



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

EPSTEIN-BARR VİRÜS ENFEKSİYONLARININ TANISINDA
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNUN YERİ

Dr. Sanem KARADAĞ GEÇGEL

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2011



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

EPSTEIN-BARR VİRÜS ENFEKSİYONLARININ TANISINDA
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNUN YERİ

Dr. Sanem KARADAĞ GEÇGEL

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Güher GÖRAL

BURSA-2011

İÇİNDEKİLER

Türkçe Özet	ii
İngilizce Özet	iv
Giriş	1
Gereç ve Yöntem	30
Bulgular	43
Tartışma ve Sonuç	55
Kaynaklar	68
Ekler	74
EK-1: Destekleyen Kuruluş	74
EK-2: Aydınlatılmış Onam Formu	75
Teşekkür	79
Özgeçmiş	80

ÖZET

Bu çalışma Epstein-Barr Virus (EBV) enfeksiyonlarının tanı ve takibinde EBV-DNA'nın önemini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Çalışmamızda 62 erişkin renal transplant ve 37 çocuk onkoloji hastasından tedavi öncesinde bir, tedavi sonrasında üç olmak üzere toplam dört kez; immünsüprese olmayan çocuk ve erişkinlerden oluşan 50 kontrol hastasından bir kez alınan serum örneklerinde Paul-Bunnell ve immünblot ile EBV serolojisi belirlendi. ELISA ile Viral Kapsid Antijen (VCA)-IgG avidite ve Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ile EBV-DNA testleri çalışıldı.

Renal transplant grubundaki hastaların üçünde (%4,8) EBV-DNA pozitif bulundu. Bu hastalarda CD4/CD8 oranları transplantasyon öncesi değerlerine göre transplantasyon sonrası birinci hafta ve üçüncü ayda anlamlı olarak düşük bulunmakla birlikte EBV enfeksiyonu ile ilişkili organ reddi gelişmedi.

Çocuk onkoloji grubundaki hastaların üçünde (%8,1) EBV-DNA pozitif saptandı. EBV-DNA pozitifliği Hodgkin lenfoma tanısıyla takip edilen iki çocukta hastalık, diğerinde ise reaktivasyon ile ilişkilendirildi.

Kontrol grubunda yer alan hastaların 10'unda (%20) EBV-DNA pozitif bulundu. İmmünblot sonuçları akut enfeksiyon serolojisi ile uyumlu olan erişkin kontrol hastalarında EBV-DNA pozitifliği, Paul-Bunnell pozitifliği ve düşük avidite sonuçları arasındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı idi. Çocuk kontrol grubunda ise bu serolojik profil ile sadece düşük avidite arasındaki uyum anlamlı bulundu.

Çalışmamız renal transplant hastalarında EBV reaktivasyonunun saptanması; çocuk onkoloji hastalarında EBV ilişkili kanserlerin tanısı ve prognozunun değerlendirilmesi; immünkompetan erişkin ve çocuk hastalarda akut enfeksiyonun tanı ve takibinde Paul-Bunnell ve spesifik antikor testleri ile

birlikte doğrulama amacıyla VCA-IgG avidite ve EBV-DNA testlerinin yararını ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: EBV, Paul-Bunnel, İmmünblot, VCA-IgG avidite, RT-PCR.

SUMMARY

In the Diagnosis of Epstein-Barr Virus (EBV) Infections the Importance of Polymerase Chain Reaction (PCR)

The aim of this study was to evaluate the importance of Epstein-Barr Virus (EBV) DNA in the diagnosis and monitoring of EBV infections.

EBV serology was determined from the serum of 62 renal transplant and 37 pediatric oncology patients and 50 non-immunocompromised adult and pediatric controls by using Paul-Bunnell and Immunoblotting tests. Serum specimens were collected four times (once before treatment and three times after treatment) from the renal transplant and pediatric oncology patients, whereas once from the control group. ELISA and Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) tests were used for the evaluation of Viral Capsid Antigen (VCA)-IgG avidity and EBV-DNA respectively.

EBV-DNA was found positive in three (4.8%) of renal transplant patients. In these patients, CD4/CD8 ratios were found significantly lower one week and three months after transplantation comparing with pre-transplantation period but there was no organ rejection associated with EBV infections.

EBV-DNA was found positive in three (8.1%) of pediatric oncology patients. The positivity of EBV-DNA was considered associated with Hodgkin's lymphoma disease in two patients and reactivation in the other patient.

EBV-DNA was found positive in 10 (20%) of the control group. At acute infections, serologic results by immunoblotting were found significantly compatible with Paul-Bunnell, EBV-DNA positivity and low avidity in adult controls but only low avidity were significantly found compatible in pediatric controls.

In this study, the usefulness of EBV-DNA was shown; in determining the reactivation in renal transplant patients; in evaluation of the diagnosis and

prognosis of EBV associated cancers in pediatric oncology patients and the diagnosis and monitoring of acute infections associated with Paul-Bunnell, immunoblotting and VCA-IgG avidity at the adult and pediatric immunocompetant control patients.

Key words: EBV, Paul-Bunnell, Immunoblotting, VCA-IgG avidity, RT-PCR.

GİRİŞ

Epstein-Barr Virüs (EBV), başta enfeksiyöz mononükleoz (EM) olmak üzere Burkitt lenfoma ve nazofarengeal karsinoma gibi malignitelerin de etiolojisinden sorumlu, Herpes grubundan bir virüstür (1). EBV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı atipik lenfositlerin, heterofil antikolların, virüs antijenlerine karşı oluşan spesifik antikolların ve viral DNA'nın saptanması ile mümkündür.

Paul-Bunnell testi hastalığın ilk haftasından itibaren serumda bulunabilen, 2.-3. haftada saptanma olasılığı artan heterofil antikolların gösterilmesinde kullanılan bir aglütinasyon testidir. EM geçiren erişkinlerin %90'ında saptanabilen bu antikolların çocuk yaş grubunda yeterince yükselmemesi ya da geç yükselmesi Paul-Bunnell testinin kullanımında yaşa özgü bir kısıtlılık getirmektedir (2). Günümüzde heterofil antikolların saptanamadığı durumlarda EBV enfeksiyonlarının tanısında EBV spesifik serolojik testler tercih edilmektedir (3).

EBV enfeksiyonlarının tanısında virüsün majör antijenlerine karşı oluşan antikolların gösterilmesi tanıda oldukça yol göstericidir (4). Bu amaçla viral kapsid antijen (VCA), nükleer antijen (EBNA) ve erken antijene (EA) karşı oluşan antikollardan (IgG ve/veya IgM) yararlanılmaktadır. Ancak yeni enfeksiyonların %20-30'unda anti-EA antikollarının saptanamaması ve anti-EBNA antikollarının genellikle konvelesan dönemde ortaya çıkması nedeniyle tanıda bu antikolların araştırılmasının önemi fazla değildir. Buna karşın anti-VCA antikolları olguların %90-94'ünde gösterilmekte ve enfeksiyon döneminin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (5). EBV serolojisinin yorumlanamadığı olgularda EBV-VCA IgG avidite testi, Western blot testi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile tanının doğrulanması yol gösterici olabilmektedir (3, 6, 7).

EBV latent enfeksiyon oluşturan bir virüstür. Ülkemizde yetişkin popülasyonun %80-95'inde EBV seropozitifliği mevcuttur (4, 8). Bu nedenle

transplant alıcıları veya onkoloji hastaları gibi özellikle immünsüpresif hasta gruplarında EBV reaktivasyonunun gösterilmesi önem taşımaktadır (2, 9).

EBV reaktivasyonunda rutin serolojik testler yetersiz kalabilmekte; bu nedenle serumda viral DNA'nın PCR ile saptanması prognozu belirlemek açısından (organın reddi?) yararlı olabilmektedir (3).

Bu çalışma, EBV seropozitifliği saptanan çeşitli hasta gruplarında EBV-DNA (PCR) düzeylerinin EBV enfeksiyonlarının tanı ve takibindeki yerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Tarihçe

Yorgunluk, ateş, farenjit, lenfadenopati, splenomegali ve mononükleer lökositozla karakterize hastalık ilk olarak 1889'da Pfeiffer tarafından glandüler ateş; 1920'de Sprunt-Evans tarafından da EM olarak tanımlanmıştır (10-13). Paul ve Bunnell 1932'de EM olgularının serumlarında koyun eritrositlerini yüksek titrede aglütine eden heterofil antikorların varlığını bildirmişlerdir (14, 15).

İngiliz bir cerrah olan Denis Burkitt, 1950'lerin sonları ve 1960'ların başlarında Afrika'da ilk olarak B hücre lenfomasını tanımlamıştır (16). Lenfomanın mevsimsel ve coğrafi dağılımının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda Afrikalı çocuklarda Burkitt lenfoma insidansının yüksek olduğu tespit edilmiş fakat hastalığın enfeksiyöz ve çevresel etiyojisi belirlenememiştir (17, 18). Anthony Epstein ile arkadaşları Yvonne Barr ve Bert Achong 1964'lerin sonlarında Burkitt lenfomalı hastaların lenfoma hücre kültürlerinde herpesvirüs partiküllerini elektron mikroskobu ile göstermişler; daha sonra bu bilgi Lancet'te yayınlanmış ve virüse EBV ismi verilmiştir (16). EBV'nin EM'nin etiyojik ajanı olduğu 1968 yılında; nazofarenks kanserli hastaların dokularında EBV-DNA'sının varlığı 1970 yılında; EBV'nin AIDS'li hastalarda oral saçlı hücreli lökoplaki ve non-Hodgkin lenfoma ile ilişkili olduğu ise 1980'lerde gösterilmiştir (16, 19). Seroepidemiyojik ve moleküler çalışmalar EBV'nin aynı zamanda gastrik karsinom, oral skuamöz hücreli

kanserler, diğer lenfoid ve epitelyal tümörlerle de ilişkili olduğunu göstermiştir (20, 21).

Sınıflandırma

EBV Herpesviridae ailesinin Gammaherpesvirinae alt ailesinde bulunan Lenfokriptovirüs genusunun bir üyesidir (22).

Toplumda yaygın olarak görülen değişik hastalıkların etiyolojisinde yer alan herpesvirüsler, nükleusta replike olan zarflı DNA virüsleridir. Tüm omurgalıları enfekte edebilme yeteneğine sahiptir (23).

Herpesvirüsler doku tropizmi, patojenite ve kültür koşullarındaki davranışlarına göre üç alt aileye ayrılırlar:

Alfaherpesvirüsler (sitolitik): Nörotropik, replikasyon döngüsü hızlı, konak ve hücre yelpazesi geniş olan virüslerdir. Oral herpes enfeksiyonu etkeni Herpes simplex virus tip-1 (HSV-1), genital herpes enfeksiyonu etkeni HSV-2, suçiçeği ve zona etkeni Varicella-Zoster Virus (VZV) bu grupta yer almaktadır.

Betaherpesvirüsler (sitomegalik): Genom büyüklüğü ve yapısı farklı, replikasyon döngüsü daha yavaş, hücre yelpazesi daha dar (glandüler hücreler ve/veya lenfoid doku hücreleri) olan virüslerdir. Egzantem subitum etkeni Roseola virüs ve Cytomegalovirus (CMV) bu grubun üyeleridir.

Gammaherpesvirüsler (lenfoproliferatif): Alfaherpesvirüslere göre nispeten daha yavaş replike olurlar; lenfoid doku hücrelerini tutarlar. Kaposi Sarkomu etkeni Human Herpesvirus tip-8 (HHV-8), EM ve lenfoma etkeni EBV bu gruba ait örnekler arasında gösterilebilir (Tablo-1) (24).

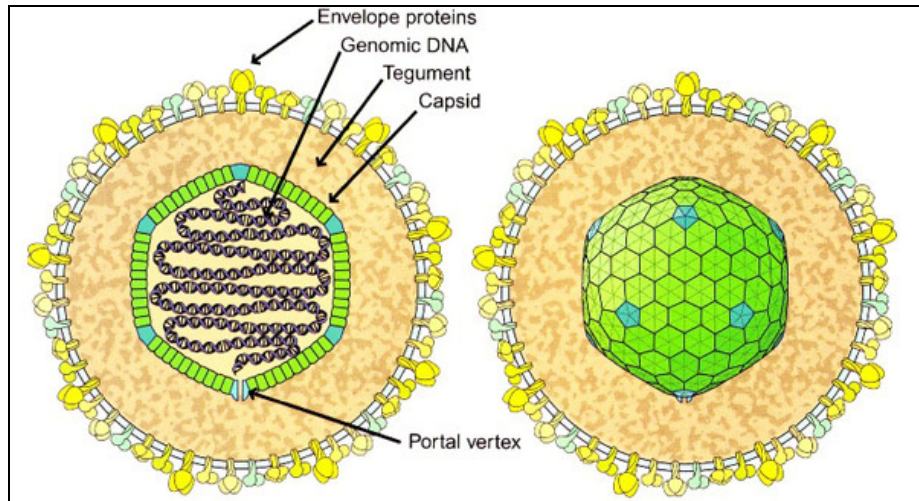
Tablo-1: Herpesvirüslerin sınıflandırılması (24).

ALTFAMİLYA	BİYOLOJİK ÖZELLİKLER			GENUS	ÖRNEKLER	
	Gelişim	Sitopatoloji	Latent Enfeksiyonlar		Resmi İsim	Genel İsim
Alphaherpesvirinae	Kısa	Sitolitik	Nöronlar	Simpleksvirüs	HHV-1, HHV-2	HSV-1, HSV-2
				Varisellavirüs	HHV-3	VZV
Betaherpesvirinae	Uzun	Sitomegalik	Böbrekler	Sitomegalovirüs	HHV-5	CMV
		Lenfo-proliferatif	Lenfooid Doku	Roseolavirüs	HHV-6, HHV-7	HHV-6, HHV-7
Gammaherpesvirinae	Değişken	Lenfo-proliferatif	Lenfooid Doku	Lenfokriptovirüs	HHV-4	EBV
				Radinovirüs	HHV-8	KS

HHV: Human herpesvirus, **CMV:** Cytomegalovirus, **HSV:** Herpes simplex virus, **EBV:** Epstein-Barr virus, **VZV:** Varicella-Zoster virus, **KS:** Kaposi sarkomu

EBV Yapısı ve Özellikleri

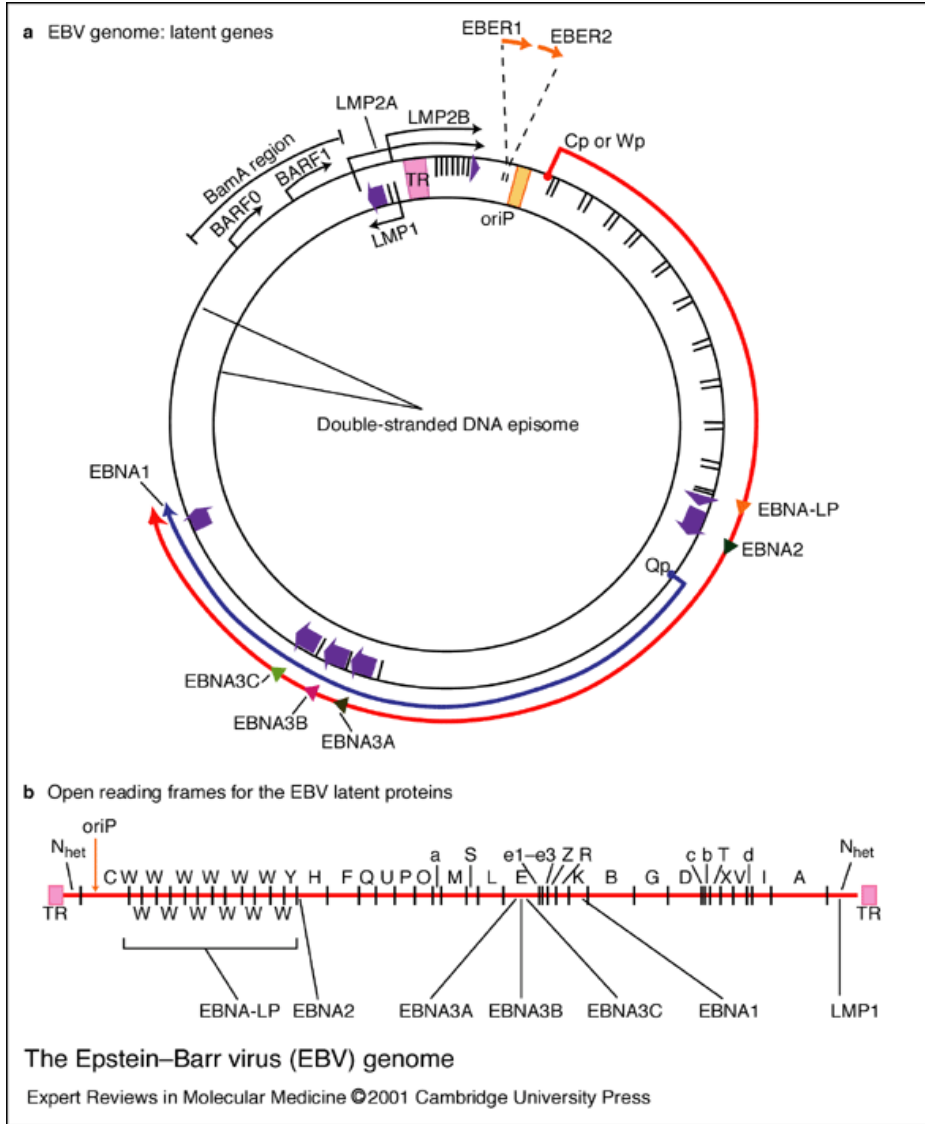
Herpesvirüslerin genel özelliklerine sahip olan EBV çift-sarmallı DNA virüsüdür. Yaklaşık 172.000 baz çifti içeren viral genom olgun viriyonda lineer; latent enfekte B hücrelerinde ise sirküler/epizomal yapıda bulunur. İkozapentahedral simetrik kapsidi 162 kapsomerden oluşur. Lipid zarfı viral glikoproteinleri içerir, zarf ile nükleokapsid arasında amorf proteinöz tegument yer alır (Şekil-1).



Şekil-1: EBV yapısı (25).

Konak özgüllüğü çok sınırlı olan EBV, *in-vitro* olarak insan ve bazı primatların B lenfosit ve nazofarenks epitel hücrelerinde üretilebilir. Hücre kültürlerinde sitopatik etki oluşturmaz. EBV genomu taşıyan enfekte hücreler devamlı bölünme özelliği kazanırlar. Böyle hücrelere 'transforme' veya 'immortal' hücre adı verilir (1, 26).

EBV genomunun tümü ve pek çok RNA ürünü tanımlanmıştır. Genom bölgeleri, genomun BamHI-restriksiyon endonükleaz haritasındaki pozisyonuna bağlı olarak belirlenmiş ve BamHI parçalarının boyutuna göre isimlendirilmiştir; BamA en uzun genom bölgesi olup, küçük parçalar küçük harflerle gösterilmiştir. Genom yaklaşık 100 tane açık okuma bölgesi (open reading frame; ORF) içerir. EBV iki tekrarlayan terminal bölge arasında, bir seri birbirine benzemeyen sekansların internal tekrarlarla ard arda dizildiği bir genoma sahiptir. Çembersel yapılaşma sırasında iki terminal bölge birleşmektedir (Şekil-2).



Şekil-2: EBV genom yapısı (27).

EBV ile enfekte hücrelerde viral genom ekstrakromozomal epizom olarak kalmaktadır. Viral DNA'nın konağın kromozomal DNA'sına entegrasyonu başlıca lenfoblastoid hücre dizilerinde gösterilmiştir (21, 28). Genomda 70 civarında protein kodlanır; tümünün fonksiyonu kesin olarak belirlenememiştir. DNA'da çeşitli tekrar bölgeleri nedeniyle proteinlerin büyüklüğü virüsten virüse değişkenlik gösterir (21).

EBV Antijenleri

Eksprese oldukları viral siklus fazına göre EBV antijenleri iki gruba ayrılır.

1. Latent faz antijenleri: Virüsün latent enfeksiyon oluşturduğu B hücrelerinde sentezlenen proteinlerdir. Epstein-Barr nükleer antijen-1 (EBNA-1), EBNA-2, EBNA-3A, 3B, 3C, EBNA-lider protein (EBNA-LP), latent membran proteinleri (LMP-1, LMP-2), translasyona uğramamış ve poliadenile olmamış küçük RNA molekülleri (EB encoded RNA; EBER-1, EBER-2) ve BamH1-A bölgesi transkriptleri (BARTs) bu grupta bulunur. Bu antijenlerin ekspresyonu, EBV genomunun varlığını gösterir. Değişmeksizin eksprese olan antijen sadece EBNA-1'dir; EBNA-1 viral epizomların devamlılığı için gereklidir. LMP-2 ekspresyonu, reaktivasyonu engeller (Tablo-2) (16).

Tablo-2: EBV latent faz antijenlerinin fonksiyonları (29).

Antijen	Fonksiyonları
EBNA-1	Epizomal DNA'nın devamlılığı
EBNA-2	B lenfosit transformasyonu, transkripsiyon aktivatörü, viral ve hücrel proteinlerin ekspresyonu
EBNA-3	B lenfosit transformasyonu (3A ve 3C)
EBNA-LP	Transformasyona uğramış hücrelerin uzun süreli devamlılığı
LMP-1	Transformasyon, sinyal yollarının uyarılması
LMP-2	B lenfositlerin EBV aracılı litik enfeksiyonlarının önlenmesi, latensinin devamı
EBER'ler	Apoptozdan kaçış

2. Litik faz antijenleri: Litik enfeksiyon fazında eksprese edilen erken ve geç proteinlerdir.

2.a. Erken başlangıç antijenleri (immediate early; IEA): Litik fazda gen ekspresyonunun indüklenmesinde anahtar rol oynayan, transkripsiyon aktivatörleridir [BZLF-1 geni tarafından kodlanan BamHi Z Epstein-Barr virus

replication activator (ZEBRA) ve BRLF-1 geni tarafından kodlanan R transaktivatör (Rta)] (30, 31).

2.b. Erken antijenler (EA): Yaklaşık 30 erken gen tarafından kodlanan yapısal olmayan proteinlerdir. Çoğunluğunun viral DNA replikasyonunda enzim fonksiyonu vardır. (32). Sentezleri viral DNA replikasyonuna bağımlı değildir. Bu antijenlerin ekspresyonu, prodüktif viral replikasyonun başladığını gösterir.

EA'nın iki komponenti vardır. Yaygın komponent (diffuse; EA-D) enfekte hücrelerin nükleus ve sitoplazmasında; kısıtlı komponent (restricted; EA-R) ise sadece nükleusda bulunur.

EA-D, EA-R'den önce viral replikasyon döngüsünün erken evresinde ortaya çıkar. Akut EM hastalarının serumlarında anti-EA-D antikoru, anti-EA-R antikoruyla daha fazla saptanır. Burkitt lenfomalı hastalarda bunun tersi görülür. Nazofarenks kanserlerinde ise anti-EA-D antikoru daha baskın olmakla birlikte genellikle her iki antikor da saptanabilir. EA'nın belirlenmesi hücrenin litik döngüye girdiğinin ilk göstergesidir (33).

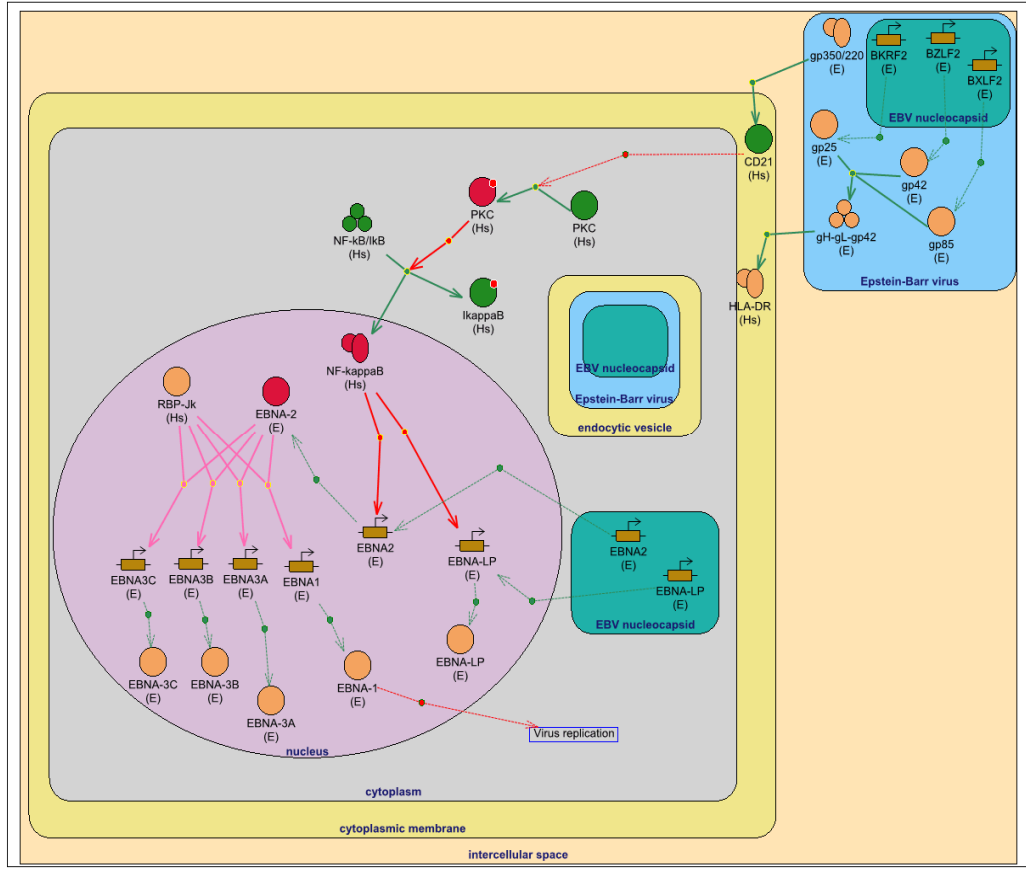
2.c. Geç antijenler: Kapsid ve zarfın yapısal komponentleridir. Özellikle prodüktif viral enfeksiyon sırasında sentezlenirler (23).

2.c.1. Viral kapsid antijen (VCA):

Litik enfeksiyonun geç döneminde sentezlenen, glikolize olmayan yapısal proteinlerdir (32). Çekirdekte viriyonların toplanmasında ve konak hücreden salınmasında rol alırlar (33, 34).

2.c.2. Membran antijenleri:

Enfekte hücre membranında bulunan glikoprotein yapısındaki bu antijenlerin virüsün enfektivitesi ve yayılmasında rolleri vardır. Olgun virüsün zarf yapısında eksprese edilirler, nötralizan antikoru indüklerler (34,35). BRLF-1 geni tarafından kodlanan majör zarf glikoproteinini (gp 350/220), BXL-2 gen ürünü gp85, BZLF-2 gen ürünü gp42 ve BKRF-2 gen ürünü gp25 bu antijenlerden bazılarıdır (36, 37) (Şekil-3).



Şekil-3: EBV enfeksiyonu (38).

EBV Enfeksiyonlarının Mekanizması

EBV, sağlıklı kişilere genellikle tükürük, boğaz salgısı, yakın temas; nadiren kan veya kontamine eşyalar ile bulaşır. Virüs EM olgularının, immün sistemi baskılanmış hastaların ve sağlıklı EBV seropozitif bireylerin oral sekresyonlarında bulunabilir (39). Enfeksiyonun başlangıcında virüs, gp350/220 majör glikoproteini ile B hücre yüzeyinde yer alan C3d kompleman reseptörüne (CR2/CD21) bağlanır. EBV'nin B hücrelerine girişinde gp85, gp42 ve gp25 glikoproteinlerinden oluşan bir kompleks de rol oynar. Bu kompleks EBV ile MHC klas-II molekülleri arasındaki etkileşime aracılık eder (Şekil-3). Virüsün B hücrelerine girişinde MHC klas-II molekülleri ko-reseptör olarak görev alır (40). CD21 ile gp350/220 çapraz bağlanması B hücrelerini aktive eder; ilk olarak lenfosit-spesifik tirozin kinaz aktivasyonu ve

Ca⁺⁺ mobilizasyonu gerçekleşir. Bunu artan mRNA sentezi, hücre adezyonu, blast transformasyonu, yüzey CD23 ekspresyonu ve IL-6 oluşumu takip eder (27).

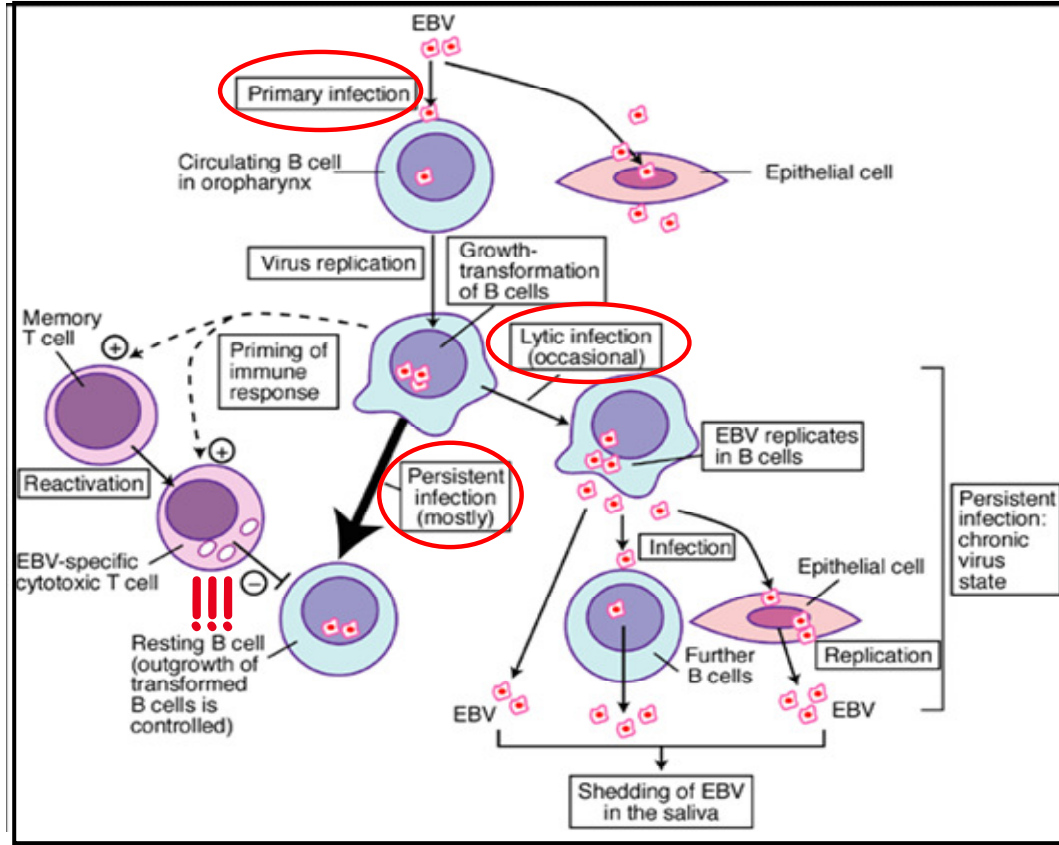
EBV, B lenfositlerinde genellikle latent enfeksiyon oluşturur. Bu dönemde tam bir viral replikasyon olmaz (23). Viral genomun kapsidsiz oluşu nükleusa transferi, Wp promotorundan sirkülasyon ve transkripsiyonu, latent genlerin ekspresyonunu sağlayan kaskatı başlatır. Epstein-Barr nükleer antijen-lider proteini (EBNA-LP) ve EBNA-2 saptanan ilk proteinlerdir. Bunlar hücre döngüsünün erken G1 fazı için gerekli hazırlığı yaparlar. EBV ile enfekte hücreler, yüksek hücre yoğunluğuna ve otokrin sitokin üretimine bağlı olarak proliferasyon olurlar. Takiben daha hızlı gelişen ve otokrin gelişme mekanizmasına daha az bağımlı olan hücrelere dönüşürler. Virüs *in-vivo* enfeksiyonu takiben, hafıza B hücreleri içinde latent enfeksiyon oluşturur ve bu olay latent genlerin sınırlı ekspresyonu ile kendini gösterir (27) (Şekil-3).

Latensiden litik enfeksiyona geçişi sağlayan anahtar transkripsiyonel aktivatör proteinleri kodlayan viral BZLF1 ve BRLF1 genleri, erken genlerin transkripsiyonunu da tetikler. EBV yaşam döngüsünün litik replikasyon fazında birçok viral gen, enzimlerle birlikte nükleotid biyosentezinde; m-RNA oluşturulmasında; viral DNA replikasyonunda; kapsid ve viral zarf proteinlerinin sentezinde görev alır (41-43).

EBV, B hücrelerini ölümsüzleştirebilme yeteneğine de sahiptir. Virüsün tutunmasını takiben hücreler, hücre döngüsüne girmek üzere aktive edilir. Bu sırada bazı viral genler eksprese olur; hücreler devamlı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalma özelliği kazanır. Lineer olan EBV genomu bir halka oluşturur ve replike olur. Viral DNA'nın büyük bir bölümü enfekte hücrelerde sirküler epizomlar halinde varlığını sürdürürken, bir kısmı hücre genomuna entegre olur. EBV ile enfekte olan B hücreleri farklılaşarak immünooglobülin sentezler ve B hücre aktivasyon ürünlerini (CD23/FcεRII) eksprese ederler. İmmortal hücrelerde en az 10 viral gen ürününün eksprese edildiği gösterilmiştir. Ölümsüzleşen B hücre popülasyonunun çok azında (<10%) viral partiküllerin serbest hale geçtiği gösterilmiştir (23, 44).

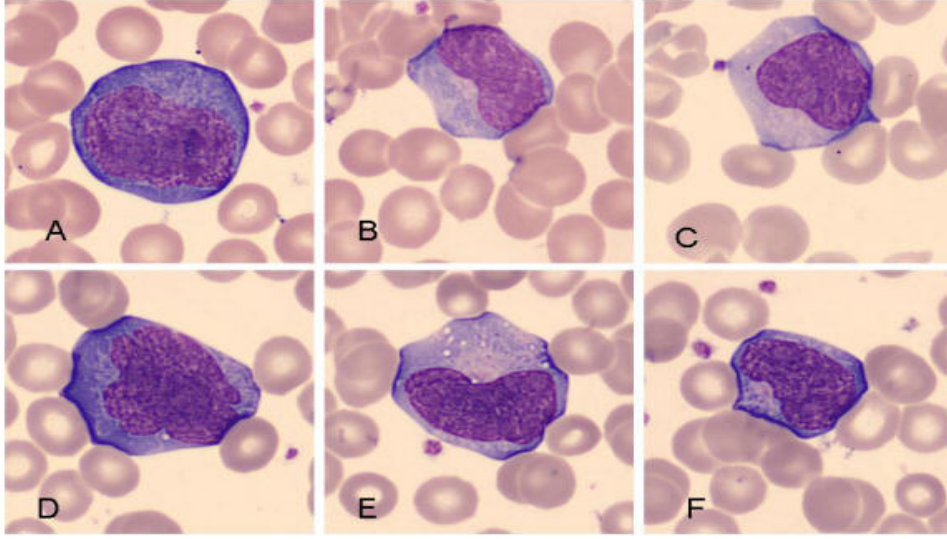
EBV Enfeksiyonlarında Patogenez ve İmmünite

Orofarenks mukozasından vücuda giren virüs önce orofarenks ve tükürük bezi epitel hücrelerine, daha sonra hedef hücreler olan larenksin lenfoid dokularındaki duyarlı B lenfositlere ulaşır. Orofarenkste sürekli olarak çoğalan virüs orofarengeal sıvıya geçer ayrıca diğer B lenfositlerini enfekte eder. EBV ile enfekte B lenfositlerde 30-50 günlük inkübasyon periyodunu takiben viral replikasyon başlar. Enfekte B lenfositler enfeksiyonun lenforetiküler sisteme yayılmasından sorumludur (45). Orofarengeal epitel hücrelerinde EBV taşıyıcılığı ömür boyu sürebilir. Enfekte B lenfositler nadiren litik enfeksiyon sürecine girerken çoğunlukla latent enfeksiyona gider. Latent enfeksiyonda enfekte B hücreleri ve lenfoepitelyal hücrelerde düşük düzeydeki virüs replikasyonu, EBV-spesifik sitotoksik T lenfosit yanıtı ile kontrol edilerek dengede tutulur. Benzer şekilde sitotoksik T lenfosit yanıtları reaktivasyonları da (litik faza geçişi) kontrol eder (32) (Şekil-4).



Şekil-4: EBV enfeksiyon basamakları (27).

Virüs, B lenfositlerinin değişik olgunlaşma basamaklarını yönlendirerek konakta yaşam boyu varlığını sürdürür (46). Viral ve hücrel promoterlerin aktivasyonu sonucu apoptoz baskılanır ve hücre proliferasyonu artar. Virüs tarafından kodlanan RNA'lar, RNA ile aktive protein kinaz aktivasyonunu engelleyerek interferona direnç sağlarken; ayrıca IL-10 salınımını uyararak T lenfosit cevabını azaltır ve proliferasyonu aktive ederler (47). Bundan sonra viral DNA enfekte hücrede plazmid-benzeri sirküler bir forma dönüşür ve B lenfosit bölündükçe bunlar da replike olarak lenfositlere ölümsüzlük özelliği kazandırır. EBNA ve LMP'nin T lenfositlerini uyarması sonucu çok sayıda CD8 T lenfosit gelişir. Bunlar sitoplazmaları vakuollü, lobüle nükleuslu atipik CD8 T lenfositlerdir. Downey hücreleri adı verilen bu hücreler enfeksiyonun 2. haftasından itibaren ortaya çıkarlar (Şekil-5). Hücrel immün yetmezliklerde (örneğin HIV enfeksiyonu), immortal B lenfositler yeterince baskılanamaz ve hastalık kronikleşir; B hücre proliferasyonu sürer ve lenfoproliferatif hastalıkların gelişimi kolaylaşır (45).



Şekil-5: Atipik lenfositler (Downey hücreleri) (45).

Transformasyonu takiben konak hücrelerin çoğalması sonucu latent formda EBV genomu içeren hücrelerin sayısı artar. EBV ile transforme olan B lenfositlerinde viral proteinlerin yanında çoğunlukla IgM olmak üzere IgG, IgA izotipinde immünoglobülinler de sentezlenir (45).

Hümmoral İmmünite

Primer EBV enfeksiyonunda, viral antijenlere karşı immün yanıt uyarılır. Bunun yanı sıra virüsle ilişkili olmayan koyun ve at eritrosit antijenlerine karşı antikor yapımını da uyarılır; bu antikorlara heterofil antikorlar adı verilir. EBV proteinleri ile çapraz reaksiyon oluşturmayan ve genellikle IgM yapısında olan heterofil antikorların, hastalığın patogenezi ve seyirindeki rolleri bilinmemektedir (49). Ayrıca heterofil antikor titresini ile hastalığın şiddeti arasında korelasyon da saptanmamıştır. Bu antikorlar ilk kez Paul ve Bunnell tarafından koyun eritrositlerini aglütine eden antikorlar olarak tanımlanmıştır. EM olgularının yaklaşık %90'ında saptanabilen bu antikorlar, hastalığın herhangi bir evresinde oluşabilir; genellikle hastalığın 2-3. haftasından sonra pozitifleşirler (45).

Enfeksiyon sırasında EBV majör antijenlerine (VCA, EBNA, EA) karşı oluşan spesifik antikorların saptanması, özellikle atipik lenfositoz ve heterofil

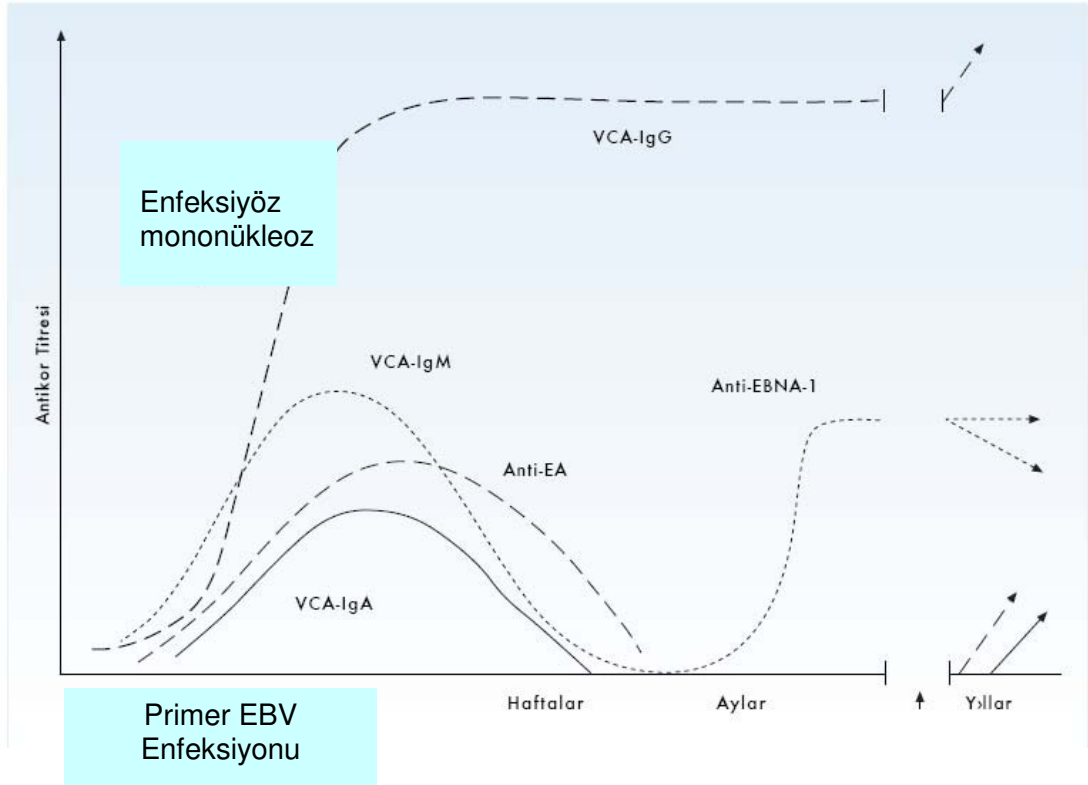
antikorların bulunmadığı ancak EBV enfeksiyonundan kuşku edilen hastaların tanısında önem taşır. EBV serolojisi aynı zamanda akut enfeksiyonu, geçirilmiş enfeksiyondan veya reaktivasyondan ayırmak için de gereklidir (4).

Anti-VCA IgM antikorları, akut enfeksiyon göstergesi olup enfeksiyonun ilk haftasında saptanır ve üç ay boyunca devam eder. Ancak olguların %10'unda 4 aydan daha uzun süren pozitiflikler bildirilmiştir. Anti-VCA IgG antikorları, semptomların başlamasından 4-7 gün sonra ortaya çıkar ve ömür boyu devam eder. Anti-VCA IgA antikorları ise akut enfeksiyonda ve nazofarengeal karsinomada saptanabilir (45).

Anti-EBNA IgG antikorları, akut enfeksiyondan konvelesan döneme geçişin göstergesidir. Bu antikorlar EM olgularının tümünde hastalığın başlangıcından 3-4 hafta sonra yükselir ve ömür boyu devam eder. Heterofil antikor negatif hastalarda anti-EBNA antikorları tanı koydurucudur. Konvelesan dönemde titresini giderek artar. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda anti-EBNA titreleri azalır ve nadiren kaybolur. Dominant antikor komponenti olan anti-EBNA-1, 6-12 ay sonra pik yapar (45).

Kapsid antijeni p22'ye karşı oluşan antikorlar da anti-EBNA-1 antikorları gibi enfeksiyonun geç döneminde oluşur.

Enfekte hücrelerin litik siklusu geçtiğinin ilk göstergesi olan anti-EA-D IgG antikorları viral replikasyon ile ilişkilidir. Bu antikorlar, primer enfeksiyon ve reaktivasyonda pozitifleşir. Akut enfeksiyonlarda %70-80 oranında saptanabilmektedir (50, 51). İmmün floresan antikor (IFA) yöntemi ile anti-D ve anti-R olmak üzere iki tipi de değerlendirilebilir. Anti-EA-D IgG antikorları üçüncü haftada pik yapar, üç ayda saptanamayan düzeylere iner; reaktivasyonda ise orta düzeyde bulunur (45). Anti EA-R antikorları iyileşme döneminde saptanır (52) (Şekil-6). Anti-VCA IgM antikorlarının saptanamadığı primer enfeksiyonlarda özellikle anti-EA antikorlarının araştırılması tanıya yardımcı olur (4) (Şekil-6).



Şekil-6: EBV spesifik antikorlar (53).

Litik EBV enfeksiyonunda viral zarf glikoproteini gp350/220'ye karşı oluşan nötralizan IgG antikorları, 6-7. haftada maksimuma ulaşır ve ömür boyu devam eder (49).

EM seyrinde serumda soğuk aglütininer, romatoid faktör, anti-nükleer, anti-trombosit ve anti-düz kas antikorları da saptanabilir. Geçici olarak belirlenen bu antikorlar, EBV enfeksiyonunun neden olduğu poliklonal B hücre aktivasyonunun sonucudur (32).

Hücrel immünite

EBV'ye karşı güçlü bir hümmoral cevap oluşmasına rağmen, enfeksiyonun kontrolünden sorumlu primer faktör hücrel immün cevaptır. Akut enfeksiyonda lenfoblastlar periferik kana geçer ve T lenfosit yanıtını uyararak tüm vücuda yayılırlar. T lenfositlerinin sentezlediği sitokinler ise klinik semptomlardan sorumludur. Oluşan lenfositozun ($15 \times 10^9/L$) nedeni

aktive sitotoksik T lenfosit düzeyindeki belirgin artıştır. T hücre aktivasyonu sonucu lenfoid organlarda büyüme saptanır. Akut enfeksiyonun 2. haftasında periferik kanda sayıları artan atipik T lenfositleri (Downey hücreleri) lökositlerin %10-80'ini oluştururlar (mononükleoz). NK hücreleri, CD4 ve CD8 T lenfositleri EBV ile enfekte B hücrelerinin proliferasyonunu kontrol etmeye çalışırlar. Ancak virüs yaşam boyu konakta persistan enfeksiyona neden olur. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda ise periferik kanda EBV pozitif B lenfosit sayısında artış saptanır (32).

EBV ile İlişkili Hastalıklar

Enfeksiyöz Mononükleoz (EM)

En sık rastlanan EBV enfeksiyonudur. Etken tükürük ile bulaşır, enfeksiyon orofarenkste başlar. Viral replikasyon farenksin epitel hücreleri ve tükürük bezlerinde gerçekleşir. Replikasyonu takiben virüs, B lenfositlerini enfekte eder ve bu hücrelerde varlığını sürdürür (latent enfeksiyon). Normal bireylerde virüsle enfekte olan hücrelerin çoğu elimine edilir, ancak az sayıda enfekte lenfosit ömür boyu konakta kalır (54).

Hastalık çocukluk çağında genellikle asemptomatik seyreder. Semptomatik hastalıkta otitis media, diyare, üst solunum yolu enfeksiyonu gibi tipik olmayan belirtiler veya EM tablosu ortaya çıkar (49). Küçük çocuklarda klinik bulgular saptansa da yarısında heterofil antikorlar oluşmaz. Yaş ile hem klinik belirtiler hem de heterofil antikor pozitifliği artar; 4 yaş grubunda enfeksiyon geçirenlerin %80'inde heterofil antikor saptandığı bildirilmiştir (55).

Hastalık genellikle boğaz ağrısı, bulantı, farenjit, ateş, baş ağrısı, gri-beyaz eksüdatlar ve nekrotik alanlar içeren tonsillit, ön ve arka servikal lenf nodu tutulumu, karaciğer enzim artışı ile karakterizedir. Hepatomegali (%6-13), splenomegali (%50-63) görülür. Hastaların periferik kanlarında atipik lenfositler saptanır. Hastalar 2-3 haftada iyileşir. Boğaz ağrısı aylarca sürebilirken diğer semptomlar kısa sürede kaybolur. Nadiren kronik mononükleoz sendromu gelişebilir (49).

EBV ile enfekte B hücreleri sıklıkla IgA ve IgG, nadiren IgM sentezler. Mononükleoz, B hücrelerinin poliklonal transformasyonudur. Otoantikör oluşumu, hastalık için tipiktir. Enfekte olmayan B hücrelerinin aktivasyonu otoantikörlerin kaynağı olabilir. Hastaların %90'ında heterofil antikörler saptanır (54).

EM olgularının en sık (%70) komplikasyonu ampisilin kullanımını takip eden morbiliform döküntüdür. Nedeni tam olarak açıklanamamıştır; hastalar ampisiline duyarlı değildir (49). Hastalarda hematolojik, nörolojik, hepatik veya dalak rüptürü gibi komplikasyonlar nadiren ortaya çıkmaktadır (45). Dalak rüptürü hayatı tehdit eder ve 1-2/1000 oranında görülür. Genellikle spontan rüptür oluşur ve hastalığın şiddeti ile uyumlu değildir (49). Ayrıca otoimmün hemolitik anemi, trombositopeni ve hafif nötropeni görülebilir. Olguların %1'inden azında ensefalit, aseptik menenjit, transvers miyelit, Guillain-Barre sendromu, optik nörit gibi nörolojik komplikasyonlar gelişebilir. Bunun dışında siroz, perikardit ve fatal miyokardit olguları da bildirilmiştir (56). Nadir ancak ölümcül olan masif ödem ve lenf nodu hiperplazisine bağlı hava yolu tıkanıklığı da görülebilir (49).

EM tablosu EBV dışında CMV ile de oluşabilir ancak klinik ve laboratuvar bulguları farklıdır. Akut toksoplazmozda ve adenovirüslerle de EM benzeri tablo oluşabilir. Tanı serolojik testlerle konur. Ayırıcı tanıda düşünülmesi gereken diğer hastalıklar viral hepatit, kızamıkçık, streptokokkal tonsillit ve primer HIV enfeksiyonudur (57).

Kronik Aktif (Persistan) EBV Enfeksiyonu

EM kliniğini takiben kalıcı yorgunluk, baş ağrısı, miyalji, subfebril ateş, lenfadenopati, hepatosplenomegali, pnömoni, nörolojik ve oftalmik patolojiler ile seyreden uzamış bir hastalık tablosudur. Hastaların çoğunda kronik EBV enfeksiyonu ile uyumlu antikör profilleri saptanır. 'Kronik mononükleoz' tablosunun aylar ve yıllar boyu devam eden bir sendrom olduğu düşünülmektedir. Ayrıca nadir görülen, ciddi malignitelere veya ölümcül seyreden diğer hastalıklara dönüşen EBV ile ilişkili tablolara 'kronik aktif EBV enfeksiyonu' adı verilmektedir.

Kronik mononükleoz sendromlu hastalarda yüksek düzeyde anti-VCA ve anti-EA antikoları (IgG ve IgA) oluşur, bunun yanı sıra normal, düşük veya saptanamayacak düzeyde anti-EBNA antikoları bulunabilir. Ayrıca anti-VCA IgM titreleri çok düşük veya saptanamayacak düzeylerde olabilir. Pansitopeni ve poliklonal hipergamaglobülinemi gelişebilir. Bu hastalarda yüksek düzeyde EBV genomu saptanmıştır. Etiyopatogenezinden hücrel immün yanıt, interferon sistemi ve NK hücre aktivitesinde yetersizlik; EBNA'ya anormal hümmoral yanıt ya da EBV varyantı bir suşun etken olabileceği sorumlu tutulmaktadır (33, 52).

Hemofagositik Lenfohistiositoz

Hemofagositik lenfohistiositoz, benign bir hastalıktır. Histiositik proliferasyon ve hemofagositoz ile karakterizedir. EBV ile enfekte lenfositler tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) ve interferon-gama (IFN- γ) salınımını artırarak makrofaj aktivasyonuna neden olur. Hastalık ateş, lenfadenopati, hepatosplenomegali, hepatit, pansitopeni ve koagülopati ile kendini gösterir (36).

Burkitt Lenfoma

Denis Burkitt, 1958 yılında Afrikalı çocuklarda lokalizasyonu, histopatolojisi ve coğrafi dağılımı farklılık gösteren bu lenfoma türünü tarif etmiştir. Hastalığın EBV ile ilişkisi ilk kez 1964 yılında gösterilmiştir. Endemik, sporadik ve immün yetmezlikli kişilerle ilişkili olmak üzere üç klinik formu vardır. Burkitt lenfomanın endemik formu, Afrika'nın ekvatoryal bölgelerinde ve Papua Yeni Gine'de sıkça (1.000.000 kişide 50-100) görülür. Tümör hücrelerinde EBV'nin varlığı ile endemik Burkitt lenfoma arasında hemen hemen %100 ilişki bulunmuştur (37). Afrika'da çene tutulumu baskın olup, diğer bölgelerde abdominal tutulum daha ön plandadır. Sporadik form çoğunlukla gençlerde ve çocuklarda görülür ve herhangi bir özel coğrafi dağılımı yoktur. İnsidansı 1.000.000 kişide 2-3 olup endemik hastalıktan çok daha düşüktür. Amerika ve Avrupa'da sporadik hastalık nadir görülür (%15-30). Burkitt lenfomanın sporadik formunda EBV'nin varlığı %15-30 arasında değişmektedir (16).

Burkitt lenfomada hücre çoğalmasında rolü olan c-myc onkogeninin immünglobülin ağır ve hafif zincir gen bölgelerine translokasyonu sonucu anormal hücre proliferasyonu görülür. EBV ile enfekte B hücrelerinin transformasyonu bu hücreleri ölümsüzleştirir. Beraberinde endemik sıtma ve kronik HIV enfeksiyonu gibi risk faktörlerinin B hücre proliferasyonunu stimüle etmesi, translokasyonların oluşması ve T hücrelerinin baskılanması sonucu c-myc onkogeninin regülasyonu bozulur. Burkitt lenfomada viral latent genlerden sadece EBER'ler ve EBNA-1 eksprese edilir. EBV tarafından kodlanan RNA'lar hücreleri c-myc tarafından indüklenen apoptozisten koruyan bcl-2 ekspresyonunu düzenleyerek hastalığın malign özellik göstermesine yol açar. c-myc, hücre proliferasyonuna ve apoptozisin artışına yol açar. c-myc ekspresyonunun artışı, bcl-2 ekspresyonunu artırır ve apoptozise direnç gelişir (16, 36, 58).

Hodgkin Lenfoma

Hodgkin lenfoma sıklıkla servikal lenf nodüllerini tutan, çoğunlukla genç erişkinlerde görülen, malign lenfoma grubunda kabul edilen heterojen bir hastalıktır. Gelişmekte olan ülkelerde 15 yaş öncesi olguların daha sık olduğu bildirilmiştir. Hodgkin ve Reed-Sternberg hücrelerinin lenfoid kökenli olması nedeniyle hastalık Hodgkin lenfoma olarak adlandırılmıştır. Etiyopatogenezinde belirsizlikler bulunmakla birlikte, enfeksiyon ile ilişkisine yönelik epidemiyolojik, klinik ve histopatolojik kesin bulgular vardır. EBV ile ilişkisi, serolojik çalışmalar ve biyopsi örneklerinde viral genomun sıklıkla saptanmasıyla gösterilmiştir. Ancak virüsün hastalığın gelişmesindeki rolü ve prognostik önemi tartışmalıdır (58).

Hodgkin lenfoma, biyolojik ve klinik özellikleri göz önünde bulundurularak nodüler lenfosit baskın ve klasik Hodgkin lenfoma olmak üzere iki gruba ayrılır (58).

Nodüler lenfosit baskın tip tüm Hodgkin lenfomaların % 5'ini oluşturur. Diğer tiplere kıyasla oldukça iyi bir prognoza sahiptir ve geç relaplara daha sık rastlanır. Neoplastik hücreler lenfosit predominant (LP) ya da "popcorn" hücreleri olarak adlandırılan B lenfosit kökenli hücrelerdir. Klasik Reed Sternberg hücreleri bulunmaz. Latent EBV enfeksiyonu LP

hücrelerinde hemen hiç görülmez, fakat zemin popülasyonundaki lenfositlerde bulunabilir. EBV'nin transformasyonda rolü yoktur (58).

Reed Sternberg hücreleri, klasik Hodgkin lenfomanın patognomonik özelliği olarak kabul edilir. EBV pozitif Reed Sternberg hücreleri, EBER in-situ hibridizasyon yöntemi ile klasik Hodgkin lenfoma olgularının yaklaşık % 40-50'sinde gösterilmiş; EBV pozitif hücrelerin monoklonal olduğu, dolayısıyla EBV enfeksiyonunun klonal hücre proliferasyonundan önce gerçekleştiği saptanmıştır. Bu nedenle klasik Hodgkin lenfomanın patogenezinde EBV sorumlu tutulmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde ve HIV ile enfekte bireylerde EBV enfeksiyonunun prevalansı % 100'e ulaşmaktadır. EBV pozitifliği hastalığın histolojik alt tiplerine ve epidemiyolojik faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir (mikst sellüler tipte % 75, nodüler sklerozan tipte ise % 10-40). Ayırıcı tanıda EBV pozitifliği önemlidir. EBV pozitif olgularda viral latent genlerden EBER'ler, EBNA-1, LMP-1 ve LMP-2A eksprese edilir (27, 58).

Nazofarengeal Karsinoma

Nazofarengeal karsinoma Güney Çin, Kuzey Afrika ve Alaska'da sıklıkla görülür (49). Nazofarengeal karsinomanın nonkeratinize ve keratinize olmak üzere iki formu vardır. En sık görülen nonkeratinize indifferansiye formunda EBV pozitifdir (16). Erken preinvaziv displastik lezyonların veya karsinoma in-situnun malign invaziv tümöre dönüşümünde EBV genomunun varlığı önemlidir (59). Nazofarengeal karsinomalı hastalarda sıklıkla EBV yapısal proteinlerine karşı yüksek titrede IgA antikorları oluşur. Güney Çin'de hastalığın erken tanısında tarama amacıyla EBV-spesifik VCA IgA antikorlarından yararlanılmaktadır. EBV-spesifik antikor titreleri arttıkça, hastalığın prognozu kötüleşir (16). Son zamanlarda, hastalığın tanı ve takibinde plazmada EBV-DNA saptanması daha güvenilir bir belirteç olarak bildirilmektedir (60, 61). Ancak moleküler yöntemler pahalıdır bu nedenle etkilenen coğrafi bölgelerde serolojik testler büyük ölçekli genel taramalar için daha uygundur.

İndifferansiye nazofarengeal karsinoma olgularının çoğunda LMP-1 ve LMP-2A ekspresyonu gösterilmiştir. LMP-1 fibroblastları transforme eder,

keratin gen ekspresyonunu etkileyerek morfolojik değişikliklere neden olur ve transforme insan keratinositlerinde olgunlaşmayı bloke eder. Ayrıca epidermal büyüme faktör ekspresyonunu uyarır; A20 geninin aktivasyonu ile p53 aracılı apoptozisi bloke eder. Yüksek invazyon ve metastaz kapasitesi olan matriks metalloproteinaz 9'u aktive eder (37).

Post Transplant Lenfoproliferatif Hastalık (PTLD)

EBV reaktivasyonları immün yetmezliği olan hastalarda, benign poliklonal hiperplaziden oligoklonal/monoklonal malign lenfomaya kadar değişen geniş spektrumda bir dizi lenfoproliferatif hastalık ile ilişkilidir (62, 63).

Transplantasyon yapılmış immünsüpresif hastalar için risk oluşturan bu hastalıklar genellikle atipik poliklonal B hücre proliferasyonu sonucu oluşur.

Görölme oranı transplantasyon sonrasında %1-20, AIDS hastalarında ise %1-4 olarak bildirilmiştir. Risk faktörleri seropozitif vericiden seronegatif alıcıya nakil, genç yaş, CMV enfeksiyonu, böbrek, ince barsak, kalp-akciğer ve karaciğer nakilleridir. Genellikle immünsüpresyonun azaltılması ya da durdurulmasını takiben PTLD geriler. Ancak bazıları agresif monomorfik non-Hodgkin lenfomaya dönüşebilir (36).

EBV ile ilişkili PTLD'nin izlenmesi, yüksek riskli transplant alıcılarında önem taşır. Seronegatiflik risk faktörü olduğu için transplantasyon öncesinde EBV serolojisi belli olmalıdır. Transplantasyon sonrasında, transplant alıcısında immünsüpresyonun yeterli antikor üretimini engellemesi nedeniyle seroloji sınırlı kalmaktadır. Virüs yükünün nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) ile izlenmesi tercih edilen bir yöntemdir (64). Sağlıklı seropozitif kişilerin tükürük ve lökositlerinde de EBV genomu saptanabildiği için hastalık tanısında testin prediktif değeri düşüktür (65, 66). Serum ve plazma örneklerinde EBV genomu saptanmasının konak-virüs ilişkisindeki patolojiyi belirlemede daha güvenilir olduğu bildirilmiştir (67, 68). Bununla beraber serum ve plazma örneklerinde saptanabilir düzeyde EBV-DNA bulunan immün yetmezlikli hastalarda EBV ile ilişkili semptomlar görülmeyebilir. Genom sayısındaki hızlı artış, testin yapıldığı dönemde gelişen patolojinin

güçlü bir göstergesidir ve riskli hastalarda EBV ile ilişkili malignitelerin daha titiz araştırılmasını gerektirir (52).

Bu hastalık ve malignitelerin dışında EBV ile T hücre lenfomaları, X'e bağlı lenfoproliferatif sendrom (Duncan Hastalığı), AIDS, lenfoid granülomatozis, gastrik karsinom, meme karsinomu gibi birçok hastalık ve malignitelerin ilişkili olduğu gösterilmiştir (Tablo-3).

Tablo-3: EBV ile ilişkili olan enfeksiyon ve maligniteler (16).

Malign Olmayan Hastalıklar	Malign Hastalıklar	
	İmmünsüprese Hastalar	İmmünkompetan Hastalar
Enfeksiyöz mononükleoz	Post transplant lenfoproliferatif hastalık	Burkitt lenfoma
Kronik aktif enfeksiyon	X'e bağlı lenfoproliferatif sendrom	Hodgkin lenfoma
Oral hairy lökoplaki	AIDS ile ilişkili B hücre lenfomaları	Nazofarengeal karsinom
Virüs ile ilişkili hemofagositik sendrom	Ciddi immün yetmezlik ile ilişkili B hücre lenfoması	T hücre lenfomaları
	Lenfomatoid granülomatozis	Ekstranodal NK/T hücre lenfoması
	Wiscott-Aldrich sendromu ile ilişkili B hücre lenfoması	Lenfoepitelyoma benzeri gastrik karsinom
	Metotreksat ile ilişkili B hücre lenfoması	Tükrük bezi ve diğer baş boyun tümörleri
	Leomyosarkom	Meme karsinomu
		Hepatoselüler karsinom
		Foliküler dendritik hücreli sarkom

Epidemiyoloji

Enfekte kişilerin tükrük ve boğaz salgısında bulunan EBV yakın temas, kan ve kontamine eşyalarla kişiden kişiye bulaşmaktadır. Çocukluk döneminde ortak kullanılan su bardakları, ergenlik döneminde öpüşme yakın

temasla bulaştan sorumludur. Sağlıklı kişilerde tükürükle virüs atılımı %15 iken bu oran immünsüpresif kişilerde, transplantasyon sonrasında ve HIV pozitiflerde %100'e yaklaşır (29, 32). Lenfoproliferatif hastalıklarda, transplant alıcılarında ve AIDS hastalarında tükürükte EBV-DNA'nın arttığını gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (69).

EBV ile karşılaşma yaşı coğrafi bölgelere göre değişkenlik gösterir. Enfeksiyon sosyoekonomik düzeyi yüksek olan topluluklarda, düşük olanlara göre daha geç yaşlarda görülür. Erişkin yaş grubunda seropozitiflik %80-100'dür. Serokonversiyon 1-6 yaş ve 14-20 yaş dönemlerinde pik yapar. Ülkemizde erişkin yaş grubunda seropozitifliğin %70-99.4 olduğu bildirilmiştir. Ege bölgesinde yapılan bir seroprevalans çalışmasında, erişkin yaş grubunda seropozitiflik %84.4 iken 0-4 yaş grubunda %67.9 bulunmuş ve seropozitifliğin yaşla anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (32).

EBV ile ilişkili malignitelere bazı kofaktörlerden söz edilmektedir. Örneğin sıtmanın neden olduğu bağışıklık yetmezliğinin Afrika'da çocuklarda görülen Afrika Burkitt lenfomasında, Çin'de görülen nazofarengeal karsinomada ise genetik faktörler, besinler ve çevresel faktörlerin kofaktör olduğuna dair çalışmalar vardır (32). Ülkemizde çeşitli malignitelerin etiolojisinde EBV'nin rolünü araştıran çalışmalarda; Hodgkin lenfoma-EBV ilişkisi %55-62.5 (mikst sellüler tipte %75-100), non Hodgkin lenfoma-EBV ilişkisi %57, nazofarengeal karsinoma-EBV ilişkisi %29 bulunmuş; Kuzeydoğu Anadolu'da Hodgkin lenfoma-EBV ilişkisi %75 iken, İç Anadolu bölgesinde %42.8 saptanmıştır (70-73).

EBV suşları EBNA genlerindeki polimorfizmlere göre tip A ve B olarak (tip 1 ve 2) sınıflandırılırlar. Seroloji ve PCR çalışmaları her iki tipin de dünyada yaygın olduğunu ancak tip A'nın tip B'den daha sık saptandığını ve EM'da baskın tip olduğunu göstermiştir. Afrika'da iki tip benzer oranda görülürken, Amerika ve Avrupa'da tip A tip B'den 10 kat daha fazla bulunur. Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde, çoklu EBV suşları ile koenfeksiyonlar gösterilmiştir (52).

Mikrobiyolojik Tanı

EBV enfeksiyonlarının tanısında tam kan, plazma, serum, doku, tükürük, boğaz çalkantı suyu, beyin omurilik sıvısı örnekleri kullanılır. Virüs izolasyonu için alınan örnekler çalışma zamanına kadar -86°C'de saklanmalıdır. Serolojik tanıda kullanılacak örneklerin -20°C'de saklanması yeterlidir (52).

Elektron Mikroskopi

EBV enfeksiyonlarının genellikle latent olması ve enfekte dokuda viriyonların yeterli miktarda bulunmaması nedeni ile tercih edilen bir tanı yöntemi değildir. Viral yükün fazla olduğu oral lökoplakili hastalarda anlamlı olabilir (29, 52).

Antijen Saptama

EBNA-1, EBV ile enfekte tüm hücrelerde eksprese edilen tek antijendir. Enfekte doku ve hücrelerde EBNA-1 antijeninin immünfloresan testi ile gösterilmesi en uygun yöntemdir. Latent/litik enfeksiyonun ayrımı ve EBV ile ilişkili tümörlerin latentlik tipini saptamak için immünohistokimyasal yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Latentlik tipini tanımlamada EBNA-2 ve LMP-1 antijenlerinden yararlanır. Virüsün saptanmasında ise nükleik asit yöntemleri daha duyarlıdır (52).

İzolasyon İşlemleri

EBV izolasyonu rutin bir işlem değildir ancak araştırma amaçlı kullanılır. EBV izolasyonu için hücreden arındırılmış, filtre edilmiş tükürük ve boğaz çalkantı örnekleri taze insan kordon kanı lenfositlerine inoküle edilir, dört hafta izlenir. Viral izolatların her biri EBNA-2 ve EBNA-3 genlerindeki polimorfizmler temel alınarak moleküler yöntemlerle tanımlanır. Ayrıca her izolat için spesifik protein paternleri farklı olduğundan Western blot yöntemiyle parmak izi 'fingerprinting' analizi veya 'EBNotyping' yapmak mümkündür (52).

Nükleik Asit Yöntemleri

Primer EBV enfeksiyonlarının tanısında rutin olarak kullanılmazlar. Bu testlerden EBV ile ilişkili hastalıkların etiyolojisini araştırmak ve tedavi

yaklaşımlarını belirlemek amacıyla yararlanılır. Kullanılacak nükleik asit yöntemi, laboratuvarın teknik donanımı, çalışılacak örnek türü ve hastanın klinik durumuna göre belirlenebilir (32, 52).

EBV ile ilişkili hastalıkların tanısı için donmuş ve parafinlenmiş kesitlerde EBER in-situ hibridizasyon, hücre süspansiyonlarında sito-hibridizasyon, dot blot hibridizasyon, Southern blot hibridizasyon veya NAAT gibi değişik nükleik asit yöntemleri kullanılmaktadır (52).

NAAT değişik klinik örneklerde EBV saptanmasında en sık kullanılan yöntemdir. Bu amaçla iki prob kullanılmaktadır. Bunlardan ilki, EBNA-1'in uzun internal tekrar sekansını kodlayan korunmuş BamHI W bölgesidir. Bu bölge EBV ile enfekte hücrelerde çok sayıda kopya olarak bulunmaktadır. DNA hibridizasyon ve genom amplifikasyon testlerinde bu bölgeyi hedefleyen proplar maksimum duyarlılığa sahiptir. İkinci prob korunmuş LMP-1 genini hedefler. İn-situ NAAT formalinle tespit edilmiş ve parafinlenmiş kesitlerde veya tam kanda bulunan EBV genomunu saptayabilir (52).

Real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) DNA saptamak için kullanılan hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. EBV için ilk olarak 1999 yılında uygulanmıştır. RT-PCR, florojenik proflu veya SYBR green boyalı PCR ürünlerini real-time laser görüntüleme sistemiyle saptamaktadır. İlkinde probun bir ucuna bağlı floresan boya bildirici olarak çalışırken diğer uçtaki ikinci boya birincinin yayım spektrumunu söndürür. Reaksiyonunun uzama fazında Taq polimerazın 5' nükleaz aktivitesi ile prop ayrılır ve ikinci boyanın inhibitör etkisi ortadan kalkar, floresan sinyal yayılır. İkinci sistemde SYBR green boyası ürün birikiminin göstergesi olarak çalışır. Bu sistem daha az pahalıdır ama EBV için hibridizasyon prob sistemine göre daha az spesifiktir. RT-PCR, PCR ürünlerinin eş zamanlı olarak görüntülenmesine olanak sağlar (74).

Son yıllarda özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış olgularda görülen EBV ile ilişkili patolojilerin saptanmasında kantitatif RT-PCR yaygın olarak kullanılmaktadır (32). Bu hasta grubunda viral genom miktarının artışı genellikle patolojik bir gidişin göstergesidir (52). Ancak yüksek viral yüke rağmen klinik hastalığın oluşmadığı veya klinik tabloya rağmen düşük viral

yükün saptandığı olgular bildirilmiştir. Latent virüsün, doğası gereği bağışıklık sistemi baskılanmış konakta reaktivasyon oluşturması bu sonuçlara neden olabilir. Burada saptanan viral yükün latent virüs ile değil, hastalık tablosu ile ilişkili etkene ait olduğunun gösterilmesi önem taşır (32).

Bazı asemptomatik olgularda da NAAT ile viral yük saptanabildiğinden her hasta grubu ve her örnek için anlamlı olan eşik değer tanımlanmalıdır. Örnekten bağımsız olarak tanıda viral yük için düşük eşik değer özgülüğün, yüksek eşik değer ise duyarlılığın düşük olmasına neden olur. Ayrıca duyarlılık ve özgülük farklılıklarının nedeni, çalışmaların farklı gruplarda (kemik iliği, solid organ transplant hastaları) yapılması; testlerde farklı örneklerin (lökosit, plazma, tam kan, serum) kullanılması; farklı PCR teknikleri; farklı hedef bölgelerinin seçilmesi ve sonuçların farklı terminoloji ile değerlendirilmesi olabilir (32) (Tablo-4). Bu nedenle EBV viral yük çalışmalarının standardizasyonu gereklidir bunun için de bağışıklık sistemi baskılanmış/maligniteli olgularda daha geniş prospektif çalışmalara gereksinim vardır (32).

Tablo-4: EBV ile ilişkili hastalıklarda viral yük saptanması için kullanılan örnekler (74).

Hastalık	Enfekte hücre	Örnekler		
		Plazma/serum	Mononükleer hücreler	Tam kan
Enfeksiyöz mononükleoz	Plazma hücresi B hücresi	Uygun	Uygun değil	Uygun değil
Post transplant lenfoproliferatif hastalık	B hücresi	Tartışmalı	Uygun	Tercih edilir
Hodgkin lenfoma	Hodgkin hücresi	Uygun	Uygun değil	Yetersiz veri
Kronik aktif EBV enfeksiyonu	T veya NK hücresi	Prognoz için faydalı	Tanı için uygun	Yetersiz veri
Nazofarengeal karsinoma	Skuamöz hücreler	Uygun	Uygun değil	Yetersiz veri

Serolojik Testler

EBV ile enfekte kişilerde oluşan antikorları saptamak amacıyla serum örneklerinde çalışılan testlerdir.

Heterofil Antikor Testleri: EBV ile oluşan enfeksiyonlar sırasında koyun ve at eritrositlerini aglütine eden IgM yapısında heterofil antikorlar sentezlenir. Bu antikorlar Paul-Bunell ve monospot testleri ile saptanabilir. Enfeksiyonun ilk ayında yüksek düzeyde olup takiben titreleri düşen heterofil antikorların 6-12 ay boyunca saptandığı olgular bildirilmiştir. Hastalığı geçirmekte olan 0-4 yaş grubu çocukların %10-50'sinde bu antikorlar saptanabilmektedir. Erişkinlerde ise bu oran %85-90'dır. Tipik olgularda heterofil antikor pozitifliği primer EBV enfeksiyonu için tanı koydurucudur (32, 52).

Monospot ve benzeri ticari kitlerde heterofil antikorlar kobay böbrek ekstresi ile önceden absorbe edilmiş eritrositler kullanılarak saptanmaktadır (32).

Heterofil antikor testlerinde yalancı pozitiflik/negatiflikler görülebilmektedir. Primer enfeksiyondan sonra heterofil antikorların düşük düzeyde kalması, otoimmün hastalıklar, gebelik ve CMV gibi viral enfeksiyonlar yalancı pozitifliklere neden olmaktadır. Her yaş grubunda rastlanabilen yalancı negatiflikler küçük çocuklarda ortalama %10-15 bildirilmiştir. Bu hastalar için EBV-spesifik antikor testlerinden yararlanılır (32, 52).

EBV-spesifik Antikor Testleri: Enfeksiyon sırasında EBV majör antijenlerine karşı oluşan antikorların saptanması oldukça yararlıdır. Bu testler özellikle atipik lenfositoz ve heterofil antikorların bulunmadığı hastaların tanısında önem taşır. EBV serolojisi aynı zamanda akut enfeksiyonu geçirilmiş enfeksiyondan veya reaktivasyondan ayırmak için de gereklidir (4) (Tablo-5).

Tablo-5: EBV enfeksiyonlarının serolojik profilleri (4).

Seroloji	EBV antikor paterni				
	VCA IgG	VCA IgM	EBNA IgG	EBNA IgM	EA IgG
Seronegatif	-	-	-	-	-
Akut enfeksiyon	+/-	+	-	+	+/-
Geçirilmiş enfeksiyon	+	-	+	-	-
Reaktivasyon	+	+/-	+	-	+

EBV enfeksiyonlarında reaktivasyon siktir ve tükürük aracılığıyla virüsün zaman zaman atılmasıyla sonuçlanır. Reaktivasyon serolojik olarak majör antijenlere karşı oluşmuş antikorlarla belirlenebilir. Virüsün onkogenik potensi nedeniyle EBV ile enfekte hastalar risk altındadır. Bu nedenle bu hastalarda ve özellikle immünsüpresif kişilerde reaktivasyonun belirlenmesi önem taşır (4).

EBV enfeksiyonu seyrinde, sonrasında ve reaktivasyonlarda oluşan antikorları saptayan bu testler, immünfloresan, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve immünblot temelli testlerdir. Ticari kitleri bulunan bu testlerde farklı antijen, konjugat, substrat ve yöntemler kullanıldığı için testler standardize değildir. Olguların %90-95'inde tipik antikor profili bulunur. Buna göre kişinin seronegatif, primer akut enfeksiyon, yakın zamanda (2-3 ay içinde) geçirilmiş enfeksiyon, geçirilmiş enfeksiyon ve reaktivasyon serolojisi belirlenebilir (52).

İmmünfloresan Testleri: Serolojik testler arasında altın standart olarak kabul edilir. Ticari kitlerde lamlar P3HR-1 ve Raji hücre dizileri ile kaplıdır. Özgüllüğü yüksek olan bu yöntemle, tek bir serum örneğinde EBV enfeksiyonun serolojik tanısı mümkündür. Testin değerlendirilmesi deneyimli personel gerektirir. Alternatif olarak antikompleman immünfloresan testi (ACIF) kullanılabilir (3).

ELISA: Solid faz rekombinan, füzyon proteinleri ve sentetik peptidlerle (VCA, EBNA) kaplıdır. Anti-EBNA-1 antikorlarını immünfloresan testlere göre daha erken saptar. Hızlı, otomasyona uygun, duyarlılığı yüksek olan bu yöntemle tek bir serum örneğinde EBV enfeksiyonunun serolojik tanısı mümkündür. Sentetik peptidlerin antijen olarak kullanıldığı testlerde duyarlılık ve özgüllüğün daha düşük olduğu bildirilmiştir (3).

İmmünblot Testleri: Yüksek özgüllüğü nedeni ile doğrulama testi olarak önerilen analitik antikor saptama yöntemidir. Viral lizat veya rekombinan antijenlerin (EBNA-1 için p72, VCA için p18, p23, EA için p54, p138) kullanıldığı bu testle tek bir serum örneğinde EBV enfeksiyonunun serolojik tanısı mümkündür (3).

VCA-IgG Avidite Testleri

EBV-spesifik antikor profilinin yorumlanamadığı durumlarda doğrulama testi olarak kullanılabilir. Enfeksiyon sürecinde oluşan IgG antikorları başlangıçta düşük aviditelidir. Zamanla antijene afinitenin olgunlaşmasıyla yüksek aviditeli antikorlar sentezlenir. VCA-IgG avidite testleri anti-VCA IgM negatif akut enfeksiyon; anti-EBNA-1 negatif geçirilmiş enfeksiyon olgularında ve uzun süreli anti-VCA IgM pozitifliğinde serolojik yorum konusunda yardımcı olmaktadır. ELISA, immünfloresan ve immünblot yöntemleri ile çalışılabilir (3).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'nun izni (21 Nisan 2009 tarih, karar no: 2009-7/28) ile yapıldı.

Çalışmaya Katılan Hasta/Gönüllü Grupları

Gönüllülere yapılacak işlemler sözlü olarak anlatıldıktan sonra, Uludağ Üniversitesi Sağlık Kuruluşları (UÜ-SK) Tıbbi Araştırmalara Katılım İçin Aydınlatılmış Gönüllü Onam Formu (Ek-2)'nu okumaları ve kabul ettikleri takdirde imzalamaları istendi. Çocuk yaş grubunda bulunan gönüllüler için veli/vasisinin onamı alındı. Çalışmaya,

1. Renal transplant alıcılarından oluşan ve transplantasyondan sonraki 3 aylık dönemde Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı'nda takip edilen, tümü erişkin 62 hasta (**renal transplant grubu**);

2. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Onkoloji Bilim Dalı'nda yeni tanı alan ve immünsüpresyon tedavisine başlandıktan sonraki 6 aylık dönemde takip edilen 37 hasta (**çocuk onkoloji grubu**);

3. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji-ELISA/Seroloji Laboratuvar'larına EBV serolojisinin belirlenmesi için kan örneği gönderilen ve seropozitiflik saptanan 50 kişi (**kontrol grubu**) dahil edildi.

Kontrol grubu immünsüpresif tedavi uygulanmayan veya herhangi bir malignitesi bulunmayan poliklinik/klinik hastalarından rastgele oluşturuldu; 28'i çocuk (%56), 22'si ise erişkin (%44) yaş grubunda idi.

Hasta/Gönüllü Kan Örnekleri

1. Renal transplant alıcılarından transplantasyon öncesi 1 kez; transplantasyon sonrası 3 kez (1. hafta, 1.ay ve 3.ayda) olmak üzere toplam 4 kez düz kan (3-5 mL) alındı. Bu grupta bulunan 62 hastadan 56'sının tüm örneklerinde (toplam 224 serum) Paul-Bunnel ve immünblot ile EBV serolojisi belirlendi, ELISA ile EBV VCA-IgG avidite ve RT-PCR ile EBV-DNA testleri çalışıldı. Diğer hastaların 2'sinde böbrek reddi geliştiği, 3'ü vefat ettiği, 1'i de takip edilemediği (devamsız olduğu) için bu hastalara ait toplam 14 serum örneğinde yukarıdaki testler çalışıldı.

Ayrıca takip eden ölçümlerde EBV-DNA pozitifliği veya EBV-DNA düzeylerinde artış saptanan hastalarda eş zamanlı T hücre oranlarına (CD4/CD8) bakılarak immünsüpresyon durumu belirlendi.

2. Çocuk onkoloji hastalarından tedavi öncesi 1 kez; immünsüpresif tedaviye başladıktan sonra 3 kez (1.ay, 3.ay ve 6.ayda) olmak üzere toplam 4 kez düz kan (3-5 mL) alındı. Bu grupta bulunan 37 hastadan 29'unun tüm örneklerinde (toplam 116 serum) Paul-Bunnel ve immünblot ile EBV serolojisi belirlendi, ELISA ile EBV VCA-IgG avidite ve RT-PCR ile EBV-DNA testleri çalışıldı. Diğer hastalardan 1'i vefat ettiği, 7'si takip edilemediği (devamsız olduğu) için bu hastalara ait toplam 24 serum örneğinde yukarıdaki testler çalışıldı.

3. EBV seropozitifliği saptanan kontrol grubu hastalarından 1 kez düz kan (3-5 mL) alındı. Tüm hastaların Paul-Bunnel ve immünblot ile EBV serolojisi belirlendi; ELISA ile EBV VCA- IgG avidite ve RT-PCR ile EBV-DNA testleri çalışıldı.

Çalışmaya katılan gönüllere ait kan örneklerinin alımına 17.06.2009 tarihinde başlandı, periyodik örnek alımı 31.01.2011 tarihinde tamamlandı.

Kan örnekleri 1000-1200×g'de 10 dakika santrifüje edilerek serumları ayrıldı. Serumlar 4-5 adet ependorf tüpüne dağıtıldı; EBV-DNA (PCR) ve EBV VCA-IgG avidite testleri için çalışmanın yapılacağı güne kadar -20°C derin dondurucuda saklandı. Paul-Bunnel ve EBV-spesifik antikor testleri (immünblot) aynı/ertesı gün çalışıldı.

Gereçler

Gerçek zamanlı PCR cihazı (Rotor-Gene 3000 Corbett Research, Avustralya)

Isı bloğu (Major Science, Tayvan)

Ependorf santrifüjü (Hermle, Almanya)

İmmünblot test cihazı (EuroBlot Master, Euroimmun, Almanya)

Yıkama cihazı (Organon Teknika, Avusturya)

Spektrofotometre (Tecan Sunrise, Avusturya)

Flov sitometre cihazı (BD FACS-Canto, Becton Dickenson, Amerika Birleşik Devletleri)

Santrifüj (Nüve, Türkiye)

Su banyosu (Grant, İngiltere)

Derin dondurucu -20°C (Bosch, Almanya)

Buzdolabı (Regal, Türkiye)

Mikropipet (10,100, 1000 µl'lik) (Gilson, Amerika Birleşik Devletleri)

Ependorf tüpü 0,2 mL'lik (Abgene, İngiltere)

Ependorf tüpü 1,5 mL'lik (Citotest, Çin)

Serolojik tüp (1×10 cm)

Yöntemler

Paul-Bunnel Testi

EBV ile enfekte kişilerde oluşan heterofil antikorları araştırmak amacıyla yapıldı. Teste başlamadan önce komplemanı inaktive etmek için hasta serumları 56°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi; takiben serum fizyolojik (%0.9'luk NaCl) ile 1/7-1/1792 oranında sulandırıldı. Üzerlerine %2'lik koyun eritrosit süspansiyonu ilave edildi. Sonuçlar 1 gece oda sıcaklığında bekletildikten sonra aglütinasyon titresine göre değerlendirildi. Aglütinasyon görülmeyen örnekler negatif kabul edildi; 1/56 ve üzerindeki pozitiflikler EBV enfeksiyonu lehine yorumlandı.

İmmünblot Yöntemi

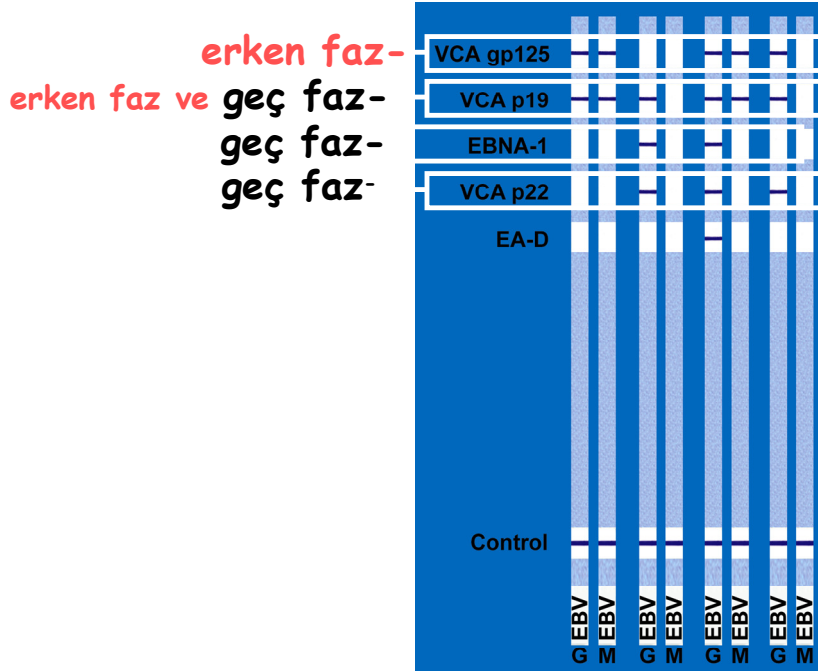
EBV-spesifik anti-VCA IgM, anti-VCA IgG, anti-EBNA-1 IgM, anti-EBNA-1 IgG ve anti-EA IgG antikorlarını saptamak için Euroline anti-EBV-profile 2 immünblot kiti (Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Testin çalışma prensibine göre;

1. Tüm reaktifler kullanımdan yaklaşık 30 dakika önce buzdolabından çıkarılıp oda sıcaklığına (18°C-25°C) getirildi.
2. EBV VCA gp125, VCA p19, EBNA-1, p22 ve EA-D antijenleri ile immünglobülin (IgG/IgM) kontrolünü paralel bantlar halinde içeren test şeritleri inkübasyon kanallarına yerleştirildi.
3. Her kanala 1.5 mL bloklayıcı tampon solüsyonu eklendi.
4. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda 15 dakika inkübe edildi.
5. Kanaldaki solüsyon aspire edildi
6. Hasta serumları serolojik tüplerde üniversal tampon çözeltisi ile 1/101 oranında sulandırıldı ve vortekslendi.
7. Test şeritlerinin bulunduğu inkübasyon kanallarına sulandırılmış serum örneklerinden 1.5 mL ilave edildi.
8. Oda sıcaklığında 60 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.
9. Kanaldaki solüsyon aspire edildi.
10. Kanala 1.5 mL üniversal tampon çözeltisi ilave edilerek 3 defa 5'er dakika çalkalayıcıda yıkandı.
11. Kanaldaki solüsyon aspire edildi.
12. Kanala 1.5 mL enzim konjugat (keçi kaynaklı, alkalen fosfatazla işaretli anti- insan IgG/IgM) ilave edildi.
13. Oda sıcaklığında 60 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.
14. Kanaldaki solüsyon aspire edildi.
15. Kanala 1.5 mL üniversal tampon çözeltisi ilave edilerek 3 defa 5'er dakika çalkalayıcıda yıkandı.
16. Kanaldaki solüsyon aspire edildi.
17. Kanala 1.5 mL substrat (nitroblutetrazolyumklorid/5-Bromo-4-kloro-3-indolilfosfat) ilave edildi.
18. Oda sıcaklığında 20 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.

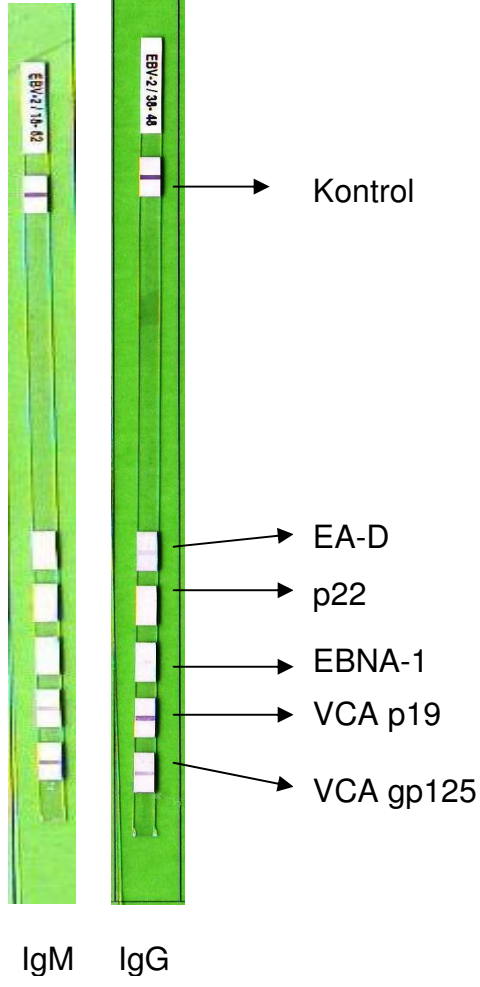
19. Kanaldaki solüsyon aspire edildi.
20. Kanala 1.5 mL distile su ilave edilerek 3 defa 1'er dakika çalkalayıcıda yıkandı.
21. Kanaldaki solüsyon aspire edildi.
22. Şeritler değerlendirme protokolüne göre yerleştirildi ve nemi giderildikten sonra değerlendirildi (Şekil-7, 8 ve 9)

İmmünblot ile EBV-spesifik IgM/IgG antikorlarının saptanmasında aynı test protokolü uygulandı; sadece enzim konjugat aşamasında immünglobülin izotipine uygun reaktif kullanıldı.

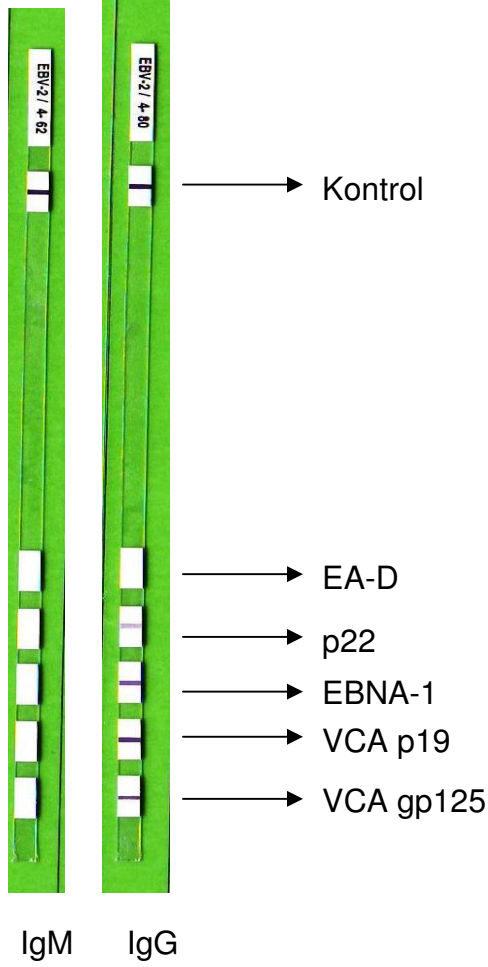
İmmünblot sonuçlarına göre seronegatif; akut enfeksiyon (anti-VCA IgM +, anti-VCA IgG +/-, anti-EBNA IgG -, anti-EA IgG +/-); geçirilmiş enfeksiyon (anti-VCA IgG +, anti-VCA IgM -, anti-EBNA IgG +, anti-EA IgG -) ve reaktivasyon (anti-VCA IgG +, anti-VCA IgM +/-, anti-EBNA IgG +, anti-EA IgG +) olmak üzere toplam dört grup EBV serolojisi belirlendi (Şekil-8 ve 9).



Şekil-7: İmmünblot sonuçlarının şematik görünümü.



Şekil-8: Akut enfeksiyon serolojisi.



Şekil-9: Geçirilmiş enfeksiyon serolojisi.

EBV-VCA IgG Avidite Testi

EBV VCA-IgG avidite testi için mikro ELISA kiti (Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Testin çalışma prensibine göre;

1. Tüm reaktifler kullanımdan yaklaşık 30 dakika önce buzdolabından çıkarılıp oda sıcaklığına (18°C-25°C) getirildi.
2. Hasta serumları serolojik tüplerde örnek tampon solüsyonu ile 1/101 oranında sulandırıldı ve vortekslendi.
3. Antijen kaplı kuyucuklara kontroller (düşük avidite, yüksek avidite) ve sulandırılmış serum örneklerinden 100 µL ilave edildi. Her kontrol ve hasta serumu için yan yana iki kuyucuk kullanıldı.
4. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.

5. Kuyucuklar 1 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve aspire edildi.
6. Her kontrol ve örnek için ilk kuyucuğa 200 µL üre solüsyonu, ikinci kuyucuğa 200 µL fosfat tamponu ilave edildi.
7. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
8. Kuyucuklar 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve aspire edildi.
9. Kuyucuklara 100 µL enzim konjugat (tavşan kaynaklı, peroksidazla işaretli anti-insan IgG) ilave edildi.
10. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
11. Kuyucuklar 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve aspire edildi.
12. Kuyucuklara 100 µL kromojen/substrat (tetrametilbenzidin/hidrojen peroksit) ilave edildi.
13. Oda sıcaklığında 15 dakika karanlıkta inkübe edildi.
14. Kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu (0.5 M sülfirik asit) ilave edildi.
15. Fotometrik ölçüm 30 dakika içinde spektrofotometrede 450-620 nm dalga boyu aralığında yapıldı.
16. Relatif avidite indeksi (RAI) üreli örnek optik dansitesi×100/üresiz örnek optik dansitesi formülü ile yüzde olarak hesaplandı.
RAI <%40= düşük avidite
RAI %40-%60= sınırdaki avidite
RAI >%60= yüksek avidite olarak değerlendirildi
17. Öncelikle kontrollere (düşük, yüksek avidite) ait RAI sonuçlarına göre testin performansı belirlendi. Takiben hasta serumlarının RAI sonuçları değerlendirildi.

Real Time PCR (RT-PCR)

RT-PCR için öncelikle çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllülere ait serum örneklerinden viral DNA izole edildi.

DNA İzolasyonu

Taze/-20°C derin dondurucuda saklanan serum örneklerinden EBV-DNA'sının izolasyonu için QIAamp DNA minikit (QIAGEN, Almanya) kullanıldı.

Çalışmaya başlamadan önce;

- Serum örnekleri ve QIAGEN protease (proteinaz K) oda sıcaklığına (18 °C-25 °C) getirildi.
- Isı bloğu 56 °C'ye ayarlandı.
- Kit içeriğinde bulunan yıkama solüsyonlarından AW1'e 25 mL, AW2'ye ise 30 mL %99,5'lik etanol eklendi.
- Lizis tampon solüsyonu (AL) içinde kristaller oluşmuşsa 56 °C'de inkübe edilerek kristalleşme giderildi.

Testin çalışma prensibine göre;

1. Boş ependorf tüpleri süpura yerleştirildi.
2. Serum örnekleri vortekslendi.
3. Ependorf tüplerine 20 µL proteinaz K,
200 µL serum örneği,
200 µL AL ilave edildi.
4. Tüpler 15 saniye vortekslendi.
5. Isı bloğunda 56 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
6. Tüp kapaklarının iç tarafındaki damlaları tüpün içine aktarmak için kısa süre santrifüje edildi (quickspin).
7. Ependorf tüplerine 200 µL etanol (%96-100) eklendi.
8. Tüpler 10 saniye vortekslendi ve kısa süre santrifüje edildi.
9. Tüp içeriği QIAGEN spin kolona aktarıldı.
10. Kapağı kapatılan tüpler 6000×g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüje edildi. Spin kolonun yerleştiği tüp atıldı. QIAamp spin kolon 2 mL'lik toplayıcı tüpe yerleştirildi.
11. Spin kolonun kapağı dikkatlice açıldı ve içine 500 µL AW1 eklendi.
12. Kapağı kapatılan tüpler 6000×g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüje edildi. Spin kolonun yerleştiği tüp atıldı. QIAamp spin kolon 2 mL'lik toplayıcı tüpe yerleştirildi.
13. Spin kolonun kapağı dikkatlice açıldı ve içine 500 µL AW2 eklendi.

14. Kapağı kapatılan tüpler 20.000×g (14.000 rpm)'de 3 dakika santrifüje edildi. Spin kolonun yerleştiği tüp atıldı. QIAamp spin kolon 2 mL'lik toplayıcı tüpe yerleştirildi.
15. Tüpler 20.000×g (14.000 rpm)'de 1 dakika santrifüje edildi. Spin kolonun yerleştiği tüp atıldı. QIAGEN spin kolon 1.5 mL'lik ependorf tüpe yerleştirildi.
16. Spin kolonun kapağı dikkatlice açıldı ve 200 µL AE ayırma solüsyonu kolonun tam ortasına gelecek şekilde ilave edildi, kolonun kapağı kapatıldı.
17. Tüpler 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 6000×g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüje edildi.
18. QIAGEN spin kolon atıldı. İçinde AE ayırma solüsyonu ve DNA bulunan ependorf tüpünün kapağı kapatıldı.
19. Elde edilen DNA'lar RT-PCR için -20°C derin dondurucuda saklandı.

DNA Denatürasyonu ve Amplifikasyonu

RT-PCR için QIAGEN Artus EBV Rotor-Gene PCR kiti kullanıldı.

1. Reaktifler ve DNA örnekleri derin dondurucudan çıkarılıp oda sıcaklığına (18°C-25°C) getirildi.
2. Kit içinde bulunan standartlar (4 adet), master miks, negatif kontrol, internal kontrol ile DNA örnekleri vortekslendi ve kısa süre santrifüje edildi.
3. Buzdolabından ısı bloğu çıkartıldı.
4. Isı bloğuna 0,2 mL'lik PCR tüpleri yerleştirildi (DNA örnekleri, 4 adet standart, 1 adet negatif kontrol için).
5. Her DNA örneği/standart/negatif kontrol için 30 µL master miks ve 2 µL internal kontrol olacak şekilde karışım hazırlandı.
6. Karışımdan ısı bloğundaki PCR tüplerine 30 µL dağıtıldı.
7. Tüplere 20 µL örnek/standart/negatif kontrol ilave edildi; kapağı kapatıldı.
8. Tüpler Rotor-Gene 3000 cihazına yerleştirildi.
9. Standart konsantrasyonları cihaza kaydedildi.

Standart 1..... 5×10^7 kopya/mL

Standart 2..... 5×10^6 kopya/mL

Standart 3..... 5×10^5 kopya/mL

Standart 4..... 5×10^4 kopya/mL

10. Denatürasyon ve amplifikasyon işlemi cihazda gerçekleştirildi.

Denatürasyon

Siklus	1
Sıcaklık değişimleri	1.Segment
Hedef sıcaklık	95 °C
İnkübasyon süresi	10 dakika

Amplifikasyon

Siklus	45		
Sıcaklık değişimleri	Segment 1	Segment 2 (FAM, JOE)	Segment 3
Hedef sıcaklık	95 °C	65 °C	72 °C
İnkübasyon süresi	15 saniye	30 saniye	20 saniye

11. Veriler Rotor-Gene 3000 6.0.23 analiz programında değerlendirildi.

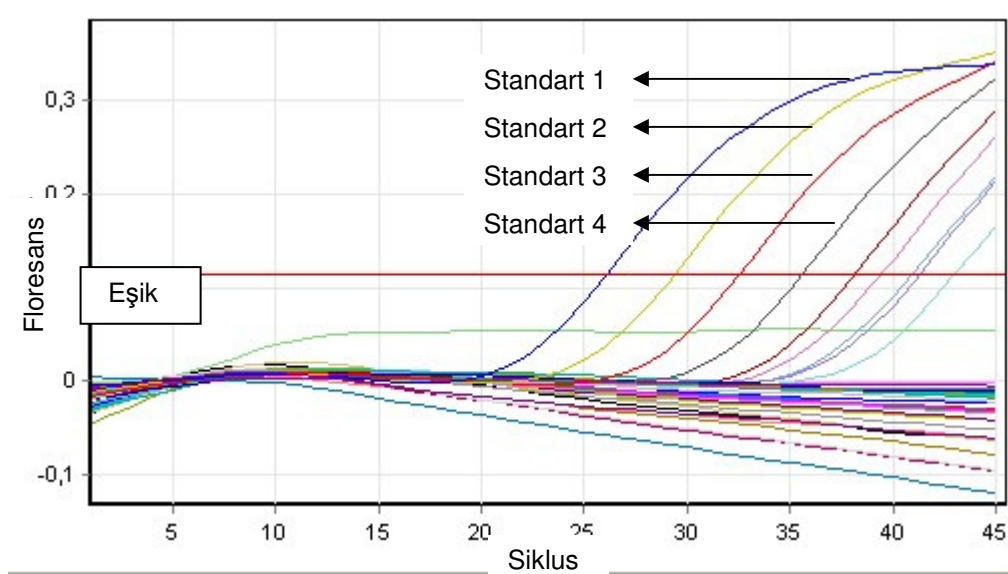
Değerlendirme

Rotor-Gene 3000 cihazında RT-PCR ile elde edilen ürünlerin analizinde 2 floresan boyadan (FAM, JOE) yararlanır. Reaksiyon sırasında floresan yoğunluğunun monitörize edilmesi PCR ürünlerinin kantitatif olarak saptanmasını sağlar. EBV-spesifik sinyaller FAM, internal kontrol-spesifik sinyaller ise JOE kanalında saptanır. Sonuçta FAM kanalında EBV-DNA varlığı, JOE kanalında muhtemel PCR inhibisyonu kontrol edilir.

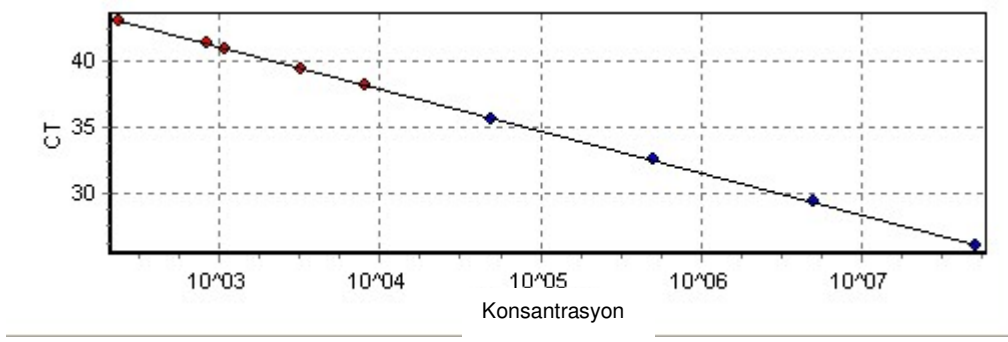
Eksternal kontrollerin (standart 1-4) eşik siklusuna (threshold cycle; CT) ve viral DNA konsantrasyonlarına göre standart eğri oluşturularak örneklerdeki viral DNA miktarı (kopya/mL) saptanır (Şekil-10 ve 11).

Elde edilen sonuçlar şu şekilde yorumlanır:

1. FAM ve JOE kanallarında sinyal pozitif ise örnekte EBV-DNA bulunmaktadır. Ancak örnekte çok yüksek miktarda PCR ürünü bulunduğunda -yarışma nedeniyle- JOE kanalında internal kontrolün floresan sinyalinde azalma veya negatiflik olabilir.
2. FAM kanalında sinyal negatif, JOE kanalında sinyal pozitif ise örnekte EBV-DNA bulunmamaktadır.
3. FAM ve JOE kanallarının ikisinde de sinyal negatif ise muhtemelen bir inhibitörün reaksiyonu inhibe ettiği ya da viral DNA ekstraksiyonunda sorun olabileceği düşünülür; işlemler tekrar edilir.



Şekil-10: Rotor-Gene cihazında kantitatif EBV-DNA (RT-PCR) sonuçlarının değerlendirilmesi.



Şekil-11: Standart eğri. CT: Eşik siklus.

İstatistiksel Analiz

Çalışmamızın istatistiksel analizi SPSS 13,0 (Chicago, IL) programında yapıldı.

Renal transplant grubunda CD4/CD8 oranları medyan minimum ve maksimum değerleri ile ifade edildi. CD4/CD8 değerlerinin transplantasyon öncesine göre transplantasyon sonrası % değişimleri hesaplandı. Bu değişim değerlerinin immüblot serolojik profilleri ile karşılaştırmasında Wilcoxon sıra toplam testi ve Mann Whitney-U testi (kategorik değişkenler sayı ve % ile ifade edilerek) kullanıldı. İmmüblot serolojik profillerinin Paul-Bunnel, VCA-IgG avidite ve EBV-DNA testleri ile karşılaştırılması Fisher'in kesin ki kare testi kullanılarak yapıldı. İmmüblot serolojik profillerinin aylar bazında karşılaştırılmasında Mc Nemar testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Renal transplant grubunda yer alan 62 hastanın hiçbirinde immünblot ile transplantasyon öncesinde seronegatiflik saptanmadı; transplantasyon sonrası herhangi bir döneme ait serum örneklerinde de akut enfeksiyon serolojisi belirlenmedi.

Bu hastalardan 42'sinin (%67,7) tüm serum örneklerinde immünblot sonuçları geçirilmiş enfeksiyon serolojisi ile uyumlu idi; Paul-Bunnel<1/56, VCA IgG yüksek avidite/sınırdan düşük avidite saptandı; 2 hasta (T2,T3) dışında EBV-DNA negatif bulundu (Tablo-6). İmmünblot sonuçları bu grupta bulunan diğer hastalardan 13'ünde reaktivasyon serolojisi, 6'sında izole IgG pozitifliği [VCA IgG (+), VCA IgM (-), EBNA IgG (-), EA IgG (-)] ile uyumlu idi; 1'inde ise VCA IgG (+), VCA IgM (+), EBNA IgG (+), EA IgG (-) saptandı (Tablo-7).

Renal transplant grubunda hastaların 3'ünde (%4,8) PCR ile EBV-DNA pozitifliği bulundu. EBV-DNA pozitifliği 1 hastada (T1) transplantasyon sonrası 1. ay (%1.6); 2 hastada (T2, T3) ise transplantasyon sonrası 3. ay (%3,2) serum örneklerine ait olup; hastaların hiçbirinde EBV enfeksiyonuna bağlı olarak PTLD ve organ reddi gelişmedi. (Tablo-6).

Tablo-6: EBV-DNA pozitifliği saptanan renal transplant hastalarının sonuçları.

Hasta no	Dönem	Paul-Bunnel	İmmünblot					VCA-IgG avidite	CD4/CD8	EBV-DNA
			VCA IgG	EBNA IgG	EA IgG	VCA IgM	EBNA IgM			
T1	Tx sonrası 1.ay	1/7 Pozitif	POZ(+)	POZ(+)	POZ(+)	NEG	NEG	%94-YA	1.4	330 kopya/mL
T2	Tx sonrası 3.ay	1/14 Pozitif	POZ(+)	POZ(+)	NEG	NEG	NEG	%75-YA	2.8	3.574 kopya/mL
T3	Tx sonrası 3.ay	NEG	POZ(+)	POZ(+)	NEG	NEG	NEG	%63-YA	3.4	6.116 kopya/mL

YA: Yüksek avidite.

PCR ile EBV-DNA pozitif bulunan hastalardan 1'inin (T1) eş zamanlı testlerinde immünblot ile reaktivasyon serolojisi, Paul-Bunnel ile $<1/56$ ve VCA-IgG avidite testi ile yüksek avidite belirlendi; CD4/CD8 <1.7 bulundu (Tablo-6). Hastanın transplantasyon öncesi ve transplantasyon sonrası 1. hafta serum örneklerinde immünblot sonuçları geçirilmiş enfeksiyon serolojisi ile uyumlu olup [VCA IgG (+), EBNA IgG (+), EA IgG (-), VCA IgM (-)]; Paul-Bunnel $<1/56$, VCA-IgG yüksek avidite, EBV-DNA negatif idi. Transplantasyon sonrası 3. ay serum örneği hastanın EBV enfeksiyonundan farklı bir nedenle vefat etmesi sonucu alınamadı.

EBV-DNA pozitif bulunan diğer 2 hastanın (T2, T3) eş zamanlı testlerinde immünblot ile geçirilmiş enfeksiyon serolojisi, Paul-Bunnel $<1/56$ ve VCA-IgG yüksek avidite belirlendi (Tablo-6). Bu hastalarda transplantasyon öncesi, transplantasyon sonrası 1. hafta ve 1. ay serum örneklerinde de immünblot sonuçları geçirilmiş enfeksiyon serolojisi ile uyumlu olup; Paul-Bunnel $<1/56$; VCA- IgG yüksek avidite saptanmış; EBV-DNA ise negatif bulunmuştu.

Renal transplant grubunda yer alan toplam 13 hastada (%20,9) immünblot sonuçları reaktivasyon serolojisi ile uyumlu bulundu (Tablo-7). Bu hastalardan 8'inin tüm serum örneklerinde, 5'inin ise sadece 1 örneğinde reaktivasyon serolojisi belirlendi (1'inde transplantasyon öncesi, 2'sinde transplantasyon sonrası 1. hafta, 1'inde transplantasyon sonrası 1. ay, 1'inde transplantasyon sonrası 3. ay). Transplantasyon sonrası 1. ay serum örneğinde reaktivasyon serolojisi saptanan hastanın (T1) eş zamanlı PCR sonucu EBV-DNA 330 kopya/mL ve CD4/CD8 1.4 bulundu (Tablo-6 ve 7).

Renal transplant hastalarında CD4/CD8 oranları, transplantasyon öncesi değerlerine göre transplantasyon sonrası 1. hafta ve 3. ayda anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p=0.030$, $p=0.01$). İmmünblot ile reaktivasyon serolojisi saptanan hastalarda transplantasyon sonrası 3. ay CD4/CD8 oranları transplantasyon öncesi değerlerine göre anlamlı olarak düşük idi ($p=0.05$). Transplantasyon öncesine göre transplantasyon sonrası 3. ay CD4/CD8 % değişim değerleri immünblot ile reaktivasyon serolojisi saptanan hastalarda %48 diğer serolojik profillerin saptandığı hastalarla ise %13

bulundu (p=0.008). Bu hasta grubunda yeterli sayıda EBV-DNA pozitifliği saptanmadığı için CD4/CD8 oranlarına göre istatistiksel analiz yapılamadı.

Tablo-7: Renal transplant hastalarına ait tartışmalı serolojik profillerin EBV-DNA (PCR) ve VCA-IgG avidite test sonuçlarına göre dağılımı.

İmmünblot	Paul-Bunnel		EBV-DNA pozitif	VCA-IgG avidite	
	<1/56	1/56		Yüksek avidite	Sınırdaki avidite
(n=13) Reaktivasyon *	12	1	1	13	-
(n=1) Üçlü pozitiflik **	1	-	-	1	-
(n=6) İzole VCA IgG pozitifliği ***	6	-	-	5	1

* VCA IgG (+), VCA IgM (+/-), EBNA IgG (+), EA IgG (+)

** VCA IgG (+), VCA IgM (+), EBNA IgG (+), EA IgG (-)

*** VCA IgG (+), VCA IgM (-), EBNA IgG (-), EA IgG (-)

İmmünblot ile reaktivasyon serolojisi belirlenen hastaların tümünde VCA-IgG avidite testi ile yüksek avidite saptandı; bir hastanın tek örneğinde Paul-Bunnel ile 1/56 pozitiflik bulundu (Tablo-7).

Renal transplant grubunda yer alan 1 hastanın transplantasyon sonrası 3. ay serum örneğinde immünblot sonucu VCA IgG (+), VCA IgM (+), EBNA IgG (+), EA IgG (-) idi. Yorumlanması genellikle tartışmalı olan bu serolojik profilin saptandığı hastanın eş zamanlı diğer testleri Paul-Bunnel<1/56, VCA-IgG yüksek avidite ve EBV-DNA negatif bulundu (Tablo-7).

Bu grupta bulunan toplam 6 hastada ise (%9,6) izole VCA-IgG pozitifliği saptandı. Bu hastalardan 4'ünün transplantasyon öncesi serum örneklerinde belirlenen bu profile, takip eden iki serum örneğinde (transplantasyon sonrası 1. hafta ve 1. ay) EBNA IgG pozitifliği eklendi; bunlardan 3'ünün son örneklerinde (transplantasyon sonrası 3. ay) tekrar

izole VCA-IgG pozitifliği gözlemlendi. Diğer 2 hastanın ise sadece tek serum örneğinde (transplantasyon sonrası 1. hafta ve transplantasyon sonrası 3. ay) izole IgG pozitifliği saptandı. Bu hastalardan ilkinin eş zamanlı VCA-IgG avidite testi sınırda avidite olarak değerlendirildi (Tablo-7).

Renal transplant grubunda toplam 3 hastanın (%4,8) transplantasyon öncesi serum örneklerinde VCA-IgG düşük avidite bulundu. Bu hastaların eş zamanlı örneklerinde immünblot testi geçirilmiş enfeksiyon serolojisi ile uyumlu olup, Paul-Bunnel<1/56, EBV-DNA negatif sonuçlandı. Takip eden diğer örneklerinde serolojik profil ve PCR sonucu değişmedi ancak VCA-IgG avidite sonuçları değişkenlik gösterdi.

Çocuk onkoloji grubunda yer alan 37 hastadan 4'ünün (%10,8) tüm serum örneklerinde immünblot ve Paul-Bunnel ile seronegatiflik saptandı; 15'inin (%40,5) ise tüm serum örneklerinde immünblot sonuçları geçirilmiş enfeksiyon serolojisi ile uyumlu idi. Bu hastalarda Paul-Bunnel<1/56, VCA-IgG yüksek avidite/sınırda avidite saptandı; 1 hasta dışında (Ç1) EBV-DNA negatif bulundu (Tablo-8). Bu grupta bulunan diğer hastaların farklı dönem serum örneklerinde immünblot sonuçlarına göre akut enfeksiyon serolojisi, reaktivasyon serolojisi, izole IgG pozitifliği ve VCA IgG (+), VCA IgM (+), EBNA IgG (+), EA IgG (-) saptandı (Tablo-9 ve 10).

Çocuk onkoloji grubunda bulunan hastaların 3'ünde (%8,1) PCR ile EBV-DNA pozitifliği saptandı. EBV-DNA pozitifliği 2 hastada (Ç1, Ç2) tedavi öncesi (%5,4), 1 hastada (Ç3) ise tedavi sonrası 3. ay (%2,7) serum örneklerine aitti. Tedavi öncesinde PCR ile EBV-DNA pozitifliği saptanan 2 hasta (Ç1, Ç2) Hodgkin lenfoma, tedavi sonrası 3. ayda EBV-DNA pozitifliği saptanan 1 hasta (Ç3) ise malign histiositoz tanılarıyla takip edildi (Tablo-8).

Tablo-8: EBV-DNA pozitifliği saptanan çocuk onkoloji hastalarının sonuçları.

Hasta no	Dönem	Paul-Bunnet	İmmünblot					VCA-IgG avidite	EBV-DNA
			VCA IgG	EBNA IgG	EA IgG	VCA IgM	EBNA IgM		
Ç1	Tedavi öncesi	NEG	POZ(+)	POZ(+)	NEG	NEG	NEG	%59- SA	332 kopya/mL
Ç2	Tedavi öncesi	NEG	POZ(+)	POZ(+)	POZ(+)	NEG	NEG	%86-YA	4599 kopya/mL
Ç3	Tedavi sonrası 3. ay	NEG	POZ(+)	POZ(+)	NEG	POZ(+)	NEG	%75-YA	908 kopya/mL

SA: Sınırdaki avidite, **YA:** Yüksek avidite.

PCR ile EBV-DNA pozitif bulunan ilk hastanın (Ç1) eş zamanlı testlerinde immünblot ile geçirilmiş enfeksiyon serolojisi, Paul-Bunnet<1/56 ve VCA-IgG sınırdaki avidite saptandı (Tablo-8). Hastanın tedavi sonrası 1. ay, 3. ay ve 6. ay serum örneklerinin tümünde immünblot sonuçları geçirilmiş enfeksiyon serolojisi ile uyumlu bulundu; Paul-Bunnet<1/56, VCA-IgG yüksek avidite, EBV-DNA negatif sonuçlandı.

EBV-DNA pozitif bulunan 2. hastanın (Ç2) eş zamanlı testlerinde immünblot ile reaktivasyon serolojisi, Paul-Bunnet<1/56 ve VCA-IgG yüksek avidite saptandı (Tablo-8). Hastanın tedavi sonrası 1. ay, 3. ay ve 6. ay serum örneklerinin tümünde immünblot sonuçları reaktivasyon serolojisi ile uyumlu bulundu; Paul-Bunnet<1/56, VCA IgG yüksek avidite, EBV-DNA negatif sonuçlandı.

EBV-DNA pozitif bulunan 3. hastanın (Ç3) eş zamanlı testlerinde immünblot ile VCA IgG (+), EBNA IgG (+), VCA IgM (+), EA IgG (-); Paul-Bunnet<1/56; VCA-IgG yüksek avidite belirlendi (Tablo-8 ve 9). Hastanın tedavi öncesi serum örneğinde immünblot sonuçları akut enfeksiyon serolojisi ile uyumlu bulundu [VCA IgG (+), VCA IgM (+), EBNA IgG (-), EA IgG (-)]; Paul-Bunnet<1/56, VCA-IgG sınırdaki avidite, EBV-DNA negatif saptandı (Tablo-9). Tedavi sonrası 1. ay serum örneğinde immünblot ile izole IgG pozitifliği, Paul-Bunnet<1/56, VCA-IgG sınırdaki avidite, EBV-DNA negatif bulundu. Tedavi sonrası 6. ay serum örneğinde immünblot serolojisi tedavi sonrası 3. ay ile benzer olup; Paul-Bunnet<1/56, VCA-IgG yüksek avidite, EBV-DNA negatif sonuçlandı (Tablo-9).

Çocuk onkoloji grubunda bulunan ve tedavi öncesi serumlarında immüblot ile akut enfeksiyon serolojisi belirlenen 3 hastanın (%8,1) eş zamanlı ve diğer örneklerindeki test sonuçları Tablo-9'da gösterilmiştir.

Tablo-9: Tedavi öncesi serum örneklerinde immüblot ile akut enfeksiyon serolojisi saptanan çocuk onkoloji hastalarının sonuçları.

Hasta no	Immüblot serolojisi/ Paul-Bunnel/ VCA-IgG avidite testi/ EBV-DNA (PCR) sonuçları			
	Tedavi öncesi	Tedavi sonrası 1. ay	Tedavi sonrası 3. ay	Tedavi sonrası 6. ay
1	Akut enfeksiyon * P-B: <1/56 Avidite: DA PCR: Negatif	İzole IgG pozitifliği ** P-B: <1/56 Avidite: YA PCR: Negatif	İzole IgG pozitifliği ** P-B: <1/56 Avidite: DA PCR: Negatif	Diğer *** P-B: <1/56 Avidite: DA PCR: Negatif
2	Akut enfeksiyon * P-B: <1/56 Avidite: YA PCR: Negatif	Geçirilmiş enfeksiyon **** P-B: <1/56 Avidite: YA PCR: Negatif	Geçirilmiş enfeksiyon **** P-B: <1/56 Avidite: YA PCR: Negatif	Reaktivasyon ***** P-B: 1/56 pozitif Avidite: YA PCR: Negatif
3 (Ç3)	Akut enfeksiyon * P-B: <1/56 Avidite: SA PCR: Negatif	İzole IgG pozitifliği ** P-B: <1/56 Avidite: SA PCR: Negatif	Üçlü pozitiflik ***** P-B: <1/56 Avidite: YA PCR: Pozitif	Üçlü pozitiflik ***** P-B: <1/56 Avidite: YA PCR: Negatif

P-B: Paul-Bunnel, **DA:** Düşük avidite, **YA:** Yüksek avidite, **SA:** Sınırdaki avidite

* VCA IgG (+), EBNA IgG (-), VCA IgM (+), EA IgG (-/+)

** VCA IgG (+), EBNA IgG (-), VCA IgM (-), EA IgG (-)

*** VCA IgG (+), EBNA IgG (-), VCA IgM (-), EA IgG (-), EBNA IgM(+)

**** VCA IgG (+), EBNA IgG (+), VCA IgM (-), EA IgG (-)

***** VCA IgG (+), EBNA IgG (+), VCA IgM (+/-), EA IgG (+)

***** VCA IgG (+), EBNA IgG (+), VCA IgM (+), EA IgG (-)

Tedavi öncesi immüblot sonuçları akut enfeksiyon serolojisi ile uyumlu bulunan 3 hastanın da eş zamanlı serum örneklerinde EBV-DNA negatif bulundu (Tablo-9). Ayrıntıları yukarıda açıklanan bir hasta (hasta no:3/Ç3) dışında çalışma süresince diğer 2 hastada EBV-DNA sonuçları değişmedi; Paul-Bunnel ile anlamlı düzeyde pozitiflik saptanmadı. VCA-IgG avidite testi ile 2 no'lu hastanın 4 serum örneğinde de yüksek avidite

belirlenirken; 1 no'lu hastanın avidite sonuçları sırasıyla düşük avidite, yüksek avidite, düşük avidite, düşük avidite olarak değerlendirildi. Benzer biçimde bu 2 hastanın immüblot serolojisi de takip eden serum örneklerinde değişkenlik gösterdi (Tablo-9).

Çocuk onkoloji grubunda yer alan toplam 11 hastada (%29,7) immüblot sonuçları reaktivasyon serolojisi ile uyumlu bulundu (Tablo-10). Bu hastalardan 3'ünün tüm serum örneklerinde, 8'inin ise sadece 1 örneğinde reaktivasyon serolojisi belirlendi (1'inde tedavi sonrası 1. ay, 1'inde tedavi sonrası 3. ay, 6'sında ise tedavi sonrası 6. ay). İmmüblot ile reaktivasyon serolojisi, tedavi sonrası 6. ayda tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p=0.031$). Tüm serum örneklerinde immüblot sonuçları reaktivasyon serolojisi ile uyumlu bulunan bir hastanın (Ç2) tedavi öncesi örneğinde PCR ile EBV-DNA 4599 kopya/mL saptandı (Tablo-8 ve 10).

İmmüblot ile reaktivasyon serolojisi belirlenen hastaların 8'inde VCA-IgG yüksek avidite, 3'ünde sınırda avidite bulundu (Tablo-10); bir hastanın (hasta no 2) tek örneğinde Paul-Bunnel ile 1/56 pozitiflik saptandı (Tablo-9 ve 10).

Tablo-10: Çocuk onkoloji hastalarına ait tartışmalı serolojik profillerin EBV-DNA (PCR) ve VCA-IgG avidite test sonuçlarına göre dağılımı.

İmmüblot	Paul- Bunnel		EBV-DNA pozitif	VCA-IgG avidite		
	<1/56	1/56		Yüksek avidite	Sınırda avidite	Düşük avidite
(n=11) Reaktivasyon *	10	1	1	8	3	-
(n=3) Üçlü pozitiflik **	3	-	1	3	-	-
(n=4) İzole VCA IgG pozitifliği ***	4	-	-	2	1	1

* VCA IgG (+), VCA IgM (+/-), EBNA IgG (+), EA IgG (+)

** VCA IgG (+), VCA IgM (+), EBNA IgG (+), EA IgG (-)

*** VCA IgG (+), VCA IgM (-), EBNA IgG (-), EA IgG (-)

Çocuk onkoloji grubunda yer alan 3 hastadan (%8,1) 1'inin tedavi öncesi, 1'inin tedavi sonrası 1. ay, 1'inin (Ç3) ise tedavi sonrası 3.ay ve 6. ay serum örneklerinde immünblot sonuçları VCA IgG (+), VCA IgM (+), EBNA IgG (+), EA IgG (-) bulundu (Tablo-9 ve 10). Bu serolojik profilin saptandığı serum örneklerinde eş zamanlı Paul- Bunnel<1/56, VCA-IgG yüksek avidite idi. Hastalardan 1'inin (Ç3) sadece tedavi sonrası 3. ay serum örneğinde EBV-DNA 908 kopya/mL saptandı (Tablo-8, 9 ve 10).

Bu grupta bulunan toplam 4 hastada (%10.8) izole VCA IgG pozitifliği gözlemlendi (1'inin üç, 2'sinin iki, 1'inin ise tek serum örneğinde). Hastaların bu profili gösteren tüm serum örneklerinde çalışılan eş zamanlı testleri Paul-Bunnel<1/56, EBV-DNA negatif sonuçlandı; sadece 1 hastanın transplant sonrası 3. ay serum örneğinde VCA-IgG düşük avidite saptandı (Tablo-9 ve 10).

Çalışmanın immünsüprese olmayan kontrol grubunu oluşturan 50 hastada immünblot ile seronegatiflik saptanmadı; 14'ü erişkin, 11'i çocuk toplam 25 hastada (%50) immünblot sonuçları geçirilmiş enfeksiyon serolojisi ile uyumlu bulundu. Bu hastaların 21'inde Paul-Bunnel<1/56, VCA-IgG yüksek avidite ve EBV-DNA negatif idi. İmmünblot ile geçirilmiş enfeksiyon serolojisi saptanan diğer 4 hastadan 3'ünde (1'i erişkin, 2'si çocuk) Paul-Bunnel≤1/56, VCA-IgG sınırdaki avidite, EBV-DNA negatif bulundu. Çocuk yaş grubundaki diğer hastada (K2) ise Paul-Bunnel negatif, VCA-IgG yüksek avidite, EBV-DNA pozitif saptandı (Tablo-11). İmmünblot sonuçları geçirilmiş enfeksiyon serolojisi ile uyumlu olan çocukların %81'inde VCA-IgG yüksek avidite bulundu (p<0.001) (Tablo-12). İmmünblot sonuçları bu grupta bulunan diğer hastaların 14'ünde (%28) akut enfeksiyon, 6'sında (%12) reaktivasyon serolojisi ile uyumlu idi; 2'sinde (%4) izole IgG pozitifliği, 3'ünde (%6) ise VCA IgG (+), VCA IgM (+), EBNA IgG (+), EA IgG (-) saptandı.

Tablo-11: EBV-DNA pozitifliği saptanan kontrol grubu hastalarının sonuçları.

Hasta no	Yaş grubu	Paul-Bunnet	İmmünblot					VCA- IgG avidite	EBV-DNA
			VCA IgG	EBNA IgG	EA IgG	VCA IgM	EBNA IgM		
K1	Ç	1/112 POZ(+)	POZ(+)	NEG	NEG	POZ(+)	POZ(+)	%12-DA	1.162 kopya/mL
K2	Ç	NEG	POZ(+)	POZ(+)	NEG	NEG	NEG	%83-YA	1.415 kopya/mL
K3	Ç	1/14 POZ(+)	POZ(+)	NEG	NEG	NEG	NEG	%51-SA	177 kopya/mL
K4	Ç	1/14 POZ(+)	POZ(+)	NEG	POZ(+)	POZ(+)	NEG	%29-DA	2.298 kopya/mL
K5	Ç	1/28 POZ(+)	POZ(+)	POZ(+)	POZ(+)	POZ(+)	POZ(+)	%18-DA	9.265 kopya/mL
K6	Ç	1/448 POZ(+)	POZ(+)	NEG	POZ(+)	POZ(+)	POZ(+)	%30-DA	275 kopya/mL
K7	Ç	1/56 POZ(+)	POZ(+)	NEG	POZ(+)	POZ(+)	POZ(+)	%13-DA	1.372 kopya/mL
K8	E	1/56 POZ(+)	POZ(+)	NEG	NEG	POZ(+)	POZ(+)	%8-DA	79 kopya/mL
K9	Ç	1/14 POZ(+)	POZ(+)	NEG	POZ(+)	POZ(+)	NEG	%29-DA	1.244 kopya/mL
K10	E	1/448 POZ(+)	POZ(+)	NEG	POZ(+)	POZ(+)	POZ(+)	%80-YA	514 kopya/mL

* Ç:Çocuk, E:Erişkin

** DA:Düşük avidite, YA:Yüksek avidite, SA:Sınırdaki avidite

Tablo-12: Çocuk yaş grubu kontrol hastalarına ait serolojik profillerin EBV-DNA (PCR) ve VCA-IgG avidite test sonuçlarına göre dağılımı.

İmmünblot	Paul-Bunnel		EBV-DNA pozitif	VCA-IgG avidite	
	<1/56	≥1/56		Yüksek avidite	Sınırdaki/Düşük avidite
(n=1) Reaktivasyon	1	-	1	-	1
(n=3) Üçlü pozitiflik	3	-	-	2	1
(n=2) İzole IgG pozitifliği	2	-	1	-	2
(n=11) Geçirilmiş enfeksiyon	10	1	1	9*	2
(n=11) Akut enfeksiyon	8	3	5	-	11*

* p<0.001

Kontrol grubunda immünblot sonuçları akut enfeksiyon serolojisi ile uyumlu; 3'ü erişkin, 11'i çocuk toplam 14 hastanın 7'sinde (K1, K4, K6, K7, K8, K9, K10) EBV-DNA pozitif (%50) bulundu (Tablo-11). EBV-DNA pozitif hastaların 6'sında düşük avidite, 5'inde Paul-Bunnel≥1/56 saptandı. EBV-DNA negatif bulunan diğer 7 hastada VCA-IgG düşük avidite, Paul-Bunnel<1/56 idi. İmmünblot sonuçları akut enfeksiyon ile uyumlu olan 14 hastanın 13'ünde (%93) VCA-IgG düşük avidite saptandı (çocuk hastalar için p<0.001, erişkin hastalar için p=0.038) (Tablo-12 ve 13). Ayrıca immünblot sonuçları akut enfeksiyon serolojisi ile uyumlu olan erişkin kontrol hastalarında Paul-Bunnel≥1/56 (p=0.013), EBV-DNA pozitifliği (p=0.013) istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo-13).

Tablo-13: Erişkin yaş grubu kontrol hastalarına ait serolojik profillerin EBV-DNA (PCR) ve VCA-IgG avidite test sonuçlarına göre dağılımı.

İmmünblot	Paul- Bunnel		EBV-DNA pozitif	VCA-IgG avidite	
	<1/56	≥1/56		Yüksek avidite	Sınırdan/Düşük avidite
(n=5) Reaktivasyon	5	-	-	5	-
(n=14) Geçirilmiş enfeksiyon	14	-	-	13	1
(n=3) Akut enfeksiyon	1	2*	2*	1	2**

* p=0.013

** p=0.038

Kontrol grubunda yer alan hastaların 10'unda (%20) PCR ile EBV-DNA pozitif bulundu. Bu hastaların 2'si erişkin, 8'i çocuk yaş grubunda idi (Tablo-11). EBV-DNA pozitif bulunan ve immünblot ile akut enfeksiyon serolojisi belirlenen 2 erişkin hastadan 1'inde (K8) Paul-Bunnel 1/56 pozitif, VCA-IgG düşük avidite, EBV-DNA 79 kopya/mL; diğesinde (K10) Paul-Bunnel 1/448 pozitif, VCA-IgG yüksek avidite, EBV-DNA 514 kopya/mL saptandı (Tablo-11).

Kontrol grubunda yer alan ve EBV-DNA pozitif bulunan 8 çocuğun 3'ünde (%6) (K1, K6, K7) immünblot ile akut enfeksiyon serolojisi, Paul-Bunnel ile ≥1/56 pozitiflik, VCA-IgG avidite testi ile düşük avidite belirlendi. EBV-DNA pozitif olup, immünblot ile akut enfeksiyon serolojisi, VCA-IgG avidite testi ile düşük avidite saptanan 2 çocuk hastada (K4, K9) ise Paul-Bunnel 1/14 pozitif bulundu (Tablo-11).

EBV-DNA pozitif bulunan diğere 3 çocuk hastanın 1'inde (K2) immünblot ile geçirilmiş enfeksiyon serolojisi, Paul-Bunnel negatif, VCA-IgG yüksek avidite saptandı. EBV-DNA 177 kopya/mL bulunan ve immünblot ile izole VCA-IgG pozitifliği gözlenen diğere hastada (K3) Paul-Bunnel 1/14 pozitif, VCA-IgG sınırdan avidite olarak değerlendirildi. EBV-DNA pozitif bulunan 3. çocuk hastada ise (K5) immünblot ile reaktivasyon serolojisi

saptandı; Paul-Bunnel 1/28 pozitif, VCA-IgG düşük avidite bulundu (Tablo-11).

Kontrol grubunda bulunan ve immünblot sonuçları reaktivasyon serolojisi ile uyumlu olan toplam 6 hastadan (%12) 1'i çocuk (K5), 5'i erişkin yaş grubunda idi. Erişkin hastaların tümünde EBV-DNA negatif, VCA-IgG yüksek avidite, Paul-Bunnel<1/56 bulundu.

Bu grupta yer alan ve çocuk yaş grubunda bulunan 3 hastada (%6) immünblot sonucu VCA IgG (+), VCA IgM (+), EBNA IgG (+), EA IgG (-) idi. Yorumlanması genellikle tartışmalı olan bu serolojik profilin saptandığı hastaların tümünde Paul-Bunnel<1/56, EBV-DNA negatif bulundu; 2'sinde VCA-IgG yüksek avidite, 1'inde sınırdaki avidite olarak değerlendirildi.

Kontrol grubundaki 2 çocuk hastada (%4) immünblot ile izole IgG pozitifliği saptandı. EBV-DNA sonucu hastalardan birinde (K3) pozitif (Tablo-11), diğerinde negatif olup; her 2 hastada da Paul-Bunnel<1/56, VCA-IgG sınırdaki avidite bulundu.

Kontrol grubunda yer alan 4'ü çocuk, 2'si erişkin toplam 6 hastada (%12) Paul-Bunnel≥1/56 bulundu. Bu hastaların 5'inde (%83.3) (K1, K6, K7, K8, K10) EBV-DNA pozitif, immünblot sonucu akut enfeksiyon serolojisi ile uyumlu idi; 4'ünde (%66.6) VCA-IgG düşük avidite (K1, K6, K7, K8) saptandı (Tablo-11).

Bu grupta bulunan 12'si çocuk, 2'si erişkin toplam 14 hastada VCA-IgG avidite testi ile düşük avidite saptandı. Hastaların 7'sinde (%50) EBV-DNA pozitif, 4'ünde (%28) Paul-Bunnel≥1/56, 13'ünde (%93) immünblot sonucu akut enfeksiyon serolojisi ile uyumlu bulundu (Tablo-14).

Tablo-14: EBV VCA-IgG düşük avidite saptanan kontrol hastalarında test sonuçlarının yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş grubu	EBV-DNA		Paul- Bunnel		İmmünblot Serolojisi	
	Pozitif	Negatif	<1/56	≥1/56	Akut enfeksiyon	Reaktivasyon
(n:12) Çocuk	6	6	9	3	11	1
(n:2) Erişkin	1	1	1	1	2	-

TARTIŞMA VE SONUÇ

EBV ile oluşan primer enfeksiyonlar çoğunlukla asemptomatik seyretmekle birlikte, adölesan ve genç erişkinlerde EM tablosuna da neden olabilir. İmmünkompetan konakta nadiren kronik aktif EBV enfeksiyonu geliştiği bildirilmiştir. Ayrıca Burkitt lenfoma, Hodgkin lenfoma, nazofarengeal karsinoma gibi çeşitli kanserlerin ve transplantasyon sonrası immünsüprese konakta ortaya çıkan PTLD'nin etiyolojisinde de EBV enfeksiyonu yer almaktadır (74).

İmmünkompetan ve immünsüprese kişilerde -farklı tedavi stratejilerini gerektirdiği için- EBV enfeksiyonlarının tanısında uygun yöntemlerin seçimi önem taşır. Özellikle immünsüprese hastalarda terapötik müdahale zamanı kritik bir öneme sahiptir. Bu nedenle EBV replikasyonunu erken saptayan, pozitif prediktif değeri yüksek olan ve tedavinin izlenmesine olanak sağlayan tanı yöntemleri seçilmelidir. Ancak böylece etkin bir preemptif tedavi gerçekleştirilebilir. Bu amaçla EBV veya EBV-DNA'sını saptayabilen direkt tanı yöntemlerinden yararlanılır (3).

İmmünkompetan kişilerde ise EBV enfeksiyonu tanısında serolojik profilin belirlenmesi anahtar rol oynar. Tanıda genellikle serolojik testlerden yararlanan bu grupta, EBV serolojisi büyük oranda değişkenlik göstermekle birlikte, sonuçları yorumlamak mümkün olabilmektedir (3).

Çalışmamızda, renal transplant ve çocuk onkoloji grubunda bulunan immünsüprese hastalardan belirli aralıklarla alınan serum örneklerinde Paul-Bunnet ve immünblot ile EBV serolojisi belirlendi. Serolojik profiller VCA-IgG avidite ve EBV-DNA sonuçlarına göre irdelendi. Ayrıca kontrol grubunu oluşturan immünkompetan kişilerde testlerin etkinliği hasta bazında değerlendirildi ve immünsüprese hasta gruplarının verileri ile karşılaştırıldı. İmmünsüprese hasta popülasyonunda belirli bir zaman diliminde ortaya çıkması muhtemel EBV enfeksiyonlarının tanısında, rutinde kullanılan testlerin etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan bu prospektif çalışma; renal

transplant ve çocuk onkoloji hastalarını birlikte içeren ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

EBV primer enfeksiyondan sonra B lenfositlerinde latent kalarak ömür boyu süren persistan enfeksiyonlar oluşturabilir. Bu nedenle EBV ile ilişkili hastalıkların tanısında rutin laboratuvar testleri yetersiz kalabilmektedir. Dolayısıyla bu hastalıkların tanısı, takibi ve patogenezinin araştırılması için viral yükün belirlenmesi önem taşır (74).

Moleküler teknolojideki gelişmeler EBV genomunun hızlı ve doğru olarak ölçümüne olanak sağlamaktadır. Ancak viral yükün saptanabileceği en uygun örnek türü EBV ile ilişkili hastalığa göre değişmektedir (Tablo-4). Ayrıca laboratuvarlar arasında örnek türü, EBV saptama tekniği, viral yük değerleri arasında ortak bir fikir birliği oluşmamıştır. RT-PCR, EBV ile ilişkili hastalıkların tanı ve takibinde kullanılan hızlı ve güvenilir bir yöntem olmakla birlikte uluslararası karşılaştırmalı çalışmalar için standardize edilmelidir (74).

Organ transplantasyonlarından sonra uzun süre immünsüpresif tedavi uygulanması, hastalarda immün sistemi baskılamakta ve enfeksiyonların yanı sıra neoplastik hastalıkların gelişme riskini de artırmaktadır. Transplantasyondan sonra gelişen komplikasyonlardan biri olan PTLD, genellikle EBV enfeksiyonu ile birlikte görülen ve çok farklı klinik bulgularla seyreden enfeksiyon ve neoplazma arasında bir hastalıktır. Uygulanan immünsüpresif rejimin tipine bağlı olarak hastalık, transplantasyondan sonra değişik süreler içinde ortaya çıkar (75). Transplantasyondan sonraki ilk yıl içinde ortaya çıkan erken PTLD, primer EBV enfeksiyonu olgularında görülmesine rağmen hastalarda PTLD gelişme riski hayat boyu devam etmektedir. PTLD insidansı transplantasyonun tipine göre değişmektedir (böbrek transplantasyonu için %1). Günümüzde PTLD'nin ön/kesin tanısı, tedavi etkinliğinin belirlenmesi ve korunmada EBV-DNA ölçümünden yararlanılmaktadır (74).

Transplantasyondan önce seronegatif olan yüksek riskli hastalarda viral yükün belirlenmesi daha yararlıdır. Viral DNA klinik bulgular oluşmadan aylar önce saptanabilmekte, böylece yüksek riskli hastalarda preemtif tedavi planlanabilmektedir (76). Bununla birlikte bazı transplant hastalarında yüksek

EBV-DNA yüküne rağmen aylar veya yıllarca PTLD gelişmediği bildirilmiştir. Ayrıca yüksek viral yükün saptandığı asemptomatik EBV reaktivasyonu da transplantasyon sonrası uzun süreli takiplerde gösterilmiştir (74).

Toyoda ve ark. (77) çocuk ve erişkin renal transplant alıcılarında yaptıkları retrospektif çalışmada, özellikle çocuk yaş grubunda ortaya çıkan EBV ile ilişkili PTLD'nin erken tanısında EBV-DNA testinin önemini vurgulamışlar; PTLD gelişmesinin önlenmesinde de testin yardımcı olabileceğini bildirmişlerdir.

Cavallo ve ark. (78) da erişkin yaş grubundaki renal transplant hastalarını transplantasyondan sonra 1 yıl takip etmişler; hastaların %24,8'inde EBV-DNA pozitifliği bildirmişlerdir. EBV-DNA pozitifliğini ilk 3 ayda (%11,8), 3-12 ay (%7,8) dönemine göre daha yüksek oranda saptamışlar; genellikle viral yükün düşük düzeylerde bulunduğunu ve hastaların hiçbirinde PTLD gelişmediğini vurgulamışlardır.

Çalışmamızda erişkin renal transplant hastaları transplantasyondan sonraki 3 aylık dönemde takip edildi. Hastaların tümünde transplantasyon öncesi EBV seropozitifliği mevcuttu. Transplantasyon sonrası 3 hastada (%4,8) EBV-DNA pozitifliği saptandı. Viral yük düzeyi 2 hastada yüksek, 1 hastada ise düşük bulundu. Takip süresince hastaların hiçbirinde EBV enfeksiyonu ile ilişkili PTLD gelişmedi.

Carpentier ve ark. (79) çocuk transplant hastalarında PTLD gelişme riskini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, periferik kan EBV-DNA yükü ile anti-EA IgG düzeylerinin birlikte değerlendirilmesinin prognostik önemi olabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da renal transplant hastalarından 1'inde (T1) EBV-DNA (330 kopya/mL) ve anti-EA IgG pozitifliği saptandı (Tablo-6). Transplantasyon sonrası 1. ay serum örneğinin alınmasından kısa süre sonra hasta vefat ettiği için bu profilin PTLD prognozu ile ilişkisi belirlenemedi. EBV-DNA düzeyleri yüksek olan diğer 2 hastada ise anti-EA IgG pozitifliği saptanmadı.

Jabs ve ark. (80) 23 renal transplant hastasının 13'ünde immünsüpresif tedaviden sonraki ilk hafta içinde (ortalama 3 gün) RT-PCR ile EBV reaktivasyonu saptamışlar; bu hastaların 10'unda 2-45 gün sonra organ

reddi geliştiğini; erken EBV reaktivasyonu ile akut rejeksiyon arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunduğunu bildirmişlerdir. EBV-DNA pozitif 13 hastanın 4'ünde, EBV-DNA negatif 10 hastanın ise 3'ünde reaktivasyon serolojisi belirlemişler ve bu hasta grubunda serolojinin erken EBV reaktivasyonu tanısında yardımcı olmadığını vurgulamışlardır.

Çalışmamızda renal transplant hastalarında, CD4/CD8 oranları transplantasyon öncesi değerlerine göre transplantasyon sonrası 1. hafta ve 3. ayda anlamlı olarak düşük bulunmakla birlikte EBV enfeksiyonu ile ilişkili organ reddi gelişmedi. Organ reddi oluşan 2 transplant hastasında ise immünblot sonucu reaktivasyon serolojisini desteklemedi, EBV-DNA negatif bulundu. İmmünblot sonucu reaktivasyon serolojisi ile uyumlu 13 renal transplant hastasının tümünde VCA-IgG yüksek avidite saptandı; 3. ay serum örneği alınamayan bir hasta (T1) dışında EBV-DNA negatif bulundu (Tablo-6 ve 7).

Çalışmamızda immünkompetan hastalardan oluşan kontrol grubunda immünblot sonuçları reaktivasyon serolojisi ile uyumlu olan toplam 6 hastadan (%12) 5'i erişkin yaş grubunda idi. Erişkin hastaların tümünde renal transplant hastaları ile benzer şekilde EBV-DNA negatif, VCA-IgG yüksek avidite, Paul-Bunnel<1/56 bulundu.

Buna göre erişkin renal transplant hastalarına ait veriler,

- Transplantasyonu takip eden 3 aylık dönemde PTLD riskinin bulunmadığını;
- EBV reaktivasyonunun değerlendirilmesinde serolojinin tek başına yetersiz kalabileceğini;
- Transplantasyon sonrası 3 aylık dönemde reaktivasyonu değerlendirmek için serolojik testlere ek olarak VCA-IgG avidite testi ve viral yük saptama yöntemlerinin yararlı olduğunu göstermiştir.

Burkitt lenfoma, nazofarengeal karsinoma, Hodgkin ve non-Hodgkin lenfoma gibi maligniteler ile EBV arasındaki etiyolojik ilişki uzun zamandan beri bilinmektedir. EBV ile ilişkili malignitelerde bazı kofaktörlerin de etkisi bulunmakla birlikte; bu hastalarda tedavi öncesi ve/veya sonrası dönemde

EBV-DNA'sının saptanması hem etiyolojinin hem de prognozun belirlenmesinde önemli olabilmektedir. Naresh ve ark. (81) standart radyoterapi/kemoterapi ile tedavi edilen değişik yaş gruplarındaki klasik Hodgkin hastalarında, EBV ile etiyolojik ilişkinin sağkalım avantajı sağladığını göstermişlerdir.

Gandhi ve ark. (82) da farklı yaş gruplarındaki Hodgkin lenfoma hastalarının hem periferik kan mononükleer hücre (PBMC) hem de plazma örneklerinde RT-PCR ile EBV-DNA'sını araştırmışlar; plazma örneklerinde duyarlılık ve özgüllüğün PBMC örneklerine göre çok daha iyi olduğunu vurgulamışlardır. Bu yöntemin EBV pozitif Hodgkin lenfoma hastalarında invazif olmayan bir belirteç olarak kullanılabileceğini; seri ölçümler ile tedaviye yanıtın değerlendirilebileceğini belirtmişlerdir.

Wagner ve ark. (83) çocuk yaş grubundaki Hodgkin lenfoma hastalarının plazma ve PBMC örneklerinde tedavi öncesi ve sonrasında RT-PCR ile EBV-DNA araştırmışlar; EBV seropozitif 24 hastanın 13'ünde tedavi öncesi plazma örneklerinde EBV-DNA saptamışlardır. Tedaviden sonra stabil remisyonda olan hastalarda EBV-DNA negatif, relaps gelişen 5 hastadan 2'sinde EBV-DNA pozitif bulmuşlar; viral yükün saptandığı hastalarda eş zamanlı anti-EA IgG ile korelasyon bulunmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar Hodgkin lenfomanın tanısı, takibi ve prognozunun değerlendirilmesinde EBV viral yük tayininin invaziv olmayan yararlı bir yöntem olabileceğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda çocuk onkoloji grubunda bulunan ve tedavi öncesi serum örneklerinde RT-PCR ile EBV-DNA pozitifliği saptanan 2 hasta (Ç1, Ç2) Hodgkin lenfoma tanısı ile takip ve tedavi edildi. Hastalardan birinde (Ç1) eş zamanlı immünblot sonucu geçirilmiş enfeksiyon serolojisi ile uyumlu olup, VCA-IgG sınırdan aşım, EBV-DNA 332 kopya/mL saptandı. Diğer hastada (Ç2) eş zamanlı immünblot sonucu reaktivasyon serolojisi ile uyumlu olup, VCA-IgG yüksek avidite, EBV-DNA 4599 kopya/mL bulundu. Her iki hastanın tedavi sonrası 1.ay, 3.ay ve 6.ay serum örneklerinde immünblot sonuçları değişmedi, EBV-DNA negatifleşti (Tablo-8). Hastaların 1 yılı aşkın süredir remisyonda olduğu belirlendi. Hasta sayısı yeterli olmamakla birlikte; EBV ile

ilişkili malignitesi olan çocuk hastalarda tedavi öncesi RT-PCR ile EBV-DNA araştırılmasının tanı, takip ve prognozu değerlendirmek açısından yararlı olabileceği sonucuna varıldı.

Chan ve ark. (84, 85) nazofarengeal karsinoma, Hodgkin lenfoma, NK/T lenfoma gibi EBV ilişkili tümörlerde periferik kan EBV-DNA pozitifliğinin viral reaktivasyonla değil, muhtemelen tümör hücreleri ile ilişkili olabileceğini ve tümörün karakterini yansıtabileceğini bildirmişler; bu kanserlerde EBV-DNA'nın gerçek bir tümör belirteci olabileceğini vurgulamışlardır. İleri moleküler testlerle desteklenmemekle birlikte çalışmamızda da Hodgkin lenfoma tanısıyla takip edilen iki hastada (Ç2, Ç3) tedavi öncesi saptanan EBV-DNA pozitifliğini, benzer şekilde daha çok tümörün kendisi ile ilişkilendirmek gerektiği sonucuna varıldı (Tablo-8).

Çalışmamızda bu grupta bulunan ve tedavi sonrası 3. ay serum örneğinde EBV-DNA pozitifliği saptanan üçüncü hasta (Ç3) malign histiositoz tanısıyla takip edildi. Eş zamanlı immünblot sonucu VCA IgG (+), EBNA IgG (+), VCA IgM (+), EA IgG (-); Paul-Bunnell < 1/56; VCA-IgG yüksek avidite bulundu. Hastanın tedavi öncesi immünblot sonucu akut enfeksiyon serolojisi ile uyumlu olup VCA-IgG sınırda avidite, EBV-DNA negatif idi. Tedavi sonrası 1.ay ve 6.ay serum örneklerinde de EBV-DNA negatifliği saptandı. Hastanın tüm örneklerinde Paul-Bunnell < 1/56 bulundu. Nystad ve ark. (2) anti-VCA IgG, anti-EBNA IgG, anti-VCA IgM pozitifliğinin serolojik olarak akut enfeksiyon ve/veya reaktivasyonu gösterdiğini ancak avidite testleri ile desteklenmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da benzer serolojik profilin saptandığı hasta (Ç3), eş zamanlı avidite ve PCR sonuçları göz önünde bulundurulduğunda tedavi sonrası 3. ayda reaktivasyon olarak değerlendirildi (Tablo-8 ve 9).

Michálek ve ark. (86) da çocuk onkoloji hastalarında EBV enfeksiyonlarının tanısında seroloji ve DNA analizinin birlikte değerlendirilmesi gerektiğini tek başına serolojik testlerin tanıda yeterli olmadığını vurgulamışlardır. Çalışmamızda çocuk onkoloji grubunda yer alan toplam 11 hastada (%29,7) immünblot sonuçları reaktivasyon serolojisi ile uyumlu idi. Bu hastalardan 10'unda EBV-DNA negatif, VCA-IgG

yüksek/sınırdan auidite bulundu (Tablo-10). Hodgkin lenfoma tanısı ile takip edilen bir hastada (Ç2) ise EBV-DNA pozitif, VCA-IgG yüksek auidite olarak değerlendirildi (Tablo-8). Hasta sayısı yeterli olmamakla birlikte çalışmamız özellikle immünsüprese çocuk onkoloji hastalarında EBV reaktivasyonunu değerlendirmek amacıyla serolojik sonuçların auidite ve PCR testleri ile desteklenmesi gerektiğini göstermiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler,

- EBV ile ilişkili malignitesi olan çocuklarda tedavi öncesi RT-PCR ile EBV-DNA araştırılmasının tanı, takip ve prognozu değerlendirmede yararlı olabileceğini;
- İmmünsüprese hastalarda EBV reaktivasyonunu saptamak için serolojik sonuçların auidite ve PCR testleri ile desteklenmesi gerektiğini göstermiştir.

Akut EBV enfeksiyonunda kanda çoğunlukla EBV-DNA saptanmaktadır. Sağlıklı seropozitif taşıyıcıların serum veya plazmalarında nadiren EBV-DNA bulunmuştur. Hücreden bağımsız EBV-DNA varlığı primer enfeksiyonu veya reaktivasyonu destekler. Bu nedenle plazma ve serumun EM veya primer EBV enfeksiyonu tanısı için en uygun örnekler olduğu bildirilmiştir. Ancak genellikle klinik semptomlar ve serolojik testler ile tanısı konulan EM'da viral DNA'nın saptanması gerekmez. Bununla birlikte serum veya plazmadaki EBV yükü hastalığın şiddeti ile uyumlu bulunmuştur (74).

Benzer olarak çalışmamızda immünkompetan kişilerden oluşan kontrol grubunda bulunan bir çocuk hastada (K5) immünblot sonucu reaktivasyon serolojisi ile uyumlu idi. EBV-DNA 9265 kopya/mL, Paul-Bunnell 1/28 pozitif, VCA-IgG düşük auidite bulundu. Hastanın periferik kan ve klinik bulguları akut EM ile uyumlu olup PCR ve auidite test sonuçları tabloyu destekledi, hastanın kliniği ile viral yükün yüksekliği arasında korelasyon saptandı. (Tablo-11).

EBV enfeksiyonlarının tanısında araştırılan heterofil antikorlar, sağlıklı kişilerde de 1/56 titreye kadar bulunabilmektedir. EBV enfeksiyonunda erişkin hastaların %10'unda, çocukların ise büyük bir kısmında bu antikorların oluşmadığı bildirilmiştir (87, 88).

Çalışmamızda renal transplant hastalarının hiçbirinde immünblot ile akut enfeksiyon serolojisi ve Paul-Bunnel $>1/56$ saptanmadı. Çocuk onkoloji grubunda ise 3 hastanın tedavi öncesi immünblot sonuçları akut enfeksiyon serolojisi ile uyumlu idi. Bu hastaların eş zamanlı serumlarında Paul-Bunnel $<1/56$, EBV-DNA negatif olup avidite sonuçları değişkenlik gösterdi (Tablo-9).

İmmünblot sonuçları akut enfeksiyon serolojisi ile uyumlu olan erişkin kontrol hastalarında EBV-DNA pozitifliği, Paul-Bunnel pozitifliği ve düşük avidite sonuçları arasındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Çocuk kontrol grubunda ise bu serolojik profil ile sadece düşük avidite arasındaki uyum anlamlı idi (Tablo-12 ve 13).

Paul-Bunnel pozitifliği saptanan 5 hastada eş zamanlı EBV-DNA pozitif; 4 hastada VCA-IgG düşük avidite saptandı (Tablo-11). Buna karşılık EBV-DNA pozitif, VCA-IgG düşük avidite saptanan 2 çocuk hastada (K4, K9) Paul-Bunnel $1/14$ bulundu (Tablo-11). Bu sonuçlar immünkompetan hastalarda özellikle çocuk yaş grubunda, Paul-Bunnel testinin akut enfeksiyon tanısında yetersiz kaldığı durumlarda VCA-IgG avidite testi ve RT-PCR ile EBV-DNA saptanmasının yararlı olduğunu gösterdi.

Bauer ve ark. (6) klinik ve serolojik olarak akut EBV enfeksiyonu saptanan 98 immünkompetan hastanın (1-47 yaş) serum örneklerinde RT-PCR ile EBV viral yükünü araştırmışlar; genç ve yatan hastalarda viral yükü daha yüksek bulmuşlardır. Serolojik olarak tartışmalı EBV enfeksiyonlarında sadece erken dönem serum örneklerinde EBV-DNA pozitifliği ile düşük avidite arasında korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Hem akut hem de yakın zamanda geçirilmiş EBV enfeksiyonlarında VCA-IgG düşük avidite saptamışlar; bu nedenle EBV-DNA pozitifliğinin hastalıkla ilişkisini düşük aviditeye göre daha anlamlı bulmuşlardır. Sonuçta akut EBV enfeksiyonunun erken tanısında ve serolojik olarak tartışmalı EBV enfeksiyonlarının yorumunda RT-PCR ile viral yük saptanmasının yararlı olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızın kontrol grubunda yer alan hastaların 10'unda (%20) PCR ile EBV-DNA pozitif bulundu. Bu hastaların 2'si erişkin, 8'i çocuk yaş

grubunda idi (Tablo-11). İmmünblot ile akut enfeksiyon serolojisi belirlenen erişkin hastada (K8) Paul-Bunnel 1/56, VCA-IgG düşük avidite, EBV-DNA 79 kopya/mL bulundu. Viral yükün düşük olması ve anti-EBNA IgM pozitifliği hastanın enfeksiyonun erken döneminde olduğunu düşündürdü. Bu grupta yer alan ve immünblot ile akut enfeksiyon serolojisi belirlenen diğer erişkin hastada (K10) ise EBV-DNA 514 kopya/mL, Paul-Bunnel 1/448 pozitif, VCA-IgG yüksek avidite saptandı (Tablo-11). Bu sonuçlar hastanın yakın zamanda (2-3 ay önce) geçirilmiş EBV enfeksiyonu lehine yorumlandı.

Çalışmamızın kontrol grubunda bulunan 5 çocuk hastada EBV-DNA pozitifliği, immünblot ile akut enfeksiyon serolojisi, VCA-IgG avidite testi ile düşük avidite saptandı. Bu hastaların 3'ünde (K1, K6, K7) Paul-Bunnel sonucu ($\geq 1/56$) akut enfeksiyonu destekledi (Tablo-11).

Ayrıca bu grupta yer alan ve EBV-DNA 1415 kopya/mL saptanan çocuk hastada (K2) immünblot sonucu geçirilmiş enfeksiyon serolojisi ile uyumlu olup, Paul-Bunnel negatif, VCA-IgG yüksek avidite bulundu. Hasta ekstremitelerindeki döküntü nedeniyle 5. hastalık tanısı almıştı. EBV-DNA 177 kopya/mL bulunan ve immünblot ile izole VCA IgG pozitifliği gözlenen diğer hastada (K3) Paul-Bunnel 1/14 pozitif, VCA-IgG sınırdaki avidite olarak değerlendirildi. Hastanın kliniği akut EBV enfeksiyonunu destekledi. Bulgularımız özellikle çocuk yaş grubu hastalarda akut enfeksiyon tanısında serolojik testlerin yetersiz kalabileceğini, viral yük saptanmasının primer EBV enfeksiyonlarında da yararlı olduğunu gösterdi.

Rosemary ve ark. (89) serolojik olarak akut ve geçirilmiş enfeksiyon tanısı alan 1-30 yaş arası kişilerde viral yük araştırmışlar; akut enfeksiyonda %70, geçirilmiş enfeksiyonda ise %4 oranında EBV-DNA saptamışlardır. Akut EBV tanısında serolojik testlerin öncelikli olduğunu, PCR'ın immünsüprese hastalarda veya tartışmalı serolojik profillerde ikincil tanı yöntemi olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Chan ve ark. da (7) primer EBV enfeksiyonu tanısında EBV-DNA testinin duyarlılığını %80, özgüllüğünü %94, pozitif prediktif değerini %95, negatif prediktif değerini %79 bulmuşlar; primer EBV enfeksiyonu tanısında

avidite testi ile birlikte genişletilmiş serolojiyi altın standart olarak değerlendirmişlerdir.

Çalışmamızda renal transplant grubunda 3 hastada (%4,8), çocuk onkoloji grubunda ise 1 hastada VCA-IgG düşük avidite bulundu. Bu hastaların hiçbirinde eş zamanlı EBV-DNA pozitifliği ve Paul-Bunnet $\geq 1/56$ saptanmadı; immünblot sonuçları ise değişkenlik gösterdi. Kontrol grubunda 14 hastada VCA-IgG düşük avidite bulundu. Hastaların 6'sında (%42) EBV-DNA pozitif; 4'ünde (%28) Paul-Bunnet $\geq 1/56$; 13'ünde (%93) immünblot sonucu akut enfeksiyon serolojisi ile uyumlu idi (Tablo-14). Çalışmamız immünsüprese hastalarda reaktivasyonu değerlendirmek, immünkompetan hastalarda ise akut enfeksiyonu doğrulamak açısından avidite testinin önemini göstermektedir.

EBV serolojisi akut enfeksiyonu geçirilmiş enfeksiyondan veya reaktivasyondan ayırmak için gereklidir (4). Anti-VCA IgG ve anti-VCA IgM pozitifliğinin yanında anti-EBNA-1 IgG negatifliği akut enfeksiyonu; anti-VCA IgG ve anti-EBNA-1 IgG pozitifliği ile birlikte anti-VCA IgM negatifliği geçirilmiş enfeksiyonu gösterir (3). Buna rağmen akut EBV enfeksiyonu geçiren çocukların %12-17'sinde VCA IgM antikörlerinin saptanmadığı; erişkin yaş grubunun küçük bir bölümünde de VCA IgM antikörlerinin oluşmadığı veya gecikebildiği bildirilmiştir (6). Ayrıca immünsüpresyon sırasında EBNA-1 antikörlerinin kaybolması veya oluşmaması nedeniyle akut enfeksiyondan sonra uzun süre anti-EBNA-1 IgG negatif kalabilir. Bazı ender olgularda anti-VCA IgM pozitifliği uzun sürebilir hatta EBNA-1 antikörlerinin olduğu dönemde bile saptanabilir. Bu durumda akut ve geçirilmiş enfeksiyonlarda benzer serolojik profil görülebilir. Ayrıca izole anti-VCA IgG, anti-VCA IgM, anti-EBNA IgG pozitiflikleri veya üçünün birlikte pozitifliği doğrulanması gereken tartışmalı profiller olarak kabul edilmektedir. Serolojik testlerle elde edilen tartışmalı sonuçların VCA-IgG avidite, floresan antikör testleri ve moleküler yöntemlerle birlikte yorumlanması gerekmektedir (2, 3).

Nystad ve ark. (2) akut EBV enfeksiyonu ön tanısı ile takip ettikleri ve ELISA ile anti-VCA IgG, anti-EBNA IgG, anti-VCA IgM birlikte pozitifliği saptadıkları hastalarda, avidite testi ve immünblot ile yaptıkları doğrulama

sonucunda bu profilin %23 oranında reaktivasyon, %49 oranında akut enfeksiyonu gösterdiğini bildirmişlerdir. Heterofil antikor pozitifliğini akut enfeksiyonda %94 oranında saptamışlar; bu serolojik profilde heterofil antikor bulunmayışını reaktivasyonun bir göstergesi olarak yorumlamışlardır. Sonuç olarak anti-VCA IgG, anti-EBNA IgG, anti-VCA IgM birlikte pozitifliği saptanan heterofil antikor negatif hastalarda reaktivasyonu değerlendirmek için avidite testinin doğrulama amacıyla kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda da renal transplant grubunda 1 hastada (Tablo-7), çocuk onkoloji grubunda 3 hastada (Tablo-10), kontrol grubunda ise 3 hastada olmak üzere toplam 6 hastada immünblot ile VCA IgG (+), VCA IgM (+), EBNA IgG (+), EA IgG (-) bulundu. Yorumlanması genellikle tartışmalı olan bu serolojik profilin saptandığı hastaların tümünde eş zamanlı Paul-Bunnel<1/56 idi. Hastaların 5'inde VCA-IgG yüksek avidite, 1'inde sınırdan avidite saptandı. Sadece bir hastanın (Ç3) tedavi sonrası 3. ay serum örneğinde EBV-DNA 908 kopya/mL bulundu (Tablo-8, 9 ve 10). İmmünblot ile üçlü pozitiflik saptadığımız hastaların Paul-Bunnel ve avidite test sonuçları akut enfeksiyondan çok reaktivasyonu desteklemiştir. Bununla birlikte reaktivasyonda beklenen EBV-DNA pozitifliği sadece immünsüpresif bir çocuk hastada saptanmış, diğer 5 hastada EBV-DNA negatif bulunmuştur. Bu sonuçlar tartışmalı serolojik profilleri değerlendirmek için avidite testinin yetersiz kalabileceğini, özellikle immünsüprese hastalarda doğrulama amacıyla EBV-DNA PCR testlerinin daha yararlı olduğunu göstermiştir.

Akut EBV enfeksiyonunda VCA IgM antikorlarının gecikmesi veya erken kaybolması, VCA IgG antikorlarının saptandığı geçirilmiş enfeksiyonda anti-EBNA-1'in kaybolması veya oluşmaması izole VCA IgG pozitifliği olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu serolojik profil (izole VCA IgG paterni) EBV enfeksiyonlarının sınıflandırmasını güçleştirmektedir. Paschale ve ark. (90) ELISA ile saptadıkları izole VCA IgG pozitifliğini immünblot sonuçlarına göre akut veya geçirilmiş enfeksiyon olarak yorumlamışlar ve heterofil antikor pozitifliği ile ilişkilendirmişlerdir. Bu profilin çoğunlukla erişkin hastalarda geçirilmiş enfeksiyonu gösterdiğini; 10 yaşından küçük çocuklarda ise akut

enfeksiyonu desteklemekle birlikte hastaların üçte birinde geçirilmiş enfeksiyon görülebileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda renal transplant grubunda 6 hasta (Tablo-7), çocuk onkoloji grubunda 4 hasta (Tablo-9 ve 10), kontrol grubunda ise 2 çocuk hastada olmak üzere toplam 12 hastada immüblot ile izole VCA IgG pozitifliği saptandı. Hastaların tümünde eş zamanlı Paul- Bunnel<1/56 idi. Eş zamanlı VCA-IgG avidite testleri değişkenlik gösterdi; RT-PCR ile hastaların 11'inde EBV-DNA negatif, 1'inde (kontrol grubu çocuk hasta) ise pozitif bulundu. Bu profil EBV-DNA ve Paul-Bunnel negatifliği ile birlikte değerlendirildiğinde, immünsüprese erişkin renal transplant hastalarında geçirilmiş enfeksiyonu destekledi; çocuk onkoloji hastalarında ise akut enfeksiyon lehine yorumlanmadı. Sadece kontrol grubunda bulunan çocuk hastalardan 1'inde saptanan EBV-DNA pozitifliği akut enfeksiyonu destekledi. Bu sonuçlar tartışmalı serolojik profillerden izole VCA IgG pozitifliğini yorumlamada heterofil antikörlerin yanı sıra özellikle çocuk yaş grubunda viral yük araştırılmasının yararlı olabileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak çalışmamız;

- Erişkin renal transplant hastalarında transplantasyonu takip eden 3 aylık dönemde PTLD riskinin bulunmadığını;
- Bu hasta grubunda EBV reaktivasyonunun değerlendirilmesinde serolojinin tek başına yetersiz kalabileceğini;
- Transplantasyon sonrası 3 aylık dönemde reaktivasyonu değerlendirmek için serolojik testlere ek olarak VCA-IgG avidite testi ve viral yük saptama yöntemlerinin yararlı olduğunu;
- EBV ile ilişkili malignitesi olan çocuklarda tedavi öncesi RT-PCR ile EBV-DNA araştırılmasının tanı, takip ve prognozu değerlendirmede yararlı olabileceğini;
- İmmünsüprese hastalarda EBV reaktivasyonunu saptamak için serolojik sonuçların avidite ve PCR testleri ile desteklenmesi gerektiğini;
- İmmünkompetan hastalarda viral yükün hastalığın kliniği ile korelasyon gösterdiğini;

- Özellikle çocuk yaş grubunda akut enfeksiyon tanısında Paul-Bunnell ve spesifik antikor testlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, VCA-IgG avidite testi ve RT-PCR ile EBV-DNA saptanmasının yararlı olduğunu;
- İmmünsüprese hastalarda reaktivasyonu değerlendirmek, immünkompetan hastalarda ise akut enfeksiyonu doğrulamak açısından avidite testinin önemini;
- Tartışmalı serolojik profilleri değerlendirmek için avidite testinin yetersiz kalabileceğini, bu nedenle özellikle immünsüprese hastalarda doğrulama amacıyla RT-PCR ile EBV-DNA saptanmasının yararlı olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Arman D. Epstein-Barr virüs. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 2. baskı. İstanbul: Nobel Kitapevi; 2002. 1197-201.
2. Nystad T, Myrmel H. Prevalence of primary versus reactivated Epstein-Barr virus infection in patients with VCA-IgG, VCA-IgM and EBNA-1 antibodies and suspected infectious mononucleosis. *J Clin Virol* 2007;38:292-7.
3. Hess R. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: Still challenging after 35 years. *J Clin Microbiol* 2004;42:3381-7.
4. Fidan I, Yüksel S, İmir T. The investigation of Epstein-Barr virus antibodies in different age groups. *T J Infect* 2005;19:453-6.
5. Ağaçfidan A, Bozacı M, Badur S. Epstein Barr virusu infeksiyonlarının tanısında kullanılan serolojik yöntemlerin değerlendirilmesi. *Klimik Derg* 1991;3:133-5.
6. Bauer CC, Aberle S, Popow-Kraupp T, Kapitan M, Hofmann H, Puchhammer-Stöckl E. Serum Epstein-Barr virus DNA load in primary Epstein-Barr virus infection. *J Med Virol* 2005;75:54-8.
7. Chan KH, Ng MN, Seto WH, Peiris JSM. Epstein-Barr virus (EBV) DNA in sera of patients with primary EBV infection. *J Clin Microbiol* 2001;39:4152-4.
8. Topkaya A, Aksungar F, Özakkaş F, Akıncı N. An infectious mononucleosis case. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007;27:279-81.
9. Gatner BC, Hess RD, Bandt D et al. Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference methods. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:78-82.
10. Van Loon AM, Cleator GM, Klapper PE. Epstein-Barr virus. In: Armstrong D, Cohen J (eds). *Infectious disease*. 1st edition. Barcelona: Mosby Harcourt Publishers Ltd; 1999. 8.5.1.2.
11. Crawford DH. Epstein-Barr virus. In: AJ Zuckerman, JE Banatvala (eds). *Principals and practice of clinical virology*. 3rd edition. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 1994. 109-34.
12. Drankin DI, Zaiats NA. Epidemiology of infectious mononucleosis. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immuno Biol* 1982;1:26-32.
13. Jenson HB. Acute complications of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Curr Opin Pediatr* 2000;12:263-8.
14. Schooley RT, Dolin R. Epstein-Barr virus (infectious mononucleosis). In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds). *Principles and practice of infectious diseases*. 3rd edition. New York: Churchill Livingstone Company; 1990. 1172.
15. Cengiz AT, Ozsan RM. The Paul-Bunnell test on 400 suspected cases of infectious mononucleosis. *Mikrobiyol Bül* 1982;16:169-79.

16. Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 2006;1:375-404.
17. Burkitt D, Wright D. Geographical and tribal distribution of the African lymphoma in Uganda. *Br Med J* 1966;5487:569-73.
18. Burkitt D. Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br Med J* 1962;5311:1019-23.
19. Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;59:94-101.
20. Tan LC, Gudgeon N, Annels NE, et al. A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* 1999;162:1827-35.
21. Kieff E, Rickinson B. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Howley PM, Griffin DE, et al (eds). *Fields virology*. 4th edition. Philadelphia: Lipincott Williams and Wilkins; 2001. 2511-73.
22. Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. Cellular responses to viral infection in humans: Lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* 2007;25:587-617.
23. Brooks GF, Butel JS, Morse SA (eds). *Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology*. 21st edition. Connecticut: Appleton and Lange; 1998. 543-65.
24. Tamer D. Epstein- Barr virus (EBV) genomunun periferik kandan PCR ve real-time PCR ile gösterilmesi ve tiplendirilmesi (Yüksek lisans tezi). Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2006.
25. <http://cullenlab.duhs.duke.edu/research/ebv>
26. Straus SE. Epstein-Barr virus and human herpesviruses types 6 and 7. In: Gallasso GJ, Whitley RJ, Merigan TC (eds). *Antiviral agents and human viral diseases*. 4th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. 697-709.
27. Murray PG, Young LS. Epstein-Barr virus infection: Basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2001;3:1-20.
28. Niedobitek G, Meru N, Delecluse HJ. Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J Exp Pathol* 2001;82:149-70.
29. Müderris T. Larenks kanserli hastaların tümör dokularında Epstein-Barr virüsün gerçek zamanlı polimeraz zincirleme reaksiyonu ile saptanması (Uzmanlık Tezi). Ankara: Gazi Üniversitesi; 2009.
30. Mellinghoff I, Daibata M, Humphreys RE, Mulder C, Takada K, Sairenji T. Early events in Epstein-Barr virus genome expression after activation: Regulation by second messengers of B cell activation. *Viol* 1991;185:922-8.
31. Packham G, Brimmel M, Cook D, Sinclair AJ, Farrell PJ. Strain variation in Epstein-Barr virus immediate-early genes. *Viol* 1993;192:541-50.
32. Erensoy S, Zeytinoğlu A. Epstein-Barr virüs. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. 3. baskı. İstanbul: Nobel Kitapevi; 2008. 1677-8.
33. Aydemir Ş. Epstein-Barr virüsün enfeksiyonunun seroprevalansı, bir alan çalışması (Uzmanlık Tezi). İzmir: Ege Üniversitesi; 1998.

34. Blauvelt A, Ser S, Cook PM, Schulz TF, Jeang KT. Human herpes virus 8 infection occurs following adolescence in United States. *J Infect Dis* 1997;176:771-4.
35. Ackermann M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Vet Microbiol* 2006;113:211-22.
36. Doğan B. Tekrarlayan tonsillit hastalarının tonsil dokularında EBV'nin gerçek zamanlı polimeraz zincirleme reaksiyonu ile kantitatif tespiti ve serum VCA-IgG titreleri ile korelasyonu (Uzmanlık Tezi). Ankara: Gazi Üniversitesi; 2005.
37. Young LS, Murray PG. EBV and oncogenesis: From latent genes to tumours. *Oncogene* 2003;22:5108-21.
38. www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/genenet/viewer/EBV
39. Yao QY, Rickinson AB, Epstein MA. A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer* 1985;35:35-42.
40. Knox PG, Young LS. Epstein-Barr virus infection of CR2-transfected epithelial cells reveals the presence of MHC class II on the virion. *Virology* 1995;213:147-57.
41. Countryman J, Miller G. Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4085-9.
42. Countryman J, Jenson H, Seibl R, Wolf H, Miller G. Polymorphic proteins encoded within BZLF1 of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupt latency. *J Virol* 1987;61:3672-9.
43. Hardwick JM, Lieberman PM, Hayward SD. A new Epstein-Barr virus transactivator R induces expression of a cytoplasmic early antigen. *J Virol* 1988;62:2274-84.
44. Rickinson AB, Rowe M, Hart IJ, et al. T-cell mediated regression of 'spontaneous' and of Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation in vitro: Studies with cyclosporin A. *Cell Immunol* 1984;87:646-58.
45. Tuncer S, Ustaçelebi Ş. Epstein-Barr virüs. Ustaçelebi Ş (editör). *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. 1.baskı. Ankara: Güneş Pres; 1999. 843-8.
46. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Human herpes viruses. In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (eds). *Medical microbiology*. 5th edition. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005. 541-64.
47. Nanbo A, Takada K. The role of EBV encoded small RNAs (EBERs) in oncogenesis. *Rev Med Virol* 2002;12:321-6.
48. <http://www.kanbilim.com/dahiliyeatlası.htm>
49. Beaulieu BL, Sullivan JL. Epstein-Barr virus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds). *Clinical virology*. 2nd edition. Washington: ASM Press; 1999. 479-95.
50. Leogrande G, Jirillo E. Studies on the epidemiology of child infections in the Bari area (South Italy) VII. epidemiology of Epstein-Barr infections. *Eur J Epidemiol* 1993;9:368-72.
51. Vardar F. EBV. *Güncel Pediatri Derg* 2008;6:62-5.
52. Linde A, Falk K. Epstein-Barr virüs. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J (eds). *Klinik mikrobiyoloji*. 9.baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık Tic. Ltd; 2009. 1567-70.

53. www.centro.com.tr/download/EPSTEIN.pdf 2009
54. Oshima M, Azuma H, Okuno A. High prevalence of Epstein-Barr virus type A strain with the 30 b.p. deletion of the latent membrane protein 1 gene in Japanese population. *Pediatrics Int* 1999;41:490-5.
55. Sumaya CV, Ench YE. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children: II. heterophil antibody and viral-specific responses. *Pediatrics* 1985;75:1011-9.
56. Engels N, Merchant M, Pappu R, Chan AC, Longnecker R, Wienands J. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) employs the SLP-65 signaling module. *J Exp Med* 2001;194:255-64.
57. Arman D. Enfeksiyöz mononükleoz. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. 3. baskı. İstanbul: Nobel Kitapevi; 2008. 1677-8.
58. Bağır E. Çocukluk çağı lenfomalarında Epstein-Barr virüs insidansının araştırılması (Uzmanlık Tezi). Adana: Çukurova Üniversitesi; 2009.
59. Niedobitek G, Aqathanqelou A, Herbst H, Whitehead L, Wright DH, Young LS. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: Virus latency, replication and phenotype of EBV infected cells. *J Pathol* 1997;182:151-9.
60. Shao JY, Li YH, Gao HY, et al. Comparison of plasma Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels and serum EBV immunoglobulin A/virus capsid antigen antibody titers in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 2004;100:1162-70.
61. Shotelersuk K, Khorprasert C, Sakdiul S, Pornthanakasem W, Voraud N, Mutirangura A. Epstein-Barr virus DNA in serum/plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1046-51.
62. Gottschalk S, Heslop HE, Rooney CM. Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Med* 2005;56:29-44.
63. Loren AW, Porter DL, Stadtmauer EA, Tsai DE. Post-transplant lymphoproliferative disorder: A review. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:145-55.
64. Rowe DT, Webber S, Schauer EM, Reyes J, Green M. Epstein-Barr virus load monitoring: its role in prevention and management of post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis* 2001;3:79-87.
65. Fafi-Kremer S, Morand P, Brion JP, et al. Long-term shedding of infectious Epstein-Barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 2005;191:985-9.
66. Khan G, Miyashita EM, Yang B, Babcock GJ, Thorley-Lawson DA. Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis?. *Immunity* 1996;5:173-9.
67. Baldanti F, Grossi P, Furione M, et al. High levels of Epstein-Barr virus DNA in blood of solid-organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 2000;38:613-9.
68. Stevens SJ, Verschuuren EA, Verkuuijen SA, Van Den Brule AJ, Meijer CJ, Middeldolp JM. Role of Epstein-Barr virus DNA load monitoring in prevention and early detection of post-transplant lymphoproliferative disease. *Leuk Lymphoma* 2002;43:831-40.

69. Idesawa M, Sugano N, Ikeda K, et al. Detection of Epstein–Barr virus in saliva by real-time PCR. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:230-2.
70. Zeytinoğlu A, Hekimgil M, Erensoy S ve ark. Lenfomalı hastaların dokularında Epstein-Barr virüs DNA ve RNA'sının araştırılması. *Mikrobiyol Bült* 2005;39:473-81.
71. Özdil A, Doğanay L, Demir M, Özpuyan F, Bilgi S. Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin diseases in Trakya region of Turkey; by in situ hybridization. *Tur J Haematol* 2002;19:461-4.
72. Kaya H, Erman Z, Gündoğdu C, Tekin SB, Gündoğdu M. Epstein-Barr virus in Hodgkin diseases patients in Northeast Anatolia. *Tur J Haematol* 2000;17:61-5.
73. Ertem U, Duru F, Pamir A, et al. Burkitt lymphoma in 63 Turkish children diagnosed over a 10 year period. *Pediatr Haematol Oncol* 1996;13:123-34.
74. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus load: The significance and application for each EBV associated disease. *Rev Med Virol* 2008;18:305-19.
75. Demircin G, Öner A. Post transplant lenfoproliferatif hastalık. *T Nefrol Diyaliz Transplant Derg* 1998;1:40-3.
76. Fan H, Gulley ML. Epstein-Barr viral load measurement as a marker of EBV-related disease. *Mol Diagn* 2001;6:279-89.
77. Toyoda M, Moudgil A, Warady BA, Puliyanada DP, Jordan SC. Clinical significance of peripheral blood EBV viral load monitoring using PCR in renal transplant recipients. *Pediatr Transplant* 2008;12:778-84.
78. Cavallo R, Elia M, Grouosso V, Curtoni A, Costa C, Bergallo M. Molecular epidemiology of Epstein-Barr virus in adult kidney transplant recipients. *Transplant Proceed* 2010;42:2527-30.
79. Carpentier L, Tapiero B, Alvandez F, Viau C, Alfieri C. Epstein-Barr virus early-antigen serologic testing in conjunction with peripheral blood EBV DNA load as a marker for risk of posttransplantation lymphoproliferative disease. *J Infect Dis* 2003;188:1853-64.
80. Jabs W, Maurmann S, Wagner H, et al. Time course and frequency of Epstein-Barr virus reactivation after kidney transplantation: Linkage to renal allograft rejection. *J Infect Dis* 2004;190:1600-4.
81. Naresh KN, Johnson J, Srinivas V, et al. Epstein-Barr virus association in classical Hodgkin's disease provides survival advantage to patients and correlates with higher expression of proliferation markers in Reed–Sternberg cells. *Ann Oncol* 2000;11:91-6.
82. Gandhi MK, Lambley E, Burrows J, et al. Plasma Epstein-Barr virus (EBV) DNA is a biomarker for EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:460-4.
83. Wagner HJ, Schlager F, Claviez A, Bucsky P. Detection of Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood of paediatric patients with Hodgkin's disease by real-time polymerase chain reaction. *Eur J Cancer* 2001;37:1853-7.
84. Chan KCA, Zhang J, Chan ATC, et al. Molecular characterization of circulating EBV DNA in the plasma of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma patients. *Cancer Res* 2003;63:2028-32.

85. Paoli P, Pratesi C, Bortolin M. The Epstein-Barr virus DNA levels as a tumor marker in EBV-associated cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133:809-15.
86. Michálek J, Horvath R. High incidence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and human herpesvirus 6 infections in children with cancer. *BMC Pediatr* 2002;2:1. <http://www.biomedcentral.com/1471-2431/2/1>.
87. Okano M, Thiele GM, Davis JR, Grierson HL, Purtilo DT. Epstein-Barr virus and human diseases: Recent advances in diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:300-12.
88. Cook L, Midgett J, Willis D, Clinton B, Folds JD. Evaluation of latex-based heterofile antibody assay for diagnosis of acute infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol* 1987;25:2391-4.
89. Rosemary C, Stevenson J, Phansalkar A, Hillyard D, Litwin C, Petti C. Limitations of PCR testing for diagnosis acute EBV infections. *Diag Microbiol Infect Dis* 2007;58:333-5.
90. Paschale M, Agrappi C, Manco M, Mirri P, Vigano E, Clerici P. Seroepidemiology of EBV and interpretation of the 'isolated VCA IgG' pattern. *J Med Virol* 2009;81:325-31.

EKLER

EK-1: Destekleyen Kuruluş

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir [proje no: UAP(T)-2009/7].

EK-2: Aydınlatılmış Onam Formu

LÜTFEN BU DÖKÜMANI DİKKATLİCE OKUMAK İÇİN ZAMAN AYIRINIZ

Sayın.....

Sizi (veya çocuğunuzu) Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile Nefroloji ve Pediatrik Onkoloji Anabilim Dalları tarafından ortaklaşa yürütülen “**Epstein-Barr Virüs (EBV) enfeksiyonlarının tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) yeri**” başlıklı araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın niçin yapıldığını, nasıl yapılacağını ve bu araştırmanın gönüllü katılımcılara getireceği olası faydaları, riskleri ve rahatsızlıklarını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. İsterseniz bu bilgileri aileniz, yakınlarınız ve/veya doktorunuzla tartışınız. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz. Katılmayı kabul ettiğiniz takdirde, gerekli yerleri siz, doktorunuz ve kuruluş görevlisi bir tanık tarafından doldurulan bu formun bir kopyası saklamanız için size verilecektir.

Araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama veya herhangi bir anda çalışmadan çıkma hakkına sahipsiniz. Her iki durumda da bir ceza veya hakkınız olan yararların kaybı kesinlikle söz konusu olmayacaktır.

Araştırma Sorumlusu
Prof.Dr.Güher Göral

1- YAPILACAK ARAŞTIRMANIN

1.1- BAŞLIĞI: Epstein-Barr Virüs (EBV) enfeksiyonlarının tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) yeri

1.2- İÇERİK VE AMACI:

Epstein-Barr Virüs (EBV) enfeksiyonlarının tanısında genellikle virüsün çeşitli yapılarına karşı oluşan antikorlardan yararlanılmaktadır. Ancak antikorların oluşmadığı olgularda (%5-10); ayrıca transplant alıcıları ve onkoloji hastaları gibi immün sistemi baskılanmış hasta gruplarında EBV'e özgü antikorların saptanmasında kullanılan testler (EBV serolojisi) yetersiz kalabilmektedir. Bu çalışma, değişik hasta gruplarında EBV enfeksiyonlarının tanısında, EBV-DNA (PCR) testinin yerini belirlemek amacıyla planlanmıştır.

1.3- İZLENECEK OLAN YÖNTEM VE YAPILACAK İŞLEMLER:

Sizden tedaviye başlanmadan önce 1 kez, tedaviye başlandıktan sonra 1. ay, 3. ay ve 6. ayda olmak üzere toplam 4 kez kan örneği (1 tüp:3-5 mL, 1 çorba kaşığı) alınacaktır.

Kan örneklerinden EBV-DNA (PCR), EBV serolojisi için serum örneklerinde ilgili testler (spesifik antikor, heterofil antikor, IgG avidite) aynı gün veya ertesi gün çalışılıp sonuçlandırılacaktır.

2- YAPILACAK ARAŞTIRMANIN:

2.1- SÜRESİ: 1 yıl

2.2- KATILMASI BEKLENEN GÖNÜLLÜ SAYISI: 150

2.3- SİZE GETİREBİLECEĞİ OLASI FAYDALAR:

EBV enfeksiyonlarında EBV-DNA (PCR) değerlerinin saptanması, enfeksiyonun tanısı ve takibinde özellikle immün baskılanmış hastalarda oldukça yol gösterici olabilir. Özellikle immün baskılanmış kişilerde EBV hastalıklarını saptamak daha zordur. Bu nedenle bu çalışma ile EBV enfeksiyonlarının daha erken ve kolay saptanması hedeflenmiştir.

2.4- SİZE GETİREBİLECEĞİ EK RİSK VE RAHATSIZLIKLAR:

Yok

3- KATILMA VE ÇIKMA:

Araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama veya herhangi bir anda çalışmadan çıkma hakkına sahipsiniz. Ayrıca sorumlu araştırmacı gerek duyarsa sizi çalışma dışı bırakabilir. Çalışmaya katılmama, çalışmadan çıkma veya çıkarılma durumlarında bir ceza veya hakkınız olan yararların kaybı kesinlikle söz konusu olmayacaktır.

4- MASRAFLAR :

Çalışma masrafları ÜÜTF Araştırma Fonu tarafından karşılanacaktır. Çalışmaya katılan gönüllülerden ücret talep edilmeyecektir.

5- GİZLİLİK:

Bu çalışmadan elde edilen bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacak ve kimlik bilgileriniz kesinlikle gizli tutulacaktır.

Ben,, [*gönüllünün adı,soyadı **Kendi el yazısı ile***] yukarıdaki metni okudum ve katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları tamamen anladım. Çalışma hakkında soru sorma ve tartışma imkanı buldum ve tatmin edici yanıtlar aldım. Bana, çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları sözlü olarak da anlatıldı. Bu çalışmayı istediğim zaman ve herhangi bir neden belirtmek zorunda kalmadan bırakabileceğimi ve bıraktığım zaman tedavimi üstlenenlerin herhangi bir ters tutumu ile karşılaşmayacağımı anladım.

Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı (çocuğumun / vasimim bu çalışmaya katılmasını) kabul ediyorum.

Gönüllünün (Kendi el yazısı ile)**Adı-Soyadı:**

.....

İmzası:

.....

Adresi:

.....

(varsa Telefon No, Faks No):

.....

Tarih (gün/ay/yıl) :/...../.....**Velayet veya Vesayet Altında Bulunanlar İçin****Veli veya Vasisinin (Kendi el yazısı ile)****Adı-Soyadı:**

..... :

İmzası:

.....

Adresi:

.....

(varsa Telefon No, Faks No):

.....

Tarih (gün/ay/yıl) :/...../.....

Açıklamaları Yapan Araştırcının (Doktorun)

Adı- Soyadı :.....

İmzası :.....

Tarih (gün/ay/yıl) :/...../.....

**Onay Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş
Görevlisinin**

Adı-Soyadı :.....

İmzası :.....

Görevi :.....

Tarih (gün/ay/yıl) :/...../.....

Bu çalışma U.Ü. Tıp Fakültesi "Tıbbi Araştırma Etik Kurulu" tarafından onaylanmıştır.

Onay Tarihi:

Onay No:

Not: Bu formun bir kopyası gönüllüde kalacak, diğer kopyası ise hasta dosyasında "onamlar" separatörü altına yerleştirilecektir. Hasta dosyası veya protokol numarası olmayan sağlıklı gönüllülerden alınacak onam formunun bir kopyası mutlaka sorumlu araştırmacı tarafından saklanacaktır.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Okan Töre ve Prof. Dr. Suna Gedikoğlu'na; tezimin oluşumu ve yürütülmesinde büyük emek ve destekleri olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Güher Göral'a; mesleki gelişimimde katkıları olan, asistanlığım boyunca her zaman her konuda desteklerini hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Safiye Helvacı, Prof. Dr. Beyza Ener, Prof. Dr. Reşit Mıstık, Prof. Dr. Halis Akalın, Prof. Dr. Barbaros Oral, Doç. Dr. Cüneyt Özakın, Doç. Dr. Yasemin Heper, Doç. Dr. Emel Yılmaz, Doç. Dr. Melda Sınırtaş ve Doç. Dr. Ferah Budak'a; birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Uzm. Dr. Oktay Alver, Uzm. Dr. Sevim Akçağlar, Uzm. Dr. Esra Kazak'a; tez hastalarının seçiminde, çalışmamızın oluşturulması ve yürütülmesinde bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım hocalarım Uludağ Üniversitesi Nefroloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Alpaslan Ersoy ile Çocuk Onkoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Betül Berrin Sevindir'e; her türlü yardımlarından dolayı Çocuk Onkoloji Bilim Dalı Uzmanı Dr. Metin Demirkaya ile asistanlarına; çalışmamızın istatistiksel analizlerini yapan Doç. Dr. İlker Ercan ve Dr. Gökhan Ocakoğlu'na; tez hastalarımın serum örneklerinin alınması sırasında bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Çocuk Onkoloji Bilim Dalı hemşiresi Meliha Açıkgöz, Nefroloji Bilim Dalı hemşireleri Aliye Özçetin ve Aynur Ulusoy'a; birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma; tez çalışmalarım sırasındaki destek ve emeklerinden dolayı Mikrobiyoloji Anabilim Dalı teknisyenleri Figen Aymak, Raziye Ülker, Şebnem Gedikli, Bilgen Aşçı, Zerrin Kaldırım ve Binnaz Güngör'e; uzmanlık eğitimim boyunca kendilerinden çok şey öğrendiğim ve her zaman desteklerini hissettiğim diğer teknisyen ve biyolog arkadaşlarıma ve Anabilim Dalımızın tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olarak beni destekleyen aileme ve eşime verdikleri sonsuz sevgi, emek ve güven için teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Adı : S. Sanem

Soyadı : Karadağ Geçgel

Doğum Yeri ve Tarihi : Karabük, 19.01.1981

Eğitimi :

2006-2011 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. - Bursa

1999-2005 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi - Bursa

1992-1999 Karabük Anadolu Lisesi - Karabük

1987-1992 Demir Çelik İlkokulu - Karabük

Yabancı Dili : İngilizce