

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
BAŞKANLIĞI

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Bülent BAYSAL

EPSTEİN-BARR VİRÜS İNFEKSİYONUNUN TANISINDA
İNDİREKT İMMÜNOFLÖRESAN VE ELISA TANI METODLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Bahadır FEYZİOĞLU

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Mahmut BAYKAN

KONYA

İÇİNDEKİLER

İçindekiler.....	i
Kısaltmalar.....	ii
Şekiller.....	iii
Tablolar.....	iv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.2 Herpesvirüs Ailesi.....	2
2.3 Tarihçe.....	3
2.3.1 Epstein-Barr Virüs (EBV).....	3
2.3.2 EBV antijenleri.....	5
2.3.2.1 Erken antijenler (Early antigen-EA):.....	6
2.3.2.2 Geç antijenler:	6
2.3.2.3 EBV Latent Antijenleri.....	7
2.4 EBV Patogenez Ve İmmünolojisi.....	9
2.4.1 Primer İnfeksiyon	9
2.4.2 Enfeksiyöz Mononükleoz.....	10
2.4.3 Latent İnfeksiyon.....	11
2.4.4 EBV İle İlişkili Malignensiler.....	12
2.4.4.1 Burkitt Lenfoma.....	13
2.4.4.2 Nazofarengeal Karsinoma.....	13
2.4.4.3 Diğer malignensiler	14
2.5 EBV İnfeksiyonunda Tanı.....	14
2.5.1 Hematolojik Bulgular.....	14
2.5.2 Serolojik Tanı.....	14
2.5.2.1 İndirekt Flöresan Yöntem (IFA- Indirect Fluorescence Assay)	18
2.5.2.2 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).....	18
2.5.3 Kültür	18
2.5.4 Moleküler Yöntemler.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1 Materyal Seçimi Ve Çalışma Programı.....	20
3.2 Kullanılan Yöntemler.....	21
3.2.1 İndirekt Flöresan Yöntem.....	21
3.2.2 ELISA- (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).....	25
4. BULGULAR.....	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	32
ÖZET.....	40
ABSTRACT.....	41
KAYNAKLAR.....	42
TEŞEKKÜR.....	48

KISALTMALAR

BL	Burkitt lenfoma
CR2.....	Kompleman Reseptör 2
EA-D	Erken antijen (Early Antigen)
EBER	Epstein Barr encoded RNA
EBNA	Epstein-Barr virüs nükleer antijen
HRP.....	Horseradish peroxidase
IRs.....	İnternal repeats
LMP.....	Latent Membran Proteini
LP.....	Latent Protein
NFK.....	Nazofaringeal Karsinom
TR.....	Terminal repeat
VCA.....	Viral Kapsid antijen

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil-1: Herpes virüs yapısı.....	2
Şekil-2: EM'lu hastalarda seroloji.....	17
Şekil-3: IFA test değerlendirme.....	24
Şekil-4: IFA referans test sonuçlarına göre oluşan sınıflandırma.....	29
Şekil-5: ELISA test sonuçlarına göre oluşan sınıflandırma.....	30

TABLÖLAR

	SAYFA
Tablo-1: Herpes virüslerin sınıflandırılması.....	3
Tablo-2: EBV antijenleri.....	5
Tablo-3: Paul-Bunnell testi.....	15
Tablo-4: EBV infeksiyonlarında serolojik profil.....	15
Tablo-5: EBV infeksiyonu için serolojik tanı standartları.....	20
Tablo-6: IFA sonuçlarının değerlendirilmesi.....	29
Tablo-7: IFA ve ELISA karşılaştırma.....	30
Tablo-8: ELISA test performansı.....	31
Tablo-9: IFA referans alınarak yapılan çeşitli çalışmalardaki VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG için ELISA test duyarlılık oranları.....	36

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Herpes virüs ailesinin bir üyesi olan Epstein-Barr Virüs (EBV); özellikle çocuklarda ve genç erişkinlerde daha sık olmak üzere, tüm yaş gruplarında ve her çeşit sosyoekonomik topluluklarda infeksiyon oluşturabilen bir etkidir. Dünya genelinde yaygın görülen EBV, Enfeksiyöz Mononükleoz (EM) gibi sıkça karşılaşılan bir hastalık tablosunun yanısıra, Burkitt Lenfoma ve Nazofarengeal Karsinoma gibi ciddi sonuçları olan pek çok malignitenin de etyolojisinde rol oynamaktadır. EBV ile infekte olmuş ve asemptomatik infeksiyon, EM, latent infeksiyon ya da EBV ilişkili Tümör gelişmiş bireylerin doğru ve güvenilir bir şekilde tanımlanması ciddi epidemiyolojik veriler sağlayacağı gibi tedavi ve ayırıcı tanıda sağlıklı kararlar alınmasını da sağlayacaktır.

Tanımlandığı 1964 yılından bugüne EBV için; viral kültür, İndirect Fluorescence Assay (IFA), ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ve son yıllarda Moleküler yöntemler gibi pek çok yöntem tanı ve araştırma amacıyla kullanılmaktadır. Üretim standardizasyonu, pratik uygulanabilirlik, test maliyeti ve kullanılan yöntemin güvenilirliği gibi faktörler, yeni teknolojilerin de ışığında, tanı metotlarının performans özelliklerinin sık sık denetlenmesi ihtiyacını doğurmaktadır.

EBV tanısı için, ucuz ve kolay uygulanabilirlikleri ile, viral kültür ve Moleküler yöntemlere göre, daha sık kullanılan IFA ve ELISA tanı performanslarının değerlendirilmesi özellikle rutin laboratuvar tanısına önemli katkılar sağlayacaktır. EBV'nin ilk tanımlanmasından bugüne "gold standart" olarak kullanılan IFA 1980'li yıllardan itibaren ELISA'nın kullanılmaya başlanması ile birlikte özellikle üretim ve test değerlendirmedeki standardizasyon güçlükleri nedeniyle daha az kullanılmaya başlanmıştır. Sonraki yıllarda ise duyarlılık ve özgüllük açısından daha güvenilir ELISA kitleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Bugün artmış teknolojik olanaklar ile yeni geliştirilmiş ELISA kitleri ve gerek üretim gerekse değerlendirme açısından daha standardize bir hal almış IFA kitlerinin varlığı, test güvenilirliği ve pratik uygulanabilirlik yönünden bu testlerin tekrar karşılaştırılmasını gerekli kılmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı; EBV infeksiyonunda tanı için kullanılan her iki testin EM şüpheli hasta serumları kullanılarak karşılaştırılması ve özellikle rutin laboratuvar şartlarında kullanımları ile ilgili yararlı olacağını düşündüğümüz yöntemlerin belirlenmesidir.

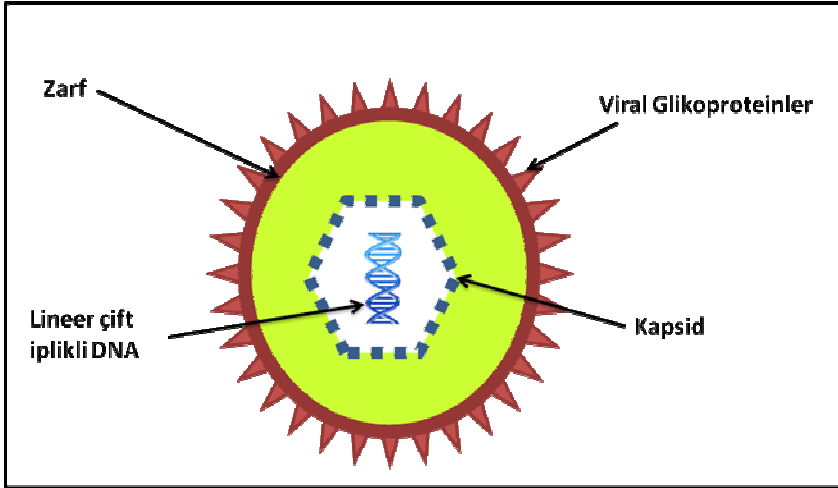
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Herpesvirüs Ailesi

Herpesvirüsler zarflı çift iplikli büyük DNA içeren önemli bir virüs grubunu oluşturur. Virion morfolojisi, replikasyon modeli, latent ve rekürrent infeksiyon kapasitesi tüm grup üyelerinin paylaştıkları ortak ve yaygın özelliklerdir. Herpes virüsler litik, persistan, latent ve EBV (Epstein-Barr Virüs) de olduğu gibi immortal infeksiyon oluşturabilme kabiliyetine sahiptirler.

Herpes virüsler yaygın ve her yerde görülebilen infeksiyonlar oluştururlar. Bu virüsler genellikle benign infeksiyon oluşturma eğiliminde iken, özellikle immünsüpresif kişilerde ciddi morbidite ve mortalite oluşturma potansiyeline de sahiptirler. Herpes virüslerin virionları yaklaşık olarak 150 nm çapındadır. DNA 162 kapsomerden oluşan ikozahedral bir kapsid tarafından kuşatılmıştır. Kapsid glikoprotein tabiatındaki zarf tarafından çevrelenmiştir (Şekil-1). Herpes virüsler; viral bağlanma, füzyon ve immüniteden kaçışı sağlayan pek çok viral protein kodlamaktadırlar. Zarflı oldukları için herpesvirüsler kuruluğa, aside ve deterjanlara duyarlıdır. Herpesvirüs'ler antiviral ajanlarla inaktive edilebilmektedir (1).

Şekil-1: Herpes virüs yapısı.



İnsan Herpesvirüs'leri; doku tropizmi, sitopatolojik etki, genom yapısı, latent yerleşim gibi viral karakteristik özelliklerine ve hastalık göstergelerine göre üç alt grupta sınıflandırılırlar (Tablo-1) (2).

Tablo-1. Herpes virüslerin sınıflandırılması

ALT FAMILYA	VİRÜS	PRİMER HEDEF HÜCRE	LATENT İNFEKSİYON YERİ	BULAŞMA YOLU
Alfa	Humanherpes virüs 1 Herpes simpleks tip 1	Mukoepitelyal hücreler	Nöron	Yakın temas
	Humanherpes virüs 2 Herpes simpleks tip 2	Mukoepitelyal hücreler	Nöron	Yakın temas (seksüel geçişli hastalık)
	Humanherpes virüs 3 Varisella zoster virüs	Mukoepitelyal hücreler	Nöron	Solunum yolu ve yakın temas
Beta	Humanherpes virüs 5 Sitomegalovirüs	Monosit, Lenfosit ve Epitel hücreleri	Monosit, Lenfosit	Yakın temas,transfüzyon, transplantasyon ve konjenital
	Humanherpes virüs 6 Herpes lenfotropik virüs	T hücreleri ve ?	T hücreleri	Solunum yolu ve yakın temas
	Humanherpes virüs 7 Humanherpes virüs 7	T hücreleri ve ?	T hücreleri	?
Gama	Humanherpes virüs 4 Epstein-Barr virüs	B hücreleri ve Epitel hücreleri	B hücreleri	Tükürük (öpücük hastalığı)
	Humanherpes virüs 8 Kaposi sarkomu ile ilişkili virüs	Lenfosit ve diğer hücreler	B hücreleri	?

2.2 Tarihçe

Epstein-Barr Virüs (EBV)'ün ilk kez tanımlanması Epstein ve arkadaşlarının 1964 yılında Burkitt lenfomalı bir hastadan elde ettikleri B Lenfosit kültüründe virüsü göstermeleriyle olmuştur (3,4). İleriki yıllarda yapılan çalışmalarda virüsün Burkitt Lenfomanın, EBV ile ilişkili lenfoid tümörlerin ve bazı Epitelyal hücre tümörlerinin etiolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir.

EBV onkojenik hastalıklarla yakın ilişkisinin yanısıra Enfeksiyöz Mononükleoz (EM) tablosunun da başlıca sorumlusudur. Hastalık, Sprunt ve Evans tarafından 1921 yılında tanımlanmıştır. Paul ve Bunnell, 1932 yılında EM'lu hasta serumlarında yüksek titrede heterofil antikor bulmuştur. Davidsohn, heterofil antikorların özelliğini araştırmıştır. EBV'ün tanımlanmasından sonra, 1968 yılında EBV üzerine araştırma yapan Henle'nin laboratuvarında çalışan bir teknisyende EM gelişmesiyle, bu hastalıkla EBV arasında bir ilişki olduğu düşünülmüştür. Heterofil antikor bulunan EM'lu hastalarda EBV'ye karşı antikorlar gösterilerek etiolojide EBV de sorumlu tutulmuştur (5).

2.2.1 Epstein-Barr Virüs (EBV)

EBV Gamaherpesvirüs alt ailesinin bir üyesidir. Çatı ve morfoloji olarak diğer Herpesvirüsler ile aynı ise de antijenik olarak farklıdır (1). İkozahedral simetri düzeninde 162 kapsomerli, 120 nm çapında ve zarflı bir yapıya sahiptir. Diğer Herpes virüslerde olduğu gibi

5:3:2 simetri düzeninde ki hegzagonal görünümlü kapsomerlerinin her biri 12,5 nm uzunluğunda ve ortasında 4nm çapında bir boşluk bulunmaktadır. Nükleokapsidi 100 nm çapındadır. Çift sarmallı 172 kb DNA'sı; olgun virionda lineer, latent olarak infekte hücrelerde ise ekstrakromozomal olarak sirküler yapıdadır. DNA'nın üzerinde dört harf ve bir sayı ile belirlenen (örneğin genomun BamHI Z parçasının ilk sola doğru orf -open reading frame- bölgesi için BZLF1 terimi gibi) 90'dan fazla orf bölgesi bulunmakta ve takriben 100 protein kodlanmaktadır. Genomun uçlarında 5 kb'lik TR (terminal repeat) ve genom üzerinde ayrı ayrı çok sayıda IRs (internal repeats) vardır (6,7).

EBV, Epstein-Barr virüs nükleer antijen (EBNA) yapısına göre tip A (tip 1) ve tip B (tip 2) olarak sınıflandırılmaktadır. Tip A, tip B'den daha fazla transformasyona neden olmakta, hücrelerde daha hızlı çoğalmaktadır (6).

EBV, tükürük ve boğaz salgısıyla çıkarılmakta ve yakın temasla, kanla veya kontamine eşyalarla kişiden kişiye bulaşmaktadır. Yakın temasla sık bulaştığı için öpüşme hastalığı "Kissing disease" olarak da bilinir. Servikal sekresyonlarda EBV izole edilmişse de bulaşta cinsel yolun rolü tartışmalıdır. EBV-EM, kötü hijyene sahip ve kalabalık bölgelerde yaşayan insanların yaşamlarının ilk yıllarında, en çok buluş çağında ve küçük çocuklarda genellikle subklinik olarak görülmektedir. Cinsiyet ayrımı olmaksızın, gelişmekte olan ülkelerde dört yaşın üzerinde seropozitiflik %90 civarındadır ve infeksiyon çoğunlukla belirtisizdir. Gelişmiş ülkelerde ise EBV-EM, 15-19 yaşlar arasında daha sık görülür ve bu toplumlarda semptomatik seyir daha olasıdır (8). Türkiye'de yapılan bir araştırmada erişkin yaş grubunda %80-86 oranında seropozitiflik saptanmıştır (9).

EBV infeksiyonu, her iki cinsiyette ve yılın her mevsiminde eşit sıklıkta görülür. Akut EBV-EM'lu bireyler ya da sağlıklı kişiler bulaştırıcı olabilir. Seropozitif sağlıklı bireylerin %10-20'sinin, renal transplant alıcılarının %50-70'inin, hematolojik maligniteli hastaların %70-90'ının ve HIV ile infekte homoseksüel erkeklerin %30'unun orofarenkslerinden EBV izole edilebilir (10,11).

EBV çok sınırlı bir doku tropizmi gösterir. Bu sınırlı hücrel reseptör kullanımının bir sonucudur. İnsan ve Yeni Dünya Maymun'larındaki B hücreleri, orofarinks ve nazofarinksdeki epitelyal hücreler bu reseptörü taşırlar (1). Aynı reseptörler Kompleman sisteminin bir komponenti olan C3 ile de etkileşim özelliğine sahiptirler (7). Virüs başlangıçta üst solunum yolu epitelinde litik infeksiyon oluştururken daha sonra tüm vücutta genaralize

olarak B hücrelerine geçer. Bu geçiş için C3 (CR2=CD21) reseptörlerine bağlanması şarttır. Geçiş sırasında klinik olarak Enfeksiyöz Mononükleoz tablosu oluşur ve kanda gerek Viral RNA gerekse proteinler tespit edilebilir.

Virüs B hücrelerinde latent enfeksiyona yol açar. Bu dönemde tam bir viral replikasyon olmaz. İnsan B lenfositleri EBV ile infekte olduğunda sürekli hücre kültürleri elde edilebilir. Hücreler virüs tarafından ölümsüzleştirilir (12).

EBV enfeksiyonu üç şekilde seyredebilir;

- 1.Epitel ve B hücrelerinde litik enfeksiyon ve replikasyon oluşumu.
- 2.B hücrelerinde latent enfeksiyon gelişmesi.
- 3.EBV uyarımı ile immortal (ölümsüz) B hücre gelişmesi (1).

EBV'ün B-hücrelerini ölümsüzleştirme yeteneği oldukça yüksektir. Virüs hücre yüzeyine tutunduktan sonra, hücreler hücre döngüsüne girmek üzere aktive edilir. Bu sırada bazı viral genler eksprese olur ve hücreler devamlı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalma özelliği kazanır. Ölümsüzleşen B-hücre popülasyonundaki hücrelerin çok azı (<%10) viral partikülleri serbestleştirir. Latentlik duraklatılabilir ve EBV genomu, çeşitli uyarılar sonucunda aktive olarak replikasyona başlayabilir (13). Bu uyarılar arasında, hücrelerin in-vitro kültürü ve kimyasal indükleyici ajanlar yer alır. Konağa bağlı değişkenler iyi anlaşılabilmiş değildir. Ancak bunlar da latentlikten viral senteze geçiş hızını belirlerler (14).

2.2.2 EBV antijenleri

EBV antijenleri viral replikasyon döngüsünün hangi döneminde eksprese edildikleri temel alınarak üç grupta toplanır (Tablo-2).

Tablo-2: EBV antijenleri

İnfeksiyon tipi	Antijen kompleksi	Molekül ağırlığı(kD)	Hüresel yerleşim
Litik	Membran antijen: MA (gp)	300-350, 200-250, 85	Hücre membranı ve virüs zarfı
	Erken antijen(Early Antigen) :EA-D / EA-R	47-60 / 85	Nükleus ve sitoplazma /sitoplazma
	Viral Kapsid antijen: VCA	125 / 160	Nükleus ve sitoplazma / Nükleus
Latent	EBNA 1	65-85	Nükleus
	EBNA 2	86	Nükleus
	EBNA 3 (3a)	140-157	Nükleus
	EBNA 3 (3b)	148-180	Nükleus
	EBNA 3 (3c)	160	Nükleus
	LP	41-70	Nükleus
	LMP1	58	Hücre membranı
	LMP2 A/B	53-40	Hücre membranı

2.2.2.1 Erken antijenler (Early antijen-EA):

Virüs gp350 vasıtasıyla infekte epitel ve B hücrelerine bağlandıktan sonra litik infeksiyonu ve acil erken gen aktivasyonunu sağlayan “transkripsiyon aktivasyon proteini” Zta-“ZEBRA”nın transkripsiyonu (Z gen bölgesinden kodlanır) ve translasyonu ilk gerçekleşen olaydır (1). Viral DNA'ya bağlanabilen Zta proteinin ekspresyonu ve sonra BRLF1 orf'un kodladığı Rta viral transaktivatör proteinin oluşmasıyla litik siklus başlar. Zta proteinin yokluğunda, Rta proteini oluşmaz. Zta proteinin ekspresyonuyla EBV “e” gen (early genes) ürünü olan erken antijenler hızla sentezlenerek, viral replikasyonun başlaması için gerekli DNA polimeraz ve DNA'nın sentezinin ardından, yapısal olmayan EA'ler kodlanır (6). Bunların sentezi prodüktif viral replikasyonun başladığını gösterir. EA'nın stoplazmada sınırlı (EA-R) ve hem nükleus hem de stoplazmada yaygın bulunan (EA-D) olmak üzere iki tipi vardır (15).

EA-D, 47-60 kD molekül ağırlığında olup hücrenin hem çekirdeğinde hem de sitoplazmasında, 85 kD molekül ağırlığında olan EA-R ise sadece hücrenin sitoplazmasında bulunur. EA-D, Aseton, Metanol ve Etanol'a stabil olduğu halde, EA-R sadece Asetona stabildir, Metanol ve Etanol ile denatüre olur. EA-D sentezinin aktivatörü, EBV DNA polimeraz ile Zta proteinidir. EA-R, EA-D'den önce ortaya çıkar ve infekte hücrenin litik fazda olduğunun ilk göstergesidir.

2.2.3 Geç antijenler:

Viral kapsid (kapsid antijen) ve zarfın (membran antijen) yapısal komponentleridir. Özellikle prodüktif viral infeksiyon geçiren hücrelerde üretilirler (14).

EBV'ün geç proteinleri; viral kapsid antijen (VCA) ve membran antijenleri (MA) denilen (340-350kDa(gp350), 220kDa(gp220), 110kDa(gp110), ve 85kDa(gp85) molekül ağırlıklarına sahip) zarf glikoproteinleridir. VCA; 125–160 kD molekül ağırlığında olup litik faz infekte hücrelerin hem nükleus hemde sitoplazmasında; zarf antijenleri ise litik faz infekte hücrelerin membranında ve virüs zarfında bulunmaktadır. gp350/220 membran proteinleri CD 21 resptörüne bağlanarak B hücre içine endositozla girmeyi kolaylaştırır. gp85 Herpes simpleks viral proteinin homoloğu olup konak hücre membranına füzyonda önemli rol üstlenirken aynı zamanda komplemanın virüs nötralizasyonunda hedef aldığı proteinlerdendir. gp110 infekte hücrelerin Nükleer membranı ve Endoplazmik retikulumu ile birleşme

özelliğine sahiptir. Virüs nötralizan antikorlar gp350 ve gp85 proteinlerini hedef almaktadır. gp350 sitotoksik T hücre yanıtını tetikleyen molekül olup aşı denemelerinde yaygınca kullanılmaktadır. Geç antijenlerin sentezlenmesiyle konak hücre ölmekte ve olgun virüs salınmaktadır (16).

2.2.4 EBV Latent Antijenleri

Latent olarak infekte olan hücrelerde sentezlenen antijenlerdir. Kapsidsiz Viral genomun nükleusa transferi; Wp promotöründen sirkülasyon ve transkripsiyonu, bütün latent genlerin ekspresyonunu sağlayan mekanizmayı başlatır.

Bu antijenlerin ekspresyonu, EBV genomunun varlığını gösterir. Hücre zarında sitotoksik T hücreleri için hedef oluştururlar. B hücrelerindeki latent infeksiyon döneminde hücreler az sayıda ve plazmid benzeri genom içerir ve sadece hücre bölünmesi sırasında replike olurlar (13). Bu replikasyon sonucunda Epstein Barr nükleer antijen'ler (EBNAs) 1,2,3A,3B ve 3C, latent proteinler (LPs), latent membran proteinler (LMPs) 1,2 ve iki küçük EBER (Epstein Barr encoded RNA) molekülleri EBER-1 ve EBER-2 oluşur. EBNAs ve LPs, infeksiyonun oluşmasını, devam etmesini (EBNA-1) ve immortalizasyon(EBNA-2) gelişmesini DNA'ya bağlanarak sağlarlar. LMPs onkojenik aktivite gösterirler. Bu LMP ler B hücre çoğalmasımı ve immortalizasyonu uyarırlar (1). Sadece EBNA-1 sürekli eksprese olur. EBV'ün B lenfositlerde latent infeksiyonu, EBNA-1 proteinin oriP (origin of plazmid) adı verilen viral promoter'e bağlanmasıyla başlamaktadır (6). Diğer latent faz antijenlerinin ekspresyonu, farklı hücrelerde regüle edilebilir. LMP2 ekspresyonu, latentlikte reaktivasyonu engeller (13).

B hücre Primer infeksiyonunda Cp veya Wp (BamHI-C ve W bölgelerinde) promotör bölgelerinden başlayan gen ekspresyonu ile latent proteinlerinin tamamı kodlanır. Tip3 latentlik olarak adlandırılan bu dönemde hücrel sitotoksositeye karşı duyarlılık söz konusudur. Bu, lenfoblastoid hücre serileri ve birçok post-transplant lenfomalar için karakteristiktir. EBV latentliğinin en az iki başka formu daha gözlenmektedir. Tip 1 latentlik; asemptomatik taşıyıcılarda ve primer infeksiyonun sonrasında, periferik kanda EBV'ün rezervuar havuzu olarak kalacak olan B hücrelerinde, Tip 2 ise, Burkitt lenfoma ve Nazofarengeal karsinomada görülmektedir (17).

EBNA1: EBV genomunun korunumu ve replikasyonu için gerekli olan ve DNA bağlayan bir proteindir. EBNA -1 flöresan teknikler ile EBV ile infekte immortal B hücrelerinde

gösterilen ilk viral gen ürünüdür. EBNA-1, viral genomun Bam HI K orf'u tarafından kodlanan 65-85 kD molekül ağırlığında bir proteindir. Genoma bağlanabilen tek proteindir. Mitoz halindeki konak hücre kromatini ile ilişki kuran bu protein EBV'ün kalıcı olması için gereklidir.

EBNA1 proteini, farklı EBV izolatlarında farklı büyüklüğe sahip glisin-glisin-alanin (Gly-Gly-Ala) tekrar dizileri içerir. Bu tekrar alanı sınırlandırılmış MHC class 1'in cis etkili inhibitörüdür ve antijen sürecini ubiquitin-proteozom kaskadı yolu ile inhibe eder. EBNA 1 oluşturan peptidlerdeki hata hedef hücrelerde eksprese olduğunda inefektif CD8+ T-hücrelerinin EBNA-1 cevabı ile sonuçlanır (18).

EBNA 2: EBNA2 viral ve konak gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde anahtar rol oynayan bir proteindir (19,20). EBNA1, EBNA3'ler ve LMP'lerin ekspresyonunu transaktive eder ve B lenfosit çoğalma ve transformasyonu için hayattır (21,22). Ayrıca c-myc onkogeni de EBNA2'nin transkripsiyonel hedefidir. Bu, EBV'ün indüklediği B-hücre proliferasyonunda önemli olan bir etkidir (23).

EBNA 3 Ailesi: Lineer viral genomun ortasına yerleşmiş ardışık üç bölgeden kodlanan 3A, 3B ve 3C olmak üzere üç proteini içerir. İn vitro B-hücre transformasyonunda EBNA3A ve EBNA3C gerekliyken, EBNA3B'nin zorunlu olmadığı gösterilmiştir (24,25). EBNA3B sitotoksik T hücrelerinin infekte B hücrelerini tanınmasında primer hedef bölgelerdendir (26). Transformasyonu desteklemek için retinoblastoma proteini pRb ile etkileşebilir. EBNA3 proteinleri transkripsiyon faktörleriyle de ilişkide bulunurlar ve EBNA2'ye bağlanmalarını engellerler. Böylece EBNA2 ve EBNA3 proteinleri, transkripsiyonu kontrol etmek amacıyla birlikte ve zıt etkili çalışırlar (27,22).

EBNA-LP: EBNA-LP, EBNA sentezi sırasında kodlanan bir öncü proteindir. EBNA-LP in vitro B-hücre transformasyonu için kesin olarak gerekli olmamasına rağmen lenfoblastoid hücre serilerinin verimli gelişebilmesi için gereklidir. EBNA proteinlerinin veya EBNA aracılı konak hücre genlerinin kodlanmasında önemli düzenleyici rol oynadığı düşünülmektedir (28,29). EBNA-LP aynı zamanda hem pRb hem de p53 ile ilişkili bulunmuştur fakat bu ilişki lenfoblastoid hücre serilerinde henüz doğrulanmamıştır (30).

LMP1: LMP ler tüm latent formlarda kodlanırlar. Böylece hücre transformasyonun sürdürülmesinde önemli bir rol oynarlar. LMP'ler infekte B lenfositlerini öldüren T lenfositleri için hedef proteinlerdir.

LMP1 hücre içinde vimentin ile ilişkilidir bu sayede stoplazma içi veziküller ile bağlantı kurabilmektedirler. EBNA-2 ile LMP-1, hücrel transformasyonda major rol oynayan proteinlerdir. Bu protein, B lenfositlerde bulunan bcl-2 geninin ekspresyonunu düzenlemekte ve B lenfosit aktivasyonunu sağlamaktadır. Bcl-2, eksprese olduğunda hücreyi apoptozis'den koruyabilir (19,31).

LMP-2: İki formu bulunmaktadır; LMP-2A ve LMP-2B. LMP-2 (A ve B). Bu proteinlere terminal proteinler (TP1 ve TP2) de denir. İnfekte B hücrelerinin membranlarında parçalar halinde Selüler Fosforile Trozin proteinlerine yakın olarak bulunurlar (32). B hücre transformasyonu için gerekli değildirler.

LMP-2A'nın en önemli rolü latent fazdaki B hücrelerinin litik faza geçişini bloke etmektir. B hücre reseptörlerini meşgul ederek uyarılmalarını engellemektedir (19,33).

LMP-2B, LPM-2A ile reseptör benzeri amino eki arasındaki boşluğu artırarak downregülasyon yapmaktadır. 2A ve 2B farklı promotorlar tarafından kodlanmakta olup bu farklılık latent fazın devamlılığı veya litik aktivasyon oluşması arasında kilit rol oynar (32).

EBER: EBV genomunun kodladığı küçük RNA parçacıklarıdır. 166 bazlık EBER-1 ve 172 bazlık EBER-2'den oluşmaktadır. RNA polimeraz III tarafından kodlanan bu proteinlerin kaybolması, virüsün kültürde üremesini etkilememektedir (19). Transformasyon veya gen transkripsiyonu için elzem değildirler (34,35).

2.3 EBV PATOGENEZ VE İMMÜNOLOJİSİ

2.3.1 Primer İnfeksiyon

Orofarengeal hücrelerdeki ilk replikasyonun ardından çoğalan virüsler tonsiller gibi yakın lenfatik bölgelerde bulunan B hücrelerini infekte etmektedirler (36). B hücrelerinin infekte olmasında yüzeylerinde bulunan CR2 hayati öneme sahip olup matür CR2'ye sahip B hücrelerinin bulunmadığı X'e bağlı agamaglobulinemi'li (XLA) hastaların kanında viral DNA tespit edilemezken, seropozitif sağlıklı kontrol grubu bireylerinde kolaylıkla tespit edilebilmiştir (37). Bu sonuçlar B lenfositlerinin yokluğunda epitel hücrelerinin primer infeksiyon oluşması için yeterli olmadığını göstermektedir. EBV ile infekte olan B hücrelerinde ilk önce genellikle latent infeksiyon başlamakla beraber bazı tonsiller B hücrelerinde litik faz gözlemlenebilir. B hücrelerinde latent gen ürünlerinin replikasyonu ve hücre proliferasyonu ile Latent B hücre havuzu gittikçe genişler. Primer infeksiyon boyunca

bu latent hücreler kanda dolaşım halindedir (38). Çocukluk çağındaki primer infeksiyon hayat boyu muhtemelen latent kalır ve ilerleyen yaşlarda indüklenmiş immün yanıt sıklıkla immünopatolojik hastalık habercisidir.

2.3.2 Enfeksiyöz Mononükleoz (EM)

EBV ile infekte vakaların yaklaşık %30-50'sinde Enfeksiyöz Mononükleoz gelişir. Genç ve erişkinlerde görülen akut EM'da klinik olarak; lenfadenopati, farenjit, düzensiz ateş, splenomegali, hepatomegali, sarılık, damak enantemi ve döküntü; serolojik olarak; heterofil antikorlar ve EBV'na karşı özgül antikorlar; hematolojik olarak ise; atipik lenfositler hakimdir. Hastaların %85-90'ında heterofil antikor pozitifdir. EM olguları, 2-3 haftada kendiliğinden iyileşir. Bazen semptomlara yorgunluk ve zayıflama eşlik edebilir ve aylarca devam edebilir. EM'da hematolojik, nörolojik, hepatik veya dalak rüptürü şeklinde nadiren kronik mononükleoz komplikasyonları ortaya çıkmaktadır. Komplikasyon yoksa nörolojik bulgular görülmez. Otoimmün hemolitik anemi, hipogammaglobulinemi, trombositopeni ve hafif bir nötropeni görülebilir. EM olgularının %80-90'ında geçici olarak karaciğer enzimleri artmaktadır. Komplikasyonsuz EM'a bağlı ölüm çok nadirdir (6).

Benzer klinik tablolara yol açan bakteriyel ve viral hastalıkların belirlenmesi ve ayırıcı tanısının yapılması önemlidir. EM sadece EBV tarafından oluşturulan bir klinik tablo olmayıp özellikle CMV infeksiyonlarında da benzer tabloyla karşılaşılmaktadır. Yine atipik lenfositlerin (Downey cells) EBV dışında, Toksoplazmoz, Rubella, Rubeola, HAV, HBV, CMV, Kabakulak infeksiyonlarının yanısıra ilaç reaksiyonlarında da gözlemlendiği unutulmamalıdır. Yani "EM" terimi; infekte eden etkenden bağımsız olarak, uzamış ateş, farenjit ve lenfadenopati'nin beraber olduğu klinik sendrom olarak düşünülmelidir. Bu yüzden EM tablosunu EBV ilişkili ve non-EBV ilişkili EM olarak tanımlama ihtiyacı duyulmaktadır (39). Burada bahsi geçen EBV ilişkili EM'dur.

EM'un inkübasyon süresi yaklaşık 30 gün olup bu süre içerisinde virüsle infekte B hücreleri dolaşıma geçer ve diğer dokulara infiltre olurlar (40).

Primer infeksiyon sonucunda hem hümmoral hem de hücreyel immün yanıt gelişse de infeksiyonu elimine etmek için yeterli değildir. EBV infeksiyonu ile birlikte B lenfositlerde poliklonal IgM yapımı uyarılarak, başta heterofil antikorlar olmak üzere, Ampisilin döküntüsünden sorumlu antikorlar, trombosit, nötrofil, lenfosit membranlarına veya nükleer

antijenlerine karşı antikorlar sentezlenir. Bu antikorlar virüsün nötralizasyonunu başaramadıkları gibi, çoğunlukla otoantikor yapısındadırlar (6). Latent ve litik dönem virüs antijenlerine karşı antikorlar oluşabilmektedir. Özellikle gp350'ye karşı gelişmiş olan antikorlar (Anti-VCA) virüsün CR2'ye bağlanmasını sınırlandırmakta olup virüs yayılımını ve reinfeksiyonunu önleyebilmektedirler.

Heterofil antikorlar: Heterofil antikorların virüsle ilişkisi ve infeksiyonun kontrolü ile iyileşmedeki rolü bilinmemektedir. Heterofil antikorlar, EBV replikasyonunu kontrol ediyor olabilir, ancak EBV antijenlerine karşı gelişen antikorlar ile çapraz reaksiyon vermezler. EBV antijenlerine karşı gelişen antikorlar, bütün EBV-EM'li hastalarda bulunurlar (41).

Bu arada infekte B lenfositlerinde sentezlenen kalıcı EBV antijenleri, T lenfositlerinde çapraz yanıt oluşumuna yol açar. CD8+ sitotoksik T hücreleri primer infeksiyonun kontrolünde anahtar rol oynarlar. Virüsün indüklediği antijenlerin B lenfositlerin hücre zarlarına girmesiyle, infekte olan B lenfositleri için sitotoksik T hücre yanıtı gelişir. Bu aktive CD8+T lenfositleri periferik kanda, atipik, vakuollü sitoplazması olan, lobule ve koyu bazofilik nükleuslu sitotoksik ve süpresör yapıdaki atipik hücrelerdir ve *Downey cells* olarak adlandırılırlar. Bu hücreler EM'da baskın hücrelerdir ve gerek dolaşım gerekse dokularda sayıları çok artmıştır. Lökosit sayısı genelde $15000/\text{mm}^3$ 'ün üzerindedir ve bunların %60 kadarı CD8+ sitotoksik T hücreleridir. Dolayısıyla T hücre anomalisinin görüldüğü konjenital veya akkiz bütün durumlarda primer infeksiyona yanıtın az veya yok olduğunu söyleyebiliriz. Bu durumda T hücre baskısından kurtulan B hücreleri; lenfoproliferatif hastalık veya lenfoma gibi tablolar oluşturabilir (42). Bu nedenle seropozitif bir donörden seronegatif bir organ alıcısına transplantasyon yapılması durumunda immünsüpresif tedavi alan alıcıda B hücreli lenfoproliferatif hastalık gelişim riski yüksektir (43).

EM'lu hastaların çoğu 2–3 hafta içinde kendiliğinden iyileşir. İyileşme ile paralel olarak atipik lenfositler yavaş yavaş azalır Kliniğin düzelmesinden 12–18 ay süre ile boğaz çalkantı suyundan ve daha sonra da aralıklı olarak kandan virüs izole edilebilir.

2.3.3 Latent İNFEKSİYON

Litik ve latent viral antijenlere karşı çeşitli immün mekanizmalar oluşmasına karşın primer infeksiyonu takiben EBV latent infeksiyon olarak devam eder. Dolaşımdaki B hücrelerinin her

biri 5-500 arasında virüs taşır ve infekte bireyler devamlı yada aralıklarla tükürüklerinde de virüsü barındırırlar (44).

Latent viral antijenler ile aktive edilmiş B hücreleri girdikleri lenf nodlarının germinal merkezlerinde antijen spesifik bir sentroblast klonu oluştururlar. Bu aşamada c-myc onkojeni yüksek miktarda kodlanır ve immünoglobulin genlerinin somatik hipermutasyonu oluşur. Sentroblastların olgunlaşması için B hücre reseptörlerinin dentritik hücre yüzeyindeki spesifik antijenlere ve yine B hücre yüzeyindeki CD40 gibi ko-reseptör moleküllerin CD4 T hücrelerine bağlanması gerekmektedir. Bu yolla eksik ya da bozuk hücreler seçilerek apoptoz yoluyla lenf nodunda imha edilirler (39). Maturasyon kısa sürede tamamlanır ve uygun antikoları salgılayan plazma hücreleri ve memory B hücreleri dolaşıma geçer (45). Primer infeksiyon sırasında infekte olan B lenfositlerinin lenf nodu germinal merkezine ulaştığında tüm latent genlerin aktive olduğu bir programın başladığı, EBNA-2 öncülüğünde hücrel proliferasyonun gerçekleştiği gösterilmiştir. Aktif replikasyon sonrasında sadece EBNA-1 ve LMP'ler kodlanır ve latent döneme girilir (46).

Sero-pozitif normal sağlıklı bireylerin kanında çok sınırlı latent viral gen kodlamasının olduğu az sayıda memory hücresi bulunur. Virüsün genomun devamlılığı için sadece EBNA-1'in varlığı yeterlidir. Latent haldeki bu hücrelerin antijenik uyarı ile aktive olmasıyla litik faz başlar ve tercihen epitelyal sahaya ulaşan plazma hücrelerinin ürettikleri viral partikülleri bu bireyler tükürükleriyle bulaştırırlar. Aynı zamanda bir kısım indüklenmiş memory hücreleri lenf nodlarında sekonder bir germinal merkezde çoğalarak yeni memory ve plazma hücrelerini oluştururlar ve döngü devam eder (47).

2.3.4 EBV İle İlişkili Malignensiler

EBV infeksiyonu yaygın ve dünyanın pek çok yerinde görülmesine rağmen ilişkili maligniteler nispeten daha azdır ve coğrafi olarak sınırlı dağılım sergiler. Bu da tümör gelişimi için diğer pek çok virüste olduğu gibi başka ek faktörlerin de olması gerektiğini ve tek başına EBV nin tümör gelişiminde rol oynamasının zayıf bir ihtimal olduğunu göstermektedir (39).

2.3.4.1 Burkitt Lenfoma

Burkitt lenfoma (BL) ilk kez 1958 yılında Burkitt tarafından, çocukluk çağı kanserlerinin en çok görüldüğü ekvatoryal Afrika'daki çocukların çenelerinde tanımlanmıştır (48). BL genelde multifokaldır ve hemen hemen daima ekstranodal yerleşimlidir. Çene bölgesine ek olarak; overler, meme dokusu, karaciğer, bağırsaklar ve böbrek yerleşimi de söz konusudur. Tümör ekvatoryal Afrika'da ve Papua Yeni Gine'de yaygın olup, dünyanın diğer yerlerinde insidansı düşüktür ve sporadiktir. BL gelişimi diğer virüs ilişkili tümörlerde olduğu gibi multifaktöriyeldir. EBV'ün yanı sıra, Malarya ve c-myc onkojeni önemli provakatörlerdir. Nitekim Malarya endemik bölgeleri ile EBV+ BL endemik bölgeleri çakışmaktadır.

Bununla birlikte BL gelişmeden önce EBV enfeksiyonun meydana geldiğini gösteren monoklonal EBV epizomları BL tümör hücrelerinde gösterilmiştir(50,49). Malign B hücrelerinde yalnızca EBNA-1 antijeni tespit edilmiş olup nadiren EBER'ler de bulunabilmektedir. Sitotoksik T hücre tarafından tanınmayan EBNA-1 sayesinde immüneliminyasyon mekanizmalarından tümör hücreleri etkilenmemektedir (51). Farelerde yapılan çalışmalarla EBNA-1'in onkojenik etkisi gösterilmiştir (52). Yine EBER'lerin anti-apoptotik bir gen olan bcl-2 nin transkripsiyonunu indüklediği kanıtlanmıştır (53).

EBV ile ilişkili olsun olmasın tüm BL'larda c-myc onkojeninin baskısı altında üç kromozomal translokasyon söz konusudur (8:14,8: ve 8:22) (54). Yine pek çok BL da p53 tümör süpressör gen mutasyonu tespit edilmiştir (55).

2.3.4.2 Nazofarengeal Karsinoma

Nazofarengeal Karsinoma squamöz epitelyal hücre menşeli, genellikle post-nazal yerleşimli ve coğrafi olarak sınırlı bölgelerde (Çin, Kuzey Amerika, Güneydoğu Asya gibi) karşımıza çıkan bir tümördür. EBV ile ilişkisini ilk gösteren veriler 1970 yılında elde edilmiştir (56). Daha sonraki yıllarda tümör hücrelerinde viral DNA'nın gösterilmesiyle bu veriler doğrulanmıştır (57). Tümör hücrelerinin %70'i non-diferansiye karakterdedir. Non-diferansiye NK olması durumunda %100 EBV ile ilişkilendirilir. Bazı diferansiye NK'lar da EBV ile ilişkilendirilmiştir (58). LMP1'in epitel hücrelerinin proliferasyonunu uyarıp diferansiye olmalarını inhibe ederek patogeneizde rol oynadığı hayvan deneyleri ile gösterilmiş olup patogeneizde suçlanmaktadır (59).

2.3.4.3 Diğer malignensiler

EBV ilişkili Burkitt lenfoma dışında lenfoid tümörler; immün bozukluğu olan hastada lenfoproliferatif hastalık ve Hodgkin lenfoma olup hepsi B hücre kökenli olmasına rağmen klinik şekil ve immünohistokimyasal olarak farklılık arz ederler (39). NK dışında, tükürük bezi, mide, akciğer, timus gibi organlarda da EBV ile ilişkili epitelyal tümörler oluşabilmektedir. Tüm bu tümörler, malign epitelyal hücrelerin yoğun bir şekilde lenfositler tarafından infiltre edilmesinden dolayı sıklıkla lenfoepitelyoma olarak adlandırılır (60).

2.4 EBV İNFEKSİYONUNDA TANI

2.4.1 Hematolojik Bulgular

EM'un erken döneminde genelde lökopeni olmakla beraber bazen lökosit sayısı normal düzeydedir. Giderek lenfositoz oluşmaya başlar ve ikinci veya üçüncü haftada pik yapar. Lökosit sayısı 12.000–18.000 /mm civarında olup nadiren 30.000–50.000/mm³'e ulaşır. Mononükleer hücre oranı %60–70 olup bunların takriben %30'u anormal lenfositlerdir (Downey Cells). Atipik lenfositler, EBV'ün oluşturduğu EM'un yanısıra; Sitomegalovirüs infeksiyonu, Toksoplazmozis, Viral Hepatit, Rubella, Kabakulak gibi hastalıklarda veya ilaç reaksiyonlarında da görülmektedir. EBV infeksiyonlarında rölatif nötropeni vardır ve hafif trombositopeni de görülebilir (6,61).

2.4.2 Serolojik Tanı

EBV infeksiyonlarında hızlı bir hümmoral immün yanıt oluşur. Karakteristik olarak EBV'ün VCA, EA-D, EA-R ve EBNA kompleks antijenlerine karşı oluşan antikorlar belirlenerek infeksiyon dönemi hakkında yorum yapılarak infeksiyonun serolojik tanısı konabilir. EM'lu hastaların %80-85'inde heterofil antikorlar bulunur. Kliniği uyan EM'lu hastada, Paul-Bunnell testi ile heterofil antikorlar pozitif bulunması tanı için oldukça değerlidir(41). Heterofil antikorlar IgM yapısında olup artmış litik-mitotik B hücre aktivasyonu sonucu oluşurlar ve hastalığın ilk haftasından itibaren tespit edilebilir. Düzeyi 4 hafta sonunda iyice azalırken bazen aylarca pozitif olarak kalabilir. Paul-Bunnell deneyinde 1/64 ve üstündeki titreler Enfeksiyöz Mononükleoz tanısını doğrular. Bu heterofil antikorların serum hastalığında veya normal serumda da bulunabilen Forsmann antikorlarından ayırt edilmesi gerekir. Bunun için

hasta serumları sığır eritrosit ve kobay böbrek özetlerinde absorbe edildikten sonra Paul-Bunnell testi tekrarlanır (Tablo-3). Paul-Bunnell testinde %3 yalancı pozitiflik, %10-15 yalancı negatiflik vardır (özellikle immünkompromize, yaşlı ve çocuk hastalarda) (62). Rutin laboratuvar analizlerinde en çok kullanılan Monospot testidir. Bu testte koyun eritrositlerinden daha duyarlı olan at eritrositleri kullanılmaktadır. Paul-Bunnell Testi ile saptanan antikorlar %70 hastada bir yıl içinde 1/40 titrenin altına düşer. Monospot testinde saptanan antikorlar ise %75 olguda 1 yıl süre ile kanda saptanabilir (41). Sitomegalovirüs infeksiyonu, Toksoplazmozis, Viral Hepatit, Rubella, Kabakulak ve HIV infeksiyonu ile heterofil antikor negatif EM oluşabilmektedir (63).

Tablo-3: Paul-Bunnell testi

Serumun kaynağı	Absorbsiyon öncesi Paul-Bunnell testi	Absorbsiyon sonrası Paul-Bunnell testi	
		Kobay böbrek özeti	Sığır eritrositleri
EBV-EM	++++	+++	-
Serum hastalığı	+++	-	-
Normal serum(Forsmann Antikorları)	+	-	+

EBV infeksiyonlarında, heterofil antikorlar ile birlikte virüse özgül antikorlar da oluşmaktadır. Atipik hücrelerin veya heterofil antikorların bulunmadığı EM olgularında, Burkitt Lenfoma, Nazofarengeal karsinoma gibi virüsün onkojenik etki gösterdiği hastalıklarda bu özgül antikorların varlığı önemli yol göstericidir (Tablo-4) (64).

Tablo-4. EBV infeksiyonlarında serolojik profil

Antikor	Immün olmayan	İM:Yeni infeksiyon	Yakın geçirilmiş infeksiyon	Eski infeksiyon	Reaktivasyon	BL	NFK
IgM-VCA	-	+	-	-	-	-	-
IgG-VCA	-	+	+	+	+	++	++
IgA-VCA	-	+/-	-	-	-	-	++
IgG-EA/D	-	+	+	-	+/-	-	++
IgA-EA/D	-	-	-	-	?	-	++
IgG-EA/R	-	+/-	+/-	-	+/-	++	+/-
Anti-EBNA	-	-	az	+	+	+	++

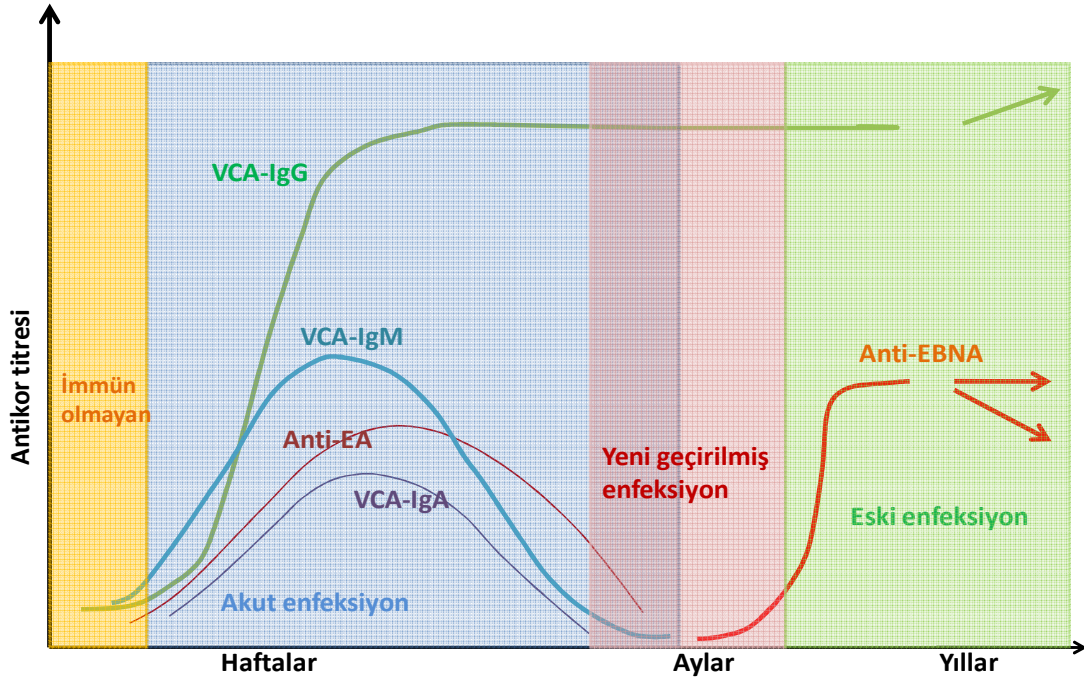
Viral Kapsid Antijene (VCA) Karşı Antikorlar: IgM sınıfından antikorlar klinik belirtilerin ortaya çıkmasıyla pozitifleşir. 4–8 hafta süre ile pozitif kalır ve hızlı şekilde düşer.

Ancak %10 olguda 4 aydan daha uzun süre pozitif kalır (Şekil-2). VCA IgM antikorları sağlıklı kişilerde bulunmaz. Bulunan kişilerde akut primer EM tanısını koydurur. Latent infeksiyon ve reaktivasyon olgularında VCA IgM antikorları saptanmaz. Hastalığın akut döneminde IgG-VCA ve IgM-VCA antikorları bulunur. 4–8 hafta içinde IgM-VCA kaybolurken, IgG-VCA birkaç ay maksimum düzeyde seyredip, sonra biraz azalarak sabit düzeyde ömür boyu kalmaktadır. Ayrıca IgA sınıfı antikorlarda oluşmakta olup tanısız değeri tartışmalıdır (64).

Early Antijene (EA) Karşı Oluşan Antikorlar: Bu antikorlar; akut dönemde yükselir, konvelesan dönemde azalır ve daha sonra kaybolur. İnfekte hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinde bulunan antikorlar anti-EA-D, sitoplazmasında toplanan antikorlar ise anti-EA-R antikorlarıdır. İnfeksiyonun akut döneminde yükselen anti-EA-D antikorları hastalığın başlamasından 3-4 hafta sonra pik yapar ve 3-6 ay sonra kaybolur. Akut hastaların %70'inde bulunur. Anti-D antikorlarının varlığı, hastalığın ciddi seyri veya nazofarenks karsinomu ile ilişkilidir. EM'lu hastalarda anti-EA-R antikorları nadiren görülür. Anti-EA-R, hastalığın başlangıcından itibaren 2 hafta ile birkaç ay içinde çıkar ve anti-EA-D antikorların kaybolmasını takiben geçici aralıklarla 2 yıl kadar kalır. EBV reaktivasyonu sırasında da anti-EA antikorları pozitifdir. Anti-EA-R antikorları, Burkitt lenfomalı, NFK'lu hastalarda veya VCA antikorlarının yüksek olduğu sağlıklı kişilerde bulunabilir (6).

Epstein-Barr Nükleer Antijene (EBNA–1 ve 2) Karşı Oluşan Antikorlar: Anti-EBNA IgG, EM'lu hastaların hepsinde hastalığın başlangıcından 3-4 hafta sonra konvelesan dönem ile birlikte ortaya çıkar ve düzenli titreler ile artar. Dominant antikor komponenti olan anti-EBNA–1 IgG, 6–12 ay sonra pik yapar ve ömür boyu kalır. Akut EM'lu hastalarda anti-EBNA–2 IgG antikorları da bulunur, fakat iyileşme döneminde azalarak devam eder. Akut dönem serumlarda anti-EBNA antikorları nadiren pozitifdir. Hastalığın başlamasından 3–4 hafta sonra ortaya çıkar ve 6–7 hafta sonra maksimum düzeye ulaşır ve ömür boyu kalır. Bu antikorların bulunması infeksiyonun geçirilmiş olduğunu gösterir. Bütün EM'lu hastalarda, anti-EBNA antikorlarına paralel olarak hastalığın başlangıcından itibaren 3–4 hafta sonra, solubl antijene karşı kompleman bağlayan antikorlar (ant-S) çıkar ve hayat boyu kalır. Konakta gp350 ve gp220 membran antijenlerine karşı nötralizan antikorlar (Anti-MA) oluşur. 4 kat titre artışı akut infeksiyonu gösterir. Nötralizan antikorların belirlenmesi zor olduğundan rutin olarak aranmamaktadır (6).

Şekil-2: EM'lu hastalarda seroloji



Anti-VCA IgG ve anti EBNA antikorları hayat boyu devam ederler ve kronik virüs taşıyıcılığı için iyi bir göstergedirler. Anti VCA-IgM ise 2-6 ayda kaybolur. Heterofil antikorlar ise aylarca pozitif olarak devam eder. Bu süre zarfında EBV farinks salgılarında bir yıl veya daha uzun devam eder. Lenfoproliferatif hastalıklarda EBV antijenlerine cevap tam olmayabilir ya da hiç olmaz. O zaman EBV antijenlerini dokuda veya kanda göstermek gerekebilir.

BL ve NFK'lu hastalarda IgG-VCA, sağlıklı kişilerden 8–10 kat daha yüksek titrelere bulunur. NFK'lu hastalarda IgA-VCA titresini de yüksektir. BL'lı hastalarda anti-EA-R IgG ve anti-MA IgG antikorları, NFK'lu hastalarda ise anti-EA-D IgG ve anti-EA-D IgA antikorları yüksek titrede görülür. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda anti-EBNA antikor titreleri azalmakta ve nadiren kaybolmaktadır (1).

Avidite: Pek çok enfeksiyon hastalığında olduğu gibi EBV'ün serolojik tanısında da; IgM tipi antikorların beklenenden erken kaybolması, hiç oluşmaması veya uzun süre pozitif olması gibi nedenlerle; primer enfeksiyon, re-enfeksiyon, re-aktivasyon durumlarının ayrımında sıkıntı yaşanabilmektedir. Bu sorunları aşabilmek için IgG avidite testlerinden yararlanılmaktadır (65-67).

2.4.2.1 İndirekt Flöresan Yöntem (IFA- INDIRECT FLUORESCENCE ASSAY)

1965 yılında BL'lılarda herpes grubunun nonspesifik boyama ile gösterilmesinin ardından 1966 yılında EBV bu yöntem ile gösterilmiştir (68,69). Özel flöresan boyalar ile konjuge edilmiş antikor veya antijenler vasıtasıyla, pek çok antijenik yapı ve antikorların gösterilmesi esasına dayanan immünoflöresan yöntemin geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Materyaldeki antijenin veya doku ya da hücredeki depo antikorların, flöresan boyalı antikorlarla işaretlenerek gösterildiği yöntem Direkt Flöresan Yöntem (direct fluorescence assay-DFA) olarak adlandırılır. Aranılan antikorun önce katı fazda bulunan antijene bağlanıp ardından flöresan boya ile işaretli ikinci bir molekülün (antikor) kullanıldığı ve daha çok serbest antikorları göstermek için kullanılan yöntem ise İndirekt Flöresan Yöntem (indirect fluorescence assay-IFA) olarak adlandırılır.

2.4.2.2 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Bir numunedeki antijen ya da antikorun bu moleküllerle birleşebilen bilinen antikor veya antijen kullanılarak tespit edilmesi ve enzim ile işaretlenmesi esasına dayanan yöntemdir. Oluşmuş antijen-antikor kompleksine sırasıyla enzim-konjugat ve substrat ilaveleriyle oluşan reaksiyonun ölçülmesiyle aranılan madde varlığı ve miktarı değerlendirilir (70).

70'li yıllardan itibaren ELISA, EBV serolojisinde de kullanılmaya başlanmıştır. EBV serolojisi için altın standart kabul edilen immünoflöresan yöntemde EBV ile infekte hücrelerden faydalanılması; seri üretim ve standardizasyon güçlüğü gibi bir dizi zorluğu da beraberinde getirdiğinden alternatif çalışmalar ELISA üzerinde yoğunlaşmıştır. VCA içinde bulunan p18 olarak adlandırılan ve yüksek immünojenik özelliği olan küçük bir peptit bugün ELISA da en yaygın kullanılan antijenik madde olmuştur. EBNA antikorları için EBNA-1 antijeni en yaygın kullanılanı olup EBNA-2 ile beraber kombine edildiği ticari kitlerde mevcuttur (71).

2.4.3 Kültür

Rutin olmamakla beraber EM'lu hastaların lenfositlerinden veya boğaz çalkantı suyundan, viral kültür yapılmaktadır. Ancak hızlı tanı için; DNA hibridizasyon veya monoklonal antikor tekniklerinden yararlanılmaktadır. EBV enfeksiyonunda yalnız dilin epitel hücrelerinde virüs

görülür. İnfekte hücreler, latent virüs taşıyıcısı olduklarından, lenfoid dokulardan hazırlanan preparatlarda elektron mikroskopuyla incelemede EBV görülmez.

2.4.4 Moleküler Yöntemler

Virüs varlığının belirlenmesi, genellikle EBV proteinleri ile EBV DNA'nın gösterilmesine dayanır. Hücrelerde EBV DNA'nın belirlenmesinde Southern blot veya PCR (Polymerase Chain Reaction) gibi yöntemler de uygulanmaktadır (6,72,73). EBV'ün latent infeksiyonunda, bütün hücrelerde EBNA pozitifdir ve human monoklonal anti-EBNA antikorları kullanılarak tespit edilir (74-76).

EBV DNA'nın gösterilmesi; İmmünkompemize hastalarda, serolojik testlerden sonuç alınamadığı durumlarda ve re-aktivasyon olgularında tercih edilmektedir (77).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL SEÇİMİ VE ÇALIŞMA PROGRAMI

Ocak-Ekim 2007 döneminde Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ndeki çeşitli polikliniklere başvuran, lenfadenopati, farenjit, düzensiz ateş, hepatomegali ve/veya splenomegali bulguları bulunan Enfeksiyöz Mononükleoz şüpheli 100 hastanın serum örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Bu serumlar ile ELISA ve referans metod olarak IFA testlerinin çalışılması planlanmıştır.(Bu çalışma için Meram Tıp Fakültesi Dekanlığı Etik Kurulundan 9858 sayı ve 31.12.2007 tarihli uygunluk raporu alınmıştır)

Rutin olarak Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji laboratuvarı Seroloji bölümüne 13x100 mm'lik 5 mL BD Vacutainer plastik SST jelli tüp ile gönderilen kan numuneleri 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Hemolizli ve yetersiz serum örnekleri çalışmaya alınmadı. Elde edilen serum örnekleri her hasta için üç farklı 1,5' ml lik eppendorf tüpüne dağıtıldı ve çalışma sıra numaraları ile etiketlendi. Birinci tüpler haftada bir ELISA testi çalışılmak üzere -20⁰C'de, 2. tüpler 100 hastanın tamamını aynı gün IFA ile daha sonra çalışmak üzere -70⁰C de ve yedek serum olarak ayrılan 3. tüpler de yine -70⁰C de saklandı. Her iki test için de; serumlar çalışılmadan önce, buzdolabının uygun rafında bekletilerek çözülmesi sağlandı. DIA.PRO (Milano-Italy) ELISA kitleri kullanılarak VCA IgG, IgM, EBNA IgG antikorları çalışıldı ve Tektime (bioMerieux Marcy l'Etoile-France) cihazında absorbansları okutulmuş sonuçlar elde edildi ve kaydedildi. Hedeflenen 100 serum örneğine ulaşıncaya bütün örnekler aynı gün içerisinde Euroimmun IFA-BIOCHIP Slide (Luebeck-Germany) kitleri kullanılarak VCA IgG, VCA IgG avidite, VCA IgM, EBNA IgG ve EA-IgG antikorları araştırıldı. Preparatlar Flöresan testlerde deneyimli iki farklı araştırmacı tarafından önce bağımsız sonra birlikte olmak üzere iki kez değerlendirildi ve sonuçlar kaydedildi.

EBV tanı Standardları göz önüne alınarak (Tablo-5) (77); IFA test sonuçlarına göre hastalar; EBV seronegatif, akut enfeksiyon, yakın geçirilmiş enfeksiyon ve eski enfeksiyon olarak gruplandırılırken, elde edilen ELISA test sonuçları bu gruplandırma ile karşılaştırıldı.

Tablo-5: EBV enfeksiyonu için serolojik tanı standartları.

	VCA-IgM	VCA-IgG	EBNA-IgG
Seronegatif	-	-	-
Akut enfeksiyon	+	+/-	-
Yeni geçirilmiş	-	+	-
Eski enfeksiyon	-	+	+

3.2 KULLANILAN YÖNTEMLER

3.2.1 İNDİREKT FLÖRESAN YÖNTEM

Testin prensibi:

Çalışmada Euroimmun IFA (Luebeck-Germany) kitleri kullanılmıştır. Test yalnızca serum veya plazmada bulunan antikörleri tespit etmektedir. Test antikörlerin kalitatif ve kantitatif ölçümüne olanak verirken aynı zamanda avidite ölçümü de yapılabilmektedir.

Bu yöntemde, aranan antikorun niteliğine göre diğer serolojik deneylerde olduğu gibi Üre ile eliminasyon ve kompleman ile birleşme gibi ek protokoller uygulanarak spesifik bağlanmalar sağlanmaktadır. Nitekim Üre kullanılarak VCA IgG aviditesi, kompleman kullanılarak da EBNA antikor varlığı gösterilmektedir.

Bir hasta numunesi için 5 alandan oluşan değerlendirme sahası mevcuttur.

Alan A ve B: Anti-VCA IgG tespiti içindir. VCA eksprese etmiş P3HR1 hücreleri bulunur.

Alan C: Anti-VCA IgM tespiti içindir. VCA eksprese etmiş P3HR1 hücreleri bulunur.

Alan D: Anti-EA tespiti içindir. EA eksprese etmiş EU33 hücreleri bulunur.

Alan E: Anti EBNA tespiti içindir. EBNA eksprese etmiş Raji hücreleri bulunur.

Birinci adımda; EBV antijenleri ile kaplı Biochip'lerin hasta örnekleri ile inkübasyonun ardından, hasta örneğinde bulunması halinde; IgA, IgG, IgM sınıfı antikörler bu antijenler ile bağlanmaktadır.

İkinci adımda; Alan A,C ve D PBS ile, Alan B üre solüsyonu ile ve Alan E kompleman solüsyonu ile inkübe edilir. Böylece Alan B ve Alan E de seçici bağlanma sağlanır.

Üçüncü adımda flöresan işaretli moleküller (Alan A,C,D için anti-human IgG, Alan B için anti-human IgM ve Alan E için anti-human C3c) ile bağlanma sağlanır.

Sonuçlar Flöresan mikroskop ile değerlendirilir.

Kitin içeriği:

- Her biri EBV ile infekte hücrelerden oluşan Biochip'lerle kaplı ve herbir hasta için 5 olmak üzere toplam 10 alandan oluşan slaytlar.
- Flöresan işaretli anti-human IgG (Keçi immünizasyonu yolu ile elde edilmiş)
- Flöresan işaretli anti-human IgM (Keçi immünizasyonu yolu ile elde edilmiş)
- Flöresan işaretli anti-human C3c (Tavşan immünizasyonu yolu ile elde edilmiş)
- Pozitif kontrol: EBV VCA'ne karşı oluşmuş IgG sınıfı antikörler

- Negatif kontrol
- Toz halinde PBS
- Tween 20
- Üre solüsyonu 8 M
- Yapıştırıcı solüsyon (Gliserol)
- Kaplama lamelleri (62 mm x 23 mm)
- Liyofilize Kompleman (insan kaynaklı)

Test için kullanılan malzemelerin hazır hale getirilmesi

- **Slaytlar:** Kullanım için hazır olup 25⁰C'nin altındaki sıcaklıklar Biochip'ler için güvenilir kabul edildi.
- **Flöresan işaretli antikorlar:** Kullanım için hazır dılar, ışığa duyarlı olup buna uygun ambalajla kaplı idiler.
- **Pozitif ve Negatif kontroller:** Kullanım için hazır dılar.
- **PBS-Tween:** 1 paket toz PBS 1 lt distile su ve 2ml Tween 20 ile partikül kalmayacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
- **Üre solüsyonu:** Kullanım için hazır dı.
- **Yapıştırıcı solüsyon (Gliserin):** Kullanım için hazır dı.
- **Liyofilize Kompleman (insan kaynaklı):** -20⁰C'de saklanan liyofilize kompleman içeriğine +4 ⁰C de olan distile su karıştırılmadan ilave edildi ve 20 dakika buzdolabında bekletildikten sonra 1 saatlik bozulma sınırı aşılmeden kullanıldı.

Testin Uygulanması:

1. -70⁰C'de saklanan serum örnekleri +4⁰C'de bekletildikten sonra çalışmaya başlandı. 180µl PBS-Tween 20 solüsyonuna 20 µl serum eklenerek 1/10 oranında dilüe edildi. (Kantitatif değerlendirme planlanmadığı için seri dilüsyonlar yapılmadı.)
2. Her bir değerlendirme alanına(5x 25 µl) 25 µl dilüe serum örneği (kontroller için 25 µl pozitif ve negatif kontrol) slayt alanına denk gelecek şekilde ayarlanmış noktalara hava kabarcığı kalmayacak şekilde eklendi ve üzerine slayt kapatılarak 60 dakika oda ısısında inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası slaytlar içerisi PBS-Tween ile dolu şale de 5 dakika bekletildi ve bu sürenin sonunda çıkarılan slaytların üzerine yavaş bir şekilde PBS-Tween dökülerek yıkandı.

4. Yıkamadan sonra, Alan A, C ve D'ye 20 µl PBS-Tween 20, Alan B'ye 20 µl üre solüsyonu, Alan E'ye 20 µl taze hazırlanmış kompleman solüsyonu ilave edilerek slaytlar kapatıldı. 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
5. İnkübasyonun ardından yıkama işlemi aynı şekilde yapıldı.
6. Yıkamayı takiben her bir alan için 20 µl uygun flöresan işaretli antikorlar, farklı antikora farklı pipet ucu kullanılarak ilgili noktalara ilave edildi ve slaytlar kapatıldı. 30 dakika oda ısısında ve ışık görmeyecek şekilde inkübe edildi.
7. İnkübasyonun ardından yıkama işlemi aynı şekilde yapıldı.
8. Yıkandıktan sonra slaytlar yumuşak kurutma kağıdı ile dikkatlice kurutuldu. Kaplayıcı lameller üzerine Biochip alanlarına denk gelecek şekilde yapıştırıcı solüsyon (Gliserol) 10 µl ilave edildi. Slaytlar Biochip yüzeyleri lamele gelecek şekilde ve hava kabarcıklarına dikkat edilerek kapatıldı.
9. Slaytlar flöresan mikroskopta 20 ve 40'lık büyütme alanlarında incelendi.

Testin Değerlendirilmesi:

Pozitif kontrollerdeki flöresan ışımalar göz önüne alınarak pozitiflik sınırı saptanmıştır.

EBV Anti-VCA IgG antikorları (Alan A ve B) için pozitif patern sitoplazmadadır. Pozitif görünümlü hücreler yaklaşık olarak alandaki hücrelerin %10-20'sini oluşturur ve genelde negatif hücrelerden daha büyüktür. Bu özellikleri gösteren alanlar pozitif olarak değerlendirildi.

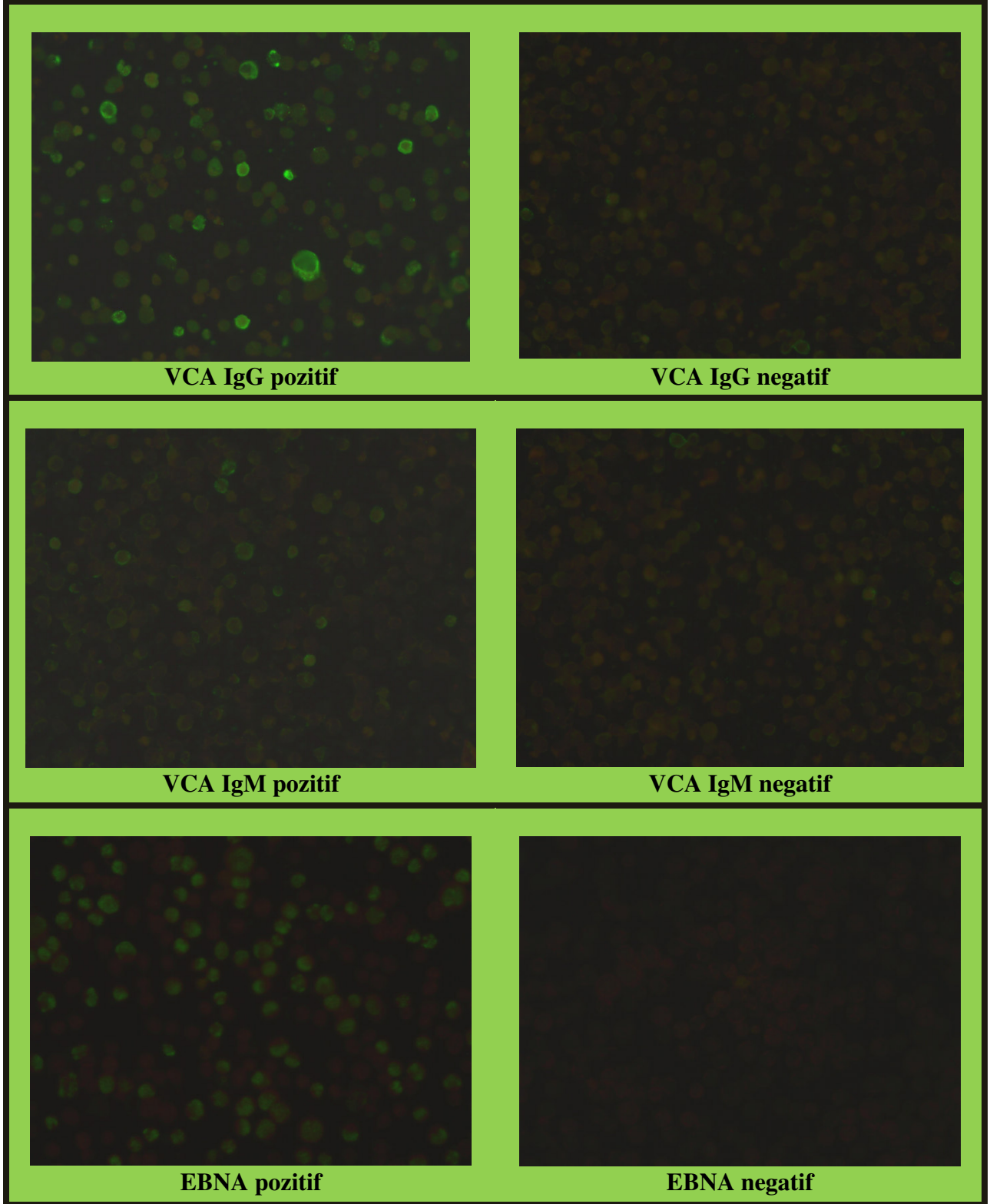
EBV VCA IgG avidite pozitiflik kriterleri Anti-VCA IgG antikorları ile aynıdır. Ürenin zayıf aviditeli antikorları eliminasyon etkisi göz önüne alınarak, negatif, düşük ve yüksek avidite şeklinde puanlama yapıldı.

EBV Anti-VCA IgM antikorları (Alan C) IgG ile benzer görünüm sağladığı için aynı pozitiflik kriterlerine göre karar verildi.

EBV Anti-EA antikorları (Alan D) hücre nükleusunda ince granüler flöresan görüntü pozitif olarak kabul edildi.

EBV Anti-EBNA antikorları (Alan E) nükleuslarında karakteristik yonca yaprağı görünümünde granüler flöresan veren hücrelerin varlığı pozitif olarak kabul edilirken Sitoplazmadaki flöresan, pozitiflik için kabul edilmedi (Şekil-3).

Şekil-3: IFA test değerlendirme(çalışmamızdan)



3.2.2 ELISA- (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY)

Testin prensibi:

Çalışmada DIA.PRO (Milano-Italy) ELISA kitleri kullanılmıştır. Antikorlar serum veya plazma örneklerinden çalışılabilir. Antikorlar serum veya plazma örneklerinden çalışılabilir.

Anti VCA IgG antikorlarını belirlemek için katı fazda VCA p18 pürifiye antijenleri içeren mikroplyetler kullanılmaktadır. 1.inkübasyonda; numunede bulunması durumunda Anti VCA IgG antikorları katı faza yapışır ve yıkama ile uzaklaşmaz. Bu antikorlar daha sonra 2. inkübasyonda peroksidaz ile etiketli anti-human IgG ile bağlanır. Kromojen substrat ilavesiyle oluşan reaksiyonun 450 nm dalga boyunda ölçülmesiyle U/ml olarak antikor miktarı belirlenir.

Anti VCA IgM'in belirlenmesinde katı fazda anti-human IgM antikorları vardır. 1.inkübasyonda; numunede bulunan bütün IgM'ler katı faza yapışır ve yıkama ile uzaklaşmaz. Bu antikorların bir kısmı (bulunması halinde), 2. inkübasyonda ilave edilen biotin ile etiketli VCA p18 antijeni ile bağlanır. Kromojen substrat ilavesinden sonraki basamaklar aynıdır.

Anti EBNA IgG ve IgM antikorlarının tespit prensibi Anti VCA IgG gibidir. Katı fazda uygun antijen olarak EBNA bulunur. 1.inkübasyonda bu antijenle bağlanan antikorlar 2.inkübasyonda peroksidaz etiketli Anti-human IgG veya IgM'in ilavesiyle işaretlenir. Kromojen substrat ilavesi ile oluşan reaksiyon aynı şekilde ölçülür.

Kitin içeriği:

- **Mikroplyet:** 12 x 8 96 kuyucuklu, kullanıma hazır.
 - Anti VCA IgG için: VCA p18 antijeni ile kaplı.
 - Anti VCA IgM için: Anti-human IgM ile kaplı
 - Anti EBNA IgG için: EBNA1 antijeni ile kaplı
 - Anti EBNA IgM için: EBNA1 antijeni ile kaplı
- **Pozitif Kontrol serumu:** Liyofilize antikor+çözücü solüsyon
 - Anti VCA IgG için: Anti VCA IgG
 - Anti VCA IgM için: Anti VCA IgM
 - Anti EBNA IgG için: Anti EBNA IgG
 - Anti EBNA IgM için: Anti EBNA IgM
- **Negatif Kontrol serumu:** İlgili antikor açısından non-reaktif insan serumu
- **Yıkama solüsyonu:** Konsantre halde 60 ml lik şişede.

- **Enzim konjugat:** 16 ml lik şişede kullanıma hazırды.
 - Anti VCA IgG için: HRP(Horseradish peroxidase) ile konjuge anti-human IgG içermektedir.
 - Anti VCA IgM için: HRP(Horseradish peroxidase) ile konjuge strept-avidin içermektedir.
 - Anti EBNA IgG için: HRP(Horseradish peroxidase) ile konjuge anti-human IgG içermektedir.
 - Anti EBNA IgM için: HRP(Horseradish peroxidase) ile konjuge anti-human IgM içermektedir.
- **EBV VCA antijen:** Sadece Anti-VCA IgM testinde bulunur. Liyofilize Biotin ile etiketli VCA p18 antijeni + antijen dilüent
- **Kromojen Substrat:** Sitrat fosfat, dimetilsülfoksit, tetra-metil-benzidin ve hidrojen peroksit içeren 16 ml'lik ışıktan koruyan şişelerde. Kullanıma hazırды.
- **Stop solüsyonu:** Sülfirik asit, 15 ml'lik şişede kullanıma hazırды.
- **Sample dilüent:** 2 adet 60 ml'lik şişede kullanıma hazırды.

Test için kullanılan malzemelerin hazır hale getirilmesi

- **Mikropleyt:** +2⁰C ile +8⁰C arasında muhafaza edilen Mikropleytlar teste başlamadan 1 saat önce oda ısısına alındı.
- **Pozitif Kontrol serumu:** Teste başlamadan hemen önce Liyofilize toz karışım beraberinde bulunan çözücü solüsyonla tarif edilen miktar ile karıştırılarak hazırlandı.
- **Negatif Kontrol serumu:** Kullanım için hazır olup vorteksenerek kullanıldı.
- **Yıkama solüsyonu:** 60 ml lik konsantre solüsyon distile su ile 20 kat sulandırılarak(1140 ml distile su ile) kullanıma hazır hale getirildi.
- **Enzim konjugat:** Anti-VCA IgG, Anti-EBNA IgG ve IgM testleri için kullanıma hazır olup pipetaj öncesi vorteksenerek kullanıldı.
- **EBV VCA antijen- konjugat kompleksi :** Anti-VCA IgM testine başlamadan hemen önce Liyofilize antijen beraberinde bulunan, antijen dilüentin tamamıyla süspanse edilip vortekslendi. 0,1 ml bu karışımdan Enzim konjugata ilave edilip yavaşça vorteksenerek kullanıma hazır hale getirildi.
- **Kromojen Substrat:** Kullanım için hazır olup vorteksenerek kullanıldı.

- **Stop solüsyonu:** Kullanım için hazır olup vortekslenerek kullanıldı.
- **Sample dilüent:** Kullanım için hazır olup vortekslenerek kullanıldı.

Testin Uygulanması:

Test manuel çalışıldı ve sonuçlar Tektime optik dansitometre cihazında okutularak elde edildi.

1. Test öncesi hazırlıklar yapıldıktan sonra önceden sıralanarak dizilmiş her bir serum örneği 1000µl sample dilüente 10µl serum olacak şekilde 1:101 oranında dilüe edildi.
2. A1 kuyucuğu kör ölçüm için boş bırakıldıktan sonra, sırasıyla negatif, pozitif kontrol ve dilüe serum örnekleri 100 µl miktarlarında kuyucuklara ilave edildi ve üzeri strip ile kapatılarak 60 dakika 37⁰C’de inkübe edildi.
3. Otomatik yıkama cihazında yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama yapıldı.
4. A1 kuyucuğu hariç tüm kuyulara 100 µl, Anti-VCA IgG, Anti-EBNA IgG ve IgM için Enzim konjugat, Anti-VCA IgM için antijen- konjugat kompleksi ilave edildi ve strip ile kapatılarak 60 dakika 37⁰C’de inkübe edildi.
5. Otomatik yıkama cihazında yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama yapıldı.
6. A1 kuyucuğu dahil tüm kuyulara 100 µl Kromojen substrat ilave edildi ve strip ile kapatılarak 20 dakika oda ısısında ışık almayan ortamda inkübe edildi.
7. Bu kez yıkama yapılmadan her kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu ilave edildi.
8. Kuyucuklar optik dansitometre hafızasına tanımlandıktan sonra 450 nm lik okuma filtresinde okutuldu.

Tanımlanmış negatif ve pozitif kontrol kuyucuklarının absorbanlarına göre bir cut off değeri oluştu ve bu değerin üstündeki absorbanlar pozitif olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

EBV serolojik tanısında; seronegatif, akut infeksiyon ve geçirilmiş infeksiyon kavramlarının ayrıştırılması anahtar rol oynamaktadır. EBV infeksiyonlarında reaktivasyon, aydınlatılması gereken diğer bir evre olmakla beraber serolojik olarak tam uyuşan bir profil yoktur. EA antikörlerinin varlığı reaktivasyon açısından bir ipucu olmakla beraber varlığı ya da yokluğu tanı koydurucu değildir. Dolayısıyla reaktivasyon olguları; klinik yaklaşım ve EBV DNA ölçümlerinin beraber yorumlanması ile değerlendirilmektedir (78).

EBV infeksiyonun serolojik tanısı için VCA IgG, VCA IgM ve EBNA IgG antikörlerinin belirlenmesi gerekmektedir (79). Pek çok gelişmiş ülkede bu üç antikorun tespiti ile EBV'ün serolojik evrelendirilmesi standart metot olarak kabul edilmektedir. IFA yöntemiyle bu antikörlerin varlığının gösterilmesi uzun zamandan beri altın standart olarak kullanılmaktadır (80,81).

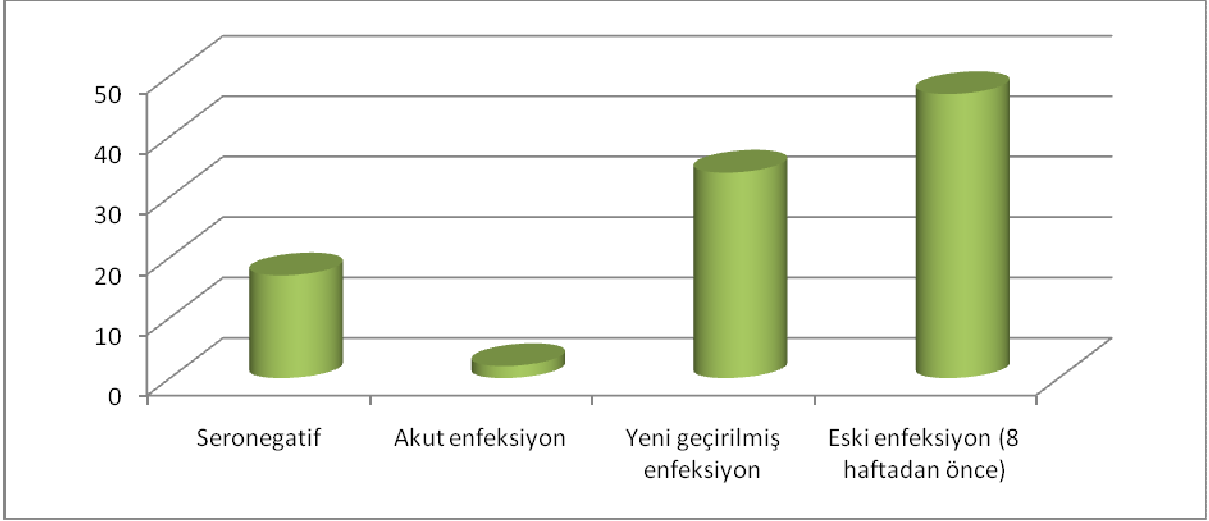
IFA eskiden daha fazla tercih edilirken, hazırlanmasında kullanılan hücre kültürlerinin elde edilmesindeki güçlükler ve standardizasyon sıkıntıları nedeniyle alternatif tanı metodları gündeme gelmiş ve benzer dezavantajları taşımayan ELISA, tanı metodu olarak özellikle 80'li yıllardan itibaren yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yeni teknolojik gelişmeler ve hücre kültür teknikleri sayesinde daha iyi standardize edilmiş ve seri üretim kalitesi yakalamış olan yeni IFA kitlerinin bu özellikleri ile mevcut ELISA teknikleriyle yeniden karşılaştırılması, her iki testin avantaj ve dezavantajlarının güncelleştirilmesini sağlayacaktır.

Çalışmamıza dahil edilen örnekler rutin laboratuvarımıza gönderilen EM şüpheli hasta serumları olup yaş, cinsiyet ya da başka bir demografik parametreye bağlı kalınmamıştır.

IFA referans metot ile elde edilen sonuçlar, EBV tanısı için belirlenen standartlar doğrultusunda sınıflandırılırken (Şekil-4), aynı zamanda bu serolojik evreler ile VCA IgG avidite artışı arasındaki ilişkide araştırılmıştır (Tablo-6).

Standart kriterlere göre toplam 17 hasta seronegatif olarak değerlendirilirken, 2 hastada Akut infeksiyon lehine sonuç elde edilmiştir. Sadece VCA IgG pozitifliğinin olduğu 34 hasta, konvelasan döneme atıf yapılarak yeni geçirilmiş infeksiyon olarak değerlendirilmiştir. 47 hasta ise eski infeksiyon serolojisi göstermektedir. Tüm bunlara paralel şekilde VCA IgG avidite sonuçları da, yüksek, düşük ve negatif olarak değerlendirilmeye alınmıştır.

Şekil-4: IFA referans test sonuçlarına göre oluşan sınıflandırma.

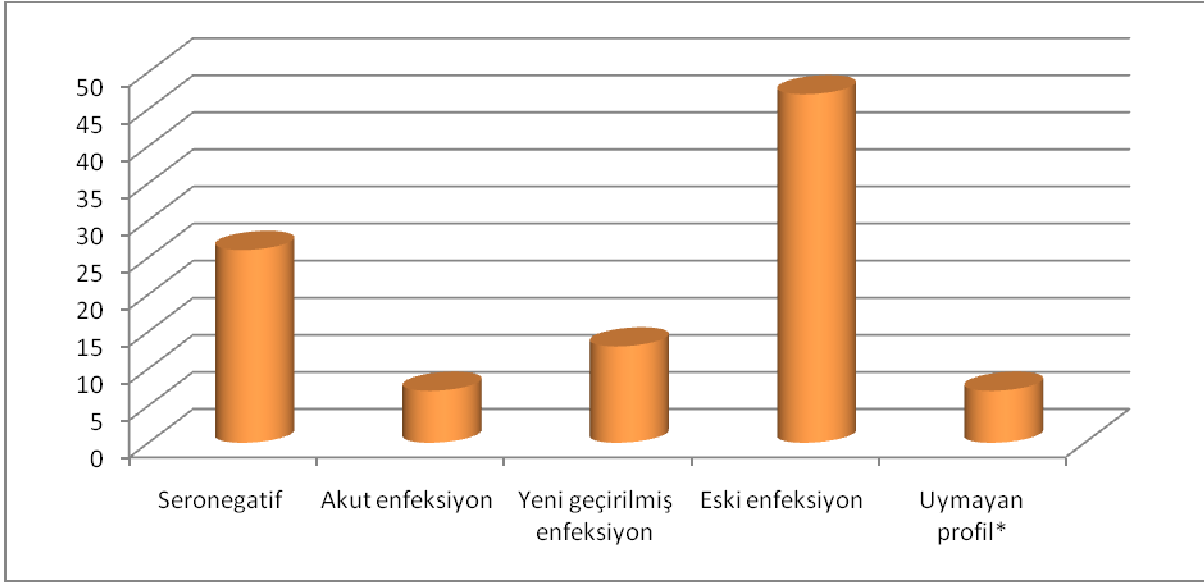


Tablo-6: IFA sonuçlarının değerlendirilmesi

IFA n:100		VCA IgM	VCA IgG	EBNA IgG	VCA IgG Avidite		
					Yüksek	Düşük	Negatif
Seronegatif	17	-	-	-	-	17	
Akut enfeksiyon	2	+	+/-	-	-	1	
Yeni geçirilmiş enfeksiyon	34	-	+	-	13	16	
Eski enfeksiyon (8 haftadan önce)	47	-	+	+	44	2	

ELISA tanı metoduyla elde edilen sonuçlar, yine EBV tanısı için belirlenen standartlar doğrultusunda sınıflandırılmışlardır (Şekil-5). ELISA sonuçlarına göre 26 hasta seronegatif, 7 hasta akut enfeksiyonlu iken, 13 yeni geçirilmiş ve 47 eski enfeksiyonlu hasta bulunmaktadır. ELISA ile ayrıca, her üç antikorun beraber pozitif olduğu veya sadece EBNA IgG pozitifliği bulunan 7 uyumsuz profil elde edilmiştir (Tablo-7).

Şekil-5: ELISA test sonuçlarına göre oluşan sınıflandırma.



Elde edilen bu sınıflandırma daha sonra referans test IFA sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. ELISA / IFA oranları Seronegatiflik için 7/17(**41**), akut enfeksiyon için 2/2(**100**), yeni geçirilmiş enfeksiyon için 5/34(**14,7**), eski enfeksiyon için ise 35/47(**74,5**) olarak bulunmuştur.

Tablo-7: IFA ve ELISA karşılaştırma

		IFA referans Seronegatif n:17	IFA referans Akut İNFEKSİYON n:2	IFA referans Yeni geçirilmiş İNFEKSİYON n:34	IFA referans Eski İNFEKSİYON n:47
ELISA	Seronegatif n: 26	7 (41)	-	17	2
	Akut enfeksiyon n:7	2	2(100)	1	2
	Yeni geçirilmiş enfeksiyon n:13	2	-	5(14,7)	6
	Eski enfeksiyon n:47	5	-	7	35(74,5)
	Uymayan profil* n: 7	1 (-,-,+)	-	4 1(-,-,+) ve 3(+,+,+)	2 1(-,-,+) ve 1(+,+,+)

* Sıralama VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG şeklindedir.

Ayrıca, VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG ELISA testlerinin her biri için duyarlılık ve özgüllük oranları ayrı ayrı hesaplanarak ELISA tekniğinin performansı tek parametre bazında değerlendirilmiştir (Tablo-8).

Tablo-8: ELISA test performansı

			IFA		ELISA	
			Pozitif	Negatif	Duyarlılık	Özgüllük
ELISA	VCA IgM	Pozitif	2	9	100	90,8
		Negatif	0	89		
	VCA IgG	Pozitif	51	8	61,5	53
		Negatif	32	9		
	EBNA IgG	Pozitif	37	10	78,7	81,1
		Negatif	10	43		

En yüksek Duyarlılık ve Özgüllük değerleri VCA IgM için sırasıyla 100 ve 90,8 olarak bulunurken, EBNA IgG için 78,7 ve 81,1 olarak bulunmuştur. VCA IgG için ise bu değerler 61,5 ve 53 olarak gerçekleşmiştir.

5. TARTIŞMA

EBV, özellikle çocukluk ve ergenlik dönemlerindeki yüksek prevalansı ile dünya genelinde yaygın bir epidemiyolojiye sahip önemli enfeksiyöz etkenlerdendir. EM tablosunun oluşturduğu genel sağlık problemlerinin yanısıra virüsün neden olduğu latent infeksiyon ve beraberindeki bir dizi neoplastik hastalık bu problemleri daha da ciddileştirmektedir. Bu nedenle EBV ün, epidemiyolojik ve fizyopatolojik özelliklerinin tam aydınlatılması, daha etkin tanı ve tedavi metotlarının geliştirilmesi gerekmektedir.

Etkin ve doğru tanı için, kullanılan yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması istenirken, aynı zamanda bu yöntemin pratik uygulanabilirlik, maliyet ve standardizasyon açısından da tatmin edici olması gerekmektedir. Ayrıca EBV de olduğu gibi litik-latent, akut-geç infeksiyon dönemlerinin bulunduğu ve bu dönemlerin aydınlatılması için çok sayıda parametrenin birlikte değerlendirildiği durumlarda; her bir parametre için elde edilen sonucun duyarlılık ve özgüllüğün yanısıra diğer parametreler ile kombine uyumunun da, test performansını belirlemede önemli bir kriter olduğu bilinmektedir (80).

Duyarlılık ve özgüllük açısından bir yöntemin irdelenebilmesi için araştırılan hastalık ya da parametre için “altın standart” olarak kabul gören bir referans yönteme ihtiyaç duyulmaktadır. Bu şekilde bireylere kesin hasta ya da sağlıklı tanısı konabilir (82).

EBV infeksiyonunun serolojik tanısı birden fazla antikor yanıtının değerlendirilip yorumlanmasıyla yapılmaktadır. Bunlardan VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG antikorları elzemdir ve infeksiyon hakkında değerli bilgiler vermektedir (77). Serolojik olarak tespit edilen EA antikorları ve VCA IgA sınıfı antikorların varlığı ya da yokluğu infeksiyon açısından mutlak bir fikir oluşturmaz, EA antikorları reaktivasyon olgularında mutlak olmayan bir fikir verirken (78). VCA IgA daha çok NFCA tanısında değer taşımaktadır (83,84).

Bu çalışmada; öncelikle örnekler EBV infeksiyonu tanı standartları göz önüne alınarak (77), IFA referans testi EBV VCA IgM, IgG ve EBNA IgG sonuçları doğrultusunda; Seronegatif, Akut infeksiyon, Yeni geçirilmiş infeksiyon ve Eski infeksiyon gruplarına ayrıştırıldı (71,80,81).

IFA testiyle 100 hasta serumunun 83'ünde VCA IgG antikor pozitif bulundu. 47 serum örneğinde EBNA IgG pozitif bulunurken, sadece 2 örnekte VCA IgM antikorları pozitif olarak elde edildi.

Fidan ve arkadaşlarının (85) 2005 yılında farklı yaş gruplarında ELISA ile yaptıkları çalışmada seropozitiflik oranı %91,4 bulunurken bizim çalışmamızda bu oran %83 bulunmuştur.

Çalışmamızda 100 hastanın sadece 2'sinde VCA IgM pozitifliği ile Akut infeksiyon tablosu gösterilmiştir. Debyser ve ark.(86) IFA ile yaptığı çalışmada VCA IgM, %2,5 oranında tespit edilirken, Fidan ve ark. (85) çalışmasında %10 bulunmuştur.

Debyser ve ark.(86) VCA IgG ve EBNA IgG'yi sırasıyla %83,3 ve %6 olarak bulurken Fidan ve ark.(85) %82,9 ve 78,6 oranlarında tespit etmişlerdir.

Elde ettiğimiz VCA IgM ve EBNA IgG pozitiflik oranları bu çalışmalar ile değişkenlik göstermektedir, oysa VCA IgG oranlarının hemen hemen örtüştüğü görülmektedir. Fung ve ark. (87) 152 serum örneğinde VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG için %21, %75 ve %42 oranlarını elde etmişlerdir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki VCA IgG ve EBNA IgG oranlarına paralel iken, VCA IgM'in oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Figueira ve ark. (88) VCA IgG ve EBNA IgG için % 71 ve 54 lük oranlar elde etmişlerdir.

Değişik çalışmalardaki VCA IgG oranları ve bizim sonuçlarımız benzer oranlara sahipken EBNA IgG ve özellikle VCA IgM değerlerinin farklılığı göze çarpmaktadır. VCA IgG antikorlarının serolojik olarak akut infeksiyonun başından itibaren var olduğu ve ömür boyu pozitif kaldığı düşünüldüğünde diğer antikorlara nazaran tespit edilme olasılığının hastalığın hangi evresinde olursa olsun yüksek olacağı beklenen bir gerçektir. Oysa VCA IgM akut dönemde tespit edilip konvelasan dönemle birlikte genelde kaybolmaktadır. Yine EBNA IgG konvelasan dönemle birlikte oluşmaya başlayıp akut dönemde hemen hemen negatiftir (89). Ayrıca seçilen hasta grubunun ait olduğu popülasyonun seroepidemiolojik farklılık arz etmesi beklenen bir sonuçtur. Bu yüzden farklı çalışmalarda incelenen serum örneklerinin elde edildiği hasta gruplarının seçim kriterlerindeki subjektif yaklaşımların, hastalık dönem oranlarıyla ve dolayısıyla bu iki antikorun tespit edilebilirliği ile ilgili farklı sonuçlar doğurması beklenebilir.

Çalışmamızda; 2 akut, 34 yeni geçirilmiş ve 47 eski infeksiyon olmak üzere 83 hasta serumunda VCA IgG gösterilmiş olup, bu dönemlerin irdelenmesinde VCA IgM ve EBNA IgG antikorlarının varlığı kullanılmıştır.

İnfeksiyon ilerledikçe immün maturasyon ile IgG antikorlarının aviditesinin artması beklenen bir sonuçtur. Genelde 3-5 aylık bir periyot sonunda yüksek aviditeli IgG antikorları oluşmaktadır (65). Araştırmamızda VCA IgG aviditesine bakılarak infeksiyon evrelerine göre avidite durumu irdelenmiştir. Akut infeksiyonlu iki serum örneğinden birinde düşük avidite elde edilirken diğeri negatif olarak sonuçlanmıştır. Yeni geçirilmiş infeksiyon örneklerinin 13'ünde yüksek, 16'sında ise düşük avidite tespit edilirken, 5 örnek negatif çıkmıştır. 47 eski infeksiyon örneğinde ise 44 gibi oldukça büyük bir oranla yüksek aviditeli antikor bulunmuştur ve bu numunelerin sadece 2'sinde düşük, 1'inde negatif avidite tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak infeksiyon ilerledikçe aviditenin arttığını söyleyebiliriz. Strasek ve arkadaşları (66) ELISA ile yaptıkları çalışmalarında akut infeksiyon tanımlanmasında aviditenin faydalı olabileceğini, fakat EBV ile ilişkili diğerklinik durumların avidite ile aydınlatılamayacağını iddia etmişlerdir. Robertson ve arkadaşları (90) ise negatif EBNA IgG ile beraber düşük aviditeli VCA IgG nin akut infeksiyon açısından %100 duyarlı olduğunu göstermişlerdir.

Bizim IFA ile yaptığımız bu çalışmadaki sonuçlar ise dönemler arasındaki avidite farkını nispeten ortaya çıkarmaktadır.

Beklenenin aksine bazen geçirilmiş infeksiyonda veya reaktivasyonda immatür antikorların varlığı nedeniyle düşük aviditeli antikorlar meydana gelmektedir, bazende akut infeksiyonlu hastada antikor aviditesinin çabuk olgunlaşması ile yüksek aviditeli antikorlar oluşabilmektedir. Bu tip olumsuzluklar nedeniyle avidite testleri ile ilgili henüz tam bir standardizasyon sağlanamamıştır (65).

Bunun yanında, uzamış IgM yanıtının olduğu geçirilmiş infeksiyon vakaları ile akut infeksiyon ayırımının yapılmasında, VCA IgG aviditesinden faydalanılabileceğini Anderson ve ark.(91) yaptıkları çalışmalarında göstermişlerdir. Aynı çalışmada EA IgG aviditesi de araştırılmış olup anlamlı bulunmamıştır. Avidite faktörünün faydalarının, klinik takip ile başlayan uzun soluklu çalışmalar ile ortaya konulmasının daha sağlıklı sonuçlar vereceği kanaatindeyiz.

Çalışmamızda örnekler, ELISA ile de EBV tanı standartları doğrultusunda Seronegatif, Akut enfeksiyon, Yeni geçirilmiş enfeksiyon ve Eski enfeksiyon olarak sınıflandırılmıştır. Bu değerlendirmeye göre 26 seronegatif, 7 akut enfeksiyonlu, 13 yeni geçirilmiş ve 47 eski enfeksiyonlu hasta bulunmaktadır. ELISA ile ayrıca, her üç antikorun beraber pozitif olduğu veya sadece EBNA IgG pozitifliği bulunan 7 uyumsuz profil de elde edilmiştir.

ELISA ile ortaya çıkan bu durum, IFA referans metoda göre belirlediğimiz sonuçlar ile karşılaştırıldığında; 17 IFA seronegatif örnek için ELISA da 7 seronegatif sonuç elde edilmiş olup %41'lik bir uyum oranı oluşmuştur. Kalan 10 örnek ise ELISA ile; 2 akut, 2 yeni geçirilmiş, 3 eski enfeksiyon ve 3 uyumsuz profil vermiştir.

IFA ile akut enfeksiyon olarak belirlenen 2 örneğin 2'sinde de (%100) ELISA, akut enfeksiyon paterni vererek yüksek uyumluluk sergilemiştir. Debysen ve ark. üç farklı ticari ELISA'nın IFA yöntemiyle karşılaştırıldığı çalışmalarında IFA ile akut enfeksiyon tanısı koydukları 27 örnekte ELISA ile %100, %85 ve %88,8 oranlarında uyumluluk göstermiş olup Akut enfeksiyon açısından bizim çalışmamızda ki ELISA performansı ile uyumludur (86).

IFA ile yeni geçirilmiş enfeksiyon olarak değerlendirilen 34 örneğin sadece 5'inde ELISA ile, yeni geçirilmiş enfeksiyon tanısı konmuş olup uyum %14,7 dir. Kalan 29 örneğin 17'si seronegatif, 1'i akut enfeksiyon, 7'si eski enfeksiyon ve 4'ü uyumsuz profil sergilemiştir.

IFA ile 47 örnek eski enfeksiyon olarak değerlendirilmiştir. Bu örneklerin 35'ine eski enfeksiyon tanısı koyan ELISA, %74,5 lik bir uyum göstermiştir. Kalan 12 örnekte 2 seronegatif, 2 akut enfeksiyon, 6 yeni enfeksiyon ve 2 uyumsuz profil sergilemiştir. Tablo-6.

Akut enfeksiyonu tanımlamada ELISA tanı metodunun IFA ile uyumlu olduğu söylenebilirken diğer hastalık evreleri için aynı şeyi söylemek pek mümkün değildir. Gartner ve ark. (81) 5 farklı ticari ELISA kitini IFA referans metoduyla karşılaştırmışlardır. Seronegatif, akut enfeksiyon ve geçirilmiş enfeksiyon olarak IFA ile sınıflandırılan serum numunelerinde yapılan çalışma ile 5 farklı ELISA yönteminde IFA'ya göre %4,9 ile %14 arasında değişen oranlarda uyumsuzluk tespit etmişlerdir. Mithoe ve ark. (80) 5 farklı ELISA kit performansını IFA sonuçlarına göre araştırmış ve Yeni geçirilmiş enfeksiyon tanısında IFA'ya göre %30 ile %88 arasında değişen oranlarda uyum tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada Eski enfeksiyon için %78 ile %96, seronegatiflik için ise %81 ile %90 arasında değişen oranlarda uyum göstermişlerdir.

EBV infeksiyonu tanısı ya da evresi hakkında karar verirken değerlendirilmeye alınan antikorların ortak göstergesine göre karar verilmektedir. Bizde çalışmamızdaki örnekleri gerek IFA gerekse ELISA ile bu şekilde tanımlayıp sınıflandırdık. Fakat çalışılan her bir parametrenin tespit edilebilirliği özellikle ELISA ile farklı olabilmektedir (71,80,81). Dolayısıyla kullanılan yöntemin performansının; çalışılan her bir antikorun duyarlılık ve özgüllüğünün bağımsız olarak belirlenmesi ile de sınılanması gerekmektedir.

Bu amaçla, IFA sonuçlarına göre VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG ELISA testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri belirlenmiştir. VCA IgM testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %90,8 bulunmuştur. Oysa VCA IgG için duyarlılık ve özgüllük %61,5 ve %53 olarak gerçekleşmiştir. EBNA IgG de ise %78,7 ve %81,1 şeklinde bulunmuştur. Farklı zamanlarda IFA ile yapılan çalışmalarda ELISA VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG için değişik oranlarda duyarlılık ve özgüllük sonuçları elde edilmiştir.

Tablo-9: IFA referans alınarak yapılan çeşitli çalışmalardaki VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG için ELISA test duyarlılık oranları

Çalışma	VCA IgM		VCA IgG		EBNA IgG	
	Duyarlılık	Özgüllük	Duyarlılık	Özgüllük	Duyarlılık	Özgüllük
Debyser ve ark.(86)	100	97	98	96		
Farber ve ark.(71)	95	93	94	97,8		
Gartner ve ark. (81) *	97-94	83-81	82-94	97-98	94	
Mithoe ve ark. (80) **	77-95	92-97	84-98	87-92	96-100	77-96
Pummanova ve ark.(92)	94	96				
Robertson ve ark.(90)		49				
K. H. Chan ve ark.(93)	96	96				
Martinez ve ark.(95)					87	89
Bizim çalışmamız	100	90,8	61,5	53	78,7	81,1

* 4 farklı ELISA için en yüksek ve en düşük değerler.

** 6 farklı ELISA için en yüksek ve en düşük değerler.

Debyser ve arkadaşları (86) rutin istem ile laboratuvara gönderilen EM şüpheli 324 serum örneği ile yaptıkları çalışmalarında IFA'ya göre ELISA testinin duyarlılık ve özgüllük oranlarını VCA IgM için %100 ve %97 olarak bulmuşlardır. Aynı kriterlerle Farber ve

ark. (71) 179 örnek ile yaptıkları çalışmalarında VCA IgM ELISA testi için %90'nın üzerinde duyarlılık ve özgüllük oranları elde etmişlerdir. Gartner ve ark. (81) 264 örnek ile 4 farklı ELISA kitini IFA'ya göre değerlendirmişlerdir. VCA IgM için %94 ile 97 arasında değişen oranlarda yüksek duyarlılık belirlemişlerdir ve özgüllük oranlarını %81-83 aralığında bulmuşlardır.

Mithoe ve ark.(80) 334 örneği 5 farklı ELISA testi ve IFA ile çalışmışlar ve VCA IgM için %77-95 aralığında kite göre değişken duyarlılık oranları elde ederlerken, %92- 97 aralığında yüksek özgüllük rakamlarına ulaşmışlardır. Daha fazla numune ile yapılan bir çalışmada ise %94 duyarlı ve %96 özgül, ELISA VCA IgM sonucu rapor edilmiştir (92). Benzer şekilde ELISA VCA IgM için %96 duyarlılık ve %96 özgüllük oranlarının bildirildiği bir çalışma 1998 yılında rapor edilmiştir (93). Robertson ve ark.(90) 28 örnek içeren çalışmalarında VCA IgM ELISA için elde ettikleri % 49 luk özgüllük değerleri diğer bütün çalışmalara ve bizim sonuçlarımıza göre oldukça düşüktür. Farklı zamanlarda ve farklı kitler ile yapılan tüm bu araştırmalarda VCA IgM ELISA testi için genel olarak yüksek duyarlılık ve özgüllük oranlarına ulaşıldığı ve bizim elde ettiğimiz rakamlar ile uyduğu söylenebilir. Fakat az sayıda da olsa bazı çalışmalardaki özellikle düşük özgüllük oranları, seçilen ELISA kitinin özelliklerinin özgüllük ve duyarlılık oranlarını değiştirebileceği gerçeğini de ortaya çıkarmaktadır.

VCA IgG ELISA testinin IFA sonuçları ile karşılaştırıldığı (71,80,81,86) çeşitli çalışmalarda duyarlılık en az %82 özgüllük ise en az %87 bulunmuştur. Oysa bizim çalışmamızda %61,5 ve %53 gibi düşük değerler elde edilmiştir. VCA IgG için yapılan pekçok araştırmada yüksek seropozitiflik oranları ortaya konmuştur (87,88). Ülkemizde Elazığ bölgesinde yapılan bir çalışmada VCA IgG seropozitifliği %99,4 gibi oldukça yüksek bir rakamla ifade edilmiştir (94). Yine ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada %91,4 seropozitiflik tanımlanmıştır (85). Dünyada ve özellikle ülkemizdeki VCA IgG pozitiflik oranları dikkate alındığında bizim çalışmamızdaki IFA VCA IgG sonuçları beklendiği gibi yüksek çıkarken (%83) ELISA VCA IgG testi sonuçlarında bir uyumsuzluk söz konusudur (%58). Dolayısıyla duyarlılık ve özgüllük oranları oldukça düşük olarak elde edilmiştir. IFA 'ya göre değerlendirildiğinde düşük duyarlılık ve özgüllük değerlerinin olmasının yanısıra, IFA testinden bağımsız olarak, beklenen seropozitiflik oranı ile de uyumsuzluk göstermesi, VCA IgG ELISA testinin yetersizliğini kuvvetlendirmektedir. Farklı çalışmalarda elde edilen

duyarlılık ve özgüllük değerleri ile bizim çalışmamızdaki bu önemli farkı, kullanılan ELISA kitinin farklılığına bağlanabilir.

EBNA IgG antikoları için %87–100 arasında değişen oranlarda duyarlılık bildiren raporlar mevcuttur (80,81,95). Aynı çalışmalarda bildirilen özgüllük oranları %77–96 arasında değişmektedir. Araştırmamızda elde ettiğimiz %78,7 lik duyarlılık oranı nispeten düşük olmakla beraber %81,1'lik özgüllük oranımız diğer çalışmalarla örtüşmektedir. Diğer testlerde olduğu farklı araştırmalarda farklı ELISA kitlerinin kullanımının duyarlılık ve özgüllük değerlerini etkileyebileceği bilinmektedir.

Çalışmamızda;

1. Referans test olarak kullandığımız IFA ile belirlenen; VCA IgM, VCA IgG, EBNA IgG antikoları sonuçlarından yola çıkarak yaptığımız hastalık evresi ile ilgili sınıflandırma ile, ELISA test sonuçlarıyla oluşan sınıflandırma karşılaştırıldı.
2. IFA VCA IgG avidite sonuçları ile enfeksiyon dönemleri arasındaki ilişki irdelendi.
3. Her bir antikor için ELISA sonuçlarının IFA'ya göre duyarlılık ve özgüllük oranları belirlendi.

Sonuç olarak;

- ELISA testinin VCA IgM test için elde edilen duyarlılık ve özgüllük oranları oldukça yüksek olup Akut enfeksiyonu tanımlama performansı yeterli bulunmuştur.
- ELISA yöntemi ile belirlenen VCA IgG ve EBNA IgG için özgüllük ve duyarlılık oranları açısından bir değerlendirme yapıldığında her iki testin; **Seronegatif, Yeni geçirilmiş enfeksiyon** ve **Eski enfeksiyon** belirleme oranlarında farklılık göze çarpmaktadır. Özellikle ELISA VCA IgG testi IFA referans teste göre yetersiz performans sergilemiş olup bu antikorun enfeksiyonun erken safhalarında oluşup ömür boyu pozitif kaldığı düşünüldüğünde diğer antikor parametreleri ile yapılan kombine serolojik yorumlarda belirsizliğe yolaçabilir.
- ELISA EBNA IgG için elde edilen yetersiz duyarlık oranı ise VCA IgG'nin pozitif olduğu durumlarda VCA IgG aviditesinin belirlenmesiyle aşılabılır.
- EBV enfeksiyonu tanısında birden fazla parametre ile değerlendirilme gereksinimi olup IFA tanı paneli bir hasta numunesinde 5 parametrenin (VCA-IgG, VCA-IgG avidite, VCA-IgM, EBNA-IgG ve EA antikor) aynı anda değerlendirilmesi fırsatı tanımaktadır.

ELISA için de bütün bu parametrelerin ayrı ayrı çalışılabileceği bilinsede tanı paneli uygulaması değerlendirme pratiği açısından avantajlı gözükmektedir.

- IFA değerlendirme aşamasında deneyimli personel gereksinimi ve test kitinin 5 parametre fiyat ile alınabilecek olması dezavantaj oluşturmaktadır. ELISA için tek bir parametrenin bağımsız çalışabilmesi maliyet verimliliğini artırmaktadır ve standart laboratuvar elemanı yeterli olabilmektedir.
- Bu değerlendirmeler ışığında her iki testin tercih edilebilirliği; testlerin tanı güvenilirliğinin yanı sıra, laboratuvarların teknik ve personel donanımı ve mali olanaklar göz önüne alınarak değişebilir.

ÖZET

Amaç: EBV enfeksiyonunun serolojik tanısı birden fazla antikor yanıtının değerlendirilip yorumlanmasıyla yapılmaktadır. Bu çalışmada VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG antikorlarının IFA ve ELISA tanı metodlarıyla çalışılması ve bu metodların tanı değerlerinin karşılaştırılması amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya Enfeksiyöz Mononükleoz şüpheli 100 hastanın serum örnekleri dahil edildi. IFA referans metod olarak kabul edildi ve bu doğrultuda örnekler, EBV enfeksiyonu tanı standartları göz önüne alınarak; Seronegatif, Akut enfeksiyon, Yeni geçirilmiş enfeksiyon ve Eski enfeksiyon gruplarına ayrıştırıldı. ELISA metodu ile aynı standart kriterler doğrultusunda oluşturulan grupların bu IFA grupları ile uyumu araştırıldı. Ayrıca VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG antikorları her iki test bazında ayrı ayrı değerlendirilerek ELISA metodu için duyarlılık ve özgüllük oranları belirlendi. IFA metodu ile ayrıca VCA IgG avidite testi çalışıldı ve enfeksiyon dönemleri ile ilişkisi irdelendi.

Bulgular: ELISA metodunun IFA metodu ile uyumu Seronegatiflik, Akut enfeksiyon, Yeni geçirilmiş enfeksiyon ve Eski enfeksiyon için sırasıyla %41, 100, 14,7 ve 74,5 olarak bulundu. Tek bir antikor bazında IFA referans testine göre ELISA metodu değerlendirdiğinde, VCA IgM testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %90,8, VCA IgG'nin duyarlılığı ve özgüllüğü %61,5 ve %53, EBNA IgG'nin ise %78,7 ve %81,1 şeklinde bulundu. IFA metodu ile belirlenen VCA IgG avitidesinin enfeksiyon ilerlemesiyle genel olarak arttığı gözlemlendi.

Sonuç: Her iki testin; Seronegatif, Yeni geçirilmiş enfeksiyon ve Eski enfeksiyon belirleme oranlarında farklılık göze çarpmaktadır. ELISA VCA IgG testi IFA referans teste göre yetersiz performans sergilemiştir. Her iki testin tercih edilebilirliği; testlerin tanı güvenilirliğinin yanı sıra, laboratuvarların teknik ve personel donanımı ve mali olanaklar göz önüne alınarak değişebilir.

Anahtar Kelimeler: Epstein-Barr virus, İndirekt Flöresan Yöntem, ELISA

ABSTRACT

Objective: The serologic diagnosis of EBV infection is made by evaluating and interpreting via more than one antibody reply. In this study, it is aimed to be studied of VCA IgM and EBNA IgG antibodies by IFA and ELISA diagnosis methods and to be evaluated of these methods' diagnosis values.

Materials and Methods: 100 patients' serum samples that suspicious of infectious mononucleosis were included to the study. IFA was accepted as the reference method. By this method, considering with diagnosis standards of EBV infections, samples were decomposed to seronegative, acute infection, new afflicted infection and ex-infection groups. The harmony of IFA groups with the groups those were formed by the same criteria with ELISA method was researched. Also, VCA IgM, VCA IgG and EBNA IgG antibodies were evaluated according to both tests and their sensitivity and specificity rates were determinate for ELISA method. Also, VCA IgG avidite test was studied by IFA method and the relationship with the infection periods was researched.

Results: The rates of harmony between ELISA method and IFA method for seronegative acute infection, new afflicted infection and ex-infection were found; %41, 100, 14,7, 74,5 respectively. When the ELISA method was evaluated according to IFA reference test in one antibody base, the sensitivity of VCA IgM test was %100, the specificity was %90,8, the sensitivity and specificity of VCA IgG were %61,5 and %53, EBNA IgG's results were %78,7 and %81,1. The VCA IgG avidite that was determined by IFA method rose generally.

Conclusion: There was a difference in determination rates of seronegative, new afflicted infection and ex-infection of both tests. ELISA VCA IgG test had an insufficient performance according to IFA reference test. The performance of both tests can change by some factors such as technique and personnel rigging of the laboratory and financial possibilities.

Key words: Epstein-Barr virus, Indirect Fluorescence Assay, ELISA

KAYNAKLAR

1. Murray PR, Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. Medical Microbiology , 5th Edition. p. 553-558
2. Barozzi P, Potenza L, Riva G, Vallerini D, Quadrelli C, Bosco R. B cells and herpesviruses: a model of lymphoproliferation. *Autoimmun Rev.* 2007 Dec;7(2):132-6.
3. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964;15: 702-703.
4. Epstein MA. Historical background. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356: 413-20,
5. Epstein MA, Achong BG. Pathogenesis of infectious mononucleosis. *Lancet* 1977; 17;2(8051):1270-3
6. Ustaçelebi, Ş. (Ed.) Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş KitabeviLtd. Şti., Ankara,1999.
7. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004;4(10):757-68
8. Porter DD, Wimberly I, Benyesh-Melnick M. Prevalence of antibodies to EB virus and other herpesviruses. *JAMA* 1969 Jun 2;208(9):1675-9.
9. Yenen OŞ, Mete Z. EBV spesifik serolojisi üzerine bir çalışma. *İnfeksiyon derg.* 1988;2(2):233
10. Zadeh ZR, Makhdumi K, Lak SS. Epstein-Barr viral infection in renal allograft recipients: a single center experience. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2006;17(3):351-4.
11. Yao QY, Croom-Carter DS, Tierney RJ, Habeshaw G, Wilde JT, Hill FG et al. Epidemiology of infection with Epstein-Barr virus types 1 and 2: lessons from the study of a T-cell-immunocompromised hemophilic cohort. *J Virol.* 1998;72(5):4352-63.
12. Rickinson A. Epstein Barr virus Mini Review. *Virus Research* 2002; 82 :109–113
13. Tamer D “Epstein-Barr Virüs (EBV)” Genomunun Periferik Kandan PCR ve Real-Time PCR İle Gösterilmesi Ve Tiplendirilmesi (Yüksek Lisans Tezi). Ankara: A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü,2006
14. Medina-Palazon C, Gruffat H, Mure F, Filhol O, Vingtdoux-Didier V, Drobecq H et al. Protein kinase CK2 phosphorylation of EB2 regulates its function in the production of Epstein-Barr virus infectious viral particles. *J Virol.* 2007;81(21):11850-60.
15. Lin JC, Choi EI, Pagano JS. Qualitative and quantitative analyses of Epstein-Barr virus early antigen diffuse component by western blotting enzyme-linked immunosorbent assay with a monoclonal antibody. *J Virol.* 1985;53(3):793-9.
16. Khyatti M, Patel PC, Stefanescu I, Menezes J. Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein gp350 expressed on transfected cells resistant to natural killer cell activity serves as a target antigen for EBV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Virol.* 1991;65(2):996-1001
17. Ruf IK, Moghaddam A, Wang F, Sample J. Mechanisms that regulate Epstein-Barr virus EBNA-1 gene transcription during restricted latency are conserved among lymphocryptoviruses of Old World primates. *J Virol.* 1999;73(3):1980-9
18. Longan L, Longnecker R. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A has no growth-altering effects when expressed in differentiating epithelia. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 9):2245-52.
19. <http://www.uq.edu.au/vdu/VDUEBV.htm#Intro>
20. Abbot SD, Rowe M, Cadwallader K, Ricksten A, Gordon J, Wang F et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J Virol.* 1990 May;64(5):2126-34.
21. Cohen JI, Wang F, Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 mutations define essential domains for transformation and transactivation. *J Virol.* 1991;65(5):2545-54

22. Robertson E, Kieff E. Reducing the complexity of the transforming Epstein-Barr virus genome to 64 kilobase pairs. *J Virol.* 1995;69(2):983-93
23. Kaiser C, Laux G, Eick D, Jochner N, Bornkamm GW, Kempkes B. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol.* 1999;73(5):4481-4.
24. Robertson KD, Ambinder RF. Mapping promoter regions that are hypersensitive to methylation-mediated inhibition of transcription: application of the methylation cassette assay to the Epstein Barr virus major latency promoter. *J Virol.* 1997;71(9):6445-54.
25. Tomkinson B, Robertson E, Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol.* 1993;67(4):2014-25
26. Rickinson AB, Moss DJ. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:405-31
27. Radkov SA, Bain M, Farrell PJ, West M, Rowe M, Allday MJ. Epstein-Barr virus EBNA3C represses Cp, the major promoter for EBNA expression, but has no effect on the promoter of the cell gene CD21. *J Virol.* 1997 Nov;71(11):8552-62.
28. Mannick JB, Cohen JI, Birkenbach M, Marchini A, Kieff E. The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol.* 1991;65(12):6826-37.
29. Longnecker R, Miller CL. Regulation of Epstein-Barr virus latency by latent membrane protein 2. *Trends Microbiol.* 1996;4(1):38-42.
30. Middeldorp JM, Brink AA, Van den Brule AJ, Meijer CJ. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003;45(1):1-36.
31. Birkenbach M, Josefson K, Yalamanchili R, Lenoir G, Kieff E. Epstein-Barr virus-induced genes: first lymphocyte-specific G protein-coupled peptide receptors. *J Virol.* 1993;67(4):2209-20.
32. Martin JM, Veis D, Korsmeyer SJ, Sugden B. Latent membrane protein of Epstein-Barr virus induces cellular phenotypes independently of expression of Bcl-2. *J Virol.* 1993;67(9):5269-78.
33. Miller WE, Edwards RH, Walling DM, Raab-Traub N. Sequence variation in the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J Gen Virol.* 1994;75 (Pt 10):2729-40.
34. Glickman JN, Howe JG, Steitz JA. Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol.* 1988;62(3):902-11
35. Toczyski DP, Matera AG, Ward DC, Steitz JA. The Epstein-Barr virus (EBV) small RNA EBER1 binds and relocalizes ribosomal protein L22 in EBV-infected human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 12;91(8):3463-7.
36. Sixbey JW, Shirley P, Chesney PJ, Buntin DM, Resnick L. Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus. *Lancet.* 1989 30;2(8666):761-5.
37. Faulkner GC, Burrows SR, Khanna R, Moss DJ, Bird AG, Crawford DH. X-Linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus. *J Virol.* 1999;73(2):1555-64.
38. Tierney RJ, Steven N, Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J Virol.* 1994;68(11):7374-85.

39. Crawford DH. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus Review. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001 29;356(1408):461-73.
40. Duca KA, Shapiro M, Delgado-Eckert E, Hadinoto V, Jarrah AS, Laubenbacher R et al. A virtual look at Epstein-Barr virus infection: biological interpretations. *PLoS Pathog.* 2007 Oct 19;3(10):1388-400.
41. Mishra B, Mohan B, Ratho RK. Heterophile antibody positive infectious mononucleosis. *Indian J Pediatr.* 2004 Jan;71(1):15-8.
42. Thomas JA, Hotchin NA, Allday MJ, Amlot P, Rose M, Yacoub M, Crawford DH. Immunohistology of Epstein-Barr virus-associated antigens in B cell disorders from immunocompromised individuals. *Transplantation.* 1990;49(5):944-53
43. Haque T, Thomas JA, Falk KI, Parratt R, Hunt BJ, Yacoub M, et al. Transmission of donor Epstein-Barr virus (EBV) in transplanted organs causes lymphoproliferative disease in EBV-seronegative recipients. *J Gen Virol.* 1996 Jun;77 (Pt 6):1169-72.
44. Miyashita EM, Yang B, Lam KM, Crawford DH, Thorley-Lawson DA. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell.* 1995;80(4):593-601.
45. MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:117-39
46. Thorley-Lawson DA, Babcock GJ. A model for persistent infection with Epstein-Barr virus: the stealth virus of human B cells. *Life Sci.* 1999;65(14):1433-53.
47. Miyashita EM, Yang B, Babcock GJ, Thorley-Lawson DA. Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol.* 1997 Jul;71(7):4882-91.
48. Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg.* 1958;46(197):218-23.
49. Gutiérrez MI, Bhatia K, Barriga F, Diez B, Muriel FS, de Andreas ML et al. Molecular epidemiology of Burkitt's lymphoma from South America: differences in breakpoint location and Epstein-Barr virus association from tumors in other world regions. *Blood.* 1992 Jun 15;79(12):3261-6.
50. Neri A, Chang CC, Lombardi L, Salina M, Corradini P, Maiolo AT et al. B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF-kappa B p50. *Cell.* 1991 Dec 20;67(6):1075-87.
51. Rowe DT, Rowe M, Evan GI, Wallace LE, Farrell PJ, Rickinson AB. Restricted expression of EBV latent genes and T-lymphocyte-detected membrane antigen in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J.* 1986;5(10):2599-607.
52. Wilson JB, Bell JL, Levine AJ. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *EMBO J.* 1996 17;15(12):3117-26.
53. Komano J, Takada K. Role of *bcl-2* in Epstein-Barr virus-induced malignant conversion of Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol.* 2001;75(3):1561-4.
54. Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer.* 1976 15;17(1):47-56.
55. Hopwood P, Crawford DH. The role of EBV in post-transplant malignancies: a review. *J Clin Pathol.* 2000;53(4):248-54.
56. Nonoyama M, Huang CH, Pagano JS, Klein G, Singh S. DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973;70(11):3265-8.

57. Suzuki T, Oboshi S, Ishihara N, Emura I, Ohnishi Y, Sairenji T et al. Detection of Epstein-Barr virus in biopsied malignant lymphoma cell and its continuous culture. *Gann*. 1978 Apr;69(2):213-21.
58. Raab-Traub N, Flynn K, Pearson G, Huang A, Levine P, Lanier A, Pagano J. The differentiated form of nasopharyngeal carcinoma contains Epstein-Barr virus DNA. *Int J Cancer*. 1987 Jan 15;39(1):25-9.
59. Nicholson LJ, Hopwood P, Johannessen I, Salisbury JR, Codd J, Thorley-Lawson D et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein does not inhibit differentiation and induces tumorigenicity of human epithelial cells. *Oncogene*. 1997 Jul 17;15(3):275-83.
60. Grinstein S, Preciado MV, Gattuso P, Chabay PA, Warren WH, De Matteo E. Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Res*. 2002 Sep 1;62(17):4876-8.
61. Infectious mononucleosis and related syndromes. Evans AS. *Am J Med Sci*. 1978 Nov-Dec;276(3):325-39.
62. Henle W, Henle G. Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals. *Cancer Res*. 1981 Nov;41(11 Pt 1):4222-5.
63. Hodge AM. Simultaneous detection of heterophil-positive and heterophil-negative mononucleosis-like syndrome in the routine laboratory. *Am Clin Lab*. 1999 Jul;18(6):8-9.
64. Blake JM, Edwards JM, Fletcher W, McSwiggan DA, Pereira MS. Measurement of heterophil antibody and antibodies to EB viral capsid antigen IgG and IgM in suspected cases of infectious mononucleosis. *J Clin Pathol*. 1976 Sep;29(9):841-7.
65. Kutlu SS, Çelikbaş AK. İnfeksiyon Hastalıklarında IgG Avidite Testinin Değeri. *İnfeksiyon Derg*. 2003;17(3):365-368
66. Strasek K, Marin J. Epstein-Barr virus infections - Avidity test for IgG antibodies. *Zdrav Vestin* 2001; 70: 321-3
67. Ory F, Antonaya J, Fernández MV, Echevarría JM. Application of low-avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol*. 1993 Jun;31(6):1669-71.
68. Coons AH. Labeling Techniques In The Diagnosis Of Viral Diseases. *Bacteriol Rev*. 1964 Dec;28:397-9.
69. Henle G, Henle W. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol*. 1966 Mar;91(3):1248-56.
70. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*. 2005 Dec;51(12):2415-8.
71. Färber I, Hinderer W, Rothe M, Lang D, Sonneborn HH, Wutzler P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection by novel ELISAs based on recombinant capsid antigens p23 and p18.
72. Ruf IK, Moghaddam A, Wang F, Sample J. Mechanisms that regulate Epstein-Barr virus EBNA-1 gene transcription during restricted latency are conserved among lymphocryptoviruses of Old World primates. *J Virol*. 1999 Mar;73(3):1980-9.
73. Adams A. Concentration of Epstein-Barr virus from cell culture fluids with polyethylene glycol. *J Gen Virol*. 1973 Sep;20(3):391-4.
74. Akyol G, Sezer C, Poyraz A, Ataoğlu Ö, Çelik B, Uluoğlu Ö, Edalı N. Epstein - Barr virüs DNA'sının İn-Situ hibridizasyon yöntemi ile saptanması: Nazofarengial Karsinoma, Burkitt ve Non- Burkitt lenfomalar. *K.B.B. ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi*; 5 : 68 - 73,1997

75. Hamilton-Dutoit SJ, Delecluse HJ, Raphael M, Lenoir G, Pallesen G. Detection of Epstein-Barr virus genomes in AIDS related lymphomas: sensitivity and specificity of in situ hybridisation compared with Southern blotting. *J Clin Pathol.* 1991 Aug;44(8):676-80.
76. Diehl V, Henle G, Henle W, Kohn G. Demonstration of a herpes group virus in cultures of peripheral leukocytes from patients with infectious mononucleosis. *J Virol.* 1968 Jul;2(7):663-9.
77. www.evaluations-standards.org.uk
78. Obel N, Høier-Madsen M, Kangro H. Serological and clinical findings in patients with serological evidence of reactivated Epstein-Barr virus infection. *APMIS.* 1996 Jun;104(6):424-8.
79. Hess RD. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. *J Clin Microbiol.* 2004 Aug;42(8):3381-7.
80. G.D. Mithoe, T. Souilljee, E. Boelens, J. Drenth, H. P. Feikens, C.A. Benne. Comparison of five Epstein Barr virus (EBV) enzyme immunoassays, an automated chemiluminescence assay and immunoblot assay with the EBV immunofluorescence assay as a reference. *Laboratory for Infectious Diseases, Groningen, The Netherlands.* 2007
81. Gärtner BC, Hess RD, Bandt D, Kruse A, Rethwilm A, Roemer K et al. Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jan;10(1):78-82.
82. Yasemin Genç. Tanı Testi Çalışmalarında Metodolojik Standartların Kullanılması. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 56, Sayı 4, 2003*
83. Tsang RK, Vlantis AC, Ho RW, Tam JS, To KF, van Hasselt CA. Sensitivity and specificity of Epstein-Barr virus IGA titer in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: a three-year institutional review. *Head Neck.* 2004 Jul;26(7):598-602.
84. Xu JW, Ahmad A, Menezes J, Prasad U. Clinical relevance of serum immunoglobulin A antibodies to Epstein-Barr virus envelope glycoprotein gp350 in nasopharyngeal carcinoma patients. *J Clin Microbiol.* 1998 Dec;36(12):3740.
85. Fidan I, Yüksel S, İmir T. Değişik Yaş Gruplarında Epstein-Barr Virus Antikorlarının Araştırılması. *İnfeksiyon Derg.* 2005; 19 (4): 453-456
86. Debyser Z, Reynders M, Goubau P, Desmyter J. Comparative evaluation of three ELISA techniques and an indirect immunofluorescence assay for the serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *Clin Diagn Virol.* 1997 May;8(1):71-81.
87. Fung MK, Mordarski KT, Bader SA, Gronowski AM. Evaluation of the Wampole Laboratories ELISA-based assay for Epstein-Barr virus serology. *Clin Chim Acta.* 2002 May 7;319(1):43-8.
88. Figueira-Silva CM, Pereira FE. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004 Sep-Oct;37(5):409-12. Epub 2004 Sep 3.
89. Rea TD, Ashley RL, Russo JE, Buchwald DS. A systematic study of Epstein-Barr virus serologic assays following acute infection. *Am J Clin Pathol.* 2002 Jan;117(1):156-61.
90. Robertson P, Beynon S, Whybin R, Brennan C, Vollmer-Conna U, Hickie I et al. Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection. *J Med Virol.* 2003 Aug;70(4):617-23.
91. Andersson A, Vetter V, Kreutzer L, Bauer G. Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr virus serology. *J Med Virol.* 1994 Jul;43(3):238-44.

92. Pumannová M, Rezbová M, Svecová M, Hrbáčková H, Novotná M, Ochočná J et al. A comparison of the detection of IgM antibodies against the viral capsid antigen (VCA) of EBV (Epstein-Barr virus) in various groups of patients, using indirect immunofluorescence, indirect ELISA and reverse ELISA. Study of the diagnostic efficacy of the anti-VCA EBV IgM ELISA-VIDITEST kit. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2004 Aug;10(4):186-90.
93. Chan KH, Luo RX, Chen HL, Ng MH, Seto WH, Peiris JS. Development and evaluation of an Epstein-Barr virus (EBV) immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay based on the 18-kilodalton matrix protein for diagnosis of primary EBV infection. *J Clin Microbiol.* 1998 Nov;36(11):3359-61.
94. Ozkan A, Kilic SS, Kalkan A, Ozden M, Demirdag K, Ozdarendeli A. Seropositivity of Epstein-Barr virus in Eastern Anatolian Region of Turkey. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2003 Mar;21(1):49-53.
95. Martínez Zapico R, Sobejano L, Llamazares I, Ladrón de Guevara C. Evaluation of IgG-IgM antibodies against the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) using ELISA. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1992 May;10(5):281-3.

TEŞEKKÜR

Tıp fakültesinden mezun olarak bayrağını taşıma şerefine nail olduğum bu mukaddes mesleğin en önemli basamağından çıkarken; asistanlığım süresince maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen ve tecrübeleri ile her daim ışık tutan tez hocam Prof.Dr. Mahmut Baykan'a, gerek mesleki gerekse hayata dair pek çok konuda öğrencisi olmaktan kıvanç duyduğum anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Bülent Baysal'a, bilgi ve deneyimleri ile mesleki birikimime değerli katkıları olan Prof. Dr. İnci Tuncer, Prof. Dr. Duygu Fındık'a, başta tez çalışmam olmak üzere hertürlü konuda yardımlarından ve rehberliğinden faydalandığım Yrd. Doç. Dr. Mehmet Özdemir'e, gösterdiği alaka ve yardımlarından dolayı Uzm.Dr. Uğur Arslan'a, Nükleer Tıp rotasyonum sırasındaki emek ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Oktay Sarı ve Yrd. Doç. Dr. Güngör Taştekin'e, duygu ve kader ortaklığı yaptığım asistan arkadaşlarıma, mesaimi paylaştığım tüm mikrobiyoloji çalışanlarına, emeklerini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim anneme ve babama ve tabii ki hayatın daha pekçok gül ve dikenlerini bereber paylaşacağımız sevgili eşime teşekkür ederim.