

Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Çocuk Hastalarda Viral Etkenlerin İmmunofluoresan ve İmmunokromatografik Yöntemler ile Araştırılması

Süleyman Pelit^{1,2}, Banu Bayraktar², Mehmet Emin Bulut², Nazan Dalgıç Karabulut³, Asiye Nuhoglu⁴

ÖZET:

Alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuk hastalarda viral etkenlerin immunofluoresan ve immunokromatografik yöntemler ile araştırılması

Amaç: Alt solunum yolu enfeksiyonları (ASYE) çocuklarda yüksek morbidite oranına sahip olup özellikle erken çocukluk döneminde yüksek mortalite ile seyreder. ASYE tanısı alan çocuk hastalarda viral etkenlerin immunofluoresan ve immunokromatografik yöntemler ile araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, klinik olarak ASYE tanısı almış 260 çocuk hastanın (1 ay-5 yaş) nazofarengeal sürüntü örnekleri immunofluoresan ve immunokromatografik yöntemler ile araştırılmıştır.

Bulgular: Örneklerden 122'sinde (%46.9) viral antijen pozitifliği saptanmıştır. ASYE'nin en sık etkeni olarak %35.3'lük pozitiflik oranı ile respiratuar sinsityal virus (RSV) tespit edilmiştir. Hastaların %4.2'sinde influenza A virusu, %1.9'unda ise influenza B virusu saptanmıştır.

Sonuç: Pediatrik popülasyonda ASYE'lerde etken olabilecek virusların hızlı tanısı, uygun spesifik antiviral tedavinin zamanında başlanabilmesi, gereksiz antibiyotik kullanımının engellenebilmesi ve bu virusların neden olabilecekleri hastane enfeksiyonlarının önlenmesi açısından önem kazanmaktadır.

Anahtar kelimeler: Alt solunum yolu enfeksiyonları, immunofluoresan, immunokromatografi, çocuk, RSV

ABSTRACT:

Investigation of viral agents in lower respiratory tract infections of children by immunofluorescent and immunochromatographic methods

Objective: Lower respiratory tract infections (LRTI) have high morbidity rates in children. They are also related with high mortality especially in early infancy. We aimed to investigate of viral agents of children, clinically diagnosed as LRTI, by immunofluorescent and immunochromatographic methods

Material and Method: In our study, nasopharyngeal swabs of 260 patients (1 month-5 years) clinically diagnosed as LRTI, were investigated by immunofluorescent and immunochromatographic techniques.

Results: In 122 (46.9%) of samples the virus was identified. RSV was the most common etiologic viral agent in LRTI by a rate of 35.3% followed by influenza A virus 4.2%, influenza B virus 1.9%.

Conclusion: In pediatric population, rapid diagnosis of LRTIs will help us to protect children and to choose appropriate treatment, avoidance of unnecessary antibiotic use and prevention of nosocomial infections caused by these agents.

Key words: Lower respiratory tract infections, immunofluorescence, immunochromatography, children, RSV

Ş.E.E.A.H. Tıp Bülteni 2015;49(2):118-21



¹Ahenk Tıbbi Tanı ve Araştırma Laboratuvarı, İstanbul-Türkiye
²Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul-Türkiye
³Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Kliniği, İstanbul-Türkiye
⁴Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Yenidoğan Kliniği, İstanbul-Türkiye

Yazışma Adresi / Address reprint requests to:
Süleyman Pelit,
Ahenk Tıbbi Tanı ve Araştırma Laboratuvarı,
İstanbul-Türkiye

E-posta / E-mail:
s_pelit@hotmail.com

Geliş tarihi / Date of receipt:
24 Haziran 2014 / June 24, 2014

Kabul tarihi / Date of acceptance:
3 Kasım 2014 / November 3, 2014

GİRİŞ

Alt solunum yolu enfeksiyonu (ASYE) tüm dünyada bebek ve süt çocuklarında mortalite ve morbiditenin ana nedenleri arasındadır (1). Ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından 2002-2004 yılları arasında gerçekleştirilen Türkiye Hastalık Yüğü Çalışması'na göre solunum yolu enfeksiyonları; 0-4 yaş grubunda %13.4, 5-14 yaş grubunda %6.5 ile en sık ikinci ölüm nedenidir (2). ASYE'nin en sık karşılaşılan etkenleri virustardır. Çocukluk çağında ASYE'ye en sık sebep olan virüsler respiratuar sinsityal virus (RSV), parainfluenza virus (PİV) tip 1, 2, 3, influenza A, influenza B ve adenovirustardır (3). Bu virüslardan RSV, özellikle kış aylarında bebek ve küçük çocuklarda ciddi ASYE'ye neden olmakta ve bronşiyolitlerin %50-90'ı ile pnömonilerin %5-40'ından sorumlu tutulmaktadır (4). Rutin tanıda, immunolojik analizler ile birkaç saat içinde güvenilir sonuçlar alınması nedeni ile pek çok laboratuvarıda tanıda altın standart yöntem olmasına rağmen hücre kültürü yerine antijen saptama teknikleri kullanılmaktadır (5).

Bu çalışmada Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Hastalıkları Kliniklerinde ASYE tanısı konup yatırılarak izlenen hastalarda bu tabloya neden olabilecek solunum yolu virüslerinden RSV, influenza A ve influenza B virüslerinin sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1 Ekim 2010 - 31 Mart 2011 tarihleri arasında Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Hastalıkları Kliniklerinde klinik olarak ASYE ön tanısı olarak yatırılan 1 ay - 5 yaş arasındaki 260 hastanın nazofarengeal sürüntü örnekleri araştırmaya dahil edildi. Çalışma Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak yapıldı. Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Danışma Kurulu onayı (sayı:101) ve çalışmayla ilgili herhangi bir işlem yapılmadan önce çocukların yakınlarından "Bilgilendirilmiş Onay" alındı.

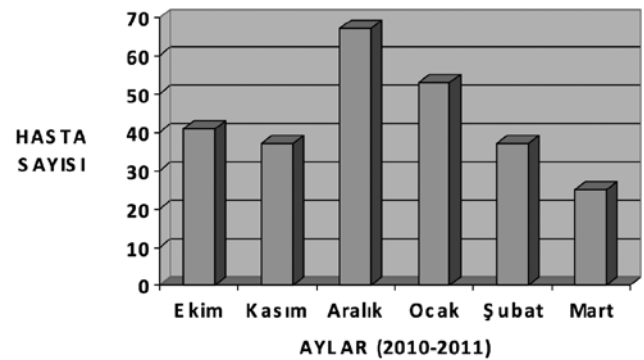
Nazofarengeal sürüntü örnekleri Flocked Swab (Copan, İtalya) kullanılarak alındı. Üzerinde epitel hücreleri içeren swab 1 ml Universal Transport Medium (UTM) (Copan Diagnostics) içine konuldu ve kısa

süre içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. Swab üzerinde kalan epitel hücrelerinin medium içerisine dağılmasını sağlamak amacıyla yaklaşık olarak 10 saniye vortekslendikten sonra UTM içerisindeki Flocked Swab çıkarılarak atıldı ve tüpler 2000 rpm de 5 dakika santirifüj edildi. Santrifüj sonunda steril pipet kullanılarak tüpün üst kısmından yaklaşık 500 µl örnek immünokromatografik testlerde kullanılmak üzere ayrılırken, kalan 500 µl örnek immünofluoresan boyama işlemleri için kullanıldı. Çalışmamızda immünofluoresan testler olarak; Respiratory Screen Test (Imagen-Oxoid UK), Respiratuar Sinsityal Virus Test (PathoDx-Remel, ABD) ve Influenza Virus A ve B Test (Imagen-Oxoid, İngiltere); immunokromatografik testler olarak RSV Card Test (CerTest-Biotec, İspanya) ve Influenza A&B Respi-Strip Test (Coris BioConcept, Belçika) kullanıldı. Çalışma prospektif olarak olgu atlanmadan gerçekleştirildi.

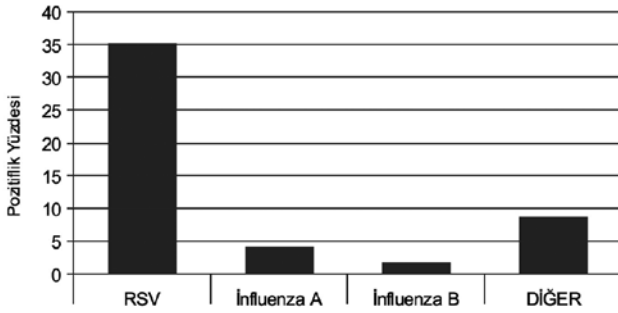
BULGULAR

Hastalar en fazla Aralık ayında (67 hasta %25.8), en az Mart ayında (25 hasta %9.6) başvurmuştur (Grafik 1). Hastaların 84 (%32.3)'ü kız, 176 (67.7)'si erkekti. Hastaların ortalama yaşı 7.65±7.60 ay (1 ay - 5 yaş) olarak tespit edilmiştir.

ASYE tanısı alarak çalışmaya dahil edilen 260 çocuğun 122 (%46.9)'ünde immünofluoresan ve immunokromatografik yöntemlerle değerlendirme sonucunda viral antijen pozitifliği bulunmuştur. RSV pozitiflik oranı immünofluoresan yöntem ile %33, immunokromatografik yöntem ile %28.9 olarak; inf-



Grafik 1: Çalışma grubunda yer alan hastaların aylara göre dağılımı



Grafik 2: Viral antijeni pozitif olarak tespit edilen hastalarda etkenlerin dağılımı

RSV: Respiratuar Sinsityal Virus, DİĞER: Parainfluenza virus tip 1, 2, 3 ve/veya Adenovirus

İnfluenza A pozitiflik oranı immunofluoresan yöntem ile %5.1, immunokromatografik yöntem ile %0.5 olarak ve influenza B pozitiflik oranı immunofluoresan yöntem ile %2, immunokromatografik yöntem ile %0.5 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullandığımız her iki yöntem ile birlikte tespit edilen pozitiflik oranları RSV için %35.3; influenza A için %4.2 ve influenza B için %1.9 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kullandığımız tarama testi olan ve ayırım yapmaksızın RSV, influenza A ve B virus, PİV tip 1, 2, 3 ve adenovirus antijenlerinin tespit edilmesini sağlayan Respiratory Screen Test ile %42.9 oranında pozitiflik saptanmıştır. Diğer yöntemlerle RSV ve/veya influenza A&B tespit edilemeyen ve sadece Screen Test ile pozitif sonuç veren 23 hastada (%8.8) PİV 1, 2, 3 ve/veya adenovirus antijen pozitifliği tespit edilmiştir (Grafik 2).

TARTIŞMA

ASYE özellikle erken çocukluk döneminde yüksek morbidite ile seyrederek (6,7). ASYE'de etyoloji yaşa göre farklılık gösterir. İki yaşın altındaki çocuklarda pnömoni ve bronşiyolitlerde en sık karşılaşılan etkenin RSV olduğu bildirilmektedir. Ayrıca erkek çocuklar kız çocuklara göre ASYE'ye yaklaşık iki kat daha duyarlıdır. Bu durum, hayatın ilk aylarında erkek çocuklarda hava yollarının daha dar olması ile açıklanmaktadır (8).

Çalışmamızda viral antijen pozitiflik oranı %46.9 olarak tespit edilirken; RSV pozitifliği %35.3, influenza A pozitifliği %4.2 ve influenza B pozitifliği %1.9 olarak bulunmuştur. RSV pozitif hastaların %70'inin,

influenza A ve/veya B pozitif hastaların %84'ünün 6 aydan küçük olması daha önceki çalışmalarla benzer şekilde bu grubun ASYE'ye en duyarlı grup olduğunu doğrulamıştır (9,10). Yine diğer çalışmalarda olduğu gibi viral etken pozitiflik oranı kızlara göre (%13) erkeklerde (%33.8) daha fazla bulunmuştur (11,12).

ASYE'ye yol açan virusların görülme sıklıkları bebeklerde ve erişkinlerde mevsimlere göre de değişiklik gösterir (1). Özellikle RSV mevsimsel patern gösterir. İngiltere ve Amerika Birleşik Devletleri'nde salgın Ocak ve Mart arasında yer alır. Bu dönemlerde hastanelere ASYE ile başvuranların sayısında artış olur. Daha ılıman bölgelerde olgu sayısının maksimuma ulaştığı dönem değişken olabilmekle birlikte Aralık ve Nisan ayları arasındadır. Tropik bölgelerde ise Haziran ve Aralık ayları arasındaki yağışlı dönemde yer alır (13). Bizim çalışmamızda Aralık ayı viral enfeksiyonların en sık görüldüğü aydı.

Türkiye'de viral ASYE sıklığını saptamaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Uyar ve ark. (4)'nün çalışmasında klinik olarak ASYE tanısı almış 0-5 yaş arası 124 çocuk hastanın örnekleri immunofluoresan yöntemi ile araştırılmış, örneklerin 35'inde (%28.2) virus varlığı gösterilmiştir. Viral antijen saptanan örneklerin %40'ı RSV, %28.6'sı PİV tipleri, %11.4'ü influenza B virusu, %8.6'sı koronavirus, %5.7'si influenza A virusu ve %5.7'si adenovirus olarak tespit edilmiştir. Yüksel ve ark. (14)'nün yaptıkları çalışmada ASYE belirtileri gösteren 151 çocuğun 38 (%25.2)'inde viral etken pozitifliği saptanmıştır. En sık rastlanan virüsler %31.5 oranları ile RSV ve adenoviruslar olmuş, bunları sırasıyla parainfluenza (%26.3) ve influenza (%23.6) virüsleri izlemiştir. İsveç'ten Eriksson ve ark. (15) ASYE'li 135 çocuğun 89'unda (%66), ABD'den Kuypers ve ark. (16) ise 1038 çocuğun 239'unda (%23) immunofluoresan yöntem ile RSV pozitifliği saptamışlardır.

Solunum virüslerinin tanısı için kullanılacak duyarlılık, fiyat ve süre açısından farklılık gösteren çeşitli laboratuvar teknikleri bulunmaktadır (17). İmmunolojik metodlar klinik örneklerden viral antijenlerin antikorlar kullanılarak tespit edilmesini sağlayan hızlı ve ucuz testler olarak bilinmektedir ve birçok laboratuvar kullanımları yaygınlaşmaktadır. Immunofluoresan tekniği, diğer immünoolojik metodlara göre daha fazla teknik deneyim gerektir-

mesine karşılık, uygun şekilde uygulandığı durumlarda en duyarlı ve özgül immunolojik yöntemdir. İmmunokromatografik testler ise yaklaşık 15 dakikada sonuç verebilen hızlı ve basit testlerdir. Yapılan çalışmalarda bu iki yöntemin duyarlılık ve özgüllükleri, çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte immunofluoresan metod için %60-99/%96-100, immunokromatografik metod için %40-96/%96-100 olarak tespit edilmiştir (18).

Viral solunum yolu enfeksiyonu etkenlerinin hızlı tanısının maliyet yarar analizleri yapıldığında, hızlı testlerin virusları saptamada kullanılmalarının pek çok açıdan yararlı olduğu saptanmıştır. Virusların hızlı tanısı; gereksiz antibiyotik kullanımını ve bu suretle antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerin gelişimini önlemekte, doğru tanı ile uygun tedaviye yönlendirerek hastaların hastanede kalış sürelerini kısaltmaktadır (19).

KAYNAKLAR

1. Yılmaz G, Uzel N, Işık N, Uğur S, Aslan S, Badur S. Akut alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda viral etkenler ve respiratory syncytial virüs alt grupları. *Turk J Infect* 2000; 14:157-64.
2. Ünüvar N, Mollahaliloğlu S, Yardım N (Eds). *Türkiye Hastalık Yüku alışması 2004*. T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı, Hıfızısıhha Mektebi Müdürlüğü. 1.Baskı. Ankara: Aydoğdu Ofset Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. şti; 2006. p.1-56.
3. Hatipoğlu S, Arıca S, elik Y, Öztora S, şevketoğlu E, Erkum T. Alt solunum yolu enfeksiyonu tanısıyla hastanemize yatırılan olgularda RSV enfeksiyonu sıklığı ve klinik özellikleri. *Düzce Tıp Fak Derg* 2009; 11: 38-44.
4. Uyar R, Günaydın M, etin M. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda viral etiyolojinin indirek immünofloresan yöntemlerle araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2000; 34: 339-45.
5. Kaul AR, Scott M, Gallagher M, Scott M, Clement J, Ogra PL. Respiratory syncytial virus infection: rapid diagnosis in children by use of indirect immunofluorescence. *Am J Dis Child* 1978; 132: 1088-90.
6. Boivin G, Côté S, Déry P, De Serres G, Bergeron MG. Multiplex real-time PCR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 45-51.
7. Denny FW, Loda FA. Acute respiratory infections are the leading cause of death in children in developing countries. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35: 1-2.
8. Weissenbacher M, Carballal G, Avila M, Salomon H, Harisiadi J, Catalano M, et al. Etiologic and clinical evaluation of acute lower respiratory tract infections in young Argentinian children: an overview. *Rev Infect Dis* 1990; 12(Suppl8): 889-98.
9. Brumback BG, Wade CD. Simultaneous rapid culture for four respiratory viruses in the same cell monolayer using a differential multicolored flourescent confirmatory stain. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 798-801.
10. Huq F, Rahman M, Nahar N, Alam A, Haque M, Sack DA, et al. Acute lower respiratory tract infection due to virus among hospitalized children in Dhaka, Bangladesh. *Rev Infect Dis* 1990; 12(Suppl 8): 982-6.
11. Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illness in the first year of life. *Am J Epidemiol* 1991; 113: 1135-51.
12. Vathanophas K, Sangchai R, Raktham S, Parlyanonda A, Thangsuwan J, Bunyaratabhandu P, et al. A community-based study of acute respiratory tract infection in Thai children. *Rev Infect Dis* 1990; 12(Suppl 8): 957-65.
13. Lina B, Valette M, Foray S, Luciani j, Stagnara, j, See DM. Surveillance of community-acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone-Alpes (France) during winter 1994-1995. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3007-11.
14. Yüksel H, Yılmaz Ö, Akalı S, Söğüt A, Yılmaz itdoğan D, Urk V, et al. Küük ocuklarda toplum kökenli viral alt solunum yolu enfeksiyonu etkenlerinin sıklığı ve uzun dönem kompliksasyonu ile ilişkileri. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42: 429-35.
15. Eriksson M, Forsgren M, Sjöberg S, von Sydow M, Wolontis S. Respiratory syncytial virus infection in young hospitalized children. Identification of risk patients and prevention of nosocomial spread by rapid diagnosis. *Acta Pediatr Scand* 1983; 72: 47-51.
16. Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang ML, Cent A, Corey L, et al. Comparison of Real-Time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J. Clin Microbiol.* 2006; 44: 2382-8.
17. Landry ML, Ferguson D. Simulfluoer respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimens by immunofluorescence staining. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 708-11.
18. Landry ML. Developments in immunologic assays for respiratory viruses. *Clin Lab Med* 2009; 29: 635-47.
19. Woo PCY, Chiu SS, Chan KH, Seto WH, Peiris M. Cost-effectiveness of rapid viral respiratory tract infections in pediatric patients. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1579-82.