KLİNİK OLARAK ALT SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONU TANISI KONULAN 0-1 YAŞ GRUBU BEBEKLERDE SOLUNUM SİNSİTYAL VİRUS ANTİJENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS ANTIGENS IN INFANTS AGED BETWEEN 0-1 YEAR OLD WHO DIAGNOSED LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION CLINICALLY

Murat ÖZSAN, Hülya KAHRAMAN***

ÖZET: Solunum sinsityal virusu (RSV) bebek ve küçük çocuklarda alt solunum yolu viral etkenlerinin başında gelmektedir. Bu çalışmada, klinik ve radyolojik olarak alt solunum yolu enfeksiyonu tanısı alan 0-1 yaş grubu 42 bebeğin nazal sürüntü örneklerinde solunum sinsityal virus (RSV) antijenleri, direkt ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile araştırılmış ve hastaların 13'ünde (% 30.9) RSV antijeni pozitif olarak bulunmuştur. RSV enfeksiyonlarının özellikle kış aylarında yüksek oranda ortaya çıkması ve virusun hücre kültürlerinde tanımlanmasının uzun (3-7 gün) ve zahmetli olması gibi nedenlerle, alt solunum yolu enfeksiyonu olan bebeklerden alınan klinik örneklerde ELISA yöntemi ile RSV antijenlerinin rutin olarak araştırılması hızlı tanı için uygun olacaktır.

Anahtar kelimeler: Solunum sinsityal virusu, alt solunum yolu enfeksiyonu, ELISA.

SUMMARY: Respiratory syncytial virus (RSV) is the major cause of viral lower respiratory tract infections (LRTI) in infants and young children. In this study, nasal swab specimens of 42 infants (0-1 year old) who diagnosed as LRTI with the clinical and radiological findings were investigated by means of RSV antigen using direct ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test, and thirteen samples (30.9%) were found positive for RSV antigens. As RSV infections are very common especially in winter periods, the routine detection of viral antigens directly from the specimens by ELISA method, will be more practical and rapid comparing the isolation of virus in cell lines for 3-7 days.

Key words: Respiratory syncytial virus, lower respiratory tract infections, ELISA.

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
** Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Hastanesi, Yenidoğan Servisi, Ankara.

Geliş Tarihi: 27.1.1998 Kabul Ediliş Tarihi: 3.6.1998

GİRİŞ

Paramyxoviridae ailesinde, pneumovirus cinsinin bir üyesi olan Solunum sinsityal virusu (RSV) bebek ve küçük çocuklarda viral solunum sistemi hastalıklarının en önemli etkenidir. Bu hastaların yaklaşık % 40'ında üst solunum yollarındaki enfeksiyon alt solunum yollarına ilerlemekte (krup, trakeobronşit, bronşiolit, bronkopnömoni) ve hastaların % 1'inin hastaneye yatırılması gerekmektedir. Normal bebeklerde RSV'a bağlı ölüm nadir olmasına karşılık hastaneye yatırılanların % 0.5-1.5'unda ölüm meydana gelmektedir[1-3]. RSV epidemileri genelde kış ve ilkbahar aylarında görülmektedir[1].

Yaşamın ilk birkaç yılı içerisinde genellikle tüm bireyler enfeksiyonu geçirmektedir[3,4]. Daha sonraki dönemlerde ise reenfeksiyonlar görülmekte, ancak bunlar genellikle daha az ciddi olmakta ve nadiren alt solunum yolları hastalıkları ortaya çıkmaktadır[4]. Yenidoğan döneminde RSV enfeksiyonu nadir olmasına rağmen, yenidoğan ünitelerinde epidemiler bildirilmektedir[5,6].

Enfeksiyonun tanısı genellikle klinik ve epidemiyolojik bulgulara göre konmaktadır. Fakat RSV enfeksiyonunun kesin tanısı hastaların solunum yolu örneklerinden virusun izolasyonu veya viral antijenlerin saptanması ile yapılmaktadır[7-9]. Virus hücre kültüründe ortalama 3-7 günde izole edilebilmekte, bazen bu süre daha da uzamaktadır. Oysa enzim immünoassay yöntemleri ve floresan antikor tekniği ile viral antijenin saptanması hızlı ve kolaydır. Nazal yıkantı, nazal ve nazofarengeal sürüntü, nazofarengeal aspirat kullanılan örneklerdir[7-11]. Küçük bebeklerde antikor cevabı iyi olmadığı için serolojik testlerin hastalığın tanısında kullanımı sınırlıdır ve yukarıdaki tanı yöntemleri tercih edilmektedir[2].

Bu çalışmada, klinik olarak alt solunum yolu enfeksiyonu tanısı konulan bebeklerde direkt ELISA yöntemi ile RSV antijeninin araştırılması ve bu tip enfeksiyonlarda RSV görülme sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya, Ekim 1995-Mart 1996 ile Ekim 1996-Nisan 1997 tarihleri arasında Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Hastanesi'ne başvuran ve pediatrist hekim tarafından klinik ve radyolojik olarak alt solunum yolu hastalığı tanısı konularak ayaktan takip edilen hastalar ile hastanede yattığı dönemde alt solunum yolu enfeksiyonu gelişen 0-1 yaş arasındaki 42 hasta (26 erkek, 16 kız) alınmıştır. Bu hastaların hiçbirisinde klasik bakteriyolojik yöntemlerle etken olarak patojen bir bakteri saptanmamıştır.

Hastalardan ilk başvuruları sırasında ve yatan hastalardan enfeksiyonun ortaya çıktığı ilk 3 günde steril tahta çubuklu eküvyon ile nazal sürüntü örneği alınmış ve % 2 bovine serum albuminli phosphate buffered saline (PBS) içine

konularak çalışılıncaya kadar –20 °C'de saklanmıştır. Daha sonra bu örneklerden ELISA yöntemi ile RSV antijeni aranmıştır.

ELISA yönteminde, RSV antijenine özgül monoklonal antikorlarla kaplı kuyucuklar kullanılmış ve çalışma üretici firmanın (Abbott) önerilerine göre yapılmıştır. Yöntemde 2 pozitif kontrol ve 3 negatif kontrol kuyucuğu ile birlikte yine firma önerilerine göre hazırlanan hasta örneklerinden 100 µl olmak üzere sırasıyla her bir kuyucuğa konularak çalışılmıştır. Sonuçlar spektrofotometrede (EL-9 Microplate Reader) 490 nm filtre kullanılarak okunmuş, pozitif ve negatif kontrol serumların absorbans değerleri ile cut-off hesaplanmış ve bu değerin üzerinde çıkan hasta sonuçları pozitif olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Klinik olarak alt solunum yolu enfeksiyonu tanısı konmuş 0-1 yaş grubu 42 bebeğin nazal sürüntü örnekleri kullanılarak yapılan direkt ELISA testinde, bu bebeklerin 13'ünde (% 30.9) RSV antijeni pozitif olarak bulunmuştur. Bu 13 hastanın 5'i bronkopnömoni ve 8'i akut bronşiolit tanısı konulan bebekler olup 9'u ayaktan başvuran, 4'ü de yatan hastalardı. RSV antijeni pozitif çıkan hastalarla ilgili bilgiler Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I.

ELISA ile RSV Antijen Pozitifliği Belirlenen Hastaların Özellikleri

Olgu No.	Yaş	Cinsiyet	İzlem şekli*	Tanı
1	2 ay	kız	YH	bronkopnömoni
2	12 ay	erkek	AİH	bronkopnömoni
3	2 ay	erkek	YH	bronkopnömoni
4	3.5 ay	erkek	AİH	akut bronşiolit
5	3 ay	erkek	AİH	akut bronşiolit
6	2 ay	erkek	YH	bronkopnömoni
7	10 ay	kız	AİH	akut bronşiolit
8	7.5 ay	erkek	AİH	akut bronşiolit
9	8 ay	erkek	AİH	akut bronşiolit
10	2.5 ay	kız	YH	akut bronşiolit
11	10 ay	kız	AİH	akut bronşiolit
12	11 ay	erkek	AİH	akut bronşiolit
13	10 ay	kız	AİH	bronkopnömoni

* YH: Yatan hasta, AİH: Ayaktan izlenen hasta

TARTIŞMA

RSV'un özellikle 0-1 yaş grubu bebeklerde ciddi alt solunum yolu enfeksiyonuna yol açması nedeniyle, bu virusla ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır[4,7-9]. Enfeksiyonun tanısında hücre kültüründe virusun üretilmesi referans yöntemdir. Fakat virusun üremesi yavaş olduğundan, bu yöntem doğru tanının ve uygun tedavinin gecikmesine yol açmaktadır. Bu nedenle son yıllarda hızlı tanı yöntemleri tercih edilmekte ve bu konudaki çalışmalar immünfloresan antikor (IFA) ve enzim immünoassay (EIA) gibi tekniklerin yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğunu ortaya koymaktadır[2,7,8,11,12]. Hızlı tanı yöntemleri enfeksiyöz olduğu kadar nonenfeksiyöz antijenleri de saptayabilmesi ve hastaya gereksiz antibiyotik kullanımını önlemesi açısından da önemlidir[7,11,13].

Dünyanın farklı bölgelerinde, RSV, alt solunum yolu enfeksiyonlarında % 12 - % 38 arasında değişen oranlarda etyolojik ajan olarak bildirilmektedir[14-17]. Ülkemizde de RSV ile ilgili çeşitli yöntemlerle yapılan çalışmalara rastlanmaktadır[18-21]. Özacar ve arkadaşları[18], alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda RSV pozitifliğini % 36.4, Dereli ve arkadaşları[20] ise % 29.2 olarak saptamışlardır. Bu çalışmalar da bizim çalışmamızdakine benzer olarak kış ve sonbahar dönemlerinde gerçekleştirilmiştir ve çalışmamızda belirlenen % 30.9'luk oran bu bulgulara benzerlik göstermektedir. Tüm bu veriler dikkate alındığında ülkemizde kış aylarında bebeklerin geçirdiği alt solunum yolu enfeksiyonlarının yaklaşık üçte birinden RSV'un sorumlu olduğunu söylemek mümkündür.

RSV enfeksiyonlarının hızlı tanısında klasik yöntemlerin yerini alan IFA ve EIA testlerinde bronkoalveolar lavaj ve transtrakeal aspirat örnekleri gibi alt solunum yolu örneklerinin yanısıra, özellikle bu yöntemlerin travmatik olabildiği küçük bebeklerde nazal yıkama suyu, nazofaringeal aspirat, nazal mukoza ve orofarinks sürüntü örnekleri kullanılmaktadır[7,9,22,23]. Çalışmamızda da 0-1 yaş grubu bebeklerde örnek almanın zorlukları nedeniyle nazal sürüntü örneği kullanılmıştır. Ayrıca çalıştığımız ELISA yönteminde antijen saptanması amacıyla RSV'a özgül monoklonal antikorların kullanılmış olması da testin özgüllüğünü artırmaktadır. Dominguez ve arkadaşlarının[7], küçük çocuklarda akut solunum yolu hastalığı viral etkenlerini klasik (kültür) ve hızlı tanı yöntemleriyle (IFA, EIA) araştırdıkları karşılaştırmalı çalışmalarında RSV için EIA yönteminin duyarlılığı % 87 ve etkinliği % 94 olarak bulunmuştur. Bu araştırıcılar da örnek olarak nazal yıkama suyu ve boğaz sürüntüsü kullanmışlardır.

Viral enfeksiyonların tanısında, özgül antikorların saptanmasının da önemli bir yeri vardır. RSV'a özgül antikorlar kompleman birleşmesi, nötralizasyon, plak redüksiyon ve EIA testleriyle saptanabilir. Ancak klasik serolojik testlerle akut ve konvelesan serum örneklerinde antikor titresindeki artışı saptamak zaman alıcı olup genellikle seroepidemiyolojik amaçla kullanılmaktadır[22]. Ayrıca, özellikle

6 aydan küçük bebeklerde RSV'a karşı ölçülebilir düzeyde antikor oluşmayabileceği bildirilmektedir[23,24]. Dolayısıyla küçük bebeklerden oluşan çalışma grubumuzda viral antikor düzeyleri araştırılmamıştır.

Bebek ve küçük çocuklarda akut solunum yolu hastalığı viral etkenleri arasında RSV'dan başka influenza A, rhinoviruslar, enteroviruslar, adenoviruslar ve herpesviruslar gibi çok sayıda virus bulunmaktadır. Ancak, çalışmamız kapsamına diğer solunum yolu virusları dahil edilmemiştir. Bunun nedeni hem çalışmanın bir epidemiyolojik çalışma niteliğinde planlanmamış olması hem de ekonomik koşullara bağımlı kalma zorunluluğudur.

Sonuç olarak, özellikle kış aylarında RSV enfeksiyonuna oldukça yüksek oranda rastlanması nedeniyle, alt solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda ELISA yöntemi ile RSV antijenlerinin rutin olarak araştırılmasının hızlı tanıda pratik ve güvenilir olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Collins PL, McIntosh K, Chanock RM: Respiratory syncytial virus, pp. 1313-1351. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds), Fields Virology. 1996, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
2. Everard ML, Milner AD: The respiratory syncytial virus and its role in acute bronchiolitis. Eur J Pediatr 1992, 151: 638-651.
3. Walsh EE, McConnochie KM, Long CE, Hall CB: Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. J Infect Dis 1997, 175: 814-820.
4. Dowell SF, Anderson LJ, Gary HE Jr et al: Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. J Infect Dis 1996, 174: 456-462.
5. Grossman M: Viral respiratory infections, pp. 573-578. In: Rudolph AM (ed), Pediatrics. 1987, 8th ed. Prentice-Hall International Inc, Norwalk.
6. Garcia PA, Caritg BJ, Juncosa MT, Krauel VJ: Outbreak of respiratory syncytial virus in a neonatal unit. An Esp Pediatr 1989, 30: 480-482.
7. Dominguez EA, Taber LH, Couch RB: Comparison of rapid diagnostic techniques for respiratory syncytial and influenza A virus respiratory infections in young children. J Clin Microbiol 1993, 31: 2286-2290.
8. Mendoza J, Rojas A, Navarro JM, Plata C, de la Rosa M: Evaluation of three rapid enzyme immunoassays and cell culture for detection of respiratory syncytial virus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992, 11: 452-454.
9. Olsen MA, Shuck KM, Sambol AR: Evaluation of Abbott Testpack RSV for the diagnosis of respiratory syncytial virus infections. Diagn Microbiol Infect Dis 1993, 16: 105-109.
10. Engler HD, Preuss J: Laboratory diagnosis of respiratory virus infections in 24 hours by utilizing shell vial cultures. J Clin Microbiol 1997, 35: 2165-2167.
11. Woo PYC, Chiu SS, Seto WH, Peiris M: Cost-effectiveness of rapid diagnosis of viral respiratory tract infections in pediatric patients. J Clin Microbiol 1997, 35: 1579-1581.
12. Halstead DS, Todd S, Fritch G: Evaluation of five methods for respiratory syncytial virus detection. J Clin Microbiol 1990, 28: 1021-1025.

13. Hendry RM, McIntosh K: ELISA for detection of respiratory syncytial virus infection: development and description. J Clin Microbiol 1982, 16: 324-328.

14. Bermans K, McIntosh K: Acute respiratory infections serial features. Rev Infect Dis 1985, 7: 674-689.

15. Floyd W, Denny MD: Acute respiratory infections in children, etiology and epidemiology. Pediatr Rev 1987, 9: 135-145.

16. Swenson PD, Kaplan MH: Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by a commercial enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 1986, 20: 485-488.

17. Saijo M, Yamamoto M, Saijo H, Takimoto M: Respiratory tract infection and respiratory syncytial virus in young infants. Kansenshogaku Zasshi 1995, 69:68-72.

18. Özacar T, Zeytinoğlu A, Özdoğru E, Aydemir Ş, Tanaç R, Bilgiç A: Alt solunum yolu infeksiyonu olan çocuklarda respiratuvar sinsityal virüs antijenlerinin araştırılması. İnfeks Derg 1996, 10: 25-27.

19. Kocabeyoğlu Ö, Yücel N, Emekdaş G, Özcan N: Respiratory syncytial virus IFAT antijenlerinin vero hücre kültüründe üretilmesi ve 0-20 yaş grubunda RSV IgG antikorlarının dağılımı. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1990, 20: 72-78.

20. Dereli D, Ethem E, Serter D, Şadıment M: 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.

21. Ustaçelebi Ş, Söyletir G, Ata Y: Çeşitli yaş gruplarında solunum sinsityal virus kompleman birleşmesi antikorlarının dağılımı. Türk Viroloji Derg 1980, 2: 19-24.

22. Schmidt NJ, Emmons RW: Respiratory Syncytial Virus, p.701. In: Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 1989, 6th Ed.,American Public Health Association, Washington DC.

23. Lennette EH: Laboratory Diagnosis of Viral Infections, p.456. 1985 Marcel Dekker Inc, New York.

24. Joklik WK: Respiratory Syncytial Virus, p.206. In: Virology. 1988, 3rd Ed. Appleton and Lange Inc, Connecticut.