

**ALT SOLUNUM YOLU İNFEKSİYONU OLAN ÇOCUKLARIN NAZOTRAKEAL  
ASPIRAT ÖRNEKLERİNDE SOLUNUM SİNSİTYAL VİRÜS'ÜN İZOLASYONU\***  
**Isolation of Respiratory Syncytial Virus in Nasotracheal Aspirate  
Specimens of Children with Respiratory Tract Infection**

**Canan GÖKALP<sup>1</sup>, Selma GÖKAHMETOĞLU<sup>2</sup>,  
Esmâ SAATÇI DENİZ<sup>3</sup>, Tamer GÜNEŞ<sup>4</sup>**

**Özet :** Solunum sinsityal virüs (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'nin hücre kültürüyle izolasyonu amaçlandı. Çalışmaya alt solunum yolu enfeksiyonu olan, yaşları 0-24 ay arasında değişen 80 hastadan alınan nazotrakeal aspirat örneği dahil edildi. RSV'nin izolasyonu için Hep-2 hücre kültürü kullanıldı. On gün süreyle RSV'ye karakteristik sitopatik etki takip edildi. Hücre kültürü örneklerindeki RSV antijeni Direkt Floresan Antikor (DFA) yöntemiyle araştırıldı. Çalışmaya dahil edilen 80 örneğin 17 (% 21.3)'sinde hücre kültürü yöntemiyle sitopatik etki gözlemlendi ve DFA ile RSV antijeni pozitif bulundu. Sonuç olarak; RSV'nin izolasyonunda sitopatik etki gözlenen hücre kültürlerinde DFA yöntemiyle RSV antijeni araştırılabileceği kanaatine varıldı.

**Anahtar kelimeler :** Solunum sinsityal virus, direkt immunofloresan antikor, hücre kültürü

Solunum sinsityal virüs (RSV; *Respiratory Syncytial virus*), bütün dünyada bebek ve çocuklarda, alt solunum yolu enfeksiyonlarının başlıca sebebidir. RSV enfeksiyonunu takiben tekrarlayan alt solunum yolu enfeksiyonu sık görülmektedir. Ayrıca RSV, morbiditesi yüksek olan nozokomiyal enfeksiyonlardan da sorumludur (1- 4).

<sup>1</sup>Bilim Uz.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.Mikrobiyoloji AD, Kayseri

<sup>2</sup>Doç.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.Mikrobiyoloji AD, Kayseri

<sup>3</sup>Uzm.Dr. Nuh Naci Yazgan Sağlık Ocağı, Kayseri

<sup>4</sup>Doç.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.Çocuk Sağ. Hast. AD, Kayseri

Geliş Tarihi : 28.09.2007      Kabul Tarihi : 13.12.2007

**\* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBY.05.05 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Summary :** Respiratory syncytial virus (RSV) is the major viral agent of lower respiratory tract infection in infants and children. The aim of this study is to isolate RSV by cell culture in children with respiratory tract infection. Nasotracheal aspirate specimens collected from 80 hospitalized patients with respiratory tract infection aged between 0-24 months were included in the study. Hep-2 cell culture was used for RSV isolation. RSV antigen was investigated in cell culture specimens by Direct Fluorescence Antibody (DFA) test. Cytopathic effect (CPE) of RSV was found positive in 17 (% 21.3) of 80 samples by cell culture, and RSV antigen was found positive by DFA in these samples.

**Key Words:** Respiratory syncytial virus, cell culture, immunofluorescence

RSV enfeksiyonları; büyük çocuklarda ve yetişkinlerde genellikle soğuk algınlığı, üst solunum yolu enfeksiyonu şeklinde kendini gösterirken, küçük çocuklarda alt solunum yolu enfeksiyonu, pnömoni, bronşiolit, trakeobronşit, krup, asemptomatik enfeksiyon olarak kendini gösterir (5, 6). RSV enfeksiyonuna en duyarlı yaş grubunu bir yaşın altındaki çocuklar oluşturmaktadır (7,8). RSV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında; virüsün antijenlerinin direkt olarak gösterilmesi, virüsün izolasyonu, serolojik teknikler, moleküler yöntemler uygulanmaktadır (7-9 ). Bu çalışmada alt solunum yolu enfeksiyonu geçiren çocuklarda RSV'nin hücre kültüründe izolasyonu amaçlandı.

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarında ve Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nde yapıldı. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi Yenidoğan ve Süt Çocuğu Servislerinde Kasım 2005-Mayıs 2006 tarihleri arasında alt solunum yolu enfeksiyonu şikayeti ile yatmakta olan, yaşları 0-24 ay arasında değişen, 80 hastadan alınan nazotrakeal aspirat örnekleri çalışmaya dahil edildi. Örnekler hücre kültürü yöntemiyle çalışılmak üzere steril endorf tüpüne alındı ve test çalışılana kadar -70 °C 'de saklandı.

RSV'nin izolasyonu için oda sıcaklığına getirilen nazotrakeal aspirat örneklerinden 200 µL pastör pipeti ile tek tabaka halindeki Hep-2 hücre kültürü tüplerine ekim yapıldı. Tüpler, 1 saat süreyle % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde, 37°C'de inkübe edildi. Süre sonunda tüpler boşaltıldı ve tüpün iç yüzeyine yapışmış olan hücrelerin üzerlerine 2 mL devam besiyeri (%2 fetal bovine serum içeren RPMI 1640 besiyeri) konuldu. Tüpler CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de inkübe edildi. Sitopatik etkiyi görebilmek için 10

gün boyunca gün aşırı olarak hücreler invert mikroskopla incelendi ve hücrelerde görülen değişiklikler kayıt edildi. RSV'ye karakteristik sitopatik etkinin oluştuğu gözlenen ve gözlenmeyen tüm tüplerde DFA (Monofluo BIO-RAD, Fransa) yöntemiyle RSV antijeni araştırıldı.

Hücre kültürü yapılmış örneklerde direkt RSV antijeninin araştırılmasında kit prosedürüne göre hazırlanan preparatlar değerlendirildi. Hazırlanan preparatlar x100 ve x400 büyütmede floresan mikroskopunda incelendi. Karakteristik sitoplazmik granüler floresan veren hücrelerden en az bir tane görüldüğünde test pozitif kabul edildi.

## **BULGULAR**

Çalışmaya dahil edilen 80 örneğin 17 (% 21.3)'sinde Hep-2 hücre kültüründe sitopatik etki gözlenmiştir (Resim 1). RSV'ye karakteristik sitopatik etkinin gözlendiği örneklerde DFA yöntemiyle RSV antijeni pozitif bulundu. Yapılan bu çalışmada RSV'ye karakteristik sitopatik etkinin gözlenmediği örneklerde DFA yöntemiyle RSV antijeni bulunamadı.



**Resim 1.** RSV için tipik sitopatik etki gözlenmiş hücre kültürünün görünümü

## TARTIŞMA

Bebek ve çocuklarda bronşiolit ve pnömoniye en sık neden olan etken RSV'dir (1, 3). RSV enfeksiyonuna en çok iki yaşın altındaki çocuklarda rastlanır. Özellikle altı aydan küçüklerde hastalık ağır seyretmekte olup morbitide ve mortalitesi yüksektir (1, 5).

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 Hep-2 hücre kültüründe RSV izole edilmiştir (10).

İzmir'de yapılan başka bir çalışmada Dereli ve arkadaşları (11) yaşları 2 ay ile 2 yaş arası değişen akut bronşiolitli 65 çocuğun 19 (%29.2)'unda hücre kültürü ve DFA ile RSV enfeksiyonunun varlığını bildirmişlerdir.

Aykut ve arkadaşları (12) Ankara'da yaptıkları çalışmada hücre kültürü yöntemiyle, 80 bebekten alınan nazal sürüntü örneklerinin 20 (% 25)'sinde RSV izole etmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada Mezeire ve arkadaşları (13) solunum yolu semptomlu 383 hastanın burun yıkama suyu örneğinde RSV antijenini immunofloresan yöntemi ile 143 (% 37); hücre kültüründe 72 saat inkübasyondan sonra immunofloresan ile yapılan testte ise 119 (% 31) hastada göstermişlerdir.

Halstead ve arkadaşları (14) yaptıkları çalışmada alt solunum yolu enfeksiyonu olan 117 çocuktan DFA, hücre kültürü ve üç ayrı ELISA yöntemi ile burun yıkama suyu örneklerinde RSV'yi araştırmışlar ve tüm yöntemlerle çocukların 77 (%65.8)'sinde RSV pozitif bulmuşlardır.

Sunulan çalışmada, 80 örneğin 17 (% 21.3) 'sinde Hep-2 hücre kültüründe sitopatik etki gözlemlendi ve sitopatik etki gözlenen kültürlerde RSV antijeni DFA yöntemiyle pozitif bulundu. Aykut ve arkadaşlarının (12) yaptığı çalışmada hücre kültürüyle %25 oranında RSV izole edilirken bu çalışmada %21.3 oranında izole edildi. Çalışmamız diğer ülkelerde yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında sonuçların benzerlik gösterdiği görülmektedir (13,14). Bu çalışmada; RSV izole edilen hücre kültürlerinin yüzdesi,

Yamazhan ve arkadaşlarının (10) çalışmalarında bildirdikleri % 4.6 oranından yüksek, Dereli ve arkadaşlarının (11) bildirdiği %29.2 oranından düşüktür. Bu farklılığın örneklerin çalışma gününe kadar derin dondurucuda beklemiş olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, çalışmamızda izolasyon için örneklerin hepsinin hastalığın erken döneminde alınmamış olması da sonucu etkileyebilir.

Sonuç olarak bulgularımız değerlendirildiğinde; RSV enfeksiyonunun tanısında hücre kültürü yönteminin uygulanabileceği ve sitopatik etki gözlenen hücre kültürlerinde DFA yöntemiyle RSV antijeni araştırılabileceği kanaatine varıldı.

## KAYNAKLAR

1. *Ufuk Pekmezci D. Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Bebek ve Çocuklarda Solunum Sinsityal Virus'una Bağlı Enfeksiyon Sıklığının Direkt Floresan Test, Hücre Kültürü ve 'ELISA' Yöntemleri ile Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana 2001.*
2. *Belshe RB, Mufson MA. Text Book of Human Virology (2 nd ed), Mosby Year Book St.Luis, 1991, pp 338-407*
3. *Türkoğlu S. Respiratory syncytial virus (RSV). Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (yazarlar). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2. Nobel Tıp Kitabevleri, 2002, ss 1289-1292.*
4. *Rota S. Solunum sinsityal virus. Ustaçelebi Ş (yazar). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 1999, ss 941-943.*
5. *Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. Fields Virology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996, pp 1313-1351.*
6. *Akan E. Genel ve Özel Viroloji, 3. Baskı, Saray Medikal Yayıncılık San ve Tic Ltd Şti, İzmir 1994, ss 463-471.*

7. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology* (8 th ed), American Society for Microbiology Pres, Washington D.C.,1999, pp 1378-1388.
8. Bachi T, Howe C. Morphogenesis and ultrastructure of respiratory syncytial virus. *J Virol* 1973,12:1173-1180.
9. Berthiaume L, Jonca J, Pavilans V. Comparative structure, morphogenesis and biological characteristics of the respiratory syncytial (RS) virus and the pneumonia virus of mice. *Arch Ges Virusforsch* 1974,45:39-51.
10. Yamazhan T, Dereli DG, Ertem E, Serter D. 1995-1996 Kış mevsiminde, hücre kültürü yöntemi ile bölgemizde saptanan adenovirus, solunum sinsityal virusu ve parainfluenza infeksiyonları. *Flora*,1999,4(2):135-138.
11. 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 İzmir, Turkey, by two diagnostic methods. *APMIS*, 1994,102:877-880.
12. Aykut E, Özsan M. Alt solunum yolu infeksiyonu olan 0-1 yaş grubu bebeklerde etken olarak solunum sinsityal virusun hücre kültürü ve direkt immunoperoksidaz yöntemleriyle araştırılması. *Mikrobiol Bült* 1999,33:203-213.
13. 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(3):241-244.
14. Halstead DC, Todd S, Fritch G. Evaluation of five methods for respiratory syncytial virus detection. *J Clin Microbiol*, 1990,28(5):1021-1025.