

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**EPSTEIN-BARR VİRUS ENFEKSİYONLARI
TANISINDA KULLANILAN YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr.Semra ÖZ

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR
2014**

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**EPSTEIN-BARR VİRUS ENFEKSİYONLARI
TANISINDA KULLANILAN YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr.Semra ÖZ

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŐMANI
Doç. Dr. Nilgün KAŐIFOĐLU**

**ESKİŞEHİR
2014**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Semra ÖZ'e ait "Epstein-Barr Virus Enfeksiyonları Tanısında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Gül Durmaz Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Üye	Prof. Dr. Tercan US Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Üye	Doç. Dr. Nilgün KAŞİFOĞLU Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte KurulununTarih veSayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bekir YAŞAR

Dekan

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren her konuda rahatlıkla ulaşıp danıştığım değerli hocam Doç. Dr. Nilgün KAŞİFOĞLU'na, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Filiz AKŞİT'e, Prof. Dr. Gül DURMAZ'a, Prof. Dr. Yurdanur AKGÜN'e, Prof. Dr. Tercan US'a, Prof. Dr. Nihal DOĞAN'a, Doç. Dr. Abdurrahman KİREMİTÇİ'ye Doç. Dr. Yasemin ÖZ'e; bölümümüzde birlikte çalıştığım arkadaşlarım Dr. Emrah AYDIN'a, Dr. Egemen GÖKBOLAT'a, Dr. Suat YILDIZ'a yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

ÖZET

Öz, S. Epstein-Barr Virus Enfeksiyonları Tanısında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2014. Epstein-Barr Virus (EBV), tüm dünyada ve ülkemizde erişkinlerin %90'ını enfekte eden Herpesvirus ailesinin bir üyesidir. Primer EBV enfeksiyonu küçük yaşlarda genellikle belirtisiz geçirilir, yaş ilerledikçe belirtili seyretme olasılığı artar. Virus kişiden kişiye tükürük ve boğaz salgıları aracılığıyla çıkarılarak, yakın temas, kan ve kontamine eşyalarla bulaşır. Lenfadenopati, ateş, hepatosplenomegali ve farenjitin eşlik ettiği enfeksiyöz mononükleozisin etiyolojik ajanıdır. Nazofaringeal karsinom, Burkitt lenfoma ve immün yetmezliği olan hastalarda görülen lenfoproliferatif hastalıklarla da yakından ilgilidir. Bu çalışmada Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderilen EBV enfeksiyonu şüpheli hastaların serumlarında EBV enfeksiyonu tanısında İndirekt Floresan Yöntem (IFA), ELISA, Immunoblot ve Real-Time PCR yöntemleri çalışılmış ve performansları altın standart yöntem olan IFA ile karşılaştırılmıştır. ELISA ile IFA uyumu seronegatiflik için % 100, akut enfeksiyon için % 95.2, yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon için % 57.1, geçirilmiş enfeksiyon için % 95.7 ve maternal antikör varlığı için % 66.6 olarak bulunmuştur. Immunoblot ile IFA uyumu seronegatiflik için % 89.4, akut enfeksiyon için % 66.6, yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon için % 28.5, geçirilmiş enfeksiyon için % 95.1 ve maternal antikör varlığı için % 100 bulunmuştur. Immunoblot yönteminin antikörleri saptamadaki duyarlılığı ELISA yöntemi ile anti-VCA IgM için aynı, diğer üç antikör için ise yüksek, özgüllüğü dört antikör için de ELISA yönteminden daha düşük değerde saptanmıştır. Akut enfeksiyonda viremi varlığını saptamada Real-Time PCR yönteminin duyarlılığı % 57.1, özgüllüğü % 99.4 bulunmuştur. Sonuç olarak, hastaların demografik özellikleri ve laboratuvarın koşulları birlikte değerlendirilerek en doğru tanı yöntemine karar verilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Epstein-Barr Virus, İndirekt Floresan Antikör (IFA), ELISA, Immunoblot, Real-Time PCR

Destekleyen Kurum: ESOGÜ BAP, Proje No 2013-139

ABSTRACT

Oz, S. Comparison of Diagnostic Methods used in Diagnosis of Epstein–Barr Virus Infections. Eskisehir Osmangazi University Medicine of Faculty, Department of Clinical Microbiology, Eskisehir, 2014.

Epstein-Barr Virus (EBV), is a member of Herpesvirus family which infects 90 % of adults all over the world. Primary EBV infection is usually asymptomatic at early ages, and the rate of symptomatic infections increases with age. Virus is excreted through coughing and throat secretions. Blood and other contaminated items, and close contact with infected people are other sources of infection. EBV is an etiologic agent of infectious mononucleosis which is accompanied by lymphadenopathy, fever, hepatosplenomegaly and pharyngitis. It is related to nasopharyngeal carcinoma, Burkitt's lymphoma and lymphoproliferative disorders in patients with immune deficiency. In this study, serum samples from suspected patients of EBV infection were sent to Eskisehir Osmangazi University Medicine of Faculty, Department of Clinical Microbiology, and investigated by IFA, ELISA, Immunoblot and Real-Time PCR, the performances of these tests were compared with gold standard IFA. The rates of harmony between ELISA and IFA were found as 100 % for seronegative, 95.2 % for acute infection, 57.1 % for recently past infection, 95.7 % for past infection and 66.6 % for presence of maternal antibodies. The rates of harmony between Immunoblot and IFA were found to be 89.4 % for seronegative, 66.6 % for acute infection, 28.5 % for recently past infection, 95.1 % for past infection and 100 % for maternal antibodies. The sensitivity of Immunoblot method for detection of anti-VCA IgM were identical with ELISA and higher for anti-VCA IgG, EBNA IgG, anti-EA antibodies, while the specificity of Immunoblot method for these antibodies were found to be lower. The sensitivity and specificity of Real-Time PCR for detection of viremia in acute infection were found as 57.1 % and 99.4 %, respectively. Evaluation of demographic characteristics of patients and laboratory conditions together are highly useful for the right choice of the diagnostic method.

Key Words: Epstein-Barr Virus, Indirect Fluorescence Assay (IFA), ELISA, Immunoblot, Real-Time PCR

Supported By ESOGU BAP, Project No 2013-139

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Etkenin Tanımlanması	3
2.2.1. Virusun Yapısı	3
2.2.2. EBV Genomu	5
2.3. Epidemiyoloji ve Bulaş	9
2.4. Patogenez	9
2.5. EBV ile İlişkili Hastalıklar	12
2.5.1. Enfeksiyöz Mononükleoz	12
2.5.2. Kronik Aktif EBV Enfeksiyonu	15
2.5.3. İmmün Yetmezlik Varlığında EBV	15
2.5.4. EBV ile İlişkili Tümörler	16
2.6. Tanısal Yöntemler	17
2.6.1. Elektron Mikroskopi	17
2.6.2. Antijen Saptama	17
2.6.3. Moleküler Yöntemler	17
2.6.4. İzolasyon İşlemleri	18
2.6.5. Serolojik Testler	18
2.6.6. Diğer Laboratuvar Bulguları	21
2.6.7. İmmünofloresan Yöntem	22
2.6.8. ELISA	22

2.6.9. Immunoblot	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Materyal Seçimi ve Çalışma Programı	24
3.2. Kullanılan Yöntemler	24
3.2.1. İndirekt Floresan	24
3.2.2. ELISA	29
3.2.3. Immunoblot	32
3.2.4. Real-Time PCR	35
4. BULGULAR	43
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACIF	Anti Complement Immunoflouescence
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AST	Aspartat aminotransferaz
ALT	Alanin aminotransferaz
Anti-	Antikor
BART	BamA rightward transcripts
BL	Burkitt Lenfoma
CD4	Cluster of differantiation 4
CD8	Cluster of differantiation 8
CR	Complement Receptor (Kompleman Reseptörü)
CSF	Colony Stimulating Factor (Koloni Stimüle Edici Faktör)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EA	Early Antigen
EBER	Epstein-Barr Virus Encoded RNA
EBNA	Epstein-Barr Virüs Nuclear Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
EKG	Elektrokardiyografi
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EM	Enfeksiyöz Mononükleoz
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
IEA	Immediate Early Antigen
IFA	Immunofloresan Assay
Ig	Immunoglobulin
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
M	Molar
MA	Membrane Antigen
MHC	Major Histocompatibility Complex
µg/ml	Mikrogram/Mililitre

ml	mililitre
NFK	Nazofaringeal Karsinoma
NK	Natural Killer
LAP	Lenfadenopati
LDH	Laktat dehidrogenaz
LMP	Latent membran protein
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PTLD	Post Transplant Lymphoproliferative Disorder
RAI	Relatif avidite indeksi
RF	Romatoid Faktör
RNA	Ribonükleik Asit
VCA	Viral Capsid Antigen
XLP	X ile İlişkili Lenfoproliferatif Sendrom

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Herpes grubu virusların şematik yapısı	4
2.2. EBV genomu	5
2.3. EBV enfeksiyonu progresyonu	10
2.4. EBV enfeksiyonu serolojik profili	19
3.1. Çalışmamızda IFA ile elde ettiğimiz mikroskopik görüntü örnekleri	29
3.2. Immunoblot testi sonuçlarının şematik görünümü	34
3.3. Çalışmamız Immunoblot testi akut enfeksiyon serolojisi örneği	34
3.4. Çalışmamız Immunoblot testi geçirilmiş enfeksiyon serolojisi örneği	35
3.5. DNA izolasyonu	37
3.6. Çalışmamızda Real-Time PCR cihazında kantitatif EBV-DNA sonuçlarının değerlendirilmesi	40
3.7. Çalışmamızda oluşan bir standart eğri	41
3.8. Çalışmamız EBV DNA (kopya/ml) sonuçları	42
4.1. IFA yöntemine göre EBV serolojik profili dağılımları	45
4.2. ELISA yöntemine göre EBV serolojik profili dağılımları	46
4.3. Immunoblot yöntemine göre EBV serolojik profili dağılımları	49

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. EBV'nin latent proteinlerinin özellikleri ve fonksiyonları	6
2.2. EBV'de latentlik tipleri, ilişkili tablolar ve eksprese edilen genler	7
2.3. EBV'nin litik proteinlerinin özellikleri ve fonksiyonları	8
2.4. EBV'nin glikoproteinlerinin özellikleri ve fonksiyonları	8
2.5. EM'de da klinik belirtiler, bulgular ve bunların görülme sıklıkları	12
2.6. Değişik durumlarda tipik EBV serolojik profilleri	20
3.1. EBV Real-Time PCR kiti için termal döngü koşulları	38
3.2. Real-Time PCR veri analizi için örnek	39
4.1. Hasta ve kontrol gruplarının bölüm ve cinsiyete göre dağılımı	43
4.2. Hasta ve kontrol grupları klinik bulgularının cinsiyet ve bölümlere göre dağılımı	44
4.3. IFA yöntemine göre EBV serolojik evrelemesi	45
4.4. ELISA yöntemine göre EBV serolojik evrelemesi	46
4.5. ELISA yöntemiyle elde edilen evrelerin IFA yöntemiyle elde edilen evrelerle karşılaştırılması	47
4.6. ELISA yöntemiyle elde edilen sonuçların IFA yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	48
4.7. Immunoblot yöntemiyle elde edilen evrelerin IFA yöntemiyle elde edilen evrelerle karşılaştırılması	49
4.8. Immunoblot yöntemiyle elde edilen sonuçların IFA yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	50
4.9. IFA, ELISA ve Immunoblot testleri ile evre bazında Real-Time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi	51
4.10. Real-Time PCR pozitifliklerinin testlerine göre evre bazında dağılımı	52

1. GİRİŞ

Epstein-Barr virus (EBV), 1964 yılında elektron mikroskobu ile Afrika Burkitt lenfoma hücre kültüründe tanımlanmıştır (1). EBV, çift zincirli deoksiribonükleik asit (DNA)'e sahip olup Herpesvirus ailesindedir (2). İnsan Herpes virus 4 olarak da adlandırılır (3).

EBV, dünya genelinde yaygın görülen, erişkin nüfusun tamamına yakınının karşılaştığı önemli bir patojendir (4). Ülkemizde de bu oran yüksek olup erişkin yaş grubunda seropozitiflik % 70 ile % 99.4 oranlarında bulunmuştur (5,6). Primer EBV enfeksiyonu çoğunlukla çocukluk çağında asemptomatik olarak geçirilir. Genel olarak, gençlerde geçirilen enfeksiyonlarda, yetişkinlerde geçirilen enfeksiyonlara göre daha hafif hastalık belirtileri görülmektedir (7). Virus, primer enfeksiyon boyunca çok çeşitli semptomlara neden olup, yaşa bağlı olarak ciddi komplikasyonların olduğu enfeksiyöz mononükleoz (EM)'dan, belirtisiz asemptomatik enfeksiyona kadar değişiklik göstermektedir (8). Enfeksiyöz mononükleoz hafif halsizlikle beraber sıklıkla belirtisiz başlangıç gösterirken, takip eden birkaç gün içerisinde ateş, boğaz ağrısı, büyümüş servikal lenf nodları ve yorgunluk izlenir (9).

EBV, tükürük ve boğaz salgısıyla çıkarılmakta ve yakın temasla, kanla veya kontamine eşyalarla kişiden kişiye bulaşmaktadır. Yakın temasla sık bulaştığı için öpüşme hastalığı olarak da bilinir (10). Virus, B ve T lenfositleri, epitel hücrelerini ve düz kas hücrelerini etkileyerek bu hücreleri malign hücrelere dönüştürmektedir. Burkitt Lenfoma, nazofarengial karsinoma (NFK), transplantasyon sonrası lenfoproliferatif hastalık (PTLD), Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfoma, gastrik karsinoma ve leiomyosarkom gibi çeşitli malignensilerle ilişkilidir (11).

İmmünesesi sağlam bireylerde, EBV reaktivasyonu, latent antijenlerin yanısıra sitotoksik T lenfositlerin B lenfositleri etkileyip ölümsüzleştirilmesiyle olmaktadır. Sağlıklı koşullar altında bu sistem çok iyi dengelenmiştir ve hemen hemen hiçbir özgül semptomu neden olmamaktadır. İmmün yetmezlik durumlarında, solid organ veya kök hücre transplantasyonu veya HIV enfeksiyonunda olduğu gibi T hücresinin yetmezliği durumlarında, virus reaktivasyonu ciddi komplikasyonlara sebebiyet verebilir (12).

EBV enfeksiyonu tanısında periferik yayma (Downey hücreleri), monospot ve Paul-Bunnell lam aglütinasyon testleri bulunmakla birlikte günümüzde daha çok Immunofloresan Assay (IFA), Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), Immunoblot ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. IFA testi EBV tanısında altın standarttır. Antijen fikse edilmiş lamalar üzerine hasta serumu ve ardından floresan işaretli anti-human globülin eklenir. Floresan mikroskop altında değerlendirilir. ELISA testinde EBV enfeksiyonu sırasında virusun çeşitli antijenik yapılarına karşı özgül antikor oluşumları değerlendirilir. Immunoblot testinde ise rekombinant antijenler kullanılarak oluşan özgül antijenlerin varlığı değerlendirilir. Özellikle virusa karşı antikor yanıtının bozulmuş olduğu immünyüpresif olgularda viral DNA'nın varlığı moleküler yöntemler ile araştırılabilir.

Bu virusa ilişkin enfeksiyonlar genellikle çocukluk döneminde gelişip asemptomatik seyrederek. Sitomegalovirus, Rubella, *Toxoplasma gondii* enfeksiyonları ve bazı hematolojik malignansiler EBV enfeksiyonlarına benzer bulgular oluşturduğundan, EBV enfeksiyonları ile karışabilir. Ayrıca immünyüprese hastalarda primer enfeksiyon sıklıkla şiddetli olur ve ölümcül olabilir ya da latent kalmış virus reaktif olabilir. Bu nedenlerle EBV enfeksiyonlarının tanısı, özellikle son yıllarda immün düşkün hasta popülasyonunun artışı nedeniyle büyük önem kazanmıştır (3).

Bu çalışmada, EBV enfeksiyonu şüphesi olan pediatrik ve/veya erişkin (immünyüprese olan ya da olmayan) hastalardan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen hasta serumlarında çalışılan ELISA, Immunoblot ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) testleri, altın standart test olan IFA testiyle karşılaştırılarak, duyarlılık ve özgüllükleri değerlendirilmiştir. Testlerin akut, geçirilmiş, reaktivasyon vb. EBV enfeksiyon evrelerini tanımlamada kullanılabilirliği de değerlendirilmiştir. Eskişehir ve çevre bölgesindeki EBV akut, geçirilmiş enfeksiyon ve reaktivasyon sıklığının bulunması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

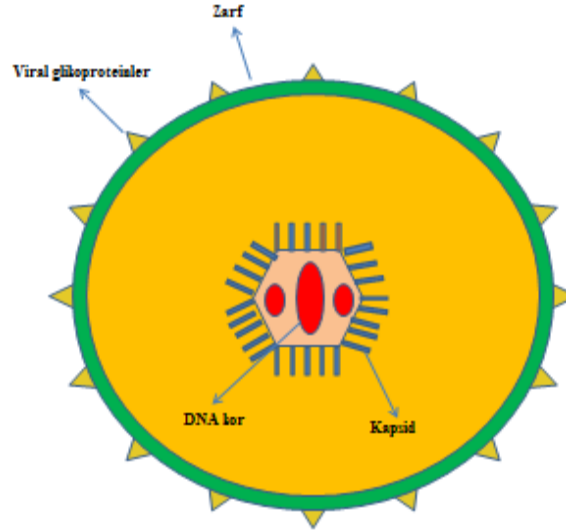
Epstein-Barr virus Denis Burkitt'in Afrikalı çocuklardaki çene kaynaklı bir tümörü tanımlaması ile farkedilmiştir. B lenfosit kaynaklı olan bu tümör "Burkitt lenfoma (BL)" olarak isimlendirilmiştir (13). 1958 yılında ilk kez tarif edilen ve Orta Afrikalı çocuklarda sık rastlanan bu tümör, Sir Denis Burkitt'in adıyla anılan lenfoid dokunun bir tümörü olup önceleri, eklem bacaklıların florası ile yakın ilişkisi, malaryanın yoğun olduğu bölgelerde sık rastlanması ve her olgunun aynı antijeniteyi göstermesi nedeniyle, etiyolojik etkeninin eklem bacaklılarla taşınan bir virus olabileceği düşünülmüş ve bir çok virus neden olarak düşünülmüştür. Tümörden alınan biyopsi örnekleri Uganda'dan Londra'ya (Middlesex Hospital Medical School) gönderilmiş ve yenidoğan farelere, doku kültürlerine, döletli tavuk yumurtasına inoküle edilmiş ama üretilenmemiştir. Ayrıca elektron mikroskopunda da virus gösterilememiştir. Epstein ve arkadaşları tarafından 1964 yılında biyopsi örneklerinden hazırlanan lenfoid hücre kültürlerinde Herpes grubu viruslara benzer bir virus izole edilmiş ve Epstein-Barr virus olarak isimlendirilmiştir (14). Daha sonraları EM'nin etiyolojik ajanı olduğu kanıtlanmıştır. Güney ve Doğu Asya'da sık rastlanan NFK gelişiminde gerekli faktörlerden biri olduğu bildirilmiştir. Yapılan moleküler ve epidemiyolojik çalışmalar ile EBV'nin başka lenfoid ve epitelyal tümörlerle olan ilişkisi de ortaya konulmuştur (13).

2.2. Etkenin Tanımlanması

2.2.1. Virusun Yapısı

EBV, elektron mikroskopisinde diğer herpesviruslerle aynı yapıda görülür. Sezyum klorid içinde dansitesi 1.2-1.3, molekül ağırlığı 100×10^6 Da'dur. Nükleik asidini üçgen şeklinde olan 162 kapsomerden oluşmuş ikozahedral yapıda bir kapsid çevreler. Enfekte hücrelerden tomurcuklanma sırasında aldığı lipid içeren zarf

bulunur. Zarf virusa ait glikoproteinler de içermektedir. Olgun virionun çapı 150-200 nm'dir (15).



Şekil 2.1. Herpes grubu virusların şematik yapısı (16).

EBV'nin doku tropizmi hüresel reseptörü ile sınırlıdır. Başlıca reseptörü Complement Reseptor (CR) 2 olup kompleman sisteminin C3d parçasının reseptörü ile aynıdır. İnsanlarda B lenfositler ile orofarinks ve nazofarinks epitel hücrelerinde bulunur. Virus, Major Histocompatibility Complex (MHC) II moleküllerini de yardımcı reseptör olarak kullanmaktadır (15).

EBV enfeksiyonu hücrelerde üç şekilde sonlanabilir:

1. B lenfositler ve epitel hücrelerinde replikasyon ve litik enfeksiyon
2. B lenfositlerde latent enfeksiyon
3. B lenfositlerin immortalizasyonu (15).

Replikatif Enfeksiyon

Enfeksiyona izin veren hücrelerde Z gen bölgesinden kodlanan (ZEBRA) protein sentezlenir. Bu protein transkripsiyonu aktive eder ve virusun en erken genlerini aktive ederek litik enfeksiyonu başlatır. Litik enfeksiyonda en erken antijen, (immediate early antigen, IEA), erken antijen (early antigen, EA), viral kapsid antijen (viral capsid antigen, VCA) ve membran antijen (membrane antigen, MA) sentezlenen başlıca proteinlerdir (15).

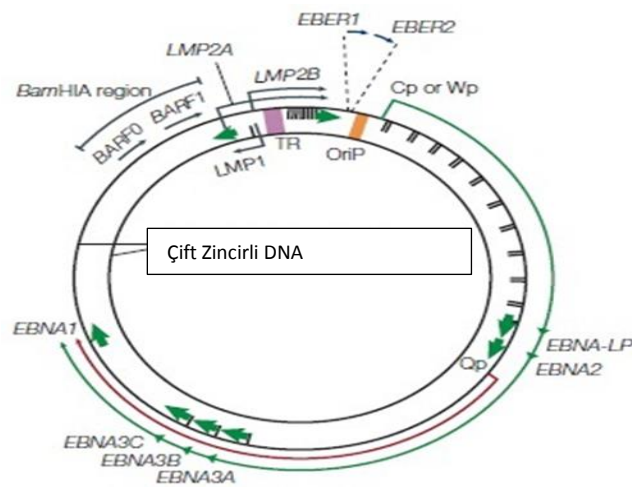
Latent Enfeksiyon

B lenfositler enfeksiyonu engellediğinde, EBV genomunun iki ucu birleşerek oluşan plazmid benzeri EBV genomları sadece hücre bölünmesi sırasında çoğalabilir. Epstein-Barr virus nükleer antijenleri (EBNA) ve latent membran proteinleri (LMP) latent enfeksiyonda sentezlenen proteinlerdir (15).

Küçük poliadenili olmayan ribonükleik asit (RNA) molekülleri olan Epstein-Barr virus encoded RNA (EBER) 1, 2 ve BamA rightward transcripts (BART) molekülleri latent enfeksiyonda virus tarafından kodlanan başlıca RNA molekülleri. EBER'ler latent olarak enfekte hücrelerde bulunan en yoğun RNA grubudur ama işlevleri tamamen bilinmemektedir. İnterferon tarafından indüklenen protein kinaz etkinliğini inhibe edebildikleri düşünülmektedir. BART moleküllerinin de görevleri anlaşılamamış olup, BamA gen bölgesinden çeşitli proteinleri kodlayan farklı şekilde kesilmiş ve ekzonları kaynaşmış RNA'lardır (15).

2.2.2. EBV Genomu

Çift sarmallı doğrusal DNA 184 kb uzunluğundadır. Genomda ardınca tekrarlayan bölgeler bulunur. Genom üzerindeki açık okuma çerçeveleri genellikle genom parçaları ile ilişkili lokalizasyonlarını belirten dört harf ve sayı ile tanımlanır (örn: BZLF-1, BNLF-1, BWRZF-1, BALF-4, BXLF-2 gibi) (13).



Şekil 2.2. EBV genomu (17).

Genomdan 70 civarında protein kodlanır. Fonksiyonları net olarak anlayamamıştır. DNA’da tekrar eden bölgeleri nedeniyle proteinlerin büyüklüğü her virus için aynı değildir. Latent proteinleri kodlayan bölgelerdeki değişikliklere göre EBV-1 ve EBV-2 veya A ve B olmak üzere iki farklı EBV tanımlanmıştır. Tipler arasında belirgin bir coğrafi dağılım veya hastalıklarla ilişki farkı görülmemiştir. İn vitro ortamda tip 1’in B lenfositleri immortalize etme yeteneği fazladır (13).

EBV Proteinleri

Latent Proteinler

EBNA-1, 2, 3A, 3B, 3C, B hücre immortalizasyonu için gerekli öncü protein LP (leader protein) ve LMP başlıca latent proteinlerdir (15). Tablo 2.1’de özellikleri ve fonksiyonları belirtilmiştir. Tablo 2.2.’de EBV’de latentlik tipleri, ilişkili tablolar ve eksprese edilen genler gösterilmiştir.

Tablo 2.1. EBV’nin latent proteinlerinin özellikleri ve fonksiyonları (15).

EBNA-1	Enfeksiyonun devamı için gereklidir. Virusun genomundaki cis-etkili eleman oriP ile etkileşerek yeterli DNA replikasyonunu destekler. Mitoz ve genom ayrılması sırasında DNA’yı kromozoma bağlar.
EBNA-2	İmmortalizasyon için gereklidir. B hücre aktivasyon genleri CD21 ve CD23 ile onkojen genlerden <i>c-myc</i> ve <i>c-fgr</i> genlerini aktive eder.
EBNA-3 (A, B, C)	EBNA-2 tarafından aktive edilen genleri inhibe ederek dengeyi sağlar.
LP	EBNA RNA’larının öncüsüdür, EBNA-2’nin hücre büyümesini arttırıcı etkisine yardımcı olur.

Tablo 2.1. EBV'nin latent proteinlerinin özellikleri ve fonksiyonları (15) (Devam).

LMP-1	EBNA-2 tarafından indüklenir. Plazma membranında yer alır, B lenfositlerin immortalizasyonu ve sürekli proliferasyonu için gereklidir. CD23 ve CD40 adezyon moleküllerini artırarak B hücre aktivasyonu ve DNA sentezini indükler.
LMP-2A, LMP-2B	Genomun terminal bölgesinden kodlandığından sadece dairesel viral genomdan translasyonu olur. Hücre membranı ile ilişkilidirler.

Tablo:2.2. EBV'de latentlik tipleri, ilişkili tablolar ve eksprese edilen genler (15).

	İlişkili Tablolar	Eksprese Edilen Genler
Latentlik 1	Burkitt Lenfoma	EBNA-1, EBER-1, EBER-2
Latentlik 2	Hodgkin Lenfoma, Nazofarengeal Karsinoma	EBNA-1, LMP-1, LMP-2, EBER-1, EBER-2
Latentlik 3	Lenfoproliferatif Hastalıklar Santral Sinir Sistemi Lenfoması	EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, LP, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B, EBER-1, EBER-2, BART'lar

Litik proteinler

Proteinlerin sentezi ve aktivasyonu döngüselidir. Her set bir önceki set ile aktive ve bir sonraki ile inhibe olmaktadır. IEA, EA) ve LA bulunan üç grup proteindir. IEA ve EA mRNA transkripsiyonu, viral DNA sentezinden önce başlar.

LA transkripsiyonu ise daha sonra olur (13). Tablo 2.3.'de EBV'nin litik proteinlerinin özellikleri ve fonksiyonları verilmiştir.

Tablo 2.3. EBV'nin litik proteinlerinin özellikleri ve fonksiyonları (15).

Erken Antijenleri	Başlangıç	BZLF-1 ve BRLF-1: Erken genlerin transkripsiyonunu tetikler
Erken Antijenler		Yaygın (diffüz, D): Enfekte hücrenin nükleus ve sitoplazmasında yaygın bulunur. Kısıtlı (restrikte, R): Sadece nükleusta bulunur. Çoğunluğunun viral DNA replikasyonu için gerekli enzim fonksiyonu vardır.
Geç gen ürünleri		Viral kapsid antijen (VCA) proteinleri: Virusun non-glikolize yapısal proteinleri kodlanır.

On adet tanımlanmış EBV glikoproteinleri, virusun enfektivitesi ve yayılımında rol alırlar. Enfekte hücrede membran içinde ve virus partikülünde zarf içinde bulunurlar (15). Tablo 2.4.'de EBV glikoproteinlerinin özellikleri ve fonksiyonları belirtilmiştir.

Tablo 2.4. EBV glikoproteinlerinin özellikleri ve fonksiyonları (15).

Gp340/220	Başlıca zarf glikoproteinidir. Konak hücre yüzeyindeki EBV reseptörü olan CR2 molekülüne tutunmasını sağlar.
Gp85	Viral ve hücrel membranlar arasındaki birleşmeyi tetikler.
Gp25	Gp85 molekülünün hücre yüzeyine taşınmasını sağlar. Viral-hücrel membranların birleşmesi sağlanır.
Gp42	B hücre yüzeyindeki HLA-II moleküllerine bağlanarak virusun hücre içine geçişini sağlar.

2.3. Epidemiyoloji ve Bulaş

EBV ile karşılaşma yaşı coğrafik bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Serokonversiyon iki yaş döneminde pik yapar; 1-6 yaş ve 14-20 yaş. Enfeksiyon, sosyoekonomik durumu yüksek topluluklarda, düşük olanlara göre daha geç yaşlarda görülmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde iki yaşına kadar % 90 seropozitiflik olabilmektedir. Erken yaşlarda enfeksiyon asemptomatik veya subklinik iken, ilerleyen yaşlarda EM kliniği görülür. Yaşla semptomatik EM prevalansının artması değişik yaş gruplarında bağışık yanıtta görülen farka bağlıdır (15). Türkiye’de erişkin yaş grubunda seropozitiflik % 70-99.4’dür (5,6).

Virus, EBV genindeki polimorfizme göre EBV-1, EBV-2 veya tip A ve B olarak da sınıflandırılabilir. Yapılan çalışmalar, her iki tipin de dünyada yaygın olduğunu ancak tip A’nın tip B’den daha sık saptandığı ve EM’de baskın tip olduğunu göstermiştir (18). Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde, çoklu EBV suşları ile koenfeksiyonlar gösterilmiştir (19). Türkiye’de yapılan bir çalışmada, erişkin yaş grubunda seropozitiflik % 84.4, 0-4 yaşta % 67.9 olarak saptanmış ve seropozitifliğin yaşla arttığı bildirilmiştir (5).

EBV’nin bulaşma yolları tükürük ve cinsel ilişki yoluyla (20,21). Çocukluk döneminde ortak kullanılan su bardakları, ergenlik döneminde ise öpüşme yakın temasla bulaş nedenidir (15). Enfeksiyöz virus ve viral genom, seropozitif kişilerin çoğunluğunun ve EM geçiren hastaların orofarinks örneklerinde saptanmaktadır (22). İmmün yetmezlik durumu olmadığında EBV’nin kan ürünleri ile bulaşması anlamlı değildir (23).

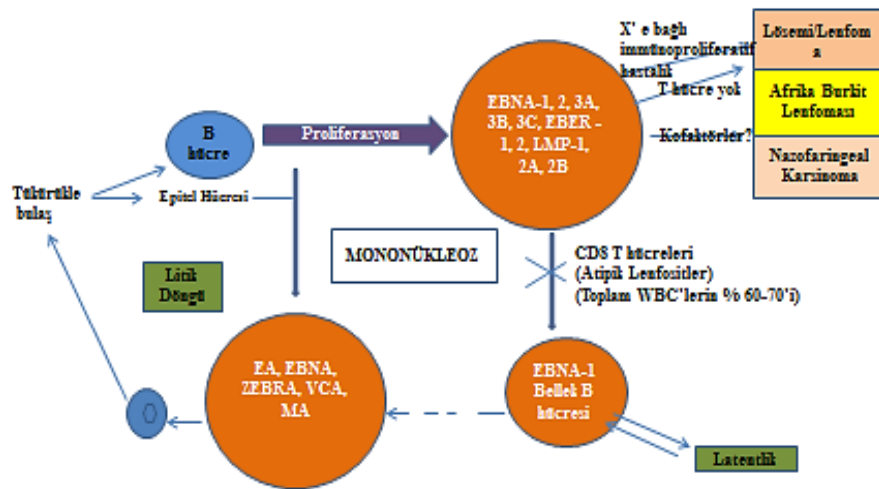
2.4. Patogenez

Seropozitif kişide EBV’nin oral atılımı ya intermitant ya da sürekli görülür. Bulaşma en sık öpüşme, sekresyonların bulaştığı gıdaların yenmesi gibi yakın temasla olmaktadır. Seropozitif kişiden seronegatif olana kan transfüzyonu, organ nakli ve muhtemelen cinsel ilişki ile de bulaşabilir. Oral yolla alınan EBV öncelikle orofaringeal epitel hücrelerinde prodüktif bir enfeksiyona neden olur. Virus

tükürükte ve boğaz çalkantı suyunda saptanır. Tonsil kriptlerindeki B lenfositleri de doğrudan enfekte olabilirler (15).

EBV gp350 yüzey proteini ile CD21 reseptörü olan B lenfositleri ve benzeri hücelere tutunarak hücreye girer. Enfekte B lenfositleri latent gen ekspresyonuna yanıt olarak aktivasyon ve proliferasyon sonucu giriş yerinde B lenfositlerinin artışına neden olurlar. Akut enfeksiyonda lenfoblastlar periferik kanda görülür ve yaygın T lenfosit yanıtını uyararak tüm vücuda yayılırlar. T lenfositlerden salınan sitokin yanıtı ise EM'de görülen klinik semptomlara neden olur. Virusla enfekte B lenfositleri ile koruyucu T lenfositleri arasında sürekli ters bir ilişki vardır. Oluşan lenfositozun ($15 \times 10^9/L$) nedeni kandaki aktivite CD8+ T lenfosit düzeylerindeki belirgin artıştır. Akut dönemde periferik kandaki CD8+ T lenfosit yanıtının yaklaşık %40'ı tek bir EBV epitopuna karşı gelişmiş bir yanıttır (15).

Lenfoid organlarda büyüme ve şişme, T hücre aktivasyonu ve proliferasyonu sonucu gelişir. Akut enfeksiyonda kanda görülen Downey hücreleri adını alan atipik lenfositler T hücreleridir. Hastalığın 2. haftasında periferik kanda sayıca fazlalaşırlar ve lökositlerin %10–80'ini oluştururlar (mononükleoz). Lenfositozda T hücrelerinin fonksiyonlarının baskılandığını gecikmiş tip aşırı duyarlılık testi ve mitojen stimülasyon testi ile göstermek mümkündür. Baskın olarak CD8+ T lenfositleri ve doğal öldürücü (Natural Killer, NK) hücreler de, enfekte B lenfositlerinin temizleyerek enfeksiyonu kontrol etmeye çalışırlar ama kontrol mümkün olmazsa virus yaşam boyu konakta persistan bir enfeksiyona neden olur (15).



Şekil 2.3. EBV enfeksiyonu progresyonu (16).

Akut EBV enfeksiyonunda koyun, at ve dana eritrositleri ile reaksiyona girebilen heterofil antikorlar oluşur ve çoğunlukla Immunoglobulin (Ig) M yapısındadırlar. EBV proteinleri ile reaksiyona girmezler. Heterofil antikor düzeyleri ile klinik arasında bir ilişki saptanamamıştır ve patogenezdaki rolleri tam olarak bilinmemektedir (15).

Primer akut enfeksiyonda klinik semptomların olduğu dönemde serumda VCA'ya karşı IgM, IgA ve IgG yapısında antikorlar oluşur. Bunların arkasından EA ve MA'ya karşı IgG yapısında antikorlar serumda saptanmaya başlar. Viral glikoproteinlere karşı oluşan antikorlar nötralizan özelliktedir. Anti-VCA IgM/Anti VCA IgA ve anti-EA IgG akut dönemde pik yapar, konvelasan dönemde ise antikor düzeyleri düşer. Anti-EBNA-1 IgG ise konvelasan dönemde saptanır. EM seyrinde serumda soğuk aglütininer, romatoid faktör, anti nükleer antikor, trombositlere ve kas hücrelerine karşı otoantikorlar gibi değişik otoimmün antikorlar saptanabilir. Bu geçici izlenen ve zararsız olan antikorların EBV enfeksiyonundaki poliklonal B hücre aktivasyonunun bir sonucu olabileceği düşünülmektedir (15).

Akut enfeksiyondan sonra bağışık yanıt EBV protein ekspresyonlarını baskılamaya çalışır. Virus ise B hücre bölünme sikluslarında EBNA-1 gibi proteinlerini eksprese ederek genomunun replikasyonunu sağlar. EBNA-1 yapısındaki glisin-alanin tekrarları proteini proteazlardan korur. Böylece MHC sınıf I hücre yüzeyinde sunulamaz ve bağışık yanıtta kaçabilir. Primer enfeksiyon sonrasında kişinin her bir ml kanında minimum bir bellek hücresi ömür boyu varlığını sürdürür. Bellek B lenfositinin aktivasyonu ile virus özellikle tonsil veya orofarinks epitel hücrelerinden reaktif olur ve tükürükle salınır (15).

EBV BCRF-1 proteini, İnterlökin (IL) 10 ile % 70 benzerlikte olup, IL-10 gibi davranarak İnterferon (IFN) gama sentezini baskılar. EBV ile enfekte hücrelerin öldürülmesi için gerekli olan CD8+ T hücre yanıtını uyarır. EBV proteini BARF-1, koloni stimulan faktör (CSF) 1 için bir çözünür reseptör görevini üstlenir ve CSF 1'in monositlerden IFN alfa ekspresyonunun artırmasını önler. EBV, konak hücre proteini bcl2'ye benzer bir protein kodlar ve konak hücrenin apoptozunu engeller (15).

EBV insan B lenfositlerinin olgunlaşma basamaklarını kullanarak konağın yaşamı boyunca sürecek enfeksiyona neden olur ve apoptozu baskılar. T

lenfositlerinin olmadığı koşullarda B lenfositleri ölümsüzleşir. Sürekli B hücre proliferasyonuna bazı faktörler de eklenince lenfoma gelişir (24).

Hücrel bağışık yanıt baskın olarak CD8+ T lenfositleri ile, daha az oranda CD4+ T lenfositleri ve NK hücreleri ile gerçekleşir. Virusun reaktivasyonu bazı kimyasallar (siklosporin, herbimisin vb) ve yüzey Ig'lerine karşı gelişen antikorlarla olur. Latentlik durumunda enfekte B hücreler ve lenfoepitelial hücrelerdeki düşük düzeyde virus replikasyonu, EBV'ye özgü sitotoksik T lenfosit yanıtı ile kontrol edilerek dengede tutulmaktadır (15).

2.5. EBV ile İlişkili Hastalıklar

2.5.1. Enfeksiyöz Mononükleoz

EBV'nin en sık rastlanan hastalık tablosu enfeksiyöz mononükleozdur (15). EBV enfeksiyonları, nadiren belirtili seyrettiği çocukluk çağı olgularında lenfadenopati (LAP), tonsillit gibi tipik bulguların yanısıra; larenjit, otit, abdominal ağrı ve diyare gibi tipik olmayan belirtilere neden olabilir. Genç ve erişkinde ise çoğunlukla yüksek ateş, boğaz ağrısı, LAP, lenfomonositoz ve heterofil antikor pozitifliği görülen karakterize akut enfeksiyon tablosu oluşturur (25). EM'ye geçmişte glandüler ateş, öpüşme hastalığı, drüsen feber gibi isimler de verilmiştir (26). İnkübasyon süresi erişkinde 30-50 gün, çocuklarda 10-14 gündür. Hastalık belirtileri genellikle 3-5 gün süren halsizlik, iştahsızlık, bulantı, batında dolgunluk hissi, miyalji, retrobulber ağrı, ateş basması, üşüme, titreme, terleme gibi prodromal belirtileri takiben ortaya çıkar (27). Tablo 2.5.'de Enfeksiyöz mononükleoz'da klinik belirtiler, bulgular ve bunların görülme sıklıkları belirtilmiştir.

Tablo 2.5. EM'de klinik belirtiler, bulgular ve bunların görülme sıklıkları (27).

Belirtiler	Sıklık %	Bulgular	Sıklık %
Boğaz ağrısı	70-88	Lenfadenopati	80-100
Halsizlik	43-76	Farenjit	69-71
Baş ağrısı	37-55	Yüksek ateş	63-100
İştahsızlık	10-27	Splenomegali	40-63
Miyalji	12-22	Hepatomegali	6-14
Titreme	9-18	Damakta enanitem	5-30

Tablo 2.5. EM’de klinik belirtiler, bulgular ve bunların görülme sıklıkları (27).
(Devam)

Belirtiler	Sıklık %	Bulgular	Sıklık %
Bulantı	2-17	Sarılık	4-10
Batında rahatsızlık	2-14	Cilt döküntüsü	0-5
Öksürük	5		
Kusma	5		
Eklem ağrıları	2		

Hastalar doktora en sık boğaz ağrısı yakınması ile başvururlar. Olguların % 90’ından fazlasında 38-40°C’a yükselen ateş saptanır. Ateşli dönem ortalama 10-14 gün sürer. Tonsiller sıklıkla hipertroftiktir. Farinks hiperemik görünümünde, sıklıkla eksudatiftir. Boğaz ağrısı ve anjin 7-10 gün sürer. Bazı hastalarda yumuşak ve sert ve damak birleşim bölgesinde 1-2 mm çapında peteşiyel döküntüler ortaya çıkar, 3-4 günde geriler. Periorbital ödem saptanabilir. Olguların % 80-90’ında servikal bölgede LAP gelişir. Submandibular LAP da sıklıkla görülür. Vücudun tüm bölgelerinde LAP görülebilir. Lenf düğümleri 5-25 mm çapında, ağrısız ancak palpasyona duyarlı, hafif sert ve mobildir (26). Ampisilin kullanımının olduğu hastalarda gövde ve ekstremitenin üst kısmında maküler veya makülopapüler döküntü ortaya çıkar ve ilacın kesilmesi ile geriler. Hastaların batın muayenesinde sağ hipokondriumda çoğunlukla hassasiyet vardır ama sadece % 10-15’inde hematomegali saptanır. Olguların yaklaşık yarısında splenomegali vardır. Dalak hastalığın ikinci haftasındaki maksimum boyutlarına ulaşmış 7-10 günde geriler. Komplikasyon görülmeyen olgularda kalp, akciğer ve nörolojik muayene bulguları normaldir (27).

Enfeksiyöz Mononükleoz’un Komplikasyonları

Hastaların çoğu komplikasyonsuz bir seyrin sonunda iyileşir. Komplikasyon gelişen nadir olgularda sıklıkla iyileşir (27).

Hematolojik Komplikasyonlar

Otoimmün hemolitik anemi sık görülen komplikasyonlardandır. Hastalığın 2-3. haftasında ortaya çıkıp, 1-2 ayda kendiliğinden iyileşir. Kortikosteroidler bu süreci kısaltır (28). EM olgularının yaklaşık yarısında hafif trombositopeni ($<140000/mm^3$) vardır. Antitrombosit antikorların aracılık ettiği otoimmün mekanizma ile gelişen periferik trombosit yıkımının trombositopeniye neden olduğu düşünülmektedir. Bazı olgularda kortikosteroidler yararlı olabilir, inatçı olgularda splenektomi endikasyonu vardır. Hafif nötropeni de EM seyrinde sık görülür. Ancak nadir de olsa derin granülositopeni ve sekonder enfeksiyona bağlı ölüm gelişebilir. Çocuklarda EM'nin başka hiçbir bulgusu olmaksızın trombositopeni, persistan lenfositoz ve pansitopeni olabilir (27).

Belirgin hemofagositoz ve yaygın histiyosit proliferasyonu ile giden hemaofagositik sendromun etkeni çoğunlukla EBV'dir. EBV dışında CMV, HSV, VZV, Adenovirus, Parvovirus B19 ve virus dışı enfeksiyöz ajanlar da neden olabilir. Hastalarda yaygın LAP ve hepatosplenomegali saptanır ve genellikle pansitopeni vardır. Atipik lenfositler yoktur veya çok azdır. Karaciğer fonksiyon testleri bozulmuştur ama beklenenden daha belirgin koagülopati oluşur. Patogenezinde immün yetmezlik varlığının da etkili olduğu düşünülmektedir. Mortalite yüksektir (29).

Dalak Rüptürü

EM'nin nadir görülen komplikasyonudur. Çoğunlukla hastalığın 2. ve 3. haftasında gelişir. Sinsi ya da ani başlayan, sol omuza vuran ağrı ve palpasyonda sol hipokondriumda hassasiyet saptanır. Nadiren bu bulguların hiçbiri saptanamaz, aniden şok gelişir. Hemotokritte düşme, nötrofili, bazen sol diyafragma yüksekliğidir görülebilir. Acil kan transfüzyonu ve genellikle splenektomi gerektirir (28).

Nörolojik Komplikasyonlar

Çok seyrek görülür ($<1\%$). Serebellit, ensefalit, aseptik menenjit, meningoensefalit, Bell paralizi, Guillain-Barre sendromu, transvers myelit gibi tablolar, EM'nin tek bulgusu olabilir. Atipik lenfositoz ve heterofil antikor da çoğunlukla bulunmadığından tanı için EBV spesifik serolojik testler gerekir. Olguların % 85'i iyileşir (28).

Diğer Komplikasyonlar

Tonsil ve farinks lenfoid dokusundaki hiperplazi nadir durumda solunum yolu obstrüksiyonuna neden olabilir ve trakeostomi gerekir (28). EM olgularının % 80-90'ında geçici transaminaz yüksekliği olsa da klinik olarak belirgin hepatit ve fatal hepatik nekroz çok nadirdir (27). Hastaların % 6'sında EKG'de S-T değişiklikleri saptanabilir. Kardiyak komplikasyon çok nadir olsa da perikardit ya da miyokardit EM'nin tek bulgusu olabilir ve ölümcül seyredebilir (28).

2.5.2. Kronik Aktif EBV Enfeksiyonu

Nadir görülen, ciddi ve EBV ile ilişkili malignitelere veya ölümcül seyreden diğer hastalıklara dönüşen EBV ile ilişkili tablolara denilebilir. Serolojik profil primer EBV enfeksiyonundakine benzerdir ama kronik reaktivasyon süresince gelişen uzun süreli antijen stimülasyonu nedeni ile anti-VCA IgG, anti-EA/D IgG antikör titreleri primer enfeksiyonuna göre daha yüksektir. Anti-VCA IgM titreleri çok düşük veya saptanamayacak düzeylerde olabilir (23).

2.5.3. İmmün Yetmezlik Varlığında EBV

İmmün yetmezliği olan hastada EBV enfeksiyonları, benign poliklonal hiperplaziden oligoklonal/monoklonal malign lenfomaya kadar birçok lenfoproliferatif hastalık ile ilişkilidir (23). PTLD gelişme riski hemopoetik kök hücre transplant alıcılarında % 1 ve solid organ transplant alıcılarında ise nakledilen organın tipine bağlı olarak % 1-20'dir. EBV seronegatif alıcının seropozitif bir vericisinin olması, geniş yaş, vericinin veya alıcının uzun süren ciddi T hücre azlığı olması, nakledilen organın ince bağırsak, kalp, akciğer ve karaciğer olması, CMV enfeksiyonu ve doku uyumsuzluğu PTLD için risk faktörleridir (30). AIDS de lenfoproliferatif hastalıklar için zemin oluşturabilir. EBV, immün yetmezliği olan çocuklarda nadir görülen leiomyosarkomun etiyolojisinde de rol oynayabilir (23).

Oral saçlı lökoplakide, oral epitelyumda EBV replikasyonu gösterilmiştir. Lezyonlar özellikle HIV ile enfekte olgularda görülen, dil sınırlarında beyaz yamalar şeklindedir (31).

X ile ilişkili lenfoproliferatif sendrom (XLP), nadir görülen ve öncelikle T ve NK hücreler ile ilişkili kalıtımsal bir immün yetmezlik tablosudur. Hasta erkek çocuklarda, EBV ile karşılaşma, akut ölümcül EM gelişimine veya lenfoproliferatif hastalık ve/veya disgamaglobulinemi ile semptomatik hastalığa neden olur. XLP'den sorumlu gen 1A içeren SH2 bölgesinde çoklu mutasyonlar saptanmıştır. Tedavi edilmeyen olgularda hastalık ölümcüldür. Transplantasyon ve gen tedavisi ile hastalık tedavi edilmeye çalışılmaktadır (23).

2.5.4. EBV ile İlişkili Tümörler

EBV, BL ve NFK olmak üzere en az iki kanserin etiyolojisinden sorumludur. Bu tip tümörlerin gelişiminde genetik veya bölgesel faktörlerin rolü tartışmalıdır. Sitotoksik T lenfositleri için hedef olan EBNA-2, EBNA-3 ve LMP antijenleri tümör oluşumunda rol oynamaktadır. BL ile NFK'li hastalardan alınan biyopsi örneklerinde elektron mikroskopuyla virus görülmediği halde, biyopsilerden hazırlanan lenfoblast hücre kültürlerinde EBV ve antijenleri EBNA-1, biyopsi örneklerinde viral DNA ve bu hastaların serumunda yüksek titrede EBV'ye karşı antikorlar bulunmuştur (14).

EBV ile enfekte B lenfositleri, bazen in vivo malign transforme olarak BL oluşmaktadır. BL'li hastaların B hücrelerinde Ig sentezini yöneten gen lokusuna "c-myc" pro-onkogenin yerleşmesiyle kromozomal translokasyonlar olmakta ve bunun tümör gelişimine yardım ettiği sanılmaktadır (14).

BL ve NFK dışında, Hodgkin Hastalığının % 40-50'sinde, gastrik adenokarsinomların % 2- 16'sında T/NK lenfomalarının % 90'ından fazlasında ve lenfoepitelioma benzeri karsinomların % 44-93'ünde tümör hücrelerinde EBV genomu saptanmıştır (14).

EBV ile ilişkili tümörlerde sıklıkla serumda ve beyin omurilik sıvısında saptanabilir düzeyde EBV genomu bulunmakta ve periferik kan mononükleer hücrelerinde ise yüksek virus yükü saptanmakta olup nedeni aydınlatılamamıştır (32).

2.6. Tanısal Yöntemler

2.6.1. Elektron Mikroskopi

Enfeksiyon latent olduğu ve virionlar enfekte dokuda yeterli miktarda bulunmadığı anlamlı bir tanı yöntemi değildir (23).

2.6.2. Antijen Saptama

EBV ile enfekte tüm hücrelerde eksprese edilen tek antijen EBNA-1'dir. Dikkatli seçilmiş poliklonal serum veya bir monoklonal antikor ile yapılan anti-kompleman immünfloresan (ACIF) testi ile dokuların ve hücre serilerinin EBNA-1 için boyanması, EBV antijeninin saptanması için en uygun yöntemdir (33). Latent/litik enfeksiyonun ayrımı ve EBV ile ilişkili değişik tümörlerin hangi latentlik tipi ile ilişkili olduğunu saptamak için immünohistokimya en yaygın kullanılan yöntemdir (23).

2.6.3. Moleküler Yöntemler

EBV nükleik asit saptanmasında moleküler yöntemler çok önemlidir. Hangi nükleik asit yönteminin kullanılacağına laboratuvarında var olan yöntemler, gelen örnekler ve yanıt aranan klinik durum ile karar verilebilir. Donmuş ve parafinlenmiş doku kesitlerinde in situ hibridizasyon, hücre süspansiyonlarında sito-hibridizasyon, dot-blot hibridizasyon, southern-blot hibridizasyon veya nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) gibi değişik yöntemler kullanılmaktadır (23). Son zamanlarda NAAT EBV saptanmasında en sık kullanılan yöntemlerdir ve RNA/DNA ekstraksiyonunun arkasından birçok değişik klinik örnekte uygulanabilmektedir. Değişik primerler, problemler ve yöntemler kullanılmaktadır (34). EBNA-1'in uzun internal tekrar sekansını kodlayan korunmuş BamHI W bölgesini hedefleyen problemler maksimum duyarlılığa sahiptirler (35).

Real-Time PCR, DNA saptamak için kullanılan hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. EBV için ilk olarak 1999 yılında uygulanmıştır. Florojenik proflu PCR ürünlerini gerçek zamanlı laser görüntüleme ile saptamaktadır ve PCR ürünlerinin eş zamanlı olarak görüntülenmesine olanak sağlamaktadır. Son yıllarda özellikle immün yetmezlik durumlarında görülen EBV ile ilişkili patolojilerin saptanmasında yaygın

olarak kullanılmaktadır. Bu hasta grubunda viral genom miktarının artışı genellikle patolojik bir gidişin göstergesidir. Yüksek viral yüke rağmen klinik hastalığın oluşmadığı veya klinik tabloya rağmen düşük viral yükün saptandığı olgular bildirilmiştir. Latent virusun, bağışıklık sistemi baskılanmış konakta reaktivasyon oluşturması bu sonuçlara neden olabilir (37). Kontaminasyon ve inhibisyon için her zaman yeterli sayıda kontrol çalışılmalıdır (23).

İn situ hibridizasyon ve sito-hibridizasyon yöntemleri az miktarda örneğe gereksinim duyarlar. İmmünohistokimya ile de kombine edilebilirler ve EBV'nin tümör dokusunda saptanmasında uygun testlerdir. İn situ hibridizasyonda, tek bir hücrede bile sekansa özgü RNA ve DNA saptanabilir ve enfeksiyonun hücresel lokalizasyonunu gösterebilir. Hibridizasyonda hem RNA hem DNA problemleri kullanılabilir (38).

2.6.4. İzolasyon İşlemleri

EBV izolasyonu rutin değildir ve daha çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır. İzolasyonu için taze ayrılmış insan kordon lenfositleri, hücreden arındırılmış ve filtre edilmiş tükrük ve boğaz çalkantı örneği ile inoküle edilir ve dört hafta izlenirler. Viral izolatların her biri EBNA-2 ve EBNA-3 genlerindeki polimorfizm temel alınarak moleküler yöntemlerle tanımlanırlar. İzolatlar, Western blot yönteminde görülen kendine özgü paterne sahip proteinleri kodladığı için, her virus için parmak izi analizi yapmak mümkündür (23).

2.6.5. Serolojik Testler

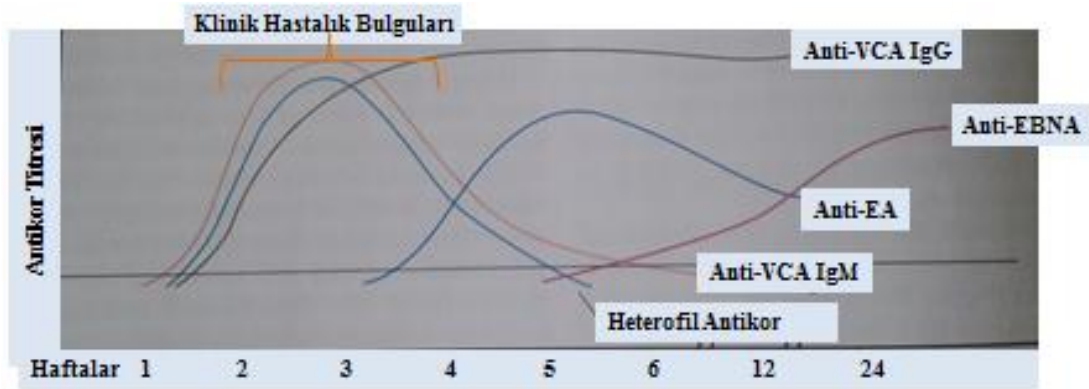
Heterofil Antikorlar

Primer EBV enfeksiyonunun tanısı için tercih edilen yöntem serolojik testlerdir (39,40). Son zamanlarda, Paul-Bunnell testleri nadir kullanılmaktadır ve yerine heterofil antikorlar için hızlı kalitatif aglütinasyon veya immünokromatografik testler yaygınlaşmıştır. Bu testler, laboratuvar ve hasta başında kullanılmak üzere hazırlanmış, EM hastalarında düşük duyarlılığa sahip testlerdir. Laboratuvar deneyimi olmayan kişilerin ise aglütinasyon testlerini yapması güvenilir olmayıp, gerçek pozitif sonucun değerlendirilmesi deneyim gerektirmektedir. Spontan

aglutinasyonun okuma zamanı geçen örneklerde de görüldüğü için testin okunma zamanına dikkat edilmelidir (41).

EBV'ye Özgü Antikorlar

EM'li hastaların yaklaşık % 15-20'sinin heterofil antikorları yoktur ve tanının doğrulanması için EBV'ye özgü serolojiye gereksimi vardır. VCA'ya, erken antijenin yaygın komponentine (EA/D), erken antijenin kısıtlı komponentine (EA/R) ve EBNAantijenlerine karşı olmak üzere, dört antijen kompleksine karşı antikorları saptanabilmektedir. VCA'ya karşı oluşan anti-IgG, anti-IgM ve bazen de anti-IgA antikorlarının ayırımı da yapılabilmektedir (23).



Şekil 2.4. EBV enfeksiyonu serolojik profili (42).

EBV Antijenleri ve Bu Antijenlere Karşı Oluşan Antikorlar

Viral Kapsid Antijeni

Ana VCA proteini 150 kDa bir proteindir ancak serolojide kullanılan VCA kompleksinin içinde p18 ve p23 proteinleri de vardır (40). VCA, litik faza geçen P3HR-1 hücre dizilerinden eksprese edilen ve insan serumu ile reaksiyona giren antijenlerin bir karışımıdır (23). Enfekte VCA hücre antijenleri içeren ELISA'lar uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Afinite ile saflaştırılmış antijen kullanan testler rekombinant veya sentetik antijen içeren ELISA'lara göre daha iyi sonuçlar vermektedir (43).

Early Antijeni

Anti- EA/D ve Anti- EA/R antikorları, klasik olarak Raji hücrelerinin forbol ester ve sodyum butirat gibi maddelerle aktivasyonu sonunda bu hücrelerin litik faza geçirilmesi ile saptanmaktadır. Anti-EA/R kompleksi etanol fiksasyonu ile yok edilir ve bu işlem sonunda testte Anti-EA/D saptanır. Günümüzde tanısal amaçlı yaklaşımlarda Anti-EA antikorlarının ayırt edilmesi nadir yapılan bir uygulamadır. ELISA'lar hücre kültüründen elde edilen antijenler ve rekombinant EA proteinleri içerirler ama bu testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü düşüktür (41,44)

EBNA Antijeni

IFA ile EBNA boyanma paterni nükleerdir ve tüm EBV ile enfekte hücrelerde vardır. Hasta serumunda olan bazı anti nükleer faktörlerin varlığı nedeniyle oluşan nükleer boyanmayı ekarte etme için, testte EBV negatif hücreler de çalışılmalıdır.

Hücre kökenli EBNA antijeni veya rekombinant EBNA-1 antijeni içeren ticari ELISA kitleri vardır. Rekombinant p72 antijeni içeren ELISA kiti, total anti-EBNA IgG için yapılan ACIF ile kıyaslandığında % 95 ve daha fazla duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (44). Aynı antijen Immunoblot testlerinde de kullanılmaktadır (23). Tablo 2.6.'da değişik durumlarda tipik EBV serolojik profilleri belirtilmiştir.

Tablo 2.6. Değişik durumlarda tipik EBV serolojik profilleri* (23).

Durum	Antijenlere karşı antikorların varlığı ve Ig izotipleri**						
	Anti-VCA IgG	Anti-VCA IgM	Anti-VCA IgA	Anti-EA/D IgG	Anti-EA/R IgG	Anti-EBNA IgG	Anti-EBNA-1 IgG
Seronegatif	-	-	-	-	-	-	-
Devam eden primer enfeksiyon	++	+++	+	+	+/-	-	-
Yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon	++	+	+	+	+	+/-	-

Tablo 2.6. Değişik durumlarda tipik EBV serolojik profilleri* (23) (Devam).

Durum	Antijenlere karşı antikorların varlığı ve Ig izotipleri**						
	Anti-VCA IgG	Anti-VCA IgM	Anti-VCA IgA	Anti-EA/D IgG	Anti-EA/R IgG	Anti-EBNA IgG	Anti-EBNA-1 IgG
Geçirilmiş enfeksiyon	+	-	+/-	-	+/-	+	+
Kronik aktif EBV enfeksiyonu	+++	+	+++	+++	+	+++	+++
NFK	+++	-	+++	+++	+	+++	+++
XLP	+/-	-	-	-	-	-	-

*En sık kullanılan antijenler ve IgG izotipleri alınmıştır.

**-, antikor yok; +/- antikorlar yok veya düşük düzeyde var; + antikor var.
 ++, antikorlar yüksek titrelerde; +++ antikorlar çok yüksek titrelerde.

Anti-VCA IgG Avidite

Anti-VCA IgG avidite testi Anti-EBNA-1 negatif olgularda ve ayrıca anti-VCA IgM'in uzun süre pozitifliğinin devam ettiği primer ve geçirilmiş enfeksiyon ayırımında kullanılabilir. Enfeksiyonun seyri sırasında yüksek avidite ile bağlanan antikorlar ile in vitro anti-VCA IgG avidite ölçülebilmektedir. İlk oluşan anti-VCA IgG antikorlar düşük aviditeli oluşmaktadır. Zamanla, anti-VCA IgG antikorlar, anti-VCA IgG DNA kodlanmış bölgede somatik hipermutasyon ile olgunlaşırlar ve daha sonra güçlü bağlanma özelliği olan yüksek aviditeli anti-VCA IgG'lere dönüşürler. Bu dönüşme süreci kişiden kişiye değişebilmekle birlikte, genellikle primer EBV enfeksiyonundan sonra birkaç hafta içinde olabilmektedir. Anti-VCA IgG avidite ölçümleri ELISA, IFA ve Immunoblot teknikleri ile yapılabilmektedir (40).

2.6.6. Diğer Laboratuvar Bulguları

Hastaların çoğunda aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri normalin 2-3 katına kadar yükselmiş

bulunur. Alkalen fosfataz yüksekliği de eşlik edebilir. Normalin 10 katına ulaşan veya daha fazla yükselen enzim düzeylerine nadiren rastlanabilir. Belirgin sarılık nadir olmasına rağmen % 45 olguda hastalığın 2. haftasında maksimuma ulaşan hafif bilirubin yüksekliği olur. Hastaların büyük kısmında orta derecede krioproteinemi saptanır (28).

2.6.7. İmmüno Floresan Yöntem

İmmüno floresan yöntemler histokimyasal temele dayanmaktadır. Floresan veren bir madde ile işaretlenmiş dedektör antikorlar ile klinik örnekteki antijen veya serumdaki antikorların saptanabilir. BL'li hastalardan alınan EBV ile transforme olmuş B hücrelerinin ürettiği P3HR-1 ya da Raji gibi hücreler kullanılmaktadır. P3HR-1 hücreleri EBNA-1'i eksprese ederken, yaklaşık % 5 ile 20'si de çekirdekte VCA'ları eksprese etmektedir. IFA yöntemleri direkt veya indirekt olarak uygulanabilir. Direkt yöntemler, doku ya da vücut sıvılarında bulunan antijenlerin tespitinde kullanılırlar. İndirekt yöntemler ise serum veya vücut sıvısında bulunan antikorların tespitinde kullanılır. Hasta örneği, hedef antijenin sabitlenmiş olduğu bir lam üzerine konulur ve inkübe edilir. Hasta serumundaki özgül antikorlar lam üzerinde bulunan antijenle bağlanarak kompleks oluştururlar. Yıkama ile bağlanmayan reaktifler giderilir ve sonra lam üzerine floresanla işaretlenmiş anti-immünglobulin süspansiyonu uygulanır. Floresan ışığın emisyonu ile sonuçlanır. IFA genelde kolay uygulanabilir ve pahalı olmayan yararlı yöntemlerdir. Dokuda bulunan özgül antijenlerin lokalizasyonları da belirlenebilir (40). 1966 yılında EBV bu yöntem ile gösterilmiştir (45). Zaman alıcı olması, pahalı floresan mikroskobuna ve değerlendirme için eğitimli ve deneyimli personele gereksinim göstermesi olumsuz yanları olarak gösterilebilir (23).

2.6.8. ELISA

ELISA'nın önemi giderek artmakta ve yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Enzimle konjuge edilmiş bir antijen veya antikorun kullanılması ve enzimin substratı ile reaksiyona girmesiyle renkli bir reaksiyon ürünü oluşur. Renk değişimi gözle veya spektrofotometre ile izlenerek renk tonu ile ölçülen analit miktarı arasında orantısallık belirlenir. Bu yöntemin en önemli basamağı, bağlanmış enzim ile işaretli

bileşenin serbest olanlardan ayırt edilmesidir (46). Bir numunedeki antijen ya da antikorun bu moleküllerle birleşebilen, bilinen antikor veya antijen kullanılarak tespit edilmesi ve enzim ile işaretlenmesi esasına dayanan yöntemdir. Bu antijen-antikor kompleksine sırasıyla enzim-konjugat ve substrat ilave edilerek oluşan reaksiyonun ölçülmesiyle aranan madde varlığı ve miktarı değerlendirilir (47). EBV serolojisinde 1970'li yıllardan sonra kullanılmaya başlanmıştır. Altın standart IFA yönteminde görülen birtakım zorluklar nedeniyle ELISA ile de çalışmalar yapılmıştır. VCA p18 peptidi'nin immünojenik özelliği yüksek olup ELISA'da yaygın olarak kullanılmaktadır. Anti-EBNA antikorları için EBNA-1 antijeni en yaygın kullanılanıdır (48).

2.6.9. Immunoblot

Jel elektroforeziyle proteinlerin ayrıştırılması, bunların bir filtre üzerine transferi ve hasta serumu ile karşılaştırıldıklarında ayrıştırılmış olan proteinler ile alınan reaksiyonun sandviç tipi ELISA yöntemi kullanılarak değerlendirilmesine dayanmaktadır. Immunblot yönteminde, katı faz membran filtredeki antijenler özgün antikorları ile yapılan reaksiyon ile tanımlanırlar. Sıklıkla çeşitli enfeksiyon etkenlerine karşı oluşan antikor paternlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır (23). Yüksek özgüllüğü nedeni ile doğrulama testi olarak önerilir. Viral lizat veya rekombinant antijenler (EBNA-1 için p72, VCA için p18, p23, EA için p54, p138) kullanılarak, tek bir serum örneğinde EBV enfeksiyonunun serolojik tanısı ve evrelemesi mümkündür (40).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Materyal Seçimi ve Çalışma Programı

Şubat–Haziran 2013 zaman diliminde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi pediatri kliniklerine ve/veya erişkin hematoloji kliniklerine başvuran lenfadenopati, farenjit, düzensiz ateş, hepatomegali ve/veya splenomegali bulguları bulunan, EM şüpheli 205 hastanın serum örnekleri çalışmaya dahil edildi. 35 kişi kontrol grubu olarak alındı. Toplamda 240 serum örneğinde IFA testi referans yöntem olarak kabul edilerek IFA, ELISA, Immunoblot ve Real-Time PCR testleri çalışıldı (Bu çalışma için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Etik Kurulu'ndan 2012/43 sayı ve 29 Mart 2012 tarihli raporu alındı).

Rutin olarak Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı seroloji bölümüne 13x100 milimetre (mm)'lik 5 mL BD Vacutainer plastik jelli tüp ile gönderilen kan numuneleri, 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Hemolizli ve yetersiz serum örnekleri çalışmaya alınmadı. Hastalardan istenilen rutin tetkikleri bekletilmeden çalışıldı ve sonuç bildirildi. Kalan serum örnekleri her hasta için, beş farklı 2 ml'lik eppendorf tüpüne dağıtıldı ve çalışma sıra numaraları ile etiketlendi. Testler çalışılana kadar tüm örnekler -70°C'de saklandı.

3.2. Kullanılan Yöntemler

3.2.1. İndirekt Floresan

Çalışmada Euroimmun IFA (Luebeck, Almanya) kiti kullanıldı. Test yalnızca serum veya plazmada bulunan antikorları tespit etmektedir. Test antikorların kalitatif ve kantitatif ölçümüne olanak verirken aynı zamanda avidite ölçümü de yapılabilmektedir.

Bu yöntemde, aranan antikorun niteliğine göre diğer serolojik deneylerde olduğu gibi üre ile eliminasyon ve kompleman ile birleşme gibi ek protokoller uygulanarak spesifik bağlanmalar sağlanmaktadır. Nitekim üre kullanılarak anti-VCA IgG aviditesi, kompleman kullanılarak da anti-EBNA antikor varlığı gösterilmektedir.

Bir hasta numunesi için 5 alandan oluşan değerlendirme sahası mevcuttur.

Alan A ve B: Anti-VCA IgG tespiti içindir. VCA eksprese etmiş P3HR-1 hücreleri bulunur.

Alan C: Anti-VCA IgM tespiti içindir. VCA eksprese etmiş P3HR-1 hücreleri bulunur.

Alan D: Anti-EA IgG tespiti içindir. EA eksprese etmiş EU33 hücreleri bulunur.

Alan E: Anti-EBNA IgG tespiti içindir. EBNA eksprese etmiş Raji hücreleri bulunur.

Birinci adımda; EBV antijenleri ile kaplı Biochip'lerin hasta örnekleri ile inkübasyonun ardından, hasta örneğinde bulunması halinde; Anti-IgA, anti-IgG ve anti-IgM sınıfı antikorlar bu antijenler ile bağlanmaktadır.

İkinci adımda; Alan A, C ve D tuzlu fosfat buffer (phosphate buffered saline, PBS) ile, alan B üre solüsyonu ile ve alan E kompleman solüsyonu ile inkübe edilir. Böylece alan B ve alan E de seçici bağlanma sağlanır.

Üçüncü adımda floresan işaretli moleküller (Alan A, C, D için anti-insan IgG, alan B için anti-insan IgM ve alan E için anti-insan C3c) ile bağlanma sağlanır.

Sonuçlar floresan mikroskop ile değerlendirilir.

Kitin içeriği şöyledir:

1. Her biri EBV ile enfekte hücrelerden oluşan Biochip'lerle kaplı ve her bir hasta için 5 olmak üzere toplam 10 alandan oluşan slaytlar.
2. Floresan işaretli anti-insan IgG (Keçi immünizasyonu yolu ile elde edilmiş).
3. Floresan işaretli anti-insan IgM (Keçi immünizasyonu yolu ile elde edilmiş).
4. Floresan işaretli anti-insan C3c (Tavşan immünizasyonu yolu ile elde edilmiş).
5. Pozitif kontrol: EBV VCA'ya karşı oluşmuş anti-IgG sınıfı antikorlar.
6. Negatif kontrol.
7. Toz halinde PBS.
8. Tween 20.
9. Üre solüsyonu 8 M.

10. Yapıştırıcı solüsyon (Gliserol).
11. Kaplama lamelleri (62 mm x 23 mm).
12. Liyofilize kompleman (İnsan kaynaklı).

Test için kullanılan malzemelerin hazır hale getirilmesi:

1. Slaytlar: Kullanıma hazır olup 25°C'nin altındaki sıcaklıklar Biochip'ler için güvenilir kabul edildi.
2. Floresan işaretli antikorlar: Kullanıma hazır ve ışığa duyarlı olup buna uygun ambalajla kaplı idiler.
3. Pozitif ve Negatif kontroller: Kullanım için hazırılar.
4. PBS-Tween: Bir paket toz PBS 1 lt distile su ve 2 ml Tween 20 ile partikül kalmayacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
5. Üre solüsyonu: Kullanım için hazırıdı.
6. Yapıştırıcı solüsyon: Kullanım için hazırıdı.
7. Liyofilize kompleman: -20°C'de saklanan liyofilize kompleman içeriğine +4°C'de olan distile su karıştırılmadan ilave edildi ve 20 dakika buzdolabında bekletildikten sonra bir saatlik bozulma sınırı aşılmadan kullanıldı.

Testin Uygulanması:

1. -70°C'de saklanan serum örnekleri +4°C'de bekletildi ve daha sonra oda ısısına getirildi. 180µl PBS-Tween 20 solüsyonuna 20 µl serum eklenerek 1/10 oranında dilüe edildi (Kantitatif değerlendirme planlanmadığı için seri dilüsyonlar yapılmadı).
2. Her bir değerlendirme alanına (5x25 µl) 25 µl dilüe serum örneği (kontroller için 25 µl pozitif ve negatif kontrol) slayt alanına denk gelecek şekilde ayarlanmış noktalara hava kabarcığı kalmayacak şekilde eklendi ve üzerine slayt kapatılarak 60 dakika oda ısısında inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası slaytlar içerisi PBS-Tween ile dolu şalede 5 dakika bekletildi ve bu sürenin sonunda çıkarılan slaytların üzerine yavaş bir şekilde PBS-Tween dökülerek yıkandı.
4. Yıkamadan sonra, Alan A, C ve D'ye 20 µl PBS-Tween 20, Alan B'ye 20 µl üre solüsyonu, Alan E'ye 20 µl taze hazırlanmış kompleman solüsyonu ilave edilerek slaytlar kapatıldı. 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
5. İnkübasyonun ardından yıkama işlemi aynı şekilde yapıldı.

6. Yıkamayı takiben her bir alan için 20 µl uygun floresan işaretli antikorlar, farklı antikora farklı pipet ucu kullanılarak ilgili noktalara ilave edildi ve slaytlar kapatıldı. 30 dakika oda ısısında ve ışık görmeyecek şekilde inkübe edildi.

7. İnkübasyonun ardından yıkama işlemi aynı şekilde yapıldı.

8. Yıkandıktan sonra slaytlar yumusak kurutma kağıdı ile dikkatlice kurulandı. Kaplayıcı lameller üzerine Biochip alanlarına denk gelecek şekilde yapıştırıcı solüsyon 10 µl ilave edildi. Slaytlar Biochip yüzeyleri lamele gelecek şekilde ve hava kabarcıklarına dikkat edilerek kapatıldı.

9. Slaytlar floresan mikroskopta 20 ve 40'luk büyütme alanlarında incelendi.

Testin Değerlendirilmesi:

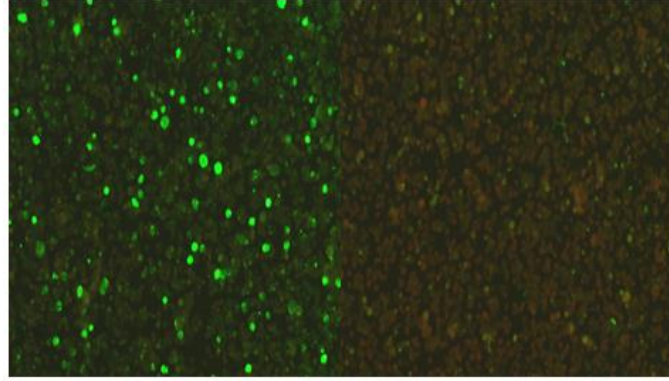
Pozitif kontrollerdeki floresan ışımalar göz önüne alınarak pozitiflik sınırı saptandı. EBV anti-VCA IgG antikorları (Alan A ve B) için pozitif patern sitoplazmadadır. Pozitif görünümlü hücreler yaklaşık olarak alandaki hücrelerin % 10-20'sini oluşturur ve genelde negatif hücrelerden daha büyüktür. Bu özellikleri gösteren alanlar pozitif olarak değerlendirildi.

EBV anti-VCA IgG avidite pozitiflik kriterleri anti-VCA IgG antikorları ile aynıdır. Ürenin zayıf aviditeli antikorları eliminasyon etkisi göz önüne alınarak, negatif, düşük ve yüksek avidite şeklinde puanlama yapıldı.

EBV Anti-VCA IgM antikorları (Alan C) anti-VCA IgG ile benzer görünüm sağladığı için aynı pozitiflik kriterlerine göre karar verildi.

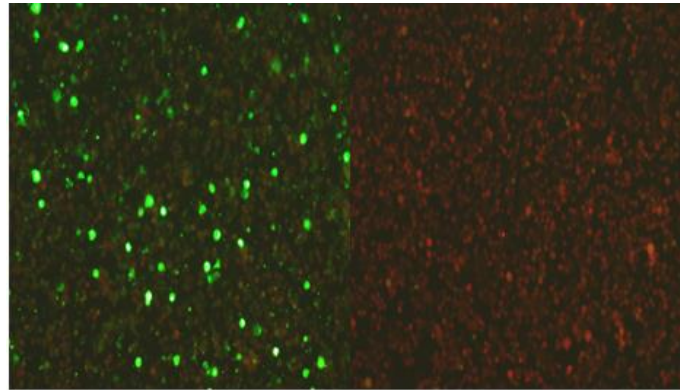
EBV Anti-EA antikorları (Alan D) için hücre nükleusunda ince granüler floresan görüntü pozitif olarak kabul edildi.

EBV Anti-EBNA antikorları (Alan E) için nükleuslarında karakteristik yonca yaprağı görünümünde granüler floresan veren hücrelerin varlığı pozitif olarak kabul edildi. Sitoplazmadaki floresan pozitif kabul edilmedi.



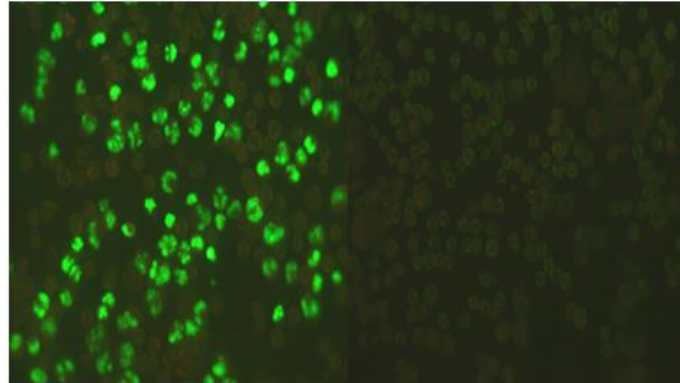
Anti-VCA IgG pozitif

Anti-VCA IgG negatif



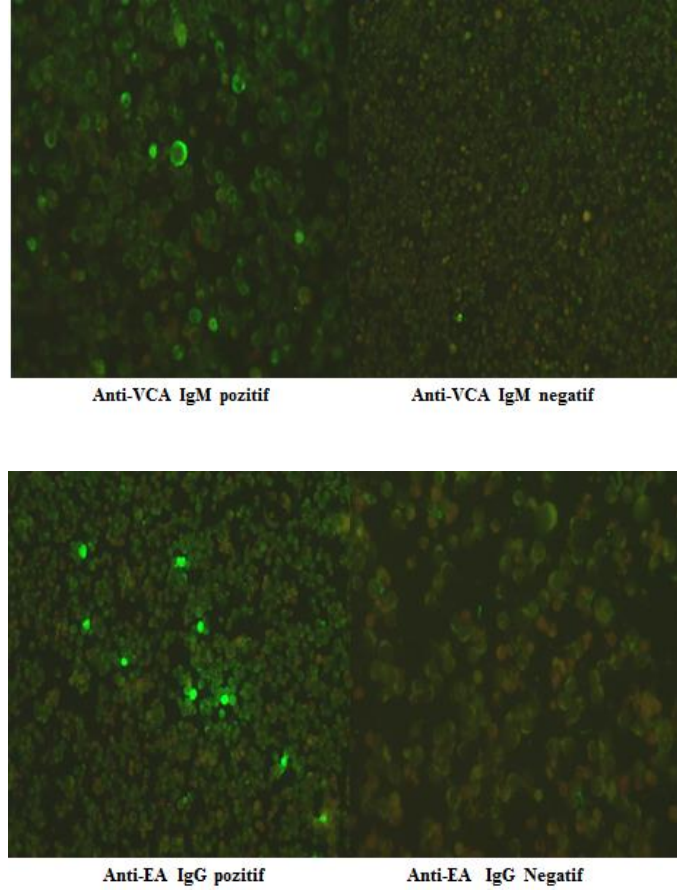
Anti-VCA IgG Yüksek Avidite

Anti-VCA IgG Düşük Avidite



Anti-EBNA IgG pozitif

Anti-EBNA IgG negatif



Şekil 3.1. Çalışmamızda IFA ile elde ettiğimiz mikroskobik görüntü örnekleri.

3.2.2. ELISA

Serum örnekleri çalışılmadan önce -70°C 'den çıkartılıp $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabının uygun rafında bekletilerek çözülmesi sağlandı ve daha sonra oda ısısına getirildi. Kit olarak Euroimmun (Luebeck, Almanya) ELISA kitleri kullanıldı. Anti-VCA IgG, anti-VCA IgM, anti-EBNA IgG, anti-EA IgG antikorları ve anti-VCA IgG avidite çalışıldı. Bio-tek elx88 (Winooski, Vermont USA) cihazında absorbansları okutularak sonuçlar elde edildi ve kaydedildi.

Anti-VCA IgM Testi

1. Tüm reaktifler kullanımdan yaklaşık 30 dakika önce buzdolabından çıkarılıp oda sıcaklığına (18°C - 25°C) getirildi.

2. Hasta serumları serolojik tüplerde örnek tampon solüsyonu Romatoid faktör (RF) işaretli keçi kaynaklı anti- insan IgG) ile 1/101 oranında sulandırıldı ve vortekslendi.

3. VCA gp125 antijeni ile kaplı kuyucuklara negatif kontrol (İnsan kaynaklı anti-IgM), pozitif kontrol (İnsan kaynaklı anti-IgM) ve kalibratör (İnsan kaynaklı anti-IgM) ve sulandırılmış serum örneklerinden 100 µL ilave edildi.

4. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.

5. Kuyucuklar otomatize yıkama cihazında 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve aspire edildi.

6. Kuyucuklara 100 µL enzim konjugat (Keçi kaynaklı, peroksidazla isaretili anti-insan IgM) ilave edildi.

7. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.

8. Kuyucuklar otomatize yıkama cihazında 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve aspire edildi.

9. Kuyucuklara 100 µL kromojen/substrat (Tetrametilbenzidin/hidrojen peroksit) ilave edildi.

10. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.

11. Kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu (0.5 M sülfirik asit) ilave edildi.

12. Fotometrik ölçüm 30 dakika içinde spektrofotometrede 450-620 nm dalga boyu aralığında yapıldı.

Anti-VCA IgG, Anti-EBNA IgG ve Anti-EA IgG Testleri

Her üç testin de çalışma prensibi aynı olup şöyledir:

1. Tüm reaktifler kullanımdan yaklaşık 30 dakika önce buzdolabından çıkarılıp oda sıcaklığına (18°C-25°C) getirildi.

2. Hasta serumları serolojik tüplerde örnek tampon solüsyonu ile 1/101 oranında sulandırıldı ve vortekslendi.

3. Antijen kaplı kuyucuklara negatif kontrol (İnsan kaynaklı anti-IgM), pozitif kontrol (İnsan kaynaklı anti-IgM) ve kalibratörler (İnsan kaynaklı anti-IgM) ve sulandırılmış serum örneklerinden 100 µL ilave edildi.

4. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.

5. Kuyucuklar otomatize yıkama cihazında 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve aspire edildi.
6. Kuyucuklara 100 µL enzim konjugat (Tavşan kaynaklı, peroksidazla isaretili anti-insan IgG) ilave edildi.
7. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
8. Kuyucuklar otomatize yıkama cihazında 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve aspire edildi.
9. Kuyucuklara 100 µL kromojen/substrat (Tetrametilbenzidin/hidrojen peroksit) ilave edildi.
10. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
11. Kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu (0.5 M sülfirik asit) ilave edildi.
12. Fotometrik ölçüm 30 dakika içinde spektrofotometrede 450-620 nm dalga boyu aralığında yapıldı.

Anti-VCA IgG Avidite Testi

Anti-VCA IgG avidite testi için mikro ELISA kiti (Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Testin çalışma prensibine göre;

1. Tüm reaktifler kullanımdan yaklaşık 30 dakika önce buzdolabından çıkarılıp oda sıcaklığına (18°C-25°C) getirildi.
2. Hasta serumları serolojik tüplerde örnek tampon solüsyonu ile 1/101 oranında sulandırıldı ve vortekslendi.
3. Antijen kaplı kuyucuklara kontroller (düşük avidite, yüksek avidite) ve sulandırılmış serum örneklerinden 100 µL ilave edildi. Her kontrol ve hasta serumu için yan yana iki kuyucuk kullanıldı.
4. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
5. Kuyucuklar bir kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve aspire edildi.
6. Her kontrol ve örnek için ilk kuyucuğa 200 µL üre solüsyonu, ikinci kuyucuğa 200 µL fosfat tamponu ilave edildi.
7. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
8. Kuyucuklar 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve aspire edildi.
9. Kuyucuklara 100 µL enzim konjugat (Peroksidazla işaretli anti-insan IgG) ilave edildi.

10. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
11. Kuyucuklar 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve aspire edildi.
12. Kuyucuklara 100 µL kromojen/substrat (Tetrametilbenzidin/hidrojen peroksit) ilave edildi.
13. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
14. Kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu (0.5 M sülfirik asit) ilave edildi.
15. Fotometrik ölçüm 30 dakika içinde spektrofotometrede 450-620 nm dalga boyu aralığında yapıldı.

$$16. \text{Relatif avidite indeksi (RAI)} = \frac{\text{ürelî örnek optik dansitesi} \times 100}{\text{üresiz örnek optik dansitesi}}$$

üresiz örnek optik dansitesi

formülü ile yüzde olarak hesaplandı.

17. RAI < %40= Düşük avidite

RAI %40-%60= Sınırdaki avidite

RAI > %60= Yüksek avidite olarak değerlendirildi.

18. Öncelikle kontrollere (düşük, sınırdaki, yüksek avidite) ait RAI sonuçlarına göre testin performansı belirlendi. Takiben hasta serumlarının RAI sonuçları değerlendirildi.

3.2.3. Immunoblot

EBV spesifik anti-VCA IgM, anti-VCA IgG, anti-EBNA-1 IgM, anti-EBNA-1 IgG, anti-p22 IgM, anti-p22 IgG ve anti-EA IgM, anti-EA IgG antikorlarını saptamak için Euroline anti-EBV profil 2 Immunoblot kiti (Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Testin çalışma prensibine göre;

1. Tüm reaktifler kullanımdan yaklaşık 30 dakika önce buzdolabından çıkarılıp oda sıcaklığına (18°C-25°C) getirildi.

2. EBV VCA gp125, VCA p19, EBNA-1, p22 ve EA-D antijenleri ile immünglobülin (IgG/IgM) kontrolünü paralel bantlar halinde içeren test şeritleri inkübasyon kanallarına yerleştirildi.

3. Her kanala 1.5 mL bloklayıcı tampon solüsyonu eklendi.

4. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda 15 dakika inkübe edildi.

5. Kanaldaki solüsyon aspire edildi.

6. Hasta serumları serolojik tüplerde üniversal tampon çözeltisi ile 1/51 oranında sulandırıldı ve vortekslendi.

7. Test şeritlerinin bulunduğu inkübasyon kanallarına sulandırılmış serum örneklerinden 1.5 mL ilave edildi.

8. Oda sıcaklığında 30 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.

9. Kanaldaki solüsyon aspire edildi.

10. Kanala 1.5 mL üniversal tampon çözeltisi ilave edilerek 3 defa 5'er dakika çalkalayıcıda yıkandı.

11. Kanaldaki solüsyon aspire edildi.

12. Kanala 1.5 mL enzim konjugat (Keçi kaynaklı, alkalen fosfatazla işaretli anti-insan IgG/IgM) ilave edildi.

13. Oda sıcaklığında 30 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.

14. Kanaldaki solüsyon aspire edildi.

15. Kanala 1.5 mL üniversal tampon çözeltisi ilave edilerek 3 defa 5'er dakika çalkalayıcıda yıkandı.

16. Kanaldaki solüsyon aspire edildi.

17. Kanala 1.5 mL substrat (Nitroblutetrazolyumklorid/5-Bromo-4-kloro-3-indolilfosfat) ilave edildi.

18. Oda sıcaklığında 10 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.

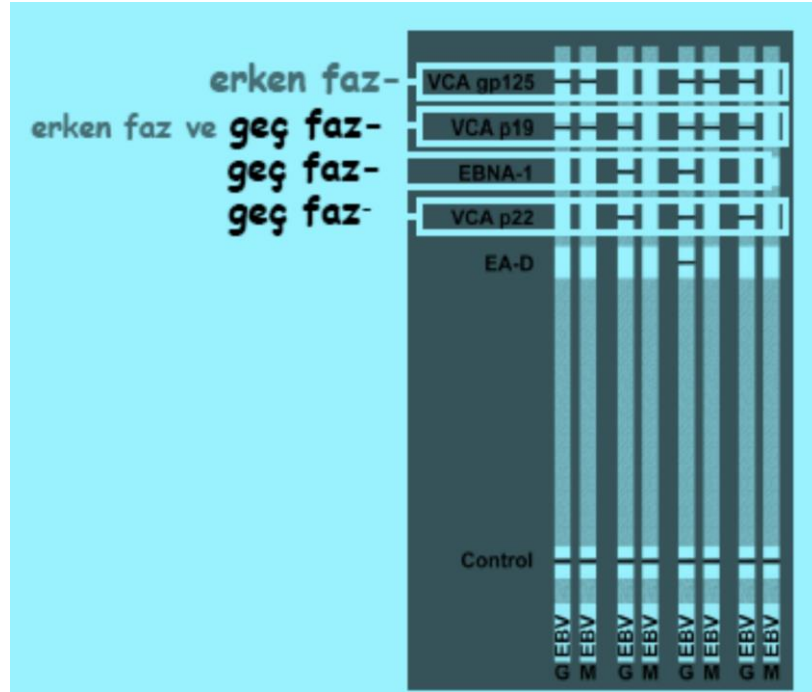
19. Kanaldaki solüsyon aspire edildi.

20. Kanala 1.5 mL distile su ilave edilerek 3 defa 1'er dakika çalkalayıcıda yıkandı.

21. Kanaldaki solüsyon aspire edildi.

22. Şeritler değerlendirme protokolüne göre yerleştirildi ve havada kuruyup nemi giderildikten sonra değerlendirildi.

Immunblot ile EBV spesifik anti-IgM/anti-IgG antikorlarının saptanmasında aynı test protokolü uygulandı; sadece enzim konjugat aşamasında immünglobülin izotipine uygun reaktif kullanıldı.



Şekil 3.2. Immunoblot testi sonuçlarının şematik görünümü (49).

Immunoblot sonuçlarına göre;

1. Seronegatif;
2. Akut enfeksiyon (anti-VCA IgM +, anti-VCA IgG +/-, anti-EBNA IgG -, anti-EA IgG +/-);
3. Geçirilmiş enfeksiyon (anti-VCA IgM -, anti-VCA IgG +, anti-EBNA IgG +, anti-EA IgG -)
4. Reaktivasyon (anti-VCA IgM +/-, anti-VCA IgG +, anti-EBNA IgG +, anti-EA IgG +) olmak üzere toplam dört grup EBV serolojisi belirlendi.



Şekil 3.3. Çalışmamız Immunoblot testi akut enfeksiyon serolojisi örneği.



Şekil 3.4. Çalışmamız Immunoblot testi geçirilmiş enfeksiyon serolojisi örneği.

3.2.4. Real-Time PCR

EBV enfeksiyonu tanısında Real-Time PCR cihazının avantajları geleneksel PCR yöntemi üzerinde olup geliştirilmiş duyarlılık, sinyalin gerçek zamanlı izlenmesini içermektedir ve kontaminasyon riskini azaltmaktadır (50).

Çalışmamızda kullanılan EBV Real-Time PCR Kiti (Bioneer, Kore); Exicycler™ 96 gerçek zamanlı kalitatif termal bloğu (Bioneer, Kore) kullanarak, klinik örneklerde EBV DNA'sının gerçek zamanlı kalitatif tespiti için hazır kullanımlı kittir.

Testte kullanılan gereçler:

1. ExiPrep16 Plus model tam otomatik nükleik asit ekstraksiyon sistemi (Bioneer, Kore).
2. ExiPrep viral DNA/RNA ekstraksiyon kiti (Bioneer, Kore).
3. ExiCycler 96 model Real-Time PCR cihazı (Bioneer, Kore).
4. ExiSpin model multi spin santrifüj cihazı (Bioneer, Kore).
5. EBV-1111 diagnostik kit (Bioneer, Kore).

EBV-1111 Diagnostik Kit'in içerisinde bulunan EBV premix tüp, EBV DNA'sının belirli genom bölgesi arttırmak için EBV spesifik primerler, çift etiketli florojenik prob, DNA polimeraz, dNTPs ve stabilizatörler de dahil olmak üzere, PCR reaksiyonu için tüm bileşenleri içerir. EBV patojen tespiti, belirli bir primer seti ve çift etiketli prob ile birlikte EBV toplam genomunun belirli RNA bölgelerinin güçlendirilmesi esasına dayanır. Primer setler ve prob biyoinformatik analiz tarafından EBV genomunun son derece korunmuş bölgesinden tasarlanmıştır.

Amplifiye edilmiş ürünlerin miktarı termal devir esnasında EBV'ye özgü prob (5'-FAM) floresan birikimi ile ölçülebilir.

Real-Time PCR testinin uygulanışı; öncelikle DNA izolasyonu, izole edilen DNA'nın denatürasyonu, amplifikasyonu ve sonuçların analizini içermektedir.

DNA İzolasyonu

Real-Time PCR için öncelikle serum örneklerinden viral DNA izole edildi. Bunun için ExiPrep viral DNA/RNA ekstraksiyon kiti kullanıldı.

1. Real-Time PCR testi için serum örnekleri çalışılmadan önce -70°C'den çıkartılıp buzdolabının uygun rafında bekletilerek çözülmesi sağlandı. Daha sonra oda ısısına getirildi.

2. Kitin içerisinden çıkan 1 ve 2 numaralı kartuşlar çalışılacak örnek sayısına göre (En az 1, en fazla 16 örnek) özel delgeçle delindi. Sadece 1 no'lu kartuşun örnek gözlerine 200 µL serum ilave edildi.

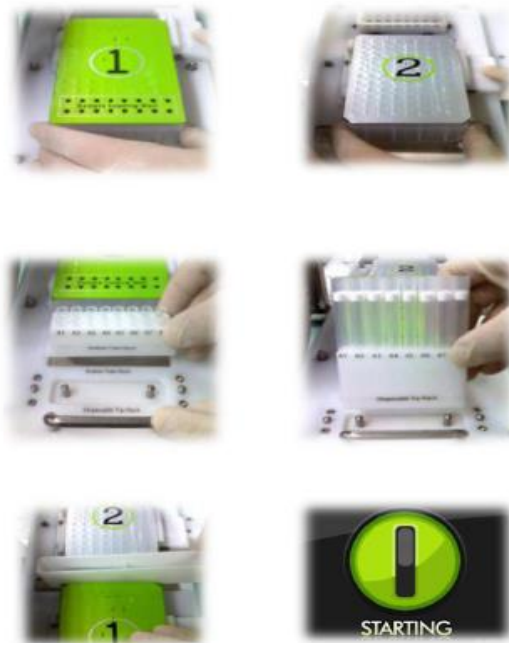
3. 1 ve 2 numaralı kartuşlar ekstraksiyon cihazı içinde belirtilen bölümlere konuldu ve tam olarak yerleştiğinden emin olundu.

4. Elüsyon tüpleri (0,2 ml'lik PCR tüpleri) ve pipet uçlarını ilgili raklarıyla plakanın yazıyla belirtilen bölümlerine yerleştirildi.

5. Atık kutusu yerleştirildi. Cihazın ön bölümdeki "AÇ" tuşuna basıldı ve güç bağlantısını tamamlandı.

6. 100 dakika sonunda 200 µL örnek kullanılarak 25 µL elüsyon hacminde EBV DNA'sı eppendorf tüplerinde elde edilmiş oldu.

7. Tek seferde 16 serum çalışılabildiği için yeterli sayıya ulaşılan kadar elde edilen DNA örnekleri numaralandırılarak -20°C'de saklandı.



Şekil 3.5. DNA izolasyonu (51).

DNA Denatürasyonu ve Amplifikasyonu

Çalışmada EBV-1111 Diagnostik Kit kullanıldı. 96 kit kapasiteli Bioneer marka ExiCycler 96 model Real-Time PCR Cihazı kullanıldı. Çalışma prosedürü şu şekildeydi:

1. Reaktifler ve DNA örnekleri derin dondurucudan çıkarılıp oda sıcaklığına (18°C-25°C) getirildi.
2. Kit içinde bulunan malzemeler; EBV pozitif kontrol DNA (standart), EBV premiks (8'li strip halinde), internal kontrol (IPC) DNA ve distile su.
3. Kitin içindeki malzemeler ve ekstrakte ettiğimiz DNA örnekleri vortekslendi ve kısa süre santrifüj edildi.
4. EBV premikslerin bulunduğu tüpler içerisine 1'er μL internal kontrol ilave edildi.
5. Standartlar (5 adet), internal kontrol eklenmiş premiks karışımına 5'er μL ilave edildi.
6. DNA örnekleri, internal kontrol eklenmiş premiks karışımına 10'ar μL ilave edildi.

7. Toplam hacimler 50 µL olacak şekilde (standart ilave edilen master mikserin üzerine 44 µL, DNA'ların ilave edildiği master mikserin üzerine 39 µL) distile su eklendi.

8. Kontaminasyonu önlemek için optik yapııştırıcı kapaklar ile tüpler kapatıldı.

9. Exispin cihazında reaksiyon tüpleri kuvvetlice vortekslendi ve santrifüj yapıldı. Hazırlanan reaksiyon karışımlarını tüplerin dibinde toplamak amacıyla sabit girdap için 20 sn /5 sn cfg. 2500 devir /7 döngü uygulandı.

10. Tüpler ExiCycler 96 model Real-Time PCR cihazı içerisine yerleştirildi.

11. Denatürasyon ve amplifikasyon işlemi cihazda gerçekleştirildi.

Tablo 3.1.'de EBV Real-Time PCR kiti için termal döngü koşulları verilmiştir.

Tablo 3.1. EBV Real-Time PCR kiti için termal döngü koşulları (52).

Döngü Basamakları	Yapılan İşlem	Sıcaklık	Zaman	Siklus Sayısı
1	Pre-denatürasyon	95°C	5 dakika	1
2	Denatürasyon	95°C	5 saniye	1
3	Bağlanma ve uzama	55°C	5 saniye	1
4	Tarama			1
5	Denatürasyon aşamasından itibaren tekrar döngüye başlangıç			45

12. Veriler ExiDiagnosis (Diagnostik Yazılım Versiyon 1.27.3) kontrol ve analiz yazılımı kullanılarak değerlendirildi.

Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bioneer marka ExiCycler 96 model Real-Time PCR cihazında Real-Time PCR yöntemi ile elde edilen ürünlerin analizinde 2 floresan boyadan (FAM, TAMRA) yararlanılır. Reaksiyon sırasında floresan yoğunluğunun monitörize edilmesi PCR ürünlerinin kantitatif olarak saptanmasını sağlar. EBV spesifik sinyaller FAM, internal kontrol spesifik sinyaller ise TAMRA kanalında saptanır.

Sonuçta FAM kanalında EBV DNA varlığı, TAMRA kanalında muhtemel PCR inhibisyonu kontrol edilir.

EBV pozitif kontrol DNA (standart)'ların eşik siklusuna (threshold cycle; CT) ve viral DNA konsantrasyonlarına göre standart eğri oluşturularak örneklerdeki viral DNA miktarı (kopya/mL) saptanır.

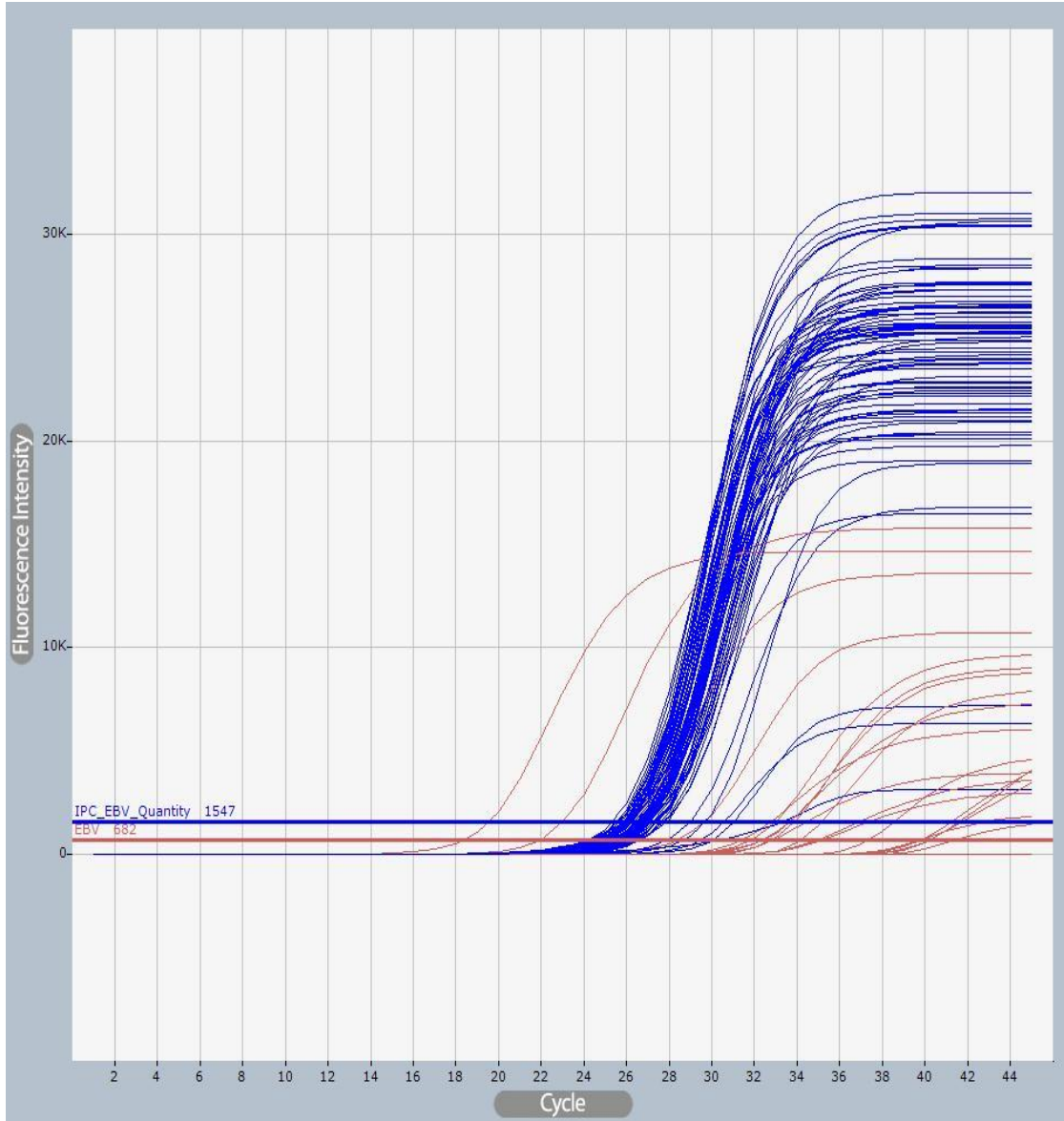
1. FAM floresan sinyal, örneklerde tespit edilmişse, bu örneklerin EBV DNA içerdiğini gösterir.

2. Eğer örneklerde FAM floresan sinyal yoksa, ama TAMRA floresan sinyal tespit edilmişse, bu örneklerin EBV DNA içermediğini gösterir.

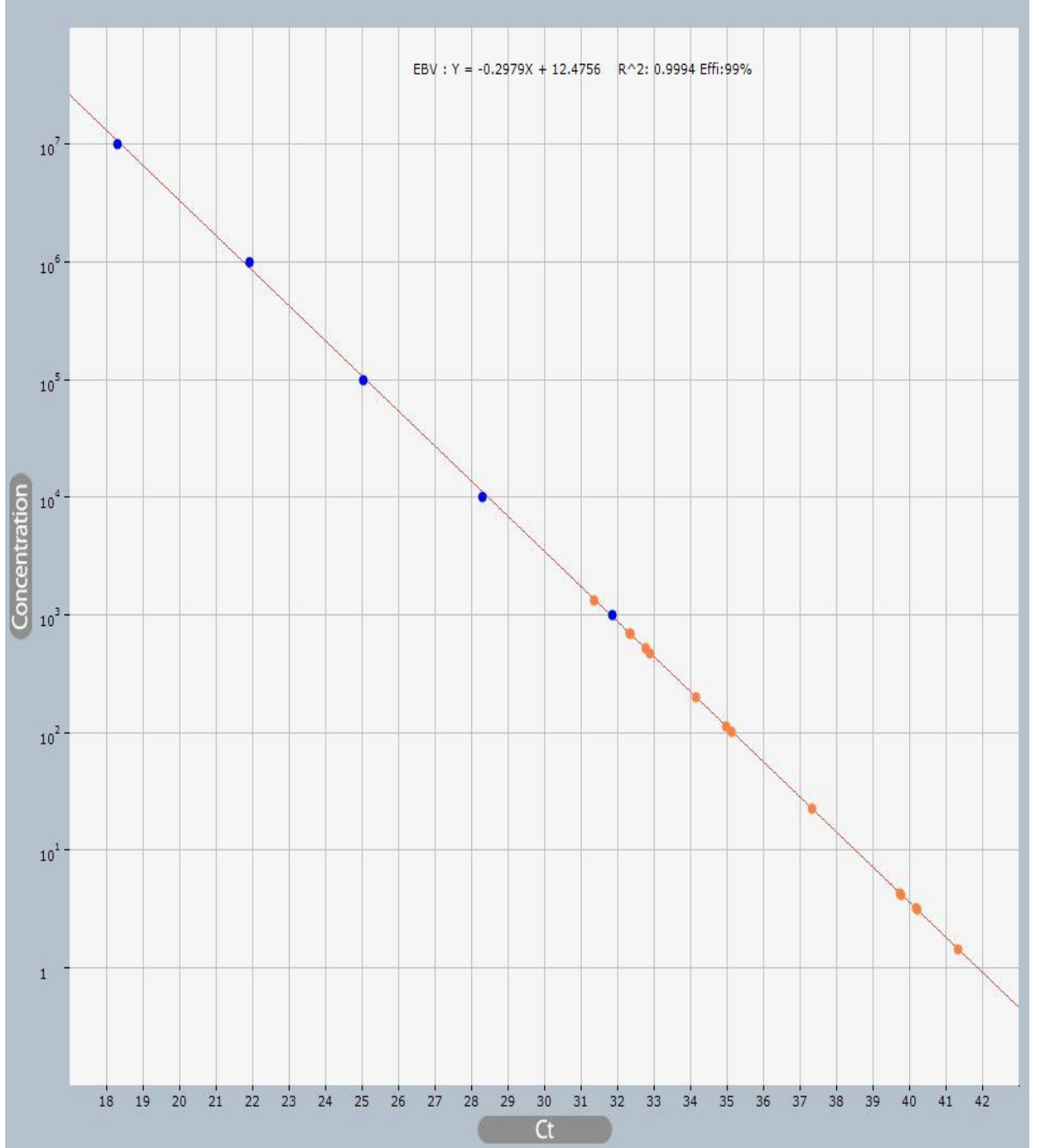
3. Hem örneklerde, hem de IPC de sinyal yoksa, hiçbir sonuca varılmamıştır. Bunun sebebi inhibisyon olabilir. Çalışmanın tekrar edilmesi uygundur. Tablo 3.2.'de Real-Time PCR veri analizi için örnek gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Real-Time PCR veri analizi için örnek (52)

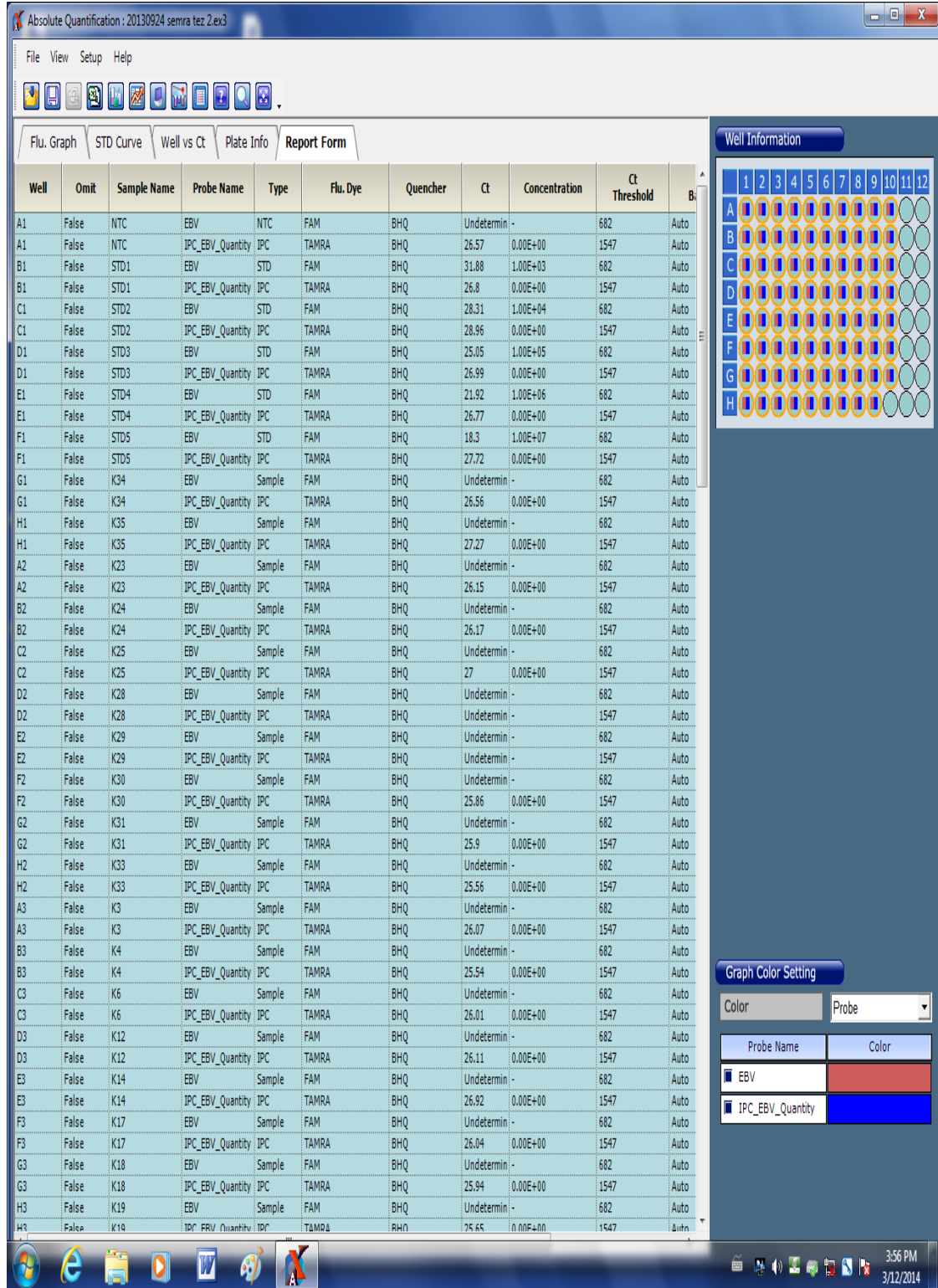
	FAM	TAMRA	SONUÇ
Cut-off değeri	<40 Ct	<35 Ct	Uygun
Pozitif kontrol	+	+	Uygun
Negatif kontrol	-	+	Uygun
Örnek	+	-	EBV DNA varlığı
Örnek	-	-	Tekrar



Şekil 3.6. Çalışmamızda Real-Time PCR cihazında kantitatif EBV-DNA sonuçlarının değerlendirilmesi.



Şekil 3.7. Çalışmamızda oluşan bir standart eğri.



Şekil 3.8. Çalışmamız EBV DNA (kopya/ ml) sonuçları.

4. BULGULAR

Çalışmamıza Şubat–Haziran 2013 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi pediatri ve/veya erişkin hematoloji kliniklerine başvuran EBV enfeksiyonu şüpheli 205 hasta dahil edilmiştir. Hasta grubunda pediatri bölümünden 190 hasta olup tüm hastaların % 92.7'sini oluşturmaktadır. 190 pediatik hasta içinde erkeklerin sayısı 106 (% 55.8), kadınların sayısı 84 (% 44.2) bulunmuştur. Pediatik grubun yaş ortalaması 87 ± 56 ay olup, en küçük hasta 7 aylık, en büyük hasta ise 216 (18 yaş) aylık'tır. Hematoloji bölümünden 15 hasta olup tüm hastaların % 7.3'ünü oluşturmaktadır. Hematoloji hastalarının 6 (% 40)'sı erkek, 9 (% 60)'u kadın hastadır. Yaş ortalaması 41.3 ± 16.5 yaş olup, en küçük yaş 19, en büyük yaş 66'dır. Kontrol grubu olarak hiçbir şikayeti olmayan çocuk ve erişkinlerden oluşan 35 kişi seçilmiştir. Bu grubun 16 (% 45.7)'sı erkek, 19 (% 54.3)'u kadındır. Çocuk grubunda 31 (% 88.5) kişi, erişkin grupta 4 (% 11.5) kişi vardır. Yaş ortalaması 11.2 ± 12 yaş olup, en küçük yaş 1, en büyük yaş 54'tür. Tablo 4.1.'de hasta ve kontrol gruplarının bölüm ve cinsiyete göre dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının bölüm ve cinsiyete göre dağılımı.

		Bölüm			Toplam
		Pediatric	Erişkin Hematoloji	Kontrol Grubu	
Cinsiyet	Erkek	106	6	16	128
	Kadın	84	9	19	112
Toplam		190	15	35	240

Klinik olarak EBV enfeksiyonundan boğaz ağrısı, ateş yüksekliği, servikal lenfadenopati, splenomegali/hepatomegali, vücutta döküntü, karaciğer enzim yükseklikleri gibi bulgular varlığı ile şüphelenilmiş olup, bu doğrultuda serolojik olarak EBV araştırılması istenmiştir. Hastaların 78 (% 38)'inde boğaz ağrısı, 82 (% 40)'sinde ateş yüksekliği, 68 (% 33.1)'inde lenfadenopati, 32 (% 15.6)'sinde splenomegali/hepatomegali, 24 (% 11.7)'ünde vücutta döküntü, 35 (% 17)'inde

karaciğer enzim yüksekliği saptanmıştır. Tablo 4.2.'de hasta ve kontrol grupları klinik bulgularının cinsiyet ve bölümlere göre dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grupları klinik bulgularının cinsiyet ve bölümlere göre dağılımı.

			Cinsiyet		Bölüm			Toplam	
			Erkek	Kadın	Pediyatri	Erişkin Hematoloji	Kontrol Grubu		
Klinik Bulgular	Boğaz Ağrısı	Var	43	35	73	5	0	78	
		Yok	85	77	117	10	35	162	
	Lenfadenopati	Var	40	28	59	9	0	68	
		Yok	88	84	131	6	35	172	
	Ateş Yüksekliği	Var	48	34	75	7	0	82	
		Yok	80	78	115	8	35	158	
	Karaciğer Enzim Yüksekliği	Var	20	15	32	3	0	35	
		Yok	108	97	158	12	35	205	
	Organomegali	Var	17	15	30	2	0	32	
		Yok	111	97	160	12	35	208	
	Vücutta peteşi/purpura	Var	10	14	23	1	0	24	
		Yok	118	98	167	14	35	216	
	Toplam			128	112	190	15	35	240

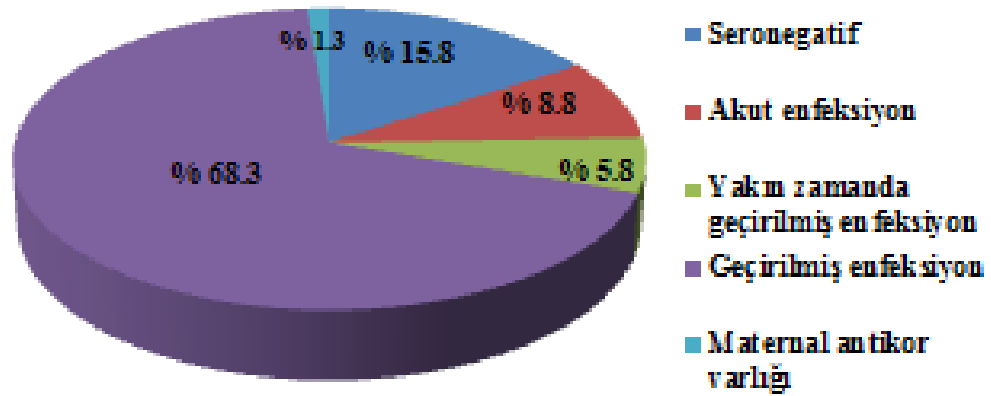
Hasta grubu 205 kişi ve kontrol grubu 35 kişi olmak üzere toplamda 240 kişide IFA referans yöntem olarak alınarak IFA, ELISA, Immunoblot testleri ile EBV enfeksiyonu serolojisi ve Real-Time PCR testi ile EBV DNA varlığı araştırılmıştır.

IFA referans yöntem ile elde edilen sonuçlar, EBV tanısı için belirlenen standartlar doğrultusunda sınıflandırılmıştır (23). Aynı zamanda bu serolojik evreler ile VCA IgG Avidite artışı arasındaki ilişki de araştırılmıştır. Tablo 4.3.'de IFA yöntemine göre EBV serolojik evrelemesi belirtilmiştir.

Tablo 4.3. IFA yöntemine göre EBV serolojik evrelemesi.

IFA Serolojik Evre	Anti-VCA IgM	Anti-VCA IgG	Anti-EBNA IgG	IFA Anti-VCA IgG Avidite			Toplam
				Negatif	Düşük	Yüksek	
Seronegatif	-	-	-	38	0	0	38
Akut enfeksiyon	+	+/-	-	0	21	0	21
Yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon	-	+	-	0	5	9	14
Geçirilmiş enfeksiyon	-	+	+	0	11	153	164
Maternal antikör varlığı	-	+/-	+/-	1	0	2	3
Toplam				39	37	164	240

IFA testine göre serolojik olarak, 38 (% 15.8) seronegatif, 21 (% 8.8) akut enfeksiyon, 14 (% 5.8) yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon, 164 (% 68.3) geçirilmiş enfeksiyon ve 3 (% 1.3) maternal antikör varlığı bulunmuştur.



Şekil 4.1. IFA yöntemine göre EBV serolojik profili dağılımları.

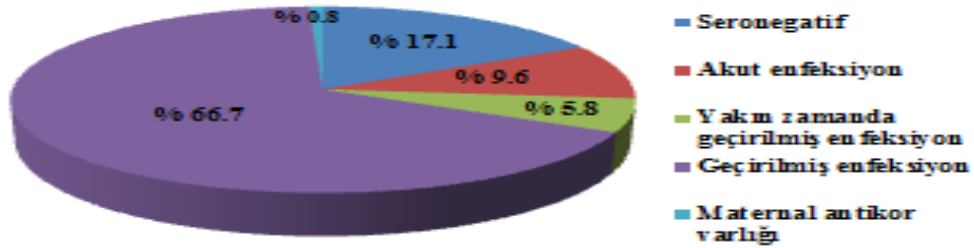
ELISA tanı yöntemiyle elde edilen sonuçlar, EBV tanısı için belirlenen standartlar doğrultusunda sınıflandırılmışlardır. ELISA testi ile evreleme yapılırken anti-VCA IgM ve anti-VCA IgG birlikte pozitifliklerinde ve anti-VCA IgG ve anti-

EA IgG birlikte pozitifliklerinde, akut enfeksiyon/yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon/reaktivasyon ayırımında yardımcı olması amacıyla, VCA IgG avidite testi çalışılmıştır. Buna göre 30 serum örneğinde anti-VCA IgG avidite çalışılmış olup 15'inde düşük, 13'ünde yüksek, 2'sinde de ara avidite değerleri bulunmuştur. 210 hastada anti-VCA IgG avidite çalışılmamıştır. Tablo 4.4.'de ELISA yöntemine göre EBV serolojik evrelemesi sunulmuştur.

Tablo 4.4. ELISA yöntemine göre EBV serolojik evrelemesi.

ELISA Serolojik Evre	ELISA Anti-VCA IgG Avidite				Toplam
	Düşük	Ara Değer	Yüksek	Çalışılmadı	
Seronegatif	0	0	0	41	41
Akut enfeksiyon	15	2	2	4	23
Yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon	0	0	1	13	14
Geçirilmiş enfeksiyon	0	0	10	150	160
Maternal antikor varlığı	0	0	0	2	2
Toplam	15	2	13	210	240

ELISA sonuçlarına göre 41 (% 17.1) seronegatif, 23 (% 9.6) akut enfeksiyon, 14 (% 5.8) yakın zamanda geçirilmiş ve 160 (% 66.7) geçirilmiş enfeksiyon ve 2 (% 0.8) maternal antikor varlığı saptanmıştır.



Şekil 4.2. ELISA yöntemine göre EBV serolojik profili dağılımları.

Elde edilen bu sınıflandırma daha sonra referans test IFA sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. ELISA/IFA uyum oranları seronegatiflik için 38/38 (% 100), akut enfeksiyon için 20/21 (% 95.2), yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon için 8/14 (% 57.1), geçirilmiş enfeksiyon için 157/164 (% 95.7) ve maternal antikor varlığı için ise 2/3 (% 66.6) olarak bulunmuştur. Tablo 4.5.'de ELISA yöntemiyle elde edilen evrelerin IFA yöntemiyle elde edilen evrelerle karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 4.5. ELISA yöntemiyle elde edilen evrelerin IFA yöntemiyle elde edilen evrelerle karşılaştırılması.

ELISA Serolojik Evre	IFA Serolojik Evre					Toplam
	Seronegatif	Akut enfeksiyon	Yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon	Geçirilmiş enfeksiyon	Maternal antikor varlığı	
Seronegatif	38	0	1	1	1	41
Akut enfeksiyon	0	20	2	1	0	23
Yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon	0	1	8	5	0	14
Geçirilmiş enfeksiyon	0	0	3	157	0	160
Maternal antikor varlığı	0	0	0	0	2	2
Toplam	38	21	14	164	3	240

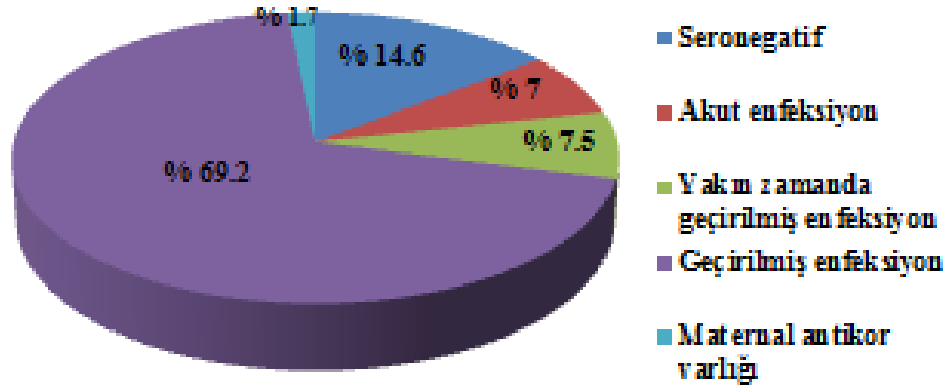
Anti-VCA IgM, anti-VCA IgG ve anti-EBNA IgG ve anti-EA IgG antikorlarının her biri için duyarlılık ve özgüllük oranları ayrı ayrı hesaplanarak ELISA testinin performansı tek parametre bazında değerlendirilmiştir. Tablo 4.6.'da ELISA yöntemiyle elde edilen sonuçların IFA yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması sunulmuştur.

Tablo 4.6. ELISA yöntemiyle elde edilen sonuçların IFA yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması.

ELISA		IFA		ELISA			
		Pozitif	Negatif	Duyarlılık	Özgüllük	Pozitif Prediktif Değer	Negatif Prediktif Değer
Anti-VCA IgM	Pozitif	21	9	84	95.8	70	98.1
	Negatif	4	206				
Anti-VCA IgG	Pozitif	194	1	96.5	97.4	99.5	84.4
	Negatif	7	38				
Anti-EBNA IgG	Pozitif	154	9	92.2	87.7	94.5	83.1
	Negatif	13	64				
Anti-EA IgG	Pozitif	8	2	26.7	99	80	90.4
	Negatif	22	208				

ELISA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla anti-VCA IgM için % 84 ve % 95.8, anti-VCA IgG için % 96.5 ve % 97.4, anti-EBNA IgG için % 92.2 ve % 87.7, anti-EA IgG için ise % 26.7 ve % 99 bulunmuştur. En yüksek duyarlılık anti-VCA IgG antikoruna için bulunurken, en düşük değer anti-EA IgG antikoruna için bulunmuştur. Özgüllük için en yüksek değer anti-EA IgG antikoruna için bulunmuşken, en düşük değer anti-EBNA IgG için bulunmuştur.

Çalışmada bir diğer test olan Immunoblot yöntemiyle alınan sonuçlar da EBV tanısı için belirlenen standartlar doğrultusunda sınıflandırılmıştır. Immunoblot yöntemi sonuçlarına göre 35 (% 14.6) seronegatif, 17 (% 7) akut enfeksiyon, 18 (% 7.5) yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon ve 166 (% 69.2) geçirilmiş enfeksiyon ve 4 (% 1.7) maternal antikor varlığı saptanmıştır.



Şekil 4.3. Immunoblot yöntemine göre EBV serolojik profili dağılımları.

Immunoblot yöntemiyle elde edilen evrelerin uyumu referans test olan IFA sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Immunoblot/IFA uyum oranları seronegatiflik için 34/38 (% 89.4), akut enfeksiyon için 14/21 (% 66.6), yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon için 4/14 (% 28.5), geçirilmiş enfeksiyon için 156/164 (% 95.1) ve maternal antikor varlığı için ise 3/3 (% 100) olarak bulunmuştur. Tablo 4.7.'de Immunoblot yöntemiyle elde edilen evrelerin IFA yöntemiyle elde edilen evrelerle karşılaştırılması belirtilmiştir.

Tablo 4.7. Immunoblot yöntemiyle elde edilen evrelerin IFA yöntemiyle elde edilen evrelerle karşılaştırılması.

IMMUNO-BLOT	IFA					Toplam
	Seronegatif	Akut enfeksiyon	Yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon	Geçirilmiş enfeksiyon	Maternal antikor varlığı	
Seronegatif	34	0	0	1	0	35
Akut Enfeksiyon	0	14	2	1	0	17
Yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon	1	7	4	6	0	18

Tablo 4.7. Immunoblot yöntemiyle elde edilen evrelerin IFA yöntemiyle elde edilen evrelerle karşılaştırılması (Devam)

Geçirilmiş enfeksiyon	2	0	8	156	0	166
Maternal antikor varlığı	1	0	0	0	3	4
Toplam	38	21	14	164	3	240

Anti-VCA IgM, anti-VCA IgG, anti-EBNA IgG ve anti-EA IgG antikorlarının her biri için duyarlılık ve özgüllük oranları ayrı ayrı hesaplanarak Immunoblot testinin performansı tek parametre bazında değerlendirilmiştir. Tablo 4.8.'de Immunoblot yöntemiyle elde edilen sonuçların IFA yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 4.8. Immunoblot yöntemiyle elde edilen sonuçların IFA yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması.

IMMUNOBLOT		IFA		IMMUNOBLOT			
		Pozitif	Negatif	Duyarlılık	Özgüllük	Pozitif Prediktif Değer	Negatif Prediktif Değer
Anti-VCA IgM	Pozitif	21	16	84	92.6	56.8	98
	Negatif	4	199				
Anti-VCA IgG	Pozitif	200	7	99.5	82.1	96.6	97.0
	Negatif	1	32				
Anti-EBNA IgG	Pozitif	161	24	96.4	67.1	87	89.1
	Negatif	6	49				
Anti-EA IgG	Pozitif	21	34	70	83.8	38.2	95.1
	Negatif	9	176				

Immunoblot yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla anti-VCA IgM için % 84 ve % 92.6, anti-VCA IgG için % 99.5 ve % 82.1, anti-EBNA IgG için % 96.4 ve % 67.1, anti-EA için ise % 70 ve % 83.8 olarak bulunmuştur. En yüksek duyarlılık anti-VCA IgG antikoru için bulunurken, en düşük anti-EA IgG antikoru için bulunmuştur. Özgüllük için en yüksek değer anti-VCA IgM antikoru için bulunurken, en düşük değer anti-EBNA IgG için bulunmuştur.

EBV enfeksiyonunun serolojik evrelemesi IFA, ELISA ve Immunoblot yöntemleriyle yapılarak, EBV viral DNA varlığı Real-Time PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Her üç test ile seronegatiflik saptanan 29 (% 12.1) kişide Real-Time PCR testi çalışılmamıştır. Yüz doksan dokuz (% 82.9) kişide EBV DNA saptanmamıştır. On iki (% 5) kişide ise EBV DNA saptanmıştır. Tablo 4.9.'da IFA, ELISA ve Immunoblot testleri ile evre bazında Real-Time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi sunulmuştur.

Tablo 4.9. IFA, ELISA ve Immunoblot testleri ile evre bazında Real-Time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi.

		Real-Time PCR			Toplam
		Saptanmadı	Saptandı	Çalışılmadı	
IFA	Seronegatif	9	0	29	38
	Akut enfeksiyon	10	11	0	21
	Yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon	14	0	0	14
	Geçirilmiş enfeksiyon	163	1	0	164
	Maternal antikor varlığı	3	0	0	3
ELISA	Seronegatif	12	0	29	41
	Akut enfeksiyon	12	11	0	23
	Yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon	14	0	0	14
	Geçirilmiş enfeksiyon	159	1	0	160
	Maternal antikor varlığı	2	0	0	2

Tablo 4.9. IFA, ELISA ve Immunoblot testleri ile evre bazında Real-Time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi (Devam).

		Real-Time PCR			Toplam
		Saptanmadı	Saptandı	Çalışılmadı	
IMMUNOBLOT	Seronegatif	8	0	27	35
	Akut enfeksiyon	8	9	0	17
	Yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon	16	2	0	18
	Geçirilmiş enfeksiyon	165	1	0	166
	Maternal antikor varlığı	2	0	2	4
Toplam		199	12	29	240

EBV DNA'nın pozitif saptandığı 12 kişide viral yük miktarları testlere göre evre bazında değerlendirilmiştir. Tablo 4.10.'da Real-Time PCR pozitifliklerinin testlerine göre evre bazında dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 4.10. Real-Time PCR pozitifliklerinin testlerine göre evre bazında dağılımı.

Real-Time PCR Viral yük (kopya/ml)	IFA Evre	ELISA Evre	IMMUNOBLOT Evre
92	Geçirilmiş	Geçirilmiş	Geçirilmiş
96.9	Akut	Akut	Akut
283	Akut	Akut	Akut
1120	Akut	Akut	Akut
2470	Akut	Akut	Akut
5440	Akut	Akut	Akut
6450	Akut	Akut	Akut
6450	Akut	Akut	Yakın zamanda geçirilmiş
8550	Akut	Akut	Akut

Tablo 4.10. Real-Time PCR pozitifliklerinin testlerine göre evre bazında dağılımı
(Devamı).

Real-Time PCR Viral yük (kopya/ml)	IFA Evre	ELISA Evre	IMMUNOBLOT Evre
8730	Akut	Akut	Akut
10300	Akut	Akut	Akut
16700	Akut	Akut	Akut

5. TARTIŞMA

EBV virusu çoğu toplumda endemik olarak bulunan önemli bir patojendir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, yetişkin nüfusun yaklaşık % 95'i EBV ile karşılaşmıştır. Gelişmiş ülkelerde maruziyet daha çok gençlerde olup % 50 ile % 70 arasındadır. Enfeksiyonların çoğu asemptomatik veya küçük üst solunum yolu enfeksiyonları şeklinde geçse de % 30 gibi bir oranda ergenlikte ve çocuklukta primer enfeksiyon EM şeklinde geçer. EBV ile ilişkili EM, genellikle oldukça iyi huylu bir hastalık olmasına rağmen, özellikle genç erişkinlerde okul gibi kalabalık alanlarda yüksek bulaştırıcılık nedenidir. Nadir durumlarda spontan dalak rüptürü, fulminan hepatit veya otoimmün hemolitik anemi gibi ciddi sağlık riskleri oluşturabilir. Pek çok viral, bakteriyel, parazitik ve immünolojik hastalık EM belirtilerini taklit edebilir (4). Primer enfeksiyondan sonra EBV latent faza geçebilir ve daha sonra konağın immünolojik durumuna göre reaktivasyon gözlemlenebilir. Reaktivasyonda genellikle asemptomatik olarak virus çoğalması ve atılımı olmaktadır. Nadir durumlarda, çoğunlukla AIDS hastaları ve transplant alıcılarındaki gibi T hücre bağışıklık sistemi zayıf kişilerde reaktivasyon EBV ilişkili lenfoproliferatif bozukluklar gibi klinik belirtiler ile ilişkilidir. Ayrıca, EBV güçlü bağışıklık sistemi olan bireylerde BL ve NFK ile de ilişkilidir (43). Bu gibi nedenlerden dolayı ve ayırıcı tanıda önemli olması nedeniyle EBV'nin erken ve doğru tanısı oldukça önemlidir.

EBV enfeksiyonu varlığında, periferik yaymada atipik lenfositlerin varlığı EM tanısını destekler, ancak her olguda rastlanmaz. Heterofil antikorlar ve EBV antijenlerine karşı spesifik antikorların tespitinin EBV enfeksiyonu tanısında yararlı olduğu kanıtlanmıştır (53). Paul-Bunnell heterofil aglütinasyon testi akut EBV enfeksiyonu laboratuvar tanısında kullanılabilir ancak bazı sınırlamaları vardır. Enfeksiyonu erken döneminde saptamada duyarlılığı düşüktür. Özgüllüğü ise özellikle küçük çocuklarda düşüktür. Diğer viral ve non-viral hastalık ve bazı immünolojik olaylar ile çapraz reaktiviteden etkilenebilir (4). EM şüpheli hastalardan yapılan bir çalışmada heterofil antikorların enfeksiyonu saptamadaki duyarlılığı % 83-87 ve özgüllüğü ise % 97 arasında bulunmuştur (8).

Atipik lenfositöz ve heterofil antikorların bulunmadığı ama EBV enfeksiyonundan şüphelenilen durumlarda EBV antijenlerine karşı oluşan özgül

antikorların saptanması tanıda oldukça yararlıdır (40). EBV antijenlerine yönelik spesifik serolojik testler EBV enfeksiyonunu tanımlamak ve diğer mononükleoza neden olan enfeksiyonların ayırt edilmesinde kullanılır. Anti-VCA IgM, anti-VCA IgG ve anti-EBNA IgG antikorları olmak üzere sadece 3 parametreye bakılarak EBV enfeksiyonunun primer ve geçirilmiş olduğunun tanısı çoğunlukla yapılabilmektedir. Büyük olasılıkla, anti-VCA IgM ve anti-VCA IgG varlığı, anti-EBNA IgG yokluğu akut enfeksiyon, anti-VCA IgG ve anti-EBNA IgG varlığı, anti-VCA IgM yokluğu geçirilmiş enfeksiyon lehinedir (54).

Anti-VCA IgM ve anti-EBNA IgG'nin olmadığı sadece anti-VCA IgG'nin olduğu durumlarda veya her üç parametrenin bulunduğu durumlarda serolojik olarak akut, geçirilmiş veya reaktivasyon gibi enfeksiyon tanımlamalarını yapmak zor olabilir. İzole anti-EBNA IgG varlığı da şüphe uyandırabilir. Bu gibi profilleri yorumlamak için, Immunoblot testi ile anti-IgM ve anti-IgG antikorlarını belirleme, anti-VCA IgG avidite ve anti-EA/D antikorları saptama, moleküler yöntemlerle viral genom tayini yapılabilir. Bu testler olası enfeksiyon durumunu tanımlamak ve rutin laboratuvar uygulamada ortaya çıkabilecek sorunları çözmek için yararlı olabilir (54).

EBV gibi önemli bir viral etkenin varlığını etkin ve doğru tanımlamada birden fazla kriter değerlendirilmekte olup, değerlendirme sürecinde de birden fazla yöntem kullanılabilir. Bu yüzden kullanılan yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, pratikte kullanılabilirliği, maliyeti ve standardizasyonu da uygun sınırlar içerisinde olmalıdır (55).

Duyarlılık ve özgüllük açısından bir yöntemin incelenebilmesi için araştırılan hastalık veya parametre için "altın standart" olarak kabul gören bir referans yönteme ihtiyaç duyulmaktadır (55). IFA testi EBV enfeksiyonunu tanımlamada substrat olarak EBV enfekte lenfositleri kullanan duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir testtir ve tanıda altın standart olarak kullanılmaktadır (4).

Bu çalışmaya, EM şüpheli erişkin ve çocuklardan oluşan 205 hasta ile kontrol grubu olarak hiçbir şikayeti olmayan 35 kişi olmak üzere toplam 240 kişi dahil edilmiştir. Bu kişilerin serum örneklerinde EBV tanı kriterlerini esas alarak ve altın standart olan IFA testi referans kabul edilerek, IFA, ELISA, Immunoblot yöntemleri ile EBV enfeksiyonu serolojisi ve Real-Time PCR testi çalışılmış, özgül

antikorlar ve EBV DNA varlığı araştırılmıştır. Daha sonra bu testlerle elde edilen sonuçlar altın standart olan IFA ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış, duyarlılık ve özgüllük hesaplanmıştır.

Çalışmaya aldığımız hastalar boğaz ağrısı, ateş yüksekliği, servikal lenfadenopati, splenomegali/hepatomegali, vücutta döküntü, karaciğer enzim yükseklikleri gibi bulgular nedeniyle EBV enfeksiyonu şüphesi olan hastalar olup, bu doğrultuda serolojik olarak EBV araştırılması istenmiştir. Hastaların 78 (% 38)'inde boğaz ağrısı, 82 (% 40)'sinde ateş yüksekliği, 68 (% 33.1)'inde lenfadenopati, 32 (% 15.6)'sinde splenomegali/hepatomegali, 24 (% 11.7)'ünde vücutta döküntü, 35 (% 17)'inde karaciğer enzim yüksekliği saptanmıştır. Grotto ve arkadaşlarının 590 EM şüpheli hastada yaptıkları bir çalışmada hastaların % 83.3'ünde boğaz ağrısı, % 79'unda ateş yüksekliği, % 36.7'sinde hepatomegali, % 53.3'ünde splenomegali, % 88.9'unda lenfadenopati, % 57.9'unda ise karaciğer enzim yüksekliği bildirilmiştir (56). Saldana ve arkadaşlarının 163 EM'li Meksikalı çocuk hastada yaptıkları çalışmada hastaların % 55.2'sinde farenjit, % 79.7'sinde ateş yüksekliği, % 89.5'inde lenfadenopati, % 47.2'sinde hepatomegali, % 36.8'inde splenomegali, % 16.5'inde döküntü, % 30.9'unda transaminaz yüksekliği bildirilmiştir (57).

Cengiz ve arkadaşları 2010 yılında Türk çocuklarında EM'nin klinik ve demografik özelliklerini araştıran çalışma yapmışlardır. Bu çalışmaya alınan anti-VCA IgM pozitifliği olan 44 çocuğun % 25'inde boğaz ağrısı, % 43.1'inde ateş yüksekliği, % 79.5'inde lenfadenopati, % 81.8'inde splenomegali/hepatomegali, % 20.4'ünde vücutta döküntü ve % 90.4'ünde ise karaciğer enzim yüksekliği varlığını bildirmişlerdir (58). Yine Türkiye'de Çeltik ve arkadaşlarının yaptıkları benzer bir çalışmada, hastaların % 84.6'sında yüksek ateş, % 88.4'ünde tonsillofarenjit, % 94.2'sinde lenfadenopati, % 59.6'sında hepatomegali, % 76.9'unda splenomegali, % 26.9'unda karaciğer enzim yüksekliği raporlanmıştır (59). Bizim çalışmamızda elde edilen oranlar diğer çalışmalara göre düşük bulunmuştur. Bunun sebebinin, klinikten laboratuvarımıza gönderilen örneklerde enfeksiyöz mononükleoz tanısını doğrulamanın yanında, bazı klinik durumlarda hastada EM'yi ekarte etmek amaçlı tanı testlerinin çalışılmasının istenilmesi olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda; öncelikle IFA yöntemiyle anti-VCA IgM, anti-VCA IgG ve anti-EBNA IgG ve anti-EA IgG antikorlarının varlığını değerlendirdik.

IFA testine göre çalıştığımız 240 kişinin 25 (% 10.4)'inde anti-VCA IgM pozitifliği, 201 (% 83.8)'inde anti-VCA IgG pozitifliği, 167 (% 69.6)'sinde anti-EBNA IgG pozitifliği ve sadece 30 (% 12.5) örnekte anti-EA IgG pozitifliği saptanmıştır.

Çalışmaya alınan 205 hastada IFA altın standart testine göre anti-VCA IgM pozitifliği 25 (% 11.6) kişide, anti-VCA IgG pozitifliği 171 (% 79.5) kişide, anti-EBNA IgG pozitifliği 139 (% 64.7) kişide ve anti-EA IgG pozitifliği 28 (% 13.2) kişide saptanmıştır.

Özkan ve arkadaşlarının 2010 yılında Elazığ ve çevresinde farklı yaş gruplarından 540 kişide ELISA yöntemiyle yapmış oldukları çalışmada, anti-VCA IgG seropozitifliği % 96.3 ve % 100 arasında bulunmuştur (6). Öztürk ve arkadaşlarının 1996 yılında İstanbul'da 305 immün yetmezliği olmayan çocukta EBV ve CMV prevalansını araştırdıkları bir çalışmada anti-VCA IgG pozitifliği % 61.1 olarak bildirilmiştir (60). Feyzioğlu ve arkadaşlarının 2011 yılında farklı yaş gruplarında EM şüpheli 100 hastada yaptıkları çalışmada anti-VCA IgG seropozitifliği % 83 olarak raporlanmıştır (61). Fidan ve arkadaşlarının 2005 yılında değişik yaş gruplarında EM şüpheli 70 hasta ile yaptıkları çalışmada anti-VCA IgG seropozitifliği % 91.4 olarak bildirilmiştir (62). Altuğlu ve arkadaşlarının Ege Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na EBV serolojisi çalışılması için gönderilen farklı yaş gruplarındaki 45 kişide yaptıkları çalışmada anti-VCA IgG seropozitifliği IFA testi ile % 82.2 olarak rapor edilmiştir (63). Bizim çalışmamızda ise bu oran % 83.8 bulunmuş olup bir çalışma hariç (Öztürk ve ark.) diğer çalışmalarla benzer pozitifliklerde bulunmuştur. Bu da anti-VCA IgG antikörlerin enfeksiyonun ilk aşamalarından itibaren oluşup enfeksiyon geçirildikten sonra da pozitif kalmasıyla açıklanabilir.

Anti-VCA IgM akut primer enfeksiyonun erken tanısı için en doğru ve yararlı bir araç olup enfeksiyon başladıktan sonra genellikle 3 ay içerisinde kaybolmaktadır (9). Çalışmamızda IFA yöntemiyle 240 kişinin 25 (% 10.4)'inde anti-VCA IgM pozitifliği saptanmış olup anti-VCA IgG antikoru pozitifliği ile birlikte değerlendirdiğimizde 21 (% 8.8)'inin akut enfeksiyon olduğu düşünülmüştür.

Altuğlu ve arkadaşları EBV enfeksiyonu şüpheli 45 kişi ile yaptıkları çalışmada anti-VCA IgM pozitifliğini % 16.2 olarak raporlamışlardır (63). Huang ve

arkadaşları 317 Çinli EM şüpheli çocukta yaptıkları bir çalışmada anti-VCA IgM pozitifliğini % 29.9 bildirmişlerdir (64). Aynı oranı Fidan ve arkadaşları % 10 (62), Feyzioğlu ve arkadaşları ise % 2 (61) olarak belirtmişlerdir. Bu şekilde farklı sonuçların elde edilmesi enfeksiyon başlangıcı ile çalışma arasında geçen sürenin uzunluğu ile açıklanabilir. Çünkü anti-VCA IgM antikoru uzun ömürlü olmayıp bir süre sonra kaybolmaktadır (9).

Anti-VCA IgM varlığının özgüllüğünün belirlenmesi de önemlidir çünkü romatoid faktör ve otoantikolar spesifik olmayan sonuçlara neden olabilirler ya da CMV veya Parvovirus B19 gibi viruslar ile çapraz reaksiyon gözlenebilir (54). Çalışmamızda 4 hastada IFA yöntemiyle elde edilmiş olan anti-VCA IgM pozitifliğine anti-VCA IgG ile beraber anti-EBNA IgG varlığı da eşlik etmekteydi. Anti-EA IgG'ler ise negatifti. ELISA ve Immunoblot yöntemleri ile serolojik olarak geçirilmiş enfeksiyon ile uyumluydu. Yapılan Real-Time PCR ile viral yük saptanmadı. Hastaların yaşları sırasıyla 2,3,4 ve 10 idi. Bu hastaların çocuk olgular olmaları nedeniyle IFA ile reaktivasyonu gösterebilmesine rağmen, diğer parametreler ile birlikte değerlendirilerek bu hastalardaki anti-VCA IgM pozitifliklerini VCA IgM persistansı olarak yorumladık. IFA altın standart yöntem olmasına rağmen bazı durumlarda tek başına yeterli olmayıp, ELISA, Immunoblot ve moleküler yöntemler gibi ilave testlere gereksinim duyulmaktadır (54).

Anti-EBNA IgG tespiti serolojik profilin belirlenmesinde nadir de olsa zorluklar olsa da, EBV enfeksiyonu tanımlama testlerinde değerli bir bileşen olarak kabul edilir. Anti-VCA IgM'in varlığı ile beraber anti-EBNA IgG'nin yokluğu akut enfeksiyon, anti-EBNA IgG'nin varlığı ise genellikle geçirilmiş enfeksiyon lehinedir (4). Çalışmamızda anti-EBNA IgG seropozitifliği 167 (% 69.6) hastada saptanmıştır. Anti-EBNA IgG pozitifliğini Fidan ve arkadaşları % 78.6 (62), Feyzioğlu ve arkadaşları ise % 47 (61) olarak raporlamışlardır. Dohno ve arkadaşlarının farklı yaş gruplarında, birer ay arayla dört farklı zamanda tekrarladıkları, 104 çocuğu içeren çalışmada, enfeksiyonun başlamasından itibaren zaman ilerledikçe anti-EBNA IgG antikoru seropozitiflikleri oranlarının arttığını saptamışlardır. İlk 3 hafta seropozitiflik % 0 - % 5.9 iken, 29 hafta ve sonrasında en az % 64.7, en fazla % 91.5 olarak bildirilmiştir (65). Bu da anti-EBNA IgG'lerin enfeksiyonun geç dönemlerinde oluştuğu düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda da IFA referans

testine göre, 167 anti-EBNA IgG pozitifliğinin 159 (% 95.2)'u geçirilmiş enfeksiyon şeklinde yorumlanmıştır.

Altuğlu ve arkadaşları EBV enfeksiyonu şüpheli 45 hastada yaptıkları çalışmada anti-EA seropozitifliğini %20 (63), Fidan ve arkadaşları % 24.2 (62), Fung ve arkadaşları % 49 (66) olarak rapor etmişlerdir. Dohno ve arkadaşları ise en yüksek seropozitiflik oranlarını enfeksiyon başlangıcı sonrası 4-8 hafta (% 63.6) ve 9-28 hafta (% 47.1) arasında saptamışlardır (65). Çalışmamızda 12'si akut enfeksiyon, 3'ü yakın zamanda geçirilmiş ve 15'i de geçirilmiş enfeksiyon olmak üzere 30 (% 12.5) kişide anti-EA seropozitifliği saptadık. Bu değer düşük seropozitiflik olup diğer çalışmalarla uyumlu bulunmamıştır. Bu da EBV enfeksiyonu değerlendirmesini yaparken tek başına anti-EA IgG varlığını araştırmanın yararlı olmadığını göstermektedir (40). Anti-EA IgG'nin özellikle NFK'lı olgularda ise yüksek titrelere çıkabileceği gösterilmiştir (67). Anti-EA IgG'nin immün yetmezliği olan olgulardaki reaktivasyon durumlarında da saptanabileceği bildirilmiştir (40).

Çalışmamızda IFA referans yöntemine göre EBV tanı kriterleri doğrultusunda anti-VCA IgM, anti-VCA IgG ve anti-EBNA IgG antikoru varlığı değerlendirildiğinde; 38 (% 15.8) seronegatif, 21 (% 8.8) akut enfeksiyon, 14 (% 5.8) yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon, 164 (% 68.3) geçirilmiş enfeksiyon saptanmış olup reaktivasyona rastlanmamıştır. Hasta grubu içerisinde iki adet 7 aylık ve bir adet de 8 aylık olan 3 hastanın, 2'sinde sadece anti-VCA IgG pozitifliği, 1'inde ise anti-VCA IgG ve anti-EBNA IgG birlikte pozitifliği bulunmuştur. Anneden bebeğe geçen antikoruların çoğunlukla 4 aylıkken azalmaya başladığı, 8 aydan sonra ise tespit edilemediği bildirilmektedir (68). Biz de bu üç (% 1.3) hastayı, hem yaşları, hem de enfeksiyonu düşündürecek anti-VCA IgM ve anti-EA IgG antikoru olmaması nedeniyle maternal antikor varlığı olarak değerlendirdik.

IFA referans yöntemine göre 205 kişiden oluşan hasta grubumuzda 33 (% 15.3) kişi seronegatif, 21 (% 9.8) kişi akut enfeksiyon, 13 (% 6) kişi yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon, 135 (% 62.8) kişi geçirilmiş enfeksiyon, 3 (% 1.4) kişi maternal antikor varlığı olarak yorumlanmıştır.

Çalışmamızda hem IFA, hem de ELISA yöntemi ile anti-VCA IgG avidite testi de çalışılmıştır. Bu test anti-VCA IgG antikoru varlığının olgunlaşma derecesini değerlendirmede kullanılarak enfeksiyon evrelendirmesini belirlerken yardımcı

olmaktadır (54). Çalışmamızda, akut enfeksiyon olarak değerlendirilmiş 21 örneğin 21 (% 100)'inde ve yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon olarak değerlendirilmiş 14 örneğin 5 (% 35.7)'inde düşük aviditeye, geçirilmiş enfeksiyon olan 164 örneğin 153 (% 93.3)'ünde ise yüksek aviditeye rastlanmıştır. Bu da anti-VCA IgG avidite'nin akut enfeksiyon başlangıcında düşük olduğu, ancak bağışıklık tepkisi olgunlaştıkça artmakta olduğu bilgisini desteklemektedir. Genellikle anti-VCA IgG'nin olgunlaşması semptomların başlangıcından itibaren ilk birkaç haftada başlamaktadır ve bazı durumlarda 3 aya kadar sürebilmektedir (69). Ama beklenenin tersine çalışmamızda, yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon olarak değerlendirilen 14 örneğin 9 (% 64.3)'unda yüksek avidite, geçirilmiş enfeksiyon olarak değerlendirilen 164 örneğin 11 (% 6.7)'inde düşük avidite bulunmuştur. Bu ise, akut enfeksiyonlu hastada antikör aviditesinin çabuk olgunlaşması ile yüksek aviditeli antikörlerinin oluşması veya geçirilmiş enfeksiyonda ya da reaktivasyonda immatür antikörlerin varlığı nedeniyle düşük aviditeli antikörlerin meydana gelmesi ile açıklanabilir. Bu gibi olumsuzluklar nedeni ile avidite testlerinin kullanımı ile ilgili tam bir standardizasyon henüz sağlanamamıştır (70).

Çalışmamızda hasta serumu örnekleri ELISA yöntemiyle çalışılıp, EBV enfeksiyonu tanı kriterleri doğrultusunda serolojik olarak sınıflandırılmıştır. ELISA sonuçlarına göre 41 (% 17.0) seronegatif, 23 (% 9.6) akut enfeksiyon, 14 (% 5.8) yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon ve 160 (% 66.7) geçirilmiş enfeksiyon ve 2 (% 0.8) maternal antikör varlığı saptanmıştır. Reaktivasyon olarak değerlendirilen örnek olmamıştır.

ELISA yöntemiyle elde edilen hastalık evresi sonuçları daha sonra referans test IFA sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. ELISA/IFA uyum oranları seronegatiflik için 38/38 (% 100), akut enfeksiyon için 20/21 (% 95.2), yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon için 8/14 (% 57.1), geçirilmiş enfeksiyon için 157/164 (% 95.7) ve maternal antikör varlığı için ise 2/3 (% 66.6) olarak bulunmuştur.

Kreuzer ve arkadaşlarının 2013 yılında 537 kişide yaptıkları ve EBV enfeksiyonunu tanımlamada IFA ve iki farklı ELISA yöntemini kıyasladıkları çalışmada sırasıyla ELISA/ELISA/IFA testleri uyumluluk oranları seronegatiflik için, % 100, % 89.7, % 92.3, akut enfeksiyon için % 100, % 100, % 100, geçirilmiş enfeksiyon için % 99.1, % 98.8, % 98.1 olarak bildirilmiştir (4). Meylan ve

arkadaşlarının 2010 yılında akut veya geçirilmiş EBV enfeksiyonu şüphesi olan 393 kişide yaptıkları çalışmada ELISA/IFA uyum oranları seronegatiflik için % 93.2, akut enfeksiyon için % 97 ve geçirilmiş enfeksiyon için ise % 100 uyumlu olarak belirtilmiştir (71). Schhade ve arkadaşlarının 66 çocuk hastayla yaptıkları çalışmada uyumluluk seronegatiflik için % 90.9, akut enfeksiyon için % 100, geçirilmiş enfeksiyon için % 86.6 olarak raporlanmıştır (72). Her iki çalışma ile de bizim çalışmamızın sonuçları benzerlik göstermektedir.

Feyzioğlu ve arkadaşları başka bir çalışmada aynı uyumlulukları seronegatiflik için % 41, akut enfeksiyon için % 100, yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon için % 14.7 ve geçirilmiş enfeksiyon için % 74.5 olarak belirtmişlerdir (61). Seronegatiflik ve yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon uyumları bizim çalışmamıza göre belirgin olarak daha düşük bulunmuştur. Bunun sebebi çalışmaya alınan kişilerin sosyodemografik özelliklerinin ve tanıda kullanılan kitlerin farklı olması olabilir.

Çalışmamızda bir diğer test olan Immunoblot testi ile de referans yöntem olan IFA sonuçlarını karşılaştırılmıştır. Immunoblot testi ile 35 (% 14.6) seronegatif, 17 (% 7) akut enfeksiyon, 18 (% 7.5) yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon ve 166 (% 69.2) geçirilmiş enfeksiyon ve 4 (% 1.7) maternal antikor varlığı saptanmıştır. Reaktivasyon bulunmamıştır.

Immunoblot testinin IFA testi ile uyumu, seronegatiflik için 34/38 (% 89.4), akut enfeksiyon için 14/21 (% 66.6), yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon için 4/14 (% 28.5), geçirilmiş enfeksiyon için 156/164 (% 95.1) ve maternal antikor varlığı için ise 3/3 (% 100) olarak bulunmuştur.

Gartner ve arkadaşlarının farklı EBV enfeksiyonu klinik bulgularına sahip hastalardan yaptıkları bir çalışmada IFA ile Immunoblot testinin uyumlulukları sırasıyla seronegatiflik için % 100, akut enfeksiyon için % 94, geçirilmiş enfeksiyon için ise % 100 olarak saptanmıştır (43). Altuğlu ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada aynı uyumluluk oranları seronegatiflik için % 100, akut enfeksiyon için % 83.3 ve geçirilmiş enfeksiyon için % 96.5 bulunmuştur (63). Altuğlu ve arkadaşlarının çocuk ve erişkin toplamda 277 kişide yaptıkları başka bir çalışmada ise uyumluluklar sırasıyla seronegatiflik için % 97.4, akut enfeksiyon için % 94.5, geçirilmiş enfeksiyon için % 100 bulunmuştur (49). Her üç çalışmayla

karşılaştırıldığında çalışmamızdaki IFA/Immunoblot testi uyumu akut enfeksiyonu belirlemede diğer çalışmalara göre düşük bulunmuştur. Bunun sebebinin ise anti-VCA IgM'in negatif olarak beklendiği, yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon olarak yorumlanan 13 hastada ve geçirilmiş enfeksiyon olarak yorumlanan 8 hastada yalancı anti-VCA IgM pozitifliklerine bağlı olarak enfeksiyon evrelemesinin yorumlamasında oluşan farklılık nedeniyle oluştuğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda EBV enfeksiyonu tanısı ve evresini belirlerken EBV enfeksiyonuna özgü antikorların varlığı/yokluğuna göre tüm antikorları birlikte değerlendirdik. Ayrıca çalışılan her bir parametrenin tespit edilebilirliği testlere göre farklılıklar arz edebilmektedir. Bu yüzden ELISA ve Immunoblot testleri ile anti-VCA IgM, anti-VCA IgG, anti-EBNA IgG ve anti-EA IgG antikorlarının durumlarını değerlendirip, duyarlılık ve özgüllüklerini IFA referans testine göre belirledik.

Çalışmamızda ELISA yöntemi ile anti-VCA IgM için duyarlılığı % 84 ve özgüllüğü % 95.8 bulduk. Ory ve arkadaşlarının yaptıkları 4 farklı yöntemin IFA ile karşılaştırıldığı çalışmada ELISA yöntemi ile saptanan duyarlılık ve özgüllükler sırasıyla anti-VCA IgM için % 67.1, % 95.8 olarak bildirilmiş olup duyarlılık oranı çalışmamızdan düşüktür (73). Meylan ve arkadaşları anti-VCA IgM için uyumu % 93 (71), Fung ve arkadaşları % 88 olarak bildirmişlerdir (66). Gartner ve arkadaşlarının 4 farklı ELISA kiti ile yaptıkları çalışmada anti-VCA IgM için duyarlılıklar % 94 ile % 98 arasında, özgüllükler ise % 69 ile % 98 arasında belirtilmiştir (43). Feyzioğlu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise duyarlılık % 100, özgüllük % 90.8 olarak raporlanmıştır (61). Farber ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada duyarlılık % 95.7, özgüllük % 93.6 olarak bildirilmiştir (48). IFA referans test alınarak 11 farklı ELISA kiti ile yapılan başka bir çalışmada kitlerin duyarlılıkları bir kit hariç (% 25.0), % 83.3 ile % 100 arası değerlerde bildirilmiştir (74). Sonuçlar arasındaki farklılık, kullanılan kitlerin kuyucuklarında kaplı olan antijenlerin farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Bizim kullandığımız kitin kuyucuğu VCA gp125 antijeni ile kaplıdır. Genel olarak çalışmalarda bildirilen bu anti-VCA IgM değerleri ile çalışmamızda bulduğumuz anti-VCA IgM değerlerinin uyumlu olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda anti-VCA IgG için duyarlılık % 96.5, özgüllük % 97.4 olarak bulunmuştur. Yapılan dört farklı çalışmada duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 89.1, % 100 (73), % 80-% 94, % 92-% 99 (43), % 61.5, % 53 (61), % 94, % 97.8 (48) olarak raporlanmıştır. Meylan ve arkadaşları anti-VCA IgG için ELISA/ IFA uyumunu % 92 (71), Fung ve arkadaşları % 79 olarak (66) bildirmişlerdir. Kleines ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada anti-VCA IgG duyarlılığı % 85 raporlanmıştır (75). Bir çalışma hariç diğer çalışmalarda bildirilen değerlerle çalışmamızın değerleri uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda anti-EBNA IgG için duyarlılık % 92.3 ve özgüllük % 87.7 olarak bulunmuştur. Başka çalışmalarda bu değerler sırasıyla % 87.5 ile % 89.9 (73), % 95-% 98 ile % 82-% 98 (43), % 78.7 ile % 81.1(61), % 95.5 ile % 90.0 (76) olarak bildirilmiştir. Meylan arkadaşları anti-EBNA IgG için ELISA/IFA uyumunu % 76 olarak raporlarken (71), başka bir çalışmada ise % 87 (66) olarak raporlanmıştır.

Çalışmamızda ELISA testinin anti-EA IgG için duyarlılık % 26.7, özgüllük % 99 olarak bulunmuştur. Fung ve arkadaşları yaptıkları çalışmada duyarlılığı % 23.6, özgüllüğü ise % 78.4 bildirmişlerdir (66). Hem bizim çalışmamız, hem de Fung ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada duyarlılığın bu kadar düşük saptanmasının en önemli sebebi testlerde saptanan antikorların farklılığı olabilir. ELISA testinde anti-EA/D (diffüz) IgG antikor aranırken, IFA testi ile anti-EA/ D ile beraber anti-EA/R (kısıtlı) de aranmaktadır. Anti-EA/D antikorlarının varlığı, bir akut enfeksiyon varlığında anti-VCA IgM antikorlarının bulguları desteklemektedir. Anti-EA/R antikorları ise daha çok iyileşme döneminde olan enfeksiyonu düşündürmektedir (66). Nitekim IFA testi ile saptanan 21 akut enfeksiyonun 20 tanesi ELISA testi ile de akut enfeksiyon olarak yorumlanmıştır. İki test arasında daha önce belirtildiği gibi akut enfeksiyonu saptamada % 95.2 oranında uyum bulunmuştur. Diğer olası neden ise, ELISA sisteminin rekombinant antijenleri kullanması IFA'da hücrelerden eksprese edilen doğal EA antijenlerin kullanması olabilir. Ayrıca temelde ELISA ile IFA testlerinin çalışma prensipleri farklıdır (66). Bunun yanı sıra immünsüpresif durumdan veya reaktivasyondan şüphelenilmiyorsa tek başına anti-EA antikor varlığının araştırılması önerilmemektedir (40).

Immunoblot testi ile değerlendirmemizde anti-VCA IgM, anti-VCA IgG, anti-EBNA IgG ve anti-EA antikorlarının duyarlılıklarını sırasıyla % 84, % 99.5, % 96.4, % 70 ve özgüllüklerini % 92.6, % 82.1, % 67.1, % 83.8 olarak bulduk. Altuğlu ve arkadaşlarının Immunoblot testini uyguladıkları çalışmada anti-VCA IgM, anti-VCA IgG, anti-EBNA IgG ve anti-EA IgG için sırasıyla duyarlılıklar % 71.4, % 75.6, % 100, % 77.7, özgüllükler ise % 100, % 100, % 100, % 94.2 olarak bildirilmiştir (63). Buisson ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise anti-VCA IgM, anti-VCA IgG ve anti-EBNA IgG için duyarlılıklar sırasıyla % 75, % 100, % 92.6, özgüllükleri ise % 85.7, % 100, % 92.6 olarak raporlamışlardır (77). Yine Altuğlu ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada duyarlılık ve özgüllükleri anti-VCA IgM için 97.1 ve % 17.7, anti-VCA IgG için ise % 97.6 ve % 75 olarak belirtmişlerdir (49).

Yapılan çalışmalarda ve bizim çalışmamızda özellikle anti-VCA IgM ve anti-VCA IgG antikorları için duyarlılık ve özgüllüklerinin birbirinden farklı çıkmasının nedeni IFA testi ile Immunoblot testinde kullanılan antijenlerin farklılığı olabilir. Immunoblot testi striplerinde VCA'dan saflaştırılmış gp125 ve rekombinant VCA p19 antijenleri kullanılırken, IFA testinde kapsid antijenini eksprese eden hücreler kullanılmaktadır (49). Ayrıca bir başka nedenin ise testin değerlendirme aşaması olduğunu düşünmekteyiz. Immunoblot testi sonuçlarını doğru değerlendirebilmek için striplerin çalışma bittikten sonra tamamıyla kuruması gerekmektedir. Kurumadan değerlendirmeye alınan stripler ile yalancı pozitiflikler oluşabilmektedir. Biz çalışmamızda bu olumsuzluğu gidermek için çalışma bitiminden sonra değerlendirme için bir süre striplerin kurumasını bekledik. Yine de IFA testiyle karşılaştırdığımızda özellikle anti-VCA IgM antikorunu göstermede yalancı pozitiflikler saptadık. IFA testi ile toplamda 25 anti-VCA IgM pozitifliği bulunmuştur. Immunoblot testi ile 16 örnekte yalancı anti-VCA IgM pozitifliği saptanmıştır. Bunun neticesi olarak Immunoblot testi ile bulunan anti-VCA IgM pozitifliklerinin ilave bir test ile doğrulanması gerekliliğini düşünmekteyiz.

Tang ve arkadaşlarının IFA testini altın standart kabul ederek EBV enfeksiyonu şüpheli 290 hastada ELISA ve Immunoblot testlerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada ELISA testinin anti-VCA IgM, anti-VCA IgG, anti-EBNA IgG için sırasıyla duyarlılıkları % 100, % 99.6, % 94.0, özgüllükleri % 93.4, % 95.6, % 94 olarak bildirilmiştir (78). Immunoblot testinin ise anti-VCA IgM, anti-VCA

IgG, anti-EBNA IgG için sırasıyla duyarlılıkları % 100, % 98.7, % 97, özgüllükleri ise % 96.5, % 90, % 91.3 olarak raporlanmıştır (78). Her iki test için de tek tek antikorlar değerlendirilerek, hem duyarlılık, hem de özgüllük açısından benzer sonuçlar bulunmuştur (78). Bizim çalışmamızda ELISA ve Immunoblot testleri ile bulduğumuz değerleri karşılaştıracak olursak anti-VCA IgM antikorunu saptamada her iki testin de duyarlılığı % 84 olarak bulunmuştur. Anti-VCA IgG ve anti-EBNA IgG antikorları için sırasıyla ELISA testi ile duyarlılık % 96.5 ve % 92.2, Immunoblot testi ile % 99.5 ve % 96.4 olup her iki test ile yakın sonuçlar alınmıştır. Anti-EA antikorunu için duyarlılık ELISA testi ile % 26.7 iken, Immunoblot testi ile % 70 bulunmuş olup iki test için de duyarlılıklar düşük olmakla beraber, ELISA testinde bu düşüklük daha belirgindir. Her iki test ile de anti-EA/D antikorunu araştırılıyor olmasına rağmen farklılığın nedeni kullandığımız ELISA kitinin anti-EA IgG antikorunu saptamadaki yetersizliğinden kaynaklanıyor olabilir. Anti-EA IgG antikorunu özgüllüğü ise tam tersine ELISA testi ile % 99 gibi yüksek bir oranda saptanırken, Immunoblot testi ile % 83.8 bulunmuştur. Sırasıyla ELISA ve Immunoblot testi ile bulunan diğer antikorların özgüllükleri ise anti-VCA IgM için % 95.8, % 97.1, anti-VCA IgG için % 97.4, % 82.1, anti-EBNA IgG için % 87.7, % 67.1' dir. Her üç antikor için de Immunoblot testi ile özgüllükler daha düşük bulunmuştur. Bunun sebebinin Immunoblot testinde saptanan yalancı pozitiflikler olduğu düşünülmektedir.

İmmünitesi sağlam kişilerde EBV enfeksiyonu tanısında serolojik profilin belirlenmesi çoğu zaman yeterli olabilmektedir (40). Daha önce de belirttiğimiz gibi anti-VCA IgM, anti-VCA IgG ve anti-EBNA IgG olmak üzere sadece üç parametreye bakılarak EBV enfeksiyonunun akut veya geçirilmiş olduğunun tanısı çoğunlukla yapılabilmektedir. İzole anti-VCA IgG, izole anti-EBNA IgG varlığında veya üç parametrenin de birlikte bulunduğu durumlarda serolojik olarak akut, geçirilmiş veya reaktivasyon gibi enfeksiyon tanımlamalarını yapmak zordur ve seroloji yetersiz kalabilmektedir (54). Bu gibi profilleri yorumlamak için moleküler yöntemlerle viral genom tayini ilave edilebilir. Bu testler olası enfeksiyon durumunu tanımlamak ve rutin laboratuvar uygulamada ortaya çıkabilecek sorunları çözmek için yararlı olabilir (54).

İmmün yetmezliği olan hastalarda ise antikorlar daha az kullanışlıdır çünkü immün sistemleri fonksiyonlarını tam yapamamaktadır. Antikor seviyeleri zaman içerisinde değişebilmektedir bu da atipik profillere sebep olmaktadır. Anti-VCA IgG ve anti-EA/D ya da anti-EA/R IgG titrelerinde artış, anti-EBNA IgG titresinde azalma veya kaybolma söz konusudur. Anti-VCA IgM sınıfında daha az olsa da anti-VCA IgM ve anti-EA/IgA sınıfı antikorlarda artışlar olabilir. Farklı hastalarda gözlenen değişkenlikler ve EBV ilişkili lenfoproliferatif bozukluklar geliştirme gibi riski olan hastaların takibinde moleküler yöntemler ile EBV DNA varlığı araştırılmasının tanı için faydalı olduğu gösterilmiştir. EBV ile ilişkili ortaya çıkan tümörlerde anti-VCA IgG ve anti-EA IgG'nin yükselip anti-EBNA IgG'nin düşmesi gibi değerler serolojik olarak genel belirleyici değildirler ve öncelikle bu gibi durumlarda EBV DNA araştırılmalıdır (54).

EBV enfeksiyonunun ciddi komplikasyonları olabileceğinden erken ve etkin tedaviye başlanması önemlidir. Özellikle immünsüpresif hastalarda bu daha da önem kazanmaktadır. EBV replikasyonunu erken saptayan ve tedavinin takibinde faydalı olabilecek tanı yöntemleri seçilmelidir. Bunun için de EBV veya EBV DNA'sını saptayabilen direkt tanı yöntemleri kullanılabilir (40). Biz de çalışmamızda bu gibi nedenlerden EBV DNA'sını saptama amaçlı etkinliği yüksek olan (40) Real-Time PCR testi ile çalıştık. IFA, ELISA ve Immunoblot testlerinin üçü ile de seronegatiflik saptanan 29 (% 12.1) kişide Real-Time PCR çalışılmamıştır. Kalan 199 (% 82.9) kişide Real-Time PCR testi ile EBV DNA'sı varlığını araştırdık. Toplamda 12 (% 5) kişide EBV DNA saptadık. Bu pozitiflikler, IFA referans testi ve ELISA testlerine göre, 11'i akut enfeksiyon ve 1'i geçirilmiş enfeksiyon serolojik profilleri ile uyumluydu. Immunoblot testi ile ise 9 akut enfeksiyon, 2 yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon ve 1 geçirilmiş enfeksiyon serolojisindeydi. Immunoblot testine göre yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon olarak yorumlanan 2 kişi IFA ve ELISA testleri ile akut enfeksiyon olarak değerlendirilip EBV DNA saptananlar arasındadır.

IFA referans testine göre 21 akut enfeksiyon şeklinde yorumlanan örneklerin 12'sinde viral yük saptanabilmiştir. Saptanan kopya miktarları 92 kopya/ml ile 16700 kopya/ml arasındadır. Testin duyarlılığı % 57.1 bulunmuştur. Akut enfeksiyon haricinde kalan 191 kişinin 190'unda viral yük saptanmamış ve özgüllük ise % 99.4

bulunmuştur. Bir hastada ise viral yük 92 kopya/ ml olarak saptanmıştır. Bu hasta 3 yaşında çocuk olup, bilinen immün yetmezliği olmayıp, enfeksiyöz mononükleozu destekleyen boğaz ağrısı, servikal lenfadenopatisi ve ateşi mevcuttu. Her üç test ile de geçirilmiş enfeksiyon olarak yorumlanan hastanın anti-VCA IgG aviditesi yüksek olup anti-EA IgM ve anti-EA IgG antikorları da negatif olarak bulunmuştur. Bu sonuç, özellikle çocuk yaş grubunda akut EBV enfeksiyonu tanısında serolojik testlerin yetersiz kalabileceğini göstermektedir. Karadağ ve arkadaşlarının 62 renal transplant, 37 çocuk onkoloji hastası ve kontrol grubu olarak aldıkları 50 EBV seropozitif immünokompetan sağlıklı birey ile yaptıkları bir çalışmada kontrol grubundaki bir çocukta, Immunoblot testi ile serolojik olarak geçirilmiş enfeksiyon ile uyumluken, Real-Time PCR ile EBV DNA düzeyi 1415 kopya/ml olarak bildirilmiştir (79). Bu çalışma da bizim öngörümüzü desteklemektedir.

Chan ve arkadaşlarının EM şüpheli 81 serum örneğiyle yaptıkları çalışmada, IFA testi ile belirledikleri 46 akut enfeksiyonun 37'sinde viral yük saptamışlardır ve testin duyarlılığını % 80 olarak bildirmişlerdir. Geri kalan 35 kişinin 33'ünde viral yük saptanmayıp, 2'sinde saptanmıştır ve özgüllüğünü % 94 olarak bildirmişlerdir (80). Viral yük saptanan bu iki hastanın serolojik profilleri ise yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon ve eski geçirilmiş enfeksiyon ile uyumlu raporlanmıştır. Çalışmada serum örnekleri hastalık belirtileri başladıktan 3 hafta sonra alınmış olduğundan bu hasta için bu süre içinde anti-EBNA IgG oluşmuş olabileceği ve anti-VCA IgG aviditesinin yükselmiş olabileceği belirtilmektedir (80). Bizim çalışmamızdaki geçirilmiş enfeksiyon serolojisine sahip hasta için de benzer bir durum olabileceğini düşünmekteyiz. Hastadan örnek alındığında, anti-VCA IgM antikorları kaybolmuş, anti-EBNA IgG antikorları oluşmuş ama viremi hala devam ediyor olabilir.

Gartzonika ve arkadaşlarının EM şüpheli 118 hasta ile yaptıkları bir çalışmada, heterofil antikor varlığını ve ELISA ile EBV'ye özgü antikorların durumunu araştırarak buldukları 46 akut enfeksiyonun 43'ünde Real-time PCR ile viral DNA saptamışlardır. Testin duyarlılığını % 93.5, özgüllüğünü % 100 olarak bildirmişlerdir (81).

İki çalışma ile de karşılaştırıldığında bizim çalışmamızdaki Real-time PCR testinin akut enfeksiyonu saptamadaki duyarlılığı belirgin düşük bulunmuştur.

Kullandığımız kitin EBV DNA'sını saptama aralığı $10-10^{10}$ kopya/rxn olup, bu da kitin çok düşük viral yük miktarını bile saptayabilecek performansta olduğunu göstermektedir. Duyarlılığın düşük (% 57.1) çıkmasını, Real-time PCR testi çalışıldığında vireminin sonlanmış olabileceğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak çalışmamızda, tüm dünyada ve ülkemizde önemli bir enfeksiyon etkeni olan EBV'nin tanımlanmasında birden fazla yöntem kullanılıp yöntemlerinin kullanılabilirliğini birbirleriyle karşılaştırdık. Çalışmalarımız sonucunda IFA, tanıda en güvenli yöntem bulunmuş olmakta birlikte pahalı olması ve deneyimli personel gerektirmesi dezavantajı olabilir. ELISA, IFA ile uyumu en yüksek test olup, kullanım kolaylığı ve antikor parametrelerinin tek olarak çalışılabilmesi avantaj sağlamaktadır. Immunoblot, ELISA'yı doğrulamada kullandığımız bir yöntem olsa da yalancı pozitifliklere dikkat edilmelidir. Real-Time PCR testi özellikle virusa karşı antikor cevabının bozulduğu immün yetmezlik durumlarında yararlı olabilecek bir yöntemdir. Viremi varlığını saptayarak tanı ve tedavinin takibinde yol gösterici olabilir. Hastanın demografik özellikleri, laboratuvarın maddi olanakları ve çalışma koşulları, personelin donanımı gibi diğer durumların da hepsi birlikte değerlendirilerek EBV enfeksiyonu tanısında en doğru tanı yöntemine karar verilmelidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Şubat–Haziran 2013 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi pediatri ve/veya erişkin hematoloji kliniklerine başvuran EM şüpheli 205 hasta ve kontrol grubu olarak 35 kişi olmak üzere toplamda 240 serum örneğinde, IFA, ELISA, Immunoblot ve Real-Time PCR testleri çalışılmış, bu testlerin duyarlılık ve özgüllükleri altın standart yöntem olan IFA ile karşılaştırılmıştır. IFA yöntemi ile EBV'ye özgü anti-VCA IgM, anti-VCA IgG, anti-EBNA IgG, anti-EA IgG antikorları varlığı ile anti-VCA IgG avidite testi eş zamanlı çalışılarak enfeksiyon varlığı ve evresi değerlendirilmiştir. ELISA ve Immunoblot yöntemleriyle EBV'ye karşı oluşmuş özgül antikorlar aranmış, Real-Time PCR yöntemiyle viremi varlığı değerlendirilmiştir.

1. ELISA yönteminin referans yöntemle uyumu seronegatiflik için % 100, akut enfeksiyon için % 95.2, yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon için % 57.1, geçirilmiş enfeksiyon % 95.7 ve maternal antikor varlığı için % 66.6 bulunmuştur.
2. ELISA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla anti-VCA IgM için % 84 ve % 95.8, anti-VCA IgG için % 96.5 ve % 97.4, anti-EBNA IgG için % 92.2 ve % 87.7, anti-EA IgG için ise % 26.7 ve % 99 olarak belirlenmiştir.
3. Immunoblot yönteminin referans yöntemle uyumu seronegatiflik için % 89.4, akut enfeksiyon için % 66.6, yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyon için % 28.5, geçirilmiş enfeksiyon için % 95.1 ve maternal antikor varlığı için % 100 bulunmuştur.
4. Immunoblot yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla anti-VCA IgM için % 84 ve % 92.6, anti-VCA IgG için % 99.5 ve % 82.1, anti-EBNA IgG için % 96.4 ve % 67.1, anti-EA için ise % 70 ve % 83.8 olarak saptanmıştır.
5. EBV enfeksiyonunu saptamada ELISA yönteminin IFA ile uyumu (maternal antikor varlığı haricinde) Immunoblot testinden yüksek bulunmuştur.
6. Immunoblot yönteminin antikorları tek olarak saptamadaki duyarlılığı ELISA ile anti-VCA IgM için aynı, diğer üç antikor için ise yüksek bulunmuştur. Buna rağmen özgüllüğü dört antikor için de ELISA testinden daha düşük değerlerde bulunmuştur.

7. IFA yöntemi ile akut enfeksiyon olarak değerlendirilen 21 kişinin 12'sinde Real-Time PCR ile viral yük saptanabilmiş olup testin duyarlılığı % 57.1 bulunmuştur. Akut enfeksiyon dışında kalan, Real-Time PCR çalışılan 191 kişinin 190'ında viral yük saptanmamış olup testin özgüllüğü % 99.4 bulunmuştur.

Bu sonuçlar doğrultusunda,

1. EBV enfeksiyonu tanısında en güvenilir yöntem, altın standart olan IFA yöntemidir. Tüm parametreler tek bir slayt ile aynı anda değerlendirilebilmektedir. Antikorların ayrı ayrı çalışılmaması ve deneyimli personel gerektirmesi dezavantajdır.
2. ELISA yöntemi IFA ile uyumu en yüksek olan testtir. Antikorların tek olarak çalışılıp değerlendirilebilmesi de avantajdır. Göreceli değerlendirmelerden uzak, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan standardize edilmiş bir yöntemdir.
3. Immunoblot yöntemi ELISA yöntemine göre düşük performans göstermiştir. Her ne kadar ELISA testini doğrulama amaçlı kullanılsa da yalancı pozitiflikler değerlendirmede yanıltıcı olabilmektedir.
4. Real-Time PCR özellikle antikor üretiminin bozulmuş olduğu immünsüpresif hastalarda ve viremi varlığının devamı araştırıldığında kullanışlı olabilecek özgüllüğü yüksek bir yöntemdir. Duyarlılığının düşük olması ve kitlerinin pahalı olması olumsuzluk yaratmaktadır.
5. Hastanın demografik özellikleri, laboratuvarın maddi olanakları ve çalışma koşulları, personelin donanımı gibi diğer durumların da hepsi birlikte değerlendirilerek EBV enfeksiyonu tanısında en doğru tanı yöntemine karar verilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*. 1964;1(7335):702-3.
2. Martinez OM, de Gruijl FR. Molecular and immunologic mechanisms of cancer pathogenesis in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2008;8(11):2205-11.
3. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH, Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(1):193-209.
4. Kreuzer C, Nabeck KU, Levy HR, Daghofer E. Reliability of the Siemens Enzygnost and Novagnost Epstein-Barr virus assays for routine laboratory diagnosis: agreement with clinical diagnosis and comparison with the Merifluor Epstein-Barr virus immunofluorescence assay. *Bmc Infect Dis*. 2013;13:260.
5. Zeytinoğlu A, Erensoy S, Aydemir Ő, Berber S, Çağırgan S, Soydan S, Bilgiç A, Lenfomalı Hastaların Dokularında Epstein-Barr Virus DNA Ve RNA'sının Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 2005.39(1):473-481.
6. Ozkan A, Kilic SS, Kalkan A, Ozden M, Demirdag K, Ozdarendeli A. Seropositivity of Epstein-Barr virus in Eastern Anatolian Region of Turkey. *Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand*. 2003;21(1):49-53.
7. Middeldorp JM, Herbrink P. Epstein-Barr virus specific marker molecules for early diagnosis of infectious mononucleosis. *Journal of Virological Methods*. 1988;21(1-4):133-46.
8. Ebell MH. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Am Fam Physician*, 2004.70(7): 1279-87.
9. Moffat LE. Infectious mononucleosis. *Prim Care Update Ob Gyns*, 2001. 8(2):73-77.

10. Porter DD, Wimberly I, Benyesh-Melnick M. Prevalence of antibodies to EB virus and other herpesviruses. *JAMA*, 1969.208(9):1675-9.
11. Duca KA, Shapiro M, Delgado-Eckert E, Hadinoto V, Jarrah AS, Laubenbacher R, et al. A virtual look at Epstein-Barr virus infection: Biological Interpretations. *Plos Pathog.* 2007;3(10):1388-400.
12. Mithoe GD, Boelens E, Drenth J, Feikens HP, Benne CA, Comparison of five Epstein Barr virus (EBV) enzyme immunoassays, an automated chemiluminescence assay and immunoblot assay with the EBV immunofluorescence assay as a reference. *Nederlands Tijdschrift Voor Medische Microbiologie*, 2007.15(1):122.
13. Kieff E, Rickinson B: Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Howley PM, Griffin DE, Robert A, Lamb D, Malcolm A, Martin MD, Roiznan B, Straus SE, Knipe DM (eds), *Virology* 2001, 4. Baskı. Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2511-573.
14. Cengiz AT. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji iç: Özbal Y, Editor. *Epstein-Barr Virüs*, Ankara: Güneş Kitabevi; 2004:937-943.
15. Erensoy S, Zeytinoğlu A. Epstein-Barr virüs. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. baskı. İstanbul: Nobel Kitabevi; 2008:1672-1679.
16. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Başustaoğlu A (Çeviri editörü). *Tıbbi mikrobiyoloji. Medical Microbiology*. İç: Mutlu Esved, Baysan BÖ, Çolak D (çeviri). *İnsan Herpesvirüsleri*. 6. Baskı. Ankara: Atlas Kitabevi; 2010:517-540.
17. Murray PG, Young LS. Epstein-Barr virus infection: Basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2001;3:1-20.
18. Sculley TB, Cross SM, Borrow P, Cooper DA. Prevalence of antibodies to Epstein- Barr virüs nuclear antijen 2B in persons infected with the human immunodeficiency virüs. *J. Infect. Dis* 1988;158:186-192.

19. Gratama JW, Ernberg I. Molecular epidemiology of Epstein-Barr virus infection. *Adv. Cancer Res* 1995;67:197-255.
20. Crawford DH, Swerdlow AJ, Higgins C, McAulay K, Harrison N, Williams H, Britton K, Macswen KF. Sexual history and Epstein-Barr virus infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2002;186(6):731-6.
21. Enbom M, Strand A, Falk KI, Linde A. Detection of Epstein-Barr virüs, but not human herpesvirus 8, DNA in cervical secretions from Swedish women by real-time polymerase chain reaction. *Sex. Transm. Dis* 2001;28:300-306.
22. Fafi-Kremer S, Morand P, Brion JP, Pavese P, Baccard M, Germe R, et al. Long-term shedding of infectious Epstein-Barr virus after infectious mononucleosis. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(6):985-9.
23. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Başustaoğlu A (Çeviri editörü). *Klinik mikrobiyoloji. Manual of clinical microbiology*. İç: Murray P, Baron E, Jorgensen J (eds). Epstein-Barr virüs. 9. Baskı. Washington DC: ASM Press. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009:1567-70.
24. Lennette ET. Epstein-Barr Virus In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 6. Baskı. American Society, Washington, 1995;905-910.
25. Horwitz CA, Henle W, Henle G, Goldfarb M, Kubic P, Gehrz RC, Balfour HH, Fleisher GR, Krivit W. Clinical and laboratory evaluation of infants and children with Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis: report of 32 patients (aged 10-48 months). *Blood*. 1981;57(5):933-8.
26. Akan E. Genel ve Özel Viroloji. Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1994.
27. Erensoy S, Zeytinoğlu A. Epstein-Barr virüs. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. 3. baskı. İstanbul: Nobel Kitapevi; 2008.970-978.
28. Schooley RT, Epstein-Barr virüs (Infectious Mononucleosis). In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Mandell, Bennett, & Dolin: Principles and Practise of Infectious Diseases*, 4th ed., Churchill Livingstone, 1995:1364-1377.

29. Sullivan JL, Oda BA, Herrod HG, Koh G, Rivara FP, Mulder C. Epstein-Barr virüs-assosiated hemophagocytic syndrome: virolojical and immunopathological studies. *Blood* 1985;65 (5): 933.
30. Cockfield SM. Identifying the patient at risk for post-transplant lymphoproliferative disorder. *Transpl. Infect. Dis* 2001;3:70-78.
31. Triantos D, Porter SR, Scully C, Teo CG. Oral hairy leukoplakia: clinicopathologic features, pathogenesis, diagnosis, and clinical significance. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1997;25(6):1392-6.
32. Middeldorp JM, Brink AA, van den Brule AJ, Meijer CJ. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2003;45(1):1-36.33.
34. Hausler M, Scheithauer S, Ritter K, Kleines M. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2003;3(1):81-92.
35. Weiss LM, Movahed LA. In situ demonstration of Epstein-Barr viral genomes in viral-assosiated B cell lymphoproliferations. *Am. J. Pathol* 1989;134:651-659.
36. Takeuchi H, Kobayashi R, Hasegawa M, Hirai K. Detection of latent infection by Epstein-Barr virus in peripheral blood cells of healty individuals and in non-neoplastic tonsillar tissue from patients by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 1996;58:81-89.
37. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virüs load: The signifiante and application for each EBV associated disease. *Rev Med Virol* 2008;18:305-19.
38. Murono S, Yoshizaki T, Tanaka S, Takeshita H, Park CS, Furukawa M. Detection of Epstein-Barr virüs in nasopharngel carcinoma by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 1997;107:523-526.

39. Henle W, Henie GE, Horwitz CA. Epstein-Barr virüs spesifik diagnostic tests in infectious mononucleosis. *Hum. Pathol* 1974;5:551-565.
40. Hess RD. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still changing after 35 years. *J. Clin. Microbiol* 2004;42:3381-3387.
41. Bruu AL, Hjetland R, Holter E, Mortensen L, Natas O, Petterson W, Skar AG, Skarpass T, Tjade T, Asjo B. Evaluation of 12 commercial tests for detection of Epstein-Barr virüs-specific and heterophile antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000;7:451-456.
42. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Diagnostic Microbiology. In Nauschuetz WF, Learmonth SL. *Clinical Virology*. St. Louis, Missouri;2007: 826-863.
43. Gartner BC, Fischinger JM, Roemer K, Mak M, Fleurent B, Mueller-Lantsch N. Evaluation of a recombinant line blot for diagnosis of Epstein-Barr Virus compared with ELISA, using immunofluorescence as reference method. *J. Virol. Methods* 2001;93:89-96.
44. Svahn A, Magnusson M, Jagdahl 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 virüs infection. *J. Clin. Microbiol* 1997;35:2728-2732.
45. Henle G, Henle W. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol.* 1966;91(3):1248-56.
46. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Başustaoğlu A (Çeviri editörü). *Klinik mikrobiyoloji. Manual of clinical microbiology*. İç: Carpenter AB, Us D (Çeviri). *Enfeksiyon Hastalıklarının Tanısında İmmünolojik yöntemler*. 9. Baskı. Washington DC: ASM Press. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009:257-270.
47. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem.* 2005 Dec;51(12):2415-8.

48. Färber I, Hinderer W, Rothe M, Lang D, Sonneborn HH, Wutzler P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection by novel ELISAs based on recombinant capsid antigens p18-23. *Journal of Medical Virology* 2001; 63:271-276
49. Altuğlu İ, Aksoy A, Zeytinoğlu A, Orman M. Epstein-Barr Virus Viral Kapsid Antikorlarının Saptanmasında İmmünoblot Yönteminin Değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2010;44: 231-236.
50. Tamer D. Epstein-Barr Virüs Genomunun Periferik Kandan PCR Ve Real-Time PCR İle Gösterilmesi ve Tiplendirilmesi. Çocuk Sağlığı Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006.
51. Bioneer marka Accupower EBV Quantative PCR Kiti Protokolü. www.genplaza.com (10.04.2014).
52. Real-Time PCR kullanım klavuzu. www.bioneer.com (11.04.2014).
53. Paul JR, Bunnell WW, Liao RS, Dunne WM, Gronowski AM. Evaluation of a Multiplexed Bead Assay for Assessment of Epstein-Barr Virus Immunologic Status, *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4996-5000.
54. De Paschale M, Clerici P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J Virol*, 2012. 1(1):31-43.
55. Feyzioğlu B. Epstein-Barr Virüs İnfeksiyonun Tanısında İndirekt İmmunoflöresan ve Elisa Tanı Metodlarının Karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi*. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Konya, 2008.
56. Grotto I, Mimouni D, Huerta M, Mimouni M, Cohen D, Robin G, Pitlik S, Green MS. Clinical and laboratory presentation of EBV positive infectious mononucleosis in young adults. *Epidemiol Infect* 2003;131: 683-689.
57. Gonzalez Saldana N, et al., Clinical and laboratory characteristics of infectious mononucleosis by Epstein-Barr virus in Mexican children. *BMC Res Notes*, 2012. 5: 361.

58. Cengiz A, et al., Infectious mononucleosis in Turkish children. *Turk J Pediatr*, 2010.52(3):245-54.
59. Celtik C, et al., Evaluation of Clinical and Laboratory Features of Epstein-Barr Virus-Associated Acute Infectious Mononucleosis in Children. *Trakya Universitesi Tıp Fakultesi Dergisi*, 2008.25(3):221-227.
60. Öztürk B. İmmün yetmezliği olmayan çocuklarda EBV ve CMV Antikor Prevelansı. Çocukluk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, 1996.
61. Feyzioğlu B, Özdemir M, Baykan M, Baysal B. Epstein-Barr Virüs İnfeksiyonunun Tanısında İndirekt İmmünoflöresan ve ELİSA Tanı Metodlarının Karşılaştırılması. *Selçuk Üniv Tıp Derg* 2011; 27(2): 77-82.
62. Fidan I, Yüksel S, İmir T. Değişik Yaş Gruplarında Epstein-Barr Virus Antikorlarının Araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 2005;19(4): 453-6.
63. 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: 393-8.
64. Huang Y, Wei C, Zheng K, Zhao DC. The impact of serological features in Chinese children with primary or past Epstein-Barr virus infections. *Virol J*. 2013;10.
65. Dohno S, Maeda A, Ishiura Y, Sato T, Fujieda M, Wakiguchi H. Diagnosis of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus in infants. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society*. 2010;52(4):536-40.
66. Fung MK, Mordarski KT, Bader SA, Gronowski AM. Evaluation of the Wampole Laboratories ELISA-based assay for Epstein-Barr virus serology. *Clinica chimica acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 2002;319(1):43-8.67.
67. Paramita DK, Fachiroh J, Haryana SM, Middeldorp JM. Two-step Epstein-Barr virus immunoglobulin A enzyme-linked immunosorbent assay system

- for serological screening and confirmation of nasopharyngeal carcinoma. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*. 2009;16(5):706-11.
68. Kieff E, Rickinson B: Epstein-Barr virus. In: Fields BN, Howley PM, Griffin DE, Robert A, Lamb D, Malcolm A, Martin MD, Roiznan B, Straus SE, Knipe DM (eds), *Virology 2001*, 4. Baskı. Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2084-2126
69. Wakiguchi H, Hisakawa H, Kubota H, Kurashige T. Serodiagnosis of infectious mononucleosis in children. *Acta paediatrica Japonica; Overseas edition*. 1998;40(4):328-32.
70. Kutlu SS, Çelikbaş AK. İnfeksiyon Hastalıklarında IgG Avidite Testinin Değeri. *İnfeksiyon Dergisi* 2003;17 (3): 365-8.
71. Devanthery O, Meylan P. Comparison of a multiplexed bead-based assay with an immunofluorescence and an enzyme-immuno assay for the assessment of Epstein-Barr virus serologic status. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010;16(12):1776-82.
72. Schaade L, Kleines M, Hausler M. Application of virus-specific immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgA antibody detection with a polyantigenic enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Epstein-Barr virus infections in childhood. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(11):3902-5.
73. De Ory F, Guisasola ME, Sanz JC, Garcia-Bermejo I. Evaluation of four commercial systems for the diagnosis of Epstein-Barr virus primary infections. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*. 2011;18(3):444-8.
74. Weber B, Brunner M, Preiser W, Doerr HW. Evaluation of 11 enzyme immunoassays for the detection of immunoglobulin M antibodies to Epstein-Barr virus. *Journal of Virological Methods*. 1996;57(1):87-93.
75. Kleines M, Scheithauer S, Ritter K, Hausler M. Sensitivity of the Enzygnost anti-EBV/IgG for the determination of the Epstein-Barr virus immune status

- in pediatric patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2006;55(3):247-9.
76. Dobson R, Topping J, Giovannoni G. Comparison of two commercial ELISA systems for evaluating anti-EBNA1 IgG titers. *Journal of Medical Virology*. 2013;85(1):128-31.
77. Buisson M, Fleurent B, Mak M, Morand P, Chan L, Ng A, et al. Novel immunoblot assay using four recombinant antigens for diagnosis of Epstein-Barr virus primary infection and reactivation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(8):2709-14.
78. Tang YM, Helgason JA, Wold AD, Smith TF. Detection of Epstein-Barr virus-specific antibodies by an automated enzyme immunoassay - Performance evaluation and cost analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1998;31(4):549-54.
79. Gecgel SK, Ersoy A, Sevinir BB, Sinirtas M, Goral G. Evaluation of PCR Results in the Diagnosis of Epstein-Barr Virus Infections. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2012;46(4):594-606.
80. Chan KH, Ng MH, Seto WH, Peiris JSM. Epstein-Barr Virus (EBV) DNA in sera of patients with primary EBV infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(11):4152-4.
81. Gartzonika C, Vrioni G, Priavali E, Pappas G, Levidiotou S. Utility of Real-Time PCR in the Diagnosis of Primary Epstein-Barr Virus Infection. *J Med Microb Diagn* 2012; 2:1

