

283935

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARAİNFLUENZA TİP I VİRUSUNA KARŞI
ANTİKORLARIN HEMAGGLÜTİNASYON ÖNLENİM TEK YÖNLÜ
İŞİNSAL HEMOLİZ VE ELİSA YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

SİRUS JEDARY SAİFY

Ankara - 1982

61

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PARAİNFLUENZA TİP I VİRUSUNA KARŞI
ANTİKORLARIN HEMAGGLÜTİNASYON ÖNLENİM TEK YÖNLÜ
IŞINSAL HEMOLİZ VE ELISA YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI

MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

SİRUS JEDARY SAİFY

Rehber Öğretim Üyesi Doç. Dr. ŞEMSETTİN USTAÇELEBİ

Ankara - 1982

İÇİNDEKİLER

1. Giriş	1 - 2
2. Genel Bilgiler	3 - 20
3. Gereç ve Yöntem	21 - 39
4. Bulgular	40 - 47
5. Tartışma	48- 53
6. Özet	54
7. Kaynaklar	55 - 62

1. GİRİŞ:

Paramyxoviridae grubu içerisinde sınıflandırılan parainfluenza virusları özellikle yeni doğan bebeklerde en önemli solunum yolu patojenleri arasında yer alırlar (1). Parainfluenza tip 1, tip 2 ve tip 3 virusları dünyanın çeşitli ülkelerinde çoğunlukla 6 aydan küçük bebeklerde krup, bronşit ve bronşiolit olgularından izole edilmişlerdir (2).

Erişkinlerde parainfluenza virus enfeksiyonu hafif seyretmekte ve yalnız diğer bir çok virus enfeksiyonlarından klinik olarak ayırdedilemeyen üst solunum yolu şikayetlerine neden olmaktadır.

Çeşitli ülkelerde yapılan seroepidemiolojik çalışmalar bu virusların toplumlarda yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir(3).

Parainfluenza viruslarının klinik örnekten izolasyonu oldukça zor ve zaman alan bir işlemdir. Bu nedenle daha fazla, hastalık esnasında virüslara karşı antikor titresinin farklı zamanlarda alınan çift serum örneğinde arttığına görülmesi, kesin tanı yönünden önem taşımaktadır. Parainfluenza virus serolojisinde kompleman birleşmesi deneyinin yanı sıra en fazla kullanılan hemagglütinasyon önlenim (HÖ) deneyidir. Ancak toplumlarda virüsün çeşitli yaş gruplarındaki yaygınlığını seroepidemiolojik yönden saptamak amacı ile HÖ deneyi yaygın olarak uygulanmaktadır.

Parainfluenza virusuna karşı HÖ deneyi ile antikor titresini saptanmadan önce serum örneğinde bulunabilecek özgül olmayan inhibitörlerin mevcut yöntemlerle yok edilmesi gerekmektedir. Buna ilaveten titre saptanması için serum örneğinin iki kat artan sulandırılmaları yapılmaktadır. Bu nedenlerle mikrotitrasyon yöntemi kullanılmasına rağmen HÖ deneyi ile parainfluenza virus antikorlarının seroepidemiolojik amaçla araştırılması zaman almakta ve çok sayıda serumun kısa zamanda taranmasını kısıtlamaktadır.

Son yıllarda bazı virüslara karşı mevcut antikorların varlığı tek yönlü ışınal hemoliz (Single Radial Haemolysis-SRH) yöntemi ile kolaylıkla saptanabilmektedir. SRH testinin en pratik özelliği, testte özgül olmayan antikorların ortadan kaldırılmasının gerekmediğidir. Ayrıca bu yöntemde çeşitli serum sulandırımalarının yapılmasına gereksinim yoktur.

Başlıca bu nedenler SRH testinin seroepidemiolojik çalışmalarındaki yaygın kullanımının birer örneğidir.

Bu çalışmada parainfluenza tip 1 virüs antikorlarının SRH deneyi ile saptanabilmesi ve bu yöntemin mevcut HÖ testi ile kıyaslanması esas olarak alınmıştır.

SRH testinin gelecekte pratik olarak parainfluenza tip 1 antikorlarının saptanmasında güvenle kullanılması için testin standardizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

Bu nedenlerle 0 - 30 yaş arası gruptan toplanan 200 serum örneği HÖ ve SRH deneyi ile incelenmiş ve sonuçlar kıyaslanmıştır. Ayrıca ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testi ile parainfluenza tip 1 antikorlarının saptanması için çalışmalar yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER:

Paramyxoviridae Grubu:

Paramyxovirusler, farklı boyutlar içeren zarflı RNA viruslerdir. İnsan paramyxoviruslarına ek olarak hayvanları da enfekte eden paramyxoviruslar vardır (1).

Paramyxovirusların karakteristik özellikleri şunlardır:

- Virion, heliksel simetrik nükleokapsidi içeren ortalama 150 - 300 nm çapında, küresel ve zarflı partiküldür.
- Virionun zarfında hemagglutinin bulunmaktadır. Grubun bazı üyeleri aynı zamanda nöraminidaz enzimi içerirler.
- Grubun üyeleri antijenik yönden sabittir. Yani genetik rekombinasyon (yeniden bileşim) görülmez.

Paramyxoviridae grubu içinde yer alan viruslar aşağıda belirtilen şekilde sınıflandırılmıştır:

a) Paramyxoviruslar :

- Kabakulak (tek antijenik tip)
- Parainfluenza (PI) 1, 2, 3, 4A, 4B tipleri
- New castle hastalığı virusu

b) Morbiliviruslar :

- Köpek gençlik hastalığı virusu
- Sığır vebası virusu

c) Pneumoviruslar :

- Solunum sinsitiyal virusu (SSV).

İnsanları enfekte eden paramyxoviruslar, PI tip 1, 2, 3, 4A, 4B, kabakulak, kızamık ve solunum sinsitiyal virusunu içine alır. Tavukların solunum yollarında patojen olan new castle hastalığı vi-

virusu insanları tesadüfi olarak enfekte eder. Pİ ve kabakulak virusu çok benzer özelliklere sahip olduklarından, "New Castle" hastalığı virusu ile birlikte paramyxovirus cinsi içinde gruplandırılmıştır.

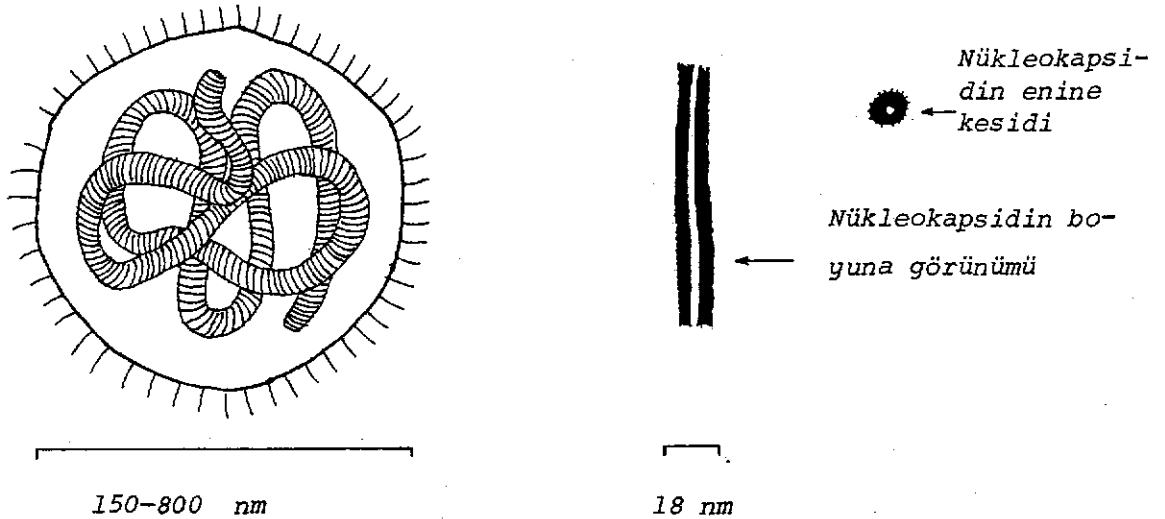
Morbillivirus cinsi içinde gruplandırılan kızamık virusu makulopapuler döküntüler ve solunum hastalığı ile karakterize çok kolay bulaşan, akut bir enfeksiyon oluşturur.

Bu virus hemagglutinine sahip olduğu halde nöraminidazı yoktur. Kızamık virusun nükleokapsidleri enfekte ettikleri hücrelerin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde sentezlenirler (2).

Pneumovirus cinsi içinde yer alan solunum sinsitiyal virusu (SSV) küçük çocuklarda, özellikle bebeklerde alt solunum yollarında enfeksiyon yapan en önemli etkidir.

Bu virus hemagglutininin ve nöraminidaza sahip değildir.

Paramyxovirusların enfeksiyöz virionunun, nükleokapsid ve zarf olmak üzere 2 komponenti vardır (Şekil 1).



Şekil I: Paramyxovirus virionunun komponentlerinin şeması

Nükleokapsid virionun zarfı içinde muhafaza edilmektedir. Zarfların çoğu tek bir nükleokapsid içerirler.

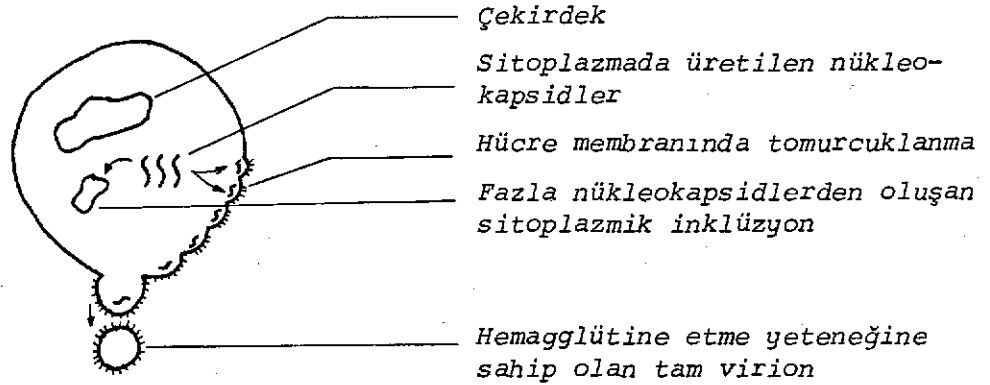
Birden fazla içerenler virionun boyutlarını genişletir.

Virusun sentezlendiği konak hücrenin sitoplazmik membranından kaynaklanan zarf glikolipid içerir.

Hemagglutinin (bazı grup üyelerinde nöraminidaz) viral orijinli peplemor adı verilen morfolojik birimler olarak zarfın yüzeyinde yer almaktadır. Zarf yapısındaki lipid, zarflı eter ve kloroform gibi organik çözücülere karşı duyarlı kılar. Zarfın harabiyeti virionun enfeksiyöz yeteneğini ortadan kaldırır (2).

Paramyxovirusların nükleokapsidlerinin replikasyonu viral RNA'nın kapsid proteinleri ile birlikte bulunduğu enfekte hücrelerin sitoplazmasında olur. Sonra nükleokapsid hücrenin plazma membranının segmentinin yanında dizilir.

Membranın bu bölgesindeki protein, hemagglutinin dahil olmak üzere viruse özgül protein ile yer değiştirir. Plazma membranı envajine olur ve tomurcuklanma meydana gelir (Şekil III).



Şekil II: Enfekte hücrede oluşan paramyxovirus virionunun şeması

Konak hücrenin üzerinde hemagglutinin içeren bu tomurcukların varlığı, enfekte hücreler tarafından alyuvarların hemadsorbsiyonu ile saptanır.

Yeni virion nükleokapsid içeren bir tomurcuk olarak hücre yüzeyinden dışarı çıkar. Enfekte hücrelerde sitoplazmadaki eozinofilik inklüzyon cisimcikleri (kızamık virusunda çekirdektedir) virion içinde birleştirilemeyen artmış nükleokapsidleri içerirler.

Paramyxovirus grubunun antijenleri insandaki enfeksiyonların serolojik tanısında önemlidir. Bu grubun ortak antijeni yoktur. Parainfluenza viruslarının ve kabakulak virusunda hemagglutinin ve nöraminidaz bulunmaktadır.

Bu virusların hepsi, grubun diğer üyelerinin en az biri ile kompleman birleşmesi (KB) ve nötralizasyon (Nt) testinde çapraz reaksiyonlar verirler. Bu durumda bazı ortak antijenik benzerliğin olduğu düşünülmektedir (4).

Sonuç olarak tek bir Pİ virusu ile oluşan enfeksiyon heterotipik antikor cevabına neden olabilir.

Kızamık virusu hayvan paramyxovirusları (köpek gençlik hastalığı ve sığır vebası virusu) ile serolojik çapraz reaksiyon verir. Buna karşın solunum sinsitiyal virusu diğer paramyxoviruslardan serolojik olarak kesinlikle ayrılır (5).

Parainfluenza tip 1 virusun genel özellikleri:

P1 virusları myxovirusların subgrubu olan paramyxovirusların üyeleridirler. Bebeklerde ve daha büyük çocuklarda solunum sistemi enfeksiyonlarında etken olarak P1 tip 1 virusunun önemli bir yeri vardır. Krup (croupe) sendromunda en önemli etken olarak tanımlanmıştır.

Aşağı solunum yolu enfeksiyonu ile hastaneye yatan bebeklerde etken ajan olarak (SSV'den sonra) ikinci sırada yer alır.

P1 virusları ile meydana gelen hastalık, basit ateşsiz bir soğuk algınlığı şeklinde olabildiği gibi, bronşit, bronşiolit ve pnömoni gibi ağır bir enfeksiyon şeklinde de seyrebilir (6).

Biyolojik Özellikleri:

P1 tip 1 bir RNA virusdur. Konakçı hücre membranında gelişen bir zarfı vardır. Replikasyonları enfekte ettikleri hücrelerin sitoplazmasında olur. Replikasyon sırasında fazla nükleokapsid yapımı enfekte hücrelerde sitoplazmik, asidofilik, inkizyon cisimciklerinin oluşumuna yol açar.

Virusun zarfının yüzeyinde bulunan hemagglütininler bazı hayvanların eritrositlerini hemagglütine etme özelliğine (hemagglütinasyon) sahiptirler.

P1 virusları hücre kültürlerinde belirtisiz enfeksiyonlara neden olurlar. Bu viruslar ilk pasajlarda, hücre kültürlerinde hiç sitopatik etki oluşturmazlar veya çok az etki meydana getirirler.

İnsan embriyonik hücre kültürleri bu viruslarla enfekte edildiklerinde hücre yüzeyinde viral hemagglütininler belirir ve bu nedenle enfekte hücreler bazı hayvan eritrositlerini adsorbe ederler (hemadsorbsiyon).

Bu şekilde enfekte edilen hücrelerde Pİ viruslarının varlığı hemadsorbsiyon yöntemi ile saptanabilir (7).

Parainfluenza viruslarının serotipleri:

Pİ viruslarının komplemanı bağlayan ve hemagglütinasyon yapan antijenlerine göre 4 antijenik tipi vardır:

Parainfluenza tip 1, 2, 3, 4 (4A, 4B). Influenza viruslarından farklı olarak Pİ virusunun antijenik yapısı sabittir (8).

Hayvanlardan da insan Pİ tip 1, 2 ve 3'e benzer virus izolasyonları yapılmıştır (7).

Parainfluenza virusları ile oluşan primer enfeksiyonları:

Pİ tip 1, 3 genellikle nezle, farenjit veya bronşite neden olur. Hastaların çoğunda 100° F ateş vardır ve 2-3 gün sürer. Burun akıntısı, servikal lenf adenopati olmayıp farenjit, e-ritem ve öksürük mevcuttur.

Pİ tip 4 enfeksiyonun karakteristik tablosu üst solunum yolunda görülür (9). Primer Pİ virus enfeksiyonu olan çocukların çoğu doktora gösterilmemektedir.

Yapılan bir çalışmada Pİ tip 3 ile enfekte 62 çocuğun üçde ikisi hayatlarının ilk 2 yılında takip edilmiş ve 2 yaşında nötrale edici antikörlerin varlığı saptanmıştır (10).

Enfekte çocukların yarısında farkedilebilen bir hastalık ortaya çıkmamaktadır. Hasta çocukların yaklaşık % 15'inde alt solunum yolu enfeksiyonu hastalığa iştirak etmiştir, yalnız % 2'si doktora baş vurmuştur.

CHANOCK ve arkadaşları bir çocuk bakım evinde tip 3 ile primer enfeksiyonu olan hastaların üçde birinde, tip 1 veya tip 2 ile enfekte hastaların dörtde birinde alt solunum hastalıklarının (bronşit veya pnömoni) da görüldüğünü bildirmişlerdir (11).

Bununla beraber primer Pİ tip 1 ve 2 enfeksiyonları olan 76 çocuğun sadece ikisinde krup ve hafif seyreden hastalık görülmüştür. Dolayısıyla Pİ virusları ile oluşan primer enfeksiyonlar olağandır. Nadiren tıbbi müdahaleye gerek gösterebilecek şiddetli hastalıklara neden olurlar.

Çocukların çoğu hayatlarının ilk beş yılı içinde Pİ viruslarının 4 tipi ile de enfekte olmaktadır. Altı yaşına kadar çocukların % 90 - 100'ünde tip 3'e karşı (10), % 75'inde tip 1'e karşı, % 60 ında tip 2'ye karşı (11) antikor bulunmuştur.

Pİ tip 4 ile bilinen enfeksiyonların nadir olmasına karşın 6 yaşındakilerin % 50 sinde tip 4'e karşı antikor bulunması enteresan bir sonuçtur (12).

Pİ viruslarının her hangi biri ile enfekte kişilerin % 31-42'sinde krup, % 7 - 17 sinde pnömoni ve % 7 - 18 inde bronşiyolit saptanmıştır (11). Pİ tip 1 ve 2 ile enfeksiyonda şiddetli bir tablo olarak ortaya çıkan krup hastalığıdır. Tip 3'de ise her üç sendrom ortaya çıkmaktadır.

Pİ virusun sebep olduğu krup, diğer virusların sebep olduklarından ayırd edilemez. Yine de 6 - 30 aylık çocuklarda krup hastalığının kaynağı Pİ tip 1 veya 2'dir.

(SSV) nin aktif olmadığı toplumlarda, çocuklardaki bronşiyolit Pİ tip 3 ile oluşabilir.

Sağlam bir etiyolojik tanı, virusun izolasyonuna veya Pİ viruslarının birine karşı antikor titresinin yükselmesine dayanmalıdır.

Parainfluenza virusları ile oluşan Re-enfeksiyonlar:

Pİ virusları ile oluşan re-enfeksiyonlara sık olarak rastlanır. Primer enfeksiyonunun ilk 3 ay içinde veya yıllar sonra ortaya çıkabildiği gibi diğer hastalıklarla birlikte de seyredebilir (13).

Re-enfeksiyonlar nadiren şiddetli bir hastalıkla birlikte görülürler. Bir çok hastalık soğuk algınlıklarından ayırdedilebilir.

CHANOCK ve arkadaşları, çocuklarda Pİ tip 3'e karşı ilk enfeksiyonda gösterilen antikörlerin varlığının ateşli ve şiddetli alt solunum yolu hastalıklarının önlendiğini bildirmişlerdir (13).

Re-enfeksiyon boyunca virus kısa bir süre organizmada kalır. Gerçektende yetişkinlerde bütün Pİ virus hastalıkları re-enfeksiyona bağlıdır (14).

Parainfluenza virus hastalıklarında korunma:

Ververt maymun hücre kültürlerinde üretilen parainfluenza tip 1 ve 2, civciv embriyonlu doku kültürlerinde üretilen Pİ virus tip 3 formalinle inaktive edilerek aşı hazırlanmıştır. Bu aşular bebeklerde teste tabi tutulmuş ve aşılanan çocuklarda 3 enjeksiyondan sonra nötralizan antikör düzeyinde bir artma gözlenmiştir.

Fakat bu aşı IgA yapımına sebep olmadığından tabii enfeksiyona karşı çocukları korumamıştır. Halen canlı attenüe bir aşı hazırlamak için çalışmalar yapılmaktadır (15,16).

Parainfluenza virus enfeksiyonlarında klinik bulgular:

Çocuklarda Pİ virus enfeksiyonuna bağlı klinik bulgular geniş spektrumlu olup, hayati tehlikesi olan krup veya bronşiyolit gibi klinik tablolar ortaya çıkabilir. Enfeksiyona neden olan virusun serotipi, hastanın cinsiyeti ve enfeksiyonun primer veya re-enfeksiyon olup olmaması klinik görünümü etkiler. Pİ viruslarıyla en sık oluşan sendrom çoğunlukla bronşitle birlikte seyreden soğuk algınlığıdır. Pİ viruslarına bağlı soğuk algınlıkları ve bronşitler hem çocuklarda, hem de erişkinlerde görülebilir. Krup sendromu havlar tarzda öksürük, boğuk ses gibi bulgularla seyreder ve ciddi bir tablo oluşur. Küçük çocuklarda krup sendromunu dörtte bir ile yarısı Pİ viruslarından birisi ile en-

feksiyona bağılıdır. Bu viruslar pnömoni de oluşturabilirler.

PI virusu enfeksiyonlarının inkübasyon süresi kesinleşmemişse de muhtemelen 3 - 6 gün arasında değişir (17,18).

PI virusunun inöküle edildiği ergin gönüllülerde re-enfeksiyon için inkübasyon süresi 3 - 8 gün arasında değişim gösterir (19).

Patogenez:

PI virusu muhtemelen direkt kontakt veya büyük damlacıklarla solunum yolu ile kişiden kişiye bulaşır ve yalnız solunum yolu epitelinde çoğalır (19,20).

Burun ve boğazın mukoz membranlarını sarar, paranazal ve üsteki borusu tıkanması da meydana gelebilir. Normal olarak bu bölgede kalır. Ancak küçük çocuklarda, larinks, trakea, bronş, bronşiyol ve akciğerlerde yayılabilir. Böylece daha ağır enfeksiyonlar meydana gelebilir.

Bebek ve küçük çocuklarda enfeksiyonun sık olarak ortaya çıkması ve re-enfeksiyonun görülmesi, bu virusların çok kolay yayılarak enfekte etmek için çok küçük bir inökülümün yeterli olduğunu göstermektedir (10).

PI tip 1 ve 2 enfeksiyonları larinkste bir krup sendromuna neden olabilirler. Koşulaşmış olan mukus birikimi bronkus ve trakeayı büyük ölçüde tıkayacağından hava yollarının tıkanması söz konusu olabilir. PI tip 3 virusunun akciğer ve küçük bronkuslara yayılmaya yatkın olup bronkopnömoni oluşturabilirler.

PI 1,3 tiplerinin yayılımı bir kreşde (11) ve bir çocuk bakım evinde (23) gözlenmiştir. Tip 3'ün hastanede yatan çocuklarda yayıldığı da ayrıca saptanmıştır (22).

Primer olarak tip 1, 2 ve 3 ile meydana gelen ağır solunum yolu hastalığı hayatın ilk 3 ile 5 inci yılında ortaya çıkar. Erişkinler ve çocuklar özellikle tip 3 ile enfeksiyona yakalanırlar. Re-enfeksiyon bilinmiyorsa da bir çok kimse tip 3 virusu ile

enfeksiyona tekrar yakalanabilir.

Pf virusunun solunum yolları mukozasına tutunmasını izleyen olaylar dizisi bilinmemektedir. Bu virus hasta çocukların solunum salgularındaki silli epitel hücrelerinde floresan antikor ile gösterilmiştir.

Ölen az sayıda kişinin akciğerindeki Pf hastalığının histopatolojik değişimleri, diğer viral alt solunum yolu hastalığından farklıdır. Krup sendromunda Pf tip 1,3 ile subglotik ilişkinin mekanizması henüz bilinmemektedir (24, 25, 26).

Parainfluenza tip 1 virusun yaptığı hastalıklar ve epidemiyolojisi:

P1 tip 1 virusunun domuz pnömonisi ve yeni doğan çocukların akciğer iltihaplarında etiyolojik etken olduğu bildirilmektedir. Yalnız laboratuvar farelerinde spontan olarak bulunması bu fareler aracılığıyla yapılan izolasyonları kuşkulu hale getirmekte, dolayısıyla bu virusun insan hastalıklarındaki rolünü tam olarak değerlendirmek mümkün olmamaktadır.

Bununla birlikte sendaii virusu somatik hücre genetiği çalışmalarında hücre füzyonu oluşturduğu ve ayrıca paramyxovirusların replikasyonlarında iyi bir model ödevi gördüğünden önem veren bir virustur.

Maymun böbrek hücreleri doku kültürlerinde, sitopatik etki (CPE) yapmayan bu virusun üremesi kobay eritrositleriyle uyguayan hemadsorbsiyon testi ile anlaşılabilir.

Bu virusun çocuklarda başlıca krup etkeni olduğu ayrıca nezle, farenjit, bronşit, bronşiyolit, pnömoni ve sık görülen özgül olmayan üst solunum yolları hastalıkları yapabileceği bildirilmektedir. Erişkinlerde ise soğuk algınlığı dediğimiz tabloyu meydana getirir. Organizmada özgül antikorlar bulunmasına rağmen re-enfeksiyonlar görülür.

P1 viruslarının inaktive edilmesiyle hazırlanan aşılar kanada antikor oluşumuna neden olurlarsa da burun salgısında bu antikorlar bulunmaz ve bu yüzden aşılanmış kişiler yeni enfeksiyonlara duyarlıdırlar. Çünkü korunmada gerçek rol oynayan IgA tipi salgısal antikorlardır. Halbuki bu viruslarla olan doğal enfeksiyonlarda burun akıntısında da salgısal (IgA tipi) antikorlar oluşur ve kişiyi re-enfeksiyonlara karşı bir müddet korur.

Parainfluenza tip 2:

Bu grubun en önemlisi krupla beraber olan virus (croupe-Associated, CA) veya çocukların, akut laringotrakeo-bronşit virusudur. Bu virus insan orijinli doku kültürlerinde (Hela veya insan embriyonik akciğer) ve maymun böbrek hücre kültürlerinde ürer ve sitopatik etki olarak sinsitialar oluşturur. Virus tavuk eritrositlerini ve daha az olmak üzere insan 0 grubu eritrositlerini agglütine eder.

Eritrositlerin adsorbsiyon ve agglütinasyonu + 4° C de, virusun eritrositlerden ayrılması (elution) 37° C'de olur. Karışım tekrar 4 dereceye getirilirse yeniden agglütinasyon görülür.

Antijenik yönden tip 2'nin kabakulak virusundan başka diğer myxoviruslarla bir ilgisi yoktur. Kabakulak geçiren hastalarla, kabakulak virusuyla enfekte edilmiş hayvan serumlarında, tip 2 ile çapraz reaksiyon veren antikörler bulunur. O halde antijenik yapısı kabakulak virusuna benzerlik gösterir. Bu virus maymun böbrek hücreleri doku kültürlerinde spontan olarak bulunabilmekte ve bu kültürlerin % 30'unda rastlanabilmektedir.

Parainfluenza tip 3:

Bu gruptaki viruslara hemadsorbsiyon virus 1, (HA-1) de denmektedir. Bu isimden de anlaşılacağı gibi bunlar maymun böbrek doku kültüründe hemadsorbsiyon yöntemi ile varlıkları saptanabilir.

Bu kültürlerde virusun seri pasajları zamanla sitopatojenik etkiye neden olmakta ise de, bu olay hemadsorbsiyon testinin pozitif olmasından günlerce sonra ortaya çıkmaktadır. Virus insan orijinli doku kültürlerinde çok çekirdekli dev hücreler oluşturmaktadır.

Pİ tip 3 hafif solunum yolları enfeksiyonları geçiren ve ayrıca krup, bronşiyolit ve pnömoni belirtileri gösteren bazı çocuklardan izole edilmiştir. Bu virusun sığırlarda görülen nezle ve üst solunum yolları enfeksiyonlarından da üretildiği mezbahalarda kesilen sığırların ortalama % 70 inin serumunda Pİ tip 3 antikorları bulunduğu bildirilmektedir.

A.B.D. de bu virusenfeksiyonu yaygın olup, özellikle sonbaharda daha çok rastlanmaktadır. Virus Pİ tip 1 ve 2'ye antijenik benzerlik gösterir. Pİ tip 1 ve 2 ile olan enfeksiyonlarda yalnız bu tiplere değil, Pİ tip 3'e karşı da antikorlar oluşmaktadır. Çocuklarda bu tiplerle ilgili enfeksiyonlar Pİ tip 1 ve 2 ile olanlardan daha evvel, yani daha küçük yaşlarda yaygın olarak görülmektedir. Bir süre Pİ tip 1 ve 2 ile olan temaslar Pİ tip 3 antikorlarını stimüle ederek adeta bir rapel aşısı gibi etki yapmaktadır (26, 27, 28).

Parainfluenza tip 4:

Bu grupta en önemli suş M-25 olup embriyonlu yumurtada üremez. Doku kültürlerinde sitopatik etki yapmadığından ancak hemadsorbsiyonla tanımlanabilir.

Bu virusun insanlarda özel bir hastalık yaptığı hakkında kesin bir fikir yoksa da küçük çocuklarda halsizlik, kırıklık, iştahsızlık gibi özgül olmayan durumlardan sorumlu olduğu sanılmaktadır.

Epidemiyoloji:

Pİ viruslarının 4 tipi de geniş bir coğrafik dağılıma sahip olup dünyanın değişik bölgelerinden izole edilmişlerdir. Pİ 1,3 tipleri uygun doku kültürü teknikleri kullanılarak aranan her yerde izole edilmişlerdir (9).

Pİ tip 4 virusu A.B.D. de (27) ve İngiltere'de (12) izole

edilmiştir. Serolojik çalışmalar bu virusların dünyada yaygın olarak dağılımı olduğunu düşündürmektedir (12, 27).

Pİ tip 4'ü izole etmek diğer 3 tipe kıyasla daha zordur. Hava yolu ve damlacık enfeksiyonu ile direkt olarak bulaşır.

Dünyadaki krup vakalarının 1/3 ünün Pİ virusları (özellikle tip 1) tarafından meydana getirildiği düşünülmektedir (28, 29).

Hayatın ilk yaşlarında tip 3 ile meydana gelen enfeksiyon genellikle çok görülür (30). Bebeklerin çoğunda 2 yaşına kadar tip 3'e karşı nötralizan antikorlar oluşur (11-31).

A.B.D. de bir yaşındaki çocukların yaklaşık olarak % 50 si ve 6 yaşındakilerin büyük bir kısmı bu tipe karşı oluşan antikorlara sahiptirler. Pİ tip 1, 2 ve 4 ile daha sonra oluşan enfeksiyonlar hafif olarak seyreder ve 10 yaşındaki çocukların % 75'i bu tiplere karşı antikorlar içerirler (26,27,29).

North Carolina (32) Washington D.C (33) ve İngiltere'de (17,34) Pİ tip 1 enfeksiyonlarının yoğun görülme zamanı çift rakamla biten yılların sonbaharında oluşurken Pİ tip 2 enfeksiyonları aynı yerlerde, sonu tek rakamla biten yılların sonbaharında görüldü. Pİ tip 1 enfeksiyonları sıfırla biten yılların sonbaharında görüldü.

Glezen ve Denny (35) Pİ tip 1 ve 2 enfeksiyonların sık görülmesinin 1 yıl arayla oluşmasını, viral solunum enfeksiyonlarındaki interferens fenomeni için tipik olduğunu gösterdiler.

Pİ tip 1 ve 2'nin neden olduğu alt solunum yolu enfeksiyonları Pİ tip 3'ünkünden farklıdır. Anneden pasif olarak geçen antikorlar çocukta tip 1 ve 2 ile olan enfeksiyonun bulgularını etkiler. Bu tiplere bağlı ağır enfeksiyonlar ile 4 ayın altında nadir görülür (10).

Bebeklerde 4-6 aydan sonra bu virüslara bağlı solunum yolu hastalığı görülme sıklığı, özellikle krup artar ve 4-6

yaşa kadar yüksek kalır. 6 yaşından sonra enfeksiyonlar (genellikle re-enfeksiyonlar) devam eder fakat sıklık ve şiddet azalır. Pİ tip 3 anneden gelen sıvısal antikörlara karşın pnömoni ve bronşiolit gibi ağır enfeksiyonlar oluşturur.

Bu durum SSV unu andırır. Pİ tip 3 virusuna bağı enfeksiyonun şiddeti, re-enfeksiyonların devam etmesine karşın 3 yaşından sonra hafifleme gösterir. Pİ tip 1 ve 2'ye bağı ağır hastalığa erkek çocuklar daha duyarlıdır. Ancak bu cinsiyet farkı sadece tıbbi müdahale gerektirecek hastalıklar için geçerlidir (10).

Hafif seyreden Pİ enfeksiyonları her iki cinsiyette de görülme sıklığı aynıdır (23) Pİ tip 3'e bağı ağır hastalıklardan olan bu durum her iki cinsiyette farksızdır (28,36).

Chicago'da yapılan son bir çalışmada Pİ virusları, özellikle tip 3 aşağı solunum yolu hastalığı olan bebeklerin takriben % 25'inde bulunmuştur. Kolej talebeleri ile askeri personel arasında görülen yukarı solunum yolu hastalıklarının takriben % 10'undan fazlası Pİ virusları tarafından meydana getirilir. Pİ tip 2 ile oluşan enfeksiyonlar genellikle sonbahar ve kışın, tip 1 ve 3 ile oluşan enfeksiyonlar ise bütün yıl boyunca meydana gelir. Pİ tip 4 genellikle subklinik veya çok hafif enfeksiyonlara neden olur (31).

Krup sendromundan sorumlu en önemli etken Pİ tip 1,2 ve 3 viruslarıdır ki bunlar krup'a ilave olarak daha hafif hastalıklardan da sorumludurlar (7, 37).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada Pİ tip 1 virus enfeksiyonlarının toplumda yaygın olduğu seroepidemiolojik olarak gösterilmiştir.

Bu çalışmada üst solunum yolu enfeksiyonu geçiren çocuklarda ve çeşitli yaş gruplarında Pİ tip 1 virusuna karşı oluşan antikörların insidansı HÖ yöntemiyle incelenmiştir (42).

Parainfluenza virusların laboratuvar teşhisi:

Pİ virusları ile oluşan enfeksiyonlarda en kesin tanı, klinik örnekten primer maymun böbrek veya insan embriyonik böbrek dokusu kültürlerinde ekim yapılarak, virus izolasyonu ile konabilir. Virus izolasyonu için gerekli örnek boğaz sürüntüsüdür.

Pİ tip 1 virusunun izolasyonu için Farengeal sekresiyon, protein içeren bir vasat içinde laboratuvara gönderilir. Gerekliğinde -60° C'de muhafaza edilebilir. Inkubasyondan önce maymun böbreği hücre kültüründe latent olarak bulunan SV5 virüsüne karşı hazırlanmış antiserum ile muamele edilir. Ekimden sonra hücre kültürleri sitopatik etki yönünden incelenir.

Pİ virusları (Hela) veya (Hep-2) gibi devamlı hücre kültürlerine adapte olabılırlar. Ancak bu hücre kültürleri klinik örnekten ilk izolasyon için uygun değildir.

Pİ viruslarının ilk izolasyonlarında, HEK (insan embriyonu böbrek), vero (maymun böbrek hücre kültürleri) kullanılabilir (38). Daha sonraki pasajlar için (Hela) ve (Hep-2), devamlı hücre kültürleri ve HEL (insan embriyonik akciğer) hücre kültürleri de kullanılabilir.

Pİ tip 1, 2, 3 virusların hücre kültürlerinde üremeleri genellikle 8-10 günde saptanabilir. Pİ tip 4 için bu süre daha fazladır ve 20 güne kadar uzayabilir. Ancak bu virusların genellikle hücre kültürlerinde tipik sitopatik etkileri (CPE) olmadığı için virüsün üremesi bazı yöntemlerle araştırılır. (Yalnız parainfluenza tip 2 ilk izolasyonda tipik sitopatik etki gösterebilir). Bu virus genellikle hücre kültürlerinde sinsitiya oluşturur (9, 19, 39).

Pİ virusları hücre kültürlerinde ürettiği zaman enfekte ettikleri hücrelerin yüzeyinde viral hemagglütininer oluşturur.

rurlar. Bu enfekte hücreler bazı hayvan eritrositleri ile muamele edildiklerinde, eritrositler enfekte hücre yüzeyinde bulunan hemagglütininlere tutunurlar. "Hemadsorbsiyon" adı verilen bu yöntem parainfluenza viruslarının hücre kültürlerinde üremelerini saptamak için en uygun yöntemdir.

Yetişkinlerde re-enfeksiyona bağlı olarak antikor fazlalığı nedeniyle sekresiyonda virus sayısının az olması sonucu hemadsorbsiyon geç çıkabilir (40). Ayrıca Pİ virusları embriyonlu tavuk yumurtalarının koryoallantoik (CAS) ve amniotik keselerine de (AS) seri pasajlar halinde ekim yapılarak adapte edilebilirler.

Embriyonlu yumurtada sadece Pİ tip 2 izole edilebilmiştir. Pİ tip 1, 3'de embriyonlu yumurtaya adapte olabilirler. Ancak embriyonlu yumurta tip 1 ve 3'ün primer izolasyonu için uygun değildir.

Pİ virusları serolojik olarak standard kontrol antiserumlar kullanılarak hemagglütinasyon önlenim (HÖ), kompleman birleşmesi (K.B) ve hemadsorbsiyon önlenim (HAD-1) deneyleri ile tipleri tanımlanabilir.

Pİ virus enfeksiyonunun serolojik tanısı konvelesan dönemde alınan serum örneğindeki antikor titresinin akut dönemdekine göre 4 kat artışı ile konur. Titre artışı hemagglütinasyon önlenim (HÖ) ve kompleman birleşmesi (K.B) veya nötralizasyon (Nt) yöntemleriyle gösterilebilir. Bir serotipe karşı heterotipik antikor cevabının olması, Pİ enfeksiyonlarının serolojik tanısında bir sorun olmaktadır (11, 14).

Sonuç olarak enfeksiyona sebep olan serotip her zaman serolojide testlerle belirlenmiyebilir. Diğer taraftan Pİ viruslarının birine veya bir kaçına karşı antikor titresinin yükselmesinin yetişkinlerde re-enfeksiyona bağlıdır (14).

Doku kùltùrlerinde viral izolasyon ve serolojik testlerin kombinasyonu Pİ virus enfeksiyonlarının insidansının seroepidemiolojik değerlendirilmesinde daha kesin sonuç alınmasını sağlar.

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

Hücre Kültürleri:

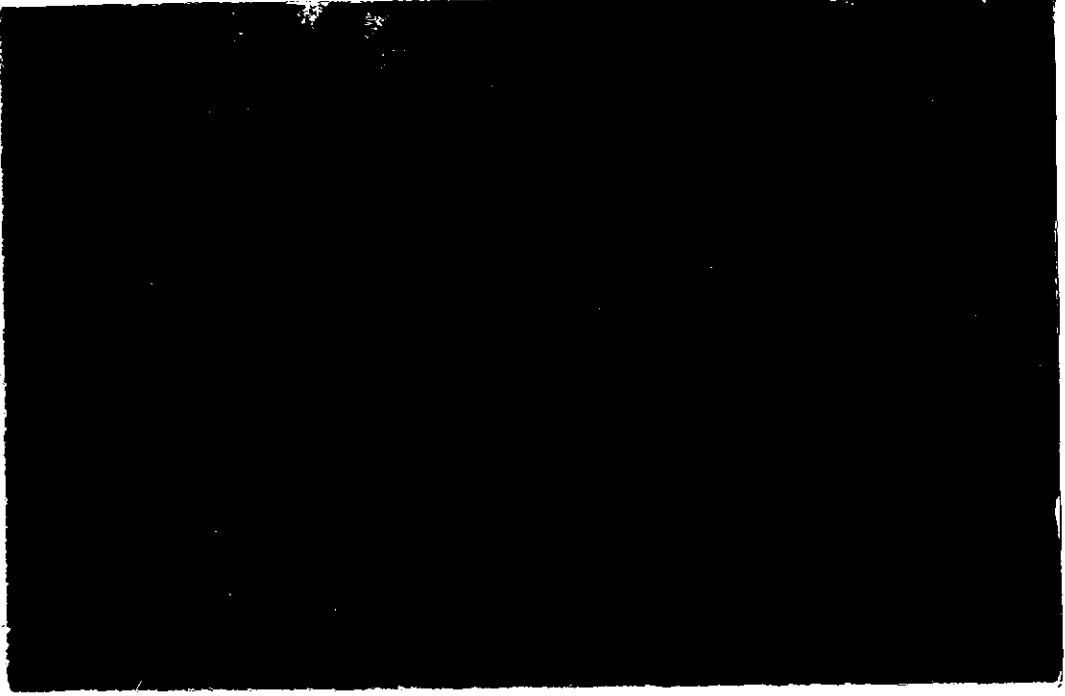
Parainfluenza tip 1 sendaii suşu (HAD-2), Vero (Maymun böbrek hücresi) ve HEL (insan embriyonik akciğer) hücre kültürlerinde üretildi.

Vero hücreleri orijinal olarak Flow.Lab.Irvine, Scotland'dan sağlandı. HEL hücreleri ise Hacettepe Üniversitesi Tıp Merkezi, kadın doğum servisi, ameliyathane bölümünde, steril şartlarda, alınan "3-4" aylık enfekte olmayan fetüslardan, kendi laboratuvarımızda standard yöntemlerle elde edildi (45).

Elde edilen hücrelerin üretilmesi için % 10 dana serumu (D.S), veya fetal dana serumu (F.D.S) ve % 1 oranında SP (streptomisin-penisilin) içeren "Eagle Minimal Essential" vasatlar kullanıldı. Hücreler 200^{CC} lik özel hücre kültürü şişelerinde (jena-glass) üretildi. Hücreler 2-3 günde tek tabaka (mono-layer) olduktan sonra, 1' den 2' ye pasaj edilerek, çoğaltıldı. Hücreler her gün makroskopik ve mikroskopik olarak gözlemlendi ve gerektiğinde vasat değiştirildi veya % 7-8 lik NaHCO₃ ile nötral PH'ya ayarlandı.

Şekil III

Şekil III:



Devamlı maymun böbrek hücre kültürü (Vero).

- Giemsa boyası.

Şekil III:



Devamlı maymun böbrek hücre kültürü (Vero).

- Giemsa boyası.

Hücre Kültürlerinde Kullanılan Vasatlar:

Hücre kültürlerinde kullanılan, (Auto-Pow) Basal Medium Eagle, vasatları Batı Almanya'daki (Flow) laboratuvarlarından sağlandı. 9.588 gr toz halindeki vasat tartılıp iyonsuz suda çözüldükten sonra glutamın eklendi ve 1 litreye tamamlandı. Zeiss filtrelerinde süzülerek steril edildi.

Hücrelerin üretilmesi için % 10 oranında dana serumu (D.S) ve % 1 oranında SP (mililitrede 200 ünite penisilin, 200 mikrogram streptomisin) eklenerek kullanıldı.

Virus:

Parainfluenza tip 1 sendaii suşu, NIH, Bethesda, Maryland, A.B.D. den sağlandı.

Eritrositleri:

Hemagglütinasyon (HA) ; Hemagglütinasyon önlenim (HÖ) ve single radial-hemdyssis deneylerinde kullanılan horoz eritrositleri ve hemadsorbsiyon yönteminde kullanılan kobay eritrositleri H.Ü.deney hayvanları bölümünden sağlandı.

Kompleman:

Kompleman için erkek kobayın kalp kanı alınarak serumu ayrıldı. Küçük miktarlarda (0.2 ml) tüplere bölünerek -25⁰ C'de saklandı ve kompleman olarak kullanıldı.

Serumlar:

Deneyde kullanılan serumlar, H.Ü. Tıp Fakültesi Hastanesinin değişik bölümlerine, üst solunum yolu enfeksiyonu dışındaki nedenlerle müracaat eden, (0-30) yaşındaki kişilerden elde edildi. Serumlar kullanılıncaya kadar - 25⁰ C'de saklandı.

Pozitif Kontrol Serumlar:

Parainfluenza tip 1 antiserumu NIH, Bethesda, Maryland, A.B.D. den sağlandı.

Ayrıca kontrol serumların bir kısmı ise kendi laboratuvarımızda, tavşanlara P1 tip 1 virusu enjekte edilerek elde edildi.

Deneyde Kullanılan Solusyonlar:

Hemaglutinasyon (HA ve Hemaglutinasyon önlenim (HÖ) deneylerinde kullanılan serum fizyolojik (SF) , 9 gram NaCl'ün 1000 ml iyonsuz suya tamamlanmasıyla hazırlandı, 120° C'de 20' dakika otoklavda steril edilerek kullanıldı.

SRH deneyinde kullanılan veronal-büffer (VB) aşağıdaki formüle göre laboratuvarımızda hazırlandı.

VB (Veronal-Buffer PH 7.2):

NaCl.....	8.5	gram
5.5 diethyl barbituric acid	0.575	"
Na 5.5 diethyl - barbiturate	0.2	"
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	1.65	"
CaCl ₂	0.28	"

Hazırlanışı:

1. 50 ml sıcak iyonsuz suda barbituric asid eritildi.
2. Diğer maddeler eklendi ve iyonsuz su ile 200 ml.ye tamamlandı.
3. Otoklavda 20' dakika 120° C'de steril edildi, sonra 4° C'de saklandı
4. Kullanıldığı zaman, iyonsuz su ile 1,5 lik sulandırım yapıldı ve PH'sı 7.2 ye ayarlandı.

Mikroteknik Gereçleri:

Hemaglutinasyon (HA) ve Hemaglutinasyon önlenim (HÖ) deneylerinde kullanılan mikroteknik gereçleri şunlardır:

1. Mikrodiluter (loop): 0.025 ml sıvı tutma yeteneğinde olan bir alettir.
2. Damlalık pipeti: Mikroteknikte kullanılan ve 0.025 ml damla verme yeteneğinde olan özel pipetlerdir.
3. Test kağıtları (go-no-go): Loopları kontrol etmede kullanılan ve üzerinde bulunan daireler tam 0.025 ml sıvı emme yeteneğinde olan, özel emici kağıtlardır.
4. U tabanlı pleytler: Tabanları U şeklinde (8x12) adet çukur içeren, bu sistemde kullanılan polistiren yapısındaki özel pleytlerdir.
5. Test okuma aynası: Deneylerin değerlendirilmesinde kullanılan iç bükey (konkav) aynadır.

Virusun Üretilmesi ve Antijenin Hazırlanması:

Doku kültürü şişelerinde üretilen vero (maymun böbrek hücresi) ve HEL (insan embriyonik akciğer) hücreleri, virus ekimi için tüplere pasaj edildi. Hücreler tüplerde tek tabaka haline geldikten sonra vasatları boşaltıldı ve kontrol tüpler hariç, diğerlerine stok virustan 0.1 ml kondu.

Adsorbsiyon için 1.5 saat 37° C'lik etüvde inkübe edildi. Daha sonra % 2'lik dana serumu (D.S) ve % 1 oranında SP içeren vasattan kontrollerde dahil olmak üzere tüplere kondu. Tüpler tekrar 37° C'lik etüve kaldırıldı ve sitopatik etki (CPE) gözlene kadar (5-6) gün etüvde bekletildi. Gerektiğinde PH'ları sodium bikarbonat ile nötral PH'ya ayarlandı.

Parainfluenza tip 1 virusu genellikle hücre kültürlerinde tipik sitopatik etki (CPE) göstermediğinden virusun üreyip üremediğini saptamak için hemadsorbsiyon yöntemi uygulandı (55).

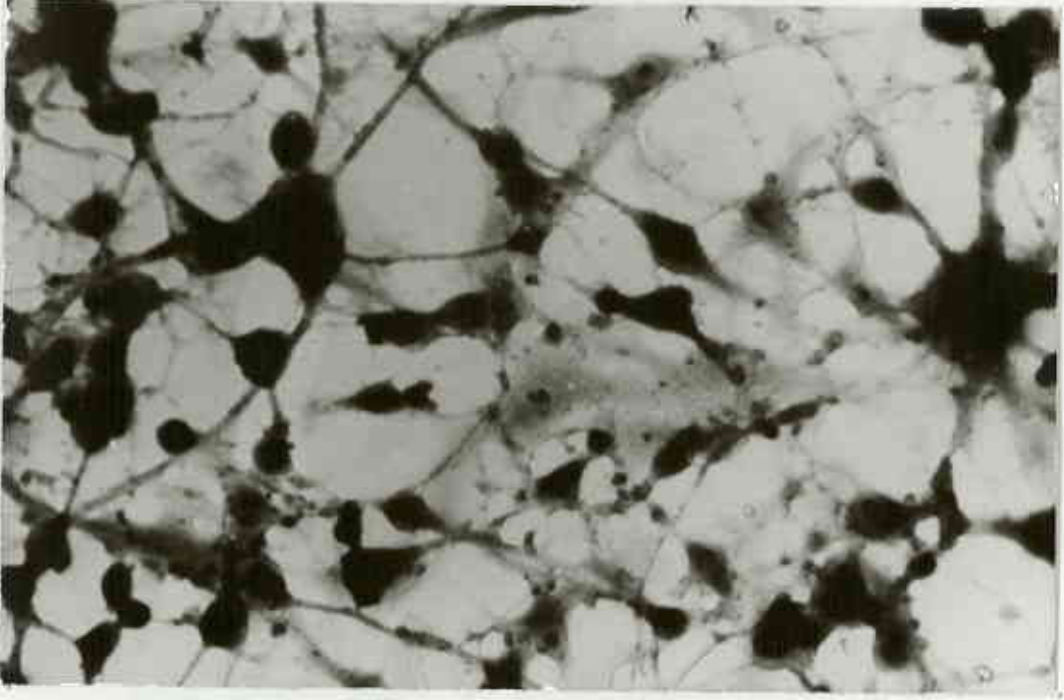
Parainfluenza tip 1 virusunun hücre kültürlerinde üremesi hemadsorbsiyon yöntemiyle gözlemlendikten sonra, virus ile enfekte hücreler, vasatları ile birlikte -25° C'de 3 kez dondurulup çözüldü. 2000 rpm'de 15' dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı serolojik tüplere bölünerek -25° C'de saklandı.

Bu sıvıların titreleri hemaglütinasyon yöntemi ile tayin edilerek antijen olarak kullanıldı. Antijenler kullanılabildiği kadar -25° C'de saklandı.

Ayrıca tek yönlü ışınal hemoliz (SRH) deneyinde kullanılan parainfluenza tip 1 antijeni dölletli tavuk yumurtalarından aşağıda anlatılan şekilde elde edildi.

Şekil IV.

Şekil IV:



*Parainfluenza tip 1 ile enfekte olan vero hücrelerinde
oluşan CPE. (Enfeksiyonun 6 ıncı günü).*

- Giemsa boyası

Embriyonlu Yumurtaya Ekim:

Deneyde kullanılan dölletli yumurtalar "Refik Saydam Merkezi, Hıfzısıhha Enstütüsü"nden sağlandı. Yumurtalar alkollü pamukla silinerek temizlendi ve 9 gün 39° - 40° C'de nemli ortamda özel yumurta inkübatörüne bırakıldı. Ara sıra yumurtalar, yumurta inkübatöründen çıkarılarak, yumurta muayene kutusunda ceninin varlığı ve yumurtanın enfekte olup olmadığı incelendi. Enfekte olanlar ve cenin olmayan yumurtalar atıldı.

9 günün sonunda, yumurta muayene kutusunda Korio-Allantoik-Mambran (CAM) üzerinde damarsız bir nokta işaretlendi. İşaretlenen nokta tendürdiyotlu pamukla dezenfekte edildi. Yumurta delicisi ile hafif bastırarak yumurtayı kırmadan bir delik açıldı. Steril enjektör ile steril koşullarda, stok virustan 0.1 ml inoküle edildi.

(Her hangi bir damar perforasiyonuna neden olmamak için. İğnenin ucunun yumurta yüzeyinden itibaren içeriye 4 mm den fazla girmemesine özen gösterildi).

Delik, eritilmiş parafin ile kapatıldı. Ekim yapılan yumurtalar, 3 gün 33° C'de yumurta inkübatöründe bırakıldı. Daha sonra yumurtalar 4° C'de buzdolabında bir gece bekletildi. Bu işlemde amaç ceninin ölmemesini ve aynı zamanda korioallantoik kesenin kılcal damarlarındaki kanı pıhtılaştırarak, sıvıların toplama esnasında kanamanın önlenmesini sağlamaktı.

Ertesi gün yumurtalar dezenfekte edilerek hava boşluğu kısmından kırıldı. Steril şartlarda hava boşluğuna çeviren kabuklu kısım tamamen çıkarıldı ve korioallantoik zar (CAM) steril pens yardımıyla kaldırıldı.

Steril pipetler ile çekilen sıvılar, steril tüplere kondu (Toplanan sıvıların berrak olması gerekmektedir). Sıvılar (10-15) dakika 2500 rpm'de santrifüj edildi. Üstteki sıvıların, hemaglutinasyon (HA) yöntemiyle titreleri tayin edilerek antijen

olarak (SRH) deneyinde kullanıldı. Bu sıvılar kullanılana kadar -25° C'de saklandı (45).

Hemadsorbsiyon Yöntemi (HAD):

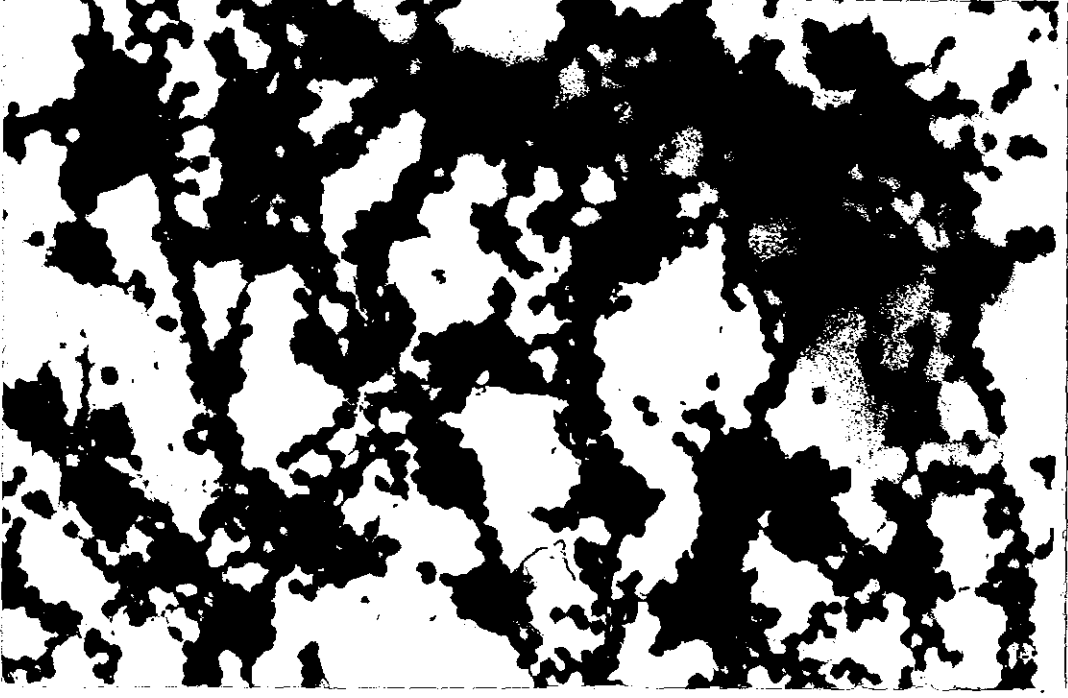
Kobay eritrositleri 1 aylık erkek kobay kanından ayrılarak, serum fizyolojik ile 3 kez yıkandı ve % 0.4 lük suspansiyonu hazırlandı. Parainfluenza tip 1 ile enfekte hücre ve kontrol hücre alınıp vasatları boşaltılarak üzerlerine 0.2 ml kobay eritrositi süspansiyonundan kondu. Tüpler yatay durumda 30' dakika 4° C buzdolabında inkübe edildi.

Daha sonra her iki hücrede SF ile 3 kez yıkanarak mikroskopta gözlendi.

Mikroskopta eritrositler, parainfluenza tip 1 virusu ile enfekte olan hücrelerin yüzeyine tutunmuş olarak gözlendi. Kontrol tüpte ise her hangi bir değişiklik saptanmadı (55).

Şekil V:

Şekil V:



*Kobay eritrositlerinin parainfluenza tip 1 ile enfekte
vero hücrelerine adsorbsiyonu. (Enfeksiyonun 6 ıncı günü).*

- Giemsa boyası

Hemaglutinasyon Yöntemi (HA):

HA deneyi : Hemaglutinasyon deneyi, HÖ deneyinde kullanılacak olan parainfluenza tip 1 virusunun titrasyonu için uygulandı:

HA deneyinde kullanılan maddeler:

1. Mikroteknik gereçleri
2. % 0.05 lik horoz eritrositleri
3. Serum fizyolojik (SF)
4. P1 tip 1 virusu

HA Deneyinin Yapılışı:

1. U tabanlı pleytin çalışılacak tüm çukurlarına damlalık pipetiyle 0.025 ml SF damlatıldı.
2. İlk sıra çukurlara (çalışılacak virus sayısına göre) 0.025 ml virus, "diluter" (loop)larla kondu ve seri sulandırılmaları yapıldı. (Kontrol çukuru hariç)
3. Tüm çukurlara 0.025 ml SF damlatıldı.
4. Eritrosit kontrol çukurlarına yalnızca 0.050 ml SF damlatıldı.
5. Kontrol dahil tüm çukurlara 0.025 ml % 0.05 lik horoz eritrosit sulandırımından damlatıldı.
6. Pleyt iyice çalkalanarak oda ısısında bir saat beklendi ve sonuçlar okundu.
7. Değerlendirme: Tam hemaglutinasyon gösteren en yüksek titre gözlenerek antijenin 1 HA ünitesi saptandı. (Hemaglutinasyon-önlenim deneyinde 4 HA ünitesi antijen kullanıldı.)

Hemaglütinasyon Önlenim Deneyi :

- Gerekli Maddeler:

1. Mikroteknik gereçleri
2. Receptor-Destroying-Enzyme (RDE) (1/10 sulandırımı)
3. % 0.05 lik horoz eritrositleri
4. SF içerisinde sulandırılmış 4 HA ünitesi Pİ tip 1 antijeni.

Deney Serumlarının Hazırlanması:

Deney serumlarında Pİ tip 1 virusuna karşı antikorların saptanmasında HÖ deneyi kullanıldı. Serumlar deneyden önce aşağıda anlatılan şekilde RDE ile muamele edildi:

1. 1 hacim (0.1 ml) hasta serumuna 4 hacim (0.4 ml) RDE (1/10 luk sulandırımından) eklendi. Bu işlem tüm serumlar için yapıldı. Serumlar 37^o C'lik su banyosunda bir gece bekletildi.
2. Ertesi gün RDE'nin etkisini gidermek için her tüpe % 2.5 luk sodyum sitrat solusyonundan 3 hacim (0.3 ml) eklendi, 56^o C'de 30^{dk} dakika bekletildi.
3. Başlangıç serum sulandırımını 1/10 yapmak için 2 hacim (0.2 ml) SF ilave edildi, serumlar bu şekilde HÖ deneyi için hazırlandı:

HÖ Deneyinin Yapılışı:

1. U tabanlı pleytlerde çalışılacak tam çukurlara 0.025 ml SF damlalık pipetiyle damlatıldı.
2. İlk çukurlara (RDE ile işleme sokulmuş her bir hasta

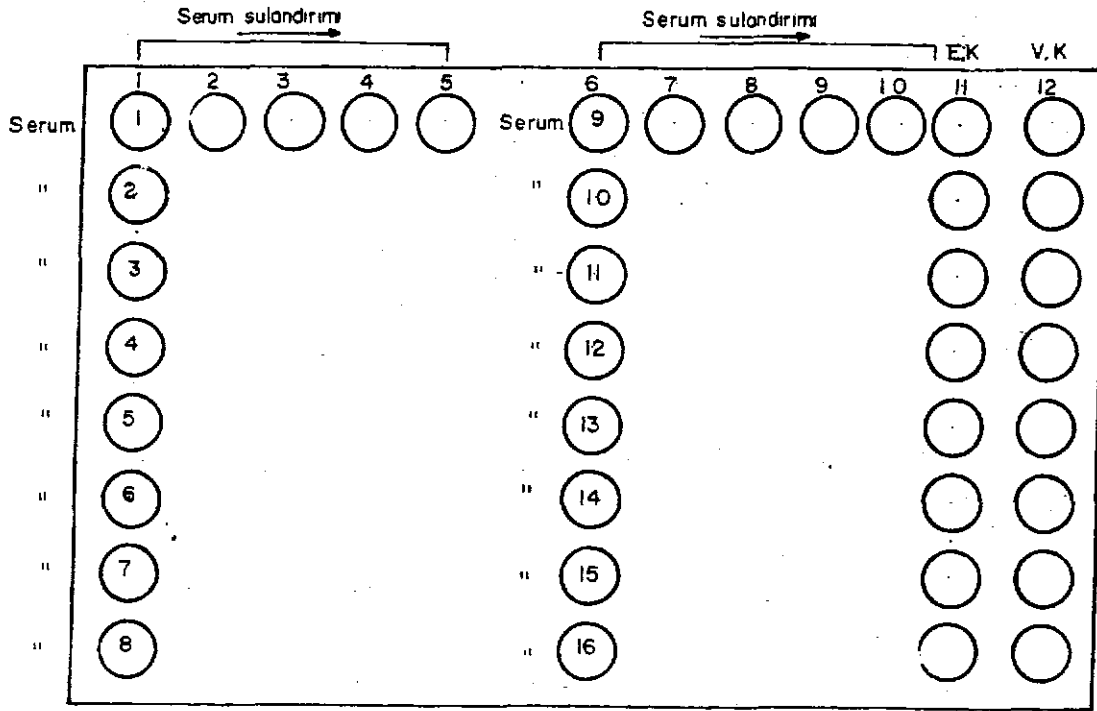
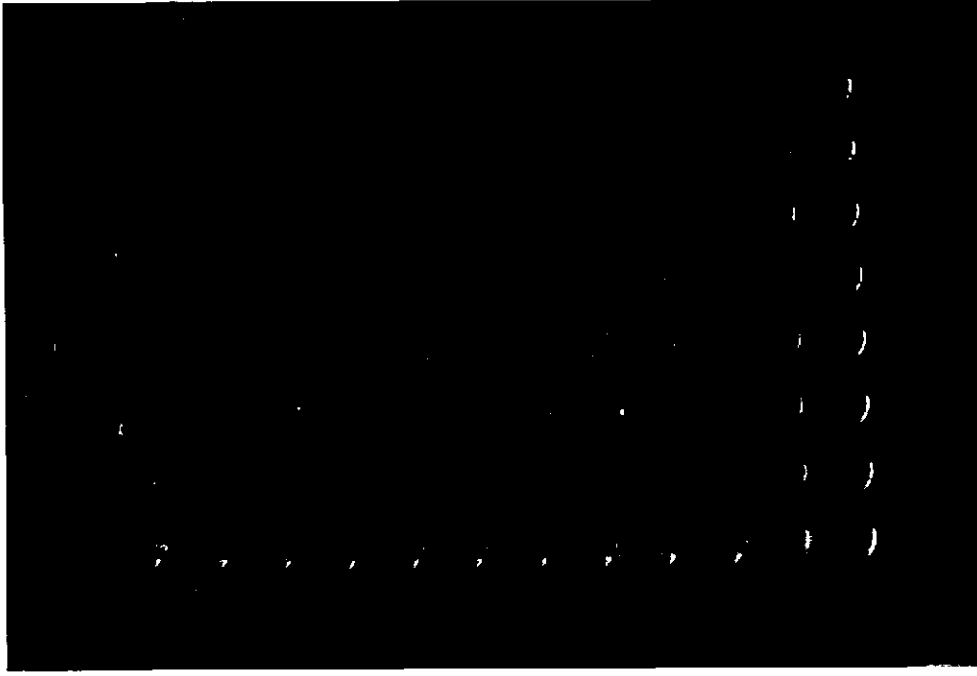
serumundan 0.025 ml "dilüter"le konu ve seri sulandırımı yapıldı.

3. Tüm çukurlara 4 HA ünitesi içeren virus sulandırımından 0.025 ml damlatıldı (eritrosit kontroller hariç)
4. Eritrosit Kontrolüne sadece 0.050 ml SF, antijen kontrolüne ise 0.025 ml SF, ve 0.025 ml 4 HA ünitesi içeren antijen damlatıldı.
5. Pleyt iyice çalkalanarak oda ısısında 30' dakika bekletildi.
6. Kontroller dahil olmak üzere tüm çocuklar % 0.5 lik horoz eritrositlerinden 0.050 şer ml damlatıldı.
7. Deney pleytleri iyice çalkalanarak bir saat oda ısısında bekletildikten sonra sonuçlar değerlendirildi.
8. Değerlendirme:

Eritrosit kontrol çukurlarında, eritrositlerde çökme antijen kontrol çukurlarında, tam hemaglutinasyon gözlemlendi. Hemaglutinasyonun tam olarak önlemediği en yüksek serum sulandırımı o serumun antikor titresi olarak değerlendirildi (45).

Şekil VI

Şekil VI:



Yukarıdan aşağıya

11. E.K: Eritrosit kontrolü

12. V.K: Virus kontrolü.

Tek Yönlü Işınsal Hemoliz Yöntemi (SRH):

SRH yöntemi Pİ tip 1 virusuna karşı antikörlerin saptanmasında ikinci yöntem olarak uygulandı. Bu yöntem Pİ tip 1 virusuna karşı antikörlerin saptanmasında daha önce hiç uygulanmamıştır. Bu nedenle bu deneyde kullanılan antijen, eritrositlerin hazırlanacağı, hemoliz plakların dökülüşünde SRH'in diğer hastalıklarda kullanıldığı yöntemler temel alınmış ancak bazı değişiklikler yapılmıştır (46, 47, 48, 49, 50, 51, 52).

Kullanılan Gereç ve Maddeler:

1. Pİ tip 1 virusu antijeni (500 H.A.Ü içeren sulandırımı)
2. Agaroz-L: Bu madde veronal buffer içinde % 1 lik olarak hazırlandı, % 0.1 sodyum Azid eklenerek 2.9 er cc olacak şekilde tüplere dağıtıldı ve otoklavda steril edildi.
3. Tannik-Asid: Veronal buffer ile (1/15.000) lik solusyonu hazırlanarak kullanıldı.
4. Kompleman
5. Horoz eritrositleri
6. Veronal buffer (PH:7.2)
7. Özel Pleyt: 3.5x9 cm boyutlarında 3 cc hacminde agaroz ile tamamen kaplanabilen çukura sahip bir gereçtir.
8. Delici alet: Pleyte dökülen agaroz üzerinde 3 mm çapında delik açmaya yarayan bir gereçtir.

SRH Deneyinin Yapılışı: A (ESAS DENEY)

1. Horoz eritrositleri 3 kez VB ile yıkandı. 0.1 ml paket eritrosit 7 ml tonnik asid (1/15.000) sulandırımı ile karıştırılıp 20' dakika 37° C'lik su banyosunda bekletildi.

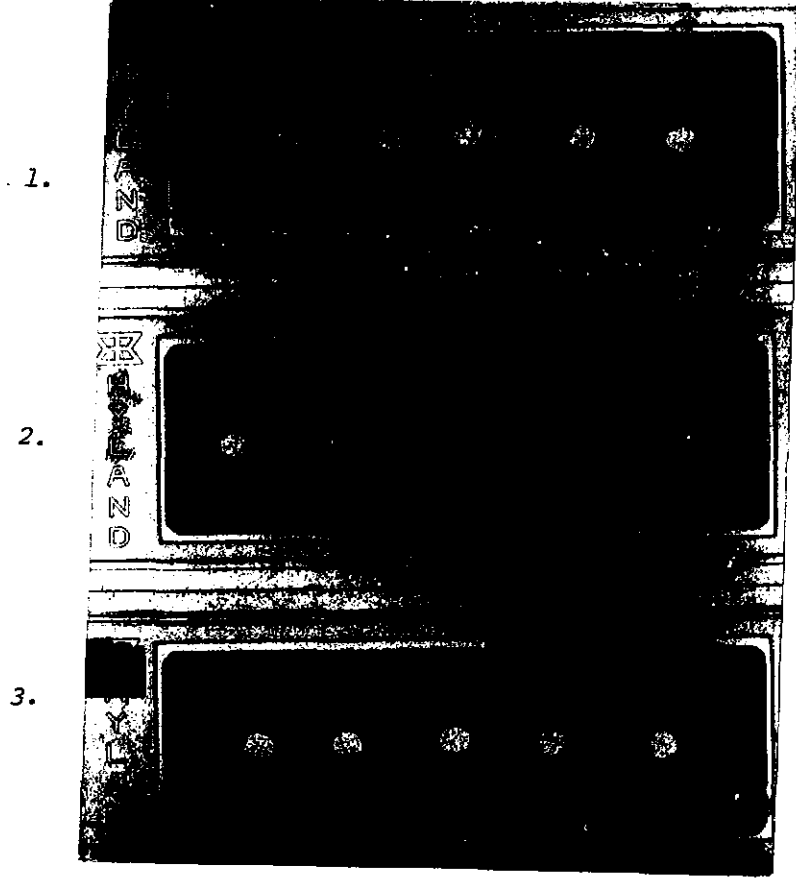
2. Bu sürenin sonunda karışım santrifüj edilip üst sıvı atıldı ve paket eritrositler tekrar 3 kez VB ile yıkandı.
3. Bu paket eritrositlerinin üzerine 0.9 ml VB ve 1 ml Pİ tip 1 (500 HA ünitesi içeren sulandırım) kondu ve iyice karıştırılıp oda derecesinde 45' dakika bekletildi.
4. Daha sonra bu karışım santrifuj edilerek üst sıvı atıldı ve paket eritrositler tekrar 3 kez VB ile yıkandı.
5. Bu eritrositlerin üzerine tüp içinde eritilmiş ve 45^o C'a kadar soğutulmuş 2.9 cc agaroz 1 eklendi. Hemen karıştırılarak donmadan pleyte döküldü, donuncaya kadar oda ısısında 10' dakika bekletildi.
6. Bu pleytlere steril koşullarda delici alet kullanılarak 1 cm ara ile 3 mm çapında delikler açıldı.
7. Bu deliklere pastör pipeti ile 50λkompleman kondu ve absorbe oluncaya kadar bekletildi.
8. Kompleman tamamıyla agarozla emildikten sonra bu deliklere 50λ hasta serumu kondu ve bir gece buzdolabında nemli bir kutu içinde bekletildi.
9. Ertesi gün pleytler 37^o C'lik etüvde 2 saat inkübe edildi.
10. Deliklerin çevresinde oluşan hemoliz çapı milimetrik olarak ölçüldü.

B- Kontrol Deney:

Yukarıda anlatılan tüm işlemler 3. basamakta konan 1 ml Pİ tip 1 antijenin yerine 1 ml VB konularak yapıldı ve kontrol pleyt olarak kullanıldı.

Şekil VII.

Şekil VII: SRH deneyinde kontrol ve test pleytleri.



1. HÖ deneyinde 1/160 titre gösteren test serumlarının SRH yönteminde hemoliz zonları.
2. HÖ deneyinde soldan sağa 1/80, 1/80, 1/40, 1/40, 1/20 ve 1/20' den az titre gösteren test serumlarının SRH yönteminde hemoliz zonları.
3. HÖ deneyinde soldan sağa 1/160, 1/80, 1/40, 1/20 ve negatif titre gösteren test serumlarının antijensiz kontrol plağında görünümü.

ELİSA:

ELISA yöntemi mikrotitrasyon tekniği ile uygulandı. HÖ ve SRH deneylerinde kullanılan Pİ tip 1 virusu bu yöntemde de antijen olarak kullanıldı.

Konjugatın Hazırlanışı:

Konjugat, Wilson ve Nakane'nin yöntemlerinde bazı değişiklikler yapılarak hazırlandı (53). 4 mg horse-radish peroksidaz (Sigma Chem.Co.Cat.No.P-8375 U.S.A) 1 ml distile suda çözülerek üzerine 0.02 ml taze hazırlanmış 0.1 M sodyum peryodat konularak oda ısısında 20' dakika karıştırıldı. Bir gece 4° C'de 0.001 M asetat tamponuna (PH 4.4) karşı diyaliz edildi. Ertesi gün 02 ml. 0.2 M Na₂CO₃ (PH 9.5) ve 0.01 M Na₂CO₃ (PH 9.5) ta çözülmüş 8 mg anti insan immünglobülini (Anti Human 1 g/1 gG) eklenerek oda ısısında 2° saat karıştırıldı. Ortamda serbest kalan enzimi uzaklaştırmak için karışıma 0.1 ml sodyum borohidrit (4 mg/ml) konuldu ve 4° C'de 2 saat bekletildi. 0.1 M borat tamponuna (PH 7.4) karşı 4° C'de bir gece diyaliz edilerek ertesi gün % 60 lık gliserolle 1/2 sulandırımı yapıldı. Deneylerde kullanmak üzere buzdolabına saklandı.

Deneyin Yapılışı:

Deneyde mikrotitrasyon "U" tabanlı pleytler (Cooke Eng. Co.U.S.A.) kullanıldı. Pİ tip 1 antijeni, 0.05 M karbonat tamponu (PH 9.6) ile sulandırılarak, her çukura 0.2 ml konuldu. Pleyt 4° C'de nemli bir kutu içinde 3 saat bekletildi. Daha sonra pleyt 3 kez PBS (PH 7.45, % 0.05 Tween20) ile yıkandı. Aynı tamponda 1/10 ve 1/20 oranlarında sulandırılan hasta ve kontrol serumları her bir serumdan ikişer çukur olmak üzere 0.2 ml çukurlara konuldu. Oda ısısında 2 saat bekletildi. Pleyt aynı

şekilde 3 kez yıkandıktan sonra, tüm çukurlara 0.2 ml 1/100 sulandırılmış konjugat kondu. Bir gece 4° C'de bekletildi. Ertesi gün pleyt 3 kez PBS ile yıkandı. Taze hazırlanan ortofenilendiamin çözeltisi enzim substratı olarak kullanıldı (54). Bu çözeltiden her çukura 0.2 ml kondu. Pleyt karanlıkta 30' dakika bekletildikten sonra, reaksiyonu durdurmak amacı ile % 12.5 luk H_2SO_4 ten 0.05 ml her çukura ilave edildi. Sonuçlar her serum örneği için ayrı ayrı Beckman model 25 spektrofotometre ile 492 nm dalga boyunda okundu.

4. BULGULAR:

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi hastaneleri çeşitli bölümlerinden son bir yıl içerisinde 0-30 arası yaş gruplarından toplanan 200 serum örneği Pİ tip 1 virusuna karşı antikorlar yönünden HÖ, SRH ve ELISA deneyleri ile araştırılmıştır.

0-30 arası yaş grubunda Pİ tip 1 virusuna karşı oluşan HÖ deneyi ile araştırılması:

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi hastanelerinden 0-30 yaş grubu kişilerden elde edilen kan serumlarında Pİ tip 1 virusuna karşı HÖ deneyi ile antikor titreleri araştırılmıştır.

Pİ tip 1 virusuna karşı HÖ antikor titresi 1/20 ve üzerinde olan serumlar pozitif kabul edilmiştir.

Deneye alınan 200 serumdan 117 si Pİ tip 1'e karşı pozitif titre göstermiştir. Bu 200 serumun yaş gruplarına göre seropozitiflik oranlarının dağılımı tablo 1 de gösterilmiştir.

Tablo I:

Pi tip 1 virusuna karşı HÖ antikorlarının yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş (Yıl)	Çalışılan Serum Sayısı	Pozitif Serum Sayısı	Seropozitiflik Oranı %
0 - 5	56	40	% 71.42
6- 10	26	16	% 61.53
11 - 15	24	10	% 41.66
16 - 20	27	13	% 48.14
21 - 25	29	16	% 55.16
26 - 30	38	22	% 57.89
TOPLAM	200	117	

Tablo 1 de görüldüğü gibi seropozitiflik oranı 0-5 yaş grubunda % 71.42 , 6-10 yaş grubunda % 61.53 , 11-15 yaş grubunda % 41.66 , 16-20 yaş grubunda % 48.14 , 21-25 yaş grubunda % 55.16 ve 26-30 yaş grubunda % 57.89 olarak bulunmuştur.

0-30 arası yaş grubunda Pİ tip 1'e karşı ortalama seropozitiflik oranı ise % 58.50 olarak saptanmıştır.

Pİ tip 1 virusuna karşı HÖ antikorların titreleri ve 0-30 yaş grubuna dağılımı Tablo II de gösterilmiştir.

0-30 yaş grubu arasında toplanan 200 serum örneğinde 83 serum 1/20'nin altında titre vermiştir. 1/160 titre gösteren 10 serum örneğinden üçü 0-5 yaş grubu, biri 5-10 yaş arası, ikisi 21.25 yaş grubu ve dördü 26-30 yaş grubunda saptanmıştır.

Bu grup yaş arasındaki kişilerden toplanan 200 serum örneğinden 110 tanesi kız ve 90 tanesi erkeklere aittir.

Pİ tip 1 virusuna karşı oluşan antikorların seropozitifliği yönünden kız ve erkekler arasında bu çalışmada önemli bir fark bulunmamıştır.

Tablo II:

Pi Tip 1 virusuna karşı HÖ antikorlarının titreleri ve 0 - 30 yaş grubuna dağılımı:

Antikor titre Yaş Grupları (yıl)	Ø Negatif	1/20	1/40	1/80	1/160	Toplam
0 - 5	16	20	9	8	3	56
6 - 10	10	9	4	2	1	26
11 - 15	14	6	3	1	-	24
16 - 20	14	6	5	2	-	27
21 - 25	13	7	4	3	2	29
26 - 30	16	8	6	4	4	38
TOPLAM	83	56	31	20	10	200

Pf Tip 1 Virusuna Karşı Oluşan Antikorların SRH yöntemi ile araştırılması:

SRH yöntemi Pf tip 1 virusuna karşı oluşan antikorların saptanmasında ilk kez uygulandı. Bu nedenle deneyin standardizasyonunda kullanılan antijen, eritrositlerin hazırlanışı ve hemoliz plakların dökülüşünde diğer viruslarda kullanılan yöntemler temel alınmış ancak bazı değişiklikler yapılmıştır.

Bu yöntemde çalışıldığında, hazırlanan test ve kontrol plakları 72-96 saat süreyle gözlemlendi. Plaklar 96 saatten fazla buzdolabında bekletildiklerinde, eritrositlerin hemoliz oldukları saptandı. Bu nedenle sonuçlar 96 saat içerisinde okunarak değerlendirme yapıldı.

Yapılan ilk denemelerde eritrositleri hassaslaştırmak amacı ile kullanılan 1/80.000, 1/40.000 ve 1/20.000 tannik asit sulandırımalarında, eritrositlerin birbirine yapışması ve yıkama sonucu hemoliz olmaları gözlemlendi. Aynı yöntem % 1.5 lik agaroz ile hazırlanan çeşitli oranlarda eritrosit sulandırımları da başarılı sonuçlar vermedi. Bu denemelerde, kompleman, hemoliz plaklarında açılan deliklere, hasta serumlarından önce ve sonra konulduğunda da olumlu sonuçlar alınamadı.

Olumlu sonuçların alındığı yöntemde % 1'lik agaroz ve tannik asidin 1/15.000 sulandırımı kullanıldı. Böylece hassaslaştırılan eritrositleri Pf tip 1 virusu ile muamele edildi ve böylece hemoliz plakları hazırlandı.

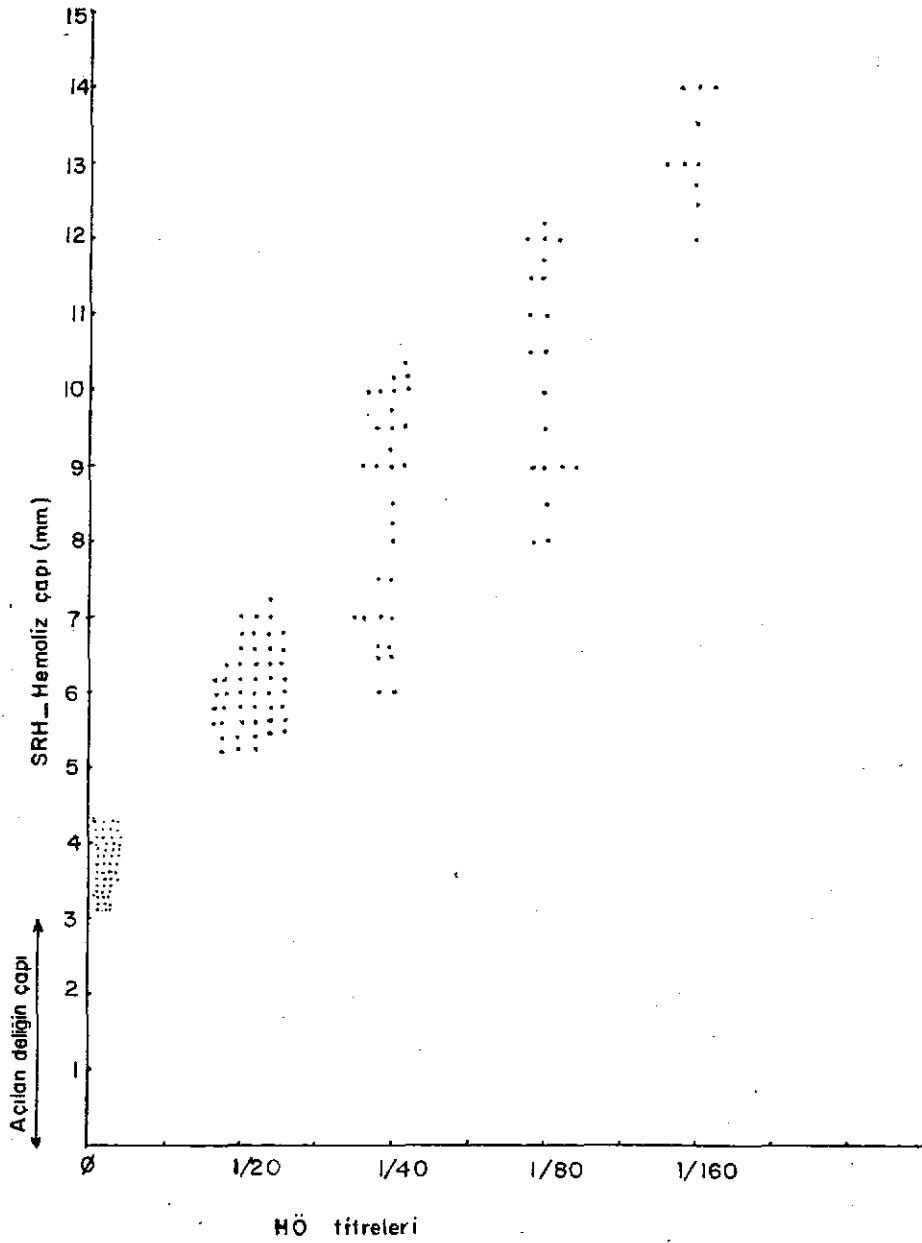
Bu yöntemde, plaklara deney serumları damlatılmadan önce kompleman kondu ve tamamıyla absorbe olana kadar buzdolabında nemli ortamda bekletildi. Aynı işlem deney serumları ve kontrol pozitif serumlar için de uygulandı.

Daha sonra kontrol ve test plakları 37° C'lik etüve kaldırıldı. İlk 1-2 saatlerde plaklar incelendiğinde hemoliz zonlarının belirlenmeye başlandığı gözlemlendi ve 5-6 saat içinde en

büyük çapa ve belirginliğe ulaştı. 24 saat sonra oluşan hemoliz çaplarında her hangi bir değişiklik saptanmadı.

0-30 yaş grubu kişilerden toplanan 200 serum örneğinden SRH ve HÖ deneyi ile ölçülen Pİ tip 1 antikor titrelerinin kıyaslanması şekil VIII de gösterilmiştir.

Şekil VIII: 0-30 yaş arasındaki kişilerden toplanan 200 serum örneğinden SRH ve HÖ deneyi ile ölçülen Pİ tip 1 antikor titrelerinin kıyaslanması.



Şekil VIII'de görüldüğü gibi SRH ve HÖ yöntemleri ile elde edilen antikor titreleri arasında direkt bir ilişki mevcuttur. Ancak serumların SRH yönteminde geniş dağılım göstermesi testin daha duyarlı olduğunu vurgulamaktadır. Zira HÖ deneyinde ancak iki misli artan sulandırılmalarda antikor titreleri ifade edilmektedir. Bu sonuçlar SRH deneyinin Pİ tip 1 virus antikorlarının saptanmasında duyarlı ve güvenilir bir test olduğunu kanıtlamaktadır.

ELISA Yöntemi ile Pİ Tip 1 Virus Antikorlarının Araştırılması:

Elisa yönteminin Pİ tip 1 virus antikorlarının saptanması için kullanılmasında literatürde bulunan ve diğer viruslar için uygulanan teknikler esas alınmıştır. Ancak hücre kültürü ve embriyonlu yumurtada hazırlanan antijenlerin çeşitli yoğunluklarda pleyte bağlanması mümkün olmamıştır.

Son zamanlarda çeşitli virusların ancak özel yapılı pleyt yüzeylerine bağlanmasının saptanması bize ELISA yönteminde Pİ tip 1 virusu için değişik uygulamanın gerektiğini ortaya çıkarmıştır. Ancak elimizdeki olanaklar ve yöntem uygulaması içerisinde ELISA yöntemi Pİ tip 1 virusu antikorları için negatif sonuç vermiştir.

Daha ileride değişik yüzey yapısına sahip pleytler kullanılarak ve yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak deneyden pozitif sonuç almak mümkün olabilir.

5. TARTIŞMA:

Viruslarla oluşturulan bir çok solunum yolu enfeksiyonunun tanısı, klinik semptomlar yardımıyla teşhis edilememektedir. Çünkü bir çok virus, solunum yollarında benzer semptomları veren enfeksiyonlar oluşturmaktadırlar. Özellikle yeni doğan bebekler bazı solunum yolu patojen viruslarına oldukça duyarlıdırlar. Yeni doğmuş bebeklerde, bilhassa 6 aydan küçük bebeklerde ağır seyreden ve solunum yollarını tutan enfeksiyonlar sık görülmekte, hatta ölüm nedeni olmaktadır. Ancak bir çok olguda yalnız viral enfeksiyon değil, bu enfeksiyona bağlı immun mekanizmanın baskılanması sonucu superenfeksiyon ölüm insidansını yükseltmektedir. Bir solunum yolu virusu ile başlatılan enfeksiyon bazen bakteriyel superenfeksiyonla pnömoniye dönüşmektedir. Bu nedenlerle viral enfeksiyonların toplumda görülme sıklığının sap tanması kontrol ve korunma yönünden çok önem taşımaktadır.

Solunum yolu viral enfeksiyonlarının ayırıcı tanısında bu nedenlerle laboratuvar teşhisinin yeri tartışılmaz derecede önemlidir. Viral hastalıklarda laboratuvar teşhisi iki esas üzerinden yapılmaktadır. Bunlar: etken virusun izolasyonu ve etken virusa karşı oluşan antikörlerin yükselmesinin gösterilmesi olarak tanımlanabilir. Etken virusun izolasyonu her zaman mümkün olmamaktadır. En gelişmiş yöntemlerle çalışan laboratuvar da bile etken virusun izolasyonu % 20 nin üzerine çıkamamaktadır. Buda ayırıcı tanıda serolojinin çok daha önemli olduğunu ve kesin teşhis için gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Paramyxoviridae grubunda yer alan Pİ virusları özellikle 6 aydan küçük bebeklerde önemli alt solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Krup, bronşit ve bronşiyolit gibi ciddi seyreden enfeksiyonlar Pİ virus tipleri ile oluşturulabildiği gibi solunum sinsitiyal virusu, influenza virusu gibi bazı viruslarda aynı klinik tabloyu ortaya çıkartabilirler. Dünyada yapılan çeşitli

seri sulandırılmaları hazırlamak gerekmektedir ve serum titresi önlenim yapan son serum sulandırımı olarak değerlendirilmektedir (Şekil III).

Son yıllarda virus enfeksiyonlarının serolojik tanısında daha pratik ve duyarlı yöntemlerin geliştirilmesine çaba harcanmaktadır. Yine son yıllarda özellikle seroepidemiolojik taramalarda pratik olan SRH testi bir çok viruslara karşı oluşan antikorların saptanmasında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle seroepidemiolojik çalışmaların yapıldığı P1 tip 1 virusuna karşı antikorların SRH testi ile saptanması konusunda literatürde yayın mevcut değildir. Bu yöntem ile çeşitli araştırmacılar influenza (46, 47, 56, 64), kabakulak (58), kızamık (67), kızamıkçık (59, 60, 65, 66), arbovirus (57), parainfluenza tip 3 (49), coronavirus (63), toksoplazma (52) ve chlamydiae (61) antikorlarını saptamakta uygulamışlar ve olumlu sonuçlar almışlardır. Bu yöntemin çok sayıda seruma kısa sürede uygulanabildiği için seroepidemiolojik taramalarda diğer yöntemlere göre üstünlük sağlamaktadır. SRH deneyinin esası virus antijen ile duyarlılaştırılmış uygun eritrositlerin kompleman ve özgül antikorların varlığında agar ortamında hemoliz olmasına dayanmaktadır. SRH deneyinde seroepidemiolojik çalışmalar için çok sayıda serum aynı anda test edilebildiği gibi mikrolitre miktarında serumu gereksinim vardır. Üstelik SRH deneyinde HÖ deneyindeki gibi özgül olmayan inhibitörleri ortadan kaldırmak için zaman alan muamelelere gereksinim yoktur. Çünkü bu tür inhibitörler deneyi interfere etmemektedir. Deney serumlarının sadece 56° C'de 30' dakika inaktivasyonu yeterlidir. Bütün bunlara ilaveten SRH yönteminde seri dilüsyonların yapılmaması deneyi daha da pratikleştirmektedir. Deneyde hemoliz çapının milimetrik olarak ölçümü, antikor titrelerinin daha da duyarlı olarak saptanmasına olanak vermektedir. Yalnız viral antijenlerin eritrositlerle iyi bir kompleks oluşturması deneyin işlevliliği yönünden önem taşımakta bunun içinde kullanılan eritrosit-

lerin kimyasal maddelerle duyarlılaştırmak gerekmektedir. Bir virusa SRH deneyi uygulamak için mutlaka o virusun bağlandığı (hemagglütine ettiği) eritrositin kullanılması şart değildir. İndirekt hemagglütinasyon deneyinde olduğu gibi virus hemagglütine etmediği bir eritrosite duyarlılaştırma yöntemi ile bağlanabilir. Bu işlemde SRH deneyinin viruslar için kullanılm alanını genişletmektedir. Duyarlılaştırılan eritrositler veya dökülen SRH pleytleri (3-6) gün müddet ile buzdolabında saklanarak deneye alınabilmektedir.

0-30 yaş arasındaki kişilerden toplanan 200 serum örneği çalışmada önce Pİ tip 1 virusuna karşı HÖ antikoru yönünden incelenmiştir. 1/20 ve üzerindeki titreler pozitif olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızda en fazla seropozitiflik oranı % 71,42 olarak 0-5 yaş grubunda bulunmuştur. Bu sonuç literatürdeki sonuçlara uygunluk göstermekle beraber bu yaş grubunda seropozitifliğin yüksek oluşu doğaldır (17, 32, 33, 34). Zira 0-5 yaş grubu Pİ tip 1 virus enfeksiyonlarının en sık görüldüğü yaş grubudur. Yaş grubu yükseldikçe seropozitiflik oranı azalmakla beraber re-enfeksiyonlara bağlı olarak erişkinlerde seropozitifliği bir miktar yükseldiği tekrar görülmektedir (Tablo I). Ancak çalışmamızda deneye alınan serum sayısının sınırlı olması erişkin yaş gruplarındaki farklılığın yorumunu güçleştirmektedir. HÖ deneyi ile incelenen serumların titreleri kıyaslandığında yüksek titrelerin 0-5 yaş grubunda saptandığı gözlenmektedir (Tablo II).

Çalışmamızda esas gaye SRH deneyinin Pİ tip 1 virusu ve bu virusa karşı oluşan antikoru saptanmasında uygulanması ve standardizasyonudur. Bunun için yapılan denemeler ve standardizasyon çalışmaları Pİ tip 1 virus antikoru yönünden saptanması için SRH yönteminin pratik ve uygulanabilir olduğunu ortaya çıkarmıştır. Pİ tip 1 virusunun horoz eritrositlerini spontan olarak hemagglütine etmesine rağmen eğer eritrositler tannik asitle duyarlılaştırmadan kullanılırsa, test olumlu sonuç vermemektedir.

Bunun nedeni eritrositlerin virusla spontan olarak yaptığı birleşmenin stabil olmayışı veya bir müddet sonra ayrışma (elution) olayının meydana gelmesine bağlı olabilir.

Ancak tannik asitle muamele, virusun eritrositlerle daha sağlam ve stabil bir birleşmeyi oluşturduğu için testin uygulanmasında bu işlemin gerekliliğini ortaya koymaktadır.

İşlemden önce tannik asit 1/15.000 sulandırımında ve agaroz % 1 konsantrasyonunda kullanıldığında iyi sonuç alınmıştır. Literatürde genellikle kompleman agaroz içerisinde direkt olarak sulandırılmadan ilave edilmektedir. Ancak Pİ tip 1 için uyguladığımız SRH deneyinde kompleman sonradan agar çukurlarına açılan deliklere 50 λ olarak ilave edildiğinde daha net bir hemoliz zonu elde edilmiştir.

Test uygulandıktan sonra 24 saat içerisinde maksimum hemoliz zonu elde edilmekte ve neticeler kaydedilmektedir.

Deney serumları agar çukurlarına konulduktan sonra 4° C'de 2-3 saat adsorbsiyona bırakılmış ve daha sonra 37° C'de 2 saat inkübe edilerek hemoliz olayının oluşması sağlanmıştır. Daha sonra 4° C'de konulan pleytler deneyin 24 üncü saatinde her serum için oluşturduğu hemoliz çapı ölçülerek sonuçlar kaydedilmiştir. Bu yöntem çeşitli inkübasyonlar sonucunda standardize edilmiş ve Pİ tip 1 için kendi laboratuvar şartlarımızda en verimli yöntem olarak saptanmıştır.

İlk deneylerde NIH (National Institute Of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A) dan sağlanan pozitif ve negatif serumlarla deneyler yapılmış ve test standardize edilmiştir. Daha sonra HÖ titreleri tayin edilmiş olan 0-30 yaş arasındaki normal kişilerden sağlanan serumlar, SRH deneyine alınmışlardır. Bu deneyler sonucu elde edilen hemoliz çapları HÖ titreleri ile kıyaslanmıştır.

Şekil VIII de bu kıyaslanmanın yapıldığında elde edilen sonuçlar izlenmektedir. Görüldüğü gibi serumlarda saptanan HÖ titreleri ile hemoliz çapları arasında direkt bir ilişki mevcuttur.

Ancak aynı HÖ titresi veren serum örnekleri arasında hemoliz çapları yönünden farklılıklar mevcuttur.

Bunun nedeni HÖ deneyi için kullanılan serum sulandırım-
larının 2 misli artan değerlerinin bulunması ve ara sulandırım-
larının olmamasıdır. SRH deneyinde ise sulandırım yapılmamasına
rağmen hemoliz çapının milimetrik ölçümü antikor farklılıklarını
duyarlı olarak ortaya çıkartmaktadır. ŞekilVIII de ifade edilen bu
kıyaslamaların sonucunda SRH deneyinin Pİ tip 1 antikorlarının saptanmasında güvenilir bir test olduğunu ortaya koymaktadır.

SRH deneyi Pİ tip 1 virusunun seroepidemiolojisi için kullanılabilecek pratik bir yöntem olarak kabul edilebilir.

Çalışmamızda Pİ tip 1 virus antikorlarının daha duyarlı bir yöntem olan ELISA ile saptanması planlanmışsa da bütün deney sistemlerinin çalışmasına rağmen Pİ tip 1 virusunun elimizde mevcut polistiren mikroplyet yüzeyine bağlanması başarısızdır. Literatürde katı faz deneylerinde virusların çeşitli yüzeylere bağlanması yönünden farklılıklar arzedeceği kaydedilmektedir. (53, 54). Bu nedenle Pİ tip 1 virusun bağlanabileceği farklı kimyasal yapıdaki mikroplyetlerin kullanılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Ancak mevcut olanaklarımızla bunun mümkün olmaması ELISA yönteminin uygulanmasını kısıtlamıştır.

Sonuç olarak yurdumuzun değişik bölgelerinden ve çeşitli yaş gruplarından daha fazla sayıda serum örnekleri bu çalışmada standardize edilen SRH deneyi ile pratik olarak çalışılabilir. Bu da gelecekte Pİ tip 1 virus antikorları insidansının seroepidemiolojik olarak saptanmasına pratik olarak olanak sağlayacaktır.

6. ÖZET:

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi hastanelerinin değişik bölümlerine, üst solunum yolu enfeksiyonu dışındaki nedenlerle baş vuran son bir yıl içerisinde 0-30 yaş arasında toplanan 200 serum örneğinde Pİ tip 1 virusuna karşı oluşan antikorlar HÖ ve SRH yöntemleriyle araştırılmıştır.

0-30 yaş arasındaki kişilerden toplanan 200 serum örneği çalışmada önce Pİ tip 1 virusuna karşı HÖ yönünden incelenmiştir. Çalışmamızda en fazla seropozitiflik oranı % 71.42 olarak 0-5 yaş grubunda bulunmuştur. Ancak bu çalışmada SRH yöntemi Pİ tip 1 virusu ve bu virusa karşı oluşan antikorların saptanmasında uygulanmış ve standardize edilmiştir.

Ayrıca bu çalışmada Pİ tip 1 virusa karşı oluşan antikorların saptanmasında ELISA testi uygulanması denenmiş ve testi işlevliliği için ileri çalışmaların yapılması gerektiği ortaya çıkmıştır.

7. KAYNAKLAR :

1. Wildy, P. : Classification and nomenclature of viruses. First report of the International Committee on nomenclature of viruses. In Melnick JI (ed): Monographs in virology, vol 5. Basel, Karger, pp, 12: (1971).
2. Mandell, G.L. , Douglas, R.G. , Benett, J.E : Parainfluenza virus. Principles and practice of infectious diseases. pp. 1170-1176, A wiley Medical publication, John Wiley and sons, New York, (1979).
3. Fenner, F. , Mc Auslan, B.R. , Mims, C.A. et al: The Biology of animal viruses, ed 2. New York, Academic press, pp 119, (1974).
4. Cook MK. Andrews B.E. , Fox H.H. , et al: Antigenic relationships among the "newer" myxoviruses (Parainfluenza). Am. J. Hyg. 69: 250, (1959).
5. Delay P.D, stones S.S, Karzon D.T, et al: Clinical and immune response of alien hosts to inoculation with measles rinderpest, and canine distemper viruses. Am. J. vet.Res 26 : 1359,(1965).
6. Monto, A.S. : The Tecumesh Study of respiratory illness. V. Patterns of infection with the parainfluenza virus. Am. J. Epidemiol. 97:338, (1973).
7. Von Euler , L. , Kantor, F.S. , and Hsiung G.O. Studies of Parainfluenza viruses. 1. Clinical, Pathological and virological observations. Yale. J. Biol. Med. 35: 523, (1963).
8. Mandell, G.L. , Douglas, R.G. , Bennett. J. E. , : Parainfluenza virus. Principles and practice of infection diseases, pp. 1170-1176, A wiley Medical Publication, John Wiley and sons, New York, (1979).

9. Chanock, R.M, Parrott, R.H, : Para-influenza viruses, in Horsfall, FL, Tamm I (eds): *Viral and Rickettsial Infections of Man*, ed 4. JB. Lippincott, Philadelphia, pp, 741, (1965).
10. Glezen W.P. , Loda F.A. , Denny. F.W. , : The parainfluenza viruses. In Evans A.S, (ed): *Viral Infections of humans*. New York, Plenum Medical Book Co, pp. 337, (1976).
11. Chanock, R.M. , Parrott, R.H. , Johnson K.M., et al: *Myxoviruses: Parainfluenza*. *Ann. Rev.Resp. Dis*, 88: 152, (1963).
12. Gardner S.D. , : The isolation of parainfluenza 4 subtypes A and B in England and serological studies of their prevalence. *J. Hyg (Camb)* 67: 545, (1969).
13. Chanock R.M. , Bell, J.A. , Parrott, R.H. : Natural history of parainfluenza infection. In Pollard (ed): *Perspectives of virology II*. pp.126, (1960).
14. Bloom H.H. , Johnson K.M. , Jacobsen R, et al: Recovery of parainfluenza viruses from adults with upper respiratory illness. *Am. J. Hyg.* 74:50, (1961).
15. Smith C.B , Bellanti J.A, Chanock R.M, : Immunoglobulins in serum and nasal secretion following infection with type 1 Parainfluenza virus and injection of inactivated vaccines. *J. Immunol.* 99: 133, (1967).
16. Vella P.P, Weibel R.E, Woodhour A.F, Respiratory virus vaccines. VIII. Field evaluation of trivalent parainfluenza virus vaccine among preschool children in families, 1967-68. *Am.Rev. Resp. D: s* 99: 526, (1969).
17. Dawnham MAPS, Mc Qillin J, Gardner P.S, : Diagnosis and clinical significance of parainfluenza virus infections in children. *Arch. Dis. child*, 49: 8, (1974).
18. Rendtorff R.C, Welker L.C, Roberts A.N, : A parainfluenza virus outbreak in an orphanage nursery. *Am. J. Hyg*, : 82, (1963).

19. Smith C.B, Purcell R.H, Bellanti, J. A, etal: Protective effect of antibody to parainfluenza type 1 virus. *New. Engl. J. Med.* 275: 1145, (1966).
20. Miller w.s, Artestein M.S, : Aerosol stability of three acute respiratory diseases viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125: 222, (1967).
21. Mclean D.M, Bannatyne R.M, Giban K: Myxoviruses dissemination by air. *Can. Med. Assoc. J*, 96: 1449, (1967).
22. Mufson M.A, Mocega H.E, Krause H.E: Acquisition of parainfluenza 3 virus infection by hospitalized children. I. Frequencies, rates, and temporal data. *J. Infect. Dis*, 128:141, (1973).
23. Loda F.A, Glezen W.P, clyde W.A, jr: Respiratory diseases ingroup day care. *Pediatrics* 49: 428, (1972).
24. Rocchi G, Arangro-Ruiz G, Giannini V, etal: Detection of viremia in acute respiratory diseases of man. *Acta virol*, 14: 405, (1970).
25. Gardner P.S, Mc Quillin J, Mcguckin R, et al: Observations on clinical and immunofluorescent diagnosis of parainfluenza virus infections. *Brit. Med. J*, 2:7, (1971).
26. Zinserling A: Peculiarities of lesion in viral and mycoplasma infections of the respiratory tract. *Virchows. Arch. Abt. A. Pathol. Anat*, 356: 259, (1972).
27. Canchola J. Vargosko Aj, Kim HW, et al: Antigenic variation among newly isolated strains of parainfluenza type 4 virus. *Am. J. Hyg* 79: 357, (1964).
28. Chanock, R.M. , Vargosko, A.J. Luckey, A. : Association of Hemadsorption viruses with Respiratory Illness in childhood. *J. A. M. A*, 169: 548, (1959).

29. Mclean, D.M. , Bach, R.D. , Larke, R.P.B. , and Mcnaughton, G.A. Myxoviruses Associated with Acute largngotracheobronchitis in Toronto, 1962-63. *Canad. Med. Ass. J.* 89:1257, (1963).

30. Chanock, R.M. , Bell, J.A. , and Parrott, R.H.: "Natural History of parainfluenza Infection", in *prespectives in virology* (M.Pollard, Ed.), Minneapolis: Burgess, pp.126, (1961).

31. PARROTT, R.H. , VARGOSKO, A.J. , KIM, H.W. , BELL, J.A. , and CHANOCK, R.M. : Acute Respiratory Diseases of viral Etiology III Myxoviruses: Parainfluenza. *A.J.P.H* 52:907-917, (1962).

32. Glezen W.P. , Ioda F.A. , Clyde W.A. Jr, et al: Epidemiologic patterns of acute lower respiratory disease of children in a pediatric group practice. *J pediatr*, 78: 397, (1971).

33. Brandt C.D, Kim H.w, Chanock R.M, et al: Parainfluenza virus epidemiology. *Pediat. Res* 8:422, (1974).

34. Clarke SKR: Parainfluenza virus infections. *Postgrad. Med. J* 49: 792, (1973).

35. Glezen W.P, Denny F.W, :Epidemiology of acnte Lower respiratory diseases in children, *New, Engl. J.Med.* 288:498,(1973)

36. Kim, H.W, VargosKO, A.J, Chanock,R.M, and Parrott, R.H Parainfluenza 2 (CA) Vir us: Etiologic Association with croup. *Pediatrics*, 28:614-621,(1961).

37. Vargasko, A.J. , Chanock, R.M, Huebner, R.J., LUCKEY A.H., Kim,H.W., Cumming, C., and Parrott, R.H,: Association of type 2 Hemadsorption (Parainfluenza 1) Virus and asian Influenza A virus with Infectious croup. *New Engl.J. Med.* 261:1, (1959)

38. Parrot, R.H., Vargusko, A.S. et al, III. Myxoviruses: Parainfluenz. *Am. J. Publ. Health*, 52:907, (1962)

39. Lewis, F.A. Lehmann, N.I., and Ferris, A.A.:The hemadsorption viruses in laryngo-Tracheobronchitis. *Med.J.Austral.* 48:929, (1961)
40. Chanack R.M.,:Parainfluenza viruses.In lennetle E.H, schmidt N.J (eds):Diagnostic procedures for viral and Rickettsial infections, ed 4,New York, American public Health Association P.434-(1969).
41. Krugman,S.,Ward,R., Katz,S.L:Acute respiratory infections etiology, in: *Infectious Diseases of children. Sixth edition.* The C.V. Mosby company,saint Louis, (1977).
42. Ata,H., ve Ustacelebi,Ş.: Üst solunum yolu enfeksiyonu geçiren çocuklarda ve çeşitli yaş gruplarında parainfluenzatip, hemaglutinasyon önlenim antikor insidansi.*Türk virol. Der. I:Sayı 1.:129,(1979).*
43. Evans A.S.: *viral infections Human, Epidemiology and control* John wiley and sons,New York, (1979).
44. Jackson, G.G. and Muldon, R.R. :*Viruses Cousing Common Respiratory Infections in man.II. Enteroviruses end paramyxoviruses,J.Infect. Dis 128:378, (1973).*
45. Grist,N.R., Bell, E.J, Folett,E.A.C, Urgut, G.E.D: *Diagnostic Methods in clinical Virology, 13 rd, Ed,Blackwell scientific pub. (1979).*
46. Vaanen, P, Hovi, T.Helle,E.P., penttin,K:*Determination of mumps and influenza antibodies by hemolsis-in-gel, Arç,Virol, 52:91, (1976).*
47. Mancini,G.D.,Ambrosio E,and Arangio-Ruiz,G:*Dedection of antibodies of influenza virus by single radial hemolsis and haemagglutination inhibition in human sera, Microbiologica 2:399, (1979).*

48. Forger, J.M. and Gilifillan, R.F., :single Radial Hemolysis as a cost effective determination of rubella antibodies status, *J.Clin Microbiol*, 9:115, (1979)

49. Probert, M. and Russel, S.M.: Measurement of parainfluenza 3 virus antibodies by the single radial hemolysis technique *J.Clin, Microbiol*, 2:157. (1975).

50. Schild, G.C., Pereira, M.S. Chakraverty, P.: Single radial hemolysis. A new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin, Applications for diagnosis and seroepidemiologic surveillance of influenza *Bull, who* 52 (1):43 , (1975).

51. Özlüarda, E., Artuk, Ç., Ataluy, Ş. Ve ark.: 1976-1977 influenza mevsimi ve laboratuvar bulgularımız SRH yönteminin rutin olarak uygulanması ve HI tekniği ile kıyaslanması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 37 (1):112, (1977).

52. Jackson, W.B., O'Conner, G.R., Hall, J.M.: plate hemolysin test for the rapid screening of toxoplasma antibodies. *Applied Microbiol* 27(5):896, (1974).

53. Wilson, N.B., and Nakane, P.K., : The covalent coupling of proteins to periodate-oxidized sephadex: a new approach to immunoadsorbent preparation. *J. Immunol Methods* 12:171, (1976).

54. Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A.: The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Available from Dynatech Europe, Borough House, Ruedu Pre, Guernsey.

55. Lennette, E.H., and Schmidt, N.J.: Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections. PP:435-453, Americ. Pub. Heath. Assoc. Inc., New York, (1969).

56. Chakraverty P: Comparison of haemagglutination-inhibition and single-radial-haemolysis techniques for detection of antibodies to influenza B virus, *Arch, Virol*, 68:285 (1980).

57. Gaidamovich s.y., Meinikova E.E.,: Passive hemolysis-in-gel with Togaviridae Arboviruses , Intervirology 13:(1980).
58. Grillner. L., Blomberg J:Haemolysis_in-gel and neutralization tests for determination of antibodies to mumps virus,J.clin Microbiol 4:11 (1976).
59. Grillner.L. strannegard Ö:Evaluation of the hemolysis in gel for the screening of immunity and the demonstration of recent infection,J.Clin.Microbiol 3:86 (1976).
60. Kurtz,J.B., Mortimer.P.P.,Mortimer., Morgon-Capner.P, Shafi M.S,white G.B.B.:Rubella antibody measured by radial haemolysis. Characteristics and performance of a simple screening method for use in diagnostic laboratories, J.Hyg.Camb 84:213 (1980).
61. Lycke E,Peterson M:Hemolysis in gel for demonstration of chlamydia antibodies,J Clin, Microbiol 4: 450 (1976).
62. Morgon-Copner P,Pullen H.J.M., Pattison J.R,Bidwell. D.E, Bartleti A,Voller A:A comparison of three tests for Rubella antibody screening,J,Clin,Pathol 32:542 (1979).
63. Riski H, Hovi T,Vaananen P,Penttinen K: Antibodies to human coronavirus OC 43 measured by radial hemolysis in gel,scand, J,Infect Dis 9:75 (1977).
64. Russel S.M, McCahon D, Reare A.S.,:A single radial hemolysis technique for the measurement for influenza antibody,JGen,virol 27:1 (1975).
65. Strannegard Ö,Grillner L., Lindberg J.M.,:Hemolysis-in-gel test for the demonstration of antibodies torubellavirus,J,cilin Microbiol 1:491 (1975).
66. Vaananen P,Vaheri A:Hemolysis-in-gel test in immunitysurveys and diagnosis of Rubella,J.Virol 3:245 (1979).

67. Wesslen L: Demonstration of antibodies to Measeles virus by hemolysis in gel (HIG) test, scand, JInfect, Dis 10:15 (1978).

68. Kökkaya.A., :0-5 yaş grubu çocuklarda prainfluenza tip 1 ve solunum sinsityal virus antikorlarının dağılımı. Uzmanlık tezi, (1981).

T E Ő E K K Ū R

Mikrobiyoloji Enstitüsünde öğrenimime başladığım günden beri virolojide beni yönlendiren, genel çalışmalarımda büyük yardımlarını esirgemeyen danışma hocam Sayın Doç.Dr.ŞEMSETTİN USTAÇELEBİ'ye teşekkürü borç bilirim.