

Influenza Virüs Enfeksiyonlarının Moleküler ve İmmün Floresan Yöntemlerle Saptanması

Detection of Influenza Virus Infections by Molecular and Immunofluorescence Methods

Deniz YILDIRIM¹, Deniz ÖZDOĞRU SAĞDIÇ¹, Buket ŞEFLEK¹, Mehmet ÇİMENTEPE¹, İbrahim BAYRAM², Fügen YARKIN¹

¹ Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı, Adana.

¹ Çukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Discipline of Virology, Adana, Turkey.

² Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı, Adana.

² Çukurova University Faculty of Medicine, Discipline of Pediatric Oncology, Adana, Turkey.

* Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TF2012D3 numaralı proje olarak desteklenmiş ve 1. Uluslararası Akdeniz Bilim ve Mühendislik Kongresi (1st International Mediterranean Science and Engineering Congress; IMSEC 2016)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 08.03.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 09.08.2017

ÖZ

Influenza virüs enfeksiyonları tüm dünyada mevsimsel epidemilere sebep olmanın yanı sıra pandemiler oluşturmaya sebebiyle de insan sağlığı için son derece önemlidir. Influenza yüksek morbidite ile ilişkilidir ve hayatı tehdit eden viral veya bakteriyel pnömoni gibi ciddi komplikasyonlara sebep olabilir. Özellikle küçük çocuklar, ileri yaşta olanlar, kalp hastalığı, akciğer hastalığı, böbrek hastalığı, şeker hastalığı gibi kronik hastalığı olanlar ve immün sistemi baskılanmış kişilerde influenza virüs enfeksiyonlarından kaynaklanan komplikasyonlar ve ölüm riski daha yüksektir. Bu çalışmanın amacı, solunum yolu enfeksiyonu olan ve hastaneye yatırılan hastalarda gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR, Sacace, İtalya), konvansiyonel RT-PCR ve direkt immün floresan antikor (Direct immunofluorescence Antibody; DFA, Argene SA, Fransa) testleri ile influenza tip A ve B virüsü enfeksiyonlarının sıklığını ve influenza A virüsü alt tiplerini tespit etmektir. Solunum yolu belirtileri olan toplam 476 hastadan, 01.04.2012-31.12.2013 tarihleri arasında "flocked eküvyon" (Copan Diagnostics, İtalya) ile nazofarengeal sürüntü örnekleri toplanmıştır. RT-PCR testi ile olguların %20.5 (98/476)'inde influenza A virüsü ve %3.3 (16/476)'ünde influenza B virüsü tespit edilmiştir. Çalışma süresi boyunca 98 influenza virüsü izolatatının %63.3'ünün influenza A(H1N1)pdm09, %36.7'sinin influenza A(H3N2) alt tipleri olduğu bulunmuştur. Influenza A(H1N1)pdm09 alt tipine bağlı en fazla Ocak 2013 tarihinde 12 olgunun, influenza A(H3N2) alt

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Fügen Yarkin, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı, 01330 Sarıçam, Adana, Türkiye.
Tel (Phone): +90 322 338 6060-3481, **E-posta (E-mail):** fugeny@yahoo.com

tipine bağlı en fazla Aralık 2013 tarihinde 11 olgunun olduğu gözlenmiştir. Gerçek zamanlı RT-PCR testi referans olarak alındığında influenza A ve B için DFA testinin ve influenza A için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) primerlerinin (M30F2/08 ve M264R3/08) kullanıldığı konvansiyonel RT-PCR testinin duyarlılığı sırasıyla %72.4, %75, %96 ve özgüllüğü %99.2, %99.5 ve %100 bulunmuştur. Sonuç olarak, çalışma grubunda influenza A virüsü enfeksiyonu oldukça yüksek oranda (%20.5) tespit edilmiştir. Influenza virüs tipleri ve alt tiplerinin izlenmesi, influenza aşı suşlarının dolaşımdaki influenza virüsleri ile uyumunun değerlendirilmesi ve pandemik potansiyeli olan alt tiplerin tanısı için gereklidir. Influenza virüsü enfeksiyonlarının erken tanısında gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi kullanılarak uygun antiviral tedavinin planlanması hastanın tedavi yönetimine önemli katkı sağlayacaktır. Böylece gereksiz ilaç kullanımı önlenecek ve hastalığın etkin tedavisiyle enfeksiyon zamanında kontrol altına alınacaktır.

Anahtar sözcükler: *Influenza tip A virüsü; influenza tip B virüsü; gerçek zamanlı RT-PCR; alt tiplendirme; immün floresan test.*

ABSTRACT

Influenza virus infections are extremely important for human health due to the occurrence of seasonal epidemics and pandemics worldwide. Influenza is associated with high morbidity and may result in serious complications such as life threatening viral or bacterial pneumonia. Especially, young children, older adults, patients with chronic diseases such as heart, lung, kidney, and diabetes and immunosuppressed people are at higher risk for complications and death from influenza virus infections. The aim of this study was to determine the incidence of influenza type A and B virus infections and influenza A virus subtypes in hospitalized patients with respiratory tract infections by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR, Sacace, Italy), conventional RT-PCR and direct immunofluorescence antibody (DFA, Argene SA, France) tests. Nasopharyngeal swab specimens were collected from a total of 476 patients with respiratory tract symptoms by using flocked swabs (Copan Diagnostics, Italy) between 1 April 2012 and 31 December 2013. Influenza A virus was detected in 20.5% (98/476) and influenza B virus in 3.3% (16/476) of the cases by real-time RT-PCR test. During the study period, 63.3% of 98 influenza virus isolates were found as influenza A (H1N1)pdm09 and 36.7% were influenza A (H3N2) subtypes. Influenza A (H1N1) pdm09 subtype was observed in 12 cases in January 2013 and influenza A (H3N2) subtype was observed in 11 cases in December 2013 as the highest values. When the real-time RT-PCR test was regarded as the reference test, the sensitivities of DFA test for influenza A and B and conventional RT-PCR test with WHO primers (M30F2/08 and M264R3/08) for influenza A were detected as 72.4%, 75%, 96% and the specificities were detected as 99.2%, 99.5% and 100%, respectively. In conclusion, influenza A virus infection was detected rather high with a rate of 20.5% in the study group. The monitoring of influenza virus types and subtypes is required for the evaluation of influenza vaccine strains and circulating influenza viruses and for the identification of subtypes with pandemic potential. Planning for appropriate antiviral therapy using real-time RT-PCR in the early diagnosis of influenza virus infections will significantly contribute to the management of the patient's treatment. Thus, unnecessary drug use will be prevented and controlled with effective treatment of the disease at the time of infection.

Keywords: *Influenza type A virus; influenza type B virus; real-time RT-PCR; subtyping; immunofluorescence test.*

GİRİŞ

Grip, insanlarda kendi kendini sınırlayan üst solunum yolu enfeksiyonundan pulmoner komplikasyonlarla seyreden fulminan hastalığa kadar değişen geniş bir klinik spektruma sahiptir. Influenza virüsünün önemli özelliği epidemi ve pandemiler oluşturmasıdır. Mevsimsel influenza önemli morbidite ve mortalite sebebidir. Her yıl popülasyonun genellikle %5-20'si influenza virüsü ile enfekte olmaktadır. Influenza; okul ve iş gücü kaybının yüksek olması, tedavi ve hastane giderleri ile büyük oranda sosyal ve ekonomik kayba yol

açmaktadır. Zanamivir ve oseltamivir gibi antiviral ilaçlar, influenzanın önlenmesi veya tedavisi için önerilse de, influenzaya karşı korunmada en etkili yöntem aşıdır. Ülkemizde uygulanan influenza aşısı inaktif aşı olup üç viral suşa karşı antijenler içeren trivalan influenza aşısıdır. Trivalan influenza aşısı, influenza A(H3N2), A(H1N1)pdm09-like virüs ve influenza B gibi üç farklı influenza virüsüne karşı korunma sağlar. Her yıl aşılar yaygın olması en muhtemel suşları yansıtacak şekilde modifiye edilerek değiştirilmektedir^{1,2}.

İnfluenza virüslerinin alt tiplendirmesinin yapılması toplumda dolaşan suşları, influenzanın yayılımını ve ciddiyetini izlemek, dolaşan suşların karakterizasyonu ile yıllık aşının formülasyonu ve pandemik potansiyeli olan suşların tanınması yönünden önemlidir. Ayrıca influenza A virüsünün alt tipleri, ciddi hastalığı olanlar, influenza ile ilişkili hastalıktan kaybedilenler, influenzaya bağlı komplikasyonlar için yüksek riskte olan hastalar ve epidemiyolojik araştırmalar için özellikle saptanmalıdır³.

Bu çalışmanın amacı, solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), konvansiyonel RT-PCR ve direkt floresan antikor (DFA) testleri ile solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda influenza virüslerinin sıklığını tespit etmektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma için, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığından "Etik Kurul Onayı" alındı. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik verileri ve klinik belirtileri hazırlanan formlara kayıt edildi.

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 01.04.2012-31.12.2013 tarihleri arasında Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalının yoğun bakım, onkoloji, hematoloji, çocuk enfeksiyon, yenidoğan yoğun bakım, allerji, süt çocuğu ve büyük çocuk servislerinde, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı servislerinde yatan ve solunum yolu enfeksiyonu tanısı konan 476 çocuk ve erişkin hastadan nazofarengeal sürüntü örnekleri steril nazofarengeal naylon "flocked eküvyon" (Copan Diagnostics, İtalya) kullanılarak alındı. Örneğin 2 ml'si DFA testi için geri kalan 1 ml'si ise gerçek zamanlı RT-PCR çalışılncaya kadar -80°C'de saklandı. Nazofarengeal sürüntü örnekleri influenza A ve B antijeni tespiti için DFA testi (Argene SA, Fransa), influenza A ve B varlığını tespit için multipleks gerçek zamanlı RT-PCR (Influenza A and B Real-TM, Sacace, İtalya) testleri ile incelendi⁴.

İnfluenza A virüsü pozitif bulunan örnekler H1N1 ve H3N2 alt tipleri yönünden influenza A H1N1 ve H3N2 Real-TM PCR kiti (Sacace, İtalya) ile araştırıldı. Ayrıca, bütün örnekler Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün önerdiği influenza A virüsünün matriks geninin 244 bp'lik bölgesine yönelik M30F2/08 ve M264R3/08 primerlerin kullanıldığı konvansiyonel RT-PCR ile test edildi⁵. Amplifikasyon ürünleri etidyum bromürlü %2 agaroz jel elektroforezi kullanılarak jel görüntüleme sisteminde (DNR Bio-Imaging Systems Visible and Ultraviolet Transilluminator, MiniBIS Bio-Imaging System) 244 bp'lik bandların varlığı yönünden incelendi.

BULGULAR

Solunum yolu enfeksiyonu olan toplam 476 hastanın 98 (%20.5)'inde influenza A virüsü, 16 (%3.3)'sında influenza B virüsü gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi ile tespit edilmiştir.

Influenza A virüsü (98 olgu) ve influenza B virüsü (16 olgu) enfeksiyonu olan toplam 114 hastanın kliniklere göre dağılımına bakıldığında; 31 (%27.2)'i çocuk yoğun bakım, 27 (%23.7)'si çocuk onkoloji, 17 (%15)'si büyük çocuk, 11 (%9.6)'i enfeksiyon hastalıkları, 10 (%8.8)'u süt çocuğu, 7 (%6.1)'si yenidoğan yoğun bakım, 4 (%3.5)'ü çocuk enfeksiyon, 3 (%2.6)'ü çocuk hematoloji, 3 (%2.6)'ü çocuk allerji, 1 (%0.9)'inin de göğüs hastalıkları bölümlerinde yatan hastalar olduğu saptanmıştır.

Solunum yolu enfeksiyonu olan toplam 476 hastanın 138'inin pnömoni, 43'ünün bronşiyolit, 35'inin üst solunum yolu enfeksiyonu ve 260'ının hematolojik, immünolojik, kardiyak, metabolik, nörolojik ve onkolojik hastalıklar gibi altta yatan hastalıkları olan solunum yolu enfeksiyonu ön tanısı alan olgular olduğu saptanmıştır. Pnömoni, bronşiyolit, üst solunum yolu enfeksiyonu ve altta yatan hastalığı olup solunum yolu enfeksiyonu olan influenza A virüsü pozitif hastaların oranı sırasıyla %17.4, %23.2, %25.7 ve %21.1, influenza B ile enfekte hastalarda bu oranların sırasıyla %2.9, %4.6, %2.8 ve %3.4 olduğu tespit edilmiştir (Tablo I).

Influenza A virüsü alt tiplendirmesi yapıldığında 01.04.2012-31.12.2013 döneminde 98 influenza virüs izolatının 62 (%63.3)'sinin influenza A(H1N1)pdm09, 36 (%36.7)'sinin influenza A(H3N2) olduğu saptanmıştır. Influenza A virüs A(H1N1)pdm09 alt tipi Ocak 2013 tarihinde 12, Aralık 2012 tarihinde 9, ekim ve kasım aylarında sekiz izolatta görülürken, influenza A virüs A(H3N2) en çok 2013 yılı aralık ayında 11, ekim ve kasım aylarında dört, ocak ve eylül aylarında üç izolatta tespit edilmiştir (Tablo II).

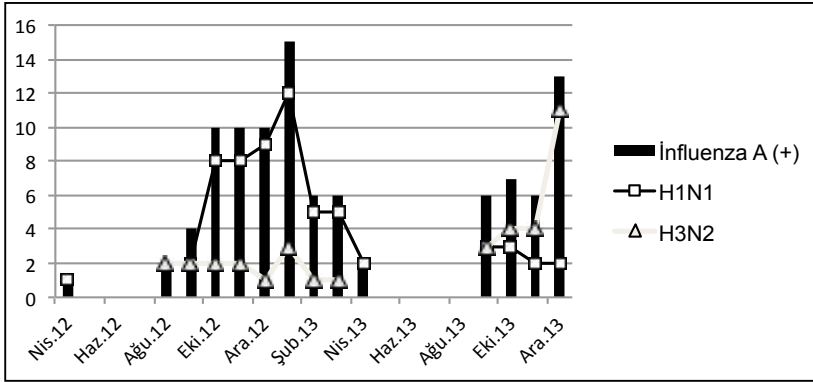
Influenza A(H1N1) pdm09 alt tipi 01.04.2012-30.04.2013 arasındaki dönemde toplam 6 influenza izolatının 52 (%86.7)'sinde, influenza A (H3N2) alt tipi ise 14

Tablo I. Influenza A ve B Virüs ile Enfekte Olan ve Olmayan Hastaların Klinik Tanıları

Hastalık	Influenza A virüsü pozitif n (%)	Influenza B virüsü pozitif n (%)	Negatif n (%)	Toplam n (%)
Pnömoni	24 (17.4)	4 (2.9)	110 (79.7)	138 (29)
Bronşiyolit	10 (23.2)	2 (4.6)	31 (72)	43 (9)
ÜS YE	9 (25.7)	1 (2.8)	25 (71.4)	35 (7.4)
SYE + altta yatan hastalık	55 (21.1)	9 (3.4)	196 (75.3)	260 (54.6)
Toplam	98 (20.5)	16 (3.3)	362 (76.1)	476 (100)
ÜS YE: Üst solunum yolu enfeksiyonu, SYE: Solunum yolu enfeksiyonu.				

Tablo II. İnfluenza A Virüs ve Alt Tiplerin Aylara Göre Dağılımı

Ay	İnfluenza A Sayı	H1N1 Sayı	H3N2 Sayı	Ay	İnfluenza A Sayı	H1N1 Sayı	H3N2 Sayı
Nisan 2012	1	1		Eylül 2013	6	3	3
Ağustos	2		2	Ekim	7	3	4
Eylül	4	2	2	Kasım	6	2	4
Ekim	10	8	2	Aralık	13	2	11
Kasım	10	8	2				
Aralık	10	9	1				
Ocak 2013	15	12	3				
Şubat	6	5	1				
Mart	6	5	1				
Nisan	2	2					
Toplam	66	52	14		32	10	22



Şekil 1. İnfluenza A virüs H1N1 ve H3N2 alt tiplerinin aylara göre dağılımı.

(%21.2)'ünde gözlenmiştir. 01.05.2013-31.12.2013 döneminde ise 32 influenza A izolatının 10 (%31.3)'ünde influenza A(H1N1)pdm09 alt tipi, 22 (%68.7)'inde influenza A(H3N2) alt tipi saptanmıştır (Şekil 1).

İnfluenza B virüsü 01.04.2012-31.12.2013 arasındaki sürede solunum yolu enfeksiyonu olan toplam 476 hastanın 16 (%3.3)'sında gerçek zamanlı RT-PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. İnfluenza B virüsü enfeksiyon sıklığı 01.04.2012-30.04.2013 arasındaki dönemde %2.5 (12/476) olarak gözlenirken, 01.05.2013-31.12.2013 döneminde %0.8 (4/476) olarak bulunmuştur.

Influenza A ve B için RT-PCR testi referans alındığında influenza A ve B için direkt immün floresan testinin duyarlılığı sırasıyla %72.4 ve %75, özgüllüğü %99.2 ve %99.5 bulunmuştur.

Influenza A virüsü, DSÖ'nün primerlerinin kullanıldığı konvansiyonel RT-PCR testi ile örneklerin 94 (%19.7)'ünde tespit edilmiş ve gerçek zamanlı RT-PCR testine göre duyarlılığı %96 ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA

Influenza enfeksiyonu genellikle diğer solunum virüslerine göre daha ciddi hastalığa sebep olmasına rağmen sadece klinik bilgiye dayanarak diğer solunum virüsleri enfeksiyonlarından kesinlikle ayırt edilemez. Tanıyı doğrulamak için laboratuvar testi gereklidir. Örnekler hastalığın başlangıcından itibaren 72 saat içinde alınmalıdır. Influenza tanısı için kullanılan yöntemler virüs izolasyonu (konvansiyonel hücre kültürü ve hızlı hücre kültür yöntemi), moleküler testler (RT-PCR ve gerçek zamanlı RT-PCR) ve viral antijenlerin tespiti için ELISA, direkt veya indirekt immün floresan testleridir. RT-PCR testinin kuş gribi etkeni influenza tip A(H5N1) virüslerinin tanısı için yaygın kullanımı influenza taramasında moleküler yöntemlerin kullanımında artışa yol açmıştır^{6,7}.

Çalışmamızda influenza A ve B için gerçek zamanlı RT-PCR testi referans olarak alındığında influenza A ve B için direkt immün floresan test ve influenza A için DSÖ primerlerinin kullanıldığı konvansiyonel RT-PCR testinin duyarlılığı sırasıyla %72.4, %75 ve %96, özgüllüğü ise %99.2, %99.5 ve %100 olarak bulunmuştur. DFA testinin duyarlılığı göreceli olarak düşük (%72.4) olmakla birlikte hasta yönetiminde hızlı tanı için kullanılabilir, ancak negatif test sonuçlarının RT-PCR testi ile doğrulanması gerektiği gözlenmiştir. Konvansiyonel RT-PCR testi ile influenza A virüsü örneklerin 94 (%19.7)'ünde tespit edilmiş ve bu testin duyarlılığı %96 oranında saptandığından gerçek zamanlı RT-PCR test ekipmanının bulunmadığı laboratuvarlarda kullanımının uygun olduğu kanısına varılmıştır.

Çalışmamızda DFA testinin duyarlılığı %72.4 olup, bu oran 2009 yılında influenza A H1N1 pandemik virüsü salgını sırasında yapılan çalışmalardan Meksika'da Zazueta-Garcia ve arkadaşlarının⁸ bildirdiği %58.9, Polonya'da Nitsch-Osuch ve arkadaşlarının⁹ bildirdiği %60 oranlarından yüksek, Kaliforniya'da Nutter ve arkadaşlarının¹⁰ bildirdiği %75 oranına yakın olarak saptanmıştır. Bu çalışmada DFA testinin özgüllüğü ise %99.2 olup yine aynı araştırmacıların sırasıyla %76.3, %96 ve %94 olarak bildirdikleri özgüllük oranlarıyla uyumlu gözlenmiştir⁸⁻¹⁰.

Çalışmamızda, alt solunum yolu enfeksiyonu olan 476 hastada %20.5 oranında bulunan influenza A virüsü sıklığı, İstanbul'da yapılan çalışmalarda bulunan %6.4 ile %33.5 oranları arasında yer alırken, Konya'da yapılan bir çalışmada saptanan %18.5 oranına benzer olarak tespit edilmiştir¹¹⁻¹³.

Diğer ülkelerde yapılan çalışmalarla karşılaştırma yapıldığında influenza A virüsü enfeksiyonu görülme oranları Endonezya'da %21.7, Çin'de %19.5 ve Vietnam'da %17.9

olarak bulunurken, bu çalışmada saptadığımız %20.5 influenza A virüsü enfeksiyonu oranıyla uyumlu, fakat İtalya'da yapılan bir çalışmada gözlenen %9.6'lık orandan daha yüksek olduğu saptanmıştır¹⁴⁻¹⁷. 2009 yılında görülen influenza A(H1N1) pandemisi sırasında Meksika, Polonya ve Kaliforniya'da yapılan çalışmalarda ise solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda influenza A(H1N1)pdm09 virüsü enfeksiyonu %51.3, %30.5 ve %30 gibi oldukça yüksek oranlarda bulunmuştur⁸⁻¹⁰.

İnfluenza A virüsünün alt tipleri analiz edildiğinde 01.04.2012-31.12.2013 döneminde 98 influenza virüsü izolatının 62 (%63.3)'sinin influenza A(H1N1)pdm09 ve 36 (%36.7)'sinin influenza A(H3N2) olduğu bulunmuştur. İnfluenza A(H1N1)pdm09 alt tipi 01.04.2012-30.04.2013 arasındaki dönemde toplam 66 influenza izolatının 52 (%78.8)'sini, A(H3N2) alt tipi ise 14 (%21.2)'ünü oluşturmuştur. Bu dönemi takip eden 01 Mayıs-31 Aralık döneminde ise 32 influenza A izolatının 10 (%31.3)'ü A(H1N1)pdm09 alt tipi olup 22 (%68.7)'si A(H3N2) alt tipi olarak tespit edilmiştir. İnfluenza A virüsü A(H1N1)pdm09 alt tipi Ocak 2013 tarihinde 12, Aralık 2012 tarihinde 9, ekim ve kasım aylarında sekiz izolat görülürken, influenza A virüsü A(H3N2) alt tipi en çok 2013 yılı aralık ayında 11, ekim ve kasım aylarında 4, ocak ve eylül aylarında üç izolat tespit edilmiştir (Tablo II).

Bu çalışmada, 2013 yılı aralık ayında influenza A virüsü pozitif olan 13 suşun 11 (%84.6)'i influenza A(H3N2) alt tipi olarak tespit edilmiştir. Ülkemizde de 2013 yılı aralık ayında influenza A virüsü pozitif suşların %96.3 (265/275)'ü İnfluenza A(H3N2) olup bu alt tipin baskın olduğu gözlenmiştir¹⁸⁻²¹. Avrupa'da ise 2013 yılı aralık ayında %69 (271/393) oranıyla yine İnfluenza A(H3N2) alt tipi baskın olup, A(H1N1)pdm09 oranı %31 (122/393) olarak bildirilmiştir¹⁹.

Sonuç olarak, çalışmamızda influenza A virüsü enfeksiyonu %20.5 gibi oldukça yüksek bir oranda bulunurken, influenza B virüsü enfeksiyonu sıklığı %3.3 oranında tespit edilmiştir. Çalışma süresi boyunca influenza pozitif olguların %63.3'ü İnfluenza A(H1N1)pdm09, %36.7'si İnfluenza A(H3N2) alt tipleri olup influenza aşısında bulunan alt tipler ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Dolaşımdaki influenza virüsü tipleri ve alt tiplerinin her yıl izlenmesi, influenza aşı suşları ile uyumunun değerlendirilmesi ve pandemik potansiyeli olan influenza virüsü alt tiplerinin erken tanısı için gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Gasparini R, Amicizia D, Lai PI, Bragazzi NI, Panatto D. Compounds with anti-influenza activity: present and future of strategies for the optimal treatment and management of influenza. Part I: influenza life-cycle and currently available drugs. *J Prev Med Hyg* 2014; 55(3): 69-85.
2. Soema PC, Kompier R, Amorij JP, Kersten GFA. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 94: 251-63.
3. Szweczyk B, Bienkowska-Szweczyk K, Krol E. Introduction to molecular biology of influenza A viruses. *Acta Biochim Pol* 2014; 61(3): 397-401.
4. Debyle C, Bulkow L, Miernyk K, et al. Comparison of nasopharyngeal flocked swabs and nasopharyngeal wash collection methods for respiratory virus detection in hospitalized children using real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2012; 185(1): 89-93.

5. World Health Organization. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus in humans-up-date.Erişim:(http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis_influenza_virus_human-supdate_201211.pdf) 10.02.2014.
6. Vemula SV, Zhao J, Liu J, Wang X, Biswas S, Hewlett I. Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans. *Viruses* 2016; 8(4): 96.
7. Kim DK, Poudel B. Tools to detect influenza virus. *Yonsei Med J* 2013; 54(3): 560-6.
8. Zazueta-García R, Canizalez-Roman A, Flores-Villaseñor H, Martínez-García J, Llausa-Vargas A, León-Sicaños N. Effectiveness of two rapid influenza tests in comparison to reverse transcription-PCR for influenza A diagnosis. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8(3): 331-8.
9. Nitsch-Osuch A, Wozniak-Kosek A, Brydak LB. Accuracy of rapid influenza diagnostic test and immunofluorescence assay compared to real time RT-PCR in children with influenza A(H1N1)pdm09 infection. *Postepy Hig Med Dosw* 2012; 66: 752-7.
10. Nutter S, Cheung M, Adler-Shohet FC, Krusel K, Vogel K, Meyers H. Evaluation of indirect fluorescent antibody assays compared to rapid influenza diagnostic tests for the detection of pandemic influenza A (H1N1) pdm09. *PLoS One* 2012; 7(3): 33097.
11. Aktürk H, Sütçü M, Badur S, et al. Evaluation of epidemiological and clinical features of influenza and other respiratory viruses. *Türk Pediatri Ars* 2015; 50(4): 217-25.
12. Özdemir M, Yavru S, Baysal B. Comparison of the detection of influenza A and B viruses by different methods. *J Int Med Res* 2012; 40(6): 2401-8.
13. Beka H, Kilic A, Unuvar E, et al. Frequency of common viruses in etiology of acute respiratory tract infections. *Indian J Pediatr* 2013; 80(2): 91-6.
14. Kosasih H, Roselinda, Nurhayati, et al. Surveillance of influenza in Indonesia, 2003-2007. *Influenza Other Respir Viruses* 2013; 7(3): 312-20.
15. Zhang G, Hu Y, Wang H, Zhang L, Bao Y, Zhou X. High incidence of multiple viral infections identified in upper respiratory tract infected children under three years of age in Shanghai, China. *PLoS One* 2012; 7(9): e44568.
16. Tran T, Chien BT, Papadakis G, et al. Respiratory virus laboratory pandemic planning and surveillance in central Viet Nam, 2008-2010. *Western Pac Surveill Response J* 2012; 3(3): 49-56.
17. Esposito S, Daleno C, Prunotto G, et al. Impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. *Influenza Other Respir Viruses* 2013; 7(1): 18-26.
18. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Haftalık İnfluenza (Grip) Sürveyans Raporu. 52.Hafta Erişim: (http://www.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/bulasici-hastaliklar_db/grip/influenza_Raporu_52_Hafta.pdf) 10.02.2014.
19. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Haftalık İnfluenza (Grip) Sürveyans Raporu, 49. Hafta. Erişim: (http://www.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/bulasici-hastaliklar_db/grip/influenza_Raporu_49_Hafta.pdf) 10.02.2014
20. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Haftalık influenza (grip) sürveyans raporu, 50. Hafta. Erişim: (http://www.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/bulasici-hastaliklar_db/grip/influenza_Raporu_50_Hafta.pdf) 10.02.2014.
21. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Haftalık influenza (grip) sürveyans raporu, 51. Hafta. Erişim: (http://www.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/bulasici-hastaliklar-db/grip/influenza_Raporu_51_Hafta.pdf) 10.02.2014.