

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**ASTIM VE KOAH' LI HASTALARIN AKUT ATAKLARINDA
VİRAL SOLUNUM YOLU İNFEKSİYON ETKENLERİNİN
CHIP TEKNİĞİYLE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Aslı TEKER

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Sinem AKÇALI

MANİSA, 2006

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimde deneyim ve bilgilerinden yararlandığım çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Beril ÖZBAKKALOĞLU'na, tez çalışmalarımıdaki yardım ve katkılarından dolayı tez danışmanım hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Sinem AKÇALI' ya, ayrıca yetişmemde emeği geçen Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Prof. Dr. Tamer ŞANLIDAĞ, Doç. Dr. Kenan DEĞERLİ, Doç. Dr. Semra KURUTEPE, Yrd. Doç. Dr. Nuri ÖZKÜTÜK, Yrd. Doç. Dr. Talat ECEMİŞ ve Yrd. Doç. Dr. Hörü GAZİ' ye teşekkür ederim.

Ayrıca bakteriyoloji, seroloji, mikoloji ve tüberküloz laboratuvarında çalışan teknisyen arkadaşlarıma, Göğüs Hastalıkları kliniğindeki asistan arkadaşım Nesrin Yaman' a, bugünlere gelmemde emekleri olan aileme ve her zaman yanımda olan ablam Dr. Arzu Bayram' a teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Dr.Aslı TEKER

İÇİNDEKİLER

ÖZET

İNGİLİZCE ÖZET

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KOAH	2
2.1.a Evreleme	2
2.1.b KOAH atağı	3
2.2. Astım	4
2.3. Atak oluşturan viral etkenler	5
2.3.a İnfluenza virüsleri	5
2.3.b Parainfluenza virüsleri	7
2.3.c Respiratuvar Sinsityal Virüs (RSV)	9
2.3.d Adenovirüsler	10
2.3.e Rinovirüsler	12
2.3.f Koronavirüsler	13
2.4. Virüslerin laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler	14
2.4.a Virüs izolasyonu	14
2.4.b Serolojik tanı	15
2.4.c Moleküler yöntemler	15
2.4.d Solunum virüsleri tanısında ProDect BCS RV chip yöntemi	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Örnekler	19
3.1.a Örneklerin hazırlanması	20
3.2. ProDect BCS RV chip yöntemi ile çalışma	21
3.2.a Ekstraksiyon	21
3.2.b Amplifikasyon	21
3.2.c Hibridizasyon	22
3.2.d Deteksiyon	22
4. BULGULAR	23
5. TARTIŞMA	25
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	29
7. EKLER	30
8. KAYNAKLAR	31

ÖZET

Astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH)' nda akut atak bu hastalıklarda yaşam kalitesini azaltması ve mortalite-morbiditeye olan etkisinden dolayı önemlidir. Akut atakların %90' ından infeksiyonlar sorumlu tutulmaktadır. Bunların da yaklaşık %50' sinde bakteriler, %30' unda virüsler, %10-20' sinde de atipik etkenler saptanmaktadır.

Bu solunum yolu patojenlerini saptamaya yönelik en sık kullanılan konvansiyonel testler, virüsün hücre kültüründe izolasyonu (viral kültür) ve/veya immunfloresan (IF) yöntemiyle viral antijen saptanmasını içermektedir. Son yıllarda daha hızlı tanı amacıyla DNA "chip"lerinden yararlanılan yeni teknikler geliştirilmiştir. "Chip"teki küçük bir yüzeye DNA fragmanları uygulanarak, bir mikroorganizmaya ait genlerin PCR ürünleri veya baz dizisi bilinmeyen mikroorganizmanın tüm genom fragmanı, taşıyıcı bir yüzeye bağlanarak transkripsiyon analizinde veya genom karşılaştırmalarında kullanılmaktadır.

Bu araştırmada DNA chip teknolojisi kullanılarak astım ve KOAH' ı bulunan ve akut atakla hastaneye başvuran hastalarda akut atak etyolojisini saptamaya yönelik solunum yolu viral etkenleri araştırılmıştır.

Bu amaçla 2005-2006 yılları arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Servis ve Göğüs Hastalıkları Kliniği' ne akut solunum sıkıntısı ile başvuran, KOAH ve astım tanısı almış ya da geldiği sırada bu tanıyı alan, 86 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalardan alınan nazofaringeal sürüntü örneklerinde DNA "chip" yöntemi ile (bcs Biotect S.p.A., Italy) SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome), influenza virüs A, B, parainfluenza virüs tip 1, 2, 3, adenovirus ve respiratuvar sinsityal virüs varlığı araştırılmıştır.

86 akut ataklı hastanın ikisinde parainfluenza virüs tip 1, birinde de influenza virüs B olmak üzere %3.5' unda viral etken tespit edilmiştir.

Henüz çok yeni geliştirilmiş bir yöntem olması nedeniyle, literatürde aynı hasta grubunda bu yöntemle yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından, saptanan pozitiflik oranının gerçek pozitiflik oranını yansıtmadığı konusu tartışmalıdır. Ayrıca yöntemin duyarlılığını ve özgüllüğünü belirleyebilmek amacıyla, viral solunum yolu etkenlerini saptamada "gold standart" yöntem olarak kabul edilen viral kültür ile örneklerin çalışılmamış olması, çalışmamızı kısıtlayan bir diğer önemli unsurdur. Bu nedenle DNA "chip" yöntemini solunum yolu virüslerinin rutin tanısında kullanmaya başlamadan önce özgüllük, spesifiklik ve tekrarlanabilirlik gibi değerlendirmelerin dikkatlice yapılması gerektiği ve rutin uygulamalarda mutlaka başka bir yöntemle eşzamanlı kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Astım, KOAH, chip, solunum virüsleri

IDENTIFYING THE VIRAL RESPIRATORY TRACT PATHOGENS IN AN ACUTE ATTACKS OF THE PATIENTS WITH ASTHMA AND COPD BY CHIP TECHNOLOGY

Acute attacks in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are important because of their effects on mortality, morbidity and reducing patient's life quality. Infections are responsible for 90 % of acute attacks. In these infections, about 50 % there are bacteria, 30% viruses and 10-20 % atypical factors are found.

Most common conventional tests to find these respiratory tract pathogens includes, isolation of the virus in cell culture (viral culture) and viral antigen determining by immunofluorescence (IF) methods. To diagnose in shorter time, in recent years new methods using DNA "Chips" are developed. By applying DNA fragments to a small surface on the "Chip", PCR products of a microorganism's genome or all genome fragment of a microorganism with unknown genome sequence are used in transcription analysis or in genome comparing, by binding to a carrying surface.

In current study, respiratory tract viral pathogens are investigated to determine using DNA Chip technology acute attack aetiology in the patients who has asthma or COPD and admitted to the hospital because of acute attacks.

Sixty-eight patients were enrolled in the study, consisting of people consulted Emergency Service and Thorax Diseases Department of Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Manisa, in 2005-2006 for having respiratory distress; diagnosed earlier with asthma / COPD, or newly diagnosed with one of these diseases. Using the DNA "Chip" method (bcs Biotect S.p.A., Italy); SARS (severe acute respiratory syndrome), influenza virus A and B, parainfluenza virus type 1, type 2, type 3, adenovirus and respiratory syncytial virus are investigated in the nasopharyngeal swabs of patients.

Parainfluenza virus type 1 is found in two, and influenza virus B is found in one of the 86 patients with acute attacks; totally viral aetiology is found in 3.5% of the patients.

Since it's a recently developed method and there isn't any study with the same patient group and method such our study, it's controversial whether our positive ratio is reflecting the real ratio. Also to determine sensitivity and specificity of the method, the lack of viral culture which is accepted as "gold standard" method for identifying viral respiratory tract pathogens, is another restricting and important factor for our study. Therefore, before using DNA "Chip" method to diagnose respiratory tract viruses as a routine, the valuations such as sensitivity, specificity must be carefully done, and in routine practice another method must be used simultaneously.

Key words: Asthma, COPD, chip, respiratory viruses

1.GİRİŞ

Astım ve kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH)' nda akut atak öksürük, pürülan balgam ve nefes darlığı gibi belirtilerde kötüleşme olarak tanımlanmaktadır. Akut atak bu hastalıklarda yaşam kalitesini azaltması ve mortalite-morbiditeye olan etkisinden dolayı önemlidir. Astım ve KOAH' ta akut atağın %90' ından infeksiyonlar sorumlu tutulmaktadır. Bunların da yaklaşık %50' sinde bakteriler, %30' unda virüsler, %10-20' sinde atipik etkenler saptanmaktadır. İnfluenza virüs A, B, C, parainfluenza virüs tip 1-4, respiratuvar sinsityal virüs, metapnömovirüs, koronavirüs OC43 ve 229E (HCoV), rinovirüs ve bazı enterovirüsler astım ve KOAH akut atakları da dahil olmak üzere insanlarda en sık solunum yolu infeksiyonlarına neden olan viral etkenlerdir.

Bu solunum yolu patojenlerini saptamaya yönelik en sık kullanılan konvansiyonel testler, virüsün hücre kültüründe izolasyonu (viral kültür) ve/veya immunfloresan (IF) yöntemiyle viral antijen saptanmasını içermektedir. Ancak konvansiyonel yöntemlerdeki bazı kısıtlılıklar, ilgiyi yeni nükleik asit temelli yöntemlerin geliştirilmesi üzerine yoğunlaştırmıştır. Reverse transcriptase-PCR solunum yolu virüslerini saptamada hızlı, duyarlı ve özgül bir yöntem olarak moleküler yöntemler arasında ilk sırayı almıştır. Son yıllarda daha hızlı tanı amacıyla DNA "chip"leri geliştirilmiştir. "Chip"teki küçük bir yüzeye DNA fragmanları uygulanarak, bir mikroorganizmaya ait genlerin PCR ürünleri veya baz dizisi bilinmeyen mikroorganizmanın tüm genom fragmanı, taşıyıcı bir yüzeye bağlanarak transkripsiyon analizinde veya genom karşılaştırmalarında kullanılmaktadır.

Bu araştırmada DNA chip teknolojisi kullanılarak astım ve KOAH' ı bulunan ve akut atakla hastaneye başvuran hastalarda akut atak etyolojisini saptamaya yönelik solunum yolu viral etkenleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

KOAH ve astım hava yollarında kronik ve ilerleyici daralmayla seyreden hastalıklardır.

2.1. KOAH

Amerikan Toraks Derneği (ATS)'nin tanımlamasına göre KOAH “Kronik bronşit veya amfizeme bağlı hava akımı kısıtlanmasıyla karakterli bir hastalıktır; hava akımı obstrüksiyonu genellikle progresif olup, hava yolu hiperreaktivitesi ile birlikte olabilir ve kısmen reverzibl olabilir” (1). Avrupa Solunum Derneği (ERS) KOAH'ı “Maksimum ekspiratuvar akımın azalması ve akciğerlerin zorlu boşalmasının yavaşlamasıdır; yavaş şekilde ilerler ve mevcut tıbbi tedavilere karşı çoğunlukla irreversibldir.” (2) şeklinde tanımlarken, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) ise; “Tam reversibl olmayan hava akımı kısıtlanmasıyla karakterli bir hastalıktır. Hava akımı kısıtlanması genellikle progresif olup, zararlı gaz ve partiküllere akciğerlerin anormal inflamatuvar cevabı ile birlikte” olarak tanımlanmaktadır .

Pek çok KOAH tanımında kronik bronşit ve amfizem terimi vurgulandığı halde, GOLD raporundaki KOAH tanımına bu terimler dahil edilmemiştir. Bazı ülkelerde bunların dışında tanımlamalar da yapılmaktadır. Burada belirtilen üç farklı kuruluşun, KOAH tanımında kullandıkları hava akımı kısıtlanmasının, reverzibilite ve hastalığın ağırlık dereceleri ile ilgili değerleri birbirinden farklıdır. Ayrıca kronik bronşit, amfizem ve astım tanımları da farklılıklar göstermektedir .

Dünya sağlık örgütü 1998 verilerine göre tüm dünya ülkelerinde 600 milyon KOAH hastası bulunmakta ve her yıl 2.3 milyon insan bu hastalıktan ölmektedir (3).

Ülkemizdeki KOAH' lı hasta sayısı mevcut verilere göre 2.5 -3 milyon olduğu tahmin edilmektedir (4).

KOAH' lı bir hastanın bir yıllık takibini kapsayan longitudinal çalışmada yıllık atak sayısındaki artışın hayat kalitesini önemli ölçüde bozduğu gösterilmiştir (5).

2.1.a Evreleme

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalarda, sağlık harcamalarının planlanmasında, prognoz ve maliyetin belirlenmesinde evreleme yararlıdır. Bu hastalarda morbidite ve mortalite ile en iyi korelasyonu gösteren parametre, birinci saniyedeki zorlu ekspiratuvar volümdür (FEV1)

ATS ve ERS, KOAH evrelemesini FEV1' e göre yapmıştır, ancak kriterler arasında farklılıklar bulunmaktadır (Tablo 1) (6).

Tablo 1. ATS ve ERS' e göre KOAH evreleri.

	EVRE	FEV1(%)
ATS	1	≥50
	2	35-49
	3	<35
ERS	HAFİF	≥70
	ORTA	50-69
	İLERİ	<50

2.1.b KOAH Atağı

KOAH atağı stabil seyreden bir olguda artan nefes darlığının varlığı ile birlikte, -vücut ısısında, öksürükte, balgam miktarı ve rengine değişiklik olsun ya da olmasın- günlük performansın azalması ve/veya mental durum bozukluğu olarak tanımlanmaktadır

KOAH hastalarında yılda yaklaşık 1-4 kez atak gözlenir. Atakların büyük kısmı hafif dereceli olup evde tedavi edilebilirlerse de, ağır atakların tedavilerinin hastaneye yatırılarak yapılması daha uygundur. Atak tedavisi nedenlerinin bilinmesini gerektirir.

Bununla birlikte KOAH hastasının hangi koşullarda tedavi edileceğine karar verirken atak şiddetinin de bilinmesi gerekir. Atak şiddeti hafif, orta, ağır dereceli olarak tanımlanmaktadır.

En sık KOAH atak nedenleri arasında trakeobronşial ağacın infeksiyonları (sıklıkla viral), pnömoni, sağ ve sol kalp yetmezliği, pulmoner emboli, pnömotoraks, yetersiz oksijen kullanımı, ilaçlar, reflü, metabolik hastalıklar (diabet), kötü beslenme ve miyopati yer almaktadır (7). KOAH' ta akut atağın %90' ından infeksiyonlar sorumlu tutulmaktadır. İnfeksiyonların da yaklaşık %40-60' dan bakteriler sorumludur (8). Viral infeksiyonlardan özellikle influenza virüsünün, akut atakların yaklaşık olarak %30' undan sorumlu olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (9).

2.2. ASTİM

Hava yollarının kronik inflamatuvar bir hastalığı olan astımın, genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile oluşan T-lenfosit farklılaşması sonucu başladığı kabul edilmektedir. Kronik inflamasyon ve buna bağlı değişiklikler hava yolu aşırı duyarlılığın artmasına neden olmaktadır. Duyarlı hale gelen hava yolu bir takım spesifik ve nonspesifik uyarılara kolayca yanıt verir. Mukozada akut inflamatuvar değişiklikler ve hava yolu daralması şeklinde gerçekleşen yanıtta özellikle mast hücresi kaynaklı mediatörler sorumlu tutulmaktadır. Astımda akut ataklara neden olan bu uyarılar tetiği çeken faktörler olarak adlandırılırlar. Bunlar allerjenler, solunum yolu infeksiyonları, ilaçlar, gastro-ösofajial reflü, hava kirliliği, sigara, egzersiz, hormonal ve emosyonel faktörlerdir (10).

Üst hava yolu infeksiyonları astımı tetikleyici etkenler arasında en sık rastlanılanıdır. İki yaşın altındaki çocuklarda respiratuvar sinsityal virüs (RSV) infeksiyonları önemli etyolojik faktör olarak rol oynamaktadır. Yaşın ilerlemesi ile rinovirüs, influenza virüs, parainfluenza virüs ve mikoplazma infeksiyonları ön plana çıkmaktadır (11).

İnfeksiyonların astımı tetikleyen mekanizmaları tam olarak anlayamamış olmakla birlikte, infeksiyondan sonra 2-8 hafta kadar süren ve epitel hasarının başlattığı hava yolu aşırı yanıtı olaydan sorumlu tutulmaktadır. Astım atak şiddetinin evrelemesi de KOAH' ta olduğu gibi hafif, orta, ağır olarak değerlendirilmekteyken, hastalık şiddeti hafif intermittan, hafif persistan, orta persistan ve ağır persistan olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 2) (12).

İnfeksiyonların astım ve KOAH ataklarının gelişmesine neden olduğu artık bilinmektedir.

Tablo 2. Astımın hastalık şiddetinin sınıflandırılması.

	FEV1(Beklenen)	PEF Değişkenliği
Hafif İntermittan	>%80	<%20
Hafif Persistan	>%80	%20-30
Orta Persistan	%60-80	>%30
Ağır Persistan	<%60	>%30

2.3. ATAK OLUŞTURAN VİRAL ETKENLER

2.3.a İnfluenza Virüsleri

İnfluenza virüsleri “grip” olarak isimlendirilen ateş, öksürük, baş ağrısı, halsizlik, kas ağrıları gibi bulgular veren solunum yolu hastalığının viral etkenidir. Tüm yaş gruplarında geniş yayılım gösterir. Epidemik ve pandemiler oluşturması, pulmoner komplikasyonlar sonucu ölüme neden olabilmesi diğer solunum sistemi viral infeksiyonlarından ayırıcı özellikleridir.

İnfluenza çok eski yıllardan beri bilinmektedir. Bilinen ilk pandemi 1510 yılına aittir. Bilinen en büyük pandemi ise 1918-1919 yıllarında görülen, yaklaşık 20 milyon insanın ölümüne yol açan İspanyol gribi (İnfluenza A/H1N1) olarak adlandırılan salgındır. Bu pandeminin dışında 20. yüzyılda 1957-1958 yıllarında Asya gribi (İnfluenza A/H2N2), 1968-1970' de Hong Kong gribi (İnfluenza A/H3N2) ve 1977-1978 yıllarında Rus gribi (İnfluenza A/H1N1) olarak adlandırılan pandemiler yaşanmıştır. Bu pandemilerin dördü de Çin' den başlayıp tüm dünyaya yayılmıştır. İnfluenza salgınlarında hayvanların önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Örneğin 18. ve 19. yüzyıllarda atlarda görülen solunum yolu infeksiyonlarının insanlarla bağlantılı olduğu saptanmıştır. Günümüzdeki influenza salgınlarında ise domuzların etkin rol oynadığı düşünülmektedir. 1997 yılında Hong Kong' da 6 kişinin ölümü ile sonuçlanan, önceden insanlarda patojen olarak rastlanmamış, kuşlarda hastalık etkeni olarak görülen H5N1 subtipi ile infeksiyon saptanmıştır.

Yapısal özellikleri : İnfluenza virüsleri *Orthomyxoviridae* ailesinde yer almaktadırlar. 80-120 nm çapında pleomorfik yapı gösteren, negatif polariteli, tek zincirli RNA virüsleridir. Genetik madde segmentli yapı göstermektedir. İnfluenza A ve B sekiz, influenza C yedi segmentlidir. Sekiz segment 10 viral protein kodlamaktadır. Üç büyük RNA segmentinden biri PB1, PB2 ve PA ile ifade edilen polimeraz proteinlerini kodlamakta olup, RNA' nın replikasyonu ve transkripsiyonundan sorumludur. Diğer segmentlerden biri nükleoprotein (NP), diğeri hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) glikoproteinlerini kodlamaktadır. HA ve NA virus zarfında yer almaktadırlar. İnfluenza C virüsünde NA yoktur; onun yerine hemaglutinin esteraz füzyon proteini (HEF) olarak ifade edilen yapı yer alır. Virüs zarfının iç kısmında matriks proteinleri M1 ve M2 yer alır. M1 proteini virüse şeklini verir. M2 proteini ise virüsün zarfından soyulmasına yardımcı olarak viryon içine hidrojen iyonlarının girişini sağlayan bir iyon kanalı oluşturmada rol oynamaktadır. İnfluenza virüslerinde ayrıca NB olarak adlandırılan ikinci bir matriks proteini ile iki adet yapısal olmayan protein NS1 ve

NS2 de bulunmaktadır. İnfluenza B, BM2 olarak adlandırılan yapısal olmayan bir proteine de sahiptir.

İnfluenza virüsleri nükleoprotein ve matriks antiijenlerindeki farklılıklara göre A, B ve C olarak isimlendirilen üç tipe ayrılmaktadırlar. İnfluenza A virüslerinde genetik madde 8 segmentlidir. İnsan, domuz, at, deniz memelileri ve kuşlarda infeksiyon oluştururlar. İnfluenza B virüslerinde de genetik madde 8 segmentlidir, sadece insanda hastalık oluştururlar. İnfluenza C virüslerinde ise genetik madde 7 segmentli olup, insanlarda ve domuzlarda hastalık yapmaktadırlar.

İnfluenza A virüsleri HA ve NA yüzey glikoproteinlerine göre alt tiplere ayrılmaktadırlar. İnfluenza A virüslerinde 15 HA ve 9 NA tipi belirlenmiştir. İnsanlardan izole edilenlerde ise 3 HA ve 2 NA saptanmıştır.

İnfluenza virüslerinin adlandırılmasında izole edilen virüsün tipi, izole edildiği canlı türü (insan belirtilmez), izole edildiği yer, yıl, HA ve NA alt tipleri parantez içinde belirtilir. Örnek: A/Johannesburg/33/94 (H3N2),B/Harbin/07/94.

İnfluenza virüsleri konak hücrenin sialooligosakkarit reseptörlerine hemaglutinin yapıları ile bağlanırlar. Endositoz ve füzyonu takiben virüs konak hücrenin sitoplazmasına geçer. Virüsün replikasyonu konak hücre nükleusunda, viral proteinlerin sentezi sitoplazmada gerçekleşir. Yeni oluşan virüs partikülleri viral zarflarını konak hücre sitoplazma membranından alırlar.

Epidemiyoloji: İnfluenza virüsü ile oluşan salgınlar her yıl kış aylarında görülür. Hastalığın hızlı yayılması ve sık antijenik değişikliğe uğraması nedeni ile Dünya Sağlık Örgütü bir iletişim ağı kurmuştur. Dünyadaki influenza virüs sirkülasyonunda, hangi tip ve antijenik yapıdaki virüsün etken olduğunun bilinmesi, izolasyonları saptayıp ilgili laboratuvarlara bilgi vererek önlem almada ve sonraki yıl için üretilecek aşı ile ilgili bilgi birikimini sağlamada önem taşır. Avrupa' da 1997' den bu yana WHO Flunet sistemi klinik ve epidemiyolojik verileri toplayarak değerlendirmektedir. Toplumun bağışıklığında rol oynayan en önemli etken virüsün antijenik yapısındaki değişikliklerdir (13).

Antijenik değişim esas olarak virüsün iki dış glikoproteini olan HA ve NA' da görülür. Ayrıca viryonun yapısal olan veya olmayan proteinlerinde de değişiklikler olabilmektedir. Bunlar arasında HA değişiklikleri en önemli olanıdır. Çünkü bu antijende hem daha çok değişim saptanmaktadır ve hem de HA' ya karşı oluşan antikolar infeksiyondan iyileşmede önemli bir role sahiptirler. Antijenik değişim başlıca iki şekilde ortaya çıkmaktadır:

a) Antijenik drift (kayma): İnfluenza alttiplerinde her yıl veya birkaç yılda bir görülen küçük antijenik değişimlerdir. Antijenik kayma, bir gendeki noktasal mutasyonların birikmesi

sonucu, bu bölgenin kodladığı aminoasitlerde ortaya çıkan antijenik bir değişimdir. Böylelikle viryonun antijenik bölgelerindeki dizinlerin değişmesi, virüsün konağın bağışık sisteminden kaçabilmesine olanak sağlar. Bu durumda yeni suş immunolojik seleksiyon ile, özellikle kendisine karşı az miktarda antikor taşıyan yaşlı kişiler arasında gerçekleşen bulaşlar ile yayılım gösterir. Aynı fenomen hücre kültürlerinde de görülebilmekte, düşük titrede antikor içeren hücre kültürlerinde pasajları yapılan suşlarda ufak antijenik kaymalar ortaya çıkmaktadır.

b) Antijenik shift (sapma): Bu deyim virüsün yüzey proteinlerinde görülen büyük antijenik değişiklikler için kullanılır. Burada saptanan değişiklik basit bir mutasyon ile açıklanmayacak kadar önemlidir. Genetik değişim, daha önce 8 segmentli olduğuna değindiğimiz nükleik asitin, bir segmentinin tamamen değişmesi sonucu ortaya çıkar. Bu olay daha çok aynı hücrenin iki farklı influenza virüsü tarafından infekte olduğu durumlarda, bu virüsler arasındaki genetik alışverişe bağlı olarak görülür, yeni suş diğer ilk iki virüse benzemeyen bir rekombinandır. Antijenik sapma A tipi influenza virüslerinde saptanan, B ve C tiplerinde görülmeyen bir genetik değişimdir (14).

2.3.b Parainfluenza Virüsleri

İlk olarak 1955 yılında kruplu (laringotrakeobronşit) yenidoğanlardan izole edilmiştir.

Yapısal özellikleri: Parainfluenza virüsleri *Paramyxoviridae* ailesi içinde yer alan, lineer, tek zincirli RNA içeren, negatif polariteli, pleomorfik bazen filamantöz yapıda, 150-300 nm büyüklüğünde, zarflı virüslerdir. *Orthomyxoviruslar'* a benzerlerse de daha büyük olmaları ve genetik maddenin segmentsiz olması ile ortamiksovirüslerden farklılık gösterirler. Parainfluenza genomu sekiz veya dokuz protein kodlar. Bu proteinlerin altı tanesi yapısaldır. Yapısal olmayan proteinler sadece enfekte hücrelerde bulunur. Viral RNA'nın kodladığı yapısal proteinler NP, polimeraz fosfoprotein, M, füzyon (F), hemaglutinin-nöraminidaz (HN) ve büyük protein CO' dur. NP nükleokapsitte görev alır ve RNA'ya sıkıca bağlanmış olarak bulunur. M proteini viral zarfın hemen alt kısmında yer alır ve viral zarftaki glikoprotein yapılar ile nükleokapsit arasındaki bağlantıda rol oynar. M proteini ayrıca HN ve F proteinlerinin konak hücre sitoplazma membranında oluşması ve virusun tomurcuklanarak konak hücreden ayrılma aşamalarının başlamasını sağlar. Virüs konak hücreye HN glikoproteinleri ile bağlanır. Konak hücre ile füzyon olabilmesi için HN glikoproteinleri gereklidir. Viral zarfta yer alan F glikoproteini virusun hücre içine

penetrasyonunda, konak hücreler arası hücre füzyonunda (sinsityum oluşumu), hemoliz ve nötralizan antikor oluşumunda rol oynar.

Parainfluenza virüslerinin tip 1, tip 2, tip 3 ve tip 4 olmak üzere dört antijenik serotipi vardır. Parainfluenza virüs tip 4' ün ayrıca iki alt tipi (4A ve 4B) bulunmaktadır.

Parainfluenza virüsleri direkt temas veya infekte damlacıkların solunum yolu ile alınması sonucu bulaşır. Solunum yolu silli epiteline tutunan virüs, burada çoğalarak infeksiyon oluşturur. İlk özgül korunma mekanizması lokal antikorlardır. Doğal sekresyonlarda bulunan antikorların, serum antikorlarına oranla direnç mekanizmasında daha etkili oldukları bilinmektedir.

Virüs konak hücre yüzeyindeki sialik asit içeren reseptörlere HN glikoproteinleri ile bağlanır. F glikoproteinleri yardımı ile penetre olur ve hücre füzyonu gerçekleşir. Viral zarf konak hücrenin dışında kalır, nükleokapsit hücre sitoplazması içine geçer. Nükleokapsitin açılmasıyla serbest kalan viral RNA sitoplazmada replike olmaya başlar. Genetik maddenin replikasyonu iki aşamada gerçekleşir. Önce (-) RNA' dan komplementer (+) RNA kopyalanır. Komplementer RNA genomik RNA sentezinde kalıp görevi görür ve bundan yeni virüs RNA' ları sentezlenir.

Virüsün sentezlenmesinde ilk aşama olan virüsün konak hücreye bağlanıp girmesinde HN ve F glikoproteinleri rol oynar. (-) viral RNA'nın mRNA' ya transkripsiyonunda görevli RNA'ya bağımlı RNA polimerazın aktivitesinde P proteini, L proteini ve NP proteininin de rolü vardır, mRNA' lar konak hücre ribozomlarına (poliribozom) giderek viral proteinlerin sentezlenmesini sağlarlar. Konak hücrenin sitoplazmasında da virüs nükleik asitleri (RNA) replike olarak (+) RNA' dan (-) RNA' ları oluştururlar. Bu işlemler olurken virüs zarfında yer alan glikoprotein yapılar da konak hücrenin sitoplazma membranında yerlerini alırlar. Yeni oluşan (-) RNA dizileri ribozomlarda sentezlenen proteinler ile çevrilir; konak hücrenin sitoplazma membranından zarfını alıp tomurcuklanarak konak hücreden ayrılırlar.

Epidemiyoloji: Parainfluenza virüsleri tüm dünyada yaygındır; tip 1 ve tip 2' nin sonbahar-kış aylarında, tip 3' ün ise ilkbahar aylarında salgınlara neden olduğu bilinmektedir. RSV' den sonra çocuklarda en sık alt solunum yolu infeksiyonuna neden olan virüstdür. Tip 3 prevalandır ve tüm çocukların hemen hemen yarısı yaşamlarının ilk yılında infeksiyonu geçirmektedirler. Parainfluenza virüsleri ile reinfeksiyon sık görülür (13).

2.3.c Respiratuvar Sinsityal Virüs (RSV)

Yenidoğan ve küçük çocuklarda alt solunum yollarında infeksiyon etkeni olan önemli bir patojendir.

Yapısal özellikleri: RSV, *paramyxoviridae* ailesi *paramyxovirinae* alt ailesinin *pneumovirus* cinsinde yer almaktadır. Diğer paramiksovirusler ile aynı yapısal özellikleri taşımasına rağmen, farklı olarak HA ve NA içermez. Hemolizin ve hemadsorpsiyon yapma özellikleri de yoktur, sadece F ve G proteini taşır. Yapısal proteinler nükleokapsitte yer alan N, P ve L proteinleri, viral zarfın yüzeyinde yer alan F ve G proteinleri ile zarfta yer alan M1 ve M2 proteinleridir. Önceleri 1B ve 1C olarak isimlendirilen iki yapısal olmayan protein de artık NS1 ve NS2 olarak isimlendirilmektedir.

N proteini orta büyüklüktedir ve nükleokapsitin major yapısal proteindir. P ve L proteinleri transkripsiyon ve replikasyonda yer alırlar. N proteinine karşı geliştirilen monoklonal antikorlar immunfloresan yönteminde intrasitoplazmik inklüzyon cisimlerini boyar. Diğer RSV proteinlerinin tersine P proteini ileri derecede fosforiledir ve nispeten asidiktir. P' ye karşı monoklonal antikorlar da intrasitoplazmik inklüzyon cisimlerini boyar. L proteini çok büyüktür ve nispeten hidrofobiktir; büyüklüğü ve nükleokapsitteki lokalizasyonu nedeni ile L proteininin viral RNA-bağımlı RNA polimeraz olduğu düşünülmektedir (13).

Yüzeyel V antijenlerindeki minör farklılıklar nedeniyle 4 tipe ayrılmaktadır. RSV izolatları monoklonal antikorlar aracılığıyla veya genetik analizler ile A ve B olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Bunlar nükleotid sekans seviyesinde ve virüsün konak hücreye bağlanmasını sağlayan G proteinlerinin aminoasit sekanslarındaki farklılıklarla birbirlerinden ayrılırlar. Her bir grup da kendi içinde subtiplere ayrılır, ancak detaylı bir sınıflandırma henüz tam olarak yapılamamıştır (15).

Epidemiyoloji: RSV tüm dünyada yaygındır. Her yıl kış aylarında epidemiler yapar; bebeklerde ve küçük çocuklarda en sık alt solunum yolu infeksiyonuna yol açan viral etkindir. Tüm yaş grupları RSV ile infeksiyona duyarlıdır. Salgın döneminde olguların çoğu 1-2 ay arasındadır. RSV ile infeksiyon sonucu oluşan hastalığa bağlı hastaneye yatış genellikle 2-6 aylık bebeklerde görülür. Bronşiolit ve pnömoniye bağlı hastaneye yatış oranı, primer RSV infeksiyonu geçiren bebeklerde 24/1000 kadar yüksek olabilmektedir. Endüstrileşmiş bölgelerde bebeklerde ve sigara dumanına maruz kalanlarda da RSV ile infeksiyon daha ağır seyretmektedir. Hayatın ilk yılında bebeklerin %50' si, ikinci yılın sonunda da hepsi RSV infeksiyonuna yakalanmış olur. Özgül lokal ve sistemik antikorlar ile

nötralize edici antikorlar RSV ile infeksiyonu takiben olduğu halde, reinfeksiyonlar sık görülmektedir (13).

2.3.d Adenovirüsler

Yapısal özellikleri: İnsan adenovirüsleri, *Adenoviridae* ailesinde Mastadenovirus cinsinde yer alan zarfsız, çift iplikli DNA virüsleridir. 70-90 nm çapında, ikosahedral simetrik olup, moleküler ağırlıkları 5.000-120.000 arasında değişen 10 yapısal protein içerirler.

Adenovirüsler konak hücrenin nükleusunda çoğalırlar ve konak türüne özgüdürler. Virüs tipik sitopatik etki oluşturur. Hekzon kapsomerleri üzerinde cinse özgü antijenik determinantlar içerirler. Her bir viryon 240 hekzon ve 12 pentondan oluşur. Çıplak virüslerdir; kübik yapının her bir köşesinde bir fiber yer alır. Fiberin uzunluğu her bir altcins üyesi için karakteristiktir. Kapsit içinde tek molekül halinde lineer, çift iplikli DNA bulunur. Çoğu adenovirüs süspansiyonları pH 6-9 arasında -20 ile +100 °C de uzun süre stabil kalır. Virüs 56°C' de, %0.25 sodyum dodesil sulfat, 0.5 pg/ml serbest klor, UV ışınlanması ve 1:400-1:4000 sulandırımındaki formalinle inaktive olur; etken eter ve kloroform ile muameleden etkilenmez. Özel önlemlere gereksinim kalmadan liyofilize edilebilir ve infektivitelerini 4 -10 °C' de korurlar.

İnsan adenovirüsleri nükleotid dizi analizine göre A' dan F' ye kadar 6 alt cinse ayrılmışlardır. Adenovirüsler önce Rosen tarafından hemaglutinasyon özelliklerine göre sınıflandırılmışlardır. Bu sınıflandırma 1973 yılında Hierholzer tarafından genişletilmiştir. 1967 yılında Hueber adenovirüsleri onkojenik özelliklerine göre sınıflandırmıştır. En son olarak da viryonda yer alan yapısal proteinlerin büyüklüklerine ve viral genomun DNA homolojisine göre bilinen tüm insan adenovirüsleri 6 alt cinse ayrılmıştır. İnsan adenovirüsleri yenidoğmuş hamsterlarda onkojenite açısından model olarak da kullanılmıştır. A alt cinsindeki adenovirüslerin çoğu yenidoğan hamsterlarda inokülasyonu takiben 2 ay içinde tümör oluşturur. B ve E adenovirüsler az sayıda hayvanda 4-18 ayda tümör oluşturur. C, D ve F alt cinslerindeki adenovirüsler in vitro sıçan hücrelerini transforme ederler. Sodyum dodesil sulfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile viryon polipeptidlerinin moleküler ağırlıklarının analizi, insan adenovirüsleri arasındaki ilişki ile ilgili daha detaylı bilgi verir.

Altcins A' da tip 12, 18 ve 31 yer alır. Tümü sağlıklı kişilerin dışkılarında izole edilebilir. Tip 31 bağışıklık yetersizliği olan kişilerden ve diyareli çocuklardan izole edilebilir. Alt cins B' de iki farklı grup bulunur. 3, 7, 16, 21 ve 51 tiplerinden oluşan gruptakiler özellikle solunum yolu infeksiyonu salgınlarından sorumludur. Bu tipler diyare

de dahil sistemik infeksiyona yol açabilirler. Dünya Sağlık Örgütü' ne bildirilen tüm izolatların 1/3' ü bu tiptendir. İkinci grup 11, 14, 34 ve 35' den oluşur. Üriner sistemde persistan infeksiyonlara yol açarlar. Tip 11 ve 14 solunum yolu infeksiyonu salgınlarına yol açabilir. Altıncı C' de tip 5 ve 6 yer alır. Lenfoid dokuda yıllarca kalıp, intermitan olarak dışkıyla atılırlar. Altıncı D göze tropizmi ile karakterize olan tip olup, bu alttıpte 30 serotip yer alır; serotip 8, 19a ve 37 epidemik keratokonjunktivit ve sporadik keratokonjunktivit etkenidir. Tip 40 ve 41 bilinen epitelyal hücre dizilerinde üremezler. Bu enterik adenovirüsler uzun süren infantil diyareden sorumludurlar.

Epidemiyoloji: Adenovirüsler insanların hemen hemen tüm organ sistemlerinden izole edilmiştir. Bir çok klinik sendrom ile ilişki kurulmuştur. Adenovirüs infeksiyonları tüm yıl boyunca endemik olup her yaşta görülür. En sık okul çağı çocuklarında infeksiyona yol açar, bu infeksiyonların %50' si asemptomatiktir. Adenovirüsler kış ve bahar aylarında lokalize solunum yolu infeksiyonu salgınlarına, yazın yüzme havuzlarından kaynaklanan faringokonjunktival ateş, yılın herhangi bir ayında oftalmolojik işlemler ya da endüstriyel göz travmaları ile ilişkili epidemik keratokonjunktivite yol açarlar. Adenovirüsler bebeklerde ve okul öncesi çocuklarda gastroenterit olgularının %5-15' inden sorumludurlar. Askeri birliklerde sık olarak görülen akut solunum yolu infeksiyonu epidemileri, günümüzde uygun serotipleri içeren aşılarda önlenmektedir. En sık infeksiyona yol açanları 1, 8, 11, 12, 21, 31, 35, 37, 40 ve 41 olup, 51 serotipi tanımlanmıştır.

Adenovirüslerin yol açtığı üst solunum yolu infeksiyonları farenjit veya tonsillit şeklinde olup genellikle bebek ve ufak çocuklarda görülmektedir. Klinik tablodan genellikle tip 1' den 7' ye kadar sayılan adenovirüsler sorumludur. Tip 1, 2, 5 ve 6' ya ait önemli bir özellik, virüsün yaklaşık %50 çocukta adenoid ve tonsil dokusunda latent halde persistans göstermesidir. Bir diğer epidemiyolojik özellik ise virüsün dışkıda semptomların tekrarı olmadan aylarca atılmasıdır.

Bronşit, bronşiolit ve pnömoni gibi alt solunum yolu infeksiyonları, sıklıkla adenovirüs infeksiyonlarında komplikasyon olarak görülür. Ölümcül olabilen ağır pnömoni, bebek ve çocuklarda -nadiren erişkinlerde- tip 3, 4, 7 ve 21 tarafından meydana gelir. Böbrek ve karaciğer tutulumu gibi ekstrapulmoner tutulum, özellikle bebeklerde ve bağışıklık yetersizliği olanlarda görülür ve bu tür hastalarda yaygın hastalık genellikle fatal seyirlidir. Tip 3, 7 ya da 21' den iyileşen bazı çocuklarda kalıcı akciğer hastalığı gelişir. Adenovirüs tip 1-3, nadiren tip 5 ile boğmacaya benzer öksürük tablosu bildirilmiştir. Adenovirüsler önemli hastane infeksiyonu etkenleridir. Hastanede yatan çocuklardaki pnömonilerin %10' undan

adenovirüsler sorumludur. Dışkıyla uzun süre atılırlar, damlacıklar ya da eşyalarla bulaşabilirler (13).

2.3.e Rinovirüsler

Soğuk algınlığı ve üst solunum yolu infeksiyonlarının önemli etkenlerinden biridir. Rinovirüs adı virüsün replikasyon yeri olan burun kelimesinden kaynaklanmaktadır. Nezle etkenidirler.

Yapısal özellikleri: Rinovirüsler *Picornoviridae* ailesinde yer alırlar. 20-27 nm büyüklükte, ikosahedral simetrik, zarfsız virüslerdir. Nükleokapsitte VP1, VP2, VP3, VP4 olarak gösterilen dört protein içerirler. VP1, VP2, VP3 genetik maddeyi örten protein tabakada, VP4 ise içte yer alır. Nükleik asit tek zincirli, pozitif polariteli, 7200 nükleotid uzunluğunda RNA'dır. Yapılan dizi analizi sonucunda rinovirüs genomunun poliovirus genomu ile %45-62 homoloji gösterdiği saptanmıştır. Bugün bilinen 113 serotipi bulunmaktadır. Rinovirüslerin %80-90' ı ortak reseptör kullanmaktadır (13).

Epidemiyoloji: Rinovirüs infeksiyonları, insandan insana, virüsle kontamine solunum sekresyonları ile bulaşır. Asemptomatik kişiler de virüsü bulaştırabilirler. Virüsün %40-90 oranında elde, %6-15 oranında kapı kolu, bardak, oyuncak gibi ev eşyalarında bulunduğu gösterilmiştir. Genellikle Eylül-Mayıs aylarındaki soğuk mevsim olarak kabul edilen aylar boyunca, sonbahar başında ve bahar aylarının sonunda rinovirüs infeksiyonları sık olarak görülmektedir. Rinovirüsler yaz aylarında da görülen soğuk algınlıklarından sorumlu tutulurlar. Rinovirüslerin bahar-yaz-sonbahar mevsimlerindeki hakimiyeti, bu virüslerin kış aylarında infeksiyon yapmadıkları anlamına gelmemekte, yıl boyunca değişen oranlarda infeksiyona neden olmaktadır. Parainfluenza virüs tip 1, tip 3 ve RSV gibi solunum yolu virüslerinden farklı olarak, bireysel rinovirüs tipleri popülasyon içinde yıldan yıla nadiren tekrarlar. Rinovirüs infeksiyonları akut solunum yolu infeksiyonları içinde en sık en yaygın olanıdır. Çocukluk çağından başlayarak yaşam süresinin her bölümünde görülür (16).

2.3.f Koronavirüsler

Yapısal özellikleri: Koronavirüsler *Coronaviridae* ailesinin üyesi pozitif sarmallı, zarflı en büyük RNA virüsüdür. Ailenin diğer üyesi torovirüslerdir. Koronavirüslerin konak hücrenin intrasellüler zarlarından köken alan zarfında büyük glikoprotein yapısında çıkıntılar bulunur. Virüs ismini elektron mikroskopundaki görünümü tacı andıran çıkıntılarında

almıştır. Koronavirüsler insanlarda solunum yolu ve enterik infeksiyonlara neden olurlar. Nezle ya da soğuk algınlığı olarak adlandırılan klinik tablonun rinovirüslerden sonra ikinci en sık etkenidir. Soğuk algınlığının yaklaşık 1/3' den koronavirüsler sorumludur. Koronavirüsler ayrıca SARS' ın da etkenidir.

Virüsün yüzey glikoproteinlerinden biri olan S proteinin dış bölümü globüler yapıdadır ve hücre yüzeyindeki siyalik asit reseptörleri için bağlanma bölgesi içerir. S proteinin iç bölümü ise konak hücre membranıyla füzyon oluşumundan sorumludur. S proteininde immunglobulinlerin tutunduğu Fc gama reseptörlerine benzer bölgelerde bulunur. Bu proteinler virüsü kaplayarak immun saldırıdan korur. Ayrıca S proteini virüsün hemaglutinasyonundan da sorumludur. S proteinine karşı nötralizan antikorlar oluşur. HE bazı koronavirüslerde bulunan bir hemaglutinineraz proteinidir. Virüsün yüzeyinde S proteininden daha küçük çıkıntılar oluşturan HE proteini hücre yüzeyindeki siyalik reseptörlerine bağlanır. HE' nin esteraz aktivitesi siyalik asiti parçalayarak replike olmuş virüsün hücreden uzaklaşmasını sağlar. HE proteinine karşı oluşan antikorlarda nötralizan özelliğindedir. Koronavirüslerde ayrıca virüsün nükleokapsitinin golgi cisimciği gibi hücre içi yapılara tutunmasına yardım eden M (membran) proteini ile E (zarf) proteini ve N (nükleokapsit) proteini de bulunur. Koronavirüsler infeksiyondan sonra kendi genomlarını mRNA olarak kullanarak önce RNA polimerazı ardından yukarıda sözü edilen yapısal proteinleri sentezlerler. Koronavirüslerin RNA polimerazının hatalı sentezini düzeltecek mekanizmaları olmadığı için bu virüslerde çok sık mutasyon olur.

Epidemiyoloji: Koronavirüsler çevre koşullarından çok fazla etkilenirler. Virüs hapşırık gibi nazal sekresyonların aerosolizasyonu ile bulaşır. Diğer solunum yolu virüslerinde olduğu gibi yakın temasın artmasına bağlı olarak infeksiyon kış aylarında daha sık görülür. Koronavirüslerin insanda en önemli replikasyon bölgesi solunum yolu epitel hücreleridir. İnkübasyon süresi yaklaşık 3 gündür. Klinik bulgular soğuk algınlığı şeklindedir. Hastaların çoğunda viral yayılım bağışık yanıtla sınırlandırılır. Buna karşın bağışıklık kısa sürelidir. Birçok koronavirüs infeksiyonunda tanı klinik olarak konur. Mikrobiyolojik tanıdan da yararlanır.

Severe acute respiratory syndrome (SARS): SARS' ın etkeni yeni bir koronavirüs olan SARS-coV'dır. Yapısı diğer koronavirüslere benzer. S, E, M ve N proteinleri bulunur. İlk SARS olguları 2002 yılının sonlarında Çin' den bildirildi. Bunu çeşitli Asya, kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinden yapılan bildirimler izledi. Salgın 2003 Nisan ayında en yüksek düzeyine ulaştı ve aynı yılın haziran ayından itibaren azalmaya başladı. Salgın sırasında yaklaşık 8000 SARS olgusu ve 775 ölüm bildirildi. SARS kuşkusu olan hastalar karantinaya

alınmalıdır. SARS-coV solunum yolu ile bulaşır. Hastalık %3-30 oranında ölüme yol açabilmektedir. Virüs maymun vero E6 hücre kültüründe üretilebilir. Buna karşın tanıda serum antikorlarının saptandığı ELISA ile serum, dışkı, solunum yolu örnekleri, çeşitli dokular ve idrar gibi klinik örneklerden virüs RNA'sının saptandığı RT-PZR yaygın olarak kullanılır. Ayrıca serolojik tanıda immunfloresan yöntemler de kullanılır. Center for Disease Control SARS-coV antikorlarının saptanmasının enfeksiyonun en güvenilir göstergesi olduğunu kabul etmektedir (17).

2.4. VİRÜSLERİN LABORATUVAR TANISINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

2.4.a Virüs İzolasyonu

Ağız çalkantı sıvısı, boğaz veya burun sürüntüsünün hücre kültürlerine ekilmesiyle etken virüsün üretilmesi esasına dayanan tekniktir. Virüsün üremesi sitopatik etkinin varlığı gözlemlenerek ve immünfloresan antikor yöntemi uygulanarak belirlenir. Hücre kültüründe influenza A ve B virüsleri primer rhesus maymun böbrek (PRMK) hücreleri veya Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücrelerinde üretilir. İnfluenza virüsleri hücre kültürlerinde ürer, ancak sitopatik etki yapmazlar. Virüsün üremesi Enzyme Immuno Assay (EIA), Floresan Antikor (FA), hemadsorbsiyon gibi yöntemlerle saptanır. Kültürler -70°C' de dondurularak saklanır. RSV Hep-2 hücre kültüründe çok nükleuslu dev hücreler oluşturur. Bu sitopatik etki RSV için karakteristiktir. Çeşitli primer maymun böbrek ve insan fibroblast hücreleri de RSV izolasyonunda kullanılabilir. Adenovirüsler Hela, KB, A549 ya da Hep-2 gibi devamlı insan hücre dizilerinde, insan embriyonik akciğer fibroblastlarında (HELFI, W138, MRC-5) ve diğer embriyonik fibroblast hücrelerinde ürerler ve sitopatik etki oluştururlar (18).

2.4.b Serolojik Tanı

Akut ve konvelasan dönem serumları kullanılarak yapılır. Antikor yanıtı nötralizasyon, hemagglütinasyon inhibisyon ve EIA yöntemleri ile saptanır. Dört kat antikor artışının gösterilmesi anlamlıdır. Hastalığın ilk üç gününde nazofarinksten alınan aspirasyon sıvısında

antijen tayini rutin tanıda duyarlı bir yöntemdir. Antijen immünfloresan ya da EIA yöntemleri ile gösterilir (13).

2.4.c Moleküler yöntemler

Solunum virüslerinin tanısında nükleik asit temelli testlerin geliştirilmesi maliyet ve hız yönünden olumlu bir gelişme olmuştur. Reverz transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) solunum yolu virüslerini saptamada hızlı, duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Ancak mono-spesifik RT-PZR yöntemleri ilgili her bir virüs için ayrı amplifikasyonu gerektirmektedir; solunumsal patojenler benzer klinik semptomlara yol açtıklarından etyolojinin belirlenmesinde her bir virüsün ayrı ayrı araştırılması gerektiğinden potansiyel olarak pahalı yöntemlerdir. Multipleks PZR tek bir reaksiyon süresinde çeşitli virüslerin aynı anda amplifikasyonuna olanak sağlaması, maliyet-etkin tanıyı kolaylaştırması ve klinik tedaviyi yönlendirmesi (örneğin influenza A ve B virüs infeksiyonlarında antiviral tedavi) gibi belirgin avantajlara sahiptir.

Son yıllarda daha hızlı tanı amacıyla DNA “chip”lerinden yararlanılan yeni teknikler geliştirilmiştir. Klasik katı faz hibridizasyona göre daha iyi düzenlenen ve kompleks olan bu yaklaşım, bir tür semikondüktör endüstri teknolojisidir. Sensör olarak silikon çipler üstüne baz dizisi bilinen oligonükleotitler belirli bir düzende yerleştirilerek, kompleks yapılar oluşturulur.

Silika zemin üzerinde bir köşeden diğerine, yüzlerce veya binlerce yerleşim yeri hazırlanabilir. Her bir yere her defada bir nükleotid olmak üzere spesifik oligonükleotid prob lar yerleştirilir ve ışıkla aktive edilir. Araştırılacak nükleik asitler floresan bir boya ile etiketlenerek oluşturulan matrikse eklenir. Hibridizasyondan sonra tarayıcı lazer konfokal floresan mikroskopu ile chip üzerindeki floresans şiddeti değerlendirilir. Mikroskopun konfokal özelliği sadece chipin üzerindeki floresansı tespit ettiği için zemindeki floresans problem olmaz. Mikroskop tarafından otomatik taranarak birkaç dakika içinde chipin yüzeyinin imajı alınır. Floresans imajın veri analizi bir bilgisayar programı ile incelenir. Sinyal yoğunluğu ile bağlanan prob moleküllerinin sayısı hakkında bilgi edilebilmektedir.

DNA çipleri çok farklı yollarla üretilebilir. En sık kullanılan yöntem, oligonükleotitlerin direkt olarak fotolitografik yolla chip yüzeyine bağlanması ve sentezlenmesidir. Bu teknik, peptit sentezindeki çalışmalardan elde edilen başaşağı senaryosundan geliştirilmiştir (19, 20).

Chipteki küçük bir yüzeye kısa oligomerler yerine DNA fragmanları da uygulanabilir. Bu yöntem bir mikroorganizmaya ait genlerin PZR ürünlerini saptayabildiği gibi, baz dizisi

bilinmeyen mikroorganizmanın tüm genom fragmanı taşıyıcı bir yüzeye bağlanarak transkripsiyon analizinde veya genom karşılaştırmalarında da kullanılmaktadır.

Matriks hibridizasyonun avantajı, amplifiye edilen baz dizilerinin kompleks yapılarını çözebilmesidir. Yüzlerce yüzeye, binlerce mikrobiyal hedef için DNA problu chipler hazırlandığında infeksiyon hastalıklarının tanısı kolaylaşacaktır. Bu tür chipler bilinen tüm bakteriyel ilaç direnç genlerini içerecek şekilde hazırlanabilir. Koloniden elde edilen bakteri RNA' sı chip ile inkübe edilirse baz dizisi tespit edilebilir ve gen ekspresyon farklılıkları açıklanabilir.

DNA chip teknolojisi günlük yaşantımızda tüm alanlarda uygulanabilir. Tanı koyma ile sınırlı kalmayıp tedavinin düzenlenmesinde de katkıda bulunabilir (21).

Chip tipleri farklı olsa da özetle uygulamada altı basamak esastır:

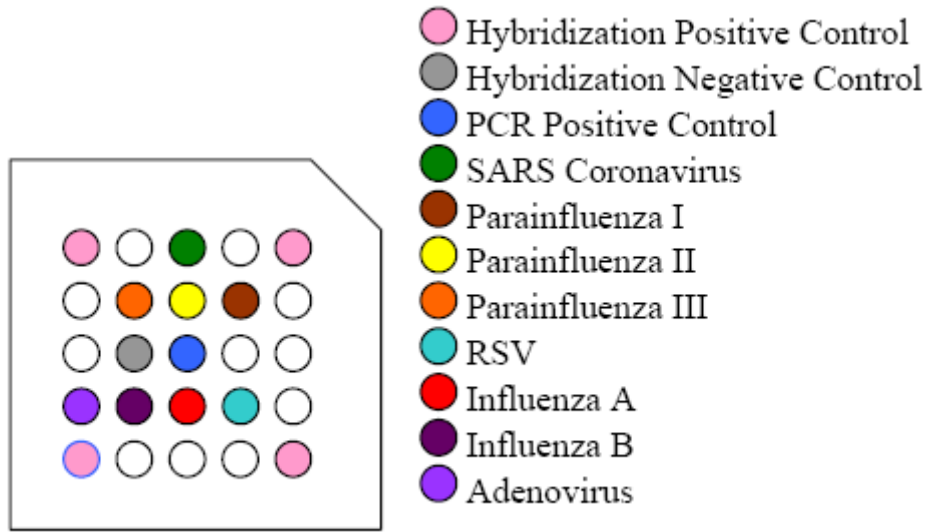
1. Prob seçimi (cDNA klonları, PZR ürünleri, oligonükleotidler)
2. Chip fabrikasyonu
3. Örnek/hedef (DNA/RNA) izolasyonu ve işaretleme (kolorimetrik, radyoaktif, floresans)
4. Hibridizasyon (prob + hedef)
5. Okuma (sinyal kantitasyonu)
6. Verilerin analizi.

Chiplerin üretiminde prob seçimi önemlidir. Problar "GenBank" veya diğer veri tabanlarından doğrudan seçilebilir. cDNA klonları, PZR ürünleri ve oligonükleotitler başlıca prob seçenekleridir. Seçilen problar katı destek faz üzerine mekanik yerleştirme (robot yardımıyla) veya "ink-jet printer" tekniği ile yerleştirilir. Probların doğrudan chip üzerinde sentez (fotolitografi tekniği) edilmesi de yaygın kullanılan diğer bir yöntemdir. Araştırılacak örnekten DNA/RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, sıklıkla floresan madde ile işaretlenerek DNA chipi ile hibridize edilir. Konfokal floresan mikroskopisine dayanan bir lazer tarayıcı ile chipin imajı alınır. Bilgisayar programları ile veriler analiz edilir (22).

2.4.d Solunum virüsleri tanısında ProDect BCS RV CHIP yöntemi

Bu sistem nükleik asit ekstraksiyonu, revers transkripsiyon, PZR ve hibridizasyondan oluşan moleküler bir yöntemdir. Hastalarda klinik semptomların ortaya çıkmasından sonra bu yöntemle tanı konulabilmektedir. Hibridizasyondan sonra hedef DNA kolorimetrik reaksiyonla ortaya çıkarılmaktadır. Bu yöntemle birçok solunum virüsü aynı anda saptanabilmektedir. Bunlar SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome), influenza virüs A, B, parainfluenza virüs tip 1,2,3, adenovirus ve RSV' dir.

“Chip” üzerindeki dizilime göre örnekler yorumlanarak sonuçlar değerlendirilmektedir. “Chip”te bulunan spesifik oligonükleotid proplar, hedef komplementer DNA’ yı hibridizasyon işlemi ile yakalamaktadır. Hibridizasyon ve kolorimetrik reaksiyon sonrası spesifik proplar yalnızca örnekte patojen varlığında hedefi yakalamaktadır; tam olarak birbirine uygun prob-hedef hibridizasyonu sonucunda “chip” te mavi-mor renk oluşmaktadır. Değerlendirmede hem kontrol kuyucukları, hem de örnek kuyucukları ayrı ayrı incelenmektedir. Testin başarılı olduğunu hibridizasyon pozitif kontrol ve PZR pozitif kontrol kuyucuklarındaki mavi-mor renk oluşumu göstermektedir (Şekil 1).

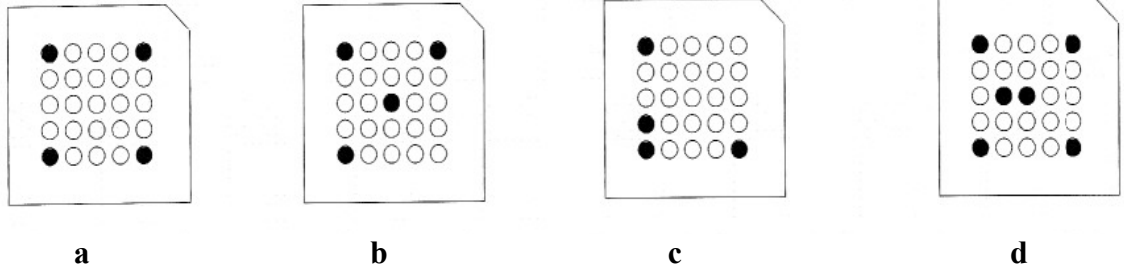


Şekil 1. ProDect BCS RV CHIP yönteminde spesifik problemlerin yerleşimi.

Coronavirus (SARS Virus)	Parainfluenza I	Parainfluenza II	Parainfluenza III	RSV
Influenza A	Influenza B	Adenovirus	Negative	

Şekil 2. Pozitif ve negatif sonuç görüntülerinden örnekler.

Sonuçlar dokuz virüsün görüntülerine göre değerlendirilmektedir. İnvaid sonuçların görüntülerinin örnekleri ise şekil 3’ de gösterildiği gibi görüntülenmektedir. Pozitif amplifikasyon kontrolünün yokluğu (a), pozitif hibridizasyon kontrolünün yokluğu (b), pozitif amplifikasyon ve hibridizasyon kontrolünün yokluğu (c), hibridizasyon negatif kontrol (d).



Şekil 3. İnvaid sonuç görüntülerinden örnekler.

3. GEREÇ YÖNTEM

3.1. Örnekler

2005-2006 yılları arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Servis ve Göğüs Hastalıkları polikliniğine akut solunum sıkıntısı ile başvuran, KOAH ve astım tanısı almış ya da geldiği sırada bu tanıyı alan 86 hasta çalışmaya alındı. Ayrıca kontrol amacıyla Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD Viroloji laboratuvarında hücre kültürü yöntemi ile adenovirus, RSV ve influenza virüs tip B olduğu doğrulanmış 3 örnek de çalışmaya dahil edildi. Hastalardan elde edilen nazofaringeal sürüntü örnekleri viral taşıma besiyerleri içerisine alındıktan sonra, çalışma gününe kadar -80°C ' de saklandı. Ayrıca hastalara ait demografik veriler anket formlarında toplandı (Form 1) .

3.1.a Örneklerin hazırlanması

Katı viral taşıma besiyerindeki (Delta lab. Spain) örnekler, sıvı besiyeri ile (HealthLink, Italy) karıştırılıp 15 dk bekletildikten sonra santifüj edildi.

3.2. ProDect BCS RV chip yöntemi ile çalışma

3.2.a Ekstraksiyon

High pure viral nucleic acid kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) kullanılarak ekstraksiyonlar yapıldı. Kullanılmadan önce tüm solüsyonlar $15-25^{\circ}\text{C}$ ' ye getirildi.

1.5 ml nuclease free mikrosantrifüj tüpünde 200µl örnek, 200µl çalışma solüsyonu [binding buffer (2.5ml) Poly A (50 µl)eklenmiş] ve 50µl proteinaz K hızla karıştırılıp, 10 dk 72°C ' de inkübe edildi. Örneğe 100 µl binding buffer eklendi. Collection tüp içine high pure filter tüp yerleştirilerek, örneğin tümü filtreye pipetlendi. 1 dakika 8000xg ' de santrifüj edildi. Collection tüpten filter tüp çıkarılıp, içindeki sıvı ile birlikte atıldı. Filter tüp yeni bir collection tüp içine kondu. 500 µl inhibitör removal buffer filter tüplere eklendi ve 1 dakika

8000xg' de santrifüj edildi. Collection tüpten filter tüp yeniden ayrıldı ve içindeki sıvı ile birlikte atılarak, filter tüp yeni bir collection tüp içine kondu. 450 µl wash buffer filter tüpe eklendi. 1 dakika 8000x g' de santrifüj edildi. Yine aynı şekilde collection tüpten filter tüp ayrılarak içindeki sıvı ile birlikte atıldı. Filter tüp yeni bir collection tüp içine kondu. Ardından 450 µl wash buffer filter tüpe eklendi. 1 dakika 8000xg' de santrifüje edildi. 10 sn residüel wash buffer' ı uzaklaştırmak için maximum hızda santrifüjlendi ve spinlendi.

Collection tüpten filter tüp ayrıldı ve içindeki sıvı ile birlikte atıldı. Filter tüp nuclease free 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne alındı. 50 µl elution buffer filter tüpe eklendi. 1 dakika 8000xg' de santrifüj edildi.

Mikrosantrifüj tüpünde elüe edilmiş stabil viral nükleik asit elde edildi. Viral RNA' lar çalışma gününe kadar -80°C' de saklandı.

3.2.b Amplifikasyon

cDNA sentezi:

ProDect BCS RV CHIP (bcs Biotect S.p.A., Italy) kiti kullanıldı. Kit içeriği çalışma gününe kadar -20°C' de saklandı. Solüsyonlar kullanılmadan önce spin edildi. Enzim işlem sırasında buzda bekletildi.

Her bir örnek için 2 tane DNase/RNase free tüp çıkarıldı ve işlem sırasına göre numaralandı. Birinci tüpe RT PZR-mix 1 solüsyonundan 2µl, ikinci tüpe ise RT PZR-mix 2 solüsyonundan 2 µl eklendi. Her iki tüpe de 4µl ekstrakte edilmiş nükleik asit solüsyonundan eklendi. Ready to go RT PZR bead' ler 20 µl DEPC su içinde çözüldü. Tüp 1 ve 2' ye 4 µl eklendi (son hacim 10µl) . Tüpler thermal cycler'a yerleştirilip, 42 °C'de 45 dk inkübe edildi.

DNA amplifikasyonu:

Her örnek için 79 µl RM solüsyonu ile 1 µl DNA polimeraz enzimi karıştırıldı. Bu karışımdan 1ve 2 no' lu tüplere 40 µl dağıtıldı (son hacim 50 µl).

Tüpler thermal cycler'a yerleştirildi. 95°C'de 5 dk bekletildikten sonra, 35 döngü 95°C'de 20 sn, 50°C'de 20 sn ve 72°C'de 40 sn olacak şekilde thermal cycler programı ayarlandı. 35 döngü tamamlandıktan sonra 72°C'de 10 dk bekletilerek amplifikasyon tamamlandı.

3.2.c Hibridizasyon

BCS mini oven 50°C'ye getirildi. Örnek sayısı kadar 1.5 ml' lik ependorf tüpe 240 µl BCS Hyb buffer eklendi. 1 ve 2 no' lu PZR ürünlerinden 5 µl ilave edilip, pipetle karıştırıldı (toplam 10 µl). Tüpler 99°C' de 5 dk bekletilerek, örnekler denatüre edildi. Hemen ardından tüpler buza gömülerek 2 dk daha bekletildi.

Örnek sayısı kadar chip çıkarıldı. Tüm karışım chip üzerine aktarıldı. Kapakları kapatıldı. Chipler 50°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda chip üzerindeki karışım döküldü. 250 µl wash buffer eklenerek 1 dk beklendi. Ardından wash buffer dökülerek, yeniden 250 µl wash buffer ilave edilerek, bekletilmeden "chip" üzerinden uzaklaştırıldı. Kurutma kağıdı yardımıyla kalan fazla sıvı atıldı ve bu işlem 3 kez tekrarlandı.

3.2.d Deteksiyon

Boş falcon tüpüne 200 µl blocking reagent ve 0.2 µl Strep-AP eklendi. Bu miktarlar örnek sayısı kadar hazırlandı. Bu karışımdan 200 µl alınıp, chip üzerine aktarıldı. 30°C'de 30 dk inkübe edildi.

Blocking reagent eliminasyonu için 250 µl wash buffer eklenerek, 1 dk beklendi. Ardından wash buffer dökülerek, yeniden 250 µl wash buffer ilave edilerek, bekletilmeden "chip" üzerinden uzaklaştırıldı. Kurutma kağıdı yardımıyla kalan fazla sıvı atıldı ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Ardından chiplere 250 µl detection buffer eklenip hemen döküldü.

Falcon tüpün etrafı folyo kağıt ile sarıldı. Örnek başına 200 µl detection buffer ile 4 µl NBT/BCIP bu tüpte hazırlandı. Bu karışımdan 200 µl chip üzerine dağıtıldı. 10 dk oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildi.

Chip üzerindeki solüsyon döküldü, reaksiyonu durdurmak için distile su ile yıkandı, kurutuldu.

En son aşamada chip okutuldu.

4. BULGULAR

Çalışmamızda astım ve KOAH hastalarından toplanan nazofaringeal sürüntü örnekleri DNA chip yöntemi ile çalışılarak ataklara neden olabilecek solunum sistemi viral infeksiyon etkenleri araştırıldı. Hastaların genel demografik bilgileri ve hastalıkla ilgili özellikleri tablo 3' te kısaca özetlendi. Altmış KOAH ve 26 astım olmak üzere toplam 86 hastada DNA chip yöntemi ile 2 parainfluenza virüs tip 1, 1 influenza B virüsü etken olarak saptandı. KOAH hastalarının kış aylarında ve yılda ortalama 3 atakla hastanemize başvurdukları gözlemlendi. Parainfluenza virüs tip 1 tespit edilen birinci hastamız 5 yıllık tanı almış, ağır KOAH' lı bir hasta olup orta atakla bize başvurmuştu. İkinci hastamız da 5 yıllık tanısı olan orta derecede KOAH' lı bir hasta olup, hafif atakla hastanemize başvurmuştu. İnfluenza B virüsü saptanan üçüncü hasta 7 yıllık tanısı olan, orta derecede KOAH' lı bir hasta olup, nisan ayında orta atakla bize başvurmuştu. Kontrol amaçlı çalışmaya dahil edilen hücre kültüründe üretilen üç solunum virüsünden adenovirus ve RSV olumlu olarak tesbit edildikleri halde, influenza B virüsü sistem tarafından influenza A virus olarak belirlendi. Yine beş hastamız ilk çalışmada PZR kontrollerinin çalışmaması sonucu tekrara alındı ve bu hastalar ikinci çalışmada negatif olarak saptandı.

Tablo 3. Çalışma grubundaki hastaların demografik verileri.

HASTALAR	ASTİM (N=26)	KOAH (N=60)	TOPLAM (N=86)
Cinsiyet (E / K)	7/19	52/9	59/28
Yaş (ortalama yıl)	52,6	66,1	62
Yaşam yeri			
Kent	22	46	68
Kırsal	4	14	18
Meslek			
Ev hanımı	15	8	23
Çiftçi	1	5	6
İşçi	2	33	35
Memur	5	13	18
Diğer	3	1	4
Tanı alma zamanı			
<5 yıl	8	11	19
5 – 10 yıl	7	29	36
>10 yıl	11	20	31
Son 1 yıl içindeki atak sayısı			
1	10	19	29
2	12	16	28
3	3	18	21
4	1	3	4
5	0	3	3
>5	0	1	1
Atak şiddeti			
Hafif	10	6	16
Orta	8	22	30
Ağır	8	32	40
Hastalık şiddeti			
Astım		KOAH	
hafif intermitan	4	hafif	4
hafif persistan	7	orta	21
orta persistan	5	ağır	35
ağır persistan	10		
Sigara kullanımı (paket/yıl)			
Yok	22	9	31
1 – 10	2	1	3
11-20	2	3	5
21-50	0	26	26
51-80	0	12	12
81->100	0	9	9
Son 1 ay içindeki solunum yolu enfeksiyon geçirenlerin oranı	5	12	17

5. TARTIŞMA

Solunum sisteminde infeksiyonlara neden olan virüslerin çeşitliliği ve bu virüslere karşı yapılabilecek medikal tedavinin genel kabulden uzak olması nedeniyle paramiksovirüsler, ortomiksovirüsler, adenovirüsler, koronavirüsler veya picornavirüsler gibi çeşitli virüs ailelerinin neden olduğu solunum sistemi infeksiyonlarında, nükleik asit amplifikasyonuna yönelik tanı yöntemlerinin kullanımı diğer viral infeksiyonlara göre geri kalmıştır (23).

Günümüzde bu solunum yolu patojenlerini saptamaya yönelik en sık kullanılan konvansiyonel testler, virüsün hücre kültüründe izolasyonu (viral kültür) ve/veya immunfloresan (IF) yöntemiyle viral antijen saptanmasını içermektedir. Viral kültür bu patojenleri saptamada “altın standart” olarak kabul edilmektedir, ancak bu yöntem genellikle zaman alıcı olup, sonuçları 14 günden önce alınamamaktadır. IF ile viral antijen saptanması hızlı sonuç verir, ancak sıklıkla bazı virüsleri saptamadaki duyarlılığı kısıtlıdır ve viral kültür gibi ileri incelemelerle sonuçların doğrulanmasını gerektirir. Her iki tekniğin kombine edilerek kullanılması pozitif sonuç yüzdesinde bir artışa neden olmakla birlikte, klinik ve epidemiyolojik olarak viral infeksiyon şüphesi olmasına rağmen belirgin sayıda örneğin her iki yöntemle çalışıldığında bile negatif olarak saptandığı çeşitli çalışmalarda gösterilmektedir.

Tüm bu kısıtlılıklar, ilgiyi yeni nükleik asit temelli yöntemlerin geliştirilmesi üzerine yoğunlaştırmıştır. RT-PZR solunum yolu virüslerini saptamada hızlı, duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Ancak mono-spesifik RT-PZR yöntemleri ilgili her bir virüs için ayrı amplifikasyonu gerektirmektedir; solunumsal patojenler benzer klinik semptomlara yol açtıklarından etyolojinin belirlenmesinde her bir virüsün ayrı ayrı araştırılması gerektiğinden potansiyel olarak pahalı yöntemlerdir. Multipleks PZR tek bir reaksiyon süresinde çeşitli virüslerin aynı anda amplifikasyonuna olanak sağlaması, maliyet-etkin tanıyı kolaylaştırması ve klinik tedaviyi yönlendirmesi (örneğin influenza A ve B virüs infeksiyonlarında antiviral tedavi) gibi belirgin avantajlara sahiptir (24).

Son yıllarda daha hızlı tanı amacıyla DNA “chip”lerinden yararlanılan yeni teknikler geliştirilmiştir. “Chip”teki küçük bir yüzeye DNA fragmanları uygulanarak, bir mikroorganizmaya ait genlerin PZR ürünleri veya baz dizisi bilinmeyen mikroorganizmanın tüm genom fragmanı taşıyıcı bir yüzeye bağlanarak transkripsiyon analizinde veya genom karşılaştırmalarında kullanılmaktadır. Bu yöntemin avantajı, amplifiye edilen baz dizilerinin kompleks yapılarını çözebilmesidir. Yüzlerce veya binlerce mikrobiyal hedef için DNA problu “chip”ler hazırlandığında infeksiyon hastalıklarının tanısı kolaylaşacaktır. DNA

“chip”leri sadece tanı opsiyonlarını arttırmakla kalmayıp, aynı zamanda tedavinin düzenlenmesine de katkıda bulunabilir (25).

Biz de çalışmamızda bu yeni geliştirilen DNA chip teknolojisini kullanarak astım ve KOAH’ ı bulunan ve akut atakla hastaneye başvuran hastalarda, akut atak etyolojisini saptamaya yönelik solunum yolu viral etkenlerini araştırdık. Altmış KOAH ve 26 astım olmak üzere toplam 86 akut ataklı hastanın ikisinde parainfluenza virüs tip 1, birinde de influenza virüs B’ yi etken olarak saptadık. Bulgularımızı karşılaştırmak amacıyla literatüre baktığımızda, çok yeni bir yöntem olduğu için bizim çalışma grubumuzda daha önce bu yöntemle yapılan bir çalışmaya rastlayamadık. Ancak aynı hasta grubunda başta multipleks RT-PZR olmak üzere farklı yöntemlerle yapılan araştırmalar bulunmaktadır. Akut astım atak hastalarında yapılan bir çalışmada hastaların %26’ sında viral etken tesbit edilmiştir (26). Yine Tan ve ark. larının (27) yaptıkları bir araştırmada, akut astım ya da KOAH atağı nedeniyle hastaneye yatırılan 60 hastanın 31’ inde (%52) viral nükleik asitler RT-PZR ile belirlenmiş olup, en sık saptanan virüsler pikornavirüsler, adenovirüsler, influenza A virüsü ve influenza B virüsü olduğu belirtilmektedir. İngiltere’ de yapılan bir başka araştırmada akut astım atağı olan hastalardan alınan 115 örneğin %24’ ünde viral etkene rastlanmış olup, rinovirüs, koronavirüs OC43 ve 229E, influenza B virüs, RSV ve parainfluenza virüslerle astım atakları arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmektedir (28).

Benzer oranlara KOAH akut ataklı hastalarda yapılan çalışmalarda da rastlanmaktadır. Seemungal ve ark. ları (29), 168 akut KOAH atağının 66’ sında (%39.2) viral etken saptayarak, bunları da en sık %58.2 ile rinovirüs, %11 koronavirüs, %16 influenza A ve B, daha az sıklıkta da parainfluenza, adenovirüs ve klamidyaya olarak bildirmişlerdir. Yine Avustralya’ da yapılan bir araştırmada ventilasyon gerektiren 107 akut KOAH ataklı hastanın 69’ unda (%64) olası bir infeksiyöz etyoloji tespit edilmiş olup, bunların da 46’ sında (%43) virüslerin etken olduğu bildirilmektedir. Olguların 35’ inde (%33) tek etken, 11’ inde (%10) çoklu etken saptanmıştır (30). Singapur’ da yapılan bir çalışmada ise, 90 KOAH’ lı olgunun 26’ sında serolojik yöntemler kullanılarak viral infeksiyon saptanmış, bu infeksiyonların da % 20’ sinde etken olarak influenza A belirlenmiştir (31). Beckham ve ark. larının (32), Amerika’ da KOAH akut ataklı hastalardan elde ettikleri 194 örnekte RT-PZR ile solunum yolu viral infeksiyon etkenlerini araştırdıkları çalışmalarında, akut atakların %41.8’ inde viral etken saptanmıştır. Araştırmacılar çalışma grubunda pikornavirüs (%20.1) ve koronavirüsleri (%8.2) RT-PZR yöntemi ile en sık saptanan etkenler olarak bildirmektedirler.

Ülkemizde astım ve KOAH akut ataklarında solunum yolu virüslerinin sıklığının araştırıldığı kısıtlı sayıda çalışmaya ulaşılmıştır. Kaygusuz ve ark.ları (33) KOAH akut atağı ile başvuran 53 hastada immunfloresan yöntemle %17 oranında *Chlamydia pneumoniae*, %9.4 *Mycoplasma pneumoniae*, %3.8 influenza virüs, %3.8 parainfluenza virüs, %1.9 adenovirüs, %7.5 çoklu etken saptamışlardır. Güldaval ve ark. larının (34), İzmir’ de Enzyme Immuno Assay yöntemiyle solunum yolu infeksiyon etkenlerine ait antikorları araştırdıkları başka bir araştırmada, 86 akut ataklı hastanın %29’ unda RSV, %15’ inde mikoplazma, %7’ sinde adenovirüs, %3’ ünde klamidy, %2.5’ unda lejyonella, %5’ inde RSV ve mikoplazma, %2.5’ unda RSV ve klamidy antikorları saptanmıştır. Yine yapılan bir başka çalışmada KOAH akut atağının en sık nedeni olarak influenza A ve *Chlamydia pneumoniae* bulunmuş, bu etkenlerin atakların etyolojisinde düşünülmesi gerektiği vurgulanmıştır (35).

Bizim çalışmamızda kullandığımız gibi moleküler yöntemlerin yukarıda sözü geçen birçok çalışmada kullanılan moleküler dışı yöntemlerden daha duyarlı olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmesine rağmen, araştırmamızda astım ve KOAH akut atağıyla hastanemize başvuran hastalardan sadece 3 tanesinde (%3.5) viral etken saptamış olmamız, bizi kullandığımız chip yönteminin duyarlılığı hakkında şüpheye düşürmektedir. Chip yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğünü saptayabilmemiz için gerekli olan, aynı örneklerin “gold standart” olarak kullanılan viral kültür yöntemiyle de çalışılması gerekliliğini, bizim araştırmamızdaki bir eksiklik olarak değerlendirmekteyiz.

Hücre kültürü, IFAT ve çalışmamızda kullandığımız chip yönteminin performanslarının karşılaştırılması amacıyla Çiçek ve ark. larının (36), İzmir’ de yaptıkları çalışmada örneklerin 22’ si (%55.0) hücre kültürü (beşi ikili etken), 16’ sı (%40,0) IFAT (dördü ikili etken), 9’ u BCS RV CHIP (%22.5) (biri ikili etken) ile pozitif bulunmuştur. BCS RV CHIP, hücre kültürü ile karşılaştırıldığında, 18 örnek her iki yöntemle negatif, dört örnekse her iki yöntemle pozitif (etkenler aynı, biri ikili etken) saptanmıştır (Test geçerliliği 22/40, %55.0). Hücre kültüründe 19 örnekte üreyen parainfluenza virüs tip 3, BCS RV CHIP ile tespit edilememiştir. Hücre kültüründe parainfluenza virüs tip 3 üreyen 6’ şar örnekte, BCS RV CHIP ile RSV bulunmuştur. IFAT sonuçları değerlendirildiğinde, BCS RV CHIP ile saptanan beş RSV’ nin üçü, bir örnekteki adenovirüs ve iki örnekteki parainfluenza virüs tip 3 direkt yöntemle de doğrulanmıştır. Araştırmacılar BCS RV CHIP yöntemini uygulanması kolay, uygulama süresi yaklaşık 4.5-5 saat olan, tek örnekte bir reaksiyonla sekiz etkeni (SARS, influenza virüs A ve B, parainfluenza virüs tip 1, 2, 3, adenovirüs, RSV) tanımlayabilmesi yönüyle zaman kazandırıcı moleküler temelli bir test olarak

değerlendirirken, çalışmada muhtemelen transport koşullarından kaynaklanan ve hücre kültürü ile beş örnekte izole edilemeyen RSV' yi saptamasıyla tanıya katkıda bulunduğunu belirtmektedirler. Çalışma kapsamına alınan 40 örnek ile test hakkında kesin bir kaniya varılmaması gerektiği de vurgulanarak, özgüllüğü yüksek olmasına karşın özellikle parainfluenza virüs tip 3' ü saptama performansının iyi olmadığı bildirilmektedir. Aynı çalışmada özellikle ikili etken izole edilen örneklerde de parainfluenza virüs tip 3' ü saptayamadığı tespit edilmiş, testin parainfluenza virüs tip 3' e ait oligonükleotid prob dizaynının yeniden gözden geçirilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Bütün mikrobiyolojik çalışmalarda olması gerektiği gibi örneklerin uygun şekillerde alınıp saklanması ve çalışmaya hazırlanmasının da sonuçların duyarlılığı açısından önemli olduğu bilinmektedir. Örneğin niteliği iyi değilse yalancı negatif sonuç alınabilmesi mümkündür. Bu araştırmada bunlara dikkat ederek planlamamızı sürdürdük. Örneklerimiz çalışma gününe kadar -80°C ' de bekletilmiştir. Çalışmada kuşkulu pozitif sonuç çıkan örnekler, 2-3 kez distile suyla yıkanarak tekrar çalışılmış, bunun sonucunda negatif sonuç alınmıştır. Yine PZR kontrolleri çalışmayan hastaların tekrarları yapılmıştır. Bu nedenle PZR işlemi tamamlandıktan sonra chip çalışmasına başlanmadan önce jel elektroforez yöntemi ile amplifikasyon kontrolü yapılmasının, kayıpların önlemesini sağlayabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda kullandığımız hücre kültüründe üretilen 3 örnekten birisinin farklı sonuç vermesi yöntemin yanlıgılarının olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle yöntemin mutlaka farklı bir yöntemle karşılaştırılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

DNA chip yönteminin en önemli problemleri, üretimin pahalı ve kompleks olması, test maliyetinin yüksek ve işlem süresinin uzun olmasıdır. Bir prob için ideal olan şartlar diğer bir prob için oldukça değişken olabilir. Bu nedenle, bir "chip" üzerine yerleştirilen birçok prob hibridizasyon şartlarını değiştirebilmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda astım ve KOAH akut atağıyla hastaneye başvuran hastaların DNA “chip” yöntemi ile %3.5’ unda viral etken saptanmıştır. Henüz çok yeni geliştirilmiş bir yöntem olması nedeniyle, literatürde aynı hasta grubunda bu yöntemle yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak farklı yöntemlerle yapılan çalışma sonuçlarıyla kıyasladığımızda bizim bu yöntemle saptayabildiğimiz pozitif hasta sayısı oldukça düşüktür. Ayrıca yöntemin duyarlılığını ve özgüllüğünü belirleyebilmek amacıyla viral solunum yolu etkenlerini saptamada “gold standart” yöntem olarak kabul edilen viral kültür ile örneklerin çalışılmamış olması, çalışmamızı kısıtlayan önemli bir unsurdur. Bu nedenle DNA “chip” yöntemini rutin tanı amacıyla kullanmaya başlamadan önce özgül, duyarlı ve tekrarlanabilir olması gibi değerlendirmelerin dikkatli yapılması gerektiği ve rutin uygulamalarda mutlaka başka bir yöntemle eşzamanlı kullanılması sonucuna varılmıştır.

7. EKLER

HASTA BİLGİ FORMU

AD-SOYAD:

BAŞVURU TARİHİ:

ASTİM:

KOAH:

YAŞ:

ADRES:

MEDENİ DURUM: * BEKAR *EVLİ

ÖĞRENİM DURUMU- MESLEK:

YAŞAM YERİ: * KENT *KIRSAL ALAN (*toplu yaşam *aile *yalnız)

TANI ALMA ZAMANI:

HASTALIĞA BAĞLI KULLANILAN İLAÇLAR:

DİĞER KRONİK HASTALIKLAR:

SON BİR YIL İÇİNDE GEÇİRİLMİŞ OLAN ATAK SAYISI VE MEVSİMİ:

ATAK ŞİDDETİ:

HASTALIK ŞİDDETİ:

ATAK TEDAVİSİ:

SFT:

ARTERİYEL KAN GAZI:

AİLE ÖYKÜSÜ:

İNFEKSİYON ÖYKÜSÜ (yakın zamanda geçirilmiş):

SİGARA ALIŞKANLIĞI (*non smoker * ex smoker * smoker.....paket yılı):

ALKOL vb KÖTÜ MADDE BAĞIMLILIKLARI:

8. KAYNAKLAR

1. American Thoracic Society. Standarts for the diagnosis and care of patiens with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1995;152: 77-121.
2. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, Yernault JC, Decramer M, Higenbottam T, Postma DS, Rees J, on behalf of the Task Force. Optimal assessment and management of chronic obsructive pulmonary disease (COPD): The eurepean respiratory society task force. Eur Respir J 1995; 8:1398-420.
3. National institutes of health pub. World Health Organization. Global initiative for COPD. 2001:1-25.
4. Kocabaş A. KOAH: Epidemiyoloji ve doğal gelişim. İçinde: S Umut, E Erdinç, editörler. Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı. İstanbul: 2000. s.8-25.
5. Seemungal TAR, Donaldson GC, Paul EA, Bestall JC, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Effect of exacerbation on quality on life in patients with COPD. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 1418-22.
6. Demir R. Kronik obstruktif akciğer hastalığı: tanım, epidemiyoloji ve risk faktörleri. Türkiye Klinikleri Göğüs Hastalıkları . 2003; 1: 1-6.
7. Taşbakan MS. Kronik obstruktif akciğer hastalığı infektif alevlenmeleri (tez). İzmir Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2000.
8. Murphy TF, Sethi S. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. Am Rev Respir Dis 1992;146(4):1067-83.
9. Sethi S. Infectious etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. Chest 2000; 117 (5 Suppl 2):380S-5S.
10. Mirici A, Girgiç M, Tutar Ü, Kaynar H, Sağlam L, Görgüner M. Atopik ve non-atopik astımlı olgularda üst solunum yolu patojenlerinin sıklığı. Akciğer Arşivi. 2001;1:17-20
11. Busse WW. Respiratory infections: their role in airway responsiveness and pathogenesis of asthma. J Allergy Clin Immunol 1990; 85 (4): 671-683.
12. Global initiative for asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. NHLB/WHO workshop report. National Institutes of Health. National Hearth, Lung and Blood Institute. Publication No:02-3659, revised 2002.
13. Bozkaya E. Solunum sistemi viral infeksiyonları ve influenza. İçinde : Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S, editörler. Moleküler, klinik ve tanısal viroloji. 1. baskı. Ankara; 2004. s.101-11.
14. Serter D. Virüs riketsiya ve klamidya hastalıkları. 1. baskı. İzmir; 1997. s. 282-83.

15. Rota S. Solunum sinsityal virus. İçinde: Ustaçelebi Ş editörü. Temel ve klinik mikrobiyoloji . 1. baskı. Ankara; 1999. s. 941-43.
16. Artuk Ç. Rinovirusler. İçinde: Ustaçelebi Ş editörü. Temel ve klinik mikrobiyoloji. 1. baskı . Ankara; 1999. s. 913-18.
17. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Asya mikrobiyoloji. 4. baskı. İzmir; 2005. s. 370-71.
18. Kimberle CC, Westenfeld FW. Reagents, stains, media and cell lines : virology. In : Murray PR editor. Manual of clinical mikrobiology. 8nd ed. Washington ;2003. p. 1246-52.
19. Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL. Multiplexed biochemical assays with biological chips. Nature. 1993; 364: 555-56.
20. Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, Hubbell E, Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fodor SP. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. Biotechniques. 1995;19:442-47.
21. Nowak R. Genome mappers have a hot time at Cold Spring Harbor. Science 1995; 268: 1134-35.
22. Taşlı H. DNA microarray teknolojisi. II. Uluslararası Katılımlı Moleküler Tanı ve Uygulamaları Sempozyumu; 2004; İzmir. s.102-03.
23. Leven M, Goosens H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. Clin Microbiol Reviews. 1997; 10: 242-56.
24. Lilolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wesselingh S. Comparison of multiplex reverse transcription - PCR enzyme hybridization assay with konvensional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. J of Clin Microbiol 2001; 39(8): 2779-83.
25. Özerol İH. Amplifikasyon ürünlerinin tespit edilmesi. İçinde: Durmaz R, editör. Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji. 1. baskı. Malatya: 2001. s. 66-67.
26. Green RM, Custovic A, Sanderson G, Hunter J, Johnston SL, Woodcock A. Synergism between allergens and viruses and risk of hospital admission with asthma: case-control study. BMJ 2002; 324(7340): 763.
27. Tan WC, Xiang X, Qiu D, NG TP, Lam SF, Hegele RG. Epidemiology of respiratory viruses in patients hospitalized with near-fatal asthma, acute exacerbations of asthma or chronic obstructive pulmonary disease. Am J Med 2003; 115: 272-77.

28. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 1993; 307(6910): 982-86.
29. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, Maccallum P, Meade TW, Jeffries DJ, Johnston SL, Wedzicha JA. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(9): 1618-23.
30. Cameron RJ, de Wit D, Welsh TN, Ferguson J, Grissell TV, Rye PJ. Virus infection in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring ventilation. *Intensive Care Med* 2006; 32(7): 1022-29.
31. Goh SK, Johan A, Cheong JH, Wang YE. A prospective study of infectious with atypical pneumoniae organisms in acute exacerbations of chronic bronchitis. *Ann Acad Med* 1999; 28: 476-80.
32. Beckham JD, Cadena A, Lin J, Piedra PA, Glezen WP, Greenberg SB, Atmar RL. Respiratory viral infections in patients with chronic, obstructive pulmonary disease. *J Infect* 2005; 50(4): 322-30.
33. Kaygusuz S, Köksal i, Aydın K, Özlü T, Kostakoğlu U, Çaylan R. Toplum kökenli alt solunum yolu infeksiyonlarında atipik etkenlerin belirlenmesi. İçinde: Toraks Derneği Ulusal Akciğer Sağlığı Kongresi; 2000 9-13 Nisan; Antalya, Türkiye. s. 5-19.
34. Güldaval F, Evciler İ, Şenol G, Özacar R. KOAH ataklarında viral ve atipik etkenlerin rolü. *İzmir Göğüs Hastanesi Dergisi*. 2005; 2: 45-50.
35. Uzun K, Özbay B, Buzgan T, Zehir İ, Evirgen Ö, Andiç Ş, Sezgi C. *Toraks Dergisi*. 2002; 3(2): 146-50.
36. Çiçek C, Bilgiç A, Gülen F, Karataş E, Demir E, Tanaç R. Solunum yolu infeksiyonlarında viral etyolojinin saptanmasında multiplex PCR yönteminin performansının değerlendirilmesi ön çalışması. 2. Ulusal Viroloji Kongresi 2005, Eylül 13-17; Antalya. s. 235.