

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ROTAVİRUSUN 0-5 YAŞ ARASI ÇOCUKLARDA POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU (PZR) YÖNTEMİ İLE SEROTİPLENDİRİLMESİ VE
POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ İLE ELEKTROFEROTİPLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Melda MERAL

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gülendam BOZDAYI

ANKARA

Haziran 2010

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 15/06/2010


Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Gülendaml BOZDAYI
Gazi Üniversitesi



Doç. Dr. F. Nur AKSAKAL
Gazi Üniversitesi



İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	V
Resimler	VI
Grafikler	VII
Tablolar	VIII
Semboller, Kısaltmalar	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Rotavirusun sınıflandırılması.....	4
2.3. Rotavirusun yapısı ve proteinleri.....	6
2.3.1. Rotavirusun yapısal proteinleri.....	8
2.3.2. Rotavirusun yapısal olmayan proteinleri.....	10
2.4. Rotaviruslarda replikasyon ve morfogenez.....	15
2.5. Rotavirusun patogenezi.....	19
2.5.1. Rotavirus diyarelerinin patofizyolojisi.....	19
2.5.2. Rotavirus 'un tetiklediği diyarenin güncel modeli.....	21
2.5.3. Diyare indüksiyonunun moleküler esasları.....	24
2.6. Klinik Bulgular.....	26

2.7. Bulaşma yolları	28
2.8. İmmünoloji.....	29
2.9. Epidemiyoloji.....	32
2.10. Tanı.....	34
2.10.1.Özgül Tanı Teknikleri.....	35
2.11. Tedavi ve Beslenme.....	39
2.12. Korunma.....	41
2.12.1.Rotavirus aşılıarı.....	42
 3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Rotavirus antijeninin ELISA Testi ile saptanması.....	49
3.2.Gaita örneklerinden çift zincirli RNA'nın ekstraksiyonu.....	52
3.3. Rotavirusun G ve P tiplerinin belirlenmesi.....	53
3.3.1. Beg9 ve End9 primerleri kullanılarak RT PZR ile VP-7 amplifikasyon.....	54
3.3.2. Nested PZR ile G Tiplendirme.....	55
3.3.3. Con2 ve Con3 primerleri kullanılarak RT-PZR ile VP4 amplifikasyonu.....	56
3.3.4. Nested PZR ile P Tiplendirme.....	58
3.4. Agaroz jel elektroforezi.....	59
3.4.1. Agaroz jelinin hazırlanması.....	60
3.5. Poliakrilamid jel elektroforezi ile elektroferotiplendirme.....	61
3.5.1. Poliakrilamid jel elektroforez solüsyonlarının hazırlanması.....	62
3.5.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezinin hazırlanması.....	63

3.6. İstatistiksel	66
4. BULGULAR.....	67
5. TARTIŞMA.....	80
6.SONUÇ.....	92
7.ÖZET.....	93
8.SUMMARY.....	95
9.KAYNAKLAR.....	97
10. EKLER.....	108
11. ÖZGEÇMİŞ.....	109

ŞEKİLLER

Şekil 1: Rotavirusun genom segmentleri ve segmentlerden kodlanan proteinler.....	7
Şekil 2: Rotavirusun yapısal proteinleri.....	10
Şekil 3: Rotavirusa bağlı diyare modeli.....	23

RESİMLER

Resim 1: İnsan rotaviruslarının negatif boyalı bir preparatının elektron mikrofafisi.....	6
Resim 2: Premier™Rotaclone® Enzim-Immunoassay kitinin görüntüsü..	51
Resim 3: ELISA mikropiağındaki renk değişimi.....	51
Resim 4: Dikey Jel Elektroforez Cihazının Görüntüsü.....	65
Resim 5a-b: Rotavirus G tiplerinin AgaroZ Jel Elektroforezindeki görüntüsü.....	75
Resim 6a-b: Rotavirus P tiplerinin AgaroZ Jel Elektroforezindeki görüntüsü.....	76
Resim 7: Rotavirus Elektroferotiplerinin PAGE'deki görüntüsü.....	77

GRAFİKLER

Grafik 1: Rotavirus enfeksiyonlarının aylara göre dağılımı.....	71
Grafik 2: Rotavirus enfeksiyonlarının mevsimlere göre dağılımı.....	71
Grafik 3: Rotavirus G tipi saptanan örneklerde tiplerin dağılımı.....	73
Grafik 4: Rotavirus P tipi saptanan örneklerde tiplerin dağılımı.....	73
Grafik 5: Rotavirus G/P serotipi saptanan örneklerde tiplerin dağılımı....	74
Grafik 6 : Elektroferotiplerin yüzdelik dağılımı.....	78

TABLÖLER

Tablo 1: Rotavirusun Yapısal ve Yapısal Olmayan Proteinlerinin Özellikleri.....	14
Tablo 2: Yeni rotavirus aşılarının özellikleri.....	46
Tablo 3: Rotavirus VP-7 amplifikasyon primerleri.....	53
Tablo 4: Rotavirus G Tiplendirme Primerleri.....	55
Tablo 5: Rotavirus VP-4 amplifikasyon primerleri.....	56
Tablo 6: Rotavirus P tiplendirme Primerleri.....	58
Tablo 7: Çalışmaya dahil edilen 0-5 yaş arası akut gastroenteritli çocukların yaş gruplarına göre dağılımı	67
Tablo 8: Rotavirus antijeni saptanan hastaların yaş gruplarına göre dağılımı	68
Tablo 9: Rotavirus antijeni pozitif ve negatif hastalarda yaş verisi.....	68
Tablo 10: ELISA sonucuna göre kız ve erkek hastaların dağılımı.....	69
Tablo 11: ELISA pozitif hastaların cinsiyete göre dağılımı	69
Tablo 12: Rotavirus antijeni saptanan örneklerde G ve P tiplerinin dağılımı.....	72
Tablo 13: Elektroferotiplerin G tiplerine dağılımı	78
Tablo 14: Elektroferotiplerin P tiplerine dağılımı	79
Tablo 15: Elektroferotiplerin G/P tiplerine dağılımı	79

KISALTMALAR

- ADRV:** Yetişkin diyare rotavirusu
- CD4⁺ T_H:** Cluster of differentiation 4 T helper
- CD8⁺ T:** Cluster of differentiation 8 T
- CDC:** Center for disease control and prevention
- cDNA:** Komplementer deoksiribonükleik asit
- CTL :** Sitotoksik T lenfosit
- DLP:** Çift tabakalı partikül
- DNA:** Deoksiribonükleik asit
- dsRNA:** Çift zincirli RNA
- EIA:** Enzim-İmmünoassay
- ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- ENS:** Enterik sinir sistemi
- ER:** Endoplazmik retikulum
- FDA:** Food and drug administration
- G:** Glikoprotein
- IFA:** İmmunofloresan antikor testi
- IRF:** İnterferon regülatör faktör
- NaCl:** Sodyum klorür
- NSP:** Yapısal olmayan protein
- NTPaz:** Nükleozit trifosfataz
- ORF:** Açık okuma çerçevesi
- P:** Proteaz sensitive

PAGE: Poliakrilamid jel elektroforezi

PBS: Fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu

PGE2: Prostaglandin E2

PLC-IP₃: Fosfolizpaz C-inozitol 1,3,5-trifosfat

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RbRP: RNA bağımlı RNA polimeraz

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

RNA: Ribonükleik Asit

RT-PZR: Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SA: Sialik asit

SCID: Severe combined immunodeficient mice

SG: Subgrup

SIDS: Ani bebek ölümü sendromu

SLP: Tek tabakalı partikül

TLP: Üç tabakalı partikül

VP: Yapısal protein

[Ca⁺²]_i: Hücre içi kalsiyum

[K⁺]_i: Hücre içi potasyum

[Na⁺]_i: Hücre içi sodyum

5-HT: 5-Hidroksi triptamin

1.GİRİŞ

Rotavirus, dünya genelinde 5 yaş altı çocuklarda görülen akut gastroenteritlerin en önde gelen etiyolojik ajanıdır. Rotavirus diyaresi nedeniyle dünya genelinde her yıl 111 milyon diyare atağı, 25 milyon poliklinik başvurusu olmakta ve 2 milyon çocuk hastaneye yatırılmaktadır.¹ Şiddetli rotavirus diyareleri sebebiyle %85'i gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere dünya çapında her yıl 611,000 çocuk hayatını kaybetmektedir.²

Gastroenterite sebep olan diğer ajanlardan farklı olarak rotaviruslar, sosyoekonomik koşullara ve hijyen önlemlerine bağlı olmaksızın gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde aynı sıklıkta görülmektedir. Bu nedenle rotavirus "demokratik virus" olarak da adlandırılmaktadır.^{3,4} Rotavirus gastroenteritleri tedavi olanaklarının yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelere mortalite ile gelişmiş ülkelere ise morbidite ve ekonomik kayıplarla sonuçlanmaktadır.³ Beş yaş altındaki çocuklarda akut gastroenterit nedeniyle hastane yatışlarının %39'undan (% 25-58'inden) rotaviruslar sorumludur.^{5,6}

Yapılan seroprevalans çalışmaları dünyada hemen hemen üç yaşın altındaki tüm çocukların rotavirus enfeksiyonu geçirmiş olduğunu ve rotavirusun en yüksek insidansa 6-24 aylık çocuklarda ulaştığını göstermektedir.^{4,7} İlk rotavirus enfeksiyonu, gelişmekte olan ülkelere (6-8 ay) gelişmiş ülkelere (14-18 ay) göre daha erken gerçekleşmektedir. Hasta bakımı ve tedavi yetersizliğinden dolayı gelişmekte olan ülkelere daha şiddetli ve ağır enfeksiyonlar gözlenmektedir.³

Dünyada en sık görülen rotavirus tipleri G1-4, G9, P[8], P[4] ve P[6]'dır. Serotip G1P[8] (%64.7), G2P[4] (%12), G4P[8] (%8.5) ve G3P[8] (%3.3) çocuklardaki rotavirus diyarelerinin %88.5'inden sorumlu tutulmaktadır.⁸

Yapılan çalışmalar rotavirusun ülkemizde de 0-5 yaş arası çocuklarda gastroenterite sebep olan önemli bir etken olduğunu, en çok iki yaşın altındaki çocukların etkilendiğini ve ülkemizde de diyare kaynaklı hastane yatışlarına, morbiditeye ve mortaliteye sebep olduğunu göstermektedir. Ancak ülkemizdeki epidemiyolojik değişikliklere ışık tutulabilecek daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.^{3,4,6}

Bu çalışmanın amacı; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı'na gastroenterit şikayeti ile başvuran ve gaitaları Mikrobiyoloji Laboratuvarına yollanan 0-5 yaş arasındaki çocuklarda rotavirus enfeksiyonlarının prevalansının belirlenmesi ve bölgemizde yaygın olan rotavirus serotip ve elektroferotiplerin saptanmasıdır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Akut diyare yüzyıllardır tüm dünyada küçük çocukların ölümüne sebep olan önemli bir etkindir. Şiddetli sıvı kaybına yol açan diyare ile hastaneye başvuran hastaların %80'inde 1973 yılına kadar enfeksiyöz ajanlar tanımlanamamıştır. Ancak 1973 yılında Ruth Bishop ve arkadaşları Geoffrey Davidson, Ian Holmes ve Brian Ruck tarafından Avustralya'da akut diyareli olan çocukların duodenum biyopsilerinin elektron mikroskopuyla incelenmesi sonucunda yeni bir virus keşfedilmiştir.⁹

Duodenal villuslarda dizili olan olgun epitel hücrelerinin sitoplazmalarında ve feçeste gözlenen bu yeni virusa elektron mikroskopunda tekerlek şeklinde görünmesi nedeniyle 1978'de Uluslararası Virusları Adlandırma komitesi tarafından Latince'de tekerlek anlamına gelen rotavirus ismi verilmiştir.^{7,9}

İlerleyen yıllarda, tanısal tekniklerin gelişmesi sonucunda çocukluk çağı diyarelerinin en yaygın sebebi olarak gösterilen rotavirus hakkında önemli bilgiler kaydedilmiştir.^{7,9}

2.2. Rotavirusun sınıflandırılması

Rotavirus, Reoviridae ailesinde yer alan ikozahedral yapıda, 70 nm büyüklüğünde bir virus grubunu oluşturur. Virion yapısı çift tabakalı protein kapsitten oluşmuştur. Zarfsız olması nedeniyle lipid çözücülere direnç göstermektedir.¹⁰ Rotavirus üç tabakalı bir partikülden (Triple-Layered Particle; TLP) oluşmaktadır. Bu tabakalar dıştan içe doğru; dış kapsid, iç kapsid ve kor kısmıdır.^{7, 9,10}

Rotaviruslar kapsid proteinin antijenik özelliklerine göre grup, subgrup ve serotiplere ayrılmaktadır. İç kapsid proteini olan viral yapı proteini 6 (VP6) virusun major antijenik determinantıdır. Rotaviruslar VP6 farklılıklarına göre A'dan G'ye kadar adlandırılan yedi gruba ayrılmaktadırlar. Grupları belirleyen bir diğer faktör genom segmentlerinin elektroforezdeki hareket özellikleridir.¹⁰

Grup A, B ve C rotavirusları hem insanda hem de hayvanlarda hastalık oluşturmaktadır. Buna karşın D-G grupları sadece hayvanlarda hastalık oluştururlar. İnsanlarda en çok A grubu enfeksiyonları görülmektedir.^{10,11} A grubu rotaviruslar da VP6 'da bulunan farklı epitoplara sayesinde subgruplara (SG) ayrılmaktadır. A grubu rotaviruslar da iki monoklonal antikorla (255/60 ve 631/9) reaktivite gösteren epitoplardan birinin veya ikisinin bulunmasına ya da hiç birinin bulunmamasına bağlı olarak SGI, SGII, SGI+II ve SG non-I ve SG non- II subgrupları tanımlanmıştır. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile subgruplara ayırma yöntemi yaygın olarak epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmış ve insan enfeksiyonlarında subgrup II subgrup I'e göre daha sık görülmüştür.^{10,11,12}

Dış kapsidde bulunan VP4 ve VP7 yapı proteinleri serotip spesifik antijenlerdir ve rotavirusların serotiplere ayrılmasını sağlamaktadırlar. Hem VP4 hem de VP7 antijenleri nötralizan antikor oluşumunu uyarmaktadır. Bu proteinler konak hücreye bağlanma ve girişten sorumludur. Protein VP7 viral yüzey glikoproteini olduğu için VP7'ye göre Glikoprotein (G) serotipleri belirlenmektedir, VP4 ise viral spike proteini olup proteaza duyarlıdır ve Proteaz sensitive (P) serotipleri VP4'e göre belirlenmektedir.^{7,9,10,11} Virusun G tipleri için serotip ve genotipler genellikle birbirleri ile uyumludur. Bu nedenle G tiplerini isimlendirmede çoğunlukla sadece serotipler kullanılmaktadır.⁸ Serotip G1, G2, G3, G4 ve G9 tüm dünyadaki insan enfeksiyonları ile ilişkilidir.^{7,10}

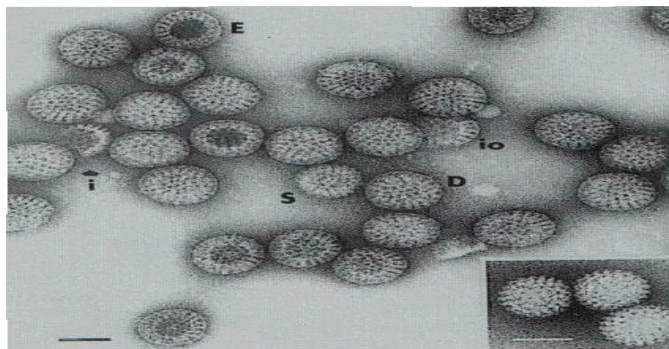
Rotavirusun P tiplendirmesi için durum biraz daha karmaşıktır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tabanlı tiplendirme ve serotiplendirme birbirinden farklı sonuçlar göstermektedir. Bu nedenle P tipleri bazen iki isim almaktadır. Örneğin serotip numarasını parantez içinde bir genotip numarasının takip ettiği P1A[8] gibi. Ancak P genotipleri serotiplere göre daha fazla tanımlandığı için P tipleri VP4 serotip testlerindeki standardizasyon güçlüğünden dolayı genellikle genotip numarasına göre belirlenmektedir.^{8,13,14} Birleşik genotiplendirme muhtemelen insan ve hayvan rotavirusları arasındaki genlerin reassortmentinden sonuçlanan nadir yeni virus tiplerinin tanımlanması için değerlidir.¹³

İnsanı enfekte eden yaygın P serotipleri 1A,1B,2A,3,4,5A,7, 8,11 ve 12' den oluşmaktadır.⁸ Virusun P serotipleri G serotiplerinden bağımsızdır. Bununla birlikte bazı G ve P serotipleri arasında sık birliktelik görülmektedir örneğin; P serotip1A'nın G serotip1,3,4 ile birlikteliği ve P serotip 1B'nin G serotip 2 ile birlikteliği. Diğer yandan rotavirusların

serotip dağılımında geniş bölgesel varyasyonlarının da olduğu belirtilmiştir.⁷ Klinik önemi olması dolayısıyla değerlendirmede en sık G serotipleri kullanılmaktadır. Dünyada rotavirus diyarelerinde en sık görülen serotipler G1P[8] (%64), G2P[4] (%12), G3P[8] (%3), G4P8 (%9) ve son zamanlarda önem kazanan G9P[8] ve G9P[6] (%4)'tür. Bu serotipler aşı çalışmalarında önem taşır. Serotipler birbirlerinden nötralizasyon testleriyle ayrılırlar.^{7,8} Günümüze kadar 23G ve 31P serotipi belirlenmiştir.^{15,16}

2.3. Rotavirusun yapısı ve proteinleri

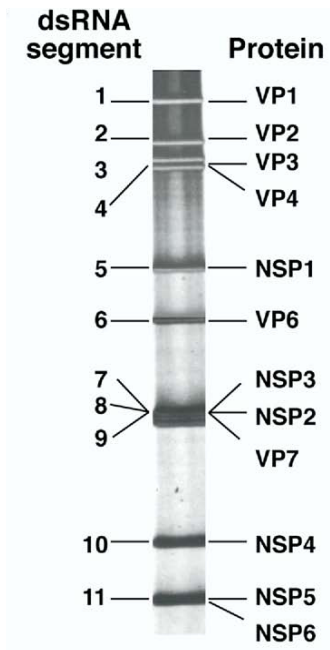
Rotavirus kapsidi genomu çevreleyen üç konsantrik protein tabakadan oluşmaktadır. Tam bir virion üç tabakalı partikül olarak adlandırılır. Rotavirusun; dış tabakası olmadığında ise çift tabakalı partikülü (Doubled-layered particles DLP) oluşturur ve bu tabaka enfeksiyöz değildir. Virionun iki dış tabakası olmadığında da tek tabakalı partiküller (Single-Layered Particles SLP) olarak adlandırılır (Resim 1).¹⁷



Resim 1: İnsan rotaviruslarının negatif boyalı bir preparatının elektron mikrofrafisi. D, çift tabakalı partiküller; S, tek tabakalı partiküller; E, boş kapsitler; i, iç tabaka fragmenti; io, iç ve dış tabaka kombinasyonunun fragmentleri. İçteki resim: Viral preparatın sodyum dodesil sülfat ile muamelesiyle elde edilmiş tek tabakalı partiküller. Çizgiler, 50 nm.

Rotavirus genomu 11 segmentten oluşan çift iplikli Ribonükleik asit (dsRNA) içermektedir. Genomda bulunan 11 RNA segmenti virus partiküllerini oluşturan 6 yapısal protein (VP) ve 6 yapısal olmayan proteini (NSP) kodlamaktadır (Şekil 1).^{10,14}

Yapısal proteinler VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 ve VP7'den oluşmaktadır(Şekil 1,2). Yapısal olmayan proteinler ise NSP1-NSP6' dan oluşmaktadır (Şekil 1). Kor rotavirus genomunu çevreler ve mRNA sentezi için bol miktarda RNA polimeaz enzimi içerir. Virionların %16'si nükleik asittir. Toplam genom 16500-21000 nükleotid uzunluğundadır. Virusun 5' ve 3' terminal sıraları korunan bölgelerdir. Viral genomun segmentli olması bu virusların genetik reassortment oluşturmalarını sağlamaktadır.¹¹ Genom segmentleri yaklaşık 660 - 3300 baz çifti kadardır ve kodladığı proteinlerde 12,000-125,000 civarında moleküler ağırlığa sahiptir.¹⁸



Şekil 1: Rotavirusun genom segmentleri ve segmentlerden kodlanan proteinler⁷

2.3.1. Rotavirusun yapısal proteinleri

Yapısal proteinler viral RNA'nın 1, 2, 3, 4, 6 ve 9. segmentlerinden kodlanmaktadır. Yapısal proteinlerden VP1, VP2 ve VP3 korda, VP6 iç kapsitte, VP4 ve VP7'de dış kapsitte yer almaktadır.¹⁴

Rotavirusun, 1. genom segmenti 125 kDa'lık VP1'i sentezlemektedir. Protein VP1 kor bölgesinin yapısında yer alan üç proteinden biridir. Bu protein RNA-bağımlı RNA polimerazdır (RbRP) ve tüm viral polimerazların ortak dizisini paylaşmaktadır. Replikasyonda görev alan bu protein tek iplikçikli RNA'ya (ssRNA) bağlanma özelliği taşımaktadır. İkozahedral köşelerinden VP2 ile etkileşim kurmakta, VP3 proteini ile de kompleks oluşturmaktadır.^{17,18,19}

Rotavirus RNA'sının 2 no'lu segmenti tarafından VP2 sentezlenmektedir ve RNA'ya bağımlı bir protein olarak bilinmektedir. Kor bölgesinde baskın olarak yer alan, 102 kDa'lık bir proteindir.^{10,20} Protein VP2, ikozahedral bir kalıpta 60 dimer şeklinde organize olmuş 120 molekülden oluşmaktadır. Böyle 120 subüniteden oluşan ikozahedral bir organizasyon eşsizdir ve sadece çift zincirli RNA içeren viruslarda bulunmaktadır.¹⁷ Protein VP2 hem tek hem de çift zincirli RNA'ya bağlanma özelliğine sahiptir.²⁰ Protein VP2'nin N-terminal rezidüleri RNA bağlama aktivitelerinin yanında VP1 ve VP3 ile ilişki sağlamada önemlidir.¹⁷ Protein VP2, VP1'in replikaz aktivitesi için gereklidir.^{18,20}

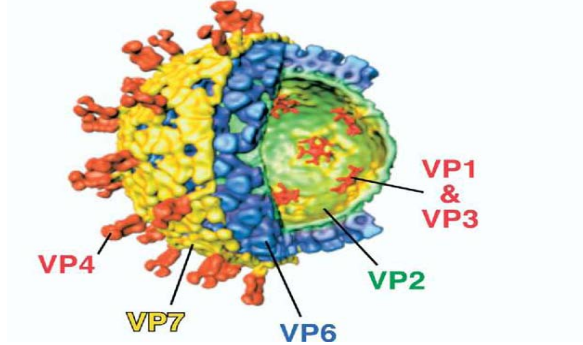
Rotavirusun, VP3 proteini 3 no'lu segmentten kodlanmakta ve kor yapısında yer almaktadır.¹⁰

Protein VP3, kor bölgesinin minor (98kDa) bileşenidir. Guanil ve metil transferaz aktivitesine sahiptir. Enkapside RNA transkriptlerinin üretilmesi için enzimatik fonksiyonları gerçekleştirmektedir.¹⁷

Rotavirüslerde dış kapsid, bir glikoprotein olan VP7'nin (38kDa) 780 kopyası ve spike protein VP4'ün (88kDa) 120 kopyasından oluşmaktadır. Protein VP4 konak hücreye tutunmadan ve penetrasyondan sorumludur. Ayrıca hemagglütinasyon, nötralizasyon ve virulans faktörü olarak görev almaktadır.¹⁷ Genom segment 4, VP4' ü sentezlemektedir. Rotavirüs VP4 proteini ikiye ayrılarak, VP5 ve VP8'i oluşturmaktadır. Protein VP5 ve VP8 dış kapsidde yer alarak hemagglütinin ve nötralizasyon antijenlerini içermektedirler.¹⁰

Viral protein 6 iç kapsidde yer alan, 6. segmentten kodlanan, hidrofobik alt grup antijenidir. Kapsid proteinlerinin %51'i VP6'dan oluşmaktadır. Bu protein non-nötralizan antikor cevabını oluşturmaktadır.¹⁰ Protein VP6 dış tabakada VP4 ve VP7 ile iç tabakada da VP2 ile etkileşime girerek hücreye girişi ve endojenöz transkripsiyonu tamamlamaktadır. Rotavirüsün VP6 tabakasında bulunan kanalların mRNA'nın çıkışı için kullanıldığı düşünülmektedir.¹⁷ Ayrıca VP6, NSP4 ile de etkileşim kurmaktadır.²¹

Rotavirüsün VP7 proteini dış kapsidde bulunan ve toplam kapsid proteinlerinin %30 'unu oluşturan, 9 no'lu segmentten kodlanan yapısal bir proteindir. Bu protein nötralizan antijeni içeren ve rotavirüslerin hücreye tutunmasını sağlayan bir yapıdır. Dış kapsidin glikozillenmiş en büyük proteindir. Grup A virüslerin G serotipinden sorumludur.¹⁰



Şekil 2: Rotavirusun yapısal proteinleri ¹⁴

2.3.2. Rotavirusun yapısal olmayan proteinleri

Rotavirus genom segmentlerinden 5, 7, 8,10 ve 11 yapısal olmayan proteinleri kodlamaktadır (Şekil1).¹⁰ Yapısal olmayan proteinler enfekte hücrelerde sentezlenir. Bu proteinler replikasyon döngüsünün bazı kısımlarında, konak proteinlerini etkileyerek patogeneze oluşturmada ya da enfeksiyona immun cevapta rol oynamaktadırlar.¹⁴

Rotavirusun NSP1 proteini 5. segment tarafından kodlanır. Rotavirus enfeksiyonları sırasında interferon regülatör faktörleri IRF3, IRF5 ve IRF7 fonksiyonları üzerine antagonist etki yaparak, Tip 1 interferon cevabını inhibe etmektedir. İnterferon regülatör faktörleri 3, IRF5 ve IRF7'nin degradasyonunu uyararak, virus yayılımını engellemeye çalışan immun mekanizmaya antagonist çalışmaktadır.²²

Viral RNA'nın 8. segmentinde NSP2 kodlanmaktadır. Enfekte hücrelerde oldukça fazla bulunan, 317 aminoasitten oluşan,

yüksek ölçüde korunmuş, 35Kda'luk bir proteindir. Viroplazmada lokalizedir. Protein NSP2 oktamaları Nükleozit trifosfataz (NTPaz) aktivitesi ile ilgilidir.²³ Virüsün NSP2 oktamaları Mg^{+2} -bağımlı nükleozit 5'-trifosfat (NTPaz) ve Mg^{+2} - bağımsız heliks-de stabilizasyon aktivitesine sahiptir. Nükleozit Trifosfat 'ın NSP2 tarafından hidrolizi sırasında ($NTP \rightarrow NDP + P_i$) protein fosforilasyon geçirmektedir.²⁴

Viroplazmanın oluşumu NSP2 ve NSP5 proteinlerine bağlıdır. Protein NSP2'nin VP1'e affinitesi olduğu kanıtlanmıştır. Rotavirus morfogenezinde, kor oluşumunun desteklenmesi için gerekli olan uygun iç kapsid proteinlerinin viroplazmaya toplanmasında NSP2 ve NSP5 görev almaktadır.²³

Viral RNA'nın 7. segmentinden NSP3 kodlanır. Viral mRNA'nın translasyonunu kolaylaştıran bir proteindir. Viral transkriptlerde konsensus 3' dizisini tanıyan, 63kDa'lık temel bir proteindir. Rotaviral transkriptler, transkripsiyon sırasında VP3'ün etkisiyle 3'uçlarından kapatılmıştır. Ancak 5' uçları poli-adenillenmemiştir. Rotaviruslar genom tarafından kodlanan proteinlerinin translasyonunu konağa yaptırırlar. Konak hücrelerinde de sadece poliadenillenmiş ve kapatılmış mesajlar translasyona uğratılmaktadır. Rotavirusun NSP3 proteini konak translasyonunu bozarak viral mRNA tarafından kodlanan translasyonun gerçekleştirilmesini sağlar. Asimetrik NSP3 homo-dimerleri 3'konsensus dizisine (5'-GUGACC) bağlanır ve büyük bir kısmını homo-dimer üzerinde köklü, derin bir yarık içinde saklar. Böylece 3' terminal nükleotitleri için bir son yaratır. Bu sıkı etkileşim sadece rotavirus mRNA'sının translasyonunu sağlamakla kalmamakta aynı zamanda selüler nükleazların rotavirus mesajlarını yıkmasını da engellemektedir.¹⁷

Protein NSP4 10. gen segmenti tarafından kodlanmaktadır. Viral olgunlaşmada rol oynamaktadır. Tek tabakalı partiküller için hücre içi bir reseptör olarak görev alır ve bu partiküllerin tomurcuklanarak Endoplazmik retikulum (ER) membranı boyunca translokasyonuna yardım eder. Tomurcuklanan partiküllerden yalancı zarfın ayrılması için NSP4'ün glikolizasyonu gereklidir. Toplam 175 aminoasitten oluşan NSP4 glikoproteininin üzerinde iki fonksiyonel domaini bulunmaktadır. Bunlardan biri SLP'ye tutunmayı sağlarken diğeri VP4 proteinine bağlanmayı sağlar. Bu domainler sırasıyla 161-175 aa ve 112-148 aa 'da bulunmaktadır. Protein NSP4 ile VP6 arasında da bir korelasyon olduğu bilinmektedir.²¹

Ayrıca NSP4 enfeksiyon sırasında diyareye sebep olan bir viral enterotoksin olarak görev almaktadır.²¹ Protein NSP4 ve NSP4'ten türeyen 22aa'lık bir peptid, ER'den kalsiyum iyonunun transportunu harekete geçiren kalsiyum-bağımlı sinyal transdüksiyon yolunu aktive ederek hücre içi kalsiyum ($[Ca^{+2}]_i$) seviyesini yükseltmektedir, artan $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonu, sitoskeleton disorganizasyonu ve hücre ölümü ile sonuçlanabilen membran de stabilizasyonuna neden olur. Bu nedenle NSP4'ün enfekte hücrelerden salınışından sonra intestinal epitele bağlanması, iyon transportunun bozulmasına ve diyareye neden olabilmektedir.¹⁸ Hücrelerde hücre içi Ca^{+2} 'yi toplayan tek rotavirus proteini NSP4'dür.¹⁴

Bir diğeri protein NSP5 segment 11 tarafından kodlanan iki proteinden (NSP5 ve NSP6) büyük olanıdır. Bu protein, 5' proksimal AUG'de başlayan uzun açık okuma çerçevesi (ORF)'den eksprese edilmektedir. Serin ve treonin rezidüleri bakımından zengin, oldukça asidik bir proteindir. Bu protein 198 aa'den oluşur ve dimeriktir.^{24,25, 26}

Enfekte hücrelerde oksijene bağlı glikolizasyon (O-linked glycosylation) geçirir ve hem hipo- hem de hiper-fosforillenmiş formda bulunur. Protein NSP5, VP1 ve NSP2 ile etkileşim halindedir ve bir RNA bağlayıcı proteindir, ancak diğer NSP'lerden farklı olarak hem ssRNA hem de dsRNA'ya non-spesifik olarak bağlanabilir.^{24,25, 26}

Viroplazmanın oluşumunda NSP2 ve NSP5 proteinleri birlikte rol almaktadır. Protein NSP2'nin VP1'e, affinitesi olduğu gibi, NSP5'in de VP2'ye affinitesi olduğu kanıtlanmıştır. Protein NSP5, NSP2 ile birlikte kor oluşumunun desteklenmesi için gerekli olan uygun iç kapsid proteinlerinin viroplazmaya toplanmasını sağlamaktadır.²³

Yapısal olmayan protein NSP6, (11kDa) 11. segmentin alternatif bir açık okuma çerçevesi tarafından kodlanan küçük bir proteindir. Viral izolatların çoğunda 92 aa uzunluğundadır ve viroplazmada lokalizedir. Bu protein, NSP5 proteininin dimerizasyonu için gerekli olan C-terminal bölgesi ile etkileşim halindedir. Bu nedenle NSP6, NSP5 dimerlerinin oluşumunu etkilemektedir. Protein NSP5'in dimerizasyonu bu proteinin hiperfosforilasyonuna da etki eder. Bu nedenle NSP6 dolaylı olarak fosforilasyonu da kontrol eder.²⁵

Özet olarak NSP6, NSP5'in multimerizasyonu ve fosforilasyonunda regülator rolü oynayan bir proteindir.^{24,25} Protein NSP6, Mc323 ve Alabama gibi bazı A grubu rotavirus suşları ve tüm C grubu rotaviruslarda kodlanmamaktadır. Bu da NSP6'nın replikasyonda yer almadığını ve bu suşlarda yerini fonksiyonel olarak başka bir protein ile değiştirdiğini göstermektedir.²⁵

Tablo1: Rotavirusun Yapısal ve Yapısal Olmayan Proteinlerinin Özellikleri

RNA segmenti	Baz çiftleri sayısı	Kodlanan proteinler	Proteinin moleküler ağırlığı H10 ⁻⁴	Proteinlerin özellikleri
1	3300	VP1	12.5	Yapısal protein, iç kor proteini, RNA bağımlı RNA polimeraz, ssRNA'ya bağlanma, VP3 ile kompleks oluşturma, VP2 ile etkileşim
2	2700	VP2	9.4	Yapısal protein, kor proteini, dsRNA ve ssRNA'ya bağlanma, VP1 replikaz aktivitesi için gerekli
3	2600	VP3	8.8	İç kor proteini, guanil transferaz, metil transferaz, VP1 ile kompleks oluşturma
4	2360	VP4	8.7	Dış kapsid proteini, reseptör bağlama, virulans faktörü, nötralizasyon proteini, hemagglütinasyon füzogenik protein, VP5 ve VP8 oluşturma
5	1600	NSP1	5.9	Yapısal olmayan protein, RNA'ya bağlanma, IRF 'ye antagonist
6	1360	VP6	4.5	İç kapsid proteinin, grup ve subgrup antijeni, transkripsiyon için gerekli
7	1100	NSP3	3.5	Yapısal olmayan protein, mRNA bağlayıcı, konak translasyonunu engelleme.
8	1060	NSP2	3.7	Yapısal olmayan protein, RNA ve NSP5 bağlayıcı, viroplazma oluşturma
9	1060	VP7	3.7	Dış kapsid glikoproteini, nötralizasyon proteini
10	750	NSP4	2.0	Yapısal olmayan protein, transmembran proteini, enterotoksin, hücrede Ca ⁺² toplama
11	660	NSP5	2.2	Yapısal olmayan protein, fosforillenmiş, NSP2 bağlayıcı, VP2 ve NSP6 etkileşimi
		NSP6	1.2	Yapısal olmayan protein, NSP5 dimerizasyonu ve fosforilasyonu

2.4. Rotavirüslerde replikasyon ve morfogenez

Rotavirüslerin replikasyonu genellikle maymun böbreğinden köken almış devamlı hücre kültürlerinde incelenmiştir. Bu hücrelerde rotavirüsler 10-12 saat gibi kısa bir sürede replike olmaktadır.^{7,10}

Rotavirüslerde dış kapsid VP7 ve VP4' ten oluşmaktadır. Konak hücreye tutunma ve penetrasyondan VP4 sorumludur ve proteolize yatkın bir proteindir. Protein VP4'ün tripsin ile proteolitik yırılması viral infektiviteyi kat kat artırır ve hücre içine girişı kolaylaştırır. Proteoliz sırasında VP4; VP5 ve VP8 yapılarına ayrılır. Yarıma ürünleri virionla ilişkili olarak kalır.¹⁷

İn vitro deneyler VP5 gibi proteolitik olarak aktive edilmiş partiküllerin lipofilik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle proteoliz rotavirüslerin hücreye girişinde önemli bir anahtar oluşturur ve rotavirüs replikasyonu proteazlarca zengin bir ortam olan ince barsak enterositleri içinde gerçekleşir. Proteolizle artan infektivitenin moleküler mekanizması ve membran penetrasyonundaki rolü tam olarak bilinmemektedir. Tripsin ile yarılmanın, spike proteinin bağlanmasını düzenlediğı ve ikozahedral dizilimi verdiğı düşünülmektedir, yani doğru konformasyonun oluşturulması ve spikelerin uygun bağlanmasının sağlanmasında hücre içi bir rol oynamaktadır.¹⁷

Birçok çalışmadan elde edilen sonuçlara göre rotavirüsün hücreye girişı ilk hücreye tutunma basamağında siyasilik asit (SA) içeren reseptörleri, sonraki tutunma basamaklarında da $\alpha\text{v}\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$ ve $\alpha 2\beta 1$ gibi

integrinleri gerektiren çok basamaklı bir işlemdir. Bu işlemde VP8 domaini SA ile etkileşime ihtiyaç duyarken, VP5 integrinler ile etkileşmektedir. Ancak SA tüm rotavirus suşlarının enfeksiyonu için gerekli bir basamak değildir. İnsan rotaviruslarını da içine alan birçok rotavirus suşunda hücreye giriş SA varlığından bağımsızdır.^{17,27}

Hücreye giriş işlemi çok basamaklıdır ve bir seri konformasyonel değişiklik gerektirmektedir. Örneğin SA bağımlı suşlarda VP4'ün integrinlere daha etkin bağlanabilmesi için VP8'de konformasyonel değişiklikleri uyatabilmektedir. Siasilik asitten -bağımsız olanlarda ise VP4 reseptörler ile etkileşime girmek için uygun konformasyonel yapıdadır. Hücreye girişte VP4'ün konformasyonel adapte olabilirliği ve esnekliği önemli bir rol oynamaktadır.^{17,28}

Protein VP7'nin hücre ile erken etkileşimi bilinmemektedir, ancak VP7'nin tutunma ve giriş işlemi sırasında VP4'ün fonksiyonunu değiştirebildiği ve VP4 ile ilk etkileşim başladıktan sonra hücre yüzey molekülleri ile etkileşime girebildiği düşünülmektedir.¹⁷

Hücreye giriş sırasında gerçekleşen olaylardan ilki transkripsiyon için aktif DLP oluşturmak için dış tabakanın kaybedilmesidir. Protein VP7 kalsiyumu bağlama özelliğine sahiptir. Uygun seviyelerdeki kalsiyum VP7 tabakasının yapısal bütünlüğünü korurken, sitoplazmada olduğu gibi düşük konsantrasyondaki kalsiyum ise VP7 trimerinin çözülmesini uyarmakta ve VP7 tabakasının soyulmasını sağlamaktadır. Dış tabakanın soyulması ile replikasyon için önem taşıyan transkripsiyonel yapı DLP oluşur. Çift tabakalı partiküller konak sitoplazmasına yayılmıştır. Bu partiküller sahip oldukları viral RNA'dan viral mRNA'lar (pozitif iplikcik)

üretmek sitoplazmaya yollar. Virusun VP6 tabakasındaki kanalların mRNA'nın çıkışı için kullanıldığı düşünülmektedir. Endojen genom replikasyonu ve transkriptlerin (mRNA) ayrılışını takiben rotavirus replikasyonun üç temel aşamaya sahip olduğu görülmektedir.¹⁷ Bunlar;

- ✓ Translasyon ve viral proteinlerin sentezi
- ✓ Replikasyon, genom paketlenmesi ve DLP'nin toplanması
- ✓ Yeni oluşturulan DLP'nin ER'ye tomurcuklanması ve olgun TLP'nin oluşturulması için dış tabakanın toplanması

Pozitif tek iplikçik RNA transkriptleri (viral mRNA'lar) rotavirus proteinlerini kodlar ve progeni dsRNA'yı oluşturmak için negatif iplikçiklerin oluşturulmasına kalıp görevi yapar. Translasyon ile viral proteinler oluşturulur. Yeni sentezlenen viral proteinler (VP1, VP3 vb) sitoplazmada bulunan viroplazma içinde paketlenerek kor yapısını oluştururlar. Negatif RNA iplikçığının replikasyonu da korların içinde gerçekleştirilir. Negatif iplikçığın sentezi ve sonrasında çift tabakalı yapının oluşturulması RbRP olan VP1 tarafından gerçekleştirilir.¹⁷ Oluşan dsRNA'dan viral transkriptler üretmek için gerekli tüm enzimatik aktiviteleri, oluşan partiküllerin kor bölgesindeki proteinler üstlenmektedir, çünkü ökaryotik hücreler dsRNA kalıbından mRNA transkribe eden RNA polimerazı üretemezler.¹⁴

Viral replikasyon ER'ye yakın, hücre çekirdeğine bitişik olan viroplazma adı verilen özelleşmiş elektron yoğun yapılar içinde gerçekleşir. Viroplazmalar olgun viral proteinlerden oluşmaktadır ve viral replikasyon döngüsü sırasında büyüklük ve şekilleri değişmektedir.¹⁴

Viroplazmanın oluşumu NSP2 ve NSP5 proteinlerine bağlıdır. Protein NSP2'nin VP1'e, NSP5'inde VP2'ye affinitesi olduğu kanıtlanmıştır. Protein NSP2 ve NSP5'in kor oluşumunun desteklenmesi için gerekli olan uygun iç kapsid proteinlerinin viroplazmaya toplanmasında önemli olduğu düşünülmektedir.²³

Viroplazmanın çevresinde VP6 bakımından zengin bir bölge bulunur ve VP6 proteinlerinin korları çevrelemesiyle DLP yapımı tamamlanmış olur.²³ Yeni replike dsRNA'yı içeren DLP'ler geçici zarflı hale gelerek viroplazmadan ER'ye tomurcuklanmaktadır. Partiküllerin ER'ye tomurcuklanması DLP'lerin bir hücre içi reseptöre bağlanması ile başlamaktadır. Bu reseptör bir transmembran ER glikoproteini olan NSP4 proteinidir.¹⁴ Çift tabakalı partiküller, ER transmembran proteini NSP4 'e VP6 proteininin affinitesi ile bağlanmakta, DLP-NSP4 etkileşimi DLP'nin VP7 içeren membran kümelerini de uyarmakta ve bilinmeyen bir mekanizma ile zarfın VP7 componenti TLP oluşturmak için birleşmektedir. Protein VP4 'ün ise nasıl birleştiği bilinmemektedir. Çift tabakalı partiküller ER içinde geçici zarfını ve NSP4'ü kaybetmektedir. Protein VP4 ve VP7 dış kapsid tabakasını birleştirerek TLP'yi oluşturur. Böylece rotavirus morfogenezi tamamlanmış olur. Olgun virus partikülleri hücreden hücre lizisi ile ayrılır.²³

Rotavirus replikasyonu, morfogenezi ve patogenezi Ca^{+2} önemli bir yer tutmaktadır. Rotavirus replikasyonu $[Ca^{+2}]$ i seviyesini düzenlemekte ve 3 kat $[Ca^{+2}]$ i artışı ile sonuçlanmaktadır. Virion oluşturulmasında, endojen RNA polimerazın aktivasyonunda ve viroplazmanın oluşturulmasında Ca^{+2} önemli bir işleve sahiptir. Virus morfogenezi Ca^{+2} olmadan çift tabakalı partikül basamağında kalmaktadır.

Ayrıca NSP4, ER'den Ca^{+2} salınımını sağlamakta, bu da plazma membran geçirgenliğini ve hücrelere ekstraselüler Ca^{+2} girişini düzenlemektedir.¹⁴

2.5. Rotavirusun Patogenezi

Diyareye sebep olan etiyolojik ajanlar arasında bakteriler, parazitler ve çeşitli toksinler gösterilmekte, viral etkenler ise dünya genelindeki tüm enfeksiyöz diyarelerin %50-%75'inden sorumlu tutulmaktadır. Rotaviruslar, bebek ve beş yaş altı çocuklarda görülen diyarelerin, özellikle hastane yatışlarına ve bebek ölümlerine neden olan ağır gastroenteritin en önde gelen nedeni olarak gösterilmektedir.^{11,31,1} Bu ajanlar kansız bol miktarda, non inflamatuvar diyareye neden olmaktadır. İnce barsak epitelyum fonksiyonunu değiştirerek su absorpsiyonunu önleyip, su ve iyon kaybına yol açarak sulu diyare oluşturmaktadır.²⁹

2.5.1. Rotavirus diyarelerinin patofizyolojisi

İnce barsakta sıralanan hücreler genellikle enterositler ve kript hücreler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 3). Villus enterositleri, sindirim ve emilim fonksiyonlarına farklılaşan, villiyi saran olgun ve non-proliferatif hücrelerdir. Absorptif enterositler çok sayıda disakkaridazları, peptidazları, sindirimle ilgili fonksiyonların yürütüldüğü apikal yüzey üzerinde eksprese edilen diğer enzimleri sentezlemektedir.³⁰

Kript epitelyum, kript hücrelerden oluşmaktadır ve villus enterositlerinin progenitörüdür. Normalde enterositlerin ve kript hücrelerin

birlikte hareketi elektrolitlerin ve suyun epitelyum boyunca, sabit iki yönlü akışını sağlamaktadır. Villi absorpsiyonu dengelerken, kript hücreler de sekresyonu dengelemektedir.³⁰

Rotaviruslar ince barsak epitelyumunun olgun enterositlerini enfekte etmekte ve bu olgun enterositlerde replike olmaktadır. Bu durum farklılaşmış enterositlerin etkin enfeksiyon ve replikasyon için gerekli faktörleri ekprese ettiğini ileri sürmektedir.³⁰

Enterositlerde çoğalan viruslar nedeniyle villus epitelyumu atrofi olmakta, mikrovilluslar azalıp, kısalmaktadır. Hasarlı hücreler barsak lümenine dökülmekte ve fazla miktarda virus açığa çıkmaktadır. İnce barsak epitelyumunun fonksiyonu diyare ile sonuçlanacak şekilde değişmektedir.³²

Diyarenin genellikle enterosit harabiyetine sekonder olarak malabsorpsiyona neden olduğu da gözlenmiştir.³³ Malabsorpsiyon, sindirilmemiş mono- ve disakkaritlerin, karbonhidratların, yağların ve proteinlerin kolona geçmesi ile sonuçlanmaktadır. Sindirilmemiş yumuşak ve çiğnenmiş durumdaki yiyecek kütlesi osmotik olarak aktiftir ve kolon yeterli miktarda su absorbe edememektedir, böylece osmotik diyare başlamaktadır.³⁰

Diyarenin, enfekte barsaklarda yükselmiş prostaglandin E2 (PGE2) seviyesine bağlı olduğu ve sekresyonun PGE2 tarafından uyarılmaya bağlı bir sekretuvar komponentinin olduğu ileri sürülmüştür.²⁹

Rotavirusun NSP4 proteininin, toksin benzeri aktivitesinin olduğu ve farelere enjekte edildiğinde diyareye sebep olduğu gözlenmiştir.³⁴ Farelerde yapılan deneylerde rotavirus diyarelerinde sıvı ve elektrolit sekresyonunun ~%67'sinin enterik sinir sisteminin (ENS) aktivasyonuna bağlı olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle rotavirus enfeksiyonu multifaktöriyeldir.³⁰

2.5.2. Rotavirusun tetiklediği diyarenin güncel modeli

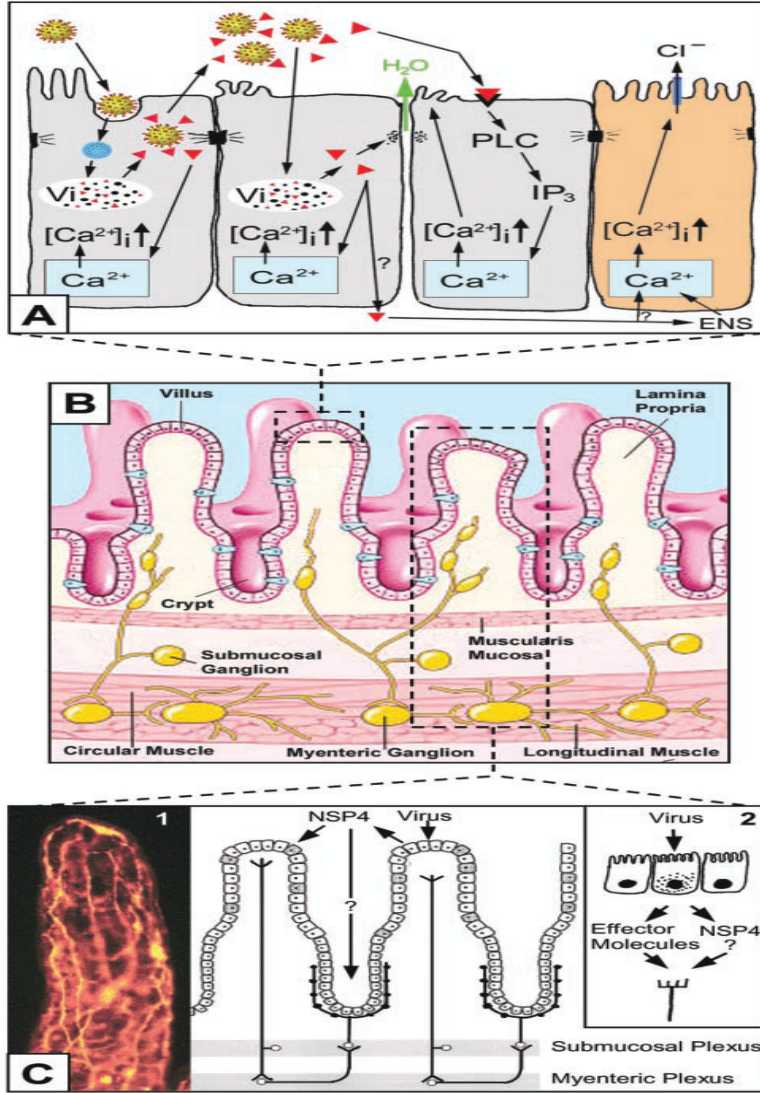
Diyareye öncülük eden işlem, rotavirus ince barsaklarda enterositlere bağlanıp, onları enfekte ettiğinde başlamaktadır (Şekil 3A). Virusun hücre içine girişi ve dış kabuğunun soyulması ile viroplazma oluşmakta, virus ve viral proteinler salınmaktadır. Böylece hücreler luminal virus tarafından enfekte edilmektedir.³⁰ Bu durum hücre içinde çok sayıda hücresel işlemi tetiklenmekte, klasik olmayan yolla NSP4 salgılanmaktadır. Hücre içi NSP4 internal depolardan, öncelikle ER'den, Ca^{+2} salınımını uyarmakta ve $[Ca^{+2}]_i$ yi arttırmaktadır (Şekil 3.A).^{14,30,34,32}

Hücre içi Ca^{+2} 'nin artışı, mikrovilus iskelet ağ yapısının bozulmasına, epitelyumun absorptif kapasitesinin azalmasına, epitelyal yüzey üzerinde sindirimle ilgili enzim ekspresyonunun azalmasına neden olmakta ve diyarenin malabsorbsiyon bileşenini doğurmaktadır.³⁰

Enfekte hücrelerden NSP4'ün salınımı, enfekte olmamış hücreler üzerinde parakrin etkilerin olmasına neden olmaktadır. NSP4, spesifik reseptörler kullanarak bu hücrelere bağlanmakta ve fosfolizpaz C-inozitol 1,3,5-trifosfat (PLC-IP₃) kaskadını tetiklemektedir, bu da ER'den Ca^{+2} 'nin salınımı ve $[Ca^{+2}]_i$ artışı ile sonuçlanmaktadır (Şekil 3.A).

Sadece enfekte hücrelerden salınan NSP4 PLC'yi uyarabilmekte, hücre içi NSP4 ekspresyonu PLC uyarımı yapamamaktadır.^{29,30,32}

Eğer NSP4, enterositler üzerinde etkili olursa sıkı bağlantıların (Tight junction) ayrılmasına neden olmakta, su ve elektrolit akışına izin vermekte yani parasellüler geçirgenlik artışı ile sonuçlanmaktadır. Eğer NSP4 kript hücreler üzerine etki gösterirse $[Ca^{+2}]_i$ 'de doğan artış kript hücrelerde sekresyonu başlatmaktadır. Bu olay bir Cl^- taşıyıcısının aktivasyonu aracılığı ile sağlanmaktadır ve diyarenin sekretuar komponenti artışı ile sonuçlanmaktadır. Kript hücrelerin sekresyonuna neden olan bir diğer yol ise salgılanan NSP4 ya da enfekte hücrelerden salınan diğer efektör moleküllerin ENS'yi uyarması ile gerçekleşmektedir. Uyarılan ENS, $[Ca^{+2}]_i$ 'de artışa neden olmakta, $[Ca^{+2}]_i$ artışı da Cl^- salınımını uyarmaktadır (Şekil 3.C). Çalışmaların sonucunda; ENS'nin fonksiyonlarını bloke eden ajanlarla yapılan deneyler rotavirus enfeksiyonunun ENS'nin uyarılımı yoluyla sekresyona sebep olduğunu göstermektedir.^{29,30,32}



Şekil 3: Rotavirusa bağlı diyare modeli

Panel A, enfekte epitelyumdaki olayları resmetmektedir. NSP4; “kırmızı üçgen”, parasellüler su ve elektrolit akışı; “yeşil ok”, kript hücre; “kahverengi” ile gösterilmiştir.

Panel B, ince barsağın normal yapısını, ENS ve onun farklı submukozal seviyelerdeki gangliolarını göstermektedir.

Panel C, ENS’de villus epitelyumundan sinyal alabilen ve kript epitelyumunu aktive edebilen bir refleks arkını göstermektedir. C 1, antikor ile kaplanmış yetişkin fare ince barsak villuslarının tüm kaidesini göstermektedir(Sarı pigmentler). C 2, enfekte villus enterositlerinin ENS’yi NSP4’ün bazolateral salınımı ya da diğer efektör moleküller ile uyarabildiğini göstermektedir. ^{14,30,34,32}

2.5.3. Diyare indüksiyonunun moleküler esasları

Rotavirus enfeksiyonu sırasında oluşan diyare multifaktöriyeldir. Bu faktörler;

1-Enfeksiyon sırasındaki enterosit harabiyetine bağlı olarak gelişen malabsorpsiyonlar: Rotavirus diyarelerinin malabsorptif unsuru virus ile primer enfeksiyona bağlı gibi görünmektedir. Hücrede Ca^{+2} homeostazisinin bozulması viral proteinlerin sentezi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Plazma membranı ve ER'de artmış Ca^{+2} permeabilitesi $[Ca^{+2}]_i$ artışı başlatmakta bu da hücre lizisini başlatan olaylar zincirini tetiklemektedir (Şekil3A).^{30,32} Hücrelerde eksprese edilen NSP4 de $[Ca^{+2}]_i$ artışı başlatmaktadır. Bu durum NSP4'ün virusa bağlı $[Ca^{+2}]_i$ regülasyonunu bozan medyatör olduğunu işaret etmektedir. Protein NSP4'ün bir segmenti enfeksiyondan hemen sonra klasik olmayan bir yol aracılığıyla salgılanmıştır ve hücreye dıştan bağlanan bu fragment $[Ca^{+2}]_i$ de bir artışa da neden olmaktadır.³⁰ Hücre içi Ca^{+2} deki artışı NSP4'ün bir apikal reseptöre bağlanması takip etmektedir. Bu da PLC-IP₃ kaskadını tetiklemekte ve hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımı ile sonuçlanmaktadır.^{30,32} Buna karşılık hücre içi NSP4 tarafından uyarılan $[Ca^{+2}]_i$ deki artış PLC stimülasyonundan bağımsızdır. Protein NSP4 aracılı etkiler önemli, gözle görünür doku hasarı olmadığında enfeksiyonun diyare yapma etkilerini çoğaltabilmektedir. Ancak inaktive olmuş rotavirus partiküllerinin diyareyi uyarması viral yapısal proteinlerin de diyareyi başlatan regülasyon bozukluğunda rol alabildiğini ileri sürmektedir.^{30,32}

Rotavirus enfeksiyonları enterositler üzerinde malabsorbsiyona yol açabilen başka etkilere de sahiptir. Enfeksiyon, hücre

içi sodyumda $[Na^+]_i$ bir artışa ve hücre içi potasyumda $[K^+]_i$ bir azalışa neden olmaktadır. Na^+ ve K^+ 'nın hücre içi seviyelerindeki değişiklik elektronötrale NaCl absorpsiyonunu ve Na^+ bağımlı besin absorpsiyonunu bozabilmekte ve sıvı kaybı ile sonuçlanmaktadır.³⁰

Enfeksiyon, enfekte enterositlerin yüzeyinde sindirim enzimlerinin salınımını da azaltabilmektedir. Örneğin, alkalen fosfataz, sükras, laktaz ve maltaz azalmıştır. Rotavirus enfeksiyonunun indüklediği hücre içi Ca^{+2} artışı Ca^{+2} 'ye duyarlı proteinler olan F-aktin, villin, ve tubulini etkilemekte, mikrovillar yapıya zarar vermektedir. Hem rotavirus enfeksiyonları hem de NSP4, enterositler arasındaki epitel bariyerleri koruyan sıkı bağlantılarda fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır. Virus ya da NSP4 tarafından uyarılan, transepitelyal dirençteki düşüş enfeksiyonun parasellüler sızıntıya neden olacağını göstermektedir.³⁰

2-Sekresyon: Villus epitelinde oluşan fonksiyonel değişikliklere bağlı olarak salgısal komponent de diyarede yer alır. Sekresyonda yer alan en önemli iki yapı NSP4 ve ENS'dir. Salgılanmış NSP4'ün tam olarak rolü ve hedefi belli değildir. Enterosit epiteliumunda NSP4 sadece enfeksiyonun etkilerini arttırmakta olabilir. Ancak NSP4 kript epiteliumda da görev alabilmektedir (Şekil 3A). Kript hücre de $[Ca^{+2}]_i$ artışını uyarmakta, Cl^- sekresyonunu aktive etmekte ve su çıkışını başlatmaktadır. Protein NSP4'ün bir kanal oluşturabileceği veya Ca^{+2} ile aktive edilebilen atıl bir anyon kanalını aktive edebileceği ileri sürülmektedir.^{29,30}

NSP4'ün bir diğer muhtemel hedefi de ENS'dir. Enterik sinir sistemi villus epitelinin hemen altında bulunmakta ve rotavirusla harap olmuş epitelden uyarı almaktadır (Şekil 3C,Ek1).^{29,30}

Enfeksiyon esnasında ENS aktive olunca, villus uçlarında az sayıda hücre enfekte olmasına rağmen kript hücreleri elektrolit ve su sekrete etmek üzere uyarılmaktadır. Enterik sinir sistemini stimüle eden bir madde olan 5-Hidroksi Triptamin'in (5-HT) salınımını, muhtemelen NSP4 enterokromafin hücrelerine bağlanarak indüklemekte ve ENS uyarılmaktadır. (Şekil 3C,Ek2). Enfekte hücrelerden kemokin ve prostaglandin sekresyonu da ENS'yi stimüle edebilmektedir. Sonuçta muhtemelen NSP4 ve ENS enfeksiyona karşı gelişen sekretuvar yanıtta önemli rol oynamaktadır.²⁹

3-Villus iskemisi: Barsak epitelyumuna zararı minimum olmasına rağmen bazı çalışmalarda gözlenen villus iskemisinin diyareye yol açtığı düşünülmektedir. Enfekte hücrelerden bilinmeyen bir vazomotor ajan salınımıyla lokal villus iskemisi gelişip sonuçta enterositlerde fonksiyon bozukluğu meydana gelmektedir. Ancak villus iskemisinin önemi henüz açık değildir.^{29,30}

4-Barsak motilitesi: Rotavirus enfeksiyonunda barsak geçiş zamanı azalmıştır, bu durum barsak motilitesinin artmış olduğunu göstermektedir. Genelde motiliteyi ENS kontrol etmektedir, ancak moleküler stimülatörü kesin olarak bilinmemektedir.^{29,30}

2.6. Klinik Bulgular

Rotaviruslar, birçok ülkede 0-5 yaş grubu çocuklarda akut gastroenteritlerin önemli bir etkenidir. Çocuklarda rotavirus enfeksiyonlarının klinik spektrumu asemptomatik enfeksiyondan

dehidratasyon ile seyreden ciddi diyare ve ölüme kadar değişmektedir. İnkübasyon periyodu 1-4 gündür. Hastalık hafif ateş (%60-%65) ve kusma (%60-%70) ile başlamaktadır. Abdominal ağrıda görülebilmektedir. Genellikle 1-3 gün süren kusmayı ani başlayan sulu diyare izlemektedir. Diyare kansız ve mukussuzdur.³⁵ Sulu diyare 5-8 gün sürmektedir. Ateş genellikle 38.5-39.5 civarındadır. Ancak önemli derecede dehidratasyon varsa daha yüksek olabilmektedir. Tedavi edilmediği takdirde şiddetli elektrolit ve su kaybına sebep olmaktadır. Ağır tablolarda asidoz ve şok gözlenmektedir. Yenidoğan ve çocuklarda ölümcül olabilmektedir. Yetersiz beslenen çocuklarda yan etkiler fazladır ve ölüm normal çocuklardan daha fazladır. Hastalık kendi kendini sınırlamakla birlikte, normal süresi 3-8 gündür.^{7,11}

Maternal antikorun koruyucu etkisinden dolayı altı aydan küçük yeni doğanlarda enfeksiyonlar sıklıkla asemptomatiktir. Olguların %20'si ise semptomatiktir ve genellikle hafif seyirlidir. Ancak prematüre bebeklerde ciddi enfeksiyonlar görülebilmektedir. Erişkinlerde rotavirus enfeksiyonu çoğunlukla hafif veya asemptomatiktir, birçok çalışmada serokonversiyon gösterilmiştir.¹¹

Gastrointestinal semptomlardan önce koriza ve öksürük gözlenebilmektedir. Üst solunum bölgesinde virus replikasyonu virusun yayılımı açısından önem taşımamaktadır. Elektrolit dengesizliği sonucu şiddetli olgularda ya da doğrudan merkezi sinir sisteminin viral enfeksiyonunda nörolojik semptomlar görülebilmektedir. Rotavirus ayrıca aseptik menenjit, nekrotizan enterokolit, akut kas yangısı, hepatik apse, pnömoni, Kawasaki hastalığı, Ani Bebek Ölümü Sendromu (SIDS) ve Crohn hastalığı ile ilişkili bulunmuştur. İmmün sistemi baskılı çocuklarda

rotavirus gastroenteritleri haftalar ya da aylar süren persistan enfeksiyonlara neden olmaktadır.³⁵

2.7. Bulaşma yolları

Rotaviruslar esas olarak fekal-oral yolla bulaşmaktadır. Ancak rotavirus oda ısısında uzun süre stabil kaldığından kontamine yüzeye temas ile kontamine su ve yiyeceklerle de bulaşabilmektedir.¹¹ Enfekte infantlar hastalığın başlangıcında ve başlangıçtan sonra 4-7 gün içinde fecesleri ile yüksek konsantrasyonda virus atılımını gerçekleştirmektedir. Rotavirus diyaresinin erken döneminde dışkıda 10^{10-11} /ml kadar yüksek sayıda virus bulunmakta bu da bulaşmayı kolaylaştırmaktadır. İmmün baskılı hastalarda virus atılımı 30 gün ya da daha fazla süre ile olabilmektedir. Enfekte infantların bezleri ve küçük çocukların hijyen kurallarına uygunsuz davranışları virusun yayılımına neden olmaktadır.^{11,35} Solunum yollarından bulaşma olduğunu belirten çalışmalarda mevcuttur.³⁶

Rotaviruslar, genellikle toplu halde yaşanan yerlerde salgın yapar. Çocuk gündüz bakım evleri, okullar, yaşlıların yaşadığı huzurevleri, askeri birlik mensupları, sağlık çalışanları, turistler, rotavirusların normale göre daha sık etkilediği topluluklardır. Erişkinlik çağındaki en büyük risk faktörünü ise, ailedeki süt çocuğu oluşturmaktadır. Süt çocuğu enfeksiyonları sırasında, erişkinlerin %50'si enfekte olmaktadır. Ancak bu enfeksiyonların sadece 1/3 'ü semptomatiktir. Rotaviruslar, değişik hayvan (buzağı, domuz yavrusu, kuzu, civciv) türlerini de enfekte edebilmektedir.^{35, 7,11}

Hasta yatışının yoğun olduğu servislerde nozokomiyal enfeksiyonların gözlemlendiği belirtilmiştir. Rotavirus ile ilgili hastane yatışlarının yaklaşık 1/3'ünü nozokomiyal enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Başka nedenlerle hastaneye yatmış olan ve yatışının üçüncü gününden sonra diyare gelişen hastalarda rotavirus çok sık karşılaşılan bir etkindir.³⁷ Avrupa'da yapılan bir çalışmada toplumdan edinilmiş rotavirus enfeksiyonu olan çocuklarla ilgilenen sağlık görevlilerinin %77'sinin ellerinde rotavirus bulunduğu bildirilmektedir. Bu da sağlık personelinin taşıyıcılığının yüksek olduğunu düşündürmektedir.³⁸

2.8.İmmünoloji

Hastalıktan korunma esas olarak bağırsak lümenindeki antikorlarla, özellikle IgA ile sağlanmaktadır. Aktif veya pasif olarak kazanılan antikorlar (kolostrum ve anne sütündeki antikorlar dahil) hastalığın ciddiyetini azaltmakta, ancak enfeksiyonu tam olarak engellememektedir. İlk olarak bir hafta sonra duodenum sıvısı ve serumda özgül IgM cevabı oluşmakta, 1-4 ay kadar sonra duodenum sıvısı ve serumda özgül IgG ve IgA cevabı gelişmektedir. Bir yıl sonra serumda özgül IgG cevabı devam etmekte ancak IgA saptanamamaktadır.^{10,11}

Buna göre dışkı ve serumda IgA yakın zamanda geçirilen bir enfeksiyonu gösterirken, serumda IgA yokken IgG saptaması eski bir enfeksiyona işaret etmektedir. Mukozal yüzeylerde bir yıl sonra ise her iki antikor da saptanamamaktadır. Doğal enfeksiyon sonucu kazanılan bağışıklık kısa süreli olduğundan, reenfeksiyonlar bir yıl içinde, hatta daha kısa sürede görülebilmektedir. Antikor yokluğunda az sayıda virus bile enfeksiyon ve diyare oluşturmaktadır. Süt çocuğu ve küçük çocuklardaki

hastalığın erişkine göre belirtili ve ağır seyretmesi özgöl antikorların varlığıyla ilişkilidir.^{10,11}

Rotavirus enfeksiyonlarının temizlenmesinde $CD4^+$ T_H hücreleri hayati bir role sahiptir. Rotavirusa özgöl B hücre yanıtının uyarılmasında $CD4^+$ T hücreleri önemli bir yer tutmaktadır. Örneğin $CD4^+$ T hücrelerinden yoksun fareler rotavirus ile enfekte olduğunda gaitaları ile kronik olarak virus saçmakta ve normal farelerde bulunan virusa özgöl IgA'nın sadece %5' ini üretmektedirler. Bunun aksine $CD8^+$ T hücrelerinden yoksun fareler ise enfeksiyonu normal olarak yanıtlayabilmektedir.³⁹

Daha önce yapılan bir çalışmada sitotoksik T lenfosit (CTL) cevabının rotavirus enfeksiyonlarının ortadan kaldırılmasında gerekli olmadığı belirtilmiştir. Rotavirusun ortadan kaldırılmasında CTL'lerin rol oynadığını, ancak onların yokluğunda da rotavirusun ortadan kaldırılabilirdiği, yani zorunlu olmadıkları gösterilmiştir. B hücreleri $CD8^+$ T hücrelerinin yokluğunda virusun temizlenmesini sağlayabilmektedir.⁴⁰

Sitotoksik T lenfositleri zorunlu olmamasına rağmen koruyucu immunitenin gelişiminde önemli bir rol oynarlar. Bu durum B ve T hücrelerinin fonksiyonundan yoksun şiddetli birleşik immün baskılı (Severe Combined Immunodeficient Mice -SCID) farelerde gözlenilmiştir. Bu SCID fareler virus inoküle edildiğinde kronik rotavirus enfeksiyonu geliştirmiştir. Bu farelere daha önce aşılannmış fareden $CD8^+$ T hücreleri transfer edildiğinde kronik rotavirus enfeksiyonundan arındıkları gözlenilmiştir. Bu işlem rotavirusa özgöl immunglobulinlerin yokluğunda gerçekleşmiştir.⁴¹

Rotavirus reenfeksiyonlarına tam direnç sağlamada B hücreleri mutlaka gereklidir. Sonuçta T ve B hücrelerinin her ikisi de rotavirusa karşı immün yanıtta önemli rol oynamaktadır. B hücreleri T_H hücre bağımlı rotavirusa özgü IgA ve IgG sekresyonu ile ilgili iken, sitotoksik T lenfositleri virusun temizlenmesinde rol oynarlar. İmmün sistem bunların ikisinden birinin yokluğunda rotavirus enfeksiyonlarının temizlenmesini sağlayabilmektedir. B hücrelerinden türemiş immünoglobulinler rotavirusa özgü hafıza yanıtında oldukça önemlidirler. Sitotoksik T lenfositleri çıkarılan fareler reenfeksiyona dirençlidir. Oysa B hücrelerinden yoksun fareler daha hafif enfeksiyon seyrinde bile hassastır.⁴⁰

Virus ile primer enfeksiyonu takiben rotavirusa özgü B ve T hücrelerinin üretimi uyarılmaktadır. Bunlar genellikle virus ile reenfeksiyonu önlemek için yeterli değildir. Ancak sekonder enfeksiyonun şiddetini azaltmayı sağlamaktadırlar. Serum Ig A antikor titresinin reenfeksiyona karşı koruma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.⁴²

Farelerde IgA olmadığında, fareleri korumak için IgG'nin yeterli olduğu gösterilmiştir. Ancak insanlarda yüksek titrelerde IgG'nin dahi hastalığın şiddetini önlemede yeterli olmadığı görülmüştür. Bu nedenle serum IgA'sı rotavirus enfeksiyonunda koruyucu immünitenin primer indikatörü olarak görev almaktadır. Bu antikorların tam bir koruma sağlamamasının sebebi serotipe özgü olmalarıdır. Bu durum farklı bir serotiple enfeksiyona karşı tam bir korumaya engel olmaktadır. Her bir ilave enfeksiyon çoklu serotipleri tanıyabilen, çapraz reaktif antikorları üreten B hücrelerinin popülasyonunu genişletmektedir. Bu tekrarlanan enfeksiyonların daha hafif olmasının da nedenidir. Yüksek miktarda çapraz reaktif sekretuar IgA, serotip spesifik serum IgA'sı ve IgG korumanın çoğunu oluşturmaktadır.⁴³

2.9.Epidemiyoloji

Rotavirus, dünya genelinde 0-5 yaş arası çocuklarda görülen akut gastroenteritlerin en önemli etkenidir. Şiddetli rotavirus diyareleri sebebiyle dünya çapında her yıl 611,000 (454,000-705,000) çocuk ölümü gerçekleşmektedir.² Sosyoekonomik koşullara ve hijyen önlemlerine bağlı olmadan gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde aynı sıklıkta görülen rotaviruslar, beş yaş altındaki çocuklarda akut gastroenterit nedeniyle hastaneye yatışların %39'undan sorumludur.^{5,6} Rotavirus enfeksiyonları en yüksek insidansa 6-24 aylık çocuklarda ulaşmaktadır.^{3,7,4}

Sadece Grup A, B ve C rotaviruslar insanlarda hastalık yapmaktadır. Çocuklarda rotavirus enfeksiyonlarının çoğuna Grup A rotavirus sebep olmaktadır. Grup A rotavirus bütün dünyada endemiktir. Ancak nadiren salgınlardan sorumlu olabilmektedir.¹¹

İnsan Grup B rotavirusa aynı zamanda "Adult diarrhea rotavirus" (ADRV) denilmektedir. Adından da anlaşılacağı gibi en çok erişkinlerde enfeksiyon yapmaktadır. Yeni doğan ve çocuklardaki semptomatik enfeksiyonlarda nadiren tespit edilmektedir. Grup B rotavirus 1982'den beri Çin'de erişkinlerde su orijinli ciddi diyare salgınları ile ilişkilidir. Grup B rotavirus hücrelerde sinsiya ve füzyon oluşturan tek rotavirustur.¹¹

Grup C rotavirus, başlıca yiyecek kökenli çocukluk çağı diyaresi ile ilişkilidir. Daha çok sporadik diyare vakalarını oluşturmakta,

salgınlara nadiren sebep olmaktadır. Grup C rotavirus diyare salgınları, ABD, Japonya ve İngiltere 'de %1-6.8 sıklıkla gözlenmiştir. ^{10,11}

Ilıman ülkelerde rotavirus epidemileri özellikle soğuk aylarda (güz sonu, kış, ilkbahar başı) 4-5 aylık bir dönemde görülmektedir ve kış aylarındaki pediatrik diyarelerin yaklaşık %50 'sinin nedeni rotaviruslardır. Tropikal ülkelerde rotavirus yılın her döneminde görülmekte, bazı ülkelerde ise kurak dönemlerde daha sık gözlenmektedir. ⁷

İnsanlarda en sık görülen rotavirus VP7 serotipleri G1-4 ve G9, VP4 serotipleri P[8], P[4] ve P[6]'dır. ^{3,8,44} Rotavirus serotiplerinden G1P[8] (%64.7), G2P[4] (%12), G3P[8] (%3.3) ve G4P[8] (%8.5) çocuklardaki rotavirus diyarelerinin %88.5'inden sorumludur. Son zamanlarda önem kazanan G9P[8] ve G9P[6] %4.1 sıklıkta görülmüş ve dördüncü önemli global G tipi olarak ortaya çıkmıştır. ⁸ Rotavirusun G1P[8], G2P[4], G3P[8] ve G4P[8] serotipleri Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da rotavirus enfeksiyonlarının %90'ından fazlasını oluştururken, Güney Amerika ve Asya'da %68'ini, Afrika'da ise %50'sini oluşturmaktadır. ⁸ Dünyada en sık görülme oranına sahip olan G1P[8] serotipi Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da enfeksiyonların % 70'ini, Güney Amerika ve Asya'da % 30'unu, Afrika'da da % 23'ünü oluşturmaktadır. ^{8,45} Sık görülmeyen serotipler ise dünya genelindeki enfeksiyonların %4.9'unu meydana getirmekte, Afrika, Asya ve Güney Amerika'da, Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya' ya oranla daha sık görülmektedir. ⁸

Son yıllarda G9 serotipinde dünya genelinde bir artış başlamış ve özellikle G9 Asya ve Afrika da önemli bir enfeksiyon etkeni

haline gelmiştir. Rotavirusun G8 serotipi Afrika'da yaygın olarak görülürken, G5 serotipi ise Güney Amerika'da diyareli çocuklarda görülmüştür. Serotip G6 Avrupa'da G10 ve G12 ise Asya'da gözlenmiştir.
3, 8, 44, 46

Virusun P tiplerinden P[8] dünyanın birçok bölgesinde en sık görülen rotavirus tipidir. Serotip P[6] da dünyada en fazla Afrika'da bulunmakta ve burada dolaşan tiplerin üçte birinde görülmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde; gelişmiş ülkelerde az görülen serotiplerle enfeksiyon daha sık görülmektedir.^{3,8}

Globalleşen dünyada farklı suşlar giderek yaygın hale gelmektedir. Genellikle tropikal bölgelerde görülen G9 suşlarının ılıman iklim kuşağında bulunan ülkemizde de görüldüğü ve giderek yaygınlaştığı belirtilmektedir.⁴ Grup D, E, F ve G rotavirus enfeksiyonları ise insanlarda gastroenterit ile ilişkili değildir.¹¹

2.10. Tanı

Rotavirus diyarelerinde dışkı suludur, nadir olgular dışında lökosit ve eritrosit içermez, lökositöz yoktur. Ağır diyarelerde elektrolit dengesizliklerine rastlanmaktadır. İncelenmek üzere dışkı hastalığın akut devresinde, tercihen semptomların başlamasından itibaren 1-5 gün içinde alınmalıdır. Semptomların başlangıcından 8 gün sonra alınan örnekler nadiren virus içermektedir. Rotavirus diyarenin erken döneminde dışkıda 10^{10-11} / ml kadar yüksek sayıda virus olması tanıyı kolaylaştırmaktadır.^{7,11}

Alınan klinik örnekler temiz bir plastik kap veya kapaklı cam tüpler içinde laboratuvara gönderilmelidir. Örneğin alındığı kaplarda koruyucu madde, deterjan, metal iyonlar, virus transport besiyeri veya doku kültür besiyeri bulunmamalıdır. Bu tip maddeler ELISA ve Lateks Aglütinasyonda engellemelere neden olabilmektedir. Ayrıca bu maddeler örneği dilüe edip, virion saptanabilecek düzeyin altına inmesine neden olabilmektedir. ^{7,11,35}

Çocuk bezinden rotavirus için örnek alınacak ise dışkının çocuk bezi içerisine absorbe olmaması gereklidir. Bu nedenle çocuk bezi içine temiz plastik bir örtü yerleştirilebilir. Bazı ticari kitlerde bu amaçla hazırlanmış gaita toplama zarfları hazır olarak bulunmaktadır. Rektal sürüntü örnekleri ise yeterli virion temin edilemediğinden genellikle tercih edilmemektedir. ^{7,35} Örnekler kısa sürede incelenecek ise +4°C 'de saklanmalıdır. İnceleme uzun süre sonra yapılacak ise örnekler -20°C veya -70°C'de saklanmalıdır. Dondurulan örnekler çözöldükten sonra tekrar dondurulup kullanılmamalıdır. ^{7,11}

2.10.1.Özgöl Tanı Teknikleri

Rotavirus enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısında, elektron mikroskobu ile görüntöleme, kültürde üretim, serolojik testler ve çeşitli moleküler yöntemler kullanılmaktadır. ^{7,11, 47}

1-Mikroskopla inceleme

Dışkı örneklerinde virus partikülleri elektron mikroskopisi ve immun elektron mikroskopisi yapılarak gösterilebilmektedir. Rotavirus, elektron mikroskopunda araba tekerleği şeklinde bir yapı olarak teşhis edilmektedir. Bu görünüm rotavirusların diğer gastroenterit etkeni viruslardan ayırt edilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Elektron mikroskobu, örnekte az sayıda virionun bulunduğu hallerde tanıda önemli avantaj sağlamaktadır. A grubu dışındaki rotavirusları görüntüleme imkanı verdiği için önemli bir tanım aracıdır. Ancak ayırt etmek oldukça zordur. Bu teknik rutin olarak kullanılmamaktadır, çünkü hem pahalı araçlara hem de deneyimli personellere gereksinim duyulmaktadır.⁴⁷

2-Hücre kültüründe üretim

Grup A rotaviruslar önceden belirli oranlarda proteolitik enzim tripsin ile muamele edilirse veya besiyerine düşük düzeyde tripsin ilave edilirse hücre kültüründe üretilebilmektedir. Virus izolasyonu için en sık kullanılan hücreler maymun böbrek hücre dizisi MA104 ve insan kolon karsinoma hücre dizisi CaCo-2'dir. Sitopatik etki minimaldir.^{47,48}

3-Serolojik testler

A-Dışkıda Antijen Saptama: Rotavirusun tanısında en sık kullanılan yöntem gaitada rotavirus antijenlerinin saptanmasıdır. Rotavirus antijenlerinin tespiti için ELISA ve Lateks aglütinasyon kitleri ticari olarak

bulunmaktadır. Oldukça ucuz, yüksek duyarlılık ve özgüllük ile hızlı tanıya imkan vermektedir. Ancak ticari testler sadece grup A rotavirusları tespit edebilir. B ve C grubu rotaviruslar VP6 antijenlerine göre grup spesifik antikorların kullanıldığı İmmunofloresan Antikor Testi (IFA) veya spesifik monoklonal antikorların kullanıldığı ELISA testleri ile birbirinden ayrılabilir. Monoklonal antikorların kullanıldığı kitler, poliklonal antikorların kullanıldığı kitlerden daha güvenli sonuç vermektedir. Bu yöntemle duyarlılık %100, özgüllük %97' dir. ^{7,11,47}

B-Dışkıda antikor saptama: Özellikle ELISA ve Lateks aglütinasyon testi antikor titre artışını tespit için kullanılmaktadır. Dışkıda IgA ve IgM enfeksiyonun başlamasından itibaren 1-10 gün boyunca pozitif bulunmaktadır. Ayrıca ELISA ile belirlenen fekal IgA antikor seviyesindeki yükselme, barsaktaki nötralizan antikor cevabını yansıtmaktadır. ^{7,11}

4-Moleküler yöntemler

Rotavirus spesifik cDNA problemleri ile nükleik asit hibridizasyon testleri ve grup A rotaviruslar için oligonükleotid microarray hibridizasyon testleri genotipleme için kullanılmaktadır. Nükleik asit hibridizasyon ve Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) yöntemleri antijen tespit metodlarına göre daha duyarlıdır. ^{11,47} Rotavirusu RT-PZR ile yüksek bir duyarlılıkla saptamak ve A,B,C grup rotavirusları belirlemek mümkündür. Ekstraintestinal dokularda RT-PZR ile rotavirus saptanabilmekte, hastalık şiddeti ile virus yükü arasındaki ilişki belirlenebilmektedir. Ayrıca RT-PZR yöntemi hibridizasyon yönteminden 5000, elektroferotip yöntemlerinden 100.000 kez daha duyarlıdır. Bu

yöntem ile diyare başlangıcından 4-57 gün sonrasına kadar virus atılımı belirlenebilmektedir.^{47,49}

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile tipe özgül primerler kullanılarak rotavirusun G ve P tipleri belirlenebilmektedir. Rotavirus tespiti için Nested PZR, Multiplex RT-PZR ve Restriction fragment length polymorphisms (RFLP) gibi yöntemlerde kullanılmaktadır.^{47,49}

Agaroz Jel elektroforezi, PZR sonucunda amplifiye edilen ürünlerin görülmesinde, özgül markerlar aracılığı ile P ve G tiplerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.⁴⁷

Rotavirusun Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ile elektroferotiplendirilmesinde dışkı örneklerinden izole edilen viral RNA' nın PAGE' deki karakteristik göç paterni tespit edilebilmektedir. Elektroforez işlemi sırasında jel boyunca negatif yüklü makromoleküller büyüklüklerine göre birbirinden ayrılmaktadır. İşlem sonrasında yapılan boyama ile dsRNA paternleri görüntülenebilmektedir. A grubu dışındaki rotaviruslar, grup A rotaviruslarından ayırt edilebilmekte, A grubu rotaviruslarda da kısa ve uzun paternli elektroferotipler belirlenebilmektedir. Zaman alıcı bir yöntem olmasına rağmen, yalancı pozitifliğin olmaması en önemli avantajıdır. Bu yöntemin rotavirusu tanımadaki duyarlılığı %90'dan fazla, özgüllüğü ise %100'dür. Özellikle epidemiyolojik veri elde edilmesinde önem taşımaktadır.⁴⁷

2.11. Tedavi ve Beslenme

Tedavide esas olan, diyare nedeniyle kaybedilen sıvı ve elektrolitleri, oral veya gerektiğinde parenteral yolla sağlamaktır. Oral rehidratasyon için hazırlanmış glukoz ve elektrolit bileşimleri (sodyum, potasyum, sodyum bikarbonat veya trisodyum sitrat, glukoz) su, ayran gibi sıvılarla çözündürülüp, dehidrete tüm hastalara oral yolla verilebilmektedir. Oral dehidretasyon sıvısı, barsak mukozasından sodyum ve glukozun birlikte transportunu sağlamaktadır. Elektrolit kaybının yerine konmasına imkan vermekte ve su emilimini arttırmaktadır.^{7,11,35,50}

Taze hazırlanmış meyve suları (Elma suyu vb.), çorbalar (Pirinç suyu), ayran ve su evde korkusuzca verilebilecek sıvılardır. İki yaşın altındaki çocuklara her diyareli dışkılamadan sonra 1/2-1 çay bardağı (50-100 mL), daha büyük çocuklara 1/2-1 su bardağı (100-200 mL), daha fazla içmek isteyenlere ise istedikleri kadar sıvı verilmesi dehidratasyonun engellenmesini sağlayacaktır.⁵¹

Anne sütü alan bebeklerin daha sık olarak emzirilmesi gerekmektedir. Anne sütü almayan bebeklerin ise normalde aldıkları süt veya mamalarla, öğün sayısı artırılarak beslenmelerine devam edilmesi önerilmektedir. Mamaların sulandırılması gerekmemektedir. Hiper ozmolaritenin önlenmesi için şeker yerine nişastalı yiyecekler (tahıllı gıdalar) verilmelidir.⁵¹

Dehidretasyon ciddiye, ileri derecede karbonhidrat malabsorpsiyonu varsa veya dışkıyla saatte 10ml/kg'dan fazla kayıp varsa parenteral sıvı (Laktatlı ringer solüsyonları) ve elektrolit desteği gerekmektedir. Normal ağızdan beslenmeye devam ettirilmekte, süt emen çocuğun emzirilmesine ara verilmemektedir. Her ne kadar anne sütünde

fazla miktarda laktoz varsa da ozmolaritesi düşük olduğu ve çok sayıda antiviral maddeler içerdđi için diyarenin şiddeti ve süresinin azalmasını sağlar. Hastaya antibiyotik, antisekretuar (Bizmut subsalisilat) ve antimotiliter (Difenoksilat, Atropin, Loperamid) maddeler ve fenotiazin grubu antiemetik ilaçlar kesinlikle verilmemelidir. Özellikle üç yaşıñ altındaki hastalarda bu ilaçların kullanımı önerilmemektedir. Rotavirus diyarelerinde hastalık genellikle kendi kendine sonlanmaktadır. Hazır meyve suları ve meşrubatların tüketimi, bu içeceklerin yüksek glukoz, düşük sodyum içerikleri ve yüksek ozmolariteleri nedeniyle önerilmemektedir. Tedavide etkili bir antiviral ajan yoktur. Değişik immunoglobulin preparatları denenmiştir. Bunlar bağışıklık yetmezliği olup, ciddi seyirli rotavirus diyaresi olanlarda yarar sağlamaktadır. *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus rhamnosus* (GG kökenli) türlerini içeren çeşitli probiyotiklerin rotavirus diyarelerinde yararlı olduğu da bildirilmiştir.^{7,35,50,51,52,53}

Probiyotikler rotavirus diyarelerinde virus atılım süresini azaltmakta, barsak permeabilitesini normale döndürmekte ve rotavirusa karşı mün ve salgısal IgA salgılayan hücrelerin ekspresyonunu arttırmaktadır.⁵⁴

Oral immunoglobülin ve kolostrum veya rotavirus antikorları içeren insan sütü rotavirus diyaresinin tedavisinde kullanılmış ve iyi sonuçlar vermiştir. Rotavirusa karşı immünize olmuş ineklerin kolostrumunda antirotavirus antikor titresi insan kolostrumundakinden daha yüksektir. İnek kolostrumu ile tedavi immun sistemi bozuk hastalar veya ciddi hastalığı olanlarda faydalıdır.^{11,53} Ancak immun ineklerin kolostrumu ile tedavi etkili olmasına rağmen maliyetlidir. Tedavide antikorlarla probiyotik bakterilerin birlikte kullanımı daha hızlı terapötik etki sağlamanın yanında daha ucuz bir yol sunmaktadır. Ayrıca diyarenin

etkilerini büyük oranda azaltmakta, barsakta histopatolojik değişikliklerin oluşumunu engellemekte ve virus yükünü azaltmaktadır.⁵³

Genelde parazitik diyarelerde kullanılan Nitazoxanit'in rotavirus diyarelerinde de etkili tedavi sağladığına ilişkin bilgiler elde edilmiştir. Ancak bu konuda daha detaylı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.⁵⁴

2.12. Korunma

Enfeksiyon az sayıda virusla bulaştığından ve hasta dışkıсында yüksek miktarda virion çıkardığından bulaşmanın kontrol edilmesi zordur. Rotavirus salgınları kişisel hijyenin zayıf olduğu çocuk yuvaları ve yaşlıların bulunduğu bakım evlerinde sıklıkla ortaya çıkar. Dikkatli el yıkama virusun bulaşmasını azaltmada önemlidir. Rotavirus başlıca fekal-oral yolla bulaşmaktadır. Ancak rotavirus çevrede, oda ısısında uzun süre stabil kaldığından kontamine yüzeye temas ile kontamine su ve yiyeceklerle de bulaşabilmektedir. Temiz su kullanımı hastalığın kontrolünde önemlidir. Özellikle çocukların yaşadığı kalabalık ortamlarda çevre kirlenmesi nedeniyle dezenfeksiyona başvurulmaktadır. Rotavirus yüzey dezenfektanları ve hijyenik el yıkama antiseptiklerine karşı oldukça dirençlidir. Deterjanlara, 3.5-10 arasındaki pH değerlerine dayanabilir. Ancak normal mide pH değerlerinde inaktive olmaktadır. Rotavirusa %6 H₂O₂, 2500ppm klor, %80 etanol, ultraviyole ışınlama etkilidir. Fenolik dezenfektanlar etkisizdir; hipokloritler dışkı organik maddelerince etkisiz hale getirilmektedir.⁷

Kişisel hijyen ve toplumsal hijyen kuralları, rotavirus enfeksiyonlarının önlenmesinde çok da etkili değildir. Bu nedenle rotavirus diyarenin önlenmesinde aşılama önemli bir yöntemdir.^{7,11}

Rotaviruslarla ilgili olarak şimdiye kadar değişik aşı çalışmaları yürütülmüş ve özellikle yaşamın ilk iki yılı içinde ciddi rotavirus enfeksiyonlarının önlenmesi amaçlanmıştır.⁷

2.12.1.Rotavirus aşıları

Bishop'un rotavirusu tanımlamasından beş yıl sonra ilk aşı çalışmaları başlamıştır. İnsan rotaviruslarını hücre kültüründe üretmenin zor olması nedeniyle ilk rotavirus aşı çalışmaları hücre kültüründe daha kolay üreyen hayvan rotavirusları attenüe edilerek başlatılmıştır.³

İnsanlarda denenen ilk rotavirus aşısı sığır türü RIT4237'dir. SmithKline Rixensart tarafından 1983 yılında geliştirilen bu canlı Rotavirus aşısı doku kültürlerinde pasajlanarak elde edilmiştir. Finlandiya'da yapılan bir çalışmada aşının rotavirus gastroenteritlerini önlemede %50 etkili olduğu gösterilmiş, ancak enfeksiyonun şiddetini azaltmadaki etkisi %88 olarak bulunmuştur. Daha sonra Finlandiya ve ABD'deki çalışmalarda da ümit verici sonuçlar alınmış ancak aşının geliştirmekte olan ülkelerde yeterli etkinlik göstermemesi nedeni ile çalışmaları sonlandırılmıştır.^{3,18}

Diğer hayvan kökenli rotavirus aşısı sığır türü WC3 (P[5]G6) içermektedir. Bu aşının bebeklerde %60-100 virus nötralizan antikoru ürettiği gösterilmiştir. Ancak, hastalıktan korumada değişken kapasitede olması ve beklendiği kadar etki gösterememesi nedeniyle üretimden kaldırılmıştır.^{3,18,55}

Hayvan kökenli aşılarından bir diğeri Maymun rotavirus aşısı olan Rhesus Rotavirus Aşısıdır (RRV). Aşı G3P[3] suşunu içermektedir. Bu aşıda nötralizan antijen fenotipi, serotip G3 insan rotavirusu ile aynıdır ve insanlarda serotip G3'e karşı %90 antikör yanıtı elde edilmiştir. Ancak G3 dışındaki insan rotaviruslarına, özellikle G1'in sebep olduğu enfeksiyonlara karşı nötralizan antikör yanıtı elde edilememiştir.¹⁸

Hayvan kökenli aşılarla bu başarısız deneyimlere rağmen, çalışmalar sürdürülmüş ve rotavirusların reassortman (iki virusun bir hücreyi aynı anda enfekte etmesi sırasında bir gen segmentinin diğere geçmesi) özelliği sayesinde reassortant aşılar geliştirilmiştir.^{3,56}

İlk reassortant rotavirus aşısı Tetravalan maymun-insan reassortant (RRVTV, Rotashield, Wyeth-Lederle) rotavirus aşısıdır. Aşı G3 maymun ile G1, G2 ve G4 insan rotavirusu çaprazlanarak elde edilmiştir. Rotashield hem insan rotavirusunun antijenik özelliklerini taşımakta, hem de RRV aşısının hücre kültüründe kolay üreme özelliğine sahip olmaktadır. ABD'de Ağustos 1998'de ruhsat almış ve 1999 yılı rutin aşı şemasına dahil edilmiştir. Ağır rotavirus hastalığını önlemede oldukça etkili olmuştur. Ancak 600.000 bebeğe, 1 milyon doz aşı uygulaması ile 15 invajinasyon olgusu bildirilmesi üzerine, Ekim 1999'da kullanımdan kaldırılmıştır. Aşının invajinasyon ile ilişkili mekanizması henüz açıklanamamıştır. Üretimi durdurulmuş olmasına rağmen bu aşının hala Food and Drug Administration (FDA) onayı bulunmaktadır.^{3, 14,18, 56}

Bu umut kırıcı deneyimlere rağmen rotavirus aşı çalışmaları sürdürülmüştür. İki yeni rotavirus aşısı monovalan human rotavirus aşısı (Rotarix, GlaxoSmithKline) ve pentavalan insan-sığır reassortant rotavirus

aşısı (RotaTeq, Merck) ile ilgili etkinlik ve güvenilirlik çalışmaları tamamlanmıştır. Bu iki aşı 2006 yılından itibaren ülkemizin de dahil olduğu 100'den fazla ülkede ruhsat almış ve rutin olarak 19 ülkede kullanıma girmiştir.³

Pentavalan human-bovine reassortant rotavirus aşısı (PRV, RotaTeq):

Aşı WC-3 sığır rotavirus G6P5[7] ile insan VP7 G1-G4 ve VP4 P1A[8] reassortant beş bileşenli aşısıdır.^{3,18} Aşının içerdiği 5 reassortant rotavirus, son 20 yılda gerek gelişmiş gerekse gelişmekte olan ülkelerde izole edilen suşların %85'inden fazlasını kapsamaktadır.^{14,18}

Koruyuculukta, serotipe özgü nötralizan antikorların önemli olduğu savına dayanmaktadır. Dolayısıyla, PRV'de ılıman iklimlerde izole edilen rotavirus suşlarının % 85'inden fazlasında bulunan G1-4 ve P1A[8] antijenlerine yanıt tasarlanmıştır.³ Aşılama sonrasında herhangi bir rotavirus diyaresine karşı %74, doktor ziyareti gerektiren diyarelere karşı %87 ve şiddetli diyarelere karşı %100 etkin bulunmuştur. Ayrıca RotaTeq içeriğinde olmadığı halde G9 suşunu içeren diyarelerin önlenmesinde de etkin bulunmuştur.¹⁴ En önemli özelliği invajinasyonla ilişkili bulunmamasıdır. Center for Disease Control And Prevention (CDC) ve FDA tarafından 2007 yılında yapılan araştırmada aşılama sonrası invajinasyonla ilişki aşı uygulananlar için beklenenden yüksek olmamıştır.^{14,18}

Avrupa'da yapılan çalışmalarda aşı şiddetli rotavirus enfeksiyonlarını önlemede 2 yaşa kadar olan çocuklarda mükemmel klinik

etkinlik göstermiş ve iyi tolere edilmiştir.^{57,58} Aşı oral yolla 3 doz uygulanmaktadır. İki doz arasında en az 4 hafta önerilmektedir. Likit formda olan PRV aşısı 2, 4 ve 6. aylarda 3 doz şeklinde uygulanmalıdır.
3,14,57

Monovalan human rotavirus aşısı (HRV, Rotarix):

Monovalan human rotavirus aşısı (HRV, Rotarix) dünya genelinde en yaygın suş olan G1P1A[8] suşunu içeren, canlı, attenüe, insan rotavirus aşısıdır. Rotarix'in orijinal suşu Cincinatti'de rotavirusla enfekte bir bebekten alınan 89-12 suşudur. Bu vahşi suş 12 defa pasajla attenüe edilmiştir.^{3,14,18,57}

İnsan rotavirus aşısı monotipik olmasına rağmen G1,G2,G3,G4 serotiplerine karşı çapraz koruma sağlayabilmektedir. Bu aşı ile G9 serotipine karşı korunma sağlandığı da gösterilmiştir.^{3,14,18}

Latin Amerika ve Avrupa'da yapılan çalışmalarda aşı yüksek etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir.¹⁴ Toplam 20,000 infantın aşı sonrası izlendiği bir çalışmada aşı herhangi rotavirus enfeksiyonuna karşı %75, hastane yatışı gerektiren durumlara karşı %85 ve şiddetli enfeksiyona karşı ise %100 koruma sağlamıştır. Rotavirus suşlarına karşı aşının etkinliği incelendiğinde; yalnız G1P[8] suşuna karşı değil, G3P[8], G4P[8] ve G9P[8] suşlarına karşı yüksek oranda (%86) etkinlik gözlenmiş, G2P[4]'e karşı ise %41 oranında etkinlik göstermiştir. Ancak daha sonra Avrupa'da yapılan meta-analiz ve etkinlik çalışmalarının sonuçları aşının G2P[4] suşlarına karşı %81 etkinlik gösterdiğini belirtmiştir.⁵⁹ Yapılan çalışmalarda, invajinasyon oranında kontrol grubuna kıyasla bir artış saptanmamıştır.^{14,57,59}

Aşı oral yolla en az dört hafta ara ile 2 doz uygulanmaktadır. Sadece iki doz gerektiren bu aşının gastrointestinal sistemde replikasyonu oldukça yüksektir ve PRV aşısına göre 100 kat daha düşük dozda etkinlik göstermektedir.¹⁴ İki yeni aşının özellikleri Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2: Yeni rotavirus aşılarının özellikleri^{3, 14}

	Rota Teq (PRV)	Rotarix (HRV)
Kökeni	Sığır/ insan reassortant	İnsan attenüe suşu
İçeriği	Pentavalan (WC-3 bovine/insan G1-G4 tip ve WC-3/insan P tip reassortantı)	Monovalan (insan serotip G1P[8])
Doz sayısı	3 doz (2, 4 ve 6. aylarda)	2 doz (2 ve 4. aylarda)
İnvazinasyon	70.301 bebekte yapılan çalışmada ilişki saptanmadı**	63.325 bebekte yapılan çalışmada ilişki saptanmadı**
Ağır rotavirus diyarene karşı koruyuculuk **	%98*	%85*
Avantajları	Güvenilir, immunojenitesi geniş, bağırsakta replikasyonu sınırlı	Güvenilir, tek virus suşu olması, 2 doz uygulanması
Dezavantajları	Kompleks aşı, 3 doz uygulama	P1 dışındaki P serotiplere karşı düşük etkinlik

* Farklı skorlama sistemleri kullanılmıştır, bu nedenle karşılaştırılması uygun değildir.

** Market sonrası süveyans bu bulguyu desteklemektedir.

Araştırma programları sırasında farklı hastalık semptom skorlamaları kullanıldığı için iki aşının doğrudan karşılaştırılması mümkün değildir. Ancak her iki aşının da rotavirus diyarelerinden korunmada yüksek etkinlik ve güvenilirlik gösterdiği Dünya Sağlık Örgütü tarafından da belirtilmiştir.^{3,14,59}

Bu iki rotavirus aşısının Afrika ve Asya'daki gelişmekte olan ülkelerde etkinliği ve güvenilirliği hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. Bu ülkelerde serotip dağılımının farklı olması aşı etkinliğinin de farklı olacağını düşündürmektedir.³

Dünyanın bir çok bölgesinde (Çin, Kore, Endonezya, Almanya ve Brezilya) bu iki aşı dışında yeni rotavirus aşısı geliştirme çabaları devam etmekte ve yenidoğanlarda asemptomatik enfeksiyon oluşturan suşların kullanımı esas alınmaktadır. Bu amaçla Hindistan'da iki (116E suşu-G9P[11] ve 1321suşu-G10P[11]) ve Avustralya'da bir (RV3 suşu-G3P[6]) neonatal rotavirus aşısı ile çalışmalar bulunmaktadır. Bunun dışında Çin'de kuzulardan LLR (Lanzou Lamb Rotavirus) monovalan, canlı, attenüe rotavirus aşısı geliştirilmiştir. Sadece Çin'de kullanılan bu aşının 12-23 aylık infantlarda etkin (%80.9) ve güvenilir olduğu belirtilmiştir.^{3,18}

Bağışıklık sistemi baskılı hastalarda ise kronik rotavirus enfeksiyonları hala önemli bir problem oluşturmaktadır. Bu hastalarda canlı virus aşılarının kullanılması önerilmemektedir. Bu nedenle replike olmayan aşılar ve antiviral ilaçları içeren yeni tedavi yollarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. İnaktif rotavirus suşları içeren oral aşılar, DNA tabanlı aşılar, rekombinant ve virus benzeri partiküllerle oluşturulan aşılar çeşitli hayvan modellerinde çalışılmaktadır.^{3,18, 60}

Aşı rotavirus enfeksiyonlarından korunmada, özellikle de mortalitenin yüksek olduğu gelişmekte olan ülkelerde önemli bir yer tutmaktadır. Çocukluk çağı rutin aşı şemalarına rotavirus aşısının eklenmesi ile gelişmekte olan ülkelerde mortalitenin, gelişmiş ülkelerde ise hastane yatışları ve morbiditenin azalacağı umut edilmektedir.³

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Rotavirus antijeninin ELISA Testi ile saptanması

Premier™ Rotaclone® Enzim-Immunoassay kitinin (Meridian, Cincinnati, Ohio, ABD) içindekiler (Resim 2):

- 1- ELISA Plağı: Rotavirus antikoru ile kaplı 48 kuyulu mikrolak
- 2- Substrat A, 6.0 mL: Tamponlanmış Üre Peroksit solusyonu
- 3- Substrat B, 6.0 mL: Kromojen solusyon, Tetramethylbenzidin (TMB)
- 4- Pozitif kontrol 2.0 mL
- 5- Negatif kontrol (Sample diluent) 50 mL
- 6- Enzim konjugat 6.0 mL
- 7- Asidik Stop solüsyonu 6.0 mL

Enzim-Linked Immunosorbent Assay testinin uygulanışı:

- 0-5 yaş arası hastalardan alınan gaita örnekleri -80°C'lik dondurucudan (Sanyo, Japonya) çıkartılarak çözülmesi ve uygun sıcaklığa gelmesi için oda sıcaklığında bekletildi.
- Kit kullanılmadan önce +4°C'den çıkartılarak oda ısısında bekletildi.
- Her bir gaita örneğinden dilüsyon amacıyla 100 µL alınarak steril ependorflar içine konuldu.
- Alınan gaitalar üzerine 900 µL PBS (Fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu) eklenerek dilüe edildi.
- Dilüe edilen örnekler vortekslendi (Velp Scientifica, İtalya) ve 1.5 dakika 13.000 rpm'de santrifüjlendi (Heraeus Biofuge Pico, Almanya).

- Mikroplağın A1 kuyusuna 100µL (2 damla) negatif kontrol, B1 kuyusuna 100µL (2 damla) pozitif kontrol konuldu.
- Geri kalan tüm kuyulara 100µL dilue edilmiş hasta örnekleri eklendi.
- Plak 1 saat, oda ısısında ve gün ışığından korunarak inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonrasında plak ELISA yıkama cihazı (TECAN, Männedorf, İsviçre) kullanılarak 5 kez distile su ile yıkandı. Ortamda hiç sıvı kalmaması için plak birkaç kez ters çevrilerek tap yapıldı.
- Her kuyucuğa substrat A'dan (Tamponlanmış üre peroksit solüsyonu) iki damla (100 µL) eklendi.
- Her kuyucuğa subtrat B (Tetramethylbenzidin)' den 2 damla (100µL) eklendi.
- Gün ışığından korunarak 10 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyonun ardından tüm kuyucuklara 2 damla (100µL) stop solüsyonu eklendi.
- Pozitif örneklerde mavi renkten sarıya dönen renk değişimi gözlemlendi (Resim3).
- Sonuçlar spektrofotometrede (BioTekELX808, ABD) 450 nm dalga boyunda okutularak değerlendirme yapıldı.
- Enzim Immunoassay kitinin önerisine göre optik yoğunluğu 0.150'den büyük olanlar pozitif, küçük olanlar ise negatif kabul edildi.



Resim 2: Premier™ Rotaclone® Enzim- Immunoassay (ABD) kitinin görüntüsü



Resim 3: ELISA mikroplağındaki renk değişimi

3.2.Gaita örneklerinden çift zincirli RNA'nın ekstraksiyonu

Yapılan ELISA testi sonucu rotavirus pozitif olan örneklerden Fenol-kloroform-izoamil alkol metodu ile dsRNA izole edilmiştir. Bu işlemin basamakları;

- ✓ Daha önce %10 dilüe edilmiş gaita örneklerinden 500µL eppendorf tüpüne alındı.
- ✓ Hızlıca vortekslendi ve 12,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.
- ✓ Süpernatanın 400µL 'si ayrı bir eppendorfa alındı ve 400µL Fenol-Kloroform-İzoamil-Alkol (25:24:1) eklendi (Merck, Almanya). Karışım 1 dakika vortekslendi. Geri kalan gaita örneği -80°C'de saklandı.
- ✓ Karışımın olduğu eppendorf tüpü 15 dakika 12,000 rpm'de santrifüjlendi.
- ✓ Üst faz (kesişim fazını bırakarak) yeni bir eppendorfa alındı.
- ✓ Üzerine 1ml etanol (Merck, Almanya) ve 50 mikrol Sodyum asetat (Merck, Almanya) eklendi.
- ✓ Bir gece boyunca ya da 3-4 saat -40°C'de bekletildi.
- ✓ Sonra 12,000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi.
- ✓ Santrifüj sonrası üst faz mümkün oldukça pellete karıştırılmadan aspire edildi.
- ✓ Oda ısısında ya da speedvac'da kurutuldu.
- ✓ Son olarak 40 µL TE tamponu ile süspanse edildi.

3.3. Rotavirusun G ve P tiplerinin belirlenmesi

Rotavirusun VP7 ve VP4 genlerinin amplifikasyonu, AccessQuick™ RT-PCR System (Promega Corporation, Madison, ABD) ve Termal cykler (ThermoHybaid PCR Px2, İngiltere) cihazı kullanılarak yapıldı.

Tablo 3: Rotavirus VP-7 amplifikasyon primerleri

Beg9(1-28) Wa.28mer	5'GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG-3'
End9 (1062-1036) SA11. 27mer	5'-GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG-3'

Primer Beg9 ve End9 kullanılarak VP-7 amplifikasyonu için RT PZR amplifikasyon karışımı hazırlanması:

✓ 2 X Access Quick Master Mix	25 µL
✓ Beg9(10 µM)....final 1.0 µL	5 µL
✓ End9 (10 µM)....final 1.0 µL	5 µL
✓ AMV	1 µL
✓ RNase free water	12 µL
Toplam	48 µL

3.3.1. Beg9 ve End9 primerleri kullanılarak RT PZR ile VP-7 amplifikasyonu

- ✓ Kalıp dsRNA'dan 2.2 µL alındı. (Kalıp DNA denatüre edilmeden önce her bir tüpte RT PZR Master Mix hazırlandı.)
- ✓ Denatürasyon 97 °C'de 5 dakika süre ile gerçekleştirildi.
- ✓ Buz üzerinde 5 dakika bekletildi.
- ✓ Her bir örnek için 2 µL alınarak, önceden RT PZR Mastermix ile doldurulan tüplere dağıtıldı.
- ✓ Program RT-PR-A50 (40siklus amplifikasyon)

45°C'de 45 dakika	}	X1 siklus
95°C'de 2 dakika		
50°C'de 1 dakika		
72°C'de 1 dakika, 30 saniye		

94°C'de 1 dakika	}	X 39 siklus
50°C'de 1 dakika		
72°C'de 1 dakika,30 saniye		

72°C'de 5 dakika	}	X 1 siklus
4°C'de saklandı.		

3.3.2. Nested PZR ile G Tiplendirme

Tablo 4: Rotavirus G Tiplendirme Primerleri

VP7-R (914-932) 20 mer	5'-AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC-3'
aBT1 (314-335) Wa.22mer amplicon: 618bp	5'-CAAGTACTCAAATCAATGATGG-3'
aCT2 (411-435)DS-1.25mer amplicon: 521 bp	5'-CAATGATATTAACACATTTTCTGTG-3'
aDT4 (480-498)ST3.19mer amplicon:452	5'-CGTTTCTGGTGAGGAGTTG-3'
G3 (250-269) 19mer amplicon: 682bp	5'-ACG AAC TCA ACA CGA GAG G-3'
G9 (757-776) 20mer amplicon: 179	5'-CTT GAT GTG ACT AYA AAT AC-3'

G-tiplendirmesi için (G1 - G4) PZR Mastermix hazırlanması

✓ 2 X PCR Master Mix (Promega)	25 µL
✓ VP7-R (10 µM).....final 0.2 µL	1 µL
✓ aBT1 (10 µM).....final 0.2 µL	1 µL
✓ aDT4 (10 µM).....final 0.2 µL	1 µL
✓ G3 (10 µM).....final 0.2 µL	1 µL
✓ G9 (10 µM).....final 0.2 µL	1 µL
✓ Nuclease free water	18 µL
Toplam	49 µL

Önceden G-tiplendirme Master Mix ile doldurulmuş her bir tüpe kalıp cDNA (VP-7 ürünü) 1 µL eklendi.

✓ PZR Programı

95°C'de 1 dakika

42°C'de 2 dakika

72°C'de 1 dakika

4°C'de saklandı.

} X 30 siklus

3.3.3. Con2 ve Con3 primerleri kullanılarak RT-PZR ile VP4 amplifikasyonu

Tablo 5: Rotavirus VP-4 amplifikasyon primerleri

con3(11-32)	5'- TGGCTTCGCTCATTATAGACA -3'
con2a(868-887)	5-ATTTCGGACCATTATATAACC-3'

Primer Con2 ve Con3 kullanılarak VP-4 amplifikasyonu için RT mastermix hazırlanması

✓ 2 X Access Quick Master Mix	25 µL
✓ Con2(10 µM)....final 0.2 µL	1 µL
✓ Con3 (10 µM)....final 0.2 µL	1 µL
✓ AMV	1 µL
✓ RNase free water	21 µL
Toplam	49 µL

Kalıp dsRNA'dan 1.25 µL alındı. (Kalıp DNA denatüre edilmeden önce her bir tüpte RT Master Mix hazırlandı.)

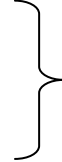
- ✓ Denatürasyon 97 °C'de 5 dakika süre ile gerçekleştirildi.
- ✓ Buz üzerinde 5 dakika bekletildi.
- ✓ Her bir örnek için 1 µL alınarak, önceden RT Mastermix ile doldurulan tüplere dağıtıldı.
- ✓ Program (30siklus amplifikasyon)

45°C'de 45 dakika
95°C'de 2 dakika
50°C'de 30 saniye
72°C'de 1 dakika



X1 siklus

94°C'de 15 saniye
50°C'de 30 saniye
72°C'de 1 dakika



X 29 siklus

72°C'de 5 dakika
4°C'de saklandı.



X 1 siklus

3.3.4. Nested PZR ile P Tiplendirme

Tablo 6: Rotavirus P tiplendirme Primerleri

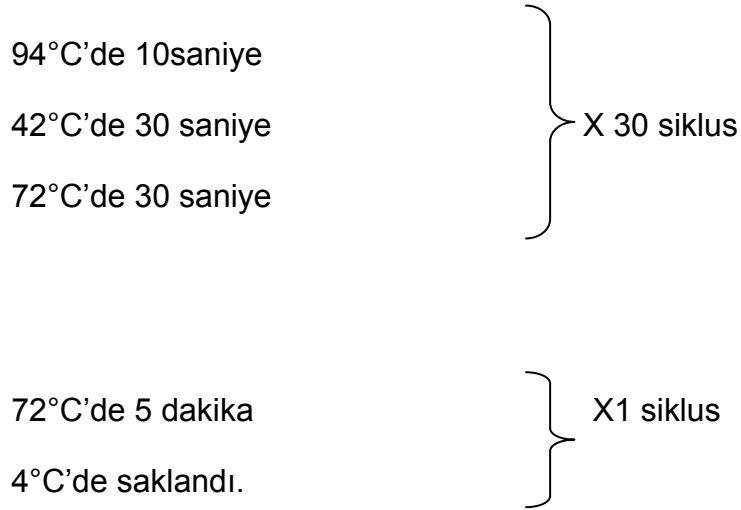
Con3 (nt11-32):	5'-TGGCTTCGCCATTTTATAGACA-3'
Con2 (nt868-887)	5'-ATTTCGGACCATTATAACC-3'
HumCom5(nt200-221)22bp:	5'-CTC TCG ATG GTC CAT ATCAAC C-3'
P[8]P1A:Wa(nt456-480)25bp:	5'-TGT ACG TCT ATT ATA AAA TTC ATTT-3'
P[4]P1B:DS-1(nt347-368)22bp:	5'-ATA TAT TGC CTA TTT GTT TGA C-3'
P[6]P2: M37(nt592-613)22bp:	5'-GTA TTA CAG TTT CTA CTT CAG A-3'
P[9]P3: AU-1(nt533-552)20bp:	5'-CGT CGC TCC TTG ATA CCA GT-3'

P-tiplendirme P[4][6][8][9] PZR Mastermix hazırlanması:

✓ 2 X PCR Master Mix (Promega)	25 µL
✓ HumCom5 (10 µM).....final 0.2 µL	1 µL
✓ P[4] (10 µM).....final 0.2 µL	1 µL
✓ P[6] (10 µM).....final 0.2 µL	1 µL
✓ P[8] (10 µM).....final 0.2 µL	1 µL
✓ P[9] (10 µM).....final 0.2 µL	1 µL
✓ Nuclease free water	19 µL
Toplam	49 µL

Önceden P-tiplendirme Master Mix ile doldurulmuş her bir tüpe kalıp cDNA'dan (con2 ve con3 ile amplifiye edilmiş 887bp'lik VP-4 ürünü) 1 µL eklendi.

PZR Programı (30 siklus amplifikasyon)



3.4. Agaroz jel elektroforezi

Yapılan RT-PZR işlemi sonucunda oluşan amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek rotavirus pozitifliği ve pozitif olan örneklerde de tiplendirme yönünden inceleme yapıldı.

3.4.1. Agaroz jelinin hazırlanması:

5X stok TBE (Tris Borat EDTA) solüsyonunun hazırlanması:

54 g Tris -Base (Ambresco, ABD)

27,5 g Borik Asit (Merck, Almanya)

20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) (Sigma, Almanya)

Tüm maddeler erlenmayer içinde eritilerek distile su ile tüm hacim 1000ml'ye tamamlandı.

5X TBE stok solüsyonu agaroz jelin hazırlanmasında ve yürütme tamponu olarak 1X'e çevrilerek kullanıldı.

Uygulama:

- 1- Jel ve yürütme tamponu hazırlamak için 100 ml 5X TBE stok solüsyonu 400ml distile su içinde dilüe edilerek 1X TBE'ye çevrildi.
- 2- Hassas terazide (Schimadzu, Japonya) 2 g agaroz (AppliChem, Almanya) tartılarak erlenmayer içerisine konuldu.
- 3- Agaroz üzerine 100ml 1X TBE ilave edildi ve mikrodalga fırında en düşük sıcaklıkta agaroz tamamen çözülünceye kadar ısıtıldı.
- 4- Agaroz tamamen çözündükten sonra biraz soğuması beklendi, ancak yaklaşık 50 °C'de katılaşıp agarozun katılaşmamasına dikkat edildi.
- 5- Jel elektroforez tankı içindeki kalıba dökülmeden hemen önce içine renklendirici olarak 0,2 µl DNA boyası Etidyum Bromid (5µl/10ml AppliChem, Almanya) eklendi.

- 6- Kalıp içine taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan jel döküldü. Bu esnada oldukça yavaş ve dikkatli davranılarak jelde akım geçişini engelleyecek baloncuk oluşması önlendi.
- 7- Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek jelin katılaşması sağlandı.
- 8- Donduktan sonra taraklar çıkartıldı ve jel elektroforez tankı (CS Cleaver Scientific Inc. Warwickshire, İngiltere) içine yerleştirildi.
- 9- Tankın içi jel yüzeyi kaplanana kadar 1X TBE tamponu ile dolduruldu.
- 10-Kuyucuklara örnek yüklemesi için yükleme tamponu Orange G (Metis, Kanada) kullanıldı.
- 11-Düz bir alüminyum folyo üzerine her örnek için 2 µl yükleme tamponu dağıtıldı. Örneklerden 6 µl alınarak yükleme tamponu ile pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- 12- Her agaroz jel kuyucuğuna 6 µl (yükleme tamponu+cDNA) dağıtıldı.
- 13-İlk kuyucuğa DNA parçalarının moleküler yüklerini tanımlamada yol gösterici olan marker (GeneRuler™100bp DNA Ladder Plus, LabAid™, Fermantas Inc, Ontario, Kanada) yüklendi.
- 14-Güç kaynağı (LABNET International Power Station 300, Edison, İngiltere) çalıştırılarak 20mA, 90V'de pozitifliğin araştırılmasında 20 dakika, tiplendirme de ise yaklaşık 1 saat yürütüldü.
- 15-Jel tanktan çıkarılarak jel görüntüleme sisteminde (UVITEC Cambridge, İngiltere) UV ışığı altında bantların değerlendirilmesi yapıldı.

3.5. Poliakrilamid jel elektroforezi ile elektroferotiplendirme

Ekstraksiyon ürünleri Poliakrilamid jel elektroforezinde (Hoefer®, San Francisco, ABD) yürütülerek elektroferotiplendirme gerçekleştirildi.

3.5.1.Poliakrilamid jel elektroforez solüsyonlarının hazırlanması:

1-%30'luk Akrilamid hazırlanması

Akrilamid	29.2 gr (Merck, Almanya)
Bis akrilamid	0.8 gr (AppliChem, Almanya)
Distile su	100ml' ye tamamlanarak, +4°C'de bekletildi.

2- Koşturma Jel (Lower jel) tamponu (pH 8.8) hazırlanması

Tris Base	74.1gr (Amresco, ABD)
Tris HCL	21.7 gr (Sigma, Almanya)
Distile su	500 ml 'ye tamamlandı

Hazırlanan karışım otoklavlandı ve oda sıcaklığında bekletildi.

3-Yükleme Jel (Upper Jel) tamponu hazırlanması

Tris Base	0.254gr
Tris HCL	7.57gr
Distile su	100ml'ye tamamlandı.

Hazırlanan karışım otoklavlandı ve oda sıcaklığında bekletildi.

4-Amonyum Persulfat 100mg/ml

Amonyum Persulfat	1gr (Gibco BRL, ABD)
Distile su	10ml'ye tamamlandı ve +4°C'de bekletildi.

5-Örnek Tamponunun hazırlanması

Gliserol	2ml (Scharlau, İspanya)
Tris 0.635 M pH6.8 (0.76gr/10ml)	2ml (Amresco, ABD)
2 mercaptoethanol	1ml (Merck, Almanya)
%10SDS	5ml (Scharlau, İspanya)

Karışım hazırlandıktan sonra pipet ucuyla Bromofenol Blue (Carlo ERBA, İtalya) eklenerek mavi bir renk alması sağlandı ve 4°C'de bekletildi.

6-Elektroforez Tamponu 10X hazırlanması

Glisin	144gr (Merck, Almanya)
Tris Base	30.3 gr

Balon Jojeye hazırlanan tampon daha sonra 1X'e çevrilerek kullanıldı.

3.5.2.Poliakrilamid Jel Elektroforezinin hazırlanması

Koşturma jelinin hazırlanması (Resolving-Ayırıcı jel)

Koşturma Jel tamponu	7.5 ml
Distile su	10ml
Akrilamid (%30)	10ml
TEMED	15 µL (Sigma, Almanya)
Amonyum Persulfat	150 µL

Yükleme Jelinin hazırlanması (Steaking Jel)

Yükleme jel tamponu	2.5 ml
Distille su	6.2 ml
Akrilamid	1.33 ml
TEMED	10 µL
Amonyum persulfat	30 µL

Uygulama:

1-Dikey jel elektroforez camları distile su ile yıkandı, alkolle silindi ve kurularak, yüzeyde kir ve partikül kalması engellendi.

2-Cam tabakaların iki yanına jelin kalınlığı ölçüsünde teflondan yapılmış birer ayırıcı yerleştirildikten sonra birbirine bakacak şekilde sabitlendi ve yanlardan vidalarla sıkıştırılarak jelin döküleceği boşluk oluşturuldu.

3-Aparat hazırlandıktan sonra önceden hazırlanmış olan %10'luk koşturma jeli enjektör ile iki cam arasına döküldü. Burada jelin hava ile temasını kesmek için üzeri tamamen saf su ile dolduruldu. Jelin polimerize olması için yaklaşık 30 dakika beklenildi.

4-Koşturma jeli polimerize olduktan sonra üzerindeki saf su aparat ters çevrilerek boşaltıldı.

5-Camlar arasına dsRNA'ların yükleneceği çukurluklar hazırlanması için plastik taraklar yerleştirildi.

6-Bu işlemten sonra yükleme jeli, koşturma jeli üzerine döküldü. Taraklar etrafında baloncuk kalmayacak şekilde sabitlendi ve 30 dakika beklenildi.

7-Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarıldı. Üst aparat camlar üzerine vidalandıktan sonra çukurlukların içi elektroforez tamponu ile yıkandı.

8- Tankın içi elektroforez tamponu ile dolduruldu ve 8 μ L örnek, 8 μ L örnek tamponu ile karıştırılıp tüm numune elektroforez iğnesi yardımı ile jel çukurluklarına yüklendi. İlk kuyucuğa marker dsRNA yüklendi. Tüm bu işlemler esnasında jellerin içinde ve arasında hava kabarcıklarının olmamasına dikkat edildi.

9-Yüklenmiş örnekler çift jel yürütüldüğünde güç kaynağı (LABNET International Power Station 300, Edison, ABD) ile 16mA'de, tek jel yürütüldüğünde 8mA'de 16 saat elektroforeze tabi tutuldu.

10-Brom Fenol Mavisinin jeldeki görüntüsü takip edildi. Koşturma işlemi tamamlandığında elektroforez durduruldu ve jel camların arasından dikkatlice çıkarılarak Etidyum bromidle boyanmış elektroforez tamponu içinde 20 dakika hafifçe sağa sola hareket ettirilerek boyandı.

11-Boyama sonucunda görüntüleme sistemi (UVITEC, Cambridge, İngiltere) ile jelin fotoğrafları çekildi.

12-Oluşan bantlar marker bantları ile karşılaştırıldı. Bantlar arasındaki benzerlik ve farklılıklar tespit edildi.



Resim 4: Dikey Jel Elektroforez Cihazının Görüntüsü

3.6. İstatistiksel Analiz

Yaş verilerinin normal dağılıma uygunluk testi (Kolmogorov Simirnov testi, K–S test) yapıldı ve normal dağılıma uymadığı saptandı. Bu nedenle yaş verisi Mean $\pm$ SD ve Median (Min-Max) [ortanca (en küçük – en büyük değer)] olarak sunuldu. İki grup karşılaştırmalarında da Ki-kare testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı'na Nisan 2009 ile Şubat 2010 tarihleri arasında gastroenterit şikayeti ile başvuran ve gaitaları Mikrobiyoloji laboratuvarına yollanan 0-5 yaş arasındaki 251 hastanın gaita örnekleri toplanarak gerçekleştirildi.

Çalışmaya alınan 251 hastanın 108'ini (%43) kız, 143'ünü (%57) de erkek hastalar oluşturdu. Bu hastaların yaşları 2 gün ile 59 ay arasında dağılım göstermekte idi. Yaş gruplarına göre 31' i (%12.4) 0-2 ay, 35'i (%13.9) 3-5 ay, 45'i (%17.9) 6-11 ay, 72'si (%28.7) 12-23 ay, 37'si (%14.7) 24-35 ay, 15'i (%6.0) 36-47 ay ve 16'sı da (%6.4) 48-59 ay yaş grubunda yer almakta idi (Tablo7).

Tablo 7: Çalışmaya dahil edilen 0-5 yaş arası akut gastroenteritli çocukların yaş gruplarına göre dağılımı (n=251)

Yaş grupları (Ay)	Sayı	Yüzde (%)
0-2	31	12.4
3-5	35	13.9
6-11	45	17.9
12-23	72	28.7
24-35	37	14.7
36-47	15	6.0
48-59	16	6.4
Toplam	251	%100

Çalışmaya katılan 251 hastadan 53'ünde (%21.1) ELISA testi sonucu rotavirus grup A antijeni bakımından pozitif bulunurken 198'inde (%78.9) rotavirus antijeni tespit edilmedi. Rotavirus antijeni saptanan 53 hastanın yaşları 6 gün ile 54 ay arasında değişmekteydi. Bu hastalar; 0-2 ay grubunda 1(%1.9), 3-5 ay grubunda 6 (%11.3), 6-11 ay grubunda 12 (%22.6), 12-23 ay grubunda 20 (%37.7), 24-35 ay grubunda 9 (%17.0), 36-47 ay grubunda 3 (%5.7) ve son olarak 48-59 ay grubunda da 2 (%3.8) hasta olarak dağılım gösterdi ($p>0.05$) (Tablo8). Mann-Whitney U testi sonucunda ELISA pozitif ve negatif hastalar arasında yaş farkı gözlenmedi.

Tablo 8: Rotavirus antijeni saptanan hastaların yaş gruplarına göre dağılımı (n=53)

Yaş grupları (Ay)	ELISA Pozitif Hastalar	
	Sayısı	Yüzde(%)
0-2	1	% 1.9
3-5	6	% 11.3
6-11	12	% 22.6
12-23	20	% 37.7
24-35	9	% 17.0
36-47	3	% 5.7
48-59	2	% 3.8
Toplam	53	% 100

Tablo 9: Rotavirus antijeni pozitif ve negatif hastalarda yaş verisi

Rotavirus	Median (Min-Max)	Mean± SD
Pozitif	15.00 (0-54)	17.74± 12.128
Negatif	12.00 (0-59)	16.87± 15.552

Kız hastaların ELISA sonucu bakımından 82'si (%75.9) negatif, 26'sı (%24.1) ise pozitif bulunurken, erkek hastaların 116'sı(%81.1) negatif, 27'i de (%18.9) pozitif bulundu (Tablo10).

Tablo 10: ELISA sonucuna göre kız ve erkek hastaların dağılımı (n=251)

Cinsiyet	ELISA sonucu		Toplam
	Negatif	Pozitif	
Kız	82 (%75.9)	26 (%24.1)	108 (%100)
Erkek	116 (%81.1)	27 (%18.9)	143 (%100)
Toplam	198 (%7.9)	53 (%21.1)	251 (%100)

Yapılan ELISA sonucu pozitif olan toplam 53 hastanın 26'sını (%49.1) kız, 27'sini de (%50.9) erkek hastalar oluşturmaktaydı (Tablo11). Çalışmamızda cinsiyete göre ELISA pozitifliği yönünden istatistiksel olarak fark görülmedi ($p>0.05$).

Tablo 11: ELISA pozitif hastaların cinsiyete göre dağılımı (n=53)

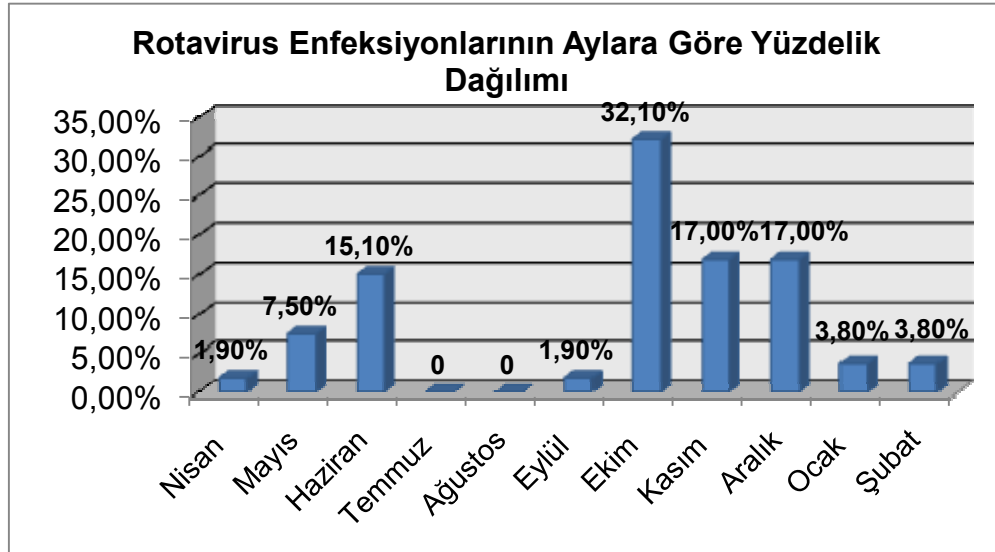
Cinsiyet	ELISA sonucu pozitif hastalar	
	Sayı	Yüzde (%)
Kız	26	%49.1
Erkek	27	%50.9
Toplam	53	%100

Çalışmaya dahil edilen hastalardan Nisan ayında gaitası alınan 4 hastanın 1'inde (%25.0), Mayıs ayında gaitası alınan 19 hastanın 4'ünde (%21.1), Haziran ayında gaitası alınan 32 hastanın 8'inde (%25.0),

Eylül ayında gaitası alınan 5 hastanın 1'inde (%20.0), Ekim ayında gaitası alınan 81 hastanın 17'sinde (%21.0), Kasım ayında gaitası alınan 36 hastanın 9'unda (%25.0), Aralık ayında gaitası alınan 41 hastanın 9'unda (%22.0) Ocak ayında gaitası alınan 21 hastanın 2'sinde (%9.5) ve Şubat ayında gaitası alınan 12 hastanın 2'sinde (%16.7) rotavirus antijeni saptandı.

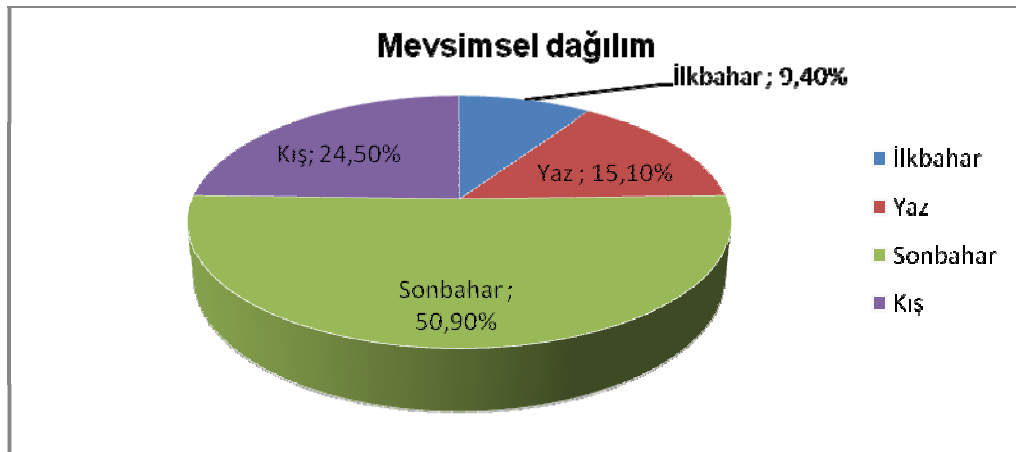
Temmuz ve Ağustos aylarında akut gastroenterit şikayeti ile hastanemize 0-5 yaş arasında hasta başvurusu olmadı. Çalışma Mart ayında örnek alınmadığı için tam bir yıllık süreyi kapsamamaktadır.

Toplam 53 rotavirusa bağlı gastroenterit olgusunun 1'i Nisan (%1.9), 4'ü Mayıs (%7.5), 8'i Haziran (%15.1), 1'i Eylül (%1.9), 17'si Ekim (%32.1), 9'u Kasım (%25.0), 9'u Aralık (%17.0), 2'si Ocak(%3.8) ve yine 2'si Şubat (%3.8) ayında gerçekleşti (Grafik1). Rotavirus pozitifliğinin aylara göre dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p>0.05$).



Grafik 1: Rotavirus enfeksiyonlarının aylara göre dağılımı (n=53)

Toplam 53 olgunun 13'ü (%24.5) kış, 5'i (%9.4) ilkbahar, 8'i (%15.1) yaz ve 27'si (%50.9) sonbaharda gözlemlendi ($p>0.05$).



Grafik 2: Rotavirus enfeksiyonlarının mevsimlere göre dağılımı (n=53)

Ekstraksiyon ürünlerinden önce RT-PZR ile VP4 ve VP7 amplifikasyonları yapıldı ve elde edilen komplementer DNA'lardan (cDNA) Nested PZR yöntemi ile G ve P tiplendirmeleri gerçekleştirildi.

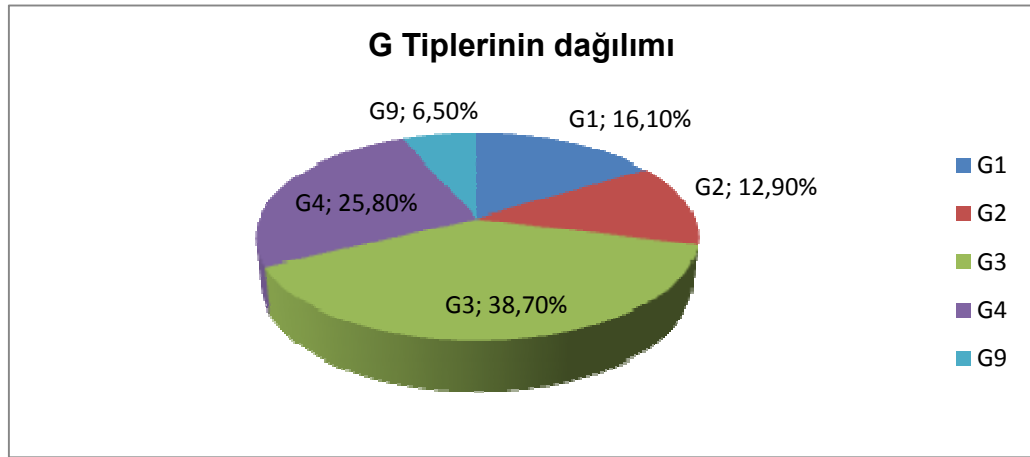
Çalışmaya dahil edilen 251 gaita örneğinden ELISA yöntemi ile rotavirus antijeni saptanan 53 örnekte sırasıyla G ve P tiplerinin varlığı araştırıldı. Örneklerin 31'inde (%58,5) G ve aynı örneklerin 24'ünde de (%45,3) P tipi saptandı. Bu örneklerin 18'inde (%34,0) hem G hem de P tipleri birlikte gözlemlendi.

Rotavirusun G tiplerinden G1, G2, G3, G4 ve G9 tipleri, P tiplerinden de P[9], P[6] ve P[8] tipleri saptandı (Resim5a-b,6a-b) Hem G hem de P tiplerinin birlikte görüldüğü örneklerde G3P[8], G2P[8], G4P[8], G1P[8], G9P[8], G4P[6] ve G1P[6] tipleri gözlemlendi. Bunların 53 rotavirus antijeni saptanan örnekteki dağılımı Tablo 12'de gösterildi.

Tablo 12: Rotavirus antijeni saptanan örneklerde G ve P tiplerinin dağılımı (n=53)

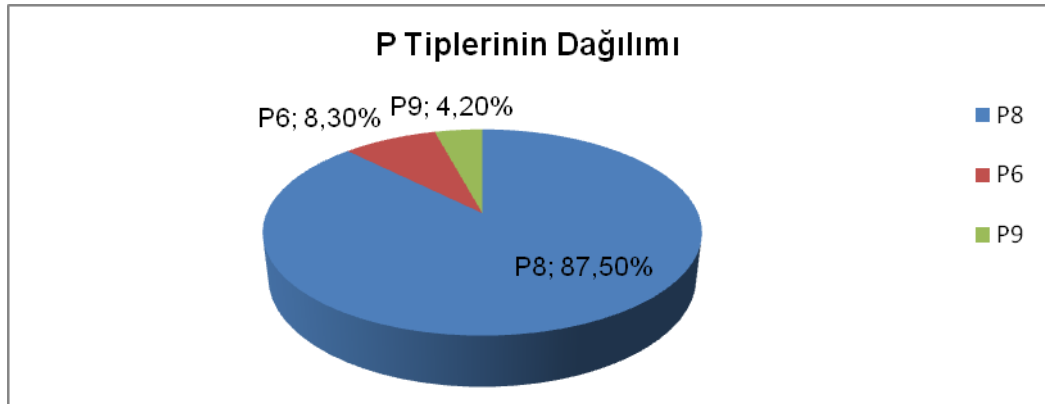
G Tipleri		P Tipleri		G/P tipleri	
G1	5 (%9.4)	P[8]	21(%39.6)	G3P[8]	7(%13.1)
G2	4 (%7.6)	P[6]	2 (%3.8)	G2P[8]	3(%5.7)
G3	12(%22.6)	P[9]	1 (%1.9)	G4P[8]	3(%5.7)
G4	8 (%15.1)			G1P[8]	2(%3.8)
G9	2 (%3.8)			G9P[8]	1(%1.9)
				G4P[6]	1(%1.9)
				G1P[6]	1(%1.9)
Toplam	31(%58.5)		24(%45.3)		18(%34)

Saptanan G1, G2, G3, G4 ve G9 tipleri 31 G tipi gözlenen örneklerin sırasıyla 5 (%16.1), 4(%12.9), 12(%38.7), 8(%25.8) ve 2'sini (%6.5) oluşturdu (Grafik3).



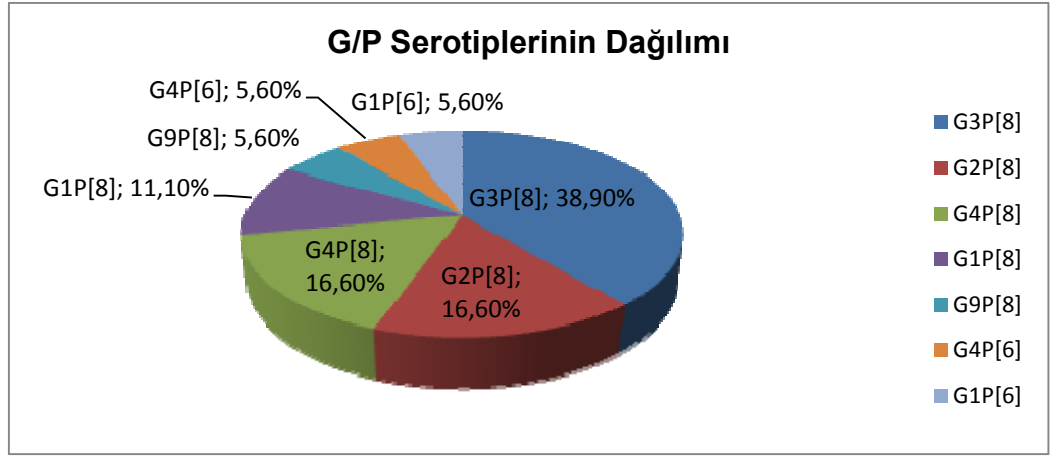
Grafik 3: Rotavirus G tipi saptanan örneklerde tiplerin dağılımı (n=31)

Çalışmamızda gözlenen P[9], P[6] ve P[8] tipleri ise 24 P tipinin sırasıyla 1 (%4.2), 2 (%8.3) ve 21'ini (%87.5) oluşturdu (Grafik4).



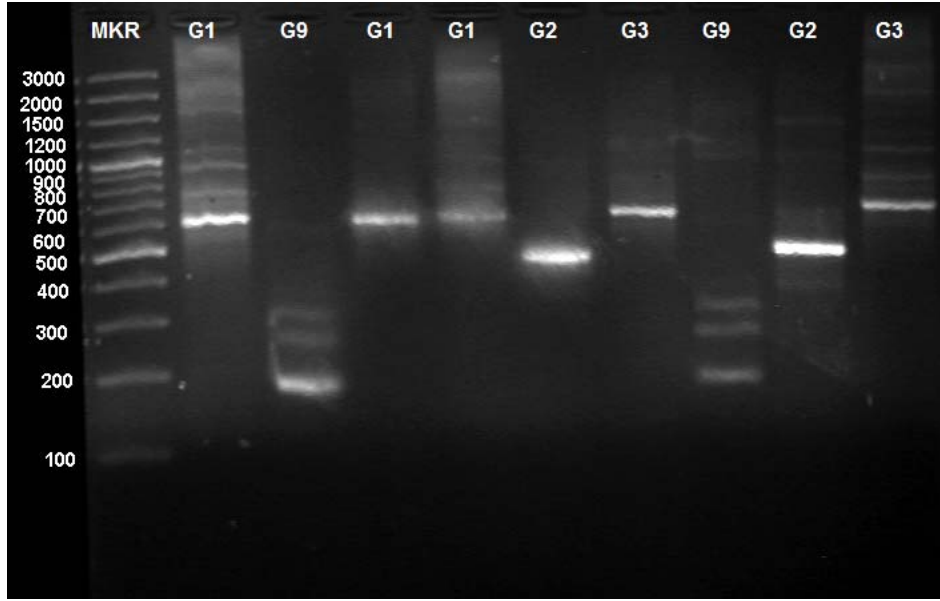
Grafik 4: Rotavirus P tipi saptanan örneklerde tiplerin dağılımı, (n=24)

Hem G hem de P tiplerinin birlikte görüldüğü örnekleri oluşturan G3P[8], G2P[8], G4P[8], G1P[8], G9P[8], G4P[6] ve G1P[6] serotipleri toplam 18 örnekte sırasıyla 7(%38.9), 3(%16.6), 3(%16.6), 2 (%11.1), 1 (%5.6), 1 (%5.6) ve 1(%5.6) olarak saptandı (Grafik5).

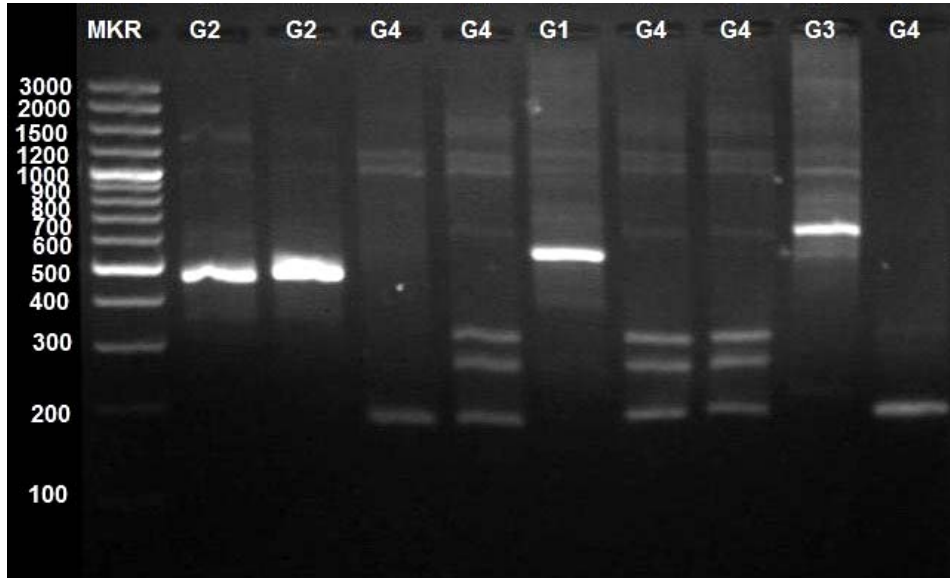


Grafik 5: Rotavirus G/P serotipi saptanan örneklerde tiplerin dağılımı (n=18)

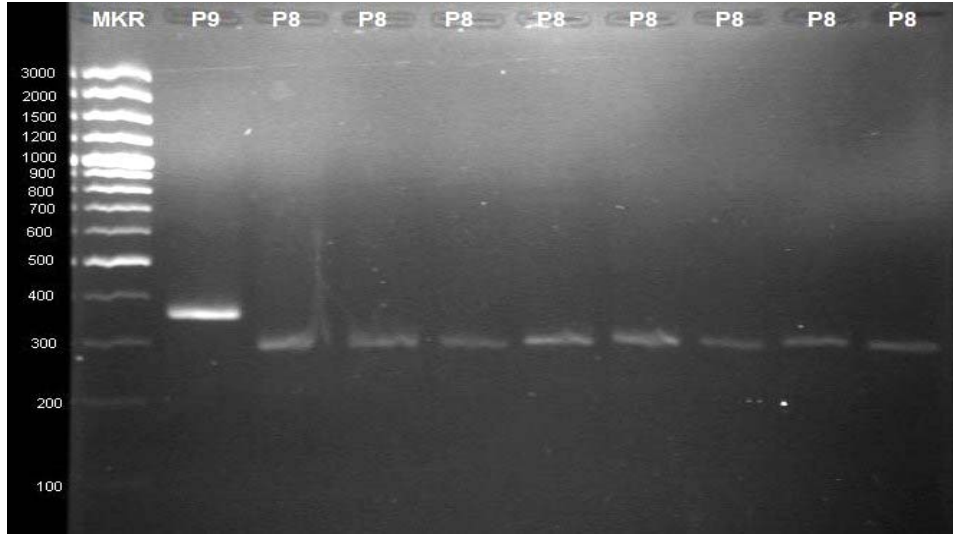
Çalışmamızda birden fazla G ve P tiplerinin birlikte görüldüğü miiks tiplere rastlanmadı.



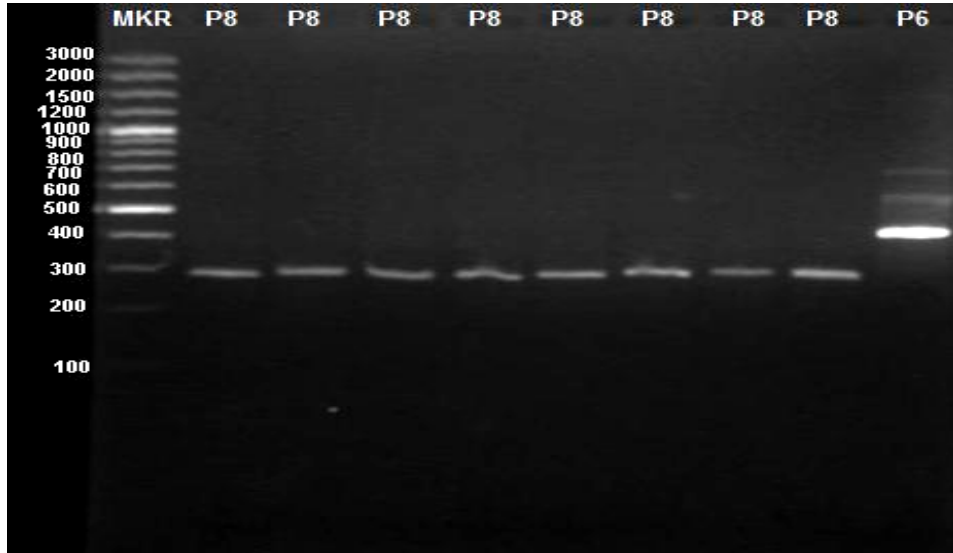
Resim 5a: Rotavirus G tiplerinin Agaroz Jel Elektroforezindeki görüntüsü



Resim 5b: Rotavirus G tiplerinin Agaroz Jel Elektroforezindeki görüntüsü

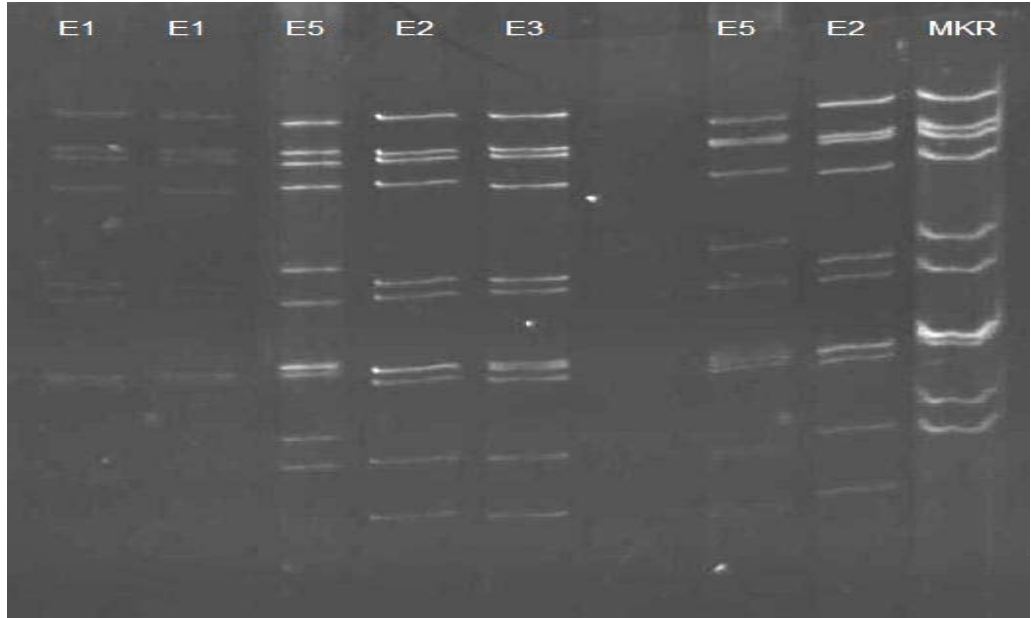


Resim 6a: Rotavirus P tiplerinin Agaroz Jel Elektroforezindeki görüntüsü



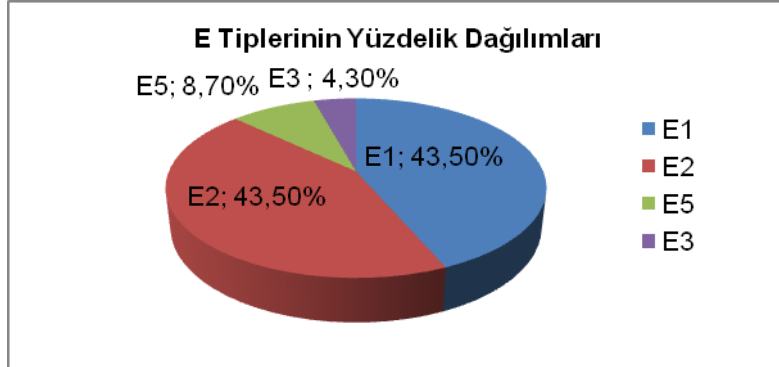
Resim 6b: Rotavirus P tiplerinin Agaroz Jel Elektroforezindeki görüntüsü

Rotavirus antijeni saptanan 53 hastanın gaita örneğinde Fenol-Kloroform-İzoamil alkol metodu ile RNA izolasyonu yapıldıktan sonra PAGE 'de RNA'nın moleküler ağırlığına göre ayrımı yapıldı. Toplam 53 örneğin 23'ünde (%43,4) elektroferotip gözlemlendi. Poliakrilamid jel üzerinde RNA'nın migrasyon paternlerine göre E1, E2, E3 ve E5 olmak üzere 4 farklı elektroferotip belirlendi (Resim7).



Resim 7: Rotavirus Elektroferotiplerinin PAGE'deki görüntüsü

Saptanan E1, E2, E3 ve E5 tipleri sırasıyla 10 (%43,5), 10 (%43,5), 1 (%4,3) ve 2 (%8,7) olarak dağılım gösterdi (Grafik6).



Grafik 6: Elektroferotiplerin Yüzdelik dağılımı (n=23)

Elektroferotipler G tipi belirlenen 11 örnekte ve P tipi belirlenen 13 örnekte saptandı. Bu örneklerden E3, G tiplerinde, E5 ise P tiplerinde gözlenmedi. Tüm G serotiplerinde en az bir E tipi saptanırken, serotip G9'da herhangi bir elektroferotip saptanmadı (Tablo13).

Tablo13: Elektroferotiplerin G tiplerine dağılımı (n=11)

	E1	E2	E3	Toplam
G1	1	1		2
G2	2			2
G3	1	4	1	6
G4		1		1
Toplam	4	6	1	11

Tablo 14: Elektroferotiplerin P tiplerine dağılımı (n=13)

	E1	E2	E5	Toplam
P[8]	7	4		11
P[6]		1		1
P[9]			1	1
Toplam	7	5	1	13

Elektroferotiplerden yalnız E1 ve E2 rotavirusun G/P serotipleri ile ilişkili bulundu ve 5 farklı serotipte E tipleri ile ilişkili saptandı. G3P[8] E2 ve E1, G1P[6] ve G4P[8] E2, G1P[8] ve G2P[8] E1 tipleri ile ilişkili bulundu (Tablo15).

Tablo15: Elektroferotiplerin G/P tiplerine dağılımı (n=9)

	E1	E2	Toplam
G3P[8]	1	3	4
G1P[6]		1	1
G4P[8]		1	1
G1P[8]	1		1
G2P[8]	2		2
Toplam	4	5	9

5. TARTIŞMA

Akut gastroenteritler, çocuklarda morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biri olup gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunudur. Beş yaşın altındaki çocuklarda 2008 yılında dünyada 1.336 milyon çocuğun diyare nedeni ile öldüğü bildirilmiştir.⁶¹ Ülkemizde de 0-14 yaş grubu çocuk ölümlerinin %8.4' ünden diyare sorumlu tutulmaktadır.⁶²

Rotaviruslar, bebek ve beş yaş altı çocuklarda görülen diyarelerin, özellikle hastane yatışlarına ve bebek ölümlerine neden olan ağır gastroenteritin en önemli nedenidir. Rotavirus gastroenteritleri nedeniyle dünya genelinde her yıl yaklaşık 611,000 çocuk hayatını kaybetmektedir.^{1,2}

Özellikle kontamine su ve gıdalar ile bulaşan, bakteri ve parazit kaynaklı diyarelerin önlenmesinde önemli bir yere sahip olan temiz içme suyu ve hijyen koşullarının sağlanması rotavirus gastroenteritlerinin önlenmesinde etkili olmamaktadır. Son yıllarda, gelişmiş ülkelerde sanitasyon, güvenilir su kaynakları ve oral rehidratasyon tedavisi ile diyareli hastalıkların morbidite ve mortalitesinde önemli azalma sağlanmasına rağmen, rotavirusa bağlı morbidite ve mortalitede azalma olmamıştır. Bunun nedeni bakteri ve parazit gastroenteritlerinin aksine rotavirus enfeksiyonlarının, hijyen koşullarından bağımsız olarak gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde benzer sıklıkta görülmesidir.^{2,3}

Dehidratasyon tedavisi ve tıbbi bakımın yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde rotavirus gastroenteritleri mortalite ile sonuçlanırken, gelişmiş ülkelerde daha çok morbiditeye, hastane yatışlarına ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır.^{2, 63}

Dünya genelinde beş yaş altı çocuklarda yaygın olan rotavirus enfeksiyonlarının en yüksek insidansa 6-24 aylık çocuklarda ulaştığı belirtilmektedir.^{3,4,7}

İnsanlarda en sık enfeksiyona neden olan rotavirus G tiplerinin G1-4 ve G9 olduğu, P tiplerinin de P[8], P[4] ve P[6] olduğu belirtilmiştir.^{3,44,8} Rotavirus serotiplerinden G1P[8] (%64.7), G2P[4] (%12), G3P[8] (%3.3) ve G4P[8] (%8.5) çocuklardaki rotavirus diyarelerinin %88.5'inden sorumlu tutulmaktadır. Son zamanlarda önem kazanan G9P[8] ve G9P[6]'da (%4.1) önemli global G tipleri arasında gösterilmektedir.⁸

Rotavirusun G1P[8], G2P[4], G3P[8] ve G4P[8] serotipleri Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da rotavirus enfeksiyonlarının %90'ından fazlasını oluştururken, Güney Amerika ve Asya'da %68'ini, Afrika'da ise %50'sini oluşturmaktadır.⁸ Dünyada en sık görülme oranına sahip olan G1P[8] serotipi Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da enfeksiyonların % 70'ini, Güney Amerika ve Asya'da % 30'unu, Afrika'da da % 23'ünü meydana getirmektedir.^{8,45}

Dünya genelinde, son yıllarda G9 serotipinde bir artış başlamış ve özellikle G9 Asya ve Afrika da önemli bir enfeksiyon etkeni

haline gelmiştir. ^{3,8,44,46} Rotavirusun P tiplerinden özellikle P[8] dünyanın birçok bölgesinde en sık görülen P tipidir. Ayrıca P[6] da dünyada en fazla Afrika'da bulunmakta ve burada dolaşan tiplerin üçte birinde görülmektedir. ^{3,8}

Rotavirusa bağlı gastroenteritler hakkında dünyada bugüne kadar çok sayıda çalışma yapılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Kiulia ve arkadaşlarının Kenya'da 1975-2005 yılları arasında yapılan çalışmalardan derledikleri verilere göre, yıl boyunca gerçekleşen diyarelerde rotavirus prevalansı %6-56'dır. Burada 1996-2002 yılları arasında global G1- G4 ve G9 genotipleri ile P[6], P[8] ve P[4] genotipleri gözlenmiştir. Çalışmalarda 2002 yılına kadar en yaygın genotip olan G1'in yerini 2002 yılından itibaren G9 ve daha az bir oranda G8 genotipi almıştır. Kenya'da, G9 önemli bir gastroenterit sebebi olarak gösterilmiştir. ⁴⁶

Arista ve arkadaşlarının Palermo'da Enzim Immünoassay (EIA), seminested RT-PZR ve PAGE yöntemlerini kullanarak yaptıkları çalışmada 1999-2000 epidemik kış sezonu sırasında, İtalyan çocuklarda G1(%43), G4(%34) ve G9(%19) tipleri yaygın olarak gözlenmiş, özellikle G9P[8] de artış olduğu ve tanımlanan tüm rotavirus suşlarının %19'unda gözlenerek önceki çalışmalara oranla oldukça yüksek bulunduğu belirtilmiştir. ⁶⁴

Ospino ve arkadaşlarının Tropikal iklime sahip Kolombiya'nın beş bölgesinde yapılan 23 çalışmadan derledikleri verilere göre,

gastroenteritlere sebep olan viral ajanlar arasında ortalama %35.5 ile 5 yaş altı çocuklarda rotavirus en fazla görülen virus olmuştur. Burada en sık görülen serotip G3P[8] (%32.7) olmuş, bunu G1P[8] (%24.7) ve G2P[4] (%22.9) serotipleri takip etmiştir.⁶⁵

Khalili ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada İran'da 2001-2002 yılları arasında ELISA yöntemi ile %78 sıklıkta rotavirus saptanmıştır. Enfeksiyon belirgin olarak Kasım ve Şubat ayları arasında gözlenmiş ve en çok 2 yaşın altındaki çocukları etkilemiştir. Burada da RT-PZR ile global olarak en sık görülen serotiplerden G1(%82), G2(%13), P[8](%74) ve P[4](%16) saptanmıştır.⁶⁶

Dey ve arkadaşlarının Bangladeş'te 2004-2005 yılları arasında RT-PZR ve Nested PZR kullanarak yaptıkları çalışmada G2(%43.3) en fazla saptanan serotip olmuş, bunu G4(%19.5), G9 (%13.7), G1(%12.7) ve G3(%2.6) izlemiştir. Rotavirusun P tiplerinden P[8], %53.2 ile en sık görülürken P[4], %42.9 ile ikinci sırada saptanmıştır. G2P[4] serotipi %43 sıklıkta gözlenmiş ve bunu sırasıyla G4P[8], G9P[8], G1P[8] ve G3P[8] serotiplerinin izlediği belirtilmiştir.⁶⁷

Damme ve arkadaşları tarafından Belçika, Fransa, Almanya, İtalya, İspanya, İsveç ve İngiltere'yi kapsayan ve 2004-2005 yılları arasında gerçekleştirilen çok merkezli bir çalışmaya göre akut gastroenteritli 2846 çocuktan 2712'sinde ELISA testi sonuç göstermiş ve bunların 1102 (%40.6)'sinde rotavirus saptanmıştır. Rotavirus antijeni saptanan örneklerden RT-PZR ile rotavirus gastroenterit olgularının %98'inden G1-G4 ve G9, geriye kalan %2'lik kısımdan ise G6, G8, G10 ve G12 serotipleri sorumlu tutulmuştur.⁶⁸

Tcheremenskaia ve arkadaşlarının Çek Cumhuriyeti, Slovenya, Hırvatistan, Arnavutluk ve Bulgaristan'da 2004 ile 2006 yılları arasında ELISA, RT-PZR ve dizi analizi yöntemlerini kullanarak yaptıkları bir diğer çalışmada şiddetli gastroenterit ile hastaneye yatan ya da ayakta tedavi gören çocuklardan izole edilen 1528 rotavirus suşunun incelenmesi sonucunda genel G/P kombinasyonları olan G1P[8], G3P[8], G4P[8] ve G2P[4] prevalansı %50 ile %85 arasında dağılmıştır. Bu ülkelerde P tiplerinden en sık P[8] (%80) bulunmuş ve bunu P[4] (%35) takip etmiştir. Sık görülmeyen P[4] ile ilişkili G1 ya da G4 ve P[8] ile ilişkili G2 %3-%20 oranında görülmüştür ve insan suşları arasında reassortment ile ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca nadir görülen G8P[8] ve G10P[6] 'de tanımlanmıştır. Rotavirus enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu 3 yaşın altındaki çocuklarda gözlenmiş ve 1-2 yaş arasında en yüksek insidansa (%34.1) ulaşmıştır.⁴⁴

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2006 yılında Payne ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada çocuklarda şiddetli rotavirus gastroenteritlerini incelemek için yapılan gözetim programında 516 gaita örneğinin 225'sinde EIA ile rotavirus saptanmıştır. Pozitif örneklerle yapılan RT-PZR sonucunda yaygın olarak G1P[8] (%84) suşu bulunmuş, bunu G2P[4] (%4.9) ve G12P[6] (%3.6) izlemiştir. Serotip G1P[6](%1.8) ise çok daha az gözlenmiştir. Ayrıca G2P[8], G12P[8] ve G9P[6] suşlarının her biri de %0.4 sıklıkta saptanmıştır. Örneklerin %4'ünde ise birden fazla tipte miks enfeksiyon gözlenmiştir.⁶⁹

Naranjo ve arkadaşlarının Ekvador'da on değişik taşra bölgesinde Mart-Ağustos 2006 tarihleri arasında yaptıkları beş yaşından küçük akut diyareli 729 çocuğun katıldığı bir çalışmada, immunoenzimatik test ile gaita örneklerinin %37'sinde rotavirus saptanmıştır. Yaygın P

tipleri RT-PZR ile yapılan tiplendirmede P[8] (%57) ve P[4] (%29.5) iken yaygın G tipleri G9(%46.1) ve G2(%27.2) olmuştur. Çalışmada G9P[8] (%56.9) ve G2P[4] (%32.6) serotipleri de yaygın olarak görülmüştür.⁷⁰

Avustralya'da 2007-2008 yılları arasında EIA ve hemi-nested RT-PZR yöntemleri ile yapılan yıllık gözlem sonucunda, G1 %52 sıklıkta görülmüş ve Avustralyalı çocuklarda en çok enfeksiyona sebep olan serotip olmuştur. Bunu G2(%19.8), G9(%12.2)ve G3(%11) serotipleri izlemiştir. G4 serotipine ise rastlanmamıştır. Bu çalışmada tanımlanan suşlar arasında G1P[8], G3P[8], G2P[4] ve G9P[8] kombinasyonları en yaygın görülenleridir. Çalışma sırasında da Avustralya' da ilk kez bir örnekte G2P[8] tipi saptanmıştır.⁷¹

Özellikle son yıllarda moleküler yöntemlerin gelişmesi ve rotavirusun ciddiyetinin kavranması nedeni ile ülkemizde de önemli epidemiyolojik veriler elde edeceğimiz çalışmalar yapılmıştır. Ülkemizdeki çalışmalar daha çok rotavirus insidansının belirlenmesine yöneliktir. Çeşitli yöntemler kullanılarak rotavirus pozitifliğinin belirlendiği bu çalışmalardan bazıları immunokromatografik incelemelere dayanmaktadır.

Karadağ ve arkadaşları tarafından Ankara'da üç hastanede 1999-2002 yılları arasında, yaşları 1-198 ay arasında değişen 1099 diyareli çocukla yapılan çalışmada immunokromatografik yöntem kullanılarak %36.8 sıklıkta rotavirus pozitifliği saptanmıştır.⁷²

Nazik ve arkadaşları 2003-2005 yıllarında İstanbul'da çocuk hastalara ait 3618 dışkı örneğini immunokromatografik yöntem ile incelemişler ve örneklerin %20.6' sında rotavirus saptamışlardır.⁷³

Bir diğer çalışmayı Biçer ve arkadaşları İstanbul'da 2007 yılında çocuk acil servisine akut gastroenterit şikayetiyle gelen 1767 çocuktan aldıkları gaita örneklerini immunokromatografik yöntemle inceleyerek yapmış ve bu örneklerin % 23.9'unda rotavirus antijeni saptamışlardır.⁷⁴

Rotavirus pozitifliğini ELISA testi kullanılarak belirleyen çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır. Türkoğlu ve arkadaşları, 1984 ve 1990 yılları arasında İstanbul'da 826 gastroenteritli çocuktan aldıkları gaita örneklerinde ELISA ve lateks aglütinasyon testlerini kullanarak %25.4 sıklıkta rotavirus saptadıklarını bildirmiştir.⁷⁵

Yıldırım ve arkadaşları tarafından 1989-1990 yıllarında Ankara' da yapılan ve akut gastroenteritli 1-18 ay arasındaki 106 süt çocuğunu kapsayan bir çalışmada, ELISA yöntemiyle örneklerin %29'unda rotavirus saptanmıştır.⁷⁶

Şıklar ve arkadaşları da 1998-1999 yıllarında yine Ankara'da yaptıkları çalışmada ELISA yöntemini kullanarak 0-2 yaş arasındaki gastroenterit tanısı olan 88 hastada rotavirus pozitiflik değerini %22.7 olarak saptamıştır.⁷⁷

Rotavirusun tiplendirilmesine yönelik çalışmalar ise son dönemlerde önem kazanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalardan birini Kurugöl ve arkadaşları 2000- 2001 yılları arasında İzmir’de gerçekleştirmiş ve 920 gastroenteritli çocukla yaptıkları çalışmada ELISA yöntemi kullanarak %39.8 (366) sıklıkta rotavirus gözlemlemiştir. Pozitif bulunan örnekler RT-PZR ile serotiplendirilmiş ve % 91.1’inde serotip G1-4 saptanmıştır. Bu tipler arasında G1 serotipi %75.1 ile en fazla görülen serotip olmuş, G2, G3 ve G4 ise sırasıyla %0.8, %3 ve %6.3 sıklıkta görülmüştür. Miks enfeksiyonlar ise %5.9 olarak saptanmıştır.⁶

Çataloluk ve arkadaşları 2000-2002 yılları arasında Türkiye’nin Batı ve Güneydoğu’sundaki dokuz şehirdeki akut diyareli 508 çocuktan aldıkları fekal örneklerde ELISA yöntemi ile %23.4 (119) sıklıkta rotavirus gözlemlemiştir. Pozitif örnekler elektroferotiplendirme yöntemi ve G, P genotiplendirme ile tiplendirilmiştir. Nükleik asit sekansı yapılan çalışmada en sık G4P[8](%42.2) serotipi saptanmıştır. Ayrıca G1P[8], G2P[4] ve G3P[8] serotipleri sırasıyla (%26.6), (%3.1) ve (%1.5) olarak gözlenmiştir. Çalışmada nadir görülen G9P[8] (%3.2), G2P[8] (%7.8), G1P[6] (%3.1), G2P[6] (%1.5) ve G4P[6] (%6.3) serotipleri de görülmüştür.⁷⁸

Bozdayı ve arkadaşlarının 2004-2005 yılları arasında Ankara’da yaptıkları çalışmada 0-5 yaş grubu çocuklara ait 322 gaita örneğinde EIA yöntemi ile %39.7 sıklıkta rotavirus saptanmıştır. Pozitif örneklerde PAGE ile beş farklı elektroferotip E1-E5 gözlenmiştir. Bunlar arasından E2, 26 örnekle en fazla görülen tip olurken, E1 ve E3 sırasıyla 7 ve 3 örnekte gözlenmiş, E4 ve E5 ise birer örnekte görülmüştür. Çalışmada yapılan RT-PZR ile G1’in %59.4 ile en fazla görülen serotip olduğu belirtilmiş, G9 ise %17.2 sıklıkta tespit edilmiştir. Çalışmada G2,

G3 ve G4 ise sırasıyla %3.9, %2.3 ve %3.1 sıklıkta görülmüştür. Çalışmada G1P[8] en sık rastlanan serotip (% 55.5) olmuş, G9P[8] serotipi ise, % 10.1 ile ikinci sıklıkta görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada daha önceki çalışmalarda gözlenilmeyen G9P[6] (%3.1), G9P[4] (%1.6), G1P[4] (%1.6), G3P[4] (%0.8) ve G4P[8] (%3.1) serotipleri de görülmüştür. Farklı serotiplerle miks enfeksiyonların düşük oranda (%2.4) saptandığı belirtilmiştir. ⁴

Çalışmamızda 251 gastroenterit olgusu rotavirus antijeninin varlığı bakımından ELISA testi ile incelenmiş ve bunların %21.1' inde rotavirus antijeni saptanmıştır. Bu değer daha önce ülkemizdeki çalışmalardan bildirilenlerle (%20.6-%39.8) ^{4,6,72,73,74,75,76,77,78} uyumludur.

Çalışmamızda rotavirusun kız (%49.1) ve erkek (%50.9) hastalara dağılımı yönünden istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir. Bu da rotavirusun cinsiyete bağlı olmayan bir enfeksiyon etkeni olduğunu bir kez daha doğrulamaktadır.

Dünya genelinde 6-24 aylık çocuklarda en yüksek orana ulaşan rotavirus enfeksiyonları çalışmamızda dünyadaki ve ülkemizdeki çalışmalara uyumlu olarak en sık 6-23 aylık çocuklar arasında gözlenmiş ve en yüksek insidansa (%37.7) 12-23 aylık çocuklar arasında ulaşmıştır. Ancak gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çalışmamızda rotavirus enfeksiyonlarının mevsimsel dağılımlarında 53 olgunun 27'si (%50.9) sonbahar, 13'ü (%24.5) kış, 8'i

(%15.1) yaz ve 5'i (%9.4) ilkbaharda gözlenmiştir. Tüm bu veriler değerlendirildiğinde mevsimler arasında rotavirusun dağılımı açısından istatistiksel bir anlam gözlenmemekle birlikte, pozitif olguların sıklıkla sonbahar mevsiminde görüldüğü tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Tüm dünyada ve ülkemizde yaygın olarak gözlenen G1-G4 ve G9 serotipleri çalışmamızda da %58.5 ile yaygın olarak saptanmıştır. Ancak daha önce ülkemizde yapılan çalışmalardan farklı olarak G1 yerine G3 serotipleri baskın serotip olarak gözlenmiştir.

Kurugöl⁶ ve Bozdayı'nın⁴ sırasıyla %75.1 ve %59.1 sıklıkta saptayarak ilk sırada gözlemledikleri G1 serotipi çalışmamızda G3 (%38.7) ve G4 (%25.8) tiplerinden sonra %16.1 ile üçüncü sırada gözlenmiştir. Bu durum G1 serotiplerinden belirgin olarak G3 ve G4' e doğru bir geçiş olduğunu göstermektedir.

Tüm dünyada gözlenen, özellikle Asya ve Afrika ülkelerinde daha yaygın olan ve ülkemizde de son yıllarda artış gösteren G9 serotipi çalışmamızda da %6.5 sıklıkta görülmüştür. Daha önce Bozdayı⁴ ve arkadaşlarının Ankara'da yaptıkları çalışmada %17.2 olarak gösterilen G9 tipinin çalışmamız ile varlığını koruduğu, ancak daha önceki çalışmalara göre giderek azaldığı düşünülmektedir.

Dünya genelinde insanlarda en sık görülen rotavirus P tiplerinin P[8], P[4] ve P[6] olduğu belirtilmektedir.^{3,8,44} Çalışmamızda ELISA pozitif örneklerde %45.3 sıklıkta P serotipleri saptanmıştır. Bu P serotiplerinin %87.5'ini P[8] oluşturarak dünya geneli ile uyum göstermiş

ve en yaygın P tipi olarak belirlenmiştir. Bunu P[6] (%3.6) ve P[9] (%4.2) takip etmiştir. Ülkemizdeki bulgulardan farklı olarak çalışmamızda P[4] serotipine rastlanmamıştır. Ayrıca bu çalışmada ilk kez ülkemizde P[9] serotipinin varlığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda toplam 18 örnekte G/P serotipleri saptanmıştır. Bu 18 örneğin %38.9'unu G3P[8] serotipi oluşturmaktadır. Bu serotip çalışmamızda en yaygın olarak saptanan G/P serotipidir. Bunu ikinci sırada %16.6 ile G2P[8] ve yine aynı oranda gözlenen G4P[8] takip etmiştir. Çataloluk ve arkadaşlarının⁷⁸ Gaziantep'te %42.2 sıklıkta saptayarak en yaygın serotip olarak belirledikleri G4P[8] çalışmamızda ikinci en yaygın serotiplerden biri olmuştur.

Global olarak yaygın olan ve Ankara'da da Bozdayı ve arkadaşları tarafından yaygın olarak saptanan G1P[8] serotipi⁽⁴⁾ çalışmamızda %11.1 sıklıkta saptanmış ve üçüncü yaygın tip olarak gözlenmiştir. Dördüncü sırada ise G9P[8], G4P[6] ve G1P[6] serotipleri saptanmış ve üç serotipte %5.6 olarak bulunmuştur. Tüm dünyada sıklıkla gözlenen serotipler arasında %12 ile ikinci sırada G2P[4] serotipi gösterilmektedir.⁸ Oysa çalışmamızda bu serotip saptanmamıştır. Çalışmamızdan elde edilen bulgular bölgemizde daha önce yaygın olarak görülen G1P[8] serotipinin yerini G3P[8]'in aldığını göstermektedir. Ayrıca G9P[8] serotipinde azalma gözlenirken G4P[8] serotipinde artış kaydedilmiştir.

Tropikal iklime sahip olan Kolombiya' da serotip G3P[8] %32.7 sıklıkta saptanmıştır.⁶⁵ Çalışmamızda G3P[8] serotipinin 38.9 ile benzer oranda bulunması ve en yaygın serotip olarak gözlenmesi ayrıca

G9 serotipinin de saptanması tropikal iklim bölgelerinde gözlenen serotiplerin ülkemizde de bulunduğunu göstermektedir.

Ülkemizde miks enfeksiyonları Kurugöl ve arkadaşları %5.9 sıklıkta, Bozdayı ve arkadaşları ise %2.4 sıklıkta saptamıştır.^{6,4} Ancak çalışmamızda miks enfeksiyonlara rastlanmamıştır.

Çalışmamızda PAGE sonucunda %43,4 sıklıkta elektroferotip gözlenmiş ve E1, E2, E3 ve E5 olmak üzere 4 farklı E tipi saptanmıştır. Oysa Bozdayı ve arkadaşları çalışmalarında 5 farklı elektroferotip saptamışlar ve E3 tipini G1P[8] suşu ile, E4 tipini ise G2P[4] suşu ile ilişkili bulmuşlardır.⁴ Bizim çalışmamızda ise G2P[4] tipi saptanamamış, G1P[8] serotipi E1 ve en sık gözlenen G3P[8] serotipi ise E2 tipi ile ilişkili bulunmuştur.

6.SONUÇ

Sonuç olarak tüm dünyada olduğu gibi çalışmamızda da rotavirus enfeksiyonlarının 0-5 yaş arası çocuklarda gastroenterite neden olan önemli bir etken olduğu gösterilmiştir.

Gastroenterite neden olan rotavirus serotipleri arasında G tiplerinden en sık G3 ve G4 tipleri gözlenmiş ve daha önceki çalışmalarla kıyaslandığında G1'den G3 ve G4 'e geçiş olduğu ve G9 tipinde de azalma olduğu görülmüştür. Rotavirus P tiplerinden P[8] en sık gözlenen etken olarak saptanmış ve ilk kez bu çalışma ile ülkemizde rotavirus enfeksiyonlarında P[9] serotipinin varlığı gösterilmiştir.

Rotavirus G/P serotiplerinden en sık görülen G3P[8]'in ülkemizdeki G1P[8] serotipinin yerini aldığı düşünülmektedir. Daha önce bölgemizde gözlenen 5 farklı elektroferotipten yalnızca E1, E2, E3, ve E5 saptanabilmiş ve E2 tipi G3P[8] serotipi ile ilişkili bulunmuştur.

Globalleşen dünyada turizmin gelişmesi, ülkeler arasında seyahatlerin artması ve benzeri nedenlerle farklı suşlar taşınmakta ve farklı suşlar yaygınlaşmaktadır. Çalışmamızda da globalleşmenin sonucu olarak bölgemizdeki serotiplerin insidansında değişimler olduğu gösterilmiş, rotavirus tedavi stratejilerinde rol oynayacak önemli bir epidemiyolojik veri elde edilmiştir.

7.ÖZET

Rotavirusun 0-5 Yaş Arası Çocuklarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Serotiplendirilmesi ve Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Elektroferotiplendirilmesi

Rotavirus tüm dünyada 0-5 yaş arası çocuklarda akut gastroenteritin en önemli etkenidir. Bu çalışmada hastanemize başvuran akut gastroenteritli 0-5 yaş arasındaki çocuklarda rotavirus enfeksiyonlarının prevalansının belirlenmesi ve bölgemizde yaygın olan rotavirus serotip ve elektroferotiplerin saptanması amaçlanmıştır.

Çalışma Nisan 2009 ile Şubat 2010 tarihleri arasında gastroenterit ile hastanemize başvuran 0-5 yaş arasındaki 251 hastanın gaita örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. Antijen pozitifliği ELISA ile saptanmış ve pozitif örneklerden fenol-kloroform-izoamil-alkol methodu ile dsRNA'lar izole edilmiştir. İzolatlar PAGE ile elektroferotiplendirilmiştir. Rotavirus G ve P serotipleri RT-PZR ve Nested PZR ile belirlenmiştir.

Çalışmaya alınan örneklerin 53'ü (%21.1) ELISA pozitif bulunmuştur. Bunların 31'inde (%58.5) G tipleri ve 24'ünde (%45.3) P tipleri saptanmıştır. Çalışmamızda G tiplerini G1(%16.1), G2(%12.9), G3(%38.7), G4(%25.8) ve G9 (%6.5) serotipleri, P tiplerini de P[8](%87.5), P[6] (%8.3) ve P[9] (%4.2) serotipleri oluşturmuştur. Rotavirus G/P(%34) kombinasyonlarından en sık G3P[8] serotipi (%38.9) saptanmıştır. Dört farklı elektroferotip gözlenmiş ve E (%43.4) tipi sıklığı; E1(%43.5), E2(%43.5), E3(%4.3) ve E5(%8.7) olarak saptanmıştır.

Çalışmamızın sonucunda, bölgemizde G1-4 ve G9 tiplerinin yaygınlığını koruduğu, ancak belirgin şekilde G1'den G3 ve G4'e geçiş

olduğu ve G9'un azaldığı gözlenmiştir. Daha önce yaygın olarak görülen G1P[8]'in yerini G3P[8]'in aldığı saptanmıştır. Önceki çalışmalarda tüm E tipleri görülebilmesine rağmen çalışmamızda 4 E tipi tespit edilmiştir. Globalleşmenin bir sonucu olarak önceki dönemlerde rastlanan sıklıklarda sapmalar olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Rotavirus, Serotip, PAGE, Elektroferotip

8.SUMMARY

Serotyping Rotavirus by PCR Method and Electropherotyping by PAGE Between 0-5 Years Old Children

Rotavirus is the major cause of gastroenteritis between 0-5 years old children worldwide. To determine the prevalence of rotavirus infection between 0-5 years old children attended our hospital with acute gastroenteritis and to confirm the prevalent serotypes and electropherotypes in our region was aimed in this study.

This study is conducted with the stool specimens of 251 children between 0-5 years old, attended our hospital from April 2009 to February 2010. Rotavirus antigen was detected by ELISA and dsRNA was extracted from the positive samples using phenol-chloroform-isoamyl alcohol method. Isolates were electropherotyped by PAGE. Serotypes G and P were determined by RT-PCR and Nested PCR.

Fifty-three of the collected samples (21.1%) were ELISA positive. In 31(58.5%) and in 24(45.3%) of the samples G and P types were detected respectively. Serotypes G1(16.1%), G2(12.9%), G3(38.7%), G4(25.8%) and G9(6.5%) constituted G types and P[8](87.5%), P[6](8.3%) and P[9](4.2%) types constituted P types. The most predominant serotype was G3P[8](38.9%) among the identified G/P(34%) combinations. Four different electropherotypes were observed (43.4%) and the prevalence of E types were detected as; E1(43.5%), E2(43.5%), E3(4.3%) and E5(8.7%).

In conclusion, it was observed that G1-4 and G9 types are still prevalent in our region, but there is a transition from the prevalence of G1 to G3 and G4, also a decrease in G9 prevalence. Instead of previously circulated G1P[8], G3P[8] was detected as the predominant combination. Although all E types were visible in previous studies, only four E types were detected in our study. As a result of globalisation a diversion in the previously observed ratio was presented.

Key words: Rotavirus, Serotype, PAGE, Electropherotype

9.KAYNAKLAR

- 1- Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(5): 565-72.
- 2- Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(2): 304-6.
- 3- Kurugöl Z, Salman N. Rotavirus infeksiyonları ve aşıları. *ANKEM derg* 2008; 22(3): 160-70.
- 4- Bozdayı G, Dogan B, Dalgıç B, Bostancı I, Sarı S, Battaloglu NO, et al. Diversity of human rotavirus G9 among children in Turkey. *J Med Virol* 2008; 80(4): 733-40.
- 5- Şimşek Y, Bostancı İ, Bozdayı G, Öner N, Ahmet A, Rota S, ve ark. 0-5 Yaş çocuklarda akut gastroenteritte rotavirus sıklığı ve serotip özellikleri. *Türkiye Klinikleri Pediatri Derg* 2007; 16: 165-70.
- 6- Kurugol Z, Geylani S, Karaca Y, Umay F, Erensoy S, Vardar F, et al. Rotavirus gastroenteritis among children under five years of age in Izmir, Turkey, *Turkish J Pediatr* 2003; 45(4): 290-4.
- 7- Öztürk R. Roevirus Ailesi ve Diğer Gastroenterit Virusları. İçinde; Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. *İnfeksiyon hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 2. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2002. s.1226-31.

- 8-** Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/ genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 2005; 15: 29-56.
- 9-** Bishop R. Discovery of rotavirus: Implication for child health. *J Gastroen Hepatol* 2009; 24(3): 81-95.
- 10-** Ustaçelebi Œ. Rotaviruslar. İçinde: Ustaçelebi Œ, editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: GneŒ kitabevi; 1999. s. 973-5.
- 11-** Yarkin F. Gastroenterit Virusları. İçinde: Ustaçelebi Œ, Abacioėlu H, Badur S, editörler. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 1. baskı. Ankara: GneŒ Kitabevi; 2004. s. 245-9.
- 12-** Iturriza-Gomara M, Wong C, Blome S, Desselbeger U, Gray J. Rotavirus subgroup characterization by restriction endonuclease digestion of a cDNA fragment of the VP6 gene. *J Virol Methods* 2002; 105: 99-103.
- 13-** Koopmans M, Brown D. Seasonality and Diversity of Group A rotaviruses in Europe. *Acta Paediatr Suppl* 1999; 88(426):14-9.
- 14-** Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: From Pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology* 2009; 136: 1939-51.
- 15-** Ursu K, Kisfali P, Rigo D, Erdelyi K, Ivanics E, Van A, et al. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. *Arch Virol* 2009; 154(8):1365-9.

- 16-**Schumann T, Hotzel H, Otto P, Johne R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. *Virology* 2009; 386: 334-43.
- 17-** Jayaram H, Estes MK, Prasad BVV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res* 2004; 102: 67-81.
- 18-**McNeal MM, Bernstein DI. Rotavirus, Pathogenesis. In: Barnett ADT, Stanberry LR, editors. *Vaccines for biodefence and emerging and neglected disease*. 1st. ed. London: Academic press; 2009.p. 645-69.
- 19-**Zeng CQY, Wenz MJ, Cohen J, Estes MK, Ramig RF. Characterization and replicase activity of double-layered and rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *J Virol* 1996; 70(5): 2736-42.
- 20-**Mansell EA, Patton JT. Rotavirus RNA replication: VP2 but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *J Virol* 1990; 64(10): 4988-96.
- 21-**Kirkwood CD, Palombo EA. Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein NSP4. *Virology* 1997; 236: 258-65.
- 22-**Barro M, Patton JT. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type 1 interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5 and IRF7. *J Virol* 2007; 81(9): 4473-81.
- 23-**Patton JT, Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-Del Carpio R, Taraporewala ZF. Rotavirus genome replication and morphogenesis: Role of the viroplasm. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 309: 169-87.

- 24-**Hernandez MS, Rodriguez ADL, Fabre RA, Ortiz CA, Rosa APB. Expression and purification of rotavirus proteins NSP5 and NSP6 in *Escherichia coli*. Cell Biochem Biophys 2006; 44: 336-41.
- 25-**Tarapowala ZF, Patton JT. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. Virus Res 2004; 101(1): 57-66.
- 26-**Rainsford EW, McCraine MA. Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. Virus Res 2007; 130: 193-201.
- 27-**Guerrero C, Mendez E, Zarate S, Isa P, Lopez S, Arias CF, et al. Integrin alpha (v) beta (3) mediates rotavirus cell entry. Proc Natl Acad Sci 2000; 97: 14644-49.
- 28-**Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, Lawton JA, Shaw AL, Ramig RF, et al. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus. VP4 spike. J Virol 2001; 75: 6052-61.
- 29-**Rota S, Fidan I. Noninflamatuvar diyarelerin patogenezi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2007; 37(4): 234-41.
- 30-**Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. J Virol 2004; 78(19): 10213-20.
- 31-**Moon HW. Pathophysiology of viral diarrhea. In: Kapikian AZ, editor. Viral infections of the gastrointestinal tract. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc; 1994. p. 27-52.

- 32-**Ruiz MC, Cohen J, Michelangeli F. Role of Ca^{+2} in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium* 2000; 28(3): 137-49.
- 33-**Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B and Straus SE, editors. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins Pa; 2001. p. 1787-833.
- 34-**Lundgren O, Svensson L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect* 2001; 3: 1145-56.
- 35-**Offit PA, Clark HF. Rotavirus. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Pa; 2000.p.1696-703.
- 36-**Prince DS, Astry C, Vonderfecht S, Jakab G, Shen FM, Yolken RH. Aerosol transmission of experimental rotavirus infection. *Pediatr Infect Dis* 1986; 5(2): 218-22.
- 37-**Yasa O, Ergüven M, Karaca-Atakan S, Çetiner N, Mısırlı T, Akkoç A. Yatarak izlenen rotavirus vakalarımızın epidemiyolojik özellikleri ve nozokomiyal infeksiyon. *Çocuk dergisi* 2009; 9(3): 127-30.
- 38-**Gleizes O, Desselberger U, Tatochenko V, Rodrigo C, Salman N, Mezner Z, et al. Nosocomial rotavirus infection in European countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital acquired rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25(1): 12-21.

- 39-**VanCott JL, McNeal MM, Flint J, Bailey SA, Choi AHC, Ward RL. Role for T cell-independent B cell activity in resolution of primary rotavirus infection in mice. *Eur J Immunol* 2001; 31(11): 3380-7.
- 40-**Franco MA, Greenberg HB. Role of Cytotoxic T Lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *J Virol* 1995; 69(12): 7800-6.
- 41-**Dharakul T, Rott L, Greenberg HB. Recovery from chronic rotavirus infection in mice with severe combined immunodeficiency: Virus clearance mediated by adoptive transfer of immune CD8⁺ T lymphocytes. *J Virol* 1990; 64(9): 4375-82.
- 42-**Valezquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, et al. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis* 2000; 182(6): 1602-9.
- 43-**Anderson EJ, Weber SG. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis* 2004; 4(2): 91-9.
- 44-**Tcheremenskaia O, Marucci G, Petris SD, Ruggeri FM, Dovercar D, Sternak SL, et al. Molecular epidemiology of rotavirus in Central and Southeastern Europe. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (7): 2197-204.
- 45-**Damme PV, Giaquinto C, Maxwell M, Todd P, Wielen MV. Distribution of rotavirus genotypes in Europe, 2004-2005: The reveal study. *J Infect Dis*. 2007; 195 (Suppl 1): 17-25.
- 46-**Kiulia NM, Kamenwa R, Irimu G, Nyangao JO, Gatheru Z, Nyachio A, et al. The Epidemiology of human rotavirus associated with diarrhoea in Kenyan children: A Review. *J Trop Pediatrics* 2008; 54(6): 401-5.

- 47-**Expanded Programme on Immunization of the Department of Immunization, Vaccination and Biologicals. Manual of rotavirus detection and characterization methods. Geneva: World Health Organization; 2009.
- 48-**Kirkwood CD, Bishop RF, Coulson BS. Attachment and Growth of Human Rotaviruses RV-3 and S12/85 in Caco-2 Cells Depend on VP4. J Virol 1998; 72 (11): 9348-52.
- 49-**Kang G, Iturriza-Gomara M, Wheeler JG, Cristal P, Monica B, Ramani S, et al. Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction: correlation with clinical severity in children in South India. J Med Virol 2004; 73: 118-22.
- 50-**Desselberger U. Rotavirus Infections: Guideliness for treatment and prevention. Drugs 1999; 58: 447-52.
- 51-**Kutlu T. İshalli çocuğun beslenmesi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum dizisi 2007; 57: 87-94.
- 52-**Casburn-Jones AC, Farthing MJG. Management of infectious diarrhoea. Gut 2004; 53: 296-305.
- 53-**Pant N, Marvotte H, Brüssow H, Svensson L, Lennard H. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and Antibodies. BMC Microbiol 2007; 7: 86-96.
- 54-**Teran CG, Teran-Escalera CN, Villarroel P. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. Int J Infect Dis 2009; 13: 518-23.

- 55-**Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* 2006; 24: 2718-31.
- 56-**Ceyhan M. Rotavirus aşılıarı. *ANKEM Derg* 2006; 20 (2): 52-5.
- 57-**Vesikari T, Van Damme P, Gianquinto C, Gray J, Mrukowicz J, Dagan R, et al. European Society for Paediatric Infectious Diseases/European Society for Paeditric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Evidence–Based Recommendations for Rotavirus Vaccination in Europe. *J Pediatr Gastr Nutr* 2008; 46: 38-48.
- 58-**Vesikari T, Itzler R, Karvonen A, Korhonen T, Van Damme P, Ulrich B, et al. Rotateq®, a pentavalent rotavirus vaccine: Efficacy and safety among infants in Europe. *Vaccine* 2010; 28: 345-51.
- 59-**Ruiz–Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Safety and efficacy on an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2006; 354: 11-22.
- 60-**Hyser JM, Estes MK. Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008. *Curr Opin Gastroen* 2008; 25: 36-43.
- 61-**Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: A systematic analysis. *Lancet* [serial online] 2010 May [cited 2010 May 12]; 10: [19 screens]. Available from: URL: [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(10\)60549-1](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(10)60549-1).

- 62-**Ministry of Health of Turkey. Burden Of Disease Final Report 2004. Ankara: Refik Saydam Hygiene Center School of Public Health; 2004.
- 63-**Gabarro MS, Mrukowicz J, Vesikari T, Verstraeten T. Burden of rotavirus Disease in European Union Countries. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25(1): 7-11.
- 64-**Arista S, Vizzi E, Migliore MC, Rosa ED, Cascio A. High incidence of G9P[8] rotavirus infections in Italian children during the winter season 1999-2000. *Eur J Epidemiol* 2003; 18: 711-14.
- 65-**Ospino DU, Young G, Navarro OA. Viral gastroenteritis and diversity of rotavirus strains in Colombian children: a systematic review. *J Infect Dev Ctries* 2008; 2(2): 99-105.
- 66-**Khalili B, Cuevas LE, Reisi N, Dove W, Cunliffe NA, Hart CA. Epidemiology of rotavirus diarrhoea in Iranian children. *J Med Virol* 2004; 73: 309–12.
- 67-**Dey SK, Hayakawa Y, Rahman M, Islam R, Mizuguchi M, Okitsu S, et al. G2 strains of rotavirus among infants and children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(1): 91-4.
- 68-**Damme PV, Giaquinto C, Maxwell M, Todd P, Wielen MV. Distribution of rotavirus genotypes in Europe, 2004-2005: The reveal study. *J Infect Dis* 2007; 195(Suppl 1): 17-25.

- 69-**Payne DC, Staat MA, Edwards KM, Szilagyi PG, Gentsch JR, Stockman LJ, et al. Active, population-based surveillance for severe rotavirus gastroenteritis in children in United States. *Pediatrics* 2008; 122:1235-43.
- 70-**Naranjo A, Cedeno C, Teran E, Castello A, et al. Prevalence of VP4 and VP7 genotypes of human rotavirus in Ecuadorian children with acute diarrhea. *J Med Virol* 2008; 80(6): 1106-11.
- 71-**Kirkwood CD, Cannan D, Boniface K, Bishop RF, Barnes GL. Australian rotavirus surveillance program. Annual report, 2007-08. *Commun Dis Intell* 2008; 32(4): 425-9.
- 72-**Karadag A, Acikgoz ZC, Avcı Z, Catal F, Gocer S, Gamberzade S, et al. Childhood diarrhoea in Ankara, Turkey: Epidemiological and clinical features of rotavirus-positive versus rotavirus-negative cases. *Scand J Infect Dis* 2005; 37: 269 -75.
- 73-**Nazik H, İlktaç M, Öngen B. Çocukluk yaş grubu gastroenteritlerinde rotavirus sıklığının araştırılması. *ANKEM Derg* 2006; 20(4): 233-5.
- 74-**Biçer S, Şahin GT, Koncay B, Yavuzcan D, Gemici H, Engerek N, ve ark. Çocuk acil servisinde saptanan rotavirus gastroenteriti olgularının sıklığı. *Çocuk Enfeksiyon Derg* 2008; 3: 96-9.
- 75-**Türkoğlu S, Petit-Çamurdan A, Akiş N, Badur S. İstanbul'da rotavirus çocuk diyareleri epidemiyolojisinin virus genom RNA'sı elektroforezi ile araştırılması *Mikrobiyol Bul* 1993; 27: 93-97.

- 76-**Yıldırım Y, Tanyer G, Dallar Y, Serdaroğlu A. Süt çocuklarının rotavirus ve diğer etiyolojik ajanlara bağlı gastroenteritlerinde klinik ve epidemiyolojik özellikler. *Anatolian J Pediatr* 1992; 1: 1-6.
- 77-**Şıklar Z, Ünalacak M, Dallar Y, Tanyer G. 0-2 yaş arası ishallerde rotavirüs sıklığı ve risk faktörleri. *Türkiye Klinikleri Pediatri Derg* 2000; 9: 219-24.
- 78-**Cataloluk O, Iturriza M, Gray J. Molecular characterization of rotaviruses circulating in the population in Turkey, *Epidemiol Infect* 2005;133(4): 673-8.

10. EKLER

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince değerli katkılarını esirgemeyen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR'a, tez konumun seçilmesinden çalışmalarımın tamamlanmasına kadar her konuda bana yol gösteren, bilgi ve tecrübesi ile her zaman destek olan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülendaml BOZDAYI' ya ve tez çalışmalarım sırasında yardımını benden esirgemen Sayın Doç.Dr. Seçil ÖZKAN'a çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Uzm.Bio.Gülçin ALP'e ve değerli dostlukları ile her zaman yanımda olan yüksek lisans arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Sonsuz güven ve destekleri ile her zaman yanımda olan, en değerli varlığım canım aileme binlerce kez teşekkür ederim.

Bio. Melda MERAL

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Melda

Soyadı: Meral

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara 15.05.1985

Eğitimi:

- 2008- Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, Ankara,
- 2004-2008 Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Ankara,
- 1998-2004 Nermin Mehmet Çekiç Anadolu Lisesi (İngilizce Hazırlık, Ortaokul ve Lise Öğrenimi) Ankara

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti
- Ankara Mikrobiyoloji Derneği

Bilimsel Etkinlikler:

İstanbul “12th Annual ESCV Meeting 2009 Kongresi”, Tübitak bursu (Ekim 2009).