



Viral Gastroenteritlerin Laboratuvar Tanısında Güncel Durum

Dr. Gülendamar Bozdayı

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD

8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi
4-7 Haziran 2014, Ankara



SUNUM PLANI

- **Viral Gastroenterit etkenleri**
- **Rotavirus**
- **Norovirus**
- **Tanıda güncel durum**

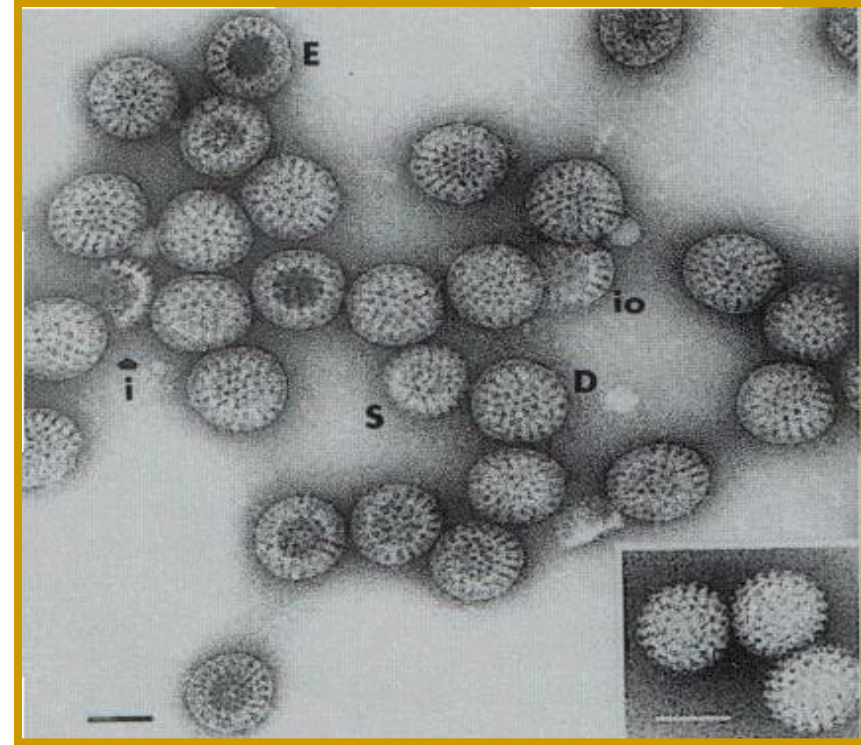
Viral Gastroenterit Etkenleri Nelerdir?

- **Enterik adenovirus**
- **Astrovirus**
- **Diğerleri; Togavirus, Aichivirus,
Picobirnavirus**

Rotavirus

Rotavirus

- Reoviridae ailesinde
- İkozahedral yapıda
- 70 nm büyüklüğünde
- Çift tabakalı protein kapsidi
- Zarfsız
- Lipid çözücülere direnç



Rotavirus Genom Yapısı

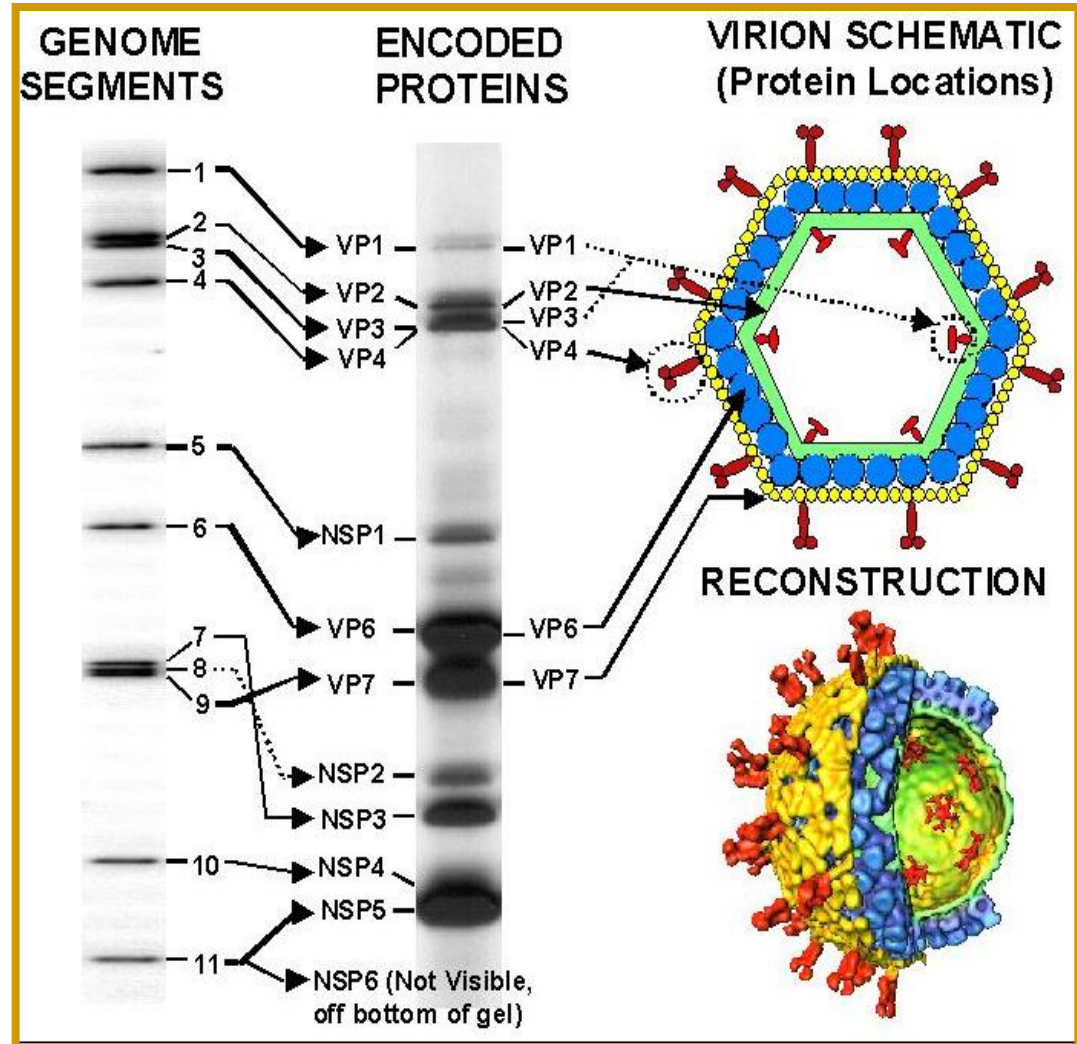
Genomu 11 segment
Çift iplikli RNA
RNA Polimeraz enzimi

6 Yapısal

Kor (VP 1,2,3)
İç kapsid (VP6)
Dış kapsid (VP4,VP7)

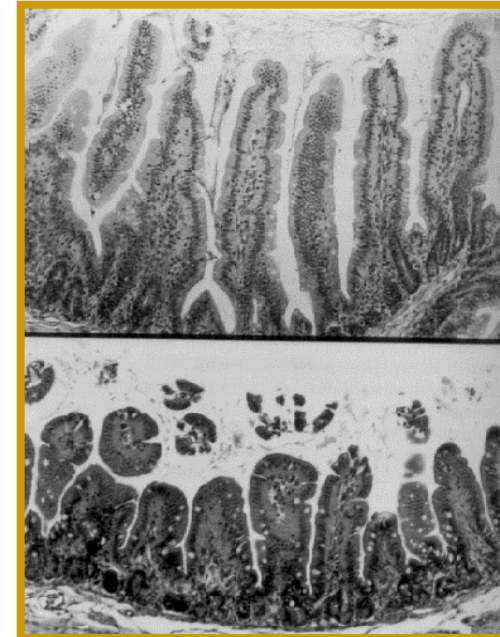
6 Yapısal Olmayan
(NSP 1-6)

Segmentli genom
reassortmentı kolaylaştırır



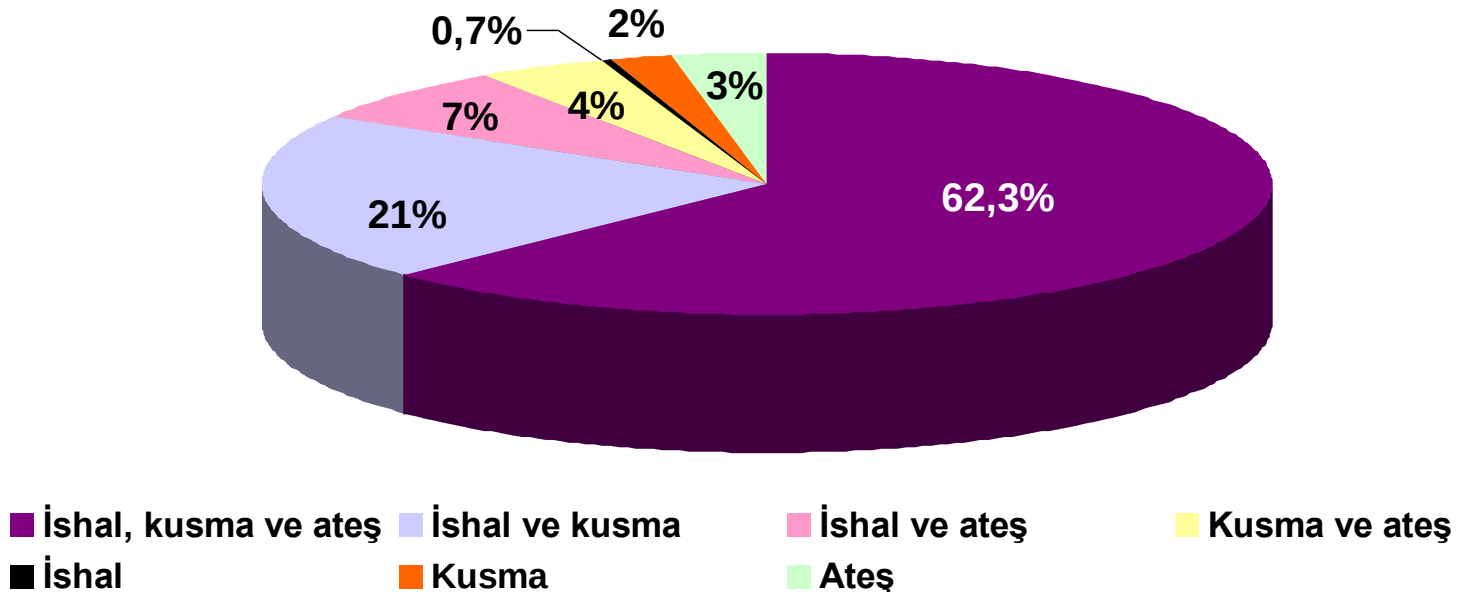
Patogeneze

- ❁ Fekal-oral yolla bulaşır.
- ❁ İnce barsak villuslarının ucunda bulunan enterositleri enfekte ederler. Enterositlerin sitoplazmasında çoğalırlar.
- ❁ Villus epiteli atrofi olur, mikrovilluslar kısalır ve azalır. Transport mekanizması bozulur.



Klinik Bulgular

- Yeni doğan ve çocuklarda, ishaller hastalıklarının büyük bir kısmının etkenidir.
- İnkübasyon periyodu 1-4 gün
- Tipik semptomları; **ateş, karın ağrısı, kusma ve diyaredir.**



Tanı

- ❶ **Dışkı suludur**
- ❷ **Lökosit ve eritrosit içermez**
- ❸ **Dışkı hastalığın akut devresinde alınmalıdır**
 - Semptomların başlamasından itibaren 1-5 gün içinde
- ❹ **İshalinin erken döneminde dışkıda 10^{10-11} /ml kadar yüksek sayıda virus tanıyı kolaylaştırır.**

Özgül Tanı Teknikleri



Mikroskopla inceleme

- İEM ve EM (A grubu dışındakilerde gözlenebilir)



Kültür

- Maymun böbrek hücre dizisi MA104
- İnsan kolon karsinoma hüç. diz. CaCo-2

} A grubu rotaviruslar



Serolojik testler

- *Dışkıda Antijen Saptama
- ELISA ve Lateks aglütinasyon
- *Dışkıda antikor saptama
- ELISA ve Lateks aglütinasyon testi

} Sadece grup A rotaviruslar

→ Dışkıda IgA ve IgM
1-10 gün(+)



Moleküler yöntemler

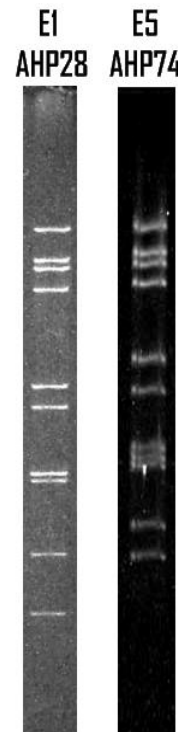
- RT-PZR
- SDS-PAGE ile elektroforetiplendirme ve Nükleik asit hibridizasyon tk.

Tanı-ELISA

- 🦠 **Rotavirus varlığı ELISA (Rotaclone, Meridian Diagnostics, U.S.A.) kiti kullanılarak gösterilmiştir.**

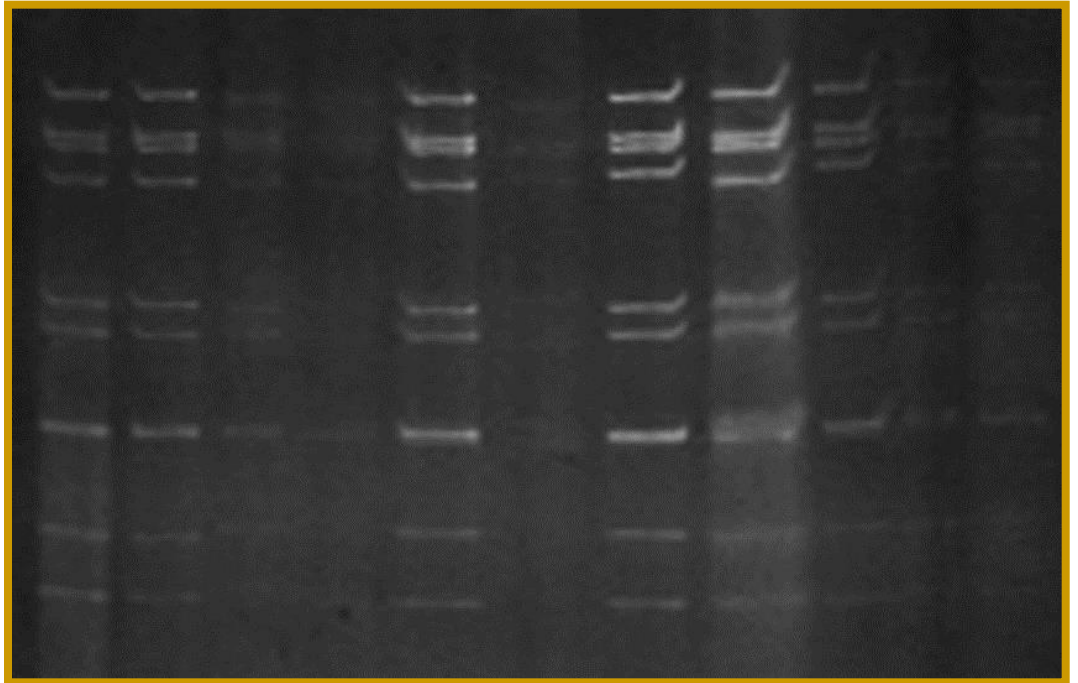
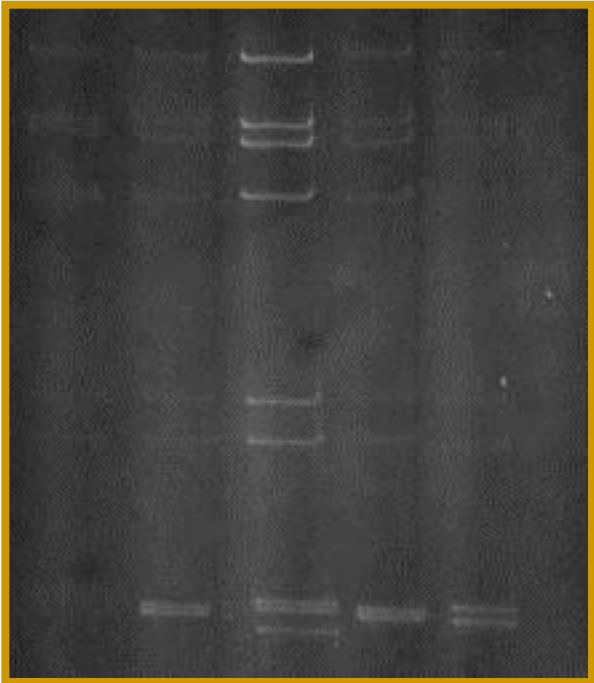
Tanı-Electropherotyping

- dsRNA ekstraksiyonu: fenol-kloroform-izoamilalkol yöntemi ile yapılmıştır.
- Elde edilen dsRNA'lara PAGE yöntemi ile elektroforetipleme yapılmıştır.
- Beş elektroforet tip
 - E1; uzun patern G9P[8]
 - E2; uzun patern 1P[8]
 - E3; uzun patern G1P[8]
 - E4; kısa patern G9P[8]
 - E5; kısa patern G9P[8]



Tani

SDS-PAGE

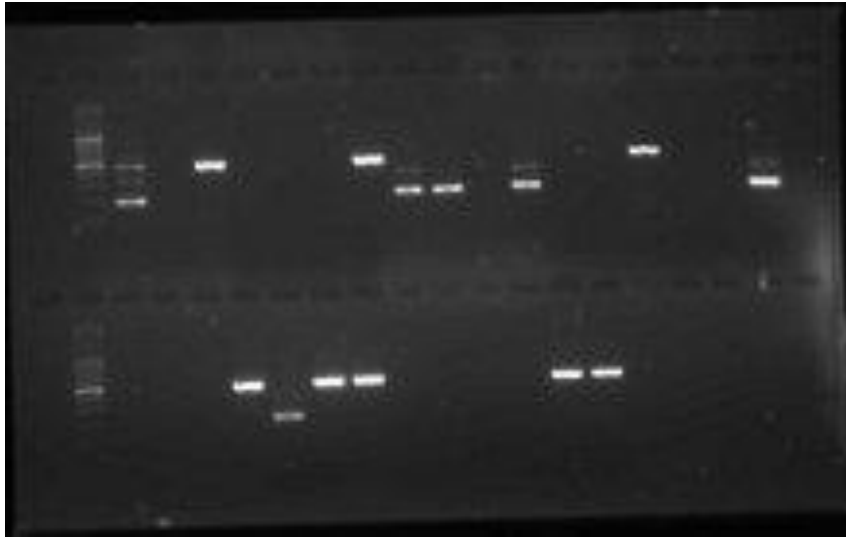


Tanı-PCR

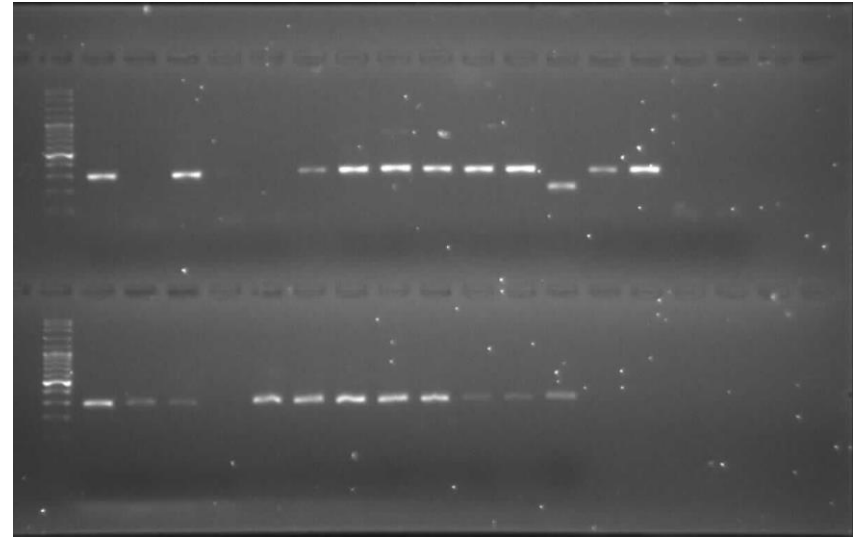
-  **VP7 ve VP4 gen amplifikasyonu için önce RT-PCR (AccessQuick RT-PCR, Promega Corporation, Madison, WI, USA), ardından **Beg9 ve End9 ile con-2 ve con-3 primerleri** kullanılarak PCR yapılmıştır.**
-  **G ve P spesifik genotip tayini için PCR (Promega) Gouvena ve Gunasena tipe spesifik primerleri kullanılarak yapılmıştır.**

Tani-PCR

G tip



P tip

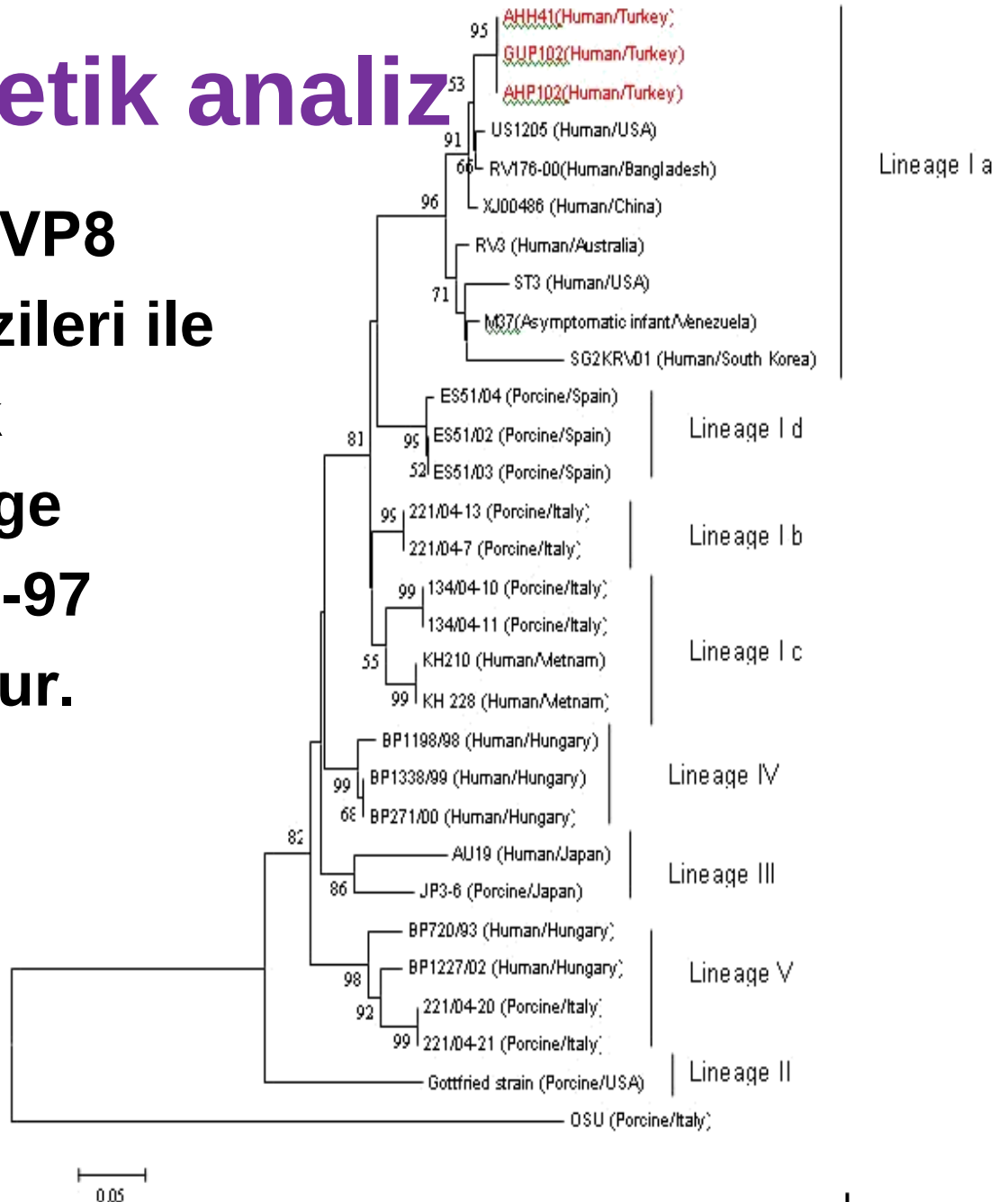


Tanı-DNA DİZİ ANALİZİ

-  **VP7 ve VP4 genlerinin DNA dizi analizi BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kiti (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) üretici firmanın önerileri doğrultusunda ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) cihazında çalışılmıştır.**
-  **G9 olarak tiplendirdiğimiz örneklerimizin filogenetik analizleri GenBankasından alınan dizilerle beraber Mega 3.1 programı ile “Neighbor-Joining Method” kullanılarak yapıldı.**

Tanı-Filogenetik analiz

**Türk G9 türlerinin VP8
geni amino asit dizileri ile
yapılan filogenetik
analizde ise; lineage
I'deki grup ile %89-97
identik bulunmuştur.**

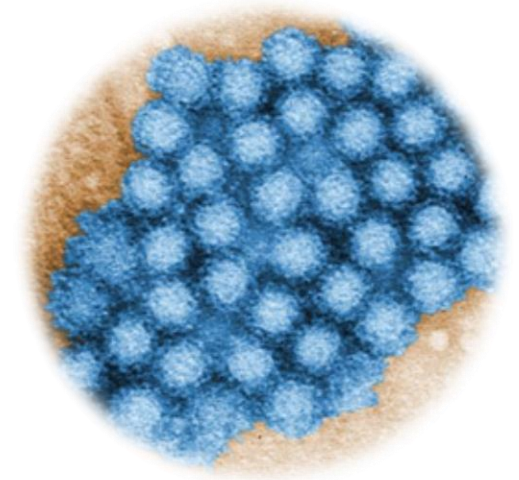


Bozdayi G et al. Diversity of human rotavirus G9 among children in Turkey. J Med Virol. 2008 Apr;80(4):733-40.

Norovirus

Norovirus

- **Norwalk**, Ohio - 1968 - **gastroenterit salgını**
- Kapikian ve arkadaşları tarafından, **1972'de immün elektron mikroskopisinin** kullanılmaya başlanmasıyla tanımlanmıştır.



Norovirus

Norwalk virusun klonlanmasından önce her üyeye **tanımlandığı bölgenin ismi** verilmiştir:

- Hawaii virus
- Snow Mountain virus
- Toronto virus
- Bristol virus
- Montgomery county virus

Norovirus

- Elektron mikroskobundaki yuvarlak görüntüsünden dolayı, geçmişte NVL'lar “small round structured viruses” (SRSV) olarak tanımlanmıştır.
- Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi tarafından 1999 yılında NoV (Norovirus) olarak tekrar isimlendirilmiştir.

Norovirus

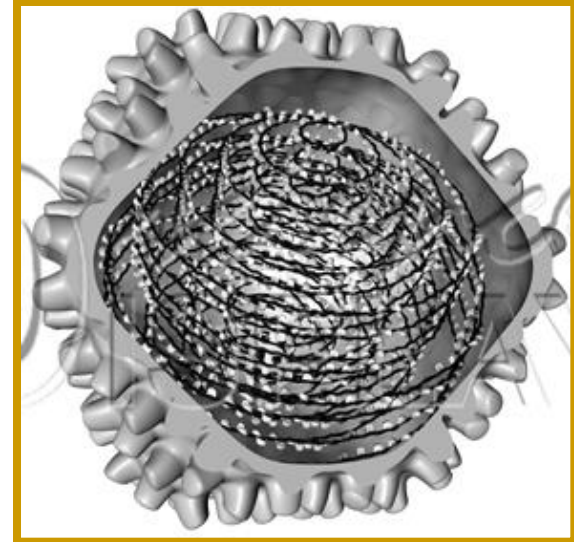
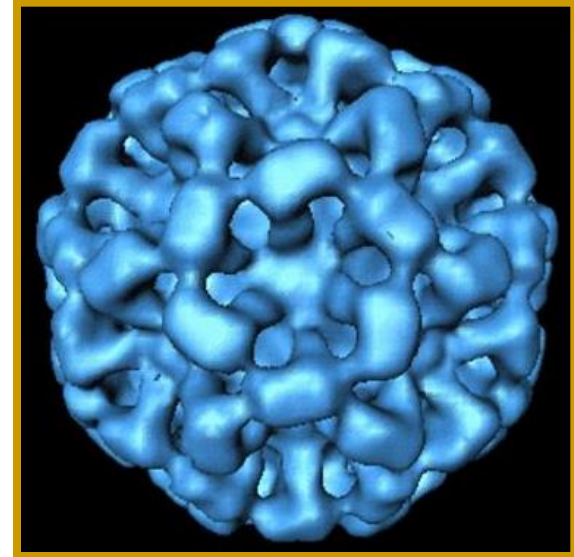
- Yetişkinlerde ve çocuklarda yaygın bir şekilde **gastroenteritlere** neden olan bir patojendir.
- Özellikle **kış** mevsimlerinde akut salgınlara sebep olmaktadır.
- Gelişmiş ülkelerde özellikle **küçük çocuklarda** hastane başvurularının önde gelen sebeplerinden birini oluştururken, gelişmekte olan ülkelerde önemli bir **mortalite** sebebidir.

Desai R, et al. Susceptibility to winter vomiting disease: a sweet matter. Rev Med Virol. 2011 Nov;21(6):370-82. doi:

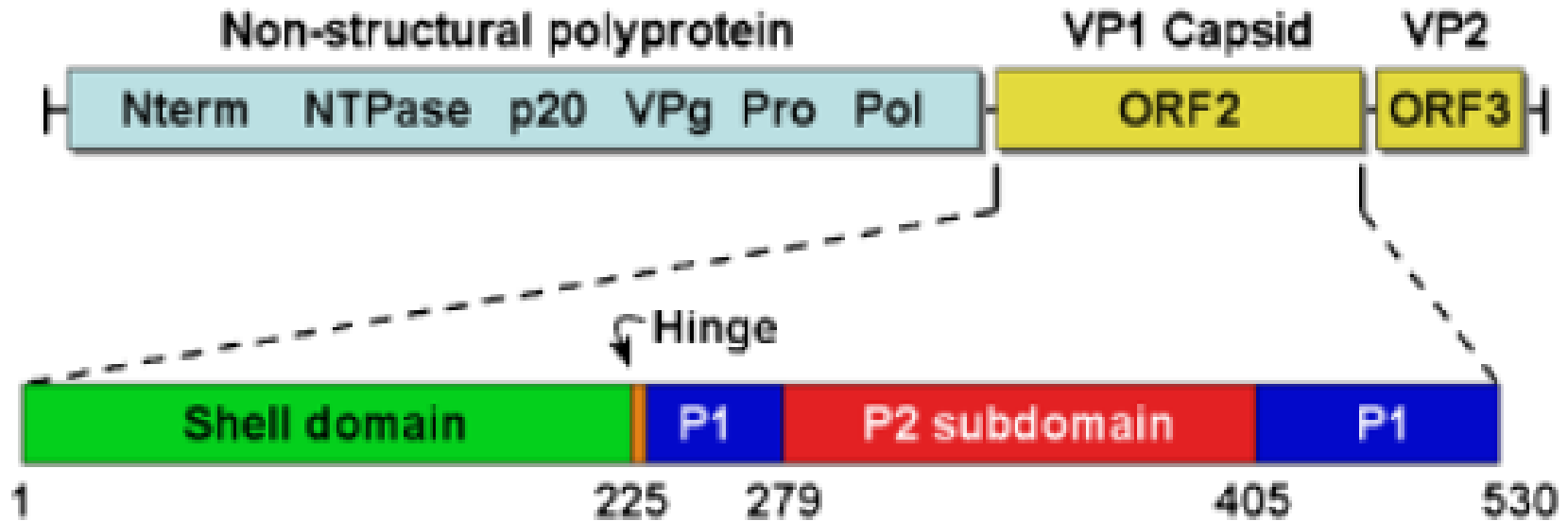
10.1002/rmv.704.

Norovirus

- **Caliciviridae** familyasında
- **Zarfsız**, 32 tane kupa şeklinde çöküntü
- **İkozahedral** yapılı
- **~ 38 nm** çapında
- **7.6 kb tek zincirli RNA virusu**



Genomik Organizasyonu



Genom yapısı ve kapsid domainleri

Yapısal olmayan poliprotein, 6 olgun proteine ayrılır: N-terminal protein (p48), Nükleozit trifosfataz (NTPaz), fonksiyonu bilinmeyen bir protein (p20), genomun 5' ucuna kovalent bağlı olan VPg, 3C benzeri proteinaz olan (Pro), RNA bağımlı RNA polimeraz (pol)

Genotipleri

- NoV sekans benzerliğine dayanarak **5 genogruba (G)** ayrılmaktadır.
- Genogrular en az 30 genetik kümeye (genocluster) ayrılırlar:

Norovirus Genogruları				
G1	GII	GIII	GIV	GV
GI.1, GI.2, GI.3, GI.4, GI.5, GI.6, GI.7, GI.8	GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.5, GII.6, GII.7, GII.8, GII.9, GII.10, GII.11, GII.12, GII.13, GII.14, GII.15, GII.16, GII.17	GIII.1, GIII.2	GIV.1	GV.1

Matthews JE, et al. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiol Infect.* 2012 Jul;140(7):1161-72.

Genotipleri

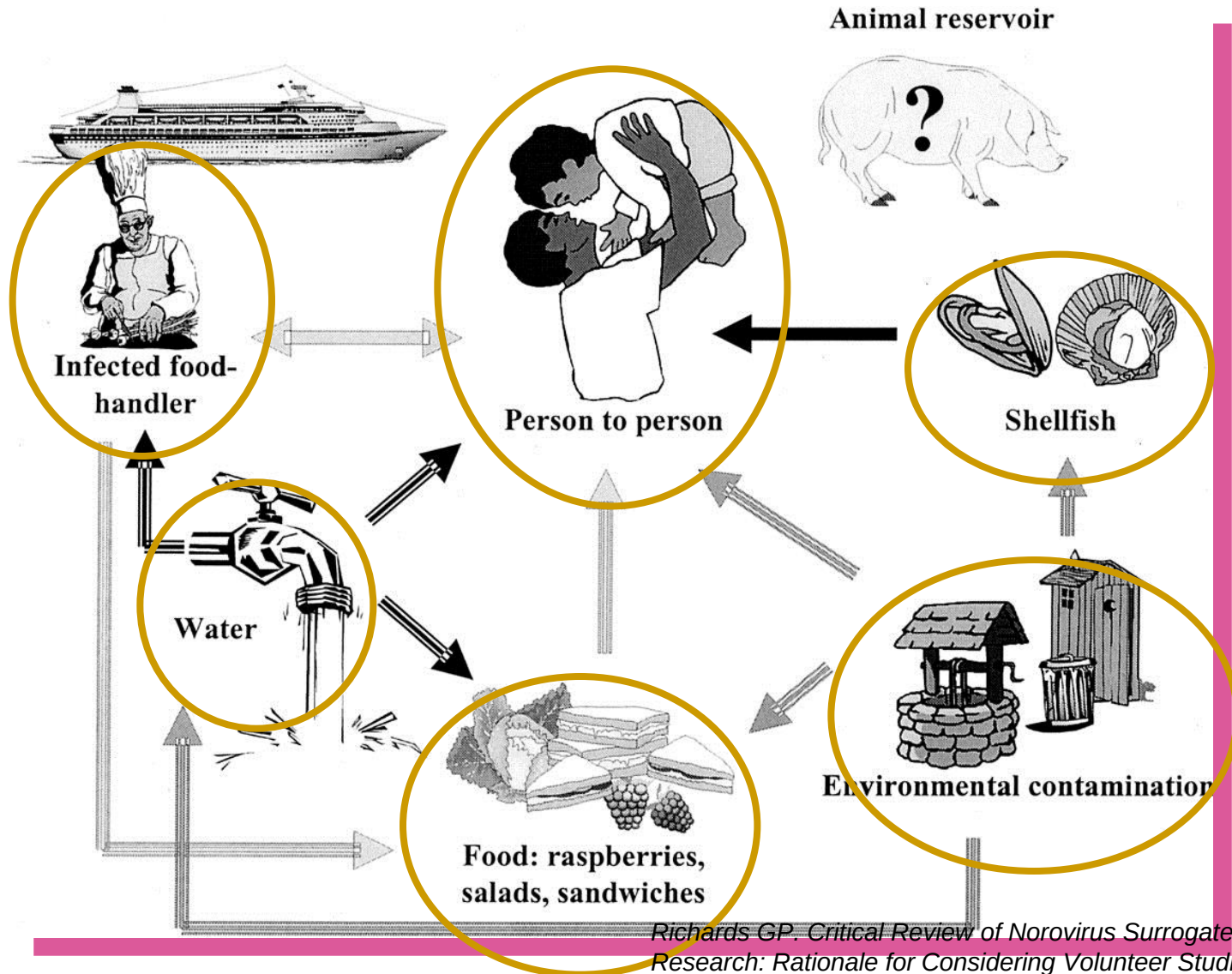
- GI, GII ve GIV → insan
- GIII → sığır
- GV → fare

Norovirus suşları, her genetik kümenin **prototip virüsleri ile kıyaslanarak sınıflandırılmaktadır**. Bir genetik kümenin norovirus suşları, referans suş olan prototip virusun VP1 bölgesine ait aminoasit sırası ile en az **%80** benzerlik göstermektedir.

Genotipleri

- Her izolat rutin olarak **suş/yıl/ülke** isimlendirmesini kullanmaktadır. NV/93/USA

Bulaşma



Bulaşma

Noroviruslar son derecede bulaşıcıdır ve **salgın oluşturmada iki özelliği** rol oynamaktadır:

- **10-100 virus partikülünden** oluşan çok az miktardaki enfektif doz bile oldukça yüksek derecede bulaşıcı bir ajan
- Donmaya, 60°C'ye kadar ısıtılmaya, klorla dezenfekte edilmeye, asidik koşullara, sirkeye, alkole, aseptik el solüsyonlarına ve yüksek şeker konsantrasyonuna karşı **dirençli**

İmmünolojisi

- Zamanla bağışık cevap zayıflamakta, 3-4 yıl sonra aynı virusla **reenfeksiyonlar** olabilmektedir.
- Norovirusların genetik değişikliği de göz önüne alındığında hayat boyu noroviruslarla tekrar enfeksiyonlar olabilir.

Tanı

NoV salgınlarında tanı genellikle **hastaların klinik tablosuna göre** yapılmaktadır.

CDC'nin epidemiyolojik kriterleri:

- Örneklerin bakteriyel ve paraziter açıdan negatif olması
- Hastalarda $>\%50$ kusma olması
- Hastalık süresinin 12-60 saat, inkübasyon süresinin 24-48 saat olması

Tanı Yöntemleri

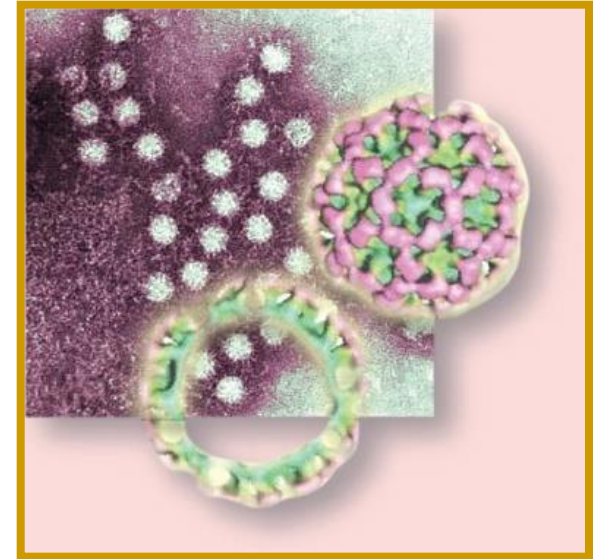
Virusun klonlanmasından önce kullanılan tanı yöntemleri

Mikroskoplama İnceleme

- Elektron mikroskobi
- İmmün elektron mikroskobi

Serolojik Testler

- Radyoimmünassay
- Adherens hemaglütinasyon deneyi
- Western blot
- Enzim bağlı immünosorbent assay (ELISA)



Tanı Yöntemleri

Norovirusun klonlanması ve dizi analizinden beri tanı için iki test kullanılmaktadır:

- RT-PCR (Reverse transkriptaz-PCR)
- ELISA



Vashist S, et al. Development of a strand specific real-time RT-qPCR assay for the detection and quantitation of murine norovirus RNA. J Virol Methods. 2012 May 22.

Nükleik Asit Saptanması

Genom sekansının bilinmesi, NoV genomunun tespiti için nükleik asit hibridizasyon yöntemlerinin dizaynının ve RT-PCR yöntemlerinin kullanılmasını sağlamıştır.

- **En duyarlı tanı yöntemi → RT-PCR**
- **Avantajı → 100 partikül /ml'de virusu saptayabilmesi**

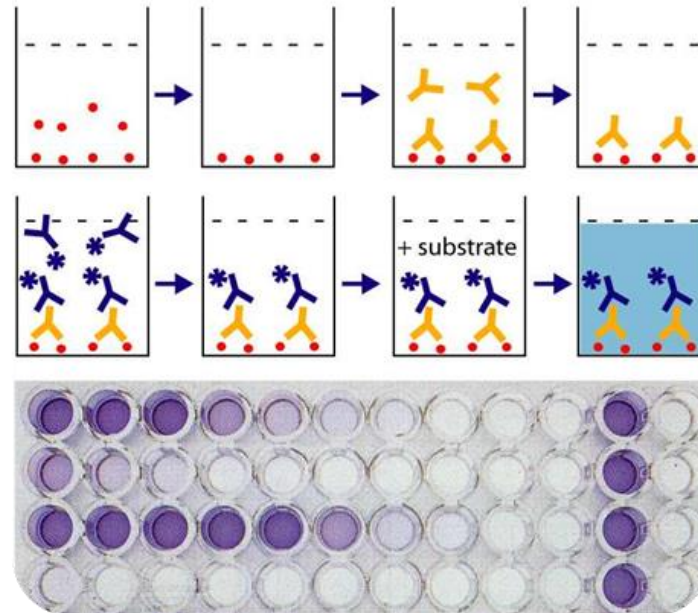


Nükleik Asit Saptanması

- Epidemik salgın araştırmalarında **ilk sırada** kullanılmaktadır.
- **RT-PCR ve ELISA** NoV'ları tanımlamak için **birlikte** kullanılmaktadır.

ELISA

- NoV'lar için geliştirilen ELISA testlerinin çoğu baculovirusta eksprese edilen **viral kapsid antijenlerine** dayanmaktadır.
- Kapsid antijenleri dışkı örneklerinde bulunan gerçek viruslara morfolojik ve antijenik olarak benzerdir.



ELISA

- Antijen tespiti için kapsid antijenleri ile immünize hayvanlardan elde edilen hiperimmün antikörlerin kullanıldığı **sandviç formatındaki ELISA** dışkı örneklerinde viral antijenlerin tespiti için geliştirilmiştir.
- Genellikle yüksek titrede antikörler elde edildiğinden klinik örneklerde **10^4 - 10^6 viral partikül/ml** saptanacak kadar duyarlıdır.
- ELISA ile NoV'un tüm antijenik tipleri saptanamamaktadır.

Türkiye’de Norovirus

Türkiye’de 2008 yılında ortaya çıkan ilk norovirus salgınının laboratuvar sonuçlarının değerlendirilmesi

ELISA Poz. Sayı (%)	Real time-PCR
13/50 (%26)	13/40 (%33)

Real-time PCR: 13 örneğin 9’u GI, 4’ü GII

Sonuç olarak;

- **Antjen testleri veya PCR testleri ile pozitif sonuçlar kesin tanıyı gösterir.**

Dışkı örneklerinin alınması için yapılan işlemler

Örnek Türü	Dışkı örneği
Örnek alma zamanı	Hastalık belirtilerinin başlamasından sonra en kısa sürede, ilk 48-72 saatte alınmalıdır.
Örnek alma özelliği	Sızdırmaz kapaklı, spatulalı, plastik kaba 2-4 g dışkı veya 10mL sulu dışkı örneği alınmalıdır. Salgınlarda en az 3 örnek alınmalıdır (13).
Trasport Özellikleri	Dışkı kapları kilitli plastik poşetlere konur ve buz paketleri ile birlikte en geç 48 saat içinde +4°C'de laboratuvara gönderilir. Gecikme olursa -70°C'de kuru buzda gönderilir.
Saklama koşulları	Örnekler alındıktan sonra antijen testi yapılana dek bir kaç gün +4°C'de saklanabilir. PCR için dışkı örnekleri test edilene kadar -20°C veya -70°C'ye konulmalıdır.
Örneklerin hazırlanması	Antijen testleri için dışkı örneği kitdeki diluent ile protokole göre süspense edilmelidir. Moleküler testler için dışkı örneği %10 PBS (Phosphate buffered saline; fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile dilüe edilip 5 dk vortekslenir ve 10.000g'de 10 dakika (veya 8000 rpm'de 15 dakika) santrifüj edilir. Üstteki sıvıdan viral RNA ekstraksiyonu yapılır (14).
Viroloji laboratuvarı örnek kabul ve red kriterleri	Dışkı örneğine idrar karışmamalıdır, tuvalet kağıdı parçası içermemelidir. Kabtan sızma olmamalıdır. Hasta kablari etiketli olmalıdır. Hasta adı, yaşı ve örnek toplanma tarihi belirtilmelidir. Laboratuvar istek formu olmalıdır. Trasportta soğuk zincir kurallarına uyulmalıdır.

UYARI:

● **Rektal sürüntü; örnekleri yetersiz miktarda virus içerdiğinden ilave örnek olarak alınabilir ve PCR testi ile çalışılmalıdır.**

- Eküvyon anal sfinkterden 1-2 cm ilerletilir ve anal kriptlerde rotasyon yaptırıldıktan sonra geri çekilir.
- Dakron, rayon veya “flocked” eküvyon ile alınan örnek 3 mL PBS içine konur. (15, 16).

● **Yeni doğan bebeklerden dışkı örneği alınmasında dışkının beze absorbe olmaması için bebek bezi ters bağlanıp plastik dış yüzeyinin iç kısma gelmesi sağlanır ve spatula ile örnek alınır**

Test ve süresi	Hedef virüs	Test adı	Testin Duyarlılığı (%)	özgüllüğü (%)
İmmuno-kromatografik test (15-20 dk)	Norovirus	RIDA®QUICK SD Bioline	61.4-83.3 54-62	87.5-100 67-98.6
	Rotavirus	RIDA®QUICK	88.8	100
		CombiStrip (Coris)	76.5	68
		Dipstick Eiken	95.8	93.3
		ROTAstrip (Coris)	99	96
	Adenovirus	RIDA®QUICK	28.6	100

Test ve süresi	Hedef virüs	Test adı	Testin Duyarlılığı (%)	özgüllüğü (%)
ELISA antijen testi (1-3 saat)	Norovirus	IDEIA Norovirus RIDASCREEN (R-Biopharm)	58.9-78.9 40-78.3	93.9-100 83.3-97
	Rotavirus	RIDASCREEN IDEIA (Dako)	82.1 96	100 99
		Premier Rotaclone	98.1	97.5
		VIDAS (bioMerieux)	76.8	100
	Astrovirus	RIDASCREEN	100	93-100
	Adenovirus	Novitec	85	

Test ve süresi	Hedef virüs	Test adı	Testin Duyarlılığı (%)	özgüllüğü (%)
Lateks agglütinasyon test (2-5 dk)	Rotavirus	Slidex (bioMerieux)	85.7	100
		MUREX (Abbott)	68	99
		Pastorex (Biorad)	85.9	97.7
	Adenovirus	Adenolex	46	99

Test ve süresi	Hedef virüs	Test adı	Testin Duyarlılığı (%)	özgüllüğü (%)
PCR testi (1-2 gün)	Norovirus	Argene Cepheid	92.8 91.2	100 100

Test ve süresi	Hedef virüs	Test adı	Testin Duyarlılığı (%)	özgüllüğü (%)
Real-time PCR testi (1-2 gün)	Rotavirus	Seeplex	100	100
	Adenovirus	Seeplex	100	100
	Norovirus	Seeplex	97	99.4

**İSHALSİZ MUTLU GÜNLER
DİLER,**

TEŞEKKÜR EDERİM.....