VİRAL SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARININ KLİNİK VİROLOJİK TANISINA GÜNCEL YAKLAŞIM

UPDATES IN THE CLINICAL VIROLOGIC DIAGNOSIS OF VIRAL RESPIRATORY TRACT INFECTIONS

Candan ÇİÇEK, Altınay BİLGİÇ**

ÖZET: Solunum virusları (solunum sinsityal virus, influenza tip A ve B virus, parainfluenza virus ve adenoviruslar) insanlarda çok çeşitli klinik tablolara neden olabilirler. Viral solunum yolu enfeksiyonları erişkin ve çocuklarda önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Bu etiyolojik ajanların güvenli ve hızlı tanısı, etkin antiviral tedavinin başlanması ve gereksiz antibiyotik tedavisinin azaltılması açısından önem taşımaktadır. Birçok viroloji laboratuvarında solunum viruslarının tanısı, solunum örneklerinin konvansiyonel tüp kültürüne inoküle edilip, sitopatik etki veya hemadsorbsiyon testi ile saptanması yoluyla yapılmaktadır. Ancak, bu yöntem birkaç gün hatta birkaç haftada sonuçlanabildiği için klinik kullanımda bir yararı olmamaktadır. Solunum viruslarının neden olduğu enfeksiyonların laboratuvar tanısında immunofloresan testler, shell vial kültür yöntemi ve moleküler biyolojik yöntemler daha kolay uygulanabilmekte ve daha hızlı sonuç vermektedir. Bu derleme yazıda, solunum viruslarının tanısında kullanılan testlerin özgüllük ve duyarlılıkları, daha önce yapılan çalışmalar göz önüne alınarak birbiri ile karşılaştırılmış ve günümüzde bu virusların tanısında rutin olarak kullanılabilecek yöntemler tartışılmıştır.

Anahtar sözcükler: Solunum sinsityal virus, influenza A virus, influenza B virus, parainfluenza virus, adenovirus, solunum yolu enfeksiyonları, tanı yöntemleri.

ABSTRACT: Respiratory viruses (respiratory syncytial virus, influenza virus type A and B, parainfluenza virus and adenovirus) can cause a wide variety of human disease. Viral respiratory diseases in adults and children cause significant morbidity and mortality. Proper and rapid diagnosis of these etiological agents is necessary for the appropriate use of effective antiviral drugs and to decrease unnecessary antibiotic therapy. Many virology laboratories detect respiratory viruses by inoculating conventional cell culture tubes with respiratory samples and then examining for cytopathic effect or hemadsorption. However, this procedure can require many days or even weeks for viral detection and identification, providing culture results to clinicians in a period of time that may not be clinically useful. Laboratory diagnosis of respiratory virus infections has become easier and more

* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

Geliş Tarihi: 8.4.2003 Kabul Ediliş Tarihi: 2.6.2003

rapid with the use of immunofluorescent antibody tests, shell vial culture methods, and molecular biological assays. In this review article, the specificities and sensitivities of these assays were compared on the basis of recent studies, and the favorable ones for the routine diagnosis were updated.

Key words: Respiratory syncytial virus, influenza virus A, influenza virus B, parainfluenza virus, adenovirus, respiratory tract infections, diagnostic methods.

GİRİŞ

Özellikle çocukluk yaş grubunda ve bağışık yetmezliği olan, organ nakli yapılan, yoğun bakım hastaları ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) alevlenmesi olan hastalar gibi erişkinlerde, alt ve üst solunum yolu enfeksiyonlarında en sık rastlanan viral etkenler, solunum sinsityal virus (respiratory syncytial virus, RSV), influenza tip A ve B virus (Inf-A, Inf-B), parainfluenza virus (PIV) ve adenovirus (AdV)'lardır. Her bir etken soğuk algınlığından pnömoniye kadar oldukça geniş spekturumda klinik bulgu verebilir ve bu olgularda oldukça önemli derecede morbidite ve mortaliteye neden olabilirler. Hepsinin tanısında altın standart yöntem, konvansiyonel tüp kültürüdür. Hücre kültürleri iki hafta boyunca inkübe edilir, sitopatik etki (CPE) gözlendikten sonra ileri yöntemlerle tanımlanır. Patojenlerin her biri için ortalama CPE oluşturma süresi en az dört gündür. Ancak bu süre, hastanın tedavisinin başlaması ve hastanede kalma süresi açısından çok uzun bir süredir. Viroloji laboratuvarlarında, özellikle kış aylarında solunum viruslarının tanısında kullanılabilecek hızlı, duyarlı ve özgül, ucuz, uygulanması kolay olan yöntemlere gereksinim vardır.

Bu yazıda, günümüzde ticari olarak bulunan kitlerin ve çeşitli tanı yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılıkları daha önce yapılan çalışmalar göz önüne alınarak birbirleri ile karşılaştırılmış ve söz konusu viruslarının tanısında rutin olarak kullanılacak en ideal yaklaşım sunulmaya çalışılmıştır.

DİREK TANI YÖNTEMLERİ

Antijen arayan testler: Direk tanı yöntemleri arasında, antijen saptayan testler olan direk floresan antikor (DFA) testi ve enzim immünassay (EIA) yöntemlerinin kullanıldığı ticari kitler mevcuttur. Her iki yöntemin avantaj ve dezavantajları vardır. DFA testinin değerlendirilebilmesi için x400'lük büyütmede en az üç kolumnar epitel hücresinin bulunması gerekmektedir. Bazı kaynaklara göre bir, bazı kaynaklara göre üç ve daha fazla inklüzyon cisimciğinin görülmesi ile örnek pozitif olarak değerlendirilir. Böylece örnek kalitesi de test edilmiş olur. Ayrıca, bu yöntemle hücre kültürü testlerinde mutlaka bulunması gereken canlı virusa gereksinim olmadığı için, test, örnek taşınması sırasında oluşabilecek ortamın ısı farklılıklarından etkilenmez. Hücre kültürüne göre daha hızlı sonuç alınır. Ancak duyarlılığı çeşitli kaynaklara göre %57-93 arasında değişmektedir. EIA yöneminin duyarlılığı ise %40-75 arasındadır. EIA testinde DFA testinde olduğu gibi kolumnar epitel hücresinin yeterli olup olmadığı gözlenmez, ancak hücre dışındaki antijen tanımlanabilir. Sadece tek bir etiyolojik ajan saptanabilir. Yalancı pozitiflik oranı yüksektir (%8-38). Test, örneğin taşınması sırasında oluşabilecek olumsuz koşullardan ve dondurma çözme

işlemlerinden etkilenmez. Çok sayıda örnek aynı anda çalışabilir. Teknik olarak çalışılması ve sonuçların değerlendirilmesi hücre kültürü ve DFA'dan daha kolaydır, çalışma ve değerlendirme süresi kısadır. Ancak sadece RSV ve influenza viruslar için geliştirilmiş ticari kitleri mevcuttur[1-5].

Birçok çalışmada, bu yöntemlerin solunum viruslarını saptamadaki duyarlılık ve özgüllükleri, standart yöntemlerle karşılaştırılarak verilmiştir (Tablo I-III) [1-6].

Tablo I: RSV'nin Saptanmasında DFA ve EIA Yöntemlerinin Standart Tüp Kültürü Yöntemi ile Karşılaştırılması[6]

Yöntem (Kaynak kit)	Yöntem	Test Süresi	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Maliyet
RSV EIA (Abbott)	Solid faz EIA (boncuklu)	4.5 saat	71	100	50 test/345$
Test Pack RSV (Abbott)	Solid faz EIA (ag-ab-ag)	21 dak	93	100	20 test/300$
DFA RSV (Bartels)	DFA	30 dak	92	96	5 ml/325$
DTG RSV (Directigen) (Becton-Dick.)	Membran EIA	15 dak	76	80	40 test/660$

Tablo II: Membran EIA (FLU OIA) Testinin Inf-A ve B'nin Saptanmasında Standart Hücre Kültürü Testi ve Moleküler Biyolojik Yöntemlerle Karşılaştırılması[2-4]

Yöntem adı	Karşılaştırıldığı Yöntem*	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
Membran EIA	PZR ve HK	54	74
Membran EIA	HK	80	73
Membran EIA	PZR	40	94
	DFA	49	94
	HK	46	90
	Ortak karşılaştırma	39	95

* PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu, HK: Hücre kültürü, DFA: Direk floresan antikor

Tablo III: RSV ve İnfluenza Virus Saptanmasında Direkt Tanı Yöntemlerinin Standart Yöntemlerle Karşılaştırılması[5]

	EIA (BD-Abbott)		DFA (Imagen, Dako)		İndirek FA (Imagen, Dako)	
	RSV	İnfluenza	RSV	İnfluenza	RSV	İnfluenza
Duyarlılık (%)	61-57	75	65	65	87	40
Özgüllük (%)	95	100	93	92	97	86

Etkenlerin tümüne yönelik tek tek floresanla (fluorescein isothiocyonat, FITC) işaretlenmiş monoklonal antikorlar bulunmaktadır. Ancak tümünün aynı hastada aynı zamanda tanısı gerektiği durumlarda, son derece zaman alıcı ve pahalı bir yöntem olmaktadır. Bu nedenle, herbirine karşı FITC ile işaretlenmiş özgül antikorları içeren ve ticari olarak elde edilebilen havuzlanmış monoklonal antikorların kullanılması daha pratiktir. Böylece, tek bir işlem ile örnekte etken olup olmadığı konusunda fikir sahibi olmak mümkündür. Eğer test sonucu pozitifse, örnek sekize bölünerek tek tek etkenlere yönelik özgül antikorlarla (negatif kontrol, RSV, AdV, Inf-A, Inf-B, PIV tip 1, 2, 3) tekrar boyanır ve klinik örnekte bulunan virus veya viruslar saptanır. Ayrıca test içeriğinde negatif kontrol olarak kullanılan "nonimmune mouse antiserum" ile özgül olmayan ışımalar ile gerçek pozitif sonuçlar ayırt edilir. Direkt örnekten yapılan immün floresan antikor testlerinde örneğin sitospinlenmesi ile duyarlılığın daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir[6-8]. Daha önce yapılan çalışmalarda, havuzlanmış monoklonal antikorların kullanıldığı direk tanı yöntemi, standart tanı yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Havuzlanmış monoklonal antikorlar ile yapılan indirek floresan antikor testi (hMAb-IFA), standart tüp kültürü sonuçları ile karşılaştırıldığında, duyarlılığının özellikle PIV, Inf-B ve AdV için çok düşük olduğu, RSV ve Inf-A için yüksek olduğu bildirilmiştir (Tablo IV)[9,10]. Diğer çalışmalardaki veriler de bu sonuçları destekler niteliktedir. Bu etkenler için duyarlılık ve özgüllüğün sırasıyla; RSV için %79-96 ve %70-100, Inf-A ve B için %33-88 ve %91-100, PIV için %31-94 ve %93-100, AdV için %28-69 ve %100 olduğu saptanmıştır[10,11].

Tablo IV: Solunum Viruslarının Tanısında Standart Tüp Kültürü İle Karşılaştırılan hMAb-IFA Testinin İki Çalışma Sonunda Saptanan Özgüllük ve Duyarlılıkları[9,10]

	Doing ve ark.		Stout ve ark.	
Solunum virusu	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
Inf-A	80.4	98.7	77.0	99.7
Inf-B	57.1	100.0	–	–
PIV (havuz ab)	66.7	100.0	–	–
PIV tip 1	–	–	57.0	100.0
PIV tip 2	–	–	25.0	100.0
PIV tip 3	–	–	33.0	100.0
RSV	81.9	98.0	87.0	98.0
AdV	55.6	100.0	50.0	100.0
Toplam saptama	76.2	96.0	–	–

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Viroloji hücre kültürü laboratuvarında rutin olarak yaklaşık bir yıldır (2002-2003) alınan sonuçlara göre, havuzlanmış monoklonal antikorlar (hMAb) kullanılarak sitospinlenmiş direk örnekten solunum viruslarının saptanması, patojenlerin uygun hücrelere tek tek ekim yapıldığı shell-vial hücre kültürü yöntemiyle karşılaştırıldığında (n=140) tüm viruslara karşı toplam duyarlılığının

%51, özgüllüğün %100 olduğu saptanmıştır (yayınlanmamış bilgi). Direk tanı yönteminin en iyi RSV ve Inf-A virusunu saptadığı, PIV ve AdV için ise yetersiz olduğu görülmüştür.

Havuzlanmış MAb-IFA testlerinde önce iki sitospinlenmiş preparat hazırlanıp, biri pozitif diğeri negatif boyama ile boyanır. Eğer sonuç pozitif ise, örnek her virusa özgül monoklonal antikor ile boyanarak tiplendirme yapılır. Bu işlemler sırasında zaman ve malzeme kayıpları göz önüne alınarak, hMAb'lar değişik renkte floresan veren kimyasallar ile işaretlenerek, ilk boyama sırasında tiplendirme amaçlanmıştır. Bu nedenle RSV monoklonal antikoru "rhodamin" ile diğer üç etkenin monoklonal antikoru (Inf, AdV, PIV) FITC ile işaretlenerek, eğer örnek pozitif ise ilk işlem sırasında tanı koymak amaçlanmıştır. Eğer örnekte portakal rengi floresan veren inklüzyon cisimcikleri varsa direk olarak RSV etken olarak bildirilmiş, yeşil floresan görülüyorsa diğer üç etken arasında tiplendirme yapılmıştır. Ayrıca, Inf-A ve Inf-B hem çekirdek hem de sitoplazmada inklüzyon cisimcikleri oluştururken, PIV sadece sitoplazmada inklüzyon cisimciği oluşturacağından, ilk işlem sırasında inklüzyon cisimcikleri oluşturma farklılıkları da göz önüne alınarak tiplendirmeye gidilmektedir[12].

HÜCRE KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ

Örnekten direk olarak yapılan immünofloresan testlerin duyarlılıkları Inf-A ve RSV'de yüksek bulunmakta ve epidemiyolojik olarak bu iki etkene daha sık rastlanmaktadır. Aynı zamanda her iki etkene yönelik etkin antiviraller bulunduğu için (Amantadin Türkiye'de yoktur) bir dereceye kadar direk tanı yöntemlerinin uygulanması tatminkardır, ancak diğer etkenler ve RSV ve influenzadaki sınırlamalar da göz önüne alındığında rutin uygulamada yeterli değildir. Standart tüp kültürü sonuçlarının elde edilmesi de uzun sürdüğü için bir çok viroloji laboratuvarında solunum yolu etkenlerinin izolasyonunda 1985 yılından beri "shell vial" (SV) hücre kültürü yöntemi kullanılmaktadır. Virusların yapılarına göre öncelikli tercih edilen hücreler ve yapılan çalışmalarda etkene göre izole edilme olasılığı yüksek olan hücreler şunlardır[13]: HEp-2, HeLa, PMK (pimer maymun böbrek): RSV için; MDCK ve HeLa: Inf-A ve B için; LLC-MK2, HEp-2 ve PMK: PIV 1-3 için; HEp-2, A-549 ve PMK: AdV için.

Santrifüjle güçlendirilmiş SV hücre kültürü yönteminde, virusların inkübasyon süresi 48-72 saattir. Bu süre özellikle AdV'ler için uzatılabilir. Ancak son zamanlarda yapılan karşılaştırılmalı çalışmalarda, bu sürenin 24 saate indirilebileceği gösterilmiştir. Her patojen için ayrı ayrı SV hücre kültürü hazırlanıp hepsi tek tek FITC ile işaretlenmiş monoklonal antikorlarla boyanarak 24, 48 saat ve 5 gün sonra incelenmiş ve aralarında 24 saat sonunda saptanan patojenlerle istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı gösterilmiştir[14,15]. Yapılan çalışmalarda, solunum viruslarının izolasyonunda standart tüp kültürü ile SV hücre kültürü yöntemi arasında istatistiksel bir fark bulunmamış ve SV hücre kültürü yöntemi standart ve moleküler yöntemlerle karşılaştırıldığında, duyarlılığı %94, özgüllüğü %97 olarak saptanmıştır[7,16].

Maliyet-etkinlik analizleri ve teknik ekibin harcadığı zaman göz önüne alınarak özellikle 90'lı yılların ortalarından itibaren tüm etkenleri aynı anda ve tek bir hücre kültüründe tanımlama yöntemleri geliştirilmiştir. Bir çalışmada, MDCK, HEp-2, LLC-

MK2 hücreleri aynı oranda tek bir SV içinde birleştirilmiş ve klinik örnek ekimleri bu karışık hücrelere yapılmıştır. Her hücrenin son konsantrasyonu 150.000 hücre /ml, üçünün birleştirilmesinde her hücreden bir SV içinde 50.000 hücre bulunacak şekilde konsantre edilmiştir. Örneklerin ekiminden 48 saat ve 6 gün sonra SV'ler FITC ile işaretlenmiş hMAb ile boyanmıştır. Pozitif olan örnekler tek tek hücrelere ekilerek tiplendirme yapılmış ve çift etkeni olan klinik örnekler de saptanmıştır. Etken saptanma oranları 48 saatlik inkübasyon sonrası %95.2, 6 günlük inkübasyon sonrası %98.2 olarak belirlenmiştir[15].

Bir diğer çalışmada, solunum viruslarının SV hücre kültürü yöntemi ile izolasyonunda "R-Mix FreshCells" adı verilen, mink akciğer hücreleri ve A-549 hücre kültürlerinin orantılı karışımından oluşan ve ticari olarak elde edilebilen hücre kültürleri geliştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra hMAb ile boyanarak etken tanımlaması yapılmış ve SV hücre kültürü, tüp kültüründen daha duyarlı bulunmuştur[17].

SV hücre kültürü yöntemi ile hem izolasyon hem de tiplendirmenin aynı anda yapılması amacıyla ticari kitler geliştirilmiştir. Böylece 24 veya 48 saatte hem izolasyon hem de tiplendirme aynı anda yapılarak zamandan kazanılmış ve maliyet düşürülmeye çalışılmıştır. MDCK, A549, LLC-MK2 ve RMK hücreleri belli konsantrasyonlarda karıştırılarak, örnek ekimleri bu hücrelere yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında tek bir hücre kültürü topluluğu, her biri ayrı renkte floresan veren maddelerle işaretlenmiş 4 monoklonal antikor ile ardışık olarak boyanmıştır. Tablo V'de monoklonal antikorların işaretlenmesinde kullanılan kimyasal maddeler ve verdikleri floresan rengi gösterilmektedir. Çok kısa sürede izolasyonun yanında, örnekte üreyen etkenlerin de tiplendirilmesi bu uygulamayla yapılabilmiştir. Tek dezavantajı işaretlemede kullanılan kimyasal maddelerin her birinin floresan mikroskobunda ayrı dalga boyunda filtreye gereksinim göstermesidir. Elde edilen sonuçlar tek tek yapılan SV hücre kültürü yöntemi ile karşılaştırılmış ve etkenleri saptamada bir fark görülmemiştir[18].

Tablo V: Monoklonal Antikorların İşaretlenen Kimyasallara Göre Verdikleri Floresan Renkler

Virusların Monoklonal Antikorları	Inf-A	Inf-B	RSV	PIV
İşaretlenen madde	FITC	Alkalen fosfataz	İndokarbosiyanin	AMCA*
Floresan rengi	Elma yeşili	Sarı-yeşil	Portakal rengi	Mavi

* Aminometil kumarinasetat

Solunum viruslarının hızlı tanısında maliyet-etkinlik çalışmasının yapıldığı bir çalışmada, iki yıl üst üste ayrı testler uygulanarak aradaki saptama hızı ve maliyet hesaplanmıştır[8]. İlk yıl klinisyenin solunum viruslarının tümünü veya birini istek yapmasına göre, örneklere tüp kültürü, EIA veya SV hücre kültürü yöntemlerinden biri uygulanmış, ikinci yıl sitospinlenmiş örneklere DFA testi uygulanmış ve pozitif

olan örnekler tek tek özgül monoklonalleri ile boyanarak tiplendirme yapılmıştır. Tüm viruslar için sonuçlar standart yöntemlerle karşılaştırıldığında, sitospinlenmiş örneklerde DFA testinin duyarlılığı %65.6, özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır. Viruslara göre duyarlılık ayrı ayrı hesaplandığında; Inf-A için %90, Inf-B için %14.3, AdV için %0 (hücre kültürü ile iki örnekte saptanmış, DFA'da saptanmamış) ve RSV için %100 bulunmuş, PIV etken olarak saptanmamıştır. İki yıl arasında test sonuçlarının rapor edilmesi, birinci yılda 4.5 günden ikinci yılda 0.9 güne düşmüş ve hastaların hastanede yatma süresi ve hasta başına maliyetin yarı yarıya azaldığı saptanmıştır[8].

MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLER

Günümüzde direk floresan testler ve/veya SV hücre kültürü yöntemi bazı laboratuvarlarda rutin uygulamalarda tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Tüp kültürünün altın standart olarak kabul edilmesine karşın sürenin uzun zaman alması (14 gün), SV hücre kültürünün özel ekipman ve eğitimli kişiler gerektirmesi, direk tanı yöntemlerinin ise duyarlılığının düşük olması gibi olumsuzlukları nedeniyle, dört patojeni aynı anda saptayacak ve tiplendirecek moleküler biyolojik yöntemler geliştirilmiştir. Her patojene yönelik tek etkeni saptayan moleküler biyolojik yöntemlein kullanıldığı ticari kitler günümüzde mevcuttur. Ancak bu virusların hepsinin tek tek moleküler yöntemlerle bile saptanması hem zaman alıcı hem de son derece pahalıdır. Diğer yöntemlerde olduğu gibi, zaman ve maliyetin azaltılmasına yönelik çalışmalarda etkenleri toplu olarak aynı reaksiyonda saptayabilen ticari kitler geliştirilmiştir. Bunların bazıları RSV, Inf A ve B, PIV tip 1-3'ü saptarken bazıları da RSV, Inf-A ve B ve AdV'yi saptamaktadır. "Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)-enzyme hybridization assay" (Multiplex PCR) yöntemi ile etkenlerin (RSV, Inf A ve B, PIV tip 1-3) amplifikasyonu tek bir reaksiyonda tamamlanmaktadır. Amplifikasyon işleminden sonra, PIV tip 1-3'ün hemaglütinin-nöraminidaz genini, Inf-A virusunun membran genini, Inf-B virusunun yapısal olmayan genini, RSV A ve B'nin 1b ve nükleokapsid genini hedefleyen probları içeren "supermix" ilave edilir. Hem olası etkeni saptama hem de eğer örnekte birden fazla etken bulunuyorsa tiplendirme aynı anda yapılmaktadır[19]. Hücre kültürü ve iki test arasında uyumsuz sonuçlar bulunduğu durumlarda başka bir bölgeyi çoğaltan primerlerin kullanıldığı PCR ile yapılan çalışmalarda tüm viruslar için duyarlılık %95-100, özgüllük %98-100 arasında bulunmuştur (Tablo VI) [20-22].

Tablo VI: Multiplex PCR Yönteminin Solunum Virusları İçin Duyarlılık ve Özgüllükleri[21-23]

Etken	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
PIV	100.0	95.3
RSV-A	98.0	98.0
RSV-B	100.0	99.7
Inf-A	95.8	98.7

Son zamanlarda "real time PCR" yöntemi ile bir reaksiyonda birden fazla etkenin saptanmasına yönelik diğer viruslarla yapılan çalışmalar mevcuttur. Amaçlanan hem kısa sürede hasta sonuçlarını elde etmek hem de hücre kültüründe bulunan bazı dezavantajlardan testi soyutlamaktır. Etkenlerin tümü lokal olarak yerleştiği için semptomların başlangıcından sonra en fazla 3-4 günde kendilerine özgül salgısal IgA ile oluşan antijen-antikor kompleksi, sürüntü örneklerinde standart hücre kültürü yöntemi ile virusun izole edilmesini engellemektedir. Ayrıca ısı farklılıklarına çok duyarlı oldukları için, örneğin taşınması uygun şekilde yapılmazsa hastada etken olarak bulunsa bile laboratuvara örnek gelinceye kadar olası patojen canlılığını yitirmekte ve hücre kültüründe üretememektedir[13,23]. Bu yöntemin standart kültür yöntemi ve diğer moleküler biyolojik yöntemlerden bir takım üstünlükleri vardır. Hücre kültürüne göre üstünlükleri; aynı gün içinde sonuç vererek tedaviye bir an önce başlanmasının sağlanması, taşıma sırasındaki olumsuz koşullardan ve antijen-antikor komplekslerinden etkilenmemesi, bu yüzden semptomların başlangıcından sonraki 7 gün içinde bile etkeni saptayabilmesi ve hasta örneğindeki çok düşük konsantrasyonlardaki virusu saptayabilme özellikleridir. Diğer moleküler biyolojik yöntemlere göre farkı ise, amplifikasyon aşamasında PCR ürününün varlığı izlenebildiği için PCR sonrası işlemlere (jel-elektroforezi) gereksinim duyulmaması ve bu nedenle kontaminasyon ve kimyasallarla temas riskinin olmaması, hedefe özgül "primer" ve floresan boyalarla işaretli "probe" kullandığından, diğer RT-PCR yöntemlerinden daha kolay uygulanabilirliği ve daha üstün saptama yöntemi olması şeklinde özetlenebilir. Ayrıca kantitatif sonuç verdiği için tedavi izleminde de kullanılabilmektedir[24-28]. "Real-time PCR" testi başta HIV, hepatit virusları ve herpesviruslar olmak üzere bir çok virusun saptanmasında kullanılmaktadır. Ancak henüz bu yöntem ile söz konusu virusların tümünü aynı anda saptayan yapılmış yayınlar mevcut değildir. Sadece Inf-A ve B virusunun tip ve subtiplerinin araştırıldığı ve AdV'ye ait birkaç çalışma bulunmaktadır[24-26].

SONUÇ

Solunum viruslarının hızlı tanısında klinik viroloji laboratuvarlarından en önemli beklentiler; en kısa zamanda etkenin tanımlanması ve ek tanı yöntemlerinin azaltılmasıdır. Bu şekilde, hastanın bir an önce etkin tedavisinin başlanması, hastanede kalış süresinin azalması, nozokomiyal enfeksiyonların önlenmesi ve yüksek riskli hastalarda hemen tedaviye başlayarak mortalite riskinin düşürülmesi ve gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesi mümkün olacaktır.

Yayınlar ışığında, rutin viroloji laboratuvarlarının uygulamalarında en olası yaklaşımın, herhangi bir solunum örneğinde etken olan virusların tümünün araştırılması isteniyorsa, öncelikle hMAb ile sitospinlenmiş örneklere direk tanı yöntemi uygulanarak bir ön sonuç alınması olduğu görülmektedir. Aynı gün, patojenlere yönelik hücreleri içeren SV hücre kültürlerine tek tek ekim yapılarak, 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra sonuçlar rapor edilmelidir. Direk testlerin dört virus göz önüne alındığında duyarlılığı düşüktür, ancak en sık izole edilen patojenler (RSV, Inf-A) için duyarlılıkları yüksek bulunmuştur. Dolayısıyla, günümüzde rutin viroloji laboratuvarlarında solunum viruslarının tanısında uygulanması önerilen en uygun

yaklaşımın, ilk olarak örneklerin tümüne hMAb ile DFA testinin yapılması ve pozitif çıkan örneklerin rapor edilmesi, negatif çıkan örneklerin ise hücre kültürü yöntemi ile doğrulandıktan sonra rapor edilmesi olduğu görülmektedir. Duyarlılık, özgüllük ve maliyet açısından yapılan çalışmalar arttıkça, günümüzde kullanılan yöntemlere göre daha avantajlı özellikleri bulunan ve söz konusu virusların tümünü aynı anda saptayabilecek özelliğe sahip olan "real time PCR" testi, çok yakın gelecekte uygulanan diğer yöntemlerin yerini alacak gibi gözükmektedir.

KAYNAKLAR

1. Kellogg JA: Culture vs direct antigen assays for detection of microbial pathogens from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial virus. Arch Pathol Lab Med 1991, 115: 451-457.
2. Boivin G, Hardy I, Kress A: Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (FLU OIA Test) in comparison with cell culture and reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol 2001, 39: 730-732.
3. Covalciuc KA, Webb KH, Carlson CA: Comparison of four clinical specimen types for detection of influenza A and B viruses by optical immunoassay (FLU OIA Test) and cell culture methods. J Clin Microbiol 1999, 37: 3971-3974.
4. Herrmann B, Larson C, Zweygberg BW: Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription PCR: Comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). J Clin Microbiol 2001, 39: 134-138.
5. 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.
6. Halstead DC, Todd S, Fritch G: Evaluation of five methods for respiratory virus detection. J Clin Microbiol 1990, 28: 1021-1025.
7. Matthey S, Nicholson D, Ruhs S, et al: Rapid detection of respiratory viruses by shell-vial culture and direct staining by using pooled and individual monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1992, 30: 540-544.
8. Barenfanger J, Drake C, Leon N, Mueller T, Troutt T: Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: An outcomes study. J Clin Microbiol 2000, 38: 2824-2828.
9. Doing KM, Jerkoesky MA, Dow EG, Jellison JA: Use of fluorescent antibody staining of cytocentrifuge prepared smears in combination with cell culture for direct detection of respiratory viruses. J Clin Microbiol 1998, 36: 2112-2114.
10. Stout C, Murphy MD, Lawrence S, Julian S: Evaluation of a monoclonal antibody pool for rapid diagnosis of respiratory viruses. J Clin Microbiol 1989, 27: 448-452.
11. Maitreyi RS, Broor S, Kabra SK, et al: Rapid detection of respiratory viruses by centrifugation enhanced cultures from children with acute lower respiratory tract infections. J Clin Virol 2000, 16: 41-47.
12. Landry ML, Ferguson D: SimulFluor respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimens by immunofluorescence staining. J Clin Microbiol 2000, 38: 708-711.
13. Wiedbrauk DL, Johnston SLG: Manual of Clinical Virology, 1993. Raven Press, New York.
14. 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.
15. Navarro-Mari JM, Gomez SS, Perez-Ruiz M, Rosa-Fraile M: Rapid detection of respiratory viruses by shell vial assay using simultaneous culture of HEp-2, LLC-MK2, and MDCK cells in a single vial. J Clin Microbiol 1999, 37: 2346-2347.

16. Olsen MA, Shuck KM, Sambol AR, Flor SM, O'Brien J, Cabrera BJ: Isolation of seven respiratory viruses in shell vials: A practical and highly sensitive method. J Clin Microbiol 1993, 31: 422-425.

17. Fong CK, Lee MK, Griffith BP: Evaluation of R-Mix FreshCells in shell vials for detection of respiratory viruses. J Clin Microbiol 2000, 38: 4660-4662.

18. Brumback BG, Wade CD: Simultaneous rapid culture for four respiratory viruses in the same cell monolayer using a differential multicolored fluorescent confirmatory stain. J Clin Microbiol 1996, 34: 798-801.

19. Lilios L, Jenney A, Spelman D, Kotbimbos T, Catton M, Wesselingh S: Comparison of a multiplex reverse transcription PCR enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. J Clin Microbiol 2001, 39: 2779-2783.

20. Kehl SC, Henrickson KJ, Hua W, Fan J: Evaluation of the hexaplex assay for the detection of respiratory viruses in children. J Clin Microbiol 2001, 39: 1696-1701.

21. Fan J, Henricksor KJ, Savatshi LL: Rapid simultaneous diagnosis of infections with respiratory syncytial viruses A and B, influenza viruses A and B, and human parainfluenza virus types 1, 2, and 3 by multiplex quantitative reverse transcription polimerase chain reaction enzyme hybridization assay (Hexaplex). Clin Infect Dis 1998, 26: 1397-1402.

22. Osiowy C: Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription PCR assay. J Clin Microbiol 1998, 36: 3149-3154.

23. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds): Pleuropulmonary and bronchial infections, pp:606-657. In: Principles and Practice of Infectious Disease. 1995, Churchill Livingstone Inc, USA.

24. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, Timm H, Pauli G: Application of a fluorogenic PCR for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. J Clin Microbiol 2000, 38: 1552-1558.

25. Wanhong XU, McDonough MC, Erdman DD: Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. J Clin Microbiol 2000, 38: 4114-4120.

26. Elden LJR, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, Loon AM: Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. J Clin Microbiol 2001, 39: 196-200.

27. Dejean AG, Manichanh C, Koon FT, et al: Development of a real time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. J Virol Methods 2002, 100: 27-35.

28. Hawrami K, Breuer J: Development of a fluorogenic polymerase chain reaction assay (TaqMan) for the detection and quantitation of varicella zoster virus. J Virol Methods 1999, 79: 33-40.