

Erişkinlerde Respiratory Syncytial Virus (RSV) Nötralizan Antikor Prevalansının Araştırılması

Dr. Murat ÖZSAN¹, Dr. Aykut ÖZKUL², Dr. A. Tefik CENGİZ¹,

Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı¹,
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı² ANKARA

✓ Respiratory syncytial virus (RSV) tüm dünyada yaygın olarak bulunmakta ve insanlarda solunum yolları infeksiyonlarına yol açmaktadır. Bu infeksiyonlar özellikle küçük çocuklarda ciddi alt solunum yolları hastalıkları oluşturabilmekte ve azda olsa ölümle sonuçlanan klinik tablolar geliştirebilmektedir. Çalışmamızda bu nedenle erişkin bireylerde RSV'a karşı nötralizan antikor düzeylerinin prevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı seroloji laboratuvarına çeşitli tetkikler için gönderilen 134 serum örneğinde yapılmıştır. Bu serumlarda RSV'a karşı oluşan antikorlar nötralizasyon peroksidaz bağlı antikor testi ile (NPLA) araştırılmıştır.

Çalışılan 134 serumun 97'sinde (%72.4) RSV nötralizan antikorları saptanmıştır. Pozitif serum örneklerinde RSV nötralizan antikor titrelerinin dağılımına baktığımızda 1/80 titrenin (97 hastanın 33'ünde) en fazla saptanan antikor titresi olduğu gözlemlenmiştir.

Bu seropozitiflik oranları, respiratuvar sistem infeksiyonlarında RSV etkinliğinin dikkate alınması gereğini yansıtmaktadır. Viral görünüşlü solunum yolu infeksiyonlarında RSV'ununda hatırlanması ve zamanında gerekli tıbbi önlemlerin alınması uygun olacaktır.

Anahtar kelimeler: Respiratory syncytial virus, nötralizasyon peroksidaz bağlı antikor testi (NPLA)

✓ Investigation of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Neutralization Antibody Prevalence in Adults

Respiratory syncytial virus (RSV) causes respiratory system infections in humans and has a worldwide distribution. These infections can be severe and rarely fatal especially in infants. The aim of this study is to investigate the prevalence of neutralizing antibody levels against RSV among adults.

134 sera that were sent to Ankara University Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Clinical Microbiology serology laboratory for various serological tests were studied. We investigated antibodies against RSV with neutralization peroxidase linked antibody assay (NPLA).

Out of 134 serum samples, neutralizing antibodies were found in 97 (72.4%). The most abundant neutralizing titer was calculated as to be 1/80 in 33 of 97 seropositive individuals.

These seropositivity rates reflect the importance of RSV in respiratory system infections. RSV should be in mind in order not to delay the treatment of respiratory system infections that might be to viruses.

Key words: Respiratory syncytial virus, neutralization peroxidase linked antibody assay (NPLA)

GİRİŞ

İnsanlarda solunum yolları infeksiyonlarına yol açan respiratory syncytial virus

(RSV), Paramyxoviridae familyasının pneumovirus genusu içinde yer almaktadır. Virus tüm dünyada yaygın infeksiyona yol

açmaktadır. Hayatın ilk bir kaç yılı içerisinde genellikle tüm çocuklar bu enfeksiyona maruz kalmaktadır. Enfeksiyonlar özellikle küçük çocuklarda ciddi alt solunum yolları hastalıkları oluşturabilmekte ve nadiren ölüme de yol açmaktadır⁽¹⁻³⁾.

İnfeksiyona karşı oluşan immünite genellikle yeterli olmamakta ve bu nedenle ilerleyen yaşlarda reinfeksiyonlar oluşmaktadır. Ancak bu enfeksiyonlar daha az ciddi olmakta ve nadiren alt solunum yolu hastalıklarına yol açmaktadır^(2,4).

Bu çalışma daha önce değişik yaş gruplarında elde edilen prevalans değerlerinin oldukça farklılık göstermesi ve zaman içinde bu prevalans değerlerinde değişimler olabileceği düşüncesiyle, modifiye bir teknik kullanılarak sağlıklı erişkinlerde nötralizan antikor düzeylerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. RSV enfeksiyonları çocukluk çağı hastalığı özelliğindedir. Hücre kültürü ile birlikte erişkin birey serumları da mevcut olduğundan böyle bir çalışma programlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Serumlar: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Seroloji Laboratuvarına çeşitli tetkikler için gönderilen 134 serum örneği kullanılmıştır. Serum örnekleri 56°C'de yarım saat inaktive edildikten sonra çalışılmaya kadar -20°C derin dondurucuda saklanmıştır.

Hücre kültürü: Araştırmada Vero hücre kültürü kullanılmıştır. Hücreler 75 cm² kültür şişelerinde %10 fetal calf serum içeren Dulbecco's modified essential medium içinde üretilmiştir.

Virus: Araştırmada kullanılan RSV 8285, National Institute of Public Health of Virology Department (OSLO/NORWAY)'dan elde edildi. Üretilen virusun Hsiung'un yöntemine⁽⁵⁾ göre titresi DKID⁵⁰ 10^{-4.25}/0.1 ml olarak tespit edildi.

Nötralizasyon Peroksidaz Bağlı Antikor Testi (NPLA): Bu test Hyera ve arkadaşlarının bildirdiği şekilde yapılmıştır⁽⁶⁾. Mikrotitrasyon pleytinde 1/5'ten başlayarak 6 basamak iki katlı sulandırmaları hazırlanan serum örneklerinin üzerine eşit hacimde 100 DKID⁵⁰ (10^{-2.25}/0.1 ml) oranında sulandırılan RSV konularak 37°C'de bir saat nötralizasyon için bekletildi. Süre sonunda 300000/ml olacak şekilde sulandırılan Vero hücre süspansiyonu kullanılan her test gözüne 0.05 ml olacak şekilde ilave edildi. 72 saat %5 CO₂'li etüvde inkübe edilen test sistemi süre sonunda pleyt içerikleri dökülmek ve fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile hücreler yıkanmak suretiyle fiksasyona hazırlandı. 80°C'de 4 saat süre ile gerçekleştirilen fiksasyondan sonra titresi nispetinde (1/50) tween 20 içeren PBS içinde sulandırılan anti-RSV peroksidaz işaretli antikor 0.05 ml hacimde ilave edildi ve oda derecesinde bir saat inkübe edildi. Bundan sonra yapılan yıkama işlemini takiben kolorojenik substrat (AEC+DMF) ilavesi ile değerlendirilmeye hazır hale getirildi. Boyanma neticesi kırmızı-kahverengi renkte boyanma gösteren gözler antikor yönünden negatif, boyanma göstermeyen gözler ise pozitif olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışılan 134 serum numunesinin 97'sinde (%72.4) RSV nötralizan antikorları saptandı. Pozitif serum örneklerinin ortalama serum nötralizasyon (SN50) değerleri Tablo'da sunulmuştur.

TARTIŞMA

RSV enfeksiyonunun tanısı çeşitli yöntemlerle yapılabilmektedir. Bunlar respiratuvar sekresyonlardan hücre kültüründe virusun üretilmesi, respiratuvar örneklerde viral antijenlerin enzim immünoassay ve floresan antikor tekniği yöntemleriyle gösterilmesi ve

Tablo. Pozitif Serum Örneklerinde RSV Nötralizan Antikor Titrelelerinin (SN₅₀) Dağılımı.

	SN ₅₀							Toplam
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	>1/160	
Pozitif serum sayısı	-	5	16	24	33	15	4	97

hasta serumunda virusa karşı oluşan antikorların gösterilmesidir^(1,4,7). Virusa karşı oluşan antikorlar kompleman birleşmesi (KB), nötralizasyon (Nt) ve enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemleriyle gösterilebilir⁽⁷⁻¹⁰⁾. RSV ile ilgili immün cevapta lokal savunma mekanizmaları ve hücrel immünite ön plana çıkmaktadır. Bu ön çalışmamız, olanaklarımız da dikkate alınarak, nötralizasyon antikor cevabının araştırılması yönünde olmuştur. Yurdumuzda RSV'a karşı antikor prevalansını göstermek için çeşitli yöntemlerle yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Bunlara bakıldığında Ustaçelebi ve arkadaşlarının⁽¹¹⁾ çeşitli yaş gruplarından 448 serumda KB testi ile yaptıkları çalışmada RSV seropozitifliğini 0-5 yaş arasında %40, 21-30 yaş arasında %69, 31-40 yaş arasında %72, 41-50 yaş arasında %75 buldukları görülmektedir. Kökkaya ve Ustaçelebi⁽¹²⁾ KB testi ile 0-5 yaş arasında 90 serumda bu oranı %70, Kocabeyoğlu ve arkadaşları⁽¹³⁾ mikronötralizasyon testi ile 13-25 yaş arasındaki 181 kişide %13.8 ve yine Kocabeyoğlu ve arkadaşları⁽¹⁴⁾ indirek floresan antikor testi ile 0-20 yaş arasındaki 175 serum örneğinde %85.1 olarak bulmuşlardır.

Sonuçlara bakıldığında elde edilen değerlerin oldukça farklılık gösterdiği görülmektedir. Bulunan bu değerler arasındaki farklılıklar, araştırmacılar tarafından kullanılan yöntemlerin hassaslığına ve serumların alındığı dönemin virusun epidemilerinin sık görüldüğü aylarda ya da en az görüldüğü aylarda alınmış olmasına bağlı olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Üzerinden oldukça zaman

geçmiş olan bu çalışmalardan sonra, modifiye nötralizasyon yöntemi kullanarak yapılan bu çalışmada serum pozitifliği oranı %72.4 olarak saptandı. Bu kadar yüksek seropozitiflik oranı, respiratuvar sistem infeksiyonlarında RSV etkinliğinin dikkate alınması gereğini yansıtmaktadır. Toplumda belirgin veya atipik gidişli RSV infeksiyonları özellikle çocukluk çağı solunum yolu infeksiyonları için önemli bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle viral görünüşlü solunum yolu infeksiyonlarında RSV'da hatırlanmalıdır.

Geliş tarihi : 11.05.1998

Yayına kabul tarihi : 29.06.1998

Yazışma adresi:

Dr. Murat ÖZSAN

Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ANKARA

KAYNAKLAR

1. Belshe RB, Mufson MA. Respiratory syncytial virus. In Belshe RB (ed.). Textbook of Human Virology. 2nd ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1991; 388-407.
2. Hall CB. Respiratory syncytial virus. In Mandell GL, Douglas RG, Jr, Bennett JE (eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases. 3rd ed. New York, Churchill-Livinstone, 1990; 1265-1279.
3. Law BJ, Carvalho VD. Respiratory syncytial virus infection in hospitalized Canadian children: regional differences in patient populations and management practices. *Pediatr Infect Dis J* 1993; 12: 659-663.
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. Hsiung GD. Virus assay, neutralization test, and antiviral assay. In Hsiung GD, Fong CKY, Landry ML (eds.). *Hsiung's Diagnostic Virology*. 4th ed. New Haven, Yale University Press, 1994; 46-55.
 6. Hyera JKM, Dahle J, Liess B, et al. Production of potent antisera raised in pigs by anamnestic response and use for direct immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. *Deutsch Tierärztl Wschr* 1987; 94: 576-580.
 7. Walsh EE, Hall CB. Respiratory syncytial virus. In Schmidt NJ, Emmons RW (eds.). *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 6th ed. WashingtonDC, American Public Health Association, 1989; 693-712.
 8. Kaul TN, Welliver RC, Ogra PL. Comparison of fluorescent-antibody, neutralizing-antibody, and complement-enhanced neutralizing antibody assays for detection of serum antibody to respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol* 1981;13: 957-961.
 9. Anderson LJ, Hierholzer JC, Bingham PG, et al. Microneutralization test for RSV based on an enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 1050-1052.
 10. Parrot RH, Brandt CD, Kim HW. Respiratory syncytial virus. In Lennette EH (ed.). *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. New York, Marcel Dekker, 1985; 453-464.
 11. Ustaçelebi Ş, Söyletir G, Ata Y. Çeşitli yaş gruplarında solunum sinsityal virus kompleman birleşme antikorları dağılımı. *Türk Viroloji Derg* 1980; 2: 19-24.
 12. Kökkaya A, Ustaçelebi Ş. 0-5 yaş grubu çocuklarda parainfluenza tip I ve solunum sinsityal virus antikorlarının dağılımı. *Türk Viroloji Derg* 1981; 3: 5-11.
 13. Kocabeyoğlu Ö, Akça Y, Toker A, et al. 13-25 yaş grubundaki sağlıklı kişilerde respiratory syncytial virus antikor düzeylerinin mikronötralizasyon testi ile araştırılması. *Mikrobiyol Bült* 1989; 23: 116-120.
 14. Kocabeyoğlu Ö, Yücel N, Emekdaş G, et al. Respiratory syncytial virus IFAT antijenlerinin vero hücre kültüründe üretilmesi ve 0-20 yaş grubunda RSV IgG antikorları dağılımı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1990; 20: 72-78.