagnostic®-Espoo, Finlandiya) ve substrat olarak p-nitrofenil fosfat (Sigma® Chemical Company- St. Louis, ABD) kullanıldı. Mikrokuyucukların fotometrik absorbansı 405 nm'de (ELISA Reader; SLT Spectra II®-Kanada) elde edildi. ELISA ile rölatif antikor titrelerinin saptanabilmesi için referans serum kontrolleri kullanıldı [(Dünya Sağlık Örgütü standart serum örnekleri ile kalibre edildi (1/5 - 1/640 HAI titresi dilüsyonlarında)]. ELISA eşik değeri, çok sayıda negatif kontrol örneğinin test edilmesi ve absorbans ortalamasının 1 standart deviasyonunun alınması ile hesaplandı (4).

İstatistiksel analiz

Bu araştırmada veriler SPSS yazılımı (SPSS win. 6.0, Manchester, İngiltere, 1989-1993) ile analiz edildi. Bağımsız değişkenlerin saptanması için verilerin geometrik ve aritmetik ortalamaları hesaplandı. Ayrıca araştırmada karşılaştırılan test yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve etkinlik performansları belirlendi.

BULGULAR

Antihemaglutinin antikorları 1/40 ve daha üzeri titrelerde koruyucu antikor düzeyi, HAI antikorlarında aşılama sonrası dört kat artış ise aşıya immün yanıt yani serokonversiyon olarak kabul edildi (1).

Tablo 1'de hastalara ait antikor titreleri görülmektedir. Koruyucu antikor düzeyleri aşıdan bir ay sonra %100 oranda artmış ve altıncı ayda devam etmiştir. Her bir subtip karşı oluşan IgA, IgM ve IgG tipi antikor yanıtları Tablo 2'de geometrik ortalama titreleri olarak verilmiştir. H₃N₂, H₁N₁ ve B virusuna karşı IgA düzeyleri aşılama sonrası birinci ayda artmış, ancak altıncı ayda azalmıştır (p<0.005). IgM yanıtında ise bu durum anlamlı bulunmamıştır (p>0.005).

IgG antikor yanıtları H₃N₂ için birinci ve altıncı ayda, H₁N₁ için sadece altıncı ayda anlamlı olarak artmıştır (p<0.005). B virusuna karşı IgG yanıtı altıncı ayda azalmıştır. Aşılama sonrası IgG antikor yanıtlarının serokonversiyonu Tablo 3'te gösterilmiştir. Hastalarda H₃N₂ ve H₁N₁ subtiplerine karşı immünizasyon sırasıyla %52 ve %64 oranında gelişmiş, B suşunda bu oran %40'da kalmıştır. Aşı suşlarına karşı IgG yanıtları ELISA ile ölçülmüş ve HAI yöntemi altın standart alınarak duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve etkinlik performansları aşı öncesi ve bir ay sonrası olmak üzere karşılaştırılmıştır (Tablo 4).

Tablo 1. Hastalarda varolan koruyucu HAI antikor yanıtları ve influenza aşılması sonrasında oluşan serokonversiyon oranları

Aşı virusu	Subtip	Aşı sonrası koruyucu antikor düzeyleri (%) [*]			Serokonversiyon ^{**}	
		Aşı öncesi	1. ay	6. ay	1. ay	6. ay
A/Shangdong/9/93	H ₃ N ₂	26	56	66	36	48
A/Texas/36/91	H ₁ N ₁	40	86	82	58	62
B/Panama/45/90		36	62	80	16	48

HAI: Hemaglutinasyon inhibisyon

^{*} Koruyucu antikor düzeyi >1/40

^{**} Serokonversiyon: HAI antikor yanıtlarında aşı sonrası en az dört katlık artış

Tablo 4. Altın standart HAI testi ile geliştirilen ELISA'nın performans karşılaştırması

Subtip	P ^a	N ^b	Hasta sayısı (n)				Frekans (%)				
			HAI				ELISA				
			GP ^c	GN	YP	YN	D ^d	Ö ^e	PPD ^f	NPD ^g	E ^h
H ₃ N ₂	18	26	10	34	4	2	83	89	71	94	88
H ₁ N ₁	29	19	11	30	4	5	69	88	73	85	82
B	8	26	6	37	5	2	75	88	54	94	86

^a P: Pozitif ^b N: Negatif ^c GP: Gerçek pozitif, GN: Gerçek negatif, YP: Yalancı pozitif, YN: Yalancı negatif

^d D: Duyarlılık: GP/GP+YN x100, ^e Ö: Özgüllük: YN/YN+YPx100, ^f PPD: Pozitif prediktif değer: GP /GP+YPx100 ^g NPD: Negatif prediktif değer: GN/GN+YNx100, ^h E: Etkinlik: GP+GN/GP+YP+YN+GN x100

Tablo 2. ELISA ile ölçülen IgA, IgM ve IgG antikor yanıtlarında geometrik ortalama titreleri

Aşı virusu	Subtip	Aylar	ELISA [*]		
			IgA	IgM	IgG
A/Shangdong/9/93	H ₃ N ₂	0	27	27	112*
		1	74*	60	313*
		6	43	29	242*
		0	33	24	194
A/Texas/36/91	H ₁ N ₁	1	86*	42	324*
		6	36	33	370*
		0	9	34	73
B/Panama/45/90		1	103*	48	112
		6	24	38	97

* ELISA'da geometrik ortalama titreleri ve p<0.005

Tablo 3. IgG antikor yanıtları yönünden ELISA da serokonversiyon oranları

Aşı virusu	Subtip	Serokonversiyon oranları (%) [*]		
		1 ay	6 ay	Toplam
A/Shangdong/9/93	H ₃ N ₂	28	24	52
A/Texas/36/91	H ₁ N ₁	30	34	64
B/Panama/45/90		22	18	40

TARTIŞMA

Bir influenza aşısının A ve B tipi İnfluenza viruslarından oluşması gerektiği 1940'lı yıllarda gösterilmiştir. Son yıllarda ise trivalan aşılar, 1978'den beri dolaşımda bulunan H₃N₂ ve H₁N₁ subtiplerini içermektedirler (5,6). Bu nedenle, bu çalışmada kullanılan aşı içeriğinde, H₂N₂ subtipi bulunmamaktadır.

Çalışma grubu KOAH ve astımlı hastalardan oluşturuldu, çünkü influenza bu hastalıklarda semptomları arttıran

tetikleyici faktörlerden biridir. Hastalar influenzanın komplikasyonlarına daha duyarlıdır ve bu nedenle korunma amaçlı aşılama yapılmalı, koruyucu antikor düzeyleri oluşturulmalıdır (7, 8).

Bu çalışmada, olgularda aşılama sonrasında serokonversiyon gelişti ve hemagglütinasyon inhibisyon antikor ünitelerinde en az dört katlık artışlar saptandı. Olguların yaklaşık yarısında aşı sonrası serokonversiyon oluşurken en iyi immünizasyon H₁N₁ subtipinde oluştu (Tablo 1).

Araştırmalarda serokonversiyon oranları oldukça farklı çıkmaktadır. Şenol ve ark. (9) serokonversiyon oranlarını aşı sonrası birinci ayda H₃N₂ için %27, H₁N₁ için %29 ve B virus tipi için %34 olarak saptamışlardır. Powers ve Belshe (10) 17 yaşlı hastada aşıya serokonversiyonu H₃N₂ için %29 ve H₁N₁ subtipi için %18 oranında belirlemişlerdir.

Nötralizan antihemagglütinin antikorları influenzanın serolojik tanısında oldukça değerlidir (1, 6, 11). Bu amaçla sıklıkla HAI testi kullanılmaktadır. Bu yöntem basit, hesaplı ve özellikle İnfluenza A viruslarına karşı oldukça duyarlı fakat B tipi İnfluenza viruslarına karşı daha az duyarlıdır (11). Öte yandan, serumda bulunan non-spesifik inhibitörler yöntemin duyarlılığını etkiler ve inhibitörleri nötralize etmek test süresini iki güne çıkarır (1, 2). ELISA, HAI yönteminden daha spesifik, duyarlı ve hızlı bulunmaktadır. Yöntem aynı zamanda nötralizan karakterdeki antihemagglütinin ve nöraminidaz antikorları ile nötralizan olmayan matriks ve nükleoprotein antikorlarını da saptamaktadır (12-14). ELISA'da tek bir serum dilüsyon örneği ile çalışmak ve antikorları kantite etmek mümkündür. Serum inhibitörleri bunu etkileyememektedirler. İnfluenza da lokal immün yanıt ve IgA antikorları önem kazanmaktadır çünkü infeksiyon bir üst solunum yolu infeksiyonudur. ELISA ile IgA ve izotiplerini göstermek mümkün olabilmektedir (2, 11-15).

Çalışmada, IgG geometrik ortalama titreleri IgA ve IgM'den daha büyük bulunmuştur (Tablo 2). Bu, korunmada önemlidir ve altı aydan sonra dahi saptanabilmiştir. Olgularda IgG serokonversiyonu ile yeterli immünizasyon yanıtı elde edilmiş ve subtipler arasında en yüksek oran H₁N₁ subtipinde belirlenmiştir (Tablo 3).

Araştırmada ELISA ve HAI yöntemleri ile benzer serokonversiyon oranları belirlenmiştir. Glück ve ark. (16) 126 yaşlı bireyde ELISA ile serokonversiyonu A virusu için % 59, B virusu için % 44 olarak saptamışlardır. Synder ve ark. (14) çalışmalarında H₃N₂ için % 59, H₁N₁ için % 83 serokonversiyon oranı bildirmişlerdir.

ELISA'da duyarlılık, IgG ile belirlenmiş ve en yüksek %83 ile H₃N₂ subtipinde, en düşük %69 ile H₁N₁ subtipinde saptanmıştır (Tablo 4). Özgüllük, A ve B viruslarında benzer oranlarda yaklaşık %88 olarak bulunmuştur.

ELISA, negatif örnekleri yüksek ve benzer oranda negatif bulurken, pozitif örnekleri beklenenin üzerinde ve değişken oranda pozitif bulmuştur. Yazarların yapımı olan ELISA zaman alıcı değildir ve hatırı sayılır duyarlılık ve özgüllüktedir. Bu nedenle aşılama sonrası serokonversiyon saptamasında ve toplumdaki influenza infeksiyonunun takibinde kullanılabilir.

Kimi hastaların aşı öncesinde düşükte olsa koruyucu antikor düzeylerine sahip olması onların aynı influenza virusları ile daha önceden karşılaştıklarını ya da farklı influenza viruslarına rağmen çapraz reaktif antikorlar ürettiklerini göstermektedir.

Aşı öncesinde var olan koruyucu HAI antikorları, H₁N₁ subtipi ve B virus tipine göre daha az oranda H₃N₂ subtipinde saptanmıştır (Tablo 1). Aşılama ile bu varolan koruyucu HAI antikorlarının oranı yukarılara doğru çekilebilmiştir. Bu bulgu, aşılamının etkinliğini göstermektedir.

Aşılama yaşlı ve hasta bireyler için etkin ve gereklidir. Çünkü virusun hemagglütinin ve nöraminidaz antijenlerine karşı koruyucu nitelikte antikor yazarlarının oluşmasını sağlamaktadır (17,18). Kullanılan aşının içeriğindeki 15 µg hemagglütinin antijeni HAI antikor üretimini yeterince tetikleyebilir. Bu nedenle aşılamının ardından daha yüksek nötralizan antikor düzeyleri amaçlanıyorsa antijen konsantrasyonunun artırılması sağlanabilir ya da ikinci bir aşı dozu uygulaması tercih edilebilir. Ayrıca aşı içeriğine adjuvan eklenmesi de düşünülebilir.

Astım ve KOAH gibi kronik solunum yolu hastaları ve diğer risk gruplarının aşılanması yaşam kalitelerini artırmakta, hastane yatışlarını ve infeksiyon epizotlarını azaltıp tedavi giderlerini düşürmektedir. Ancak yaşlı bireylerde immünite bir yıldan az sürebilmektedir. Bu nedenle aşı her yıl tekrarlanmalı ya da bir ay arayla ikinci bir doz uygulaması yapılmalıdır.

TEŞEKKÜR

Hemagglütinin antijenlerini ve referans kontrollerini bizlere sağladığı için Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Anonymous.** *Advanced Laboratory Techniques for Influenza Diagnosis*. Immunology Series. No: 6. Procedural Guides. Atlanta: U.S. Department of Health Education and Welfare, Public Health Service, **1975**: 26-8.
2. **Benne CA, Kraaijeveld CA, van Strijp JAG, et al.** Interactions of surfactant protein A with Influenza A viruses: Binding and neutralization. *J Infect Dis* **1995**; 171: 335-41.
3. **Berktaş MB.** Influenza vaccination. *Mikrobiyol Bült* **1994**; 28: 392-403.
4. **Deutscher MP.** Guide to protein purification. Abelson JN, Simon MI, eds. *Methods in Enzimology*. San Diego, CA: Academic Press Inc. Harcourt Brace & Co, **1990**; 182: 57-459.
5. **Belshe RB, Swierkosz EM, Anderson EL, Newman FK, Nugent SL, Maassab HF.** Immunization of infants and young children with live attenuated trivalent COPD - recombinant Influenza A/H₁N₁, H₃N₂ and B vaccine. *J Infect Dis* **1992**; 165: 727-32.
6. **Murphy BR, Clements ML, Tierney EL, Robert EB, Stienberg J, Chanock RM.** Dose response of Influenza A/Washington/897/80 (HN) avian - human reassortant virus in adult volunteers. *J Infect Dis* **1985**; 152: 225-9.
7. **Heilman C, Montagne JR.** Influenza: Status and prospects for its prevention, therapy and control. *Pediatr Clin North Am* **1990**; 37: 669-81.
8. **Karen L, Kristin L, Gregory A, Robert A, Pahrn D.** Side effects of influenza vaccine in the elderly people. *JAMA* **1992**; 5: 617-9.
9. **Şenol E, Yetkin A, Artuk Ç, Aktaş F, Ulutan F.** Evaluation of the efficacy of influenza vaccination in health care professionals. *İnfek Derg* **1996**; 10: 21-4.
10. **Powers DC, Belshe RB.** Vaccine-induced antibodies to heterologous Influenza A H₁N₁ viruses: Effects of aging and "original antigenic sin". *J Infect Dis* **1994**; 169: 1125-9.
11. **Harman MW, Kendal AP.** Influenza viruses. In: Balows A, Hausler WS, Herrmann K, Isenberg HD, Shadony HJ, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, **1991**: 868-77.
12. **Jawetz E, Melnick J, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN.** *Medical Microbiology*. 18th ed. East Norwalk, CT: Prentice-Hall, Appleton and Lange, **1989**: 467-78.
13. **Leonardi GP, Leib H, Birkhead GS, Smith C, Costello P, Conron W.** Comparison of rapid detection methods for Influenza A virus and their value in health - care management of institutionalized geriatric patients. *J Clin Microbiol* **1994**; 32: 70-4.
14. **Snyder MH, Banks S, Murphy BR.** Determination of antibody response to Influenza virus surface glycoproteins by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay. *J Infect Dis* **1988**; 26: 2034-40.
15. **Heilman C.** Influenza: Status and prospects for its prevention, therapy and control. *Pediatr Clin North Am* **1990**; 37: 669-81.
16. **Glück R, Mischler R, Finkel B, Que JU, Scarpa B, Cryz Jr SJ.** Immunogenicity of new virosome Influenza vaccine in elderly people. *Lancet* **1994**; 344: 160-3.
17. **Callan RJ, Hartmann FA, West SEH, Hinshaw VS.** Cleavage of Influenza A virus H₁ hemagglutinin by swine respiratory bacterial proteases. *J Virol* **1997**; 71: 7579-85.
18. **Kodihalli S, Haynes JR, Robinson HL, Webster RG.** Cross-protection among lethal H₃N₂ Influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin. *J Virol* **1997**; 71: 3391-6.

İLETİŞİM

Dr. Murat SAYAN
 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
 Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
 İZMİR
 e-posta: sayanmurat@hotmail.com