

İnfluenza A Virüsünün Tanısında Hücre Kültürü, Real-time PCR, in-House PCR ve Hızlı Test Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Seyhan Selvi ASLAN *, Meral AKÇAY ÇIBLAK *, Melis KANTURVARDAR TÜTENYURD*, Emel BOZKAYA **, Selim BADUR *

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarı*, Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü**

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, influenza virüslerinin neden olduğu hastalıkların tanısında kullanılan hücre kültürü, "reverse transcription real-time polimerase chain reaction" (rRT-PCR), in-house PCR ve hızlı testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin değerlendirilmesi ve birbirleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: İnfluenza benzeri hastalık (IBH) tanısı alan 100 hastanın sürüntü örneklerinde, hücre kültürü/immun capture-enzyme-linked immunosorbant assay (IC-ELISA), rRT-PCR ve hızlı tanı testleri olmak üzere üç yöntem kullanılarak virüs aranmışken, 50 hastadan alınan örneklerde ilave olarak, in-house PCR ile de çalışılmıştır. Birinci grupta rRT-PCR yönteminde HA bölgesine ait primer-problar kullanılırken, ikinci grupta rRT-PCR ve in-house PCR yöntemlerinde M bölgesine ait primer-problar kullanılmıştır. Her iki grupta da, çelişkili bulguların saptandığı örnekler farklı gen bölgelerini hedefleyen primerlerin kullanıldığı üçüncü bir PCR "reverse transcription polymerase chain reaction enzyme hybridization assay" (RT-PCR-EHA) tekniği ile incelenmiştir.

Bulgular: Üç yöntemin karşılaştırıldığı 100 örneklik grupta hücre kültürü altın standart yöntem olarak kabul edilmiş, elde edilen sonuçlara göre rRT-PCR ve hızlı testlerin duyarlılıkları sırasıyla %80 ve %14,5; özgüllükleri ise %91,1 ve %100 olarak saptanmıştır. In-house PCR'in dördüncü bir yöntem olarak eklendiği 50 örneklik grupta ise gerçek pozitif örnekleri saptamak için en az iki testte pozitiflik kriteri aranmış, sonuçta hücre kültürü, rRT-PCR, in-house PCR ve hızlı testin duyarlılıkları sırasıyla %86,7, %100, %76,7, and %10, özgüllükleri ise %100, %85, %100 ve %100 olarak tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada, PCR tekniklerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin artırılması için uygun primer ve probların kullanılması, kalite kontrol ölçümlerinin yapılması ve gerektiğinde gerçek pozitif örneklerin saptanması için farklı laboratuvar tekniklerinin paralel çalışılması gibi parametrelerin önemi ortaya konmuş ve vurgulanmıştır.

Anahtar kelimeler: İnfluenza, sürveyans, tanı yöntemleri

SUMMARY

Comparison of Cell Culture, Real-time PCR, in-House PCR and Rapid Tests in Diagnosis of Influenza A Viruses

Objective: This study was aimed to evaluate and compare the sensitivity and specificity of cell culture, "reverse transcription real-time polymerase chain reaction" (rRT-PCR), in-house PCR and rapid tests used for the diagnosis of diseases caused by influenza viruses.

Materials and Methods: Nasal swabs obtained from a total of 100 patients with Influenza Like Illness (ILI) were tested using three different methods: a) cell culture / immune capture-enzyme-linked immunosorbant assay (IC-ELISA) b) RT-PCR and c) rapid test. On the other hand, nasal samples obtained from 50 other patients were also tested by in-house PCR in addition to the three methods mentioned above. In the first group in rRT-PCR primer-probes directed for HA region were used while in the second group in rRT-PCR and in in-house PCR primer-probes directed for M region were used. The samples which yielded conflicting results were further investigated by reverse transcription polymerase chain reaction enzyme hybridization assay (RT-PCR-EHA) using primers targeting different gene regions.

Results: In the group in which the three methods were compared, cell culture was considered as the gold standard and the sensitivity of rRT-PCR and rapid tests were determined as 80% and 14,5 and specificities as 91,1% and 100%, respectively. In the group which was composed of 50 samples, positive results in at least two tests were taken as a prerequisite for the true positive results. Accordingly, the sensitivities of cell culture, real time RT-PCR, in-house PCR and rapid tests were 86,7%, 100%, 76,7%, and 10%, and specificities were 100%, 85%, 100% and 100% respectively.

Conclusion: As important issues, this study revealed, and emphasized the importance of usage of appropriate primers and probes to increase the sensitivity and specificity of PCR tests, taking quality control measures and when necessary application of different laboratory techniques to reach the true positive results.

Key words: Influenza, surveillance, diagnostic methods

Alındığı tarih: 27.06.2012

Kabul tarihi: 03.07.2012

Yazışma adresi: Selim Badur, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Temel Bilimler Binası, Çapa-34390, İstanbul

e-posta: selimbador@hotmail.com

GİRİŞ

İnfluenza virüsleri, yüksek morbidite ve mortalite ile sonuçlanan epidemilerden sorumlu solunum yolu enfeksiyonlarının önemli etkenlerindendir. Ani başlayan yüksek ateş, öksürük, halsizlik, miyalji ve baş ağrısı gibi belirtilerin görüldüğü bu enfeksiyonlar oldukça bulaşıcı olup, toplumda hızlı yayılım gösterir ⁽¹⁾. Her yıl, çocukların yaklaşık %20'sinde, erişkinlerin ise %10'unda semptomatik influenza A ve B virüs enfeksiyonları gelişmektedir ⁽²⁾. Öte yandan çeşitli alt tipleri bulunan influenza A virüsü, önemli salgınlara hatta pandemilere neden olma özelliği ile ayrı bir öneme sahiptir. Bu durumda söz konusu enfeksiyonların erken tanısı, gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesini, gerektiğinde antiviral tedavinin uygulanmasını ve enfeksiyonun yayılımının kısıtlanması için çeşitli önlemlerin alınmasını sağlamaktadır ^(3,4).

Gerek laboratuvar tanısı ve tedavi etkinliğini belirlemede, gerekse süreyans çalışmalarında uygulanabilecek birçok farklı tanı tekniği mevcuttur. Süreyansın gerçekleştirildiği bir referans laboratuvarında virüs izolasyonu için klasik olarak embriyolu yumurta veya hücre kültüründen yararlanılır. Ayrıca elde edilen virüs izolatlarının antijenik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, bir dizi ilave testin gerçekleştirilmesi gerekmektedir ^(5,6). Virüsün identifikasyonu ve antijenik özelliklerinin belirlenmesi ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ile yapılan işbirliği sonucunda, doğru aşı kombinasyonlarına karar verilmesi ve olası epidemilere zamanında müdahale edilmesi için planlar hazırlanması mümkün olur ^(7,8).

İnfluenza virüslerinin tanısında kullanılan laboratuvar yöntemlerinin her birinin, kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Hücre kültürü tekniği ile virüs izolasyonu yaygın olarak uygulanmakla beraber, donanımlı laboratuvar ve deneyimli personel gerektirmesi, sonucun elde edilmesi için uzun süre gerekmesi ve virüs izolasyonunun örnek alımı ile transport koşullarına bağlı olması önemli dezavantajlarıdır. Antijen saptayan mevcut hızlı testlerin ise göreceli olarak düşük duyarlılığa sahip olmaları kullanımlarını kısıtlamaktadır ^(5,6). Bu bağlamda klinik ön tanının kısa sürede doğrulanması ve süreyans sisteminin kalitesinin artırılması amacıyla, hızlı ve güvenilir sonuç veren çeşitli moleküler teknikler geliştirilmiştir. Daha çok "polimerase chain reaction"

(PCR) temelli olan bu yöntemlerin yüksek duyarlılığa sahip olmaları, süratli sonuç vermeleri ve canlı virüse gerek duyulmaması kullanımlarının yaygınlaşmasına neden olmuştur ⁽⁹⁾. Genellikle standart influenza virüs tanı tekniklerinden daha duyarlı bulunan PCR yöntemleri ile virüs tespiti yanı sıra, tip ve alt tip ayrımı da yapılabilmekte ve laboratuvar koşullarına bağlı olarak multipleks PCR, nested PCR, real-time (RT) PCR gibi farklı formatlar uygulanabilmektedir ⁽¹⁰⁾.

Çalışmamızda influenza virüslerinin tanısında kullanılan hücre kültürü, "reverse transcription" RT-PCR (rRT-PCR), in-house PCR ve hızlı testlerin duyarlık ve özgüllüklerinin değerlendirilmesi ve birbirleri ile karşılaştırılması hedeflenmiş; influenza virüs süreyansının kalitesinin artırılmasına katkıda bulunabilecek laboratuvar bulgularına ulaşılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar ve örnekler: İnfluenza süreyans çalışması kapsamında laboratuvarımıza gönderilen 85'i burun, 65'i farenks sürüntüsü, toplam 150 örnek farklı tanı teknikleri ile incelenmiştir. Örnekler, influenza benzeri hastalığın (IBH) belirtilerinden (ani başlayan ateş $\geq 38^{\circ}\text{C}$), öksürük, baş ağrısı, halsizlik, kas ağrısı gibi) en az iki tanesinin bulunduğu hastalardan alınmıştır. Ulusal süreyans çalışması kapsamında ülkenin çeşitli sağlık merkezlerinde görev yapan hekimler tarafından, IBH tanısı konan hastalardan alınan örnekler, laboratuvarımızda hazırlanıp ilgili kurumlara dağıtılan viral transport besiyerine aktarıldıktan sonra soğuk zincir kurallarına uyularak laboratuvara ulaştırılmış, vorteksenerek homojenize edilmiş ve ekime hazır hale getirilmiştir. Örneklerden 100 tanesi, hücre kültürü/"immun capture enzyme-linked immunosorbent assay" (IC-ELISA), rRT-PCR ve hızlı testten oluşan üç ayrı teknik ile incelenmiş; 50 örnek ise, belirtilen testlere ilave olarak ikinci bir moleküler yöntem olan in-house PCR tekniği ile çalışılmıştır. Kullanılan yöntemlerle çelişkili sonuçların elde edilmesi durumunda, diğerlerinden farklı bir gen bölgesini hedef alan yeni bir moleküler tanı tekniği doğrulama amacıyla uygulanmış; farklı yöntemlerin duyarlık ve özgüllükleri değerlendirilmiştir.

Hücre kültürü: Klinik örneklerden influenza virüs izolasyonu için Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücreleri kullanılmış ve 24 kuyucuklu plak-

larda klasik hücre kültürü yöntemi uygulanmıştır. Sığır serumunun influenza virüs üretmesi üzerine inhibitör etkisini ortadan kaldırmak amacıyla, ekim işleminde önce her kuyucuk serumsuz ve %2 oranında penisilin ve streptomisin çözeltisi içeren besiyeri ile yıkanmıştır. Daha sonra her hasta örneğinden kuyucuklara 200'er µl ekim yapılmıştır. Virüsün hücreye girişini kolaylaştırmak için ekim yapılan plaklar, 1000 rpm ve 20°C'da, 30 dk. çevrilmiş ve her kuyucuğa 2µg/ml "L-1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone" (TPCK)-tripsin içeren serumsuz besiyerinden 1,5 ml eklenmiştir. Ekim yapılan plaklar %5 CO₂'li etüvde 33°C'da inkübe edilmiş; üç gün sonunda üreme kontrolü, kültür üst sıvısından IC-ELISA deneyi ile gerçekleştirilmiştir. IC-ELISA uygulamasını takiben negatif sonuç veren hasta örneklerinin kültür üst sıvısı (ilk pasaj; P1), yine 24'lük plaklara ekilip üç gün daha inkübe edilerek (ikinci pasaj; P2) benzer şekilde IC-ELISA ile incelenmiştir.

IC-ELISA: Hücre kültürü sonrası üretilen virüsün influenza A suşu olup olmadığını saptamak için IC-ELISA deneyi gerçekleştirilmiştir. İnfluenza virüs tipine özgü nükleoprotein antijeninin tespitinin amaçlandığı bu deneyde, 1/1000 oranında sulandırılmış anti-influenza A monoklonal antikoru (Ulusal İnfluenza Merkezi, Lyon-Fransa) ile kaplanmış düz tabanlı ve 96 kuyucuklu ELISA plakları kullanılmıştır. Kuyucuklara sırasıyla kültür üst sıvılarından ve kontrollerden 90'ar µl dağıtılmış ve 37°C'da iki saat inkübe edildikten sonra plaklar PBS ile yıkanmıştır. Tavşanda elde edilen ve 1/1000 oranında sulandırılan anti-influenza A (H3N2 ve H1N1) poliklonal antikoları (Ulusal İnfluenza Merkezi Lyon-Fransa) 100'er µl olacak şekilde kuyucuklara dağıtılmıştır. Plaklar yukarıda belirtilen deney koşullarında bir saat daha inkübe edildikten sonra PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra, kuyucuklara 100'er µl 1/1500 sulandırılmış peroksidaz işaretli anti-tavşan antikoru (Biosource, Fransa) ilave edilip plaklar 37°C'de 45 dk. inkübe edilmiştir. Tekrar PBS ile üç kez yıkandıktan sonra kuyucuklara 100'er µl ABTS substrat çözeltisinden (Roche Diagnostics, İsviçre) dağıtılmış ve plaklar oda ısısında ve karanlıkta 30 dk. inkübe edilmiştir. Optik okuyucuda 620 nm dalga boyundaki filtreler kullanılarak absorbans değeri okunmuş ve cut-off değeri (negatif kontrollerin ortalamasına 0,150 eklenerek elde edilen) üzerinde absorbans değeri saptanan örnekler pozitif kabul edilmiştir.

RNA ekstraksiyonu: RNA ekstraksiyonu için "High Pure Template Preparation" ekstraksiyon kiti (Roche Applied Science, İsviçre) üreticinin önerileri doğrultusunda kullanılmıştır. Bu işlem için 200µl örnek üzerine 200µl bağlama solüsyonu ve 40µl proteinaz K ilave edilerek tüpler iyice karıştırılmış ve 70°C'de 10 dk. inkübe edilmiştir. İzopropanolün 100µl ilavesinden sonra karışım filtreli kolon içeren tüplere aktarılmıştır. İki kez yıkama çözeltisi ile muamele edildikten sonra çözücü tampondan kolonlara 200µl dağıtılmış, tüpler santrifüjde çevrilerek nükleik asit ekstresi elde edilmiş ve kullanımına dek -20°C'da saklanmıştır.

In-house PCR: Bu yöntemde, influenza virüs matriks (M) proteinlerini kodlayan gen bölgesini hedefleyen primerler kullanılmıştır (A/M/+52 primer sens: 5'-CCT CTA ACC GAG GTC GAA ACG-3' ve A/M/-253 primer anti-sens: 5'-AGG GCA TTT TGG ACA AAK CGT CTA-3'). Söz konusu primer dizilimleri "Institut Pasteur" de (Paris, Fransa) uygulanan protokolden sağlanmıştır ⁽¹¹⁾. İlk aşamada, 10µl RNA ekstresi üzerine, komplementer DNA (cDNA) sentezi için gerekli reaktiflerden 25µl eklenmiş ve 42°C'de bir saat, 95°C'de 5 dk. bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'nın çoğaltıldığı PCR işleminde ise, her örnek için, 4µl PCR karışımına 2µl cDNA ürünü ilave edilmiştir. Termal döngü cihazı, ön denatürasyon için 95°C'de 2 dk. olacak şekilde ve 35 amplifikasyon siklusu (denatürasyon için 95°C'de 1 dk., bağlanma için 60°C'de 1dk, uzama için 72°C'de 1 dk.) için programlanmış ve PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan amplifikasyon ürünleri %3'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülerek sonuçlar değerlendirilmiş ve UV translüminatörde 201 baz çifti uzunluğunda bant veren örnekler, influenza A açısından pozitif olarak kabul edilmiştir.

rRT-PCR: Bu çalışma iki farklı rRT-PCR kit/reaktifleri ve protokolü kullanılmıştır. Real-time cihazı (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System) her iki kit/reaktifleri ve protokolü ve TaqMan problemleri kullanıldığı "fluorojenik 5'nükleaz yöntemi" prensibiyle kalitatif influenza virüs tespiti yapmaya uyumlu olup, her iki uygulamada da revers transkripsiyon (RT) ve çoğaltma işlemi (PCR) tek aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

a. Taqman®One step PCR kitinin kullanıldığı rRT-PCR yöntemi: Bu kit 100 örnekte denenmiş olup, kit içeriğinde olmayan ve ilgili firmanın sağladığı, influenza A virüsü hemaglutinin (HA) proteininin tipe özgül korunmuş gen bölgesini hedefleyen primer-prob sistemi kullanılmıştır. Üreticinin önerileri doğrultusunda PCR yöntemi uygulanmıştır ⁽¹²⁾. Özetle, 20µl PCR karışımı (12,5µl master miks, 0,5µl RNaz inhibitörü, 7µl primer-prob karışımı) üzerine 5'er µl RNA örneklerinden eklenmiştir. RT için 48°C'de 30 dk., ön denatürasyon için 94°C'de 10dk ve PCR için 40 siklus (erime için 94°C'de 15 sn; bağlanma ve uzama için 60°C'de 1 dk.) olmak üzere cihaz programlanmıştır. Her örnek, FAM boya sinyali (hedefe özgü sinyal) ve VIC boya sinyali (IPC) açısından kontrol edilmiş ve hem FAM sinyali hem de VIC sinyali veren örnekler pozitif, FAM sinyali negatif VIC sinyali pozitif olan örnekler ise negatif kabul edilmiştir.

b. Taqman®Influenza A/H5 detection kitinin kullanıldığı rRT-PCR yöntemi: Bu kit 50 hasta örneğinde yalnızca tespit amacıyla kullanılmış, kit içinde yer alan H5N1 influenza virüs reaktifleri işleme sokulmamıştır. Pozitif kontrol olarak kitin sağladığı kontroller ve influenza A virüs matriks (M) proteinlerini kodlayan gen bölgesini hedefleyen primer-prob seti, üreticinin önerileri doğrultusunda kullanılmıştır. Özetle, 40µl PCR karışımı (AmpErase®UNG, Deoxy ATP, Deoxy CTP, Deoxy GTP, Deoxy UTP, 5X TaqMan®EZ Tampon, Manganez asetat çözeltisi, 10X Influenza A Target Assay Mix) üzerine RNA örneklerinden 10'ar µl ilave edilmiş ve birinci basamakta UNG'nin etki göstermesi için 72°C'da 1 dk., RT için 50°C'da 2 dk., UNG deaktivasyonu için 95°C'de 5 dk. ve PCR için 40 siklus (erime için 94°C'da 20 sn, bağlanma ve uzama için 58°C'da 1 dk.) olmak üzere cihaz programlanmıştır ⁽¹³⁾. Sonuçların değerlendirilmesi yukarıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Hızlı testler: Laboratuvara ulaşmalarını takiben hasta örneklerine, influenza A/B hızlı tanı testi (Influenza A+B Rapid Test, Roche Diagnostics, İsviçre) uygulanmıştır. Hasta örneğinin alındığı eküvyon lizis solüsyonu ile muamele edilmiş, üreticinin önerileri doğrultusunda karışıma kitin içerdiği AB1 ve AB2 antikorları eklenmiş, test stripi tüp içine yerleştirilmiş ve 5 dk. içinde sonuç okunmuştur. Pozitif çıkan

örneklerin influenza A ve B ayrımı için hasta materyelinden önceden hazırlanan hücre preparatları, direkt floresan antikor (DFA) yöntemi ile (Imagen Dakocytomation, Ref No: K6105) boyanmıştır.

FluAVision™ influenza A virüsü saptama PCR kiti ("reverse transcription polymerase chain reaction enzyme hybridization assay"[RT-PCR-EHA]): Virüs genomunun beşinci segmentinin kodladığı nükleoprotein (NP) hedeflendiği bu tanı kiti, çalışmada uygulanan diğer yöntemlerle elde edilen çelişkili sonuçların değerlendirilmesinde doğrulama testi olarak kullanılmıştır. FluAVision PCR (DNA Technology A/S, Danimarka) testinde RT ve çoğaltma işlemi tek tüpte gerçekleştirilmekte ve oluşan PCR ürünü, hibridizasyon yöntemi ile saptanmaktadır.

BULGULAR

Hücre kültürü, Taqman®One step PCR kiti ile rRT-PCR ve hızlı tanı yöntemlerinin uygulandığı 100 örneğin sırasıyla 55'i (P1 aşamasında 41, P2 aşamasında 14), 48'i ve 8'i pozitif bulunmuş ve toplamda 59 örneğin bir veya birden fazla yöntem ile pozitif olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Gerçek pozitif örnek sayısını saptamak için hücre kültürüyle pozitif, rRT-PCR yöntemiyle negatif çıkan 11 örnek ile hücre kültürüyle negatif, rRT-PCR yöntemiyle pozitif çıkan dört örnek (toplam 15 örnek), RT-PCR-EHA ile çalışılmış ve hücre kültürü ile aynı sonuçlar elde edilmiştir. Hücre kültür yöntemi "altın standart" yöntem olarak kabul edilmiş ve gerçek pozitif örnek sayısı 55 olarak belirlenmiştir. Bu durumda rRT-PCR'ın duyarlık %80 ve özgüllüğünün %91,1 olarak bulunmuş, hızlı testte ise özgüllük sorununa rastlanmamakla beraber hücre kültürü ile aralarında %85,5 gibi ciddi oranda bir duyarlık farkı olduğu saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo 1. Kullanılan üç yöntemin sonuçları (100 örnek).

Örnek Sayısı (100)	Hücre Kültürü / IC-ELISA	rRT-PCR	Hızlı Test
8	+	+	+
36	+	+	-
11	+	-	-
4	-	+	-
41	-	-	-
Toplam	55	48	8

Tablo 2. Yüz örneğe uygulanan yöntemlerin duyarlık ve özgüllükleri.

%	Hücre Kültürü / IC-ELISA (55 pozitif)	rRT-PCR (48 pozitif)	Hızlı Test (8 pozitif)
Duyarlılık	100	80	14,5
Özgüllük	100	91,1	100
PPD	100	91,7	100
NPD	100	78,8	48,9
X ²	96	47,3	5,3
P	<0,001	<0,001	<0,05

Tablo 3. Kullanılan dört yöntemin sonuçları (50 örnek).

Örnek sayısı (50)	Hücre Kültürü / IC-ELISA	rRT-PCR	In-House PCR	Hızlı Test
3	+	+	+	+
17	+	+	+	-
6	+	+	-	-
3	-	+	+	-
4	-	+	-	-
17	-	-	-	-
Toplam (%)	26 (52)	33 (66)	23 (46)	3 (6)

Dört yöntemin denendiği 50 örnek içinden, 33 örnek (%66) rRT-PCR yöntemi; P1 aşamasında 20, P2 aşamasında altı adet olmak üzere toplam 26 örnek (%52) hücre kültürü / IC-ELISA yöntemi; 23 örnek (%46) in-house PCR yöntemi, üç örnek ise (%6) hızlı tanı testi ile pozitif sonuç vermiştir. Bulguların analizi sonunda toplam 33 örneğin bir veya birden fazla test ile pozitif bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 3). Hücre kültürü / IC-ELISA ve rRT-PCR yöntemi ile pozitif bulunup, in-house PCR ile negatif bulunan altı örneğe; hücre kültürü ile negatif bulunup, rRT-PCR ve in-house PCR ile pozitif bulunan üç örneğe ve rRT-PCR yöntemi ile pozitif bulunup, hücre kültürü ve in-house PCR ile negatif bulunan dört örneğe (toplam 13 örnek) sonuçlarının kontrolü ve gerçek pozitif örnek sayısını saptamak amacıyla RT-PCR-EHA yöntemi uygulanmıştır. Bu grupta, diğer gruptan farklı olarak gerçek pozitif örneklerin belirlenmesinde en az iki test ile pozitiflik saptanması kriteri uygulanmıştır. Hücre kültürü / IC-ELISA ve rRT-PCR yöntemi ile pozitif bulunup, in-house PCR ile negatif bulunan altı örneğin dördü RT-PCR-EHA ile pozitif, ikisi negatif bulunmuştur. Hücre kültürü ile negatif bulunup, rRT-PCR ve in-house PCR ile pozitif bulunan üç örneğin tamamı konfirmasyon testinde de pozitif bulunmuştur. Kültürde ve in-house PCR tekniğinde negatif sonuç veren ancak rRT-PCR ile pozitif

Tablo 4. Elli örnekte hücre kültürü ve rRT-PCR ve in-house PCR ile çelişkili sonuç veren 13 örneğe uygulanan RT-PCR-EHA doğrulama testi ile elde edilen bulgular.

Örnek Sayısı (13)	Hücre Kültürü / IC-ELISA	rRT-PCR	In-House PCR	RT-PCR EHA
4	+	+	-	+
2	+	+	-	-
3	-	+	+	+
1	-	+	-	+
3	-	+	-	-

Tablo 5. Elli örneğe uygulanan yöntemlerin duyarlık ve özgüllükleri.

%	Hücre Kültürü / IC-ELISA (26 pozitif)	rRT-PCR (33 pozitif)	In-House PCR (23 pozitif)	Hızlı Test (3pozitif)
Duyarlılık	86,7	100	76,7	10
Özgüllük	100	85	100	100
PPD	100	90,9	100	100
NPD	83,3	100	74,1	42,5
X ²	32,7	34,9	25,4	0,4
P	<0,001	<0,001	<0,001	0,7

tif bulunan dört örnekten biri RT-PCR-EHA ile pozitif, üçü negatif bulunmuştur. Bu değerlendirmeye göre çelişkili sonuçların alındığı 13 örnekten 10'u, en az iki farklı test ile pozitif sonuç verdiklerinden gerçek pozitif örnekler şeklinde değerlendirilmişlerdir. (Tablo 4).

Bu deney grubunda örneklerin çalışıldığı yöntemler arasında en yüksek duyarlılığa %100'lük oranla rRT-PCR'in sahip olduğu, bunu %86,7 ile hücre kültürü / IC-ELISA yönteminin izlediği görülmektedir. In-house PCR yönteminde ise, her iki yöntemden daha düşük duyarlık elde edilmiştir (%76,7). Bu verilere paralel olarak en yüksek negatif prediktif değere (NPD) rRT-PCR yönteminde rastlanmıştır (%100). Testlerin özgüllükleri karşılaştırıldığında ise rRT-PCR yöntemi, bu test ile elde edilen üç yalancı pozitiflikten (gerçek pozitif sayısı 30, rRT-PCR pozitif sayısı 33) dolayı, diğer iki yöntemden daha düşük özgüllüğe sahip bulunmuştur (%85). Buna uygun olarak en düşük pozitif prediktif değer (PPD) rRT-PCR'da saptanmıştır (%90,9). Yöntemlerin p değerleri incelendiğinde ise hücre kültürü, in-house PCR ve rRT-PCR sonuçları oldukça anlamlı bulunmuş; güvenilirlikleri eşit ve yüksek saptanmıştır. Hızlı testin güvenilirliği ise anlamsız ve düşük bulunmuştur (Tablo 5).

TARTIŞMA

İnfluenza enfeksiyonlarının yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaları ve antiviral ajanların erken dönemde uygulanmasının gerekliliği nedeniyle, hızlı ve güvenilir sonuç veren tanı testleri gittikçe önem kazanmaktadır. Bu bağlamda, klinik ön tanının kısa sürede doğrulanması ve sürveyans sisteminin kalitesinin artırılması amacıyla çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Daha çok PCR temeline dayanan bu yöntemler ile influenza virüsünün saptanmasının yanı sıra tiplendirme ve alt tiplendirme de yapılabilmektedir ^(5,6,10). PCR uygulamalarından biri olan ve floresan işaretli problemlerin kullanıldığı rRT-PCR yöntemleri, birçok çalışmada denenmiş ve hücre kültürü gibi standart teknikler ile karşılaştırılarak duyarlık ve özgüllükleri araştırılmıştır ⁽¹²⁻¹⁶⁾.

Çalışmamızda; hücre kültürü, in-house PCR ve hızlı test yöntemlerin yanı sıra rRT-PCR'in influenza A virüsünün tanısındaki yerini belirlemek amacıyla grip sürveyansı kapsamında laboratuvarımıza gönderilen örneklerden iki ayrı çalışma grubu oluşturulmuştur. Kültür, rRT-PCR ve hızlı testlerin uygulandığı birinci grupta 100, yukarıdaki testlere ek olarak in-house PCR yönteminin uygulandığı ikinci grupta ise 50 olmak üzere, toplam 150 hasta örneği incelemeye alınmıştır. Hücre kültürü yönteminin altın standart kabul edildiği 100 örneklik grupta, 11 yalancı negatiflik ve dört yalancı pozitiflikten dolayı, rRT-PCR yönteminin hücre kültüründen daha düşük duyarlık (%80) ve özgüllükte (%91,1) olduğu saptanmıştır. İkinci gruba ait 50 örnekte ise, P1 aşamasında 20, P2 aşamasında altı adet olmak üzere toplam 26 adet influenza A virüsünün izolasyonu yapılmıştır. Aynı hasta örnekleri, HA bölgesine ait primer-problarının uygulandığı ilk gruptan farklı olarak, M bölgesine ait primer-prob sisteminin kullanıldığı rRT-PCR kiti ile incelenmiş ve 50 örneğin 33'ünde (%66) influenza A virüsü tespit edilmiştir. Bu gruptaki örneklerde, son aşamada jel elektroforezinin kullanıldığı in-house PCR yöntemi olan ikinci bir moleküler tanı tekniği de uygulanmıştır. Çelişkili sonuçların yorumlanmasında ise RT-PCR-EHA yönteminden yararlanılmıştır. Sonuç olarak, biri doğrulama testi olmak üzere, üç farklı PCR tekniği ve hücre kültürü uygulanan ikinci gruba ait çalışmada, gerçek pozitif örneklerin saptanması için hücre kültürünün esas alındığı önceki gruptan farklı olarak, en az iki testte

pozitiflik saptanması kriteri uygulanmış; buna göre ilk gruptakilerden farklı olarak rRT-PCR yönteminde, kültüre oranla %13,3 oranında daha fazla virüs tespiti mümkün olmuştur.

İnfluenza tanısında hücre kültürü ile karşılaştırılmasının yapıldığı çalışmalarda, rRT-PCR yöntemi genel olarak yüksek duyarlılıkta bulunmuştur ⁽¹²⁻¹⁷⁾. Schweiger ve ark. ⁽¹³⁾ çalışmamızda olduğu gibi fluorojenik bazlı TaqMan-PCR yöntemi ile hücre kültürü yöntemini kıyaslamışlar; sonuçta TaqMan PCR yönteminin, çalışmamızın ikinci grubundaki bulgulara benzer biçimde, hücre kültürü ile izolasyon yönteminden daha yüksek duyarlılığa sahip olduğunu bulmuşlardır. rRT-PCR'in hücre kültüründen daha duyarlı bulunduğu bu çalışmaların yanı sıra, bizim birinci grupta bulduğumuz gibi hücre kültürünün rRT-PCR yönteminden daha duyarlı bulunduğu az sayıda çalışma da mevcuttur ⁽¹⁸⁾.

Çalışma gruplarımızda, rRT-PCR testinin duyarlılığında farklılık saptanmış olması (ilk grup için %80, ikinci grup için %100), iki gruba uygulanan rRT-PCR tekniklerinde farklı kit ve primer-prob sistemlerinin kullanılmış olmasından kaynaklanmış olabilir. Sonuç olarak, deneylerde birinci grup hasta örnekleri için kullanılan primer-prob sisteminin influenza virüsünün HA glikoproteinini kodlayan gen bölgelerine ait olmasına rağmen, ikinci grup hasta örneklerinde M gen bölgesini hedefleyen primer-prob sistemleri kullanılmıştır. Bu durumun, duyarlık ve özgüllüğün her iki grupta farklı bulunmasına neden olabileceği öngörülmüştür. Çeşitli çalışmalarda M geninin iyi korunmuş ve H3N2, H1N1, H2N2, H5N1, H9N2 gibi influenza A alt tipleri arasında %80'den fazla homoloji gösteren gen bölgesi olduğu belirtilmiştir ^(11,13,19,20). Bizim de M gen bölgesini hedefleyen primer-prob sisteminin kullanıldığı çalışmamızın ikinci grubunda diğer rRT-PCR çalışmaları ile benzer sonuçlar alınmış ve rRT-PCR tekniği, hücre kültüründen daha duyarlı bulunmuştur. Bu arada çalışmamızın ikinci grubunda kullanılan kit içeriğindeki UNG enzimine rağmen saptanan üç yalancı pozitiflikten dolayı, rRT-PCR (%85), hücre kültüründen (%100) daha düşük özgüllükte bulunmuştur. PCR ile yapılan çeşitli çalışmalarda yöntemin yüksek duyarlılığının yalancı pozitifliklere neden olabileceği, PCR ürünlerinin birbirleri ile kontaminasyonunu önlemek için internal ve eksternal kontrolleri kullanmanın yanı sıra UNG

enzimi uygulamasının önemi belirtilmiştir. Ancak UNG kullanımına rağmen, yanlış pozitifliklerin elde edilebildiği ve UNG etkinliğinin PCR ürünün uzunluğuyla ve “guanin+sitozin” içeriğine göre değişkenlik gösterebileceği bildirilmiştir ^(21,22). rRT-PCR yöntemlerinde, oluşan spesifik baz dizilerinin tespiti için PCR sonrası işlem gerekmediğinden, PCR sonrası kontaminasyonun söz konusu olmaması, rRT-PCR yöntemlerinin diğer PCR yöntemlerinden bu anlamda ayrıcalıklı olmasını sağlamaktadır. Çalışmamızda elde edilen üç yalancı pozitifliğin kesin nedeni saptanamamakla beraber, rRT-PCR’ın yüksek duyarlılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda uygulanan diğer PCR tekniği agaroz jel analizine dayalı in-house PCR yöntemi olup, ikinci grup 50 hasta örneğinin incelenmesinde kullanılmıştır. İnfluenza A’nın M proteinini hedefleyen primerlerin uygulamaya sokulduğu bu PCR yöntemi ile 23 influenza A (%46) pozitifliği elde edilmiştir. Jel elektroforez PCR yöntemi (in-house PCR) ile rRT-PCR’ın karşılaştırıldığı çalışmalarda bizim çalışmamızda olduğu gibi rRT-PCR daha yüksek duyarlılığa sahip bulunmuştur. Bu durumun, deneylerin analitik duyarlıklarının birbirinden farklı olması ile açıklanmıştır ^(23,24). Çeşitli yayınlarda in-house PCR ile ilgili yalancı negatiflikler ile ilgili olarak; solunum örneklerinde çeşitli oranlarda bulunan RNaz enzimlerinin viral zarfı bulunmayan RNA’ları sindirdiği, böylece yöntemin çok miktarda RNaz, az miktarda RNA içeren örneklerde düşük duyarlılığa sahip olmasından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür ^(9,25). Çalışmamızdaki in-house PCR’ın duyarlılığının hücre kültürüne ve rRT-PCR yöntemlerine oranla düşük saptanmasının, RNaz varlığı dışında, bazı örneklerde cDNA sentezinin veya cDNA çoğaltılması aşamasında reaksiyonun yetersiz oluşmasından veya hiç oluşmamasından kaynaklanabileceği de olasıdır. Çeşitli çalışmalarda jel elektroforezinde görülen bu duyarlılık sorununun, nested PCR uygulaması ile büyük ölçüde giderilebildiği savunulmuştur ^(26,27). Gerek bizim çalışmamızda gerekse rRT-PCR ile klasik PCR’ların değerlendirildiği diğer bazı çalışmalarda, rRT-PCR’ın, PCR sonrası işleme gerek kalmadığı ve çok daha hızlı sonuç verdiği ve ayrıca kontaminasyon riskini en aza indirdiği belirlenmiştir ⁽²⁸⁾. rRT-PCR, klasik PCR ile karşılaştırıldığında, çok sayıda örneğin bir arada çalışılabilmesi, yüksek duyarlılığa (<5 kopya) ve geniş dinamik aralığa sahip olması (10-

1010 kopya), sonuçların kantite edilebilir olması gibi özellikleri nedeniyle, daha avantajlı bir teknik olarak değerlendirilmesi olasıdır ^(9,24). Magnard ve ark ⁽²⁶⁾ çalışmasında hücre kültürü ile nested RT-PCR sonuçlarının birbirine yakın bulunması, hücre kültürünün optimize edilmesi ile ilişkili bulunmuştur. Bu optimizasyon için negatif bulunan örneklerin ikinci kez hücre kültürüne ekilmesi, yüksek kalitede düşük pasajlı MDCK hücrelerinin kullanılması, influenza virüslerinin üreme kontrolünün ve kültür üst sıvısından antijen aranmasının sistematik biçimde yapılmasının gerektiği belirtilmiştir. Çalışmamızda da hücre kültürü ile negatif bulunan örneklerin birinci kültür üst sıvısı (P1) tekrar hücre kültürüne ekilmiş, bu şekilde pozitiflik oranı birinci ve ikinci çalışma grubunda %23 ve %12 oranlarında artırılmıştır. Ayrıca önceki çalışmada belirtildiği gibi yüksek pasajlı MDCK hücreleri kullanılan örneklerde duyarlılık sorunu ortaya çıkmış ve bu örnekler düşük pasajlı hücrelere tekrar ekilerek, viral izolasyon oranı artırılmıştır. Benzer çalışmalarda ayrıca inokülasyon sonrası santrifüj işlemi uygulanmasının, virüsün hücreye penetrasyonunu arttırdığı belirtilmiştir ⁽²⁸⁻³⁰⁾. Çalışmamızda da inokülasyon sonrası santrifüj işlemi uygulanmış, ancak santrifüj edilen ve edilmeyen örneklerde virüs titresinin karşılaştırılması ile ilgili bir ek inceleme yapılmamıştır.

Çalışmamızda ayrıca hasta başında hızlı tanıya olanak tanınması açısından önemli olan hızlı testlerden, İnfluenza A/B Rapid (Roche Diagnostics, İsviçre) testinin diğer yöntemlerle karşılaştırılması yapılmış ve diğer yöntemlere göre düşük duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür. Hızlı sonuç vermesine rağmen, kullanılan kite ve örnekler göre değişmekle birlikte ciddi duyarlılık sorunu olan bu testlerin, çeşitli çalışmalarda özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmalarda hızlı test diğer yöntemlere göre düşük duyarlılıkta bulunmasına rağmen, genelde elde edilen duyarlılık oranları, çalışmamızda elde ettiğimiz oranlardan (%14,5 ve %10) yüksektir ^(31,32). Yine bu testlerle ilgili yapılan çalışmalarda farklı duyarlılık ve özgüllük oranlarının elde edilmesi hızlı testlerle karşılaştırılmakta kullanılan hücre kültürü yöntemlerinin farklı duyarlılıkta olması, araştırmacıların farklı performans göstermeleri, hastaların yaşları gibi faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür ⁽³³⁻³⁹⁾. Çalışmamızda hızlı test ile elde ettiğimiz düşük duyarlılığın nedeninin, kullanılan standart yöntemlerin yüksek duyarlılık-

ta olmasının yanı sıra uygulamada saptanamayan hatalar ile de ilgili olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada, PCR tekniklerinin duyarlık ve özgüllüklerinin artırılması için uygun primer ve problemlerin kullanılması, rRT-PCR gibi duyarlılığı yüksek olan yöntemlerde ise yalancı pozitifliklerin önlenmesi için bazı ilave kalite kontrol ölçümlerinin yapılması ve gerektiğinde gerçek pozitif örneklerin saptanması için farklı laboratuvar tekniklerinin paralel çalışılması gibi parametrelerin önemi ortaya çıkmıştır. Ayrıca antijenik özelliklerinin değerlendirilmesi için kültürde izolasyonu şart olan influenza virüslerinin hücre kültür tekniği ile optimal duyarlılıkta izolasyonu ve tespiti için örneklerin uygun koşullarda alımı ve transportundan başlayarak, doğru hücre seçimi, virüs titresinin yüksek eldesini sağlayan çeşitli işlemlerin uygulanması (ekim sonrası santrifüj uygulanması, TPCK-tripsin ilavesi ve negatif örneklerin yine ekilmesi), kültür sonrası identifikasyon için duyarlı yöntemlerinin seçilip uygulanması gibi bir dizi işlemin gerçekleştirilmesinin gerekliliği ortaya konmuştur ⁽⁴⁰⁾.

KAYNAKLAR

1. Cox NJ, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses: Influenza. In: Mahy BWJ, Collier L eds. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th ed. New York: Oxford University Press, 1998:385-433.
2. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet* 2003; 362:1733-45.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14854-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14854-4)
3. Atmar RL, Lindstrom SE. Influenza viruses. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW eds. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington: ASM Press, 2011:1333-46.
4. Wilschut JC, McElhaney JE, Palache AM. Influenza. 2th ed. Edinburgh: Mosby Elsevier, 2006.
PMid:1798193
5. Dwyer DE, Smith DW, Catton MG, Barr IG. Laboratory diagnosis of human seasonal and pandemic influenza virus infection. *Med J Aust* 2006; 185(Suppl 10):S48-S53.
PMid:17115952
6. Zambon M. Laboratory diagnosis of influenza. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, eds. Textbook of Influenza. Oxford: Blackwell, 1998:291-313.
7. Scuffham PA, West PA. Economic evaluation of strategies for the control and management of influenza in Europe. *Vaccine* 2002; 20:2562-78.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00154-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00154-8)
8. Wood JM. Standardization of inactivated influenza vaccine. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, eds. Textbook of influenza. Oxford: Blackwell, 1998:333-45.
9. Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:716-47.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00037-07>
PMid:18854489 PMid:2570148
10. Ellis JS, Zambon MC. Molecular diagnosis of influenza. *Rev Med Virol* 2002; 12:375-89.
<http://dx.doi.org/10.1002/rmv.370>
PMid:12410529
11. Institut Pasteur. Protocole de la detection du virus grippal de type A par RT-PCR. Unité Génétique Moléculaire des Virus Respiratoires. Centre National de Référence du Virus Influenzae (Région Nord), Institut Pasteur, Paris Cedex 15, France, 2004.
12. Koenig M, Kosha S, Hickman M, Heath D, Riddell S, Aldous W. Detection of influenza virus from throat and pharyngeal swabs with a nested duplex light cyclers RT-PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46:35-7.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00552-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00552-7)
13. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, Timm H, Pauli G. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1552-8.
PMid:10747142 PMid:86487
14. Stone B, Burrows J, Schepetiuk S, et al. Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real time PCR. *J Virol Methods* 2004; 117:103-12.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.12.005>
PMid:15041206
15. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1564-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.4.1564-1569.2004>
PMid:15071005 PMid:387552
16. Van Elden LJ, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon AM. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39:196-200.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.1.196-200.2001>
PMid:11136770 PMid:87701
17. Smith AB, Mock V, Melear R, Colarusso P, Willis DE. Rapid detection of influenza A and B viruses in clinical specimens by Light Cycler real time RT-PCR. *J Clin Virol* 2003; 28:51-8.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532\(02\)00238-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532(02)00238-X)
18. Habib-Bein NF, Beckwith WH 3rd, Mayo D, Landry ML. Comparison of SmartCycler real-time reverse transcription-PCR assay in a public health laboratory with direct immunofluorescence and cell culture assays in a medical center for detection of influenza A virus. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3597-601.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.8.3597-3601.2003>
PMid:12904361 PMid:179819
19. Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4096-101.
PMid:11060074 PMid:87547
20. Widjaja L, Krauss SL, Webby RJ, Xie T, Webster RG. Matrix gene of influenza A viruses isolated from wild aquatic birds: ecology and emergence of influenza A viruses. *J Virol* 2004; 78:8771-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.16.8771-8779.2004>
PMid:15280485 PMid:479093
21. Boivin G, Hardy I, Tellier G, Maziade J. Predicting influenza infections during epidemics with use of a clinical case definition. *Clin Infect Dis* 2000; 31:1166-9.
<http://dx.doi.org/10.1086/317425>
PMid:11073747
22. Booth S, Baleriola C, Rawlinson WD. Comparison of two rapid influenza A/B test kits with reference methods showing high specificity and sensitivity for influenza A infection. *J Med Virol* 2006; 78:619-22.
<http://dx.doi.org/10.1002/jmv.20584>
PMid:16555288
23. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:165-256.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006>
PMid:16418529 PMid:1360278
24. Real-Time PCR vs. Traditional PCR. Applied [web page on the Internet] Biosystems. 18.08.2006 (http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtPCR_vs_tradPCR.pdf).
25. Steining C, Kundi M, Aberle SW, Aberle JH, Popow-Kraupp T. Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2051-6.

- http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.6.2051-2056.2002
PMid:12037063 PMCID:130702
26. **Magnard C, Valette M, Aymard M, Lina B.** Comparison of two nested PCR, cell culture, and antigen detection for the diagnosis of upper respiratory tract infections due to influenza viruses. *J Med Virol* 1999; 59:215-20.
http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199910)59:2<215::AID-JMV15>3.0.CO;2-J
27. **Coiras MT, Pérez-Bre-a P, García ML, Casas I.** Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol* 2003; 69:132-44.
http://dx.doi.org/10.1002/jmv.10255
PMid:12436489
28. **Mills RD, Cain KJ, Woods GL.** Detection of influenza virus by centrifugal inoculation of MDCK cells and staining with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1989; 27:2505-8.
PMid:2808674 PMCID:267067
29. **Herrmann B, Larsson C, Zwegyberg BW.** Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J Clin Microbiol* 2001; 39:134-8.
http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.1.134-138.2001
PMid:11136761 PMCID:87692
30. **Ling AE, Doraisingham S.** Comparison of tube cultures of Madin Darby canine kidney cells with shell-vial cultures after low-speed centrifugation for influenza virus isolation. *Pathology* 1988; 20:346-8.
http://dx.doi.org/10.3109/00313028809085216
PMid:3071771
31. **Covalciuc KA, Webb KH, Carlson CA.** Comparison of four clinical specimen types for detection of influenza A and B viruses by optical immunoassay (FLU OIA test) and cell culture methods. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3971-4.
PMid:10565916 PMCID:85858
32. **Lange W, Schottler M.** Real-time influenza surveillance in Germany--results of a pilot project. *Med Microbiol Immunol* 2002; 191:139-44.
http://dx.doi.org/10.1007/s00430-002-0133-2
PMid:12458348
33. **Cazacu AC, Chung SE, Greer J, Demmler GJ.** Comparison of the Directigen Flu A+B membrane enzyme immunoassay with viral culture for rapid detection of influenza A and B viruses in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3707-10.
http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.8.3707-3710.2004
PMid:15297520 PMCID:497654
34. **Chan KH, Maldeis N, Pope W, et al.** Evaluation of the Directigen Flu A+B test for rapid diagnosis of influenza virus type A and B infections. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1675-80.
http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.5.1675-1680.2002
PMid:11980941 PMCID:130655
35. **Pachucki CT.** Rapid tests for influenza. *Curr Infect Dis Rep* 2005; 7:187-92.
http://dx.doi.org/10.1007/s11908-005-0033-x
PMid:15847720
36. **Reina J, Padilla E, Alonso F, Ruiz De Gopegui E, Munar M, Mari M.** Evaluation of a new dot blot enzyme immunoassay (directigen flu A+B) for simultaneous and differential detection of influenza A and B virus antigens from respiratory samples. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3515-7.
http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.9.3515-3517.2002
PMid:12202608 PMCID:130707
37. **Rodriguez WJ, Schwartz RH, Thorne MM.** Evaluation of diagnostic tests for influenza in a pediatric practice. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:193-6.
http://dx.doi.org/10.1097/00006454-200203000-00006
PMid:12005080
38. **Storch GA.** Rapid diagnostic tests for influenza. *Curr Opin Pediatr* 2003; 15:77-84.
http://dx.doi.org/10.1097/00008480-200302000-00013
PMid:12544276
39. **Katz MA, Lamias MJ, Shay DK, Uyeki TM.** Use of rapid tests and antiviral medications for influenza among primary care providers in the United States. *Influenza Other Resp Viruses* 2009; 3:29-35.
http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-2659.2009.00070.x
PMid:19453439
40. **Foo H, Blyth CC, van Hal S et al.** Laboratory test performance in young adults during influenza outbreaks at world youth day 2008. *J Clin Virol* 2009; 46:384-6.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.09.019
PMid:19828366