



EPSTEIN-BARR VİRUS ENFEKSİYONLARI TANISINDA ELISA VE İMMUNOBLOT TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Nilgün Kaşifoğlu, Tercan Us, Nazmiye Ülkü Koçman, Yurdanur Akgün

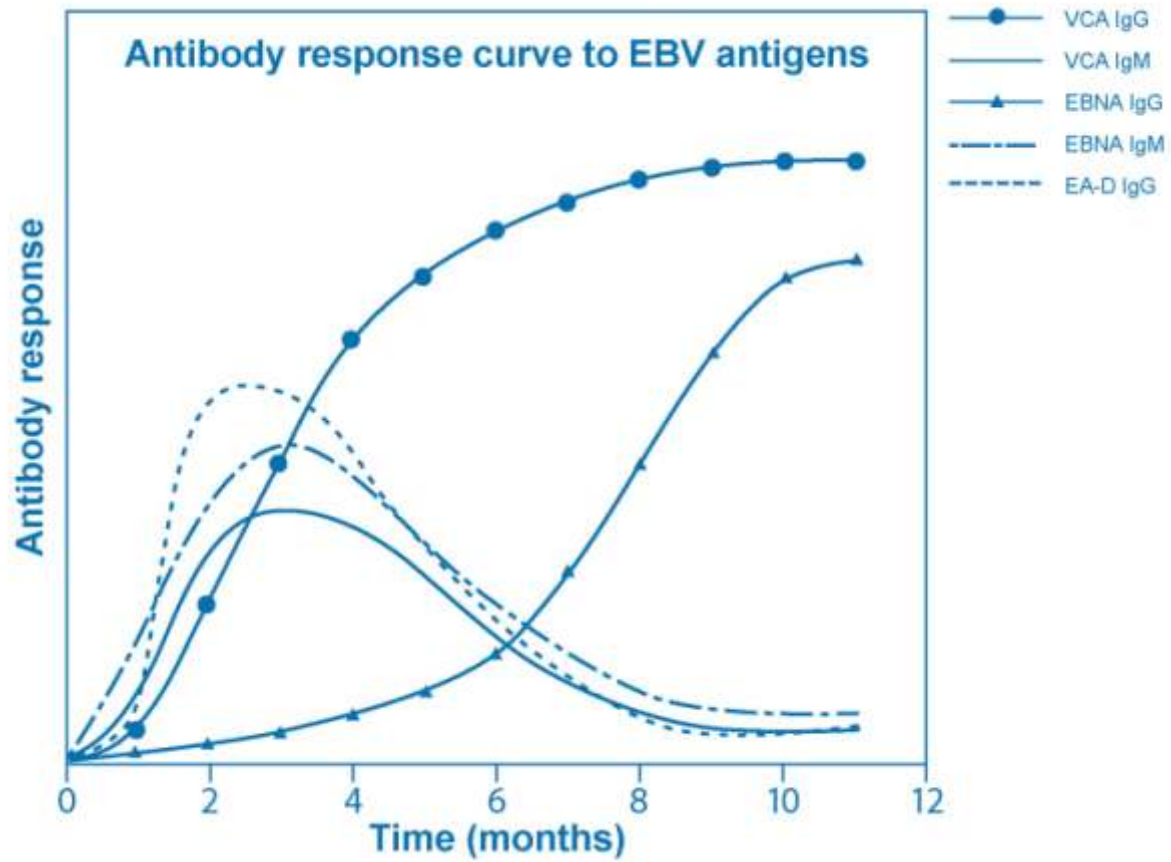
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim
Dalı, Eskişehir

- İnsan herpes virüsü
- Çift sarmallı, zarflı, DNA virüsü
- İnsan, enfeksiyonun tek doğal konağı
- B-lenfotropik
- B hücrelerde uzun süre latent kalabilir
- Erişkinlerin >%90'ı enfekte
- Primer enfeksiyonlar genelde tanı almaz

- Viral Kapsid Antijeni (VCA)
- Litik siklusun geç döneminde sentezlenir.
- Viral kapsidi oluşturan 7 yapısal protein ve glikoproteinden oluşur.

- Early antijen (EA)
- EA sadece litik siklustaki enfekte hücrelerde eksprese olan protein kompleksidir.
- Early antigen /diffüz (EA/D)
- Early antigen / restrikted (EA/R)
- EA/D akut enfeksiyon sırasında yükselir ve 3-6 ayda saptanamayan düzeylere düşer.
- EA/R 2 yıla kadar yüksek kalır.

- Nükleer antijenler (EBNA-1, EBNA-2, -3A, -3B,-3C,-LP)
- En az 6 proteinden oluşmuş kompleks (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP)
- Enfekte hücrelerde epizomal evrenin değerlendirilmesinde önemli
- Virus taşıyan bütün hücrelerde EBNA-1 ekspresyonu olur.



ELISA

- VCA'ya karşı antikorları saptamak için solid fazda pek çok farklı antijen kullanılmıştır (VCA, EBNA-1).
- Hızlı, duyarlı bir yöntem
- Otomasyona uygun

WESTERN BLOT VE LINE BLOT TESTLERİ

- Rekombinant antijenler; duyarlılık ve özgüllük yüksek
- Kolay okunan bantlar ile yorumlama kolay ve nettir.
- Test prosedürü kolaydır.
- IgM ve IgG antikorlar ayrı ayrı saptanabilir.
- Tek başına IgG stripi ile geçirilmiş EBV enfeksiyonlarının %95'e yakını doğru olarak tanımlanabilir.

EUROLineScan - protocol

Protocol: 20100527ebvig
Operator: osmangazi1

Date: 5/27/2010
Printed: 5/27/2010

No	Patient / Test	Lot	Strips
1	EBV2 EL	D071023AD 20-40	EBV-2 / 20-40
2	EBV2 EL	D071023AD 20-41	EBV-2 / 20-41
3	EBV2 EL	D071023AD 20-42	EBV-2 / 20-42
4	EBV2 EL	D071023AD 20-43	EBV-2 / 20-43

EUROLineScan - protocol

Protocol: 20100527ebvig
Operator: osmangazi1

Date: 5/27/2010
Printed: 5/27/2010

No	Patient / Test	Lot	Strips
1	EBV2 EL	D071011AD 24-01	EBV-2 / 24-01
2	EBV2 EL	D071011AD 24-02	EBV-2 / 24-02
3	EBV2 EL	D071011AD 24-03	EBV-2 / 24-03
4	EBV2 EL	D071011AD 24-04	EBV-2 / 24-04

EUROLineScan - evaluation

Protocol: 20100527ebvig
Operator: osmangazi1

Date: 5/27/2010 1:30:18 AM
Printed: 5/27/2010 5:53:27 AM

No	Patient ID Date of birth Test	EUROLINE / Allergy				Westernblot			
		Abbreviation				Results Result	Abbreviation		
		char					Category char		
1		LA Co EAD p22 EBN p19 125 EBV-2 / 20-40 LA Co EAD p22 EBN p19 125 +++ 0 0 0 0 0							
2		LA Co EAD p22 EBN p19 125 EBV-2 / 20-41 LA Co EAD p22 EBN p19 125 +++ (+) 0 (+) 0 0							
3		LA Co EAD p22 EBN p19 125 EBV-2 / 20-42 LA Co EAD p22 EBN p19 125 +++ 0 0 0 0 0							
4		LA Co EAD p22 EBN p19 125 EBV-2 / 20-43 LA Co EAD p22 EBN p19 125 +++ 0 0 (+) + 0							

EUROLineScan - evaluation

Protocol: 20100527ebvig
Operator: osmangazi1

Date: 5/27/2010 1:36:28 AM
Printed: 5/27/2010 5:56:51 AM

No	Patient ID Date of birth Test	EUROLINE / Allergy				Westernblot				
		Abbreviation				Results Result	Abbreviation			
		char					Category char			
1		LA Co EAD p22 EBN p19 125				EAD	p22	EBN	p19	125
		EBV-2 / 24- 01								
		LA	Co	EAD	p22	EBN	p19	125		
2		LA Co EAD p22 EBN p19 125				EAD	p22	EBN	p19	125
		EBV-2 / 24- 02								
		LA	Co	EAD	p22	EBN	p19	125		
3		LA Co EAD p22 EBN p19 125				EAD	p22	EBN	p19	125
		EBV-2 / 24- 03								
		LA	Co	EAD	p22	EBN	p19	125		
4		LA Co EAD p22 EBN p19 125				EAD	p22	EBN	p19	125
		EBV-2 / 24- 04								
		LA	Co	EAD	p22	EBN	p19	125		

Yöntem	Antijen veya substrat	Yorum
Seroloji		
IFA	P3HR-1, Raji gibi hücreler	Klasik metod, altın stand., spesifik, tek serumla evreleme
C fiksasyon reaksiyonu	EBV transforme hc. lizatı	Duyarlılık, özgüllük düşük, tek serumla evreleme yapılmaz
ELISA / kemiluminesans	EBV transforme hc. lizatı Rekomb. proteinler	Hızlı, duyarlı, otomasyon, tek serum örneği
blot (WB) (Line blot)	EBV transforme hc. lizatı Rekomb. proteinler	Spesifik, doğrulama metodu, tek serumla evreleme
IgG avid., IFA, ELISA, WB	Üreli ve üresiz antikor titreleri	Belirsiz sonuçların doğrulanması
heterofil antikor agg.	Paul-Bunnell ag, sığır eritrositleri	Duyarlılık, özgüllük düşük, 4 yaş altı çocukların %10-50'si (-)
Virus izolasyonu	Hasta lenfositlerinden lenfoblastoid hücreler	Özel laboratuvarlar, uzun sürede sonuç alınır (4-8 hafta)
Nükleik asit saptama		
PCR	Lenfosit, plazma, serum, BOS, doku	EBV-ilişkili meningoensefalit, viral yük, reaktivasyon
insitu hibrid., insitu PCR	Tümör dokusu, parafin kesit	EBV-ilişkili tümörleri saptama
Virus antijenleri , immunhistokimya, immunsitoloji	Tümör dokusu, parafin kesit	EBV-ilişkili tümörleri saptama

AMAÇ

- Epstein Barr Virus (EBV) enfeksiyonları tanısında pek çok farklı tanı yöntemi kullanılabilir.
- Tanı yöntemi algoritmaları, laboratuvarların hizmet verdiği hasta gruplarına ve sayısına, iş yüküne ve laboratuvar koşullarına göre seçilmelidir.
- Laboratuvarımızda, tarama amacıyla enzim immunoassay (ELISA), doğrulama amacıyla immüno blot testi kullanılmaktadır.
- Bu çalışmada, EBV immüno blot sonuçları ile ELISA test sonuçları karşılaştırılmıştır.

YÖNTEMLER

- EBV enfeksiyonları tanısı için toplam 99 serum örneği değerlendirilmiştir.
- Örneklerde immüno blot testiyle elde edilen sonuçlar gerçek sonuçlar olarak kabul edilmiş, ELISA testi sonuçları bu sonuçlarla kıyaslanmıştır.

- ELISA kitlerinde kullanılan antijenler,
 - anti VCA IgG için purifiye edilmiş rekombinant VCA p18,
 - anti VCA IgM için purifiye edilmiş VCA gp 125
 - anti EBNA-1 IgG için rekombinant EBNA-1
 - (Trinity Biotech, New York, ABD)

- İmmunoblot testinde;
 - EBV viral kapsid antijenleri (VCA) gp125 ve p19
 - EBV latent nüklear antijen-1 (EBNA-1)
 - early antijen-diffüz (EA-D)
 - p22'ye karşı oluşmuş IgM ve IgG sınıfı antikorlar araştırılmıştır.
 - (EUROLINE EBV Profile-2, Euroimmun, Almanya)

BULGULAR

- EBV-immüno blot testi ile, 99 örneğin
 - 8'i seronegatif
 - 8'i akut enfeksiyon
 - 62'si geçirilmiş enfeksiyon
 - 7'si anti-EBNA-1 antikorlarının yokluğu ile birlikte geçirilmiş enfeksiyon
 - 9'u reaktivasyon

- Doksan dokuz örneğin 69 (%69.7)'unda ELISA yorumları immünoblot test sonuçları ile **uyumlu** olarak bulunmuştur.
- Beş örnekte maternal IgG sınıfı antikorların varlığı yorumu yapılmıştır.
- ELISA testi, immünoblot testi ile akut enfeksiyon yorumu yapılmış olan 8 hastadan sadece 2'sini saptayabilmiş, bu hastalarda da tek başına VCA IgM varlığını gösterebilmiştir.
- Reaktivasyon yorumu yapılmış olan 9 hastanın 8'i, ELISA testi sonucuna göre geçirilmiş enfeksiyon tanısı almıştır.

TABLO İMMUNOBLOT SONUÇLARININ YORUMLANMASI VE ELISA TEST SONUÇLARI İLE KARŞILAŞTIRILMASI

İmmüno blot test yorumları	Uyumlu ELISA sonuçları n (%)	Uyumsuz ELISA sonuçları n (%)	Toplam
EBV seronegatif	5 (62.5)	3 (37.5)	8 (100)
Akut enfeksiyon	2 (25)	6 (75)	8 (100)
Geçirilmiş enfeksiyon	55 (88.7)	7 (11.3)	62 (100)
Anti EBNA-1 negatifliği olan geçirilmiş enfeksiyon	1 (14.3)	6 (85.7)	7 (100)
Reaktivasyon	1 (11.1)	8 (88.9)	9 (100)
Maternal antikorlar	5 (100)	0	5 (100)
Toplam	69 (69.7)	30 (30.3)	99 (100)

Immüno blot test yorumları	Uyumlu ELISA sonuçları n (%)	Uyumsuz ELISA sonuçları n (%)	Toplam
EBV seronegatif	5 (62.5)	3 (37.5) 2 hastada sadece EBNA pozitif, 1 hastada VCA-IgG ve EBNA pozitif	8 (100)
Akut enfeksiyon	2 (25) Her 2 hastada da sadece VCA-IgM pozitif	6 (75) 2'si seronegatif, 1'i VCA IgG/EBNA pozitif, 2'si hepsi pozitif, 1 VCA-IgG pozitif	8 (100)
Geçirilmiş enfeksiyon	55 (88.7) 3 hastada ELISA ile sadece EBNA pozitif	7 (11.3) 3 hastada ELISA ile EBNA yokluğunda geçirilmiş	62 (100)
Anti EBNA-1 negatifliği olan geçirilmiş enfeksiyon	1 (14.3)	6 (85.7) 1 hastada VCA-IgM pozitif, 1 hastada hepsi pozitif, 4 hastada VCA-IgG/EBNA pozitif	7 (100)
Reaktivasyon	1 (11.1)	8 (88.9) Hepsinde VCA-IgG/EBNA pozitif	9 (100)
Maternal antikorlar	5 (100) 3'ünde VCA-IgG/EBNA, 1'inde sadece EBNA pozitif, 1'i immunoblot ile VCA IgG/EBNA pozitif ancak ELISA ile sadece EBNA pozitif	0	5 (100)
Toplam	69 (69.7)	30 (30.3)	99 (100)

- VCA IgM-immüno blot sonuçları ELISA testi ile karşılaştırıldığında
 - 5 (%5.1) örnekte yalancı pozitiflik,
 - 12 (%12.1) örnekte yalancı negatiflik,
- VCA IgG-immüno blot için
 - 1 (%1.0) örnekte yalancı pozitiflik,
 - 11 (%11.1) örnekte yalancı negatiflik,
- EBNA-1 IgG-immüno blot için ise
 - 11 (%11.1) örnekte yalancı pozitiflik,
 - 4 (%4.0) örnekte yalancı negatiflik saptanmıştır.

**TABLO 2. İMMUNOBLOT TESTİYLE KARŞILAŞTIRILDIĞINDA
ELISA TESTİYLE ELDE EDİLEN YALANCI POZİTİF VE NEGATİF
SONUÇ SAYILARI**

İmmüno blot parametresi	ELISA testinde elde edilen sonuçlar n (%)
Anti VCA IgM	Yalancı pozitif 5 (5.1) Yalancı negatif 12 (12.1) Uyumlu 82 (82.8)
Anti VCA IgG	Yalancı pozitif 1 (1.0) Yalancı negatif 11 (11.1) Uyumlu 87 (87.9)
Anti EBNA-1 IgG	Yalancı pozitif 11 (11.1) Yalancı negatif 4 (4.0) Uyumlu 84 (84.9)

SONUÇ

- EBV enfeksiyonları tanısında ELISA, IFA, blot testleri gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir.
- ELISA kitlerinin duyarlılığı kullanılan antijenlerle ilişkilidir.
- Blot testleri özellikle enfeksiyonun evresinin belirlenmesinin zorunlu olduğu hastalarda önemlidir.
- Bu nedenle, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda, hastalığın evresi ile ilgili bilgi sağlayabilen testlerin kullanılması gerektiği düşüncesindeyiz.

TEŞEKKÜRLER