

Atipik Pnömoni Etkeni Virusların Laboratuvar Tanısı

Güliden Yılmaz

Giriş

Solunum sistemi infeksiyonuna yol açan 200'ün üzerinde virus serotipinin oluşu, bu tür infeksiyonlarda viral etyolojik tanının rutin olarak uygulanmasını uzunca süre gereksiz kılmıştır. Bu incelemeler epidemiyolojik amaçlarla yapılmıştır. Ancak giderek artan sayıda antiviralin solunum sistemi infeksiyonlarında yaygın olarak kullanıma girmesi, bu virusların önemli hastane infeksiyonu etkenleri arasında olduğunun anlaşılması, viral tanının erken konmasının gereksiz antibiyotik kullanımı önleyeceğinin bilinci, diğer virus hastalıklarında olduğu gibi solunum yolu infeksiyonu etkeni viruslarının tanısında da hızlı tanı yöntemlerine gereksinimi doğurmuştur. Özellikle bazı antivirallerin dar spektrumlu oluşu hızlı idantifikasyona ek olarak özgül tanıya da ihtiyacı getirmiştir. Yakın zamanda artması beklenen antivirallerin bu gereksinimi daha da artacağı düşünülmektedir. Bunlara bağlı olarak rutin tanıda viroloji laboratuvarına aktif rol yüklenmiştir (1-4).

Erişkinlerde atipik viral pnömoni etkenleri arasında influenza A ve B virusları, adenoviruslar en sık karşılaşılanlardır. Diğer daha az sıklıkla görülen etkenler ise parainfluenza virusları, respiratory syncytial virus (RSV), rinovirus ve enteroviruslardır (5). Genelde viral pnömoni etkenlerinin çocukluk ve erişkin dönemde görülme sıklıkları farklılık gösterir (Tablo 1) (6). Alt solunum yolu infeksiyonuna yol açan virusların görülme sıklıkları bebeklerde ve erişkinlerde mevsimlere göre de değişiklik gösterir (Tablo 2) (7). Primer ve sekonder bağışıklık yetersizliği olanlarda olduğu gibi, sağlıklı kişilerde de birden fazla virusun aynı anda etken olduğu akut mikst infeksiyonlar görülebilmektedir. Solunum yolu infeksiyonu etkeni viruslar da bu tür mikst infeksiyonlara yol açabilirler. Birden fazla virusun etken olduğu bu tür infeksiyonlarda, en sık karşılaşılan etken RSV ve en sık birlikte etken olduğu virus ise influenza virusudur (8). Viral infeksiyonların laboratuvar tanısı başlıca üç şekilde yapılabilir:

Örnekten virusun izolasyonu ve idantifikasyonu; virus antijenlerinin ya da nükleik asidlerinin örnekten direkt olarak gösterilmesi; spesifik viral antikorların gösterilmesine dayanan serolojik tanı (4). Viral infeksiyonların tanısında kullanılan yöntemleri başlıca iki grup olarak incelemek de mümkündür: Geleneksel ve ye-

Tablo 1. Pnömoni Etkeni Virusların Yaşa Göre Görülme Sıklıklarının Farklılığı

	Etken Virus	
	Sık	Daha Nadir
Erişkinler	Influenza A	Adenovirus Herpes simpleks Varisella-zoster Sitomegalovirus
Çocuklar	RSV Parainfluenza 1-3 Influenza A	Kızamık Varisella-zoster Adenovirus

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Çapa-İstanbul
Atipik Pnömonielerin Laboratuvar Tanısında Yenilikler Simpozyumu (25 Mart 1994, İstanbul)'nda bildirilmiştir.

Tablo 2. Pnömonu Etkeni Virusların Mevsimlere Göre Dağılımı

Yaş	Yaz	Mevsim		
		Sonbahar	Kış	İlk bahar
Bebek	Para 3 Adeno	Para 3 Para 1 Cox A Echo	RSV Para 3 Flu A Adeno	RSV Para 3 Flu A Adeno
Çocuk	Adeno	Para 1 Cox A	Flu A,B Adeno	Flu A, B Adeno
Erişkin	Adeno	Cox A	Flu A,B Adeno	Flu A Adeno
Para-Parainfluenza Cox-Koksaki Flu-Influenza				

Tablo 3. Virolojide Geleneksel ve Yeni Tanı Yöntemleri

Yöntem	Tanısında Yöntemin Tercih Edildiği Virus
Geleneksel	
Hücre kültürü	HSV, RSV dışında diğer solunum sistemi infeksiyonu etkeni viruslar
Elektron mikroskopu	Rolavirus dışında diğer gastroenterit etkeni viruslar
Sitoloji	-
Histoloji	-
Seroloji	HIV, HAV, HBV, HCV, EBV, Rubella, Rubeola, Kabakulak, Arbovirus
Yeni	
Antijen	RSV, RV, VZV
Santrifüj-kültür	CMV
Hibridizasyon	EBV
Amplifikasyon	HIV, Parvovirus B 19.

ni yöntemler. Geleneksel yöntemler, hücre kültüründe virusun izolasyonu, elektron mikroskopu ile etkenin aranması, sitoloji ve serolojik yöntemlerden oluşur. Antijen tayini, santrifüj kültür (shell vial) yöntemi ile virus izolasyonu, hibridizasyon ve nükleik asid amplifikasyonu ise yeni yöntemleri oluşturmaktadır (Tablo 3). Pnömoni etkeni virusların laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler ise hücre kültürü ile virusun izolasyonu (klasik hücre kültürü ya da santrifüj kültür yöntemi ile), direkt olarak viral antijenin tayini (fluoresan antikor, FA) boyama ya da enzimimmünoessey (EIA) ile ya da nükleik asidin gösterilmesinden oluşur (hibridizasyon ya da amplifikasyon ile) (9).

Hücre Kültürü

Hücre kültüründe izolasyon, halen viral infeksiyonların tanısında "altın standart" olarak tanımlanan en duyarlı ve en özgül yöntemdir. Viroloji laboratuvarının belkemiği olarak tanımlanmaktadır. Son on yıl içinde bu alanda çok büyük değişiklikler olmuştur. Santrifüj kültür yöntemi ile ilk kez özellikle yavaş üreyen

Tablo 4. Solunum Yolu İnfeksiyonu Etkeni Virusların Hücre Kültüründe Üreme Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

• Rutin hücre kültürü teknikleri ile kolaylıkla ve sıklıkla izole edilenler	Adenovirus İnfluenza A ve B
• Gerek virusun stabilitesi gerekse özel kültür şartlarına gereksinim nedeni ile izolasyonu nispeten güç olanlar	Parainfluenza virusları RSV Rinoviruslar
• En iyi hayvan sistemlerinde üreyenler	
• Özel laboratuvarlarda üreyenler	Koronavirus
• Hücre kültüründe izole edilemeyenler	

virusların tanısında klinikçilere zamanında sonuç verme olanağı sağlanmıştır (10).

Üst solunum yolundan virus izolasyonu genellikle yeni infeksiyonu gösterir; çünkü bu bölgeden atılım genellikle hastalık başladıktan en çok 10-14 gün sonraya kadar devam eder. Üst solunum yollarında uzun süre saptanabilen ve normal florada kabul edilebileceği bildirilen tek virus herpes simpleks virusudur. Normal erişkinlerin % 5'nin üst solunum yollarından izole edilebileceği bildirilmektedir. Adenovirus izolasyonu da dikkatle yorumlanmalıdır. Akut viral infeksiyonu takiben 18 ay kadar asemptomatik virus atımı devam edebilmektedir (6,11).

Virusları hücre kültüründe üreme özelliklerine göre beş grupta toplamak mümkündür. Solunum yolu infeksiyonu etkeni virusların bu gruplara göre dağılımı Tablo 4'te gösterilmiştir (6).

Klasik Hücre Kültürü

Bu yöntem uygun hücre kültürünün seçilmesine, uygun örneğin inokülasyonuna, inoküle edilen hücrelerin uygun şartlarda devamına ve hücrelerin virus varlığı açısından incelenmesine (hemagglütinin, sitopatik etki) ve immünolojik reaktifler ile kültürün konfirmasyonuna dayanır.

Hücre kültürü seçimi: Hücre kültürü seçimi, hücrelerin belirli viruslara duyarlılığına, bu hücrelerde oluşan sitopatik etkinin özelliğine, üreme özelliklerine bağlıdır. Belirli virusların üretilmesi için ideal hücre kültürleri bilinmektedir. Buna bağlı olarak belirli örnekten izole edilmesi beklenen viruslara duyarlı hücre kültürü kombinasyonları rutin olarak kullanılmalıdır. Bu aşamada laboratuvar ve klinikçi arasında işbirliği çok önemlidir; çünkü belirli bir örnekten sıklıkla elde edilenlerin dışında ek bir virüsdan şüpheleniliyorsa bilinmesi ve gerekiyorsa o virusa en duyarlı hücre kültürünün de inokülasyonda kullanılması gerekmektedir. Tablo 5'te klasik hücre kültüründe solunum sistemi infeksiyonu etkeni virusları üretmekte kullanılan hücre kültürleri gösterilmiştir. Örnekler hücrelere ekildiğinde, kültürün aktif olarak büyüme safhasında, tam tabaka halinde ve kontaminasyondan ari olması gereklidir. Solunum sistemi infeksiyonu etkeni viruslar hücre kültürüne ekildikten sonra 7-28 gün süre ile izlenirler. Bu süre içinde sitopatik etki varlığı açısından gözlenirler. Sitopatik etki virus ile

Tablo 5. Solunum Yolu İnfeksiyonu Etkeni Virusların Klasik Hücre Kültüründe Üretilmesinde Kullanılan Hücreler

	Adenovirus	RSV	İnfluenza	Parainfluenza
PMK	+	+	+	+
HEK	+			
Hep-2	+	+		+
A549	+	+	+/-	+/-
Vero	+			
MRC-5	+			
HFF	+			
HeLa	+	+		

infekte hücrede oluşan morfolojik değişikliktir. Sitopatik etki kullanılan hücre kültürüne ve virusa göre farklılık gösterir. Deneysel bir göz sitopatik etkiye dayanarak virusu tahmin edebilir. Ayrıca replikasyonları sırasında bazı viruslar örneğin influenza ve parainfluenza virusları, konak hücre plazma membranında hemagglütinin oluştururlar. Bu hemagglütinler eritrosit bağladıkları için virus ile infekte hücreler tanımlanabilirler. Hemadsorbsiyon yöntemleri uygun, ucuz ve hızlı yöntemlerdir. 4°C ve 22°C derecedeki hemadsorbsiyon kıyaslanarak virus ayırımı yapmak da olasıdır. İnfluenza virusları 4°C ve 22°C derecede eşit hemadsorbsiyon yaptığı halde, parainfluenza infeksiyonlarında eritrositler kültür 22°C'ye ısıtıldığında infekte hücrelerden ayrılırlar. Hemadsorbsiyon kobay ve insan O grubu eritrositleri kullanılarak yapılabilir. Genellikle fosfat tamponlu sudaki % 0.5'lik kobay eritrositleri tercih edilir. Bazı laboratuvarlar hemagglütinasyonu tercih etmektedir. Bu amaçla hücre kültürü sıvısını kullanılmaktadır. O halde hücre kültürü izlenirken gözlenen sitopatik etki ve belirli aralarda uygulanan hemadsorbsiyon ya da hemagglütinasyon deneylerine dayanarak belirli bir virüsün üremekte olduğundan şüphe edilebilir; ancak kesin tanı pozitif hücrelerin peroksidaz ya da fluoresan ile işaretli özgül antikorlar ile boyanarak mikroskop altında gösterilmesi ile koyulur.

Örnek alımı: Örneğin uygun bölgeden ve zamanında alınması gereklidir. Çoğu solunum sistemi infeksiyonu etkeni virus kısa sürede atılır. Buna bağlı olarak hastalığın erken döneminde özellikle ilk üç gün içinde örnek gönderilmelidir. Bakteri ve mantar infeksiyonlarındakinin tersine viral alt solunum yolu infeksiyonlarının tanısında alt solunum yolu örneklerine gereksinim yoktur. En uygun örnek nazofarinksten sonda kullanarak aspirasyon ile alınmış örnektir. Eğer başka nedenler ile alınmışa bronkoalveoler lavaj sıvısı da kullanılabilir. Kişide başgışıklık yetersizliği söz konusu ise bronkoalveoler lavaj sıvısına gereksinim vardır. Örnek özel transport besiyerlerinde ve buz üzerinde mümkün olduğunca çabuk laboratuvara gönderilmelidir. Özellikle RSV izolasyonu için dondurup bekletmeden örneğin hemen ekilmesi gerekmektedir. Hemen ekilemiyorsa 24 saat 2-8°C'de bekletilebilir. Daha uzun süre bekletmek için -70°C'de dondurulması, tekrarlayan dondurma çözme işlemlerinden kaçınılması gerekmektedir (10,12).

Hücre kültürü genellikle yavaş olmasından dolayı kritik edilir. Virusu saptama süresi, genellikle izole edilen virusa göre değişir. İnfluenza virusunun genellikle beş, RSV'nin ve parainfluenzanın yedi ve adenovirusun 9 günde izole edildiği bildirilmektedir (9).

Santrifüj Kültür (Shell-Vial) Yöntemi

Viroloji alanında 1980'li yılların en heyecan verici uygulaması santrifüj kültür yöntemidir. Virolojide bu yöntem ilk kez sitomegalovirus'un üretilmesinde kullanılmıştır. Bu yöntemde kültür ve antijen tayin yöntemleri birleştirilmektedir. Örnek hücre kültürü üzerine santrifüj edilir, böylece hücrelerin infeksiyonu kolaylaştırılmış olur. 1-3 gün sonra sitopatik etki oluşumunu beklemeden infekte hücrelerdeki viral antijenler işaretli özgül monoklonal antikorlar ile boyanır. Floresan ile işaretli monoklonal kullanıldı ise özel floresans mikroskopunda, peroksidaz ile işaretli monoklonal kullanıldı ise ışık mikroskopunda incelenerek infekte hücreler saptanır (9). Genel olarak santrifüj kültür yönteminin duyarlılığı % 70-100 olarak bildirilmektedir. Klasik hücre kültürüne göre daha az duyarlı oluşu dezavantajı ve hızı tercih edilme nedenidir. Duyarlılığı çeşitli faktörlere bağlıdır: Kullanılan hücrenin çeşidi, yaşı, kullanılan şişe sayısı, santrifüj hızı, boyamada kullanılan monoklonallerin seçimi (13). Santrifüj kültür yöntemi ile kullanılacak hücreler Tablo 6'da bildirilmiştir. Genellikle tercih edilen klasik ve santrifüj kültür yöntemini birlikte kullanmak (10).

Antijen Tayini

1980'li yıllarda diyagnostik virolojideki bir önemli diğer gelişme, klinik örneklerden viral antijenlerin tayininin yaygın olarak kullanıma girmesidir. Bu amaçla hem floresan antikor (FA) hem

Tablo 6. Solunum Yolu Enfeksiyonu Etkeni Virusların Santrifüj Kültür Yöntemi ile Üretilmesinde Kullanılan Hücreler

	Adenovirus	RSV	İnfluenza	Parainfluenza
PMK	+	+	+	+
Hep-2	+	+		
A549	+	+	+	+
MRC-5	+	+	+	

de enzim immünoessey (EIA) kullanılmaktadır. Monoklonal antikorların kullanıma girmesi ile bu yöntemlerin özgüllük ve duyarlılıkları da artmıştır. Antijen tayini solunum yolu enfeksiyonu etkenlerini saptamada RSV için en tercih edilen yöntemdir. RSV dış şartlara çok duyarlı bir virus olduğundan, infektivitesini çok kolay kaybedebilmesi, diğer solunum yolu enfeksiyonu etkeni virüslerin tayininde ilk tercih olan hücre kültürünün, bu virüsün tanısında ikinci tercih olmasına yol açmaktadır. Ayrıca hastalığın ileri safhasında oluşabilen antikor-virus kompleksi yine hücre kültürü ile izolasyonu güçleştirebildiğinden, bu dönemde de antijen tayini avantajlı olabilmektedir (9). Kullanılan örnek tercihan nazofarinksten aspirasyonla alınan sekresyondur. Örneğin enfeksiyonun erken döneminde en geç yedinci günde kadar alınması gereklidir. Laboratuvara buz üzerinde ulaştırılmalıdır. Örneğin kalitesi de bu yöntemin duyarlılığı açısından çok önemlidir. İçinde mutlaka yeterli miktarda infekte hücre içermesi gereklidir. FA yönteminin bir avantajı alınan örneğin yeterince hücre içerip içermediğinin saptanmasına olanak sağlamasıdır. Örnek lama fikse edildiğinde her kuyucukta en az 25 silialı epitel bulunmalıdır. Bu özelliği taşımayan örneğin FA sonucu "yetersiz hücre görülmüştür" olarak bildirilerek tekrar örnek istenir. FA yönteminin bu avantajına rağmen sonuçların değerlendiriminin sübjektif oluşu dezavantajları arasındadır. Bu dezavantaj, sonuçlar deneyimli kişiler tarafından değerlendirilerek giderilebilir. Gerek EIA gerekse FA yönteminde özgül monoklonallerin seçimi duyarlılığı etkileyen en önemli faktördür (3,13).

Nükleik Asidin Gösterilmesi

Solunum yolu enfeksiyonu etkeni virüsleri saptamada bugün için kullanılan gerek hücre kültürü gerekse antijen tayini kolaylıkla uygulanabildiğinden ve yeterli duyarlılık ve özgüllükte olduklarından, nükleik asidin gösterilmesine rutin tanıda acilen gereksinim yoktur. Ancak araştırma amaçlı çeşitli çalışmalarda solunum sistemi enfeksiyonu viral etkenlerin saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR-Polymerase chain reaction) kullanılmakta ve diğer yöntem-

lerle karşılaştırılmaktadır. Ancak kısa dönemde PCR rutin tanıda diğer yöntemleri yerini alacak gibi görülmemektedir (14,15).

Kaynaklar

1. Matthey S, Nicholson D, Rutis *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: 540-4
2. Leonardi GP, Leib H, Birkhead GS, Smith C, Costello P, Conron W. Comparison of rapid detection for influenza A virus and their value in health-care management of institutionalized geriatric patient. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 70-4
3. Miller H, Milk R, Diaz-Mitoma F. Comparison of the Vidas RSV assay and the Abbott testpack RSV with direct immunofluorescence for detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1336-8
4. Yolken HY. Laboratory diagnosis of viral infections. In: Galasso, GJ, Whitley RJ, Merigan TC eds. *Practical Diagnosis of Viral Infections*. New York: Raven Press, 1993: 17-67
5. Donowitz GR, Madell GL. Acute pneumonia. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1990: 540-52
6. Menegus MA, Douglas RG. Viruses, rickettsiae, chlamydiae and mycoplasmas. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1990: 193-205
7. Couch RB. Respiratory diseases. In: Galasso, GJ, Whitley RJ, Merigan TC eds. *Practical Diagnosis of Viral Infections*. New York: Raven Press, 1993: 143-8
8. Waner JL. Mixed viral infections. Detection and management. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 143-51
9. Storch GA. The diagnosis of viral infections. *Infect Dis Clin Pract* 1993; 2: 1-20
10. Danny LW, Sheryl LG. *Manual of Clinical Virology*. New York: Raven Press, 1993: 11-7
11. Greenberg SB, Krilov L. Laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Cumitech* 21. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1986: 1-16
12. Minnich LL, Thomas FS, Ray CG. Rapid detection of viruses by immunofluorescence. *Cumitech* 24. Washington, DC: American Society for Microbiology 1988: 1-13
13. Smith TF, Wold AD, Espy MJ, Marshall W. New developments in the diagnosis of viral diseases. *Lab Diag Infect Dis* 1993; 2: 183-201
14. Cherian T, Bobo L, Steinhoff MC, Karron RA, Yolken RH. Use of PCR-enzyme immunoassay for identification of influenza A virus Matrix RNA in clinical samples negative for cultivable virus. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 623-8
15. Karron RA, Froehlich JL, Bobo L, Belshe R, Yolken RH. Rapid detection of parainfluenza virus type 3 RNA in respiratory specimens. Use of reverse transcription PCR-enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 484-8