

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**EPSTEİN BARR VİRÜS ENFEKSİYONUNUN TANISINDA MOLEKÜLER VE
SEROLOJİK GÖSTERGELERİN YERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Faisal Mohsin Qaddo QADDO

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Seyyal ROTA

ANKARA
KASIM 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**EPSTEİN BARR VİRÜS ENFEKSİYONUNUN TANISINDA MOLEKÜLER VE
SEROLOJİK GÖSTERGELERİN YERİ**

YÜKSEKLİSANS TEZİ

Faisal Mohsin Qaddo QADDO

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Seyyal ROTA

ANKARA
KASIM 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 08 /11/ 2013

Prof.Dr. Seyyal ROTA
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof.Dr. Sibel ERGÜVEN
Hacettepe Üniversitesi



Doç.Dr. Işıl FİDAN
Gazi Üniversitesi



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Tablolar Listesi	v
Şekiller Listesi.....	vi
Kısaltmalar	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİGİLER.....	3
2.1 Epstein Barr Virüs.....	3
2.2 Fiziksel özellikleri.....	3
2.3 Tarihçe	3
2.4.Hastalık Mekanizması	4
2.5 EBV'nin Patogenezi.....	4
2.5.1 Enfeksiyöz Mononükleoz (EM).....	4
2.5.2 Nazofarengeal Karsinoma.....	5
2.5.3 Burkitt Lenfoma	6
2.5.4 Hodgkin Hastalığı.....	7
2.5.5 İmmün Sistemi Baskılanmış Hastalarda Patogenez.....	7
2.5.5.1 X'e bağlı lenfoproliferatif sendrom (X-LPS) ve virüs ilişkili hemofagositik sendrom (VAHS)	8
2.5.5.2 Post-Transplant Lenfoproliferatif Hastalıklar	9
2.5.5.3.Lenfositik İnterstitial Pnömoni	9
2.5.5.4 Non-Hodgkin lenfoma	10

2.5.5.5 Oral “Hairy” leukoplakia	10
2.6. EBV Enfeksiyonunda Kullanılan Tanı Yöntemleri	11
2.6.1 Heterofil Testi	11
2.6.2 Avidite	11
2.6.3 ELISA Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay	12
2.6.4 IFA	13
2.7 EBV antikoru	14
2.7.1 Anti VCA antikoru	14
2.7.2 Anti EA antikoru	15
2.7.3 Anti EBNA antikoru	15
2.8 Moleküler Tanı Yöntemleri.....	16
2.8.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	17
2.8.2 İn Situ Teknikler	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	20
3.1 Serolojik Tanı	20
3.2 Moleküler Tanı.....	22
4. BULGULAR.....	24
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇ.....	44
7. ÖZET	45
8. SUMMARY	46
9. KAYNAKLAR	47
10.EKLER	56
10.1 Teşekkür.....	56

11. ÖZGEÇMİŞ.....	57
--------------------------	-----------

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.	Seroloji Testin Yapılış Şekli.....	22
Tablo 2.	Hasta Örneklerin Geldiği Bölümlerin Dağılımı	24
Tablo 3.	EBV DNA Pozitif Örneklerin Cinsiyet ve Yaş Gruplarına Göre Dağılımı.....	25
Tablo 4.	EBV DNA'sı Pozitif Olan Hasta Örneklerinin Geldiği Bölümlerin Dağılımı.....	25
Tablo 5.	EBV DNA Pozitif Hasta Örneklerinin Serolojik Dağılımı	26
Tablo 6.	EBV DNA Pozitif Hastaların EBV Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA, Anti-EA Serolojisi.	27
Tablo 7.	EBV DNA Pozitif Örneklerde Serolojik Profile Göre Epstein-Barr Virus Enfeksiyonunun Tipi.....	28
Tablo 8.	Serolojik Profiline Göre EBV DNA'sı Pozitif Örneklerin Geldiği Bölümlerin Dağılımı.....	29
Tablo 9.	EBV DNA Negatif Örneklerin Cinsiyet Ve Yaş Gruplarına Göre Dağılımı.....	30
Tablo 10.	EBV DNA Negatif Hasta Örneklerinin Serolojik Dağılımı	31
Tablo 11.	EBV DNA Negatif Hastaların EBV Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA, Anti-EA Serolojisi	33
Tablo 12.	EBV DNA Negatif Örneklerde Serolojik Profile Göre Epstein-Barr Virus Enfeksiyonunun Şekli.....	34
Tablo 13.	Yapılan Çeşitli Çalışmalardaki Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA ve Anti-EA Değerlerin Karşılaştırılması.	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** EBV DNA pozitif hastaların EBV Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA, Anti-EA serolojisi 27
- Şekil 2.** EBV DNA Pozitif Örneklerde Serolojik Profile Göre Epstein-Barr Virus Enfeksiyonunun Tipi 30
- Şekil 3.** EBV DNA Negatif Hastaların EBV Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA, Anti-EA Serolojisi 33
- Şekil 4.** EBV DNA Negatif Örneklerde Serolojik Profile Göre Epstein-Barr Virus Enfeksiyonunun Pasta Dilimi Sekli 34

KISALTMALAR

- BL : Burkitt lenfoma
- CMV : Sitomegalovirüs
- DNA : Deoksiribonükleik asit
- dNTP : deoksinükleotid trifosfatlar
- EA : erken antijen
- EBNA : Epstein Barr Virüs Nükleer Antijeni
- EBV : Epstein Barr Virus
- EIA : Enzyme Immunoassay
- ELISA : Enzyme linked immuno sorbent assay
- EM : enfeksiyöz mononükleoz
- FPIA : Floresan particle immunoassay immunotesti
- HD : Hodgkin lenfoma
- HIV : Human Immunodeficiency Virus (İnsan immün yetmezlik virüsü)
- IFA : indirek fluoreсан assay
- Ig : immünglobulinler
- LMP : latent membran prtein
- MA : membran antijen

NHL : Non-Hodgkin lenfoma
NK : Doğal öldürücü hücre (Natural Killer)
NPC : Nazofarengeal Karsinoma
ORF : open reading frames
PBMC : peripheral blood mononuclear cell
PTLH : posttransplant lenfoproliferatif hastalığı
PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu
RF : romatoid faktör
RNA : Ribonükleik asit
VAHS : virüs ilişkili hemofagositik sendrom
VCA : viral kapsit antigen
X-LPS : X'e bağlı lenfoproliferatif sendrom
ZEBRA : Z EBV replikasyon aktivatör

1. GİRİŞ

Epstein-Barr Virus (EBV) tüm dünyada erişkinlerin %90'ını enfekte eden insane herpesvirüs ailesinin bir üyesidir.¹ Tükürük ve boğaz salgıları ile yakın temas, kan ve kontamine eşyalarla bulaşmaktadır. Epidemiler yapmamaktadır. Epstein-Barr Virus (EBV), enfeksiyöz mononükleoz (EM) başta olmak üzere Burkitt lenfoma ve nazofarengeal karsinoma gibi malignitelerin de etiyolojisinden sorumludur. Sosyo-ekonomik düzeyi düşük toplumlarda prevalansı daha yüksektir. EBV enfeksiyonları genellikle çocukluk döneminde gelişip asemptomatik seyrederek. Tanısı klinik, hematolojik ve serolojik bulgulara dayanır. Enfeksiyonun erken döneminde lökopeni veya normal lökosit sayısı saptanabilir. Lenfomonositoz yanında %30 atipik lenfositler (Viroisit yada Downey hücresi) enfeksiyonun 2. haftasından itibaren gelişirler.^{2,3,4}

Sitomegalovirus, Rubella, Toxoplasma gondii enfeksiyonları ve bazı hematolojik malignansiler EBV enfeksiyonlarına benzer bulgular oluşturabilir. Ayrıca immünsüprese hastalarda primer enfeksiyon sıklıkla şiddetlidir ve ölümcül olabilir. Bu nedenlerle EBV enfeksiyon tanısı önem taşımaktadır. Virüsün Virüsün majör antijenleri; EBV nükleer antijen (EBNA), erken antijen (EA), viral kapsit antijeni (VCA), membran antijeni (MA), latent membran proteinidir (LMP).⁵

EM'un laboratuvar tanısı atipik lenfositlerin, heterofil antikorların, virus antijenlerine karşı oluşan spesifik antikorların ve viral DNA'nın saptanması ile mümkündür. EBV enfeksiyonun tanısında kullanılan serolojik testler hem akut enfeksiyonu, geçirilmiş enfeksiyondan hem de reaktivasyondan ayırmak için gereklidir. EBV spesifik viral kapsid antijen (VCA), nükleer antijen (EBNA) ve erken antijen (EA) antijenlerine karşı oluşan antikorların araştırılması tanıda oldukça yol göstericidir.² VCA IgM antikorları

akut enfeksiyon göstergesidir, enfeksiyonun ilk haftası içinde ortaya çıkıp üç ay boyunca saptanırken; VCA IgG antikoru semptomların başlamasından 4-7 gün sonra ortaya çıkarak ömür boyu pozitif kalır. EBNA-1 IgG antikoru akut enfeksiyondan konvelesan döneme geçişin göstergesi olup ömür boyu saptanabilir.^{2,3} Kapsid antijeni p22'ye karşı oluşan antikoru da anti-EBNA-1 antikoru gibi enfeksiyonun geç döneminde oluşur.² Günümüzde EBV ile ilişkili hastalıkların ön/kesin tanısı, tedavi etkinliğinin belirlenmesi ve önlenmesinde EBV-DNA ölçümünden yararlanılmaktadır.^{5,6}

Çalışmamızda serolojik olarak EBV akut kronik enfeksiyonu ve ya reaktivasyonu düşünülen hastalarda gerçek zamanlı PZR yönteminin EBV enfeksiyonunun tanı ve evrelendirmedeki önemini belirlemesini amaçlanmıştır.

2. GENEL BİGİLER

2.1 Epstein Barr Virüs

Epstein-Barr viruse (EBV), başta enfeksiyöz mononükleoz (EM) olmak üzere Burkitt lenfoma ve nazofarengeal karsinoma gibi malignitelerin ayrıca transplantasyon sonrası immünsüpresif konakta ortaya çıkan posttransplant lenfoproliferatif hastalığın (PTLH) etiolojisinden sorumlu herpes grubundan bir virüsdür.⁷

2.2 Fiziksel Özellikleri

EBV 180-200 nm çapılı DNA virüsüdür. Virüs *Herpesviridae* ailesinden *Gammaherpesvirinae* alt familyasının bir üyesidir. Virüs; ikosahedral simetri düzeninde, 126 kapsomerli, 120 nm çapında ve kılıflıdır. Nükleokapsidi 100 nm çapındadır. Çift sarmalı 172 kb olan DNA'sı olgun virionda lineer, latent olarak enfekte hücrelerde sirküler yapıdadır. EBV genomu 80 protein kodlamaktadır.⁸

2.3 Tarihçe

Epstein-Barr virüsü (EBV) ilk kez 19. yüzyıl sonunda ateş, hepatosplenomegali ve lenfadenopati ile karakterize "glandüler ateş" olarak tanımlanmıştır. 1964 yılında Denis Burkitt adlı cerrah, Afrikalı çocuklardan aldığı tümör örneklerini İngiliz Epstein, Barr ve Achong isimli araştırmacılara göndermiş ve araştırmacılar herpes virüs ailesinin daha önce bilinmeyen bu üyesini tanımlamışlardır. Bu virüsün enfeksiyöz mononükleozun (EM) etkeni olduğu ise 1968 yılında gösterilmiştir. Daha sonra prospektif seroepidemiolojik çalışmalar EBV'unun enfeksiyöz mononükleozun etkeni

olduğu doğrulanmış. EBV'unun transformasyon yeteneği, 1970'li yılların başlarında dinlenme halindeki B lenfositlerinin EBV klonal çoğalmaya y6nlendirildiği çalışmaların sonuçları ile belirlenmiştir.^{9,10}

2.4 Hastalık Mekanizması

EBV 6nce orofarinksin epitel h6crelerini enfekte eder, vir6s6n replikasyonu, h6crenin lizisi ve viryon salımı burada gerçekleşir. Daha sonra nazofarenks ve t6k6r6k bezleri ile hedef h6cre olan larenksin lenfoid dokularında bulunan duyarlı B lenfositleri enfekte eder. Vir6s 6rediği h6creye sitopatik etki yapmaz ancak, vir6s genomu içeren h6cre, devamlı 6reme 6zelliği kazanır. Konakçı h6crelerden sentezlenen antijenik yapılar B lenfositler için otokrin b6y6me fakt6r6n6 stim6le eder ve apoptozisi engeller. Enfeksiyonla birlikte B lenfositler proliferasyon, stim6lasyon ve sonrasında imm6nglob6lin 6retimi için aktive olur ve IgM başta olmak 6zere IgG ve IgA sınıfı antikorlar sentezler. Humoral ve h6creyel imm6n yanıt gelişmesine rağmen vir6s konaktan elimine edilemez ve enfekte B lenfositlerin içinde latent olarak kalır.⁹

2.5 EBV'nun Patogenezi

2.5.1 Enfeksiy6z Monon6kleoz (EM)

Enfeksiy6z monon6kleoz, en sıklıkla temel Epstein barr virus (EBV) enfeksiyonuyla ilişkili bir klinik sendromdur. EBV bulaşması ağırlıklı mikroorganizmayı içeren t6kr6k salgısına maruz kalma yoluyla, sıklıkla 6p6şme ve daha az cinsel yolla meydana gelir.¹¹ Enfeksiy6z monon6kleozun baskın çoğunluğu temel EBV enfeksiyonu esnasında oluşmasına rağmen, enfeksiy6z monon6kleoz sendromları CD3'e karşı monoklonal antikorlar ile T-

lenfosit azaldığından sonra kronik olarak etkilenmiş kişilerde de rapor edilmiştir.¹² inkübasyon dönemi, ilk maruz kalma zamanından belirtilerin başlangıcına kadar, 30 ile 50 gün arası olarak tahmin edilir ¹³. Enfeksiyöz mononükleoz en sıklıkla hayatlarının ikinci on yılı esnasında ya da sonrasında EBV enfeksiyonu taşıyanları etkiler. Ekonomik ve sağlık koşulları geçen yıllar boyunca iyileştiği için, erken çocukluk döneminde EBV enfeksiyonu çok azdır ancak büyüme çağına geldiklerinde duyarlı hale gelirler. Örneğin, Japonya'daki 5 ile 9 yaş arasındaki çocukların seroprevalans oranı 1990 yılında %80'in üzerinden 1995 ile 1999 yılları arasında %59'a düşmüştür. Birleşik devletlerdeki enfeksiyöz mononükleozun genel etki alanı en çok rastlanan 15 ile 24 yaş grubu ile yıllık 100,000 kişide 500 civarında rapor edilmiştir.¹⁴

2.5.2 Nazofarengeal Karsinoma

Nazofarenks karsinomu etki alanındaki işaretli coğrafik ve nüfus farklılıkları tarafından karakterize edilen bir epitel tümördür. Batı popülasyonlarında bu insidansı yıllık her 100000 insanda belirli bir oranda oluşan bütün kanserlerin %0.25'i kadar düşükken, Doğu Çin ve Güneydoğu Asya'da bütün kanserlerin %20'sini temsil eder. Tümör Akdeniz Afrika'sı popülasyonunda olduğu kadar Inuit popülasyonunda (eskimo) da oldukça sıktır.¹⁵ EBV genomu coğrafik dağılıma ya da ırksal geçmişe bakmaksızın NPC içinde kalıcı bir biçimde tespit edilmiştir ¹⁶. Bu malignite tümörün coğrafik dağılımı hastalık duyarlılık genleri kadar çevresel faktörlerin kanserojen işleyişte yer aldığını öne sürer.¹⁷

Nazofarenks karsinomunun eşsiz bir özelliği Epstein-Barr virüsü ile kuvvetli ortalıklığıdır. EBV genomu, EBV genomun NPC vakalarının hepsinde tespit

edilebilir ve EBV üretiminin bu malignite pathogenezinde rol oynadığını düşündürmektedir.¹⁸

2.5.3 Burkit Lenfoma

Burkit Lenfoma yaygın, ara sıra görülen ve bağışıklık yetmezlik ilişkili agresif bir B-hücre habis tümörüdür. Uzun yıllardır bilinmektedir ki, BL'deki ana dönüşüm olayı MYC geninin yer değiştirmesidir, ve bu yer değiştirmeye yol açan olaylar ve MYC'nin temel ekspresyonu ile hücrelere hayatta kalmaya izin verenler yoğun araştırmaların konusudurlar. Epstein-Barr virüs enfeksiyonu, sıtma, immün yetmezlik ve kendiliğinden olan fiziksel mutasyon hepsi bu kanserin doğuşuna ve devamına katkıda bulunabilir ve onların mekanizmaları bu görüşün konusudur. Burkit Lemfoma coğrafik dağılıma ve Epstein-Barr virüsü ilişkisine göre üç forma sınıflandırılabilir: endemik(eBL), sporadik (sBL) ve HIV ilişkili BL.¹⁹

Bütün BL'lerin ayırıcı özelliği MYC geni ile immünglobülin ağır veya hafif zincir loküslerinin biri arasındaki translokasyonudur. EBV ile çok az ilişkili olan (sBL)'nin dünya çapındaki rastlanma geçmişi çok azdır ve Batı Avrupa ve Amerika'daki yetişkin lenfomaların %1-2'sinden sorumludur, fakat eBL vakaların %95'inden fazlasında EBV ile ilişkilidir ve Afrika'nın ekvatorial kuşağında ve sıtmanın hiperendemik olduğu dünyanın diğer bölgelerinde baskındır. EBV ile orta ilişki gösteren BL'ler tümörlerin %87'ye kadarının EBV pozitif ve AIDS başlangıcıyla şiddetli bağışıklık sisteminin durdurulması rastlantısından önce tümörlerin gelişebildiği HIV taşıyıcılarında BL olduğu Mısır ve Brezilya'da belgelenmiştir. Yaklaşık olarak AIDS ilişkili tümörlerin %30'u EBV pozitifdir. Sıklıkla görülen EBV ilişkili BL'nin 100,000 çocukta 5-10 rastlantısı vardır ve Afrika ekvatorial kuşağındaki çocuk malignitelerin %74'ü kadarından sorumludur. En sıklıkla karın tümörlerine yol açan sBL'nin aksine,

eBL sık sık çene yada böbreklerde görülür fakat karında, yumurtalıklarda, yüz kemiklerinde ve diğer ektranodal bölgelerde de oluşabilir.¹⁹

2.5.4 Hodgkin Hastalığı

Hodgkin lenfoma “Reed-Sternberg hücreleri” (bu hücreleri ilk kez tanımlayan bilim adamının adıyla anılmaktadırlar) ile diğer lenfoma tiplerinden ayrılır. Hastalıkla ilişkili diğer hücreler “Hodgkin hücreleri” olarak adlandırılmaktadır. Hodgkin hastalarında %20–40 oranında EBV-DNA ve EBNA-1'in gösterilmesi EBV'nin Hodgkin lenfomanın patogenezi de katkıda bulunabileceğini göstermiştir. Oranın daha az gelişmiş olan ülkelerde daha fazla olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda özellikle pediatrik hastalarda ve mikst sellüler tip histolojisi gösteren vakalarda önemli oranda birliktelik saptanmıştır. EBV DNA'nın başlıca Reed Steinberg hücrelerinde bulunduğu bildirilmiştir. HD'nin temel biyolojisindeki virüsün rolünün artan bilgisi EBV pozitif HD için yeni terapötik stratejiler üretebilir ve habis HD hücrelerindeki EBV-gizli antijenlerin varlığı hücrel immüterapi için bir hedef gösterebilir.²¹

2.5.5 İmmün Sistemi Baskılanmış Hastalarda Patogenez

Normal kişilerde primer enfeksiyondan sonra EBV'u enfekte B lenfositlerinde latent olarak kalmaya devam eder. Bu enfekte hücreler periodik olarak virüsün çoğaldığı litik replikasyon fazına girerler. Nötralize eden antikolar, natural killer hücreleri (NK hücreleri) ve CD8 sitotoksik T lenfositleri primer enfeksiyonu sınırlamaya ve immortalizasyon özelliği taşıyan hücreleri kontrol etmeye çalışır. Bu şekilde EBV'u ile enfekte B lenfosit havuzu kontrol altında tutulur. Bununla birlikte immün yanıtın bir veya birden fazla elementinde fonksiyonel bir bozukluk gelişirse normal olarak EBV'u ile

enfekte hücre havuzu genişlemeye başlar. EBV aktive ettiği B lenfositleri lenfoma hücrelerine transforme olabilir. Bu malign transformasyonun patogenezinde ortaya çıkan yeni genetik rekombinasyonların onkogen aktivasyonuna ve klonal çoğalmanın kontrol dışı kalmasına imkan verebileceği ve ayrıca T lenfositlerinin katkısı olabileceği görüşü yer almaktadır.²²

2.5.5.1 X'e bağlı lenfoproliferatif sendrom (X-LPS) ve virüs ilişkili hemofagositik sendrom (VAHS)

Nadir olarak X'e bağlı genetik predispozisyon nedeniyle primer EBV enfeksiyonuna karşı normal immün yanıtlar sürdürülemez ve bu kişilerin yaklaşık %75'de progressif proliferatif yanıtlar gelişir.²³

Bu hastalar lenfosit infiltrasyonuna bağlı karaciğer nekrozu nedeniyle kaybedilirler. Patolojik incelemelerinde hastaların üçte ikisinde fatal EM'a ait değişiklikler veya hastaların 1/3'ünde genellikle Burkitt B-hücreli lenfomaların geliştiği görülür. XLPS'li hastaların büyük çoğunluğu, rutin çocukluk çağı immünizasyonlarına viral ve bakteriyel enfeksiyonlara normal yanıtlar verirler. Bunun dışında EBV seronegatif genellikle normal hücresel immün yanıtlar ve T ve B lenfosit sayılarının normal olduğu görülür. Bununla birlikte özellikle IgA ve IgM yüksekliği, IgG subgrup eksiklikleri, IgM üzerinden IgG yapımına geçişte defektlerin olduğu EBV enfeksiyonlarından önce belirlenmiştir. XLPS'li hastalara akut EM sırasında yapılan immünolojik incelemelerde tipik EMN de olduğu gibi sellüler immünitenin baskılandığı, bazı hastalarda natural killer (NK) aktivitesinin arttığı görülmüştür. Yaşayan hastalarda T lenfosit ve NK hücre fonksiyonlarında azalma belirlenmiştir.²³

Ayrıca bütün yaşayanlarda EBV antikorlarının eksik olduğu veya yapılamadığı ve EBNA antikorlarının kaybolduğu ve primer EBV

enfeksiyonunun regülasyonunda yetersiz kaldığı belirlenmiştir. XLPS'unda T lenfosit sinyal yolu üzerinde genetik bir defekt olduğu gösterilmiştir. Bu defektin olasılıkla eğer yanıt çok aşırı ise fatal enfeksiyöz mononukleosiz'e veya aroliferasyona neden olduğu, eğer yanıt yetersiz ise malign lenfoma gelişmesine izin verdiği düşünülmektedir.²⁴

2.5.5.2 Post-Transplant Lenfoproliferatif Hastalıklar

Böbrek, kalp, karaciğer veya kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda uygulanan kronik immünosupresif tedaviler post transplant lenfoproliferatif hastalık (PTLH) sıklığını arttırmaktadır. Transplantasyondan 1-2 yıl sonra EM'e benzer bir hastalık tablosu görülebilir. Transplantasyonu izleyen sürenin uzamasıyla birlikte solid tümörler ve NHL gelişme riski artar.

Post-transplant lenfoproliferatif hastalıklar erken ya da geç olarak ortaya çıkabilir. Bu malignitelerde EBV'unun rolünü destekleyen bulgular: 1) Hastaların büyük bölümünde primer veya reaktif EBV enfeksiyonlarının bulunması 2) Lezyonlarda viral genom ve antijenlerin gösterilmesi (özellikle transplantasyondan sonra erken gelişen tümörlerde). Serum immünglobulinleri artmış olabilir. Serolojik olarak primer veya reaktif EBV yanıtları ile birlikte EBNA titrelerinde düşme görülebilir. Moleküler tekniklerle EBV DNA'sı ve EBERs'ın lezyonlarda gösterilmesi önemlidir. PTLH'in mortalitesi yaklaşık %50'dir.^{22, 24, 25}

2.5.5.3 Lenfositik İnterstitial Pnömoni

AIDS'ten önce nadir olan bu tablo daha çok disgammaglobulinemi gibi immünolojik bozukluklarla birlikte tanımlanmıştır.

LİP'nin sistemik lenfoproliferatif bozukluklarla birlikte ve akciğerle sınırlı olmak üzere iki klinik prezentasyonu vardır. AIDS'li hastalarda LİP generalize lenfadenopati ve parotitis ile birlikte dir. LİP'li hastaların %80'inde EBV DNA'sı akciğerlerde belirlenebilir. LİP'li çocuklarda primer veya reaktif EBV enfeksiyon bulguları vardır. Erişkinlerde de benzer sonuçlar gösterilmiştir.²²

2.5.5.4 Non-Hodgkin lenfoma

Genel popülasyonda Hodgkin lenfoma sıklığının daha fazla olmasına karşılık AIDS gibi immün baskılanmış kişilerde NHL daha fazla görülür. AIDS'li hastalarda NHL daha agresif, ekstra nodal tutulumları daha fazla ve esas olarak B-hücre kökenlidir. EBV'u Southern-blot tekniği ile AIDS'li hastaların yarısında gösterilebilir. Santral sinir sistemi lenfomalarının %90'nından fazlasında EBV beraberliği vardır.²⁶

2.5.5.5 Oral "Hairy" leukoplakia

Oral leukoplakia'nın yeni bir formu 1984 yılından itibaren HIV-seropozitif homoseksüel erkeklerde tanımlanmaya başlanmıştır. Bu tablo nadiren çocuklarda rapor edilmiştir. Oral hairy leukoplakia prensip olarak dilin lateral yüzeplerinde ortaya çıkmaktadır. Lezyonlar düz sigillere benzer. EBV DNA ve antijenlerinin biyopsi materyallerinde gösterilmesi ile EBV'unun rolü desteklenmiştir. Lezyonlarda epitel hücrelerinde litik EBV DNA replikasyonu dökümente edilmiştir ve asiklovir tedavisi ile lezyonlar regrese olmuştur. Ayrıca HIV enfekte hastalarda özofagusta ülserler belirlenmiştir. Bunların oral hairy leukoplakia'ya patolojik olarak benzediği görülmüştür. Bu hastalarda özofagusun orta bölümünde alışılmışın dışında derin, linear ülserasyonlar vardır.²²

2.6 EBV Enfeksiyonunda Kullanılan Tanı Yöntemleri

EBV enfeksiyonun teşhis etmek için çeşitli laboratuvar testleri kullanılır buna ek olarak tanısız içi yararlı olan diğer testler parametreleri (lökositoz, lenfositoz ile atipik lenfositler, anormal kara ciğer fonksiyon testleri, vb) vardır. Non-spesifik heterofil antikorların ve spesifik anti-EBV antikorların tespiti için testler, EBV DNA tespit etmek için moleküler biyolojik yöntemler kullanılır.²⁷

2.6.1 Heterofil Testi

30 yıl önce, Paul ve Bunnell IgM modelinin heterofilik antikorların EM ile birleşik olduğunu ilk keşfedenlerdi. Bu antikorlar çapraz türlerdir ve EBV özellikli değildir. Bu antikorla tipik olarak poliklonal uyarmanın sonucudur fakat özellikle mononükleozlu hastalarda bulunmazlar. Heterofil antikorlar EM'den başka diğer hastalıkları olan hastalarda da tespit edilebilir, ve test sonuçları 6 ile 12 boyunca pozitif kalabilir. Ticari olarak bulunabilir olan heterofil antikorların tespiti için aglütinasyon test araçları keçi, at ya da sığır eritrosilerini kobay ciğeri ekstrasyonunu ile reabsorpsiyon olduktan sonra kullanılır ve gençlerin ya da yetişkinlerin %85-90 için akut faz serumları ile etkilidir fakat 2-5 yaşları arasındaki çocuklar için sadece %50 etkilidir. Böylece yanlış-pozitif sonuçlar otoimmün hastalarda %2-3'ünde bulunmuşken, yanlış-negatif sonuçların yüksek oranı beklenebilir.²⁸

2.6.2 Avidite

Avidite testi ek bir metot olarak, VCA IgG'nin avidite testi anti-EBNA-1-negatif vakalarında ilk enfeksiyon ve geçmiş enfeksiyon arasında değişiklik gösterebilen ve VCA IgM'nin uzun dönem sürdüğü vakaları da

çözebilir. Enfeksiyon süreci esnasında sadece en yüksek aviditesi olan antikorlar seçilir; böylece in vivo IgG'nin olgunlaşması in vitro ortamda aviditenin kararlılığıyla ölçülebilir. B hücreleri canlıda IgM'yi IgG izotipine çevirir. IgG olgunlaşma işlemin kinetikleri, ilk EBV enfeksiyonundan sonra birkaç hafta içinde olgunlaşma süreci tamamlanmış olabilmese rağmen kişiden kişiye değişiklik gösterir. Ölçümler VCA özellikli substratlı EIA, IFA ya da Western blot tekniğiyle elde edilir²⁰. Benzer örneğin iki temsil parçası IgG antikorların varlığı için paralel olarak test edilir biri işlenmez ve diğeri antijenleri antikorlardan ayıran maddelerle işlenir. Bu ayrılma antikorun aviditesine bağlı olduğu için, işlenmiş ve işlenmemiş örnekler arasındaki oran aviditinin derecesine karar verir. Avidite bu nedenle bir ilk enfeksiyonun sürecini tahmin etmekte, akut ve geçmiş enfeksiyonu ayırt etmek için kullanılabilir.²⁸

2.6.3 ELISA Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

Antijen antikor reaksiyonlarını gösterebilmek için enzim kullanılan tüm tekniklere ve tahlil yöntemlerine genel olarak enzim immunotest (enzyme immunoassay, EIA, ELİSA) denmektedir. Enzimle işaretli immuno reaktiflere dayalı bu testler, antijen antikor reaksiyonu tespiti ile özellikle Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında sıkça çeşitli enfeksiyonlar, antijen ve antikorların tanısında kullanılmaktadır. Bu tekniklerde çeşitli enzimler kullanılabilir, fakat en genelleri alkalın fosfotaz ve peroksidazdır. Tipik tahlil süreleri 2-3 saattir fakat kendinden membran içeren EIA'lar ve competitive EIA'lar önemli derecede hızlı olabilirler. EIA'lar böylece üreticilere tarafından farklı klinik uygulamalarına uyması için geniş çapta bir format çeşitliliğini ortaya koyarlar. Floresan particle immunoassay immunotesti (FPIA) ve kemilüminesans immunotest gibi daha otomatikleşmiş EIA metotları, ilaç ve hormon testleri gibi daha yüksek yoğunluk testleri için kullanılmaya

meyillidirler ²⁹. EIA genellikle çeşitli antijenleri, solid faza bağlamak için kullanılırlar. Ya saf ya da tekrar birleştirilmiş proteinler, füzyon proteinleri, ya tam boyutunda VCA kodlanmış gen ya da sadece VCA kodlanmış genin kısımlarını temsil eden sentetik peptidler kullanılır. Aynıısı EBNA-1 içinde doğrudur. Fakat, çoğu üretici bugün tekrar birleştirilmiş tam boyutlu EBNA-1 proteinleri kullanır. EIA ile ilk enfeksiyondan 7 gün sonra erken bir sürede antikorları gösterebilirken geleneksel IFA klinik belirtilerinden sonra EBNA-1 IgG antikorların 4 ile 6 haftada arasında tespit eder.^{30,31}

2.6.4 IFA

İndirekt Floresan Antikor (IFA) günümüzde altın standart olarak kabul edilen yöntemdir. IFA testinde genellikle burkit lenfomalı hastalardan alınan insan EBV transform B hücre dizileri kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak P3HR-1 hücre dizisi veya IFA'nın ilk substratı olan raji hücre dizisidir. P3HR-1 hücreleri EBNA-1'i üretirken, hücrelerin yaklaşık %5-20'si çekirdek içinde ayrıca VCA üretir. Raji hücre dizisinin EBV spesifik protein modeli özellikle çekirdekteki EBNA-1 ve EBNA-2 üretimi olmak üzere EBNA'larla sınırlıdır. Raji hücre dizisi VCA üretmez. Bir antijen-antikor reaksiyonu olan bu testte, spesifik antikorlar fluorokrom bir boya (FITC, Auramine, Rhodamin, vs) ile boyanmıştır. Bir preparatta homolog antijenin bulunduğu durumlarda üzerine boyalı antikor konursa, boyalı antikorlar antijenle birleşir ve UV-ışınları ile donatılmış mikroskop altında sarı-yeşil parlak bir floresans vererek kolayca fark edilirler. IFA tekniği halen primer EBV enfeksiyonunun tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem EBV-VCA, EBV-EA ve EBNA antijenlerine karşı oluşan antikorların paralel olarak belirlenmesi ile akut ve geçirilmiş enfeksiyonları birbirinden ayırt ederken aynı zamanda reaktivasyon ve kronik enfeksiyonların belirlenmesini sağlamaktadır.²⁷

2.7 EBV Antikorları

2.7.1 Anti VCA antikorlar

VCA virüs içinde bulunan yapısal bir proteindir. VCA IgM ve IgG sıklıkla aynı anda ortaya çıkarlar fakat VCA IgM daha erken tespit edilebildiği için akut enfeksiyon sinyali olduğu bilinmektedir. Anti VCA IgG birçok vakada başvuru anında pik düzeydedir ve bu nedenle 3-4 hafta sonra alınan 2. serum örneğinde antikor düzeyinde beklenen 4 kat artış vakaların ancak %20'sinde saptanabilir. Sıklıkla anti VCA IgG yüksek düzeydeyken daha sonra düzeyi azalarak yaşam boyu saptanabilen titrede kalır. Genellikle VCA IgG aynı anda anti VCA IgM de belirir ve bir kaç haftada azalarak kaybolur. Bazı vakalarda VCA IgM üretilmez veya VCA IgG üretiminden 1-2 hafta sonra üretilir veya kısa bir süre belli olur veya düşük titrede bulunur ve testlerde tespit edilemez. VCA-IgM antikorları pozitifse halen veya çok yakın zamanda EBV enfeksiyonu geçirme olasılığı mevcuttur. Ayrıca mononükleoz bulguları da mevcutsa mononükleoz testi negatif çıksa bile yüksek ihtimalle mononükleoz tanısı konacaktır. VCA-IgG ve EA-D IgG testi de pozitifse EBV enfeksiyonuna halen veya yakın zaman enfeksiyon geçirmiş olma ihtimali çok yüksektir. VCA-IgM negatif, diğer testler ve bir EBNA antikor testi pozitifse önceden bir EBV enfeksiyonu geçirmiş olabilir. Genellikle yükselen VCA-IgG düzeyleri aktif EBV enfeksiyonuna işaret ederken azalan konsantrasyonlar geçmekte olan yakın zamanlı bir enfeksiyonu gösterebilmektedir.²⁸

Akut enfeksiyon sonrası VCA IgM bir kaç ay devam edebilir ve (veya) reaktivasyon esnasında tekrar ortaya çıkar. Vakaların üçte ikisinde ise geçici anti VCA IgA antikorları saptanır.³²

2.7.2 Anti EA antikorlar

Boyanma karakterlerine göre EA'lar diffüz (D) ve sınırlı (R) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Her ikisinde enfekte olan hücrelerde ifade edilmiş ve virüs replikasyonu ile ilgili enzimlerdir. EA'ler yapısal olmayan proteinlerdir. Bunların sentezi viral DNA replikasyonuna bağımlı değildir. Bu antijenlerin ekspresyonu, prodüktif viral replikasyonun başladığını gösterir. Akut enfeksiyonda %70-%85 oranında saptanan anti EA-D antikorları genellikle anti VCA antikorlarından sonra belirir ve semptom başlangıcından sonra 3 aya kadar pozitif kalır. Nadiren 1-2 yıl pozitif kalır. Anti EA-D antikor varlığı ve titresi, klinik hastalığın süresi ve ağırlığı ile ilişkilidir. Anti EA-R antikorları genellikle uzamış veya atipik vakalarda ve daha geç olarak çıkar. Yaklaşık 2 yıl sonra kaybolur. Reaktif enfeksiyonda anti EA-D veya R tekrar ortaya çıkarlar. EA (R) IgG iki yaşından küçük çocuklarda hafif enfeksiyon şeklinde, burkitt lenfom hastalarında ve ayrıca daha önce EBV enfeksiyonu geçirmiş kişilerde düşük seviyede bulunur.^{33,34}

2.7.3 Anti EBNA antikorlar

EBNA'nın 6 komponenti vardır. EBNA-1 geni DNA bağlayıcı bir proteini kodlar; bu protein virüsün enfekte hücre içinde replikasyonunda görev alır. Bu gen, latent fazın sürdürülebilmesi için gerekli olduğundan her tip latent fazda bulunmaktadır. EBNA-1, başta Burkitt lenfoma olmak üzere, EBV ile ilişkili malignitelerin viral patogenezinde de görev alır.³²

EM başlangıcından sonraki üç ayda anti EBNA-2 ve 6 antikorları yükselir. Vakaların yaklaşık üçte ikisinde saptanabilen anti EBNA-2 titresi azalırken, anti EBNA-1 antikorları ortaya çıkarak 6-12 ayda pik düzeye ulaşır. Genellikle anti EBNA-1 titresi yaşam boyu saptanabilen düzeyde kalır. Önceden anti VCA antikorları pozitif ve anti EBNA antikorları negatif olan

kimsede EBNA antikörlerinin ortaya çıkışı yeni EBV enfeksiyonunu gösterir buna ek olarak hastaların %5'inde EBV enfeksiyonundan sonra EBNA-1 IgG üretilmez veya saptanabilen düzeyin altında kalır. Ayrıca üretilen bile zamanla kayıp olabilir.^{32,35}

İzole VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG pozitiflikleri veya üçünün birlikte pozitifliği şüpheli olarak kabul edilmektedir. Bu hastalarda klasik EBV serolojisinin yanı sıra VCA IgG avidite ve floresan antikör testleri ile moleküler yöntemlerin bir arada yorumlanması gerekmektedir.³²

Özetlemek gerekirse EBV enfeksiyonunda ilk olarak anti VCA IgM ve IgG, anti EA-D ve heterofil antikörler, daha sonra anti MA ve nötralizan antikörler ve en sonda anti-EBNA antikörleri ortaya çıkarlar. EBV serolojisi için ideal olarak anti VCA IgG, anti EA IgG ve anti EBNA antikörleri ölçülmelidir anti EBNA antikörleri sayesinde primer enfeksiyon 2–3. ayındayken de tanınabilir. Primer enfeksiyon için mutlaka anti VCA IgM bakılması gerekmez. Ayrıca IgM antikoru, serumda romatoid faktör (RF) varlığında yanlış pozitif ve serumun geç alınmasında yanlış negatif sonuç verebilir.^{32,35}

2.8 Moleküler Tanı Yöntemleri

Pek çok farklı metot, teknik ve protokoller EBV DNA ve virüs varlığını tespit etmek için kullanıldılar. Dot blot, PZR ve in situ hibridizasyon hepsi çeşitli materyallere uygulanmıştır, fakat onların yoğunluktaki ve özgüllük farklılıkları laboratuardan laboratuara değişiklik gösterdiği için dikkatle gözlenmesi gereken sonuçlara yol açmıştır. Son çalışmalar, gerçek zamanlı PZR'nin hassas olduğunu ve özellikle immün sistemi baskılanmış olan hastalardaki ve EBV alakalı bozukluklar geliştirenlerdeki enfeksiyon durumunu tanımlamak için çok kullanışlı olduğunu bildirmiştir. Fakat, hala en

iyi materyallerin, ölçme birimleri ya da müdahale gerektiren yada prognozu önceden haber veren sayısal seviyelerin kullanımına ilişkin bir fikir bilgisi yoktur.^{36,37}

2.8.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu sadece birkaç saat içinde milyarlarca katmanlı DNA'nın belirli bir bölgesini kopya etmek ya da amplifikasyon için kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. Bu amplifikasyon ilk katmanı küçük nükleotidlerden oluşan yapılardır ve DNA bölgesinin yanında olur. PZR, teşhis ve araştırma laboratuvarlarında yeterince test etmek, analiz etmek ya da işlenmiş olmak için yeterli miktarda DNA üretmek için kullanılmaktadır. Sunduğu aşırı hassasiyet sebebiyle, PZR teşhis mikrobiyolojisinde hızla standart bir metot olmuştur. Son zamanlarda kullanılan kitler ve çeşitli cihaz platformu reaksiyona hız, esneklik ve sadelik eklemiştir.^{38,39}

PZR'yi pratik bir araştırma ve tanı aracı yapmaktan sorumlu iki eski termal vardır termostabil DNA polimerazı ve termal dolaşımılığıdır. PZR ilk defa ısıya dayanıksız DNA polimeraz kullanılırken uygulandı. Her devir sonrasında yok edilen enzimin bu manuel yenilenmesi gerekmektedir. Sabit ısılı DNA polimeraz *Thermus aquaticus* adlı ısının 90⁰C aştığı kaynaklarda yaşayan bakteriden yalıtılmıştır. Taq DNA polimeraz olarak adlandırılan bu enzim amplifikasyonun pek çok devri esnasında tekrar ısıtılmaya rağmen aktif kalmıştır.²⁷

DNA polimerazına ek olarak PZR reaksiyonunun gerekli komponentleri, oligonükleotid primerleri, deoksinükleotid trifosfatlar (dNTPs), kalıp ve hedef DNA ve baffer (genellikle Tris) ve magnezyum klorid gibi iki değerli bir katyon içermektedir. Primerler genellikle 20-25 taban

uzunluğunda oligonükleotitlerdir. Onlar hedefin özel sırasını tanımak ve amplifikasyon bölgeyi tanımlamak için dizayn edilmişlerdir.²⁹

Primerlerin uzunluğu ve sekansı onun erime ve sertleşme derecesine karar verir. Hedef DNA'ya bir kez tav verildiğinde, primerler bir çift zincirli DNA kalıbı gerek duyan DNA polimeraz için bağlayıcı bir alan yaratmaktadır. Bu kısa çift zincirli primer bölümü DNA replikasyonun ya da amplifikasyonun temelidir. Taq DNA polimerazı yeni DNA zinciri sentezi ya da genişletmesinden sorumlu enzimdir.²⁹

DNA amplifikasyon teknolojileri direk virüs ölçümünde ve klinik laboratuvarlarda virüs ilişkili hastalıkların teşhisinde ve gözlemlenmesinde daha geniş kullanımlar kazanıyor.⁴⁰ PZR'nin EBV enfeksiyonun tespit ve izlenmesinde kullanımı pek çok araştırmada rapor edilmiştir. En iyi denetimler primer ve prop farklı sekanslar ile yüksek korunmuş open reading frames (ORFs) hedefi kullanarak çok az ya da hiç yanlış olmayan sonuçlar vermiştir. Yaklaşımlar nükleik asit için çok hafif farklı kaynaklar ve işleme teknikleri kullanmaktadır ve farklı miktar ölçme standartlarını görevlendirmektedir. En yüksek hassasiyet için, en iyisi kan örneklerini ya da DNA virüslerinin kaynağı olan periferal kan mononükleer hücreleri kullanmak, çünkü virüs hemen hemen her zaman hücreyle ilişkilidir ve (plasma ya da omurilik sıvısı gibi) hücrenin olmadığı yerlerde nadiren kıyaslanabilir seviyelerde bulunmaktadır.⁴¹

2.8.2 İn Situ Teknikler

İn situ teknikleri öncelikle lezyon için hücrelerde EBV bulunup bulunmadığına karar vermek için doku biyopsisi kullanılmaktadır. İki in situ tekniği kullanılmaktadır, birincisi EBV özellikli DNA'yı kullanarak DNA'nın

genomik varlığını tespit etmek ve EBER RNA'yı tespit etmek için oligonükleotid proplarını kullanmaktadır.⁴¹

İkincisi daha çok genel olarak kullanılan bir tekniktir ve prob araçları bazı kaynaklardan temin edilebilir. Onlar EBV genomunun en aktif şekilde uyarlanmış bölgesinden RNA polimeraz III tarafından yapılmış iki küçük RNA moleküllerinin birinin ya da her ikisinde tespitine güvenir. EBERs için in situ tekniğinin büyük avantajı hücre başına 10^7 kopyanın aşacağı tahmin edilmiş olan RNA birikimidir. Böylece kolaylıkla doku bölümleriyle EBV'nin yeri iki saatten az zamanda tespit edilebilir. Viral varlığı (EBER prop) in situ özellikleri ile enfekte hücrelerde viral gen ekspresyonu virüsün tanısında yardımını çoğaltmak için çalışmalar vardır. Ayrıca ZEBRA (EBV replikasyon aktivatör), EA_D (EA diffüz), EA_R (EA sınırlı) ve M antijen diye adlandırılan litik faz antijenleri için kitler vardır. Bunların herhangi biri litik virüs üretimini tespit etmek için kullanılabilir.⁴¹

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Gazi üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalında gerçekleştirildi. EBV enfeksiyon şüpheli 60 hasta serumu çalışıldı. Spesifik EBV antikorlarında; viral kapsit antikorları IgG (VCA-IgG), VCA IgM, EBNA antikorları ve EA IgG antikorları (Diagnostic Bioprobes Srl-Italy) kiti kullanarak Enzyme Immuno Assay (ELISA) tekniği ile araştırıldı. Daha sonra EBV DNA'sına bakıldı. EBV DNA araştırmasında gerçek zamanlı PZR tekniği, (artus EBV QS-RGQ Kit (24) CE-Qiagen-Almanya) kiti kullanılmıştır.

3.1 Serolojik Tanı

ELİSA testi için ticari kitin sağladıkları (96 test için)

1. Mikroplate
2. Kalibrasyon Eğrisi
3. serum Kontrol
4. Konsantre Yıkama Buferi
5. Enzim Konjugat
6. Kromojen Substrat
7. Sülfürik Asit
8. Dilüent Örneği

Diğer gereçler:

1. Mikropipet
2. Mikorplate inkübatörü
3. ELISA mikroplate okuyucu (TECAN, Sunrise)
4. ELISA mikroplate yıkayıcı (BioTek)
5. Vorteks

Testin Yapılışı

1. Örnekler 1:101 oranında dilüe edili.
2. Mikrowell tutucusuna gerekli sayılar verildi. A1 ve B1 blank olarak boş bırakıldı
3. Kalibratörler 100 µl ve 100 µl control serum çift bir şekilde kuyucuklara dağıtılır. Daha sonra 100 µl dilüe edilmiş numunelerden tanımlanmış kuyucuklara dağıtıldı.
4. Mikroplate 60 dk +37°C inkübe edildi.
5. Otomatik yıkama ile mikroplate yıkandı.
6. A1 ve B1 kuyucukları hariç her kuyuya 100 µl enzim konjuge eklendi.
7. Mikroplate 60 dk +37°C inkübe edildi.
8. Otomatik yıkama ile mikroplate yıkandı.
9. Blank A1 ve B1 kuyucukları dahil olmak üzere her kuyuya 100 µl kromojen/substrat miski dağıtıldı. Daha sonra mikroplate oda sıcaklığında (18_20 °C) 20 dk inkübe edildi.
10. Enzimatik reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl sülfürik asit eklendi.
11. Mikrowell okuyucu ile 450 nm de okutuldu.

Tablo 1. Seroloji Testin Yapılış Şekli

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S1									
B	BLK	CAL4	S2									
C	CAL1	CAL5	S3									
D	CAL1	CAL5	S4									
E	CAL2	CAL6	S5									
F	CAL2	CAL6	S6									
G	CAL3	CS	S7									
H	CAL3	CS	S8									

3.2 Moleküler Tanı

Gerçek zamanlı PZR için serum örneklerinden EBV DNA izolasyonu (EZ1 Virus Mini Kit v2.0 QIAGEN, Almanya) ile gerçekleştirildi. İzolasyonda (EZ1 qiagen, Almanya) cihazı kullanıldı ayrıca izolasyon sırasında internal control eklendi. Elde edilen DNA örnekleri çalışmaya kadar -20°C'de saklandı. Gerçek zamanlı PZR için (artus EBV QS-RGQ Kit (24) CE-Qiagen-Almanya) kiti ve (Roto GeneQ qiagen, Almanya) cihazı kullanıldı.

PCR testi için ticari kitin sağladıkları:

1. EBV RG Master

2. Standartlar:

EBV RG QS 1 (5×10^4 copies/ μ l)

EBV RG QS 1 (5×10^3 copies/ μ l)

EBV RG QS 1 (5×10^2 copies/ μ l)

EBV RG QS 1 (5×10^1 copies/ μ l)

3. EBV RG Internal control (IC)

4. Distile su

PZR testin yapılışı:

Blok 2-8 °C'ya kadar soğutuldu. Soğutulmuş bloğa 0.2 amplifikasyon tüpleri dizildi ve numaralandırıldı.

Amlifikasyon tüplerine 30 μ l master miks eklendi, standartlar (EBV QS1-4) pozitif kontrol ve distile su negatif kontrol olarak kullanıldı ve bu işlemler hijyenik bir ortamda yapıldı.

Kabinde 30 μ l master içeren tüplere 20 μ l izole edilen DNA örnekleri eklendi ve tüpler Roto Gene Q cihazına yerleştirildi.

4. BULGULAR

Çalışma grubuna dahil olan toplam 60 adet ait serum örneğinin 22'si (%36.7) kadın, 38'i (%63.3) erkek hastaya ait örneklerdi. Serum örneklerinin alındığı hastaların yaşları 0-53 arasındaydı (ortalama yaş 11).

Hasta örneklerin geldiği bölümlerin dağılımı tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Hasta Örneklerin Geldiği Bölümlerin Dağılımı

Bölümler	Hasta örneklerin sayısı	%
Nefroloji	9	15
Genel Çocuk Polikliniği	9	15
Çocuk Hematoloji-Onkoloji	12	20
Çocuk Yoğun Bakım	6	10
Çocuk Gastroloji	12	20
Çocuk Enfeksiyon	3	5
Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi	6	10
Çocuk Nefroloji	3	5
Toplam	60	100

Gerçek zamanlı PZR ile 60 serum örneğinin 17'sinde (%28.33) EBV DNA pozitif olarak bulunurken, 43 örnek (71.67%) EBV DNA negative olarak bulunmuştur.

EBV DNA pozitif örneklerin 11 (% 64.72) erkek ve 6 (%35.28) kadın hastalara ait örneklerdi. EBV DNA pozitif hastaların yaş aralığı 0-30 yaş (Ortalama yaş 7) arasında idi.

EBV DNA pozitif bulunan örneklerin cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımları Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. EBV DNA Pozitif Örneklerin Cinsiyet ve Yaş Gruplarına Göre Dağılımı.

Yaş	Kadın		Erkek		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
0 – 10	5	29.42	10	58.82	15	88.24
10 – 20	0	0.00	1	5.88	1	5.88
20 - 30	1	5.88	0	0.00	1	5.88
Toplam	6	35.3	11	64.7	17	100

Tablo 4. EBV DNA'sı Pozitif Olan Hasta Örneklerinin Geldiği Bölümlerin Dağılımı

Bölümler	Hasta örneklerin sayısı	%
Çocuk Hematoloji,onkoloji	5	29.42
Kemik iliği Transplantasyon Ünitesi	1	5.88
Genel Çocuk Polikliniği	3	17.64
Çocuk Yoğun Bakım	2	11.76
Çocuk Gastroloji	5	29.42
Çocuk Enfeksiyonu	1	5.88
Toplam	17	100

EBV DNA pozitif hasta örneklerinin EBV serolojik profil dağılımları Tablo 5’de belirtilmiştir.

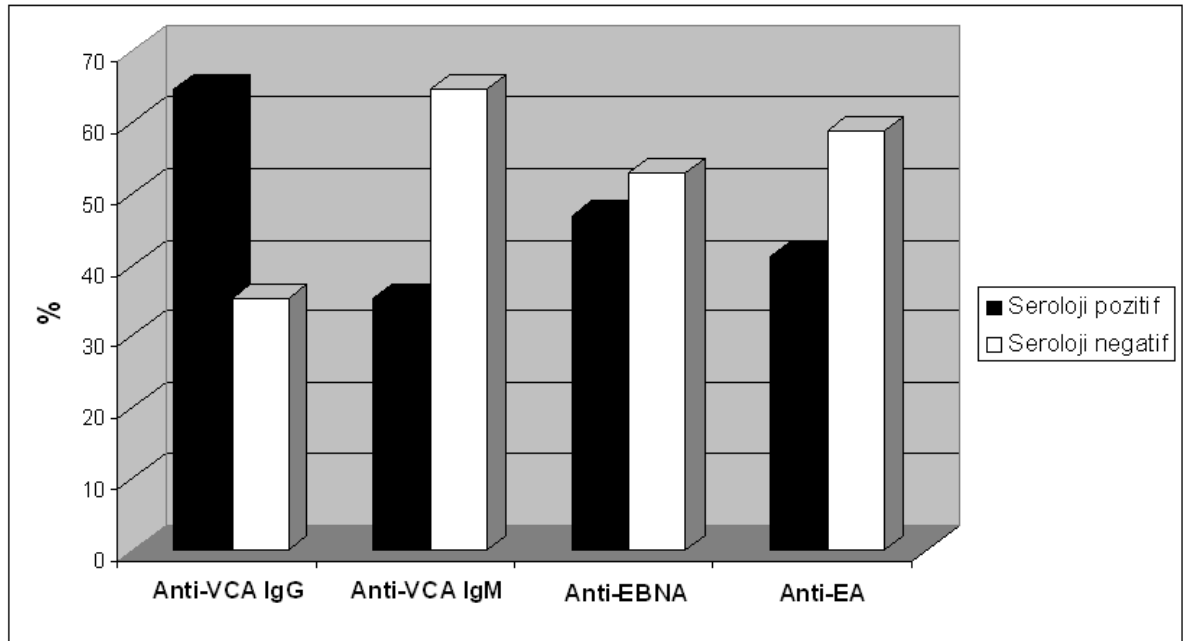
Tablo 5. EBV DNA Pozitif Hasta Örneklerinin Serolojik Dağılımı

EBV DNA (+)	Anti-VCA IgG	Anti-VCA IgM	Anti-EBNA	Anti-EA
1. örnek	+	-	+	+
2. örnek	+	-	+	+
3. örnek	+	-	+	-
4. örnek	+	+	+	+
5. örnek	-	-	-	-
6. örnek	+	-	+	+
7. örnek	-	+	-	+
8. örnek	+	-	+	-
9. örnek	-	-	-	-
10. örnek	+	+	-	-
11. örnek	-	-	-	-
12. örnek	-	-	-	-
13. örnek	+	-	+	-
14. örnek	+	-	+	+
15. örnek	-	+	-	-
16. örnek	+	+	-	+
17. örnek	+	+	-	-

EBV DNA pozitif olarak tespit edilen 17 hasta örneğinin EBV Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA, Anti-EA serolojisi **Şekil 1** ve Tablo 6’de gösterilmiştir.

Tablo 6. EBV DNA Pozitif Hastaların EBV Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA, Anti-EA Serolojisi.

EBV DNA Seroloji (+)	Anti-VCA IgG	Anti-VCA IgM	Anti-EBNA	Anti-EA
Pozitif	11 (%64.7)	6 (%35.3)	8 (%47)	7 (%41.2)
Negatif	6 (%35.3)	11(%64.7)	9 (%53)	10 (%58.8)
Toplam	17	17	17	17



Şekil 1. EBV DNA pozitif hastaların EBV Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA, Anti-EA serolojisi

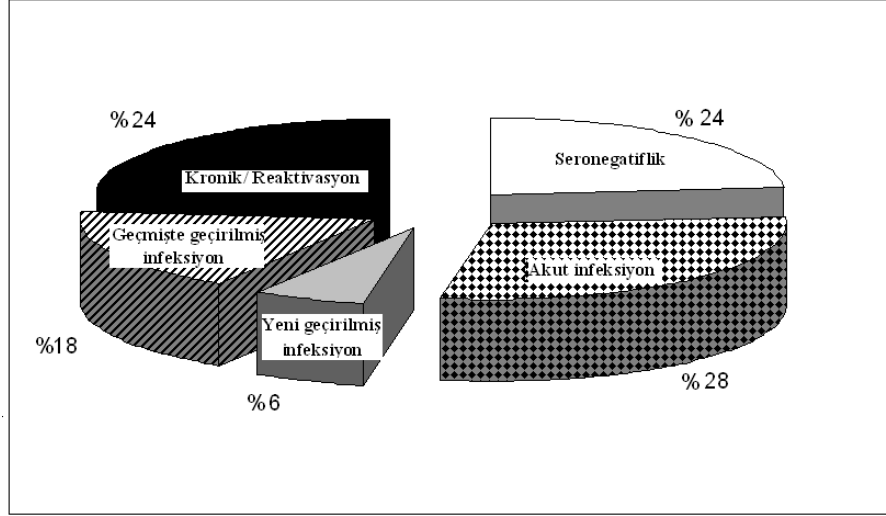
EBV DNA pozitif hastaların EBV serolojik profillerine göre yorumlanan EBV enfeksiyon durumu **Şekil 2** ve Tablo 7’de belirtilmiştir.

Tablo 7. EBV DNA Pozitif Örneklerde Serolojik Profile Göre Epstein-Barr Virus Enfeksiyonunun Tipi

Seroloji	EBV Antikor serolojisi				Örnek sayısı
	VCA IgG	VCA IgM	EBNA	EAlg	
Seronegatiflik	-	-	-	-	4 (%23.5)
Akut enfeksiyon	+,++	+,++	-	+	5 (%29.4)
Yeni geçirilmiş enfeksiyon	++	-,+	-,+	+;++	1 (%5.9)
Geçmişte geçirilmiş enfeksiyon	+	-	+	-	3 (%17.7)
Kronik/Reaktivasyon	+	-	+	-,+	4 (%23.5)
Toplam					17

Tablo 8. Serolojik Profiline Göre EBV DNA'sı Pozitif Örneklerin Geldiği Bölümlerin Dağılımı

	Seronegatiflik	Akut Enfeksiyon	Yeni Geçirilmiş Enfeksiyon	Geçmişte Geçirilmiş Enfeksiyon	Kronik/ Reaktivasyon
Çocuk Hematoloji-onkoloji	3(17.64)				2(11.76)
Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi	1(5.88)				
Genel Çocuk Polikliniği		3(17.64)			
Çocuk Yoğun Bakım		1(5.88)			1(5.88)
Çocuk Gastroloji		1(5.88)		3(17.64)	1(5.88)
Çocuk Enfeksiyonu			1(5.88)		



Şekil 2. EBV DNA Pozitif Örneklerde Serolojik Profile Göre Epstein-Barr Virus Enfeksiyonunun Tipi

Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile EBV DNA'sı negatif bulunan 43 örneğin 16'sı (%37.2) kadın, 27'si (%62.8) erkek hastalara ait örneklerdi. EBV DNA negatif olan hastaların yaş aralığı ortalaması 13 yıl olarak belirlenmiştir. EBV DNA negatif bulunan örneklerin cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımları Tablo 9'de gösterilmiştir.

Tablo 9. EBV DNA Negatif Örneklerin Cinsiyet Ve Yaş Gruplarına Göre Dağılımı

Yaş	Kadın		Erkek		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
0 – 2	6	13.95	4	9.30	10	23.25
2 -10	3	6.98	9	20.93	12	27.91
10 -20	6	13.95	9	20.93	15	34.88
20 -30	0	0.00	0	0.00	0	0
30 -40	1	2.32	2	4.66	3	6.98
40 üstü	0	0.00	3	6.98	3	6.98
Toplam	16	37.2	27	62.8	43	100

EBV DNA negatif hasta örneklerinin EBV serolojik profil dağılımları Tablo 10'da belirtilmiştir.

Tablo 10. EBV DNA Negatif Hasta Örneklerinin Serolojik Dağılımı

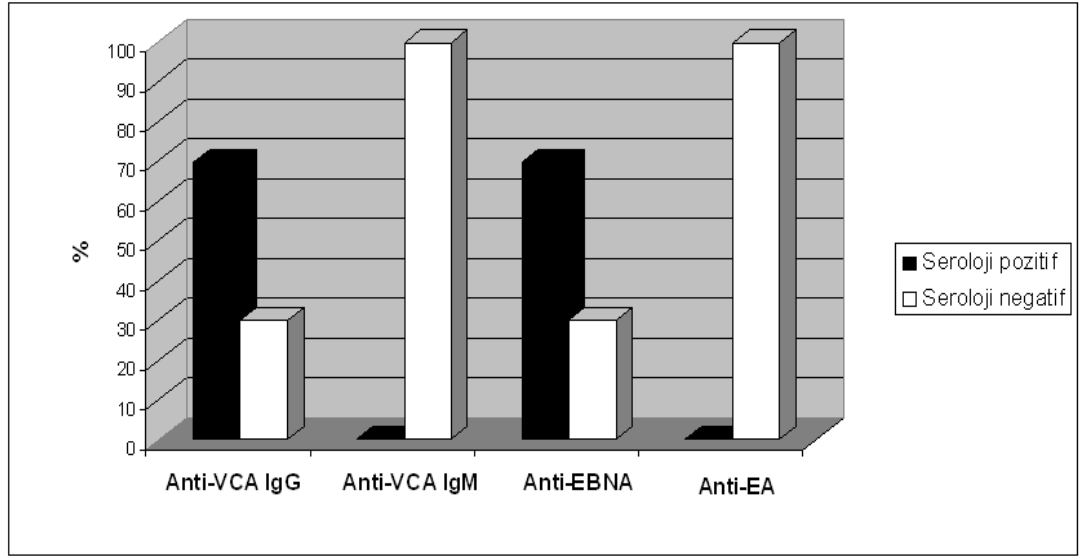
EBV DNA (-)	Anti-VCA IgG	Anti-VCA IgM	Anti-EBNA	Anti-EA
1. örnek	+	-	+	-
2. örnek	+	-	+	-
3. örnek	+	-	+	-
4. örnek	+	-	+	-
5. örnek	+	-	+	-
6. örnek	-	-	-	-
7. örnek	+	-	+	-
8. örnek	+	-	+	-
9. örnek	+	-	+	-
10. örnek	-	-	-	-
11. örnek	-	-	-	-
12. örnek	+	-	+	-
13. örnek	+	-	+	-
14. örnek	+	-	+	-
15. örnek	+	-	+	-
16. örnek	-	-	-	-
17. örnek	+	-	+	-
18. örnek	+	-	+	-
19. örnek	+	-	+	-
20. örnek	+	-	+	-
21. örnek	+	-	+	-
22. örnek	+	-	+	-

23. örnek	-	-	-	-
24. örnek	-	-	-	-
25. örnek	-	-	-	-
26. örnek	+	-	+	-
27. örnek	+	-	+	-
28. örnek	-	-	-	-
29. örnek	-	-	-	-
30. örnek	+	-	+	-
31. örnek	+	-	+	-
32. örnek	+	-	+	-
33. örnek	-	-	-	-
34. örnek	+	-	+	-
35. örnek	+	-	+	-
36. örnek	-	-	-	-
37. örnek	-	-	-	-
38. örnek	+	-	+	-
39. örnek	+	-	+	-
40. örnek	+	-	+	-
41. örnek	+	-	+	-
42. örnek	+	-	+	-
43. örnek	-	-	-	-

EBV DNA negatif olarak tespit edilen 43 hasta örneğinin EBV Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA, Anti-EA serolojisi **Şekil 3** ve Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. EBV DNA Negatif Hastaların EBV Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA, Anti-EA Serolojisi

EBV DNA	Seroloji	Anti-VCA IgG	Anti-VCA IgM	Anti-EBNA	Anti-EA
(-)	Pozitif	30 (69.77%)	0 (0.00%)	30 (69.77%)	0 (0.00%)
	Negatif	13 (30.23%)	43(100%)	13(30.23%)	43(100%)
	Toplam	43	43	43	43

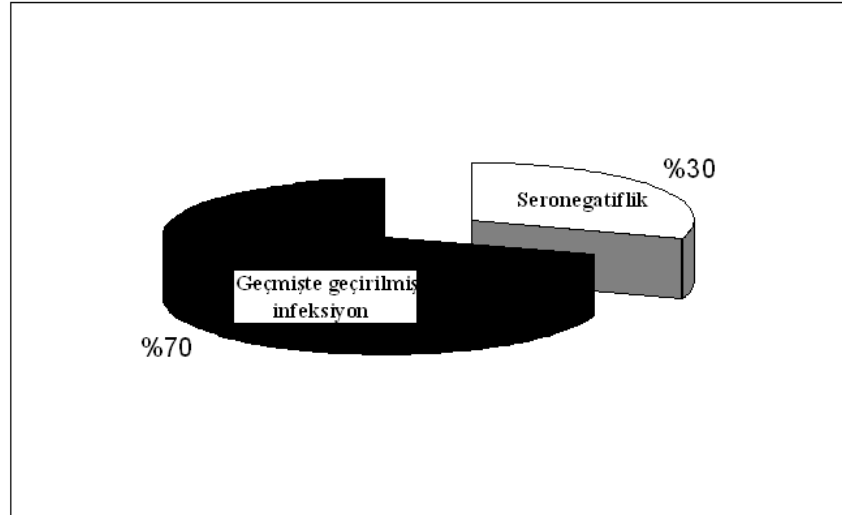


Şekil 3. EBV DNA Negatif Hastaların EBV Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA, Anti-EA Serolojisi

EBV DNA negative hastaların EBV serolojik profillerine göre yorumlanan EBV enfeksiyon durumu **Şekil 4** ve Tablo 12'de belirtilmiştir.

Tablo 12. EBV DNA Negatif Örneklerde Serolojik Profile Göre Epstein-Barr Virus Enfeksiyonunun Şekli

Seroloji	EBV Antikor serolojisi				Örnek sayısı
	VCA IgG	VCA IgM	EBNA	EAlg	
Seronegatiflik	-	-	-	-	13 (30.23%)
Akut enfeksiyon	+,++	+,++	-	+	0 (0.00%)
Yeni geçirilmiş enfeksiyon	++	-,+	-,+	+;++	0 (0.00%)
Geçmişte geçirilmiş enfeksiyon	+	-	+	-	30 (69.77%)
Kronik/Reaktivasyon	+	-	+	-,+	0(0.00%)
Toplam					43



Şekil 4. EBV DNA Negatif Örneklerde Serolojik Profile Göre Epstein-Barr Virus Enfeksiyonunun Pasta Dilimi Sekli

5. TARTIŞMA

Epstein bar virüsü (EBV) herpes virüs 4 yaygındır ve dünya yetişkinlerin yüzde 90'ı anti_EBV antikörlerine sahiptir. Akut enfeksiyonu genelde immün sistemi sağlam çocuklarda belirti vermez ve %30 ile %50 arasında immün sistemi sağlam ergen ve yetişkinlerde enfeksiyöz mononükleoz olarak kendini gösterir. Özellikle immün sistemi baskılanmış olan hastalarda EBV çeşitli lenfoproliferatif bozukluklar ve bazı neoplastik hastalıklar ile ilişkilidir, Burkitt lenfoma ve nazofarengeal karsinoma dahildir. Diğer herpes virüs grubu gibi EBV üretken litik ve latent faza sahiptir. B lenfositleri viral zarfı gp350/220 CD21 hücre reseptörüne bağlandıktan sonra enfekte olur. Litik dönüşüm süresince ani erken antijen (IEA) ve erken antijen(EA) gruplarına ait düzenleyici proteinler viral DNA (EBV-DNA), virion yapısal proteinleri (Viral kapsid antijen, VCA) (membran) proteinlerine (MA) üretimini sağlamak için sentezlenir⁴². Litik dönem virüse ilişkin parçacıkların üremesini ve enfekte hücrelerin yok olmasına yol açar, ancak EBV ayrıca seçilmiş birkaç virüsle ilgili genlerin ifadesini takip eden ekstrakromozomal nükleik asitleri çoğaltarak virüs üremesini tamamlamadan konak hücrelerde devam edebilir. Bu genlerin ifadesi B hücrelerinin ölümsüzleşmesine ve onların çoğalma patlamalarına yol açar. İmmün sistemi yeterli olan hastalarda NK hücreleri ve sitotoksik T lenfositleri, özellikle litik döngünün antijenlerine karşı yönlendirilen CD8+ T ve Birincil enfeksiyon sırasında dönüştürülmüş hücrelerin büyümesini kontrol eder.⁴³ Bu hücreler ayrıca, latent faz antijenlerine karşı da yönlendirilir. Ancak yanıt virüsün tamamen ortadan kalkması için yetersiz kalabilir ve virüs virion üretiminin düşük veya aralıklı düzeyleri ile yaşam boyunca devam edebilir. İyileşmeden sonra epizomal formunda olan neredeyse 10.000- 100.000 hafıza hücresi içinde birinin EBV DNA içerdiği tahmin ediliyor.⁴⁴ Latent faz boyunca EBV nükleer antijenler (EBNA) ve üç latent membran proteinleri (LMPs) enfekte hücrelerde ifade

edilir. EBNA'lar en az altı proteinin bir karışımını yansıtır (EBNA1-6). EBNA1, enfekte hücrelerde EBV DNA'nın epizomal durumunu korumakla sorumludur. EBNA2, B lenfositlerin ölümsüzlüğüne dahil oldukları görünmektedir.⁴⁵ LMPIler, (LMP1, LMP2A ve LMP2B) ayrıca ölümsüzleştirme sürecinde etkili olabilir. Onkoprotein LMP1 enfekte B hücrelerinin gelişmesini değiştirerek çoğu etkilerden sorumlu görünür. EBNA3 CD8 lenfositlerin hedefi olduğu için gizli hücreler immün sistemi sağlam hastalarda normal olarak ortadan kaldırılabılır. Oysa dönüştürülmüş hücreler çoğalabilir ve bağışıklı sistemi baskın hastalarda çeşitli lenfoproliferatif hastalıklara neden olabilir.⁴⁶

Litik döngüsünün reaktivasyonu muhtemelen doğal antijenleri ile uyarılmış, lenfoid dokular içinde enfekt B hafıza hücrelerinin yeniden dönüşümü, plazma hücrelerinde farklılaşması nedeniyle latent faz süresince ortaya çıkabilir. replikasyon başlangıcı BZLF1 geninin başlangıç ifadesiyle ve Z Epstein barr replikasyon aktivatör proteinin üretimiyle oluşturulur.⁴⁷

Çeşitli çalışmalar bu reaktivasyonu organ naklinin kabul edilememesi olaylarıyla, organ naklinden sonra lenfoproliferatif hastalıklarla ve çok yönlü doku sertleşmesiyle ilişkilendirdi. Humoral yanıtı hem litik döngü hem de latent faz antijenlerine karşı antikoları içerir. Buna rağmen sadece birkaçı geniş çapta çalışılmıştır ve tanı amaçlı olarak kullanılmıştır. EA karşıtı antikolar (EA IgG) iki model yansıtırlar: difüz (D) ve sınırlı (R). Bunlar aslında hücre içindeki dağılımları ve denatürasyon farklılığı temelinde immunofloresan bakımından gözlemlenmiştir. Her zaman göstermemesine rağmen, EA (D) IgG ilk 3-4 hafta boyunca artar ve 3-4 ay sonra saptanamaz (akut enfeksiyonu olan hastaların yaklaşık %85'i semptomların başlangıcından 3 aya kadar pozitif olur) buna rağmen bazı durumlarda başlangıç enfeksiyonundan yıllar sonra bile saptanabilir.⁴⁸ EBV ile daha önce enfekte olmuş sağlık bireylerin %20- ve %30 unda EA (D)IgG bulunur.²⁸ EA

(R) IgG seviyeleri iki yılın üstünde yüksek titreler barındırabilir ve uzun süren hastalık durumunda EA (D) IgG'nin ortadan kalkmasından sonra belirlenebilir. Ayrıca VCA ve EA IgA'ların yüksek titreleri olan nazofarengeal karsinoma hastalarında reaktivasyon süresinde yüksek titreler görülebilir.⁴⁹

Üç antikor kullanılarak (VCA IgG, VCA IgM ve EBNA- 1 IgG), bağışıklık sistemi zayıf olmayan hastalarda akut ve geçmiş enfeksiyonu ayırmak genellikle kolaydır.⁵⁰ VCA IgG ve VCA IgM nin varlığında EBNA1 IgG yokluğu akut enfeksiyonu işaret eder, ve VCA IgG ve EBNA1 IgG nin bulunduğu VCA IgM eksikliğinde geçmiş enfeksiyonu gösterir. Buna rağmen bazı durumlarda VCA IgG nin varlığı VCA IgM ve EBNA 1 IgG nin olmadığı, eş zamanlı olarak VCA IgG, VCA IgM ve EBNA-1 IgG nin mevcut olması ve EBNA-1 IgG nin bulunması, VCA IgG ve IgM yokluğunda şüpheleri tanı ortaya çıkabilir. Böyle durumlarda, antikor profilindeki herhangi bir değişimini değerlendirmek için hastayı takip ve diğer laboratuvar testleri uygulamak yararlıdır.⁵¹

Bağışıklık sistemi zayıf hastalarda antikorların belirlenmesi, bağışıklık sistemlerinin işlev yapmaması ve antikor türü ve onların bakımının zaman içerisinde hastalığın dinamiklerine bağlı olarak farklılık gösterebilmesi ve böylece atipik profil görünümüne yol açtığı gerçeği nedeniyle daha az yararlıdır. Genellikle VCA IgG ve EA (D) veya EA (R) IgG titrelerinin EBNA 1 IgG titresinin azalışı ya da kaybolmasıyla bir artışı görülür. Farklı hastalarda gözlemlenen değişkenlikler, moleküler biyoloji yöntemleriyle EBV DNA'nın incelenmesinin EBV ile bağlantılı lenfoproliferatif bozuklukların gelişme riski olan hastalarda teşhis ve takip için yararlı olduğunu göstermiştir.⁵²

EBV DNA PBMC'lerde olduğu gibi serum ya da plazma içinde belirlenebilir. Başlangıç enfeksiyonunda olan hastalarda belirtinin kendini göstermesinden on dört gün içinde sıklıkla bütün kanda teşhis edilir

(PBMÇ'ler, plazma ve serum). Başışıklık cevabının başlamasından sonra virüs yükü PBMÇlerde yavaşça, plazma ve serumda hızlıca azalmaya başlar ve 3-4 hafta sonra belirlenemez hale gelir. Diğer yandan EBV'li hafıza hücreleri kanda uzun süre gizli kalabilir. Yine de akılda tutulmalıdır ki kinetik kişisel farklılıklardan dolayı virüs yükü başlangıç düşüşünden sonra artabilir ve bazı durumlarda istikrarlı bir şekilde düşük seviyeye ulaşmadan önce bir yıl ya da daha fazla sürebilir. Bu nedenle plazma veya serumda EBV DNA bulunuşu başlangıç enfeksiyonu ya da reaksiyon işareti olarak düşünülür ve virüs yükü hastalık şiddetiyle ilişkilendirir. EBV DNA saptanması hastalığın erken dönemlerinde serolojiden daha duyarlı olabilir ve bazı çalışmalar EBV DNA, VCA IgG aviditesine göre klinik akut enfeksiyonla daha fazla ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır.⁵³ Yine de akut enfeksiyonu olan başışıklı sistemi sağlam hastalarda genellikle seroloji, güçlü klinik enfeksiyon şüphelerinde olumsuz ya da şüpheli seroloji buluşlar haricinde yeterlidir ve moleküler teşhis gerekmediği bilinmektedir.⁵⁴ Yanlış negatif antikörlerin doğal olarak kayıp olmsından ve transplantasyon hastalarda yetersiz yanıt olduğundan kaynaklanır yanlış pozitifse autoantibody, serum faktörleri ve diğer enfeksiyonlarla cross reaksiyon sonucu ortaya çıkar.⁵⁴

EBV'ne ait protein yapısındaki bazı bileşenlerin normal insandaki protein yapılarla benzerlik gösterdiği saptanmış olup bundan dolayı yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda bu çapraz reaksiyona bağlı olarak pozitif sonuçlar elde edildiği görüşü, moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda desteklenmiştir.⁵⁵

İmmünkompetan ve immünsüpresif kişilerde EBV enfeksiyonlarının tanısında kullanılacak yöntemlerin seçimi önem taşır. Özellikle immünsüpresif hastalarda terapötik müdahale zamanı kritik bir öneme sahiptir. Bu nedenle EBV replikasyonunu erken saptayan, pozitif

prediktif değeri yüksek olan ve tedavinin izlenmesine olanak sağlayan tanı yöntemleri seçilmelidir. PTLH ile ilişkili EBV'nin tanısında, tedavisinde ve önlenmesinde moleküler yöntemlerinden yararlanmaktadır. Viral DNA klinik bulgular oluşmadan aylar önce saptanabilmekte Bununla birlikte bazı transplant hastalarında yüksek EBV-DNA yüküne rağmen aylar veya yıllarca PTLH gelişmediği bildirilmiştir. Bununla birlikte bazı transplant hastalarında yüksek EBV-DNA yüküne rağmen aylar veya yıllarca PTLH gelişmediği bildirilmiştir.⁸

PZR, EBV enfeksiyonunun ilk günlerinde serolojiden daha duyarlı olduğunu ve serolojik olarak, özellikle çocuklarda antikorların bir kaç gün boyunca tespit edilmediği veya yanlış negatif sonuç olasılığı dikkate alınması gerekmektedir.⁸

EBV ve CMV DNA'sının araştırılması hastalığın hangi evrede olduğunu tespitinde ve tedavinin planlamasında faydalı olduğu düşünülmektedir.⁵⁶

Çocukluk çağı lenfomalarının % 40'ını HL oluşturmakta iken %60'ını NHL'ler oluşturmaktadır. NHL'lar, 15 yaşın altındaki çocuklarda HL'den 1,5 kat daha sık görülürler. Erken çocukluk yaşı ve geç erişkin olmak üzere iki sıklık göstermekte olup, hayat boyu görülme sıklığı gittikçe artmaktadır.⁵⁷

Michalek ve ark. çocuk onkoloji hastalarında EBV enfeksiyonlarının tanısında seroloji ve DNA analizinin birlikte değerlendirilmesi gerektiğini tek başına serolojik testlerin tanıda yeterli olmadığını vurgulamışlardır.⁵⁸

Çalışmamıza dahil edilen 60 hastaya ait serum örneğinin gerçek zamanlı PZR ile pozitif negatifliği araştırıldı ve 60 örnekten 17' sinde (%28.33) pozitif sonuca ulaşıldı. Hastaların serolojisine (Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA, Anti-EA) ELİSA ile bakıldı. EBV-DNA pozitif bulunan hastalarda seroloji sonuçları (Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA, Anti-EA) (%64.4, %35.5, %47, %41.2) sırasıyla pozitif olarak bulundu. EBV-DNA'sı negatif bulunan 43 hastanın seroloji sonuçlarıysa Anti-VCA IgG ve Anti-EBNA %69.77 pozitif olarak bulunurken, Anti-VCA IgM ve Anti-EA ise örneklerinin tümünde negatif olarak saptandı.

Ersoy ve ark. inflamatuvar romatizmal hastalıklarla ilgili yaptıkları çalışmada EBV-VCA pozitifliği VCA IgG %93, VCA IgM %8.7. Bizim çalışmamızda ise 60 hastanın Anti-VCA IgG ve Anti-VCA IgM pozitifliği sırasıyla %63.8, %10 oranında Anti-VCA IgM ile uyumluluk göstermektedir.⁵⁵

Thomas ve ark. yaptıkları çalışmada multiplex ve ELİSA yöntemleri değerlendirilmiştir. ELİSA ile Anti-VCA IgG %83, Anti-VCA IgM %20, Anti-EBNA %62.7, Anti-EA %43 pozitif olarak tespit edilmiştir.²

Feyzioğlu ve ark. EBV enfeksiyonunun serolojik tanısı ve birden fazla antikor yanıtının değerlendirilip yorumlanmasıyla yaptıkları çalışmada ELİSA ile Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA sonuçları %59, %11, %47 pozitif olarak tespit edilmiştir.⁵

Altuglu ve arkadaşlarının 2007 yılında üç farklı yöntemin değerlendirmesiyle yaptıkları çalışmada referans metodu olarak belirlenen IFA sonuçları Anti-VCA IgG %82.2, Anti-VCA IgM %15.5, Anti-EBNA %62.2, Anti-EA %20. Bizim yaptığımız çalışmada Anti-VCA IgG %63.8, Anti-VCA IgM %10, Anti-EBNA %63.3, Anti-EA %11.6 oranında pozitif olarak bulunmuştur.⁵⁹

Tablo 13. Yapılan Çeşitli Çalışmalardaki Anti-VCA IgG, Anti-VCA IgM, Anti-EBNA ve Anti-EA Değerlerin Karşılaştırılması.

	Anti-VCA IgG %	Anti-VCA IgM %	Anti-EBNA %	Anti-EA %
Ersoy ve ark.	93	8.2	–	–
Thomas ve ark.	83	20	62.7	43
Feyzioglu ve ark.	59	11	47	–
Aluglu ve ark.(IFA)	82.2	15.5	62.2	20
Bizim çalışmamız	63.8	10	63.3	11.6

Yaptığımız çalışmada Anti-VCA IgG pozitiflik oranı Feyzi ve ark. yaptıkları çalışmaya göre uyumlu olsa da diğer çalışmalara göre düşük oranda olduğu görülmektedir. Anti-VCA IgM ve Anti-EBNA antikorları çalışmalara göre yüksek uyumluluk sergiledi. Anti-EA antikorları reaktivasyon olgularında mutlak olmayan bir fikir veren diğer çalışmalara göre bu antikorun oranı oldukça düşük olduğu görülmektedir.

Inci ve ark. kemik iliği transplantasyon hastalarında yaptıkları çalışmada EBV seropozitifliği 128 hastadan 126(%98.4)'sında iken EBV-DNA pozitifliği sadece 17(%13.3) hastada tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızdaysa seropozitiflik düşük orandayken (%73) EBV-DNA pozitifliği (%28.3) oranında tespit edildi ve Inci ve ark.yaptıkları çalışmaya göre uyumsuzluk sergiledi.⁶⁰

Zeytinoğlu ve ark. yaptıkları çalışmada, PTLD hasta gruplarında indirek bir tanı yöntemi olan serolojinin EBV enfeksiyonun tanısında yararlı olmadığını ayrıca antikor testlerinin HIV/AIDS'li olgularda görülen lenfoproliferatif hastalıkların tanısında da yeri kısıtlı olduğunu ve moleküler

yöntemlerle viral nükleik asitlerin gösterilmesi daha anlamlı olduğunu desteklemektedir.⁶¹

Sousa ve ark. 2011 yılında Portekiz'de sağlıklı bireylerde EBV frekansını araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada EBV-DNA pozitifliği 508 kişiden 189(%37.2)'unda tespit edilmiştir. Çalışmamızda seropozitiflik diğer çalışmalara göre düşük oranda bulunsa da EBV-DNA pozitiflik oranı uyumluluk göstermektedir.⁶²

Karadağ ve ark. Epstein-Barr Virus (EBV) enfeksiyonlarının serolojik tanısında laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan Paul-Bunnell ve immünblot test sonuçlarını eş zamanlı karşılaştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada immünblot ile akut enfeksiyon %3.5, Seronegatif %12.5, Geçirilmiş enfeksiyon %64.5, Reaktivasyon %19.5 oranları saptanmıştır.²

Svahn ve ark İsveç'te yaptıkları çalışmada üç ELİSA ticari kiti ile iki lateks aglütinasyon metotlarını incelediler ve referans metodu olarak IFA kullanıldı. IFA sonuçlarına göre %18.8 akut enfeksiyon, %16.75 seronegatif, %60.9 geçirilmiş enfeksiyon ve %3.55 atipik reaksiyon sergilemiştir.³¹

Altuglu ve ark. yaptıkları çalışmada IFA yöntemiyle %13.33 akut enfeksiyon, %17.78 seronegatif, %57.78 geçirilmiş enfeksiyon veya reaktivasyon, %11.11 atipik reaksiyon sergilemiştir.⁵⁹

Yaptığımız çalışmada akut enfeksiyon %8.3, seronegatiflik %28.3, yeni ve geçmişte geçirilmiş enfeksiyon %57 ve Reaktivasyon %28.3 oranında tespit edildi. Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki geçirilmiş enfeksiyon oranına paralel iken, diğer sonuçlar değişkenlik göstermektedir.

Geçgel ve ark. yaptıkları çalışmada gerçek zamanlı PZR ile Renal transplant grubundaki hastaların 3 (%4.8)'ünde EBV-DNA pozitif çocuk

onkoloji grubundaki hastaların 3 (%8.1)'unde EBV-DNA pozitif bulmuşlar ve gerçek zamanlı PZR ile EBV-DNA araştırılmasının tanı, takip ve prognozu değerlendirmede yararlı olabileceği; immünsüpresif hastalarda EBV reaktivasyonunu saptamak için serolojik sonuçların avidite ve PZR testleri ile desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür.⁸

Gartzonik ve ark. yaptıkları çalışmada, Gerçek zamanlı PZR, primer EBV tanısı için erken hastalık evrelerinde olan özellikle serolojik EBV enfeksiyonu belirsiz durumlarda yararlı bir ek tanı yöntemi ve güvenilir bir araç olduğunu belirtmişlerdir.⁶³

NPC ile serumda bulunan EBV DNA'sının yükü ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Buna ek olarak hastaların radyoterapisi tamamlanmasından sonra serumda EBV DNA'sının devam etmesi bilinmektedir. Yong shao ve ark. yaptıkları çalışmada EBV DNA tespiti, NPC hastaların tanı, evrelendirme, ve izlemesinde serum IgA/IgM titrelerinden daha duyarlı ve spesifik olduğunu ortaya koymuşlardır.⁶⁴

Çalışmamızda EBV DNA'sı pozitif bulunan ve seronegatif olarak bilinen 4hasta öneğinin 3'ü çocuk hematoloji-onkoloji bölümünden 1'si kemik iliği transplantasyon ünitesinden gelen hastalardır. Bu sonuçlara göre serolojik yönteminin anahtar tanı yöntemi olmadığını ve moleküler yöntemlerle desteklenmesi düşünülmektedir.

6. SONUÇ

EBV DNA'nın özellikle antikor yanıtının yeterli olmadığı veya yanlış çıkabileceği immün yetmezlikli hastaların tanısında ve EBV enfeksiyonunun evrelendirmesinde önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle, EBV enfeksiyonu düşünülen hastalarda tanıda seroloji yanında moleküler yöntemlerin de kullanılması uygun olacaktır. Bu durum özellikle immün yetmezlikli hastalarda tanının geç konulması sonucu ortaya çıkabilecek komplikasyonların önlenmesi açısından da önemli olacaktır.

7. ÖZET

Epstein Barr Virüs enfeksiyonunun tanısında moleküler ve serolojik göstergelerin yeri

Epstein-Barr viruse (EBV), başta enfeksiyöz mononükleoz (EM) olmak üzere Burkitt lenfoma ve nazofarengeal karsinoma gibi malignitelerin ayrıca transplantasyon sonrası immünsüpresif konakta ortaya çıkan posttransplant lenfoproliferatif hastalığın (PTLH) etiolojisinden sorumlu, tüm dünyada erişkinlerin %90'ını enfekte eden insan herpesvirüs ailesinin bir üyesidir. Yaptığımız çalışmada 60 hasta serum örneğinin spesifik EBV antikorlarına VCA-IgG, VCA IgM, EBNA antikorları ve EA IgG antikorları (Diagnostic Bioprobes Srl-Italy) kiti kullanarak ELISA tekniği, EBV DNA'sına gerçek zamanlı PZR tekniği ile (artus EBV QS-RGQ Kit (24) CE-Qiagen-Almanya) kiti kullanılarak bakıldı. Çalışmamızda EBV DNA'sı pozitif bulunan 17(%28.33) hastadan 4(%23.5) hasta öneğinin 3(%17.64)'ü çocuk hematoloji-onkoloji bölümünden 1(%5.88)'si kemik iliği transplantasyon ünitesinden gelen hastalar seronegatif olarak saptanmıştır. Çalışmamızda serolojik olarak EBV enfeksiyonu düşünülen hastalarda gerçek zamanlı PZR yönteminin EBV enfeksiyonunun tanı ve evrelendirmedeki öneminin belirlenmesini amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Epstein Barr Virüs, moleküler, serolojik, ELISA, PZR

8. SUMMARY

The location of the molecular and serological markers in diagnosis of the Epstein Barr Virus infection

Epstein-Barr viruse (EBV) is a member of human herpesvirus family seen in particularly infectious mononucleosis (EM), including malignancies such as Burkitt 's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma, as well as responsible for the etiology of posttransplant lymphoproliferative disease emerging in immunosuppressive host (PTLH) after transplantation and that infects more than 90% of the adults. In our study, serum samples of 60 patients have been observed for their specific EBV antibodies of VCA-IgG, VCA-IgM, EBNA antibody and EA IgG by using (Diagnostic Bioprobes Srl-Italy) kit with the ELISA technique, EBV DNA has been observed by real-time PCR technique by using (artus EBV Kit QS-RGQ (24) CE-Qiagen, Germany) kit. In our study, of 17 patients which were found positive in EBV DNA (%28.33), 4(%23.5) of patient samples, three samples (17.64%) were children's hematology-oncology section, 1 (5.88%) was found to be seronegative patients from the bone marrow transplant unit. In our study, the purpose is to determine the importance of PZR real-time method fort he diagnosis and staging in patients with suspected serological EBV infection.

Keywords: Epstein Barr Virus, molecular, serological, ELISA, PCR

9. KAYNAKLAR

1. Klutts JS, Liao RS, Dunne WM, Jr., and Gronowski AM. Evaluation Of A Multiplex Bead Assay For Assesment of Epstein-Barr Virus Immunologic Status. J. Clin. Microbiol 2004; p: 4996-5000.
2. Karadağ S, Sınırtaş M, Göral G. Comparison of Paul-Bunnel and Immunoblot Methods for the Investigation of Epstein-Barr Virus Antibodies. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2010; 40 (2): 117 – 124.
3. Fidan I, Yüksel S, İmir T. The Investigation Of Epstein- Barr Virus Antibodies In Different Age Groups. İnfekt Derg 2005; 19:453-6.
4. Thomas B. Martins, Christine M. Litwin, Harry R. Hill. Evaluation of a Multiplex Fluorescent Microsphere Immunoassay for the Determination of Epstein-Barr Virus Serologic Status. Am J Clin Pathol 2008;129:34-41.
5. Feyzioğlu B, Özdemir M, Baykan M, Baysal B. Comparative Evaluation of Indirect Immunofluorescence Assay and ELISA Methods for the Diagnosis of Epstein-Barr Virus Infection Selçuk Üniv Tıp Derg 2011; 27(2):77-82.
6. Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz A.T, Tümbay A, Ömer m, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara:Güneş kitapevi; 1999.
7. Karadağ Geçgel S, Ersoy A, Sivindir B B, Sınırtaş M, Göral G. Evaluation Of PCR Results In The Diagnosis Of Epstein-Barr Viruse Infection. Mikrobiyol Bul 2012; 46(4): 594-606
8. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV associated disease. Rev Med Virol 2008; 18(5): 305-19

9. Denizci S, Uğar Çankal D. The Relation of Epstein-Barr Virus with Oral Disease and it's Importance in Dentistry. EÜ Dişhek Fak Derg 2006; 27: 125-133.
10. Yavuz G. Epstein-Barr virus Infections in the Immunosuppressed Patients J Pediatr Inf 2009; 3 (Suppl 1): 17-21.
11. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. Nat Rev Immunol 2001; 1:75-82.
12. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, et al. Insulin needs after CD3- antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. N Engl J Med 2005; 352:2598-608.
13. Hadinoto V, Shapiro M, Greenough TC, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA. On the dynamics of acute EBV infection and the pathogenesis of infectious mononucleosis. Blood 2008; 111: 1420-7.
14. Takeuchi K, Tanaka-Taya K, Kazuyama Y, et al. Prevalence of Epstein-Barr virus in Japan: trends and future prediction. Pathol Int 2006; 56:112-6.
15. Nielsen N.H, Mikkelsen F, and Hansen J, Nasopharyngeal Cancer in Greenland. The Incidence in an Arctic Eskimo Population. Acta Pathol Microbiol Scand [A], 1977. 85(6): 850-8.
16. Raab-Traub N, et al. The Differentiated Form of Nasopharyngeal Carcinoma Contains Epstein-Barr Virus DNA. Int J Cancer, 1987. 39(1): 25-9.

17. Shao Y.M, et al. Epstein-Barr Virus Activation in Raji Cells by Extracts of Preserved Food from High Risk Areas for Nasopharyngeal Carcinoma. *Carcinogenesis*, 1988. 9(8): 1455- 1457.
18. Shu-Jen C, et al. Characterization of Epstein-Barr Virus miRNAome in Nasopharyngeal Carcinoma by Deep Sequencing. *PLoS ONE* 2010; 5(9): 1-14.
19. Brady G, MacArthur G , Farrell P. Epstein–Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol* 2007;60: 1397–1402.
20. Gandhi M, Tellam J, and Khanna R., Epstein-Barr Virus-Associated Hodgkin's Lymphoma. *Br J Haematol*, 2004; 125(3): 267-81.
21. Young, L.S. and P.G. Murray, Epstein-Barr Virus and Oncogenesis: From Latent Genes to Tumours. *Oncogene*, 2003; 22(33): 5108-21.
22. Carbone A, Gloghini A, Dotti G. EBV-associated lymphoproliferative disorders: Classification and treatment. *The Oncologist*, 2008; 13: 577-85.
23. Rezk SA, Weiss LM. Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative disorders. *Human Pathology*. 2007; 38: 1293-1304.
24. Menard F, Besson C, Rince P et al. Hodgkin lymphoma-associated hemophagocytic syndrome: a disorder strongly correlated with Epstein-Barr virus. *Clin Infect Dis*. 2008; 15: 47: 531-534.
25. Schuberts S, Renner C, Hammer M et al. Relationship of immunosuppression to Epstein-Barr viral load and lymphoproliferative

- disease in pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2008; 27: 100-5.
26. Weinstein HJ, Hudson MM, Link MP (eds). *Pediatric Lymphomas*. Springer-Verlag-Berlin-Heilderberg 2007.
 27. Paschale M, Clerici P, Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J Virol* 2012; 1(1): 31-43.
 28. Hess R. Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(8): 3381–3387.
 29. Tang Y, Stratton C, editors. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. New York: Springer Science and Business Media; 2006
 30. Gartner, B. C., R. D. Hess, D. Bandt, A. Kruse, A. Rethwilm, K. Roemer, Evaluation Of Four Commercially Available Epstein-Barr Virus Enzyme Immunoassays With An Immunofluorescence Assay As The Reference method. *Clin. Microbiol. and N. Mueller-Lantzsch*. 2003. 10:78–82.
 31. Svahn A, Magnusson M, Jagdahl L, Schloss L, Kahlmeter G, and Linde A. Evaluation Of Three Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays And Two Latex Agglutination Assays For Diagnosis Of Primary Epstein- Barr virus infection. *J. Clin. Microbiol* 1997; 35: 2728–2732.
 32. Thomas D, Rhoda L, Joan E, and Dedra S. A Systematic Study of Epstein-Barr Virus Serologic Assays Following Acute Infection. *Am J Clin Pathol* 2002;117:156-161

33. Svahn A, Magnusson M, Gdahl L, Schloss L, Kahlmeter G, Linde A. Evaluation of Three Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Two Latex Agglutination Assays for Diagnosis of Primary Epstein-Barr Virus Infection. *J. CLIN. Microbiol* 1997; 35: 2728–2732.
34. Paschale M, Cagnin D, Cerulli T, Manco M, Agrappi C, Mirri P, Gatti A et al. Search for Anti-EA(D) Antibodies in Subjects with an “Isolated VCA IgG” Pattern. *International Journal of Microbiology* 2010; 1-4
35. Henle W, Henle G, Andersson J, Ernbergt I, Kleint G, Horwitz CH A, et al. Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 570-574.
36. Preiksaitis JK, Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Caliendo AM, Miller GG. Interlaboratory comparison of Epstein-Barr virus viral load assays. *Am J Transplant* 2009; 9: 269-279.
37. Hayden R, Hokanson K, Pounds S, Bankowski M, et al. Multicenter comparison of different real-time PCR assays for quantitative detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 157-163
38. Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335–350.
39. Fredricks, D, Relman, D. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis*, 1999 29(3), 475–486; quiz 487–478.

40. Macky I, Arden k, Netsche A, Real time PCR in virology. *Nucliec Acid Res* 2002; 30: 1292_1305
41. Hayden R, Carroll K, Tang Y, Wolk D, *Diagnostic Microbiology Of The Immunocompromised Host*. Washington: ASM; 2009
42. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williamsand Wilkins, 2001: 2575-2627
43. Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein- Barr virus. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 587-617
44. Thorley-Lawson DA, Gross A. Persistence of the Epstein- Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 2004; 350: 1328-1337
- 45 Leight ER, Sugden B. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev Med Virol* 2000; 10: 83-100
46. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol* 2008; 18: 305-319
47. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 75-82
48. Bauer G. Simplicity through complexity: immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein- Barr virus serology. *Clin Lab* 2001; 47: 223-230

49. Jenson HB. Virologic Diagnosis, Viral Monitoring, and Treatment of Epstein-Barr Virus Infectious Mononucleosis. *Curr Infect Dis Rep* 2004; 6: 200-207
50. Gartner BC, Hess RD, Bandt D, Kruse A, Rethwilm A, Roemer K, Mueller-Lantzsch N. Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10: 78-82
51. Ambinder RF, Lin L. Mononucleosis in the laboratory. *J Infect Dis* 2005; 192: 1503-1504
52. Holmes RD, Sokol RJ. Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Transplant* 2002; 6: 456-464
53. Bauer CC, Aberle SW, Popow-Kraupp T, Kapitan M, Hofmann H, Puchhammer-Stöckl E. Serum Epstein-Barr virus DNA load in primary Epstein-Barr virus infection. *J Med Virol* 2005; 75: 54-58
54. Balfour HH, Holman CJ, Hokanson KM, Lelonek MM, Giesbrecht JE, White DR, Schmeling DO, Webb CH, Cavert W, Wang DH, Brundage RC. A prospective clinical study of Epstein-Barr virus and host interactions during acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 2005; 192: 1505-1512
55. Ersoy Y, Ersoy Y, Oltu B, Kraratutlu İ, Altay Z, Emine S and Özerol İ. Epstein_Barr And Cytomegaloviruse Antibody Positivities İn İnflammatory Rheumatic Diseases. *Turgut özel tıp merkezi dergisi* 2000; 7(2):141-143.

56. Sakamoto Y, Mariya Y and Kobu K. Quantification of Epstein Barr Virus DNA Is helpful for evaluation of chronic active Epstein Barr Virus infection. *J. EXP. Med* 2012; 227:306-311.
57. Lanzkowsky P. Non-Hodgkin's Lymphoma in Manual Pediatric Hematology and Oncology, 4th ed. London, 1999; P:445-469.
58. Michalek J, Horvath R. High incidence of Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus and Human Herpesvirus 6 infections in children with cancer. *BMC Pediatr* 2002; 2: 1
59. Altuglu I, Bozkurt H, Samlioglu P, Zeytinoglu A. Evaluation of three different assays for the assessment of Epstein Barr Virus immunological status. *New Microbiologica* 2007; 30, 393-398.
60. Inci M, Gokahmetoglu S, Kaynar L, Ercal B, Durmaz S. and Buyukoglan R. Investigation of Epstein-Barr virus serology and DNA in bone marrow transplant recipients *Afr. J. Microbiol.* 2011; 5(5) . 496-500.
61. Zeytinoglu A , Hekimgil M , Erensoy S, Aydemir Ş,et al. Investigation of Epstein-Barr virus DNA and RNA in tissues of patients with Lymphoma. *Mikrobiyol Bül.* 2005; 39:473_481.
62. Sousa H, Silva J, Azevedo L, Pinto-Correia A L. et al. Epstein-Barr virus in healthy individuals from Portugal. *Acta Med Port* 2011; 24: 707-712.
63. Gartzonika C, Vrioni G, Priavali E, Pappas G and Levidiotou S. Utility of Real-Time PCR in the Diagnosis of Primary Epstein-Barr Virus Infection. *J Med Microb Diagn* 2012; 2:1-4
64. Yong Shao J, Li Yu, Yi Gao H, et al. Comparison of Plasma Epstein-Barr Virus (EBV) DNA Levels and Serum EBV Immunoglobulin A/Virus Capsid

Antigen Antibody Titers in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma.
American Cancer Society 2004; 100:61-9

10.EKLER

10.1 Teşekkür

Çalışma sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım ve hocam Prof.Dr. Seyyal ROTA'ya;

Tez çalışmam sırasında her türlü konuda bana yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Işıl FİDAN'a;

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgi ve bilgileri ile bana yardımcı olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Doç.Dr.Funda DOĞRUMAN AL'a, Prof.Dr. Nedim SULTAN'a ve diğer ders hocalarıma;

birlikte çalışmaktan her zaman büyük mutluluk ve gurur duyduğum, sadece çalışma arkadaşları değil hayatım boyunca yanımda olacaklarına inandığım dostlarım çalışma ve ders arkadaşlarıma;

Maddi-manevi her türlü desteği veren, bu zor günlerinde dahi hep yanımda olduklarını bildiğim sevgili babam muhsin QADDO'ya, sevgili annem wafaa HAYDER'e ve sevgili kardeşlerime; hep yanımda olan ve iyi, kötü, güzel , çirkin her şeyi paylaştığımız ev arkadaşlarım Ali AFANDI'ye, Faez AZEEZ'e bütün içtenliğimle teşekkürü bir borç bilirim.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Faisal

Soyadı: QADDO

Doğum yeri ve Tarihi: Ninawa – Irak / 06.06.1986

Eğitimi:

2010-2013 Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji
ABD, Ankara,

2009-2010 Gazi Üniversitesi Türkçe Öğrenim, Araştırma ve Uygulama
Merkezi (TÖMER), Ankara

2005-2009 Musul Üniversitesi, Fen- Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji
ABD, Musul. Irak

2001-2005 Telafer Lisesi, Telafer

Yabancı Dili: İngilizce-Arapça