

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALT SOLUNUM YOLU İNFEKSİYONU OLAN ÇOCUKLARDA
SOLUNUM SİNSİTYAL VİRÜS'ÜN İMMUNOFLORESAN,
HÜCRE KÜLTÜRÜ VE PCR YÖNTEMLERİYLE
ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Canan GÖKALP**

**Tezi Yöneten
Doç.Dr.Selma GÖKAHMETOĞLU**

**Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Ağustos 2006
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALT SOLUNUM YOLU İNFEKSİYONU OLAN ÇOCUKLARDA
SOLUNUM SİNSİTYAL VİRÜS'ÜN İMMUNOFLORESAN,
HÜCRE KÜLTÜRÜ VE PCR YÖNTEMLERİYLE
ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Canan GÖKALP**

**Tezi Yöneten
Doç.Dr.Selma GÖKAHMETOĞLU**

**Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBY.05.05 nolu
proje ile desteklenmiştir**

**Ağustos 2006
KAYSERİ**

II

Doç.Dr.Selma GÖKAHMETOĞLU danışmanlığında **Canan GÖKALP** tarafından hazırlanan “**Alt Solunum Yolu İnfeksiyonu Olan Çocuklarda Solunum Sinsityal Virüs’ün İmmunofloresan, Hücre Kültürü Ve PCR Yöntemleriyle Araştırılması**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Mikrobiyoloji** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

...../...../2006

JÜRİ :

İmza

Üye :

Üye :

Üye :

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

TEŞEKKÜR

Öncelikle değerli hocam tez danışmanım Sayın Doç.Dr.Selma GÖKAHMETOĞLU'na tez çalışmalarım süresince yapmış olduğu destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım boyunca beni destekleyen ve yönlendiren Prof.Dr.Yusuf ÖZBAL, Prof.Dr.Nedret KOÇ, Araş.Gör.Esma SAATÇI DENİZ, arkadaşım Fatma Filiz KASAP olmak üzere tüm Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Merkez Seroloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu araştırmanın yapılması ve tezin hazırlanması sırasında başta manevi olarak en büyük desteği gördüğüm annem ve sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

IV

ALT SOLUNUM YOLU İNFEKSİYONU OLAN ÇOCUKLARDA SOLUNUM SİNSİTYAL VİRÜS'ÜN İMMUNOFLORESAN, HÜCRE KÜLTÜRÜ VE PCR YÖNTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI ÖZET

Solunum Sinsityal Virüs (Respiratory Syncytial virus, RSV), bebek ve küçük çocuklarda alt solunum yolu infeksiyonuna yol açan etkenlerden en önemlisidir. Bu çalışmada alt solunum yolu infeksiyonu olan çocuklarda Solunum Sinsityal Virüs'ün Direkt Immunofloresan Antikor (DFA), hücre kültürü, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) yöntemleri ile araştırılması amaçlandı.

Bu çalışmaya alt solunum yolu infeksiyonu olan, yaşları 0-24 ay arasında değişen 80 hastadan alınan nazotrakeal aspirat örneği dahil edildi. Örneklerde RSV antijeni Direkt Immunofloresan Antikor (DFA) (Monofluo BIO-RAD, Fransa) yöntemiyle araştırıldı. RSV'nin izolasyonu için Hep-2 hücre kültürü kullanıldı. Klinik örnekteki RSV-RNA varlığı gerçek zamanlı PCR (Fluorion IONTEK, Türkiye) yöntemiyle araştırıldı.

Çalışmaya dahil edilen 80 örneğin 26 (% 32.5)'sında DFA yöntemiyle, 17 (% 21.3)'sinde hücre kültürü yöntemiyle RSV pozitifliği bulundu. Ancak çalışmaya alınan örnekler arasında 6 tane örneğin miktarı yeterli olmadığı için PCR yöntemiyle çalışılmadı. Bu yüzden çalışılan 74 hastadan 20 (% 27) 'sinde PCR yöntemiyle RSV RNA pozitif bulundu.

Hücre kültürü yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde DFA yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü %85.7, doğruluk oranı %88.75, PPV %65.38 ve NPV %100 olarak, PCR yönteminin ise sırasıyla %100, % 94.7, %95.94, %85, %100 olarak bulundu.

Sonuç olarak; RSV infeksiyonunun tanısında DFA, PCR ve hücre kültürü yöntemleri uygulanabileceği ancak hücre kültürü yönteminin örneğin hemen inoküle edilmesi şartıyla uygulanması gerektiği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler : Solunum Sinsityal Virus, Direkt Immunofloresan Antikor, Hücre Kültürü, PCR

**INVESTIGATION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS BY
IMMUNOFLOURESAN, CELL CULTURE AND PCR METHODS IN
CHILDREN WITH RESPIRATORY TRACT INFECTION**

ABSTRACT

Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the major viral agent of lower respiratory tract infection in infants and children. The aim of this study was to investigate of RSV by immunoflouresan, cell culture and PCR methods in children with respiratory tract infection.

Nasotrakeal aspirate specimens collected from hospitalized 80 patients with respiratory tract infection aged between 0-24 months were included in the study. RSV antigen was investigated in nasotrakeal aspirate specimens by direct flouresence antibody (DFA) test (Monofluo BIO-RAD, France). Hep-2 cell culture was used for RSV isolation. RSV-RNA was investigated real time PCR (Fluorion IONTEK, Turkey) in clinical specimens.

Of 80 samples tested RSV was found positive in 26 (% 32.5) and 17 (% 21.3) by DFA and cell culture respectively. The six specimens were not studied by PCR as samples were not sufficient. Of 74 samples tested 20 (27%) samples were found to be positive by real time PCR.

Considering cell culture as the “gold standard” the sensitivity, specificity, agreement, PPV, NPV were 100, 85.7, 88.75, 65.38, 100 %, respectively, for DFA and 100, 94.7, 95.94, 85, 100 %, respectively for PCR.

As a conclusion DFA, PCR and cell culture methods can be applied for diagnosis of RSV infection however specimens should be inoculated to the cell culture immediately.

Key Words: Respiratory Syncytial Virus , cell culture, PCR, immunoflouresence

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TARİHÇE.....	3
2.2. VİRÜSÜN GENEL ÖZELLİKLERİ	4
2.3. ANTİJEN YAPISI	4
2.4. DİRENÇLİLİK	6
2.5. PATOGENEZ.....	7
2.6. İMMÜNİTE.....	8
2.7. RSV'NİN YAPTIĞI HASTALIKLAR.....	10
2.8. RSV'NİN TANISI	11
2.8.1. Klinik Tanı	11
2.8.2. Laboratuvar Tanısı.....	12
2.9. EPİDEMİYOLOJİ	15
2.10. TEDAVİ.....	16
2.11. KORUNMA	17
2.11.1. Pasif Bağışıklama	19

VII

Sayfa No

3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. NAZOTRAKEAL ASPİRAT ÖRNEKLERİNDE DİREKT RSV ANTİJENİNİN ARAŞTIRILMASI	22
3.2. RSV'NİN KLASİK HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İZOLASYONU	23
3.3. NAZOTRAKEAL ASPİRAT ÖRNEKLERİNDE RSV-RNA'NİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI	27
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
6. KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 4.1. Çalışılan örneklerde DFA, Hücre Kültürü, PCR yöntemleriyle elde edilen pozitif sonuçlar ve yüzdeleri	31
Tablo 4.2. DFA, Hücre Kültürü, PCR yöntemleriyle elde edilen sonuçların kıyaslanması	33
Tablo 4.3. Hücre Kültürü altın standart olarak alındığında DFA ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması	33
Tablo 4.4. DFA ve PCR yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük, doğruluk oranı, PPV, NPV, yanlış pozitif ve yanlış negatif oranları	34
Şekil 2.1. RSV genomunun haritası	6
Resim 3.1. Tek tabaka halinde üretilmiş hep-2 hücre kültürü	26
Resim 4.1. RSV için tipik CPE gözlenmiş hücre kültürü	32
Resim 4.1. DFA ile boyanmış RSV ile infekte floresan veren hücreler	32

KISALTMALAR

ARDS	: Adult Respiratory Distress Syndrome
BRSV	: Bovine Respiratory Syncytial Virus
CRSV	: Caprine Respiratory Syncytial Virus
C	: Yapısal olmayan protein
°C	: Santigrad derece
CPE	: sitopatik etki
cp	: cold passaged
DFA	: Direkt Immunofloresan Antikor
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ELISA	: Enzyme Linke ImmunoSorbent Assay
F	: Füzyon proteini
FDA	: Food and Drug Administration
G	: Bağlanma proteini
Hep-2	: Larinks epitelyal karsinoma hücre kültürü
HeLa	: Serviks epiteli karsinoması hücre kültürü
Ig	: İmmunoglobulin
IFT	: İndirekt Floresan Test
kDA	: kilodalton
KBD	: Kompleman Birleşme Deneyi
L	: Büyük polimeraz proteini
M1, M2	: Matriks proteini
mRNA	: Messenger RNA
MN	: MonoNükleer
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
N	: Nükleokapsid proteini

X

NT	: Nötralizan Antikor Testi
NS1, NS2	: Yapısal olmayan protein
ORSV	: Ovine Respiratory Syncytial Virus
PVM	: Pneumonia Virus of Mice
P	: Fosfoprotein
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PFP	: Purified Fusion Protein
PBS	: Phosphat Buffer Solution
RSV	: Respiratory Syncytial Virus
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-PCR	: revers transcription- PCR
rpm	: Rotation per minute
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SH	: Hidrofobik protein
SIDS	: Sudden Infant Death Syndrome
ŞKE	: Şempanze Koriza Etkeni
TCID	: Tissue Culture Infectivity doz
TRTV	: Turkey Rhinotracheitis Virus
Tm	: Melting temperature
ts	: Temperature sensitive
V	: Sisteinden zengin protein
Vero	: Afrika yeşil maymun böbrek hücre kültürü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Solunum sinsityal virüs (RSV; *Respiratory Syncytial Virus*), bütün dünyada bebek ve çocuklarda, alt solunum yolu infeksiyonlarının başlıca sebebidir. RSV infeksiyonunu takiben tekrarlayan alt solunum yolu infeksiyonu sık görülmektedir. Ayrıca RSV, morbiditesi yüksek olan nozokomiyal infeksiyonlardan da sorumludur.

RSV infeksiyonların hızlı tanısı; uygun infeksiyon kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi ve erken antiviral tedavinin yararı nedeni ile önemlidir. RSV'nin hızlı tanısı; gereksiz antibiyotik kullanımını ve bu suretle antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerin gelişimini önlemekte, doğru tanı ile uygun tedaviyi yönlendirerek hastaların hastanede kalış sürelerini kısaltmaktadır. RSV infeksiyonlarının özgül tanısında hücre kültürü, virüs antijenlerinin direkt olarak gösterilmesi, moleküler teknikler ve serolojik testler uygulanmaktadır. RSV infeksiyonlarının tanısında hücre kültürü yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak virüsün hücre kültürlerinde yavaş üremesi daha hızlı sonuç alınabilen yöntemlerin kullanıma girmesine yol açmıştır. Direkt immunofloresan antikor (DFA) yöntemi testler arasında tercih edilen yöntemdir. Ancak örnekte virüs miktarı az olduğunda DFA testiyle virüs gösterilemezken hücre kültüründe üreyebilmektedir. Dolayısıyla, virüs antijenlerinin direkt olarak gösterilmesi ile birlikte virüs izolasyon yöntemlerinin yapılmasına önem verilmelidir. Diğer yöntemlerle kıyaslandığında Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin de yüksek duyarlılığa

ve özgüllüğe sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak PCR yönteminin pahalı oluşu dezavantajıdır. Serolojik yöntemler tanıda tercih edilmemektedir ve epidemiyolojik çalışmalarda uygulanmaktadır.

Bu çalışmada alt solunum yolu infeksiyonu geçiren çocuklarda RSV'nin DFA, hücre kültürü, PCR yöntemleri ile araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.TARİHÇE

Adams 1937 yılının ocak-şubat-mart aylarında 32 bebeğin hastalandığı ve 9'unun öldüğü, öksürük, solunum güçlüğü ve siyanozla karakterize nozokomiyal bir epidemi tarif etmiştir. Ölen bebeklerin akciğerlerinden yapılan sitopatolojik incelemelerde bronş epitel hücrelerinde stoplazmik inklüzyon cisimcikleri gösterilmiştir. Bu bulgular *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) enfeksiyonu nedeniyle ölen bebeklerden yapılan ilk patolojik tanımlamadır. RSV pnömonisinin tarifi ilk kez 1939 yılında Goodpasture tarafından yapılmıştır (1,2).

RSV ilk olarak 1956 yılında Morris ve arkadaşları tarafından soğuk algınlığı geçiren bir grup şempanzeden izole edilmiş ve etkene “Şempanze Koriza Etkeni” (ŞKE) adı verilmiştir. Şempanze bakıcılarından birinde aynı hastalık tablosunun görülmesi virüsün kaynağının insan olabileceği fikrini düşündürmüştür. Ertesi sene Chanock ve arkadaşları iki bebekten ŞKE'ne benzer bir virüs izole etmişlerdir. Serolojik çalışmalar sonucunda bebeklerden izole edilen bu virüsün hastalık etkeni olduğu ortaya çıkmıştır. Çok geçmeden bu virüsün doğal kaynağının insan solunum yolu olduğu ve bu virüsle enfekte hücre kültürlerinde yaygın sinsityumların geliştiği görülmüştür. Bu nedenle virüse daha uygun olan “solunum sinsityal virüs” adı verilmiştir (1, 3, 4).

2.2.VİRÜSÜN GENEL ÖZELLİKLERİ

RSV, *Paramiksoviridae* ailesinin *Pneumovirinae* alt ailesinin *Pnömovirus* cinsi içinde yer alır. *Paramiksoviridae* ailesinin bir diğer alt ailesi *Paramyxovirinae* olup *Rubulavirus*, *Paramyxovirus* ve *Morbillivirus* olmak üzere 3 cinsi bulunmaktadır (5). RSV'nin antijenik ve morfolojik özellikleri *Paramiksoviridae* ailesinin diğer üyelerinden farklı olması nedeniyle *Pnömovirus* cinsine dahil edilmiştir (1,5-8). *Pnömovirus* cinsi içine aynı zamanda Sığır Solunum Sinsityal Virüs (BRSV), Fare Pnömoni Virüs (PVM), Koyun Solunum Sinsityal Virüs (ORSV), Keçi Solunum Sinsityal Virüs (CRSV) ve Hindi Rinotrakeit Virüs (TRTV) bulunur (5). Bu cins içerisinde bulunan üyeler hakkında serolojik çalışmalar devam etmektedir (9).

Elektron mikroskopuyla yapılan incelemeler sonucunda RSV'nin 100-300 nm büyüklüğünde ve pleomorfik yapıda olduğu görülür (4, 5, 10-12). RSV tek zincirli, negatif polariteli 50 S RNA virüsüdür (1, 9, 13). Genom düz bir yapıda olup kütleli ağırlığı 5×10^6 daltondur (14). Yaklaşık 15.000 nükleotitten oluşur (5). RSV nükleokapsidi 12-15 nm çapında olup helikal simetridir (1, 5). Virüsün zarfı 12 nm uzunluğundadır ve 10 nm aralıklarla dizili glikoprotein yapısındaki çıkıntılar sebebiyle dikensi görünümündedir (5). Diğer Paramiksoviruslardan farklı olarak RSV'nin hemolitik aktivite, hemaglutinin ve nöraminidazları yoktur (4).

2.3.ANTİJEN YAPISI

RSV'nin keşfedilişinden 30 yıl sonrasına kadar RSV'nin yalnızca homojen ve tek bir serotipi olduğu düşünülmüştür (1). Hayvan serumu ile çeşitli RSV suşlarına karşı belli bir düzeyde farklılıklar içeren nötralize edici titreler elde edilmişken, insan serumunda suşlar farklı da olsa genelde aynı düzeyde nötralize edici titreler elde edilmiştir (3). Sonraları yapılan monoklonal antikor çalışmalarında birçok protein bakımından RSV suşlarının birbirine benzediği gösterilmiştir (15-18). Fakat bunlardan yalnızca G proteininde belirgin farklar olduğu saptanmıştır. Bu durumda monoklonal antikor kalıplarına göre RSV'nin alt grup A ve B diye 2 alt grubu tanımlanmıştır. A ve B alt grupları da kendi içlerinde alt tiplere ayrılırlar. Alt grup A, A2 suşu ile alt grup B ise 18537 suşu ile karakterizedir (1, 2, 6).

A ve B alt gruplarının G proteinlerinin antijenik yakınlığı ancak %5 iken, F proteinlerinin antijenik yakınlığı yaklaşık %50'dir (3). Ayrıca bu iki alt grubun F proteinlerinde % 89 amino asit homolojisi varken G proteinlerinde bu oranın çok düşük olduğu bulunmuştur (19). Alt grup A suşları nispeten belli bir bütünlüğü korumakta, alt grup B suşları ise daha fazla değişim göstermektedir (3). Alt grup A ile oluşan infeksiyon sırasında alt grup B'ye karşıda çapraz antikor yanıtı olduğu saptanmıştır (20). Uzun yıllar yapılan epidemiyolojik çalışmalar genellikle alt grup A'nın daha baskın olduğunu göstermiştir (15,21-23).

Tek zincirli negatif yüklü RNA'nın yaklaşık 15.000 nükleotidli olan 10 major mRNA'sı vardır ve bunların her biri bir proteini kodlar. Nükleokapsid proteini (N), fosfoprotein (P), ve büyük polimeraz proteini (L), yapısal proteinler olup nükleokapsitte; füzyon proteini (F), bağlanma proteini (G) ve matriks proteini (M1 ve M2) ise virüsün zarfında bulunur (5, 6, 7, 24, 25). RSV ile infekte hücrelerin yüzeylerinden salgılanan küçük hidrofobik protein (SH)'in, membran proteinlerinin üçüncüsü olabileceği düşünülmektedir. NS1 ve NS2 yapısal olmayan iki proteindir. NS1 asidik, NS2 bazik yapıdadır. NS1 ve NS2 proteinlerinin görevleri tam olarak bilinmemekle birlikte virion morfolojisinin düzenlenmesinde görevli oldukları sanılmaktadır (5, 9).

N proteini orta büyüklükte olup nükleokapsidin major yapısal proteini iken P ve L proteinleri transkripsiyon ve replikasyonda önem taşır. L proteini çok büyük (250 kDA) ve nispeten hidrofobiktir. Büyük oluşunun nedeni nükleokapsitte yer almasındandır. L'nin viral RNA'ya bağlı RNA polimeraz olduğu düşünülmektedir (1, 5, 7, 9, 24).

Virüsün zarfı; matriks (M1 ve 22 kDA'luk bir protein olan M2) ve yüzey proteinleri olan F ve G'den oluşur (1, 5, 9). Matriks proteini glikozillenmemiş olup hidrofobik ve bazik yapıdadır. Bunlardan M1 proteinin 2 genel fonksiyonu olduğu düşünülmektedir; paket yapılmadan önce nükleokapsidin transkripsiyonunu sonlandırmak ve nükleokapsid ile zarfın birleşmesine aracılık etmektedir (5).

F ve G glikolize iki protein olup virüsün yüzeyinde bulunur ve RSV ile oluşan infeksiyon sırasında önemli immunojenlerdir (1). G proteini yaklaşık 90 kDA molekül ağırlığındadır. G proteininin büyük kısmını glikoprotein oluşturmaktadır. Elektroforez ile yapılan çalışmada ancak 32.5 kDA'luk kısmının polipeptit olduğu anlaşılmıştır (5, 9). G proteinin işlevi konak hücreye adsorbsiyonu sağlamaktır (1).

F proteinin F1 ve F2 olmak üzere 2 alt ünitesi bulunur ve birbirlerine disülfid bağları ile bağlıdır (9, 26). F proteini virüs zarfının konak hücreye füzyonunu sağlar ve hücre kültüründe sinsityum oluşumuna neden olur (5, 9, 27).

N, P, M, G/HN/H, F ve L proteinleri paramiksoviruslar ile pnömoviruslar arasında ortak proteinlerdir. NS1 ve NS2, SH ve M2 yalnızca pnömovirüslerde bulunurken, yapısal olmayan protein (C) ve sisteinden zengin protein (V) paramiksovirus proteinleri olup, pnömovirüslerde bulunmaz (1, 5, 24).

RSV genomunun 3' ucundan 5' ucuna olan genomik haritası Şekil 2.1.'de gösterilmiştir (1, 5).

Şekil 2.1. RSV genomunun haritası

2.4.DİRENÇLİLİK

RSV, pH ve ısı değişikliklerinden hızlı etkilenen bir virüsdür. 55 °C'de 5 dakika beklemekle RSV'lerin ancak %10'u canlı kalır. Virüs 37 °C'de 1 saat stabil kalır ve 24 saat sonra infektivite ancak %10'unda kalmıştır. 48 saat süreyle 25 °C'de bekletilmekle infektivite oranı %10'a düşmektedir (3). RSV'nin infektivitesinin %90'ı yavaş bir şekilde dondurma ve çözme işlemlerinde kaybolmaktadır (4). Optimal pH RSV için 7.5'tur. Asit pH virüsü olumsuz etkiler. Virüs; eter, kloroform ve çeşitli deterjanlarla (%1 sodyum deoksilat, sodyum dodesil sülfat (SDS), Triton x-100) çabuk inaktive olur (8, 3)

RSV'nin saklanması için alkol-kuru buz karışımı veya gliserin yada sukroz eklenerek hızlı dondurma yöntemleri kullanılabilir (7, 8). RSV'nin canlılığı kısmen ortamın nemine de bağlı olup; RSV gözeneksiz yüzeylerde (masa, stetoskop vb) 3-30 saat canlılığını sürdürebilirken; gözenekli yüzeylerde (giysi yada kağıt gibi) canlı kalma süresi 1 saatten azdır. Ellerde RSV'nin infektivitesi kişiden kişiye değişmekle birlikte genellikle 1 saatten azdır (8, 28, 29).

2.5.PATOGENEZ

RSV'nin yol açtığı solunum yolu hastalığının inkübasyon dönemi ortalama 5 gündür (30). Hastalığın başlangıcında virüs nazofarinkste çoğalmakta ve hastaların sekresyonlarında mililitrede 10^4 - 10^6 TCID₅₀ (doku kültürünün % 50'sini infekte eden doz) düzeylerine kadar ulaşmaktadır (17, 31). RSV'nin bulaşması virüs içeren solunum yolu kaynaklı büyük damlacıklar veya bunlarla kontamine olmuş nesnelere ve ellerle olur (33, 33).

Virüsün organizmaya girişinde göz ve burun mukozaları eşit önem taşıırken ağız nadir bir giriş yoludur. RSV'nin infeksiyonu genellikle solunum yolu ile sınırlı olup virüsün yayılımı yukarı solunum yolundan alt solunum yollarına doğru olmaktadır (8). Üst solunum yolundan alt solunum yoluna geçiş mekanizması tam olarak bilinmemektedir; solunum yolu epiteli ile direkt olarak veya nazofaringeal sekresyonların aspirasyonu ile olduğu sanılmaktadır. Başka bir olası mekanizma da infeksiyonun alt solunum yoluna makrofajların göçü yoluyla taşınmasıdır (3).

RSV'nin solunum yolu epiteline hangi reseptör ile bağlandığı henüz bilinmemektedir. Pnömovirüsler da diğer paramiksovirüsler gibi füzyon yolu ile hücreye penetre olurlar. Penetrasyondan sonra virüsün zarfı hücre zarfı ile birleşir. Nükleokapsid sitoplazmaya geçer ve RNA polimeraz tarafından transkripsiyon başlatılır. RSV'nin replikatif siklusunun tamamı sitoplazmada gerçekleşir. Daha sonra tomurcuklanma öncesi hücre zarfının altında nükleokapsid görünümünü alır. Şişerek lümene doğru çıkıntı yapan virüsle infekte kirpikli epitel hücreleri kirpiklerini kaybeder ve virüs partikülü buradan tomurcuklanır (5). Bu esnada infekte hücre zarfı komşu hücre zarfı ile birleşerek, RSV'nin sitopatik etkisi (CPE) olan çok çekirdekli dev hücreler oluşturur. Böylece virüs ekstraselüller sıvıya geçmeden hücreden hücreye yayılır (1).

RSV infeksiyonunun başlangıcından 18-24 saat sonra histolojik olarak bronşiol epiteline proliferasyon gelişimi başlar. Plazma hücreleri, makrofajlar ve lenfositlerin eşlik ettiği peribronşial infiltrasyon konak hücre yanıtının göstergesidir (1). Bronşiollerin lümeninden dökülen epitel hücreleri ve artan mukus salgısı nedeniyle yoğun bir tıkaç oluşur. Bu tıkaçlarla kapanan küçük bronşiolde tıkanma meydana gelir. Zamanla gelişen tam tıkanma, birden çok alanda atelettazinin gelişimine neden olur. Sonuçta bronşiolitli bebeğin akciğer hacmi artar ve ekspirasyonu zorlu olur (2, 8).

RSV'ye bağlı alt solunum yolu infeksiyonu olan bebeklerde sıklıkla pnömoni ve bronşiolit belirtileri birlikte gürölür. Pnömonili vakaların interstisyumunda mononükleer (MN) hücre infiltrasyonu sonucu interalveolar duvar kalınlaşır ve alveol boşluğu sıvı ile dolar. Başta alveolleri tutan nekrotik alanlar çoğunlukla yama tarzında akciğeri tutar. RSV'nin etken olduğu hafif pnömoni ve bronşiolitin mikroskopik patolojisi hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır (1, 5).

Bebeklerde alt solunum yolunun tutulma belirtileri burun akıntısının başlangıcından genellikle 1-3 gün sonradır. Otopsi çalışmalarında elde edilen verilere göre fetal seyreden vakalarda virüs antijenleri daha yoğun bulunmaktadır. Bu da virüs replikasyonunun solunum yetmezliğinin artışı ile doğru orantılı olduğunu ve yine RSV antijenlerinin derinlere gitmeyip solunum yolunun yüzeyel tabakalarında sınırlı kaldığını göstermiştir. RSV antijenleri solunum yolu dışında dolaşımdaki mononükleer hücrelerde de bulunmuş ve RSV'nin az düzeyde de olsa çoğalabildiği *in vitro* olarak gösterilmiştir. Ancak viremi saptanamamıştır ve bu da bağışıklık sistemi normal kişilerde hematogen bulaşma olmadığını göstermektedir. Virüs bağışıklık yetmezliği olanlarda karaciğer, miyokard ve böbrekte bulunmuştur. RSV'nin yol açtığı hafif bronşiolit vakalarında infeksiyon başlıca alt solunum yollarını tutar ve değişik derecede peribronşiyal ve interstisyel inflamasyona yol açar (3).

2.6. İMMÜNİTE

RSV infeksiyonlarından korunma ve iyileşmede immun sistem önemli rol oynamaktadır. Salgısal antikorlar, serum antikorları, sitotoksik T lenfositleri ve anneden bebeğe geçen antikorlar korunmada etkilidir (34-36). İmmün sistemi normal olanlarda RSV infeksiyonu sırasında virüs salınımı 1 hafta sürerken immün sistem baskılandığında aylarca devam etmektedir (37, 38). RSV ile infekte yetişkin farelerde CD8⁺ ve CD4⁺ hücrelerinin iyileşmede ve virüsün titresinde azalmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (39).

Küçük bebeklerde serum ve salgısal antikorlar infeksiyona cevap olarak üretilse de genellikle düzeyleri düşük olmaktadır (35, 36). Küçük bebeklerde RSV infeksiyonu sonucu salınan salgısal antikorlar, sıklıkla *in vitro* olarak virüsü nötralize edememektedir ancak virüs titresini azaltmaktadır (5). Salgısal IgA'ların ömrünün kısa olması ise RSV infeksiyonlarının sık sık tekrarlanmasına neden olur (40). IgA üst solunum yolu infeksiyonuna karşı koruma sağlamaktadır (41). RSV ile infekte

çocukların salgılarında özgül IgM, IgG ve IgE antikorların varlığı da gösterilmiştir. Küçük bebeklerde antikor yanıtı daha az olup özellikle G proteinine karşı daha azdır. IgA ve IgG yanıt ise F proteini ile ilgilidir (8). IgG'nin akciğerleri daha etkin bir şekilde koruması mümkündür. F proteini genellikle daha yüksek antikor titresi indüklemektedir. Daha az immunojenik olan G proteini ise aynı grup veya subgrup suşlara karşı koruma sağlamaktadır (41).

RSV infeksiyonu sonrasında kazanılan bağışıklık zayıftır. Antikorlar sürekli koruma sağlamazlar (41). Primer infeksiyon sonucu oluşan antikorlar hastalığın tekrarını önlemez ancak ilerde daha hafif geçmesine neden olur (42, 43). Yetişkin ve büyük çocuklarda geçirilen infeksiyon reinfeksiyon şeklindedir (2, 42). Hastalık sırasında yüksek düzeyde nötralizan antikorlar oluşmakta olup, bunlar plesanta yoluyla bebeğe geçer ve 2 ay süre ile koruma sağlar. Bu yüzden bebekler yaşamın ilk iki ayında hastalığa karşı korunmaktadır. Ancak bazen anneden geçen antikorlar olmasına rağmen bebekte RSV infeksiyonu görülebilmektedir. Bebeklerde oluşan infeksiyonlar daha çok bu antikorların kaybolduğu 2-4 ay arasında ortaya çıkmaktadır (40).

Hücrel immunité çalışmalarında spesifik sitotoksik T lenfositlerin çocuk ve erişkin hastalarda geliştiği de gösterilmiştir. Bu spesifik sitotoksik T hücrelerinin hedefi N, F, M2 proteinleridir (4). Hücrel immunité, infeksiyona yanıt oluşumu ve infeksiyonun tekrarlanmasında önemlidir. Hücrel immun yetmezliği olan çocuk ve yetişkinler ile deneysel olarak immun sistemi baskılanmış hayvanların infeksiyonları ağır geçer ve virüs bulaştırma süreleri de uzar (5, 8).

Özet olarak; iyileşmede ve reinfeksiyonlara dirençte immun sistem önemlidir. Hücrel immunité RSV infeksiyonundan korunmada önemli rol oynamaktadır. Serum ve salgısal antikorlar infeksiyonlardan korunmada rol oynamakta fakat bu koruma tam olmadığı için reinfeksiyonlar görülmektedir. Lokal bağışıklık üst solunum yollarının korunmasında önemlidir. Ancak yüksek düzeydeki serum antikorları alt solunum yollarındaki RSV infeksiyonuna dirençte büyük rol oynamaktadır. Küçük çocuklarda RSV antijenine karşı oluşan serum ve salgısal antikorlar azdır. Daha büyük çocuklarda ve yetişkinlerde reinfeksiyon sonucu oluşan bağışıklık hastalığın ağır geçmesini engellemektedir (5).

2.7.RSV'İN YAPTIĞI HASTALIKLAR

RSV infeksiyonları; büyük çocuklarda ve yetişkinlerde genellikle soğuk algınlığı, üst solunum yolu infeksiyonu şeklinde kendini gösterirken, küçük çocuklarda alt solunum yolu infeksiyonu, pnömoni, bronşiolit, trakeobronşit, krup, asemptomatik infeksiyon olarak kendini gösterir (3, 4).

RSV'ye bağlı alt solunum yolu infeksiyonu hastalıklarından en sık görüleni pnömoni olup, ikinci sıklıkta bronşiolit görülmektedir (2, 44) RSV infeksiyonuna en duyarlı yaş grubunu bir yaşın altındaki çocuklar oluşturmaktadır (1, 3).

Hastalık virüsle karşılaşan duyarlı kişilerde 2-8 günlük kuluçka döneminin ardından orta derecede üst solunum yolu infeksiyonu belirtileri ile başlar. Burun akıntısı, hafif ateş ve öksürükle karakterize 3-5 gün süren üst solunum yolu infeksiyonu hastalığını takiben alt solunum yolu infeksiyonu hastalığı bulguları gelişir (2, 3, 5).

Bronşioollerin lümeni salgı ve mukozanın iltihabi yanıtı ile tamamen tıkalı olduğundan, alveollerde havanın girişi çıkışından daha fazla olur ve alveollerdeki bu kısmi solunum tıkanıklığı, amfizem ve hırıltılı solunum ile karakterize olur (6). Pnömoni ve bronşiolit tanısı sıklıkla birlikte konur ve bunları RSV ile infekte yenidoğanlarda klinik olarak ayırt etmek zordur (3).

RSV'nin "sudden infant death syndrome" (SIDS) unda rolü olduğu sanılmaktadır. Alt solunum yolu hastalıklarına bağlı olarak gelişen ani ölümlerin büyük bir kısmını RSV infeksiyonları oluşturmaktadır (45).

Krup RSV infeksiyonunda çok sık görülmeyen bir klinik tablodur. RSV nadiren orta kulak iltihabının primer nedeni olarak izole edilebilir. Orta kulak iltihabında etken daha çok RSV infeksiyonunu izleyen veya RSV ile eş zamanlı oluşan bir bakteri infeksiyonudur (2).

Eğer çocuklar RSV'nin neden olduğu şiddetli pulmoner infeksiyondan kurtulursa, bazılarında yıllar boyu süren solunum yetmezliği ve astım atakları görülebilir (41).

İmmun yetmezliği olan çocuklar ve yetişkinler, yaşlılar ve altta yatan başka bir hastalığı olanlar, yenidoğanlar RSV hastalığının ağır formlarına yatkın olup, bu kişilerde RSV infeksiyonu ölümcül seyredebilir. Bronkopulmoner displazi veya siyanotik konjenital kalp hastalığı olan çocuklarda, prematürlerde ciddi RSV infeksiyonları görülür. Bütün bebeklerin yaklaşık %1'inde RSV infeksiyonu hastane yatışını gerektirecek kadar

şiddetlidir ve bu bebeklerin yaklaşık %1'i ölür. (42). RSV infeksiyonunda santral sinir sisteminin tutulumu nadir olup menenjit, miyelit, ataksi gelişebilir (3, 4)

Yetişkinlerde, sağlık personellerinde ve çocuk bakıcılarında akut RSV infeksiyonları sıklıkla görülmektedir (46, 47). Yetişkin ve büyük çocuklarda meydana gelen infeksiyonlar, tekrarlayan infeksiyonlar olup genellikle hafif seyirli dirler. Bu gruptaki hastaların kliniğinin daha hafif olması, sahip oldukları özgül antikorlara bağlıdır (3, 4). Bu kişilerde burun akıntısı, faranjit, soğuk algınlığı semptomları görülmektedir. Hastalık genellikle 5 gün sürmektedir. Yaşlılarda, huzurevlerindeki, hastanelerdeki salgınlarda veya toplumda sporadik olarak kazanılan RSV infeksiyonunun öneminin arttığını gösteren deliller bulunmaktadır (48-51). Altta yatan hastalığı olan yaşlı kişilerde veya nadiren normal yetişkinlerde “adult respiratory distress syndrome” (ARDS) gelişimi nedeniyle ciddi pnömoni görülebilmektedir. Huzurevlerinde görülen ateşli bronşit veya ciddi pnömoni salgınlığının RSV ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (49).

2.8. RSV’NİN TANISI

2.8.1. Klinik Tanı

Klinik belirtilere bakılarak RSV infeksiyonunun tanısının konulması zordur. Ancak altı aydan küçük bebeklerdeki bütün bronşiolit veya pnömoni vakalarında RSV’den şüphe edilmelidir. Çünkü altı aydan küçük bebeklerde bronşiolite en fazla sebep olan virüs RSV’dir (6, 52).

RSV’nin ayırıcı tanısında parainfluenza virüslerinden özellikle parainfluenza tip 3, adenovirüsler ve *Chlamydia trachomatis* infeksiyonları ayırt edilmelidir. İmmun yetmezliği olan çocuklarda *Pneumocystis carinii* infeksiyonunun belirtileri ile RSV infeksiyonunun belirtileri karışabileceği de göz ardı edilmemelidir. Bazen bakteri nedenli pnömoniden ayırımı güç olabileceği gibi çocuklarda çevresel allerjenlerin ve yabancı cisim aspirasyonuna bağlı olarak gelişen bronkospastik hastalık olasılığı da ayırıcı tanıda düşünölmelidir. Yetişkinlerde ve yaşlı hastalarda özellikle kış dönemlerinde akut bronşit ve orta derecede pnömoni görölenlerde ve altta yatan kardiopulmoner hastalığı olanlarda RSV infeksiyonlarından şüphelenilmelidir (5).

2.8.2. Laboratuvar Tanısı

RSV'ye bağlı alt solunum yolu infeksiyonu olan bebek ve çocuklarda tanı, klinik ve epidemiyolojik bulgular temel alınarak konur. Ancak asıl tanı hastadan alınan solunum kaynaklı örnekte virüsün gösterilmesi ile konulmaktadır. RSV infeksiyonlarının özgül tanısında;

1. Virüsün antijenlerinin direkt olarak gösterilmesi,
 2. Virüsün izolasyonu,
 3. Serolojik teknikler (nötralizan antikor testi (NT), Kompleman Birleşme Deneyi (KBD), ELISA ve indirekt floresan test (IFT),
 4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR),
- yöntemleri uygulanmaktadır (1, 3, 9).

Örnekler nazotrakeal, nazofaringeal aspirasyon yıkama sıvılarından elde edilir (5). Burun, boğaz ve nazofarinks sürüntüleri de virüs içeren örneklerdir (4). RSV nispeten dayanıksız bir virüs olup özellikle ısı ve pH değışikliklerine oldukça duyarlıdır. Bu yüzden alınan +4 °C 'de mümkün olduğu kadar kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır (1).

Virüs Antijenlerinin Direkt Olarak Gösterilmesi

RSV'nin klinik örneklerde direkt olarak saptanması hem hızlı, hem de duyarlıdır ve günümüzde RSV infeksiyonlarının tanısında sıkça uygulanan bir yöntemdir (3). RSV ile infekte hastaların solunum yolu kaynaklı salgılarında, dökülmüş epitel hücrelerinde direkt immunofloresan antikor (DFA) yöntemi ile RSV'ye ait antijen gösterilebilmektedir. RSV antijeninin varlığını göstermek için hazırlanmış birçok ticari kit bulunmaktadır. Bu kitler ile birkaç saat içinde tanı konulabilmektedir (53, 54).

DFA yönteminde fluorescein isothiocyanate ile işaretli monoklonal anti RSV antikor kullanılmaktadır. DFA yönteminin prensibi klinik örnekteki virüs antijeni ile fluorescein isothiocyanate ile işaretli monoklonal anti RSV antikorun birleşmesi esasına dayanır. Klinik örnekte RSV varlığında floresan mikroskopunda karakteristik stoplazmik granüler floresan veren hücreler gözlenir (55).

Hücre kültürü ile kıyaslandığında direkt immunofloresan testinin duyarlılığı %80'nin üzerinde, özgülüğü ise %90'nın üzerindedir (56).

Virüs İzolasyonu

RSV'nin üretilmesi için insan larinks epitelyal karsinoma (Hep-2) hücre kültürleri en duyarlı hücre kültürü olup; serviks epiteli karsinoması hücre kültürü (HeLa) ve Afrika yeşil maymun böbrek hücre kültürü (Vero) de kullanılabilir. Ancak bunlar Hep-2 hücreleri kadar duyarlı değildir. Virüsün karakteristiği olan sinsityum oluşumu ise en iyi Hep-2 hücre kültürlerinde izlenmektedir (8). Hücre kültürünün tipinin yanı sıra; hücre tabakasının yoğunluğu, kullanılan besiyeri, virüsün yapısı ve enfeksiyonun çeşidi de optimal üreme ve sinsityum oluşumunda etkili faktörlerdir (1).

Virüsün optimal üremesi ve gelişimi için besiyerine glutamin ve kalsiyum eklenmesi gereklidir. Klinik örnek hücre kültürüne inokule edildikten sonra 33-37 °C'de inkübe edilmelidir. RSV'nin sitopatik etkisi (CPE) genellikle 3-7 gün içerisinde oluşur. RSV için karakteristik CPE füzyona uğramış çok nükleuslu dev hücreler ile geniş sinsityumlar ve sitoplazma içinde eozinofilik granüllerin varlığı şeklinde özetlenebilir (9).

Shell vial testi, bir çeşit hızlı hücre kültürü yöntemidir (57). Bu yöntemde kısaca yüzeyinde hücre üretilmiş lameller içeren kapaklı tüplere ilave edilen klinik materyaller düşük devirlerde ortalama 30 dakika süre ile santrifüj edilmekte böylece makromoleküllerin hücre yüzeyine teması sağlanmaktadır. İnokülasyon yapılmış shell vial tüpünün 37 °C'de 24-48 saat inkübasyonundan sonra lamel alınıp tespit edilerek floresan veya peroksidaz işaretli en erken veya erken proteinlere spesifik monoklonal antikorlarla boyanmaktadır (58). RSV'nin tanısında shell vial kullanımı kültürün duyarlılığını az da olsa artırır ve virüsün izolasyonunun da hızlanmasını sağlar (1).

Serolojik Teknikler

RSV'ye karşı oluşan antikor yanıtını göstermek için en çok kullanılan serolojik testler; nötralizan antikor testi (NT), Kompleman Birleşme Deneyi , ELISA ve indirekt floresan test (IFT)'tir (7). Özellikle IFT ve ELISA serolojik testler arasında en çabuk sonuç veren testlerdir (5). RSV'ye ait antijeni göstermede ELISA'nın duyarlılığı ve özgüllüğü de %90'a yakındır (56). Testin basit ve çabuk uygulanabilmesi ve otomatize edilebilmesi başlıca avantajlarıdır (1).

Serolojik testler RSV infesiyonun tanısında tek başlarına kullanılmazlar, özellikle epidemiyolojik çalışmalarda faydalıdır. Ayrıca antijen tanı testi ve hücre kültürü ile kıyaslandığında serolojik testlerin duyarlılıkları daha azdır (7).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

RSV'nin tanısında PCR teknolojisinden de faydalanılmaktadır. RNA içeren infekte hasta örneği yada kültür sıvısındaki virüsün RNA'sı ters transkripsiyon-PCR (RT-PCR; revers-transcription-polimerase chain reaction) ile çoğaltılıp gösterilebilir (59).

PCR yöntemi örnekten nükleik asit izolasyonu, DNA'nın çoğaltılması ve belirlenmesi basamaklarından oluşur. Teorik olarak çoğaltma aşamasında her döngüde DNA iki katına çıkar. Sonuçta ürün milyon katlara ulaşır. Virüsün nükleik asidi RNA ise DNA oluşturabilmek için reverse transkripsiyon basamağı ile çoğaltma işlemi başlamadan RNA DNA dönüşümü sağlanmalıdır (60).

Gerçek zamanlı (real time) PCR teknolojisi temel olarak nükleik asit dizisinin eş zamanlı olarak çoğaltılması ve kantitasyonuna dayanır. Bu amaçla, floresans veren bazı boya ya da proplar ile oluşan floresanı saptayabilen ısı-döngü aygıtları (thermal cyclers) kullanılır. Boyalar arasında en sık kullanılanı çift iplikli DNA'ya bağlayan SYBR Green I' dir. Tepkime sırasında hedef nükleik asit dizilerinin sayısı arttıkça, oluşan çift iplikli DNA moleküllerine giderek daha fazla sayıda SYBR Green I molekülü bağlanır ve daha fazla floresans oluşur. Oluşan floresans eş zamanlı olarak okunur (60). Bu uygulamada, floresan artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü, çift sarmal DNA'ya entegre SYBR Green I ortamda hedef moleküller olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek bağlanmalar sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü "melting temperature, T_m" (çift sarmal DNA'nın % 50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca SYBR Green I boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Erime eğrisinden yararlanılarak amplikonun T_m derecesi saptanabilmektedir. Aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrollerin T_m derecesiyle karşılaştırılarak değerlendirme yapılır (61). Gerçek zamanlı PCR uygulamalarında floresan veren oligonükleotid proplarda kullanılmaktadır. Taqman sisteminde propların 5' ucunda bir florofor (floresin gibi), 3' ucunda ise (rhodamine gibi) bir sönmüleyici

(quencher) molekül bulunur. Prob serbest halde iken sönümleyicinin etkisi ile floresan sinyali oluşmaz. Oysa, prob hedef diziye bağlandığında, polimerazın 5' nükleaz etkinliği ile flor grubu serbest kalır ve oluşan sinyal aygıt tarafından saptanabilir. Gerçek zamanlı PCR teknolojisi kullanılan sistemlerde çoğaltma ürünlerinin saptanmasında elektroforez gibi ayrı bir basamak kullanılmadığından hem zamandan kazanç sağlanılmakta hem de kontaminasyon riski azalmaktadır (60).

RSV'nin tanısında ideal olan; hücre kültürünün, DFA, serolojik testler ve PCR testinin biri veya birkaçı ile birlikte uygulanmasıdır. Hastadan alınan solunum yolu kaynaklı örnekler, uygun olmayan şartlara maruz kalırsa (yüksek ısı ve pH gibi) hücre kültüründe RSV izole edilememekte ancak aynı örnekte DFA ve ELISA testleri ile RSV'ye ait antijen varlığı gösterilebilmektedir. Benzer şekilde klinik hastalık döneminden sonra örnek alınırsa virüsün izolasyonu yapılamazken antijenin varlığı gösterilebilmektedir. Dolayısıyla hem DFA hem de ELISA ile virüsa ait antijenleri hücre kültüründe CPE oluşmadan önce saptamak mümkündür (53). Ancak örnekte virüs miktarı az olduğunda DFA testiyle virüs gösterilemezken hücre kültüründe üreyebilmektedir. Bu sebepten, virüs antijenlerinin direkt olarak gösterilmesi ile birlikte virüs izolasyon yöntemlerinin yapılmasına önem verilmelidir (76).

2.9.EPIDEMİYOLOJİ

RSV bebeklerdeki viral alt solunum yolu hastalıklarının en önemli sebebini oluşturmaktadır (9). RSV ile infeksiyon her çeşit coğrafya ve iklimde ortaya çıkabilir (3). Epidemiler her yıl tekrarlar, ortalama 2-5 ay sürer. Ilıman iklimli yerlerde kış ve baharın ilk aylarında görülürken, tropikal iklime sahip yerlerde ise yağmurlu mevsimlerde meydana gelir. Epidemiler büyük şehirlere oranla küçük kasaba ve topluluklarda daha sık görülmektedir (2, 7).

Yaşamın ilk birkaç yılında hemen bütün çocuklar infekte olurlar. Tüm yenidoğanlar virüsa özgü nötralizan antikorları ve virüsün major yüzey glikoproteinine karşı oluşan antikorları pasif olarak annelerinden alırlar. Doğal infeksiyon olmadıkça bu antikorlar 6-7 ay içerisinde saptanamayacak düzeye düşerler ancak 2 yaşına geldiğinde çocukların %95 yada daha fazlası seropozitif olurlar (3). RSV infeksiyonunun bebeklik döneminde önemli oluşunun nedeni hem sıklığının yüksek olması hem de ağır geçmesidir. RSV infeksiyonu nedeni ile hastaneye yatırılanların çoğunluğunu 2-6 ay arası bebekler oluşturmaktadır (62).

RSV salgınının en belirgin özelliği o dönemlerde bronşiolit ve pnömonin toplumda artması ve küçük çocukların akut alt solunum yolu infeksiyonu ile hastaneye başvurmalarıdır (4). Epidemiler esnasında hastaneye başvuran alt solunum yolu infeksiyonlu çocukların % 80'inden daha fazlasında RSV izole edilir. Bebeklerin %50'si birinci yaşlarında primer RSV infeksiyonu geçirirken bu oran iki yaşında % 100'e yaklaşmaktadır (62). Yaş, cinsiyet ve sosyoekonomik durum hastalığın ciddiyetinde ve seyrinde etkili faktörlerdir. En ciddi hastalık formları yenidoğanlarda görülür (4). Erkek çocuklar kızlara göre RSV hastalığının ağır formuna daha fazla yakalanmaktadır (2, 43).

Hastalık %90 çocukta tekrarlar ve 2-3 defa oluşabilir. Hastalığın ağır geçmesinde 3 aylıktan ufak bebek oluşu, prematürite ve altta yatan bir kardiopulmoner hastalık veya immunsupresyon gibi predispozan faktörler önemlidir. Ayrıca düşük sosyoekonomik durum, sigara içmek, kalabalık aile ortamında yaşamak, bebeklerin anne sütü emmemesi ve düşük düzeyde maternal antikor geçişi bu faktörlere ilave edilebilir (4). RSV infeksiyonu çocukluk çağının erken hastalığı olduğundan büyük çocuk ve yetişkindeki formu reinfeksiyon şeklindedir ve oluşan infeksiyonlar, primer infeksiyonlara göre daha hafif olup, genellikle soğuk algınlığı şeklinde seyreder (40, 63).

Çalışmalarda RSV epidemileri esnasında çocuk servislerinde çalışan hastane personeline infeksiyon oranının %25- %50 arasında olduğu gösterilmiştir (5). Bulaşma infekte kişinin solunum yolu kaynaklı damlacıkları veya bu damlacıklarla infekte olmuş nesnelere yada kontamine ellerle olmaktadır (63, 64).

2.10.TEDAVİ

RSV hastalıklarının tedavisinde önemli olan destek tedavisidir. Salgıların mekanik olarak uzaklaştırılması, bebeklerin uygun şekilde yatırılması, oksijen veya solunum desteği uygulanabilir (5).

Son yıllarda bronşit ve pnömonili hastalara yapılan destek tedavisinin ölüm oranını azalttığı belirtilmektedir (5). Hastaların büyük kısmı evde takip edilirken ortalama %1 kadarı da hastaneye yatırılmaktadır (43, 65).

RSV hastalıklarının tedavisinde sadece tek bir antiviral bileşim etki göstermiştir. Ribavirin sentetik bir nükleozid yapısında olup geniş spektrumlu bir antiviral ajandır. (5). Ribavirin guanozin sentezinde rol oynayan ionosin monofosfat dehidrogenazı inhibe eder, mRNA sentezini engeller ve RNA polimerazı inhibe eder (66). Ribavirin, hastalığın şiddetini ve akciğerlerdeki virüs titresini azaltmaktadır (41). Klinik olarak iyileşme sağladığı gibi nazal sekresyonlardaki RSV'ye özgü IgE yanıtını da önlemektedir (4). Oksijen çadırı, kabin, ventilatör veya maske içine günlük 12-18 saatlik ve 3-6 gün süreyle küçük parçacıklı aerosol halinde püskürtme yapılmaktadır. Ribavirin karaciğere ve kemik iliğine ağızdan tatbik edildiğinde toksik etkisi olup, pahalı bir ilaçtır. Bu yüzden uygulama çok şiddetli hasta olan bebek ve çocuklarda tavsiye edilmektedir (41).

In vitro şartlarda RSV interferona karşı duyarlı bulunmuştur. Ancak RSV ile infekte kişilerin tedavisinde yararlılığı ve yan etkilerine ait yapılan araştırmaların yetersiz olması sebebiyle α -interferonun kullanılmamaktadır (2, 8). F proteinine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar gönüllülerde yapılan çalışmalarda ümit verici neticeler vermiştir (4). Ayrıca saflaştırılmış insan IgG'si intravenöz olarak bebeklerdeki RSV bronşiolit-pnömonisini tedavi için kullanılmıştır ve olumlu sonuçlar rapor edilmiştir (41). Sülfatlı polisakkaritler, sülfonik asit polimerleri ve dekstran deliverileri gibi maddelerin *in vitro* olarak anti-RSV etkileri olduğu gözlenmiştir (3).

2.11.KORUNMA

RSV'nin sebep olduğu alt solunum yolu infeksiyonunun tedavisi esas olarak destekleyicidir. Bu nedenle özellikle yüksek riskli bebeklerde ve küçük çocuklarda korunma tercih edilen yaklaşımdır. RSV infeksiyonuna karşı bağışıklık sağlamak için henüz ticari bir aşı bulunmamaktadır (6).

Formalinle inaktive edilmiş aşı 1960'lı yıllarda elde edilmiş ama infeksiyondan korumada başarılı olamamıştır (5). Birkaç inaktif aşı denenmiş, kompleman bağlayan ve nötralizan antikor titrelerinin arttığı ve hücresel bağışıklığında uyarıldığı görülmüştür. Ancak aşını RSV infeksiyonunu arttırdığı sonucuna varılmıştır.

Başarısızlıkla sonuçlanan inaktif aşı uygulama çalışmalarının ardından aşı sonrası geçirilen doğal enfeksiyonun şiddetindeki artışı açıklayan teoriler aşağıda belirtilmiştir;

1. RSV'nin formalinle muamelesinin G glikoproteini ile F glikoproteininin epitopunu değiştirdiği, buna bağlı olarak işlevi olmayan antikorların oluştuğu,
2. Antikorların akciğerlerde oluşturduğu arthus reaksiyonu sonucu patolojik olayın arttığı,
3. F proteinlerine karşı oluşan antikorların virüsün hücreden hücreye yayılımının önlenmesinde önemli olduğu ve inaktif aşı uygulaması sonucu F antijenine karşı antikorların meydana gelmemesinin bebeği şiddetli enfeksiyona hassas kıldığı şeklindeki teorilerdir (1, 2).

Doğal yoldan gelişen enfeksiyonu ve formalinle inaktive aşığı takiben oluşan hücrel immunitenin performansı 1970 yılında ölçülmüş ve klinik düzelleme döneminde enfekte yetişkinlerde RSV özel sitotoksik T lenfositlerinin varlığı her iki hastalık formunda da saptanmıştır. Araştırmalar fare akciğerlerinin RSV'den temizlenmesinin sitotoksik T lenfositleri tarafından arttırıldığını göstermiştir. Başka çalışmalarda da RSV'nin sitotoksik T lenfositleri tarafından yok edildiği bildirilmiştir (5).

Formalinle inaktif RSV aşılardaki başarısızlıktan sonra canlı aşı çalışmaları yapılmıştır. Bunlar soğuga adapte (cp:cold passaged) RSV aşısı ve RSV'nin ısıya duyarlı (ts:temperature sensitive) mutantlarından elde edilen aşılardır (5).

Soğuga adapte RSV aşısı çocuk ve yetişkinlere burun içi yolla uygulanmış ve bu aşının verildiği küçük çocukların birkaçında alt solunum yolu enfeksiyonunun oluştuğu görülmüştür (1).

Ts mutantlarından iki alt tip çocuk ve yetişkinlerde teste tabii tutulmuştur. Teste tabii tutulan ts-1'in burun içi yolla kullanımı enfeksiyonu üst solunum yoluna sınırlamış ve salgısal RSV-IgA üretimini de arttırmıştır (2). Yetişkin ve büyük çocuklarda ts-1'in uygulanmasının ardından hastalık oluşumuna rastlanmamıştır. Küçük çocuklara yüksek doz uygulaması bazı çocuklarda hafif üst solunum yolu enfeksiyonu ve bir çocukta da otitis media gelişimine neden olmuştur. Bunun yanı sıra virüs ts özelliğini kaybedip bulaşıcı sokak suşu haline dönmüş ve bulaş görülmüştür. Bu etkiler düşük doz uygulandığında görülmemiştir. Ayrıca ts-1 aşısı yapıldıktan sonra doğal RSV ile enfekte olan çocuklarda hastalığın şiddetinde artma olmamıştır. Ts mutantlarından bir diğeri

olan ts-2 (mutant F glikoproteininde) aşısı seronegatif bebeklere uygulanmış, yüksek dozlarda uygulanmasına rağmen infeksiyon oluşumu görülmemiştir (67). Ancak ts mutantlarının henüz rutin kullanımda olan bir formu yoktur (1). Ayrıca yaşlılar ve kronik kalp yada akciğer hastalığı olan RSV seropozitif çocuklar için hazırlanan PFP (purified fusion protein) alt ünite aşı çalışmaları yapılmaktadır (3).

RSV'nin F ve G glikoprotein rekombinant aşısı kemirgenler ve maymunlar üzerindeki ilk denemelerinde başarılı olup gelecekte RSV'ye karşı etkili bağışıklığın elde edilebileceği ümidini vermiştir (68). Adenovirüslerin rekombinant vektörler olarak kullanıldığı RSV aşı çalışmaları sürmektedir (5).

RSV'ye karşı etkili aşı geliştirme çalışmaları aşağıdaki sebeplerden dolayı başarısızlıkla sonuçlanmıştır:

1. Bağışıklamaya infeksiyon riskinin en fazla olduğu altı aydan küçük bebeklerde ve immun sistemin henüz olgunlaşmadığı dönemde gerek duyulması (69),
2. RSV'nin iki suşu ve birçok alt tipinin olması nedeni ile geniş spektrumlu bir aşıya ihtiyaç duyulması (70),
3. RSV'ye karşı bağışıklığın kısa ömürlü olması (62)'dir.

Moleküler tekniğin avantajları kullanılarak F ve G glikoproteinlerinin saflaştırılması ile elde edilen aşuların geliştirilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir (68).

2.11.1.Pasif Bağışıklama

Anneden geçen antikorlar hayatın ilk 6 haftasında koruma sağlamaktadır (41). Doğumla birlikte anne sütü alınması önerilmektedir. Son zamanlarda özellikle yüksek risk grubuna dahil (prematüre, kronik akciğer hastalığı ve konjenital kalp hastalığı olanlar) bebek ve süt çocuklarında immunoterapötik ajanlar kullanılmaya başlanmıştır (71).

RSV'ye karşı nötralizan antikorlardan yüksek titrede hazırlanmış immunoglobulin preparatı (respigam), 1996 yılında FDA (Food and Drug Administration) onayı almıştır ve intravenöz olarak uygulanmaktadır (1). Bu preparat RSV infeksiyonunu önlememektedir fakat hastalığın şiddetli formlarının oluşumunu engellediği iddia edilmektedir. Bu nedenle yüksek risk grubundaki hastalara önerilmektedir (72). Ancak kan kaynaklı patojenleri bulaştırma riski, intravenöz uygulamanın güç olması,

uygulamanın birkaç saatten uzun sürmesi ve uygulama sonrası canlı aşı yapımını geciktirmesi dezavantajlarını oluşturmaktadır (1).

RSV monoklonal antikorun intramüsküler formu olan palivizumab 1998 yılında FDA onayı almıştır (65). Palivizumab RSV'nin F proteininin A epitopuna bağlanır ve virüsün alt solunum yollarını döşeyen epitel hücrelerini infekte etmesini önler (73). Palivizumab rekombinant DNA teknoloji ile üretilmiş olup kullanımı respigamdan daha kolay ve yan etkileri daha azdır. Ancak maliyetinin yüksek oluşu nedeniyle kullanımı sınırlıdır ve yüksek riskli hastalarda kullanılmaya başlanmıştır (1).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarında ve Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nde yapıldı.

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yenidoğan ve Süt Çocuğu Servislerinde Kasım 2005- Mayıs 2006 tarihleri arasında alt solunum yolu infeksiyonu şikayeti ile yatmakta olan, yaşları 0-24 ay arasında değişen, 80 hastadan alınan nazotrakeal aspirat örnekleri çalışmaya dahil edildi. Klinik örnekteki RSV antijeni bekletilmeden araştırıldı. Örnekler hücre kültürü ve PCR yöntemleriyle çalışılmak üzere iki steril ependorf tüpüne ayrıldı ve testler çalışılana kadar -70°C 'de saklandı.

Laboratuvara gelen örneklerde RSV antijeni DFA (Monofluo BIO-RAD, Fransa) yöntemiyle araştırıldı.. RSV'nin izolasyonu için her örnek Hep-2 hücre kültürüne inokule edildi ve 37°C 'de 10 gün bekletildi. Hücre kültüründe RSV antijeni DFA (Monofluo BIO-RAD, Fransa) yöntemiyle araştırıldı. Klinik örnekteki RSV-RNA QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN-Almanya) ile izole edildi ve gerçek zamanlı PCR yöntemiyle (Fluorion, IONTEK Türkiye) saptandı.

3.1.NAZOTRAKEAL ASPİRAT ÖRNEKLERİNDE DİREKT RSV ANTİJENİNİN ARAŞTIRILMASI

3.1.1. Direkt Immunofloresan Antikor (DFA) Testi

Kitin İçeriği :

- Konjugat (fluorescein isothiocyanate ile işaretli monoklonal anti RSV antikor)
- Mounting Medium

Hastalardan alınan nazotrakeal aspirat örnekleri tüplerde laboratuvara ulaştırıldı.

Testin Uygulanması

1. Tüpteki örneğin üzerine 5mL PBS (Phosphat Buffer Solution) eklendi.
2. Örnek 10 dakika 500'rpmde santrifüj edildi.
3. Süpernatant atıldı. PBS ile yapılan bu yıkama işlemi mukus tamamen uzaklaşincaya kadar 2- 3 kez tekrar edildi.
4. Yıkama işlemi son kez yapıldıktan sonra dip çökeltisinin üzerine 1 mL PBS eklendi ve örnek mikropipetle pipetaj yapılarak homojen getirildi
5. Homojen hale gelen örnekten 20 µL teflon kaplı lam üzerine yerleştirildi ve oda ısısında kurutuldu.
6. Kuruyan preparat 10 dakika asetonla tespit edildi.
7. Preparattaki örneğin bulunduğu alan üzerine bir damla fluorescein isothiocyanate (FITC) ile işaretli konjuge monoklonal anti-RSV solüsyonundan damlatılıp nemli ortamda 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
8. Preparat daha sonra PBS ile 5'er dakika olmak üzere 2 kez çalkalanarak yıkandı ve mounting medium solüsyonu damlatılarak lamelle kapatıldı.
9. Preparat floresan mikroskopunda x100 ve x400 büyütmede incelendi.
10. Karakteristik stoplazmik granüler floresan veren hücrelerden en az bir tane görüldüğünde test pozitif kabul edildi.

3.2. RSV'NİN KLASİK HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İZOLASYONU

RSV'nin izolasyonu DEKAM'da Hep-2 hücreleri kullanılarak yapıldı. Bu çalışmada kullanılan Hep-2 hücre kültürleri İstanbul Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'ndan temin edildi. Seksen nazotrakeal aspirat örneğinden Hep-2 hücre kültürüne ekim yapıldı. Hücrelerdeki sitopatik etki 10 gün süreyle gün aşırı incelendi.

Kullanılan besiyerleri ve malzemeler:

1. Hanks' dengeli tuz solüsyonu

- Hanks' solüsyonu (Sigma, 10X) 10 mL
- Steril deiyonize su 90 mL
- %4.4'lük NaHCO₃ 1 mL

2. Gelişme besiyeri

- RPMI 1640 besiyeri (Sigma,10X) 10 mL
- Steril deiyonize su 90 mL
- %4.4'lük NaHCO₃ 3.5 mL
- 200 mM L-glutamin 1 mL
- Fetal bovine serumu (56°C'de 30 dakika inaktive edilmiş) 10 mL
- 10 000 U/mL penisilin 1 mL
- 10 000 U/mL streptomisin 1 mL

3. Devam besiyeri

Gelişme besiyeri hazırlanırken kullanılan solüsyonlar ve miktarları aynı şekilde kullanıldı ancak fetal bovine serumu 2 mL olarak eklendi.

4. Tripsin

- Tripsin (Sigma 1/256) 2.5 mg
- Hanks' dengeli tuz solüsyonu 100 mL
- Tripsin ve Hanks' dengeli tuz solüsyonu karışımı 1 saat manyetik karıştırıcıda işlem gördükten sonra kullanıma hazır hale geldi.

Hücre Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar

1. CO₂'li etüv
2. Class 2A koruma kabini (hücre kültür çalışmalarının bütün aşamaları önceden %70'lik alkolle ve ultraviyole ışınlarla temizlenmiş bu kabinde yapıldı.)
3. Santrifüj
4. Benmari
5. İnvvert mikroskop

Hep-2 Hücrelerinin Pasaj Edilmesi

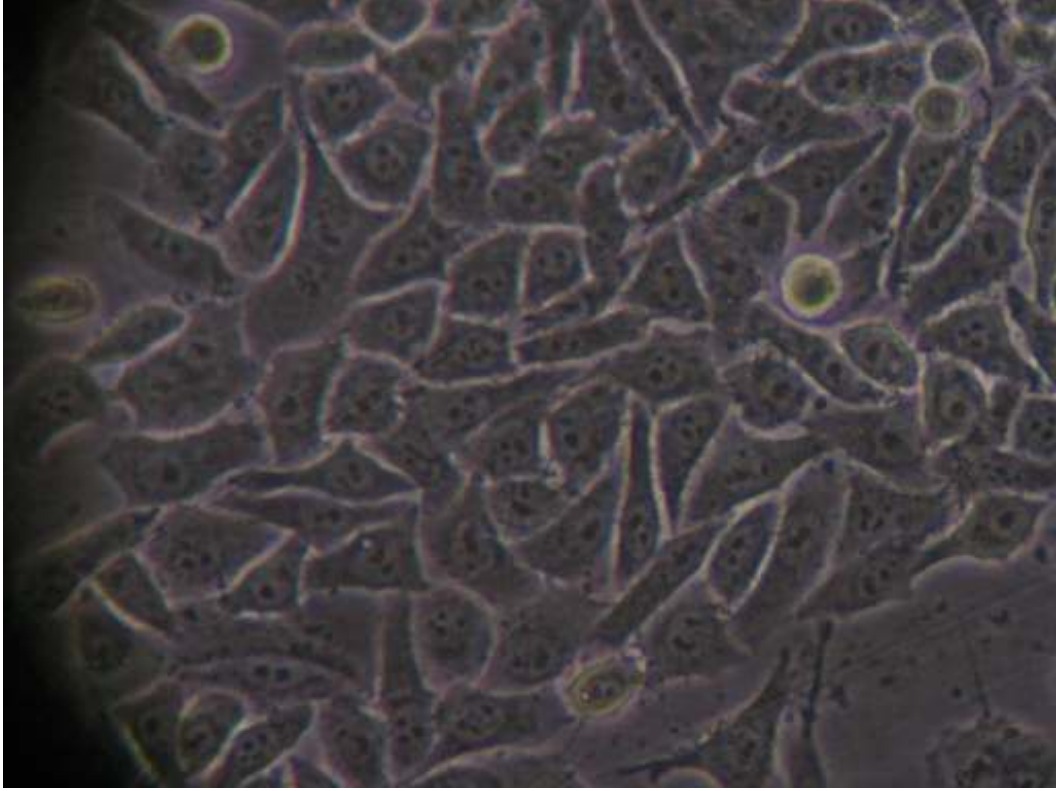
1. Doku kültürü şişelerinde (75 cm² lik) tam tabaka halinde bulunan Hep-2 hücrelerinin üzerindeki besiyeri alındı.
2. Doku kültürü şişesi üzerine 10 mL Hanks' dengeli tuz solüsyonu eklenerek hücreler yıkandı. Hanks' dengeli tuz solüsyonu döküldü.
3. 10 mL Hanks' dengeli tuz solüsyonu içerisine 1 mL tripsin eklenerek elde edilen solüsyon şişe üzerine eklendi. Birkaç dakika bekletildikten sonra karışım döküldü. Şişeler 37 °C'de 5-10 dakika bekletilerek hücrelerin şişenin yüzeyinden ayrılması sağlandı.
4. Hücreler şişe yüzeyinden ayrılıp hareket etmeye başlayınca üzerine 10 mL gelişme besiyeri konuldu. Hücrelerin kümeleşmesini önlemek için iyice pipetaj yapıldıktan sonra 2 adet boş doku kültürü şişesine eşit biçimde dağıtıldı.
5. Yeni hazırlanan doku kültürü şişeleri üzerine şişe hacminin % 10'unu tamamlayacak kadar (yaklaşık 20-25 mL) gelişme besiyeri konuldu ve pipetaj yapıldı.
6. Tripsin uygulanan doku kültürü şişesi üzerine 25-30 mL kadar gelişme besiyeri eklendi.
7. Doku kültürü şişeleri %5 CO₂'li ortamda 37 °C'de inkübe edildi.
8. Hücreler doku kültürü şişelerinin yüzeyini tek tabaka halinde tamamen kaplayana kadar besiyeri 24-48 saatte bir gelişme besiyeri ile değiştirildi.

Hücrelerin Dondurulması

1. Hücreler üzerlerindeki besiyeri alınarak yukarıda anlatılan pasaj işlemlerindeki gibi tripsin ile muamele edildi.
2. Hücreler santrifüj tüpüne alınarak 750-1000 rpm devirde 5-10 dakika santrifüj edildi.
3. Üstteki süpernatant atıldı. Gelişme besiyeri ve fetal bovine serumu bire bir oranında karıştırıldığı solüsyon hücre pelleti üzerine konuldu ve süspansiyon edilip mL'de 1×10^6 hücre olacak şekilde ticari saklama tüpüne (kriyotüp) dağıtıldı.
4. Hazırlanan hücre karışımı üzerine %10 dimetilsülfoksit konuldu ve pipetaj yapıldı.
5. Hücreler +4 °C'de 30 dakika bekletildikten sonra, -20 °C'de 1 saat ve takiben -70 °C'de bir gece tutulduktan sonra kriyotüpler alınıp sıvı azot tankına kaldırıldı.

Donmuş Hücrelerinin Çözdürülüp Doku Kültürü Şişesine Alınması

1. Kriyotüp -196 °C'de sıvı azot tankından çıkarıldı ve 37 °C'deki su banyosunda çözdürüldü.
2. Kriyotüp içerisindeki hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne alınarak 1000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi.
3. Süpernatant atıldı ve hücre pelleti üzerine 5-10 mL % 20 fetal bovine serumu içeren besiyeri konularak iyice pipetaj yapıldı. Hücre süspansiyonu steril doku kültürü şişesine transfer edildi. Üzerine doku kültürü şişesinin hacminin %10'u kadar olacak şekilde besiyeri ilave edildi ve pipetaj yapıldı.
4. Doku kültürü şişeleri %5 CO₂'li ortamda 37 °C'de inkübe edildi.
5. Bir gece bekletildikten sonra besiyeri, hücreleri dimetilsülfoksitin toksik etkisinden korumak için gelişme besiyeri ile değiştirildi.



Resim 3.1. Tek tabaka halinde üretilmiş Hep-2 hücre kültürü

Örneklerin İnokülasyonu

1. Hücreler üzerlerindeki besiyeri alınarak yukarıda anlatılan pasaj işlemlerindeki gibi tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı.
2. Süspansiyon halindeki hücreler steril tüplere 2 mL konuldu.
3. Tüpler CO₂'li etüvde 37°C'de muhafaza edildi.
4. Hücreler tek tabaka halinde tüpleri kaplayınca besiyeri devam besiyeri ile değiştirildi.
5. Oda sıcaklığına getirilen nazotrekeal aspirat örneklerinden 200 µL pastör pipeti ile tüplere ekim yapıldı. Tüpler 1 saat CO₂'li etüvde 37°C'de inkübe edildi.
6. Süre sonunda tüpler boşaltıldı ve üzerlerine 2 mL devam besiyeri konuldu.
7. Tüpler CO₂'li etüvde 37°C'de inkübe edildi.
8. Sitopatik etkiyi görebilmek için hücreler invert mikroskopla 10 gün boyunca gün aşırı incelendi.

9. Bu süre içerisinde rengi sarıya dönüşen (hücre metabolizmasından dolayı asidik ortamın meydana gelmesi) besiyerleri yenisi ile değiştirildi.
10. Sitopatik etki değerlendirilirken hücrelerde görülen değişiklikler kayıt edildi.
11. 10 gün takip edilen tüplerde RSV'ye karakteristik sitopatik etkinin (CPE) oluştuğu gözlenen ve gözlenmeyen tüm tüplerde DFA yöntemiyle RSV antijeni araştırıldı.

Hücre Kültürü Yapılmış Örneklerde Direkt RSV Antijeninin Araştırılması

1. Tüplerindeki besiyeri döküldü.
2. Tüpte yapışmış olan hücreler pastör pipeti ile kazındı.
3. Tüpün üzerine 1mL PBS (Phosphat Buffer Solution) eklendi. İyice pipetaj yapıldı. Oluşan süspansiyon teflon kaplı lam üzerine 20 µL konularak oda ısısında kuruyuncaya kadar bekletildi.
4. Kuruyan preparat petri içine yerleştirildi. Preparatın üzerini kaplayacak kadar aseton eklendi ve -20 °C 'de 10 dakika bekletildi.
5. Süre sonunda preparattaki örneğin bulunduğu alan üzerine FTC-konjuge monoklonal anti-RSV solusyonundan bir damla damlatılıp nemli ortamda 37⁰C'de 30 dakika inkübe edildi.
6. Preparat her biri 5'er dakika olmak üzere 2 defa PBS ile yıkandı.
7. Preparat birkaç dakika distile su ile yıkandı ve havada hafifçe kurutuldu.
8. Preparat üzerine mounting medium solusyonu bir damla damlatıldı ve lamelle kapatılarak x100 ve x400 büyütmede floresan mikrokobunda incelendi. Karakteristik stoplazmik granüler floresan veren hücrelerden en az bir tane görüldüğünde test pozitif kabul edildi.

3.3. NAZOTRAKEAL ASPIRAT ÖRNEKLERİNDE RSV-RNA'NIN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

RSV-RNA İzolasyonu: Klinik örneklerden nükleik asit izolasyon QIAamp DNA Mini Kiti (QIAGEN-Almanya) ile yapıldı.

Kit İçeriği

- ✓ Protease K
- ✓ Buffer AL
- ✓ Buffer AW 1
- ✓ Buffer AW 2

- ✓ Buffer AE
- ✓ QIAamp DNA Virus Kolonu (toplama tüpleri ile birlikte)
- ✓ Toplama tüpleri (2 mL'lik)

Kit İçeriği Dışında Kullanılan Malzemeler

- ✓ 1 mL'lik ve 100 µL'lik otomatik pipet ve bunlara uygun filtreli pipet uçları
- ✓ 1,5 mL'lik steril ependorf tüpleri
- ✓ Vorteks
- ✓ Santrifuj
- ✓ Etüv
- ✓ %96'lık Etil Alkol

Testte Kullanılacak Solüsyonların Hazırlanışı

- ✓ Buffer AW 1 solüsyonunun içerisine 15 mL %96'lık etil alkol eklendi.
- ✓ Buffer AW 2 solüsyonunun içerisine 25 mL %96'lık etil alkol eklendi.

Nükleik asit izolasyon prosedürü

Nazotrekeal aspirat örnekleri çalışmaya başlamadan önce oda ısısında erimeye bırakıldı.

1. Steril ependorf tüpleri ependorf standlarına dizildi. Herbir ependorf tüpüne 20 µL proteaz konuldu
2. Tüpe 200 µL nazotrekeal aspirat örnekleri eklendi.
3. Tüpe 200 µL Buffer AL ekleyip tüpün kapağını kapatılarak 15 saniye vorteksle karıştırıldı.
4. Tüpler 56 °C'de 10 dakika bekletildi.
5. Tüpe 200 µL etanol (%96-100) eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 15 saniye vorteksle karıştırıldı.
6. Tüpün içindeki sıvı 2 mL'lik temiz bir toplama tüpüne yerleştirilen QIAamp kolonuna dikkatlice aktarıldı. Kapağını kapatıp 6000 g (8000 rpm.) hızda 1 dakika santrifuj edildi. Alttaki 2 mL'lik tüpün içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı ve kolon temiz bir 2 mL'lik toplama tüpünün içine yerleştirildi.

7. Kolon dikkatlice açılıp ve tüpün çeperine değmeden 500 µL Buffer AW1 eklendi. Kapağı kapatılıp 6000 g (8000 rpm.) hızda 1 dakika santrifuj edildi. Toplama tüpü içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı ve kolon 2 mL'lik temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi.
8. Kolon dikkatlice açıldı ve tüpün çeperine değmeden 500 µL Buffer AW2 eklendi. Kapağı kapatılıp 12.000 g'de 3 dakika santrifuj edildi. Toplama tüpü içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı ve kolon 1.5 mL'lik steril bir ependorf tüpünün içine yerleştirildi.
9. Ependorf dikkatlice açıldı, içine 50 µL Buffer AE koyuldu, kapağı kapatıldı ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 6000 g, (8000 rpm) hızda 1 dakika santrifuj edildi. Kolon atıldı ve alta geçen sıvı izole edilen nükleik asitti. İzole edilen RSV-RNA'lar çalışmaya alınana kadar en fazla iki gün -20 °C 'de saklandı.

RSV RNA Amplifikasyonu

RSV RNA Amplifikasyon Karışımı

• <i>SYBR PCR miks</i>	<i>12.50µL</i>
<i>(HotStarTaq DNA polimeraz, QuantiTect SYBR Green PCR tamponu, dUTP içeren dNTP karışımı, 5mM MgCl₂)</i>	
• <i>Revers Transkriptaz miks (RT miks)</i>	<i>0.25 µL</i>
• Deteksiyon miks 1 (primerler)	5.00 µL
• dH ₂ O	2.25 µL
Toplam	
20.0 µL	

Testin Uygulanması

1. Amplifikasyon aşaması izolasyon odasından farklı bir odada yapıldı. Önceden %10'lik hipokloridli su ile silinmiş ve ultraviyole ışığı ile sterilize edilmiş laminer akım içerisinde çalışıldı. Amplifikasyon kiti -20°C'lik derin dondurucudan çıkarılarak çalışma anına kadar buz kalıbı üzerinde bekletildi.
2. Örnek sayısı, pozitif ve negatif kontrol sayısı kadar PCR amplifikasyon karışımı tek ependorf tüpüne hazırlandı ve mikroplaktaki çukurlara 20'şer µL dağıtıldı.

3. Kit içerisinden çıkan pozitif kontrol, negatif kontrol ve hasta örneklerinden elde edilmiş RNA'lardan 5'er μL mikroplaktaki çukurlara dağıtıldı.
4. Mikroplak üzeri kapatıldıktan sonra Icycler (BIO-RAD, Amerika) cihazına yerleştirildi.
5. Amplifikasyon işlemi aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleşti.

50°C'de 30.00 dakika

95°C'de 13.30 dakika

94°C'de 00.20 dakika

60°C'de 01.00 dakika

72°C'de 01.00 dakika

} 50 döngü

94°C'de 00.30 dakika

60°C'de 01.00 dakika

60°C'de 00.15 dakika

70 döngü (+ 0,5°C /döngü)

22°C'de α

Reaksiyon sona erdikten sonra cihazın verdiği "Melt Curve" analizlerine bakılarak klinik örneğe ait T_m derecesi aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrollerin T_m derecesiyle karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı.

Hücre kültürü altın standart olarak kabul edilerek DFA ve PCR testlerinin özgüllük, duyarlılık, doğruluk oranı, pozitif tahmini değerleri (PPV; positive predictive value), negatif tahmini değerleri (NPV; negative predictive value), yanlış negatif oranı ve yanlış pozitif oranı hesaplandı.

4. BULGULAR

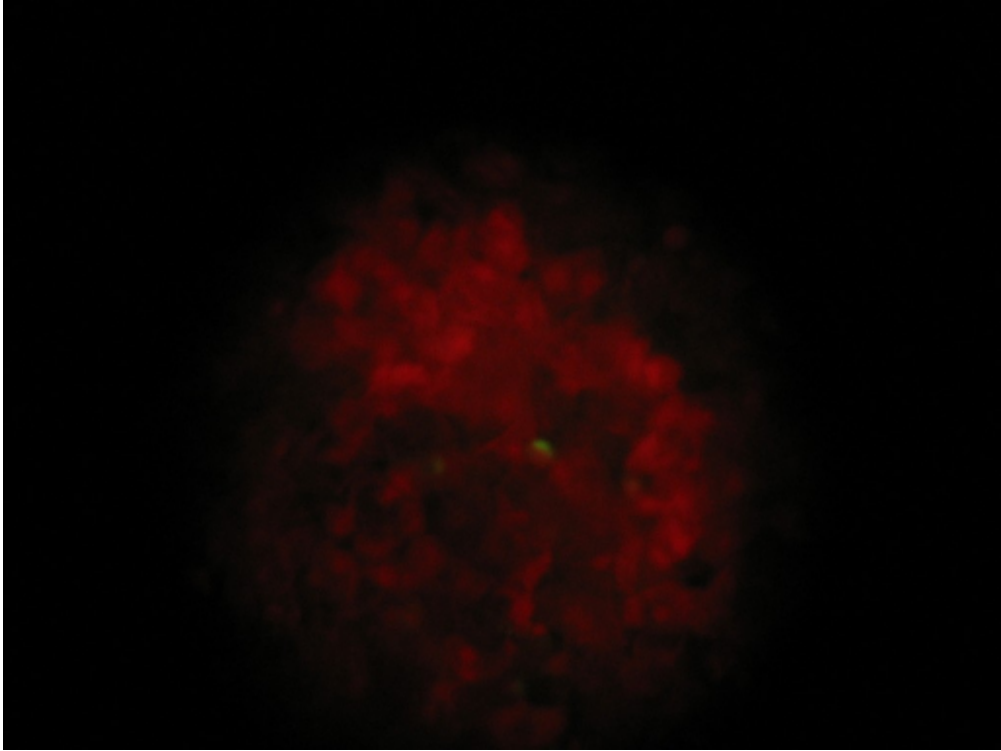
Çalışmaya dahil edilen 80 örneğin 26 (% 32.5)'sında DFA yöntemiyle, 17 (% 21.3) 'sinde hücre kültürü yöntemiyle RSV pozitifliği bulunmuştur. Ancak çalışmaya alınan örnekler arasında 6 tane örneğin miktarı yeterli olmadığı için PCR yöntemiyle çalışılamamıştır. Bu yüzden çalışılan 74 hastadan 20 (% 27)'sinde PCR yöntemiyle RSV RNA pozitif bulundu. Buna karşın RSV antijeni DFA yöntemiyle 54 hastada (% 67.5), hücre kültürü yöntemiyle 63 hastada (% 78.75) negatif bulunurken, PCR yöntemiyle çalışılan 74 hastanın 54 (% 72.9)'ünde RSV RNA negatif bulundu (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışılan örneklerde DFA, hücre kültürü, PCR yöntemleriyle elde edilen pozitif sonuçlar ve yüzdeleri

Yöntem	Örnek Sayısı	Pozitif Sonuç	%
DFA	80	26	32.5
Hücre Kültürü	80	17	21.3
PCR	74	20	27.0



Resim 4.1. RSV için tipik CPE gözlenmiş hücre kültürü



Resim 4.2. DFA ile boyanmış RSV ile infekte floresan veren hücreler

Bu çalışmada bütün testlerde 12 hastada (% 16.2) RSV pozitif bulundu. Bununla birlikte 74 hastadan 8 (% 10.8)'inde DFA ve PCR yöntemleriyle RSV pozitif bulunmasına rağmen hücre kültürü yöntemiyle RSV izole edilemedi. Ayrıca örnek yetersizliği sebebiyle PCR yöntemiyle çalışılmayan 5 hastada DFA ve hücre kültürü yöntemleriyle RSV pozitif bulundu. Yine örnek yetersizliği sebebiyle PCR yöntemiyle çalışılmayan 1 hastada DFA yöntemiyle RSV antijeni bulunduğu halde hücre kültürü yöntemiyle RSV izole edilemedi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. DFA, hücre kültürü, PCR yöntemleriyle elde edilen sonuçların kıyaslanması

Örnek Sayısı	DFA	Hücre Kültürü	PCR
54	-	-	-
12	+	+	+
8	+	-	+
5	+	+	*
1	+	-	*

* : Örnek yetersizliğinden dolayı çalışılmamıştır.

Hücre kültürü yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde DFA ve PCR yöntemleriyle elde edilen sonuçlar tablo-3'te gösterilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Hücre kültürü altın standart olarak alındığında DFA ve PCR yöntemleriyle elde edilen sonuçların karşılaştırılması

		Hücre Kültürü					
		+	-	+	-		
DFA	+	17	9	PCR	+	17	3
	-	0	54		-	0	54

Hücre kültürü yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde DFA yönteminin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 85.7, doğruluk oranı % 88.75, pozitif tahmini değer (PPV; positive predictive value) % 65.38, negatif tahmini değerler (NPV; negative predictive value) %100 olarak, PCR yönteminin ise sırasıyla %100, % 94.7, % 95.94, %85, %100 olarak bulundu (Tablo 4.4).

Çalışmamızda hücre kültürü altın standart olarak kabul edildiğinde DFA yanlış negatif oranı ve yanlış pozitif oranı sıra ile 0 ve % 14.2 bulunurken, PCR testinin ise 0 ve % 5.26 bulundu (Tablo 4.4)

Tablo 4.4. DFA ve PCR yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük, doğruluk oranı, PPV, NPV, yanlış negatif oranı ve yanlış pozitif oranları

	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Doğruluk Oranı (%)	PPV (%)	NPV (%)	Yanlış Negatif Oranı (%)	Yanlış Pozitif Oranı (%)
DFA	100.0	85.70	88.75	65.38	100.0	0.00	14.20
PCR	100.0	94.70	95.94	85.00	100.0	0.00	5.26

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bebek ve çocuklarda bronşiolit ve pnömoniye en sık neden olan etken RSV'dir (74, 75). RSV enfeksiyonuna en çok iki yaşın altındaki çocuklarda rastlanır. Özellikle altı aydan küçüklerde hastalık ağır seyretmekte olup morbitide ve mortalitesi yüksektir (74, 76). Bir yaşına kadar olan çocukların % 50'si primer enfeksiyonu geçirmiş iken iki yaşına kadar olan çocukların hemen hepsi bu virüsle enfekte olmuşlardır (7, 62). RSV enfeksiyonunun ardından gelişen immün yanıt tam olmadığından çocuk ve yetişkinlerde hayat boyu tekrarlayan enfeksiyonlar görülür (75). Bu durum toplumda virüsün yayılışını artırır, ancak nötralizan antikorların etkisi ile tekrarlayan enfeksiyonlar daha hafif seyreder (1).

RSV için yüksek risk grubunu; altı haftadan küçük olan bebekler, prematüre doğanlar, konjenital kalp hastalığı, immün yetmezliği, kronik akciğer hastalığı olanlar ile kemik iliği nakli yapılanlar oluşturur (76).

RSV enfeksiyonunun ılıman iklimlerde en sık görüldüğü mevsim sonbahar sonu, kış ve ilkbaharın başı olup, hastalık kış aylarında zirve yapar (75). RSV, hasta bireyler ile yakın temas sonucu solunum kaynaklı damlacıklarla direkt olarak veya solunum salgıları ile kontamine nesnelere veya ellerle (göz ve burun mukozaya yüzeylerine temasla) indirekt olarak bulaşır. Solunum kaynaklı damlacıklarla bulaşma minimaldir. Buna

karşılık RSV el ve çevredeki nesnelere üzerinde (steteskop, masa vb) 6 saatten uzun süre canlı kalabildiğinden indirekt bulaşma hastalığın yayılmasında çok önemlidir (28).

RSV infeksiyonlarının kontrolünde, RSV ile infekte hastaların erken tanısı ve tedavisi, korunma önlemlerinin alınması, her salgın mevsimi öncesi ve boyunca sağlık çalışanlarının RSV infeksiyonunun epidemiyolojisi konusunda eğitimi önemli rol oynar. Salgınların önlenmesinde RSV ile infekte kişilerin hızlı tanısı esastır (1). RSV yavaş üreyen bir virüstür. Hücre kültürü sistemlerinde üretilerek tanı konulması için bir veya birkaç hafta gerekir. Yatak başında alınan klinik örneğin (burun yıkama suyu, nazotrekeal aspirat) hemen hücre kültürüne inokülasyonu ile RSV 4-5 günde izole edilebilmektedir. İmmunofloresan tekniği ile birkaç saat içinde sonuç almak mümkündür (1). Son zamanlarda geliştirilen PCR yöntemi de RSV'nin tanısında uygulanmaktadır. Klinik örnekteki RSV'nin RNA'sı ters transkripsiyon-PCR (RT-PCR; revers-transcription-polimerase chain reaction) ile çoğaltılıp gösterilmektedir. PCR genelde hücre kültürü yapılan RSV'nin alt gruplarının ayırımı için uygulanmaktadır (9).

RSV infeksiyonlarının tanısında hücre kültürü yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak virüsün hücre kültürlerinde yavaş üremesi daha hızlı sonuç alınabilen yöntemlerin kullanıma girmesine yol açmıştır (77). Solunum virüslerinin hızlı tanısı uygun infeksiyon kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi ve erken antiviral tedavinin yararı nedeni ile önemlidir (78). Virüslerin hızlı tanısı; gereksiz antibiyotik kullanımını ve bu suretle antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerin gelişimini önlemekte, doğru tanı ile uygun tedaviyi yönlendirerek hastaların hastanede kalış sürelerini kısaltmaktadır (79). İmmunofloresan yöntemi testler arasında en çok tercih edilen yöntemdir. Ancak örnekte virüs miktarı az olduğunda immunofloresan testiyle virüs gösterilemezken hücre kültüründe üreyebilmektedir. Dolayısıyla, direkt antijen testi ile birlikte virüs izolasyon yöntemlerinin yapılmasına önem verilmelidir (77). Diğer yöntemlerle kıyaslandığında PCR yönteminin de yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olduğu belirlenmiştir (59). Ancak PCR yönteminin pahalı oluşu dezavantajdır (78). Serolojik yöntemler tanıda tercih edilmemektedir ve epidemiyolojik çalışmalarda uygulanmaktadır (79).

RSV hastalığı tanısı konulan yüksek risk grubundaki bebek ve çocukların tedavisinde ve hastalıktan korunmada antiviral ilaç tedavisi ve immunoproflaksi kullanılmaktadır (71). Tek antiviral ilaç olan ribavirin; pahalı, etkisi sınırlı ve uygulaması zor olması sebebiyle

kullanımı kısıtlıdır (81). Bu sebeple hastalığın tedavisinde başlıca yaklaşım destekleyici tedavi olup amaç semptomların kontrolüdür (82). Etkili tedavi olmadığından tercih edilen yaklaşım korunmadır. RSV aşısı olmadığından ağır RSV infeksiyonunun önlenmesi için pasif proflaksi geliştirilmiştir (62, 74, 80). Pasif proflaksi için RSV-intravenöz IgG (RespiGAM) ve RSV-intramüsküler monoklonal antikor (Palizivumab) uygulanmaktadır (71, 75). Her iki proflaksi yöntemi de etkili ve güvenilirdir ancak yüksek maliyetleri nedeniyle kullanımları sınırlıdır (80).

Ülkemizde, İzmir’de yapılan bir çalışmada solunum yolu hastalığı olan ve yaşları 2.5 ay-12 yaş arasında değişen 131 çocuğun 6 (% 4.6)’sında hücre kültürü yöntemiyle RSV izole edilmiştir (83). Yine İzmir’de yapılan başka bir çalışmada Dereli ve ark. (84) yaşları 2 ay ile 2 yaş arası değişen akut bronşiolitli 65 çocuğun 19 (%29.2)’unda hücre kültürü ve DFA ile RSV infeksiyonunun varlığını bildirmişlerdir.

Yılmaz ve ark. (79) İstanbul’da yaptıkları bir çalışmada iki farklı dönemde akut alt solunum yolu infeksiyonu geçiren 2 yaşından küçük çocuklarda immunofloresan yöntemi ile yaptıkları çalışmada, ilk dönemde (Nisan 1994-1995) 188 hastanın 65 (% 39.2)’inde, ikinci çalışma döneminde (Kasım 1995-Nisan 1996) 113 hastanın 39 (%34.5)’unda RSV antijeni göstermişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada akut bronşiolit tanısı almış, yaşları 4 ay ile 2 yaş arasında değişen 50 bebeğin 13’ünde indirekt immunofloresan yöntemi ile RSV antijeni pozitif bulunmuştur (78).

Aykut ve ark (77) Ankara’da yaptıkları çalışmada hücre kültürü yöntemiyle, 80 bebekten alınan nazal sürüntü örneklerinin 20 (% 25)’sinde RSV izole etmişlerdir.

Adana’da; yaşları 7 gün ile 42 ay arasında değişen 90 hastada RSV’ye bağlı infeksiyon sıklığı DFA, hücre kültürü ve ELISA yöntemleriyle araştırılmıştır. Alt solunum yolu infeksiyonu olan 90 çocuğun DFA ile 56 (% 62)’sında ve hücre kültürü yöntemiyle 36 (%40)’sında RSV infeksiyonu bulunmuştur (1).

Ahluwalia ve ark.’nın (85) Kanada ‘da yaptıkları bir çalışmada pnömoni ve bronşiolit tanısı konulan 32 bebekte nazotrakeal aspirat ve nazotrekeal sürüntü örnek çiftleri ile hücre kültürü, indirekt immunofloresan (IFA), ELISA yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Aynı çalışmada hücre kültürü yöntemi altın standart olarak alındığında IFA yönteminin duyarlılığı %61, özgüllüğü %89, PPV %96 bulunmuştur.

Halstead ve ark (86) yaptıkları çalışmada alt solunum yolu infeksiyonu olan 117 çocuktan DFA, hücre kültürü ve üç ayrı ELISA yöntemi ile burun yıkama suyu örneklerinde RSV infeksiyonu araştırmışlar ve tüm yöntemlerle çocukların 77 (%65.8) 'sinde RSV infeksiyonunun varlığını saptamışlardır. Aynı çalışmada DFA testinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla % 91.9, %96.4 pozitif tahmini değer (PPV; positive predictive value) %96.6 ve negatif tahmini değerler (NPV; negative predictive value) %91.4 olarak bulunmuştur.

X. Zheng ve ark (87) RSV'yi 89 örnekte 3 ayrı antijen hızlı tanı testi, shell vial hücre kültürü yöntemleriyle araştırmışlar ve 32 örnekte shell vial ve hızlı tanı testleriyle RSV pozitif bulmuşlardır.

Mezeire ve ark (88) 383 solunum yolu semptomlu hastanın burun yıkama suyu örneğinde RSV antijenini immunofloresan ile 143 (% 37); hücre kültüründe 72 saat inkübasyondan sonra immunofloresan ile yapılan testte 119 (% 31) hastada göstermişlerdir. Aynı çalışmada hücre kültürü ile kıyaslandığında immunofloresan testin duyarlılığı %89, özgüllüğü %85, 72 saat sonra yapılan immunofloresan testin ise duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla % 80 ve % 91 olarak bildirilmiştir.

Valdivia ve ark. (89) 20 hastada RSV'yi hücre kültürü, PCR ve immunofloresan testleriyle araştırmışlar ve hücre kültürü yöntemini altın standart olarak kabul etmişlerdir. Aynı çalışmada PCR yönteminin duyarlılık, özgüllük ve doğruluk oranları sırasıyla % 100, % 80, % 90 bulunurken; immunofloresan yönteminin oranları % 100 bulunmuştur.

Y. W. Tang ve ark. (90) yaptıkları bir çalışmada nazal aspirat örneklerinde PCR ve hücre kültürü yöntemleriyle RSV araştırmışlar ve PCR testinin duyarlılığını %94.4 ve özgüllüğünü ise %100 bulmuşlardır.

Freymuth ve ark (59) yapmış olduğu bir çalışmada RSV'yi DFA, hücre kültürü ve 2 farklı PCR yöntemiyle araştırmışlardır. Aynı çalışmada immunofloresan ve hücre kültürü yöntemleri altın standart olarak kabul edilip; PCR-1 yönteminin duyarlılık, özgüllük, doğruluk oranı, PPV ve NPV oranları sırasıyla %97.5, %63.9, %75.2, %57.8, %98 bulunmuş, PCR-2 yönteminin duyarlılık, özgüllük, doğruluk oranı, PPV ve NPV oranları sırasıyla %89.7, %71.9, %77.7, %60.9, %93.5 bulunmuştur.

Bu çalışmada 80 örneğin 26 (% 32.5)'sında DFA, 17 (% 21.3)'sinde hücre kültürü yöntemiyle RSV pozitifliği bulunmuştur. Ancak çalışmaya alınan örnekler arasında 6 tane örneğin miktarı yeterli olmadığı için PCR yöntemiyle çalışılmadı. Bu yüzden çalışılan 74 hastadan 20 (% 27)'sinde PCR yöntemiyle RSV RNA pozitif bulundu.

Bu çalışmada 3 yöntemle de 12 hastada (% 16.2) RSV pozitif bulundu. Ayrıca örnek yetersizliği sebebiyle PCR yöntemiyle çalışılmayan 5 hastada DFA ve hücre kültürü yöntemleriyle RSV pozitif bulundu. Yine örnek yetersizliği sebebiyle PCR yöntemiyle çalışılmayan bir hastada DFA yöntemiyle RSV antijeni bulunduğu halde hücre kültürü yöntemiyle negatif bulundu.

Bu çalışmada DFA yöntemiyle %32.5 oranında RSV pozitif bulundu. Bu oranın Yılmaz ve ark. (79) nın 2. çalışma döneminde bildirdiği % 34.5 oranıyla uyumlu olduğu görüldü.

Çalışmamızda 8 örnekte DFA ve PCR yöntemiyle RSV pozitif bulunduğu halde hücre kültüründe RSV izole edilemedi. Bunun nedeni örneğin hücre kültürüne inokulasyonunun hemen yapılamaması olabilir. Ayrıca örneğin infeksiyonun başlamasını takiben erken dönemlerde alınması izolasyon için gereklidir (79). Klinik örneklerin hepsi hastalığın erken döneminde alınmamış olabilir. Yapılan bir çalışmada RSV antijen IFA ile gösterilirken hücre kültüründe gösterilememiştir (85).

Aykut ve arkadaşlarının (77) yaptığı çalışmada hücre kültürüyle %25 oranında RSV izole edilirken bu çalışmada %21.3 oranında izole edildi. Bu çalışmada örneklerin çalışma gününe kadar derin dondurucuda beklemiş olmasından dolayı izolasyon oranı düşük olabilir.

Bu çalışmada hücre kültürü altın standart olarak alındığında DFA yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü %85.7, PPV %65.38, NPV %100 ve doğruluk oranı %88.75 olarak, PCR yönteminin ise sırasıyla %100, % 94.7, %85, %100, %95.94 olarak bulundu. Bu sonuçlar diğer ülkelerle bildirilen sonuçlarla karşılaştırıldığında; Valdivia ve ark. (89) nın PCR yönteminin duyarlılığını %100 ve özgüllüğünü %94.7, immunofloresan yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünü %100 olarak bildirdiği sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları Y. W. Tang ve ark (90) yaptığı çalışmada PCR yönteminin duyarlılığı %94.4 ve özgüllüğü %100 olarak buldukları sonuçlarla uyumludur. Mezeire ve ark. (88) yaptıkları çalışmada immunofloresan testin duyarlılığı %89, özgüllüğü %85 olup, bu çalışmanın

sonuçlarından düşüktür. Bu alışmada DFA testinin PPV ve NPV değerleri, Halstead ve ark (86) sırasıyla %96.6, %91.4 olarak bildirdiği sonuçlarına göre düşük olup; Freymuth ve ark. (59) nın %60.9, %93.5 olarak buldukları sonuçlardan yüksek bulundu.

Bu çalışmada hücre kültürü altın standart olarak kabul edilmiş olup, DFA ve PCR yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllük oranının yüksek olduğu bulundu. Ancak 5 örnekten hücre kültüründe RSV izole edilemeyip PCR ve DFA yöntemleriyle RSV pozitif bulundu.

Sonuç olarak; RSV infeksiyonunun tanısında DFA, PCR ve hücre kültürü yöntemleri uygulanabileceği ancak hücre kültürü yönteminin örneğin hemen inoküle edilmesi şartıyla uygulanması gerektiği kanaatine varıldı.

6. KAYNAKLAR

1. Ufuk Pekmezci D. Alt Solunum Yolu İnfeksiyonu Olan Bebek ve Çocuklarda Solunum Sinsityal Virus'una Bağlı İnfeksiyon Sıklığının Direkt Floresan Test, Hücre Kültürü ve 'ELISA' Yöntemleri ile Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana 2001
2. Belshe RB, Mufson MA. Text book of human virology (2 nd ed), St.Luis: Mosby Year Book, 1991:338-407
3. Türkoğlu S. Respiratory Syncytial Virus (RSV). Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi kitabında, Nobel Tıp Kitabevleri, cilt 2 2002:1289-1292
4. Rota S. Solunum Sinsityal Virus. Ustaçelebi Ş (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji kitabında. Güneş Kitabevi, Ankara 1999:941-943
5. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. Fields virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996: 1313-1351
6. Akan E. Genel ve Özel Viroloji, 3. Baskı, İzmir: Saray Medikal Yayıncılık San ve Tic Ltd Şti, 1994:463-471

7. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology (7 th ed), Washington, D.C.:American Society for Microbiology Pres, 1999: 942-958
8. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practise of Infectious Diseases (4 th ed) United States of America: Churchill Livingstone Inc., 1995: 1501-1519
9. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology (8 th ed), Washington, D.C.:American Society for Microbiology Pres, 1999: 1378-1388
10. Bachi T, Howe C. Morphogenesis and ultrastructure of respiratory syncytial virus. J virol 1973;12:1173-1180
11. Berthiaume L, Jonca J, Pavilans V. Comparative structure, morphogenesis and biological characteristics of the respiratory syncytial (RS) virus and the pneumonia virus of mice. Arch Ges Virusforsch 1974;45:39-51
12. Joncas J, Berthiauma L, Pavilanis V. The structure of respiratory syncytial virus. Virology 1969;38:493-496
13. Takimoto CH, Cram DL, Root RK. Respiratory syncytial virus infections on an adult medical ward. Arch Intern Med, 1991;151(4):706-708
14. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. Fields virology. Philadelphia:Lippincott-Raven Publishers, 1996: 963-1074
15. Akerling B, Norrby B. Occurrence of respiratory syncytial virus subtypes A and B strains in Sweden. J Med Virol 1986;19:241-247
16. Anderson LJ, Hendry RM, Pierik LT, Tsou C, McIntosh K. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. J Infect Dis 1991;163:687-692
17. Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies J Infect Dis 1985;151:626-633
18. Gimenez HB, Hardman N, Keir HM, Cash P. Antigenic variation between human syncytial virus isolates. J Gen Virol 1986; 863-870

19. Johnson PR, Spriggs MK, OLMsted RA, Collins PL. The g glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987;84(16):5625-5629.
20. Mufson MA, Belshe RB, Orvell C, Norrbye E. Respiratory syncytial virus epidemics: variable dominance of subgroups A and B strains among children, 1981-1986. *J Infect Dis*, 1988; 157(1): 143-148.
21. Hendry RM, Talis AL, Godfrey E, Anderson LJ, Ferne BF, McIntosh K. Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. *J Infect Dis* 1986, 153: 291-297
22. Mufson MA, Belshe RB, Orvell C, Norrbye E. Respiratory syncytial virus epidemics: variable dominance of subgroups A and B strains among children, 1981-1986. *J Infect Dis* 1988; 143-148.
23. Tsutsumi H, Onuma M, Suga K, et al. Occurrence of respiratory syncytial virus subgroup A and B strains in Japan, 1980 to 1987. *J Clin Microbiol* 1988;26 1171-1174.
24. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fundamental Virology*. (3th ed). Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996: 577-604.
25. Venkatesan S, Elango N, Satake M, Camargo E, and Chanock R. M. Organization and expression of respiratory syncytial virus genome. In R. Lerner and Chanock R. M. (ed.), *Modern approaches to Vaccines*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1984:31-44
26. Walsh, E.E, Brandriss M.W, and Schlesinger. Purification and characterization of the respiratory syncytial virus fusion protein. *J.Gen. Virol.* 1985;66: 409-415
27. Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levine S, Ball LA. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82(12):4075-4079

28. Brief Eports. Recovery of respiratory syncytial virus from stethoscopes by conventional viral culture and polymerase chain reaction. *Ped Inf Dis J*, 1999; 18: 164-165
29. Hall CB, Douglas RG. Nosocomial respiratory syncytial viral infections. Should gowns and masks be used *Am J Dis Child* 1981; 135 (6): 512-515.
30. Johnson KM, Chanock RM, Rifkind D, Kravetz HM, Knight V. Respiratory syncytial virus. IV. Correlation on virus shedding, serologic response, and illness in adult volunteers. *JAMA* 1961; 176: 663-667.
31. Anderson K, King AMQ, Lerch RA, Wertz GW. Polylactosaminoglycan modification of the respiratory virus small hydrophobic (SH) protein: a conserved feature among human and bovine respiratory syncytial viruses. *Virology* 1992; 191: 417-430.
32. Hall CB, Douglas RG. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr*, 1981;99(1):100-103
33. Hall CB, Douglas RG, Geiman JM. Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*,1980;141(1):98-102
34. Bangham CRM, Cannon MJ, Karzon DT, Askonas BA. Cytotoxic T cell response to respiratory syncytial virus in mice. *J Virol* 1985; 56: 55-59.
35. Chanok RM, Kim HW, Vargosko AJ, et al. Respiratory syncytial virus. I. Virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia, and minor respiratory diseases in children. *JAMA* 1961; 176: 647-653.
36. McIntosh K, Masters HB, Orr I, Chao RK, Barkin RM. The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. *J Infect Dis* 1978; 138: 24
37. Fishaot M, Tubergen D, McIntosh K. Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity. *J Pediatr* 1980; 96: 179-186.
38. Taylor CE, Craft AW, Kernahan J, et al. Local antibody production and respiratory syncytial virus infection in children with leukaemia. *J Med Virol* 1990;30:277-281

39. Graham BS, Bunton LA, Wight PF, Karzon DT. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J Clin Invest* 1991; 88: 1026-1033.
40. Poyraz Ö. Paramyxoviridae Ailesi. Genel ve Özel Tıbbi Viroloji 1990:166-168
41. Doymaz MZ. Solunum Sinsityal Virus. Medikal Viroloji Kitabı, Nobel Kitabevleri, İstanbul 1994:469-474
42. Chanock RM, Parrott RH, Connors m Collins PL, Murpy BR. Serious respiratory tract disease caused by respiratory syncytial virus: prospects for improved therapy and effective immunization. *Pediatrics*,1992;90:137-143
43. Glezen WP, Paredes A, Allison JE, Taber LH, Frank AL. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from lowincome families in relationship to age, sex, ehnic group, and maternal antibody level. *J Pediatr*, 1981;98(5):708-715
44. McIntosh K. Respiratory syncytial virus infection in infants and children: diagnosis and treatment. *Pediatr Rev*, 1987;9(6):191-196
45. Ferris JAJ, Aherne WA, Locke WS, et al. Sudden and unexpected deaths i infants: histology and virology. *Br Med J* 1973;2:439-442
46. Hall CB, Geiman JM, Biggar R, Kotok D, Hogan PM, el al. Respiratory syncytial virus infections within families. *N Engl J Med* 1976;29:414-419
47. Hall WJ, Hall CB, Speers DM. Respiratory syncytial virus infections in adults: clinical, virologic and serial pulmonary funtion studies. *Ann Intern Med* 1978;88:203-205
48. Falsey AR, Walsh EE, Betts RF. Serologic evidence of respiratory syncytial virus infection in nursing home patients. *J Infect Dis* 1990;162:548-549
49. Garvie DG, Gray J. Outbreak of respiratory syncytial virus infection in the elderly. *Br Med J* 1980;281:1253-1254
50. Osterwell D, Norman D. An outbreak of an influenza-like illness in a nursing home. *J Am Geriatr Soc* 1990;38:659-662
51. Takimoto CH, Cram DL, Root RK. Respiratory syncytial virus infections on an adult medical ward. *Arch Intern Med* 1991;151:706-708

52. Wright AL, Taussig LM, Ray CG, Harrison HR, Holberg CJ. The Tucson Children's Respiratory Study. II. Lower respiratory tract illness in the first year of life. *Am J Epidemiol*, 1989;129(6):123-1246
53. Bromberg K, Tannis G, Daidone B. Early use of indirect immunofluorescence for the detection of respiratory syncytial virus in Hep-2 cell culture. *Am J Clin Pathol*, 1991;96(1):127-129
54. Kim HW, Wyatt RG, Fernie BF, Brandt CD, Arrobio JO et al. Respiratory syncytial virus detection by immunofluorescence in nasal secretions with monoclonal antibodies against selected surface and internal proteins. *J Clin Microbiol*, 1983;18(6):1399-1404
55. Duran N. Viruslarda Teşhis Yöntemleri. Burgu İ, Akça Y. Genel Viroloji Ankara 1994:81-84
56. Kellogg JA. Culture vs direct antigen assays for detection of microbial pathogens from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial virus. *Arch Pathol Lab Med*, 1991;115(5):451-458
57. Smith MC, Creutz C, Huang YT. Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by shell vial technique. *J Clin Microbiol*, 1991;29(3):463-465
58. İnci M. Böbrek ve Kemik İliği Yapılan Hastalarda Cytomegalovirus Antijeni ve CMV-DNA'nın Araştırılması uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri 2003
59. Freymunt F, Eugene G, Vabret A, Petitjean J, Gennetay E, et al. Detection of respiratory syncytial virus by reverse transcription-PCR and hybridization with a DNA enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*, 1995;33(12):3352-3355
60. Abacıoğlu H. Moleküler yöntemlerde yeni gelişmeler ve yeni teknolojiler. KLİMİK Adana 2001 Kitabında, s. 191-2.
61. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, İnönü Üniversitesi tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya 2001:39
62. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child*, 1986;140(6):543-546

63. Lennette EH, Schmidt NJ. Diagnostic Procedures for: Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 5th ed., Washington: American Public Health Association Inc., 1979:695-709
64. Collins PL, Huang YT, Wertz GW. Identification of a tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides to the 10 viral genes. *J Virol*, 1984;49(29):572-578
65. IMPact-RSV Study Group: Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduced hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics*, 1998;102:531-537
66. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. *Asya Mikrobiyoloji, Asya Tıp Kitabevi, İzmir* 2005:294
67. Karon RA, Wright PF, Crowe JE, Clemets-Mann ML, Thompson J, et al. Evaluation of two live, cold-passaged, temperature-sensitive respiratory syncytial virus vaccines in chimpanzees and in human adults, infants and children. *J Infect Dis*, 1997;7(6):1428-1436
68. Olmsted RA, Elango N, Prince GA, et al. Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:7462-7466
69. Crowe JE. Immune responses of infants to infection with respiratory viruses and live attenuated respiratory virus candidate vaccines. *Vaccine*, 1998;16:1423-1432
70. Prober CG, Sullender WM. Advances in prevention of respiratory syncytial virus infections. *J Pediatr*, 1999;135(5):546-558
71. Groothuis JR, Simoes EA, Levin MJ, Hall CB, Long CE, et al. Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Study Group. *N Engl J Med*, 1993;29(21):1524-1530
72. Sandritter TL, Kraus DM. Respiratory syncytial virus-immunoglobulin intravenous (RSV-IGIV) for respiratory syncytial viral infections: part I. *J Pediatr Health Care*, 1997;11(6):284-291

73. Johnson S, Oliver C, Prince GA, Hemming VG, Pfarr DS, et al. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*, 1997;176(5):1215-1224
74. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout LW, et al, Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA*, 1999;282(15):1440-1446
75. Ottolini MG, Hemming VG. Respiratory syncytial virus infection: An old problem presents New Challenges. *Infect Med*, 1996;11(3):22-31
76. Weber MW, Milligan P, Hilton S, Lahai G, Whittle H, et al. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection leading to hospital admission in children in the western Region of the Gambia. *Int J Epidemiol*, 1999;28(1):157-162
77. Aykut E, Özsan M. Alt solunum yolu infeksiyonu olan 0-1 yaş grubu bebeklerde etken olarak solunum sinsityal virusun hücre kültürü ve direk immunoperoksidaz yöntemleriyle araştırılması. *Mikrobiol Bült* 1999;33:203-213
78. Altuğlu İ, Özacar T, Özyurt S, Bilgiç A, Çetin N, ve ark. Akut bronşiolitli bebeklerde solunum viruslerinin araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 2002;16(1):87-90
79. Yılmaz G, Aslan S, Uzel N, Badur S, Işık N. ve ark. Akut alt solunum yolu infeksiyonu olan çocuklarda viral etkenler ve respiratory syncytial virus alt grupları. *İnfeksiyon Dergisi* 2000;14(2):157-164
80. Simoes EA, Sondheimer HM, Top FH, Meisser HC, Welliver RC, et al. Respiratory syncytial virus immuno globulin for prophylaxis against respiratory syncytial virus disease in infants and children with congenital heart disease. The Cardiac Study Group. *J Pediatr*, 1998;133(4):492-499
81. Jairat S, Vargas PB, Hamlin HA, Field AK, Kilkuskie RE. Inhibition of respiratory syncytial virus replication by antisense oligodeoxyribonucleotides. *Antiviral Res*, 1997;33(3):201-23
82. Schuh S, Canny G, Reisman JJ, Kerem E, Bentur L, et al. Nebulized albuterol in acute bronchiolitis. *J Pediatr*, 1990;117(4):633-637

83. Yamazhan T, Dereli DG, Ertem E, Serter D. 1995-1996 Kış mevsiminde, hücre kültürü yöntemi ile bölgemizde saptanan Adenovirus, solunum sinsityal irusu ve paraimfluenza infeksiyonları. *Flora*,1999;4(2):135-138
84. Dereli D, Ertem E, Serter D, Şadimen M, Çoker M, Tanaç R. Detection of respiratory syncytial virus in children in the 1993-1994 winter season in İzmir, Turkey, by two diagnostic methods. *APMIS*, 1994;102:877-880
85. Ahluwalia G, Embree J, McNicol P, Law B, Hammond GW. Comparison of nasopharyngeal aspirate and nasopharyngeal swab specimens for respiratory syncytial virus diagnosis by cell culture, indirect immunofluorescence assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J of Clin Microbiol* 1987;25(5):763-767
86. Halstead DC, Todd S, Fritch G. Evaluation of five methods for respiratory syncytial virus Detection. *J Clin microbiol*, 1990;28(5):1021-1025
87. Zheng X, Quianzon S, Mu Y, Katz BZ. Comparison of two new rapid antigen detection assay for respiratory syncytial virus with another assay and shell vial culture. *J Clin Virology* 2004
88. Mezeire A, mollat C, Lapied R, Billaudel S, Courtie AL. Detection of respiratory syncytial virus antigen after seventy-two hours of culture. *J Med Virol*, 1990;31(3):241-244
89. Valdivia A, Sarmiento L, Morier L, Otero A, Soton Y, et al. Analysis of respiratory syncytial virus in clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction restriction mapping. 1997;92(3):389-393
90. Tang YW, Heimgartner PJ, Tollefson SJ, Berg TJ, Rys PN, et al. A colorimetric microtiter plate PCR system detects respiratory syncytial virus in nasal aspirates and discriminates subtypes A and B. *Diagn Microbiol Infec Dis* 1999;34:333-337

ÖZGEÇMİŞ

Canan GÖKALP. 1978 yılında Bornova’da doğdu. 1990 yılında Servet Akaydın İlkokulu’ndan, 1993 yılında Sabahat Hıfzı Gözübüyük Ortaokulu’ndan, 1997 yılında Melikgazi Süper Lisesi’nden mezun oldu. 4 yıllık lisans öğrenimini Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde yaptı (1997-2002). 2002 yılında Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalının açmış olduğu yüksek lisans sınavını kazanarak yüksek lisans eğitimine başladı. 2004 yılında Kamu Personeli Seçme Sınavında başarı göstererek öğretmen olmaya hak kazandı. Şuan Erciyes Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında tez dönemi yüksek lisans öğrencisi olup aynı zamanda Kayseri, Sarıoğlan, Gaziler İlköğretim Okulu’nda Sınıf Öğretmeni olarak görev yapmaktadır.