

# Çeşitli Viral Etkenlerin Nazofarinks Aspirasyon Sıvısında İndirekt İmmünofluoresans Yöntemi ile Saptanması

Gülden Yılmaz<sup>1</sup>, Emel Bozkaya<sup>1</sup>, Salih Türkoğlu<sup>1</sup>, Selim Badur<sup>1</sup>, Enver Tali Çetin<sup>1</sup>, Nuran Salman<sup>2</sup>  
Sibel Aşkın<sup>2</sup>

**Özet:** Nazofarinksten aspirasyonla alınan 176 numunenin indirekt immünofluoresans yöntemi ile incelenmesi sonucu 20'sinde (% 11) respiratory syncytial virus, ikisinde (% 1) influenza A virusu, birinde (% 0.6) adenovirus saptanmıştır. İnfluenza B ve parainfluenza 1,2,3 virüsleri bulunmamıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Respiratory syncytial virus, adenovirus, influenza A,B virusu, parainfluenzavirus 1,2,3, indirekt immünofluoresans yöntemi

**Summary:** Detection of viral agents in nasopharyngeal aspirates by immunofluorescence. In 176 nasopharyngeal aspirates, respiratory syncytial virus was detected in 20 (11%), influenza A virus in two (1%) and adenovirus in one (0.6%) of the material by indirect immunofluorescence. Influenza B and parainfluenza 1,2,3 viruses were not detected.

**Key Words:** Respiratory syncytial virus, adenovirus, influenza A, B virus, parainfluenzavirus 1,2,3, indirect immunofluorescence

## Giriş

Bebek ve çocuk ölüm oranlarının çok yüksek olduğu gelişmekte olan ülkelerde akut solunum yolu infeksiyonları ve ishal, morbidite ve mortalitenin ana nedenleridir. 5 yaşın altındaki çocuklarda her yıl görülen 15 milyon ölümün % 25-30'u akut solunum yolu infeksiyonlarına bağlıdır. Hastanede tedavi altına alınan pnömone olgularının % 80'inde *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae*'nin etken olduğu saptanmıştır. Çocuklarda akut alt solunum yolu infeksiyonlarının geriye kalan kısmının çoğu ise viral kaynaklıdır. Bu tür infeksiyonlara en sık yol açan virüsler respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenzavirus tip 1,2,3, influenza A ve B virüsleri ve adenovirüslerdir.

Solunum yolu infeksiyonu yapan virüslerden özellikle RSV'nin 2 yaş altı çocuklarda pnömone ve bronşiyolitlerde en sık karşılaşılan etken olduğu bildirilmekte ve her yıl bebeklerde ve özellikle akciğer ve kalp hastalığı olan çocuklarda önemli mortalite ve morbidite nedeni olduğu bilinmektedir. RSV infeksiyonlarının ribavirin ile; influenza A virus infeksiyonlarının amandatin ve rimandatin ile tedavisi mümkün olmaktadır. Etken virüsün saptanarak mümkünse uygun spesifik antiviral tedavinin zamanında başlanabilmesi, gereksiz antibiyotik kullanımının engellenebilmesi ve bu virüslerin neden olabilecekleri hastane infeksiyonlarının önlenmesi için alt solunum yolu infeksiyonlarında etken olabilecek virüslerin hızlı tanısı önem kazanmaktadır (1-6).

Bu çalışmada, 176 nazofarinks aspirasyon sıvısında RSV, parainfluenzavirus tip 1,2,3, influenza A ve B virüsleri ve adenovirus indirekt immünofluoresans (IF) yöntemi ile incelenmiştir.

## Yöntemler

Nazofarinksten alınan 176 örnek incelenmiştir. Nazofarinks aspirasyon sıvıları, nazogastrik sonda kullanılarak klinikçi hekim tarafından alınmıştır. Sonda ön burun deliklerin-

den nazofarinkse sokulmuş, ucuna iğnesi çıkarılmış 10 ml'lik enjektör takılıp emilim uygulanarak sekresyon elde edilmiştir. Örnek hemen laboratuvara ulaştırılmıştır. Örnekteki hücreleri mukustan arındırmak için pH 7.2-7.8 olan fosfat tamponlu su ile yıkanmıştır. Bu amaçla önce örneğe 5 ml fosfat tamponlu su eklenerek yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra üst sıvı dökülerek çökelektan kuyucuklu lamaların kuyucuklarına 20 µl koyulmuştur. Numune kuruduktan sonra lam asetonda 10 dakika fikse edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan lama indirekt IF yöntemi uygulanmıştır. RSV, influenza A ve B virüsleri, parainfluenzavirus tip 1,2,3 ve adenovirus'u saptamak için Diagnostics Pasteur monoklonal antikor kitleri kullanılmıştır. Önce her bir virüsü saptayabilmek için ayrı kuyucuklardaki numuneye birer damla spesifik antikor koyulmuştur. 37°C'de nemli ortamda yarım saat inkübe edilerek fosfat tamponlu su ile yıkanmıştır. Tekrar kuyucuklara floreseyn izotiyosiyanat ile işaretli ilk antikora karşı antikor, yani konjuge koyularak yine inkübe edilmiştir. Yıkama işleminin ardından preparatlar kurutulduktan sonra tamponlu gliserol koyulup kuyucukların üzerine lamel kapatılmıştır. Bu şekilde boyanan numuneler floresan mikroskopta (Olympus BH2-RFL) 400'lük büyütmeye incelenmiştir.

## Sonuçlar

İncelenen 176 nazofarinks aspirasyon sıvısının 23'ünde (% 13) indirekt IF ile virus saptanmıştır. 23 örnekten 20'sinde saptanan RSV (% 11), ikisinde influenza A virusu (% 1) ve birinde adenovirüstür (% 0.6) (Tablo 1).

## İrdeleme

Hastadan alınan örnekte direkt olarak virus partiküllerinin, antijenlerinin ya da nükleik asitlerinin saptanması, viral hastalıkların hızlı tanısında kullanılmaktadır. Virus partiküllerinin tayini elektron mikroskobu ile, nükleik asitlerin tayini ise hibridizasyon yöntemleri ile olmaktadır. Antijen tayini için ise spesifik monoklonal antikorların kullanıldığı immünojenik yöntemler uygulanmaktadır. IF yöntemi, katıfaz immünoesseyler (enzyme immunoassay "EIA" ve radioimmunoassay "RIA") ve latex aglütinasyonu bu immünojenik yöntemlerdendir (7).

(1) İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Çapa-İstanbul

(2) İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çapa-İstanbul

**Tablo 1. 176 Örneğin İndirekt IF Yöntemi İle İncelenmesi Sonuçları**

Antijeni Aranılan Virus	İncelenen Örnek Sayısı	Pozitiflik Saptanan Örnek Sayısı (%)
RSV	176	20 (% 11)
İnfluenza A virusu	176	2 (% 1)
İnfluenza B virusu	176	-
Adenovirus	176	1 (% 0.6)
Parainfluenzavirus 1,2,3	176	-
<b>Toplam</b>	<b>176</b>	<b>23 (% 13)</b>

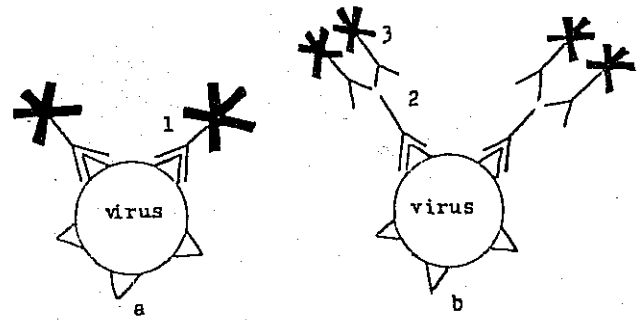
Viral infeksiyonların tanısında hücre kültürü genelde en duyarlı yöntemdir. Çok az sayıdaki virusun çoğaltılıp saptanmasını sağlar. Oysa RSV için bu geçerli değildir. Virus dış ortam şartlarına çok duyarlıdır. Bu nedenle uygun şartlarda transportu sağlansa da, IF yöntemi ile direkt virusun saptanmasının, hücre kültüründen daha duyarlı olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (8,9).

Bu nedenle IF yönteminin en yaygın kullanım alanlarından biri, RSV'nin önemli etken olduğu solunum yolu infeksiyonlarının hızlı tanısıdır (7). Bu çalışmada nazofarinks aspirasyon sıvılarında IF yöntemi ile dört virus araştırılmıştır. Çeşitli çalışmalarda solunum yolu infeksiyonlarında etken virusların IF ile incelenmesinde en uygun örneğin nazofarinks aspirasyon sıvısı olduğu gösterilmiştir (8,10). IF yönteminde örnekte infekte hücrelerin bulunması gereklidir. Oysa katı-faz immünoesseylerde ekskrate edilen antijenler de tayı edilebilmektedir (7). IF yönteminin bir üstünlüğü, mikroskopla inceleme sırasında örneğin uygun olarak alınıp alınmadığının saptanabilmesidir. Yeterince epitel hücreleri içermeyen örneğin uygun olmadığı kabul edilmektedir (11).

IF ile, alınacak örneğin uygun zamanda alınması ve laboratuvara ulaştırılması deneyin duyarlılığı açısından önem taşımaktadır. Örnek, infeksiyonun akut döneminde alınmalıdır. Alınan örnek hemen laboratuvara ulaşamayacaksa, buz üzerinde laboratuvara gönderilmelidir; çünkü örneğin uzun süre oda ısısında veya aşırı sıcakta kalması IF yöntemi ile saptanan virus antijenlerine zarar verecek, deneyin duyarlılığını azaltacaktır (7).

Bu çalışmada indirekt IF yöntemi kullanılmıştır (Şekil 1). Sıklıkla kullanılabilen diğer yöntem direkt IF yöntemidir. Direkt yöntemde antijene karşı floreseyn ile işaretli konjuge numune üzerine koyularak inkübe edilir ve yıkama işlemini takiben incelenir. Direkt yöntemin üstünlüğü tek aşamalı olup daha az zaman alır. Ayrıca daha özgüldür. İndirekt yöntem ise daha duyarlıdır. Monoklonal antikorların kullanımını da çapraz reaksiyonları önleyerek yalnızca pozitiflikleri en aza indirmiştir (11). Bu çalışmada kullanılan kitler de monoklonal antikor içermektedir.

Akut solunum yolu infeksiyonları bebeklik ve çocuklukta en sık karşılaşılan hastalıktır (12). Çocukluk çağında en sık viral pnömoni etkenleri RSV, parainfluenzavirus tip 1,2,3 ve influenza A virusudur. Erişkinlerde ise en sık viral etkenler influenza A,B virusları ve adenoviruslardır (13). Bronşiyolit etkenlerine gelince en sık karşılaşılan etkenlerin RSV ve ikinci sırada parainfluenza viruslarının olduğu bildirilmektedir (14). Parainfluenza virusları krupla en sık tanımla-



**Şekil 1. IF yöntemi**

a- Direkt IF: 1. floreseyn izotiyosiyonat ile işaretli antikor

b- İndirekt IF: 2. spesifik antikor

3. Spesifik antikora karşı floreseyn izotiyosiyonat ile işaretli antikor

nan etkenlerdir (16).

Bu çalışmada 176 numuneden 23 (% 13.1)'ünde pozitif sonuç elde edilmiştir. Grover ve arkadaşları (8) yaptıkları çalışmada 769 materyeli virus yönünden incelemişler, 197 (% 25.6)'sinde pozitif sonuç elde etmişlerdir. Bunların 157'sinde RSV, 12'sinde parainfluenza virusu, 7'sinde adenovirus saptamışlardır. 6190 numunenin solunum yolu virusları yönünden incelendiği bir başka çalışmada 1388 numunede % 22 oranında pozitiflik saptanmıştır. 826 numunede RSV, 91 numunede influenza A, 13 numunede influenza B virusu, 80 numunede parainfluenza 3 virusu, 224 numunede adenovirus saptanmıştır (7).

Bu çalışmada da en sık saptanan viral etken RSV olmuştur (Şekil 2). RSV tüm dünyada yaygın olarak bulunmaktadır. Genelde kış ve ilkbahar aylarında salgınlar yapmaktadır. Çocukların ilkokul çağına gelmeden bu virusla infekte oldukları bildirilmektedir. Ancak infeksiyon sonucu tam bağışıklık gelişmemekte ve reinfeksiyon görülebilmektedir. İleri yaşlarda reinfeksiyonlar genelde üst solunum yolu infeksiyonu şeklinde geçirilmektedir (3).

Kocabaşoğlu ve arkadaşları (15) yaptıkları çalışmada indirekt floresan antikor tekniği ile 0-20 yaş grubunda RSV IgG cinsi antikorları araştırmışlardır. İnceledikleri 175 serumun 149'unda (% 85.1) spesifik IgG cinsi antikorları saptamışlardır. Bu epidemiyolojik çalışma RSV infeksiyonun tüm dünyada olduğu gibi yurdumuzda da yaygın olduğunu desteklemektedir. Bizim yaptığımız çalışmada da RSV'nin en sık saptanan viral etken olduğu görülmüştür.

RSV infeksiyonlarının ribavirin ile; influenza A virusu infeksiyonlarının amantadin ve rimantadin gibi antiviral ilaçlar ile tedavileri mümkündür. Bu nedenle gereksiz antibiyotik kullanımını önlemek ve spesifik antiviral tedaviye en kısa zamanda başlayabilmek amacı ile özellikle çocuklarda alt solunum yolu infeksiyonlarında, öncelikle RSV ve diğer virusların hızlı tanısı için nazofarinks aspirasyon sıvısının IF ile incelenmesi uygundur.

#### Kaynaklar

1. WHO. Programme for Control of Acute Respiratory Infections: 1988 Programme Report. Document WHO/ARI/89.3.



Şekil 2. IFA yöntemi ile boyanan ve RSV antijeni içeren nazofarinks aspirasyon sıvısının floresan mikroskopundaki görüntüsü

2. WHO. *Acute Respiratory Infections*. Document WHO/ARI/90.17.
3. McIntosh K, Chanock RM. Respiratory syncytial virus. In: Bernard NF, David MK, Robert MC, Martin SH, Joseph LM, Thomas PM, Bernard R, eds. *Virology*. New York: Raven Press, 1990: 1045-66.
4. Betts RF, Douglas RG Jr. Influenza virus. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1990: 1306-25.
5. Baum SG. Adenovirus. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1990: 1185-91.
6. Grendies M. Paramyxoviridae. The parainfluenza viruses. In: Lenette EH, Halonen P, Murphy FA, eds. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice. Vol II. Viral, Rickettsial, and Chlamydial Diseases*. New York: Springer-Verlag, 1988: 484-506.
7. Arstila P, Halonen PE. Direct antigen detection. In: Lenette EH, Halonen P, Murphy FA, eds. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice. Vol II. Viral, Rickettsial, and Chlamydial Diseases*. New York: Springer-Verlag, 1988: 69-75.
8. Grover S, Watkins P, Örvell C, Booth J. Comparison of direct immunofluorescence of exfoliated cells (DIF), tissue culture immunofluorescence (TCIF) and conventional virus isolation (CVI) for the diagnosis of respiratory virus infection. *Serodiagn Immunother Infect Dis* 1990; 4: 59-66.
9. Moris DJ, Semple D. Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by direct immunofluorescence using monoclonal antibodies. *Serodiagn Immunother Infect Dis* 1990; 4: 53-7.
10. Ahluwalia G, Embree J, McNicol P, Barbara L, 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; 5: 763-7.
11. Minnich LL, Smith TF, Ray CG. Rapid detection of viruses by immunofluorescence. In: Specter S, coordinating ed. *Cumitech 24* Washington DC: American Society for Microbiology, 1989.
12. Hendley JO. Parainfluenza viruses. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1990: 1255-60.
13. Donowitz GR, Mandell GL. Acute pneumonia. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1990: 540-55.
14. Hall CB, Holl WJ. Bronchiolitis. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1990: 535-40.
15. Kocabeyoğlu Ö, Yücel N, Emekdaş G, Özcan N: Respiratory syncytial virus antijenlerinin Vero hücre kültüründe üretilmesi ve 0-20 yaş grubunda RSV IgG antikorları dağılımı. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg* 1990; 20: 72-8.
16. Kendal A, Harmon NW. Orthomyxoviridae: The influenza viruses. In: Lenette EH, Halonen P, Murphy FA, eds. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice. Vol II. Viral, Rickettsial, and Chlamydial Diseases*. New York: Springer-Verlag, 1988: 484-506.
17. Hall CB. Respiratory syncytial virus. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1990: 1265-75.