

VİRAL SEROLOJİK TESTLER VE PCR

Prof. Dr. Ayper SOMER

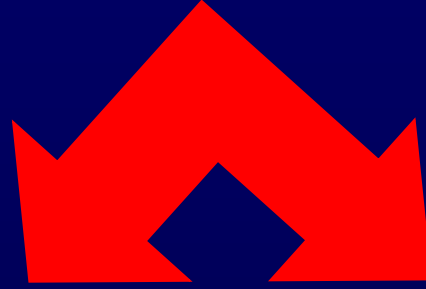
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Pediatrik
Enfeksiyon Hastalıkları B.D.

15 Kasım 2017 Antalya

"Klinisyenler enfeksiyonun direkt
kanıtını indirekt kanıtlarına
tercih ederler"



Virolojik Tanı Yöntemleri



Direkt tanı
yöntemleri

İndirekt tanı
yöntemleri

Virolojik Tanı Yöntemleri

1. Direkt Tanı yöntemleri

- Direkt inceleme

 - Histoloji

 - Sitoloji

- Elektron mikroskopisi yöntemi

- Hücre kültürleri

- Antijenlerin saptanması

 - İmmün boyama (-floresan, -peroksidaz, vb)

 - ELISA

 - Lateks agl.

- Nükleik asitlerin tayini

 - Moleküler testler (PCR vb)

Virolojik Tanı Yöntemleri

2. İndirekt Tanı Yöntemleri

- Özgül antikorların araştırılması

IgM

IgG

IgG avidite

serum, BOS, vb.



Örnek Toplama ve Transport

- Örnekler giriş kapısından alınmalı..
- Solunum virusları; sürüntü yerine nazofarengeal aspirasyon veya yıkama örnekleri
- Sürüntü örnekleri; Konjunktiva, üretra, serviks, vezikül veya ülserler
- Taze dışkı, rektal sürüntüden üstündür.
- İdrar örnekleri, aspiratlar ve diğer sıvılar (BOS gibi) temiz ve steril bir kaba alınmalıdır.

Transport Besiyerleri

- Kuru eküviyon uygun değil
- Pamuk veya dakron çubuklu transport besiyerleri
- Bakteri izolasyonu için kullanılan çubuklar virüslara uygun değildir.
- Benzer şekilde virus için kullanılacak çubuklar da birçok bakteri veya mantarın üremesini inhibe ederler.
- Enfeksiyöz virus izolasyonunda kalsiyum alginatlı çubuklar da kullanılmamalıdır (alginat enfektiviteyi bozar)

Kan ve serum örnekleri

- HIV → lenfosit ve makrofajlar
- CMV → nütrofillerde; az oranda mononükleer hücrelerde
- Enteroviruslar → plazmada ve lökositlerde
- Virus saptanması için kan örneği sedimentasyon veya hücre ayrıştırma ile nütrofil ve mononükleer hücre olarak ayrıştırılır.

Antikoagülan Seçimi

- Virus izolasyonu için en iyi antikoagülan ??
- HIV virusu izolasyon oranlarına göre EDTA önerilir.
- Heparinli kanda virus izolasyon oranları daha düşüktür.
- Heparin PCR gibi nükleik asit çoğaltma yöntemlerini de inhibe eder.

TRANSPORT VE SAKLAMA ISISI

- Uygun transport ve depolama ısısı + 4°C (buzdolabı veya kuru buz).
- Viruslar bu ısıda 2-4 gün stabildir.
- -20°C'da (olağan dondurma ısısı) saklama virusu tahrip eder veya enfektivitesini azaltır.
- Dondurma viral antijen tayinini de bozar.
- Örnekler 96 saatten fazla saklanacaksa -70°C'da saklanmalı ve laboratuvarlar arasında kuru buzda taşınmalıdır.

Virus izolasyonu= Kültür

- HSV-1, HSV-2
- CMV, VZV
- RSV
- İnfluenza A ve B
- Parainfluenza virusları
- Adenoviruslar
- Enteroviruslar (Coxsackie, echovirus, poliovirus)
- Kızamık virusu

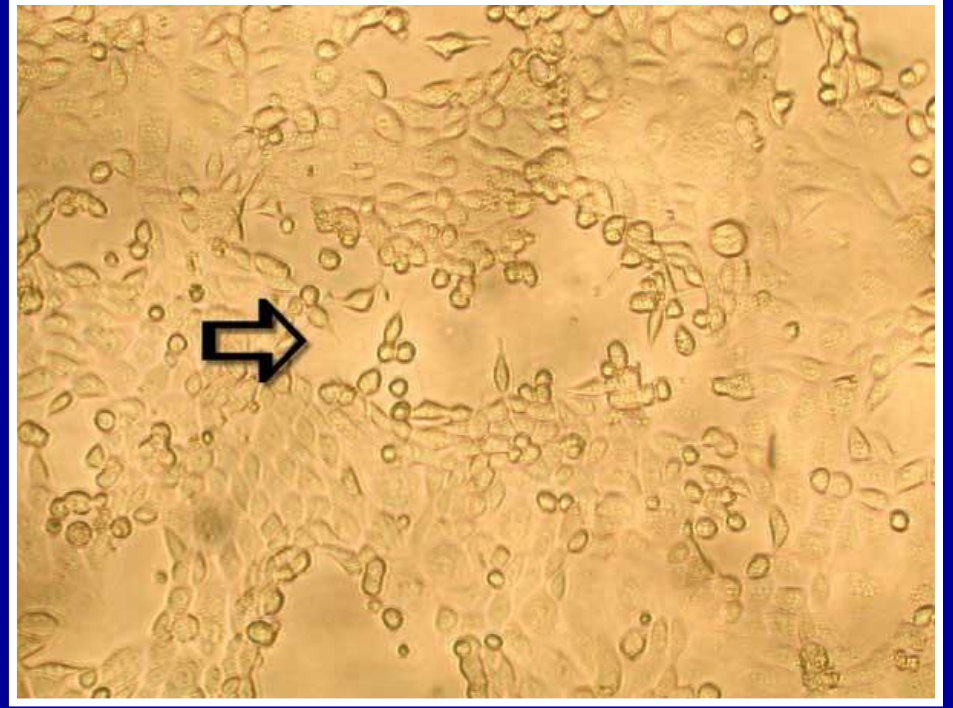
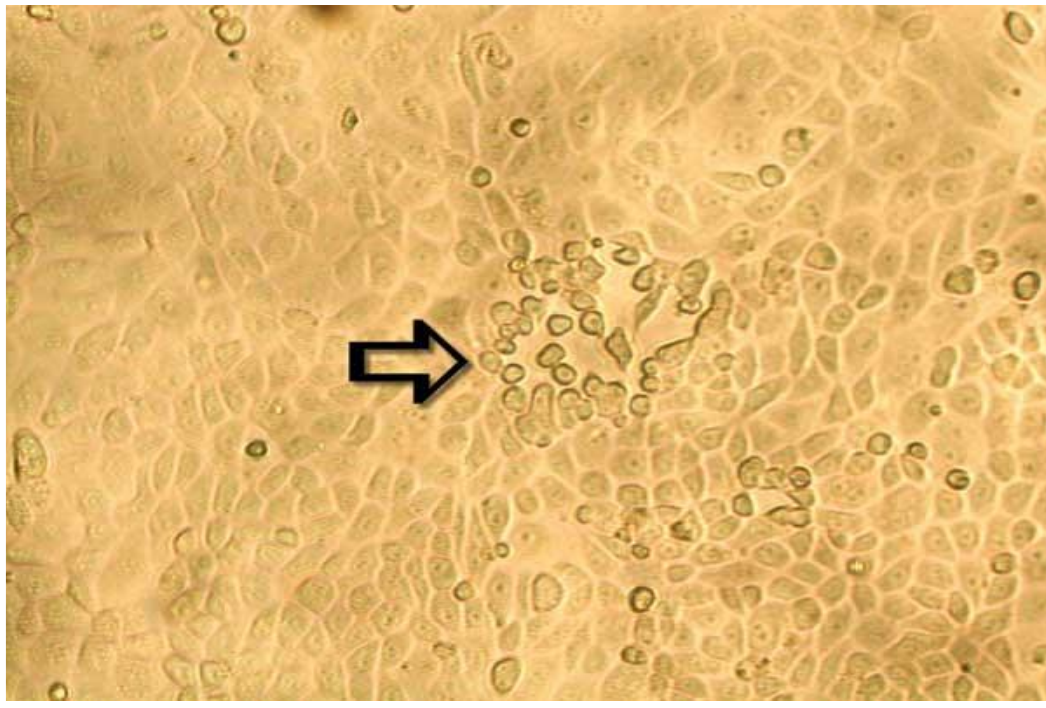
Virus izolasyonu= Kültür

- İnsan fibroblast hücre dizilerinde (deri veya akciğer fibroblastları): HSV-1, HSV-2, VZV ve CMV
- Primer rhesus maymunu böbrek hücre dizilerinde: Solunum virusları ve enteroviruslar
- Hep-2 hücreleri: RSV

Sitopatik etki

- SPE: virus kültürde çoğalırken oluşan morfolojik değişiklikler.
- Bazı virüslarda SPE 2 günde oluşurken (HSV), bazılarında 1 haftada (enterovirus), bazılarında ise haftalar sonra (CMV) görülür.
- Özel bir virüsün hücre kültüründe ilk belirlenmesi enfekte hücre tipi, SPE'nin saptanma zamanı ve görünümüne göredir.

Human Metapneumovirus



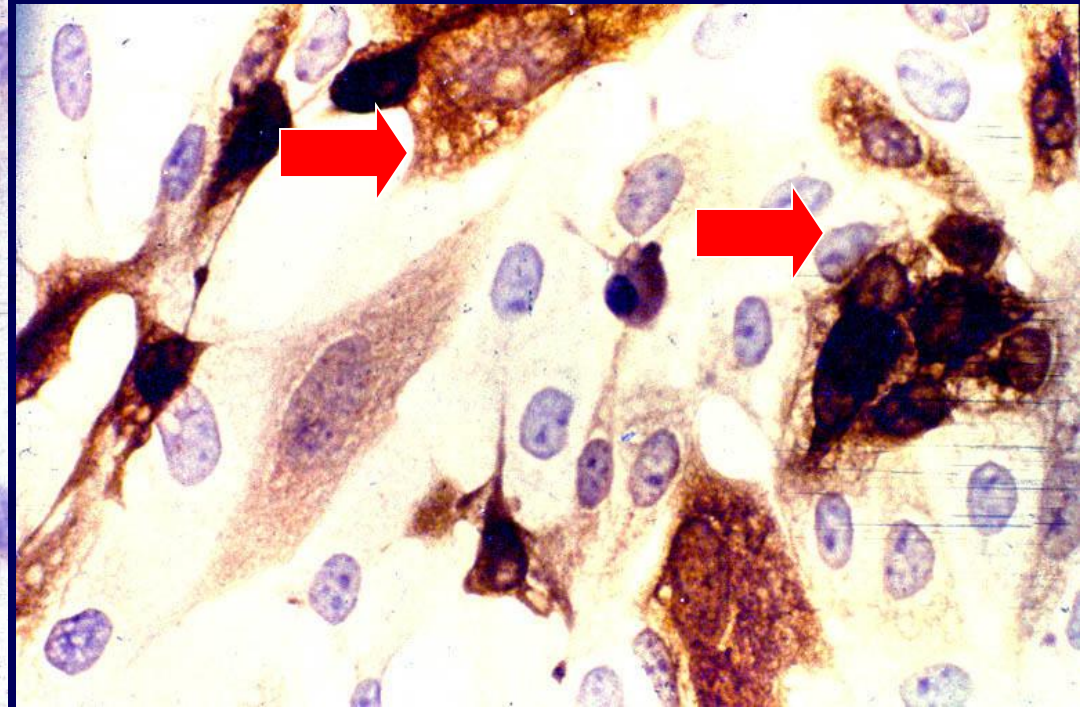
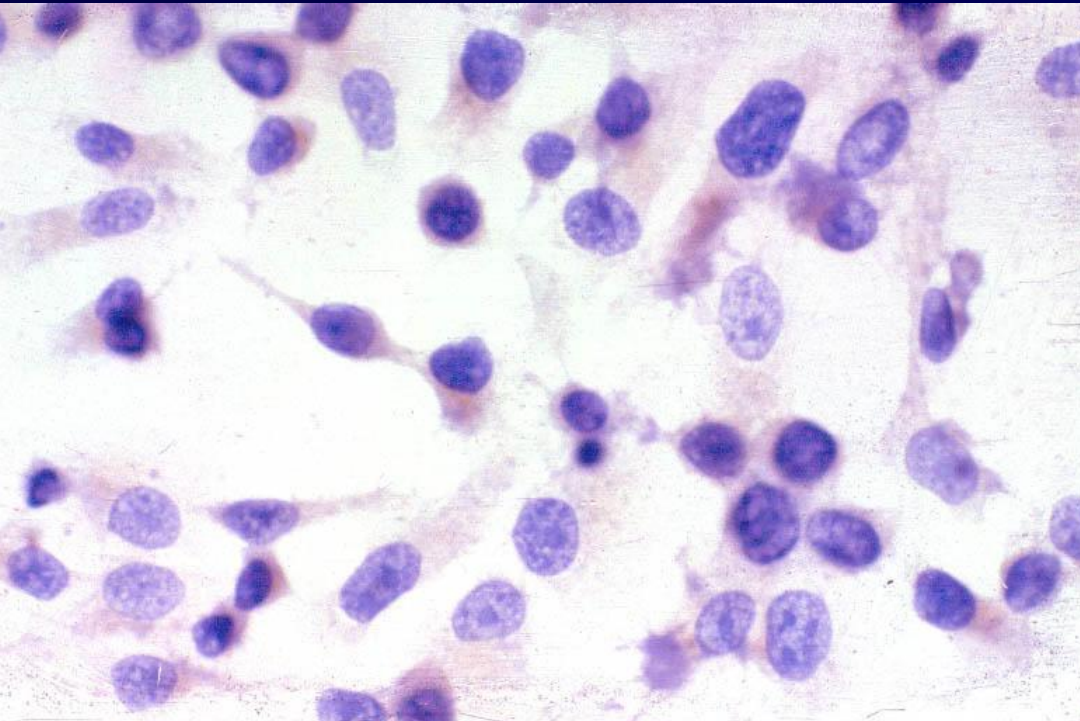
- ✓ Sitopatik etkisi RSV ile benzerdir.
- ✓ Etki 3-23 günde ortaya çıkar

"Shell vial" Yöntemi



- Örnekler ince tabaka şeklinde hücre dizileri içeren "shell vial" üzerine santrifüjle yerleştirilir
- 1-3 günlük enkübasyonun ardından monoklonal antikor ile viral antijen boyanır.
- Virusların saptanma sürelerini kısaltır, oranları arttırır.
- CMV, HSV, VZV, solunum virusları ve enteroviruslar

HSV-Shell vial



Kültür Yöntemleri-Avantajlar

1. Çok sayıda virusun saptanmasını sağlar.
2. Enfeksiyöz ajanın ileri tiplendirmeler için eldesini sağlar.
3. %100 özgüllük (Duyarlılık %50-70)
4. Antijen tayinine göre yüksek duyarlılığa sahiptir.

Kültür Yöntemleri-Dezavantajlar

1. Özel ekipman, destek ve deneyimli personel gerektiren laboratuvarlar şarttır.
2. Antijen tayinine göre daha uzun süre gerektirir (1-30 gün)
3. Uygun olmayan örnek alma ve transport koşullarına birçok virus duyarlıdır.
4. Üremeyen viruslar

Elektron Mikroskopisi

- Viruslar çok küçük olduğundan ışık mikroskobu ile görülemezler.
- Rutin tanıda pratik değil, aynı morfolojik görünüme sahip virusları birbirinden ayırmak mümkün değil.
- Gastroenterite neden olan diğer viruslar (Norwalk virusu, astrovirus, calicivirus ve ufak yuvarlak viruslar)
- Vezikül sıvısında (VZV ve HSV),
- Beyin dokusunda (HSV, CMV, EBV)
- Virusun saatler içinde saptanmasını sağlar; ancak fazla sayıda virus gerekir (mL'de 1×10^6)

Elektron Mikroskopisi Yöntemi

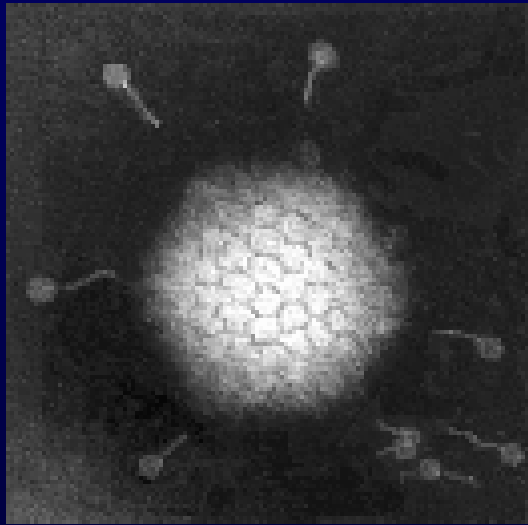
Direkt görüntü
Virus karakterizasyonu
Hızlı
Ayırdedici

Pahalı
Duyarlılık 10^6 part./mL

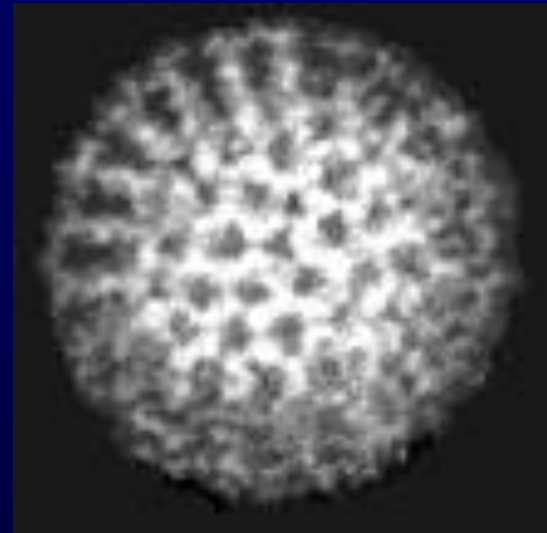
Araştırma lab.

İmmün Elektron Mikroskopisi

Elektron Mikroskopisi Yöntemi



Adenovirus



Rotavirus

Antijen Tayini

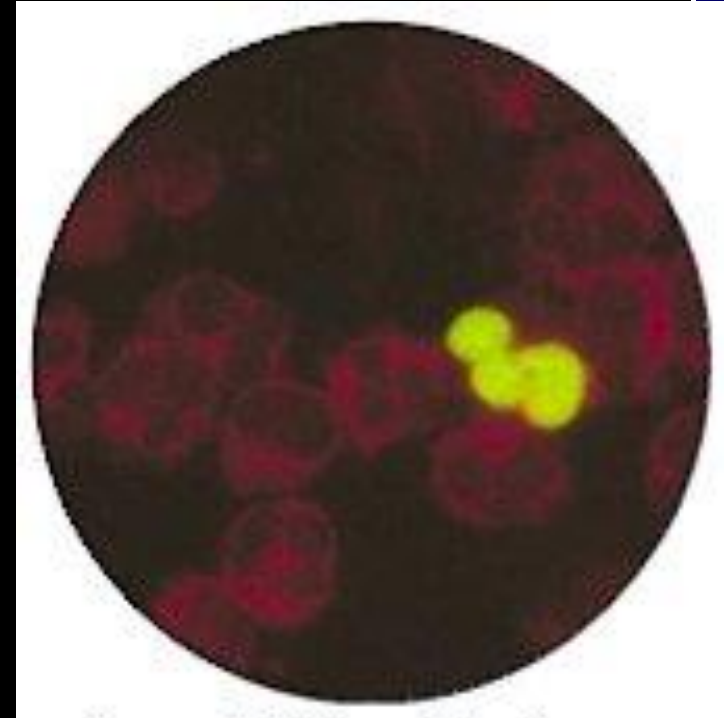
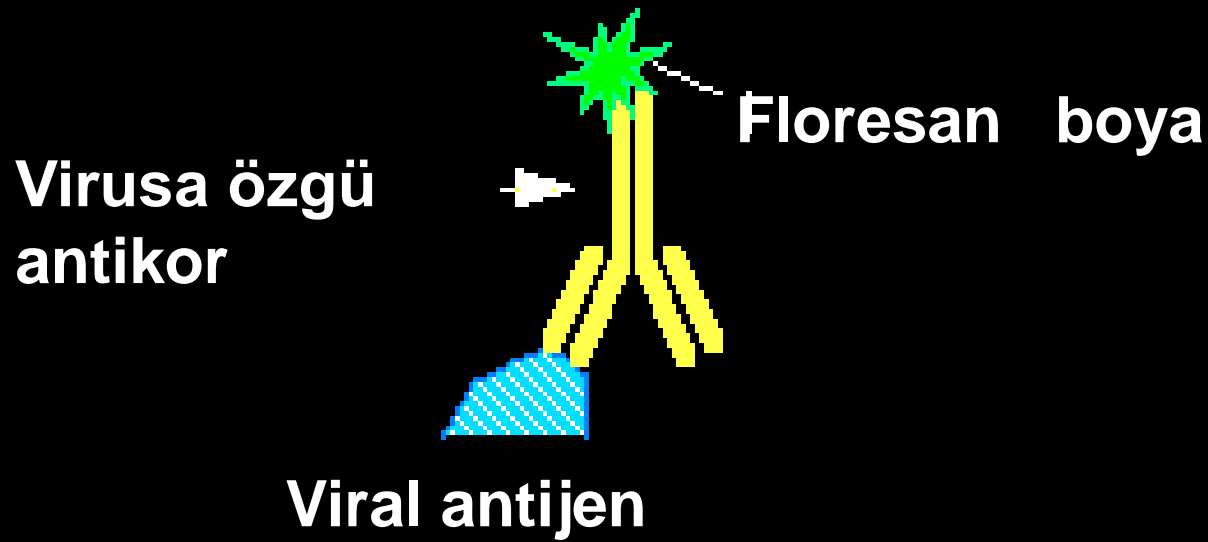
- Nazal salgılar
- Nazofarengeal salgılar
- BAL sıvısı
- Vezikül sürüntüsü
- Konjunktiva salgısı
- Serviks
- Üretra sürüntüsü
- Dışkı örnekleri
- Doku biyopsi örnekleri
- Viral antijenler hücre ile birlikte bulunduğundan alınan örneklerde yeterli sayıda enfekte hücre bulunmalıdır.
- Mukoza veya deri epiteliyal hücreleri pürülan materyalden daha iyi bir örnektir.

Antijen Tayini

- EIA veya FA test kitleri
 1. Dışkıda rotavirus ve enterik adenoviruslar
 2. Solunum yolu örneklerinde RSV, influenza A ve B virusları, parainfluenza, adenoviruslar
 3. Serumda HBsAg ve HIV p24 antijeni
 4. Vezikül veya ülser sürüntü örneklerinde VZV ve HSV
 5. BAL ve kan örneklerinde CMV

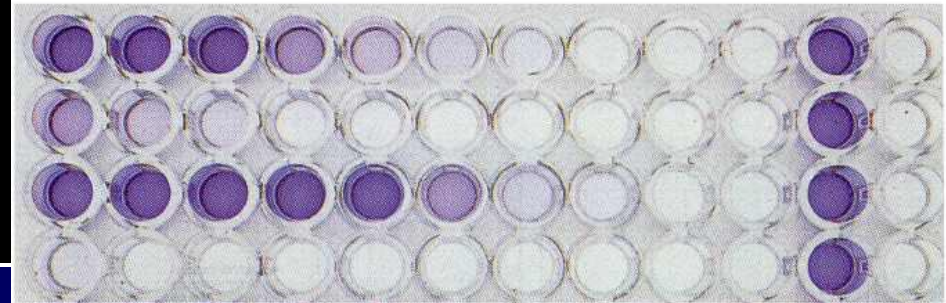
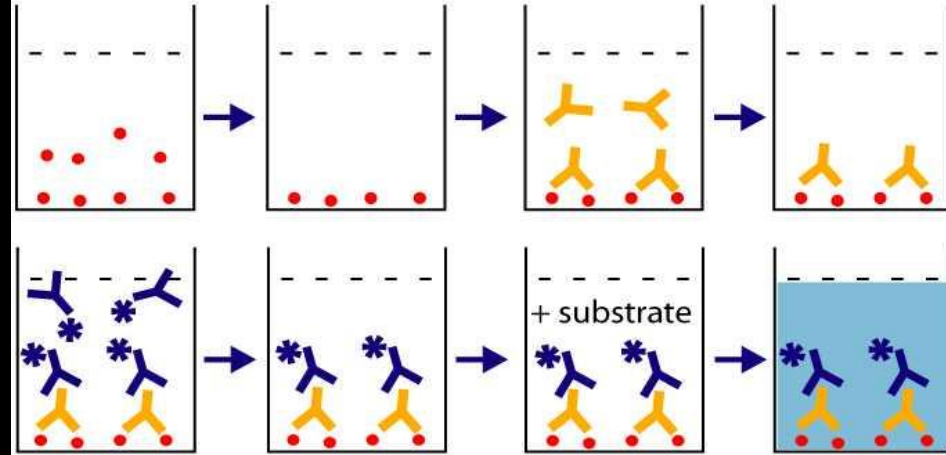
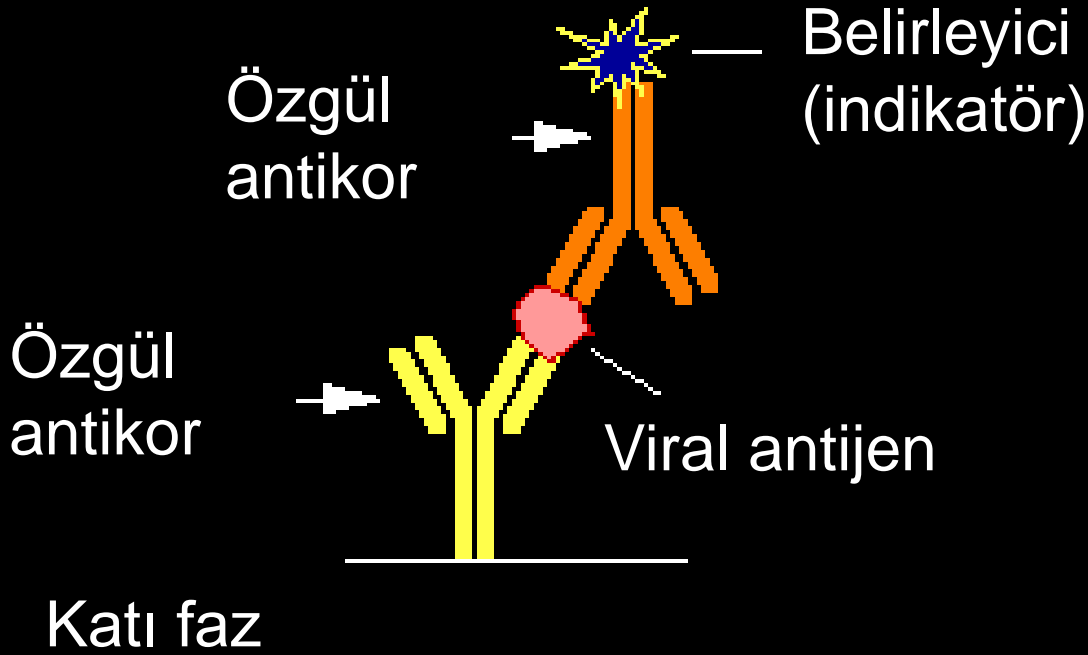
Viral antijenlerin saptanması (İmmün floresan antikor testi)

İmmün floresan antikor testi



Viral antijenlerin saptanması (ELISA)

ELISA (Antijen saptama)



Antijen Tayini-Üstünlükler

1. Örnek toplanması ve transportu işlemlerine gerek yoktur.
2. Kültüre edilemeyen virusların saptanmasını sağlar (rotavirus, enterik adenovirus, HBV, HIV)
3. Hücre kültürü materyalleri ve yüksek deneyimli personel gerektirmez.
4. Bazı viruslarda kültüre göre daha duyarlıdır.
5. Sonuçlar hızla elde edilir (saatler içinde).
6. Canlı virus şart değildir.

Antijen Tayini-Dezavantajlar

1. Klinik önemli bir çok virus (EBV, HAV, HCV ve enteroviruslar, kızamıkçık, kabakulak, arboviruslar, parvovirus B19) için kullanılabilir kit yoktur.
2. Kültür ile karşılaştırıldığında birçok virus için daha düşük duyarlılık ve tüm viruslar için daha düşük özgünlük gösterir.



Serolojik Yöntemler

- Hasta serumunda spesifik antikor gelişiminin gösterilmesi (IgG, IgM, IgA)
- Hasta doku veya sıvılarında bilinen etkene karşı hiperimmün serum kullanılarak enfeksiyon ajanının antijeninin gösterilmesi



Serolojik Tanı

1. Yakın tarihli, devam eden veya geçirilmiş enfeksiyonu gösteren IgG antikorları (HIV)
2. Akut veya yakın tarihli enfeksiyonu gösteren virusa özgü IgG'nin anlamlı artışı
3. Virusa özgü antijenler (Hepatit B yüzey antijeni)
4. Geç akut veya erken nekahat serumunda bulunan virus spesifik IgM varlığı gösterilebilir.

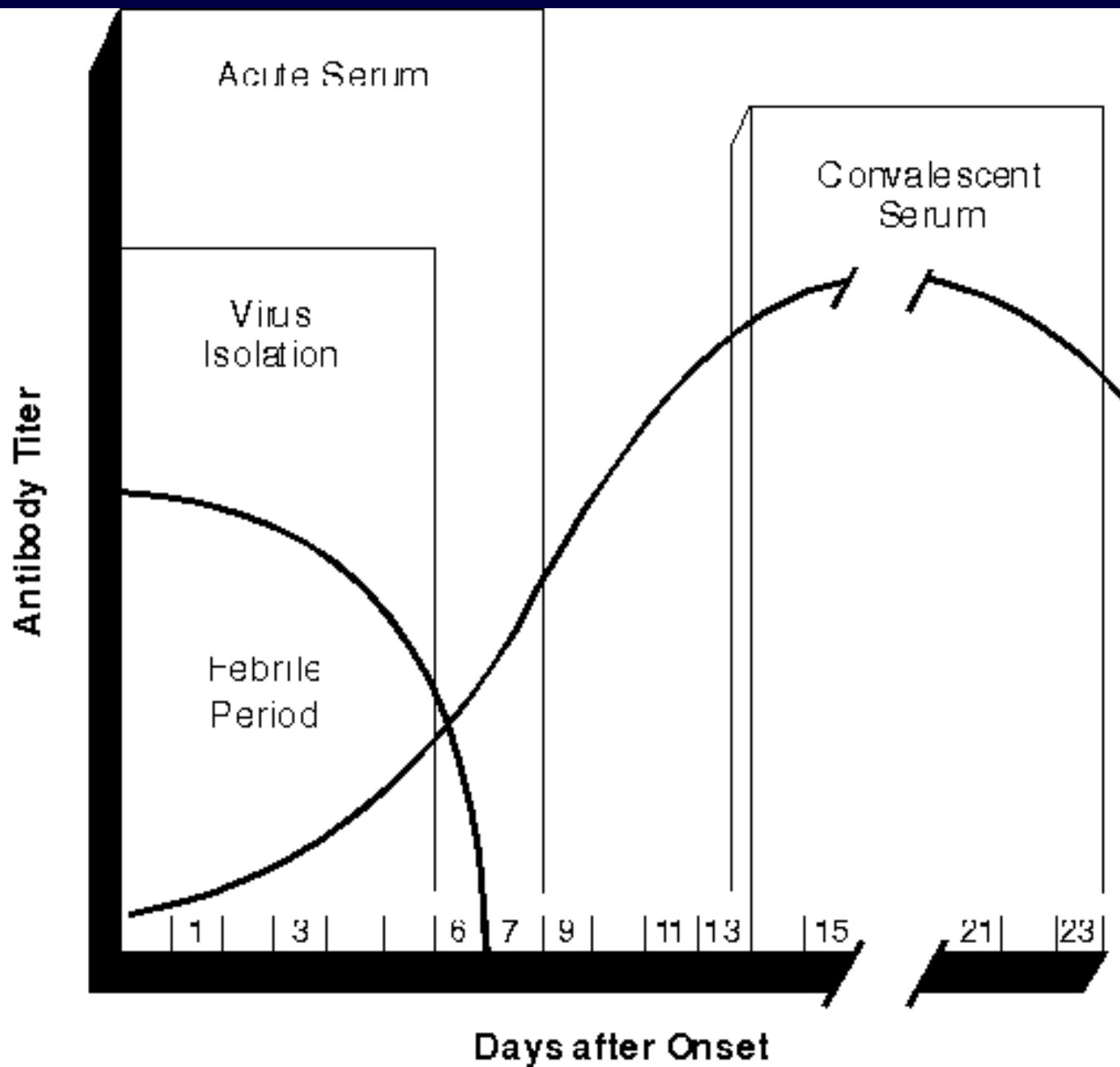
Serolojik Yöntemler



- Seroloji sonuçlarını yorumlamak virusa özgüdür.
- Örneğin, HIV antikorlarının varlığı varolan enfeksiyonu gösterirken rubella IgG varlığı bağışıklığı göstermektedir.

Serolojik Yöntemler

- Kuluçka süresi uzun olan viruslar için (3-6 hafta) uygun; Hastalığın bulguları saptandığında serumda antikorlar mevcuttur (EBV, CMV ve viral hepatitler).
- Kuluçka süresi günler ile 2 hafta arası olan viruslarda (kızamık, kabakulak veya kızamıkçık vb) bulgular ortaya çıktığında antikor saptanamaz veya çok düşük titrelerde dir.



Optimal Time for Collecting Specimens for Isolation and Serology

Seroloji için örnek alımı

- Serum veya plazma
- Antikoagülan olarak EDTA, heparin veya sodyum sitrat uygundur.
- Kan laboratuvara oda ısısında taşınmalıdır.
- Hemen çalışılmayacaksa buzdolabında + 2-8°C'de saklanmalıdır.
- Serum veya plazma en kısa sürede ayrıştırılır.
- Hemen test edilmeyecekse -20°C'de dondurulmalıdır.
- Dondurma ve çözme işlemlerinin tekrarından kaçınılmalıdır.

GENEL BİLGİLER

- Serum IgG enfeksiyondan 2-3 hafta sonra artar ve yaşam boyu (+)
- Tanı için akut dönem ve 2-4 hafta sonraki serum örnekleri aynı anda test edilmelidir.
- İki serum arasında antikor titrelerinin 4 kat ve üzerinde artışı yeni enfeksiyon lehinedir.


GENEL BİLGİLER

- IgM antikorları 1-2 haftada artar ve 2-3 ay persiste eder.
- Enfeksiyon ajanına özgü IgM varlığı tanı koydurucudur.

Bazı Viral Enfeksiyonların Tanısında Kullanılan Serolojik Testler

	KF	HAI	NEUT	IFA	RIA	ELISA	İmmunoblot
CMV	+	+	+	+			
EBV				+			
Hepatit A					+	+	
Hepatit B					+	+	
Hepatit C						+	+
HSV	+		+				
İnfluenza	+	+	+				
Kızamık	+	+					
Kabakulak	+	+					
Polio	+		+				
RSV	+	+	+	+		+	
Rubella	+	+	+				
Varisella	+						

IgM'in Yalancı (+)'liği

1. Çapraz reaksiyon (herpesviruslar arasında)
2. Romatoid faktör (+)  Yanlış IgM (+)
3. Akut hastalıktan aylar sonra IgM'in persistansı (EBV);
4. Latent virusların reaktivasyonu (HSV ve CMV) sonucu IgM yapımına bağlıdır.

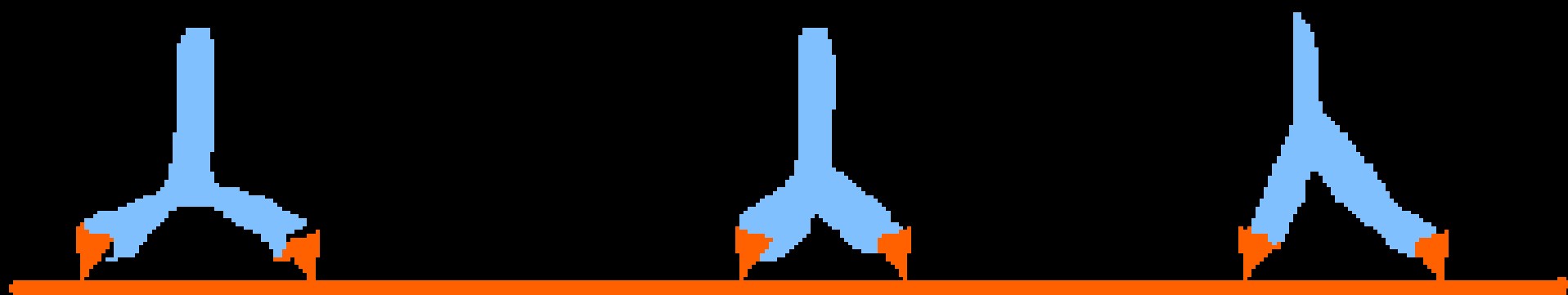
IgM'in Yalancı (-)'liği

1. İmmünolojik immatür konaklarda (konjenital CMV veya HIV enfeksiyonu) veya immün süprese bireylerde (AIDS vakaları) gelişmemiş, zayıf veya gecikmiş IgM yanıtı olabilir.
2. Aynı anda serumda hem IgM hem de IgG var ise Yüksek titredeki IgG molekülleri antijen test sistemlerinin tüm alanlarını bağlar. IgG'nin antijen aviditesi > IgM
 - (YD'da anneden geçen IgG ve kendi IgM' i var).

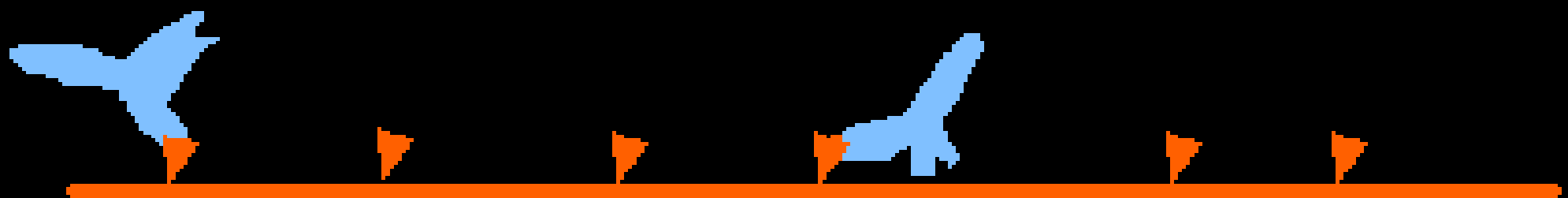
IgG Avidite Testi

- Primer ve sekonder enfeksiyonların ayırımında kullanılır.
- Enfeksiyonun erken döneminde oluşan IgG antikoru düşük antijen aviditesi gösterirken yeni oluşan IgG'ler yüksek avidite gösterir.
- Özellikle Konjenital enfeksiyon tanısında önemli.

High Avidity



Low Avidity



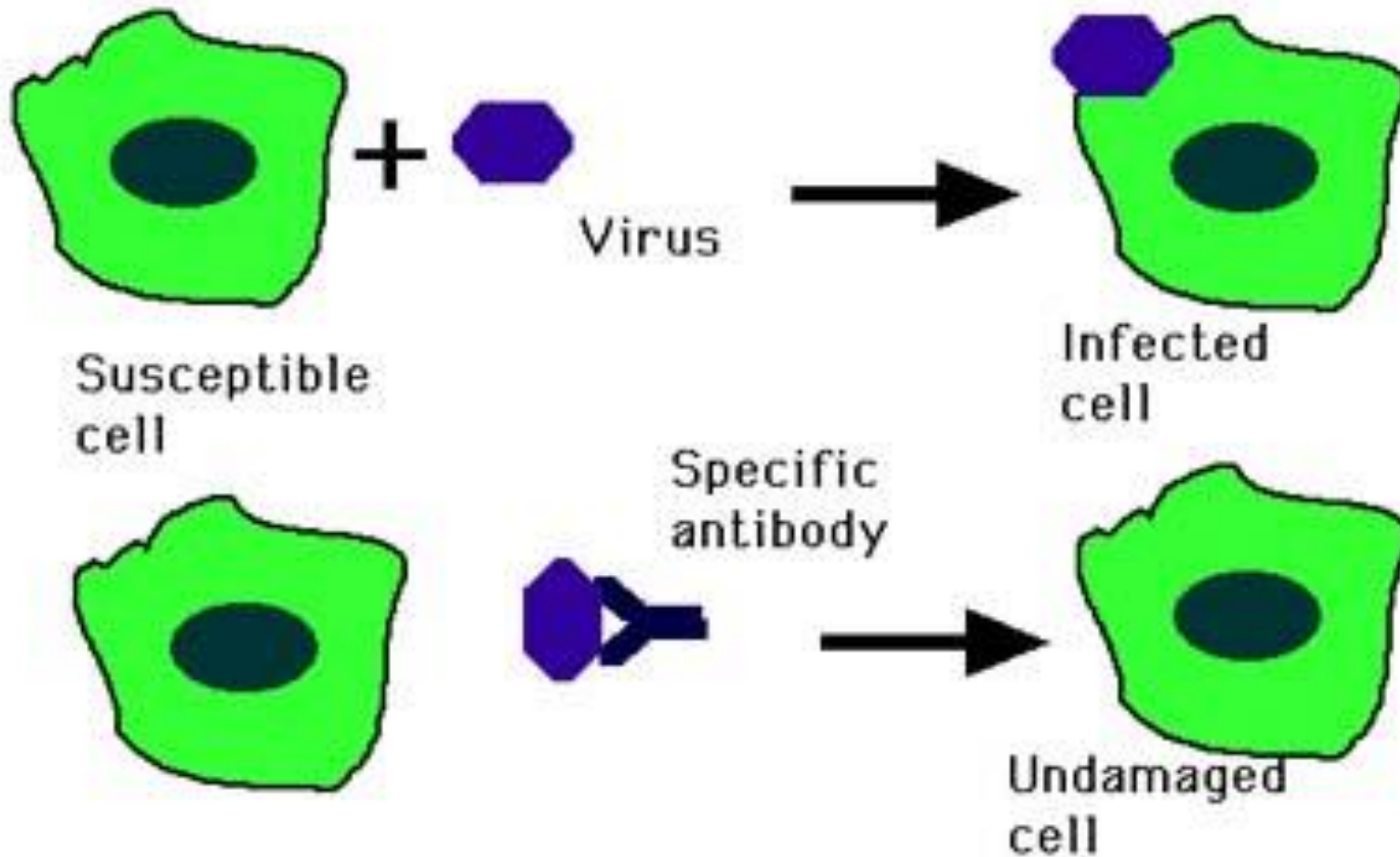
Low Avidity



Serolojik Yöntemler

- Avantaj: örnek eldesinde özel bir önleme gerek olmaması ve yaygın kullanımındır.
- Dezavantajlar;
 1. IgG antikor testlerinde akut ve konvalesan serum gerektirmesi.
 2. Yanlış pozitif ve yanlış negatif IgM antikor sonuçları.
 3. Kısa kuluçkası olan viruslarda tanının kesinleşmesi için 2-3 hafta gerektirmesidir.

Virus Nötralizasyon Testi



Nükleik Asid Tayin (NAT) Yöntemleri

- ❖ Virusun hızlı izolasyon veya antijen saptama yöntemleri ile belirlenemediği veya duyarlı kitlerin olmadığı durumlarda kullanılabilir.
- ❖ Viral genomun sadece belirli bir bölgesine yönelik proplar kullanılır
- ❖ Sadece özgün komplementer DNA veya RNA'yı bağlar.

Nükleik Asid Tayin (NAT) Yöntemleri

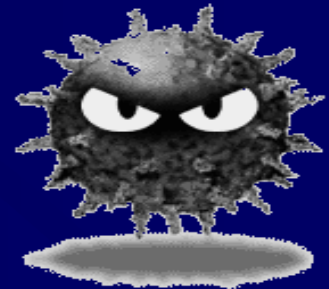
- Bu yöntemler
 - Ensefalitli hastaların BOS'larından HSV tayininde,
 - Kronik anemili hastaların serumunda parvovirus B19 saptanmasında
 - Viral menenjitte BOS'dan enterovirusların belirlenmesinde yararlı.
 - Solunum yolu enfeksiyonlarında
- Bazı viruslar için ticari kitler (CMV, HIV, HPV) bulunsa da bu testlerin büyük kısmı ancak referans laboratuvarlarında yapılabilmektedir.

Nükleik Asid Tayin (NAT) Yöntemleri

1) Hibridizasyon (**birleşme**)

2) Amplikasyon (**çoğaltma**)

başlıkları altında incelenir



Hibridizasyon-1

- **DNA molekülü;** Komplementer, Isı yada çeşitli kimyasal maddelerle ayrılabilen, uygun ısı, tuz konsantrasyonu, PH'da yeniden birleşebilen 2 sarmal zincire sahiptir.
- **İşte tanı amacıyla nükleik asitlerin araştırılması**
Molekülün bu özelliklerine dayanmaktadır.

Hibridizasyon-2

- Klinik örnekte varsayılan etkenin nükleik asidi ısı ve kimyasal maddelerle iki zincire ayrılır ve Bu zincirlerin varlığı PROB adı verilen işaretli DNA ve RNA parçasıyla gösterilmektedir.
- PROB adı verilen reaktiflerin işaretlenmesinde
 - ✱ Flurokrom, Enzim, Kemilüminesan madde veya Radyoizotop kullanılmaktadır.

Hibridizasyon-3

- 1) Sıvı faz hibridizasyonu
- 2) Katı faz hibridizasyonu
 - a) Makroarray
 - Southern blot
 - Northern blot
 - Dot blot
 - b) Mikroarray
- 3) İn situ hibridizasyon

Hibridizasyon Kullanımı-1

- ★ 16 S ve 23 S r RNA hedeflenmesiyle patojen bakterilerin
 - ★ Filogenetik analizleri (Tür, cins, aile, filum)
- ★ Patojen bakterilerin direkt tespiti ve identifikasyonu
- ★ Çevredeki ekosistemlerde ve karışık enfeksiyonlarda
 - ★ Mikrobiyal hücreleri ayırmada
- ★ Yavaş üreyen, kültürü zor bakterilerin
 - ★ Legionella
 - ★ Bordetella
 - ★ Mycobacterium
 - ★ Brucella vb. hızlı tanı ve identifikasyonunda kullanılır

Hibridizasyon Kullanımı-2

- ✱ Genital örneklerde
 - ✱ HPV-DNA
- ✱ Hepatit B' li hastalarda
 - ✱ HBV-DNA
- ✱ AIDS'li hastalarda
 - ✱ HIV- RNA veya HIV proviral DNA
- ✱ Transplant hastalar ve kongenital enf
 - ✱ CMV-DNA
- ✱ *M. tuberculosis*, *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis* vb. bir çok bakterinin moleküler tanısında
- ✱ Pediatrik sepsis olgularında kan patojenleri
 - ✱ *S.aureus*

Amplifikasyon Yöntemleri

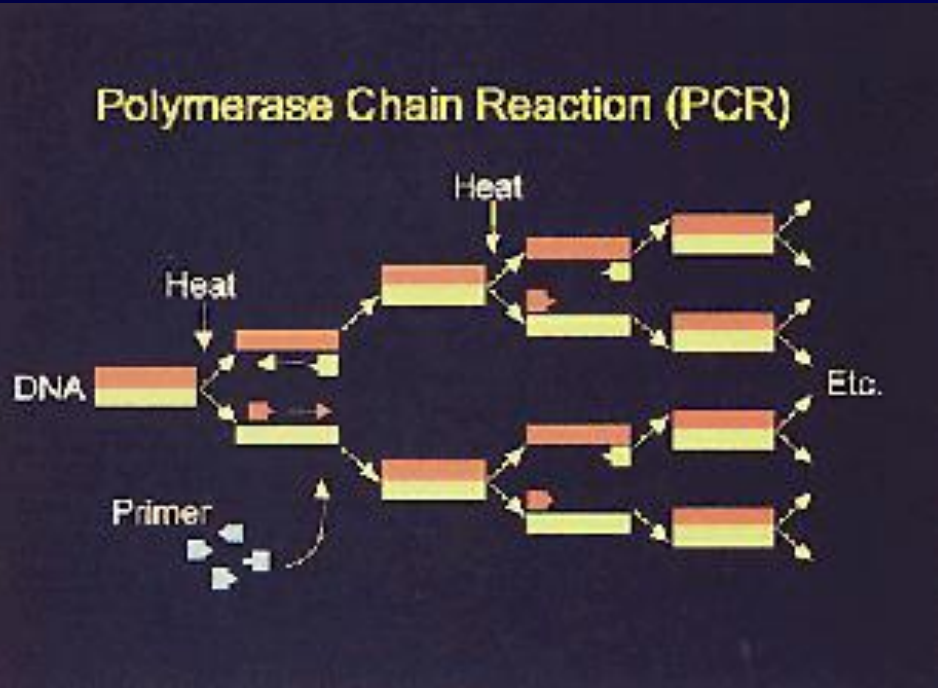
İncelenecek örnekteki az sayıda hedef molekülün (DNA, RNA)

✱ İn vitro enzimatik replikasyon yöntemleriyle, saptanabilecek düzeylere çıkarılmasıdır.

❖ PCR

- ✱ Klinik ve Adli tıp
- ✱ Mikrobiyoloji
- ✱ Fizyoloji
- ✱ Veterinerlik
- ✱ Zooloji alanlarında kullanılmaktadır
- ✱ İmmünoloji
- ✱ Epidemiyoloji
- ✱ İlaç ve aşı çalışmaları
- ✱ Ziraat ve tarım

Amplifikasyon Yöntemleri



1. Hedef amplifikasyon;

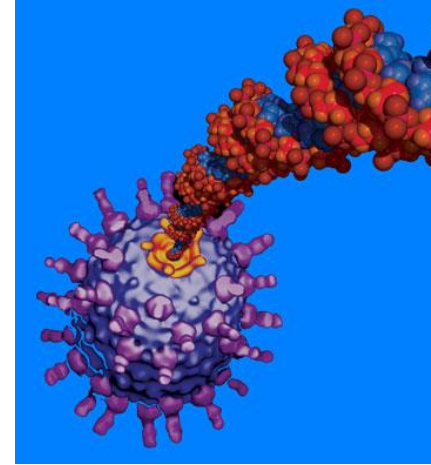
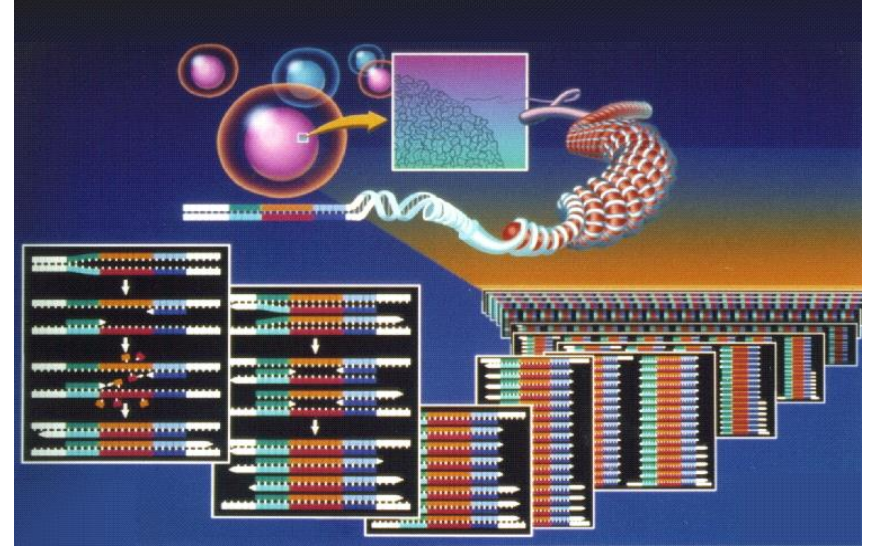
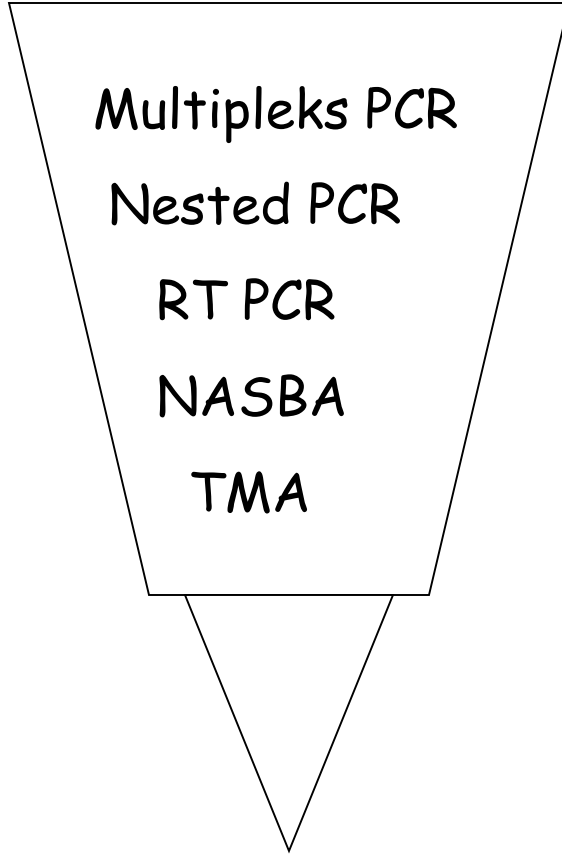
- PCR
- Strand displacement amplifikasyonu (SDA),
- Nükleik asid sekans amplifikasyonu (NASBA)
- Transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA) sistemleri

2. Prob amplifikasyonu, Q-beta replikaz ve ligaz zincir reaksiyonu (LCR)

3. Sinyal amplifikasyonu, dallanmış zincirli DNA (bDNA) testidir.

Neden Amplifikasyon Yöntemlerine gerek duyarız?

PCR ve Modifikasyonları



Hedef viral DNA ya da RNA'nın çoğaltılması

PCR

* Klinik örnekte DNA aranıyorsa

* 4 adet deoksinükleik trifosfat (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

* Özgül oligonükleotik primerleri (15-30 bazlık)

* Isıya dayanıklı *Taq* polimeraz enzimi

94 °C'de (denatürasyon)

54 °C'de (bağlama)

72 °C'de (Genişleme)

♣ Bu işlem 25-30 kez yapılır

* Southern hibridizasyonla tanımlama yapılır

* Klinik örnekte RNA aranıyorsa

* RNA'nın elde edilmesinden sonra

* Revers-Transkriptaz uygulanarak

cDNA'ya çevrilir

● Daha sonra cDNA amplifiye edilir

★ Değişik PCR tipleri

★ Arbitrarily primer PCR (APP)

★ Multiplex PCR (MP)

★ Nested PCR (NP)

★ RT-PCR (RTP)

★ Kantitatif PCR (KP)

★ Real time PCR (RTIP)

◆ En gelişmiş sistem

◆ çoğaltma ve tanımlama aynı anda ve tüpte

✿ PCR' IN KULLANIM ALANLARI ÖZELLİKLE;

✿ Enfeksiyöz mikroorganizmaların

- ◆ Saptanması

- ◆ İdentifikasyonu

- ◆ Kantitasyonu

- ◆ Alt tip değerlendirmesi

- ◆ Bakterilerde antibiyotik direnci

 - ♣ **Enterokoklarda** vankomisin direnci
(Van A,B,C)

 - ♣ ***S. aureus***'da mecA geni

- * Epidemiyolojik tiplendirmede (aynı kökenin iki tipi)
- * Enfekte hastaların antimikrobiyal tedavisini izlemede
- * İnsan ve kanser genotipi incelemelerinde
 - ◆ DNA yapısındaki mutasyonlar
 - ◆ Gen tayini ve dizilimi saptaması
 - ◆ Gen ve genetik polimorfizmi saptama
 - ◆ Transkriptlerin özellikleri ve miktarı saptanması
 - ◆ Genetik manipülasyonun saptanması

DİĞER YÖNTEMLER

- LCR (Ligaz Zincir Reaksiyonu)
- SDA (Strand Displacement Amp-Zincir Yer Değiştirme)
- Transkripsiyon temelli Amplikasyon teknikleri
 - ☀ Hedef molekülleri RNA'dır
 - * TAS (Transcription based Amp)
 - * TMA (Transcription mediated Amp)
 - * NASBA (Nükleik Asid Sequence based Amp)
 - ◆ Northern blot ile tanımlama yapılır

Sinyal (Prob) Amplifikasyon sistemleri (SAS)

Hedef Amplifikasyon tekniğinin aksine

■ Bu sistemde

✿ Amplifiye edilen ve saptananlar

✿ Problar veya

✿ Hedef dizilime özgül

◆ bDNA (branched DNA)

♣ Hedef DNA

♣ bDNA probu ile hibridize edilir

♣ Bu proba özgün

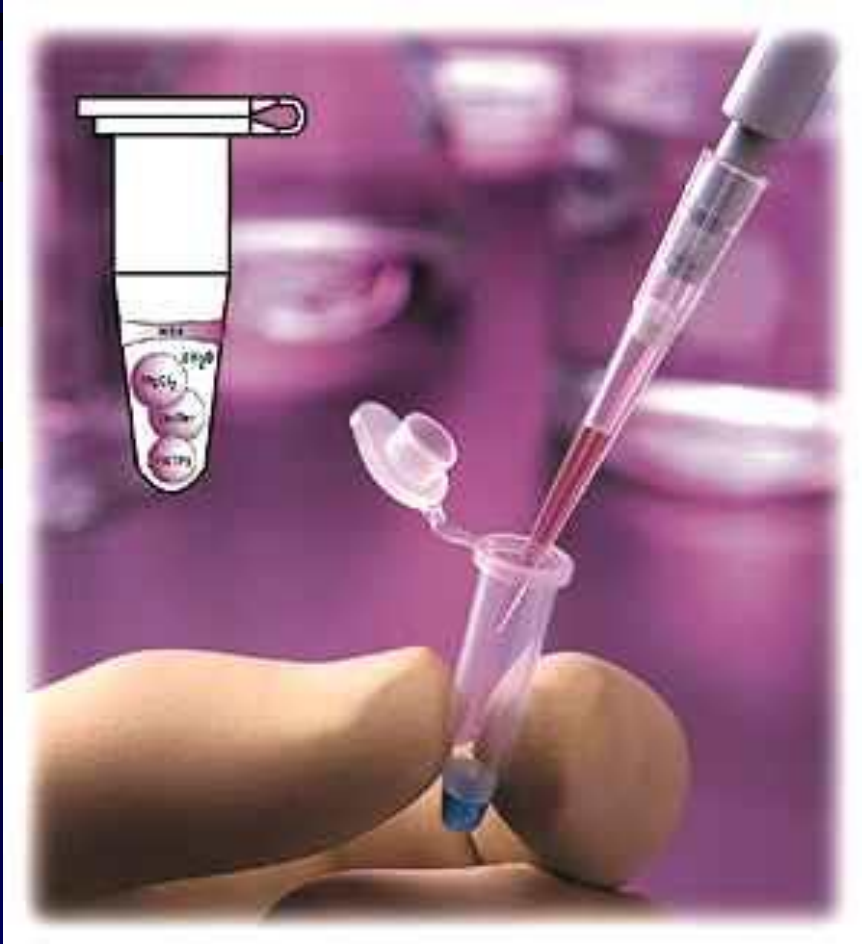
❖ Alkali fosfatazla işaretli ek problar eklenir

♣ Substrat eklenir

♣ Luminimetrede okunur

◆ **HBV, HCV, HIV-1** tayininde kullanılır

Amplifikasyon Yöntemleri



- HIV virusunun plazma veya lökositlerde
- HSV'nin BOS'da,
- Enterovirusların BOS'da,
- HBV ve HCV'nin serumda saptanmasını kolaylaştırır.
- Viral genom saptanması
 - AIDS hastalarında
 - Kronik HBV ve HCV enfeksiyonlarında
 - İmmün süprese hastalardaki CMV enfeksiyonlarında prognozda ve tedavi yanıtında önemlidir

Moleküler tanı testleri (FDA onaylı)

HEPATİT	CYBH	SOLUNUM SSS	SHİ	KÜLTÜR DOĞRULAMA/ DİĞER
HBV HCV HCV GENOTİP	HPV HSV CT NG CT/NG HIV-1	MTB INFLUENZA A ve B INFLUENZA H1N1 ÇOKLU hPIV hMPV Adeno Entero	MRSA Enterokok <i>C. difficile</i>	GBS GAS GA, GV, TV SEPSİS PANELLERİ Mikobakteri tanımlama Mikoplazma

Viral Yük Testleri

- HBV
- HCV
- HIV
- CMV
- EBV
- BK

- HSV
- VZV
- HHV 6, 7, 8
- Adenovirus
- İnfluenza A/B
- SARS
- RSV
- HTLV 1, 2
- Kızamık
- Kabakulak
- Batı Nil
- Parvovirus B19
- Enterovirus

Viral Yük - Amaç

- Hastalığı öngörme
 - CMV, EBV, BK
- Tedavi kararının verilmesi
 - HIV, HBV, CMV, BK
- Tedavi izlemi
 - HIV, HBV, HCV, CMV, BK
- Prognoz belirleme
- Viral kinetiklerin incelenmesi

Moleküler testler: Avantajları

- Hızlı
- Duyarlılık yüksek
"latent viruslar için kantitatif testler"
- Pek çok patojen için uygulanabiliyor
- Seçilen yönteme göre kontaminasyon riski çok az
"MagnaPure + LightCycler"

Tedavi
monitörizasyonu

Moleküler testler: Dezavantajları

- Çoğu standardize değil
“internal ve eksternal kalite kontrol uygulamaları”
- Lab.lar arası sonuç karşılaştırması zor
“tanı karmaşası”
- Rutin sonuç verirken dikkat!
- Pahalı
- Seçilen yönteme göre kontaminasyon riski fazla
“in house PCR”

Bazı spesifik viral enfeksiyonlar ve uygulanacak yöntemler

Ajan	Hastalık Tabloları	Uygun örnekler	Tanı yöntemi	Süre
Kızamık virusu	Kızamık	Nazofarengeal aspirat Serum	Kültür Antijen IgG ve IgM	5 gün 2 saat 1-2 gün
Kızamıkçık	Edinsel veya konjenital rubella	Serum Boğaz sürüntüsü	IgG, IgM Kültür	1-2 gün 5-7 gün
Kabakulak virusu	Parotit, menenjit	İdrar, boğaz sürüntüsü Serum	Kültür IgM, IgG	8 gün 1-2 gün
Parvovirus B 19	Eritema enfeksiyozum, immün süpreselerde hemoglobinopatilerde anemi, hidrops fetalis	Serum	IgG, IgM PCR	2 gün 2 gün

Bazı spesifik viral enfeksiyonlar ve uygulanacak yöntemler

Ajan	Hastalık Tabloları	Uygun örnekler	Tanı yöntemi	Süre
Human herpes virus tip 6	Roseola infantum	Serum	IgG (Kültür,PCR)	1-3 gün
Varicella zoster virusu	Suçiçeği, zona, nadir MSS kompl	Vezikül sıvısı, Serum, BOS	Antijen, Kültür IgG, IgM PCR	2 saat 5-10 gün 1-3 gün 1 hafta

Herpes Simpleks virus

- Kültür: sürüntü örnekleri, menenjit veya ensefalitte BOS ve bazı özel durumlarda doku biyopsisi
- Shell vial yönteminde 16-24 saatte üremede duyarlılık %99, özgünlük %100'dür.
- Direkt antijen testleri: EIA ve FA
- Farklı EIA kitlerinin duyarlılıkları %49-89, özgünlükleri ise %85-100 arasındadır.
- Asemptomatik yayılmayı gösteremez !

Herpes Simpleks Virus-Ensefalit

- Beyin biyopsisi
- Rutin BOS virolojik tetkikleri başarılı değil.
- HSV PCR: Duyarlılık %96, özgünlüğü %99.
- PCR hastalığın ilk 6-7 gününde, hasta asiklovir tedavisi olsa bile pozitiftir.
- Ancak sütçocukları ve çocuklarda %25 yanlış (-) olabilir.

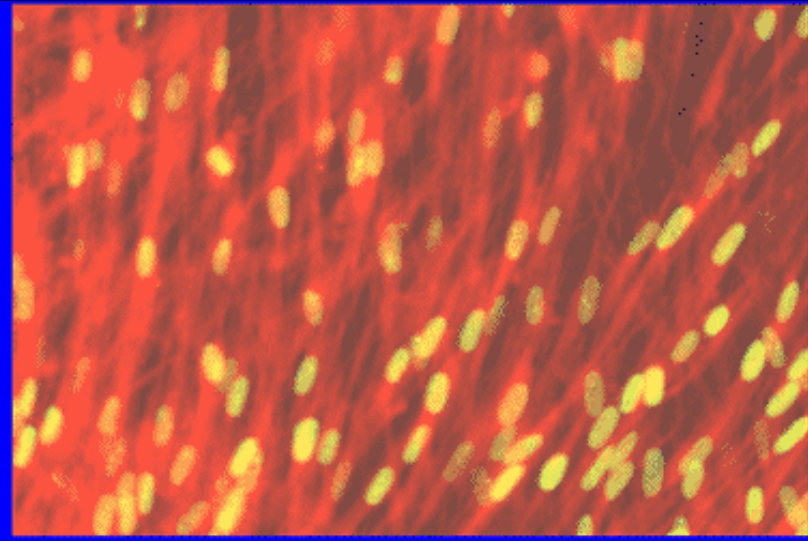
Herpes Simpleks virus-Seroloji

- HSV IgG ve IgM; primer enfeksiyonun 10-20. günü (+)
- HSV IgG titrelerindeki artış rekürren HSV enfeksiyonlarının tanısında kullanılamaz.
- IgM antikoru ise immün süprese bireylerde primer enfeksiyonun belirleyicisi olarak kullanılamaz, çünkü bu bireylerde IgM düzeylerinde artış meydana gelmeyebilir.
- HSV-1 ve HSV-2 enfeksiyonlarını ayırt edemez.

Sitomegalovirus

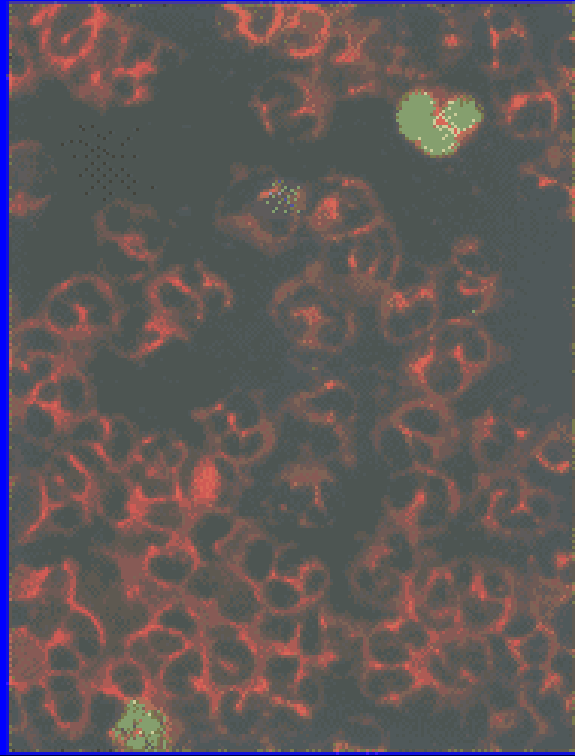
- Kültür, antijen, nükleik asid teknikleri.
- Asemptomatik yayılım-reaktivasyon ayırımı önemlidir.
- Asemptomatik yayılma idrar, servikal salgılar, semen, tükürük ve solunum salgıları ile olmaktadır.

Sitomegalovirus-İzolasyon



- "Shell vial" yöntemi
- Pozitif örnek 24.saatte %68, 48.saatte %96
- Yaşamın ilk günlerinde alınan idrarda CMV izolasyonu konjenital enfeksiyon tanısında önemlidir.
- İmmün süprese bireylerde CMV pnömoniti şüphesinde BAL incelemesi tanıda yardımcıdır.

Sitomegalovirus-Antijen Tayini



- CMV viremisi özellikle ağır immün süprese vakalarda CMV hastalığının bir bulgusudur.
- Lökositlerden CMV izolasyonunun duyarlılığı az.
- Alternatif yöntemler:
- CMV antijenemisinin saptanması
- Lökosit, plazma, serumda PCR
- Hibrid capture analizi; NASBA; ve bDNA testidir.

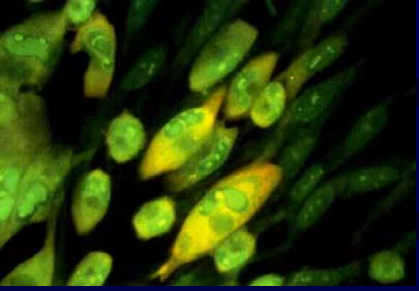
Sitomegalovirus-Antijen, NAT

- İmmün süprese vakalarda özellikle transplantasyon ve HIV vakalarında, daha az oranda da konjenital CMV enfeksiyonu olan sütçocuklarında kullanılır.
- Bu testlerin bazıları kantitatif.
- Kandaki CMV düzeyi ile immün kompromize hastalardaki aktif veya gelecekteki CMV hastalığı arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.
- Bu testler bu hastalarda koruyucu önlemler alınmasında ve CMV tedavisine yanıtın değerlendirilmesinde kullanılmaktadır.

Sitomegalovirus-Seroloji

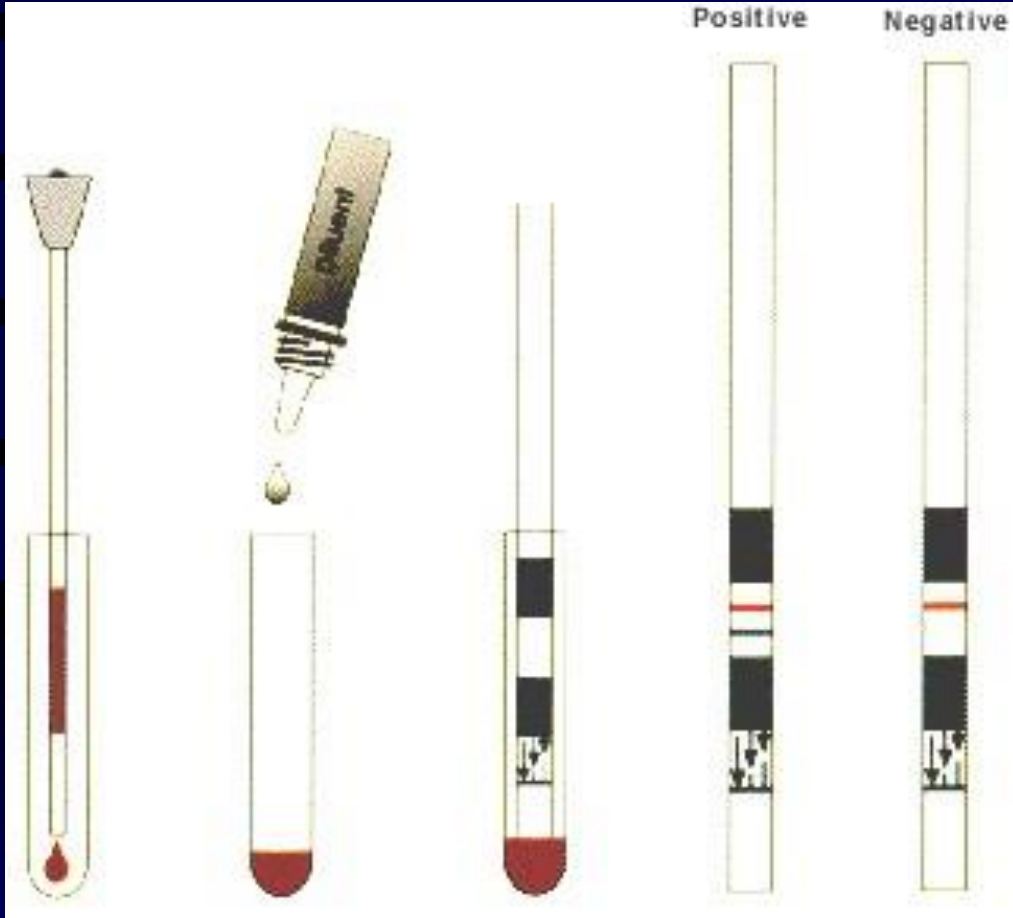
- Serumda CMV IgG tayini akut enfeksiyonun tanısında anlamsızdır.
- CMV-IgM
- Konjenital CMV'de IgG antikorlarını saptayan KF testi yaygın olan test
- Maternal antikorların kaybolduğu 3-6.aylarda KF testi tekrarlanmalı.
- Tek örnekte CMV-IgM gösterilmesi: Konjenital enfeksiyon

Sitomegalovirus Serolojisi



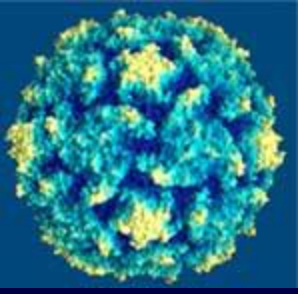
- Primer CMV: IgM artışı 4 ay persiste edebilir.
- Ancak CMV ile sürekli temasta da IgM artabilir.
- CMV-IgG (+) ; IgM (-) ; Geçmiş enfeksiyon
- İmmünolojik olarak immatür veya immün süprese bireylerde akut enfeksiyon sırasında CMV IgM yanıtı gecikebilir veya hiç görülmeyebilir.
- CMV IgG kullanımı; Kan vericileri ve organ verici/alıcılarının CMV durumlarının tespitinde

Epstein-Barr Virus



Paul-Bunnell testi

- Heterofil antikorlar: Serum hastalığı, idiyopatik
- Koyun eritrositlerinin aglutine edilmesi prensibine dayanır (IgM antikorları)
- Geliştirilmiş şekli: Monospot test (at veya siğir eritrositleri); duyarlılık arttırılmıştır.



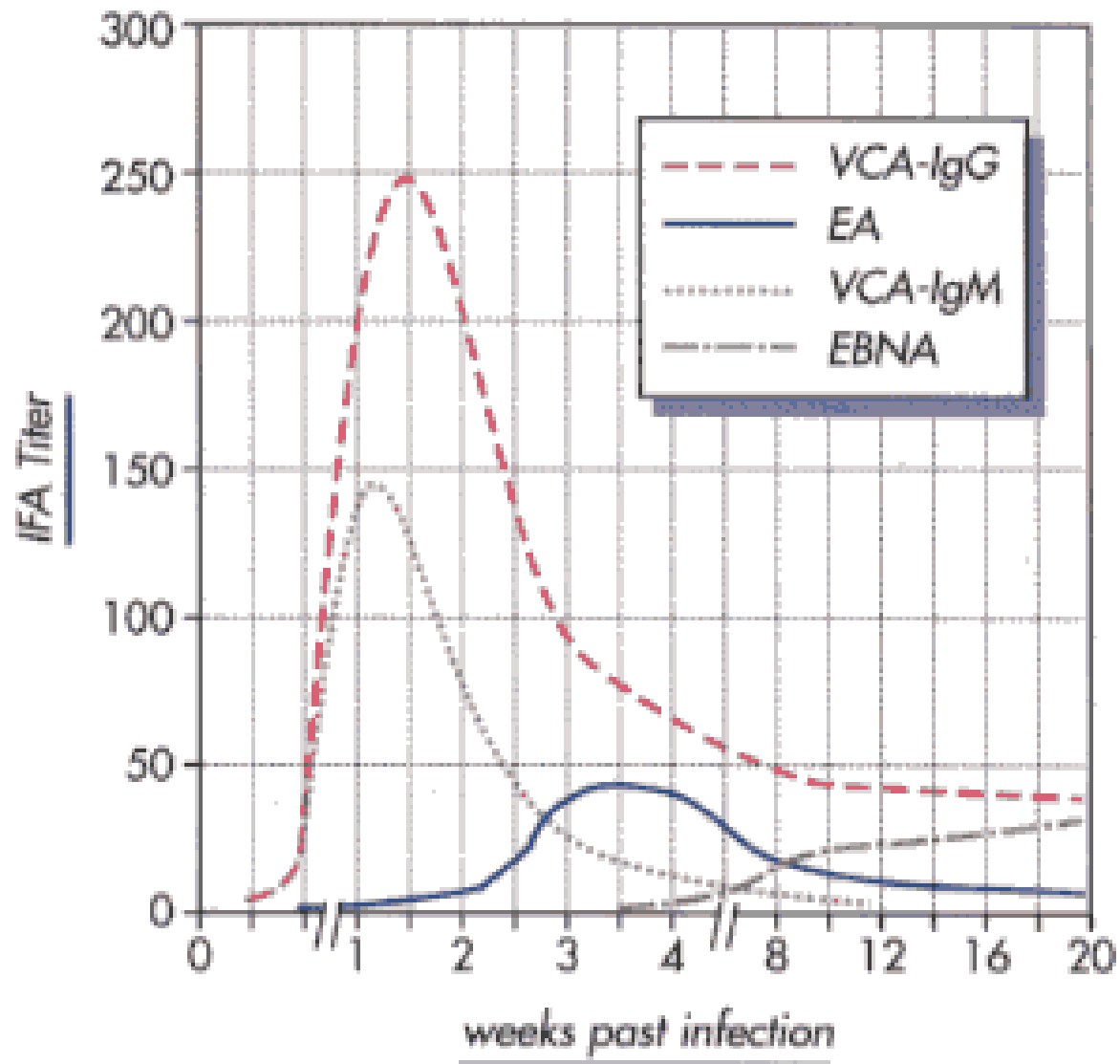
Epstein-Barr Virus Serolojisi

- Yeni LA testi daha hızlı ve basit bir test, %96 duyarlılık ve %99 özgüllük göstermektedir.
- Heterofil antikolar EBV enfeksiyöz mononükleozlu vakaların %85-90'ında hastalığın 2-3. haftasında saptanabilir.
- Birkaç ayda kaybolur.
- Enfeksiyöz mononükleozlu hastaların %10-15'inde saptanamaz

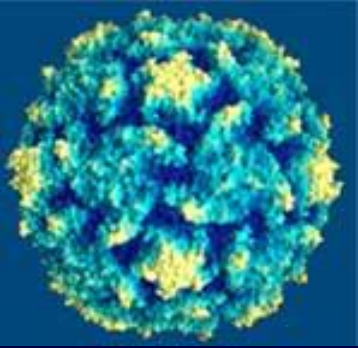
Epstein-Barr Virus Serolojisi (IFA, EIA)

	VCA-IgM	VCA-IgG	Anti-NA	Anti-EA
Akut Enfeksiyon	+	+	-	-/+
Yakın tarihli enfeksiyon	-/+	+	-/+	+
Geçirilmiş Enfeksiyon	-	+	+	-

Serologic profile



Diagnosis of Epstein-Barr Virus (EBV) Infections.



Epstein-Barr virus

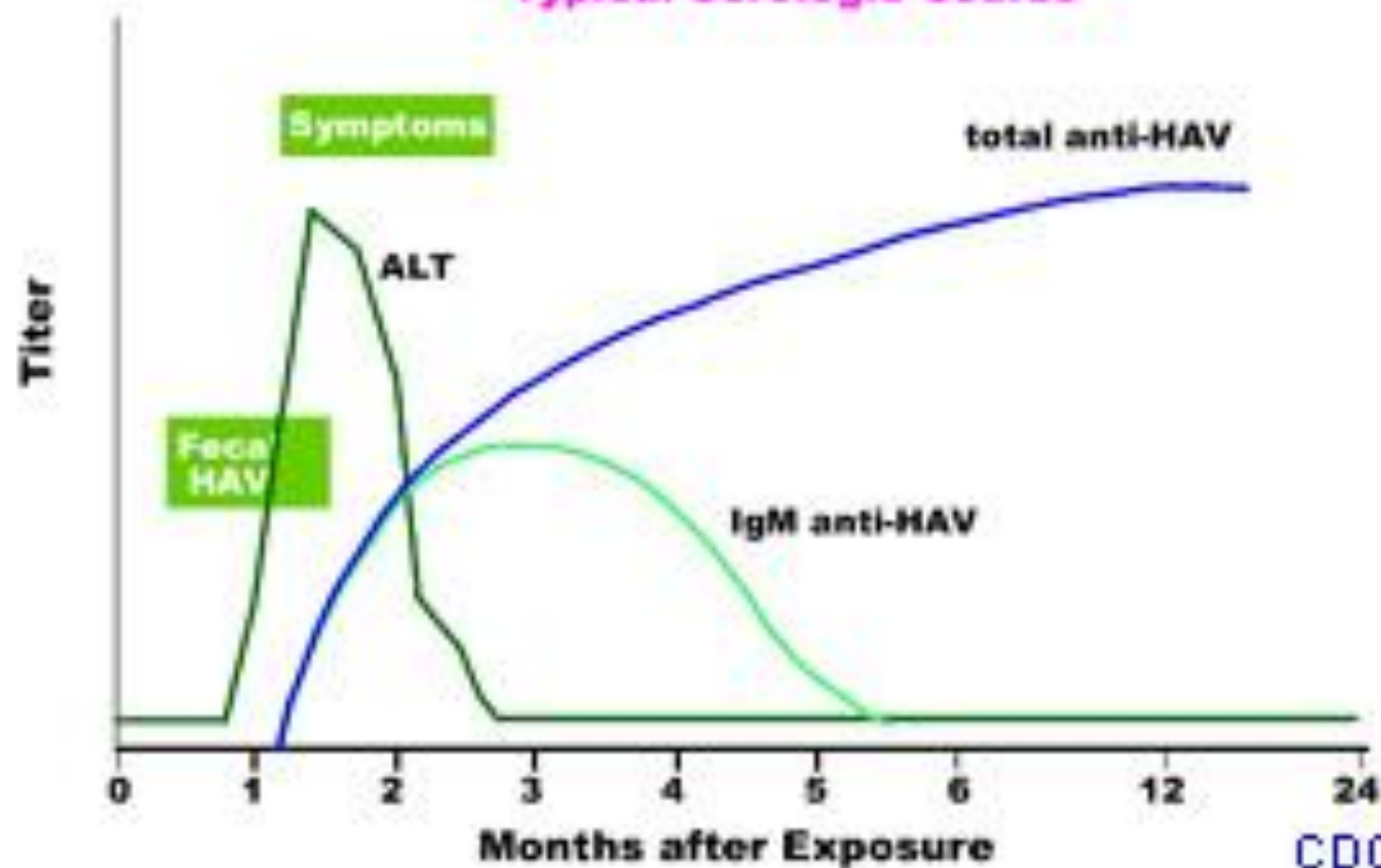
- Kordon kanı lökositlerinden kültür, monoklonal antikorlarla immünfloresan boyama yöntemi ile direkt saptama veya DNA problemleri ile saptama referans laboratuvarları tarafından kullanılmaktadır.
- EBV DNA'sının BOS ve serumdan PCR ile saptanması olasıdır.
- Organ veya kemik iliği transplantasyonu sonrası gelişebilen post-transplant lenfoproliferatif hastalığın tanısında EBV PCR yararlıdır.

Hepatit A Virus Serolojisi

- RIA, HAI testi veya ELISA
- Total Ig veya sadece IgM'i saptarlar
- HAV yüksek IgG titreleri ile belirlenen yaşam boyu immünite bırakır
- Akut HAV enfeksiyonu: tek başına IgM (+)
- Doğal enfeksiyon veya aşı ile immünizasyon sonrası gelişen bağışıklık ise total hepatit A antikorlarının ölçümü ile olasıdır.

Hepatitis A Virus Infection

Typical Serologic Course



Hepatit B Virus Serolojisi

1. Yüzey antijeni (HBsAg): Kuluçka döneminde saptanır ve akut enfeksiyon boyunca (+). İyileşme döneminde genellikle kaybolur.
2. Çekirdek antijeni (HBcAg): Virionun nükleokapsididir. İF ile hepatositlerde gösterilebilir. Serumda saptanamaz.
3. e antijeni (HBeAg): nükleokapsidin solid bir proteini. Serumda varlığı dolaşan çok sayıda virusu gösterir, enfektivite fazladır ve hastalık çok aktiftir. HBeAg'nin persiste etmesi kronik hepatiti gösterir.

Hepatit B Virus Serolojisi

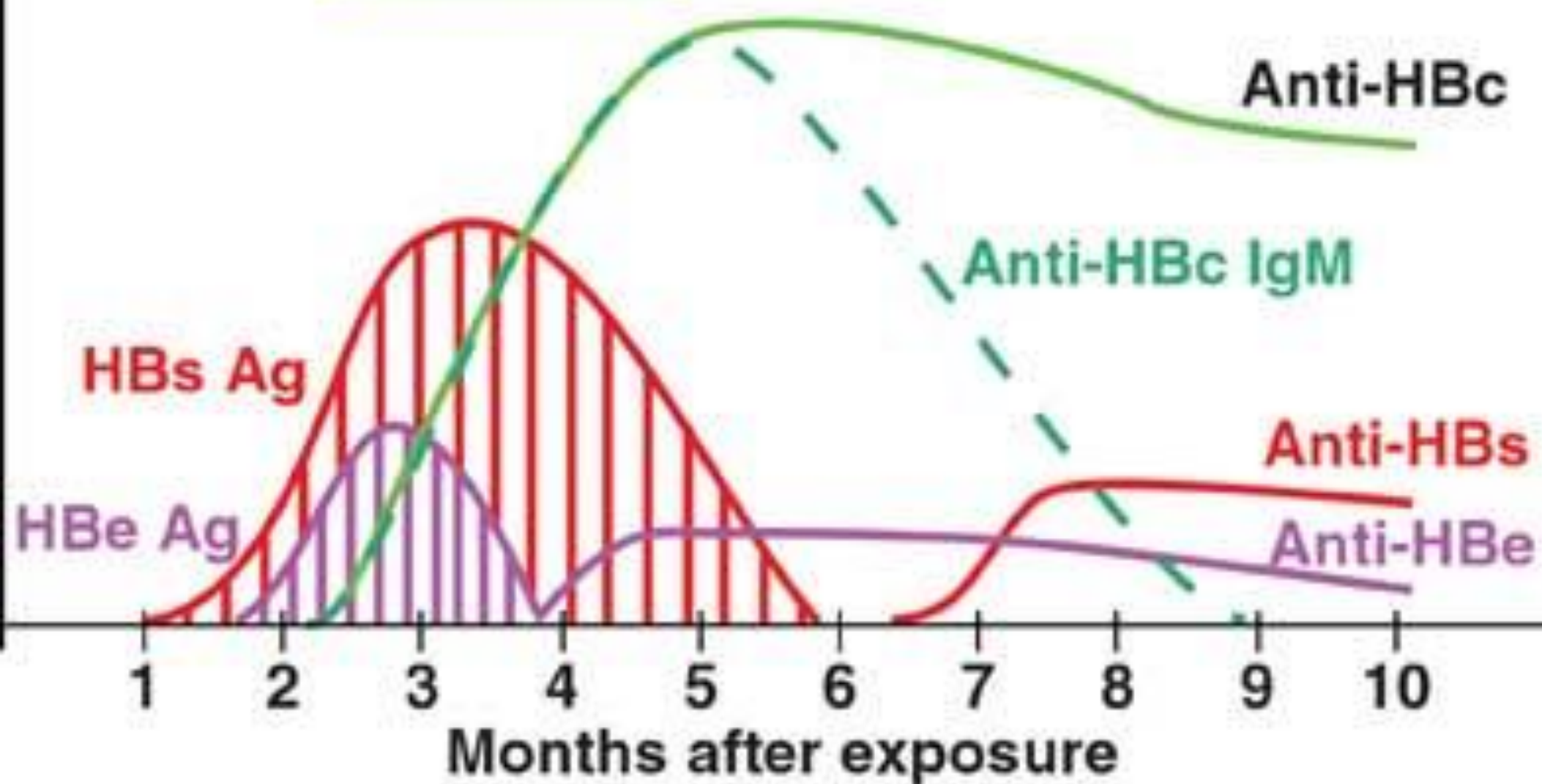
- Antikorlar RIA ve ELISA ile saptanabilir.
1. Anti-HBs: Akut ve kronik hepatitte, iyileşen hastaların büyük kısmında saptanır. Aşılama ile sadece anti-HBsAg artar.
 2. Anti-HBc IgM: Akut hastalıkta yüksek titrelerde saptanır, kronik hastalıkta ise titreleri düşüktür.
 3. Anti-HBe: Prognoz ile ilgili. Erken saptanması (<6 hafta) komplikasyonsuz iyileşmeyi gösterirken, gecikme kronik hepatit gelişiminde önemlidir.



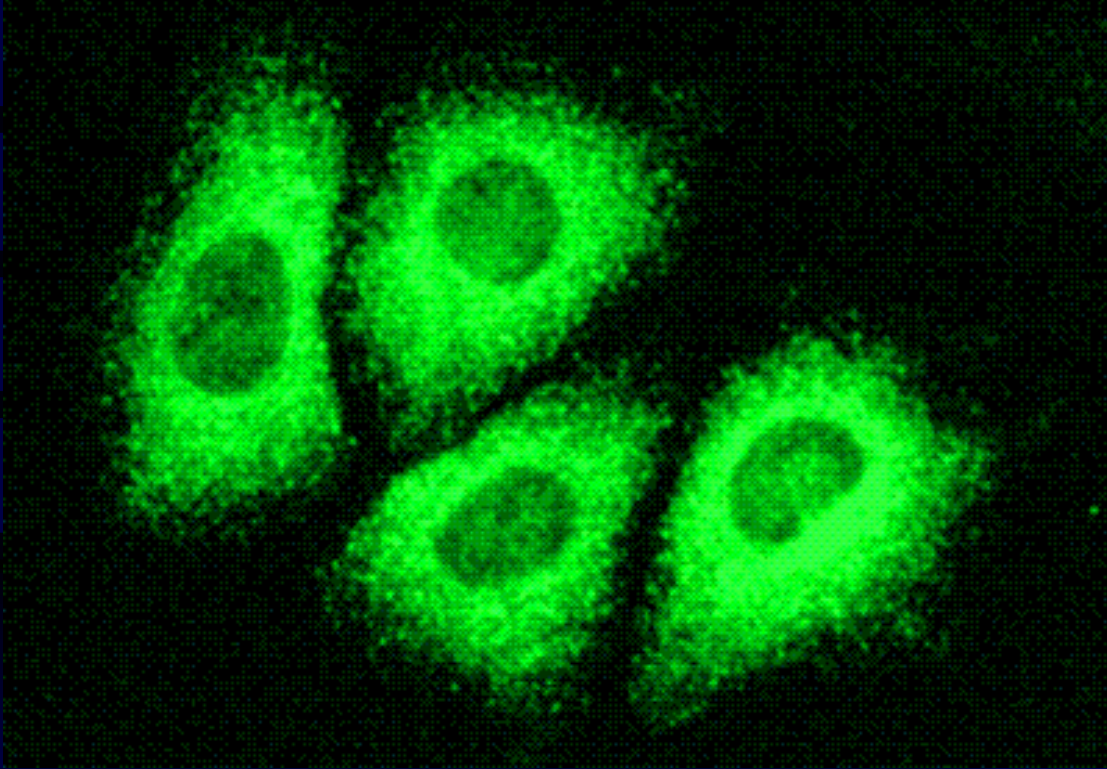
Hepatit B Virus Serolojisi

	Akut HBV	Kronik aktif	Kronik persistan	Taşıyıcı	Aşılı
HBsAg	+	+	+	+	-
HBeAg	+	+/-	+/-	+/-	-
Anti-HBs	+/-	-	-	-	+
Anti-HBc	+	+	+	+	-
Anti-HBe	+	+/-	+/-	+/-	-
Semptomlar	+	+	-	-	-

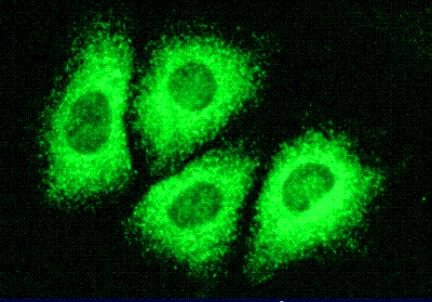
Illness



Hepatit C Virus Serolojisi

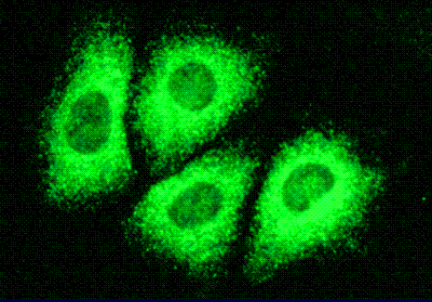


- Kan nakli ve tedavide önemlidir.
- Serolojik testler klonlanmış antijenler ile yapılan birinci, ikinci ve üçüncü kuşak ELISA testleri ve immunblot yöntemleridir.



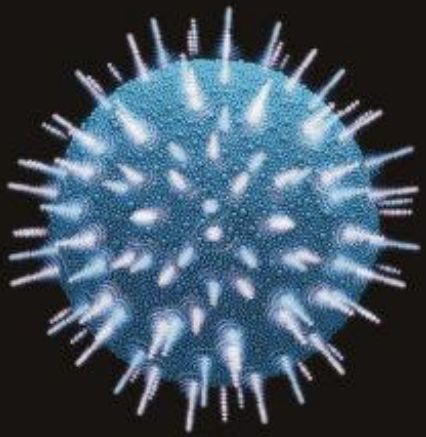
Hepatit C Virus Serolojisi

- İmmunblot: Çapraz reaksiyonların saptanmasında ve EİA'nın doğrulanmasında kullanılır.
- HCV'li hastada IgM saptanması akut enfeksiyon ile kronik enfeksiyon ayırımını yaptırmaz.
- Hastalığın evresini belirlemek için serolojik testleri belli aralıklar ile tekrarlamak gerekmektedir.



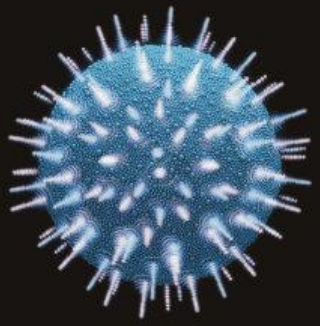
Hepatit C Virus Serolojisi

- Birinci kuşak EİA: Transfüzyon sonrası gelişen hepatitli hastalarda non-A non-B antikorlarının büyük kısmını saptamakta idi; hastalığın erken evrelerinde duyarlılıkları az ve yanlış pozitiflik sık.
- İkinci kuşak EİA: enfeksiyonun erken saptanmasına olanak verdi ve yüksek özgüllüğe sahip.
- Üçüncü kuşak EİA: Yeni rekombinan antijenler kullanıyor, duyarlılık ve özgüllük çok artmış.



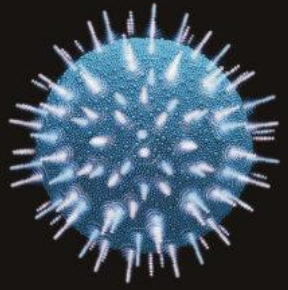
HIV Tanısı

- Tanıda; seroloji, Westernblot testi, EIA ile p24 antijeni tayini ve plazmada HIV RNA tayini, monositlerde proviral DNA tayini
- Virus kültürü lenfokin ile uyarılmış hücreler ve 2-3 haftalık süre gerektirir, rutinde uygulanamaz.



HIV-1 Serolojisi

- 1985'de ilk kez verici kanlarının taranmasında ELİSA
- Bu test şimdi AIDS tanısında hem HIV-1 hem de HIV-2'yi ayrı ayrı veya birlikte tanımlayacak şekilde geliştirilmiş.
- İnaktif tam virüsü kullanan ELİSA testinin duyarlılığı %93-95, özgüllüğü %99'dur.
- Şüpheli durumlarda: Western blot yöntemi



HIV Tanısı

- HIV enfeksiyonu ile ilgili tanısal yaklaşımda genellikle 3 durum söz konusudur:
 - 1) HIV enfeksiyonu olduğu düşünülen bir erişkin veya büyük çocuk.
 - 2) HIV enfeksiyonu olduğundan şüphe edilen bir sütçocuğu.
 - 3) HIV ile enfekte bir kişi ile temas sonrası akut enfeksiyon veya serokonversiyon olup olmadığının saptanması.

HIV enfeksiyonu olduğu düşünülen bir erişkin veya büyük çocuk

- EİA ile tarama, test pozitif ise EİA tekrarlama
- 2. EİA pozitif ise Western blot testi ile tanıyı doğrulama şeklindedir.
- Western blot testinde 9 HIV protein veya glikoproteini araştırılır: gp160, gp120, p66, p55, gp41, p31, p24 ve p17.
- Burada CDC'nin önerisi p24, gp41 veya gp120/160'dan en az 2'sine karşı antikorun pozitif olmasıdır.

HIV enfeksiyonu olduğu düşünölen bir erişkin veya büyük çocuk

- Serolojik test sonuçları kesin sonucu vermezse yüzey işaretleyicileri veya direkt olarak virusu araştırmak gereklidir.
- P24 antijeni
- PCR
- Virus kültürü
- Tüm yaş gruplarında kültür ve PCR en duyarlı tanı yöntemleridir.

HIV enfeksiyonu olduğundan şüphe edilen bir sütçocuğu

- Anneden geçen antikörler!!
- Perinatal bulaşma!!!
- 18. aya kadar EIA veya Western blot testinin yorumu zordur.
- 4-6 aydan büyük asemptomatik bir çocukta PCR ile HIV genomunun gösterilmesi ve virus kültürü daha uygun testlerdir.

HIV ile enfekte bir kişi ile temas sonrası akut enfeksiyon veya serokonversiyon olup olmadığının saptanması

- Virusa karşı gelişen antikorlar 2-8 hafta içinde saptanabilir.
- Üç ay sonra vakaların büyük kısmında antikor vardır.
- Bu nedenle seri testler gerekir.
- Enfekte immünkompetan kişilerin tümünde 6.ayda antikor saptanır.

Kullanılacak testler

- Adenovirus: Kültür, NAT (FA, EIA; seroloji)
- CMV : Kültür, NAT (antijen, Q.PCR)
- EBV : Seroloji, NAT
- HBV, HCV : Seroloji, NAT
- HSV : Kültür, NAT
- HHV-6 ve 7: NAT
- VZV : Kültür, NAT
- Sol. yol. etkenleri: Kültür, NAT



SABRINIZ İÇİN TEŞEKKÜR EDERİM.



11. Ulusal Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi

4 - 8 Nisan 2018

Maxx Royal
Belek, Antalya



www.cocukenfeksiyon2018.org