

# Hızlı Viral Tanı Testleri

**Dr. Dilek Çolak**

*Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Viroloji BD, Antalya*

Viral infeksiyonların direkt tanısı; klinik örneklerde virusun, viral antijenlerin ya da viral nükleik asitlerin gösterilmesi esasına dayanmaktadır. İndirekt tanı yöntemleri ise; serumda, viral antijenlere karşı oluşmuş antikorların araştırıldığı serolojik yöntemler olarak bilinmektedir. Serolojik yöntemler, immünyetmezliği olan konaklarda aktif infeksiyon tanısında yetersiz kalmaktadırlar.

Viral infeksiyonların erken ve hızlı tanısı, özellikle immünyetmezliği olan konaklarda son yıllarda kabul gören pre-emptif tedavi yaklaşımları nedeni ile önemlidir. Diğer yandan, geliştirilen yeni ve etkili antiviral ajanlarla tedavi olanağının bulunması ve ayırıcı tanının yapılabilmesi için de viral infeksiyonların erken ve hızlı tanısı gereklidir.

## 1. Virusun Gösterilmesi

Viruslar partikül büyüklüklerine ve morfolojik yapılarına göre Elektron Mikroskopi Yöntemi (EM) ile görüntülenebilirler. EM ile virusun gösterilmesi benzer klinik tablolara yol açan farklı virusların ayırılmasını sağlar. Yöntem hızlı olmakla birlikte, en önemli dezavantajı elektron mikroskobun pahalı olmasıdır. Ayrıca virusun gösterilebilmesi için mililitredeki viral partikül sayısı en az  $10^6$  olmalıdır. İmmün EM ile az sayıdaki viral partiküller gösterilebilirse de EM kullanımı araştırma laboratuvarları ile sınırlı kalmıştır.

Pek çok virus konvansiyonel hücre kültürlerinde en erken birkaç günde, hatta febril nötropenik hastalarda önemli bir patojen olan olan cytomegalovirus (CMV) 2-4 haftada üremektedir. Klinik örneklerin hücrelere inokülasyonu aşamasında, plakların genellikle 3000 rpm devirde 30-60 dk santrifüj edilmesi ile hızlı hücre kültürleri yöntemleri geliştirilmiş ve bu şekilde sonuç verme süresi 24 saate kadar indirilebilmiştir. CMV için bu süre 48 saattir ve bu sürenin sonunda hücreler fikse edilerek çok erken ya da erken antijenlere karşı hazırlanmış monoklonal antikorlarla immünfloresan ya da immünperoksidad boyama yapılmaktadır. Herpes simplex virus (HSV) ise 24 saatte izole edilebilir ve tiplendirilebilir. Hücre kültürleri viral infeksiyonların tanısında "altın standart" kabul edilmektedirler. Ancak klinik örneklerin bekletilmesi, olumsuz transport koşulları ve özellikle kan örneklerinin hücrelere toksik etkilerinin olması hücre kültürlerinin duyarlılığını azaltmaktadır. Herpesviruslar için kalsiyum alginatlı eküvyonlar inhibitör etkileri nedeni ile kul-

lanılmamalıdır. Hücre kültürleri özel laboratuvar donanımı ve deneyimli personel gerektiren yöntemlerdir.

## 2. Viral antijenlerin gösterilmesi

Viral infeksiyonların hızlı tanısında immünfloresan (IF) boyama yöntemleri sık kullanılmaktadır. Sonuçların birkaç saat içerisinde verilebileceği, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek yöntemlerdir. Ancak, örneğin kalitesi sonucu ve testin duyarlılığını etkilemektedir. Yöntemde hücrelerdeki viral antijenler gösterileceği için; infeksiyon bölgesinden alınan örnekler yeterli miktarda hücre içermelidirler. Sıvı örneklerden, eküvyonla alınan örneklerin konulduğu viral transport besiyerlerinden sitosantrifüj yöntemi ile sitospin preparatlarının hazırlanması ve IF yöntemi ile boyanması önerilmektedir. CMV infeksiyonlarının tanısında kullanılan antijenemi testi; periferik kan örneklerinde pp65 antijeninin saptandığı bir IF yöntemidir. Duyarlılığı ve özgüllüğü çok yüksek olan yöntemle 3 saat içinde sonuç verilebilmektedir. Test heparinli kan örneklerinde çalışılmakta, kan alındıktan sonra maksimum 4 saat içerisinde teste başlanması gerekmektedir. IF yöntemi ile solunum yoluna ait örneklerde respiratory syncytial virus, influenza, parainfluenza, adenovirus, coxsackie virus; deriye ait örneklerde HSV, varicella-zoster virus antijenleri araştırılabilmektedir.

Viral antijenler enzim immün assay (EIA) yöntemleri ile de araştırılabilir ve birkaç saat içinde sonuç verilir. IF yöntemi ile benzer olarak örnek kalitesi burada da çok önemlidir.

Viral antijenlerin araştırılabildiği bir diğer yöntem lateks aglütinasyon yöntemidir ve dakikalar içerisinde sonuç verilebilir. Bu yöntemin duyarlılığının düşük olması en önemli dezavantajdır.

## 3. Viral nükleik asitlerin gösterilmesi

Moleküler testler olarak da bilinen hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), “nucleic acid sequence-based amplification” (NASBA) gibi yöntemlerle virüslere ait spesifik DNA ya da RNA dizileri saptanabilmektedir. PCR temelli testlerin yüksek duyarlılıkları herpesviruslar gibi latent virüslerin tanısında kantitatif-PCR yöntemlerini gündeme getirmiştir. Bazı testlerle bir iki saat içerisinde sonuç alınabilmektedir. Moleküler testlerle ilgili olarak karşılaşılan en önemli sorunlardan biri kontaminasyondur. Son yıllarda ticari olarak piyasaya sürülen ürünlerde kontaminasyon riski en aza indirilmiş ve belli oranlarda standardizasyon sağlanmıştır. Moleküler biyolojik tekniklerle özellikle kültürde üretilmeyen virüslerin tanısında büyük kolaylık sağlanmıştır. İnfeksiyonların hızlı tanısında yeni geliştirilen bir yöntem de hibridizasyon temelli DNA biyosensörleridir ve önümüzdeki yıllarda daha yaygın kullanım alanı bulacaktır.

## Kaynaklar

1. Clewley JP. A role for arrays in clinical virology: Fact or fiction? *J Clin Virol* 2002;29:2-12.
2. Gault E, Michel Y, Dehee A, belabani C, Nicolas JC, Garbarg-Chenon A. Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:772-775.
3. Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002;40:746-752.
4. Rocholl C, Gerber K, Daly J, Pavia AT, Byington CL. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis. *Pediatrics* 2004;113: e51-e56.
5. Soldatou A, Davies EG. Respiratory virus infections in the immunocompromised host. *Paediatric Respiratory Reviews* 2003;4:193-204.
6. Storch GA. Respiratory infections. *Essentials of Diagnostic Virology*. Churchill Livingstone, New York. p.59-78 (2000).
7. Storch GA. Skin and mucous membrane infections. *Essentials of Diagnostic Virology*. Churchill Livingstone, New York. p.93-103 (2000).
8. Storch GA. Viral infections in immunocompromised patients. *Essentials of Diagnostic Virology*. Churchill Livingstone, New York. p.203-232 (2000).
9. Tedder RS, Ayliffe U, Preiser W, et al. Development and evaluation of an internally controlled semi-automated PCR assay for quantification of cell-free cytomegalovirus. *J Med Virol* 2002;66:518-523 .
10. Whiley DM, Syrmis MW, Mackay IM, Sloots TP. Detection of human respiratory syncytial virus in respiratory samples by LightCycler reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:4418-4422.
11. Van den Berg AP, Klimpmaker IJ, Haagsma EB, et al. Antigenemia in the diagnosis and monitoring of active cytomegalovirus infection after liver transplantation. *J Infect Dis* 1991;164:265-170.
12. Zaia JA. Prevention of cytomegalovirus disease in hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2002;35;999-1004.