

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

AKUT GASTROENTERİTLİ ÇOCUKLARDA ROTAVİRUS ENFEKSİYON İNSİDANSI VE GENOTİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gökhan ÖZTÜRK

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN**

ADANA-2018

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

AKUT GASTROENTERİTLİ ÇOCUKLARDA ROTAVİRUS ENFEKSİYON İNSİDANSI VE GENOTİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gökhan ÖZTÜRK

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN**

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TYL-2017-9143
numaralı proje olarak desteklenmiştir.**

ADANA-2018

KABUL ve ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan

“Akut Gastroenteritli Çocuklarda Rotavirus Enfeksiyon İnsidansı

Ve Genotiplerinin Araştırılması”

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 24 / 01 / 2018

TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof. Dr.Fügen Yarkin
Çukurova Üniversitesi
Başkan



Prof.Dr.Fatih Köksal
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Mehmet Sami Serin
Mersin Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof.Dr. Behice Durgun
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK BEYANI

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. / / 20....

İMZA

Adı Soyadı

Gökhan ÖZTÜRK

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı
Tezin Konusu : Akut Gastroenteritli Çocuklarda Rotavirus Enfeksiyon İnsidansı
Ve Genotiplerinin Araştırılması

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☐ Doktora: ☐

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Fügen YARKIN

Danışmanın İletişim Bilgileri

Telefon : 05326849960

E-Posta : fugeny@yahoo.com

Öğrencinin İletişim Bilgileri

Telefon : 05456636081

E-Posta : gokhan_jest@hotmail.com

Adresi : Osmangazi mah. 2025 sk.

No:4 D/12

Sarıçam/ADANA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımda bana yol gösteren, yardım ve desteğini esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. Fügen Yarkın'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Yetişmemde emeği geçen Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Fatih Köksal'a ve diğer öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Çocuk Acil Bilim Dalı başkanı Prof. Dr. Hayri Levent Yılmaz'a tez çalışmama katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Viroloji Bilim Dalı laboratuvarında tıpkı bir aile gibi samimi olan, birlikte çalıştığım arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde bana ellerinden gelenin fazlasıyla destek veren, bugünlere gelmemi sağlayan, evlatları olmaktan onur duyduğum sevgili anneme, babama ve abime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum...



Gökhan ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No:
KABUL ve ONAY	ii
ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Rotavirus (RV)	3
2.2. Virus yapısı	4
2.3. Sınıflandırma	7
2.4. Rotavirus genomu	8
2.4.1. Rotavirusların yapısal olmayan proteinleri	9
2.4.1.1. NSP3	9
2.4.1.2. NSP2	11
2.4.1.3. NSP5	13
2.4.1.4. NSP4	13
2.5. Rotavirus replikasyon döngüsü	15
2.5.1. Virus partikülünün tutunması	16
2.5.2. Virus partikülünün penetrasyonu ve kapsidin soyulması	17
2.5.3. Endositoz	18
2.5.4. İntraselüler veziküler trafik	18
2.5.5. Katepsinlerin gerekliliği	20
2.5.6. Endozomal sistemden çıkış	21
2.6. Pozitif polariteli mRNA sentezi	22
2.6.1. RV replikasyon ve transkripsiyonunun düzenlenmesi	22

2.6.1.1. Polimeraz aktivitesi.....	22
2.6.1.2. VP1 yapısı ve işlevi	23
2.6.1.3. Replikasyonun düzenlenmesi	24
2.6.1.4. Transkripsiyonun düzenlenmesi	25
2.7. Viroplazma oluşumu.....	26
2.8. Pozitif polariteli RNA sentezi, RNA paketleme ve DLP oluşumu.....	27
2.9. Virus partikülünün (virion) olgunlaşması ve salınımı	28
2.10. Rotavirus enfeksiyonları	28
2.10.1. Toplum kökenli rotavirus.....	28
2.10.2. Nozokomiyal rotavirus (nRV) enfeksiyonu.....	29
2.10.3. RV ve ekstraintestinal enfeksiyonlar	30
2.10.4. Kalıcı RV enfeksiyonu.....	32
2.11. Moleküler patogenez ve patofizyoloji	32
2.12. İmmün yanıt	33
2.12.1. RV spesifik humoral ve hücrel immün yanıt.....	33
2.12.2. Doğal immün yanıt	35
2.12.3. IgA ile korunma arasındaki korelasyon	37
2.12.4. Rotavirus gastroenteritene karşı probiyotik ve prebiyotik kullanımı	37
2.13. Klinik belirtiler	40
2.14 Laboratuvar tanısı	40
2.15 Tedavi	41
2.16. Moleküler epidemiyoloji ve evrim mekanizması	42
2.17. Rotavirusun küresel sürveyansı	44
2.18. Rotavirusun türler arası yayılımı ve zoonotik potansiyeli	45
2.19. RV aşıları	46
2.19.1. İlk aşı: Sığır rotavirus aşısı	47
2.19.2. Rhesus-human reassortant rotavirus aşısı	48
2.19.3. İnsan rotavirus G1P[8] aşısı.....	49
2.19.4. Sığır-insan reassortant rotavirus aşısı	52
2.19.5. Rotavirus aşısının uygulanması	53
2.19.6. Rotavirus aşısının sorunları	54
2.19.7. Diğer aşılar.....	55

2.19.8. Aşılama öncesi ve sonrası dönemlerde insanlarda rotavirus suşlarının dağılımı	56
3. GEREÇ ve YÖNTEM	58
3.1. Ridascreen rotavirus (ELISA) test protokolü	58
3.1.1. Rotavirus ELISA çalışma prensibi	59
3.1.2. Rotavirus ELISA testinin değerlendirilmesi.....	59
3.2. Viral RNA ekstraksiyonu.....	60
3.2.1. High Pure Viral RNA kit protokolü.....	60
3.3. Rotavirus RT-PCR ve genotipleme	61
3.3.1. Rotavirus G ve P tip cDNA sentezi	61
3.3.2. Rotavirus G ve P tip RT-PCR.....	62
3.3.3. Rotavirus spesifik G ve P tip genotipleme.....	64
3.4. Agaroz jel elektroforezi	66
4. BULGULAR.....	68
5. TARTIŞMA.....	75
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	104
KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ	117

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. Rotavirus virion yapısı	5
Şekil 2. Rotavirus VP1 ve VP3 yapısı.....	6
Şekil 3. Rotavirus NSP3 proteininin hücresel translasyonu inhibe etmesi	10
Şekil 4. Rotavirus replikasyon döngüsü	16
Şekil 5. Veziküler trafik	20
Şekil 6. Rotavirus G tip RT-PCR pozitif	63
Şekil 7. Rotavirus P tip RT-PCR pozitif	64
Şekil 8. Rotavirus G tip genotipleme (1. ve 19. kuyular 50 bp'lik marker; 3, 4, 5, 12, 13, 15, ve 18. kuyular 652 bp ile G2; 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 34 ve 35. kuyular 749 bp ile G1 genotipi)	65
Şekil 9. Rotavirus P tip genotipleme (1 ve 9. kuyu 50 bp'lik marker; 2, 6, 7, 10 ve 11. kuyular 483 bp ile P[4], 3 ve 4. kuyular 345 bp ile P[8]; 12. Kuyu 267 bp ile P[6] genotipi)	66
Şekil 10. Rotavirus antijen negatif ve pozitif örneklerin 2017 yılı boyunca aylara göre dağılımı	72
Şekil 11. Rotavirus G/P genotip kombinasyonlarının dağılımı	74

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1. Rotavirus G tip RT-PCR ısı döngüsü	62
Tablo 2. Rotavirus P tip RT-PCR ısı döngüsü.....	62
Tablo 3. Rotavirus G ve P tip RT-PCR için kullanılan konsensus primerler	63
Tablo 4. Rotavirus G ve P tip genotipleme ısı döngüsü	65
Tablo 5. RV antijen pozitif ve RV antijen negatif örneklerin yaş gruplarına göre dağılımı.....	68
Tablo 6. Toplam 400 hastanın demografik özellikleri, klinik belirtileri ve tedavi rejimleri dağılımı	70
Tablo 7. Rotavirus G ve P genotiplerin dağılımı.....	73

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Complementary DNA (Komplementer DNA)
CRM1	Chromosome region maintenance 1
DFA	Direct Fluorescent Antibody Test (Direkt Floresan Antikor Testi)
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
HA	Hemagglutinin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Ig	Immunoglobulin
IFN	İnterferon
kDa	Kilodalton
LAMP	Lysosomal-Associated Membrane Protein
LAMP	Loop-Aracılı İzotermal Amplifikasyon
M	Matriks
NA	Nöraminidaz
NASBA	Nükleik Asit Sekans Bazlı Amplifikasyon
NGS	Next-Generation Sequencing (Yeni nesil sekans)
nm	Nanometre
NP	Nükleoprotein
NSP-1	Non-structural Protein Type 1 (Yapısal olmayan protein tip 1)
NSP-2	Non-structural Protein Type 2 (Yapısal olmayan protein tip 2)
PA	Polimeraz Asidik Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PB1	Polimeraz Bazik Protein- 1
PB1-F2	Polimeraz Bazik Protein 1- F2

PB2	Polimeraz Bazik Protein- 2
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphoinositide 3- kinase
RIDTs	Rapid Influenza Diagnostic Tests (Hızlı influenza tanı testleri)
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonükleoprotein
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SAMBA	Simple Amplification-based Assay (Basit amplifikasyon temelli test)
TCID₅₀	Tissue Culture Infective Dose 50 (Doku kültürü infeksiyöz doz 50)
vRNP	Viral Ribonükleoprotein

ÖZET

Akut Gastroenteritli Çocuklarda Rotavirus Enfeksiyon İnsidansı Ve Genotiplerinin Araştırılması

Rotavirus bütün dünyada yenidoğan ve küçük çocuklarda ciddi akut gastroenteritin en yaygın sebebidir. Bu çalışmanın amacı akut gastroenterit sebebi ile hastaneye başvuran 5 yaş ve altındaki çocuklarda rotavirus enfeksiyon insidansını ve genotiplerini tespit etmektir.

Ocak-Aralık 2017 tarihleri arasında akut gastroenteriti olan 400 çocuğa ait dışkı örnekleri toplanmıştır. Rotavirus antijen varlığı Ridascreen Rotavirus ELISA (R-Biopharm AG, Germany) testi ile araştırılmıştır. Rotavirus pozitif örneklerden High Pure Viral RNA kiti (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak viral RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Rotavirus G ve P genotiplerinin tespiti için RT-PCR testi VP7 ve VP4 bölgesine spesifik konsensus primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra semi-nested multipleks PCR testi ile yedi rotavirus spesifik G genotipi (G1-4, G8-10) ve altı rotavirus spesifik P genotipi (P[4], P[6], P[8]-[11]) araştırılmıştır.

Rotavirus antijen pozitiflik oranı %22.7 (91) olarak tespit edilmiştir. Rotavirus antijen pozitifliği 0-24 ay yaş grubunda daha yüksek (%76.9) bulunmuştur. Rotavirus enfeksiyonu en fazla sonbahar mevsiminde, özellikle Kasım ayında (%38.5) görülmüştür. Rotavirus antijen pozitif 91 örneğin RT-PCR testi ile 89'u (%22.2) pozitif bulunmuştur. Toplam 89 dışkı örneğinde rotavirus G1 genotipi en fazla tespit edilen (%50.5) G genotipi olup bunu sırasıyla G2 (%21.3), G3 (%14.6) ve G9 (%3.4) takip etmiştir. En baskın P genotipi ise P[8] (%36) olup bunu sırasıyla P[6] (%22.5), P[4] (%19), P[9] (%4.5), P[10] (%3.4) ve P[11] (%1) izlemiştir. En yaygın görülen G/P kombinasyonu %21.3 ile G1P[8] olup diğerleri G2P[4] %12.4, G1P[6] %6.7, G2P[8] %4.5 ve G3P[8] %3.4 oranlarında gözlenmiştir. Rotavirus miks enfeksiyon insidansı %7.9 (7) olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada tespit edilen rotavirus P ve G genotipleri mevcut rotavirus aşılarda genotipleri ile uyumlu bulunmuştur. Bölgemizde rotavirus genotiplerinin belirlenmesi ve her yıl düzenli sürveyansı rotavirus aşısı uygulamasını yaygınlaştırmak, aşı etkinliğini tespit etmek ve gelecekte alternatif rotavirus aşılarının geliştirilebilmesi için önemlidir.

Anahtar sözcükler: Akut gastroenterit, rotavirus, RT-PCR, semi-nested multipleks PCR, genotipleme

ABSTRACT

Investigation of Rotavirus Infection Incidence and Genotypes in Children with Acute Gastroenteritis

Rotavirus is the most common cause of severe acute gastroenteritis in newborns and young children worldwide. The aim of this study is to determine the incidence and genotypes of rotavirus infection in children under and 5 years of age who were admitted to hospital due to acute gastroenteritis.

Between January and December 2017, stool samples were collected from 400 children with acute gastroenteritis. The presence of rotavirus antigen was investigated by the Ridascreen Rotavirus ELISA test (R-Biopharm AG, Germany). Viral RNA extraction from rotavirus positive samples was performed using High Pure Viral RNA kit (Roche Diagnostics, Germany). The RT-PCR test for identification of rotavirus G and P genotypes was carried out using consensus primers specific for the VP7 and VP4 regions. Then, seven rotavirus specific G genotypes (G1-4, G8-10) and six rotavirus specific P genotypes (P[4], P[6], P[8]-[11]) were detected by semi-nested multiplex PCR test.

The rate of rotavirus antigen positivity was 22.7% (91). Rotavirus antigen positivity was higher (76.9%) in 0-24 months age group. Rotavirus infection was most prevalent during the autumn, especially in November (38.5%). Out of 91 rotavirus antigen positive samples, 89 (22.2%) were found to be positive by RT-PCR test. Rotavirus G1 genotype was the most common (50.5%) G genotype in 89 stool specimens, followed by G2 (21.3%), G3 (14.6%) and G9 (3.4%). The most predominant P genotype was P[8] (36%), followed by P[6] (22.5%), P[4] (19%), P[9] (4.5%), P[10] (3.4%) and P[11] (1%). The most common G/P combination was G1P[8] with 21.3%, followed by G2P[4] (12.4%), G1P[6] (6.7%), G2P[8] (4.5%) and G3P[8] (3.3%). The incidence of mixed rotavirus infection was detected in 7.9% (7).

As a result, the rotavirus P and G genotypes identified in this study were found to be compatible with the genotypes of the existing rotavirus vaccines. Identification and annual surveillance of rotavirus genotypes in our region are important to widespread rotavirus vaccination, to determine vaccine efficacy and to develop alternative rotavirus vaccines in the future.

Key Words: Acute gastroenteritis, rotavirus, RT-PCR, semi-nested multiplex PCR, genotyping

1. GİRİŞ

Rotaviruslar ilk olarak 1960'lı yıllarda hayvanlarda keşfedilmiş olup daha sonra 1973 yılında Avusturalyada Ruth Bishop ve arkadaşları tarafından ciddi gastroenteriti olan çocukların duodenal biyopsi örneklerinin elektron mikroskopisi ile incelenmesi sonucunda insanlarda tanımlanmıştır ve dışkı örneklerinde de tespit edilmiştir ⁽¹⁾.

Daha sonraki çalışmalarda rotavirusun Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) ve Finlandiya'da akut gastroenterite sebep olan önemli bir etken olduğu belirlenmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde epidemiyolojik çalışmaların başlaması ile rotavirusun bütün dünyada akut diarelerin önemli bir etkeni olduğu ve yüksek mortalite ile ilişkisi gösterilmiştir. Rotavirus kaynaklı enfeksiyon sebebi ile meydana gelen ölüm vakaları için 1980'lerde belirlenen rakam yılda 870.000 olgu iken yakın tarihteki rakamsal verilere göre yıllık 450.000 olgudur ⁽²⁾. Birçok faktör özellikle de oral rehidrasyon terapisinin uygulanması diare kaynaklı global mortaliteyi azaltmıştır, ancak aşılama ile rotavirus gastroenteritinin (RVGE) önlenmesi ihtiyacı hala devam etmektedir. Çocuklarda rotavirus gastroenteritinden kaynaklanan mortalite ve morbidite oranı azalmasına rağmen rotavirus enfeksiyonu, enfeksiyon kaynaklı şiddetli diare ve dehidrasyona bağlı olarak çocuklarda hastaneye yatma ve mortalitenin en yaygın sebebi olmaya devam etmektedir ⁽³⁾.

Rotaviruslar Reoviridae familyasının Rotavirus cinsine dahildir. Elektron mikroskopisi ile virusun 70 nm'lik, zarfsız, çift zincirli RNA genomunu içeren ikozahedral kapside sahip olduğu belirlenmiştir. Rotavirus genomik RNA'sı üç katmanlı bir kapsid ile çevrelenmiştir. Rotavirus genomu yapısal (viral protein; VP) VP1-VP4, VP6, VP7 ve yapısal olmayan proteinler olan (non-structural protein; NSP) NSP1-NSP6'yı kodlayan 11 RNA segmentinden oluşur. Grup spesifik antijenik determinant olan VP6 proteini kapsidin orta katmanını oluşturur. Rotavirus serotipleri majör dış kapsid yüzey proteinleri olan ve nötralize edici antikoru uyaran antijen olarak görev yapan VP7 ve VP4 proteinleri tarafından belirlenir. NSP4'te antijeniktir ve diareye sebep olan bir enterotoksin olarak rol oynar. Rotaviruslar aynı zamanda eksprese edilen belirli NSP4 proteinlerine göre farklı genotiplere ayrılmıştır ^(4,5). VP7 ve VP4 translasyon sonrası modifiye edilmektedir. VP7 glikozile edilirken VP4 proteini bir proteaz tarafından kesilir. Rotavirusun G ve P serotipleri sırasıyla VP7 ve VP4

tarafından belirlenir. P serotiplerini virus nötralizasyon testlerini içeren geleneksel yöntemlerle tanımlamak zordur. Bunun yerine "P serotipleri" nin genotipini belirlemek için sekans analizine dayanan moleküler yöntemler kullanılmaktadır. G serotipleri ve genotipleri aynı numara ile temsil edilirken P genotiplerinin numarası parantez içinde (örneğin; P1[8]) gösterilir ve bu genotipler bilinen serotiplerle yakından ilişkilidir. VP7 ve VP4 proteinleri serotip spesifiktir ve bazı durumlarda akut gastroenterite karşı çapraz reaktif koruma sağlayan nötralizan antikorlar için hedeftirler. Bu sebeple aşı geliştirme çalışmalarında dikkate alınan temel yapılardır ^(6,7).

İnsan rotaviruslarının şimdiye kadar G ve P proteinlerinin ayırımı ve birbirinden bağımsız çeşitliliği sebebiyle farklı suşların oluşması ile en az 42 farklı G-P serotip kombinasyonu tanımlanmıştır. Neyse ki dünyada dolaşan birçok rotavirus suşlarının yalnızca az bir kısmı insanlarda hastalığa sebep olmaktadır ⁽⁸⁾.

Rotavirus başlıca fekal-oral yolla bulaşır, ancak damlacık yoluyla da bulaş mümkündür. İshal başlangıcından önce ve semptomlar koybulduktan haftalarca sonra bile dışkı ile rotavirus atılımı gerçekleşebilir. Rotavirus kuru yüzeylerde 10 günden fazla, elde ise dört saatten fazla aktif kalabilir. Pediatri servisleri ve diğer çocuk hizmet merkezleri rotavirus için önemli rezervuarlardır. Bu bölgelerde enfeksiyon çocukların, ailelerin ve sağlık personelinin elleriyle veya enfekte kişilerin temasta bulunduğu oyuncaklarla yayılabilir. Nozokomiyal rotavirus gastroenteriti hastanede kalış süresini uzatır, ekonomik ve sosyal yükü artırır ^(9,10).

Beş yaşın altındaki çocuklarda rotavirus enfeksiyonuna bağlı ölümlerin %85'inden fazlası Asya ve Sahra altı Afrika ülkelerinde görülmektedir. Türkiye'de gastroenteritli çocuklarda rotavirus pozitifliğinin %16-43 arasında olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde beş yaş ve altı çocuklarda mortalitenin %12'si diare ve diareli hastalıklarla ilişkilidir ^(11,12,13).

Bu çalışmanın amacı akut gastroenterit sebebi ile hastaneye başvuran 5 yaş ve altı pediatrik grupta rotavirus insidansını ve dolaşımda olan rotavirus genotiplerini belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Rotavirus (RV)

Akut gastroenterit (AGE) çoğunlukla 5 yaşın altındaki çocuklarda görülmektedir. Rotavirus (RV), norovirus (NoV), sapovirus (SaV), enterik adenovirus (EAdV) 40 ve 41 serotipleri, astrovirus (AstV), insan parechovirus (HPeV), Aichivirus (AiV) ve pikobirnavirüsün (PBV) yanı sıra daha az oranda torovirus (ToVs) ve coronavirus (CoVs) gibi birçok virus AGE'e sebep olabilir ⁽¹⁴⁾.

Bu viruslardan rotaviruslar 1973 yılında çocuklarda ve infantlarda akut gastroenteritin (AGE) önemli bir etkeni olarak tanımlanmıştır. Zaten daha önce RV'ler diareli farelerde, maymunlarda, sığırlarda daha sonrasında yaraları da içeren birçok genç memeli türünde ve ayrıca kuşlarda keşfedilmiştir ⁽¹⁵⁾.

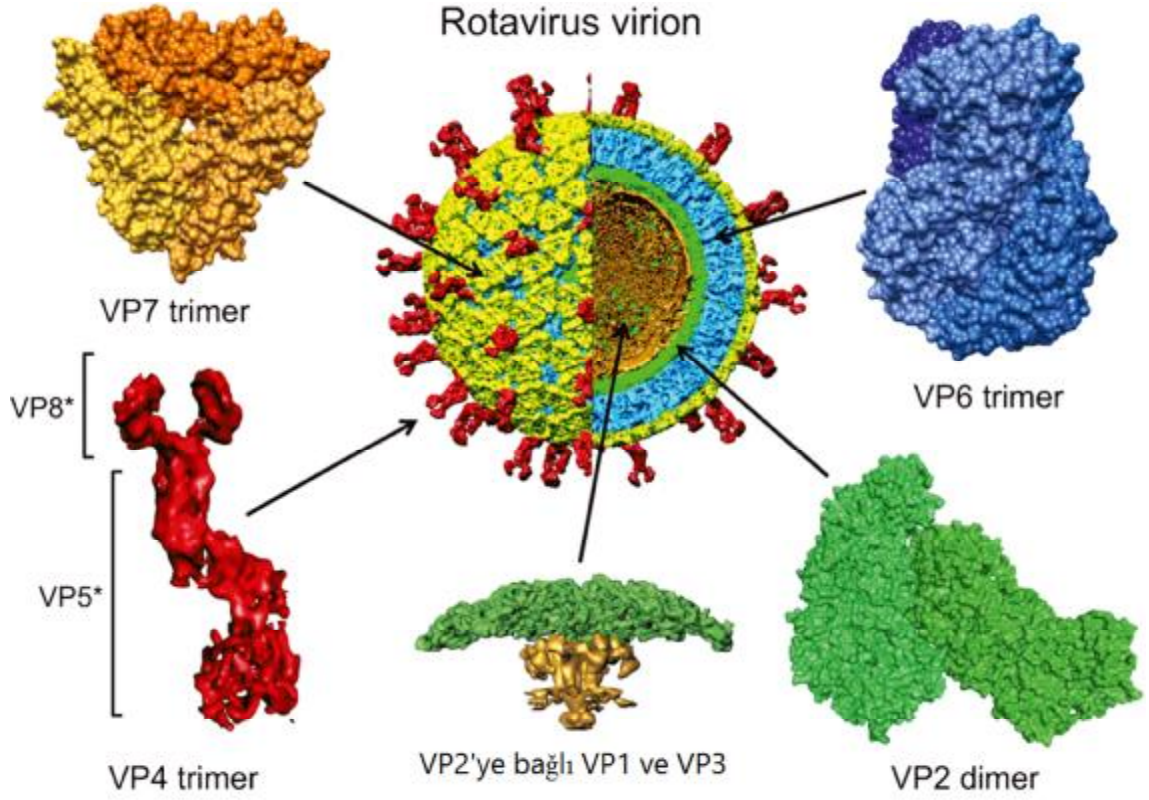
RV'ler gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklar arasında AGE vakalarının %6'sından ve AGE'le ilişkili ölümlerin %20'sinden sorumludur. Rotaviruslar Sahra Altı Afrika, Asya ve Güney Amerika gibi gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere dünya genelinde önemli ağır bir hastalık yüküne(450.000-500.000 çocuk <5 yaş/yıl) sebep olmaktadır ⁽¹⁶⁾.

Rotavirus yayılımı spesifik hücresel reseptörler aracılığıyla savunmasız bir hücreye enfeksiyöz bir virus partikülünün (virion) adsorbsiyonu ile doğal olarak başlar, bunu takiben viral replikasyon döngüsünün basamakları: penetrasyon, kapsidin soyulması, transkripsiyon, translasyon, viral nükleik asit replikasyonu, viral komponentlerin birleşimi (morfogenez) ve virionların hücre lizisiyle salınması şeklinde devam eder ⁽¹⁷⁾.

Son 30 yılda RV aşısı geliştirilmesi için çok çaba sarf edilmiştir. Rotashield™, (Wyeth Lederle Aşıları, Philadelphia, PA), ilk lisanslı RV aşısıdır, ancak aşılanan çocuklarda intussepsiyon ile epidemiyolojik olarak ilişkili olduğu gerekçesiyle geri çekilmiştir. Yakın tarihte ciddi diareye karşı etkili koruma gösteren, canlı atenué aşısı olan RotaTeq™ ve Rotarix™ geliştirilmiştir. Aday aşılar arasında virus benzeri partikül (VLP) temelli yapılar veya inaktive virus partikülleri gibi non-replikatif RV aşıları umut vadeden sonuçlar göstermiştir ⁽¹⁸⁾.

2.2. Virus yapısı

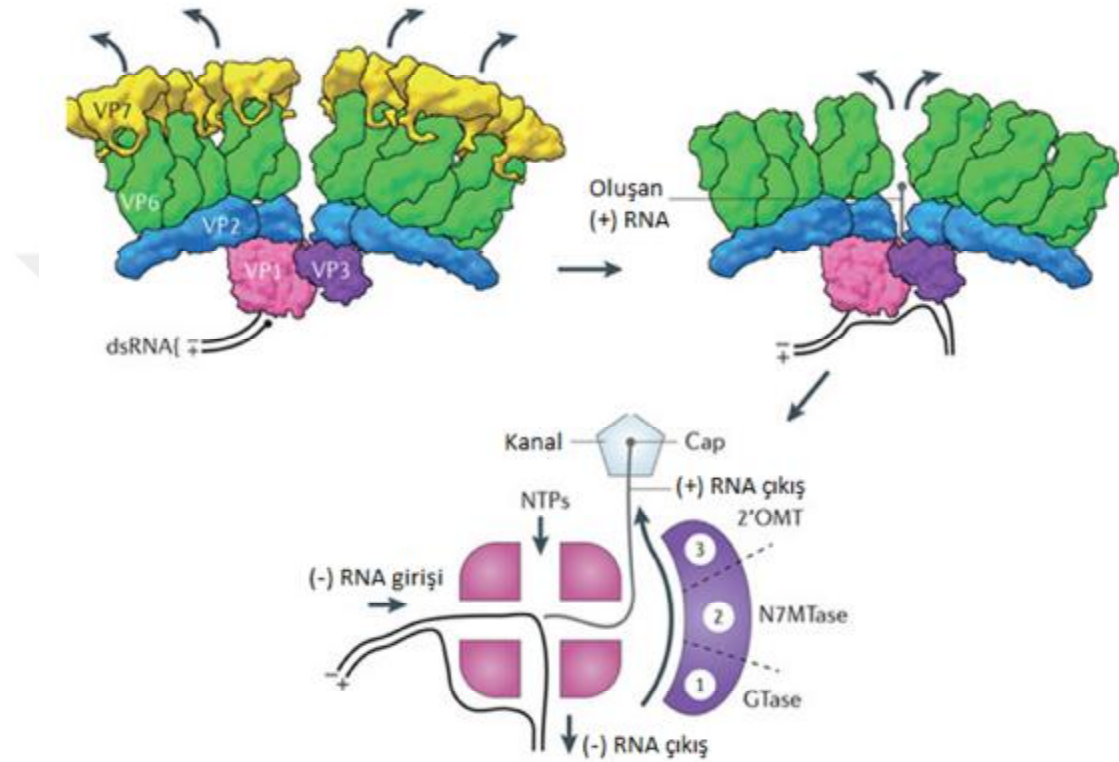
Tam enfektif RV partikülü (virion) 3 protein tabakası içerir ve triple-layered particle (TLP) olarak adlandırılır. Elektron mikroskopunda tekerleğe benzeyen TLP'ler, *genus* Rotavirus olarak isimlendirilmesine sebep olmuştur. Cryo-elektron mikroskobu ve görüntü yapılandırma verileri ile ikozahedral simetrisinin yapısı tanımlanmış durumdadır. Tek tabakalı partikül (single layered particle; SLP=kor kabuğu) 120 adet viral protein 2 (VP2)'den oluşur ve T=1 simetri biçiminde 60 dimer olarak düzenlenir. Yapısal olarak beş dimer, beş simetri ekseninin çevresinde bir dekamer oluşturur, kor protein tabakası 12 dekamerden oluşur ve beş simetrik eksen boyunca küçük porlar haricinde aynı yapıdadır ⁽¹⁹⁾. Başlangıçta beş simetrik eksen boyunca “Beş simetrik tekerlek merkezinde” korun içine doğru olan çıkıntıların VP2 N-terminal ucu ile oluştuğu düşünülmüştür, ancak sonrasında bu yapı VP1 proteini olarak tanımlanmıştır. VP1 ve VP3'ü içeren replikasyon enzim kompleksi beş simetri ekseninde korun içerisinde class 1 kanalları karşısında konumlanır ve VP1 aracılığıyla genomik dsRNA segmenti ile yoğun bir etkileşim içerisinde. Kor partikülleri VP2'den oluşan ve içerisinde 11 genomik dsRNA segmentini, RNA bağımlı RNA polimerazı (RdRp, VP1) ve cap enzimini (VP3) içermektedir. Korun içindeki bu bileşenlerin yapısı ayrıntılı olarak incelenmiştir ayrıca RNA, VP3 ve VP2 ile kompleks oluşturmuş olan RdRp'nin yapı-fonksiyon ilişkileri araştırılmıştır (Şekil 1) ^(20,21).



Şekil 1. Rotavirus virion yapısı

Genomik RNA segmentlerinin replikasyon kompleksi çevresinde konik silindir formunda bulunduğu düşünülmektedir, fakat kor içerisindeki dsRNA yapısının ayrıntıları tamamıyla belirlenememiştir. Benzer dsRNA segment yapısı bluetongue virusunun kor partiküllerinde de gözlenmiştir. Toplamda 11 adet RNA segmentinin 5' ve 3' terminal nükleotit (nt) sırasının çok küçük bir kısmı (5'-GGC.....ACC-3') tam anlamıyla korunmuştur. RNA segmentlerindeki (+ polariteli) kodlanmayan bölgeler (untranslated regions; UTR) 5' ucunda 9-48 nt, 3' ucunda ise 17-182 nt gibi oldukça küçük bölgelerdir. RNA segmentinin 5' ve 3' uçlarının bir kısmı tersine çevrilmiş komplementerlerdir ve "long range interactions" (LRI) içerisindedirler⁽²²⁾. Segmentin 3' ucunun fonksiyonu RdRp sinyallerini tanımak NSP3 ile etkileşime girmek ve ayrıca translasyonu aktive etmektir. RdRp yapısı 2.9 Å ayırımı ile belirlenmiştir⁽²³⁾. VP1 proteini, merkezdeki katalitik bölgeye giden 4 kanalı içeren kafes benzeri bir yapıdan oluşur. Sırasıyla bu kanalların işlevleri: (1.kanal) serbest nükleozit trifosfatların (NTPs) girişini, (2. kanal) kalıp ssRNA'nın girişini, (3. kanal) (+) ssRNA ürününün çıkışını ve (4. kanal) (-) ssRNA'nın (transkripsiyon) ve dsRNA'nın (replikasyon aşaması) çıkışını gerçekleştirmektedir. Kanal 3 VP2'nin içindeki class 1 kanalının karşısında

bulunmaktadır, sitoplazma içerisine (+) RNA'ların salınmasını sağlar; kanal 4 yeni replike olmuş dsRNA'ları iç kora doğru yönlendirir (Şekil 2) ^(20,24). Farklı VP1-poliribonükleotit komplekslerin analizleri ile RNA'nın 3' ucundaki 5'-UGUG-3' dizisinin özellikle ssRNA giriş kanalı tarafından tanındığı tespit edilmiştir. RV RdRp'sinin yapısı birçok yönüyle orthoreovirus enzimine benzemektedir ⁽²³⁾.



Şekil 2. Rotavirus VP1 ve VP3 yapısı

Viral kor 260 adet VP6 trimeri ile çevrelenmiştir ve bu kısım orta tabakayı yani çift tabakalı partikülleri (double-layered particles; DLPs) oluşturur. VP6'dan oluşan orta katman "kor" partiküllerini elde etmek amacıyla yüksek konsantrasyonlarda CaCl_2 'nin varlığında uzaklaştırılabilir. VP6 trimerleri iç kısımdaki kor tabakası (VP2) ve dış kısımdaki VP7, VP4 trimerleri ile etkileşim halindedir ⁽²⁵⁾.

DLP'ler 260 adet VP7 trimerinden oluşan tabaka ve 60 adet VP4 trimerinden oluşan spike (180 molekül) ile kaplıdır. Bu yapı üç tabakalı partikülleri (triple layered particles; TLP) oluşturur. TLP'lerden oluşan virionların VP7 ve VP4'ü içeren dış tabakaları hafif EDTA ile muamele edildiğinde ayrışır ve iki tabakalı partiküller (DLP'ler) elde edilir. Virion beş simetrik (12 adet class 1 kanal), üç simetrik (60 adet class 2 kanal) ve iki simetrik (60 adet class 3 kanal) eksen boyunca toplam 132 kanal

içermektedir. RV virionunun üç boyutlu yapısı yaklaşık 4.3 Å'da tek partikül tomografisi ve kriyo-elektron mikroskopisi (cryoEM) ile belirlenmiştir ⁽²⁰⁾. VP4 trimerinin VP6 (VP5'in tabanının yarısı içine gömülüdür) ve VP7 trimerleri ile yoğun bir etkileşim içerisinde. VP4'ün yapısı ve diğer yapısal RV proteinleri ile etkileşimi RV'nin giriş mekanizmasının tanımlanmasına olanak sağlamıştır. VP4 trimerlerinin tripsin varlığında olgunlaşan TLP'lerde cryo-EM ile gözlemlenebildiği daha önceden gösterilmiştir ⁽²⁷⁾. Tripsin varlığında ya da yokluğunda olgunlaşan RV'lerdeki VP4'ün stokiyometrisi benzer olduğu için tripsin yokluğunda üreyen RV'nin VP4 çıkıntılarının konformasyonel olarak bozulduğu sonucuna varılmıştır ^(26,27).

2.3. Sınıflandırma

Rotavirus cinsi yalnızca omurgalı hayvanlarda (kuşlar ve memeliler) enfeksiyona sebep olmaktadır. Rotaviruslar Reoviridae familyasındaki 15 cinsten biri olan Rotavirus genusunu oluştururlar. Reoviridae familyası Sedoreovirinae (Cardoreovirus, Mimoreovirus, Orbivirus, Phytoreovirus, Rotavirus, Seadornavirus cinsleri) ve Spinareovirinae (Aquareovirus, Coltivirus, Cypovirus, Dinovernavirus, Fijivirus, Idnoreovirus, Mycoreovirus, Orthoreovirus, Oryzavirus cinsleri) sub-familyası olarak gruplara ayrılmıştır ⁽²⁸⁾.

Rotavirusların ortak bir antijeni vardır, bu orta kapsid tabakasını oluşturan ve grup antijeni olarak adlandırılan VP6 proteindir. Rotavirus VP6 grup antijeni aracılığıyla Grup A rotavirus (RVA), Grup B rotavirus (RVB), Grup C rotavirus (RVC), Grup D rotavirus (RVD) ve Grup E rotavirus E (RVE), Grup F rotavirus (RVF), Grup G rotavirus (RVG) ve Grup H rotavirus(RVH) olmak üzere 8 grup tespit edilmiştir. Son zamanlarda köpeklerde yeni bir Grup I rotavirusu (RVI) tanımlanmıştır. Grup A rotavirus, RVB, RVC ve RVH, insanlarda ve hayvanlarda akut gastroenterit ile ilişkilidir. B grubu rotavirus insanlarda, sığırlarda, koyunlarda, domuzlarda, köpeklerde ve sığanlarda tespit edilmiştir. Grup C rotavirus domuzlar, insanlar, sığırlar, köpekler ve gelincikleri enfekte etmektedir. Grup H rotavirusu (J19, B219 ve ADRV-N suşları) insanlarda ilk olarak Çin'de ve Bangladeş'te tespit edilmiştir, daha sonra Japonya'da (SKA-1 suşu) ve Brezilya'da (BR60, BR63 ve BR59 suşları) domuzlarda tespit edilmiştir. D grubu rotavirus, RVE, RVF ve RVG sadece hayvanlarda saptanmıştır.

RVD, RVF ve RVG yalnızca kuşlarda enfeksiyona sebep olmaktadır. Grup E rotavirus sadece domuzlarda tespit edilmiştir ^(29, 30, 31, 32).

RVA için oluşturulan ikili sınıflandırma sistemi, VP7 ve VP4 protein genlerinin dizisine ve ayrıca her biri bağımsız olarak nötralizan antikor üretimini stimüle eden antijenik yapılarına göre oluşturulmuştur. Bu sebeple RVA suşları VP4 yani "P genotipleri" ("P" proteaz duyarlılığı ifade eder) ve VP7 yani "G genotipleri" ("G" glikoprotein anlamına gelir) olarak sınıflandırılır. G tipleri için serotip ve genotip sinonimleri G1, G2 şeklindedir. P tipleri için P serotiplerinden daha fazla P genotipleri mevcuttur. Bu sebeple P serotip ve genotipleri ikili isimlendirme ile gösterilir, örneğin P1A[8] P serotip 1A ve P genotip numarası parantez içerisinde 8 şeklinde tanımlanır. RVA suşunun en az 27 G (VP7'nin nt sekansına göre) tipi ve 37 P (VP4'ün nt sekansına göre) tipi bulunmaktadır. RVA için 2008 yılında tam genomun nükleotid analizine dayanan bir sınıflandırma sistemi önerilmiştir. Sistem 11 dsRNA segmentinin her birine spesifik bir genotip atfedilerek ve RVA suşlarının VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 genleri için Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx ("x" 1'den başlayarak numarayı temsil eder) kısaltmaları kullanılarak oluşturulmuştur. Kısaltmalardan G; glikozillenmiş, P; proteaz duyarlı, I; iç kapsid, R; RdRp, C; kor proteini, M; metiltransferaz, A; interferon antagonisti, N; NTPaz, T; translasyon aktivatörü, E; enterotoksin, P; fosfoprotein anlamına gelmektedir ^(17, 29, 33).

2.4. Rotavirus genomu

RVA genomu 6 adet yapısal, 6 adet yapısal olmayan protein kodlayan 11 dsRNA segmenti içerir ve yaklaşık olarak 18.500 bp büyüklüğündedir. Genler iki protein kodlayan 11. genom segmenti hariç monosistroniktir. Gen segmentlerinin uzunluğu 667 ile 3302 bp arasındadır. Gen-protein ve protein-fonksiyon ilişkileri birkaç RVA suşunda gösterilmiştir. Tanımlanmış olan 6 adet yapısal proteinin (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) yanında 5-6 adet yapısal olmayan protein (NSP1–NSP5/6) üretilir. RVC suşları NSP6'yı sentezleyemezler. Farklı RV suşlarında RNAların 3' ucu arasındaki farklılıkların hatalı gerçekleşen reassortment sebebiyle oluştuğu düşünülmektedir. İnfluenza virusların ve orbivirusların RNA segmentlerinin paketlenmesinde rol alan sinyallerin komşu ORF ve UTR dizilerinin bir kısmını içerdiği keşfedilmiştir ⁽³⁴⁾.

Rotavirus genleri intra genetik rekombinasyonun özel formları ile oluşturulan RNA segmentlerinin kısmi nt duplikasyonu ve delesyonu ile yeniden düzenlenebilir (reassortment). Rotavirusların 3 geninde reassortment yapılarak yaklaşık 1800 bp'lik ek RNA'yı yani genomunun yaklaşık %10'unu paketlediği, bu kısmın replikasyona uygun olduğu ayrıca fiziksel ve genetik olarak kararlı olduğu tespit edilmişti. Genomdaki reassortment yüksek MOI'deki (multiplicity of infection; MOI) hücre kültüründe RV'lerin seri pasajlanması ile deneysel olarak gösterilmiştir ⁽³⁵⁾.

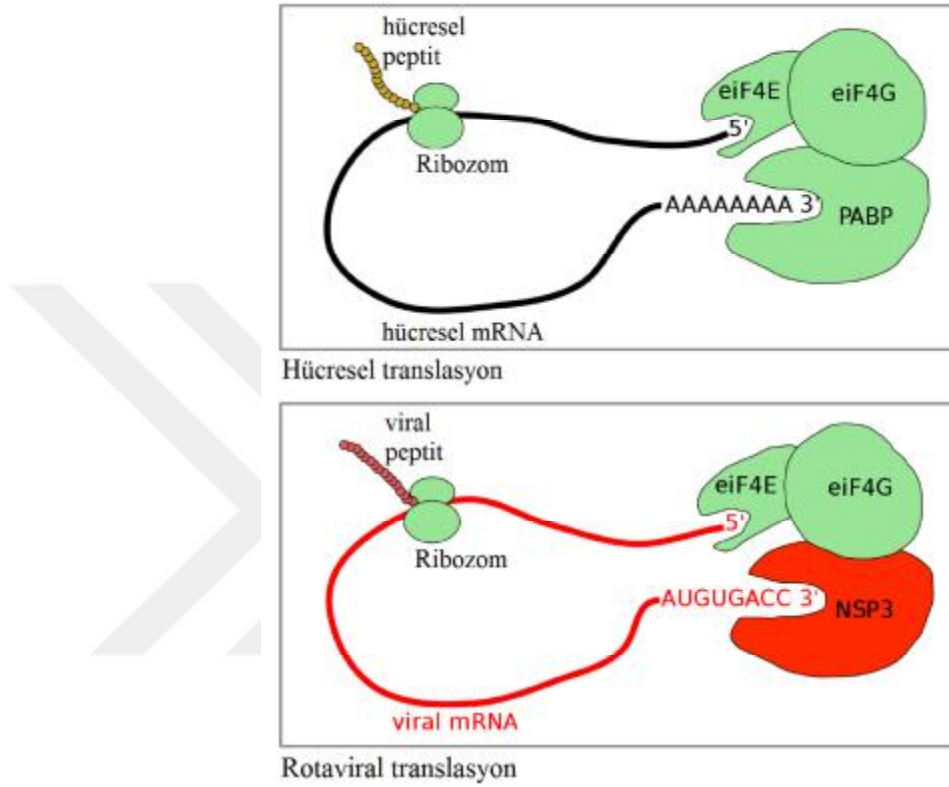
2.4.1. Rotavirusların yapısal olmayan proteinleri

2.4.1.1. NSP3

Rotavirus suşu olan SA11'de 7. segment tarafından kodlanan 36.4 kDa'luk bazik bir protein olan NSP3 rotaviral mRNA transkriptlerinin translasyonunu kolaylaştırır ve poli A bağlama proteininin (poly A binding protein; PABP) antagonisti olarak konağın protein sentezini inhihe eder ⁽³⁶⁾. Rotaviruslar genomları tarafından kodlanan viral proteinleri üretmek için konağın translasyon mekanizmasını kullanırlar. Konak hücrelerde sadece cap'lenmiş ve poliadenillenmiş mRNA etkili bir şekilde translate edilir. Bu süreç eIF4E tarafından 5' cap'in (m7GpppN) ve PABP tarafından poli-A kuyruğunun tanınmasını içerir. PABP hücrel faktör olan eIF4G'ye bağlanır, fiziksel olarak PABP ve eIF4E'yi bağlayan bir iskele işlevi gören bu protein hücre mRNA'sının sirküler yapı oluşturmasını kolaylaştırmak ve etkili bir translasyon başlatmak için önemlidir ⁽³⁷⁾.

Rotavirusların transkriptleri VP3 yapısal proteini tarafından endojen transkripsiyon sırasında cap'li olmasına rağmen poliadenilli değildirler ⁽³⁸⁾. Rotaviruslar 3' ucunda A grubu rotaviruslar için bir konsensus dizisi (5'-GUGACC-3') kullanarak mRNA'larındaki poli-A kuyruğu eksikliğini giderirler. Bu özelliğiyle PABP'nin fonksiyonel bir benzeri olarak işlev gören NSP3 ile bağlanır (Şekil 3). NSP3'ün N-terminal bölgesi (NSP3-N) 3' konsensüs sekansını bağlarken C-terminal bölgesi (NSP3-C) eIF4G ile etkileşime girer ve viral mRNA'nın cap bağlayıcı protein eIF4E aracılığıyla dairesel hale gelmesini sağlar. Viral enfeksiyon sırasında NSP3 eIF4G'ye, PABP'dan daha fazla afinite ile bağlanır. Bu PABP'nin eIF4G'den çıkarıldığı ve böylece viral transkriptlerin translasyonunu arttırdığı modeli desteklemektedir. Hücrel protein

sentezi hücresel mRNA'dan NSP3'ün PABP'ı çıkarması sonucu durabilir. NSP3 aktivitesinin yapısal temeli, konsensus 3' mRNA dizisi ile kompleks içinde olan NSP3-N'nin ve eIF4G üzerindeki bağlanma alanına karşılık gelen bir peptide bağlanan NSP3-C'nin kristalografik çalışmaları ile gösterilmiştir^(39,40).



Şekil 3. Rotavirus NSP3 proteininin hücresel translasyonu inhibe etmesi

NSP3-N, yapısal olarak benzer N-terminal fragmentlerden ve yapısal olarak farklı C-terminal fragmentlerden oluşan kapsamlı bir dimerik arayüze sahip kalp şeklinde bir asimetrik dimer oluşturur. Bu yapılar rotaviral 3' konsensus dizisinin spesifik olarak tanınması için uygun bir biçimde tasarlanmış oldukça basit bir tünel oluşturmak için iç içe geçmiş durumdadır. NSP3'ün C-terminal bölgesi genellikle α helikaldir ve eIF4G bağlanması için iki hidrofobik cebe sahip simetrik bir dimer oluşturur. Termal denatürasyon ve filtre bağlama çalışmaları apo-NSP3'ün muhtemelen yarı kararlı bir yapıda olduğunu, konsensus dizisine bağlandığında oldukça kararlı bir kompleks oluşturduğunu göstermektedir. Böyle sıkı bir etkileşim yalnızca rotavirus mRNA'sının translasyonunu başlatmakla kalmaz, aynı zamanda hücresel nükleazlar ile rotavirus mRNA'sının denatürasyonunu önler⁽³⁹⁾.

Bu gözlem replikasyon sırasında VP1 ile negatif polariteli iplik sentezini başlatmak için viral RNA'nın 3' ucunun nasıl serbest bırakıldığı ile ilgili bir soruyu beraberinde getirmektedir. Bununla ilgili olarak VP1'in mRNA'nın 3' ucundaki örtüşen bir diziye bağlandığı ve NSP3'ün ayrıldığı düşünülmektedir. Replikasyonun sadece viroplazmada gerçekleşmesi sebebiyle daha olası bir ihtimal ise translasyon ve replikasyon için ayrı transkript havuzlarının kullanılmış olmasıdır. NSP3'ün viral translasyondaki rolü için oluşturulan, viral mRNA ve eIF4G ile eşzamanlı etkileşimini içeren model yaygın olarak kabul edilmesine rağmen yöntem olarak uygun hücre hatlarında NSP3 ve eIF4G'nin selektif susturulmasını kullanan yeni çalışmalar bu modeli sorgulamıştır. Bu çalışmalar eIF4G ile NSP3 etkileşiminin viral translasyon için zorunlu olmadığını, ancak hücre protein sentezinin durdurulması için gerekli olduğunu, NSP3 ile 3' konsensus bölgesi arasındaki sıkı etkileşimin viral mRNA'yı dejenerasyondan koruduğu ve replikasyon havuzuna girmesini önlediği düşünülmektedir ⁽⁴¹⁾.

2.4.1.2. NSP2

NSP2'nin viroplazma oluşumunda ve genom replikasyonu/kapsidasyonundaki kritik rolleri eksiksiz bir biçimde belirlenmiştir. NSP2'nin viroplazmanın oluşumunda NSP5 ile olan etkileşimine ek olarak NSP2'nin virionun iç kapsid tabakasını oluşturan VP2 ve VP1 viral polimeraz gibi viroplazmadaki diğer yapısal proteinlerle doğrudan veya dolaylı olarak etkileşime girdiği görülmektedir ⁽⁴²⁾.

NSP2 çok fonksiyonlu bir enzimdir: diziden bağımsız ssRNA'ya bağlanması ve nükleik asit helikal yapısını kararsızlaştırması ile birlikte Mg^{2+} 'e bağlı nükleozid trifosfataz (NTPaz), RNA trifosfataz (RTPaz) ve nükleozid difosfat (NDP) kinaz aktiviteleri göstermektedir. X-ışını kristalografik ve cryo-EM çalışmaları bu aktivitelerin bazıları için yapısal bir temel ortaya koymuştur ⁽⁴³⁾. NSP2 nükleotid bağlanması ve g-fosfatın hidrolizi için derin bir yarık ile ayrılmış iki domaine sahiptir. Yarık içinde oldukça korunmuş H225, gözlemlenen enzimatik aktiviteler için katalitik bir rezidü olarak işlev görür. Hem kristal yapıda hem de çözelti halinde NSP2 35 Å ° genişliğinde bir merkezi delik ve yan kısımlarında ağırlıklı olarak temel rezidülerle kaplı dört oluklu simit şeklinde bir oktamerden oluşur. Cryo-EM çalışmaları ile

gösterildiği üzere hem NSP5 (rezidü 66-188) hem de RNA, NSP2 oktamerinin oluklarına bağlanır⁽⁴⁴⁾.

Bu yapısal gözlem ile uyumlu olarak deneyler NSP5'in NSP2'ye bağlanmak için ssRNA ile rekabet ettiğini göstermektedir. Bu gözlemler NSP5'in işlevlerinden birinin genom replikasyonu sırasında NSP2-RNA etkileşimini düzenlemek olduğunu ortaya koymaktadır. Yakın zamanda tübülünün NSP2 ile doğrudan etkileşime girdiği, böylece rotavirus enfeksiyonu sırasında viroplazma oluşumunun mikrotübül ağı bozduğu ve tübülün granüllerinin viroplazmayla birlikte lokalize olduğu in vitro ortamda gösterilmiştir. Cryo-EM çalışmaları tübülünün NSP5 ve RNA'da olduğu gibi oktamer üzerindeki aynı oluklara bağlandığını ve tübülünün, NSP5 ve RNA ile rekabet ettiğini göstermektedir⁽⁴⁵⁾.

Rotavirus enfeksiyonu sırasında mikrotübül depolimerizasyonunun rolü tam olarak anlaşılamasa da bunun hücrel fonksiyonları virusun lehine çeviren bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. NSP2'nin ssRNA'ya bağlanması ve helikal-destabilizasyon etkileri, muhtemelen dsRNA sentezine hazırlık sırasında mRNA kalıplarının ayrılması için gereklidir. Bununla birlikte NSP2'nin rotavirus replikasyonu sırasında gözlemlenen NTPaz, RTPaz ve NDP kinaz aktiviteleri için üstlendiği roller tam olarak açıklanamamıştır. Bu enzimatik aktivitelerin hepsi yüksek oranda korunmuş tek bir H225 rezidüsüne bağlıdır. Komplementasyon testleri bir H225A mutasyonunun genom replikasyon /capsidasyonunu ortadan kaldırdığını, ancak viroplazma oluşumunu etkilemediğini göstermiştir. Bu da replikasyon için bu enzimatik aktivitelerin önemli bir rolü olduğunu göstermektedir⁽⁴⁶⁾.

Başlangıçta NSP2'nin helikaz benzeri bir moleküler motor olarak işlev gördüğü ve genom replikasyon/encapsidasyonuna yardımcı olmak için NTP hidrolizinden türetilen enerjiden faydalandığı düşünülmüştür. Bununla birlikte NSP2'nin oktamerik olarak kendi kendine toplanması, herhangi bir tanımlanabilir helikaz motifinin yokluğu, nükleotid bağlama ve hidroliz sırasında belirgin konformasyonel değişikliğin olmaması, histidinin katalitik bir kalıntı olarak kullanılması ve NTP hidrolizi sırasında nispeten stabil bir fosfohistidin ara maddesinin oluşması gibi birkaç özelliği NSP2'yi tipik helikazlardan ayırmakta ve NTPaz aktivitesinin enerji transdüksiyonunda rol almadığını göstermektedir. Rotavirus genomunun olağandışı bir yönü negatif polariteli RNA'nın 5' ucunda bir g-fosfat bulunmamasıdır⁽³⁸⁾. RNA-trifosfatlar tarafından uyarılan retinoik

asit indüklenebilir gen I (retinoic acid inducible gene I; RIG-I) antiviral yolağına karşı bir savunma olarak terminal fosfatın çıkarılması gereklidir ve NSP2, RTPaz aktivitesini bu amaç için kullanabilir. NSP2'nin NTPaz aktivitesine dayanan NDP kinaz aktivitesinin rolü ise viroplazmadaki nükleotid havuzlarını, viral polimeraz tarafından genom transkripsiyonu ve replikasyonunu desteklemeye yeterli olacak şekilde düzenlemek olabilir ⁽⁴³⁾.

2.4.1.3. NSP5

NSP5'e atfedilen birçok özelliklere rağmen bu protein için net bir şekilde belirlenen tek rol viroplazma oluşumunda NSP2 ile bağlanmasıdır. NSP5 Ser ve Thr rezidüleri bakımında zengin O-bağı glikozilasyona uğramış dimerik bir fosfoproteindir ⁽⁴⁷⁾. NSP5'in enfeksiyon sırasında fosforile edildiği mekanizma (lar) bilinmemektedir. Otokinaz aktivitesi yoluyla kendi fosforilasyonunu sağladığı, kazein kinaz I ve II gibi hücrel kinazları bağladığı ve viroplazma oluşumunda rol aldığı düşünülmektedir ⁽⁴⁸⁾.

Viroplazma oluşumunda lipid damlacıkların komponentleri gereklidir, fakat viroplazma oluşumunda yer alan bu damlacıkların mekanizması ve proteinleri açıklanmamıştır. NSP2 ve NSP5'in tek başına eksprese edilerek viroplazma benzeri yapılar oluşturması kalsiyum tarafından düzenlenir ve NSP5'ni C-terminal helikal domaini tarafından yönlendirilir ⁽⁴⁹⁾. NSP2'ye ek olarak NSP5'in VP1, VP2 ve NSP6 gibi diğer rotavirus proteinleri ile ve aynı zamanda diziden bağımsız bir şekilde tek zincirli ve çift zincirli RNA'larla etkileşime girdiği gösterilmiştir ⁽⁵⁰⁾. Bu çalışmalar NSP5'in viroplazmanın dinamikleri, düzenlenmesi ve ayrıca viral genomun replikasyonu ve kapsidasyonu sırasında diğer rotavirus proteinleriyle NSP2'nin çeşitli fonksiyonel özelliklerinin entegrasyonu gibi birçok işlemde yer aldığını ortaya koymaktadır ⁽⁵¹⁾.

2.4.1.4. NSP4

NSP4 viral genomda bulunan 10. segment tarafından kodlanan, 175 amino asit içeren çok işlevli bir proteindir ve NSP4 fonksiyonlarının birçoğu protein içindeki farklı domainlerde gerçekleşmektedir. NSP4 ER (endoplazmik retikulum) transmembran glikoproteini olarak sentezlenir ve üç hidrofobik domain (H1-H3) içermektedir. H1

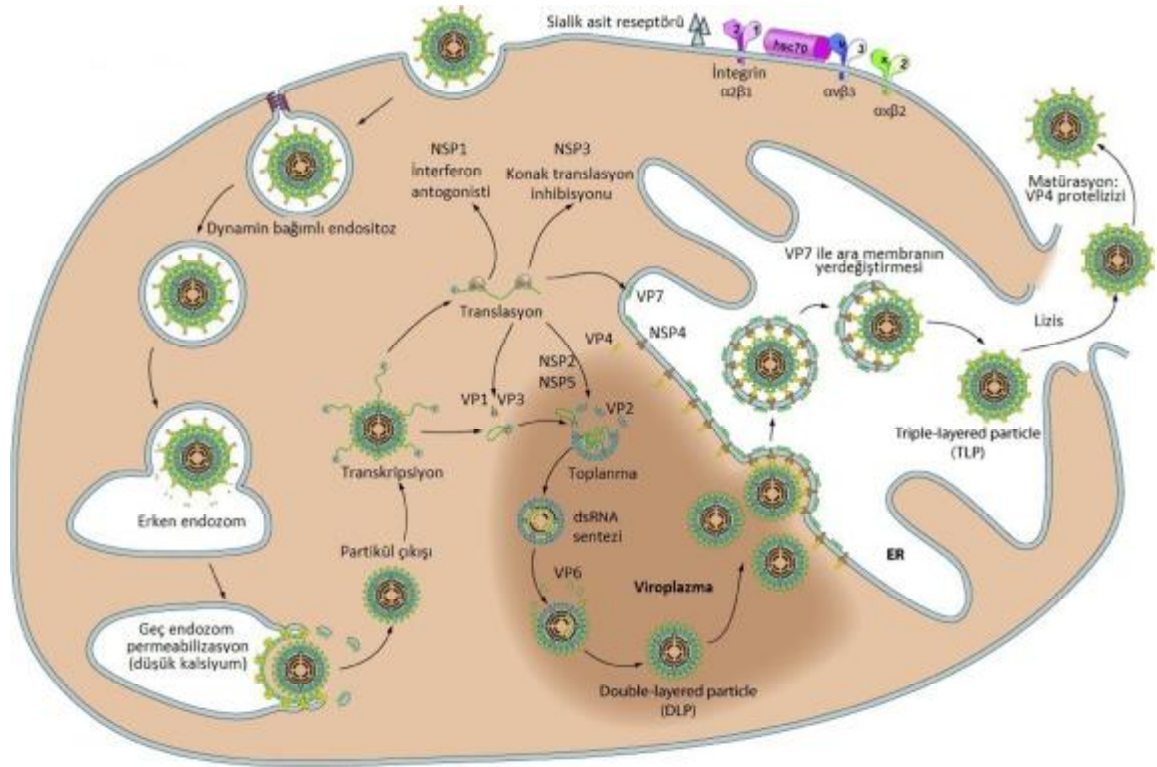
domaini ER'nin luminal tarafına yönlendirilmiş iki N-bağlı yüksek mannoz glikozilasyon bölgesine sahiptir ⁽⁵²⁾.

H2 transmembran domaini ER çift tabakası boyunca uzanır ve açılmamış sinyal dizisi olarak işlev görmektedir. Pozitif yüklü rezidülerden oluşan bir küme, amfipatik α -heliks tarafından oluşturulan bir viroporin domaini olan H3 ve bunu takiben sarılı bir bobin bölgesi ile esnek bir C-ucu içeren geniş sitoplazmik domainden oluşur. H3 domaini son derece amfipatiktir ve yakın zamanda ER depolarından kalsiyumun viroporin aracılığıyla salınımıyla hücresel kalsiyum homeostazını bozduğu gösterilmiştir ⁽⁵³⁾. Bir takım fonksiyonel işlevler ve integrin I domainleri, kaveolin ve VP4'ü içeren protein bağlama alanları NSP4'ün sitoplazmik sarılı bobin bölgesi ile bağdaştırılmıştır. İntegrin I domaini bağlama bölgesi bulunan sekrete edilen bir NSP4'ün hücresel plazma membran integrin I domainleri ve diğer reseptörler ile etkileşimi diareye sebep olmaktadır. Fosfolipaz C'ye bağlı olarak hücre içi kalsiyumda bir artış ve bunun ardından kalsiyum ile aktive klorür kanalı transmembran proteini 16A (Transmembrane protein 16A; TMEM16A) klorür salınması sinyalini verir ⁽⁵⁴⁾. Son olarak NSP4'ün C-ucu esnek bölgesi mikrotübülleri bağlar ve infeksiyöz partiküllerin bir araya gelmesini kolaylaştırmak adına DLP'ler için bir hücre içi reseptör görevi görür ⁽⁵⁵⁾.

NSP4'ün fonksiyonel alanlarının tam olarak tanımlanmadığı diğer aktiviteleri plazma membran bütünlüğünü bozması, epitel sodyum kanalları (epithelial sodium channels; ENaC) ve sodyum glikoz taşıyıcı 1 (sodium glucose transporter 1; SGLT1) ile sodyum absorpsiyonunun inhibisyonu ve hücresel mikrotübül ve aktin ağların yeniden şekillendirilmesidir ⁽⁵⁶⁾. NSP4'ün RNAi (RNA interference; RNAi) aracılığıyla işlevini yitirmesi NSP4'ün rotavirus replikasyonu, transkripsiyonu ve morfogenezi için önemli olduğunu göstermektedir ⁽⁵⁷⁾. Calnexin, laminin-3, fibronectin, kaveolin, integrin I domaini ve tubulin dahil NSP4'ün birçok viral ve hücresel proteinlerle değişik şekillerde etkileşime girme kabiliyeti, NSP4'ün enfeksiyonun farklı aşamalarında çeşitli hücresel kompartmanlara (ER, ER-Golgi ara bölmesi (ERGIC), viroplazmayı çevreleyen LC3-pozitif otofagozomlar, mikrotübüller, membran yığınları, plazma zarının dışa bakan yüzeyi ve ekstrasellüler matriks) lokalizasyonu ile ilişkilendirilir ^(57, 58).

2.5. Rotavirus replikasyon döngüsü

Rotavirus girişı sırasında virionun VP4-VP7'den oluşmuş olan dış kapsidinde bozulma meydana gelir ve çift tabakalı bir partikül (DLP) oluşur. DLP VP1 ve VP3 bileşenlerinin aktivitesi ile 11 cap'li, poliadenadenilasyona uğramamış, (+) polariteli RNA sentezler. Bu RNA'ların altı tane yapısal (VP1-VP4, VP6-VP7) ve altı tane yapısal olmayan protein (NSP1-NSP6) oluşturacak şekilde translasyonu gerçekleşir. VP1, VP2, VP3 kor proteinlerini ve orta kapsid tabakasının proteini olan VP6'yı içeren transkripsiyonel olarak aktif DLP'ler viroplazma olarak adlandırılan NSP2 ve NSP5 tarafından oluşturulan büyük sitoplazmik viral inklüzyon içerisine gömülürler. Viroplazma içindeki 11 pozitif polariteli viral RNA segmenti reassortment geçirir ve toplanan progen kor ile etkileşime girer. Korun VP1 bileşenleri daha sonra dsRNA oluşturmak için negatif polariteli zincir sentezine yönelir. Viral dsRNA'nın 11 segmentide eşit mol seviyelerinde üretilmesine rağmen (+) RNA kopyaları eşit değildir, bu reassortmen'ın tam ve RNA'ya spesifik olduğunu, dsRNA genomunun (+) RNA'ların komplementeri tamamlandıktan sonra sentezlendiğini ve progen kor içerisine paketlenildiğini gösterir. VP6'nın progen kor ile ilişkisi viroplazma ile ilişkisinden doğar ve bu şekilde DLP'ler oluşur daha sonra virus parçacıkları TLP'lere olgunlaştığı endoplazmik retikuluma göç ederler (Şekil 4) ⁽⁵¹⁾.



Şekil 4. Rotavirus replikasyon döngüsü

2.5.1. Virus partikülünün tutunması

RV'nin hücreye tutunması ve girişi, hücresel glikanları ve bağlanma sonrasındaki adımlarda birkaç ko-reseptörü içeren çok basamaklı bir süreçtir. Virus yüzeyinde bağlanma VP4'ün alt ünitesi olan VP8 aracılığıyla olur: VP8'in yüzeyinde bulunan yüzeysel bir oluk hücresel glikanlar üzerindeki sialik asit'ler (SA) ile etkileşime girer. Reseptör terminal veya sub-terminal konumlanmış SA'lar içerir. Rhesus RV VP4'ü için SA bağlanma bölgesi yapısal olarak tanımlanmıştır. Nörominidaz (NA) ile hücrelerin muamele edilmesi belli RV suşları için (SA11) enfeksiyonu ortadan kaldırır. Bu sebeple SA-duyarlı suşlar olarak adlandırılmıştır. Bazı hayvan RV suşlarının bağlanması için SA gerekirken diğer hayvan RV'leri ile çoğu insan RV suşları SA'ya dirençlidir. Nörominidaz ile işlem görmüş hücreleri enfekte edebilen diğer suşlar (Wa ve DS-1) başlangıçta 'SA-dirençli' olarak isimlendirilmiş, ancak sonrasında gangliosit GM1'i gibi nörominidaz işlemine duyarlı glikolipidlerin, internal pozisyonundaki SA içeren reseptörlere bağlandığı gösterilmiştir^(52, 53, 54).

Buna ek olarak son zamanlarda birçok insan RV suşunun insan doku-kan grup antijenini bağladığı tespit edilmiştir. Bazıları H tipine bağlanma özgülüne sahipken diğerlerinin A tipi glikanları bağladığı gösterilmiştir. Ayrıca G10P[11] gibi RV

suşlarının SA içermeyen histo-blood grup antijenlerine (histo-blood group antigens; HBGA) Gal β 1-4GlcNAc motifi aracılığıyla bağlandığı ve P[8] genotipinin HBGA reseptörü ile etkileşiminin işlevsel bir FUT2 enzimine bağlı olduğu gösterilmiştir. Virusun hücre yüzeyi ile ilk etkileşimi VP4'ün VP8 domaini aracılığıyla gerçekleşirken VP5 ve yüzey glikoproteini VP7 ko-reseptörler ile etkileşime girer. Çeşitli hücrel yüzey molekülleri ko-reseptör olarak davranabilir, örneğin birkaç integral (α 2 β 1, α v β 3, α x β 2, α 4 β 1) VP5 ve VP7 üzerindeki integral ligand motifleri ile (VP5 üzerinde DGE motifi, VP7 üzerinde GRP ve CNP motifleri) veya insan ısı şok benzeri protein 70 (Hsc70) ile etkileşime girer. Simian RV suşu RRV'nin (rhesus rotavirus) özel durumunda bu etkileşimlerin bir kısmını sırayla gerçekleştirdiği gösterilmiştir ^(52, 55, 56).

Tüm RV suşlarında integrinler bağlanma için gerekmezken test edilen suşların tümünde etkin bir hücre enfeksiyonu için hsc70'in gerekli olduğu görülmüştür. Tüm ko-reseptörler lipid yığınları ile ilişkilidir, yani hücre plazma membranı RV TLP'leri ile etkileşimde bir platform görevindedir. MA104 (epitelyal maymun böbrek) hücrelerindeki deterjana dirençli membran alanlarında Gangliosid GM1, integrin altbirimleri α 2, β 3 ve hsc70 konumlanmıştır ve bu alanların bütünlüğü RRV'nin hücre içerisine girişi için temel unsurdur. Buna ek olarak son zamanlarda sıkı bağlanma (tight-junction) proteinleri olan JAM-A, okkludin ve ZO-1'in bazı RV suşlarının hücre girişi için önemli olduğu bulunmuştur. Ayrıca gangliosidlerin virus girişi sırasında bağlanma sonrasındaki bir adımda rol oynadığı bildirilmiştir. Tanımlanan tüm moleküllerin uyum halinde çalışıp çalışmadıklarını veya alternatif giriş yollarını temsil edip etmediklerini belirlemek oldukça önemlidir. Proteazlar, antikorlar, peptidler, şeker analogları, rekabet eden proteinler veya small interferans RNA'lar (siRNA'lar) kullanılarak RV'nin bildirilen reseptör ve ko-reseptörlerle etkileşiminin engellenmesiyle bulaşıcılığın 1 log'un altında bir azalma gösterdiği bildirilmiştir ^(52, 57).

2.5.2 Virus partikülünün penetrasyonu ve kapsidin soyulması

Tripsin ile işlenmeden önce VP4 çıkıntıları (spike) esnektir ve bu yüzden EM ile görülmez, buna karşın son zamanlarda tek parçacıklı cryo-ET ile yapı gerçekçi bir şekilde belirlenebilmektedir. Hücrel reseptörler ile etkileşime giren RV TLP'lerin VP4 çıkıntıları konformasyonel değişime uğrar ve bir şekilde normalde VP8'in altında saklı olan VP5'in lipofilik domaini yüzeyde “penetrasyon sonrası şemsiye”

konformasyonuna dönüşür. Tripsin ile muamele edilen RV partiküllerinin bu şekilde değişime uğradığı ve enfektif TLP'leri oluşturduğu bilinmektedir. Kısmen tripsin-dirençli RV mutantların hücre içine girişinde bir gecikme olduğu, ancak sonrasında yine vahşi-tip (wild type; wt) virusta olduğu gibi replikasyonu gerçekleştirdiği gösterilmiştir (19, 21).

2.5.3. Endositoz

RV'lerin başlangıçta plazma membranında doğrudan penetrasyon ile hücre içerisine girdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte son bulgular virusun hücrelere endositoz ile girdiğini ve farklı RV suşlarının farklı endositik yollar kullandığını göstermiştir. İnsan (Wa, DS-1, WI69) ve hayvan (UK, YM, SA11-4S, nar3) suşları dahil olmak üzere test edilen RV'lerin çoğu klattrin aracılı endositoz ile hücrelere girerler. Buna karşılık simian RRV suşu klattrin ve kaveolin bağımsız, ancak hücre yüzeyinde dynamin 2, küçük GTPaz RhoA ve Cdc42, aktinin-4 ve kolesterol varlığına bağlı bir endositik yol izler (Şekil 5a). Madin-Darby canin böbrek hücrelerinde çelişkili sonuçlar bildirilmiş olsa da kolesterol ve dynamin, klattrin bağımlı endositoz ile MA104 hücrelerine giriş yapan RV'ler içinde gereklidir. İlginç bir şekilde hücre yüzeyine bağlanmak için RV'ler tarafından kullanılan glikan, kullanılan endositik yolu belirlemez, çünkü hem kan grubu antijenleri ile etkileşime giren RV'ler, hem de NA'ya dirençli ve duyarlı suşlar klattrin aracılı endositoz yoluyla hücre içine girebilir. Son bulgular "spike" proteini olan VP4'ün kullanılan endositik yolu belirlediğini göstermektedir. Bu bağlamda VP8'deki tek bir amino asitin yer değiştirmesi (K187R) ile RRV'nin hücre içine girişini klattrin bağımlı yoldan klattrin bağımsız yolla veya tam tersi şekilde değiştirmesi oldukça önemlidir. Ayrıca bu mutasyonu taşıyan ve nar3 olarak adlandırılan farklı RRV suşları NA'ya duyarlı bir fenotipten NA'ya dirençli bir fenotipe geçmektedir ve VP5 ile integrin $\alpha 2\beta 1$ arasındaki etkileşim aracılığıyla hücre yüzeyine tutunurlar (57, 58, 59).

2.5.4. İntraselüler veziküler trafik

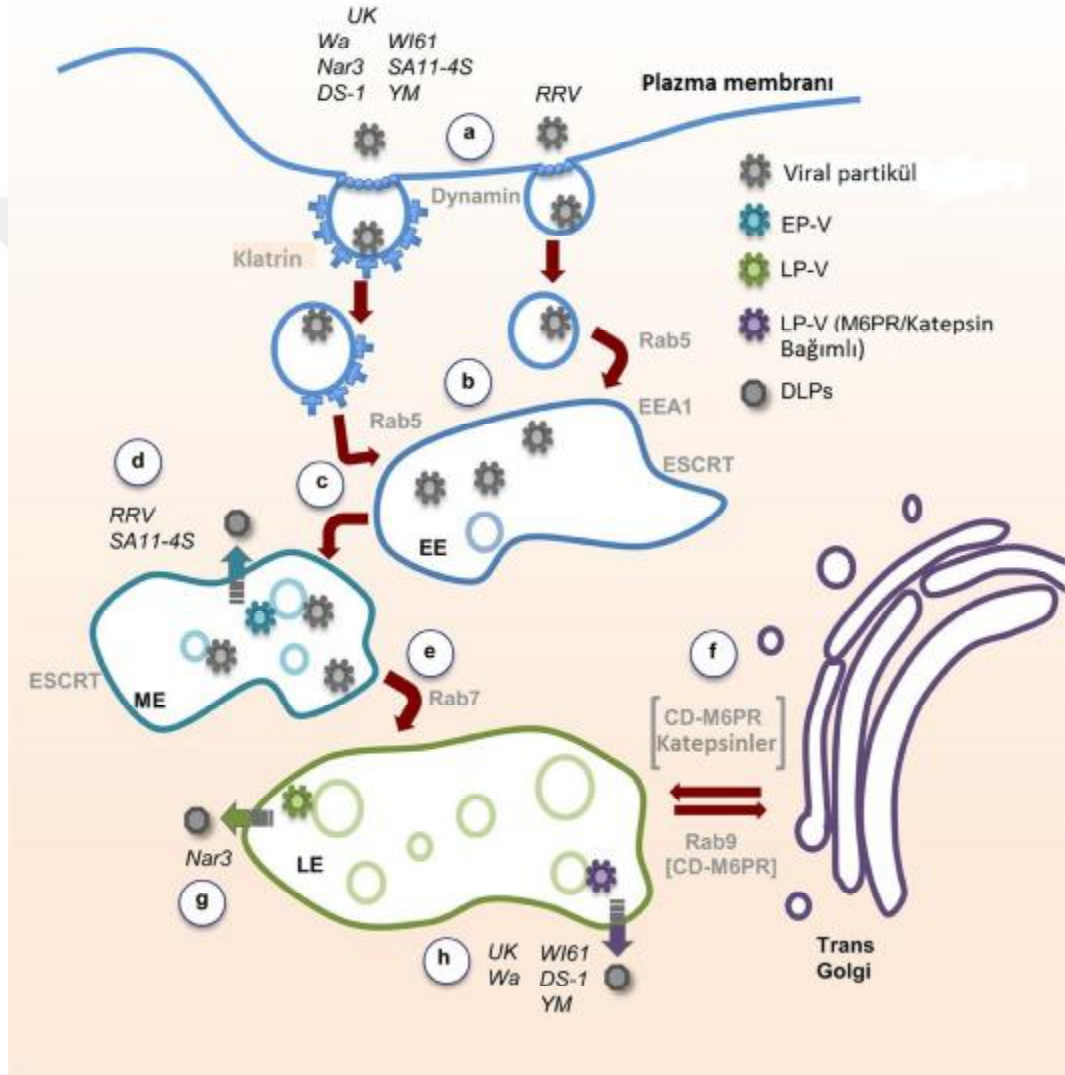
Hücreye giriş için kullanılan hücre yüzey reseptörün ve endositik yolun niteliğine bakılmaksızın tüm RV suşlarının hücre girişinde EE (early endosomes; EE) (erken endozom) basamağı ortaktır ve dolayısıyla enfektiviteleri Rab5 ve EEA1'in (endosomal antigen 1; EEA1) (erken endozomal antijen 1) aktivitesine bağlıdır (Şekil

5b). Ayrıca MA104'te ve kolon karsinoması insan Caco-2 hücrelerinde test edilen tüm RV'lerde dört ESCRT (endosomal sorting complex required for transport; ESCRT) kompleksinin her bir bileşeninin ekspresyonunun susturulması ile virus enfektivitesinin azalması işlevsel bir ESCRT sisteminin varlığının gerekliliğini ortaya koymaktadır. ILV'lerin (intralüminal vesiküller) füzyonunda görev alan ESCRT ile ilişkili ATPaz olan VPS4A'nın siRNA'lar tarafından engellenmesi ayrıca hücrelerin, ILV membranlarında bulunan ve ILV oluşumu için önemli olan fosfolipid lizobisofosfatidik asidi (LBPA) bloke eden bir antikör ile inkübasyonu, viral enfektiviteyi inhibe etmekte bu da ILV'lerin virus girişi sırasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir ^(58, 59).

ESCRT mekanizmasının RV'nin hücre girişine nasıl katkı sağladığı ve ILV'lerin oluşumunun neden gerekli olduğu cevaplanması gereken önemli bir sorudur. Bunun için iki olası senaryo bulunmaktadır. Birincisi ILV'ler RV ko-reseptörü bakımından zengin ve kümelenmiş bir alan olabilir ve bu kümelenme EE membranının dejenerasyonunu uyarmak amacıyla VP4'ün konformasyonel değişimini başlatmak için gerekli olabilir. İkinci senaryo ise ESCRT mekanizması ve ILV'lerin oluşumunun gerekliliği, bir sinyal yolağını inhibe etme veya aktive etme ihtiyacından kaynaklanabilir. Birçok hücrel sinyal olayında ligandla aktive edilmiş reseptörler endositoz ile içeri alınır. Fakat reseptörler yine de erken sinyal endozomlarında sinyal verebilirler. Bu durumda endozomlardaki reseptör kompleksinin ILV'ler tarafından tutulmasıyla sinyal iletimi sona erer. Buna karşılık canonical WNT sinyal yolağında ILV'ler içindeki sitozolde bir enzimin tutulmasının sinyal yolunu aktive ettiği bildirilmiştir. Bu sebeple etkili bir virus replikasyonu için gerekli olan bir sinyal yolağını düzenlemek amacıyla RV girişi için ILV oluşumu gereklidir. RV suşları ME'lere (maturing endosomes; ME) (olgun endozom) eriştikten sonra sitoplazmaya girmek için farklı yolları izler (Şekil 5c) ⁽⁶⁰⁾.

RV suşları RRV ve SA11-4S ise muhtemelen ME'lerden çıkmaktadır, çünkü infektivitelerinin Rab7'ye (GTPaz) bağlı olmadığı bilinmektedir (Şekil 5d). Diğer taraftan nar3 de dahil olmak üzere test edilen diğer tüm RV suşlarının enfektivitesi bu GTPazın ekspresyonuna bağlıdır, bu da virusların LE'ye (late endosomes; LE) ulaşmak için hücre içerisinde yolculuğa devam ettiğini düşündürmektedir. Bu endozomal bölme Rab7'ye bağımlı suşların sitozole girmesi için optimal bir ortam sağlar. Bu sebeple RRV ve SA11-4S simian RV suşlarının erken penetrasyon (E-P) virusları olduğu düşünülürken Rab7 bağımlı RV'ler geç penetrasyon (L-P) virusları gibi hareket

etmektedir (Şekil 5e). Yukarıda belirtildiği gibi endositik yolun belirlenmesinde VP4'ün rolü oldukça önemlidir. RRV (E-P), UK ve nar3 (L-P)'ün endositik trafiği VP4 spike proteini tarafından belirlenir ve nar3'ün VP4 proteininin RRV'ninkinden tek amino asit ile farklı olması sadece kullanılan endositoz yolunu değil aynı zamanda bir L-P virusu olarak davranmasına sebep olur (Şekil 5g) ^(59, 60).



Şekil 5. Veziküler trafik

2.5.5. Katepsinlerin gerekliliği

Yeni sentezlenmiş lizozomal asit hidrolazlar manoz-6-fosfat reseptörleri (mannose-6-phosphate receptors; M6PRs) ile trans-Golgi ağından endozomlara gönderilir ve M6PR'lerin Golgi ağına geri dönüşü small GTPaz Rab9'a bağlıdır (Şekil

5f). Trans-Golgi ağından endozom/lizozom'lara taşınan hidrolozlar arasında sistein katepsinler bulunur. LE'lere ulaşan RV suşların hücreyi enfekte edilmesi fonksiyonel bir Rab9a GTPaz'ın varlığına bağlıdır ve nar3 haricinde suşların hepsi katyon bağımlı M6PR'nin (CD-M6PR) aktivitesine gereksinim duyar (Şekil 5h). Bu viruslar sırasıyla sistein katepsin B, L ve S'nin aktivitesine de ihtiyaç duyarlar. Endozomal sistein katepsinler reovirus, Ebola virusu, ciddi akut respiratuvar sendrom (Severe acute respiratory syndrome; SARS) coronavirusu ve Nipah virusu gibi diğer virusların kapsid veya yüzey proteinlerinin işlenmesi için de gereklidir. Ayrıca bu ayrılma virusların bulaşıcı olması için zorunludur. Diğer virus sistemlerinde katepsin proteazların rolü üzerine yapılan çalışmalara dayanarak bu endozomal proteazların transkripsiyonel olarak aktif DLP'lerin sitoplazmaya çıkışını kolaylaştırmak amacıyla bir veya iki RV yüzey proteinine etki ettiği söylenebilir ^(59, 61).

2.5.6. Endozomal sistemden çıkış

Veziküler trafik esnasında viruslar luminal pH'da düşüş, kalsiyum konsantrasyonunda azalma, membran bileşenlerinin değişimi, ekstra ILV'lerin ve lizozomal bileşenlerin oluşması gibi endozomal çevrede gerçekleşen değişikliklere maruz kalırlar ve bu viral genomun veya nükleokapsidin sitoplazmaya iletilmesini sağlamak amacıyla viral partikülde konformasyonel değişikliklere sebep olur. RV'lerin endozomal sistemden çıkış mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir, ancak sözü edilen faktörlerin birkaçının bu süreçte yer aldığı söylenebilir. NH₄Cl ve diğer zayıf bazlarla endozomal asidifikasyonun engellenmesinin RRV enfeksiyonunu inhibe etmediği, ancak RV UK, Wa ve TFR-41'in enfektivitesini azalttığı bildirilmiştir ⁽⁵⁷⁾.

Bu bulgular RRV'nin aksine L-P RV'lerin hücreye girmek için düşük pH'lı LE'lere ihtiyaç duyduğunu düşündürmektedir. VP4'ün VP5 domaininin yapısal kriyo-elektron mikroskobu ve kristalografi verilerine dayanarak endozomal sistemden çıkmak için VP4 proteininin bilinmeyen bir faktör tarafından tetiklenerek başlangıçta konformasyonel bir değişikliğe uğradığı ileri sürülmüştür. Kalsiyumdaki azalma VP4'ün, VP5 alt birimine ait hidrofobik bir domainin, endozomal zar ile etkileşime girmesini sağlayan katlanır konformasyona yeniden düzenlenmesine sebep olduğu düşünülür ve bu şekilde endozomdaki düzgün VP7 yüzey tabakası serbest kalmaktadır. Bunu takiben virus genomunun transkripsiyona başlaması için DLP'ler sitozole girmektedir. Bu sebeple

farklı RV suşlarının veziküler sistemden sitoplazmaya çıkışı VP4'ün konformasyonel değişimi için gerekli spesifik luminal koşulların sağlaması ile gerçekleşmektedir ⁽⁶²⁾.

2.6. Pozitif polariteli mRNA sentezi

RV partikülleri viral RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) olan VP1'i ve viral capping enzimi VP3'ü (fosfodiesteraz, guanililtransferaz ve metilaz aktivitelerine sahip) içeren kendi transkripsiyon komplekslerine (transcription complexes; TC'ler) sahiptir. TC'ler beş simetri eksenlerinde VP2 (kor) tabakasının iç yüzeyinde yani 11 veya 12 köşede lokalizedir. Her bir TC kendine özgü viral RNA segmentiyle kompleks halindedir. Sitoplazmada bulunan rotavirus DLP'leri class I kanalları aracılığıyla üretilen cap'li, poliadenillenmemiş, (+) ssRNA transkriptleri (genomik RNA'nın negatif ipliğinden) ortama salarlar. Transkriptler ya virusun kodladığı proteinlerin translasyonuna (replikasyon döngüsünün erken döneminde) veya RV progeninin dsRNA genomlarını oluşturmak için replikasyonda kalıp (replikasyon döngüsünün geç döneminde) olarak hizmet ederler. Reoviridae ailesinin partikülleri maksimum 12 farklı genomik segmentin (örneğin Coltivirus cinsinde) mRNA'larını üretebilir. Rotavirus (11 genomik RNA segmentli) ve Orthoreovirus (10 genomik RNA segmentli) cinsi için 1-2 “ekstra” TC'lerin RNA içerip içermediği veya “boş” olup olmadığı bilinmemektedir. RV DLP'leri öncüller ve yeterli miktarda enerji kaynağı (ATP) tedarik edildiğinde büyük miktarda (mg aralığında) mRNA ürettikleri hücresel sitoplazmada ve in vitro ortamda “transkripsiyonel olarak” aktiftirler. Enfeksiyonun geç döneminde (>4 saat) mRNA üretiminde logaritmik bir artış olması yeni sentezlenen DLP'lerin transkripsiyon için aktif hale geldiğini göstermektedir (ikincil transkripsiyon). DLP'lerden çıkarılan rotavirus segmentine özgü mRNA'lar daha sonra sitoplazmada proteinlere dönüştürülür (23, 63, 64).

2.6.1. RV replikasyon ve transkripsiyonunun düzenlenmesi

2.6.1.1. Polimeraz aktivitesi

RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesi olan VP1 ile viral iç kapsid proteinlerinin varlığı arasında bir bağ olduğunu kanıtlamıştır. Bazı çalışmalar rotavirus replikasyonu ve transkriptaz aktivitesinin yalnızca VP1, VP2 veya VP1, VP2 ve VP6

içeren izole edilmiş subviral partiküllerde saptanabildiği göstermiştir. Ayrıca sıcaklığa duyarlı rotavirus mutantları tsF ve tsG'nin analizi replikaz aktivitesi olan subviral partiküllerin oluşumu için VP2'nin (VP6 gerekli değil) gerekli olduğunu, transkriptaz aktivitesi olan partiküllerin oluşumunun ise hem VP2'ye hem de VP6'ya bağlı olduğunu göstermektedir. Son zamanlarda rekombinant kor proteinleri ile yapılan in vitro çalışmalar VP2 olmadığında VP1'in replikaz aktivitesinden yoksun olduğunu ortaya koymuştur. Bu tür deneyler gerçekten de optimum replikaz aktivitesi için VP1 ve VP2'nin 1:10'luk molar konsantrasyonda bulunması gerektiğini göstermiştir. DLP'lerden VP6 tabakası çıkarıldığında kor yapısal olarak bozulmamasına rağmen transkriptaz aktivitesini yitirir. Bu tür kor yapısı VP6 ile yeniden oluşturulduğunda transkriptaz aktivitesi geri kazanılır; bu da VP6 ve DLP'nin bütünlüğünün VP1'in bir transkriptaz olarak işlev görmesinde kritik bir role sahip olduğunu göstermektedir. VP6'ya olan bu ihtiyaç nükleotidlerin ve başlangıçtaki transkriptlerin korun içine ve dışına taşınmasına yardımcı olan kanalların oluşumuna ve işlevine katkısından kaynaklandığı düşünülmektedir ^(65, 66).

2.6.1.2. VP1 yapısı ve işlevi

Kısa viral RNA'lar ile kompleks halindeki VP1 için atomik yapıları bildiren çalışmalar VP2'nin rotavirus polimeraz aktivitesini etkilediği mekanizmayla ilgili önemli bilgiler sağlamıştır. Bu analizler VP1'in geniş N-terminal ve C-terminal domainleri arasında sıkışmış merkezi bir polimeraz domainini içeren kapalı kafes benzeri bir yapıya sahip olduğunu ortaya koymuştur. Polimeraz domaini parmaklar, avuç içi ve başparmak subdomainleri ve A-F kanonik polimeraz motifleri içeren klasik "sağ el" polimeraz mimarisine sahiptir. Bu dört kanal, polimerazın katalitik merkezine doğru yönlenmektedir; biri RNA giriş kanalı diğeri nükleotid/pirofosfat (NTP/PPi) değişim kanalı ve diğer ikisi RNA çıkış kanalları olarak işlev görmektedir. Replikasyon sırasında yalnızca bir RNA çıkış kanalının çalıştığı düşünülmektedir. Bu kanal C terminal domaini boyunca uzanır ve korun iç kısmına yeni sentezlenmiş dsRNA'nın salınımı için bir yol oluşturur. Transkripsiyon sırasında polimerazın iki RNA çıkış kanalının da işlev gördüğü düşünülmektedir. Biri negatif polariteli kalıp RNA'nın polimerazdan salınımı için kullanılır ve replikasyon sırasında dsRNA ürününün salınması için kullanılan kanalla aynıdır (dsRNA/(-)RNA çıkış kanalı). Diğer yeni

üretileen (+) RNA'ların salınması için kullanılır ve ortaya çıkan transkriptleri korun dışına yönlendiren bir oluğu temsil eder. VP1'in RNA cap bağlama bölgesini temsil eden kalıp giriş tüneline yakın sığ bir oluğu bulunmaktadır. Bu alan replikasyon sırasında cap'li (+) RNA kalıpların tanınmasına yardımcı olabilir veya çoklu transkripsiyon sırasında viral genom segmentlerinin (+) RNA'sının cap'li 5'-ucu için bağlantı noktası oluşturabilir⁽⁶⁷⁾.

2.6.1.3. Replikasyonun düzenlenmesi

Rotavirus VP1, VP2 mevcut değilken NTP'ler ve viral (+) RNA'lar ile inkübe edildiğinde bile polimeraz aktivitesinden yoksundur. Bununla birlikte VP1 tek başına spesifik olarak VP1'in RNA girişı oluğunu kaplayan rezidüler ile RNA'nın korunmuş olan 3'-terminal UGUGACC bölgesi arasında oluşan hidrojen bağları aracılığıyla (+) RNA'ları bağlar. Polimeraz, UGUG rezidülerinin bazıları ve ACC rezidülerinin riboz-fosfat omurgası ile hidrojen bağı oluşturur. UGUG etkileşimi polimerazın viral (+) RNA'ları spesifik olarak tanımasına olanak sağlar. Bununla birlikte VP1 ve bir UGUGACC poliribonükleotidi tarafından oluşturulan komplekslerin analizi RNA'nın 3' ucunun, nükleotit'lerin alındığı yere ve dolayısıyla polimerazın katalitik bağlanma (P) alanına zıt olmayan bir pozisyonda, VP1'i stabilize ettiğini ortaya çıkarmıştır⁽⁶⁷⁾.

VP2'nin varlığının, polimeraz içindeki P alanıyla ilişkili (+) RNA'nın 3' ucunu bir birim atlatacak şekilde yeniden konumlandıran konformasyonel değişikliklere sebep olduğu düşünülmektedir. Bu şekildeki yeniden konumlandırma dsRNA sentezinin, kalıp zincirin ilk rezidüsünden başlayacağını garanti altına alır. Rotavirus VP1, primer RNA veya nükleotidillenmiş bir proteinden bağımsız bir yolla dsRNA sentezini başlatabilir. Yapısal olarak benzer reovirus RdRP ($\lambda 3$) ile ilgili daha önceki çalışmalara dayanarak VP1 tarafından dsRNA sentezinin başlatılması, bir primer halkası olarak adlandırılan özel esnek bir elemanın etkinliği tarafından desteklenmektedir. Bu halka (10 aa) parmakların ve avuç içi subdomainlerinin birleşme yerinde konumlanmıştır ve kabaca polimerizasyon kafesinin tabanından P bölgesine doğru bir yönde uzanır. $\lambda 3$ için gösterildiği gibi primer halkası, büzülmüş ve genişletilmiş formlar dahil olmak üzere çok çeşitli konformasyonlarda bulunabilir. Genişletilmiş formda primer halkası nükleotidi P bölgesine sabitlemektedir. Büzülmüş formda halka böyle bir işlevi desteklemek için P alanından çok uzakta kalır ve polimeraz katalitik olarak pasiftir.

UGUGACC oligoribonükleotid ve NTP'ler ile ıslatılmış VP1 kristallerinin analizi hem P hem de N alanlarının boş olduğunu ortaya koymuştur^(67, 68).

Bu gibi VP1-UGUGACC kompleksleri VP1 polimeraz aktivitesinin eksikliğini açıklayan büzülmüş bir primer halkası ile karakterizedir. Polimerazın VP2 varlığında katalitik olarak aktif hale geldiği göz önüne alındığında, kor kapsid proteininin P bölgesindeki bir bağlayıcı GTP'yi uyarması ile primer halkasının uzamasını tetiklediği ve böylece başka bir GTP'nin N alanını doldurmasına ve nihayetinde dsRNA ürününün ilk fosfodiester bağının oluşmasına izin verdiği tamini edilmektedir. Ardından primer halka büzülerek uzayan dsRNA ürünün polimerazdan çıkmasını sağlar. DLP'lerin yapısal analizine dayanarak Estrozi ve arkadaşları VP2 dekameriyle etkileşim halinde olan VP1 yüzey alanının büzülen primer halkasına veya yakınına yerleşmiş rezidüler içerdiğini tespit ettiler. Bu sebeple VP1-VP2 bağlantısı primer halkayı konformasyonel olarak genişletilmiş bir forma dönüştüren elektrostatik değişikliklere sebep olabilir. Hücresiz replikasyon deneylerine dayanarak VP1 polimeraz aktivitesinin VP2 aracılığıyla aktivasyonu yalnızca aynı rotavirus suşlarının VP1 ve VP2'si kombine edildiğinde mümkün olan spesifik bir işlemdir. Örneğin C grubu rotavirusların VP2 proteinleri A grubu rotavirusların VP1 polimerazını aktive edemez bu da A grubu ve C grubu rotavirusların başarılı bir şekilde reassortment oluşturamadığını açıklar. Mutasyon araştırmaları VP2'nin iskele ve zincir domainlerinin optimal polimeraz aktivitesi için gerekli olduğunu belirlemiştir. Bununla birlikte bu tür çalışmalar VP2'ye bağlı polimeraz aktivasyonunda tür özgüllüğünden sorumlu olanın zincir yapısı değil iskele domaini olduğunu göstermiştir^(69, 70).

2.6.1.4. Transkripsiyonun düzenlenmesi

Yapısal analizler bilezik domaininin yüzeyinden dsRNA/(-)RNA çıkış kanalına uzanan VP1'in C-ucunda bir esnek elemanın (tıkaç) varlığını ortaya çıkarmıştır. Tıkaç VP1'in kristal yapılarındaki kanal içerisinde gözlemlenmesine rağmen C-terminal polihistidin afinite etiketi kullanarak VP1'in başarılı bir şekilde pürifikasyonu ile tıkaçın tünelin dışına da uzayabileceği gösterilmiştir. Delesyon mutagenesi, tıkaçın VP1 katalitik aktivitesi için gerekli olmamasına rağmen dsRNA/(-)RNA çıkış kanalının çapı üzerindeki etkisi sebebiyle bir replikaz veya transkriptaz olarak polimerazın işlevini düzenleyebileceğini göstermektedir. Özellikle tıkaç kanaldan çıktığında kanalın çapı

dsRNA'yı içine alabilecek kadar geniştir. Bununla birlikte tıkaç var olduğunda kanalın çapı yalnızca tek sarmallı RNA'nın girebileceği noktaya indirgenmiş olur. Dolayısıyla tıkaçın varlığı transkripsiyon sırasında negatif polariteli kalıp ve oluşmakta olan (+) RNA tarafından oluşturulan dubleks ürünün ayrılmasına ve dolayısıyla polimerazın farklı kanallarından iki RNA'nın salınmasına sebep olabilir. Tıkaçın konumunun nasıl kontrol edildiği bilinmemektedir. Bununla birlikte VP1 ve VP3'ün tahmin edilen heterodimerik kompleksi DLP içindeki VP2 dekamerlerinin iç yüzeyine bağlı olduğundan, VP3 tıkaçın dsRNA/(-)RNA çıkış kanalından çıkışını önleyerek VP1 ile transkripsiyonu düzenliyor olabilir. VP3 olmadığında veya VP1'e stabil olarak bağlı olmadığında ortaya çıkan dsRNA ürünü muhtemelen tıkaç çıkış tünelinin dışına iter ve böylece polimeraz bir replikaz olarak çalışabilir⁽⁶⁷⁾.

2.7. Viroplazma oluşumu

Rotavirus proteinleri ve RNA'lar "viroplazma" olarak adlandırılan sitoplazmik inklüzyon cisimciklerinde özel olarak etkileşime girmektedir. Viroplazmaların oluşması için RV'nin yapısal olmayan iki proteini NSP2 ve NSP5'in varlığı gereklidir, çünkü enfekte olmamış hücrelerde NSP2 ve NSP5'in birlikte ekspresyonu viroplazma benzeri yapıların üretilmesine yol açmaktadır. Bu iki proteinin spesifik siRNA'lar, intra-antikorlar ve sıcaklığa duyarlı NSP2 veya NSP5'e özgü RV ts mutantların kullanımı ile bloke edilmesi viroplazma oluşumunu, RV morfogenezisini ve enfeksiyöz RV progeninin üretimini engeller. Son zamanlarda hipofosforile NSP5 ile etkileşim yoluyla sitoplazmanın viroplazma haline dönüşümü gözlemlenmektedir ve bunu her iki molekülün fosforilasyonu izlemektedir. Otofajik yolağın fonksiyonel proteazomları ve bileşenleri viroplazma oluşumu ve RV replikasyonu için gereklidir. Bir transmembran glikoproteini olan NSP4 esas olarak endoplazmik retikulumda (endoplasmic reticulum; ER) lokalizedir ve birçok fonksiyona sahiptir: (1) VP6 ile etkileşime girerek DLP'ler için bir hücre içi reseptör görevi görür. (2) Bir viroporin olarak hareket ederek hücre içi depolardan Ca^{2+} salınımını gerçekleştirir, böylece TLP'lerin dış tabakasını stabilize etmek için gerekli olan hücre içi Ca^{2+} seviyelerini yükseltir. NSP4'ün viroporin fonksiyonunun hücre içi Ca^{2+} sensör molekülü olan STIM1 ile etkileşime girmesine bağlı olduğu bulunmuştur. (3) NSP4 viroplazmada kapaklar oluşturur ve otofaji proteini LC3 ile birlikte lokalize olur. NSP4 ile tetiklenen Ca^{2+} artışı otofajiye yol açan

intraselüler bir kinaz bağımlı yolu aktive eder. (4) NSP4 plazma zarının geçirgenliğini değiştirir ve hücreler arası bağlantıların dengesini bozar. (5) En önemli bulgu NSP4'ün bir viral enterotoksin gibi davrandığının keşfedilmesidir ^(71, 72, 73).

NSP4 RV enfeksiyonundan sonra erken dönemde ya bir peptid parçası veya bütün bir molekül olarak salgılanır ve enfekte edilmemiş bağırsak hücrelerinin bazolateral plazma membranında konumlanmış integrin $\alpha1\beta1$ ve $\alpha2\beta1$ reseptörleri ile etkileşime girer. Aktive edilmiş integrin reseptörleri hücre içi Ca^{2+} salınımı ve diare ile korelasyon gösteren hücre içi reaksiyon basamaklarını uyarır. NSP3 doğuştan gelen bağışıklık yanıtının kısmi antagonistidir. NSP1 tüm RV proteinlerinin en değişkenidir. Muhtemelen konak dağılımının sınırlanmasında görevlidir. NSP1'in önemli bir fonksiyonu doğuştan gelen bağışıklık yanıtının bir antagonisti olarak hareket etme kabiliyetidir. Viroplazma hücre içinde enerji deposu ve taşıma araçları olarak görev yapan hücresel lipid damlacıklarını (lipid droplets; LDs) kullanır. Viroplazma-LD komplekslerinin lipidom analizi etkileşimlerini doğrulamıştır. LD homeostazisine müdahale ve nötral yağ parçalanmasının engellenmesi viroplazma sayısını, boyutunu, viral progeninin üretilmesini ve enfektivitesini azaltmaktadır ⁽²⁷⁾.

2.8. Pozitif polariteli RNA sentezi, RNA paketlenme ve DLP oluşumu

Uzunluğu 1130°A olduğu için çıplak dsRNA'lar kor içinde paketlenemez. Bunun yerine 11 farklı (+) ssRNA segmenti yeniden düzenlenir, viral kor proteinleri ile etkileşime girer, daha sonra paketlenir ve çoğaltılır. VP1/VP3/ssRNA primer replikasyon kompleksinin bir VP2 dekameri ile etkileşime girerek (muhtemelen NSP5 ve NSP2'yi içeren) kor partiküllerinin oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir. Bu işlem sırasında RNA'nın negatif yükü iki değerlikli katyonlar veya bir hücresel üç değerlikli katyonik bileşik olan spermidin ile birlikte paketlenmesiyle nötralize edilmelidir. VP2'nin N-terminal bölgesi VP1'in (ve bağlı ssRNA'nın) capsidasyonu için gereklidir. VP2 ile kompleks oluşumu VP1'in RdRp aktivitesi ve VP1/VP2 kompleksinin in vitro ortamda minimal replikaz partiküllerini oluşturması için zorunludur. RV partiküllerinin erken morfogenezinin moleküler detayları, kor partikül oluşumu ve RNA replikasyonu tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Özellikle 11 RNA segmentinin kontrollü bir şekilde partikül içine nasıl paklendiği belirsizdir. Kor

partikülleri bir kez oluştuktan sonra hızla VP6 ile transkapsidize olur ve bu DLP sentezlenmesini sağlar. Bu süreç in vitro olarak çalışılmıştır^(21, 74).

2.9. Virus partikülünün (virion) olgunlaşması ve salınımı

RV DLP'leri viroplazmadan ayrıldıktan sonra olgunlaşmak için ER aracılığıyla tomurcuklanırlar. Bu süreçte NSP4, VP6 ile etkileşime girerek bir hücre içi reseptör görevi görür. ER'den tomurcuklanan RV partikülleri geçici olarak sarılıdır, ancak RV partikülleri VP4 (60 trimer) ve VP7 (260 trimer)'den oluşan dış tabakayı elde ettiğinde zarf kaybolur. Geçici zarfın kökeni, işlevi ve kaybı anlaşılamamıştır. Bununla birlikte virionun çıkıntılarını oluşturan VP4 trimerlerinin önce VP6 ile reaksiyona girdiği ve daha sonra VP7 trimerlerinin oluşturduğu katmana gömüldüğü tahmin edilmektedir. Geleneksel hücre kültürü enfeksiyon deneylerindeki DLP'ler ve kor partikülleri enfeksiyöz değildir. Bununla birlikte in vitro'da kor partiküllerine VP6, VP7 ve VP4'ün ardışık eklenmesi (transkapsidasyon) ile enfektivitenin kısmen yeniden oluşturulması ve in vitro transkapsidasyon sisteminin düzgün bir şekilde kantitasyonu sağlandığı zaman, tam enfektivite tekrardan kazanılabilir. Yukarıda anlatıldığı gibi DLP'lerle etkileşen NSP4 olgunlaşma sürecinde çok önemli bir işleve sahiptir. NSP4 ekspresyonunun siRNA ile bloke edilmesi RV partikülünün hatalı olgunlaşmasına sebep olur. Ayrıca viroplazma ile etkileşen NSP4 fraksiyonunun RV RNA replikasyonunu da inhibe ettiği düşünülmektedir. RV TLP'ler non-polarize hücrelerden (MA104) lizis ile salınır, ancak epitel hücrelerinden (örn; Caco-2) salınımı hücreyi aniden öldürmeyen bir tomurcuklanma işlemi ile gerçekleşir⁽⁷⁵⁾.

2.10. Rotavirus enfeksiyonları

2.10.1. Toplum kökenli rotavirus

Avrupa'da aşı öncesi dönemde toplum kökenli rotavirusun CARV (community-acquired RV-infection; CARV) için hastaneye yatırılma oranları Pediatrik ROTavirus Avrupa Komitesi (PROTECT) çalışmaları tarafından belirlenmiştir. Bu sistematik çalışmada 2 yaşından küçük çocuklar için prevalansı % 60-80, 5 yaşın altındaki çocuklar için yıllık ortalama insidans oranını 3/1.000 (0.3-11.9/1000 aralığında) olduğu vurgulanmaktadır. CARV için hastanede kalış süresi 2 ila 9.5 gün arasında değişmekle birlikte ortalama 4.8 gün olarak belirlenmiştir. Bu veriler birçok prospektif ve

retrospektif çalışmayla doğrulanmıştır. En güvenilir sonuçlar 7 Avrupa ülkesinde pediatrik AGE'nin prospektif, çok merkezli REVEAL çalışmasından elde edilmiştir. Bu çalışmaya göre başlıca 6-23 aylık çocukları etkileyen RV ile ilişkili gastroenterit sebebiyle acil servise ve hastanenin diğer bölümlerine yapılan başvuruların %50'sinde birincil tanı CARV'dır. Dahası doğu ve batı ülkelerinde CARV'nın farklı epidemiyolojik özellikleriyle ilişkili olarak hastaneye yatırılma oranlarında farklılık gözlemlenmekte ve çocukların hastaneye erişiminde farklı bir tutum bulunmaktadır ^(76, 77).

Aşı sonrası dönemde CARV sebebiyle hastaneye kaldırılma oranında ve AS başvurularında azalma gözlemlenmiştir. Giaquinto ve arkadaşları⁽⁷⁸⁾ 2011 yılında hastaneye yatışlarda ve acil servise başvurularında yaklaşık %94.5'lik bir azalma gözlemlemişlerdir. Zlamy ve arkadaşları⁽⁷⁹⁾ 2013'te Avusturya'da hastanede yatış oranında %74'lük bir azalma olduğunu ve CARV için ortalama hastanede kalış süresinin aşı öncesi dönem ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha düşük olduğunu ve maliyetlerin genel olarak %72.7 ile daha düşük olduğunu bildirmiştir. RV aşılmasını düzenli olarak uygulayan Avrupa ülkelerinde azalma yalnızca RV aşılı yaş gruplarında görülmemiştir. Bu çalışmaların sonuçları özellikle hafif vakalarla ilişkili olarak insidans ve hastaneye kaldırılma oranlarının sırasıyla %41 ve %24 oranlarında azalması ile birlikte sürü bağışıklığının sağlanması ihtimalini ortaya koymaktadır ⁽⁷⁷⁾.

2.10.2. Nozokomiyal rotavirus (nRV) enfeksiyonu

Nozokomiyal hastalıklarla ilgili yapılan geniş çaplı çalışmalarda genellikle yetişkin populasyon odak noktası olduğu için gerçek bir nRV tahmini elde etmek zorlaşmaktadır. Bununla birlikte viruslar enfeksiyonların %23 ile %34'ünü oluşturması sebebiyle pediatri servisinde nozokomiyal hastalığın en yaygın ajanlarıdır. Tüm nozokomiyal diare vakalarının %91-94'ü (pediatrik grubun %65-90'ı) viruslardan kaynaklanmaktadır. Tüm bu nozokomiyal diarelerin %31-87'sinden rotavirusun sorumlu olması sebebiyle nozokomiyal diarenin en sık görülen etyolojik ajanı olarak düşünülmektedir, ancak prevalans yıldan yıla ve coğrafi bölgeye bağlı olarak değişmektedir. Alrifai ve ark.⁽⁷⁸⁾ 5 yaşın altındaki çocuklarda nozokomiyal diarenin prevalansını ve etyolojisini saptamak amacıyla Irak'taki Tikrit eğitim hastanesinde gerçekleştirdikleri çalışmada nozokomiyal diarenin %18.5'inden rotavirusun sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Sherchan ve ark.⁽⁷⁹⁾ Nepal'de rotavirus kaynaklı nozokomiyal

enfeksiyon prevalansının %30.2 olduğunu bulmuşlardır. Fröhlich ve ark.⁽⁸⁰⁾ Avusturya, Almanya ve İsviçre'de nozokomiyal rotavirus enfeksiyonlarının özelliklerini karşılaştırmış ve Avusturya, Almanya ve İsviçre'de nozokomiyal gastroenteritli çocukların sırasıyla %57, %69 ve %49'unda rotavirus tespit etmişlerdir. RV ile ilişkili AGE sebebiyle hastaneye yatırıldıktan 48 saat sonrası ile hastaneden taburcu olduktan 72 saat sonrasına kadar ortaya çıkan semptomlar nozokomiyal olarak tanımlanmaktadır. Özellikle bazı çalışmalar nRV vakalarının %15-30'unun hastaneden taburcu olduktan sonra ortaya çıktığını göstermiştir. Bir çalışmada örnek sayısı 134 ila 355.339 arasında değişen 23 adet seçilmiş bildiride, 0 ila 18 yaş aralığı ve özellikle 0-5 yaş grubuna odaklanılarak nRV insidansı hesaplanmıştır. Ortalama nozokomiyal hastaneye yatış oranı 29 (3-277 arasında) nRV/1000 yatış, 5 yaş altı çocuklar için bu oran 198 (30-1030 arasında) nRV / 100,000 çocuk olup CARV'lerin nozokomiyal RV'lere oranı 0.32 (0.03-0.96 arasında) nRV/CARV, hastaneye yatış süresi ise 4.8 (0.46-13 arasında) nRV /1.000 gün olarak hesaplanmıştır. Avusturya'da nRV insidansının RV aşısı öncesi ve sonrası dönemi karşılaştırıldığında nRV/CARV oranı %11.5'ten %3.1'e anlamlı bir azalma göstermiştir^(81, 82).

2.10.3. RV ve ekstraintestinal enfeksiyonlar

RV'ler başlangıçta ince bağırsağın olgun ve farklılaşmış enterositlerini enfekte ederken bazı veriler RV'lerin gastrointestinal sistemi geçip sistemik hale gelebildiğini göstermektedir. Elde edilen bilgilere göre RV enfeksiyonunun ekstraintestinal yayılımı ile ilgili raporların sayısı artmaktadır. Başlangıç olarak kronik RV enfeksiyonu olan üç immün yetmezliği olan hastanın serumunda RV antijeninin saptandığı bildirilmiştir. Gerçekten RV enfeksiyonu olan immünkompetan çocukların serumlarında RV antijeninin veya RNA'sının varlığı ilk olarak Blutt ve ark. tarafından belgelenmiştir. Bu bulguları desteklemek amacıyla deneysel hayvan modelleri üzerine çalışmalar yapılmış ve RV'nin ekstraintestinal bölgelere ulaştığı gösterilmiştir. RV ile ilişkili AGE'li hastaların serumunda RV antijen ve RNA'nın ortalama bulunma oranı sırasıyla %63.2 (%33.3-%90 arasında) ve %74.7 (%64.3-%93 arasında) olarak bildirilmiştir. Bununla birlikte serum bazlı yapılan bir çalışmada vakaların sadece %5'inde RV RNA saptanmıştır⁽⁸³⁾.

Bu konu ile ilgili olarak örnek toplama öncesi hastalık süresindeki değişiklikler, çalışma popülasyonlarının çeşitliliği ve yöntemlerin duyarlılıklarındaki farklılıkların bu gözlemlenen tutarsızlıklara sebep olduğu söylenebilir. Serumda RV antijeninin tespit oranının ve konsantrasyonunun akut fazda, konvelasan faza göre anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Serumda RV antijeninin ve RNA'nın varlığı yüksek ateş ile ilişkilendirilmiştir, ancak nöbet ve konvülsiyon açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca RV antijenemisi olan çocuklardan alınan serumun hücre kültüründe pasajlanmasıyla enfeksiyöz RV partiküllerin varlığını doğrulamıştır. Dışkı ve PBMC/serum örneklerinde eşleştirilen RV genotiplerinin daha yakından araştırılmasıyla, RV G tipinin antijenemi ile spesifik bir ilişkisi bulunmadığı, fakat nükleotid değişikliği ve genotip uyumsuzluğu gösterdiği bildirilmiştir. Bu bulgular doku tropizminde varolan değişiklikler sebebiyle RV replikasyonunun ekstraintestinal bölgelerde gerçekleşebileceği spekülasyonunu ortaya çıkarmıştır. BOS, kalp, testis, böbrek, akciğer, karaciğer ve mesaneyi içeren farklı bölgelerden RV antijeni veya RNA'sının saptanmasıyla, sistemik RV enfeksiyonunda virusun gastrointestinal sistemden kaçmasıyla ekstraintestinal bölgelere yayılmış olabileceği düşünülmektedir⁽⁸⁴⁾. Buna karşılık ciddi hastalığın oluşması için ekstraintestinal virus yayılımından ziyade diğer başka faktörlere ihtiyaç duyulmaktadır. Akut ensefalit, ensefalopati, konvülsiyonlar ve nöbet de dahil olmak üzere RV enfeksiyonu ile ilişkili olarak çeşitli nörolojik komplikasyonlar bildirilmiştir. Bu bağlamda RV gastroenteritli hastaların nörolojik bulgularının sıklığı yaklaşık %2-%6 arasındadır. Ayrıca birkaç olguda nörolojik bulguları olan hastaların BOS'unda RV saptandığı bildirilmiştir. Bununla birlikte RV gen sekans analizi ile BOS ve dışkıdan alınan örnekler arasında anlamlı bir farklılığın gözlemlenmediği tespit edilmiştir. RV ve MSS (Merkezi Sinir Sistemi) bozuklukları arasında sağlam bir ilişki kurulamasa da RV gastroenteritli hastalarda MSS komplikasyonlarının sıklığı oldukça önemlidir. Özetle enterik bir virus olarak kabul edilmesine rağmen ekstraintestinal bölgelerde RV enfeksiyonunun rolü bilinmemekle beraber, AGE'li çocuklarda RV enfeksiyonunun doku tropizmi ve klinik komplikasyonlar gösterebileceği yeni yeni incelenmeye başlanmıştır⁽⁸⁵⁾.

2.10.4. Kalıcı RV enfeksiyonu

Hücre kültüründe ve bağışık sistemi baskılanmış konaklarda (insanlar ve diğer memeli türleri) RV enfeksiyonu persitan hale gelebilir. Bu virus-konak ilişkisinin ayrıntılı moleküler mekanizması günümüzde tam olarak anlaşılamamıştır ⁽⁸⁶⁾.

2.11. Moleküler patogeneze ve patofizyoloji

Rotavirus ince bağırsak villus hücre dizisinin apikal yüzeyine karşı tropizm gösterir ve olgun enterositleri enfekte eder. Rotavirus enterositleri enfekte ederken hücre dökülmesine sebep olur. Enterosit hücreleri yıkıma uğrar ve bu hücrelerin yerine kriptlerden gelen sekretuar immatür hücrelerin villi'ye göçü daha hızlı gerçekleşir, bağırsağın absorpsiyon kapasitesi geçici olarak kaybedilir ve diare meydana gelir. Rotavirusun olgun enterositlerdeki sitolitik replikasyonundan sonra salınan yeni viral partiküller ince bağırsağın en uzak kısımlarına bulaşabilir ve dışkı yoluyla atılabilir. Son bulgular rotavirus enfeksiyonunun konak vücuduna yayılabileceğini ve sistemik enfeksiyona sebep olabileceğini göstermektedir. RV'nin ekstraintestinal yayılımı serum ve konağın diğer vücut bölgelerinde RV dsRNA, RV antijeni ve bazen enfeksiyöz RV'nin saptanması ile kanıtlanmış olarak sıklıkla ortaya çıksa normal (immunocompetent) konaklardaki patolojik bulgular için bu gözlemlerin önemi tartışmalıdır. Aksine bağışıklığı baskılanmış konaklardaki RV karaciğer, safra sistemi ve pankreasında çoğalabilir ve safra atrezisi ve pankreatit ile ilişkili olabilir. Rotavirus enfeksiyonu ile ilişkili olarak vakaların yaklaşık % 2 ila 5'inde benign nöbetlerden ölümcül ensefalite kadar değişen nörolojik belirtiler bildirilmiştir. Bununla birlikte rotavirusun aktif olarak ekstraintestinal bölgelerde çoğalmaya devam edip etmediği veya virusun pasif olarak kan dolaşımı yoluyla yayılıp yayılmadığı hala net değildir ^(55, 87).

NSP4 proteini enterotoksin fonksiyonu ile diarenin gelişiminde çok önemli bir rol oynamaktadır. İnce bağırsağın histopatolojik değişikliklerin olmadığı erken dönemde diarenin başlaması oldukça şaşırtıcı bir bulgudur ve muhtemelen bu olay farklı büyüklükteki oligomerleri oluşturan NSP4'ün erken reaktivitesi ile gerçekleşmektedir. RV enfeksiyon patogenezi konağın yaşına, virus-konak etkileşiminin homolojisine/heterolojisine ve belirli viral gen ürünlerine bağlı olarak (VP3, VP4, VP7, NSP2, NSP3, NSP4) multifaktöriyeldir. Fanc ve arkadaşları⁽⁸⁸⁾ simian (RRV)-mouse

(EW) RV reassortment'ı kullanarak farenin VP4'ünü ve NSP1'ini kodlayan genlerin, süt farelerinde etkin bir replikasyon için belirleyici olduğu sonucuna varmıştır. Hastalık mekanizmasının faktörleri; epitelin yok olmasının ardından malabsorbsiyon, villus iskemisi, viral enterotoksin olan NSP4'ün etkisi ve enterik sinir sisteminin aktivasyonu şeklinde tanımlanabilir. Son zamanlarda kusma semptomunun patogenezi, RV'nin özellikle intestinal motilite ve sekreyonu regüle eden bağırsaktaki enterokromaffin hücreleri enfekte etmesi ile vagal afferent sinirleri harekete geçiren ve kusmayı kontrol eden beyin sapı yapılarını uyaran 5-hidroksitriptamin (serotonin) üretimini uyarabilmesinin gözlemlenmesi ile anlaşılmıştır. Enterokromaffin hücreler nörotransmitter (serotonin) ve diğer peptitlerin sekresyonu ile enterik sinir sisteminde nöron sinyalizasyonunu modüle eden kemosensörlerdir ^(15, 89).

Biliyer atrezi yenidoğan farelerde RV enfeksiyonu ile uyarılabilir, bu da obstrüktif kolanjiopatiye sebep olur. Hastalığın şiddeti konağın yaşına ayrıca doğal immün yanıtın varlığına ve potansiyeline bağlıdır. Bu modelde yenidoğan fareler ya RV-benzeri partiküller ile anneleri uyararak veya enfeksiyondan önce yavrulara hiperimmün serum enjekte edilerek oluşan pasif immünizasyon ile biliyer atreziden korunabilir. RV enfeksiyonunu anlamak için gnotobiyotik domuz modeli kullanarak olgun insan bağırsak viromunun analizi yapılmaya başlanmıştır. RV enfeksiyonu ve hastalığında gnotobiyotik domuz modeli kullanarak dozu düzgün şekilde ayarlanmış probiyotik laktik asit bakterilerinin Th1 ve Th2 sitokin yanıtını artırabileceği ve bağırsak epitelindeki RV kaynaklı hücre hasarını kısmen önleyebileceği gözlemlenmiştir ⁽⁹⁰⁾.

2.12. İmmün yanıt

2.12.1. RV spesifik humoral ve hücresel immün yanıt

RV enfeksiyonunu takiben hem virusa özgü proteinlere karşı antikor üreten B hücreleri hem de enfekte olmuş hücrelerin yüzeyinde sunulan RV epitoplarını MHC class I ve II antijenleri ile tanıyan T hücreleri ile immün yanıt oluşur. VP6 başlıca ince bağırsak mukozasında IgA üretimini uyaran en immünojenik protein olarak bilinir. Doğal RVA enfeksiyonu sonraki reenfeksiyon için önemli bir klinik koruma sağlar. Meksika ve Gine-Bissau'da yapılan kohort araştırmalarında tekrarlayan RVA enfeksiyonlarının ilk vakaya kıyasla daha hafif seyrettiği ve ikinci bir enfeksiyona karşı

%77 ile %70 koruyucu etkinlik sağladığı gösterilmiştir. Koruma uzun sürmemekle beraber eksik ve yaşa bağlı olabilir. RVA'nın sebep olduğu primer ve sekonder enfeksiyonlar, serum, tükürük ve intestinal sekresyonlarda IgG, IgM ve IgA sınıfı antikor üretimini uyarabilir. RV partiküllerinin yüzeyindeki VP7 ve VP4'e karşı oluşan birçok antikor pasif transfer metodu ile fare ve gnotobiyotik domuz yavruları kullanılarak oluşturulan hayvan modellerinde gösterildiği gibi in vitro ortamda nötralize edici, in vivo ortamda ise koruyucudur ⁽⁹¹⁾.

RV'ye özgü CD8+ T hücrelerinin pasif transferinin de koruyucu olduğu gösterilmiştir. Hamilelik esnasında plasental antikor transferi ile pasif bağışıklık oluşur ve emzirme yenidoğanları RVA enfeksiyonundan koruyabilir, fakat bu durum RV aşısı ile oluşan immün yanıtı olumsuz etkilemektedir. Çeşitli knock-out mutant farelerin varlığı araştırmacıların, humoral ve hücrel immün yanıtın koruma üzerindeki etkisini incelemesine olanak sağlamıştır. RV spesifik T hücreleri primer enfeksiyon sonrasında RV'yi ortadan kaldırmaya yardımcı olurken, RV-spesifik B hafıza hücreleri sonraki enfeksiyona karşı koruma sağlar ⁽⁹²⁾.

VP7 ve VP4 proteinleri konağa genotip spesifik koruma (homotipik) sağlayan serum nötralizan antikorların üretimini stimüle eder. RVA'nın klasik immünolojik yanıtı homotipik olmasına rağmen birçok genotipler ile olan çapraz reaktif heterotipik yanıt da vardır. Tekrar eden enfeksiyondan sonra artan humoral antikorlar hem VP4 hem de VP7 molekülleri üzerindeki serotip-spesifik ve çapraz-reaktif epitoplara yönelir ve böylece heterotipik koruma sağlanır. Plazmositoid dendritik hücrelerin, fare (in vivo) ve insan hücrelerindeki (in vitro) RV enfeksiyonundan sonra B hücre aktivasyonunu uyarmak için etkili ve gerekli olduğu tespit edilmiştir. Kan dolaşımında bulunan RV-spesifik CD4+ T hücreleri bağırsak "homing" reseptör $\alpha 4\beta 7$ 'yi eksprese eder. Bununla birlikte RV enfeksiyonundan korunma tamamen VP4 ve VP7'ye spesifik nötralizan antikor konsantrasyonu ile ilişkili değildir. RV doğal enfeksiyonu veya RV aşısı ile infantlar ve çocuklarda da diğer yapısal (VP6, VP2) ve yapısal olmayan (NSP4) proteinlere karşı antikor gelişir. VP6-spesifik antikorlar in vitro ortamda nötralizan değildir, ancak IgA sınıfı VP6-spesifik antikorlar uygulandığında in vivo ortamda koruyucu oldukları gösterilmiştir. VP6'ya spesifik IgA antikorların, bazolateral membrandan J protein reseptörleri aracılığıyla epitelyal bağırsak hücreleri tarafından alındığı ve viroplazmadan salınan yeni DLP'ler ile kompleks oluşturularak TLP'lere olgunlaşmasını "Hücre içi

nötralizasyon” ile önlendiği ileri sürülmüş ve son zamanlarda da kanıtlanmıştır. Bununla birlikte IgA eksikliği olan farelerin ve hastaların IgG'nin koruyucu bağışıklığı sayesinde enfeksiyon sonrası RV'yi ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. NSP4 antikorunun pasif transferi farelerde bir miktar koruma sağlamıştır, ancak aktif olarak edinilen NSP4 antikoru gnotobiyotik domuz yavrularını RVA enfeksiyonundan korumamaktadır. Kapsamlı çalışmalar 1 veya 2 doğal RV enfeksiyonundan sonra çocukların çeşitli heterotipik RV'ler ile enfeksiyon sonrası oluşan şiddetli hastalıklara karşı oldukça korunmuş olduğunu göstermiştir ^(93, 94).

2.12.2. Doğal immün yanıt

RV enfeksiyonları hızlı bir şekilde çeşitli doğal bağışıklık mekanizmalarını tetikler (innate immune responses; IIR) bu yüzden primer enfeksiyondan sonra RV spesifik kazanılmış immün yanıt oluşur. Çoğu IIR, RV suşuna ve hücre tipine özgü ortaya çıkmaktadır. Günümüzde çeşitli RV enfeksiyon hastalıklarından sonra IIR'nin ne ölçüde olduğu tamamen açıklanmamıştır. Son zamanlarda RV'nin innate immün yanıtından ve özellikle de interferon (IFN) yanıtından kaçma yeteneğini inceleyen bir dizi çalışma yayınlanmıştır. Fare yavrularından elde edilen intestinal epitelyal hücrelerin saflaştırılmamış preparatları kullanılarak RV enfeksiyonunun tip I (IFN- β) ve tip III IFN (IFN- λ) mRNA ekspresyonunu uyardığı tespit edilmiştir. Dahası farelerin IFN- λ ve daha az ölçüde tip I IFN ile tedavisi virusun replikasyonunu azaltmıştır. Bu bulgularla uyumlu olarak tip III IFN ve daha düşük seviyede tip I IFN reseptörü bulundurmeyen farelerde, vahşi tipli farelere göre viral replikasyon seviyesi oldukça yüksektir ve bu olgu viral replikasyonun modülasyonunda IFN sisteminin önemini göstermektedir. RV NSP1'in hücrel proteinlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir sırasıyla: interferon (IFN) düzenleyici faktör (interferon regulatory factor; IRF) 3, β -transdusin tekrar içeren protein (β -transducin repeat containing protein; β -TrCp0), melanoma farklılaşma ile ilgili gen 5 (Melanoma differentiation-associated gene-5; MDA5)/mitokondriyal antiviral sinyal proteini (mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS), tümör baskılayıcı protein p53 ve TNF reseptörle ilişkili faktör 2 (TNF receptor associated factor 2, TRAF2) gibi proteinler ile etkileşimi proteozomal degradasyona ve böylece interferon yanıtının erken oluşumunu önlemeye veya azaltmaya sebep olur ⁽⁹⁵⁾.

RV NSP1 ayrıca retinoik asit-uyarılabilir gen 1 (Retinoic acid inducible gene I; RIG1)'i hedefler ve proteozom bağımsız yol ile IRF5 ve IRF7'nin azalmasına sebep olur. Rotavirus enfeksiyonu ayrıca STAT1'in (Signal transducers and activators of transcription; STAT) fosforilasyonunu, STAT1/STAT2'nin nükleusa taşınmasını ve dolayısı ile "antiviral durumu" oluşturan IFN cevabının oluşumunu inhibe eder. Ayrıca son zamanlarda RV cap enzimi VP3'ün C-terminal domaininin bir fosfodiesteraz özelliği göstererek 2',5'-oligoadenilatı böldüğü böylece RNase L'nin aktivasyonunu ve konakta potansiyel bir IIR hücrel yanıtın oluşmasını önlediği gösterilmiştir. RIG-1'in transfer olmuş DLP'lerden çıkan ssRNA'lar için bir sitoplazmik sensör olarak görev yaptığı tespit edilmiştir⁽⁹⁶⁾.

Viral replikasyon RIG-I ve/veya MDA-5 ile tanınır, bu IRF3 ve NF- κ B'yi (Nuclear transcription factor; NF- κ B) aktive eder. Daha sonra bu transkripsiyon faktörleri tip I IFN ve IFN-stimüle edici genlerin (Interferon-stimulated genes; ISG) ekspresyonunu uyarır. RV NSP1 IRF3'ün yıkımına ve NF- κ B aktivitesinin inhibisyonuna sebep olur. NSP1, IRF3 proteininin dimerizasyon domainine bağlanarak etkileşime girer. Bu etkiler karmaşıktır, viral suşa ve hücre tipine bağlıdır. Örneğin, bazı hayvansal RV'lerin NSP1'leri IRF3, IRF5 ve IRF7'yi degrade ederken, insan RV'lerinin NSP1'i ağırlıklı olarak IRF5 ve IRF7'yi degrade etmektedir. Bu sebeple IFN yanıtını daha az etkili bir şekilde engelleyebilmektedir. NSP1 pro-apoptotik hücrel protein p53'ü hedefler ve bu proteozomal yıkıma sebep olur böylece RV replikasyonunun erken aşamasında hücre ölümünü geciktirir^(97, 98).

Homolog RV ile enfekte bir faredeki sağlıklı ve RV ile enfekte intestinal epitel hücre IIR'sinin kombine flow sitometri ve tek hücre multipleks RT-PCR yöntemi ile incelenmesi sonucu erken IIR'nin yıkımı ve uyarılmasının heterojenliği keşfedilmiştir. Rotavirus enfeksiyonu IFN yanıtı yetersiz olan farelerde çok ciddi rahatsızlıklara sebep olur. İnterferon üretimi RV ile enfekte olmuş domuzlarda ve insanlarda baskın bir IIR'dir. RV'nin ekstraintestinal yayılımının ve replikasyon derecesinin en azından kısmen RV suşunun spesifik hücrelerdeki IFN sistemini inhibe etme yeteneğine bağlı olduğu düşünülmektedir. Etkin bir IFN sinyal sistemi olmayan süt farelerinde bazı heterolog RV suşları safra yollarında ve pankreasta çok etkin bir biçimde çoğalarak safra atrezisi ve pankreas hastalığına sebep olurken homolog fare suşlarının böyle bir etkisi yoktur. RV'nin fare safra sisteminde replikasyonu hem VP4 ile viral girişe hem de

NSP1 aracılığı ile innate immün yanıttan kaçışa bağlıdır. RV, IFN transkripsiyonunu uyardıktan sonra sitokin salınımı PKR tarafından modüle edilir. Otokrin modelde, IFN tip I IFNR'yi (interferon receptor; IFNR) uyarır; IFNR daha sonra STAT1/STAT2/IRF9 kompleksleri aracılığıyla sinyal göndererek IFN ve ISG ekspresyonunu ve böylece antiviral durumu uyarır. Ayrıca RV'nin STAT1 ve STAT2'nin işlevini bilinmeyen bir mekanizma ile inhibe ettiği ve bu sebeple potansiyel olarak her türlü IFN yanıtını inhibe edebildiği gösterilmiştir. RV'nin ayrıca polarize Caco-2 hücrelerinde TGF- β (Transforming growth factor beta) sekresyonunu uyardığı ve bu etki ile dendritik hücrelerin Th1 T hücrelerini aktive etme yeteneğini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu mekanizmanın in vivo oluşup oluşmadığı bilinmemekle birlikte, eğer öyleyse RV'ye karşı in vivo ortamda görülen zayıf T hücre yanıtını potansiyel olarak açıklayabilir. Virus tarafından kodlanan yapısal olmayan ve RV ile enfekte olmuş hücrelerden salgılanan NSP4 proteininin fare makrofajlarında pro-enflamatuvar proteinlerin sentezine sebep olduğu gösterilmiştir. RV-spesifik CD4+, CD8+ T hücreleri ve B hücreleri intestinal homing $\alpha 4\beta 7$ reseptörünü sentezler^(98, 99).

2.12.3. IgA ile korunma arasındaki korelasyon

Genelde intestinal sistemde belirli seviyelerdeki humoral RV-spesifik IgA antikorların (copro IgA) varlığı (RV-spesifik copro IgA > 1:80; RV-spesifik serum IgA >1:200; RV-spesifik serum IgG >1:800) ile korunma arasında bir korelasyon vardır. Korunma ile ilişkili olarak RV-spesifik serum IgA antikor seviyelerinin önemli olduğu söylene de bu argüman tartışmaya açıktır. Aşı veya doğal RV enfeksiyon sonrası düşük nötralizan antikor titresi ile yüksek seviyede oluşan koruyucu immunitenin arasında nispeten bir korelasyon eksikliği vardır. Bu sebeple koruyuculukta ek faktörlerin önemli olduğu düşünülmektedir. İlginç bir şekilde mevcut iki lisanslı RV aşısı ılıman iklimli ülkelerde oldukça etkili olmasına rağmen korunma ile ilişkileri tam anlamıyla açıklanamamıştır⁽¹⁰⁰⁾.

2.12.4. Rotavirus gastroenteritene karşı probiyotik ve prebiyotik kullanımı

RV kaynaklı gastroenteritin tedavisinde kusma ve diare ile kaybedilen sıvıları ve elektrolitleri telafi etmek için oral rehidrasyon (oral rehidrasyon solüsyonları, ORS) uygulanır. Çinko takviyesi oral rehidrasyonu destekler ve akut gastroenteritli çocuklar

için DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından önerilmektedir. ORS formülasyonuna ilave birçok katkı maddesi araştırılmaktadır; Bunlar laktoferrin ve lizozim gibi enzimler ile glisin, alanin ve glutamin içeren çeşitli amino asitlerdir. Ek olarak RV aşılarının (Rotarix ve RotaTeq), RV kaynaklı ciddi gastroenteritin önlenmesinde güvenli ve etkili olduğu görülmüştür. Buna karşılık, maliyeti, depolanma ve nakliye gereksinimleri (2-8°C'de) ve gelişmekte olan ülkelerde daha düşük korunma sağlaması sebebiyle küresel olarak uygulanmamaktadır. Üstelik RV kaynaklı gastroenterit, anne sütü, probiyotik veya prebiyotiklerin biyoaktif bileşenleri gibi besinlele modüle edilebilir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri ve *Saccharomyces boulardii* gibi probiyotiklerin kullanımı RV kaynaklı enfeksiyonun önlenmesi, diare süresinin ve şiddetinin azaltılması, enfeksiyonların görülme sıklığının azaltılması ve bağışıklık tepkisinin ve virus bulaşmasının modülasyonu ile ilişkilendirilmiştir ^(15, 101, 102).

Bağırsak patojeni antagonisti potansiyeli gösterdiği bildirilen probiyotikler arasında, dünya genelinde yaygın olarak bildiren türler *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleridir. Fareler üzerinde yapılan RV odaklı bir *in vivo* değerlendirmede, *Bifidobacterium breve*'nin oral uygulanmasının RV kaynaklı diareye karşı kuvvetli şekilde koruma sağladığı görülmüştür ve böylece tedavi edilen farenin dışkı, meme bezi ve bağırsağında anti-RV IgA düzeyinde bir artış gözlenmiştir. Diğer murin (fare) modellerinde, patojensiz sıçanlar SA11 RV suşu ile enfekte edilmiş ve *L. casei* ile oral yoldan tedavi uygulanmıştır; ince bağırsak lezyonları, RV enfeksiyon seviyesi ve diare azalmıştır. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, RV enfeksiyonuna karşı probiyotik mekanizmaların bazılarının; antimikrobiyal maddelerin (laktik asit, nitrik oksit, H₂O₂ ve bakteriyosinler) üretimi, antimikrobiyal peptitlerin uyarılması, epitel hücreleri tarafından münin üretimi, lokal adaptif stimülasyon (spesifik IgA tepkisi) ve doğal bağışıklık yanıtın olduğu görülmüştür. Ayrıca, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri, bağırsak hücreleri tarafından IL25, IL33, TGF; doğal bağışıklık hücreleri tarafından IL22 ve antijen sunucu hücreler tarafından IL12, IL25, IL10 ve TGF sitokinlerinin üretiminin tetiklenmesiyle ilişkilendirilmiştir. Bu durumda bağırsak bariyer fonksiyonunun gelişmesi, efektör proteinlerin azalması ve düzenleyici bağışıklık yanıtın artması gibi sonuçlar ortaya çıkmıştır ⁽¹⁰³⁾.

Öte yandan bakterilerin gelişmesini arttıran sindirilemeyen karbonhidratlar olan sialik asit içeren insan sütü oligosakkaritleri (Human milk oligosaccharides; HMO) gibi

prebiyotikler, in vitro RV enfektivitesi ve replikasyonunun azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. HMO aynı zamanda kolon mikrobiyotası ve RV enfeksiyonuna karşı bağışıklık yanıtın düzenlenmesi (modüle edilmesi) yoluyla domuz yavrularında RV kaynaklı diare süresinin azaltılması ile ilişkilendirilmiştir. Ek olarak kısa zincirli galaktooligosakkaritler (short-chain galactooligosaccharides; scGOS), uzun zincirli fruktooligosakkaritler (long-chain fructooligosaccharides; lcFOS) ve Bifidobacterium breve'den oluşan bir karışım, süt farelerinde RV enfeksiyonuna karşı koruma sağlamıştır. RV kaynaklı akut gastroenteritli çocuklarda, prebiyotik olarak Bifidobacterium lactis B94 ve inülinin karışımı oral yoldan verildiğinde, RV'nin sebep olduğu sulu akut diarenin daha kısa sürdüğü görülmüştür. Diğer taraftan süt farelerinde RV kaynaklı diare ile ilişkili olarak scGOS, lcFOS gibi prebiyotiklerin, pektin türevi asidik oligosakkarit karışımının ve fermente süt bileşenlerinde ısı işlem görmüş probiyotiklerin virus atılımı ve klinik belirtilerin azalması ile ilişkilendirilmiştir⁽¹⁰²⁾.

Probiyotiklerin ve prebiyotiklerin RV patogeneze karşı aktivitesi, probiyotiklerin (veya metabolitlerinin) ve prebiyotiklerin, enterositlere girişi önleyen ve dolayısıyla RV replikasyonunu azaltan viral partiküllerle etkileşime girmesi sebebiyle virus bulaşının azalmasına bağlanabilir. Ayrıca Lactobacillus casei ve Bifidobacterium adolescentis metabolitlerinin in vitro etkisi, RV kaynaklı enterotoksin NSP4 ekspresyonunun ve Ca^{+2} salınım seviyelerinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir; bu durum da hücrenin bu yolağından kaynaklanan elektrolit dengesizliğine erişmeyeceğini göstermektedir. Ayrıca probiyotikler ve prebiyotikler ile RV bağışıklık yanıtın modülasyonu, kalıp tanıma reseptör sinyali yoluyla ve IFN sinyal yolağının önemli düzenleyicileri olan tip I IFN'lerin desteklenmesi yoluyla gerçekleşen antiviral tepki ile ilişkilendirilmiştir. Bifidobakteryum infantis MCC12 ve Bifidobakteryum breve MCC1274 enfekte domuz bağırsak epitel hücrelerinde RV titrelerinin önemli derecede azalması ile ilişkilendirilmiştir; her iki bifidobakterinin yararlı etkileri A20 ekspresyonunun azaltılması, IRF-3 aktivasyonu, IFN- β üretimi, MxA (myxovirus-resistance protein A; MxA) ve RNase L ekspresyonunu iyileştirmesi şeklinde tanımlanabilir. A20'nin azaltılması, NF- κ B ile aktive edici kinaz/Traf ailesi üyesi ile ilişkili NF- κ B etkinleştirici-bağlayıcı kinaz 1 ve IKK-i /IKKe ile fiziksel olarak etkileşime girerek, IFN stimülasyonu ve transkripsiyona bağlı IFN düzenleyicisi ile ilişkilidir, ayrıca TLR3'ün dsRNA ile etkileşimini takiben IRF-3'ün dimerizasyonunu

inhibe eder. Bu bağlamda MxA'nın ekspresyonunun artması yeni sentezlenmiş viral proteinleri ayırarak virusları inhibe eder ve RNase L daha düşük RV replikasyonu ile ilişkilidir. Dolayısıyla probiyotikler ve prebiyotikler genellikle antiviral etki ve spesifik anti-RV aktivitesi ile ilişkilidir ^(102, 104).

2.13. Klinik belirtiler

RV enfeksiyonları asemptomatik kalabilir veya hafif ile ciddi diare, kusma, çeşitli derecelerde dehidratasyon ile seyreden akut gastroenterite (AGE) sebep olabilir. İnkübasyon süresi genellikle 48 saattir. Diarenin klinik tablosu kısa süreli ve sulu hafif diarenden ateş, kusma, dehidrasyon, elektrolit dengesizliği, şok ve ölümle sonuçlanan ciddi diareye kadar değişebilir. Ateş genellikle vardır, ancak bazen orta dereceli seyreder. Kusma diarenden önce başlar ve kısa bir dönem daha devam eder (3 ile 5 gün). Genellikle ciddi dehidratasyon, ağır elektrolit dengesizliğine sebep olur. RV enfeksiyonlarında ölümün başlıca sebebi ciddi dehidratasyon ve kardiyovasküler yetmezliktir. RV enfeksiyonlarının tedavisinde genel olarak ozmotik ve elektrolit dengesini korumak için oral veya intravenöz rehidrasyon terapisi uygulanmaktadır. RV ile ilişkili enfeksiyon sebebiyle ölüm rehidrasyon ölçümünün zamanında yapılmasından dolayı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde nadir görülür ⁽¹³⁾.

RVA ile enfekte olan bağışıklık sistemi baskılanmış çocuklarda ve yetişkinlerde (konjenital immün yetmezliği veya organ transplantasyonu), uzun süreli diare gözlemlenebilir. Buna karşılık Brezilya'da HIV ile enfekte olan veya olmayan çocuklar arasında diarenin şiddeti açısından bir farklılık bulunmamıştır. Doğal enfeksiyon, yanlış aşılama veya ağır kombine immün yetmezlikli (severe combined immunodeficiency; SCID) çocuklarda kronik RV enfeksiyonu ve hastalığı gelişebilir. RV'ler kronik olarak enfekte olan çocuklarda genomun yeniden düzenlenmesine (reassortment) bağlı olarak alışılmadık RNA dağılımı gösterirler ⁽¹⁰⁵⁾.

2.14 Laboratuvar tanısı

Laboratuvar tanısı için en yaygın kullanılan yöntem doğrudan dışkı örneğinde RVA grup antijenini (VP6) tespit eden enzim immünoassay (EIA veya ELISA)'dir. Lateks aglutinasyon testleri genellikle hastanelerde düşük maliyetli, hızlı ve kullanımı kolay olduğu için tercih edilir, ancak duyarlılıkları ve özgüllüğü EIA'lere kıyasla daha

düşüktür. Revers transkripsiyon ardından nested/multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi ile moleküler tanı RVA'nın eş zamanlı olarak tiplendirme avantajına sahiptir. Mikroarray gibi genetik sekans ve RT-PCR (RT-qPCR) yöntemleri çok hassas ve miks RVA enfeksiyonlarını ayırt etme kabiliyetine sahiptir. Keşfinden bu yana RT-PCR tanı için altın standarttır. Nokta mutasyonları sebebiyle devam eden genomik drift'den dolayı genotipleme için kullanılan primerler periyodik olarak değiştirilmek zorundadır. Hastalık sebeplerinin ayırıcı tanısı için başlıca düşünülebilecek viruslar insan calicivirus (norovirus, sapovirus), astrovirus ve daha az olasılıkla enterik adenovirus ve aichivirus'dur. Bu virusların çoğu multipleks RT-PCR ile araştırılabilir. Bağırsağı enfekte eden ve çoğunlukla asemptomatik olarak kalan diğer viruslar ise farklı enteroviruslar, immun sistemi zayıf olanlarda picabirnavirus, cytomegalovirus ve HIV'dir. Hindistan'da 2003-2004 yılları arasında Vellore'deki çalışmalarda 19 semptomatik ve 20 asemptomatik yeni doğandan izole edilmiş G10P[11] genomuna sahip RV izolatları dideoksinükleotit (Sanger) yöntemiyle belirlenmiş ve ileri nesil sekanslama yöntemi ile bu suşların hemen hemen benzer oldukları bulunmuştur. Bu oldukça önemlidir, çünkü asemptomatik veya semptomatik enfeksiyon arasında ilişki kurabilecek nükleotit veya aminoasit (aa) farklılıkları bulunamamıştır. Sonuç olarak diğer önemsiz görülen faktörler klinik semptomların şeklini belirleyebilir^(74, 90, 106).

2.15 Tedavi

RVA enfeksiyonuna karşı spesifik bir antiviral ajan yoktur. Başlıca tedavi yöntemi oral ya da intravenöz rehidratasyondur. Oral rehidratasyon tuzlarının (oral rehydration solution; ORS) çeşitli kombinasyonları geliştirilmiş olup pirinç temelli solüsyonular başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Loperamidinin, antikolinergik ilaçların ve adsorbentlerin kullanımı tavsiye edilmez. RV enfeksiyonundan sonra uyarılan enterik sinir sistemini baskılayan bir encefalinaz inhibitörü olan rececadotril'in, serotonin reseptörüne ve vazodilatör intestinal peptidlere karşı olan granisetron'un ciddi akut diarenin azaltılmasında faydalı olduğu bildirilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda RV antikoru içeren oral solüsyonların terapötik ve koruyucu olarak faydalı olduğu tespit edilmiştir. Son zamanlarda RV VP6'ya özgü lamadan üretilen tek zincirli antikor fragmentlerinin, in vitro ortamda geniş ölçüde çapraz reaksiyona sebep olduğu ve enfekte olmuş farede virusun yayılımını azalttığı gösterilmiştir. Bu antikorların

gnotobiyotik domuzlarda RV replikasyonunu azaltmada etkili olduğu, insandaki RV enfeksiyonları üzerine ise orta derecede yararlı bir etkisi olduğu bildirilmiştir. Bu antikor fragmentleri yalnızca 15kDa büyüklüğünde, saklandığında uzun bir dönem boyunca aktif olarak kalabilen (>1 yıl) ve 94°C sıcaklığa 90 dk dayanabilen antikorlardır. Lama antikor fragmentleri transgenik pirinçler (MucoRice-ARP1) ile yüksek miktarlarda eksprese edilmiştir. Pilot çalışmada antikorlar immun sistemi tam ve immun sistemi zayıf iki farede de viral yükü bastırmış ve aynı zamanda RV enfeksiyonundan korumuştur^(107, 108).

Bu ve benzer şekilde hazırlanan antikorlar insanlarda profilaktik ve terapötik olarak kullanım potansiyeline sahiptir. Gnotobiyotik domuzlarda yararlılığı ispatlanmış probiyotikler ve geniş spektrumlu antiviral nitazoksanid diğer terapötik yaklaşımlardır. Rossignol ve arkadaşları nitazoksanid'in (Brezilya'daki marka ismi Annita®) yetişkinlerde viral gastroenterit kontrolünde önemli bir rol oynayabileceğini ve RVA'ya karşı iyi etkinlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Kim ve arkadaşları⁽¹⁰⁹⁾ triacsin C analoglarının RVA ile mücadelede güçlü antiviraller olarak rol oynayabileceğini bildirmişlerdir. Brezilya'da son zamanlarda medikal bitkiler in vitro olarak test edilmektedir. Araştırılan türler arasında Byrsonima verbascifolia, Eugenia dysenterica, Hymenaea courbaril ve Myracrodruon urundeuva RVA enfeksiyonuna karşı potansiyel bir antiviral aktivite göstermiştir^(90, 109, 110).

2.16. Moleküler epidemiyoloji ve evrim mekanizması

Rotavirus 5 yaş altı çocuklarda ve infantlarda AGE vakalarının %5-10'undan sorumludur. RV enfeksiyonlarının %30'u için hastanelerde ve sağlık ocaklarında ciddi bir tedaviye gerek duyulmaz. Aşıdan önce Amerika'da RV'ler yılda 3 milyon insanın hastalanmasına, 500.000 hastanın bir doktor tarafından muayene edilmesine ve 60.000 kişinin hastaneye yatırılmasına sebep olmuştur, ancak yalnızca 20-40 kişi hayatını kaybetmiştir. Benzer rakamların Avrupa içinde geçerli olduğu görülmüş, yalnız farklı olarak yaklaşık 200 kişi kaybedilmiştir. Afrika'da aşağı Sahra'da ve benzer şekilde güney Asya şehirlerinde RV enfeksiyonu yüksek mortalite ile ilişkilidir. RV'lerin çok bulaşıcı olmasının sebepleri arasında; az sayıda (10 kadar) virus partikülünün savunmasız bireyde enfeksiyon oluşturmak için yeterli olması, rotavirus partiküllerinin enfeksiyonun akut fazı esnasında dışkı yoluyla (10^{10} /ml den fazla) yüksek miktarlarda

atılması ve viral partiküllerin çevre koşullarına (sıcaklık, pH) çok dirençli olması sayılabilir⁽¹³⁾.

Temelde RV hastalığından sorumlu olan grup A rotavirus enfeksiyonları fomit ve kontamine nesnelerle kişiden kişiye temas da dahil olmak üzere fekal-oral yolla bulaşır. Kontamine su veya gıdaların tüketilmesi yoluyla bulaş bildirilse de nadiren ortaya çıkar. İdrar örneklerinde ve üst solunum yollarında RVA tespit edilmesine rağmen bu vücut sıvıları genellikle RVA yayılımı ile ilişkili değildir. Kreşlere gidilmesi semptomatik RV enfeksiyonu oluşumunda risk faktörüdür. Yaşlı insanlar arasında (huzur evleri, geriatrik bölümler) küçük çapta RV epidemileri gözlemlenmiştir. Çin’de gözlemlenmiş olan AGE salgınına B tipi RV’ler sebep olmuştur, ayrıca spodik B tipi RV enfeksiyonları Hindistan’da ve Bangladeş’te görülmüştür. RVC enfeksiyonları asemptomatiktir ve klinik olarak hafif seyreder, ancak yetişkinlerde diareye sebep olabilir. RVD, RVF ve RVG enfeksiyonları başlıca kuşlarda görülür. RVH enfeksiyonu domuzlarda ve insanlarda tespit edilmiştir. RV’lerin antijenik çeşitlilikleri ve büyük bir genomu olmasına rağmen geçtiğimiz 30 yıl içinde küresel çapta az sayıda rotavirus tipi insanlar arasında yayılmıştır; G1P1A[8], G2P1B8[4], G4P1A[8] ve son zamanlarda daha fazla G9P1A[8], G12P1[8] sıklıkla izole edilmiştir. Avustralya, Avrupa ve Kuzey Amerika’daki tüm RV enfeksiyonlarının %80-90’ından bu tipler sorumludur. Aksine Afrika, Asya ve Güney Amerika’da G5, G6 ve G8 gibi diğer genotipler yaygındır. RT-PCR ile RV genotiplerinin belirlenmesi RV’ler ile ilgili kapsamlı moleküler epidemiyolojik çalışmalara olanak sağlamıştır. Genotipleme insan, memeli ve kuşlardaki RV’lerin evriminin ve epidemiyolojik yollarının değerlendirilmesinde büyük bir öneme sahiptir. RV’lerin evrimi cDNA sekanslama ile desteklenen tüm genomu kapsayan RT-PCR genotipleme sayesinde aydınlatılmıştır^(111, 112).

Temelde RVA iki ana mekanizma yoluyla farklılaşır ve gelişir. Birincisi genetik soyları ortaya çıkaracak ve önceden var olan antikorlardan kaçabilecek mutantların ortaya çıkmasına sebep olacak olan nokta mutasyonlarının birikimidir. İkinci mekanizma “shift” olup tek bir hücrenin iki veya daha fazla farklı RVA tipi ile enfeksiyonu sırasında genetik reassortment tarafından genetik materyalin değiştirilmesidir. Hayvan ve insan RVA arasında reassortment meydana gelebilir, bu da her iki RVA’nın genomik segmentlerini taşıyan kimerik viruslar meydana getirir. RVA’nın türler arası bariyeri aştığı söylenir, ancak bunu yaparken virus yeni konağı

etkili bir şekilde enfekte edemez ve yayılamaz. Bununla birlikte insan rotavirus segmentleri kazanıldığı zaman bu kimerik virusların insan popülasyonu arasında verimli bir şekilde yayılma şansı artacaktır. Dolayısıyla hayvan ve insan RVA arasındaki zoonotik yayılım ve gen segment reassortment'ı insanlara bulaşan suşların çeşitliliğinin artmasına katkıda bulunmaktadır. RVA reassortment oluşumu için önemli bir faktör yüksek enfeksiyon sıklığıdır. Gelişmekte olan ülkelerde ko-enfeksiyon oranı (yaklaşık %20) gelişmiş ülkelere oranla (yaklaşık %5) daha yüksektir. Bu durum atipik suşların saptanma sıklığının gelişmekte olan ülkelerde neden daha yüksek olduğunu da açıklayabilir. Dünyada yaygın olmayan G veya P tiplerinin epidemiyolojik olarak önemli olabilecekleri konusundaki veriler artmaktadır. Buna karşılık hangi suşların küresel olarak yayılabileceğini tahmin etmek oldukça zordur. G9P[8] suşu bu tür yayılımın yeni bir örneğidir, çünkü ilk tespit edildiğinde nadir görülürken bugün dünya üzerinde sirküle olan suşlar arasında dominant bir konumdadır. Yakın geçmişte bazı raporlar G12 genotipinin tespitinde artış olduğunu göstermiştir, bu da muhtemelen global olarak baskın hale gelecek sıradaki suşun G12 genotipi olacağını düşündürmektedir. Filogenetik kanıtlar bu iki suşun - G9 ve G12 - muhtemelen domuz kökenli olduğunu ve gen reassortment'ına dayalı olarak insanlara bulaşmaya başladığını göstermektedir ⁽¹¹³⁾.

2.17. Rotavirusun küresel sürveyansı

Bütün dünyada rotavirus aşısının kullanımı artmaya devam etmekte olup küresel rotavirus sürveyans çalışmaları da sürmektedir. Rotavirus sürveyansının faydası farklı bölgelerdeki serotip dağılımının izlenmesi ve yeni ortaya çıkan rotavirus suşlarının tahmin edilebilmesidir. Rotavirus sürveyans programlarının bir diğer rolü aşılamanın rotavirus enfeksiyon oluşumu ve ölümün azaltılması üzerindeki etkisini değerlendirmek, ayrıca rotavirus dışındaki diare etkenlerini belirlemektir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2008 yılından itibaren akut diarezi olan çocuklarda rotavirus enfeksiyonunun klinik özellikleri ve laboratuvar test verileri hakkında bilgi toplanmaktadır. DSÖ 2013 yılında sürveyans ağının performansını değerlendirmiş ve ağı kullanan tüm DSÖ üyelerinin diğer aşıyla önlenebilir hastalıklar için sürveyans oluşturmak amacıyla sistemden faydalanmasını tavsiye etmiştir. Bu protokol ilk olarak Asya'da uygulanmış ve daha sonra Latin Amerika, Akdeniz bölgesi, Avrupa ve Afrika da dahil olmak üzere birçok

ülke ve bölgeye genişletilmiştir. Bu global sistemler tarafından 2011 ve 2012 yılları arasında 37 ülkeden gelen veriler toplanmıştır. Çeşitli bölgesel sürveyans sistemlerinden toplanan verilerin güvenilirliği artırılarak ve geçerliliği sağlanarak standart hale getirilmiştir. Ayrıca bu modelin uygulanmasıyla rotavirus sürveyans sisteminin sürdürülebilirliği geliştirilmiştir. Rotavirus sürveyansının bir parçası olarak sirkülasyondaki rotavirus suşlarına ilişkin toplanan bilgiler aşı geliştirme, yeni viral suşların belirlenmesi ve aşı etkinliğinin değerlendirilmesi için değerli bir kaynaktır. Ek olarak bu veriler aşılama programının uygulanmasından sonra sirkülasyondaki rotavirus suşlarının izlenmesi için faydalı olacaktır. Önceki çalışmalar küresel çapta sirkülasyonda olan en yaygın rotavirus VP7 serotiplerinin G1, G2, G3, G4 ve G9 olduğunu göstermektedir, en yaygın VP4 genotipleri ise (%70-90) P[8], P[4], P[6]'dır. Yine sirkülasyonda olan en yaygın G/P kombinasyonları G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] ve G9P[8]'dir. Daha önceki çalışmaların aksine Tayvan'da tanımlanan en yaygın VP7 serotipleri G1 (%40) ve ardından G3 (%27), G9 (%18) ve G2 (%8) dir. En yüksek rotavirus çeşitliliği Afrika ve Asya bölgelerinde bulunmaktadır. Bu yüksek çeşitliliğin olası sebepleri arasında çoklu rotavirus suşları ile oluşan miks enfeksiyonların yaygınlığı ve aktif virus yayılımının olduğu evcil hayvanların yakınında ikamet etmek yer almaktadır. Coğrafyanın farklılıklarına ek olarak dominant sirküle olan suşların genotipleri mevsime göre de farklılık gösterebilir. Yeni G9 ve G12 rotavirus suşları son birkaç yılda oluşmuş ve yayılmıştır. Aynı dönem içerisinde rotavirusun farklı serotiplerinin aynı bölgede sirkülasyonu mümkündür. Sirkülasyondaki rotavirus suşlarının kalıcı olarak izlenmesi rotavirus hastalığının moleküler özelliklerini ve rotavirus aşısının etkinliğini belirlemek için halen kritik bir öneme sahiptir ^(114, 115).

2.18. Rotavirusun türler arası yayılımı ve zoonotik potansiyeli

Memeli türleri arasında RVA yayılım kapasitesi 1980'lerde gösterilmiştir. Castrucci ve arkadaşları buzağuların sığır RVA ile enfekte olmuş tavşanlardan bulaş ile RVA enfeksiyonuna duyarlı olduklarını göstermiştir. Buzağuların simian, domuz veya leporid orijinli RVA enfeksiyonuna eşit derecede duyarlı olduğu belirlenmiştir. Sığır RVA atılımı köpekler ve kedilerde tespit edilmiş ve memelilerden kuşlara RVA yayılımı belgelenmiştir. Moleküler biyolojinin ortaya çıkışı dünyanın farklı bölgelerinde

insanlara bulaşan hayvan RVA suşlarının identifiye edilmesine olanak sağlamıştır. G3P[3] (Ro1845 ve HCR 3A) genotipine ait insan RVA suşlarının tam genoma ait dizi analizi bu suşun köpek (CU-1; K9 ve A79-10) ve kedi RVA'sı (Cat 97) ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. At RVA'nın insan ve domuz RVA ile çok yakın genetik ilişki içerisinde olduğu bilinmektedir. G3 (kedilerde, köpeklerde, domuzlarda ve atlarda yaygın), G5 (domuzlarda ve atlarda yaygın), G6, G8, G10 (sığırlarda yaygın) ve G9 (domuzlarda ve koyunda yaygın) RVA suşları dünyanın farklı bölgelerinde insan popülasyonlarında tanımlanmıştır. Domuz G4, G5, G6 ve G8 genotiplerinin insanlar, buzağılar ve develer arasında sirkülasyonda olduğu bulunmuştur. Bu veriler domuzların, insanlar ve diğer hayvanlar için ortaya çıkan RVA suşların kaynağı ve rezervuarı olabileceğini düşündürmektedir. Elde edilen bilgiler göz önünde bulundurularak RVA potansiyel zoonotik patojenler olarak düşünülmelidir. Ana zoonotik transmisyon aracı insanlar ve hayvanlar arasındaki yakın temastır. Bu tür bulaş enfekte hayvanların dışkılarıyla su depoları veya gıdaların kontaminasyonu ile gerçekleşir. Bununla birlikte RVA zoonozları üzerine yapılan çalışmalar önemli ölçüde kısıtlıdır. İnsan ve hayvan vakaları arasında epidemiyolojik ilişki bulunmamaktadır. Bu sebeple belirli bir RVA suşunun zoonotik yönünün çalışılması sadece filogenetik kanıtlara ve belirli bir konadaki spesifik bir genotipin insidansı ile ilgili mevcut verilere dayanılarak teyit edilir ⁽¹¹⁶⁾.

2.19. RV aşıları

Rotavirus aşısının başlangıçtan itibaren geliştirilmesindeki hedef, global mortalitenin ve gelişmiş ülkelerdeki yüksek morbiditenin önlenmesidir. Hayvan modelleri üzerine yapılan araştırmalar ile RV hastalığına karşı korunmanın, RV'ye spesifik immün yanıt ürünlerinin (antikorlar, T hücreleri) pasif olarak aktarılması veya aşılama yoluyla gerçekleştirilebileceği belirgin bir şekilde ortaya çıkmıştır. Primer RV enfeksiyonu çoğunlukla hayatın ilk yıllarında ortaya çıkar ve genellikle semptomatiktir. RV ile reinfeksiyonlar 2-3 yaşlarında sıktır, ancak nadiren AGE eşlik eder (enfeksiyon orijinal enfeksiyonunkinden farklı olan G/P genotipli RV'ler tarafından meydana geldiğinde dahi). Tekrarlanan doğal enfeksiyonlardan sonra elde edilen koruma, serumda ve daha da önemlisi bağırsakta RV IgA antikorlarının varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Bu sebeple insanlarda RV enfeksiyonu sıklıkla aşı ile önlenabilir

olarak kabul edilir. Hücre kültüründe üretilen canlı atenüe bir rotavirusu oral aşı için kullanmak geleneksel bir yöntemdir. Oral bir aşının bağırsaktaki vahşi tip rotavirus enfeksiyonunun sebep olduğu doğal bağışıklığı en iyi şekilde taklit ettiği düşünülmektedir. Ciddi hastalıklardan korunma ile sonuçlanan tekrarlayan doğal enfeksiyonların taklitine uygun gözüktüğü için başlangıçta canlı atenüe aşılar geliştirilmiştir. İnsan rotavirüsleri birkaç yıldan sonra doku kültüründe üretilemediğinden olası aşı adayları olarak heterolog hayvan rotavirüsleri araştırılmıştır. Finlandiya'da canlı-atenüe sığır RV aşısı (RIT 4237 suşu) ile ilgili başlangıçtaki umut verici sonuçlar, gelişmekte olan ülkelerdeki uygulamalarda elde edilemedi ve bu aşı adayı üzerine yapılan çalışma durduruldu. Bir başka sığır RV olan WC3 suşu ve bir simian RV olan RRV suşularının monovalan formları benzer şekilde etkisiz bulunmuş veya değişken etkinlik göstermiştir ^(74,100).

2.19.1. İlk aşı: Sığır rotavirus aşısı

Sığır rotavirusu NCDV (Nebraska Buzağı İshal Virüsü) 1971'de izole edildirmiştir. Hücre kültürüne adapte edilmiş ve 154'üncü pasaj seviyesinde median doku kültürü enfektif dozu en az 10^8 (doz/mL) gibi yüksek bir titrede kültürü yapılabilmiştir. Pasajdan sonra NCDV suş ismi RIT4237 olarak değiştirilmiştir. İnsan rotavirüslerine karşı çapraz koruma sağlandığı gnotobiyotik domuzlarda yapılan çalışmalarda gösterildikten sonra insan denemeleri başlatılmıştır. Finlandiya'da 1982'den 1986'ya kadar yetişkinlerde faz I çalışmalarından başlayarak bebeklerde etkinlik denemelerine, hızla ilerleyen birçok insan deneyleri gerçekleştirilmiştir. Analiz edildiğinde RIT4237 aşısının tek oral dozunun kış mevsimindeki rotavirus sezondan kısa bir süre önce verilmesinin etkin bir şekilde (%90) ciddi rotavirus gastroenteritini önlediği bununla birlikte daha hafif vakaların meydana geldiği ve toplam etkinliğinin yaklaşık %50'den fazla olduğu sonucuna varılmıştır. Aşının etkinlik ölçütünün son noktasının herhangi bir RVGE'den (rotavirus gastroenteriti) ziyade ciddi gastroenterit olması gerektiği fikri kademeli olarak kabul edilmiştir, ancak ciddi RVGE'ye karşı etkinlik şu anda rotavirus aşısı etkinliğinin başlıca göstergesidir. Bununla birlikte "ciddi" RVGE tanımı açık değildir. Finlandiya'daki rotavirus aşısı çalışmalarında RVGE şiddetini değerlendirebilmek için 1-20 puanlık bir sayısal skor geliştirilmiştir. "Vesikari skoru" olarak adlandırılan bu puanlama sistemi çoğunlukla klinik araştırmalarda rotavirus

aşısının etkililiğini ölçmek için uygulanmıştır. Şiddetli ile daha az şiddetli veya hafif arasında kesin bir ayırım olmasa da şiddetli RVGE'yi belirtmek için sıklıkla 11/20 skoru kullanılmıştır. Finlandiya'da sığır rotavirus aşısı RIT4237'nin başlangıç çalışmalarında birçok farklı temel gözlem yapılmıştır. Mide asiditesine karşı tamponlama gereksinimi, anne sütü veya beslenmeden kaynaklanan supresyonun eksikliği bunlar arasındadır. Oral poliovirus aşısının kullanıldığı İtalya ve Yugoslavya'daki çalışmalar poliovirus aşısı ve oral rotavirus aşısı arasında olumsuz etkileşim olduğunu göstermiştir ^(117, 118).

2.19.2. Rhesus-human reassortant rotavirus aşısı

RRV tabanlı kuadrivalan insan reassortant aşısı bir kaç büyük çaplı faz III çalışmasında etkili olmuştur. Bu sonuçlara dayanılarak aşı lisans almış ve 1998'de RotaShield® (Wyeth Lederle Aşıları) adı altında üretilmiştir. ABD'de 1998-1999 arasında 1 milyondan fazla çocuğa evrensel aşılama programı (universal mass vaccination; UMV) uygulanmıştır. Rhesus rotavirus (RRV) alternatif heterolog rotavirus aşı adayı (büyükbaş hayvan)olarak ortaya çıkarılmıştır. RRV'nin avantajı insan bağırsağında etkili bir şekilde çoğalması ve güçlü bir bağışıklık yanıtı oluşturmasıdır. Buna karşılık dezavantaj olarak sığır rotavirusu ki insanlara karşı zararsızdır ancak çok daha fazla reaktogeniktir; RRV yüksek oranda febril reaksiyonlara sebep olur ve bu olay aşı uygulandıktan 3-5 gün sonra viral çoğalmanın tepe noktası ile çakışır. Rhesus rotavirus tek başına Finlandiya veya ABD'de önemli bir koruyucu etkinlik göstermemiştir ⁽¹¹⁸⁾.

Ardından RRV, G tiplerinden G1, G2 ve G4'ü temsil eden insan rotavirus VP7 proteinleriyle birleştirilmiştir. Zayıflatılmış RRV (G3P7[5]) suşunu ve RRV suşunun diğer 10 RNA segmentini genetik olarak arka planda bırakıp, insan G1, G2 ve G4 genotiplerinin VP7 kodlayan genlerini bulunduran mono-reassortant'ları içeren bir karışımından oluşan kuadrivalan aşı geliştirilmiştir. RRV'nin 3 G-tipi ile (rhesus olmasına rağmen) oluşturulan kombinasyon "tetraavalan (TV)" veya RRV-TV aşısı olarak adlandırılır. Üç dozda verilen RRV-TV daha sonra Wyeth, Pearl River, NY, ABD'de RotaShield olarak lisans almıştır ve ABD'de, Finlandiya'da ve ayrıca Venezuela'da şiddetli RVGE'ne karşı oldukça etkili olduğu saptanmıştır. ABD'de 1998'de yapılan çalışmalar RotaShield'in lisans almasına olanak tanımıştır. RRV-TV'nin etkinliği RRV ile karşılaştırıldığında genellikle insan G-türüne özgü immünite ile

ilişkilidir. Buna karşılık bu açıklama çoğunlukla doğru görünmemektedir, çünkü üç doz RRV-TV'den sonra genel immün yanıt oranı %100'e yakınken, G-tiplerinin her birine karşı nötralize edici antikor yanıtı genellikle düşüktür. RRV-TV ile ilgili daha makul bir açıklama, monotipik RRV'nin aksine RRV-TV her bir doz alımında farklı G tiplerine karşı bir şans elde edilmesini ve sonuç olarak genel bağışıklığa katkıda bulunulmasını sağlar. Rotavirus serum IgA tarafından enzim immunoassay kullanılarak VP6 grup antijenine karşı oluşan antikorlar ile ölçüldüğünde yüksek düzeyde rotavirus IgA ile koruyucu etkinlik arasında anlamlı bir korelasyon bulunmaktadır ⁽¹¹⁹⁾.

RotaShield lisansdan sonra bir yıldan kısa bir süre içinde 1999 yılında bağırsağın bir bölümünün takip eden bağırsak segmenti içine girmesi olan intussusepsiyon ile bağlantısı sebebiyle geri çekilmiştir. Sonraki araştırmalarda aşının intestinal intussusepsiyon sebebiyet riskinin yaklaşık 1:2500 olduğu tahmin edilmiştir. Bağırsakta aşıya bağlı intussusepsiyon riskinin büyüklüğü üzerine önemli bir tartışma başlamıştır. İntussusepsiyon lisans çalışmaları öncesinde gözlemlenmiştir, ancak bu gözlem ABD'de yaklaşık olarak bir milyon aşı uygulanmasına ve bunların içerisinde 100 olgu görülene kadar tam anlamıyla ilişkilendirilememiştir. Tipik olarak intussusepsiyon vakalarının çoğu 1.doz'dan 3-7 gün sonra ortaya çıkmakta olup, virusun çoğalmasının ve febril reaksiyonların pik yaptığı zaman ile çakışmaktadır. İntussusepsiyon vakalarının çoğunluğu ABD'de başlatılan "tarama" programının bir parçası olarak RRV-TV'nin ilk dozu 3-9 aylık bebeklere uygulandığında ortaya çıkmıştır. Bu yaş aralığında doğal olarak meydana gelen intussusepsiyon indidansının pik noktası ile benzer olduğu tespit edilmiştir. Nitekim 3 aydan küçük bebeklerde RotaShield'den sonra meydana gelen intussusepsiyon riski düşük bulunmuştur. Rhesus rotavirus-TV'nin ikinci bir şansı olabilir. İntussusepsiyonun bir risk faktörü olarak değerlendirilmesinde yaşın önem kazanması ile aşı kısa bir süre önce Gana'da 1-29 günü ve 30-59 günü takiben iki doz uygulanarak test edilmiştir. Böyle bir programın ardından elde edilen ilk veriler aşının Afrika'da hem güvenli hem de etkili olabileceğini göstermektedir ^(118, 120).

2.19.3. İnsan rotavirus G1P[8] aşısı

İnsan rotavirusu G1P[8] aşısı Cincinnati'de hücre kültüründe üretilen bir klinik izolattan türetilmiştir. Hücre kültüründe seri pasajlama yöntemi ile zayıflatılmış insan RV izolat 89-12'den türetilen oral canlı atenüe monovalent (G1P1A[8]) aşı adayıdır. İlk

aşı adayı olarak etkili olabileceği gösterilmiştir, ancak yine de biraz reaktogeniktir ve düşük seviyede ateşe bazen de diyareye sebep olmuştur. Glaxo Smith Kline Biologicals (Rixensart, Belçika) tarafından edinilen bilgilerden sonra aşı suşu klonlanmış (iki plak varyantı içerdiği gösterildi), Rixensart'ta 12 den fazla kez pasajlanarak RIX4414 olarak isimlendirilmiş ve 2005 yılında infantların küresel ölçüde aşılınması için Rotarix adıyla ruhsatlandırılmış ve o tarihten bu yana dünyadaki pek çok ülkede kullanılmaktadır. Glaxo Smith Kline tarafından “Rotarix®” olarak üretilir ve RV1 olarak da adlandırılır. İnsan rotavirus G1P[8] suşu ile oluşturulan bu aşının mantığı en yaygın insan G tipi ve P tipi rotavirüslerle karşı serotip spesifik bağışıklığı indüklemektir. Aşı 2 doz halinde 2. ve 4. aylarda oral olarak verilir. Aşılınmaya 6-12 haftada başlanması ve ilk dozun en geç 15. haftaya kadar yapılması önemlidir. Aşılama 24. haftaya kadar tamamlanmalıdır. Güvenlik açısından bakıldığında bu insan rotavirus aşısının intussusepsiyona sebep olabileceği düşünülmemiştir, çünkü vahşi tip insan rotavirüsü intussusepsiyon ile ilişkili bulunmamıştır⁽¹¹⁸⁾.

Hücre kültürüne uyarlanmış RIX4414 suşu doğal olarak diare oluşturma potansiyelini kaybetmesi sebebiyle vahşi tip G1 rotavirüse kıyasla daha iyi attenüe edilmiştir, ancak insanlar için yüksek enfektivite özelliği korunmuştur, aşının intussepsiyon oluşturma potansiyelinin gerçekte vahşi türe ait olanlardan farklı olup olmadığı bilinmemektedir. Finlandiya’lı 2 aylık bebeklerde yapılan erken faz I-II çalışmalarda RIX4414’nın ilk dozu %88 oranında rotavirus IgA antikorı yanıtını indüklemiş ve ikinci doz serokonversiyonu %96’ya yükseltmiştir. Bu arada titre geometrik ortalaması artmamıştır. Bu sebeple ikinci doz antikor titresinde yükseltici bir etki oluşturmamıştır, ancak etkin bir şekilde başarılı olan birinci doz ikinci dozun alınmasını önleyen bir bağışıklık yanıtı oluşturmıştır. Yani 2. Dozun bu etkisi aşıya bağlı serotip spesifik anti-G1 antikorları tarafından engellenmiştir. RIX4414’ün immünojenik aktivitesi 10^4 - 10^6 doz aralığında aşı titresine bağlıdır. RIX4414’ün Latin Amerika ve Güney Afrika’daki kullanım oranları Finlandiya’dan daha düşük bulunmuştur, bunun sebebi muhtemelen aşılama sırasında anneden kazanılan yüksek seviyedeki anti-G1 rotavirus antikorlarıdır. Bu bölgelerdeki düşük immünojeniteyi gidermek için Rotarix aşısının son titresini 105.3 PFU/mL’ye ayarlanmıştır. RIX4414 aşısı virusunun dışkı ile etkili bir şekilde atılması, virusun bağırsaklarda etkin bir biçimde çoğaldığını göstermektedir. İlk dozdan sonra alıcıların yaklaşık %60’ı enzim

immünoassay ile incelendiğinde aşı virusunu dışkı ile attıkları belirlenmiştir, ancak ikinci dozdan sonra hemen hemen hiç atılma gerçekleşmemektedir ⁽¹²¹⁾.

Virusun dışkı ile atılımı IgA eksikliği gibi immün yetersizlik durumlarında uzayabilir. Aşı virusunun bulaşması olabilir ancak bu nadir bir olaydır. Yüksek doz alımından beklendiği gibi Avrupa'daki klinik çalışmalar Rotarix'in aşılama sonrası sonraki ilk yılda yüksek derecede bir koruyucu etkiye sahip olduğunu, ikinci yılda biraz daha az koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Asya'daki bir araştırmada da iki yıl boyunca devam eden bir etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Buna karşılık Güney Afrika ve Malawi'de olduğu gibi Vietnam ve Bangladeş'te de aşı etkinliği büyük oranda aşılandıktan sonraki ilk yıl ile sınırlandırılmıştır. İki rotavirus mevsimi boyunca birkaç rotavirus tipi için yapılan Avrupa etkinlik araştırmasında bu "monovalent" aşının serotipe spesifik koruma üzerindeki etkisi tanımlanmıştır. Büyük çaptaki faz III klinik araştırmasında aşı, homolog RV suşunun sebep olduğu ağır RV enfeksiyonlarına ve ayrıca G3P[8], G4P[8] gibi heterolog suşlara karşı oldukça etkili olduğu daha az oranda da heterolog G2P[4] suşuna etki ettiği bulunmuştur. Genel olarak ciddi RVGE'ye karşı Rotarix tarafından oluşan korumanın rotavirus G tipleri arasında benzer olduğu saptanır iken en yüksek G1P[8] (%90) ve en düşük G2P[4] (%58) olmak üzere RVGE'ne karşı oluşan korumada bir miktar farklılık tespit edilmiştir ⁽¹²²⁾.

Yapılan gözlemler homotipik aşı tarafından uyarılan G1 spesifik bağışıklığın genel korumada yalnızca küçük bir rol oynadığını düşündürmektedir. Ciddi RVGE'ye karşı oluşan koruyucu etkinin çoğu Rotarix'in G ve P tiplerinden bağımsız olmakla birlikte burada hayati önemi olan antijen, rotavirusta en bol bulunan ve en immünojenik protein olan VP6 olabilir ve RVGE'ye karşı korunmayı sağlayan serum IgA antikorlarını indüklüyor olabilir. Bu sebeple monovalan insan rotavirus aşısı yalnızca Avrupa'da değil Afrika'da da birçok serotipin sebep olduğu ciddi RVGE'nin önlenmesinde son derece başarılı olabilir. G2P[4] suşu korunmada bir boşluğu göstermektedir. Bu suş sadece farklı G ve P serotipleri içermekten ziyade sirkülasyonda olan diğer insan rotaviruslarından biraz farklı olan VP6 sub tipine sahiptir. Brezilya'da ulusal immünizasyon programında Rotarix'in yaygın şekilde kullanılmasına rağmen korunmanın eksikliği G2P[4] rotavirusların sürekli sirkülasyonda olması ile ilişkilidir ⁽¹¹⁸⁾.

2.19.4. Sığır-insan reassortant rotavirus aşısı

Sığır-insan reassortant pentavalan aşının (RV5, RotaTeq, Merck, Whitehouse Station, NJ, ABD) yapısında sığır rotavirus WC-3 suşu kullanılır ve buzağı rotavirusunun düşük pasaj seviyeli izolatu olup 1980'li yıllarda aday aşısı olarak kullanılmıştır. İnsan rotavirus tip G1 den G4'e VP7'yi ve insan tip P[8]'de VP4'ü kodlayan genleri tek tek taşıyan beş mono-reassortant için RV WC3 suşu (G6P7[5]) kullanılarak bir pentavalan oral canlı attenüe aşısı geliştirilmiştir (Merck tarafından 'RotaTeq®' olarak üretilmiştir, ayrıca RV5 olarakda adlandırılır). Reassortment'ın orijinal fikri RRV-TV aşısı gibi ilgili rotavirus tiplerine karşı koruma sağlamak için G ve P serotipe spesifik nötralize edici antikor yanıtını uyarmaktır. Bununla birlikte pratikte ve RRV-TV aşısından farklı olarak serotipe spesifik nötralize edici antikor yanıtı düşüktür ve bu sebeple aşının koruyucu etkisinin çoğundan sorumlu olmayabilir. Bundan farklı olarak aşısındaki çoklu serotipler tekrarlanan dozların alımına ve sağlam çapraz koruyucu bağışıklık oluşturulmasına izin verebilir; bu muhtemelen VP6 grup antijenine karşı oluşmuş yüksek seviyedeki serum IgA antikorlarıdır. Bu sebeple monovalan aşıya kıyasla RV5'in esas avantajı üç doz olarak başarıyla verilmesi ve IgA antikorlarının seviyesinin artırılması olasılığı olabilir. Rotateq aşısı 2, 4 ve 6 aylık bebeklere oral olarak uygulanır. Aşının ilk dozunun en geç 15. haftaya kadar uygulanması önerilir ve aşılama 32. haftaya kadar tamamlanmalıdır. Farklı aşısı kompozisyonları karşılaştırılan RV5'in ön etkinliği ve doz ayarlama çalışmaları sadece P[8] reassortantı içeren monotipik bir aşının, tetravalan ve pentavalan kompozisyonlara göre daha düşük etkinliğinin olduğunu göstermiştir. Bunun sebebi tek tip içeren reassortant aşının tekrarlanan dozların alınmasına izin vermemesi olabilir. Bu aşısı da çok başarılı bir faz III klinik araştırması geçirmiştir ve 2006 yılından itibaren dünya çapında birçok ülkede ruhsatlandırılmıştır. RotaTeq'in etkinliği, ağırlıklı olarak Avrupa'da (çoğunlukla Finlandiya'da) ve ABD'de yürütülen Rotavirus Etkinlik ve Güvenlik Çalışması (Rotavirus Efficacy and Safety Trial; REST) adlı büyük bir çalışmada gösterilmiştir⁽¹²³⁾.

Primer hedef bireylerin RVGE sebebiyle hastaneye kaldırılmasına veya acil servis'e başvurulmasına karşı etkili olmasıdır. Bu son kombinasyonun aşısı etkinliği %95 olarak bulunmuş ve Finlandiya'da uzun süren bir gözlemle bu etkinliğin 3.1 yıla kadar devam ettiği tespit edilmiştir. Daha yakından izlenen bir alt grupta ciddi RVGE karşı

%100 ve takipteki ilk yılda tüm RVGE'ye karşı %72 oranında etkinlik tespit edilmiştir; İkinci yılda ciddi RVGE'ye karşı etkinlik %94 oranında devam ederken tüm RVGE'ye karşı olan etkinlik %58'e düşmüştür. RotaTeq aşısı araştırılan herhangi bir serotip ile ilişkili ciddi RVGE'ye karşı korumaktadır. Hastaneye yatışlara ve acil servis başvurularına karşı kullanılan en son kombinasyonun aşısı etkinliği G1'e karşı (en yüksek) %95, G2P[4]'e karşı %82 (en düşük) arasında olduğu tespit edilmiştir. G9P[8]'e karşı aşısı etkinliğinin yüksek (%94) olması dikkat çekmektedir, çünkü bu serotip aşuya dahil değildir. Afrika'da RotaTeq'in etkinliği değişkendir. Ciddi RVGE'ye karşı etkinlik 1 yıllık gözlem sonucunda Kenya'da %83, Gana'da %64 oranında bulunurken, Mali'de ise herhangi bir etkinlik bulunmamaktadır. İkinci yılda her yerde aşısı etkinliğinin düştüğü tespit edilmiştir. Vietnam'da 1 yıllık takip sonrasında ciddi RVGE'ye karşı aşısı etkinliği %73; Bangladeş'te sadece %43 olarak bulunmuştur ⁽¹²⁴⁾.

2.19.5. Rotavirus aşısının uygulanması

Lisans sonrasındaki ilk 6 yıl içerisinde rotavirusa karşı evrensel aşılama istikrarlı bir şekilde ilerlemesine karşın önemli ölçüde bölgesel farklılıklar göstermektedir. Aşılama sonrası çalışmalarda iki aşının da (rotarix ve rotateq) gelişmiş ülkelerde %70 ile >%90'lık koruma oranları ile oldukça etkili olduğu, RV'ye bağlı AGE vakalarının görülme sıklığını, hospitalizasyonu önemli ölçüde azalttığı ve bazı durumlarda da mortaliteyi düşürdüğü tespit edilmiştir. İki aşısı arasında etkinlik açısından ciddi bir fark yoktur. Şaşırtıcı bir şekilde faydalı sayılabilecek bir yan etki olarak aşılama sonrası çocuklarda "sürü bağışıklığı" ("herd immunity") gözlemlenmiştir. Her iki aşısı için aşısı kaynaklı mevcut intususepsiyon riski yaklaşık 1:50.000 veya daha düşüktür ki bu risk aşısının faydaları ile tolere edilmektedir. Rotarix aşısı Latin Amerika'daki 18 ülkenin ve bölgenin yanı sıra Güney Afrika, Avustralya, Belçika, Lüksemburg, Avusturya, Finlandiya ve Almanya gibi bir çok ülkenin ulusal immunizasyon programlarına dahil edilmiştir. Latin Amerika'da Brezilya ve Meksika'da etkisi oldukça yüksektir. Mart 2006'da evrensel rotavirus aşılması yapan ilk ülke Brezilya olmuştur. Tahmini alan etkinliği %85-90 ve kapsama alanı %78 olarak tespit edilmiştir ve Rotavirus gastroenteriti ile ilişkilendirilen ölümlerin yıllık sayısı 850'den 210'a düşmüştür. Meksika'da benzer oranda bir etkinlik tespit edilmiştir ve gastroenteritten kaynaklanan ölümler de dahil olmak üzere tüm sebeplere bağlı ölümler %41 oranında azalmıştır.

Ölümlerin önlenmesinin doğrudan kanıtı, diareye bağlı mortalitenin halen yüksek olduğu bölgelerde rotavirus aşısının desteklenmesi açısından son derece önemlidir. Avrupa'da yüksek etkinlik Avusturya ve Belçika'da belgelendirilmiştir. RotaTeq 2006 yılında ABD'de evrensel aşılama programına dahil edilmiştir ve RVGE'ye bağlı hastaneye yatışlarda çarpıcı bir düşüş gözlemlenmiştir. ABD'de dolaylı bir aşı etkisi olarak bebeklerin evrensel olarak aşılmasından bu yana büyük çocuklarda ve hatta erişkinlerde RV sebebiyle hastaneye yatışların azaldığı gözlemlenmiştir. Finlandiya 2009'da RotaTeq'in özel kullanımı ile evrensel bir bağışıklama programı uygulamıştır ve ilk sonuçlar tam üç dozluk aşılamanın RVGE için hastaneye kaldırılmaya karşı %100 etkili olduğunu göstermektedir. Afrika'da genel olarak rotavirus aşılarının daha düşük etkinliğine rağmen, Rotarix, RotaTeq veya diğer aşılar ile birlikte olan evrensel rotavirus aşısı büyük bir potansiyele sahip olacaktır, çünkü düşük etkinlikte bile önlenebilir ölüm sayısı önemlidir ⁽¹²⁵⁾.

2.19.6. Rotavirus aşısının sorunları

Gelişmiş ülkelerde RV aşılmasının yüksek etkinliğinin aksine, Meksika, Nikaragua, Malavi, Güney Afrika, Kenya, Mali, Bangladeş ve Vietnam gibi bazı orta ve düşük gelirli ülkelerde aşı etkinliği günümüzde tam olarak anlaşılamamış olan sebeplerden dolayı oldukça (%20-30) düşük olduğu tespit edilmiştir. Gnotobiyotik domuz yavrularında deneysel olarak araştırıldığı gibi vitamin A eksikliği bir faktör olabilir. Düşük gelirli ülkelerde RV ile ilişkili AGE'den ölüm oranı arttığından beri DSÖ, düşük gelirli ülkelerde nispeten daha düşük aşı etkinliğini kabul etmekte ve 2009 yılından beri tüm ülkelerde RV aşılmasının yapılmasını teşvik etmektedir ⁽¹³⁾.

Rotarix Mart 2010'da domuz circovirus 1 (porcine circovirus type 1; PCV-1) DNA'sının aşıda bulunduğu tespit edilmesi ile bir gerileme yaşadı. Sonuç olarak ABD Gıda ve İlaç İdaresi geçici olarak ABD'de Rotarix kullanımına karşı tavsiyelerde bulundu ve bu önerileri bazı Avrupa ülkelerinde dikkate aldı. Bu arada Avrupa İlaç Ajansı ve DSÖ Rotarix'in kullanımını tavsiye etmeye devam etti. PCV-1'in insanlara bulaşının bilinmemesine ve hastalığa sebep olmamasına rağmen aşıdaki varlığı kesinlikle istenmemektedir. Ana üretici virusda PCV-1 enfeksiyonu keşfedilmesi ile Rotarix'in üretim sürecindeki tüm basamakları gözden geçirmesi gerekti, ancak PCV-1-free aşı yakın bir tarihte hazır olacaktır. RotaTeq'te 2010 yılında PCV-1 ve PCV-2 DNA

parçaları da keşfedildi, ancak bu kontaminasyon üretim sürecinde kullanılan tripsin serilerine kadar izlendi ve yok edildi. Monovalan RV1 aşısı heterotipik G2P[4] RV'lere karşı oldukça etkili olmasına rağmen, G2P[4] ile ilişkili AGE oranı aşılammış çocuklarda, aşılammamış hastaneye yatırılan çocuklara göre daha yüksek bulunmuştur. Belirli RV genotiplerinin prevalansında, aşı kaynaklı önemli bir değişiklik bulunamamıştır. Bu sorun hakkında daha fazla bilgi edinmek için RV suşlarının ve genotip prevalansının aşılama sonrası gözlemleri devam etmektedir. Her iki RV aşısı da canlı attenuue virus içerdiğinden, doğal dolaşım esnasında ortaya çıkan RV aşısı suşları ile aşı ve wt suşları arasında RV aşı suşu reassortantlarının keşfedilmesi şaşırtıcı değildir. Hem Rotarix hem de RotaTeq için 1.doz'dan sonraki 7 gün içinde aşıyla ilişkili intussusepsiyon oranının 1:51000 ile 1:68000 arasında düşük olduğu bildirilmiştir. Bu RotaShield'in aşıyla ilişkili riskinden çok daha azdır, ancak yakalama programı olarak adlandırılan izleme Rota-Shield'in kullanımı sonrasında çoğu intussepsiyon vakasının 90 günden daha büyük bebeklerde meydana geldiğini dikkate almamaktadır. Rotarix ve RotaTeq'in önlisans çalışmalarında bu yaş aralığında çalışmaktan önemli ölçüde kaçınılmıştır. Ayrıca ABD'de aşılama sonrası sürveyansında RotaTeq için intussepsiyon riski tespit edilmediği ve ABD'de rotavirus aşısının ilk dozu için yaş sınırının (%75 RotaTeq, %25 Rotarix) iyi bir şekilde uygulandığı dikkat çekicidir. Avrupa'da Rotarix'in uygulanması için oluşturulan öneride, 6 ila 24 hafta arasında 4 hafta aralıklarla iki doz verilmesi uygun bulunmuştur. Bu teorik olarak lisans öncesi çalışmalardan daha sonraki 20 haftalık infantlara ilk dozun verilmesini sağlar. Meksika'daki vakaların çoğunun bundan daha küçük olan çocuklarda görülmesine rağmen Rotarix veya RotaTeq'le ilişkili intussepsiyonda yaşınl rolünün ne olduğu açık değildir⁽¹²⁶⁾.

2.19.7. Diğer aşılar

Hindistan'da bir diğer canlı attenüe RV aşısı insan sığır doğal reassortant 116E (Hindistan'da asemptomatik enfekte olan yenidoğanlardan izole edilen G9P8[11]) faz III klinik araştırmasında test edilmiştir. Orta ve düşük gelirli ülkelerdeki R1 ve R5 RV aşıları ile karşılaştırılabilecek seviyede ciddi RV hastalığına karşı %56'lık bir etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. RV aşı programlarının yüksek etkinliğinden dolayı artık AGE'li çocukların hastaneye kaldırılmasının en önemli sebebi norovirus

enfeksiyonlarıdır. Canlı atenué aşıların alternatifleri olarak inaktif virus partikülleri, virus benzeri partiküller (virus like particles; VLP'ler) baculovirus rekombinantı ile infekte böcek hücrelerinde ya da mayalarda eksprese edilmektedir. DNA tabanlı aşilar araştırılmaktadır. Ayrıca norovirus VLP'leri ile kombinasyon halinde olan Rotavirus VP6 nanotubülleri yeni RV aşiları için aday olarak gösterilmektedir. Deneyisel olarak lamalarda üretilen VP6'ya özgü tek zincirli antikorların (sadece 15 kDa MW) in vitro ve in vivo ortamda çapraz koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir ⁽¹²⁶⁾.

2.19.8. Aşılama öncesi ve sonrası dönemlerde insanlarda rotavirus suşlarının dağılımı

G ve P tiplerinin kombinasyonu ile belirlenen RVA suşlarının farklılaşması üzerine yapılan epidemiyolojik araştırmalar oldukça yaygındır ve genotipler özellikle birkaç hayvan türü arasında dağılmıştır. RVA genomunun segmentli olması sebebiyle VP7 ve VP4'ü kodlayan genler teorik olarak bağımsız bir şekilde ayrılabilir ve bu şekilde büyük bir suş çeşitliliği elde edilir. G1P[8], G2P[4], G3P[8] ve G4P[8] kombinasyonları dünyada insanlar arasında en yaygın olduğu kabul edilen suşlardır. Bununla birlikte son 10 yılda G9 suşları genellikle P[8] ile ilişkili olarak sıklıkla tespit edilmiştir. Dolayısıyla G9P[8] şu anda insanlardaki en yaygın genotipler arasında beşinci sırada yer almaktadır. Son zamanlarda ortaya çıkan bir genotip ise G12P[8]'dir ve tüm dünyaya yayıldığı düşünülmektedir. Gelişmiş ölkelerde RVA enfeksiyonlarının yaklaşık %100'ünden G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] ve G9P[8] suşları sorumludur. Gelişmekte olan ölkelerde ise bu sık tespit edilen suşların yanı sıra, bir bölgeden diğetine geniş varyasyon gösteren daha az sıklıkla görölen RVA kombinasyonları tespit edilmiştir. DSÖ tarafından 2010'da yapılan bir süveyans programında yagın olmayan en dominant suşların Güneydoğu Asya'da G12P[8] ve G12P[6]; Sahra altı Afrika'da G2P[6], G3P[6] ve G1P[6]; Batı Pasifik'te G1P[4] ve G2P[8]; ve Amerika'da G9P[4] olduğu gösterilmiştir. Çeşitli araştırmalar da insan popölasyonundaki dominant RVA genotiplerinin zaman içerisinde değıştığını bildirilmiştir. Belirli dominant bir suş bir veya iki yıl içerisinde yerini başka bir suşa bırakabilir. Diğere bazı suşlar 1980'lerde Brezilya'da G5P[8], Afrika'da G8 suşu gibi periyodik olarak veya lokal olarak önemini koruyabilir. RVA suşlarının mevsimsel değışimi ile ilgili olarak virusun önceki enfeksiyonlarda kazanılan immün yanıtı kaçıması için bir mekanizma olabileceğine ve

dolayısıyla insan popülasyonunda persistent kalabileceğine inanılmaktadır. Brezilya'da 2007'den itibaren G2P[4]'nin tespitinde bir artış gözlemlenmiştir. Bazı araştırmacılar bu prevalansın aşı etkisiyle ilişkili olabileceğini ve bir monovalan G1P[8] aşısının kullanımının G2P[4] suşunun duyarlı konak enfeksiyonu için rekabet ederken diğer suşlar üzerine (P[8] genotipini paylaşan) avantaj elde etmesi için uygun koşullar oluşturabileceğini öne sürmektedir. Bununla G1P[8], G3P[8] veya G9P[8] gibi birlikte diğer yaygın suşlar Avustralya'daki RVA suşlarının sürveyansında gözlemlendiği gibi zaman içerisinde marjinal şekilde sirkülasyona devam etmektedir. G2P[4]'nün ortaya çıkışı 2007'de pentavalan aşı olan Rotateq®'i aşı takvimlerine dahil eden Avustralya, Nikaragua gibi ülkelerde ve aşılanmamış popülasyonlarda (Portekiz, Arjantin ve Paraguay) rapor edilmiştir. RVA genotiplerinin sirkülasyondaki periyodikliği belgelenmiş bir gerçektir. G12P[8] genotipinin dünya çapında epidemiyolojik açıdan önemli bir suş olarak ortaya çıkması bu G12 suşlarına karşı heterotipik koruma oluşturması açısından RVA'ya karşı aşılarda geliştirilmesi ve izlenmesine ilişkin yeni sorunlara yol açmıştır. İki lisanslı RVA aşısının (Rotarix® ve RotaTeq®) etkinlik testleri en yaygın G genotipleri (G1, G2, G3, G4 ve G9) ile gerçekleştirilmiştir, G12'ye karşı etkinlik verileri ise oldukça sınırlıdır. G12 suşlarında VP4 P[8] proteininin varlığı her iki aşının da ortaya çıkan G12P[8] suşlarını etkin şekilde önleyebileceğini göstermektedir. Bu sebeple bütün dünyada araştırma laboratuvarları satılan veya aday aşılarla dahil olmayan nadir veya yaygın olmayan G ve P suşlarını tespit etmek amacıyla bir aşının uygulanmasından sonra RVA suşlarının sirkülasyonunu izlemektedir. Yeni RVA suşlarının ortaya çıkma ihtimaline rağmen Rotarix® ve RotaTeq® ile aşılama RVA'nın sebep olduğu aku gastroenterit görülme sıklığını önemli ölçüde azaltmıştır^(113, 127).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Acil Servisine ve Adana Şehir Hastanesine Ocak-Aralık 2017 tarihleri arasında akut gastroenterit sebebi ile başvuran 5 yaş ve altındaki 400 yenidoğan ve çocuk hastadan dışkı örnekleri toplanmıştır. Ayrıca her hastanın demografik verileri, hastalık bulguları, ilaç kullanımı, komplikasyonları ve tedavi bilgileri hazırlanan anketlere kaydedilmiştir. Toplanan dışkı örnekleri çalışılmak üzere -80°C buzdolabına kaldırılmıştır. Daha sonra bu dışkı örneklerinde rotavirus antijen varlığının tespiti için kullanılan Ridascreen Rotavirus ELISA (C0901, R-Biopharm AG, Germany) testi üreticinin önerdiği test protokolüne göre yapılmıştır.

3.1. Ridascreen rotavirus (ELISA) test protokolü

1. Plak ve reaktantlar oda sıcaklığına (20-25°C) getirildi.
2. Yıkama solüsyonu (Wash) 1:10 oranında distile su ile dilüe edildi.
3. Önceden -80°C’de saklanan gaita örnekleri oda sıcaklığında çözülerek ependorf tüp içerisinde dilüsyon buffer (Diluent 1) ile 1:11 oranında dilüe edildi, 2-3 dk vortekslenir ve ardından 4000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
4. Kuyulara 100 µl (+) kontrol, (-) kontrol ve örnekler eklendi.
5. Kuyulara 100 µl konjugat 1 (Conjugate 1) eklendi ve iyice karıştırıldı.
6. Oda sıcaklığında (20-25°C) 60 dk inkübe edildi.
7. Daha sonra 300 µl wash buffer ile 5 kere yıkandı.
8. Kuyulara 100 µl konjugat 2 (Conjugate 2) eklendi.
9. Oda sıcaklığında (20-25°C) 30 dk inkübe edildi.
10. Kuyular 300 µl wash buffer ile 5 kere yıkandı.
11. Ardından 100 µl substrat (Substrate) eklendi.
12. Karanlık ortamda 15 dk oda sıcaklığında (20-25°C) inkübe edildi.
13. Kuyulara 50 µl stop reaktantı (Stop) eklendi.
14. Fotometrik ölçüm 450 nm dalga boyunda yapıldı.

3.1.1. Rotavirus ELISA çalışma prensibi

Test çalışma prensibi sandviç ELISA yöntemine dayanmaktadır. Kit içerisinde hazır olarak gelen strip kuyuları A grubu rotavirus VP6 viral kapsid proteinine karşı oluşan monoklonal antikorlarla kaplanmıştır. Örnekler eklendiğinde eğer varsa pozitif olanlardaki viral kapsid proteini bu monoklonal antikorlar ile birleşir. Daha sonra antikor ile konjuge antijen haricindeki her şey Medispec ESW 300 cihazıyla yapılan yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırıldı. Yıkama işlemini takiben içerisinde biyotin ile işaretlenmiş monoklonal antikor bulunan konjugat 1 solüsyonu kuyulara eklendi ve inkübasyona bırakıldı.

Bu işlem sonrasında tekrardan yıkama yapılarak monoklonal antikorlar ile sandviç görünümü oluşturmuş VP6 ile konjuge olmuş antikorlar dışındaki tüm materyal ortamdan uzaklaştırıldı. Sonraki adımda içerisinde streptavidin ile konjuge poli-peroksidaz enzimi bulunan konjugat 2 solüsyonu kuyulara eklenerek inkübasyona bırakıldı. Daha önce eklenmiş olan monoklonal antikorun biyotini ile streptavidin arasında sıkı bir bağlantı oluşur ve tekrardan yıkama işlemi ile artan materyal kuyulardan uzaklaştırıldı. Sonraki aşamada eklenen substrat (tetrametilbenzidin) ile enzim reaksiyona girerek pozitif olan kuyularda mavi renk oluşmasına sebep olur. Son olarak eklenen stop solüsyonu (sülfürik asit) reaksiyonu durdurarak pozitif olan kuyuların rengini sarıya çevirir ve ardından 450 nm dalga boyunda Denley Welscan cihazı kullanılarak fotometrik ölçüm yapıldı.

3.1.2. Rotavirus ELISA testinin değerlendirilmesi

Fotometrik ölçüm yapılan örneklerin değerlendirilmesi yine üretici tarafından oluşturulmuş protokole göre gerçekleştirilmiştir. Testin düzgün çalıştığını belirlemek amacıyla negatif kontrol için OD (optik dansite) 0,2'den küçük, pozitif kontrol içinse 0,8'den büyük olmalıdır. Yorumlama aşamasında ilk olarak negatif kontrolün OD değerine 0,15 eklenerek "cut-off" değeri oluşturulur. Örnekler için ölçülen OD değeri "cut-off" değerinin %10 üzerinde ise pozitif, %10'na yakın veya çok az altında ise sınırda, %10'undan düşük ise negatif olarak değerlendirildi.

3.2. Viral RNA ekstraksiyonu

Roche High Pure Viral RNA Kiti (Cat. No. 11 858 882 001, Germany) kullanılarak ELISA testi pozitif olan dışkı örneklerinden viral RNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

3.2.1 High Pure Viral RNA kit protokolü

1. Teste başlamadan önce kit içinde bulunan Poly A 0,4 ml Elution buffer içinde çözüldü, İnhibitör Removal Buffer üzerine 20 ml ve Wash buffer üzerine 40 ml saf etanol eklendi.
2. Steril bir falkon tüp içerisinde 50 µl Poly A üzerine 5ml Binding Buffer eklenerek 12 reaksiyonluk çalışma solüsyonu hazırlandı.
3. Hazırlanan steril ependorf tüplerine daha öncesinden ELISA için dilüe edilmiş dışkı örneklerinden 200 µl eklendi.
4. Örnek üzerine 400 µl Poly A-Binding Buffer karışımı eklenidi ve vortekslendi.
5. Karışım 10 dk oda ısısında bekletildi.
6. Karışım filtre tüpü ve toplama kabı iç içe geçmiş spin kolonlara aktarılır ve 15 sn 8000g'de santrifüj edildi. Toplama kabı içerisindeki sıvı ile atılarak filtre tüpü yeni toplama kabına yerleştirildi.
7. Tüplerin üzerine 500 µl inhibitör removal buffer eklenir ve 1 dk 8000g'de santrifüj edildi. Toplama kabı içerisindeki sıvı ile atılarak filtre tüpü yeni toplama kabına yerleştirildi.
8. Tüplerin üzerine 450 µl wash buffer eklendi ve 1 dk 8000g'de santrifüj edildi. Toplama kabı, içerisindeki sıvı ile atılarak filtre tüpü yeni toplama kabına yerleştirildi.
9. Tüplerin üzerine 450 µl wash buffer eklendi ve 1 dk 8000g'de santrifüj edildi. Ardından 10 sn 13.000g'de tekrar santrifüj edildi ve toplama kabı, içerisindeki sıvı ile atılarak filtre tüpü yeni steril 1.5 ml'lik ependorf tüpe yerleştirildi.
10. Tüplerin üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi ve 1dk 8000g'de santrifüj edildi.
11. Filtre tüpleri atıldı. Eğer hemen çalışılacaksa ependorf tüpleri -20°C'ye hemen çalışılmayacaksa -80°C'ye kaldırıldı.

3.3. Rotavirus RT-PCR ve genotipleme

Rotavirus RT-PCR (Reverse-Transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) amplifikasyon aşaması MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad) cihazı kullanılarak yapıldı. Rotavirus RNA virusu olduğu için RT-PCR için önce cDNA aşaması (RT aşaması) gerçekleştirildi. İlk olarak G genotipi için rotavirusun VP7 dış kapsid proteinini kodlayan viral RNA genomunun 9. segmentinde 1062 bp uzunluğundaki bölgeyi hedef alan Beg9 (forward; F) ve End9 (reverse; R) konsensus primerleri kullanılarak aşağıda verilmiş olan protokole göre cDNA eldesi gerçekleştirildi. P genotipi için ise viral genomun 4. segmentinde 876 bp'lık bölgeyi hedef alan Con2 (reverse) ve Con3 (forward) konsensus primerleri kullanıldı (Tablo.3) (Iturriza-Gómara ve ark., 2004)⁽¹²⁸⁾. Sonrasında rotavirus G ve P tip için elde edilen cDNA'lar kullanılarak RT-PCR amplifikasyon aşaması gerçekleştirildi. Rotavirusun G tipi için RT-PCR sonucu elde edilen ampliconlar kullanılarak rotavirusun VP7 bölgesine ait tip spesifik primerler (G1, G2, G3, G4, G8, G9 ve G10; F) ve RVG9 (R) konsensus primeri ile genotipleme için semi-nested multipleks PCR testi yapıldı (Gouvea ve ark., 1990)⁽¹²⁹⁾. Rotavirusun P tipi için ise rotavirusun VP4 bölgesine ait tip spesifik primerler (P[4], P[6], P[8], P[9], P[10] ve P[11]; R) ve Con3A (F) konsensus primeri ile genotipleme için semi-nested multipleks PCR testi gerçekleştirildi (Gentsch ve ark., 1992)⁽¹³⁰⁾.

3.3.1. Rotavirus G ve P tip cDNA sentezi

RT-PCR testinin reverse transkripsiyon aşamasında rotavirusun G genotipinin tespiti için 25 pmol Beg9 ve 25 pmol End9 primerleri, deiyonize RNase free distile su ve 5 µl RNA ekstraktı ile toplam 12.5 µl RT karışımı hazırlandı. Karışım MJ Mini Thermal Cycler cihazında 95°C'de 5 dakika ardından buz üzerinde 5 dakika bekletildi. Daha sonra PCR tüplerine 4 µl 5 X RT-Buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 200 mM KCl), 1mM dNTP (dNTP Set, Thermo Scientific, USA), 20U RNasin (RiboLock RNase Inhibitor, Thermo Scientific, USA), 200U RT enzim (RevertAid Reverse Transcriptase, Thermo Scientific, USA) ilave edilerek toplam 20 µl'lik karışım 42°C'de 60 dakika tutularak cDNA sentezi gerçekleştirildi ve enzim inaktivasyonu için 70°C'de 10 dakika bekletildi. Elde edilen cDNA'lar kullanılmak üzere -20°C buzdolabına kaldırıldı. Rotavirusun P genotipinin tespiti için aynı prosedür Con2, Con3 primerleri kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3.2. Rotavirus G ve P tip RT-PCR

cDNA eldesinden sonra amplifikasyon aşaması için PCR miks hazırlandı. Bunun için 5 µl 10x Taq buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 500 mM KCl), 200µM dNTP, 1.5mM MgCl₂, G tipi için her bir primerden Beg9 ve End9 25 pmol, 2U Taq DNA polimeraz enzimi (Taq DNA Polymerase, Sigma-Aldrich, USA) ve distile su ile toplam 45 µl olacak şekilde PCR miks karışımı hazırlandı. P tipi için ise aynı protokolde Con2 ve Con3 primerleri kullanıldı. RT-PCR için kullanılan primerler Tablo 3'te gösterilmiştir. Hazırlanan PCR miks karışımların üzerine 5 µl cDNA eklendi. Total hacmi 50 µl olan bu karışım amplifikasyon için Termal Cykler cihazına yerleştirildi. G ve P tip rotavirus RT-PCR için kullanılan ısı döngüleri aşağıda verilmiştir (Tablo 1 ve 2). PCR aşamasından sonra amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile yürütülerek G tipi için 1062 bp (Şekil 6) ve P tipi için 876 bp'lik (Şekil 7) bant oluşumu incelendi.

Tablo 1. Rotavirus G tip RT-PCR ısı döngüsü

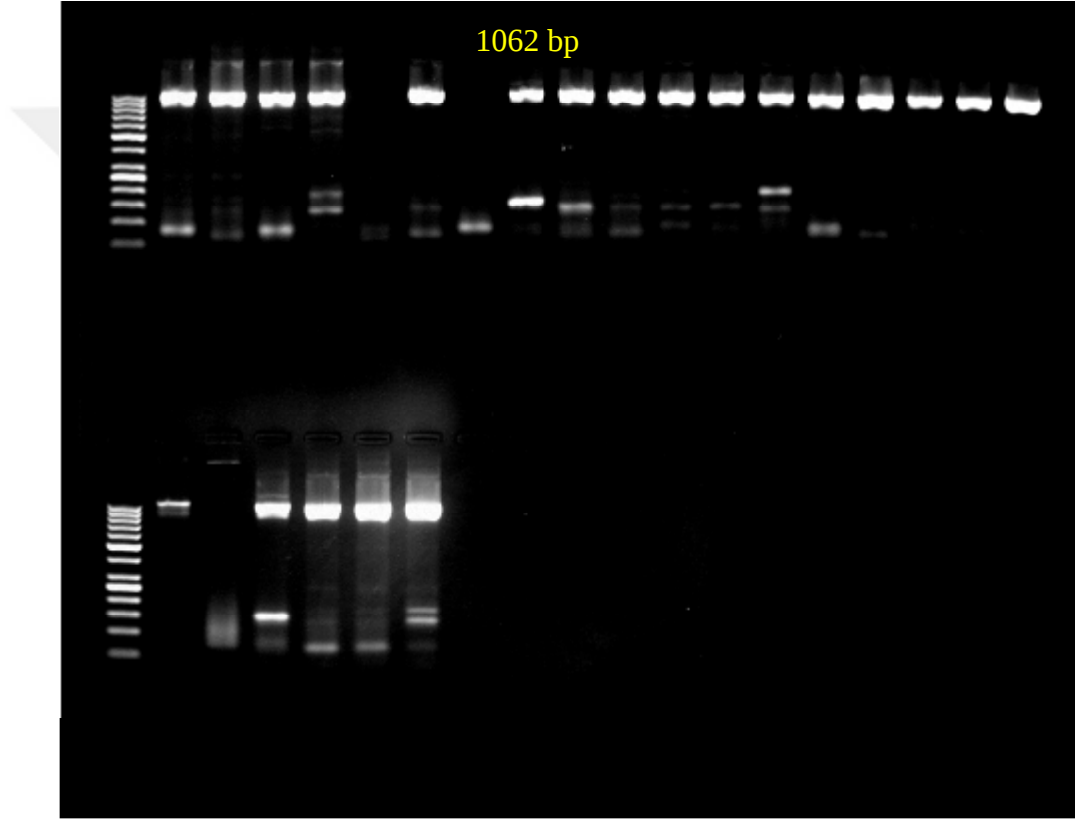
	Sıcaklık	Süre	Döngü
1.	94°C	3 dakika	1
2.	95°C	1 dakika	35
	52°C	2 dakika	
	72°C	1 dakika	
3.	72°C	10 dakika	1

Tablo 2. Rotavirus P tip RT-PCR ısı döngüsü

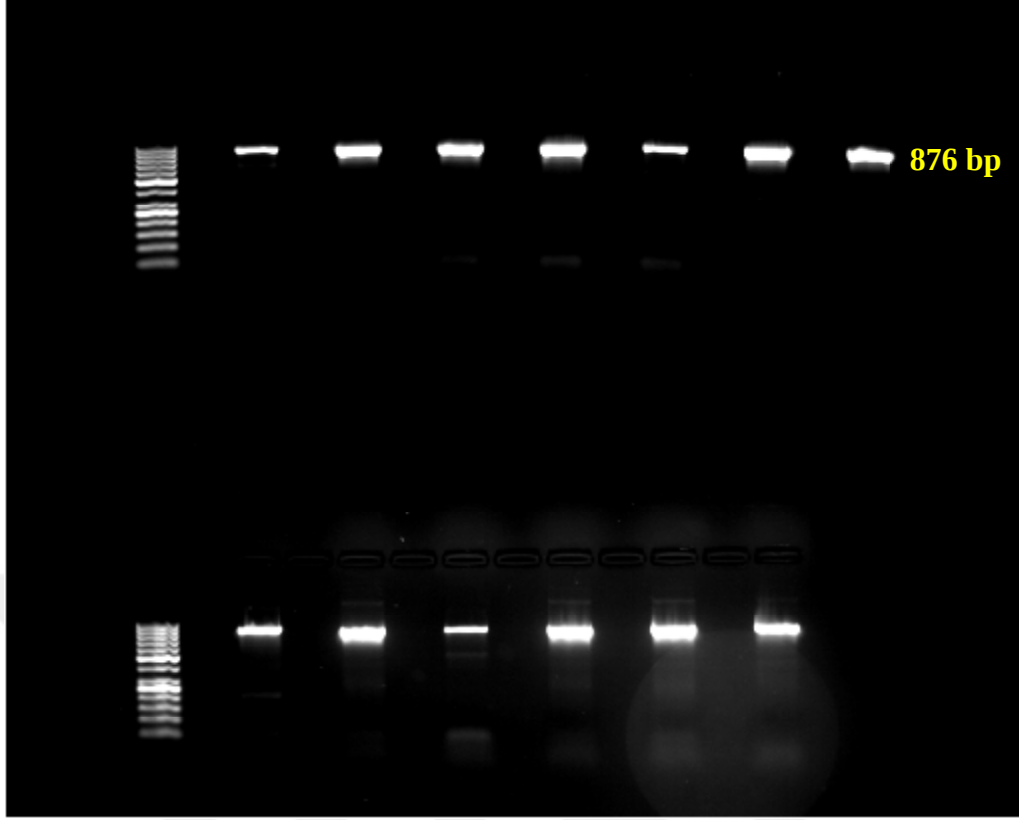
	Sıcaklık	Süre	Döngü
1.	94°C	3 dakika	1
2.	95°C	1 dakika	35
	50°C	2 dakika	
	72°C	1 dakika	
3.	72°C	10 dakika	1

Tablo 3. Rotavirus G ve P tip RT-PCR için kullanılan konsensus primerler

Rotavirus G ve P Tip RT-PCR		
Primer	Baz Dizilimi	Uzunluğu
Beg9 (F)	5'- GGG TTT AAA AGA GAG ATT TTC CGT CTG G -3'	1062 bp
End9 (R)	5'- GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG -3'	
Con2 (R)	5'- ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC -3'	876 bp
Con3 (F)	5'- TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A -3'	



Şekil 6. Rotavirus G tip RT-PCR pozitif



Şekil 7. Rotavirus P tip RT-PCR pozitif

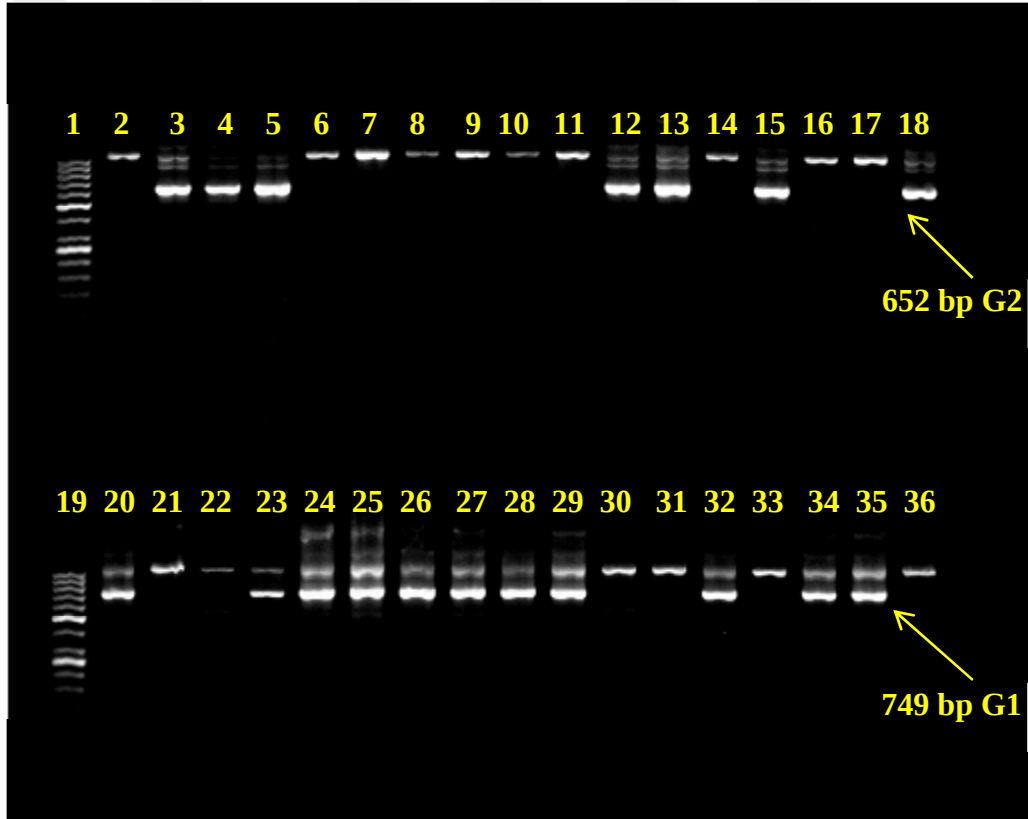
3.3.3. Rotavirus spesifik G ve P tip genotipleme

RT-PCR aşamasında pozitifliği doğrulanan örneklerden semi-nested multipleks PCR işlemi ile rotavirus spesifik G ve P genotiplemesi yapıldı. Rotavirus G genotipleme aşamasında 5 µl 10X PCR Taq Buffer, 2mM MgCl₂, 200µM dNTP, 2 U Taq DNA Polimeraz, her bir primerden (G1, G2, G3, G4, G8, G9, G10 ve RVG9) 20 pmol ve distile su ile toplam 48 µl'lik PCR karışımı hazırlandı. Bu hazırlanan karışımların üzerine RT-PCR aşamasında elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 2 µl eklendi. Daha sonra toplam hacmi 50 µl olan bu karışım Termal Cyclor cihazına yerleştirildi. Rotavirus P tip genotipleme için aynı protokol P[4], P[6], P[8], P[9], P[10], P[11] ve Con3A primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. Rotavirus G ve P tip genotipleme aşamasında aynı ısı döngüleri kullanılmıştır (Tablo 4). Semi-nested mutipleks PCR işlemi sonrasında amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. Rotavirus G tip genotiplemede G1 için 749 bp, G2 için 652 bp, G3 için 374 bp, G4 için 583 bp, G8 için 885 bp, G9 için 306 bp ve G10 için 397 bp'de bant varlığı incelendi (Şekil 8). Rotavirus P tip genotiplemede ise P[4] için 483 bp, P[6] için

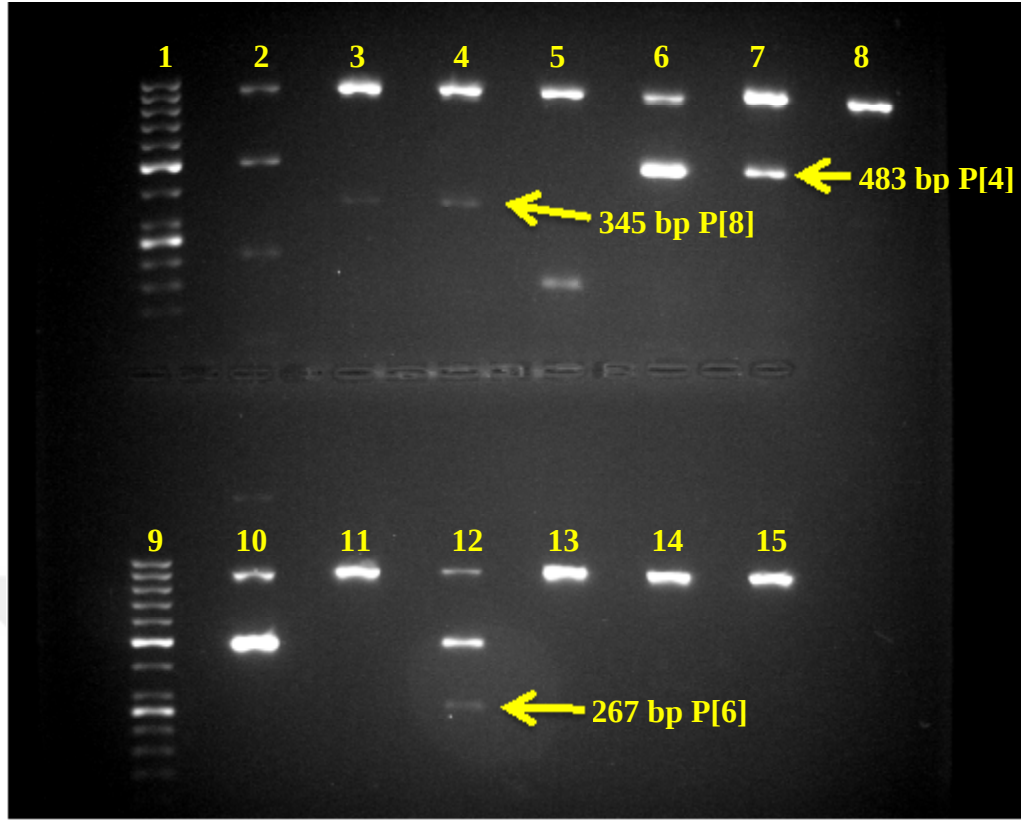
267 bp, P[8] için 345 bp, P[9] için 391 bp, P[10] için 583 bp, P[11] için 312 bp'lık bant oluşumu görüntülendi (Şekil 9).

Tablo 4. Rotavirus G ve P tip genotipleme ısı döngüsü

	Sıcaklık	Süre	Döngü
1.	94°C	3 dakika	1
2.	94°C	1 dakika	30
	42°C	2 dakika	
	72°C	1 dakika	
3.	72°C	10 dakika	1



Şekil 8. Rotavirus G tip genotipleme (1. ve 19. kuyular 50 bp'lık marker; 3, 4, 5, 12, 13, 15, ve 18. kuyular 652 bp ile G2; 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 34 ve 35. kuyular 749 bp ile G1 genotipi)



Şekil 9. Rotavirus P tip genotipleme (1 ve 9. kuyu 50 bp'lik marker; 2, 6, 7, 10 ve 11. kuyular 483 bp ile P[4], 3 ve 4. kuyular 345 bp ile P[8]; 12. Kuyu 267 bp ile P[6] genotipi)

3.4. Agaroz jel elektroforezi

Amplifikasyon ürünlerinin incelenmesinde etidyum bromürlü %2'lik agaroz jel elektroforezi kullanıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında ve tampon çözelti olarak TBE (Tris Borat EDTA) buffer hazırlandı. Başlangıçta 10X'lik stok TBE solüsyonu hazırlanıp çalışma için gerektiğinde bu stok solüsyonundan sulandırılarak (1X) kullanıldı. 10X'lik TBE hazırlamak için tartılan 108 gr Tris base (tris(hidroksimetil)aminometan, Sigma-Aldrich, USA), 55 gr borik asit (Sigma-Aldrich, USA) ve 7.5 gr EDTA (etilendiamin tetraasetik asit, Sigma-Aldrich, USA) son hacim 1 lt olacak şekilde distile suda çözüldü. Elektroforez için uygulanan protokol;

1. Agar hazırlamak ve elektroforez tankında buffer olarak kullanmak için 10X'lik TBE stok solüsyonundan alınan 100 ml, 900 ml distile su ile dilüe edildi (1X).
2. Agar hazırlamak amacıyla 1X'lik solüsyondan 100 ml erlene aktarıldı, daha sonra üzerine hassas terazide (Chyo JL-200) tartılan 2 gr agaroz (A5093, Sigma-Aldrich, USA) eklendi.

3. Agarın erimesi için erlen 30 saniyelik süre ile 3 defa mikrodalga fırında ısıtıldı.
4. Agarın sıcaklığı 60-65°C'ye düşüncüye kadar bekletildi ve üzerine 5 µl etidyum bromid (20 mg/ml) eklendi.
5. Elektroforez tank tablasına uygun bir şekilde taraklar yerleştirilerek agar tabla içerisine yavaşça döküldü.
6. Jelin katılaşması ve oda sıcaklığına ulaşması için 10-15 dakika beklendi.
7. Jel soğuduktan sonra taraklar tabladan yavaşça çıkarıldı. Tabla tank içerisine kuyular (-) kutba gelecek biçimde yerleştirildi ve tank 1X'lik TBE solüsyonu ile dolduruldu.
8. Ependorf tüplere 2 µl Loading (Thermo Scientific, USA) dye ve 10 µl örnek eklendi, pipetaj yapılarak jel içerisindeki kuyulara dağıtıldı. İlk kuyuya 6 µl 50 bp'lik DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, USA) yüklendi.
9. Tankın güç kaynağı ile 100 V'luk akım verildi.
10. Örnekler RT-PCR için 45 dakika, genotipleme için 90 dakika yürütüldü.
11. Süre bitiminde tabla tank içerisinden çıkarılarak jel görüntüleme sisteminde (MiniBIS, Bio-Imaging Systems) rotavirus pozitifliği ve genotiplendirme yönünden incelendi.

4. BULGULAR

Ocak-Aralık 2017 tarihleri arasında Çukurova Üniversite Tıp Fakültesi Hastanesine ve Adana Şehir Hastanesine akut gastroenteriti olan 5 yaş ve altı 400 çocuktan %54.5'i (218) erkek, %45.5'i (182) kız çocuklardan oluşmaktadır. Hastaların yaşları ortalaması 20.4 ay (1 ay-60 ay) olup çalışma popülasyonunun büyük çoğunluğunu (%61.8;247) 0-24 aylık yaş grubu oluşturmaktadır. Çalışmaya dahil edilen çocukların yaş gruplarına göre dağılımına bakıldığında %35.5'i (142) 0-12 ay, %26.3'ü (105) 13-24 ay, %11.5'i (46) 25-36 ay, %11'i (44) 37-48 ay, %5.2'si (21) 49-60 ay ve %10.5'i (42) 61-72 ay yaş grubundadır. Böylece hasta popülasyonunun %61.8'ini 0-24 ay yaş grubu çocuklar oluşturmaktadır. Ayrıca çalışma popülasyonunun %19.2'si (77) 6 aydan küçüktür.

Dışkı örneğinde rotavirus antijeni pozitif bulunan 91 hastanın %70.3'ü (64) erkeklerden, %29.6'sı (27) kızlardan oluşmaktadır. Bu çocukların yaş gruplarına göre dağılımına bakıldığında %35.5'i (142) 0-12 ay, %26.3'ü (105) 13-24 ay, %6.6'sı (6) 25-36 ay, %6.6'sı (6) 37-48 ay, %3.4'ü (3) 49-60 ay ve %6.6'sı (6) 61-72 ay yaş grubuna dahildir. Çocukların yaşları ortalaması 16.8 ay'dır (1 ay-60 ay). Tüm pozitif hastaların %76.9'unu (70) 0-24 ay yaş grubu oluşturmuştur. Ayrıca pozitif popülasyonun %13.2'si (12) 6 aylık ve daha küçük çocuklardır, 0-24 ay yaş grubunda yaş ilerledikçe pozitiflik oranı artmaktadır (sırasıyla %13.2 0-6 ay, %29.7 7-12 ay, %34 13-24 ay) (Tablo 5).

Tablo 5. RV antijen pozitif ve RV antijen negatif örneklerin yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş	Total (400)	RV antijen Negatif (309)	RV antijen Pozitif (91)
0-6 ay	%19.2 (77)	%21 (65)	%13.2 (12)
7-12 ay	%16.3 (65)	%12,4 (38)	%29.7 (27)
13-24 ay	%26.3 (105)	%23.9 (74)	%34 (31)
25-36 ay	%11.5 (46)	%13 (40)	%6.6 (6)
37-48 ay	%11 (44)	%12,3 (38)	%6.6 (6)
49-60 ay	%5.2 (21)	%5,8 (18)	%3.3 (3)
61-72 ay	%10.5 (42)	%11,6 (36)	%6.6 (6)
Yaş Ort.	20.4 (ay)	28.8 (ay)	16.8 (ay)

Tüm hastaların %66'sı (264) çocuk polikliniğine, %34'ü (136) acil servisine başvurmuştur. Toplam 84 (%21) çocuğun hastaneye yatışı gerçekleştirilmiştir. Ortalama yatış süresi 4.3 gün (1-17 gün) olarak hesaplanmıştır.

Hastaların %81'inde (324) sulu, %16'sında (64) mukuslu ve %3'ünde (12) kanlı dışkı görülmüştür. Çocuklarda ortalama günlük diare sayısı 4.2/2.8 (kez/gün) ve ortalama günlük kusma sayısı 2.4/2 (kez/gün) olarak hesaplanmıştır. Çocukların %63'ünde (252) ise kusma belirtisi görülmüştür. Hastaların %43.4'ünde (174) ateş, %12'sinde (48) abdominal ağrı, %18.2'sinde (73) bulantı, %53'ünde (212) halsizlik ve %47.2'sinde (189) iştahsızlık gözlenmiştir. Ayrıca hastaların %31'inde (124) hafif, %17.8'inde (71) orta ve %2.8'inde (11) ciddi dehidratasyon gözlenmiş olup %48'inde (192) ise herhangi bir şiddette dehidratasyon görülmemiştir.

Çocukların %48.7'si (195) anne sütü ile beslenmektedir. Hastaların yalnızca %3.2'sinin (13) rotavirus aşısı yaptırdığı tespit edilmiştir. Çalışma grubunun çok az bir kısmı (%5.7; 23) enfeksiyon yayılma ihtimalini arttıran kreşe gitmiştir. Rehidratasyon tedavisinin %33.2'si (133) yalnızca oral, %9.5'i (38) yalnızca intravenöz uygulanmış olup hastaların %20.2'sinde (81) oral ve intravenöz tedavi birlikte uygulanmıştır. Hastaların %30'una (120) rehidratasyon tedavisine ek olarak antibiyotik (%16; 64) (flagyl %4.8 (19), metronidazol %3 (12), suprax %2.8 (11), bactrim %2.5 (10), diğer %2,9 (12)) ve probiyotik (%12.5; 50) (reflor,maflor) gibi destekleyici ilaçlar verilmiştir. Hastaların % 7'sine (28) ise herhangi bir tedavi uygulanmamıştır.

Rotavirus antijen pozitif hastaların %56'sı (51) polikliniklere, %43.9'u (40) acil servisine başvurmuş olup %42.8'inin (39) yatışı gerçekleştirilmiştir ve ortalama yatış süresi 5.8 gün (1-17 gün) olarak hesaplanmıştır. Rotavirus antijen pozitif grubun %46'sında (42) ateş, %10'nunda (9) abdominal ağrı, %33'ünde (30) bulantı, %60.4'ünde (55) halsizlik ve %50.5'inde (46) iştahsızlık görülmüş olup %19.8'inde (18) herhangi bir bulgu kaydedilmemiştir.

İshalin karakteristik özelliklerine bakıldığında hastaların %80'ninin (73) sulu ve %20'sinin (18) mukuslu gaitaya sahip olduğu görülmektedir. Ortalama günlük diare sayısı 6.14/2,39 (kez/gün) olup bu değerler kusma bulgusu için 2.68/1.68 (kez/gün)'dir ve hastaların %16.5'inde (15) kusma bulgusu gözlenmemiştir. Bu hastaların %23'ünde (21) herhangi bir seviyede dehidratasyon görülmemekle birlikte %30'unda (27) hafif, %43'ünde (39) orta ve %3'ünde (1) ciddi derecede dehidratasyon varlığı bildirilmiştir.

Rotavirus pozitif gruptaki bebekleri %60'ı (55) anne sütü ile beslenmektedir. Tedavi olarak 21 hastaya (%23) oral, 40 (%43,3) hastaya intravenöz rehidratasyon tedavisi uygulanmıştır. Bu hastaların 24'ünde (%26) oral ve intravenöz rehidratasyon birlikte uygulanmış olup ayrıca 6 hastaya (%7) probiyotik verilmiştir. Sadece 2 hastada antibiyotik kullanılmıştır (Tablo 6). Bu rotavirus pozitif gruptaki 5 hastada havale, hipoglisemi (2), preder wili sendromu ve konjenital toxoplazmozis gibi hastalıklar görülmüştür.

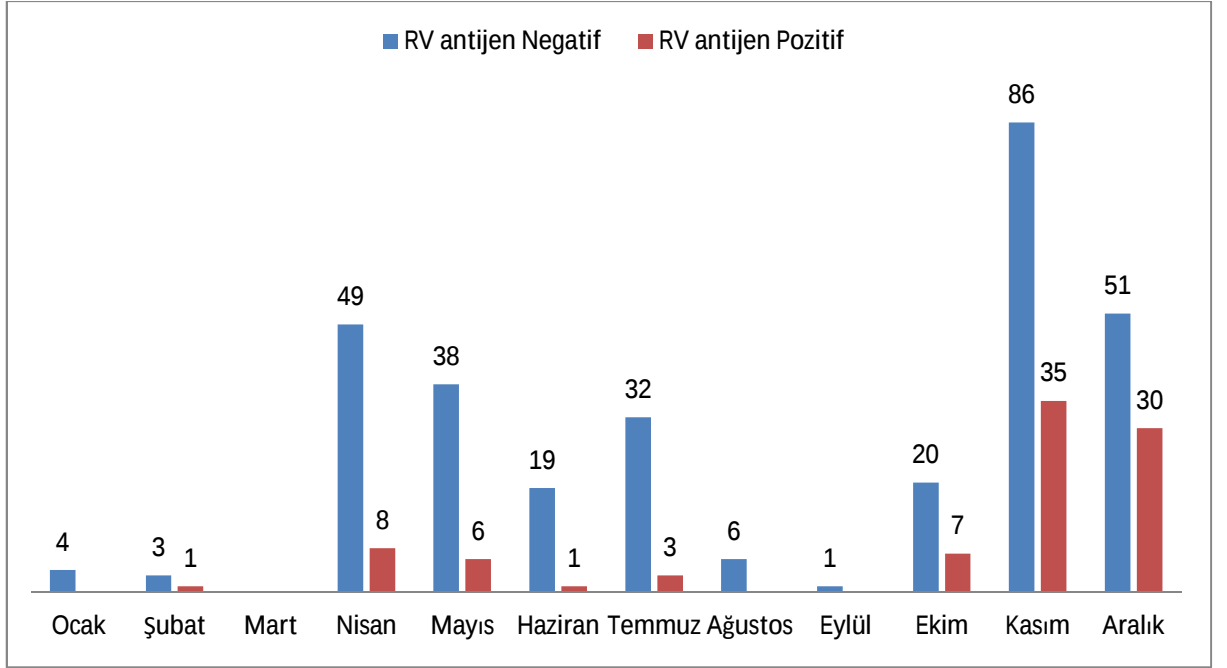
Tablo 6. Toplam 400 hastanın demografik özellikleri, klinik belirtileri ve tedavi rejimleri dağılımı

	Total	RV antijen Negatif	RV antijen Pozitif
Cinsiyet			
Erkek	%54.5 (218)	%49.8 (154)	%70.3 (64)
Kız	%45.5 (182)	%50.2 (155)	%29.7 (27)
Toplam	400	309	91
Başvuru			
Acil	%34'ü (136)	%31 (96)	%44 (40)
Poliklinik	%66'sı (264)	%69 (213)	%56 (51)
Hastaneye yatış	%21 (84)	%14.5 (45)	%42.8 (39)
Hastaneye yatış süresi (1-17 gün)	4.3 gün	3.6 gün	5.8 gün
Klinik Bulgular			
İshal			
Ortalama (kez/gün)	4.2/2.8	3.94/2.82	6.14/2,39
Sulu	%81 (324)	%81 (251)	%80 (73)
Mukuslu	%16 (64)	%15 (46)	%20 (18)
Kanlı	%3 (12)	%4 (12)	-
Kusma	%63 (252)	%57 (176)	%83.5 (76)
Ortalama (kez/gün)	2.4/2	2.31/2.06	2.68/1.68
Ateş	%43.4 (174)	%42.7 (132)	%46 (42)
Abdominal Ağrı	%12 (48)	%12.6 (39)	%10 (9)
Bulantı	%18.2 (73)	%14 (43)	%33 (30)
Halsizlik	%53 (212)	%50.8 (157)	%60.4 (55)
İştahsızlık	%47.2 (189)	%46.3 (143)	%50.5 (46)

Tablo 6. Toplam 400 hastanın demografik özellikleri (Devamı)

Dehidratasyon	%52 (208)	%44.7 (138)	%77 (70)
Hafif	%31 (124)	%31.4 (97)	%30 (27)
Orta	%17.8 (71)	%10.3 (32)	%43 (39)
Ciddi	%2.8 (11)	%3.3 (10)	%3 (1)
Anne sütü ile beslenme	%48.7 (195)	%45.3 (140)	%60'ı (55)
Rotavirus aşısı	%3.2 (13)	%4.2 (13)	-
Tedavi			
Oral rehidratasyon	%68.5 (274)	%73.8 (228)	%50 (46)
IV rehidratasyon	%41 (164)	%33.3 (103)	%67 (61)
Propiyotik	%14.5 (58)	%17.1 (53)	%16 (5)
Antibiyotik	%16 (64)	%20 (62)	%2.2 (2)
Tedavi uygulanmayan	%7 (28)	%9 (28)	-

Çalışma süresince toplam 400 örneğin aylara göre dağılımı incelendiğinde 4'ü (%1) Ocak, 4'ü (%1) Şubat, 57'si (%14.2) Nisan, 44'ü (%11) Mayıs, 20'si (%5) Haziran, 35'i (%9) Temmuz, 6'sı (1.5) Ağustos, 1'i (% 0.2) Eylül, 27'si (%6.7) Ekim, 121'i (%30.2) Kasım ve 81'i (%20.2) Aralık ayına aittir. Mart ayında hiç örnek alımı olmamıştır. Pozitif örneklerin yıl içerisinde aylara göre dağılımına bakıldığında Şubat ayında 1 (%1), Nisan ayında 8 (%8.8), Mayıs ayında 6 (%6.6), Haziranda ayında 1 (%1), Temmuz ayında 3 (%3.3), Ekim ayında 7 (%7.7), Kasım ayında 35 (%38.5), Aralık ayında 30 (%33) hasta RV pozitif olup Ocak, Mart, Ağustos ve Eylül aylarında pozitiflik tespit edilememiştir. (Şekil 10)



Şekil 10. Rotavirus antijen negatif ve pozitif örneklerin 2017 yılı boyunca aylara göre dağılımı

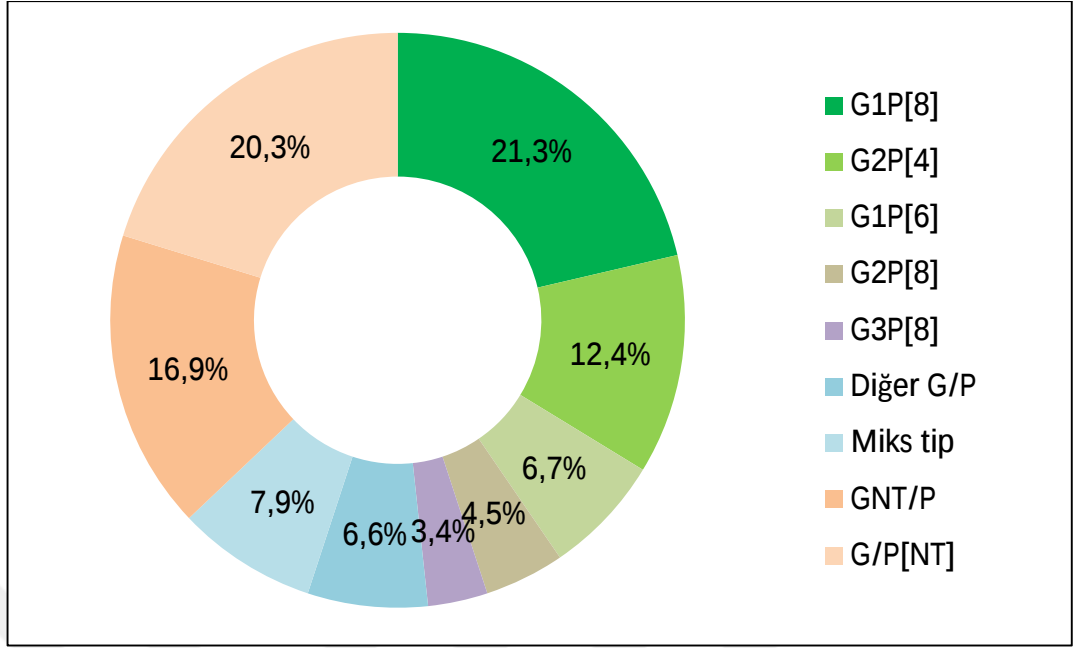
Rotavirus ELISA testi ile toplam 400 hastanın 91'i (%22.7) rotavirus antijen pozitif bulunmuştur. Rotavirus antijen pozitif 91 örneğin 89'u (%98) RT-PCR ile pozitif bulunmuş olup yüksek OD değerine sahip 2 örnek ise RT-PCR ile negatif bulunmuştur.

RT-PCR pozitif 89 (%22.2) hastada semi-nested multipleks PCR ile yapılan G tip genotiplleme (G1-4, G8-10) sonucunda örneklerin %50.5'inin (45) G1, %21.3'ünün (19) G2, %14.6'sının (13) G3 ve %3.4'ünün (3) G9 tip olduğu tespit edilmiştir. Örneklerin %16.9'u (15) ise G tip için non-typing (NT) olarak belirlenmiştir. Yine aynı yöntem ile yapılan P tip genotiplleme (P[4], P[6], P[8]-[11]) sonucunda ise örneklerin %19'u (17) P[4], %22,5'i (20) P[6], %36'sı (32) P[8], %4.5'i (4) P[9], %3.4'ü (3) P[10] ve %1'i (1) P[11] bulunmuştur. P tipi için örneklerin %20.3'ü (18) non-typing olarak belirlenmiştir. Hem G tipi (G3G9 (3), G1G2 (2), G1G3 (1)) hem de P tipi için (P[6][9] (2), P[4][9] (1), P[4][6] (1), P[4][8] (1), P[6][8] (1)) 6 hastada (%6.7) çoklu tip tespit edilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Rotavirus G ve P genotiplerin dağılımı

RV RT-PCR (+) %22.2 (89)			
G genotipleri		G/P kombinasyon	
G1	%50.5 (45)	G1P[8]	%21.3 (19)
G2	%21.3 (19)	G2P[4]	%12.4 (11)
G3	%14.6 (13)	G1P[6]	%6.7 (6)
G9	%3.4 (3)	G2P[8]	%4.5 (4)
P genotipleri		G3P[8]	%3.4 (3)
P[4]	%19 (17)	G1P[4]	%1,1 (1)
P[6]	%22,5 (20)	G1P[10]	%1,1 (1)
P[8]	%36 (32)	G1P[11]	%1,1 (1)
P[9]	%4.5 (4)	G3P[6]	%1,1 (1)
P[10]	%3.4 (3)	G3P[9]	%1,1 (1)
P[11]	%1 (1)	G3P[10]	%1,1 (1)
G genotiplendirilemeyen %16.9 (15)		Miks G/P kombinasyon	
GNT[8]	%4.6 (4)	G1G2P[4]	%1.1 (1)
GNT[6]	%9 (8)	G1G2P[6]	%1.1 (1)
GNT[4]P[8]	%1.1 (1)	G1G3P[4]	%1.1 (1)
GNT[6]P[8]	%1.1 (1)	G2P[4]P[9]	%1.1 (1)
GNT[6]P[9]	%1.1 (1)	G2P[4]P[6]	%1.1 (1)
P genotiplendirilemeyen %20.3 (18)		G3G9P[10]	%1.1 (1)
G1P[NT]	%15.8 (14)	G3G9P[6]P[9]	%1.1 (1)
G3P[NT]	%3.4 (6)		
G3G9P[NT]	%1.1 (1)		

Semi-nested multipleks PCR sonucunda elde edilen en yaygın G/P kombinasyonu %21.3 (19) ile G1P[8] olup sırasıyla %12.4 (11) ile G2P[4], %6.7 (6) ile G1P[6], %4.5 (4) ile G2P[8] ve %3.4 (3) ile G3P[8] takip etmektedir. Bu yaygın kombinasyonlar dışında G1P[4], G1P[10], G1P[11], G3P[6], G3P[9] ve G3P[10] gibi G/P kombinasyonlarının her biri %1.1 (1) oranında bulunmuştur. Bunun yanı sıra G genotiplendirilemeyen (GNT) %4.6 (4) GNT[8], %9 (8) GNT[6] ve her biri %1.1 (1) oranında GNT[4]P[8], GNT[6]P[8] ve GNT[6]P[9] olmak üzere toplam %16.9 (15) GNT/P kombinasyonu tespit edilmiştir. Ayrıca P genotiplendirilemeyen (P[NT]) 18 (%20.3) örneğin %15.8'ini (14) G1P[NT], %3.4'ünü (6) G3P[NT] ve %1.1'ini (1) G3G9P[NT] oluşturmaktadır (Şekil 11).



Şekil 11. Rotavirus G/P genotip kombinasyonlarının dağılımı

Rotavirus miks enfeksiyon prevelansı %7.9 (7) bulunmuş olup G/P multiple kombinasyonları G1G2P[4], G1G2P[6], G1G3P[4], G2P[4]P[6], G2P[4]P[9], G3G9P[10] ve G3G9P[6]P[9]'dur.

5. TARTIŞMA

Diare gelişmiş olan ve gelişmekte olan ülkelerde infant ve çocuklarda görülen en yaygın hastalıklardan biridir. Afrika, Latin Amerika ve Asya ülkelerinde diare vakalarının bir milyarı üzerinde olduğu ve beş yaş altı çocuklarda yıllık yaklaşık 3.3 milyon ölümün meydana geldiği tahmin edilmektedir. Çocuklarda diare genellikle rotavirus, enterik adenovirus, astrovirus, Norwalk virus, calicivirus ve torovirus gibi toplumda dolaşan viral etkenlerden kaynaklanmaktadır.

Human rotavirus yenidoğan ve çocuklar arasında akut gastroenterit'nin (AGE) en yaygın sebeplerinden biridir. Reoviridae ailesine dahil çift sarmallı RNA virusudur. Dünyadaki her çocuk beş yaşına kadar en az bir kez rotavirus enfeksiyonu geçirmektedir. Bulaş genel olarak fekal-oral yolla gerçekleşmektedir. Rotavirus VP6 antijenine göre A, B, C, D, E, F ve G, H olarak sekiz gruba ayrılır ve son zamanlarda dokuzuncu rotavirus grubu da (I) tanımlanmıştır. Grup A rotaviruslar infant ve çocuklarda dehidrasyon ile seyreden gastroenteritin önemli bir sebebi olarak bilinen en yaygın gruptur. AGE hala Sahra altı Afrika'da 5 yaşın altındaki çocuklarda morbidite ve mortalitenin önemli bir sebebidir ve AGE'li çocukların yarısı %23-43 gibi yüksek mortalite oranı ile rotavirus açısından pozitiflik göstermiştir. Rotavirus aşıları 2012 yılında AGE ile ilişkili mortalite ve morbiditenin artması sonucu uygulanmaya başlanmıştır⁽¹³¹⁾.

Virusun yapısal ve yapısal olmayan proteinleri bulunmaktadır. Yapısal olmayan proteinlerin, virionda RNA sentezi ve paketlenmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapısal proteinler altı adettir ve kısaca; Viral protein 1 (VP1) RNA polimeraz enzimidir, VP2 virionun çekirdeğini oluşturur ve RNA genomunu bağlar. VP3 virionun iç çekirdeğinin bir parçasıdır ve guanilflransferaz enzimidir. Bu enzim mRNA'nın cap işlemi ve post-translasyonel modifikasyonlar için önemlidir. VP4 virion yüzeyinde bir spike olarak çıkıntı yapar ve virulans için önemlidir. VP6 kapsidin büyük kısmını oluşturan oldukça antijenik ve rotavirus gruplarını tanımlamak için kullanılan yapısal bir proteindir. Bu protein rotavirus A enfeksiyonlarını tanımlamak amacıyla rutin laboratuvar testlerinde kullanılır. VP7 virionun dış yüzeyini oluşturan bir glikoproteindir. Yapısal işlevleri olmakla birlikte suşun G tipini belirlemektedir. Aynı zamanda VP4 ile birlikte enfeksiyona karşı bağışıklık oluşmasında etkilidir.

Rotaviruslar çoğunlukla intestinal sistemde replike olur ve ince bağırsağın villuslarındaki enterositleri enfekte ederek epiteli yapısal ve fonksiyonel olarak dejenere eder. Üçlü protein tabakası virusu midenin asidik pH'sına ve bağırsaktaki sindirim enzimlerine karşı dirençli hale getirir. Virus reseptör aracılı endositoz aracılığıyla hücrelere girer ve bir endozom olarak bilinen vezikülü oluşturur. Üçüncü tabakadaki VP7 ve VP4 spike proteinler kalsiyum konsantrasyonunda fark oluşturarak endozomun membran yapısını bozar. Bu olay VP7 trimerlerinin tekli protein alt birimlerine ayrılmasına ve viral dsRNA'nın etrafında VP2 ve VP6 proteinlerinin kalması ile çift tabakalı bir partikül (DLP) oluşmasına sebep olur. İki protein katmanının koruması altında bulunan 11 dsRNA ipliği ve viral RNA bağımlı RNA polimeraz, çift iplikli viral genomun mRNA transkriptlerini oluşturur. Kor içinde kalan viral RNA, çift iplikli RNA varlığında uyarılan RNA interferans (RNAi) olarak adlandırılan immün yanıtı kaçar. Rotavirus enfeksiyon sırasında hem protein sentezi hem de gen replikasyonu için mRNA sentezler. Rotavirus proteinlerinin çoğu viroplazma içerisinde toplanır, RNA burada replike olur ve DLP'ler oluşturulur.

Virus enfeksiyonundan yaklaşık iki saat sonra hücre çekirdeğinin etrafında viroplazma oluşur ve bu yapı iki yapısal olmayan viral protein NSP5 ve NSP2 tarafından meydana getirildiği düşünülen viral birimlerden oluşur. RNA interferans ile NSP5'in engellenmesi rotavirus replikasyonunda ani bir düşüş meydana getirir. Enfeksiyon durumunda endoplazmik retikuluma göç eden DLP'ler üçüncü dış tabakalarını (VP7 ve VP4 tarafından oluşturulmuş) kazanırlar. Yeni viruslar lizis yoluyla hücreden ayrılır⁽¹³¹⁾.

Rotavirus gastroenterit klinik tablosu hafif ile ağır seyreden enfeksiyona kadar geniş bir yelpazede değişiklik gösterir. Semptomlar genellikle kusma, dört ila sekiz gün boyunca sulu diare ve düşük dereceli ateş ile karakterizedir. Belirtilerin ortaya çıkmasından önce yaklaşık iki günlük bir inkübasyon periyodu vardır. Dehidrasyon genellikle meydana gelir ve çukur göz, artan deri sarkıklığı, bilinç bozukluğu ve dolaşım şokuyla karakterizedir. Rotavirus enfeksiyonunda dehidrasyon bakteriyel patojenlerden kaynaklanan enfeksiyonlardan daha yaygındır ve rotavirus enfeksiyonlarında mortalite oranı daha yüksektir. Hayat boyunca en az bir rotavirus enfeksiyonu geçirilir, ilk enfeksiyon semptomatik seyrederken sonraki enfeksiyonlar genellikle hafif veya asemptomatiktir. En ciddi semptomlar altı ay ile iki yaş arası

çocuklarda, yaşlılarda ve immün sistemi zayıflamış veya bulunmayan kişilerde görülür. Rotavirus ayrıca nozokomiyal enfeksiyonlara da sebep olmaktadır. Nozokomiyal diare gelişmiş ülkelerde pediatrik hastane kaynaklı enfeksiyonların %35'ini oluşturmakta olup çocuklarda morbidite ve mortalitenin önemli bir sebebidir. Rotavirus özellikle kış aylarında infantlarda nozokomiyal gastroenteritin en önemli sebebi olarak kabul edilmektedir⁽¹³¹⁾.

Rotavirusla ilişkili ölümlerin çoğunluğu (> %80) güney Asya ve Sahra altı Afrika'da sınırlı kaynağa sahip ülkelerde bulunmaktadır. Çocukluk çağındaki rotavirus enfeksiyonlarının çoğu 5 yaşına kadar ortaya çıkmaktadır ve toplumsal hijyen koşulları, enfekte olmuş çocukların bulunduğu bölge veya etkilenen ülkelerin sosyo-ekonomik durumunun daha yüksek olması ile ilgisizdir. Bu sebeple su temini, sanitasyon, kişisel beslenme, konutlaşma ve halk sağlığı eğitiminde iyileştirmeler olsa bile rotavirus enfeksiyonunun genel insidansı değişmeyecektir. Aşı rotavirus enfeksiyonlarına karşı savunmak ve enfeksiyonu önlemek için etkin ve kullanılabilir bir önlemdir. Akut gastroenterit bütün dünyada çocuk ölümlerinin önde gelen sebeplerinden biridir ve çocuk ölümlerin yaklaşık %15'inden sorumlu iken 2016 yılında bu oran %8'e düşmüştür, ancak rotavirus önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bu ölümlerin çoğunu düşük sosyoekonomik statüye sahip ülkeler ile Afrika'nın ve Asya'nın dezavantajlı kırsal bölgelerinde yetersiz beslenen infantlar oluşturur. Yüksek sosyoekonomik statüye sahip endüstrileşmiş ülkelerdeki çocuklarda rotavirus kaynaklı mortalite nadir görülürken rotavirus enfeksiyon insidansı hem yüksek hem de düşük sosyoekonomik seviyelerdeki ülkelerde benzerdir. Rotavirus aşısı ruhsatlandırılmadan önce endüstrileşmiş ülkelerde yıllık rotavirus enfeksiyonu ve hastalığı sonucu 220.000 hastaneye yatırılma, 1.8 milyon polikliniğe başvuru ve 7.1 milyondan fazla çocukta rotavirusla ilişkili gastroenterit vakası olduğu tahmin edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1990'lı yıllardan 2000'lerin başına kadar her yıl rotavirus enfeksiyonu sebebiyle yaklaşık 60 ölüm, 410.000 poliklinik başvurusu, 272.000 acil servis başvurusu ve 70.000 hastaneye yatış gerçekleşmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki çocukların yaklaşık %1.2-1.5'nin rotavirus enfeksiyonu sebebiyle hastaneye kaldırıldığı bildirilmiştir. Tayvan'da Ulusal Sağlık Sigortası Veri Bankasının bilgileri kullanarak rotavirus aşısı kullanılmadan önce 2000 ile 2005 yılları arasında her yıl en az 150.000 rotavirus gastroenterit vakasının meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu vakaların

arasında 106.000 ayakta hasta, 12.800 acil servis başvurusu, 15.000 hastaneye yatış ve bu çalışma süresi boyunca rotavirus enfeksiyonunun sebep olduğu yaklaşık 7 ölüm yer almaktadır. Rotavirus enfeksiyonu kaynaklı toplumsal maliyetler farklı ülkeler için hesaplanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2004 yılında rotavirus enfeksiyonundan kaynaklanan toplumsal maliyetin yıllık 900 milyon ABD doları olduğu tahmin edilmektedir; Tayvan'da 2005 yılında rotavirusle ilgili maliyetler yaklaşık 21.5 milyon dolardır; 2002'de Avrupa Birliği'nde toplumsal maliyetler yaklaşık yılda 550 milyon euro'ya ulaşmıştır ve gelişmekte olan ülkelerde 2007'de rotavirusun toplumsal maliyetinin 423 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir. Bu verilere göre rotavirus gastroenteriti halk sağlığı kaynaklarının büyük bir kısmını kullanmaktadır ⁽¹³⁸⁾.

Rotavirus için ön tanı özellikle düşük gelirli merkezlerde akut diareli beş yaşından küçük herhangi bir çocuk olması durumudur. Bununla birlikte rotavirus A için kesin tanı dışkı örneklerinde ELISA ile yapılır. Polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR, G ve P genotipleme), poliakrilamid jel elektroforezi ve elektron mikroskopisi araştırma için kullanılmaktadır. Tedavi için semptomların şiddetine göre DSÖ protokolünde önerilen dehidratasyon derecesinin ciddiyetine göre oral rehidrasyon terapisi (ORS) verilir. Gelişmiş sanitasyona rağmen rotaviral hastalık prevalansının azalmadığı ve oral rehidrasyon ilaçlarının kullanılmasına rağmen hastaneye yatış oranı yüksek olduğundan halk sağlığı için primer korunma için aşı uygulanır. GlaxoSmithKline tarafından üretilen Rotarix ve Merck tarafından geliştirilen RotaTeq rotavirus A enfeksiyonuna karşı çocuklar için güvenilir ve etkili olan iki aşıdır. Her ikisi de oral olarak kullanılan, atenué, canlı virus aşılardır. İmmünizasyon programı 2009 yılında başlamıştır. Rotavirus enfeksiyonlarının insidansı ve şiddeti aşılama yapan ülkelerde önemli ölçüde azalmıştır ⁽¹³²⁾.

Aşı Uygulamaları Danışma Komitesi (Advisory Committee on Immunization Practices; ACIP) 1998'de Birleşik Devletlerindeki çocuklarda RotaShield® (RRV-TV) aşısının (Wyeth Lederle Aşıları ve Pediatri, Marietta, Pensilvanya) kullanılmasını tavsiye etmiştir. Bu aşı insan G1, G2 ve G4 genotipleri (VP7 geni) ile ilişkili 11 simian geninden (RRV) oluşmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri, Finlandiya ve Venezuela'da yapılan klinik araştırmalarda RRV-TV'nin oldukça etkili olduğu ve vakaların %80 ila %100'ünde RVA'nın sebep olduğu AGE'yi önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte bu aşı 1999 yılında intussepsiyon vakaları ile ilişkili olduğu

gerekeçisiyle uygulamadan geri çekilmiştir. İntestinal invajinasyon veya intussusepsiyon bağırsağın bir segmentinin bitişiğinde bulunan diğer segment içerisine doğru girdiği durumdur. Bu olumsuz olayın gerçek insidansının değerlendirilmesi zordur ve aşılannmış çocuklar için 10 bin'de 1 risk taşıdığı düşünölmektedir. Daha sonra bazı çalışmalar RotaShield® ile aşılama sonucu oluşan intussuspsiyon riskinin ≥ 90 günlük çocuklarda ilk dozun uygulanmasıyla ilişkili olduğunu belirtmiştir. Çocuklarda 3 ila 9. aylar arasında intussusepsiyona karşı doğal duyarlılığın arttığı bilinmektedir. Dolayısıyla RRV-TV halen ABD'de lisanslıdır ancak kullanımı durdurulmuştur. RotaShield® son zamanlarda aşılama programında değışiklikler yapıldıktan sonra Afrika ölkelerinde (Güney Afrika ve Gana) klinik araştırmalarda değerlendirilmiştir. RotaShield® ile yaşanan deneyim Aşı Güvenliği Küresel Danışma Komitesini (Global Advisory Committee on Vaccine Safety; GACVS) RVA'ya karşı yeni aşılarn geliştirilmesinde intussusepsiyon riskinin değerlendirilmesine yönlendirmiştir. Şu anda DSÖ tarafından güvenli ve etkili olduğu kanıtlanan lisanslı ve tavsiye edilen iki aşı bulunmaktadır. RotaTeq® (RV5) (Merck & Co. Inc., West Point, Pensilvanya) reassortment ile birleştirilen beş insan ve sığır viral genotipi (G1 ila G4 + P [8]) içeren oral pentavalan bir atenüe aşıdır. RotaTeq® 1 ila 8 aylık çocuklara üç doz şeklinde uygulanmaktadır; birinci doz 6-12 haftalık iken, ikinci doz birinci dozdan 4 ila 10 hafta sonra, üçüncü doz ikinci dozun ardından 4 ila 10 hafta sonra uygulanır, bununla birlikte son doz en çok 32. haftada verilmelidir. Rotarix® (RIX4414) (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belçika) RVA'nın en yaygın insan genotipini temsil eden G1P1A [8] suşundan oluşan oral monovalan atenüe bir aşıdır. Rotarix® iki doz şeklinde uygulanır, ilki 2. ayda ve ikinci dozun da 4 aylıkken uygulanması önerilir. Brezilya'da Rotarix® 2006 yılında Ulusal Aşı Programı'na dahil edilmiştir. RotaTeq®'te aynı zamanda ölkede ruhsatlıdır, ancak yalnızca özel aşılama servislerinde bulunmaktadır. Çin 2000-2001 yıllarında Ulusal Aşı Programı'nda kuzudan izole edilmiş RVA'dan türetilmiş olan oral aşı LLR'yi (Lanzhou Lamp Rotavirus) (G10P'nin zayıflatılmış suşu [12]) tanıtmıştır. Yeni bir oral RVA aşısı olan Rotavac® 2014 yılında Hindistan'da piyasaya sürölmüş olup şimdiye kadar sadece o ölkede lisans almıştır. Rotavac® Hindistan'da geliştirilmiş ve üretilmiştir. İnsan yenidoğan suşundan türetilmiş, sığır suş segmenti (doğal insan-sığır rekombinantı) içeren G9P[11] (11E6) doğal olarak zayıflatılmış oral monovalan bir aşıdır⁽¹³³⁾.

Ülkemizde Rotavirus enfeksiyon insidansı ile ilgili yapılan çalışmalardan Kızılırmak ve arkadaşları⁽¹³⁴⁾ Eylül 2014-Eylül 2015 tarihleri arasında Düzce Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne AGE ön tanısı ile başvuran çocuk hastalardan alınan dışkı örnekleri incelemişlerdir. Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na üniversitenin çocuk hastalıkları servisi, çocuk hastalıkları polikliniği ve acil çocuk polikliniğinden gönderilen 1080 gaita örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Gaita örneklerinin incelenmesinde, dışkıda özgül monoklonal antikorları kullanarak virus antijeni saptamaya yönelik hızlı ve kalitatif bir test olan Rotavirus Adenovirus antijen test kiti (Rotavirus and Adenovirus Combo test Device, Bon Biopharm) kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 1080 çocuğun 650'si (%60,2) erkek, 430'u (%39,8) kız olup yaş ortalamaları 1.96/yıl olarak hesaplanmıştır. Toplam 173 (%16) hastada rotavirus pozitifliği saptanmıştır. Rotavirus pozitiflik oranları incelendiğinde cinsiyete göre farklılığın olmadığı görülmüştür. Hastaların yaşlarına göre (ay) rotavirus pozitiflik oranları incelendiğinde 7-12 ay (%18.5), 13-24 ay (%21.1), 37-48 ay (%19.2), 49-60 ay (%21.9) yaş grubundaki rotavirus insidansının 0-6 ay (%8.5) ve 25-36 ay (%12.3) yaş grubuna oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Rotavirusun kış ve ilkbahar mevsimlerindeki görülme sıklığının sonbahar ve yazdan belirgin şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir.

Şimşek ve arkadaşları⁽¹³⁵⁾ Ocak 2004-Aralık 2005 tarihleri arasında, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin çocuk polikliniğine AGE sebebi ile başvuran 0-5 yaş grubu çocuklarda prospektif olarak rotavirus sıklığı ve serotip özelliklerini araştırmışlardır. Olgularda ateş, bulantı, kusma ve karın ağrısının eşlik ettiği veya etmediği akut diare mevcuttur. Vakaların hepsi Ruuska ve Vesikari'nin tanımladığı rotavirus diare sayısal skorlama sistemine göre 0-20 puan arası olacak şekilde puanlanmıştır. Hastalardan başvuru sırasında alınan gaita örnekleri ELISA (Rotaclone ELISA kiti) yöntemi ile rotavirus pozitifliği açısından incelenmiştir. Gaitasında rotavirus antijeni pozitif saptanan hastaların gaita örneklerinde reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile rotavirus genotipleri araştırılmıştır.

Çalışmaya 127 diareli olgu dahil edilmiş olup bu olguların 68'i (%53.5) erkektir. Örneklerin 37'sinde (%29.1) rotavirus antijeni saptanmıştır. Antijen pozitif olguların 21'i (%55.8) erkektir. Örneklerin 49'u (%38.6) kış, 22'si (%17.3) ilkbahar, 19'u (%15) yaz ve 37'si (%29.1) sonbahar mevsiminde toplanmıştır. Rotavirus pozitifliği en sık

sonbaharda (n= 20, %54.1) görülürken, kışın 7 (%18.9), ilkbaharda 2 (%5.4), ve yazın 8 (%21.6) olguda rotavirus pozitifliği saptanmıştır. Tüm olguların 81'i (%63.8), rotavirus pozitifliği saptanan hastaların 26'sı (%70.3) 0-12 ay yaş grubuna dahildir. Tüm hastaların yaşlarına göre dağılımına bakıldığında 13-24 ay arasında 32 (%25.2), 25-36 ay arasında 10 (%7.9), 37-48 ay arasında 1 (%0.8), 49-60 ay arasında 3 (%2.4) iken rotavirus pozitif olguların yaş gruplarına göre dağılımı sırasıyla 6 (%16.2), 3 (%8.1), 0, 2 (%5.4) olarak saptanmıştır. Rotavirus pozitif olgularda yapılan genotiplendirme sonucunda 30 (%81) olguda G1-4 genotip pozitifliği belirlenmiştir. En sık bulunan genotip 26 (%86.0) olguyla G1 olmak üzere, G2 1 (%3.3), G3 1 (%3.3), G4 2 (%6.6) olguda pozitif olarak saptanmıştır. Olguların 7'sinde (%18.9) genotip belirlenememiştir.

Balkan ve arkadaşları⁽¹³⁶⁾ Eylül 2010-Eylül 2011 tarihleri arasında Erzurum'da akut gastroenterit sebebi ile Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran 0-5 yaş grubu 340 çocuğa ait dışkı örneğinde rotavirus antijen varlığı araştırmışlardır. Rotavirus antijenleri CerTest Rota-Adeno Card Test (CerTest, Biotec, Spain) kiti ile tespit edilmiştir.

Dışkı örneklerinin 89'u (%26.1) rotavirus pozitif olarak tespit edilmiştir. Rotavirus antijen pozitifliği en çok 5-24 ay yaş grubunda ve kış mevsiminde gözlenmiştir. Tüm hastaların %43.2'si (147), rotavirus pozitif hastaların ise %9.4'ü (32) kızlardan oluşmaktadır. Çocukların yaş gruplarına göre dağılımı %19.7'si (67) 4 ay altı, %52.4'ü (178) 5-24 ay, %27.9'u (95) 25-60 ay olup bu yaş gruplarında rotavirus pozitiflik oranları sırasıyla %2.7 (9), %17.6 (60) ve %5.8 (20)'dir. RV(+) örneklerin mevsimsel dağılım oranları ise ilkbaharda %4.4 (15), yazın %1.5 (5), sonbaharda %3.2 (11) ve kışın %17 (58)'dir.

Şafak ve arkadaşları⁽¹³⁷⁾ Eylül 2011-Mayıs 2013 tarihleri arasında Balıkesir Atatürk Devlet Hastanesine diare şikayeti ile başvuran 0-6 yaş arasındaki 568'i erkek, 418'i kız çocuktan elde edilen 986 dışkı örneği incelemiştir. Örneklerde rotavirus antijen varlığı kalitatif immünokromatografik test (Toyo Diagnostics Rota-Adeno Combo Test, Gesan Production, Italy) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda araştırılmıştır. İncelenen 986 örnekte rotavirus antijeni saptanma oranı %12.8 (127/986) olarak belirlenmiştir. Rotavirus pozitifliği, 0-12 aylık çocuklarda (35/350) %10, 13-24 aylık çocuklarda (38/231) %16.4, 25-36 aylık çocuklarda (23/106) %21.7, 37-48 aylık çocuklarda (11/55) %20, 49- 60 aylık çocuklarda (6/46) %13 ve >60 aylık çocuklarda

(198) %6.6 olarak saptanmıştır. Rotavirus antijeni pozitif olgu sayısında kış (%15.65; 53/338) ve ilkbahar (%15.2; 56/369) başında bir artış izlenmiş ve pozitif olgulara en sık Şubat ve Mart ayında rastlanmıştır.

Tekin ve arkadaşları⁽¹³⁸⁾ 2011-2013 tarihleri arasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi çocuk polikliniği ve acil servisine akut diare sebebiyle başvuran ve dışkı örnekleri incelenen 263 olgunun hastane kayıt verilerini geriye dönük olarak taramışlardır. Dışkı örnekleri, kalitatif monoklonal antikorlarla kaplanmış kromatografik immunoassay yöntemi ile çalışan ticari bir test (Rota-Adeno Virus Combo Test Device, Ecotest, Çin) ile üreticinin önerilerine göre incelenmiştir. Çalışmada toplam 263 hastanın dosyası incelenmiş ve hastaların 139'nun (%52.9) erkek, 124'nün (%47.1) kız olduğu belirlenmiştir. Olguların %23.6'sında (62) rotavirus antijen pozitifliği saptanırken, 2 yaş altı çocuklarda sıklık %34.5 (55) olarak belirlenmiştir. Erkeklerin 38'inde kızların 28'inde rotavirus pozitifliği saptanmış, ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Rotavirus pozitifliğinin mevsimlere göre sıklığı sırasıyla ilkbaharda %27.8, yazın %14.6, sonbaharda %26.3 ve kışın %21.4 olarak belirlenmiştir.

Atalay ve arkadaşları⁽¹³⁹⁾ Ocak 2009-Aralık 2012 tarihleri arasında Kayseri'de Erciyes Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Seroloji Ünitesi'ne rotavirus antijeni araştırılması için gönderilen, 0-16 yaş arası çocuklara ait 2636 taze dışkı örneğini incelemişlerdir. Kanlı olduğu ve parazit görüldüğü rapor edilen dışkı örneklerine ait veriler değerlendirme dışı bırakılmıştır. Dışkı örneklerini incelemede, kalitatif immünokromatografik yöntem prensibi ile çalışan, duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %96 ve %98 olarak bildirilen ticari bir test (Rota/Adenovirus Rapid Test Card, GenxBio, India) kullanılmıştır.

Toplam 2636 hastaya ait taze dışkı örneklerinden 1102'si (%41.8) kız çocuklarına, 1534'ü (%58.2) erkek çocuklarına aittir. Hasta örneklerinin 277'si kız çocuklarına, 386'sı erkek çocuklarına ait olmak üzere toplam 663 hastada (%25.2) rotavirus antijeni saptanmıştır. Kız ve erkek çocuklarda rotavirus antijen pozitifliği sırasıyla; %25.1 ve %25.2 olarak saptanmış ve cinsiyet ile rotavirus antijeni pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Yıllara göre değerlendirildiğinde rotavirus antijen pozitiflik oranları 2009 yılında %31.8, 2010 yılında %30.8, 2011 yılında %28.2 ve 2012 yılında %20.6 olarak

belirlenmiştir. Yaş grupları açısından değerlendirildiğinde rotavirus antijen pozitifliği 0-6 ay, 7-24 ay ve 3-5 yaş gruplarında sırasıyla; 128 (%21.9), 368 (%32.8) ve 111 (%22.9) vakada bulunmuştur. Rotavirus antijen pozitiflik oranı beş yaş grubunda %27.7 olup 7-24 ay yaş grubunda diğer yaş gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Rotavirus antijen pozitifliği mevsimsel olarak değerlendirildiğinde, pozitiflik en sık kış mevsiminde (%39.5), en az yaz mevsiminde (%9.7) saptanmıştır. Kış mevsimindeki rotavirus antijen pozitifliği diğer mevsimlere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Rotavirus antijen pozitifliğinin en sık saptandığı ilk üç ay sırasıyla Ocak (%46.4), Aralık (%40) ve Kasım (%32.3) olarak belirlenmiştir.

İnan ve arkadaşları⁽¹⁴⁰⁾ Ocak 2011-Aralık 2012 tarihleri arasında İstanbul'da akut gastroenterit ön tanısı ile Gayrettepe Florence Nightingale Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na tanı için gönderilmiş olan dışkı örneklerini rotavirus pozitifliği açısından araştırmıştır. Dışkı örneklerinde rotavirus tespiti için immunokromatografik yöntem prensibi ile geliştirilmiş olan (Vikia®-Rota-Adeno bioMérieux Diagnostic) kaset test kullanılmıştır. Akut gastroenterit ön tanısı konan 5 yaş altı toplam 260 hastada rotavirus varlığı araştırılmış ve %8.5 (22) oranında rotavirus pozitif bulunmuştur. Hastaların %48.3'ü kızlardan ve %51.7'si erkeklerden oluşmaktadır. Rotavirus pozitifliği en çok kış (47.6) ve ilkbahar (30.9) mevsimlerinde gözlenmiştir.

Özer ve arkadaşları⁽¹⁴¹⁾ Antakya'da Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına 1 Ocak 2010 ile 31 Aralık 2013 yılları arasında akut gastroenterit ön tanısı ile başvuran hastaların rotavirus antijen testi (VIKIA® Rota-Adeno (BioMerieux, Fransa) ile incelenen dışkı örneklerinin sonuçlarını retrospektif olarak incelemiştir. Bu dört yıllık dönemde rotavirus antijen araştırılması istenilen 64 dışkı örneğinin 20 (%31.2) tanesinin rotavirus pozitif olduğu tespit edilmiştir. Kış ve sonbahar mevsimlerinde gönderilen dışkı örneklerinde rotavirus antijen pozitifliği ise sırasıyla 12 (%60) ve 7 (%35) vakada olmak üzere diğer mevsimlerden daha fazla olduğu saptanmıştır. Örneklerin %45.3'ü (29) 0-2 yaş, %21.9'u (14) 3-5 yaş grubuna aittir. Rotavirus pozitif 20 hastanın 15'inin (%75) 0-2 yaş ve 3'ünün (%15) 3-5 yaş grubuna ait olduğu belirlenmiştir.

Meral ve arkadaşları⁽¹⁴²⁾ çalışmalarına Nisan 2009 ile Şubat 2010 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine gastroenterit şikayeti ile başvuran

0-5 yaş arasındaki 108'i (%43) kız, 143'ü (%57) erkek olmak üzere toplam 251 çocuk hastayı dahil etmişlerdir. Olgulardan alınan dışkı örneklerinde rotavirus grup A antijen pozitifliği, %10 oranında sulandırılmış örneklerde ELISA yöntemi ile (Rotaclone, Meridian Diagnostics, Inc., USA) araştırılmıştır. Rotavirus antijen pozitifliği saptanan örneklerden viral çift zincirli RNA izolasyonu, fenol-kloroform-izoamil-alkol yöntemi ile yapılmıştır.

Rotavirus VP-7 amplifikasyonu Beg9 ve End9 primerleri kullanılarak, G tiplendirme G1-G4 ve G9 için özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. VP-4 amplifikasyonu con-2 ve con-3 primerleri kullanılarak yapılmış, P tipleri için P[8], P[4], P[6] ve P[9] primerleri kullanılmıştır. VP4 ve VP7 gen amplifikasyonu için AccessQuick RT-PCR (Promega Corporation, Madison, WI), genotiplendirme için de PCR Mastermix (Promega, Madison, WI) kullanılmıştır.

Çalışmaya alınan 251 olgunun 53'ünde (%21.1) ELISA testi ile rotavirus antijeni pozitif bulunmuştur. Rotavirus antijen pozitifliği saptanan olguların yaşları 6 gün ile 54 ay arasında değişmektedir. Rotavirus enfeksiyonunun en sık 6-23 aylık çocuklarda saptandığı ve 12-23 aylık çocuklarda (%37.7) pik yaptığı gözlenmiştir. Ancak rotavirus antijen pozitif ve negatif olan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Rotavirus antijen pozitifliği saptanan olguların 26'sı (%49.1) kız, 27'si (%50.9) erkek olup, cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Rotavirus enfeksiyonlarının mevsimsel dağılımı incelendiğinde 27'sinin (%50.9) sonbahar, 13'ünün (%24.5) kış, 8'inin (%15.1) yaz ve 5'inin (%9.4) ilkbahar aylarında tespit edildiği belirlenmiştir. Antijen pozitifliği en sık Ekim ayı olmak üzere sonbahar mevsiminde yoğunlaştığı gözlenmiştir.

Tiplendirme sonucunda, rotavirus antijeni pozitif 53 örneğin 31'inde (%58.5) G tipi, 24'ünde (%45.3) ise P tipi saptanmıştır. G tipi saptanan örneklerin 5'i (%16.1) G1, 4'ü (%12.9) G2, 12'si (%38.7) G3, 8'i (%25.8) G4 ve 2'si (%6.5) G9 olarak belirlenmiştir. Saptanan P tiplerinin ise 1'i (%4.2) P[9], 2'si (%8.3) P[6] ve 21'i (%87.5) P[8] olarak tanımlanmıştır. Örneklerin 18'inde (%34) belirlenen G/P tip kombinasyonlarına bakıldığında 7'sinin (%38.9) G3P[8], 3'ünün (%16.6) G2P[8], 3'ünün (%16.6) G4P[8], 2'sinin (%11.1) G1P[8] ve her bir örnekte (%5.6) ise G9P[8], G4P[6] ve G1P[6] olduğu saptanmıştır.

Altındış ve arkadaşları⁽¹⁴³⁾ Ocak-Aralık 2009 tarihleri arasında Afyonkarahisar'da Afyon Kocatepe Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Pediatri Anabilim Dalı tarafından Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen gaita örnekleri ile Afyonkarahisar Zübeyde Hanım Doğum ve Çocuk Hastanesi Yenidoğan servisine başvurup, yatırılarak tedavi edilen, 6 yaş altı akut gastroenteritli çocuklara ait toplam 150 gaita örneğini incelemişlerdir. Çalışmaya alınan gaita örneklerinde rotavirus varlığı hızlı ve kalitatif sonuç veren immunokromotografik test yöntemi ile (VIKIA Rota-Adeno, Biomerieux) araştırılmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında, klinik olarak diareli olan 95 olgunun dışkı örneklerinden reverse transkriptaz PCR (RT PCR) yöntemi ile rotavirus varlığı ve devamında tiplendirmesi çalışılmıştır. Bu amaçla rotavirus RNA'sının ekstraksiyonu (QIAGEN-QIAamp DNA stool mini kit) sonrasında VP7 ve VP4 konsensus primer dizileri kullanılarak RT-PCR çalışılmıştır. Rotavirusların VP7 ve VP4 genotiplerinin belirlenmesinde iki aşamalı RT-PCR testi uygulanmıştır.

Çalışmaya alınan 6 yaş altı akut gastroenteritli çocuklara ait toplam 150 gaita örneğinin 86'sı (%57.3) erkek, 64'ü (%42.7) kız çocuklarına aittir.

İmmunokromotografik kaset test yöntemiyle tüm dışkı örneklerinin 60'ı (%40) rotavirus pozitif bulunmuştur. Yine aynı gruptan, RT PCR ile çalışılan 95 dışkı örneğinin 15'i (%15.8) rotavirus pozitif olarak belirlenmiştir. En yaygın G9 (%65) bulunmuş olup diğer G genotipleri sırası ile G1 (%22), G2 (%10), G4 (%1), G8 (%1) ve G10 (%0.5) şeklindedir. P genotipleri ise sırasıyla %81 P[8], %19 P[4] olarak belirlenmiştir. En sık görülen G ve P kombinasyonları; G9P[8] (%52), G1P[8] (%18), G9P[4] (%13) olup, diğerleri (%13) G1P[4], G2P[8], G4P[4], G4P[8], G2P[4], G1G9P[4], G10P[8], G2G9P[8]'dir

Araştırmada en çok pozitifliğin saptandığı ilk üç ay Şubat, Ocak ve Mart ayları olup olgu sayıları sırasıyla 18 (%12), 14 (%9.3) ve 7 (%4.7) olarak tespit edilmiştir. Kış mevsiminde artış gösteren olgu sayısı Şubat ayında en yüksek değerine ulaşmış, sonrasında ise azalmaya başlayarak yaz aylarında hiçbir olguda rotavirus pozitifliği tespit edilmemiştir.

Çoban ve arkadaşları⁽¹⁴⁴⁾ Antalya'da Nisan 2008'den Mart 2013'e kadar Başkent Üniversitesi Alanya Araştırma ve Tıp Merkezi'nde, 16 yaş ve altı 3.106 çocuğun gaita örneğinde CerTest Rota Blister Testi (CerTest, Biotec, İspanya) ve RIDA® Quick

Rotavirus/Adenovirus Combi (r-Biopharm, Almanya) testi kullanarak monoklonal antikör yöntemi ile rotavirus antijen varlığını araştırmışlardır. Çalışmada yaklaşık olarak beş yıl içerisinde 3.106 dışkı örneği rotavirus antijen varlığını araştırmak amacıyla test edilmiş ve hastaların %13.6'sının (422) rotavirus pozitif olduğu belirlenmiştir. Pozitif hastaların %55.2'si (233) erkeklerden, %44.8'i (189) kızlardan oluşmaktadır. Hastaların yaş ortalaması 34.69 (3-157) ay olarak hesaplanmıştır. Hastaların yarısının (208/422, %49.3) 2 yaş altı ve %77'sinin ise (325/422) 4 yaş altı olduğu, 46 (%11) hastanın 10-12 aylık, 34 (%8) hastanın 22-24 aylık olduğu belirlenmiştir. RVGE'nin mevsimsel dağılımına bakıldığında kış ve ilkbahar başlangıcında daha yüksek bir insidans gösterdiği tespit edilmiştir. Sırasıyla aylara göre çalışılan örnek sayısı ve bu örneklerdeki pozitiflik oranı; Ocak ayında 332 örneğin %18.9'u (63), Şubat ayında 284 örneğin %19.3'ü (55), Mart ayında 247 örneğin %18.6'sı (46), Nisan ayında 210 örneğin %19.0'u (40), Mayıs ayında 223 örneğin %12.1'i (27), Haziran ayında 231 örneğin %8.6'sı (20), Temmuz ayında 340 örneğin %0.3'ü (9), Ağustos ayında 282 örneğin %0.4'ü (11), Eylül ayında 212 örneğin %12.7'si (27), Ekim ayında 254 örneğin %14.1'i (36), Kasım ayında 194 örneğin %17.0'si (33), Aralık ayında 297 örneğin %18.5'i (55) ve toplamda 3106 örneğin %13.58'i (422) pozitif bulunmuştur. Rotavirus pozitiflik oranı %19.3 ile en yüksek Şubat ayında, %0.3 ile en düşük Temmuz ayında tespit edilmiştir. Tüm RVGE vakalarının %40.9'u (173/422) kış aylarında tespit edilmiş olup Temmuz ve Ağustos aylarında sadece 20 (%4.7) RVGE vakası görülmüştür.

Kurugöl ve arkadaşları⁽¹⁴⁵⁾ İzmir'deki Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Behçet Uz Çocuk Hastanesi ve Sosyal Güvenlik Tepecik Çocuk Hastanesi dahilinde prospektif bir araştırma gerçekleştirmişlerdir. Ocak 2000'den Ocak 2001'e kadar akut gastroenterit sebebiyle bu hastanelere başvuran beş yaşın altındaki 920 çocuk değerlendirmeye alınmıştır. Dışkı örneklerindeki rotavirus antijen varlığı ELISA kiti (IDEIATM rotavirus testi, Dako, United Kingdom) kullanılarak tespit edilmiştir. Rotavirus pozitif örnekler revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile genotiplendirilmiştir.

Bir yıllık çalışma süresi boyunca değerlendirmeye alınan 920 çocuğun 366'sında (%39.8) rotavirus tespit edilmiştir. Rotavirus enfeksiyonu olan çocukların (yaş ortalaması 15.3 ± 12.4) rotavirus negatif olan hastalardan daha küçük olduğu (yaş

ortalaması 17.5 ± 16.7) belirlenmiştir. Rotavirus gastroenteriti olan hastaların çoğunun (295/366, %80.7) iki yaşından küçük olduğu görülmüştür. Rotavirus enfeksiyon insidansı 6-23 aylık çocuklarda en yüksek olup tüm gastroenteriti olgularının %46'sını (237/515) oluşturmaktadır. İki yaşın üzerindeki çocuklarda sadece %30.5 (71/233) oranında RV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Rotavirus enfeksiyonu olan çocukların yaş gruplarına göre dağılımına bakıldığında sırasıyla 0-5 aylık 58 (%15.8), 6-11 aylık 118 (%32.3), 12-23 aylık 119 (%32.5) ve 24-60 aylık 71 (%19.4) çocukta rotavirus enfeksiyonu tespit edilmiştir. Yaş grupları kıyaslandığında 6-23 aylık yaş grubu ile iki yaşından büyük yaş grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. Rotavirus gastroenteritinin mevsimsel insidansının kış ve ilkbaharın erken dönemlerinde yükseldiği belirlenmiştir. Rotavirus sezonu Ekim ayında kademeli olarak başlayıp Ocak-Mart aylarında yükselmiş ve Mayıs ayında sonlanmıştır. Kış aylarında akut gastroenterit olgularının yaklaşık %60-65'inde rotavirus tespit edilmiş ve yaz aylarında rotavirus gastroenterit oranı %20'den daha düşük bulunmuştur. Prematüre bebeklerde rotavirus varlığı veya yokluğunun gastroenterit artışı (Sırasıyla %7.1, %5.3) ile ilişkisi bulunmamıştır. Rotavirus pozitif hastaların cinsiyeti rotavirus negatif hastalarla hemen hemen aynıdır. Yaşamın ilk altı ayında sadece anne sütü ile beslenmeme ve rotavirus diareli arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Sadece altı ay veya daha uzun süre anne sütü ile beslenen çocuklarla karşılaştırıldığında, altı aydan daha kısa süre emzirilenlerin çocuklarda iki kat daha fazla rotavirus enfeksiyonu tespit edilmiştir. Anne sütü ile beslenen infantlarda gastroenterit vakaların %30.7'sinden (85/277) rotavirus sorumlu olup emzirilmemiş bebeklerde bu oran %49.5'tir.

Rotavirus gastroenteriti, gastroenterit etkeni rotavirus olmayan enfeksiyonlardan anlamlı derecede daha ciddi (sırasıyla ortalama ciddiyet skoru 13 ve 9) bulunmuştur. Rotavirus gastroenteritli çocukların çoğunluğu için ciddiyet skoru (253/366, %69.1) ≥ 11 iken, non-rotavirus gastroenteritli çocukların sadece %39.2'sinde (217/554) ≥ 11 skor gözlenmiştir. Rotavirus gastroenteritli hastaların yaklaşık %45'inde dehidrasyon gelişirken bu oran non-rotavirus gastroenteritli hastalarınkinden (%19) oldukça yüksek bulunmuştur. Çalışma grubundaki 920 çocuğun 193'ünün (%21) hastaneye yatışı gerçekleşmiştir. Hastaneye yatış gerektiren vakaların çoğunluğu (113/193, %58.9) rotavirus ile ilişkilidir. Rotavirus gastroenteritinin ortalama hastanede kalış süresi 5.5 ± 5.1 gün iken non-rotavirus gastroenterit için bu süre 3.3 ± 3.1 gün'dür. Rotavirus

gastroenteritinin hastanede kalış süresi non-rotavirus gastroenterit için belirlenen süreye oranla anlamlı derecede daha uzundur.

Toplam 366 rotavirus pozitif dışkı örneğinden 324 RT-PCR ile tiplendirilebilmiştir. Bu örneklerin 295'u (%91.1) genotip G1, G2, G3 ve G4'ten oluşmaktadır. Tiplendirmede en sık G1 serotipi (%75.1) tespit edilmiştir. Diğer genotipler ise sırasıyla G2 %0.8, G3 %3 ve G4 %6.3'tür. Suşların %8.9'u tiplendirilememiştir. Miks enfeksiyon oranını %5.9 olarak tespit etmişlerdir.

Durmaz ve arkadaşları⁽¹⁴⁶⁾ süveyans çalışmasında evrensel rotavirus aşılama programının başlangıcından önce Türkiye genelinde bulunan rotavirus G ve P genotipleri için temel veriler elde etmeyi amaçlamışlardır. Bu süveyans çalışması Ağustos 2012'den Temmuz 2014'e kadar ülke genelinde 23 ilde 35 hastanede gerçekleştirilmiştir. Bu illerin yedi coğrafik bölgeye göre dağılımı: Marmara bölgesinde İstanbul ve Bursa; Ege Bölgesi'nde İzmir ve Afyon; Orta Anadolu'da Ankara, Eskişehir, Kayseri ve Konya; Akdeniz bölgesinde Antalya, Mersin, Isparta ve Adana; Güneydoğu Anadolu'da Gaziantep, Şanlıurfa ve Diyarbakır; Doğu Anadolu'da Erzurum, Malatya ve Van; Karadeniz bölgesinde Rize, Trabzon, Tokat, Samsun ve Karabük'tür. Katılan tüm hastanelerde akut gastroenterit sebebi ile başvuran 5 yaşından küçük çocuklardan dışkı örnekleri toplanmıştır. Dışkı örnekleri hastaneye kaldırıldıktan sonraki ilk 48 saat içerisinde toplanarak hastanelerin laboratuvarlarında lateks aglütinasyon (Rotalex, Orion Diagnostica), immünokromatografik test (Rota Uni-Strip, Coris BioConcept; Vikia Rota- Adeno, BioMerieux) veya enzim immunoassay (Ridascreen rotavirus, RBiopharm, Darmstadt, Germany) gibi ticari serolojik testlerle rotavirus antijeninin varlığı test edilmiştir. Antijen pozitif dışkı örnekleri daha sonra genotipleme için Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'na gönderilmiştir. Hastaların yaşı, cinsiyeti, örnek toplanma tarihi, semptomlar, coğrafi konum ve çalışmaya katılan hastane formlara kaydedilmiştir. EZ1 virusu Mini Kiti (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) üreticinin talimatlarına uygun olarak RNA ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Tüm antijen pozitif örneklerden konsensus primerleriyle RT-PCR yapılmış daha sonra G1, G2, G3, G4, G8, G9 ve G10'a hedeflenen spesifik primerler ile G genotipleme ve ardından P[4] , P[6] , P[8] , P[9], P[10] ve P[11] primerleri kullanılarak P genotipleme yapılmıştır.

Antijen pozitif tüm dışkı örnekleri (2102) yıl boyunca Eylül ayından Mayıs ayının sonuna kadar şiddetli akut gastroenterit geçiren 5 yaşından küçük çocuklardan

elde edilmiştir. En yüksek örnek kabulü %17.1 (359/2102) oranı ile Mart ayında gerçekleşmiştir ve bunu sırayla Ocak ayı %14.4 (303/2102) ve Şubat ayı %13.1 (276/2102) takip etmektedir. Geri kalan dokuz ayda rotavirus antijen pozitif vakaların oranı %1'den %9.5'e kadar değişmektedir. RT-PCR ile test edilen örneklerin 1644'ünde (%78.2) rotavirus RNA tespit edilmiş ve geriye kalan 458 (%21.8) örnek konsensus RT-PCR ve ticari real time RT-PCR ile negatif sonuç vermiştir. Rotavirus RNA pozitif örneklerin 396'sı (%24.1) Güneydoğu Anadolu'dan, 394'ü (%24) İç Anadolu'dan, 318'i (%19) Marmara bölgesinden, 194'ü (%12) Karadeniz bölgesinden, 160'ı (%10) Ege bölgesinden, 97'si (% 6) Akdeniz bölgesinden ve 85'i (%5) Doğu Anadolu'dan gelmiştir.

Rotavirus RNA pozitif hastaların yaşlarına göre dağılımına bakıldığında % 8.4'ü (138) 0-12 aylık yaş grubuna, %38.7'si (637) 13-24 aylık yaş grubuna, %28.3'ü (466) 25-36 aylık yaş grubuna , %10.7'si (176) 37-48 aylık yaş grubuna ve %13.8'i (227) 49-59 aylık yaş grubuna dahildir. Rotavirus enfeksiyon prevalansı 13 ila 24 ay arasında diğer yaş gruplarına göre oldukça yüksek oran bulunmuştur. 1644 çocuğun 721'i (%43.9) kızlarda kalan 923'ü (%56.1) erkeklerden oluşmakta olup rotavirus pozitifliği açısından kızlar ve erkekler arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Toplam 1638 örnekte G ve P genotipleri tanımlanmıştır. Toplam sekiz farklı G tipi, altı farklı P tipi ve 42 farklı G-P kombinasyonu belirlenmiştir. G genotipleri arasında G9 (%48.7), G1 (%25.9), G2 (%16.2), G3 (%4.3), G4 (%2.7), G8 (%0.9), G12 (%0.8) ve G10 (%0.4) bulunmaktadır. Türkiye'de G12 ilk kez tespit edilmiştir.

Dominant P genotipi P[8] (79.4%) olup bunu sırasıyla P[4] (%19.5), P[9] (%0.43), P[6] (%0.30) , P [11] (%0.12) ve P [10] (%0.06) takip etmektedir. Yaygın olarak dört G tipi (G1, G2, G3 ve G9) ve iki P tipi (P[8], P[4]) suşların sırasıyla %95.1 ve %98.8'ini oluşturmaktadır.

Test edilen örneklerde en sık görülen G ve P kombinasyonları sırasıyla G9P[8] (40.5%), G1P[8] (%21.6), G2P[8] (%9.3), G2P[4] (%6.5), G3P[8] (% 3.5) ve G4P[8] (%3.4) 'dir. Bu altı yaygın genotip çalışmada test edilen örneklerin 1377'sini (%83.7) oluşturmaktadır. Kalan 231 örnek (%14.1) sırasıyla G9P[4] (%7.2), G1P[4] (%3.3), G8P[8], (%0.6) , G12P[8] (%0.4), G3P[4] (%0.5) veya G10P[8] (%0.3) gibi nadir bulunan kombinasyonlardan oluşmaktadır. Toplam 36 örnekte (%2.2) G9P[4] P[8] (6,

%0.4), G1P[4] P[8] (5, %0.3) ve G2G9P[8] (5, 0.3) gibi toplam 16 farklı karışık genotip tespit edilmiştir.

Belirli bir yaş grubu için cinsiyet veya yaşta genotip sınırlaması tespit edilememiştir. Farklı aylarda saptanan G ve P genotiplerinin oranında da büyük bir farklılık bulunamamıştır. G9P[8], G1P[8] ve G2P[8] tüm aylarda saptanan üç yaygın genotiptir. Her yaş grubu için tanımlanan her bir genotipin oranı neredeyse benzerdir. Örneğin tüm yaş gruplarında sırasıyla en çok G9P[8] ve G1P[8] genotipleri görülmektedir. Tüm yaygın genotipler hem kadınlarda hem de erkeklerde benzer sıklıkta saptanmıştır. Erkeklerde G9P[8], G1P[8], G2P[8] ve G2P[4] oranları sırasıyla %39, %22, %8 ve %6 iken bu değerler kızlar için %43, %21, %11 ve %7'dir.

Umair ve arkadaşları⁽¹⁴⁷⁾ 2014 yılı boyunca Pakistan'da Rawalpindi'de akut gastroenterit sebebiyle hastaneye yatırılan 5 yaş altı çocuklardan 502 dışkı örneğini A grubu rotavirus (RVA) varlığını ve genotip çeşitliliğini araştırmak amacıyla toplamıştır. Enstitüde tüm dışkı örnekleri enzim immünoassay (ProSpecT Rotavirus Microplate Assay, Oxoid Ltd, Birleşik Krallık) ile A grubu rotavirus varlığı açısından taranmış ve moleküler analizleri yapılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır. ELISA ile test edilen toplam 502 dışkı örneğinden 147'si (%29.3) pozitif bulunmuştur. Bununla birlikte erkek ve kadınlar arasında rotavirus pozitifliği ve negatifliği açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. RV pozitif hastaların yaşı RV negatif hastalar ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde düşük olduğu (RV (+); 9.109 ± 12.14 RV (-); 17.694 ± 24.20) ve gastroenterit vakalarında yaşlar (ay) arasında anlamlı bir farklılık ($p=0.001$) olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte klinik özelliklerden ateş, kusma süresi ve sayısı, diare süresi ve sayısı bakımından RV pozitif ve RV negatif olgular arasında anlamlı bir fark (sırasıyla ateş; 37.66, 37.56, kusma süresi; 2.66, 2.75 (gün), kusma sayısı; 4.00, 4.55, diare süresi; 2.73, 2.93 (gün), diare sayısı; 15.54, 15.02) bulunamamıştır. Gastroenterit olgularında hem RV (+) hemde RV (-) gruplarda ortalama ateşin hemen hemen aynı olduğu tespit edilmiştir. RV negatif hastalarda (ortalama; 4.55) pozitif hastalara kıyasla (ortalama; 4.0) daha fazla kusma sayısı görülmüştür. RV negatif gastroenterit olgularının diare süresinin (ortalama; 2.93 gün) RV pozitif olgulara (ortalama; 2.73 gün) göre biraz uzun olduğu belirlenmiştir. ELISA pozitif örneklerden bir kısmı RVA genotiplendirme için seçilmiş ve PCR ile örneklerin %89'unun (131/147) RV RNA pozitif olduğu tespit edilmiştir. Çocuklarda RVA enfeksiyonu yıl boyunca

Ocak-Mart ve Kasım-Aralık aylarında iki pik noktası oluşturmıştır. PCR pozitif hastaların yaşı 1 ila 36 ay arasında olup hastaların çoğunda (%91, 119/131) yaşamın ilk yılında enfeksiyon ortaya çıkmıştır. RVA pozitif hastaların cinsiyetleri karşılaştırıldığında erkeklerin (n=79) kızlara (n=52) göre daha fazla enfeksiyona yakalandıkları tespit edilmiştir. En sık görülen G tipi G1 %23.6 (31/131) 'dir ve bunu G3 %22.9 (30/131), G12 %19.8 (26/131), G2 %19.08 (25/131) ve G9 %9.9 (13/131) takip etmektedir. Toplam 6 örnekte (%4.58) G genotipe ait koenfeksiyon tespit edilmiştir. En yaygın P tipi P[8] %41.2 (54/131) olarak bulunmuş ve bunu sırasıyla P[6] %29 (38/113) ve P[4] %28.24 (37/131) izlemiştir. Toplamda İki örnekte (%1.52) P tipi koenfeksiyon gözlenmiştir. Toplam 22 farklı G-P kombinasyonu bulunmuştur. En baskın olan genotip kombinasyonu %17.55 ile G3P[8] olup bunu %16.7 ile G12P[6] (22/131), %15.2 ile G2P[4] (20/131) ve %14.5 ile G1P[8] (19/131) takip etmektedir. Her bir kombinasyondan bir vakada bulunmak üzere örneklerin %5.3'ünde G1P[6] (6/131) ve G9P[8] (7/131) bulunmuştur. Rotavirus G-P koenfeksiyonu da 8 (%6.1) örnekte gözlenmiştir. Saptanan genotip çeşitliliğinin aylara göre dağılımına bakıldığında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Çalışma süresi boyunca çocuklarda enfeksiyona sebep olan G-P Tip kombinasyonları G3P[8] ve G12P[6]'dır. Çocuklarda 1-12 aylık yaş grubunda RVA enfeksiyonuna sebep olan genotiplerin çoğunluğu (%91) genellikle G1P[8], G2P[4], G3P[8], G9P[8] genotipleri olup en az G12P[6] genotipi tespit edilmiştir. Miks enfeksiyon oranı ise %6'dır

Mohanty ve arkadaşları⁽¹⁴⁸⁾ Eylül 2013 ve Mayıs 2015 yılları arasında Doğu Hindistan Odisha'daki 15 farklı hastaneye rota aşısı yapılmamış ve gastroenterit sebebi ile başvuran 5 yaş altı 652 çocukta rotavirus enfeksiyon insidansı ile yaygın genotiplerin klinik özellikleri, ciddiyeti ve mevsimsel dağılımı incelenmiştir. Rotavirus için ELISA ile test edilen 652 dışkı örneğinin 357'si pozitif (%54.75) bulunmuştur. RV pozitif çocukların %32.5'i kızlardan, %67.5'i erkeklerden oluşmaktadır. Hastalığın yaşlara göre dağılımına bakılacak olursa 1-6 aylık 43 (%41.34), 7-12 aylık 175 (%56.63), 13-18 aylık 96 (%62.34), 19-24 aylık 21 (%50) ve 24-59 aylık 22 (%50) toplam 357 (%54.75) çocuğun rotavirus ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. Rotavirus enfeksiyonu araştırılan çocuklarda 3-18 aylık yaş grubunda rotavirus pozitifliği (%62.4) diğer yaş gruplarına göre (%41.34 -%56.63) daha yüksek bulunmuştur. Fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Tüm rotavirus pozitif olgularda oral rehidrasyon tedavisi uygulanırken

olguların % 95'inde intravenöz tedavi de verilmiştir. Ölüm tespit edilmemiştir. Rotavirus enfeksiyon sıklığının yaz mevsimine (%45.45) ve yağışlı mevsimlere (%45.32) kıyasla kışın (%66.9) daha yüksek olduğu bulunmuştur. G1P[8] (46;%62.16) gastroenteritin en yaygın sebebi olup bunu G1P[11] (7; %9.45), G3P[8] (6;%8.10), G9P[8] (5;%6.75), G2P[4] (3; %4.05), G2P[6] (3;%4.05), G9P[4] (2;%2.70), G9P[11] (1;%1.35) ve G1P[6] (1; %1.35) izlemiştir. Tanımlanmış baskın G genotipleri G1 (%72.9), G9 (%10.81), G2 (%8.10) ve G3 (%8.10) 'tür.

Yu ve arkadaşları⁽¹⁴⁹⁾ Ocak 2007'den Aralık 2016'ya kadar Tayvan'da Chang Gung Çocuk Hastanesine (CGCH) yatırılan akut kanlı olmayan sulu diare olarak tanımlanan AGE'li 5 yaşınadan küçük pediatrik grubu çalışmaya dahil etmiştir. Çalışma periyodunu etyoloji ve klinik gözetim için aşı sonrası erken ve aşı sonrası geç periyotlara ayırmışlardır. Viral nükleik asit ekstraksiyonu, üreticinin protokolüne göre High Pure Viral Nükleik Asit kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Rotavirus için cDNA sentezi ve PCR (RT-PCR), Super-Script III First-Strand Sentez Sistemi (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresi boyunca (Ocak 2007 - Aralık 2016) AGE olan 5 yaşın altındaki 837 çocuktan dışkı örnekleri enterik etkenleri tanımlamak amacıyla incelemeye alınmıştır. Bu hastaların %3.2'sinin hastaneye yatışı yapılmıştır. Örneklerin %66.5'inde enterik patojenler (557) tespit edilmiştir. Bu enterik patojenlerin içinde rotaviruslar %22.1 ile (185) en yüksek paya sahiptir. Aşının erken ve geç dönemleri arasındaki patojen prevalansları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, rotavirus enfeksiyonunda (%17.9) belirgin bir azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Rotavirus genotip prevalansı için 116 örnekte rotavirus G genotiplendirme (aşı sonrası erken dönemde 54, aşı sonrası geç dönemde 62) gerçekleştirilmiştir. G genotipi için erken aşı sonrası dönemde görülme oranları G1 %50 (27), G2 %20.4 (11), G3 %22.2 (12) ve G9 %7.4 (4), geç aşı sonrası dönemde ise G1 %33.9 (21), G2 %25.8 (16), G3 %29 (18), G4 %1.6 (1), G8 %1.6 (1) ve G9 %11.2 (7)'dir. Aşı sonrası geç dönemde, aşı sonrası erken döneme kıyasla G1 oranında önemli bir düşüş bulunmuştur. G4 ve G8 gibi nadir genotipler 2012 ve 2015 yıllarında tespit edilmiştir.

Dhital ve arkadaşları⁽¹⁵⁰⁾ Nepal'de bölgesel gerçekleştirdikleri çalışmaya Ocak-Kasım 2014 tarihleri arasında Kanti Çocuk Hastanesi ve Tribhuvan Üniversite Eğitim Hastanesi'ne (Kanti Children's Hospital and Tribhuvan University Teaching Hospital)

AGE sebebiyle başvuran 5 yaşından küçük çocukları dahil etmişlerdir. AGE olan, gözlem merkezine müracaat eden ve hastaneye 3 günden fazla olmamak üzere başvuran 717 çocuktan dışkı örneği toplanmıştır. Örnekler fosfat buffer salin kullanılarak %10-20'lik süspansiyon halinde antijen testi ve genotiplendirme için farklı şişelerde ve -20°C'de saklanmıştır. Örnekler ilk aşamada A grubu rotavirus antijen tespiti için ProSpecT Rotavirus ELISA testi (Oxoid Ltd., Basingstoke Hants, UK) kullanılarak çalışılmış ve daha sonra rastgele 59 rotavirus pozitif numuneden QIAamp Viral RNA Mini Kiti (QIAGEN Inc) kullanılarak RNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Multipleks PCR ile G tip G1-G4, G8-G10 ve G12 ve P tip P[4], P[6], P[8], P[9], P[10] ve P[11] tanımlanmıştır. En fazla hasta sayısı 0-12 ay yaş grubunda olup (341) bunu 13-24 ay yaş grubu (202) izlemiştir. Hasta popülasyonunun 475'i (%66.2) erkek ve 242'si (%33.8) kızdır. ELISA yöntemi ile rotavirus antijen varlığı araştırılmış ve izolatların %22.9'unda (164) rotavirus pozitifliği tespit edilmiştir. Rotavirus pozitiflik oranının yaşlara göre dağılımına bakıldığında 0-12 aylık grub da %56.1 (92), 13-24 aylık grub da %27.5 (45), 25-36 aylık grub da %8.5 (14), 37-48 aylık grub da %4.8 (8) ve 49-60 aylık grub da %3.05 (5) olarak belirlenmiştir. Tüm örneklerde aylık rotavirus enfeksiyon oranı en yüksek Ocak ayında (30), ardından Şubat ayında (26) görülmüştür. Rotavirus genotiplerinin moleküler analizi sonucu baskın G tipinin G12 (21, %36) olduğu bunu G9 (18, %31), G1 (11, %21) ve G2 (5, %8.6) izlediği belirlenmiştir. Test edilen tüm G tipleri arasında G3 (4) %3.4 ile en az gözlenen genotip olmuştur, örneklerin %1.8'i ise tiplendirilememiştir. Rotavirus genotiplerinin moleküler analizi sonucu baskın P tipinin P[6] (19, %32.8) olduğu ve bunu P[8] (17, %31), P[10] (10, %14.8) ve P[4] 'ün (9, %14.8) takip ettiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde izolatların %6.6'sı tiplendirilememiştir. En sık tespit edilen rotavirus suşu olan G12P[6] (19, %35.1), G1P[8] (8, %15.1), G9P[8] (8, %15.1), G9P[4] (5, %9.4) ve G2P[4] (4, %7.5) dahil olmak üzere toplam yedi G/P tip kombinasyon tanımlanmıştır. Geriye kalan tipler ise her tipten 2 adet olmak üzere G1P[10], G3P[10], G9P[10] ve G2P[10], G12P[10], G12P[8] 'dir. Miks enfeksiyon oranı %7.5'dir

Agutu ve arkadaşları⁽¹⁵¹⁾ Ocak-Haziran 2012 tarihleri arasında Kenya'da Gertrude Çocuk Hastanesine gastroenterit sebebi ile başvuran 5 yaşın altındaki 298 çocuktan topladıkları dışkı örneklerinde rotavirus antijen varlığını ELISA testi (ProSpect™ Rotavirus Microplate Assay, Oxoid Ltd, United Kingdom) ile

araştırmışlardır. Rotavirus pozitif örnekler üzerinde rotavirus dsRNA'dan revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. G tiplendirmesi için VP7'ye ait altı insan serotip G1-G4, G8 ve G9'a özgü primer karışımı kullanılmıştır (aBT1, aCT2, aET3, aDT4, aAT8 ve AFT9). VP4 için spesifik beş insan P tipi P[4], P[6], P[8], P[9] ve P[10] (2T-l, 3T-l, 1T-l, 4T-l, 5T-l) primerlerinden oluşan karışım ile genotipleme yapılmıştır. PCR fragmentleri uygun marker kullanılarak 80-90 volt'ta % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile yürütülmüştür.

Rotavirus prevalansı %31.5 (94/298) bulunmuştur. Rotavirus enfeksiyonunun 2 yaşın altındaki çocuklar arasında daha sık olduğu belirlenmiştir. Rotavirus pozitif hastaların %48.9'u erkeklerden (46), %51.1'i (48) kızlardan oluşmaktadır, ayrıca annelerin %60.1'nin (57) hala emzirmekte olduğu belirlenmiştir. Rotavirus pozitif vakalardan 33'ü (%35.1) mevcut rotavirus aşılardan biri ile aşılanmıştır. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımına bakıldığında RV (+) 94 hastanın %37.2'si (35) 0-12, %39.4'ü (37) 13-24, %6.4'ü (6) 25-36, %8.5'i (8) 37-48, %8.5'i (8) 49-60 aylık çocuklardan oluşmaktadır. Diare süresinin 67 hastada 3 günden az, 13 hastada 3-5 gün arası ve 14 hastada 5 günden fazla olduğu tespit edilmiştir. Toplam 68 hastanın diare sıklığı 3'ten az iken 26 hasta için diare sıklığının 4-7 arasında olduğu belirlenmiştir. Kusma süresi sırasıyla 74 hastada 3 günden az, 16 hastada 3-5 gün arası ve 4 hastada 5 günden fazla olduğu tespit edilmiştir. Kusma sıklığı ise 61 hastada 3'ten az, 23 hastada 3-7 arası ve 10 hastada 7'den fazla olarak bulunmuştur. RV (+) hastaların 52'si 3 günden az, 37'si 4 veya 4 günden fazla hastanede kalmışlardır. RV pozitif 94 hastanın 7'sinde dehidratasyon görülmez iken 83'ünde çeşitli şekillerde 4'ünde ise ağır dehidratasyon görülmüştür. Tedavi olarak 5 hastaya oral ve 86 hastaya IV rehidratasyon uygulanmıştır.

Yeterli RNA ekstraktına sahip 83 örnekte cDNA eldesi gerçekleştirilmiş, PCR ve G, P genotipleme işlemleri yapılmıştır. G genotip oranları G9/3 (%5.3), G9 (%4.3), G3 (%4.3), G12 (%2.1) ve karışık G1/3 (%1.1) olarak bulunmuştur. P genotiplerinden P[4] (%5.3) ve P[6] (%5.3) tespit edilmiştir. Sonuçlar genel olarak en sık görülen rotavirus suşlarının G3P[4] (%8.5), G12P[6] (%4.3), G9P[6] (%2.1) ve G3P[6] (%1.1) olduğunu göstermiştir. Karışık suşlar olarak G9/3P[4] (%4.3), G9/3P[6] (%1.1) ve G1/3P[4] (%1.1) gibi tespit edilen birçok suş bulunmaktadır. Kısmi olarak tanımlanmış

tipler (non-typing; NT) ise G9P[NT] (%9.6), G9/3 P[NT] (%6.4), G3P[NT] (%3.2), G1P[NT] (%3.2), GNTP[4] (%2.1) ve GNTP[6] (%2.1) şeklindedir.

Mchaile ve arkadaşları⁽¹⁵²⁾ Tanzanya'da Ocak-Mayıs 2016 tarihleri arasında toplam dört çalışma merkezinden diare sebebi ile başvuran 5 yaş altı 277 çocuktan dışkı örnekleri toplamışlardır. Örneklerde rotavirus antijen varlığı katı faz sandviç tipi enzim immünoassay yöntemi ile (Rotavirus Antigen ELISA, EitopDiagnostic Inc, Carroll Road San Diego, USA) üreticinin talimatlarına göre araştırılmıştır. Viral RNA ekstraksiyonu QIAamp Viral RNA Mini Kiti (Qiagen / Westburg, Leusden, Netherlands) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Rastgele primerler kullanılarak cDNA aşaması gerçekleştirilmiş olup G tiplerinin belirlenmesi için konsensus ve semi-nested PCR yöntemi kullanılmıştır. Rotavirus genel prevalansı 2009'da %33.2 iken 2016'da %26.4'e (73/277) düşmüştür. Ortalama yaş 11 ay olarak hesaplanmış ve hastaların yarısından fazlasını kızlar 143/277 (%51.6) oluşturmaktadır. Hastaların 259'u (%93.5) rotavirus aşısını yaptırmıştır. Çalışmada genel rotavirus prevalansı %26.4 (73/277) bulunmuş olup yaş gruplarına göre dağılımı sırasıyla; 12 aydan daha küçük yaşta çocuklar için %39.7 (29/73), 13-24 aylık çocuklar için % 34.2 (25/73) ve 24 aydan büyük çocuklar için %21.9 (16/73) olarak belirlenmiştir. ELISA ile rotavirus pozitif örneklerin %56'sından (41/73) suşa özgü primerler kullanılarak G tip konsensus PCR (VP7) yapılmıştır. Rotavirus için baskın G tipleri sırasıyla G1 %53.8 (21/73), G8 %23.1 (9/73), G12 %12.8 (5/73), G9 %7.7 (3/73) ve G4 %2.6 (1/73) olarak tespit edilmiştir.

Rahajamanana ve arkadaşları⁽¹⁵³⁾ Madagaskar'da Ocak 2010'dan Aralık 2016'ya kadar Center Hospitalier Universitaire Mère Enfant Tsaralalàna'da (CHUMET) hastanesine yatırılan 5 yaş altı 19.619 çocuk arasında gastroenterit sebebiyle hastaneye kaldırma oranını tespit etmek amacıyla hastane kayıtları gözden geçirilmiştir. Haziran 2013-Aralık 2016 yılları arasında DSÖ'nün desteği ile CHUMET'te aktif rotavirus enfeksiyon gözlemi gerçekleştirilmiştir ve sirkülasyondaki rotavirus genotiplerinin dağılımı değerlendirilmiştir. CHUMET'te 5 yaşın altındaki uygun çocuklardan toplanan dışkı örneklerinden enzim immünoassay (EIA) Rotavirus kiti (ProSpecTM) kullanılarak rotavirus antijen tespiti yapılmıştır. Akut gastroenterit tanımına uyan 24 saat içinde en az 7 gün süren sulu, kanlı olmayan diarezi olan çocuklar dahil edilmiş ve gaita 48 saat içinde toplamıştır. Rotavirus surveyans verileri Haziran 2013'ten Aralık 2016'ya kadar

toplanmış; aşı öncesi 11 aylık rotavirus sürveyansı (Haziran 2013-Nisan 2014) aşı sonrasındaki (Ocak 2015-Aralık 2016) 2 yıllık veriler ile karşılaştırılmıştır. Rotavirus antijeni gastroenterit sebebiyle hastaneye başvuran çocukların dışkı örneğinden EIA ile tespit edilmiş ve rotavirus pozitif örnekler Bölgesel Referans Laboratuvarında RT-PCR ile genotiplendirilmiştir. RRL-SA'da (rotavirus regional reference laboratory in South Africa; RRL-SA) rotavirus antijen pozitif örneklerde G ve P tiplerinin belirlenmesi için konsensus ve genotip spesifik primerler kullanılarak semi-nested multiplex PCR testi gerçekleştirilmiştir

Test edilen dışkı örneklerinin sayısı ve EIA rotavirus pozitiflik sonuçlarının Haziran 2013 ile Aralık 2016 arasındaki aylara göre dağılımına bakıldığında 2013 Kasım, 2014 Ekim, 2015 ve 2016 Haziran'da RV pozitiflik oranının pik yaptığı görülmüştür. Rotavirus sürveyans süresince rotavirus aşı uygulamasından önce 203 dışkı örneği (tüm diare başvurularının %30'u) ve aşı uygulamasından sonra 449 dışkı örneği (tüm diare başvurularının %47'si) toplanmış ve analiz edilmiştir. Haziran 2013 - Nisan 2014 tarihleri arasında 114 (%56) dışkı örneğinde rotavirus tespit edilmiş olup aşılama dönemi sonrası için 2015 yılında rotavirus pozitif dışkı örneklerinin oranı %13 (31) ve 2016'da %12 (25) bulunmuş, böylece aşı öncesi döneme göre %78'lik bir düşüş tespit edilmiştir. Aşılama öncesi dönem için dışkı örneklerinde saptanan tüm rotavirusların %67'si 0-11 aylık, %32'si 12-23 aylık ve %1'i 24-59 aylık çocuklara aittir. Aksine aşılama sonrası dışkı örneklerinde saptanan tüm rotavirusların % 48'i 0-11 aylık,% 43'ü 12-23 aylık ve %9'u 24-59 aylık çocuklara aittir. Toplam 195 (%69) rotavirus pozitif örnek genotipleme için referans laboratuvarına gönderilmiştir, fakat 112 örnekte genotipleme yapılamamıştır. Aşı öncesi dönemde 80 örnekte 7 farklı G/P genotip kombinasyonları tespit edilmiştir. En sık saptanan genotipler G3P[8] (n=53; %66), G2P[4] (n=12; %15) ve G1P[8] (n=11; %14) dir. Aşı öncesi dönemindeki genotiplendirilmiş örneklerin %68'i 0-11 aylık çocuklara aittir. Rotavirus aşısının 2014'te uygulanmasından sonraki ilk sekiz ay boyunca, 73 örnekte 13 rotavirus genotipi tespit edilmiştir. En sık tespit edilen genotipler G3P[8] (n=20, %27), G9P[6] (n=9, %12), G9P[8] (n=9 %12) ve G9P[4]P[8]'dir (n=9 %12). En yaygın genotip G2P[4] (n=10,% 67) olup 26 örnekte 9 ek genotip saptanmış ve 2015'te 15 örnekte 6 farklı rotavirus genotipi bulunmuştur. Geriye kalan G3P[8], G9P[4]P[8], G1G3P[4], G1G3P[NT], G3G12P[4]P[8] 5 tipin her biri bir örnekte tespit edilmiştir. Aşı öncesi

dönemde tespit edilen genotiplere kıyasla 2015 yılında G1P[8], G3P[NT], G4P[6], G12P[6] ve GNTP[8] bulunmamıştır. Yine 2015'te genotiplendirilmiş örneklerin %60'ı 12-23 aylık çocuklardan alınmıştır.

Gasparinho ve arkadaşları⁽¹⁵⁴⁾ Angola'da Eylül 2012 ve Aralık 2013 yılları arasında Bengo Merkez Hastanesi'nde (BGH) beş yaşın altındaki çocuklarda diarenin (virüsler, parazitler ve bakteri) en sık görülen etyolojik ajanlarını belirlemek amacıyla bir çalışma düzenlemişlerdir. Sürveyans verileri ülkede A grubu rotavirus (RVA) aşısı uygulamasından önce toplanmıştır. Çalışmaya çocuk acil servisine veya pediatri polikliniğine akut gastroenterit (AGE) sebebiyle başvuran 342 çocuk dahil edilmiştir ve hastalar RVA enfeksiyon varlığı açısından test edilmiştir.

Dışkı örnekleri klinik personel'i tarafından temin edilen steril kaplarla toplanmıştır. Toplam 342 örnek hızlı kalitatif bir immünokromatografik test (Rotavirus + Adenovirus, CerTest Biotec S.L., Zaragoza, Spain) ile üreticinin talimatlarına göre kullanılarak RVA ve adenovirüs serotip 40/41 antijenlerinin mevcudiyeti araştırılmıştır. RVA pozitif dışkı örnekleri RNA ekstraksiyonu yapıncaya kadar guanidin tiyosiyanat solüsyonunda saklanmıştır. Saklanan dışkı örnekleri RVA genotiplendirmesi için Portekiz Lizbon'daki Hijyen ve Tropikal Tıp Enstitüsüne gönderilmiştir. Üreticinin talimatlarına göre innuPREP Virus RNA Kiti (Analytik Jena AG, Jena, Germany) kullanılarak %10 (w/v) dışkı süspansiyonlarından Viral RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. PCR'da spesifik farklı genler için şablon olarak kullanılacak cDNA'yı üretmek amacıyla revers transkripsiyon (RT) aşaması rastgele hekzamerler kullanan ticari bir kit (NZY Firststrand cDNA Sentez Kiti, NZYTech, Lizbon, Portugal) ile gerçekleştirilmiştir. RVA G ve P genotipleme sekiz G tipini (G1-4, G8-11) ve altı P tipini (P[4], P[6], P[8]-[11]) tespit etmek için optimize edilmiş semi-nested tip spesifik multipleks PCR kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 342 çocukta RVA enfeksiyon oranı %25.1 (86/342) olarak tespit edilmiştir. Çalışmadaki 342 hastanın %53.5'i (183) erkek, %46.5'i (159) kızdır. RV (+) hastalar için bu oranlar sırasıyla %49 ve %37'dir. Hastaların yaşlarına göre dağılımına bakıldığında %16.1'i (55) 0-6 ay, %38.6'sı (132) 6-12 ay, %26.9'u (92) 12-24 ay ve %18.4'ü (63) 25-59 ay grubuna dahildir. RV pozitif hastalar için ise bu oranlar sırasıyla %24.4 (21), %55.8 (48), %18.6 (16) ve %1.2 (1)'dir. Hastaların yaşları ortalaması 15.5 ay olup RV (+) grup için 9.2 ay'dır. RVA enfeksiyonundan en çok

etkilenen yaş grubunun 6 aydan küçük çocuklar olduğu belirlenmiştir. RVA enfeksiyonu olan çocuklar için yaş ortalaması belirgin olarak daha düşüktür.

Çalışmaya dahil edilen 240 (%70.2) çocuğun (çocukların yalnızca 38'i emzirilmiş, 202'si tamamlayıcı anne sütü ile beslenmiş) anne sütü ile beslendiği, 98 çocuğun süttten kesildiği (%28.6) ve 4'ünün hiç anne sütüyle beslenmediği (%1.2) belirlenmiştir. RV enfeksiyonu görülme oranının hastaneye başvuru sırasında emzirilen (82/240, %34.2) çocuklarda, henüz süttten kesilmiş veya emzirilmemiş çocuklara kıyasla (4/102, % 3.9) daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Toplam 342 hastanın 175'inde (%51) kusma semptomu tespit edilmiş olup bu hastaların 62'si (%72.1) RV pozitif, 113'ü (%44.1) ise RV negatiftir. Ayrıca kusma semptomu gözlenmeyen 24 hastanın (%27.9) RV pozitif olduğu tespit edilmiştir. Kusma semptomu RVA enfeksiyonu ile anlamlı derecede ilişkili (%72.1) bulunmuştur. Hastaların 255'inde (%74.5) ateş tespit edilmiştir ve bunların 69'u (%80.2) RV (+), 186'sı (%72.7) RV (-) tir. RV (+) 17 hastada (%19.7) ise ateş gözlenmemiştir. RV (+) 85 hastanın 68'i (%80) için diare süresi (gün) 1-3 gün, 10 hasta için (%11.8) 4-5 gün ve 7 hasta için (%8.2) ≥6 gün olarak belirlenmiştir. Toplam 342 hastanın %48'i (164) polikliniğe, 178'i ise (%52) acil servisine başvurmuştur. RV (+) 86 hastanın 29'u polikliniğe (%33.7) ve 57'si ise acil servisine (%66.3) başvurmuştur, ayrıca pozitif 74 hastanın 24'ünün (%32.4) hastaneye yatışı gerçekleşmiştir. Tüm çocuklardaki hastaneye yatış oranı ise %26.8 (81) olarak belirlenmiş olup negatif hastalarda bu oran %25 (57)'tir.

Çalışma süresi boyunca Mayıs-Ekim 2013 döneminde Mayıs ayında pik yaparak (46 olgu) BGH'da görülen diare vakalarında önemli bir artış olduğu belirlenmiştir. Çalışma süresi boyunca RV enfeksiyonu tespit edilmiş olup 2013 yılının Şubat ayında % 60.0, Mart ayında % 40.0, Haziran'da % 40.0 ve Temmuz ayında % 40.9 olmak üzere daha yüksek oranlarda RVA enfeksiyonu saptanmıştır.

Hızlı immünokromatografik test ile tespit edilen 86 RVA pozitif örneğin 76'sı (%88.4) moleküler tanı metodu ile analiz edilmiştir. Bunlardan dört örneğin PCR ile negatif olduğu kanıtlanmıştır. Diğer 72 (%83.7) örnek için G ve P genotipleme yapılmış ve en yaygın genotip kombinasyonu G1P[8] %47.2 (34/72) ardından alışılmadık bir şekilde G1P[6] %29.2 (21/72) ve G2P[4] % 12.5 (9/72) olarak belirlenmiştir. G1 %83.3 (60/72) ve G2 %15.3 (11/72) olmak üzere sadece iki G tipi

bulunmuş ve bir örnek için G tipi tespit edilememiştir. P genotipleri arasında P[6] %30.6 (22/72), P[8] %47.2 (34/72) ve P[4] %12.5 (9/72) ile en sık görülen genotipler olarak belirlenmiştir. P tiplendirmesi sırasında 7 örnek için sonuç alınamamıştır (%9.7; 7/72).

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Adana Şehir Hastanesine Ocak-Aralık 2017 tarihleri arasında akut gastroenterit sebebi ile başvuran 5 yaş ve altındaki 400 hastanın dahil olduğu çalışmamızda hastaların %54.5 erkek ve %45.5'i kızdır. Toplam 400 hastanın çoğu %61.8 oranla 0-24 aylık olup tüm hastaların yaşları ortalaması 20.4 aydır. Rotavirus enfeksiyon insidansı %22.7 olup, 0-6 ay %13.2, 7-12 ay %29.7 ve 13-24 ay %34 oranları ile 2 yaşına kadar çocuklarda RV antijen pozitifliğinde yaş attıkça yükselme gözlenmiştir. Böylece diğer yaş gruplarına göre 0-12 aylık grupta %42.9 ve 0-24 aylık yaş grubunda ise %76.9 oranında daha yüksek RV antijen pozitifliği bulunmuştur. Buna karşılık sonraki yaş gruplarında ise %6.6 ve %3.3 gibi daha düşük oranlarda RV antijen pozitifliği tespit edilmiştir. RV antijen pozitif çocukların %70.3'ü erkek, %29.7'si kızdır. Yine RV diarezi olan hastaların %42.8'i hospitalize edilirken RV enfeksiyonu olmayanların ise %14.5'i hastaneye yatırılmıştır. Ortalama hastaneye yatış süresi ise RV gastroenteriti olanlarda (5.5 gün) olmayanlara göre (3.6 gün) daha uzun bulunmuştur. RV diarezi olanlarda kusma (%83.5) RV ile enfekte olmayanlara göre (%57) daha yüksek oranda görülmüştür. Dehidratasyon belirtisi yine RV gastroenteriti olanlarda (%77) RV gastroenteriti olmayanlardan (%44.7) daha yüksek oranda görüldü. RV gastroenteriti olanlarda IV rehidratasyon tedavisi %67 ile RV negatiflere uygulanan %33.3'lük orandan daha yüksektir. RV antijen pozitifliği en çok sonbahar ve kış aylarında (sırasıyla Kasım %38.5, Aralık %33) görülmüştür. RT-PCR pozitif 89 hastada en yaygın G genotipi %50.5 ile G1 olup, %36 ile en yaygın P genotipi P[8] bulunmuştur. En baskın G/P kombinasyonu ise %21.3 ile G1P[8]'dir. Miks enfeksiyon oranı %7.9 dur.

Araştırmamızda hasta grubundaki erkeklerin oranı %54.5 olup Çanakkale'de Tekin ve ark. %52.9, İstanbul'da İnan ve ark.'nın %51.7 oranlarından biraz yüksek, Ankara'da Şimşek ve ark. %53.5 oranına benzer, Düzce'de Kızılırmak ve ark. %60.2, Erzurum'da Balkan ve ark. %56.8, Balıkesir'de Şafak ve ark. %57.6, Kayseri'de Atalay ve ark. %58.2, Ankara'da Meral ve ark. %57 ve Afyonkarahisar'da Altındiş ve ark. %57.3 oranlarından düşüktür. Yine benzer şekilde Tanzanya'da Mchaile ve ark. %48.4

oranından yüksek, Angola'da Gasparinho ve ark. %53.5 oranına benzer, Nepal'de Dhital ve ark.%66.2 oranından düşüktür.

Hastaların yaşları ortalaması 20.4 ay olup Düzce'de Kızılırmak ve ark. 23.5 ay yaş ortalamasından düşük, Tanzania'da Mchaile ve ark. 11 ay ve Angola'da Gasparinho ve ark.'nın 15.5 ay yaş ortalamalarından yüksektir.

Çalışmamızdaki akut gastroenteriti olan 400 hastanın %61.8'ini 0-24 aylık çocuklar oluşturmakta olup bu oran Antakya'da Özer ve ark. %45.3, Antalya'da Çoban ve ark.'nın %49.3 oranlarından yüksek, Erzurum'da Balkan ve ark.'nın %72.1 oranından ise düşüktür. Ayrıca çalışmamızda 0-12 aylık yaş grubu %35.5 oranı ile en yüksek paya sahipken yine Ankara'da Şimşek ve ark. çalışmasında da %63.8 ile 0-12 ay, Nepal'de Dhital ve ark. çalışmasında %47.5 ile 0-12 ay, Hindistan'da Mohanty ve ark. çalışmasında %47.4 ile 7-12 ay ve Angola'da Gasparinho ve ark. çalışmasında %38.6 ile 7-12 ay yaş grupları en yüksek orana sahiptir.

Çalışmamızda rotavirus antijen pozitiflik oranı %22.7 olup ülkemizdeki çalışmalardan Düzce'de Kızılırmak ve ark. %16, Balıkesir'de Şafak ve ark. %12.8, İstanbul'da İnan ve ark. %8.5, Antalya'da Çoban ve ark. %13.6 ve Madagaskar'da Rahajamanana ve ark. %13 (2015-2016) oranlarından yüksek, Erzurum'da Balkan ve ark. %26.1, Çanakkale'de Tekin ve ark. %23.6, Ankara'da Meral ve ark. %21.1, Tayvan'da Yu ve ark. %22.1, Nepal'de Dhital ve ark. %22.9, Tanzania'da Mchaile ve ark. %26.4 ve Angola'da Gasparinho ve ark. %25.1 oranlarına benzerdir. Ayrıca Ankara'da Şimşek ve ark. %29.1, Kayseri'de Atalay ve ark. %27.7, Antakya'da Özer ve ark. %31.2, Afyonkarahisar'da Altındiş ve ark. %40, İzmirde Kurugöl ve ark. %39.8, Pakistan'da Umair ve ark. %29.3, Hindistan'da Monhanty ve ark. %54.7, Kenya'da Agutu ve ark. %31.5 ve Madagaskar'da Rahajamanana ve ark.'nın %56 (2013-2014) oranlarından düşüktür.

Çalışma grubumuzda RV antijen pozitif hastaların yaş gruplarına göre dağılımına bakıldığında %42.9 ile en yüksek oran 0-12 ay yaş grubuna ait olup bu oran yurt içinde Ankara'da Şimşek ve ark. çalışmasında %70.3 ile 0-12 ay, Ankara'da Meral ve ark. çalışmasında %37.7 ile 12-23 ay, İzmir'de Kurugöl ve ark. çalışmasında %32.5 ile 12-23 ay, Türkiye genelinde Durmaz ve ark. çalışmasında %38.7 ile 13-24 ay, Balıkesir'de Şafak ve ark. çalışmasında %21.7 ile 25-36 ay ve Düzce'de Kızılırmak ve ark. çalışmasında %21.9 ile 49-60 ay yaş gruplarına aittir. Yurt dışında Hindistan'da

Monhanty ve ark. çalışmasında %49 ile 7-12 ay, Angola'da Gasparinho ve ark. çalışmasında %55.8 ile 6-12 ay, Nepal'de Dhital ve ark. çalışmasında %56.1 ile 1-12 ay, Tanzania'da Mchaile ve ark. çalışmasında %39.7 ile 0-12 ay, Madagaskar'da Rahajamanana ve ark. çalışmasında %67 ile 0-11 ay (2013-2014; %48 2015-2016) ve Kenya'da Agutu ve ark. çalışmasında %39.4 ile 13-24 ay yaş gruplarındaki rotavirus pozitiflik oranı diğer yaş gruplarına göre yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda 0-24 aylık çocuklar için RV pozitiflik oranı %76.9 olup Çanakkale'de Tekin ve ark. %34.5 oranından yüksek Erzurum'da Balkan ve ark. %77.5, Antakya'da Özer ve ark. %75 oranlarına yakın İzmir'de Kurugöl ve ark. %80.7 oranından ise biraz düşüktür.

RV antijen pozitif hastalarımızın yaş ortalaması 16.8 ay olup Ankara'da Meral ve ark. ve İzmir'de Kurugöl ve ark. çalışmasındaki ortalama değere (sırasıyla 16.8 ay, 15.5 ay) benzer, Angola'da Gasparinho ve ark. çalışmasındaki ortalama değerden (9.6 ay) ise yüksektir.

Çalışmamız süresince RV pozitifliği en yüksek sonbahar ve kış mevsiminde görülmüş olup hem örnek kabulü (sırasıyla %30.2, %20.2) hemde RV pozitiflik oranı (sırasıyla %38.5, %33) Kasım ve Aralık aylarında görülmüştür. Araştırmamıza benzer olarak en yüksek pozitiflik oranı Erzurum'da Balkan ve ark. (%64.7), Kayseri'de Atalay ve ark. (%39.5), İstanbul'da İnan ve ark. (%47.6), Antakya'da Özer ve ark. (%60), Afyonkarahisar'da Altındış ve ark. (Şubat %12), Antalya'da Çoban ve ark. (%40.9), İzmir'de Kurugöl ve ark. (%60-65), Hindistan'da Mohanty ve ark. (%66.9), Nepal'de Dhital ve ark. (Ocak %18.3) ve Gasporino ve ark. (Şubat %60) çalışmalarında kış mevsiminde tespit edilmiştir. Yine çalışmamızın sonuçlarına uyumlu olarak Ankara'da Meral ve ark. (%50.99) ve Pakistan'da Umair ve ark. (Kasım) sonbahar mevsiminde en yüksek pozitiflik oranını tespit etmişlerdir. Farklı olarak Balıkesir'de Şafak ve ark. (Mart %15.6), Çanakkale'de Tekin ve ark. (%27.8) ve Türkiye genelinde Durmaz ve ark. (Mart) en yüksek pozitiflik oranını ilkbaharın erken döneminde tespit etmişlerdir.

Araştırmamızda en fazla bulunan G genotipi G1 (%50.5) olup Ankara'da Şimşek ve ark. (%86), İzmir'de Kurugöl ve ark. (%75.1), Pakistan'da Umair ve ark. (%23.6), Hindistan'da Monhanty ve ark. (%72.9), Tayvan'da Yu ve ark. (%41), Tanzania'da Mchaile ve ark. (%53.8) ve Angola'da Gasparinho ve ark.'nın (%83.3) çalışmalarındaki baskın tip yine G1'dir. Farklı olarak Ankara'da Meral ve ark. G3 (%38.7),

Afyonkarahisar'da Altındış ve ark. G9 (%65), Türkiye genelinde Durmaz ve ark. G9 (%48.7) ve Nepal'de Dhital ve ark. G12 (%36) tiplerini en yaygın G genotipleri olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmamızda %16.8 oranında G tip için tiplendirilememiş örnek bulunmakta olup bu oranı Ankara'da Meral ve ark. %41.5, Ankara'da Şimşek ve ark. %18.9, İzmir'de Kurugöl ve ark. %8.9, Nepal'de Dhital ve ark. %1.8 ve Tanzanya'da Mchaile ve ark. %1.4 olarak bulmuştur.

Bu çalışmada en fazla gözlenen (%36) P genotipi P[8] olup Ankara'da Meral ve ark. (%87.5), Türkiye genelinde Durmaz ve ark. (%79.4), Pakistan'da Umair ve ark. (%41.2), Nepal'de Dhital ve ark. (%31 ile 2. sırada) ve Angola'da Gasparinho ve ark.'nın (%47.2) çalışmalarının bulguları ile benzerdir. Farklı olarak Afyonkarahisar'da Altındış ve ark. P[4] (%81) ve Nepal'de Dhital ve ark. P[6] (%32.8) genotiplerini yaygın P tipleri olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda örneklerin %20.3'ü oranında P genotiplendirilememiş olup bu oranı Ankara'da Meral ve ark. %54.7, Nepal'de Dhital ve ark. %6.6 ve Angola'da Gasparinho ve ark. %9.7 olarak tespit etmiştir.

Çalışmamızda G1P[8] (%21.3) ve G2P[4] (%12.4) en çok tespit edilen G/P kombinasyonları olup Ankara'da Meral ve ark. %38.9 ile G3P[8]'i (G1P[8] %11.1 ile 4. sırada), Afyonkarahisar'da Altındış ve ark. %52 ile G9P[8]'i (G1P[8] %21.6 ile 2. sırada), Türkiye genelinde Durmaz ve ark. %40.5 ile G9P[8]'i (G1P[8] %21.6 ile 2. sırada) tespit etmişlerdir. Pakistan'da Umair ve ark. G3P[8]'i %17.5 (G1P[8] %14.5 ile 4. sırada), Hindistan'da Monhanty ve ark. G1P[8]'i %62.2, Nepal'de Dhital ve ark. G12P[6]'yı %35.1 (G1P[8] ve G9P[8] %15.1 ile 2. sırada), Kenya'da Agutu ve ark. G3P[4]'ü, Madagaskar'da Rahajamanana ve ark. Haziran 2013-Nisan 2014 yılları arasında G3P[8]'i %66 (G2P[4] %15 ile 2. sırada) ve Ocak 2015-Aralık 2016 yılları arasında ise G2P[4]'ü %67 ve Angola'da Gasparinho ve ark. G1P[8]'i %47.2 oranlarında en yaygın G/P kombinasyonları olarak belirlemişlerdir.

Ayrıca araştırmamızda %7.9 (7; G1G2P[4], G1G2P[6], G1G3P[4], G2P[4]P[9], G2P[4]P[6], G3G9P[10] ve G3G9P[6]P[9]) oranında miks enfeksiyon tespit edilmiştir. Bu oran İzmir'de Kurugöl ve ark çalışmasındaki %5.9, Türkiye genelinde yapılan Durmaz ve ark. çalışmasındaki %2.2 (36; G9P[4]P[8], G1P[4]P[8], G2G9P[8]), Kenya'da Agutu ve ark. çalışmasındaki %6.5 (5; G9G3P[4], G9G3P[6], G1G3P[4]) ve Pakistan'da Umair ve ark. çalışmasındaki %6 oranlarından yüksek, Nepal'de Dhital ve ark. çalışmasındaki %7.5 oranına benzer, Madagaskar'da Rahajamanana ve ark.

alışmasındaki %10.7 (12; G1G3P[4], G9P[4]P[8], G3G12P[4]P[8]) oranından ise daha düşüktür.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Adana Şehir hastanesine Ocak-Aralık 2017 tarihleri arasında akut gastroenterit sebebi ile başvuran 5 yaş ve altı 400 çocukta rotavirus enfeksiyon insidansının ve genotiplerinin ELISA, RT-PCR ve semi-nested multipleks PCR testleri ile araştırıldığı çalışmamızın sonuçları;

1. Toplam 400 hastanın %54.5'i erkek ve %45.5'i kızlardan oluşmaktadır. Çalışmaya dahil edilen çocukların %61.8'i 0-24 ay yaş grubuna dahil olup ilerleyen yaşlarda bu oran %11.5 (25-36 ay) ile %5.2 (49-60 ay) arasında değişmektedir. Hastaların yaş ortalaması 20.4 ay'dır.
2. Rotavirus ELISA testi ile toplam 400 hastanın %22.7'si (91) rotavirus antijen pozitif bulunmuş olup RT-PCR ile hastaların %22.2'sinin (89) RV RNA pozitif olduğu tespit edilmiştir.
3. Rotavirus antijen pozitif olan hastaların %70.3'ü (64) erkeklerden, %29.6'sı (27) kızlardan oluşmaktadır. Bu çocukların yaş gruplarına göre dağılımına bakıldığında 2 yaşına kadar çocuklarda RV antijen pozitifliğinde yaş attıkça yükselme (0-6 aylık grupta %13.2, 7-12 aylık grupta %29.7 ve 13-24 aylık yaş grubunda %34) gözlenmiştir. RV antijen pozitif çocukların yaş ortalaması 16.8 ay olarak hesaplanmıştır.
4. RV antijen negatif hastaların çoğu (%69) pediatri polikliniklerine başvurmuş iken bu oran RV antijen pozitiflerde (%56) daha düşük bulunmuştur.
5. RV diarezi olan hastaların %42.8'i hospitalize edilirken RV enfeksiyonu olmayanların ise %14.5'i hastaneye yatırılmıştır. Ortalama hastaneye yatış süresi ise RV gastroenteriti olanlarda (5.5 gün) olmayanlara göre (3.6 gün) daha uzun bulunmuştur.
6. RV diarezi olanlarda kusma (%83.5) RV ile enfekte olmayanlara göre (%57) daha yüksek oranda görülmüştür.
7. Dehidratasyon belirtisi yine RV gastroenteriti olanlarda (%77) RV gastroenteriti olmayanlardan (%44.7) daha yüksek oranda gözlenmiştir.

8. RV gastroenteriti olanlarda IV rehidratasyon tedavisi %67 ile RV negatiflere uygulanan %33.3'lük orandan daha yüksektir. RV negatif hastaların çoğuna (%73.8) oral rehidratasyon tedavisi verilmiştir.
9. RV antijen pozitif örneklerin yıl içerisinde aylara göre dağılımına bakıldığında en yüksek pozitiflik sonbahar mevsiminde, %38.5 (35) ile Kasım ayında ve kış mevsiminde, %33 (30) ile Aralık ayında tespit edilmiştir.
10. Semi-nested multipleks PCR ile yapılan G tip genotipleme (G1-4, G8-10) sonucunda %50.5 (45) ile en yaygın G genotipi G1 olup bunu sırasıyla G2 %21.3 (19), G3 %14.6 (13) ve G9 %3.4 (3) takip etmiştir.
11. P tip genotipleme (P[4], P[6], P[8]-[11]) sonucunda ise en yaygın P genotipi %36 (32) ile P[8] olup bunu sırasıyla P[6] %22,5 (20), P[4] %19 (17), P[9] %4.5 (4), P[10] %3.4 (3) ve P[11] %1 (1) izlemektedir.
12. Tepit edilen en yaygın G/P kombinasyonu %21.3 (19) ile G1P[8] olup bunu sırasıyla %12.4 (11) ile G[4], %6.7 (6) ile G1P[6], %4.5 (4) ile G2[P8] ve %3.4 (3) ile G3[P8] takip etmiştir.
13. Rotavirus ko-enfeksiyon insidansı %7.9 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda akut gastroenteriti olan hastalarda rotavirus enfeksiyon insidansı %22.7 bulunmuştur. Hastaların çok az bir kısmının (%3.2) rotavirus aşısı yaptırdığı belirlenmiştir. Tespit edilen rotavirus P ve G genotipleri mevcut rotavirus aşılarının genotipleri ile uyumlu bulunmuştur. En yaygın G/P kombinasyonunun %21.3 (19) ile G1P[8] olduğu belirlenmiştir. Rotavirus aşısı uygulamasını yaygınlaştırmak, aşı etkinliğini tespit etmek ve gelecekte alternatif aşılar üretebilmek için rotavirus genotiplerinin belirlenmesi ve her yıl düzenli olarak sürveyansı oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

1. **Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Cline WL, Arrobio JO, Brandt CD, Rodriguez WJ, Sack DA, Chanock RM, Parrott RH.** Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with “winter” gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N Engl J Med* **1976**; 294(18):965-72.
2. **Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD; WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network.** 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **2012**; 12(2):136-41.
3. **Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, Franco MA, Greenberg HB, O’Ryan M, Kang G, Desselberger U, Estes MK.** Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. **2017**; 3:17083.
4. **Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ.** Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. **1973**; 2(7841):1281-3.
5. **Desselberger U.** Rotaviruses *Virus Res* **2014**; 22;190:75-96.
6. **Hoshino Y, Kapikian AZ.** Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J Health Popul Nutr*. **2000**; 18(1):5-14.
7. **Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI.** Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis*. **2005**; 192 Suppl 1:S146-59.
8. **Ward RL, Bernstein DI, Young EC, Sherwood JR, Knowlton DR, Schiff GM.** Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis*. **1986**; 154(5):871-80.
9. **Gleizes O, Desselberger U, Tatochenko V, Rodrigo C, Salman N, Mezner Z, Giaquinto C, Grimpel E.** 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 Suppl):S12-21.
10. **Sandora TJ.** Prevention of healthcare-associated infections in children: new strategies and success stories. *Curr Opin Infect Dis*. **2010**; 23(4):300-5.
11. **Jalilvand S, Marashi SM, Tafakhori A, Shoja Z.** Extraintestinal Involvement of Rotavirus Infection in Children. *Arch Iran Med*. **2015**; 18(9):604-5.
12. **Greenberg HB, Estes MK.** Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*. **2009**; 136(6):1939-51.
13. **Tate JE, Haynes A, Payne DC, Cortese MM, Lopman BA, Patel MM, Parashar UD.** Trends in national rotavirus activity before and after introduction of rotavirus vaccine into the national immunization program in the United States, 2000 to 2012. *Pediatr Infect Dis J*. **2013**; 32(7):741-4.
14. **McClain B, Settembre E, Temple BR, Bellamy AR, Harrison SC.** X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol*. **2010**; 397(2):587-99.

15. **Estrozi LF, Settembre EC, Goret G, McClain B, Zhang X, Chen JZ, Grigorieff N, Harrison SC.** Location of the dsRNA-dependent polymerase, VP1, in rotavirus particles. *J Mol Biol.* **2013**; 425(1):124-32.
16. **Trask SD, Ogden KM, Patton JT.** Interactions among capsid proteins orchestrate rotavirus particle functions. *Curr Opin Virol.* **2012**; 2(4):373-9.
17. **Li W, Manktelow E, von Kirchbach JC, Gog JR, Desselberger U, Lever AM.** Genomic analysis of codon, sequence and structural conservation with selective biochemical-structure mapping reveals highly conserved and dynamic structures in rotavirus RNAs with potential cis-acting functions. *Nucleic Acids Res.* **2010**; 38(21):7718-35.
18. **Lu, X., McDonald, S.M., Tortorici, M.A., Tao, Y.J., Vasquez-Del Carpio, R., Nibert, M.L., Patton, J.T., Harrison, S.C.** Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure.* **2008**; 16(11):1678–1688.
19. **Settembre EC, Chen JZ, Dormitzer PR, Grigorieff N, Harrison SC.** Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J.* 2011; 30(2):408-16.
20. **Charpilienne A, Lepault J, Rey F, Cohen J.** Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. *J Virol.* **2002**; 76(15):7822-31.
21. **Rodríguez JM, Chichón FJ, Martín-Forero E, González-Camacho F, Carrascosa JL, Castón JR, Luque D.** New insights into rotavirus entry machinery: stabilization of rotavirus spike conformation is independent of trypsin cleavage. *PLoS Pathog.* **2014**; 10(5):e1004157.
22. **Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, Lawton JA, Shaw AL, Ramig RF, Prasad BV.** Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J Virol.* **2001**; 75(13):6052-61.
23. **Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, Jha P, Campbell H, Walker CF, Cibulskis R, Eisele T, Liu L, Mathers C.** Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet.* **2010**; 375(9730):1969-87.
24. **Lamberti LM, Fischer Walker CL, Noiman A, Victora C, Black RE.** Breastfeeding and the risk for diarrhea morbidity and mortality. *BMC Public Health.* **2011**; 11 Suppl 3:S15.
25. **Mihalov-Kovács E, Gellért Á, Marton S, Farkas SL, Fehér E, Oldal M, Jakab F, Martella V, Bányai K.** Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg Infect Dis.* **2015**; 21(4):660-3.
26. **Molinari BL, Lorenzetti E, Otonel RA, Alfieri AF, Alfieri AA.** Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012. *Emerg Infect Dis.* **2014**; 20(6):1019-22.
27. **Johne R, Otto P, Roth B, Löhren U, Belnap D, Reetz J, Trojnar E.** Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. *Virology.* **2011**; 412(2):384-91.
28. **Rubio RM, Mora SI, Romero P, Arias CF, López S.** Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *J Virol.* **2013**; 87(11):6336-45.
29. **Essere B, Yver M, Gavazzi C, Terrier O, Isel C, Fournier E, Giroux F, Textoris J, Julien T, Socratous C, Rosa-Calatrava M, Lina B, Marquet R, Moules V.** Critical role of segment-specific packaging signals in genetic reassortment of influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2013**; 110(40):E3840-8.

30. **Hundley F, Biryahwaho B, Gow M, Desselberger U.** Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology*. **1985**; 143(1):88-103.
31. **Vende P, Piron M, Castagne N, Poncet D.** Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 30 end. *Journal of Virology* **2000**; 74:7064-7071.
32. **Keryer-Bibens C, Legagneux V, Namanda-Vanderbeken A, Cosson B, Paillard L, Poncet D, Osborne HB.** The rotaviral NSP3 protein stimulates translation of polyadenylated target mRNAs independently of its RNA-binding domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2009**; 390:302-306.
33. **McCrae MA, McCorquodale JG.** Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology*. **1983**; 126:204-212.
34. **Deo RC, Groft CM, Rajashankar KR, Burley SK.** Recognition of the rotavirus mRNA 30 consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell*. 2002, 108:71-81.
35. **Groft CM, Burley SK.** Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Molecular Cell*. **2002**; 9:1273-1283.
36. **Montero H, Arias CF, Lopez S.** Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *Journal of Virology*. **2006**; 80:9031-9038.
37. **Valenzuela S, Pizarro J, Sandino AM, Vasquez M, Fernandez J, Hernandez O, Patton J, Spencer E.** Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *Journal of Virology*. **1991**; 65:3964-3967.
38. **Kumar M, Jayaram H, Carpio RV, Jiang X, Taraporewala ZF, Jacobson RH, Patton JT, Prasad BV.** Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleotides reveals an NDP kinase like activity. *Journal of Virology*. **2007**; 81:12272-12284.
39. **Martin D, Duarte M, Lepault J, Poncet D.** Sequestration of free tubulin molecules by the viral protein NSP2 induces microtubule depolymerization during rotavirus infection. *Journal of Virology*. **2010**; 84:2522-2532.
40. **Taraporewala ZF, Jiang X, Vasquez-Del Carpio R, Jayaram H, Prasad BV, Patton JT.** Structure-function analysis of rotavirus NSP2 octamer by using a novel complementation system. *Journal of Virology*. **2006**; 80:7984-7994.
41. **Welch SK, Crawford SE, Estes MK.** Rotavirus SA11 genome segment 11 protein is a nonstructural phosphoprotein. *Journal of Virology*. **1989**; 63:3974-3982.
42. **Eichwald C, Jacob G, Muszynski B, Allende JE, Burrone OR.** Uncoupling substrate and activation functions of rotavirus NSP5: phosphorylation of Ser-67 by casein kinase 1 is essential for hyperphosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2004**; 101:16304-16309.
43. **Sen A, Sen N, Mackow ER.** The formation of viroplasm-like structures by the rotavirus NSP5 protein is calcium regulated and directed by a C-terminal helical domain. *Journal of Virology*. **2007**; 81:11758-11767.
44. **Vende P, Taraporewala ZF, Patton JT.** RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *Journal of Virology*. **2002**; 76:5291-5299.
45. **Martin D, Ouldali M, Menetrey J, Poncet D.** Structural organisation of the rotavirus nonstructural protein NSP5. *Journal of Molecular Biology*. **2011**; 413:209-221.

46. **Hyser JM, Collinson-Pautz MR, Utama B, Estes MK.** Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *MBio*. **2010**; 1 pii:e00265-10.
47. **Seo NS, Zeng CQ, Hyser JM, Utama B, Crawford SE, Kim KJ, Hook M, Estes MK.** Integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 are receptors for the rotavirus enterotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2008**; 105:8811-8818.
48. **Xu A, Bellamy AR, Taylor JA.** Immobilization of the early secretory pathway by a virus glycoprotein that binds to microtubules. *EMBO Journal*. **2000**; 19:6465-6474.
49. **Berkova Z, Crawford SE, Blutt SE, Morris AP, Estes MK.** Expression of rotavirus NSP4 alters the actin network organization through the actin remodeling protein cofilin. *Journal of Virology*. **2007**; 81:3545-3553.
50. **Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-Del Carpio R, Patton JT.** Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *Journal of Virology*. 2005; 79:15165-15174.
51. **Sandino AM, Jashes M, Faundez G, Spencer E.** Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. *J Virol*. **1986**; 60:797-802.
52. **Lopez S, Arias CF.** Early steps in rotavirus cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol* . **2006**; 309:39-66.
53. **Dormitzer PR, Sun ZY, Blixt O, Paulson JC, Wagner G, Harrison SC.** Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core. *J Virol*. **2002**; 76(20):10512-7.
54. **Haselhorst T, Fleming FE, Dyason JC, Hartnell RD, Yu X, Holloway G, Santegoets K, Kiefel MJ, Blanchard H, Coulson BS, von Itzstein M.** Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nat Chem Biol*. **2009**; 5(2):91-3.
55. **Ramani S, Cortes-Penfield NW, Hu L, Crawford SE, Czako R, Smith DF, Kang G, Ramig RF, Le Pendu J, Prasad BV, Estes MK.** The VP8* domain of neonatal rotavirus strain G10P[11] binds to type II precursor glycans. *J Virol*. **2013**; 87(13):7255-64.
56. **Imbert-Marcille BM, Barbé L, Dupé M, Le Moullac-Vaidye B, Besse B, Peltier C, Ruvoën-Clouet N, Le Pendu J.** A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus A of the P[8] genotype. *J Infect Dis*. **2014**; 209(8):1227-30.
57. **Gutierrez M, Isa P, Sanchez-San Martin C, Perez-Vargas J, Espinosa R, Arias CF, Lopez S.** Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*. **2010**; 84:9161-9169.
58. **Martinez MA, Lopez S, Arias CF, Isa P.** Gangliosides have a functional role during rotavirus cell entry. *J Virol*. **2013**; 87:1115-1122.
59. **Diaz-Salinas MA, Silva-Ayala D, Lopez S, Arias CF.** Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6- phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell. *J Virol*. **2014**, 88:4389-4402.
60. **Silva-Ayala D, Lopez T, Gutierrez M, Perrimon N, Lopez S, Arias CF.** Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2013**; 110:10270-0275.
61. **Braulke T, Bonifacino JS.** Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*. **2009**; 1793:605-614.

62. **Tsai B.** Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2007**; 23:23-43.
63. **Periz J, Celma C, Jing B, Pinkney JN, Roy P, Kapanidis AN.** Rotavirus mRNAs are released by transcript-specific channels in the double-layered viral capsid. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2013**; 110(29):12042-7.
64. **Ayala-Breton C, Arias M, Espinosa R, Romero P, Arias CF, López S.** Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J Virol.* **2009**; 83(17):8819-31.
65. **Sandino AM, Jashes M, Faundez G, Spencer E.** Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. *J Virol.* **1986**; 60:797-802.
66. **Mansell EA, Patton JT.** Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *J Virol.* **1990**; 64:4988-96.
67. **Lu X, McDonald SM, Tortorici MA, Tao YJ, Vasquez-Del Carpio R, Nibert ML, Patton JT, Harrison SC.** Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure.* **2008**; 16:1678-88.
68. **Estrozi LF, Settembre EC, Goret G, McClain B, Zhang X, Chen JZ, Grigorieff N, Harrison SC.** Location of the dsRNA-dependent polymerase, VP1, in rotavirus particles. *J Mol Biol.* **2013**; 425:124-132.
69. **McDonald SM, Patton JT.** Rotavirus VP2 core shell regions critical for viral polymerase activation. *J Virol.* **2011**; 85:3095-105.
70. **Tao Y, Farsetta DL, Nibert ML, Harrison SC.** RNA synthesis in a cage—structural studies of reovirus polymerase λ 3. *Cell.* **2002**; 111:733-45.
71. **Campagna M, Eichwald C, Vascotto F, Burrone OR.** RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J Gen Virol.* **2005**; 86(Pt 5):1481-7.
72. **Arnoldi F, De Lorenzo G, Mano M, Schraner EM, Wild P, Eichwald C, Burrone OR.** Rotavirus increases levels of lipidated LC3 supporting accumulation of infectious progeny virus without inducing autophagosome formation. *PLoS One.* **2014**; 9(4):e95197.
73. **Hyser JM, Utama B, Crawford SE, Broughman JR, Estes MK.** Activation of the endoplasmic reticulum calcium sensor STIM1 and store-operated calcium entry by rotavirus requires NSP4 viroporin activity. *J Virol.* **2013**; 87(24):13579-88.
74. **Desselberger U, Richards J, Tchertanov L, Lepault J, Lever A, Burrone O, Cohen J.** Further characterisation of rotavirus cores: Ss(+)RNAs can be packaged in vitro but packaging lacks sequence specificity. *Virus Res.* **2013**; 178(2):252-63.
75. **Trask SD, Dormitzer PR.** Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *J Virol.* **2006**; 80(22):11293-304.
76. **Van Damme P, Giaquinto C, Huet F, Gothefors L, Maxwell M, Van der Wielen M, REVEAL Study Group.** Multicenter prospective study of the burden of rotavirus acute gastroenteritis in Europe, 2004-2005: the REVEAL study. *J Infect Dis* **2007**; 195:S4-16.
77. **Pediatric ROTavirus European CommitTee (PROTECT).** The paediatric burden of rotavirus disease in Europe. *Epidemiol Infect* **2006**; 134:908-16.

78. **Giaquinto C, Dominiak-Felden G, Van Damme P, Myint TTH, Maldonado YA, Spoulou V, Mast TC, Staat MA.** Summary of effectiveness and impact of rotavirus vaccination with the oral pentavalent rotavirus vaccine: a systematic review of the experience in industrialized countries. *Hum Vaccin* **2011**; 7:734-48.
79. **Zlomy M, Kofler S, Orth D, Węrzner R, Heinz-Erian P, Streng A, Prelog M.** The impact of Rotavirus mass vaccination on hospitalization rates, nosocomial Rotavirus gastroenteritis and secondary blood stream infections. *BMC Infect Dis* **2013**; 13:112-122.
80. **Frühwirth M, Heininger U, Ehlken B, Petersen G, Laubereau B, Moll-Schüler I, Mutz I, Forster J.** International variation in disease burden of rotavirus gastroenteritis in children with community- and nosocomially acquired infection. *Pediatr Infect Dis J* **2001**; 20: 784-791.
81. **Stefkovicova M, Simurka P, Jurackov L, Hudeckova H, Mad'ar R.** Nosocomial rotaviral gastroenteritis in paediatric departments. *Cent Eur J Public Health* **2008**; 16:12-6.
82. **Zlomy M, Kofler S, Orth D, Węrzner R, Heinz-Erian P, Streng A, Prelog M.** The impact of Rotavirus mass vaccination on hospitalization rates, nosocomial Rotavirus gastroenteritis and secondary blood stream infections. *BMC Infect Dis* **2013**; 13:112-122.
83. **Yu TH, Tsai CN, Lai MW, Chen CC, Chao HC, Lin CW.** Antigenemia and cytokine expression in rotavirus gastroenteritis in children. *J Microbiol Immunol Infect.* **2012**; 45:265-270.
84. **Salmi TT, Arstila P, Koivikko A.** Central nervous system involvement in patients with rotavirus gastroenteritis. *Scand J Infect Dis.* **1978**; 10:29-31.
85. **Ahmed K, Bozdayi G, Mitui MT, Ahmed S, Kabir L, Buket D.** Circulating rotaviral RNA in children with rotavirus antigenemia. *J Negat Results Biomed.* **2013**; 12:5.
86. **Mrukowicz JZ, Wetzel JD, Goral MI, Fogo AB, Wright PF, Dermody TS.** Viruses and cells with mutations affecting viral entry are selected during persistent rotavirus infections of MA104 cells. *J Virol.* **1998**; 72(4):3088-97.
87. **Medici MC, Abelli LA, Guerra P, Dodi I, Dettori G, Chezzi C.** Case report: detection of rotavirus RNA in the cerebrospinal fluid of a child with rotavirus gastroenteritis and meningism. *J Med Virol.* **2011**; 83(9):1637-40.
88. **Feng N, Yasukawa LL, Sen A, Greenberg HB.** Permissive replication of homologous murine rotavirus in the mouse intestine is primarily regulated by VP4 and NSP1. *J Virol.* **2013**; 87(15):8307-16.
89. **Chattopadhyay S, Basak T, Nayak MK, Bhardwaj G, Mukherjee A, Bhowmick R, Sengupta S, Chakrabarti O, Chatterjee NS, Chawla-Sarkar M.** Identification of cellular calcium binding protein calmodulin as a regulator of rotavirus A infection during comparative proteomic study. *PLoS One.* **2013**; 8(2):e56655.
90. **Liu F, Li G, Wen K, Wu S, Zhang Y, Bui T, Yang X, Kocher J, Sun J, Jortner B, Yuan L.** *Lactobacillus rhamnosus* GG on rotavirus-induced injury of ileal epithelium in gnotobiotic pigs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **2013**; 57(6):750-8.
91. **Jiang B, Gentsch JR, Glass RI.** The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis.* **2002**; 34(10):1351-61.
92. **Fischer TK, Valentiner-Branth P, Steinsland H, Perch M, Santos G, Aaby P, Mølbak K, Sommerfelt H.** Protective immunity after natural rotavirus infection: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, west Africa. *J Infect Dis.* **2002**; 186(5):593-7.

93. **Sapparapu G, Sims AL, Aiyegbo MS, Shaikh FY, Harth EM, Crowe JE Jr.** Intracellular neutralization of a virus using a cell-penetrating molecular transporter. *Nanomedicine (Lond)*. **2014**; 9(11):1613-24.
94. **Parra M, Herrera D, Calvo-Calle JM, Stern LJ, Parra-López CA, Butcher E, Franco M, Angel J.** Circulating human rotavirus specific CD4 T cells identified with a class II tetramer express the intestinal homing receptors $\alpha 4\beta 7$ and CCR9. *Virology*. **2014**; 452-453:191-201.
95. **Pott J, Mahlakoiv T, Mordstein M, Duerr CU, Michiels T, Stockinger S, Staeheli P, Hornef MW.** IFN-lambda determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2011**; 108(19):7944-9.
96. **Sen A, Rott L, Phan N, Mukherjee G, Greenberg HB.** Rotavirus NSP1 protein inhibits interferon-mediated STAT1 activation. *J Virol*. **2014**; 88(1):41-53.
97. **Bhowmick R, Halder UC, Chattopadhyay S, Nayak MK, Chawla-Sarkar M.** Rotavirus-encoded nonstructural protein 1 modulates cellular apoptotic machinery by targeting tumor suppressor protein p53. *J Virol*. **2013**; 87(12):6840-50.
98. **Sen A, Pruijssers AJ, Dermody TS, Garcia-Sastre A, Greenberg HB.** The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *J Virol*. **2011**; 85:3717-3732.
99. **Holloway G, Truong TT, Coulson BS.** Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NF-kappa B. *J Virol*. **2009**; 83:4942-4951.
100. **Desselberger U, Huppertz HI.** Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *J Infect Dis*. **2011**; 203(2):188-95.
101. **Rigo-Adrover M, Saldaña-Ruiz S, van Limpt K, Knipping K, Garssen J, Knol J, Franch A, Castell M, Pérez-Cano FJ.** A combination of scGOS/lcFOS with Bifidobacterium breve M-16V protects suckling rats from rotavirus gastroenteritis. *Eur J Nutr*. **2017**; 56(4):1657-1670.
102. **Rigo-Adrover M, Pérez-Berezo T, Ramos-Romero S, van Limpt K, Knipping K, Garssen J, Knol J, Franch A, Castell M, Pérez-Cano FJ.** A fermented milk concentrate and a combination of short-chain galacto-oligosaccharides/long-chain fructo-oligosaccharides/pectin-derived acidic oligosaccharides protect suckling rats from rotavirus gastroenteritis. *Br J Nutr*. **2017**; 117(2):209-217.
103. **Vlasova AN, Kandasamy S, Chattha KS, Rajashekara G, Saif LJ.** Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Vet Immunol Immunopathol*. **2016**; 172:72-84.
104. **Ishizuka T, Kanmani P, Kobayashi H, Miyazaki A, Soma J, Suda Y, Aso H, Nochi T, Iwabuchi N, Xiao JZ, Saito T, Villena J, Kitazawa H.** Immunobiotic Bifidobacteria Strains Modulate Rotavirus Immune Response in Porcine Intestinal Epitheliocytes via Pattern Recognition Receptor Signaling. *PLoS One*. **2016**; 11(3):e0152416.
105. **Patel NC, Hertel PM, Estes MK, de la Morena M, Petru AM, Noroski LM, Revell PA, Hanson IC, Paul ME, Rosenblatt HM, Abramson SL.** Vaccine-acquired rotavirus in infants with severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. **2010**; 362(4):314-9.
106. **Vesikari T, Karvonen A, Prymula R, Schuster V, Tejedor JC, Cohen R, Meurice F, Han HH, Damaso S, Bouckennooghe A.** Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. *Lancet*. **2007**; 370:1757-1763.

107. **Aladin F, Einerhand AW, Bouma J, Bezemer S, Hermans P, Wolvers D, Bellamy K, Frenken LG, Gray J, Iturriza-Gómara M.** In vitro neutralisation of rotavirus infection by two broadly specific recombinant monovalent llama-derived antibody fragments. *PLoS One*. **2012**; 7(3):e32949.
108. **Tokuhara D, Álvarez B, Mejima M, Hiroiwa T, Takahashi Y, Kurokawa S, Kuroda M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Nochi T, Sagara H, Aladin F, Marcotte H, Frenken LG, Iturriza-Gómara M, Kiyono H, Hammarström L, Yuki Y.** Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J Clin Invest*. **2013**; 123(9):3829-38.
109. **Kim Y, George D, Prior AM, Prasain K, Hao S, Le DD, Hua DH, Chang KO.** Novel triacsin C analogs as potential antivirals against rotavirus infections. *Eur J Med Chem*. **2012**; 50:311-8.
110. **La Frazia S, Ciucci A, Arnoldi F, Coira M, Gianferretti P, Angelini M, Belardo G, Burrone OR, Rossignol JF, Santoro MG.** Thiazolidines, a new class of antiviral agents effective against rotavirus infection, target viral morphogenesis, inhibiting viroplasm formation. *J Virol*. **2013**; 87(20):11096-106.
111. **Dennehy PH, Cortese MM, Bégué RE, Jaeger JL, Roberts NE, Zhang R, Rhodes P, Gentsch J, Ward R, Bernstein DI, Vitek C, Bresee JS, Staat MA.** A case-control study to determine risk factors for hospitalization for rotavirus gastroenteritis in U.S. children. *Pediatr Infect Dis J*. **2006**; 25(12):1123-31.
112. **Douglas Marthaler, Kurt Rossow, Marie Culhane, Sagar Goyal, Jim Collins, Jelle Matthijnssens, Martha Nelson, and Max Ciarlet.** Widespread Rotavirus H in Commercially Raised Pigs, United States. *Emerg Infect Dis*. **2014**; 20(7): 1203–1206.
113. **Patton JT.** Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med*. **2012**; 13(68):85-97.
114. **Sharma S, Paul VK, Bhan MK, Ray P.** Genomic characterization of nontypeable rotaviruses and detection of a rare G8 strain in Delhi, India. *J Clin Microbiol*. **2009**; 47: 3998-4005.
115. **Widdowson MA, Steele D, Vojdani J, Wecker J, Parashar U.** Global rotavirus surveillance: determining the need and measuring the impact of rotavirus vaccines. *J Infect Dis*. **2009**; 200; S1-8.
116. **Luchs A, Cilli A, Morillo SG, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C.** Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: possible human-canine interspecies transmission. *J Clin Virol*. **2012**; 54(1):89-92.
117. **Vesikari T, Isolauri E, D'Hondt E, Delem A, André' FE, Zissis G.** Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet*. **1984**; 1: 977–981.
118. **Vesikari T.** Rotavirus vaccination: a concise review. *Clin Microbiol Infect*. **2012**; 18 Suppl 5:57-63.
119. **Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH, Bernstein DI, Pichichero ME, Zito ET, Mack ME, Davidson BL, Kapikian AZ.** Safety and efficacy of highdose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines – report of the National Multicenter Trial. United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *Pediatrics*. **1996**; 97: 7–13.
120. **Murphy TV, Gargiullo PM, Massoudi MS, Nelson DB, Jumaan AO, Okoro CA, Zanardi LR, Setia S, Fair E, LeBaron CW, Wharton M, Livengood JR.** Rotavirus Intussusception Investigation Team. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N Engl J Med*. **2001**; 344: 561–572.
121. **Vesikari T, Karvonen A, Korhonen T, Espo M, Lebacqz E, Forster J, Zepp F, Delem A, De Vos B.** Safety and immunogenicity of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in adults, toddlers and previously uninfected infants. *Vaccine*. **2004**; 22:2836–2842.

122. **Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, Witte D, Kirsten M, Louw C, Ngwira B, Victor JC, Gillard PH, Cheuvart BB, Han HH, Neuzil KM.** Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *N Engl J Med.* **2010**; 362:289–298.
123. **Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, Dallas MJ, Heyse JF, Goveia MG, Black SB, Shinefield HR, Christie CD, Ylitalo S, Itzler RF, Coia ML, Onorato MT, Adeyi BA, Marshall GS, Gothefors L, Campens D, Karvonen A, Watt JP, O'Brien KL, DiNubile MJ, Clark HF, Boslego JW, Offit PA, Heaton PM.** Rotavirus Efficacy and Safety Trial (REST) Study Team. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med.* **2006**; 354: 23–33.
124. **Vesikari T, Karvonen A, Ferrante SA, Ciarlet M.** Efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq, in Finnish infants up to 3 years of age: the Finnish Extension Study. *Eur J Pediatr.* **2010**; 169: 1379–1386.
125. **Desselberger U.** Rotaviruses. *Virus Res.* **2014**; 190:75-96.
126. **Hemming M, Räsänen S, Huhti L, Paloniemi M, Salminen M, Vesikari T.** Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. *Eur J Pediatr.* **2013**; 172(6):739-46.
127. **Pitzer VE, Patel MM, Lopman BA, Viboud C, Parashar UD, Grenfell BT.** Modeling rotavirus strain dynamics in developed countries to understand the potential impact of vaccination on genotype distributions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2011**; 108(48):19353-8.
128. **Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J.** Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol.* **2004**; 31(4):259-65.
129. **Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY.** Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* **1990**; 28(2):276-82.
130. **Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK.** Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* **1992**; 30(6):1365-73.
131. **Binka E, Vermund SH, Armah GE.** Rotavirus diarrhea among children less than 5 years of age in urban Ghana. *Pediatr Infect Dis J.* **2011**; 30(8):716-8.
132. **Lin CL, Chen SC, Liu SY, Chen KT.** Disease caused by rotavirus infection. *Open Virol J.* **2014**; 8:14-9.
133. **Luchs A, Timenetsky Mdo C.** Group A rotavirus gastroenteritis: post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission. *Einstein (Sao Paulo).* **2016**; 14(2):278-87.
134. **K Arif, Çalışkan E, Temizkan CR.** Rotavirus and Adenovirus Frequency in Children with Acute Gastroenteritis. *Konuralp Tıp Dergisi.* **2017**; 9(2):35-39.
135. **Şimsek Y, Bostancı I, Bozdayı G, Öner N, Kamruddin S, Rota S, Dallar Y.** Frequency and serotype features of rotavirus in 0-5 age children with acute gastroenteritis. *Türkiye Klinikleri J Pediatr.* **2007**, 16:165-170.
136. **Balkan ÇE, Çelebi D, Çelebi Ö, Altıparlak Ü.** Among 0-5 Years Old Children with Acute Gastroenteritis in Erzurum. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* **2012**; 42(2):51-54.

137. **Şafak B.** The Frequency Of Rotavirus And Adenovirus In Pediatric Patients wİth Acute Gastroenteritis. *ACU Sağlık Bil Derg.* **2014;** (2):121-124.
138. **Tekin M, Topaloğlu N, Yıldırım Ş, Binnetoğlu K, Kaymaz N, Aylanç H, Battal F, Vural A, Başer E.** Frequency Of Rotavirus in Children With Acute Gastroenteritis. *International Journal of Clinical Research.* **2014;** 2(1):18-20.
139. **Atalay MA, Kandemir İ, Gökahmetoğlu S.** Frequency of Rotavirus infection in children with gastroenteritis in a tertiary hospital. *Dicle Medical Journal.* **2013;** 40(2): 212-215.
140. **İnan N, Ünsür EK, Demirel A, Mamçu D, Sönmez E, Arısoy A.** Investigation of Frequency of Rotavirus, Adenovirus and Norovirus in Patients with Acute Gastroenteritis. *ANKEM Derg.* **2014;** 28(1):14-19.
141. **Özer B, Jenedi K, Pehlivanoğlu C, Göçmen M.** Rotavirus and Adenovirus Prevelance in Stool Samples of Patients with Acute Gastroenteritis. *Mustafa Kemal Üniv.Tıp Derg, Cilt 5, Sayı 20, Yıl 2014.*
142. **Meral M, Bozdayı G, Ozkan S, Dalgıç B, Alp G, Ahmed K.** Rotavirus prevalence in children with acute gastroenteritis and the distribution of serotypes and electropherotypes. *Mikrobiyol Bul.* **2011;** 45(1):104-12.
143. **Altındış M, Küçükkurt Ş, Kalaycı R, Aslan FG, Bükülmez A, Yoldaş Y.** The Frequency Of Rotavirus, Enteric Adenovirus And Norovirus In Children With Acute Diarrhea. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi* **2016,** Cilt 1, Sayı 1, 1-12.
144. **Çoban B, Topal B.** Evaluation of rotavirus gastroenteritis in children: five years'surveillance in Alanya, Antalya. *The Turkish Journal of Pediatrics.* **2014;** 56: 280-284.
145. **Kurugöl Z, Geylani S, Karaca Y, Umay F, Erensoy S, Vardar F, Bak M, Yaprak I, Özknay F, C Özknay.** Rotavirus gastroenteritis among children under five years of age in Izmir, Turkey. *The Turkish Journal of Pediatrics.* **2003;** 45: 290-294.
146. **Durmaz R, Kalaycioglu AT, Acar S, Bakkaloglu Z, Karagoz A, Korukluoglu G, Ertek M, Torunoglu MA.** Turkish Rotavirus Surveillance Network. Prevalence of rotavirus genotypes in children younger than 5 years of age before the introduction of a universal rotavirus vaccination program: report of rotavirus surveillance in Turkey. *PLoS One.* **2014;** 9(12):e113674.
147. **Umair M, Abbasi BH, Nisar N, Alam MM, Sharif S, Shaukat S, Rana MS, Khurshid A, Mujtaba G, Aamir UB, Zaidi SSZ.** Molecular analysis of group A rotaviruses detected in hospitalized children from Rawalpindi, Pakistan during 2014. *Infect Genet Evol.* **2017;** 53:160-166.
148. **Mohanty E, Dwibedi B, Kar SK, Acharya AS.** Epidemiological features and genetic characterization of virus strains in rotavirus associated gastroenteritis in children of Odisha in Eastern India. *Infect Genet Evol.* **2017;** 53:77-84.
149. **Yu WJ, Chen SY, Tsai CN, Chao HC, Kong MS, Chang YJ, Chiu CH.** Long-term impact of suboptimal rotavirus vaccines on acute gastroenteritis in hospitalized children in Northern Taiwan. *J Formos Med Assoc.* **2017;** 11.
150. **Dhital S, Sherchand JB, Pokhrel BM, Parajuli K, Shah N, Mishra SK, Sharma S, Kattel HP, Khadka S, Khatiwada S, Parajuli N, Rijal B.** Molecular epidemiology of Rotavirus causing diarrhea among children less than five years of age visiting national level children hospitals, Nepal. *BMC Pediatr.* **2017;** 17(1):101.
151. **Agutu MT, Ongus J, Kombich J, Kamenwa R, Nyangao J, Kagira J, Ogutu AA, Bitek A.** Prevalence and genetic diversity of rotavirus infection in children with acute gastroenteritis in a

hospital setting, Nairobi Kenya in post vaccination era: a cross-sectional study. *Pan Afr Med J.* **2017**; 24;26:38.

152. **Mchaile DN, Philemon RN, Kabika S, Albogast E, Morijo KJ, Kifaro E, Mmbaga BT.** Prevalence and genotypes of Rotavirus among children under 5 years presenting with diarrhoea in Moshi, Tanzania: a hospital based cross sectional study. *BMC Res Notes.* **2017** Oct 30;10(1):542.
153. **Rahajamanana VL, Raboba JL, Rakotozanany A, Razafindraibe NJ, Andriatahirintsoa EJPR, Razafindrakoto AC, Mioramalala SA, Razaiarimanga C, Weldegebriel GG, Burnett E, Mwenda JM, Seheri M1, Mphahlele MJ, Robinson AL.** Impact of rotavirus vaccine on all-cause diarrhea and rotavirus hospitalizations in Madagascar. *Vaccine.* **2017**; 25.
154. **Gasparinho C, Piedade J, Mirante MC, Mendes C, Mayer C, Vaz Nery S, Brito M, Istrate C.** Characterization of rotavirus infection in children with acute gastroenteritis in Bengo province, Northwestern Angola, prior to vaccine introduction. *PLoS One.* **2017**; 19;12(4):e0176046.



ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Kastamonu’da doğdu. 2003 yılında Çatalzeytin İlköğretim Okulu’ndan mezun oldu ve liseyi Kastamonu Kuzeykent Anadolu Lisesi’nde 2010 yılında tamamladı. 2014 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden mezun oldu. 2015 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Tezli Yüksek Lisans programına başladı ve 2016 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına geçerek Yüksek Lisans eğitimine araştırma görevlisi olarak devam etti.

