

**TİP 1 DİABETES MELLİTUSLU HASTALARDA
COXSACKIE B VİRUSLARA KARŞI ANTİKOR
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

INVESTIGATION OF ANDIBODY LEVELS AGAINST
COXSACKIE B VIRUSES IN SERA FROM PATIENTS
WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Gürol EMEKDAŞ*, **Seyyal ROTA****, **Semra KUŞTİMUR****
Ömer KOCABEYOĞLU***

Özet: Tip 1 diabetin etyolojisinde Coxsackie B Virus (CBV)'ların bulunup bulunmadığının araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada tip 1 diabetli 37 hasta ve kontrol grubu olarak sağlıklı 100 kişiden sağlanan serum örneklerinde CBV serotip 1, 2, 3, 4, 5 ve 6'ya karşı antikorlar mikronötralizasyon testi ile araştırıldı. Tip 1 diabetli hasta serumlarında ve sağlıklı kişilerdeki serumlarda CBV serotiplerine karşı nötralizan antikor düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. Sonuç olarak tip 1 diabetes mellitus oluşumu ile CBV enfeksiyonu arasında bir ilişki saptanamadı.

Summary: In order to detect if the presence of interrelationship between Coxsackie B Viruses (CBV) and etiology of type 1 diabetes mellitus, antibodies to CBV by microneutralization test serotypes 1, 2, 3, 4, 5 and 6 were investigated in 37 sera obtained from patients with type 1 diabetes mellitus and 100 sera from healthy individuals as control group. No significant difference could found that neutrazing antibody levels to CBV serotypes between in sera obtained from patient with type 1 diabetes mellitus and sera obtained from control group. As a result, interrelationship was not detected between CBV infection and having type 1 diabetes mellitus.

G İ R İ Ş

Virolojinin gelişmesindeki altın çağın başlangıcı olarak ifade edilen Coxsackie virusların bulunması ve bunu takiben serolojik testlerdeki gelişmelere rağmen Coxsackie virus enfeksiyonlarının önemi azalmıştır (1).

* Uz Dr., 600 Yataklı Mevki Askeri Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Şefi, ANKARA.

** Doç. Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, ANKARA.

*** Doç. Dr., GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyoloji Servis Şefi, İSTANBUL.

COXSACKIE B ANTİKORLARI

İnsanlarda yapılan serolojik çalışmalar, yeni tanı konan bazı olgularda CBV-4'e karşı antikor titresinde artış olduğunu göstermektedir (2, 3). Ancak bu sonuçlar bütün araştırmacılar tarafından henüz doğrulanmamıştır (2). Notkin ve arkadaşları akut diabet geliştikten birkaç gün sonra ölen bir çocuğun langerhans adacıklarında immünfluoresan test ile CBV-4 antiijenlerini saptamışlardır. Bu hastadan izole edilen virusun farelerde de diabet oluşturması nedeniyle hastalığın etiolojinde CBV-4'ün rol oynayabileceği öne sürülmüştür (4, 5, 6, 7, 8).

Bu çalışmada tip 1 diabetes mellitus'un etiolojinde CBV'ların rol alıp almadıklarının ve bu hastalık grubuyla CBV serotipleri arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

1. VİRUS: Çalışmada Cocksackie B virusların 6 serotipi antijen olarak kullanılmıştır. Değişik merkezlerden sağlanan, bu CBV serotipleri Vero hücre kültüründe üretilmiş ve bu amaçla % 10'luk inaktif dana serumu içeren Eagle MEM (Seromed Biochrom KG) besiyeri kullanılmıştır. Ayrıca muhtemel kontaminasyonların önlenmesi amacıyla ortama penicillin (100/Uml), streptomycin (100 µgr/ml) ve mycostatin (25 U/ml) ilave edilmiştir (9).

2. SERUMLAR: Çalışmada değişik hastanelerde tip 1 diabetes mellitus tanısı konan 37 hasta serumu ile hiçbir şikayeti olmayan 100 kişilik kontrol serumu kullanılmış olup her iki gruba da 0-30 yaş arasındaki fertler dahil edilmişlerdir. Serumlar çalışmadan önce 56°C'de 30 dakika inaktive edilip kullanılıncaya kadar -40°C'de saklanmış ve kullanılmadan önce yeniden 10 dakika inaktive edilmiştir.

3. MİKRONÖTRALİZASYON TESTİ: Test, Frey ve Liess'in (10) bildirdiği şekilde yapılmıştır. Teste geçmeden önce çalışmaya alınan CBV suşlarının titrasyonları yapıp Kaerber formülüne (11) göre hesaplanmıştır. Serumlar Eagle MEM besiyeri ile 1/5 dilüsyondan başlayarak ikişer kat sulandırılmış ve herbir CBV suşunun 100 DKID₅₀ oranlarıyla ayrı ayrı test edilmişlerdir. Vero hücre kültürü kullanılan test sonuçları 6'ncı günde değerlendirilerek serum nötralizasyon 50 (SN50) değerleri Kaerber formülü (11) ile hesaplanmıştır.

B U L G U L A R

Mikronötralizasyon testi ile yapılan çalışma sonunda tip 1 diabetes mellitus'lu ve kontrol grubuna ait serumlardaki CBV serotiplerine karşı nötralizan antikor saptanan serumların sayı ve oranları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1

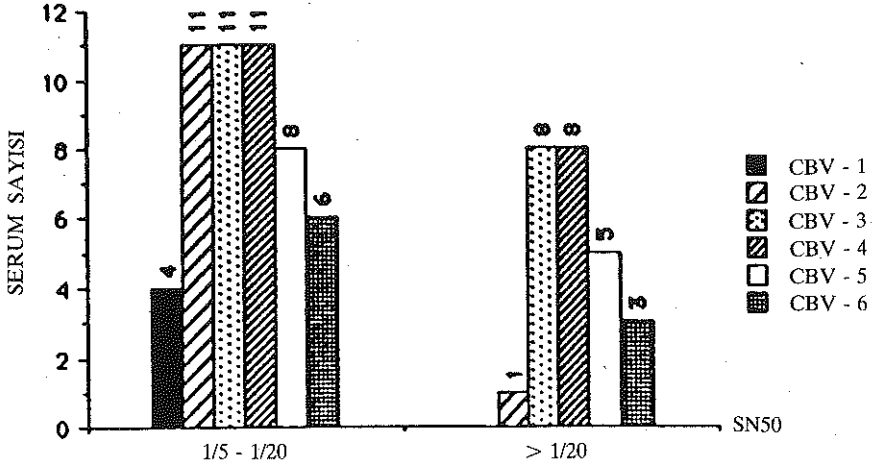
**Tip 1 Diabetes Mellituslu ve Kontrol Grubu Serumlarındaki
CBV Nötralizan Antikor Dağılımı**

Çalışma Grubu	CBV - 1	CBV - 2	CBV - 3	CBV - 4	CBV - 5	CBV - 6
Tip 1 Diabetes Mellitus (n = 37)	10.8 (4)	32.4 (12)	51.4 (19)	32.4 (12)	35.1 (13)	24.3 (9)
Kontrol Grubu (n = 100)	15.0 (15)	34.0 (34)	51.0 (51)	54.0 (54)	44.0 (44)	17.0 (17)

Çalışma sonunda mikronötralizasyon testi ile pozitif bulunan tip 1 diabetlilere ait serumlardaki serum nötralizasyon 50 (SN50) antikor dağılımları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2

Tip Diabetli Hastalara Ait CBV Pozitif Serumların SN50 Dağılımları



TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsülin bağımlı diabetes mellitus (İBDM) (Tip 1 diabetes mellitus)'un insidansı mevsimlere, yıllara ve coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermekte ve bu da tip 1 diabetin oluşumunda çevresel faktörlerin de etkisi olduğunu düşündürmektedir. Tip 1 diabetin oluşumunda virusların da rol oynadığı iddia edilmektedir. Bu hipotez; 1) Pankreatik bozukluklar, 2) İBDM'un

bazı viral hastalıkları takiben ortaya çıktığı vakalar, 3) Ani başlangıç, mevsimsel insidans ve belirli viral enfeksiyonlar ve İBDM'un başlaması arasında pozitif serolojik ilişkileri gösteren epidemiyolojik çalışmalar gibi bulgulara dayanmaktadır (12).

Gamble ve arkadaşları (5), CBV-4 enfeksiyonunun İBDM'da bir rolü olduğunu bildirmektedirler. Araştırmacılar 10-19 yaş grubundaki diabetik hastalarda CBV-4 titresini % 87 olarak bulurken, bu titreyi kontrol grubunda % 65 olarak saptamışlardır. 20 yaş üzerindeki diabetiklerde pozitiflik oranı % 63 ve bu yaş grubunun kontrollerinde ise % 55 olarak bulunmuştur. Tüm hastalarda CBV-4 pozitifliği % 70 iken bu oran kontrol grubunda % 58 olarak saptanmıştır. Diğer CBV serotiplerine yönelik çalışmada böyle bir fark saptanamamıştır. Bizim çalışmamızda da CBV-3 pozitifliği tip 1 diabetlilerde % 51.4, kontrol grubunda % 51; CBV-4 pozitifliği tip 1 diabetlilerde % 32.4, kontrol grubunda ise % 54 olarak bulunmuş ve pozitiflik açısından anlamlı olabilecek bir fark saptanamamıştır ($p > 0.05$).

Tosaka ve arkadaşları (13), CBV-3 ile yaptıkları bir çalışmada non-obez diabetlilerle bu virus arasında bir ilişki ortaya koyamamışlardır.

Champsaur ve arkadaşları (4), İBDM'un özellikle CBV-4 sonucu olabileceğini bildirmişler ve bunu da bazı hastaların pankreasından CBV-4 izolasyonu ile açıklamışlardır. Aynı araştırmacılar 16 aylık bir bebekte bir CBV-5 enfeksiyonu sonucu ani İBDM oluştuğunu gözlemişlerdir.

Baum ve arkadaşları (2), CBV'ların İBDM'da rolü olmadığını, burada kabakulak vb. virusların rol alabileceğini iddia etmektedirler.

Mertens ve arkadaşları (7) ile Alberti ve arkadaşları (12) CBV-4'ün İBDM'dan ölen çocukların pankreaslarından izole edildiğini, hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda da CBV'ların diabete neden olduğunu bildirmişlerdir.

Barret-Connor (14) İBDM'lu hastaların en az 1/3'ünde CBV antikorları saptandığını bildirmiştir. Bu araştırmacı Polmer ve arkadaşlarının 27 hastalık serilerinde CBV-2 % 22, CBV-3 % 33, CBV-4 % 4 ve CBV-5 % 48'lik nötralizan antikor pozitifliğine değinmiş ve diabet ile CBV'lar arasında kesin bir ilişki bulunmadığını bildirmiştir.

Alberti ve arkadaşları (12), yeni tanı konan 22 İBDM'lu hastada yaptığı nötralizasyon testi sonunda CBV-1 % 13.6, CBV-2 % 18.2, CBV-3 % 22.7, CBV-4 % 31.8, CBV-5 % 18.2, CBV-6 % 0 oranında bir antikor pozitifliği saptamışlardır.

Tip 1 diabetli hastaların sonuçlarını karşılaştırdığımızda CBV-1 (% 10.8) ve CBV-4 (% 32.4) sonuçlarımız Alberti ve arkadaşlarının (12)

% 13.6 ve % 31.8'lik sonuçlarıyla; CBV-5'deki % 31.5 pozitiflik bulgumuz Barret-Connor'un (14) bildirdiği Polmer ve arkadaşlarının % 48 pozitif sonuçlarıyla uyumlu diğerleriyle ise farklı bulunmuştur. Çalışmamız sonunda elde ettiğimiz bulguların istatistiksel analizini yaptığımızda, bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gözledik ($p > 0.05$). Bulgularımız bu yönden birçok araştırmacının bulgularıyla uyumludur.

Bu çalışmada, tip 1 diabetli hasta serumları ve sağlıklı kişilerden sağlanan serumlardaki, CBV serotiplerine karşı nötralizan antikor pozitiflik oranları ve pozitif bulunan serumlardaki antikor düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Sonuç olarak; CBV'lar ile tip 1 diabet oluşumu arasında bir ilişki saptanamamıştır.

KAYNAKLAR

1. Akan E: Genel ve Özel Viroloji, 2. Baskı, Türkiye Klinikleri Yayınevi, s. 282-291, 1989.
2. Baum JD, Aynsley-Green A, MacCallum FO: Coxsackie Viruses and Diabetes Mellitus, *Br Med J*, 3: 172, 1974.
3. Scherthaner G, Banatvala JE, Schenbaum W, Bryant J, Borkenstein M, Schober E, Mayr WR: Coxsackie B virus specific IgM responses, Complement-fixings Islet-cell antibodies, HLA DR antigens, and C peptide secretion in insulin dependent Diabetes mellitus, *The Lancet*, Sept 21, 630-2, 1985.
4. Champsaur H, Dussaix E, Samolyk D, Fabre M, Bach CH, Assan R: Diabetes and Coxsackie Virus B5 Infection, *The Lancet*, 1: 251, 1980.
5. Gamble DR, Taylor KW, Cumming H: Coxsackie viruses and Diabetes Mellitus, *Br Med J*, 4: 260-2, 1973.
6. Melnick JL: Enteroviruses, "Virology" (Fields BN, Knipe DM eds), Second edition, Raven Press, New York, p. 549-605, 1990.
7. Mertens TH, Gruneklee D, Eggers HJ: Neutralizing Antibodies Against Coxsackie B viruses in patients with recent onset of type 1 diabetes, *Eur J Pediatr*, 140: 293-4, 1983.
8. Serter F, Serter D: Klinik Viroloji, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, 1986.
9. Kocabeyoğlu Ö, Toker A, Akça Y, Emekdaş G, Burgu İ: Kan donörlerine ait serumlarda Coxsackie B virus tip-2 ve tip-3'e karşı antikor düzeylerinin mikronötralizasyon yöntemi ile araştırılması, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 23: 220-4, 1989.
10. Frey HR, Liess B: Vermehrungskinetik und Vermendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der microtiter-methode, *ZBL.Vet Med*, 18: 6171, 1971.
11. Kaerber G: In diagnostic procedures for virus and rickettsial disease, *Public Health Ass.*, 3: 48-50, 1964.
12. Alberti AM, Amato C, Candela A, Costantina F, Grandolfo ME, Lombardi F, Novello F, Orsini M, Santoro R: Serum antibodies Against Coxsackie B 1-6 viruses in type 1 diabetics, *Acta Diabet. Lat.*, 22: 33-8, 1985.
13. Tasaka Y, Inoue Y, Marumo K, Mizuno Y, Hirata Y, Akao Y: Insulin glucagon and somatostatin content of the non-obese diabetic (NOD) mouse pancreas and plasma virus antibodies to coxsackie B and reoviruses, *Tehoku J Exp Med*, 146: 153-62, 1985.
14. Barrett-Connor E: Is insulin dependent diabetes mellitus caused by coxsackievirus B infection? A review of the epidemiological evidence, *Rev Infect Dis*, (2): 207-15, 1985.