

ALT SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONU OLAN ÇOCUKLARDA SOLUNUM SİNSİTYAL VİRUS VARLIĞININ ÜÇ FARKLI YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS BY THREE DIFFERENT METHODS IN CHILDREN WITH LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION

Canan GÖKALP¹, Selma GÖKAHMETOĞLU¹, Esmâ SAATÇI DENİZ², Tamer GÜNEŞ³

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri. (selmag@erciyes.edu.tr)

² Nuh Naci Yazgan Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Kayseri.

³ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatri Anabilim Dalı, Kayseri.

ÖZET

Solunum sinsityal virusu [Respiratory Syncytial Virus (RSV)], bebek ve küçük çocuklarda alt solunum yolu enfeksiyonuna yol açan etkenlerden en önemlisidir. Bu çalışmada alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda RSV varlığının direkt immünfloresan antikor (DFA), hücre kültürü ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Kasım 2005-Mayıs 2006 tarihleri arasında klinik olarak alt solunum yolu enfeksiyonu tanısı koyularak hastaneye yatırılan, yaşları 0-24 ay arasında değişen 80 hastadan alınan nazotrakeal aspirat örnekleri dahil edilmiştir. Örneklerde RSV antijeni DFA (Monofluo Bio-Rad, Fransa) yöntemiyle, RSV-RNA varlığı gerçek zamanlı PCR (Fluorion Iontek, Türkiye) yöntemiyle araştırılmış, RSV'nin izolasyonu için Hep-2 hücre kültürleri kullanılmıştır. Çalışılan 80 örneğin 26 (%32.5)'sında DFA, 17 (%21.3)'sinde ise hücre kültürü yöntemiyle RSV pozitifliği saptanmıştır. Örneklerin 6 tanesi miktar yetersizliği nedeniyle PCR yöntemiyle çalışılmamış, çalışılan 74 hasta örneğinin 20 (%27)'sinde RSV-RNA pozitif bulunmuştur. Örneklerin 54'ü her 3 yöntemle de negatif, 12'si ise her 3 yöntemle de pozitif bulunmuş; DFA ve PCR ile pozitif bulunan 8 örnek hücre kültüründe negatif sonuç vermiştir. Miktar yetersizliği nedeniyle PCR çalışılmayan 6 örneğin 5'i hem DFA hem de hücre kültürü ile pozitif, 1'i ise sadece DFA ile pozitif olarak saptanmıştır. Hücre kültürü yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde DFA yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü %85.7, pozitif öngörü değeri %65.4 ve negatif öngörü değeri %100 olarak hesaplanmış; bu oranlar PCR için sırasıyla %100, %94.7, %85 ve %100 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, RSV enfeksiyonunun tanısında virus izolasyonu için klinik örneğin erken dönemde alınması ve hemen inoküle edilmesi gerektiği; hücre kültürü ve PCR yöntemlerinin uygulanamadığı, laboratuvarlarda ise görece olarak daha pratik, hızlı ve ekonomik olan DFA yönteminin rutin tanı amacıyla uygulanabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Solunum sinsityal virus, tanı, direkt immünfloresan, hücre kültürü, PCR.

ABSTRACT

Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the most important viral agent leading to lower respiratory tract infection in infants and children. The aim of this study was to investigate the presence of RSV by direct immunofluorescence antibody (DFA), cell culture and polymerase chain reaction (PCR) in children with lower respiratory tract infection. Nasotracheal aspirate specimens collected from 80 hospitalized patients aged between 0-24 months and clinically diagnosed as lower respiratory tract infection, during November 2005-May 2006 period, were included to the study. RSV antigen was investigated in clinical specimens by DFA method (Monofluo Bio-Rad, France). Hep-2 culture was used for isolation of RSV. RSV-RNA was investigated by real-time PCR (Fluorion Iontek, Turkey) in clinical specimens. RSV was found positive in 26 (32.5%) of 80 samples by DFA and in 17 (21.3%) samples by cell culture. Six specimens were not studied by PCR as sample amounts were not sufficient. Of the 74 samples tested, 20 (27%) were found to be positive by real-time PCR. Fifty-four of the samples were negative by 3 of the methods, while 12 were positive by all of them. DFA and PCR positive 8 samples yielded negative result in cell culture. Five of the 6 samples not investigated by PCR, were positive both in DFA and cell culture while 1 sample was positive only by DFA. Considering cell culture as the gold standard, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were found as 100%, 85.7%, 65.4% and 100%, respectively, for DFA and 100%, 94.7%, 85% and 100%, respectively, for PCR. As a conclusion for the accurate diagnosis of RSV infections the clinical samples should be collected in the early phase of the disease and inoculated to the cell cultures immediately for viral isolation. If cell culture or PCR facilities are not available for routine diagnosis, DFA method can be used for rapid and cost effective diagnosis of RSV infections.

Key words: Respiratory syncytial virus, direct immunofluorescence, cell culture, PCR.

GİRİŞ

Solunum sinsityal virusu (Respiratory Syncytial Virus; RSV), tüm dünyada bebek ve küçük çocuklarda alt solunum yolu enfeksiyonlarının başlıca sebebidir. RSV enfeksiyonları, büyük çocuk ve yetişkinlerde genellikle soğuk algınlığı ve üst solunum yolu enfeksiyonu şeklinde seyrederken, küçük çocuklarda pnömoni, bronşiyolit, trakeobronşit ve krup gibi ciddi enfeksiyonlara neden olabilir^{1,2}. Ayrıca RSV, morbiditesi yüksek olan nozokomiyal enfeksiyonlardan da sorumludur.

RSV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında, viral antijenlerin gösterilmesi, virusun izolasyonu, serolojik teknikler ve moleküler yöntemler uygulanmaktadır^{1,2}. Bu çalışmanın amacı, alt solunum yolu enfeksiyonu geçiren çocuklarda RSV varlığının direkt immünfloresan antikor (DFA), hücre kültürü ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri ile araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Yenidoğan ve Süt Çocuğu Servislerinde Kasım 2005-Mayıs 2006 tarihleri arasında pediatri uzmanları tarafından klinik olarak alt solunum yolu enfeksiyonu ön tanısı ile yatmakta olan, yaşları 0-24 ay arasında değişen 80 hastadan alınan nazotrakeal aspirat (NTA) örnekleri çalışmaya dahil edildi. Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı ile gerçekleştirildi. RSV antijen testi örnekler bekletilmeden uygulandı ve örnekler hücre kültürü ve PCR yöntemleriyle çalışılmak üzere 2 steril ependorf tüpüne ayrılarak -70°C'de saklandı.

Örneklerde RSV antijen varlığı, monoklonal antikorların kullanıldığı DFA (Monofluo BIO-RAD, Fransa) yöntemiyle kit prosedürüne uyularak araştırıldı. Her çalışmada pozitif ve negatif kontroller kullanıldı ve her mikroskop alanında (x400) karakteristik sitoplazmik granüler floresan veren hücrelerden en az bir tane görüldüğünde test pozitif kabul edildi.

Virus izolasyonu için, tüm NTA örneklerinden 200 µl tek tabaka halindeki Hep-2 hücre kültürü tüplerine ekim yapıldı. Tüpler 1 saat CO₂'li etüvde 37°C'de inkübe edildi. Süre sonunda tüpler boşaltıldı ve üzerlerine 2 ml idame besiyeri (%2 fetal sıgır serumu içeren RPMI 1640 besiyeri) eklendi. Tüpler CO₂'li etüvde 37°C'de inkübasyona bırakıldı ve hücreler 10 gün boyunca sitopatik etki (CPE) yönünden izlendi. RSV için karakteristik CPE (sinsitya ve dev hücre oluşumu) gözlenen ve gözlenmeyen tüm tüplerde DFA yöntemiyle (Monofluo BIO-RAD, Fransa) RSV antijeni araştırıldı. Klinik örneklerde RSV antijeni araştırılmasında ve hücre kültüründe RSV üremesinin desteklenmesinde aynı kit kullanıldı. Hücre kültürü tüplerinden hazırlanan preparat lamelle kapatılarak x100 ve x400 büyütmede floresan mikroskopunda incelendi. Her mikroskop alanında karakteristik sitoplazmik granüler floresan veren hücrelerden en az bir tane görüldüğünde test pozitif kabul edildi.

PCR yönteminde, örneklerden RSV-RNA izolasyonu QIAamp DNA Mini Kiti (QIAGEN-Almanya) ile testin prosedürüne uyularak yapıldı. PCR karışımı Fluorion RSV PCR kiti (İontek, Türkiye) kullanılarak hazırlandı. Amplifikasyon işlemi, Icyler (BIO-RAD, ABD) cihazında üretici firmanın önerilerine göre uygulandı. Reaksiyon sona erdikten sonra cihazın verdiği erime eğrisi analizlerine bakılarak klinik örneğe ait erime derecesi aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrollerin erime derecesiyle karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı.

Hücre kültürü altın standart olarak kabul edilerek DFA ve PCR testlerinin özgüllük ve duyarlılık oranları ile pozitif [positive predictive value (PPV)] ve negatif öngörü değerleri [negative predictive value (NPV)] hesaplandı³.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 80 örneğin 26 (%32.5)'sında DFA yöntemiyle, 17 (%21.3) 'sinde hücre kültürü yöntemiyle RSV pozitifliği saptanmıştır. Ancak 6 örnek miktar yetersizliği nedeniyle PCR yöntemiyle çalışılamamış, çalışılan 74 hasta örneğinin 20 (%27)'sinde RSV-RNA pozitif bulunmuştur.

Örneklerin 54'ü her 3 yöntemle de negatif, 12'si ise her 3 yöntemle de pozitif bulunmuştur. Buna karşın DFA ve PCR ile pozitif bulunan 8 örnek hücre kültüründe negatif sonuç vermiş; miktar yetersizliği nedeniyle PCR çalışılmayan 6 örnekten 5'i hem DFA hem de hücre kültürü ile pozitif, 1'i ise sadece DFA ile pozitif olarak saptanmıştır.

Hücre kültürü, DFA ve PCR yöntemleri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması Tablo I'de, hücre kültürü altın standart olarak kabul edildiğinde DFA ve PCR yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük, PPV ve NPV oranları ise Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo I. Hücre Kültürü, DFA ve PCR Yöntemleriyle Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması

	Hücre kültürü				Hücre kültürü		
	Pozitif	Negatif	Toplam		Pozitif	Negatif	Toplam
DFA Pozitif	17	9	26	PCR Pozitif	17	3	20
DFA Negatif	0	54	54	PCR Negatif	0	54	54
Toplam	17	63	80	Toplam	17	57	74*

* Miktar yetersizliği nedeniyle 6 örnekte PCR çalışılamamıştır.
DFA: Direkt immünfloresan antikor, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

Tablo II. DFA ve PCR Yöntemlerinin Duyarlılık, Özgüllük, PPV ve NPV Oranları

	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPV (%)	NPV (%)
DFA	100	85.7	65.4	100
PCR	100	94.7	85	100

DFA: Direkt immünfloresan antikor, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, PPV: Pozitif öngörü değeri, NPV: Negatif öngörü değeri.

TARTIŞMA

Bebek ve küçük çocuklarda (≤ 2 yaş) bronşiyolit ve pnömoninin en sık rastlanılan etkeni RSV olup, enfeksiyonun morbidite ve mortalitesi özellikle 6 aydan küçük bebeklerde yüksektir⁴⁻⁶. Ülkemizde, İzmir’de yapılan bir çalışmada, solunum yolu hastalığı olan ve yaşları 2.5 ay-12 yaş arasında değişen 131 çocuğun 6 (%4.6)’sında hücre kültürü yöntemiyle RSV izole edilmiştir⁷. Yine İzmir’de yapılan başka bir çalışmada Dereli ve arkadaşları⁸ 2 ay-2 yaş arasındaki akut bronşiyolitli 65 çocuğun 19 (%29.2)’unda hücre kültürü ve DFA ile RSV enfeksiyonunun varlığını bildirmişlerdir. Yılmaz ve arkadaşları⁹ iki farklı dönemde akut alt solunum yolu enfeksiyonu geçiren 2 yaşından küçük çocuklarda immünfloresans (IF) yöntemi ile yaptıkları çalışmada, ilk dönemde (Nisan 1994-1995) 188 hastanın 65 (%39.2)’inde, ikinci dönemde (Kasım 1995-Nisan 1996) 113 hastanın 39 (%34.5)’unda RSV antijeni göstermişlerdir. Ankara’da yapılan bir çalışmada hücre kültürü yöntemiyle, 80 bebekten alınan nazal sürüntü örneklerinin 20 (%25)’sinde RSV izole edilmiştir¹⁰. Bizim çalışmamızda RSV izolasyon oranı %21.3 olarak saptanmıştır. Örneklerin çalışma gününe kadar derin dondurucuda beklemiş olmasından dolayı çalışmamızda izolasyon oranı düşük olabilir.

Valdivia ve arkadaşları¹¹ 20 hastada RSV’yi hücre kültürü, PCR ve IF testleriyle araştırmışlar ve hücre kültürü yöntemini altın standart olarak kabul etmişlerdir. Aynı çalışmada PCR yönteminin duyarlılık, özgüllük ve doğruluk oranları sırasıyla %100, %80, %90 bulunurken, IF yöntemi için bu oranlar %100 olarak tespit edilmiştir. Whiley ve arkadaşlarının¹² çalışmasında, PCR, DFA ve DFA ile desteklenen kültür yöntemleri kullanılmış, DFA ve kültür yöntemlerinin kombinasyonu ile örneklerin %39’unda, PCR ile %41’inde RSV pozitifliği saptanmıştır. Bir diğer çalışmada RSV pozitifliği, PCR ile %11, DFA ile %8 ve hücre kültürü ile %6 oranlarında belirlenmiştir¹³. Tang ve arkadaşları¹⁴, nazal aspirat ör-

neklerinde PCR ve hücre kültürü yöntemleriyle RSV araştırmış ve PCR testinin duyarlılığını %94.4, özgüllüğünü ise %100 olarak rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada, solunum yolu semptomlu 383 hastanın burun yıkama suyu örneğinde RSV antijeni IF ile 143 (%37), hücre kültüründe 72 saat inkübasyondan sonra IF ile 119 (%31) hastada gösterilmiştir¹⁵. Aynı çalışmada hücre kültürü ile kıyaslandığında IF testinin duyarlılığı %89, özgüllüğü %85, 72 saat sonra yapılan IF testinin ise duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %80 ve %91 olarak bulunmuştur¹⁵. Halstead ve arkadaşları¹⁶ yaptıkları çalışmada, solunum yolu enfeksiyonu olan 117 çocukta DFA, hücre kültürü ve 3 ayrı ELISA yöntemi ile burun yıkama suyu örneklerinde RSV enfeksiyonunu araştırmışlar ve tüm yöntemlerle çocukların 77 (%65.8)'sinde RSV varlığını saptamışlardır. Aynı çalışmada DFA testinin duyarlılık, özgüllük, PPV ve NPV oranları sırasıyla %91.9, %96.4, %96.6 ve %91.4 olarak bulunmuştur¹⁶. Freymuth ve arkadaşları¹⁷ da, RSV'yi DFA, hücre kültürü ve 2 farklı PCR yöntemiyle araştırmışlar; DFA ve hücre kültürü yöntemlerini altın standart olarak kabul ettiklerinde duyarlılık, özgüllük, doğruluk, PPV ve NPV oranlarını 1. PCR yöntemi için sırasıyla %97.5, %63.9, %75.2, %57.8 ve %98, 2. PCR yöntemi için sırasıyla %89.7, %71.9, %77.7, %60.9 ve %93.5 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda hücre kültürü altın standart olarak alındığında, DFA yönteminin duyarlılık, özgüllük, PPV ve NPV oranları sırasıyla %100, %85.7, %65.4 ve %100 olarak saptanmış, bu oranlar PCR yöntemi için ise sırasıyla %100, %94.7, %85 ve %100 olarak belirlenmiştir. Sonuçlarımızın, diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmektedir^{11,14}.

Çalışmamızda, klinik olarak alt solunum yolu enfeksiyonu tanısı koyulan ≤ 2 yaş 80 çocuktan alınan örneklerin 26 (%32.5)'sında DFA, 17 (%21.3)'sinde ise hücre kültürü yöntemiyle RSV pozitifliği tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan örneklerden 6'sının miktarı yeterli olmadığı için PCR yöntemiyle çalışılamamış, PCR uygulanan 74 örneğin 20 (%27)'sinde RSV-RNA pozitif bulunmuştur. Çalışmamızda, her 3 yöntemle de hastaların 12 (%16.2)'sinde RSV varlığı saptanmış, ayrıca PCR ile çalışılamayan 5 hastada DFA ve hücre kültürü yöntemleriyle RSV pozitif bulunmuştur. Örnek yetersizliği sebebiyle PCR yöntemiyle çalışılamayan 1 hastada ise DFA yöntemiyle pozitiflik saptandığı halde hücre kültüründen RSV izolasyonu yapılamamıştır. Çalışmamızda DFA yöntemiyle saptanan %32.5 oranındaki RSV pozitifliği, Yılmaz ve arkadaşlarının⁹ 2. çalışma döneminde bildirmediği %34.5 oranıyla uyumludur.

Çalışmamızda 8 örnekte DFA ve PCR yöntemiyle RSV pozitif bulunduğu halde hücre kültüründen RSV izole edilememiştir. Bunun nedeni örneğin hücre kültürüne inokülasyonunun hemen yapılamaması olabilir. Ayrıca, örneğin enfeksiyonun başlamasını takiben erken dönemlerde alınması izolasyon için gereklidir⁹. Klinik örneklerin hepsi hastalığın erken döneminde alınmamış olabilir. Ahluwalia ve arkadaşları¹⁸ da benzer olarak IF yöntemi ile RSV antijenini gösterirken hücre kültüründen izolasyon yapamamışlardır.

Sonuç olarak, RSV enfeksiyonunun tanısında virus izolasyonu için klinik örneğin erken dönemde alınması ve hemen inoküle edilmesi gerektiği; hücre kültürü ve PCR yöntemlerinin uygulanamadığı laboratuvarlarda ise görece olarak daha pratik, hızlı ve ekonomik olan DFA yönteminin rutin tanı amacıyla uygulanabileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Bozkaya E. Solunum sisteminde enfeksiyon yapan viruslar, s: 294-317. Özbal Y, Gökahmetoğlu S (ed), Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji Kurs Kitabı. 2008, Kayseri.
2. Tristram DA. Respiratory syncytial virus, pp: 1378-88. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenen RH (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8th ed. ASM Press, Washington DC.
3. Özdamar K. Bioistatistik. 2003. Kaan Kitabevi, Ankara.
4. Shay DK, Holman RC, Newman RD, et al. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. JAMA 1999; 282: 1440-6.
5. Checchia P. Identification and management of severe respiratory syncytial virus. Am J Health Syst Pharm 2008; 65(23 Suppl 8): 7-12.
6. Weber MW, Milligan P, Hilton S, et al. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection leading to hospital admission in children in the western region of the Gambia. Int J Epidemiol 1999; 28: 157-62.
7. Yamazhan T, Dereli DG, Ertem E, Serter D. 1995-1996 kış mevsiminde, hücre kültürü yöntemi ile bölgemizde saptanan adenovirus, solunum sinsityal virusu ve parainfluenza enfeksiyonları. FLORA 1999; 4: 135-8.
8. Dereli D, Ertem E, Serter D, Şadimen M, Çoker M, Tanaç R. Detection of respiratory syncytial virus in children in the 1993-1994 winter season in Izmir, Turkey, by two diagnostic methods. APMIS 1994; 102: 877-80.
9. Yılmaz G, Aslan S, Uzel N ve ark. Akut alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda viral etkenler ve respiratory syncytial virus alt grupları. İnfeksiyon Derg 2000; 14: 157-64.
10. Aykut E, Özsan M. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan 0-1 yaş grubu bebeklerde etken olarak solunum sinsityal virusun hücre kültürü ve direk immünoperoksidaz yöntemleriyle araştırılması. Mikrobiyol Bul 1999; 33: 203-13.
11. Valdivia A, Savon C, Chacon D, et al. Analysis of respiratory syncytial virus in clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction restriction mapping. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92: 389-93.
12. Whiley DM, Symmis MW, Mackay IM, Sloots TP. Detection of human respiratory syncytial virus in respiratory samples by Light Cycler reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol 2002; 40: 4418-22.
13. Reis AI, Fink MC, Machado CM, et al; CHIADO and RDGV/FAPESP Research Groups. Comparison of direct immunofluorescence, conventional cell culture and polymerase chain reaction techniques for detecting respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates from infants. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2008; 50: 37-40.
14. Tang YW, Heimgartner PJ, Tollefson SJ, et al. A colorimetric microtiter plate PCR system detects respiratory syncytial virus in nasal aspirates and discriminates subtypes A and B. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34: 333-7.
15. Mezeire A, Mollat C, Lapied R, Billaudel S, Courtie AL. Detection of respiratory syncytial virus antigen after seventy-two hours of culture. J Med Virol 1990; 31: 241-4.
16. Halstead DC, Todd S, Fritch G. Evaluation of five methods for respiratory syncytial virus detection. J Clin Microbiol 1990; 28: 1021-5.
17. Freymuth F, Eugene G, Vabret A, et al. Detection of respiratory syncytial virus by reverse transcription-PCR and hybridization with a DNA enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 1995; 33: 3352-5.
18. Ahluwalia G, Embree J, McNicol P, Law B, Hammond GW. Comparison of nasopharyngeal aspirate and nasopharyngeal swab specimens for respiratory syncytial virus diagnosis by cell culture, indirect immunofluorescence assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1987; 25: 763-7.