

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

ALT SOLUNUM YOLU İNFEKSİYONU ÖN TANILI ÇOCUKLARDA
RESPIRATORY SYNCYTIAL VİRUS’UN GERÇEK ZAMANLI TERS
TRANSKRİPTAZ PZR İLE ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. AYTÜL DEMİRAĞ

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR.SEYYAL ROTA

ANKARA-2007

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında vermiş olduğu büyük destekten dolayı değerli hocam sayın Prof. Dr. Seyyal Rota'ya, değerli hocalarım Prof. Dr. Nedim Sultan'a, Prof. Dr. Sevgi Türet'e, Prof. Dr. Turgut İmir'e, Prof. Dr. Semra Kuştimur'a, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Meltem Yalınay Çırak'a, Doç. Dr. Kayhan Çağlar'a, Doç. Dr. Ayşe Kalkancı'ya, Yrd. Doç.Dr. Işıl Fidan'a, Öğr. Gör. Dr. Funda Doğruman Al'a, Öğr. Gör. Dr. Doruk Engin'e ve her konuda daima desteği olan Yrd. Doç. Dr. Gülendam Bozdayı'ya, birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma ve her zaman yanımda olan değerli eşime sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

Giriş	1
Genel Bilgiler	3
Gereç ve yöntem.....	30
Bulgular	37
Tartışma	42
Özet.....	53
Summary	54
Kaynaklar.....	55

KISALTMALAR

EIA: Enzyme immunoassay

IFA: Immunofluorescent assay

DFA: Direct immunofluorescent assay

PBS: Phosphate buffered saline

TT-PZR: Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

PIV: Parainfluenza virus

NP: Nükleoprotein

HN: Hemaglütinin

NA: Nöraminidaz

NS: Yapısal olmayan

SH: Küçük hidrofobik

ORF: Açık okuma bölgesi

GAG: Glikozaminoglikan

MNH: Mononükleer hücre

TNF: Tümör nekrotizan faktör

NPA: Nazofaringeal aspirat

NS: Nazal sürüntü

SIDS: Ani bebek ölümü sendromu

GİRİŞ

Respiratory syncytial virus (RSV) paramiksovirus grubunda bulunan, tüm dünyada bebeklerde ve küçük çocuklarda viral alt solunum yolu hastalığının en önemli nedeni olarak bilinen bir virustur (23,46,62,77). Çocuklardaki hastaneye yatırılan bütün bronşiolit olgularının yaklaşık yarısından ve bütün pnömoni olgularının %25'inden sorumlu tutulmaktadır (59,82). RSV altta yatan kardiyopulmoner hastalık olduğunda, yaşlılık, immün yetmezlik durumlarında özellikle kemik iliği nakli yapılan hastalarda yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir. Günümüzde kullanılan çeşitli tanı yöntemleri infeksiyon etkeninin saptanarak gerekli terapötik yaklaşımların belirlenmesini sağlamaktadır (56).

Primer RSV infeksiyonu genellikle iki yaşından küçük çocuklarda görülmektedir. Virus büyük çocuklarda ve erişkinlerde hafif üst solunum yolu infeksiyonuna neden olurken, bebeklerde ve küçük çocuklarda klinik tablo çok daha şiddetlidir. Özellikle 6 aydan küçük bebeklerde hastaneye yatışı gerektiren şiddetli alt solunum yolu infeksiyonuna neden olmaktadır. Bebeklerin %50-70'i hayatın ilk yılında infekte olmakta, iki yaşına kadar çocukların hemen hemen hepsi RSV ile karşılaşmaktadır. Bebeklerin %3'ü bir yaşından önce hastaneye yatırılmakta, bunların ise %10'u mekanik ventilasyona gereksinim duymaktadır. Mekanik ventilasyon gerektirenlerin ise %5-10'u ölmektedir (13,15). RSV infeksiyonlarında ciddi hastalık ve ölüm oranları; konjenital kalp hastalığı, kronik akciğer hastalığı, immün yetmezlik, gestasyonel yaşın 36 haftadan küçük olması gibi durumlarda artmaktadır (59).

Mevsimsel özellik gösteren RSV infeksiyonunun tanısı genellikle klinik bulgular ve mikrobiyolojik testlerle yapılmaktadır. Hızlı tanı gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesi, uygun tedavinin verilerek hastaların hastanede yatış süresinin ve mortalitesinin azaltılması, nozokomiyal yayılımın önlenmesi açısından önemlidir. Özgül tanıda hücre kültürü altın standart olmakla birlikte kısa sürede ve kesin tanı için antijen arama yöntemlerinden EIA

(Enzyme immunoassay) ve IFA (Immunofluorescent assay) yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemlerin düşük duyarlılığından ve hücre kültürünün uzun sürede sonuç vermesinden dolayı son yıllarda diğer viral infeksiyonların tanısında olduğu gibi solunum sistemi viral infeksiyonlarının tanısında da moleküler yöntemlerden yararlanılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada hastanemiz pediatri yenidoğan ve süt çocuğu servislerine ve yoğun bakım ünitesine alt solunum yolu infeksiyonu nedeniyle yatırılan çocuklardan bir yıl boyunca toplanan nazofaringeal aspirat örneklerinde;

- a) RSV RNA'sının Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemiyle araştırılarak RSV infeksiyonu sıklığının saptanması,
- b) Saptanan RSV'lerin alt tiplendirilmesinin yapılması,
- c) RSV infeksiyonunun mevsimsel dağılımına bakılması,
- d) RSV infeksiyonunda cinsiyet farklılığının araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

PARAMİKSOVİRUSLAR

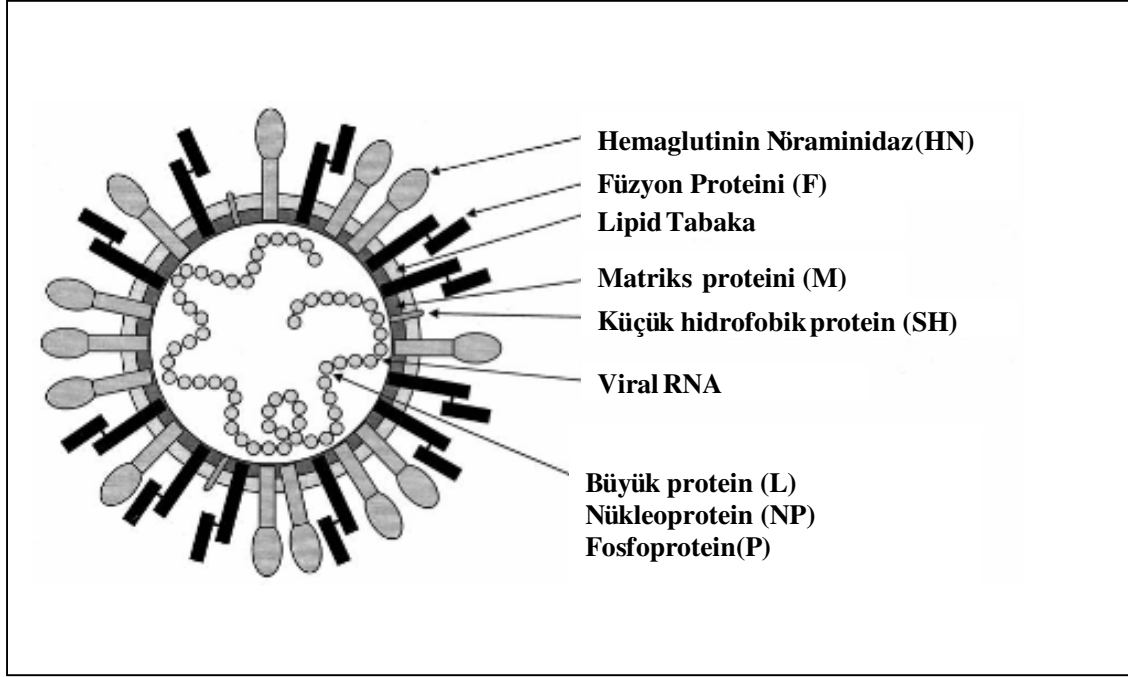
Paramiksovirus ailesi insanlarda üst ve alt solunum yolu infeksiyonlarına neden olan önemli virusları (RSV, Parainfluenza, Metapnömovirus) içermektedir (18). Paramiksovirus infeksiyonları başlıca damlacık yoluyla bulaşır ve infeksiyon üst solunum yollarından başlar. Solunum yolu infeksiyonuna neden olanlarda replikasyon solunum yolu epitelinde olurken kızamık (measles) ve kabakulak (mumps) virusları ise yayılarak tüm vücutta yaygın infeksiyona yol açarlar (72).

SINIFLANDIRMA

Paramiksovirus ailesi 2000 yılında uluslararası sınıflandırma komitesi tarafından yeniden sınıflandırılmıştır (41).

Paramiksovirus ailesi (sadece insan virusları) (41)

Tür		
Takım	Mononegavirales	
Aile	Paramyxoviridae	
Alt aile	Paramyxovirinae	
Cins	Respirovirus	PIV1, PIV3
	Rubulavirus	Mumps virusu, PIV2, PIV4a, PIV4b
	Morbillivirus	Measles virus
Alt aile	Pneumovirinae	
Cins	Pneumovirus	RSV
	Metapneumovirus	Human metapneumovirus



Şekil 1: Paramiksovirusların yapısı (11)

Paramiksoviruslar zarflı, helikal simetrik, negatif sarmallı tek zincirli RNA'ya (5×10^6) sahip viruslardır. Negatif RNA genomu helikal nükleokapsid içinde yer alır. Nükleokapsid viral bağlama protein (HN) içeren bir zarf tarafından çevrelenmiştir (7).

Kapsidin içinde RNA ile birlikte NP, P ve L proteinleri bulunur. L proteini RNA'ya bağımlı RNA polimerazdır. P proteini RNA sentezini artırırken, NP proteini genom yapısının korunmasına yardımcıdır. Lipit zarfın altında ise matriks proteini olan M proteini yer alır. Kapsid yüzeyinde viral tutunma proteinleri (HN, H veya G) ve füzyon (F) glikoproteini bulunan bir zarfla çevrilidir (53). Füzyon proteini virus ile konak hücre arasında füzyon oluşumunu dolayısıyla hücre içine girişini kolaylaştırır. Viral tutunma proteinleri F proteiniyle birlikte çalışarak virusun konak hücre yüzeyindeki reseptörlerine tutunmasını sağlar. Viral tutunma proteinin aktiviteleri genel olarak üç şekilde ayırt edilebilir. Parainfluenza virusunun HN'si, kabakulak virusunun HA ve NA'ı, kızamık virusunun H'ı hemagglütinin aktivitesine sahiptir. Fakat RSV'nin G proteininde bu aktiviteler eksiktir (7). Paramiksoviruslar konak

hücresinin sitoplazmasında replike olurlar. Virionlar hücreye füzyonla penetre olur ve tomurcuklanarak çıkarlar. Viruslar hücreden hücreye füzyon yapabilir ve çok çekirdekli dev hücrelerin oluşumuna neden olurlar (11).

Tablo I: Paramiksovirusların virion proteinleri (82).

	Cins			
	Respirovirus	Rubulavirus	Morbillivirus	Pneumovirus
Bağlanma proteini	HN*	HA, NA*	H*	G
Füzyon proteini	F	F	F	F
Nükleoprotein	NP	NP	N	N
Transkriptaz	L ve P	L ve P	L ve P	L ve P
Matriks proteini	M	M	M	M
Küçük membran proteinleri	SH	SH	-	SH,M2

* Hemaglütinin aktivitesi vardır.

RESPIRATORY SYNCYTIAL VİRUS

TARİHÇE

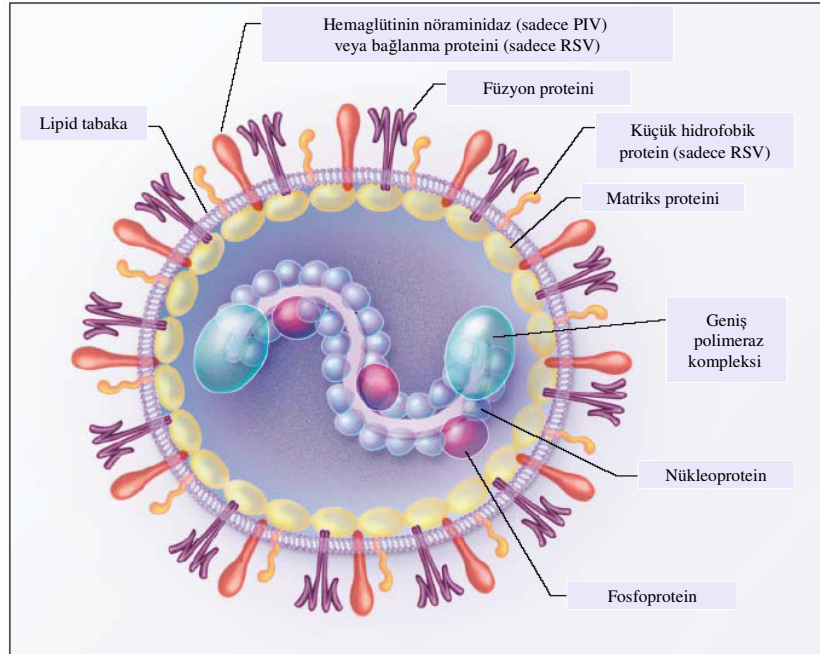
Respiratory syncytial virus ilk kez Morris ve ark. tarafından 1956 yılında soğuk algınlığı geçirmekte olan 14 adet şempanzeden izole edilmiş ve ‘chimpanzee coryza agent’ adı verilmiştir. Daha sonra bu etkenin aynısı olduğu saptanan bir virusun çocuklarda solunum yolu enfeksiyonu yaptığı saptanmıştır (72). Serolojik çalışmalar bebek ve çocuklarda bu enfeksiyonun yaygın olduğunu göstermiştir. RSV hızla çocuklarda şiddetli solunum yolu hastalığının en önemli etkeni olarak tanınmaya başlamıştır (11). İnsanlarda enfeksiyon etkeni

olan bu virus hücre kültüründe üremesinde gösterdiği dev hücre oluşumundan dolayı respiratory syncytial virus adını almıştır (72).

VİRUSUN YAPISI

Respiratory syncytial virus, Mononegavirales takımında Paramiksoviridae ailesinde pneumovirinae alt grubunda sınıflandırılır. Pnömoviruslar bazı yönlerden paramiksovirus ailesinden ayrılır;

- 1) Pnömoviruslarla paramiksoviruslar arasında aminoasit sekansı bakımından uzak akrabalık vardır. F ve L proteinleri ile N proteininin bir domaini ile akrabalıkları vardır
- 2) Pnömoviruslar paramiksoviruslarda bulunmayan bazı proteinleri kodlar; NS1, NS2, M2-1, M2-2.
- 3) Bağlanmayı sağlayan pnömovirusların G proteini paramiksovirusların HN ve N proteinlerinden yapısal olarak farklıdır (11).

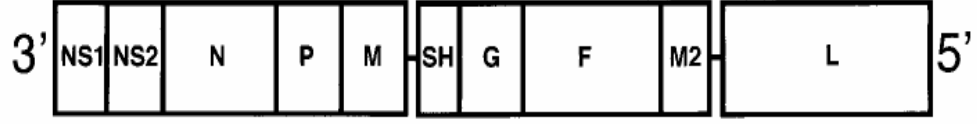


Şekil 2: RSV ve Parainfluenza virusun yapısı (27)

Konak hücreden alınan bir lipid tabaka ve yüzeyinde glikoprotein çıkıntılar bulunan bir lipid zarfa sahiptir. Helikal nükleokapsidin çapı 12-15 nm'dir. Virion çapı 150-300 nm kadar olup sferik ya da filamantöz şekildedir. Geniş filamantöz formların nükleokapsidi eksik olduğundan infeksiyöz değildir (63). Negatif polariteli RSV genomu 11 protein kodlar ve 15200 nükleotidden oluşan tek zincirli RNA'dan meydana gelir (23,63). Diğer paramiksoviruslarla aynı yapısal özellikleri taşımasına rağmen farklı olarak hemagglütinin ve nöronaminidaz içermez. Hemolizin ve hemadsorbsiyon yapma özellikleri de yoktur. Sadece füzyon ve G proteini taşır (55).

Tablo II: RSV'nin kodladığı proteinler ve proteinlerin fonksiyonları (11,15)

	Protein	Fonksiyonu
Yapısal proteinler		
Zarf glikoproteinleri	G: bağlanma	Hücreye bağlanma
	F: füzyon	Hücreye giriş ve sinsitya oluşumu
	SH: küçük hidrofobik	Fonksiyonu bilinmiyor.
Nükleokapsid proteinleri	N: nükleokapsid	Transkripsiyonel aktivite
	P: fosfoprotein	Transkripsiyonel aktivite
	L: büyük	RNA polimeraz
	M2-1	Transkripsiyon elongasyon faktör
Yapısal olmayan proteinler	NS1: yapısal olmayan	Fonksiyonu bilinmiyor.
	NS2: yapısal olmayan	Fonksiyonu bilinmiyor.
	M2-2	Transkripsiyonun düzenlenmesi
	M: matriks	Viral toplanma



Şekil 3: RSV genomu (15)

G proteini; Ağır glikolize edilmiş 288-289 aminoasittenden (aa) ibaret olan tip 2 transmembran glikoproteinidir (23). G proteini virusun hücreye bağlanmasından sorumludur (46). G proteini nötralize edici antikorlar tarafından tanınır, fakat sitotoksik T lenfosit yanıtını önemli bir şekilde stimüle etmez. RSV A ve B grupları arasında antijenik ve nükleotid sekans farklılıkları en fazla G glikoproteini üzerinde bulunmuştur (71). Aynı suşun G proteinleri arasında %20 kadar farklılık varken, A ve B suşlarının G proteini %47'den fazla farklılık gösterebilir. Bu çeşitliliğe rağmen insan RSV suşlarının G proteini 13 aminoasitlik değişmez bir bölgeye sahiptir. Bu bölgenin konak reseptörüne bağlanmak için bir aday olduğu düşünülmektedir (15). G proteini için hücresel bir reseptör saptanamamış, fakat hücre yüzey glikozaminoglikanları (GAG) heparan sülfat ve kondroitin sülfat B'nin infeksiyon için önemli olabileceği gösterilmiştir (23). F proteininden daha az immunojenik olan G proteini aynı grup veya alt grup suşlara karşı koruma sağlamaktadır (82).

F proteini; F proteini ve inaktif formu 574 aa'den oluşur. F proteini ilk olarak öncül Fo proteini olarak yapılır. F proteininin etkinlik kazanabilmesi için öncül proteinin (Fo) hücresel bir proteaz aracılığıyla iki disülfid bağlı polipeptit olan F1 ve F2 haline kesimi gereklidir. F proteini hücre membranlarına füzyonu sağlar. İnfekte ve komşu hücre membranlarının füzyonu sinsitya oluşumuna neden olur. Sinsitya virusun sitopatik etkisinin bir göstergesidir ve virusun hücreden hücreye direkt yayılımı için gereklidir (46,82). F proteinine cevap humoral cevap ve sitotoksik T lenfosit cevabı şeklindedir (71). F proteini aynı zamanda Ras aile proteini olarak isimlendirilen Rho A ile etkileşir. Rho A küçük bir

guanozin trifosfatazdır ve hücrede çeşitli rollere sahiptir. (IL 1Beta, IL-6, IL-8 sekresyonu, hücre motilitesi, hücre morfolojisi, ve en önemli olarak aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi) Rho A ekspresyonu RSV ile infekte Hep-2 hücrelerinde sinsitya oluşumunu kolaylaştırır (23). RhoA'nın plazma membranı içinde olmasına rağmen viral reseptör gibi fonksiyon görmesinin mekanizması açık değildir. F ve Rho A arasındaki birlikteliğin penetrasyonu sağlayabildiği ve Rho A'nın aynı zamanda RSV enfeksiyonunda sinyal fonksiyonunda rol aldığı düşünülmektedir (11) .

SH protein; Üçüncü transmembran proteini olan SH'ın rolü bilinmemekte, viral replikasyon ya da sinsityum oluşumunda gerek duyulmamasına rağmen füzyonu kolaylaştırdığı düşünülmektedir (46).

Dört protein (N, P, L ve M2 ORF 1), nükleokapsid formunda genomik RNA ile birliktedir. Transkripsiyon ve replikasyonda görev alırlar. N proteini orta büyüklüktedir ve nükleokapsidin major yapısal proteindir (23). P proteini transkripsiyonel aktivite için esansiyel fosfoproteindir. Büyüklüğü ve nükleokapsiddeki lokalizasyonu nedeni ile L proteininin viral RNA bağımlı RNA polimeraz olduğu düşünülmektedir (7). M2 ORF-1' in ikinci matriks protein olduğu düşünülmüş fakat son zamanlarda nükleokapsid protein F ve N ile birlikte yer aldığı bulunmuştur. M2 ORF-1 protein viral replikasyonun zorunlu bir komponentidir, tam uzunluktaki mRNA'nın etkin üretimini sağlamaktadır (15).

NS1 ve NS2'nin tam olarak fonksiyonu bilinmemektedir. Anti IF alfa ve beta aktivitesi vardır (7,23).

M2 ORF-2; M2 geninden transkribe edilen proteindir. M2 ORF-2'nin negatif düzenleyici bir faktör olabildiği tespit edilmiştir (15,23).

M proteini; Glikozillenmemiş virion matriks proteinidir. Replikasyon esnasında RSV'nin toplanma aşamasında başlıca rolü oynamaktadır. Nükleokapsid ve zarf arasındaki birlikteliğe aracılık etmektedir (23,41).

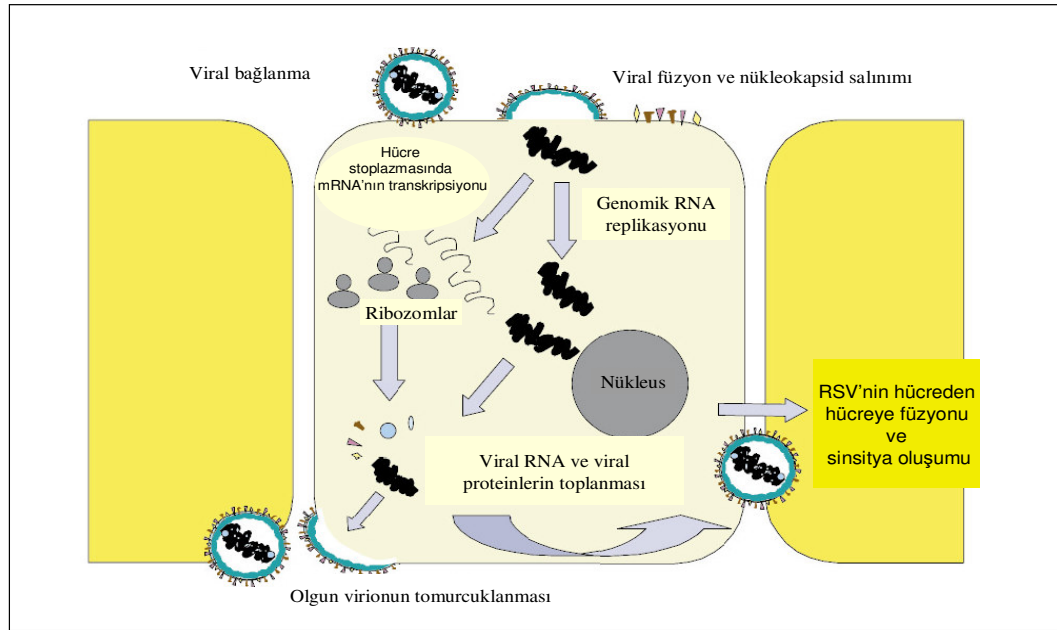
DİRENÇLİLİK

Respiratory syncytial virus ısı ve pH değişikliklerinden çabuk etkilenen bir virusdur. 55°C'de 5 dakika bekletilirse virusun %90'ı infektivitesini kaybetmektedir. 25°C'de iki gün sonra %10 infektivite ve 4°C'de 7 gün sonra %1 infektivitesi bulunmaktadır. RSV yavaş dondurma ve çözmeden, asit ortamdan çok etkilenir ve optimal pH 7.5'dur. Eter, kloroform, sodyum dodesil sülfat, %1'lik Na deoksikolat ve triton X-100 gibi kimyasallar virusu hızla inaktive etmektedir (15,24,72).

REPLİKASYON

İnfeksiyon virusun duyarlı hücrelere G proteini tarafından bağlanmasıyla başlar. G proteini ile hücre arasındaki etkileşimde hücre yüzeyindeki heparin benzeri GAG moleküllerinin rol oynadığı düşünülür. RSV plasma membranından füzyonla hücreye girer. Penetrasyonun meydana gelmesi için F proteini hücresel proteolitik enzimler tarafından parçalanmalıdır. F proteini bölündüğü zaman aktive olur ve konak hücre membranını eritir (63). Penetrasyondan sonra virusun nükleokapsidi hücresel sitoplazma içine salınır. Nükleokapsidin açılmasıyla serbest kalan viral RNA mRNA olarak görev alır, viral proteinlerin translasyonunu sağlar ve virion RNA'sının transkripsiyonu için komplementer RNA'yı sağlar (55). Genetik maddenin replikasyonu iki aşamada gerçekleşir. Önce (-)RNA'dan komplementer (+) RNA kopyalanır. Komplementer RNA kalıp görevini görür, virus nükleik asitleri (RNA) replike olarak (+) RNA'dan (-) RNA'lar oluştururlar. (-) viral RNA'nın mRNA'ya transkripsiyonunda görevli RNA'ya bağımlı RNA polimerazın aktivitesinde P, L, NP proteinlerinin de rolü vardır. mRNA'lar konak hücre ribozomlarına

giderek viral proteinlerin sentezini sağlarlar. Yeni oluşan (-) RNA dizileri viral proteinler ile çevrilerek konak hücrenin sitoplazma membranından zarfını alıp tomurcuklanarak hücreden ayrılırlar (11).



Şekil 4: RSV'nin Replikasyonu (55)

VİRUSLARIN ALT TIPLENDİRİLMESİ

Respiratory syncytial virus'un tek serotipi ve iki antijenik grubu vardır (11).

Virus çok az antijenik heterojenite gösterir. G proteini en değişken proteindir (55). RSV suşları G glikoproteinlerindeki farklılıklara dayanarak alt grup A (Long ve A2 suşları ile karakterize) ve alt grup B (18537 suşu ile karakterize) olmak üzere iki alt tipe ayrılır (7). A ve B alt grupları G, F, N, ve P proteinleri üzerinde antijenik farklılıklara sahiptir. A ve B gruplarının G proteinlerinin aminoasit sekansları arasında sadece %53 homoloji vardır.

Aksine F ve N proteinleri iki grup arasında yüksek derecede genetik ve antijenik homolojiye sahiptir. Son veriler grup A ve B arasında oldukça fazla genetik farklılık olduğunu göstermiştir. G proteini sekansları grup A neslinde %20, grup B neslinde %9 farklıdır (55). Nükleotid ve aminoasit dizi analizi, her alt grubun F glikoproteininin %53 antijenik ilişki gösterdiği ve %89 aminoasit dizi homolojisi bulunduğunu göstermiştir. Oysa A ve B grubunun G glikoproteinleri %5 oranında antijenik ilişki ve % 53 aminoasit dizi homolojisi gösterirler (7).

Virusun epidemiyolojisinde antijenik farklılığın önemi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Epidemilerin şiddetindeki yıllık değişimi ve yaşam boyunca olan reinfeksiyona duyarlılığı kısmen açıklayabildiği düşünülmektedir (43).

Dünyanın bütün bölgelerinde yıllık salgınlar arasında RSV A ve B'nin sıklığı değişkendir. Epidemiler süresince iki alt grup da birlikte bulunabilir (6,71). Bir alt tipe bağlı infeksiyon belirli bir coğrafik bölgede ya da dönemde belirgin olabilir (7).

İnfeksiyonunun klinik şiddeti genellikle epidemiyolojiyle ve konak faktörüyle ilişkilidir, fakat daha az oranda viral faktörlerin (suşlar gibi) etkileri de bulunmuştur (64). Çeşitli çalışmalarda A ve B grupları arasındaki klinik şiddetin farklılığı değerlendirilmiştir. Alt grup A suşlarının sıklıkla daha şiddetli hastalığa neden olduğu düşünülmektedir. Fakat bazı çalışmalarda alt grup B suşlarının daha virulan olduğu görülmüştür (11).

Savon ve ark.'nın Küba'lı bebekler üzerinde yaptıkları çalışmada grup A infeksiyonlarının grup B'den daha şiddetli olduğunu ve daha sık görüldüğünü saptamışlardır. Aynı zamanda hastanede yatış süresinin de yine grup A'da daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (64).

Walsh ve ark. yatan hasta bebekler üzerinde yaptıkları çalışmada RSV grup A infeksiyonlarının B'den daha şiddetli klinik tabloya neden olduklarını tespit etmişlerdir. Grup

A viruslarının grup B'den daha şiddetli hastalığa neden oluşunun mekanizması bilinmemektedir. Genetik replikasyonla ilgili proteinlerin (N, P, L, M2) suşa bağlı farklılıkları viral replikasyonun azalmasına ya da farklı üreme hızına neden olabilir. Deneysel olarak kanıtlanmamasına rağmen Grup B RSV izolatlarının yavaş ürettiği ve doku kültüründe düşük titrede bulunduğu düşünülmektedir (75).

EPİDEMİYOLOJİ

Respiratory syncytial virus tüm dünyada yaygındır. İnfluenza'nın aksine RSV her yıl epidemi yapar (72). Son yıllarda DSÖ (Dünya sağlık örgütü)'nün yürüttüğü çok merkezli çalışmada, şiddetli solunum yolu enfeksiyonu bulgularıyla hastaneye kabul edilen küçük bebeklerin %30'undan RSV etken olarak izole edilmiştir. Epideminin tetikleyicisi açık değildir, fakat mevsim sıcaklığına bağlı olabilir. RSV epidemilerinin şiddeti yıldan yıla değişir. RSV epidemisi olduğu zaman diğer major solunum yolu patojenlerinin yokluğu dikkati çeker. RSV ve influenza A'nın ortaya çıkışı bazen aynı zamana rastlayabilir, fakat bunların epidemik salgınları nadiren üst üste biner (28).

Respiratory syncytial virus enfeksiyonu mevsimsel bir özellik gösterir. Ilıman iklimde ilkbahar ve kış aylarında, tropikal iklimlerde hava sıcaklığının düştüğü yağışlı mevsimlerde meydana gelir (23,46,65). Kuzey yarımkürede en erken salgın Aralık ayında en geç ise Haziran ayında meydana gelir. Fakat en yüksek görülme sıklığı Şubat ve Mart aylarındadır (11).

Respiratory syncytial virus ile enfeksiyon genellikle erken çocuklukta görülür (63). Bebeklerin yaklaşık 2/3'ü yaşamının ilk yılında RSV ile enfekte olmakta, bunların 1/3'ünde alt solunum yolu hastalığı gelişmektedir (15). Enfekte bebeklerin %2'si hastaneye yatırılmakta, (ABD'de her yıl 90000 çocuktan fazla), %0.5-1.5'u ölmektedir (15,28).

Genellikle iki yaşına gelen çocukların %90'ı RSV ile karşılaşmıştır. RSV infeksiyonu en sık 6 aydan küçük çocuklarda görülür (23,65). İnfeksiyonların çoğu semptomatiktir ve sıklıkla alt solunum yolu infeksiyonuna neden olur (63). RSV küçük çocuklarda pnömoni olgularının %5-40'ından, bronşiolit olgularının %50-90'ından sorumludur (9,28,74) Yapılan çalışmalarda erkek bebeklerde 1.3-1.4 kat daha fazla hastaneye yatışın olduğu görülmüştür. Irk ve etnik köken RSV infeksiyonunda ya da şiddetinde önemli değildir (28).

Alt solunum yolu hastalığının primer RSV infeksiyonu insidansı yaştan artmasıyla azalır. Tekrarlayan infeksiyonlar çocuklarda ve yetişkinlerde sıklıkla meydana gelir. Bu da reinfeksiyona karşı koruyuculuğun tam olmadığını gösterir. Tekrarlayan infeksiyon genellikle üst solunum yolu infeksiyonu şeklindedir. İnfeksiyondan sonra immunité kısa sürelidir, reinfeksiyonu önlemez ama hastalığın şiddetini azaltmada önemli olabileceği düşünülmektedir (63).

Gelişmiş ülkelerde yüksek riskli gruplar şiddetli infeksiyona yakalanır, genellikle altta yatan kronik bir hastalık vardır. Düşük sosyoekonomik durum, aile hikayesinde atopi ya da astım öyküsünün olması, kalabalık yaşam (kreş, kardeşler), sigara dumanına maruziyet gibi faktörler infeksiyon sıklığını artırması açısından önemlidir. Gelişmekte olan ülkelerde RSV infeksiyonunun epidemiyolojisi hakkında bilgi azdır. Ancak kalabalık yaşam, malnutrisyon, sigara dumanı gibi faktörlerin şiddetli RSV hastalığının gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. RSV'nin yaş dağılımı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere benzerine rağmen daha büyük çocukların gelişmekte olan ülkelere daha şiddetli etkilenebildiği belirtilmektedir (65).

RİSK FAKTÖRLERİ

1) Prematür doğum; RSV hastalığının şiddetinin prematürlerde yüksek oluşu nedenine yönelik çeşitli faktörler öne sürülmüştür. En önemli iki mekanizma infeksiyona karşı yetersiz

direnç ve tam olmayan hava yolu gelişimidir. Doğumda miadında doğan bebekte IgG antikor düzeyleri normal yetişkindeki gibidir. Çünkü maternal IgG antikorları plasenta yoluyla bebeğe geçer. Bu antikorlar oldukça geç zamanda (3.trimesterde) bebeğe transfer edilir. Bu yüzden prematür bebeklerin nötralizan antikorları düşük düzeydedir. Ayrıca hava yolu gelişimi tam değildir (80). Bu nedenle prematürite önemli bir risk faktörüdür.

2)Kronik akciğer hastalığı (bronkopulmoner displazi, kistik fibrosis)

3)Konjenital kalp hastalığı (pulmoner hipertansiyon)

4)İmmün yetmezlik (kemoterapi, kemik iliği ve solid organ nakli) (59)

BULAŞ YOLU

Respiratory syncytial virus yüksek bulaşıcılığa sahip, solunum salgılarında birkaç gün veya bazen haftalarca bulunan ve temas ile duyarlı bireylere bulaşan bir virustur (82). Virusun bulaşması direkt olarak damlacık infeksiyonu yoluyla ya da kontamine olan ellerin göz veya burun ile teması sonucu olmaktadır (52,59).

Respiratory syncytial virus pediatrik nozokomiyal enfeksiyonların da en önemli nedenlerinden birisidir. RSV epidemisi süresince hastaneye yatırılan bebeklerde ve çocuklarda nozokomiyal infeksiyonun %20-47 oranları arasında olduğu bildirilmektedir (24,26,42). Hastane personeli nozokomiyal bulaşta en önemli faktördür. Oda sıcaklığında RSV hastaların sekresyonlarında, gözeneksiz yüzeylerde neme bağlı olarak 3-30 saat kadar yaşar, gözenekli yüzeyler üzerinde bir saat kadar yaşar. RSV'nin eller üzerindeki infektivitesi kişiden kişiye değişir ve genellikle bir saatten azdır (24,52).

Genellikle virusun replikasyon düzeyi ile hastalığın şiddeti arasında pozitif korelasyon olduğu düşünülmektedir (11,63). Büyük çocuklarda ve erişkinlerde virus sadece 3-4 gün bulunurken, bebeklerde virus 4 haftadan fazla, immün yetmezlikli kişilerde ise aylarca bulunabilir (28,63).

PATOGENEZ

Respiratory syncytial virus'un inkübasyon periyodu 4-5 gündür. Virus replikasyonu nazofarinkste başlar. RSV nedeniyle hastaneye yatırılan bebeklerde virus titresi genellikle her mililitrede $10^{3.5}$ - 10^5 TCID₅₀ (doku kültürünün %50'sini infekte eden doz) düzeylerindedir ve hastanede yattığı süre içinde derecesi azalır. Bazı bebeklerde hastaneye yatıştan itibaren 3 hafta gibi uzun bir süre virus bulunabilir. Yetişkinlerde ise düşük titrede bulunur (11).

Respiratory syncytial virus başlıca solunum yolu epitelinin üst tabakasında replike olur (11). Solunum yolu epiteli virusa karşı ilk savunmada önemlidir, hastalığın yol açtığı inflamasyonun ilk yeridir (23). RSV akciğer epitelindeki hücreler üzerinde direkt sitopatik etkiye sahiptir (56). Virus aynı zamanda hücreden hücreye füzyonla yayılır ve sinsitya olarak bilinen çok nükleuslu dev hücrelerin oluşumuna neden olur (11,28). RSV antijenlerinin solunum epitelinin yüzeyel tabakalarından derine penetre olmadığı gösterilmiştir (15).

Virus aynı zamanda makrofaj ve monositleri infekte etmekte ve onların fonksiyonlarından bazılarını engellemektedir (11).

Virusun üst solunum yolundan alt solunum yoluna yayılım mekanizması tam olarak açık değildir, virusun sekresyonların aspirasyonu ve/veya solunum epiteli boyunca direkt olarak yayıldığı düşünülmektedir (11,15).

Bebeklerde alt solunum yolu belirtileri burun akıntısı başladıktan 1-3 gün sonra görülür. Bronş ve bronşiolle yayılır. Alt solunum yollarında viral titreleri saptamak güçtür. Ancak otopsi çalışmalarında RSV pnömonisinde bronşiolite göre çok daha fazla RSV antijeni tespit edilmiştir (15).

Respiratory syncytial virus pnömotropik bir virus olmasına rağmen tam olarak bu bölgeye sınırlı değildir. Şiddetli RSV enfeksiyonu olan immun yetmezlikli bebek ve yetişkinlerde yapılan çeşitli çalışmalarda virusun böbrek, karaciğer, miyokard gibi diğer

organlara yayıldığı tespit edilmiş, fakat bu yayılım ölümün nedeni olarak düşünülmemiştir. Normal çocuklarda ve bebeklerde infeksiyon süresince viremi tanımlanmamasına rağmen RSV antijenleri bazılarının dolaşımdaki MNH'inde (mononükleer hücre) ve viral genomik RNA veya mRNA arteriyel kandaki hücrelerde saptanmıştır (11).

Henüz cevaplanmamış ve önemli bir soru niye bazı bebeklerde şiddetli alt solunum yolu hastalığı geliştiğidir (82). Direkt virus aracılı sitopatoloji RSV infeksiyonu patogeneğinde önemlidir. RSV infeksiyonu epitelin ve silyalı bronşiol epitel hücresinin yıkımına neden olur. Bronşiollerde ve alveollerde eksudanın toplanmasını kolaylaştırır. Küçük bebeklerde bronşiollerin çapı küçüktür, nekroz ve ödemle kolayca tıkanır (11). Ancak bu durum bu bebeklerin sadece küçük bir kısmında bronşiolit gelişmesini açıklayamamaktadır (82). Araştırmacılar RSV bronşiolitinde maternal antikor düzeyleri yüksek olduğu halde 2-6 aylık bebekler arasında şiddetli infeksiyonun görülmesinde immunopatolojik mekanizmanın rol aldığını düşünmüşlerdir (15). Antijen antikor kompleksinin klasik ya da alternatif kompleman yolunu tetikleyerek ya da granülositleri aktive ederek zedelenmeyi artırdığı bilinmektedir (6).

Virusa özgü antikorların patojenik oluşundan ziyade koruyucu olduğuna dair bazı görüşler vardır;

- a) Yaşamın ilk 5-6 haftası süresince şiddetli RSV hastalığı riski relatif olarak azdır.
- b) Bazı prematür yenidoğan bebeklerde ölçülebilir akut faz nötralizan antikorların yokluğunda bronşiolit gelişir.
- c) Virusun göbek kordon kanındaki düşük antikor titre düzeylerinin şiddetli RSV hastalığıyla birlikteliği vardır.
- d) Virusun nötralizan antikorlarının deneysel hayvanlara ve yüksek riskli bebeklere parenteral uygulaması RSV infeksiyonundan koruma sağlar (11).

PATOLOJİ

Respiratory syncytial virus bronşiolitinde sıklıkla epitelin nekrozu ile küçük hava yollarında submukozal ödem, lenfositler, nötrofiller, eozinofiller, plasma hücreleri ve makrofajların peribronşiyolar infiltratı vardır. Postmortem çalışmalarda peribronşiyolar mononükleer hücre infiltratının yoğunluğu gösterilmiştir. Tipik patolojik bulgular ilk olarak küçük havayollarında meydana gelir. Nekrotik epitelin dökülmesi ve artan mukus sekresyonu mukus plağına neden olur. Mukus plağı ve ödem, aşırı havalanma ya da distal akciğer dokusunun kollapsına neden olur. Histolojik iyileşme genellikle 3-4 günde olur, fakat silyalı epitel hücreleri 2 hafta sonrasına kadar bulunmayabilir. Sıklıkla bronşiyol duvarında muskular hipertrofi ile birlikte goblet hücrelerinin sayısında artış ve mukozal bez hipertrofisi vardır. RSV pnömonisinde MNH'in interstisyel infiltrasyonu vardır. İnfiltrasyon çok daha yaygındır, bronş, alveol, bronşiyollerini içerir (28).

İMMÜN YANIT

DOĞAL DİRENÇ

Solunum yolu epitel hücreleri RSV enfeksiyonu için hem başlıca hedef hem de virusa karşı savunmanın başladığı ilk yerdir. (23). İnflamasyon süresince lökotrienler salınır, eozinofil degranülasyonu olur ve epitelyal hücrelerden sitokinler ve kemokinler salınır. Bu ürünlerin çoğu inflamasyon yerine hücrelerin toplanmasında önemlidir (55). Alveolar makrofajlar da RSV'ye karşı doğal dirençte önemli rol oynarlar, immün yanıtı düzenlerler ve inflamatuvar sitokinleri salarlar (23).

Epitel hücreleri tarafından üretilen kollektinler arasında sürfaktan A RSV'nin temizlenmesinde önemli rol oynar. İn vitro çalışmalarda sürfaktan A'nın virusa bağlandığı ve onu nötralize ettiği gösterilmiştir. Makrofajlar ve MNH'lerin de sürfaktan A gibi RSV'nin opsonizasyonunu ve TNF alfa üretimini artırdığı düşünülmektedir (23).

Nötrofiller RSV bronşiolitinde havayollarında baskın olan hücrelerdir. RSV bronşioliti süresince alınan lavajlarda üst solunum ve alt solunum yollarının sırasıyla %93 ve %76'sının nötrofillerden ibaret olduğu bildirilmiştir (6).

KAZANILMIŞ DİRENÇ

Hücresel yanıt

Hücresel yanıtın RSV'nin temizlenmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (15). Hücresel immünitesi baskılanmış çocuklarda uzamış ve şiddetli RSV enfeksiyonu görülür (28). İmmün sistemi sağlam bebeklerde enfeksiyonu takiben 21 gün içinde virus saçılımı durdurulur (15). Konjenital T hücresi defektlerine sahip çocukların enfeksiyondan aylar sonra bile akciğerlerinden virus saçtukları gösterilmiştir (82). RSV ile enfekte çocuklarda RSV'ye özgü T lenfosit proliferatif yanıtı ortaya çıkar. CD4 ve CD8 T lenfositler viral replikasyonun durdurulmasına yardım ederler. Bununla birlikte sitotoksik T lenfositlerin RSV hastalığının alevlenmesiyle de ilgili olduğu gösterilmiştir. Sitotoksik T lenfositlerin koruyucu ve hastalığı artırıcı etkileri arasında ince bir çizgi vardır (28).

Salgısal yanıt

Salgısal yanıtın RSV hastalığının konak yanıtında rol oynamasına rağmen koruyucu olmadığı açıktır. Salgısal yanıt primer enfeksiyondan çok, sonraki enfeksiyona karşı korumada önemlidir. Bebeklerde yüksek titrelerde transplasental yoldan kazanılan antikolar bulunur. Bu bebeklerde RSV bronşioliti daha az şiddetlidir (23).

Çocukta pnömoni, hırıltı ya da bronşiolit olmadıkça genellikle solunum salgılarında serbest IgE saptanamaz. Yaşamın erken safhasında çocukların çoğunda az miktarda IgE üretimi görülür. RSV'ye özgü IgE yanıtının şiddetli hastalıkla ve hırıltılı solunum ile birlikteliği gösterilmiştir (23,55).

Virusa karşı kazanılmış immünite tam değildir ve kısa ömürlüdür. RSV ile primer infeksiyonda bebeklerin %50'sinin nazal sekresyonlarda 3 güne kadar IgM, IgG, IgA antikorları üretilir. IgM serumda birkaç günden sonra bulunur, 2-3 hafta saptanabilir düzeyde kalır. IgG antikorları 2 hafta içinde bulunur, 4 haftada pik yapar ve 1-2 ay sonra kaybolur (28). Serum IgA antikor yanıtı IgG ve IgM'den birkaç gün sonra meydana gelir. Serbest anti RSV IgA infeksiyondan sonra 2-5 gün içinde görülür ve pik titreleri 8-13 gün arasını kapsar. Nazofaringeal IgA cevabı 6 aydan büyük çocuklarda daha çoktur (55).

Reinfeksiyon serum antikor yanıtını artırır ve alt solunum yolu hastalığına karşı koruyucu etkiye sahiptir (28). Lokal salgısal IgA'nın üst solunum yolunda savunmada başlıca salgısal eleman olduğu düşünülmektedir. IgG nötralizan antikorlarının ise alt solunum yolunda koruyucu olduğu görülmektedir. IgG konsantrasyonu her reinfeksiyonla artmaktadır (65). Bebeklerde ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda RSV'ye özgü yüksek titreli nötralizan antikorlar ile yapılan tedavinin şiddetli RSV hastalığını azaltabildiği ama tam olarak önleyemediği tespit edilmiştir. Yenidoğanlar annelerinden yüksek titrelerde nötralizan antikorlar alırlar, bu da niçin yaşamın ilk 4 haftasında RSV hastalığının yaygın olmadığını açıklamaktadır (28).

KLİNİK

Respiratory syncytial virus çocuklarda üst solunum yolu infeksiyonunun en sık nedenlerindendir. RSV infeksiyonunun klinik şekli yaşa göre çeşitlilik gösterir. Etyolojik olarak 5 klinik sendromla bağlantılıdır; Hafif üst solunum yolu hastalığı, krup, trakeobronşit, bronşiolit, pnömoni (36). Virus aynı zamanda orta kulak iltihabına da neden olur. RSV en önemli orta kulak iltihabı etkenlerinden biridir. RSV hastalıklı her üç çocuktan birinde otitis media gelişir (8,10).

Primer infeksiyon 6 ay ile 2 yaş arasındaki çocuklarda genellikle semptomatiktir ve alt solunum yolu hastalığını içerir. Asemptomatik primer infeksiyon çocuklarda nadirdir. (55). Reinfeksiyonlar genellikle büyük çocuklarda ve yetişkinlerde hafiftir (56). Ancak yaşlılardaki kış epidemilerinde ve immün yetmezlikli transplantasyon hastalarında şiddetli pnömoni gözlenebilir (82). Büyük çocuklarda tekrarlayan infeksiyonlar genellikle daha az şiddetlidir (55). İnfeksiyon genellikle burun akıntısı, öksürük ve ateşle karakterizedir. Bronşiolit ve pnömoni ise hastaneye başvurmayı gerektiren en yaygın klinik tablodur. Şiddetli hastalık tablosuyla hastaneye yatırılan bebeklerde genellikle prematürite, konjenital kalp hastalığı, bronkopulmoner displazi gibi altta yatan bir risk faktörü vardır. Takipnenin varlığı, göğüs duvarında çekilme, duyulabilir hırıltı, beslenme güçlüğü alt solunum yolu infeksiyonunu düşündürür. Tipik olarak öksürük ve burun akıntısı başladıktan birkaç gün sonra gelişir (10).

KOMPLİKASYONLAR

Akciğer dışı belirtiler şiddetli RSV infeksiyonlu mekanik ventilasyona alınmış bebeklerde yaygındır. Yaşamı tehdit eden bu belirtiler apne, solunum yetmezliği, epilepsi, ventriküler taşikardi ve fibrilasyon, kalp bloğu, perikardiyal tamponad olabilir. RSV ile infeksiyonda hiponatremi yaygındır, uygun destek tedavisinin yapılabilmesi için takibi gereklidir (83).

RSV infeksiyonu nedeniyle hastaneye yatırılan bebeklerde yapılan bir çalışmada bebeklerin %60'ında solunum yolu, %41'inde infeksiyöz, %19'unda elektrolit dengesizliği, %9'unda kardiyovasküler sistem ile ilgili komplikasyonlar gelişmiştir (83).

Hastaneye yatırılan çocuklarda yapılan çalışmalarda RSV infeksiyonunu takiben çok düşük bir risk olmasına rağmen bakteriyel pnömoni komplikasyon olarak gelişebilir. Fakat yaşlılarda %30 oranında sekonder bakteriyel infeksiyon olabilir (63).

Ani bebek ölümü sendromu (SIDS) ile RSV infeksiyonları arasında önemli bir birliktelik olduğu gösterilmiştir (8). SIDS'den ölen bebeklerin %25'inin akciğerlerinde RSV gösterilmiş ancak SIDS'de RSV'nin rolü tam olarak anlaşılamamıştır (55).

RSV'nin neden olduğu şiddetli pulmoner infeksiyon sonrası bazı çocuklarda akciğer fonksiyon bozukluğu gelişebilmekte ve astım hastalığına yatkınlık olabilmektedir (82).

Sağlıklı çocuklarda primer RSV infeksiyonunun mortalite oranının %0.005-%0.020 arasında olduğu, hastaneye yatırılan çocuklarda ise mortalite oranının %1-%3 arasında olduğu tahmin edilmektedir (55). Modern yoğun bakım ünitelerinde bu oran % 0.3-1'e kadar indirilmiştir (11). Risk faktörlerini taşıyan çocuklarda ise mortalite oranı yüksektir (55). RSV ile infekte olan immun yetmezlikli çocukların ve yetişkinlerin yaklaşık %50'sinde pnömoni gelişir ve buna bağlı olan mortalite oranı da %20-80 arasında değişir (63). Konjenital kalp hastalıklı ve pulmoner hastalıklı bebeklerde 1970'li yıllarda mortalite oranı %40'lara ulaşırken bu oran günümüzde uygun destek tedavisinin verilmesiyle %3-4'lere indirilmiştir (11).

TANI

Respiratory syncytial virus infeksiyonlarının tanısı klinik görünüm ve mikrobiyolojik testlerle yapılmaktadır. Kesin tanı laboratuvar yöntemlerine bağlıdır (11). RSV'nin tanısında başlıca laboratuvar yöntemi solunum sekresyonlarında virusun saptanmasıdır. Bu testlerin hepsi bebeklerde daha duyarlıdır, çünkü bebekler yetişkinlerden daha uzun süreli ve yüksek konsantrasyonda virus bulundururlar (10). Yetişkinlerde virusun titresi düşüktür ve saptamak güçtür (4).

Virus izolasyonu

Klinik örnek olarak sıklıkla nasal sekresyonlar kullanılmaktadır. İzolasyon için ya da antijen saptama için nazofaringeal aspirat (NPA) ya da yıkama örnekleri sürüntü

örneklerinden daha iyi duyarlılığa sahiptir (4,24). Bu örnekler klinik belirtiler başladıktan sonra 3-4 gün içinde toplanmalıdır (4). NPA alımı invazivdir, ağrılıdır, özel ekipman gerektirir, nasal sürüntü (NS) ise daha az ağrılıdır fakat duyarlılığı düşüktür. Yapılan bir çalışmada NPA'da RSV pozitif bulunan olguların üçte birinde NS ile RSV saptanamamış, buna bağlı olarak NPA örneklerinin virus izolasyonunda daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (40).

Hücre Kültürü

RSV'nin tanısında altın standart nazofaringeal sekresyonlardan yapılan hücre kültüründe virusun izole edilmesidir (77). Kültür bebeklerde yüksek duyarlılıkta ve özgüldür. Uygulamadaki problemlerden dolayı kullanımı sınırlıdır. RSV yapısal olarak değişken bir virus olduğu için, klinik örnekler buz üzerinde taşınmalı ve hızla hücre kültürüne inokule edilmelidir. Örneklerin transportu sırasında aktif virusun %50'sinin kaybolduğu tahmin edilmektedir (10,77). Ayrıca semptomların başlangıcından sonra en fazla 3-4 günde virusa özgül salgısal IgA ile oluşan antijen antikor kompleksi sürüntü örneklerinde standart hücre kültürü yöntemi ile virusun izole edilmesini engellemektedir (12). Hücre kültürü yöntemleri genellikle yavaştır (77). Uygun hücre kültüründe tipik sitopatik etki 3-7 günde gözlenir, fakat bu süre daha fazla uzayabilmektedir (24).

İnsan epitel hücreleri (Hep-2), insan akciğer fibroblast hücreleri (WI-38 ve MRC-5) ya da primer maymun böbrek hücreleri (RMK), RSV'yi saptamak için kullanılan uygun hücre kültürleridir (77).

Shell vial yöntemi

Standart tüp kültürü sonuçlarının elde edilmesi uzun sürdüğü için birçok viroloji laboratuvarında solunum yolu etkenlerinin izolasyonunda 1985 yılından beri shell vial (santrifüjle kültür) yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde içinde özel bir lam içeren düz

tabanlı tüpler kullanılır. Lamalar üzerinde üretilmiş hücre kültürlerine ekilen örnekler düşük hızda santrifüj edilir ve 37°C’de inkübasyona bırakılır. 24-48 saat inkübasyon sonrası lamalar çıkarılarak infekte hücrelerdeki viral antijenler özgül monoklonal antikorlarla immünofloresan ya da immünoperoksidaz yöntemiyle boyanır. Bu şekilde virusların sitopatik etki oluşturmalarını beklemeksizin hücre içinde oluşan viral proteinler saptanabilir (7,11). Standart hücre kültürü ve antijen saptama yöntemleriyle shell vial yönteminin karşılaştırıldığı çalışmalarda bu yöntemin duyarlılığı % 78-94, özgüllüğü %96-98 olarak bulunmuştur (35,45,50,67). Kullanılan hücre kültürü, virusun canlılığı, kullanılan monoklonal antikorlar gibi faktörler yöntemin duyarlılığını etkileyebilir (67).

Hızlı yöntemler sekresyonlarda nükleik asitin ya da viral antijenin saptanmasını içermektedir (11).

Antijen saptama

Bebeklerin solunum sekresyonlarında antijen saptanmasında en çok kullanılan yöntemler IFA veya EIA’dır. Çeşitli ticari kitleri mevcuttur (10). Nazal örneklerde antijenin saptanması yaşlılarda ve immun yetmezlikli kişilerde duyarlılığı düşük bir yöntemdir (27).

IFA’nın direkt (DFA) ve indirekt (indirekt IFA) olmak üzere iki farklı uygulama şekli vardır. DFA yönteminde epitel hücreleri floresan işaretli RSV’ye özgü monoklonal antikorlarla muamele edilir ve mikroskopta incelenir. EIA’de virusa özgü enzimle işaretli antikorlarla yakalanan antijen saptanır (11).

IFA’nın duyarlılığı çeşitli kaynaklara göre %57-93 arasında değişmektedir (16,21). EIA yönteminin duyarlılığı ise %40-75 arasındadır (1,37). Her iki yöntemin avantaj ve dezavantajları vardır. DFA testinin değerlendirilebilmesi için deneyimli personel ve incelenen klinik örnekte x400’lük büyütmede en az üç epitel hücresinin bulunması gerekmektedir. Bu yöntemde hücre kültüründeki canlı virus gerekliliği olmadığı için, test örnek taşınması

sırasında oluşabilecek ortamın ısı farklılıklarından etkilenmez. Hücre kültürüne göre daha hızlı sonuç alınır (12).

EIA testinde, DFA testinde olduğu gibi epitel hücresinin yeterli sayıda olup olmadığı gözlenmez, çünkü epitel hücresinin sağlam olması gerekmez, hücre dışındaki antijen tanımlanabilir. Bu nedenle test, örneğin taşınması sırasında oluşabilecek olumsuz koşullardan, dondurma ve çözme gibi işlemlerden etkilenmez. Çok sayıda örnek aynı anda çalışılabilir. Sadece tek bir etiyolojik ajan saptanabilir (12).

Moleküler yöntemler

Moleküler yöntemlerin solunum yolu viruslarının saptanmasında kullanımı diğer viruslara göre geride kalmıştır. Fakat hücre kültürünün altın standart olarak kabul edilmesine karşılık uzun zaman alması ve antijen saptama yöntemlerinin duyarlılığının düşük olması gibi olumsuzluklar nedeniyle moleküler yöntemler son yıllarda önem kazanmıştır (12,33).

Moleküler yöntemlerin hücre kültürü ve antijen saptama yöntemleriyle karşılaştırıldığı çeşitli çalışmalarda moleküler yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin klasik yöntemlerden daha yüksek olduğu gösterilmiştir (21,31,32,60).

Solunum yolu viruslarının moleküler yöntemlerle saptanmasında nükleik asit çoğaltma yöntemleri kullanılmaktadır. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri her türlü hasta örneğinin tanı amacıyla kullanılabilmesi ve örnek içindeki çok düşük miktardaki mikroorganizmayı saptayabilme avantajlarına sahiptir. Nükleik asit çoğaltma yöntemlerinden en çok kullanılanı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) dur. PZR, nükleik asitlerin in vitro olarak replikasyonunun gerçekleştirildiği, bu amaçla kısa oligonükleotid primerler ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz enziminin kullanıldığı, hedef DNA'nın belirli uzunluktaki bir bölgesinin çoğaltıldığı test tüp sistemidir. Bu yöntemle bir DNA parçası kısa sürede milyon defa kopyalanabilir. Eğer örnekte rRNA ya da mRNA araştırılacaksa ters transkriptaz (TT) enziminin kullanılarak

RNA'nın DNA'ya çevrildikten sonra DNA'daki hedef bölgenin çoğaltıldığı TT- PZR yöntemi kullanılır (11,17).

RSV'nin tanısında sıklıkla kullanılan PZR teknikleri;

- a) Nested TT-PZR,
- b) Multiplex TT-PZR ,
- c) Gerçek zamanlı TT-PZR'dir.

Nested TT-PZR iki aşamalı çoğaltma yöntemidir. Bu yöntemde iki tane dış primer kullanılarak hedef molekül üzerinde uzun olan bir bölge çoğaltılmaktadır. Daha sonra bu tüpten alınan örnekteki DNA'nın daha kısa bir bölümü iç primerlerle çoğaltılmaktadır. Bu yöntemle örnekte tek bir hedef DNA molekülü bulunsa bile iki aşamalı çoğaltıldığı için çok sayıda DNA elde edilmekte ve testin duyarlılığı artmaktadır. Fakat bu yöntem iki basamaklı olduğu için zaman alıcıdır ve kontaminasyon riski vardır (33,54).

Multiplex PZR yönteminde klinik örnekte bulunabilecek her mikroorganizma için özgül olan primerler kullanılarak birden fazla viral etken tek bir tüp içinde aynı anda saptanabilmektedir (17). Multiplex reaksiyonda kullanılan primerlerin benzer bağlanma ısılarına sahip olmaları ve dimerizasyondan kaçınmak için birbirlerini tamamlayıcı özellikte olmamaları önemlidir. Bu yöntemde tüpte paralel olarak gerçekleştirilen tüm reaksiyonlar substratlar için yarışmaya girer. Bu, özellikle düşük kopya sayılı kalıpların çoğalmasını engelleyebilir, bu da yöntemin duyarlılığını azaltmaktadır (29).

Gerçek zamanlı PZR yöntemi ise DNA'nın amplifikasyonu ile eş zamanlı artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesi esasına dayanır. Günümüzde ticari olarak geliştirilmiş gerçek zamanlı PZR sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemlerde PZR ürünü oluşumunu gözlemlemek için çeşitli floresan yöntemleri kullanılmaktadır (TaqMan probu, hibridizasyon probu, moleküler yonga, Sybr Green 1 v.b...) (34).

Gerçek zamanlı TT-PZR yönteminin hücre kültürü ve diğer moleküler yöntemlere göre üstünlükleri vardır. Klasik PZR testlerinde genellikle üç bazen dört aşamada gerçekleştirilen testler gerçek zamanlı PZR’de iki aşamada yapılmaktadır. Bu nedenle 1 gün içerisinde sonuç vermektedir. Fakat diğer PZR yöntemlerinde bu süre en erken iki bazen üç güne uzayabilmektedir (34). Klasik PZR’ın aksine bu yöntemle floresanla işaretli PZR ürünleri oluşur, siklus süresince ölçülür ve kaydedilir. Bu, zaman kaybettiren PZR sonrası işlemleri (jel elektroforezi, blotting ve hibridizasyon v.s) elimine eder. Bu da yöntemin hızını artırmakta ve çoğaltma işlemi kapalı tüp sistemi içerisinde gerçekleştiğinden kontaminasyon olasılığını azaltmaktadır (12). Ayrıca reaksiyon tüpü içinde iki ya da daha fazla floresan boya işaretli prob kullanılması daha özgül bölgelerin tanımlanmasını sağlamaktadır (34). Aynı zamanda gerçek zamanlı PZR yönteminde bulunan otomatik veri analizi kullanıcının subjektifliği ortadan kaldırmaktadır (32).

Serolojik Yöntemler

Serolojik çalışmalar daha çok epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır. Teşhis amacıyla kullanılmamaktadır. Yeterli düzeyde antikor yanıtı normal olarak meydana gelmemektedir. (82). Bebeklerde alternatif testlerin duyarlılıklarından dolayı kullanımı yaygın değildir (10).

TEDAVİ

RSV enfeksiyonu için tam olarak özgül bir tedavi yoktur (79). Şiddetli RSV hastalığının tedavisi destekleyicidir. Sekresyonların mekanik olarak çıkarılması, bebeğe uygun pozisyon verilmesi, oksijen desteği, çok şiddetli durumlarda mekanik ventilasyon uygulanabilir. Bronkodilatörler büyük bebeklerde hırıltı varsa kullanılabilir. Kortikosteroid kullanımı etkinliğini gösteren yeterli veri olmamasına rağmen antinflamatuar olarak kullanılabilir (11).

Tedavide sadece hastanede yatan bebeklerde geniş spektrumlu bir antiviral ve sentetik bir guanozin analogu olan aerolize ribavirin kullanılabilir (27). Ribavirin çeşitli mekanizmalarla viral replikasyonu önlemekte, hastalığın şiddetini ve süresini düşürmekte ve akciğerlerdeki virus titresinde azalmaya neden olmaktadır (18,82). Bununla birlikte klinikte kullanımı sınırlıdır. Çünkü pahalıdır ve klinik sonuç üzerine etkisi tartışmalıdır (27).

KORUNMA

Respiratory syncytial virus tüm dünyada aşı gelişimi için en önemli patojenlerden birisi olarak sayılmaktadır (11).

Uygun RSV aşısı çeşitli problemlerden dolayı henüz geliştirilememiştir (15). Yıllar önce formalinle inaktive edilmiş deneysel bir RSV aşısı çocuklarda test edilmiştir. Bağışıklanan çocuklar daha sonraki epidemi sırasında RSV ile karşılaştıklarında bağışıklanmayanlara göre daha şiddetli bir alt solunum yolu hastalığına maruz kalmışlardır. Bu hastalığın mekanizması tam olarak açıklanamamıştır, bu nedenle bütün inaktive aşılardan aynı etkiyi yapabileceği düşünülmüştür (79,82)

İki büyük grup içinde yer alan birçok antijenik suşa karşı koruyucu olabilecek bir aşının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Alt ünite, polipeptid ve canlı atenüe aşılardan geliştirilmiştir (27).

Alt ünite aşılardan 1993-1998 yılları arasında geliştirilmiştir. Alt ünite aşılardan başlıca hedefi G ve F proteinleridir. Klinik çalışmalarda alt ünite aşılardan pürifiye füzyon proteini (PFP) aşılardan denenmiştir (PFP-1, PFP-2, PFP-3) Emniyetli ve genellikle immunojenik olduğu gösterilmiştir. Polipeptid aşısı olan BBG2Na'nın ise farede immunojenik olduğu görülmüş fakat insanlarda çalışma yapılmamıştır. İnaktif aşılardan sonra 1997-2000 yılları arasında canlı atenüe aşılardan ilgili çalışmalar yapılmıştır. Canlı atenüe aşılardan ısıya duyarlı ya da soğuk

pasaj mutantlarından oluşmaktadır. İnsanlarda yapılan çalışmalarda yetişkinlerde etkili olduğu ancak çocuklarda virulan ya da zayıf etkili olabileceği, stabil olmadığı gösterilmiştir (27).

Aşı gelişimine yönelik çalışmalara devam edilmektedir (15,24). Ancak güvenli bir RSV aşısının hedef kitlesi bebekler ve küçük çocuklar olduğu ve bu kadar erken bir yaşta ve maternal antikorların varlığında yeterli immün yanıtı elde etmenin zor olduğu bildirilmektedir (82).

Yüksek riskli hastalara nötralizan antikorları içeren pasif immünoprofilaksi uygulanması şiddetli RSV hastalığını önleyebilir (79). Erken doğmuş veya immün yetmezlikli bebeklerde koruma için RSV'nin füzyon proteinine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorla (Palivizumab) pasif bağışıklama yapılabilir. Bu bebekler ve kronik akciğer hastalığı bulunan çocukları korumak için kullanılacak hiperimmünglobulinler (Respigam) de vardır (79).

Çalışan personel tarafından gerçekleştirilen nozokomiyal bulaşın en aza indirilmesi için ellerin yıkanması, önlük giyilmesi, eldiven kullanılması hatta maske kullanımı gibi konularda personel bilgilendirilmelidir (82).

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇ

Laboratuvar araçları

Otoklav (Hirayama, Japonya)

Derin dondurucu, -86°C (Sanyo, Japonya)

Derin dondurucu, -20°C (Bosch, Almanya)

Buzdolabı (Philco, Türkiye)

Güvenlik kabini (Metisafe, Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

10, 100, 1000 µl'lik mikropipetler (Gilson, Fransa)

Distile su cihazı (Seralpur PRO 90C)

Manyetik karıştırıcı (Jenway 1000, hotplate& Stirrer, İngiltere)

Mikropipet uçları (CLP; ABD)

Mikrosantrifüj (Heraeus, Almanya)

0.2-0.5-1.5 µl'lik ependorf tüpler (Greiner Bio-One, Almanya)

Kuru ısıtıcı blok (Thermolyne, ABD)

Hassas terazi (Shimadzu, Japonya)

pH metre (Fisher Scientific, ABD)

Vorteks cihazı (VELP, Scientifica, İtalya)

Gene Amp 5700 Sequence detection system (Applied biosystems, ABD)

RNA eldesinde kullanılan kit ve kimyasallar

High Pure Viral Nucleic Acid Isolation kit (Roche, Almanya)

Robo-gene Real time PCR kiti (Roboscreen-The Bio Quantification Company, Almanya)

Sodyum klorür (NaCl) (AppliChem, Almanya)

Potasyum klorür (Merck, Almanya)

Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (Merck, Almanya)

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck, Almanya)

%100 etanol (Kimetsan, Türkiye)

Glasiel asetik asit (Sigma, Almanya)

Sodyum hidroksit, NaOH (Merck, Almanya)

YÖNTEM

Çalışma grubu: Ekim 2005-Mayıs 2006 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları bölümü Yenidoğan ve Süt Çocuğu servisleri ile Yoğun Bakım Ünitesine alt solunum yolu infeksiyonu tanısıyla yatırılan 0-2 yaş grubundaki 41'i erkek (%59.4), 28'i kız (%40.6) olan 69 çocuk çalışma grubuna alındı.

Örneklerin toplanması: Çalışma grubundan nazofaringeal aspirat (NPA) örnekleri hızla transfer edilmek koşuluyla toplandı. Gelen her örneğe 1ml PBS (phosphate buffered saline) eklenerek vortekslendi ve örnekler çalışma zamanına kadar -86°C de saklandı. Örnekler semptomlar başladıktan sonra 1-20 gün ortalama 5.5 gün sonra alındı.

Kullanılan solüsyonların hazırlanması

PBS:

8 gr NaCl

0.2 gr KCl

1.15 gr Na_2HPO_4

0.2 gr KH_2PO_4

Bir litre distile su içinde eritildikten sonra pH metrede pH 7.4 olacak şekilde ayarlandı ve otoklavda steril hale getirildi. Hastalardan örnek alımında kullanılmak üzere + 4°C’de saklandı.

RNA saflaştırılması

Hazırlık:

RNA saflaştırılması için High Pure Viral Nucleic Acid Isolation kit protokolü uygulandı. Bu protokole göre kitin içinde bulunan inhibitör uzaklaştırıcı tampon’a 20 ml, yıkama tamponuna ise 40ml %99,5’luk etanol eklendi.

Viral nükleik asit izolasyon yöntemi:

1) 1.5 ml’lik ependorf tüpe 200µl bağlayıcı tampon (6M guanidine HCl, 10 mM urea, 10 mM tris - HCl, %20 triton-x 100, pH 4.4), 50µl proteinaz K, 4µl poly A ve 200µl hasta örneği eklendi. Vorteks yardımıyla karıştırılarak spin santrifüj yapıldı.

2) Kuru ısıtıcı blokta 72°C de 10 dk inkübe edildi.

3) Spin santrifüj sonrasında örneklerin üzerine 100 µl bağlayıcı tampon eklendi.

4) Vorteks ve spin santrifüj sonrası bütün karışım filtreli tüplere aktarıldı.

5)8000rpm’de 1dk santrifüj sonrası alttaki toplama tüpleri atılarak filtreler yeni tüplere yerleştirildi. 500µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon (5M guanidine HCl, 20mM Tris-HCl , pH 6.6) eklendi.

6)8000rpm de 1 dk santrifüj sonrası filtreler yeni tüplere aktarıldı ve 450µl yıkama tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris- HCl pH 7.5) eklendi.

7) 8000 rpm’de 1dk santrifüjün ardından yıkama işlemi tekrar edildi. 13000 rpm’de 10 saniye tutularak kalan alkolün uzaklaştırılması sağlandı.

8) Ependorf tüplere aktarılan filtrelere 50µl çözücü tampon (H₂O Sterile, DNA’sse RNA’sse free) eklenerek RNA’ lar elde edildi.

DNA'nın çoğaltılması:

RNA'ların DNA'ya çevrilerek çoğaltılması için Robo-gene Real time PCR kiti kullanıldı.

Kitin içerisinde;

- 1)RSV reagent mix
- 2)RSV A reverse primer
- 3)RSV A forward primer
- 4)RSV A Taq Man prob (5'FAM/3'TAMRA)
- 5)RSV B reverse primer
- 6)RSV B forward primer
- 7) RSV B Taq Man prob (5'JOE/3'TAMRA)

FAM:6-karboksifloresein

TAMRA: 6-karboksi-tetrametil-rodamin

JOE: 2', 7'-dimetoksi-4',5'-dikloro-6-karboksifloresein

RSV A ve RSV B'yi tespit edebilmek için 2 ayrı reaksiyon karışımı hazırlandı.

a)18.5 µl RSV reagent mix, 0.5 µl RSV A reverse primer, 0.5 µl RSV A forward primer, 0.5 µl RSV A Taq man prob kullanılarak RSV A için reaksiyon karışımı hazırlandı.

b) 18.5 µl RSV reagent mix, 0.5 µl RSV B reverse primer, 0.5 µl RSV B forward primer, 0.5 µl RSV B Taq man prob kullanılarak RSV B için reaksiyon karışımı hazırlandı.

c) Her örnek için iki ayrı reaksiyon karışımı tüplere 20'şer µl dağıtıldı.

d) Üzerlerine 5'er µl örnek eklendi, kapakları kapatıldı ve cihaza yerleştirildi.

e)Hedef DNA'nın amplifikasyon ve PZR ürünlerinin görüntülenmesi için Gene Amp 5700 Sequence Detection System cihazı kullanıldı.

f) RSV A ve RSV B için testin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek ve sonuçları değerlendirmek amacıyla birer adet pozitif kontrol, kontaminasyon olasılığına karşılık birer adet negatif kontrol kullanıldı.

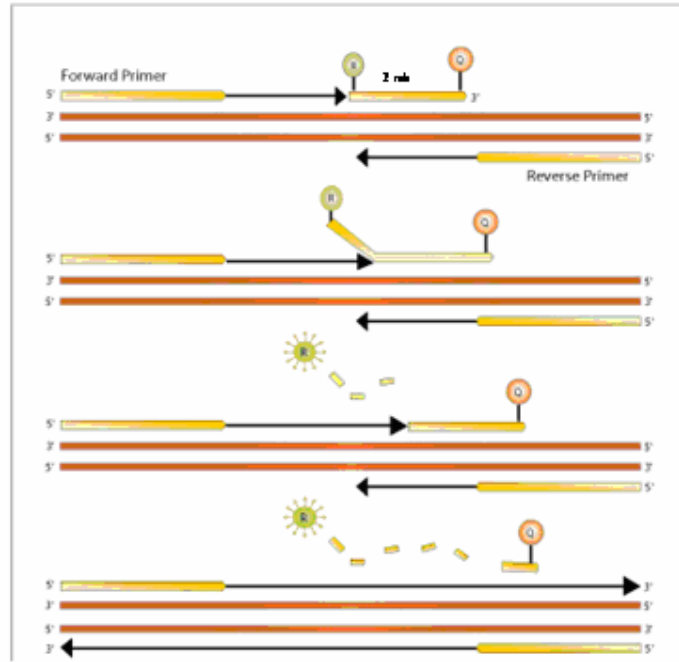
TABLO III : PZR'DE KULLANILAN ISI DÖNGÜSÜ PROGRAMI

Sıcaklık (°C)	42	95	60
Süre (dk:s)	60:00	10:00	00:15 01:00
Döngü sayısı	-	-	45

Verilerin değerlendirilmesi;

Robo-gene Real time PCR kiti Taq Man prensibi ile çalışmaktadır. TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probu 5' ucunda işaretletici florokrom (FAM/JOE), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (TAMRA) bulunmaktadır. Prob tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır.

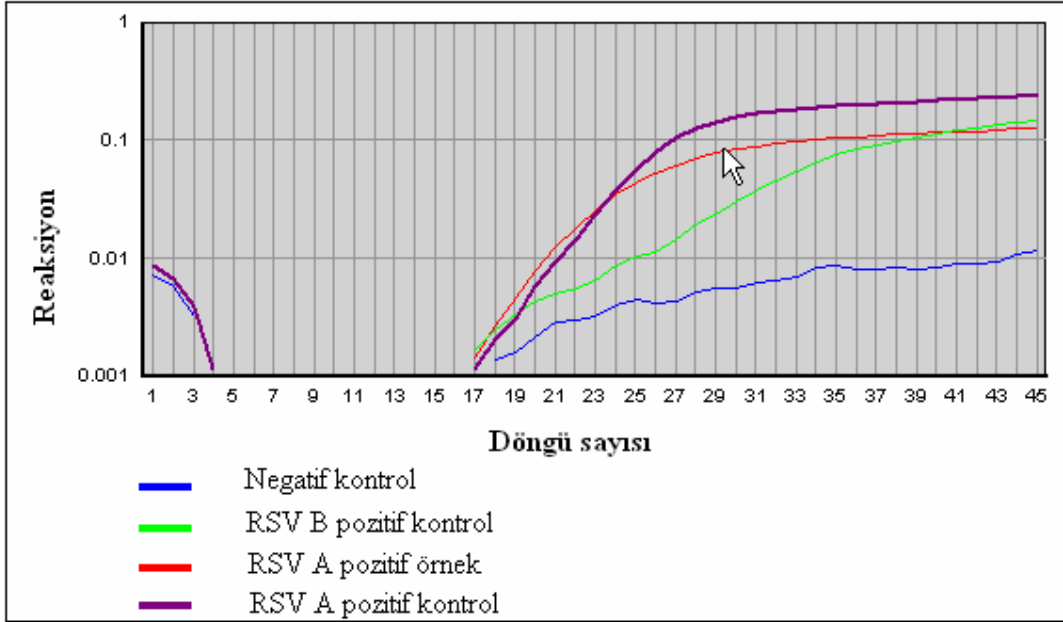
Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'-3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece işaretletici florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her döngüde PZR ürün miktarı arttıkça, floresan miktarı da artmakta ve oluşan bu sinyal ölçülmektedir. Her siklusa üretilen ampikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (17).



R (reporter): işaretleme florokrom Q (Quencher): Baskılayıcı florokrom

Şekil 5: Taq Man TT-PZR yöntemi (www.servicexs.com isimli internet sitesinden alınmıştır)

Çalışmanın sonunda RSV A ve RSV B'nin pozitif kontroller için belirlenen floresan ışık miktarı esas alınarak örnekler pozitif ya da negatif olarak değerlendirildi.



ŞEKİL 6: RSV pozitifliğinin GeneAmp 5700 SDS cihazındaki görünümü

İstatistiksel analiz;

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Windows için SPSS 11,5 programı kullanıldı. Oranların karşılaştırmalı istatistiksel analizinde Pearson ki-kare ve Fisher'in exact testleri kullanıldı. $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 69 hastadan elde edilen nazofaringeal aspirat örneklerinde RSV pozitifliği % 56.5 iken, % 43.5'i RSV negatif olarak saptanmıştır. RSV pozitifliklerinin % 84.5'inin RSV A, % 15.5'inin ise RSV B'ye ait olduğu olduğu tespit edilmiştir.

1-Yaş ve cinsiyet dağılımı:

Yaş gruplarına göre cinsiyet dağılımı Tablo IV'de gösterilmiştir.

Tablo IV: Yaş gruplarına göre cinsiyet dağılımı

n (%)	Toplam	<1 ay	1-3ay	3-6ay	6 ay-2 yıl
ERKEK	41(100)	6(14.6)	12(29.3)	12(29.3)	11(26.8)
KADIN	28(100)	5(17.9)	13(46.4)	7(25)	3(10.7)
Toplam	69(100)	11(16)	25(36.2)	19(27.5)	14(20.3)

Çalışmaya dahil edilen hastaların %59.4'ü erkek çocuklar (41 hasta) ve % 40.6'sı kız çocuklar (28 hasta) olup, erkeklerin % 58.5'inde (24/41 hasta) ve kızların ise % 53.6'sında (15/28 hasta) RSV (A veya B) pozitif olarak tespit edilmiştir. Her iki cinsiyette RSV sıklıkları oldukça yakın olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p= 0.68)

2- Klinik tanılara göre RSV dağılımı:

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik tanıları sıklık sırasına göre incelendiklerinde pnömoni % 59.4 (41 hasta), bronşiolit % 31.9 (22 hasta), respiratuvar distress sendromu (RDS), %4.3 (3 hasta) ve astım % 4.3 (3 hasta) oranında görülmektedir. Tanılara göre RSV dağılımları ise Tablo V'de verilmiştir.

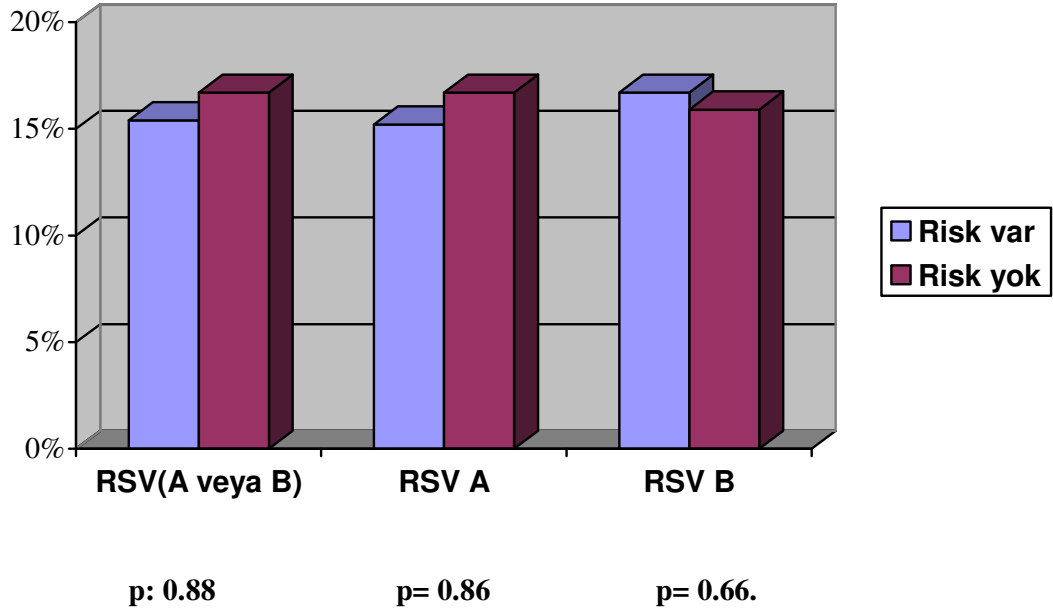
Tablo V: Tanılara göre RSV dağılımları

n (%)	Pnömoni	Bronşiolit	RDS	Astım
RSV A	20 (48.8)	13 (59.1)	0	0
RSV B	5 (12.2)	1 (4.5)	0	0
Negatif	16 (39)	8 (36.4)	3	3
TOPLAM	41(100)	22 (100)	3 (100)	3 (100)

Tablo V’de görüldüğü üzere RSV sadece pnömoni ve bronşiolit tanılı hastalarda tespit edilmiş olup RDS ve astımlı hastaların hiç birinde RSV pozitifliği saptanmamıştır.

3-Risk Faktörleri:

Çalışmaya dahil edilen hastalar risk faktörleri açısından incelendiklerinde prematür doğum hastaların % 3’ünde (2 hasta) ve konjenital kalp hastalıkları hastaların % 13’ünde (9 hasta) bulunurken hastaların % 84’ünde herhangi bir risk faktörü bulunmamıştır. RSV (A veya B) pozitif ve negatif hastalar 2 gruba ayrılarak incelendiğinde RSV pozitif hastaların % 15.4’ünde (6/39 hasta), RSV negatif hastaların ise % 16.7’sinde (5/30 hasta) risk faktörü bulunmuştur. Hastalar RSV A açısından incelendiklerinde, RSV A pozitif hastaların % 15.2’sinde (5/33 hasta) , RSV A negatif hastaların ise % 16.7 sinde (6/36 hasta) risk faktörü gösterilmiştir. Aynı şekilde, hastalar RSV B açısından incelendiklerinde, RSV B pozitif hastaların % 16.7’sinde (1/6), RSV B negatif hastaların ise % 15.9’unda (10/63 hasta) risk faktörü gösterilmiştir. RSV (A veya B), RSV A ve RSV B pozitif ve negatif hastalarda risk faktörleri sıklıkları açısından gözlenen bu farklar istatistiksel açıdan anlamlı olarak saptanmamıştır(p değerleri sırası ile 0.88, 0.86 ve 0.66) (Grafik 1).



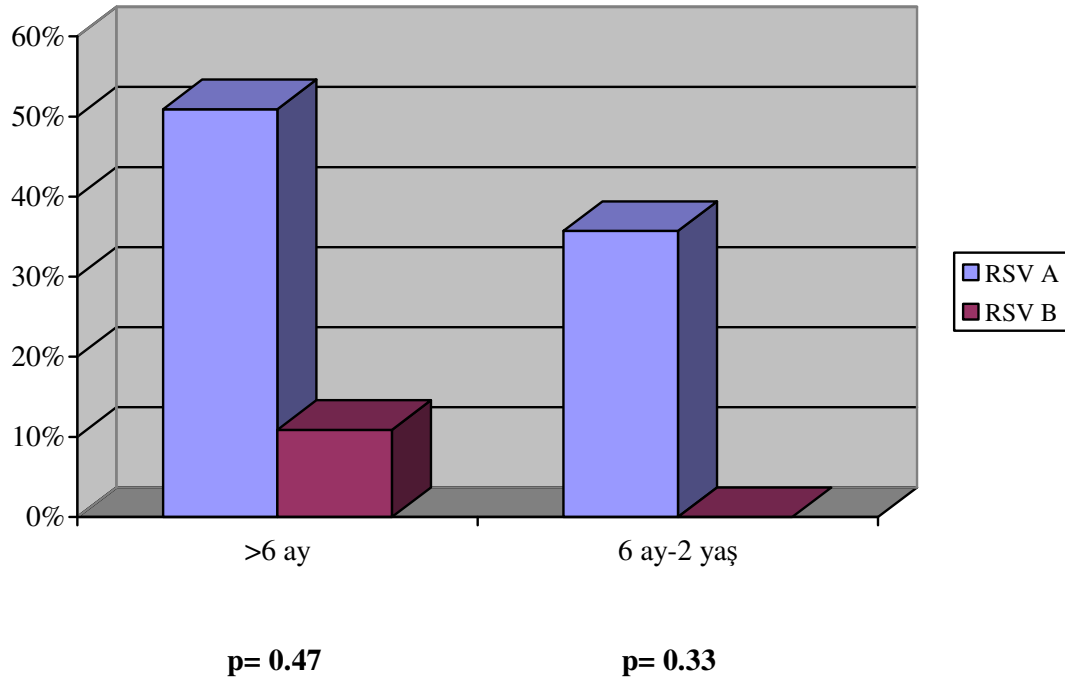
Grafik 1: Risk faktörlerinin görülme sıklıkları

4 - RSV A ve RSV B'nin yaş gruplarına göre dağılımları: Çalışmaya dahil edilen 69 hastanın 30 tanesinde (% 43.5) RSV A ve B negatif, 33 tanesinde (% 47.8) RSV A pozitif ve 6 tanesinde ise (% 8.7) RSV B pozitif olarak saptanmıştır. RSV A ve RSV B'nin yaş gruplarına göre dağılımları Tablo VI'da gösterilmiştir.

Tablo VI: RSV A ve RSV B'nin yaş gruplarına göre dağılımları

n(%)	Toplam	<1 ay	1-3ay	3-6ay	6 ay-2 yıl
RSV A	33 (100)	8(24.2)	11(33.3)	9(27.3)	5(15.2)
RSV B	6(100)	1(16.7)	3(50)	2(33.3)	0(0)
Toplam	39(100)	9(231)	14(35.9)	11(28.2)	5(12.8)

Yaş grupları ilk 6 ay ile 6 ay ve sonrası olarak 2 grupta incelendiğinde (Grafik 2); 6 aylıktan küçük çocuklarda RSV A görülme sıklığı %50.9 (28/55 hasta) iken, 6 aylık ve üzeri çocuklarda RSV A görülme sıklığı % 35.7 (5/14 hasta) olarak saptanmıştır. RSV B için 6 aylıktan küçük çocuklarda görülme sıklığı % 10.9 (6/55 hasta) iken 6 aylık ve üzeri çocuklarda RSV B pozitifliğine rastlanmamıştır (0/55 hasta). Hem RSV A hem de RSV B pozitiflikleri ilk 6 ay içerisinde daha sık olmakla birlikte aradaki gözlenen bu farklar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. P değerleri ilk 6 ay ve sonrası için sırası ile 0.47 ve 0.33 olarak bulunmuştur (Grafik 2). Ayrıca 6 ay öncesinde ve sonrası RSV pozitifliği açısından incelendiğinde, 6 aydan küçük çocuklardaki RSV pozitifliği % 61.8 (34/55 hasta), 6 aydan büyük çocuklarda ise % 35,7 (5/14 hasta) olarak saptanmış olup aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p= 0.130$).



Grafik 2: RSV A ve B nin ilk 6 ay ve sonrasında görülme sıklıkları

5-Mevsimsel Özellikler:

Elde edilen örneklerin mevsimsel olarak dağılımları incelendiğinde örneklerin kış, ilkbahar ve sonbaharda elde edildikleri izlenmektedir. Yaz mevsiminde çalışmaya uygun hasta olmadığından, bu mevsimde örnek elde edilememiştir. Mevsimlere göre RSV A ve B'nin görülme sıklıkları Tablo VII'de verilmiştir.

Tablo VII: Mevsimlere göre RSV A ve B'nin görülme sıklıkları

Pozitif hasta/toplam hasta (görülme sıklığı %)	KIŞ	İLKBAHAR	SONBAHAR
RSV A	10/22 (45.5)	20/43 (46.5)	3/4 (75)
RSV B	0/22	6/43 (14)	0/4

Tablo VII 'de görüldüğü üzere RSV A her üç mevsimde izlenebilmektedir. Ancak RSV B sadece ilkbahar mevsiminde saptanabilmiştir.

TARTIŞMA

Solunum yolu infeksiyonları insanlarda en sık görülen hastalık tablosudur ve viruslar da bu infeksiyonların en önemli etkenleridir. Solunum yolu infeksiyonuna neden olan viral etkenler arasında influenza A ve B, rhinovirus, adenovirus, RSV, parainfluenza 1,2,3 virusları yaygındır ve solunum yolunun çeşitli yerlerini infekte ederek farklı klinik tablolara neden olmaktadır (31). En sık üst solunum yolu infeksiyonları görülmekte, ancak sıklıkla bebeklerde, çocuklarda, yaşlılarda, immun yetmezlik gibi risk faktörleri olan hastalarda şiddetli hastalık ve çeşitli klinik komplikasyonlar gelişmektedir (59).

Viral solunum yolu infeksiyonları bebeklerde ve küçük çocuklarda önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Bu yaş grubunda birçok virusun solunum yolu infeksiyonuna yol açmasına karşılık RSV en önemli viral etkindir (59). Tüm dünyada bebeklerde ve küçük çocuklarda bronşiolit ve pnömoni gibi şiddetli alt solunum yolu infeksiyonunun en sık nedenidir (11,66). Bronşiolit ve pnömoni genellikle kendi kendini sınırlayan bir hastalık olmasına rağmen bebeklerde hastaneye yatışı gerektirecek kadar önemli komplikasyonlara neden olabilir. RSV infeksiyonu nedeniyle takip edilen bebeklerde yapılan bir çalışmada bebeklerin %79'unda bir ya da daha fazla komplikasyonun geliştiği tespit edilmiştir (83).

Freytmuth ve ark. çocukların nazal aspirat örneklerinden solunum yolu viruslarının araştırılmasına yönelik yaptıkları bir çalışmada %43.6 oranı ile RSV'yi en sık viral etken olarak saptamışlardır. Bunu %31.8 oranıyla rinovirus, %8.8 oranıyla influenza virusu, %4.4 oranıyla metapnömovirusun izlediğini belirtmişlerdir (20).

Hong Kong'ta yapılan bir çalışmada hastaneye başvuran herhangi bir infeksiyon hastalığı düşünülen çocukların %83.7'nin solunum yolu infeksiyonu oldukları tespit edilmiş ve bunların %22.7'sinde RSV, %9.2'sinde parainfluenza virus, %8.6'sında influenza A ve B virusları etken olarak bildirilmiştir (39).

Altuğlu ve ark. yaptıkları bir çalışmada akut bronşiolitli çocukların %32'sinde viral antijen saptamışlardır. Bunların %26'sını RSV, %4'ünü İnfluenza A, %2'sini adenovirus olarak tespit etmişlerdir (2).

Yılmaz ve ark.'nın alt solunum yolu infeksiyonu geçiren iki yaşından küçük çocuklarda yaptıkları çalışmada NPA örneklerinden IFA yöntemiyle viral etkenler araştırılmıştır. Viral etken olarak örneklerin %39.2'sinde RSV, %3.6'sında adenovirus, %2.4'ünde influenza, %1.2'sinde parainfluenza virusları saptanmıştır. Akut alt solunum yolu infeksiyonu olan 2 yaşından küçük çocuklarda RSV'nin en sık görülen viral etken olduğunu belirtilmiştir (85).

Yarkın ve ark.'nın alt solunum yolu infeksiyonu olan 5 yaş altı çocuklarda yaptıkları bir çalışmada çocukların %30.8'inde akut viral infeksiyonu gösteren IgM cevabı saptanmış ve %24.7 oranıyla en sık rastlanan viral etkenin RSV olduğu belirtilmiştir (84).

Ülkemizde çeşitli antijen saptama yöntemleri kullanılarak yapılan diğer çalışmalarda çocuklarda RSV görülme sıklığı %36.4 - %43.8 arasında bulunmuştur (3,36,57,58).

Güney ve ark. solunum yolu hastalığı nedeniyle hastaneye yatırılan iki yaşından küçük çocuklarda yaptıkları çalışmada nazofaringeal sekresyon örneklerinden TT-PZR yöntemiyle RSV pozitifliğini %51.4 oranında bulmuşlardır (22).

Gerçek zamanlı TT-PZR kullanarak yaptığımız bu çalışmada ise alt solunum yolu infeksiyonu nedeniyle hastaneye yatırılan iki yaşından küçük çocuklarda RSV pozitifliği oranı %56.5 olarak tespit edilmiştir. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında yüksek oranda saptanan RSV pozitifliği, kullandığımız yöntemin diğerlerinden daha duyarlı olmasına bağlanmıştır.

Primer RSV infeksiyonu sıklıkla iki yaşından küçük çocuklarda görülmektedir. Bebeklerin %50-70'i ilk bir yıl içinde infekte olmakta, iki yaşına kadar hemen hemen hepsi

RSV infeksiyonu geçirmektedir (75). Şiddetli hastalık altta yatan bir risk faktörü olmaksızın genellikle 6 aydan küçük bebeklerde görülmektedir. Yaşamın ilk dört haftasında yaygın değildir. Yaşamın ilk dört haftasında RSV infeksiyonu olan bebeklerin ise altta yatan bir risk faktörüne bağlı olabileceği ya da nozokomiyal kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. 1-3 ay arasında hastaneye yatış oranı ise %50'den fazla olduğu bildirilmektedir (28). Yaşamın ilk birkaç ayı içinde azalan maternal antikor düzeyi, solunum yolunun anatomik yapısı ve immun sistemin henüz tam olgunlaşmamış olması gibi nedenlerden dolayı şiddetli infeksiyonun görülme sıklığı artmaktadır (47).

Bizim çalışmamızda 0-2 yaş grubu çocuklar arasında RSV infeksiyonu saptanan hastaların %33.3'ünü 1-3 ay, %27.3'ünü 3-6ay, %24.2'sini bir aydan küçük ve %15.2'sini 6ay-2 yaş arasındaki çocuklar oluşturmaktadır. 1-3 ay arasında RSV pozitifliği oranı en yüksek olarak saptanmıştır. İlk 6 ay ile 6 ay-2 yaş grubu çocuklarda RSV pozitifliği karşılaştırıldığında 6 aydan küçük çocuklarda RSV görülme sıklığı %61.8 olarak saptanırken, 6ay-2yaş çocuklarda %35.7 olarak saptanmıştır. Altı aydan küçük çocuklarda RSV infeksiyonu görülme sıklığı yüksek olmasına rağmen iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bunun hasta sayısının azlığına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Şiddetli RSV infeksiyonu prematürite, kronik akciğer hastalığı, konjenital kalp hastalığı gibi, immun yetmezlik gibi risk faktörlerinin olduğu durumlarda artmaktadır (80). Bu da risk faktörü olan çocuklarda hastaneye yatış sıklığını ve hastanede kalış süresini artırmaktadır (47).

Kanra ve ark. risk faktörü olan çocuklarda yaptıkları bir çalışmada RSV görülme sıklığının altta yatan bir hastalık varlığında artmadığını ve hastanede kalış süresinin RSV infeksiyonu olan ve olmayan hasta grupları arasında farklı olmadığını saptamışlardır (35).

Bizim çalışmamızda RSV pozitif ve negatif hastalar risk faktörleri sıklıkları açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Bronşiolit ve pnömoni bir yaştan altındaki çocukların %2-3'ünde hastaneye yatışa neden olan alt solunum yolu infeksiyonlarıdır (66,69). RSV çocuklardaki pnömonilerin %25'inde ve bronşiolitlerin %50'sinde saptanan, en sık görülen etkindir (59,82). Yapılan çeşitli çalışmalarda RSV infeksiyonu saptanan çocuklarda pnömoni sıklığı %17.5-56.7 ve bronşiolit sıklığı %51-59.9 olarak bulunmuştur (9,51,74). Bizim çalışmamızda RSV pozitif olarak saptanan hastalarda pnömoni %59.4 ve bronşiolit %31.9 oranında saptanmıştır.

Respiratory syncytial virus infeksiyonunun sıklığı ırk ve cinsten bağımsızdır. Fakat erkek çocuklarda infeksiyonun daha şiddetli seyrettiği bildirilmektedir (51, 52, 62). Bizim çalışmamızda erkek ve kız cinsiyetler arasında RSV infeksiyonunun sıklığı açısından bir fark bulunamamıştır.

Respiratory syncytial virus infeksiyonunun mevsimsel bir özelliği vardır. Ilıman iklimlerde sıklıkla ilkbahar ve kış aylarında salgına neden olmaktadır (78). Bu çalışmada da infeksiyon sıklığı kış ve ilkbahar aylarında artmıştır. Sonbaharda görülen yüksek oran hasta sayısının azlığından dolayı anlamlı kabul edilmemiştir.

Virus antijenik ve genetik özelliklerine göre A ve B olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda grup A ve B izolatlarının sıklığı ve klinik şiddeti değerlendirilmiştir. Farklı coğrafik bölgelerde klinik izolatların her ikisinin de aynı anda bulunabileceği fakat farklı yıllarda görülme oranlarının değişik olabileceği tespit edilmiştir. Epidemiler süresince grup A ve B virusları birlikte bulunmakla birlikte bir grup belirgin şekilde baskın olabilmektedir. Genellikle grup A izolatları daha sıklıkla izole edilmektedir (63).

Onbeş yıllık bir sürede yapılan bir çalışmada 9 yıl grup A (%83-100), 2 yıl grup B izolatları baskın olarak bulunmuş, 4 yıl ise her iki grubun da eşit sıklıkta görüldüğü saptanmıştır (25). Alt grupların farklılığının klinik önemi tam olarak açıklanamamıştır. Genel görüş her iki alt tip suşları arasında virulansta önemli bir farklılık olmadığı şeklindedir (78). Bununla birlikte bazı araştırmacılar genellikle grup A ile enfeksiyonun daha şiddetli hastalığa neden olduğu sonucuna varmışlardır (44,62,64).

Walsh ve ark.'nın yaptıkları çalışmada prematürite ve altta yatan diğer risk faktörleri olan çocuklarda RSV alt tiplerinin saptanma oranı arasında önemli bir fark bulunmamış, yalnız alt grup B ile enfeksiyon risk altındaki grupta daha fazla olarak saptanmıştır. Alt solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle yatan hastalar arasında yapılan bu çalışmada grup A suşlarının daha şiddetli hastalığa neden olduğunu belirtilmiştir (75).

Tablo: RSV alt gruplarının PZR yöntemi ile saptanma sıklığı

Ülke-yıl	Yöntem	RSV A	RSV B
ABD, 2004 (13)	TT-PZR	%72	%28
Almanya, 2005 (48)	TT-PZR	%86.8	%9.2
ABD, 2004 (38)	TT-PZR	%52	%48
Kuba, 2006 (64)	PZR, RFLP	%60	%40
Türkiye, 2004 (22)	TT-PZR, RFLP	%6	%94

Bizim çalışmamızda da RSV pozitif örneklerin % 84.5'i RSV A iken %15.5'i RSV B olarak tanımlanmıştır. Her iki grup da 6 aydan küçük bebeklerde daha sık görülmekte ve RSV B pozitif hastaların tamamını 6 aydan küçük bebekler oluşturmaktadır.

Respiratory syncytial virus enfeksiyonu genellikle kendi kendini sınırlayan bir enfeksiyon olmasına rağmen, laboratuvar tanısının yapılması ve virusun gösterilmesi;

hastaneye yatırılan hastalarda gereksiz diğer müdahalelerin önlenmesi, enfeksiyonun kontrolü, hastaya uygun tedavinin verilmesi, gereksiz antibiyotik kullanımının azaltılması ve epidemiyolojik takip açısından önemlidir (10).

Viral alt solunum yolu enfeksiyonlu birçok hastaya uygulanan tanı testlerinde etken tespit edilemez. Bu yeni keşfedilen etkenlere, klinik örnekteki düşük viral yüke, örnekteki viral inhibitörlerin varlığına bağlı olabilir (31).

Klinik örneğin semptomlar başladıktan sonra alınma ve laboratuvara ulaştırılma zamanı tanıda etkenin saptanabilmesi için en önemli faktörlerdendir. Virusun kolay bozulabilir yapısı nedeniyle hızla laboratuvara ulaştırılması gereklidir. Örneklerin semptomların başlangıcından sonraki 7 gün içinde toplanmış olması önemlidir, çünkü virus salınımı 7 günden sonra azalmaktadır (60). Bu çalışmada da örnekler semptomların başlangıcından itibaren ortalama 5.5 günde alınmıştır.

Tanıda kullanılan örneğin tipi de önemli bir faktördür (54). RSV enfeksiyonunun saptanmasında örnek olarak genellikle nazal sekresyonlar kullanılmaktadır (11).

Viral solunum yolu enfeksiyon etkenlerinin saptanmasında nazal sürüntü örnekleriyle karşılaştırıldığında NPA ve nazal yıkama örneklerinin duyarlılıklarının daha iyi olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (30,70). Macfarland ve ark. IFA testiyle yaptıkları çalışmada NPA'nın duyarlılığını %97, NS'nin duyarlılığını %67 olarak saptamışlardır (40). Araştırmacılar NPA örneklerinin çok miktarda solunum yolu epiteli içerdiğini ve virusun sıcaklığı daha yüksek olan nazofarinksin epitel bölgesini tercih ettiğini, bu nedenle RSV ile enfekte hücrelerin miktarının NPA'da daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir(40,70).

Respiratory syncytial virus'un laboratuvar tanısında hücre kültürü, antijen saptama (EIA, IF)yöntemleri, serolojik yöntemler ve moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır.

Hücre kültürü virusun tanısında altın standart olmasına rağmen son 10 yılda moleküler yöntemlerle yer değiştirmiştir (31). Virusun oluşturduğu sitopatik etkinin gözlenmesi için uzun süre gerekmesi (3-7 gün), virusun hızla hücre kültürüne inokulasyonu zorunluluğu nedeniyle kültürün kullanımı sınırlanmıştır. Viral sitopatik etkiyi beklemeksizin daha kısa sürede (1-2 gün) sonuç veren shell vial yönteminde ise viral proteinler saptanmaktadır. Bu yöntemin duyarlılığı da kullanılan hücre kültürü tipi, hızlı inokulasyon, kullanılan monoklonal antikor gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (67).

Bebeklerde ve çocuklarda yeterli düzeyde antikor yanıtı beklenemeyeceğinden serolojik yöntemlerle antikor aranması bebekler ve çocuklarda genellikle akut tanıda kullanılmamaktadır (31).

Respiratory syncytial virus infeksiyonunun laboratuvar tanısında antijene dayalı yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Kullanımı kolay olan ve hızlı sonuç veren bu yöntemlerin yapılan çalışmalarda duyarlılıklarının düşük olduğu bulunmuştur (31,60). Antijen saptama yöntemlerinden yaygın olarak kullanılan EIA ile IFA yöntemlerinin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları vardır. Fakat her iki yöntemin de duyarlılıkları birbirine benzerdir. Çeşitli çalışmalarda %40-93 arasında değişmektedir (1,21,37).

Hücre kültürü, shell vial kültür, DFA ve EIA'nın karşılaştırıldığı bir çalışmada RSV pozitifliği EIA ile %87, DFA ile %83, shell vial yöntemiyle %73, hücre kültürüyle %40 oranlarında saptanmıştır. EIA ve DFA yönteminin canlı olmayan virüsü da saptaması, shell vial yönteminin düşük düzeylerdeki virüsü da saptaması nedeniyle duyarlılıklarının farklı olduğu belirtilmiştir (35).

Moleküler yöntemler solunum yolu viruslarının saptanmasında henüz yeni kullanılmaktadır. Solunum sistemi infeksiyonuna neden olan viruslar çok çeşitli olduğundan ve genellikle uygulanan tedavi virusa özgül olmadığı için virusların etken olduğu solunum

sistemi infeksiyonlarının tanısında moleküler yöntemlerin kullanımı diğer viral infeksiyonlara göre geride kalmıştır (33).

Solunum yolu viruslarının saptanmasında moleküler yöntemlerden en çok PZR yöntemleri kullanılmaktadır. Bu teknik standart laboratuvar yöntemleriyle karşılaştırıldığında (virus kültürü ya da EIA) sadece yüksek duyarlı ve özgül değil aynı zamanda uygulama kolaylığı ve çok sayıda örnekle çalışılabilmesi açısından yararlıdır (60,61).

Birçok farklı PZR teknikleri kullanılmaktadır. Reaksiyon sonunda çoğaltılan DNA'nın görüntülenmesine dayanan klasik PZR teknikleri günümüze kadar kullanılmaktayken, son yıllarda DNA'nın çoğaltılması ve görüntülenmesinin eş zamanlı olarak gerçekleştiği gerçek zamanlı PZR tekniği sıklıkla kullanılmaktadır. Biz çalışmamızda duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı bir tanı yöntemi olan gerçek zamanlı TT-PZR yöntemini kullandık. Bu yöntemle aynı zamanda tek bir reaksiyonla alt grup analizi de yapılabilmektedir. PZR ürünlerinin varlığı çoğaltma aşamasında izlenebildiğinden PZR sonrası görüntüleme işlemlerine (jel elektroforezi) gerek duyulmaması yöntemin hızını artırmakta ve çapraz kontaminasyon olasılığını azaltarak, yanlış pozitif sonuçların verilmesini önlemektedir (32,49).

Gerçek zamanlı TT-PZR ile diğer yöntemlerin karşılaştırıldığı çalışmalarda gerçek zamanlı TT-PZR'nin daha duyarlı ve özgül olduğu gösterilmiştir (14,19,32,62,73,76,81). TT-PZR'nin duyarlılığı %94.6-100, özgüllüğü %90-97.1'in üzerinde tespit edilmiştir (38,60)

Gerçek zamanlı TT-PZR ile hücre kültürü karşılaştırıldığında saptama sınırının düşük olması, örneğin dondurulma ve çözülmesinden sonra yöntemin stabilitesi, deneysel antiviral ajanlardan ya da pasif nötralizan antikorlardan etkilenmemesi ve hızlı sonuç vermesi gibi avantajlara sahiptir (62).

Gerçek zamanlı TT-PZR, hücre kültürü ve IFA'nın karşılaştırıldığı bir çalışmada çocukların nazal aspirat örneklerinden RSV'nin saptanmasında gerçek zamanlı TT-PZR'ın %100, kültür metodunun %88, IFA'nın %82 duyarlılıkta olduğu bulunmuştur (21).

Mentel ve ark. yaptıkları bir çalışmada akut solunum yolu hastalığı nedeniyle hastaneye yatırılan çocukların NPA örneklerinden RSV enfeksiyonunun insidansını araştırmışlardır. Gerçek zamanlı TT-PZR yöntemi ile %35.2, nested TT-PZR yöntemi ile %26.7, antijen ELİSA ile %14.1 sıklıkta RSV'yi etken olarak saptamışlardır. Bu yöntemler karşılaştırıldığında gerçek zamanlı TT-PZR yöntemi nested TT-PZR'den %25, antijen ELİSA'dan %60 daha duyarlı bulunmuş ve bu yöntemin düşük viral yükleri bile saptayabildiği için duyarlılığının yüksek olduğu belirtilmiştir (49).

Moleküler testlerin dezavantajı ölü mikroorganizmalardaki genetik materyali de saptayabilmeleridir. Fakat RSV'nin hastalık nedeni olarak belirlenmesinde RSV RNA'sının tespiti önemlidir. Çünkü araştırmacılar RSV RNA'sının TT-PZR ile saptanmasının viral replikasyonu gösterdiğini ve normal sağlıklı yetişkinlerde viral RNA'nın düşük düzeylerinin bile saptanmadığını belirtmektedirler (8,19). İmmun yetmezlikli yetişkinlerde gerçek zamanlı PZR ile yapılan bir çalışmada solunum yolu enfeksiyonu bulguları olmayan hastaların hiçbirisinde RSV pozitifliği saptanmamıştır (73). Bu nedenle bizim çalışmamızda kontrol grubu kullanılmamıştır.

Gueudin ve ark.'nın yaptığı çalışmada şiddetli bronşiolitli çocukların nazal aspiratlarında RSV RNA'sının kantitasyonuna bakıldığında şiddetli hastalıklı olmayan çocuklardan RSV kopya sayıları daha yüksek bulunmuştur. Fakat kantitatif sonuç örnekteki hücre sayısına göre standardize edildiğinde hastalığın yükünün RSV'nin şiddeti ile bağlantılı olmadığı görülmüştür. Aslında bronşiolitin şiddetinde viral replikasyondan ziyade inflamatuvar yanıt, hastaların genetik duyarlılığı gibi faktörlerin rol oynadığı belirtilmektedir.

Bu nedenle RSV'nin saptanmasında gerçek zamanlı TT-PZR'nin kalitatif bir test gibi kullanılmasının yeterli olabilecek hızlı bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir (21).

Hızlı viral tanı testlerinin kullanılmasının yararlarından birisi de zorunlu olmayan antibiyotik kullanımının azaltılmasıdır. RSV infeksiyonunda antibiyotik kullanımının yararı olmadığı bilinmesine rağmen komplike olmayan RSV infeksiyonlarında sıklıkla antibiyotik kullanılmaktadır. RSV infeksiyonunda pediatri yoğun bakım ünitesinde bulunanlarda, özellikle ventilasyon destekli olanlarda, nozokomiyal infeksiyonda, risk altındaki hastalarda gelişebilecek komplikasyonlar düşünüldüğü takdirde antibiyotik kullanımı önerilmektedir (5).

Respiratory syncytial virus nozokomiyal infeksiyonun önemli nedenlerindendir. Narlı ve ark.'ları yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yaptıkları çalışmada RSV infeksiyonu saptadıkları bebeklerin % 80'inde etkenin nozokomiyal kaynaklı olabileceğini belirtmişlerdir. Nitekim RSV gözeneksiz yüzeylerde 6 saatten fazla, eldivenler üzerinde 1-1/2 saat, kumaş ve kağıt doku üzerinde 30-45 dk ve deride 20 dk canlı kalabilmektedir (52). Hızlı tanı aynı zamanda nozokomiyal infeksiyonların önlenmesi için gerekli önlemlerin alınmasını sağlamaktadır (48,60).

Sonuç olarak alt solunum yolu infeksiyonu tanısı nedeniyle hastaneye yatırılan bebek ve çocuklarda klinik ve mevsimsel özellikler dikkate alınarak bu yaş grubunda en sık görülebilecek etken olan RSV'nin araştırılması önemlidir. Bu amaçla gereksiz diğer girişimlerin önlenmesi, uygun tedavinin verilmesi, hastanede yatış süresinin azaltılması ile gereksiz antibiyotik kullanımının ve nozokomiyal infeksiyonun önlenmesi açısından duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan, hızlı sonuç veren uygun tanı yönteminin kullanılması gereklidir (12,81)

Solunum viruslarının hızlı tanısında viroloji laboratuvarlarından en önemli beklentiler en kısa zamanda etkenin tanımlanması ve ek tanı yöntemlerinin azaltılmasıdır. Günümüze

kadar klinik virolojide solunum yolu viruslarının saptanmasında moleküler yöntemler nispeten az sayıda kullanılmakla birlikte, son yıllarda ek tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaksızın kullanılabilen, kısa sürede sonuç veren ve duyarlılığı yüksek olan bu yöntemler tanıda önem kazanmıştır (68). Moleküler yöntemlerin alt solunum yolu enfeksiyonu tanısında kullanım sıklığının artmasının ve bu yöntemlerin en duyarlı ve gelişmiş şekli olan gerçek zamanlı PZR yönteminin rutin olarak tanı laboratuvarına girmesinin yararlı olacağı görüşündeyiz.

ÖZET

RSV tüm dünyada bebeklerde ve küçük çocuklarda akut alt solunum yolu infeksiyonunun en önemli etkeni olup hastaneye yatışı gerektirebilecek kadar şiddetli bronşiolit ve pnömoni tablosuna yol açabilmektedir.

Bu çalışmada hastanemiz pediatri servislerine alt solunum yolu infeksiyonu nedeniyle yatırılan iki yaşından küçük 69 çocuğun nazofaringeal aspirat örneklerinde gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle RSV'nin varlığı araştırılmış ve RSV sıklığı %56.5 oranında saptanmıştır. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında yüksek oranda saptanan bu oranın yöntemin duyarlılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Aynı zamanda bu yöntemle alt gruplar da belirlenmiş ve pozitif örneklerin % 84.5'i RSV A ve % 15.5'i RSV B olarak saptanmıştır. Bu oran epidemilerde her iki grubun da birlikte bulunabileceği ve sıklıkla bir grubun daha baskın olduğu genel görüşünü desteklemektedir.

Çalışmamızda RSV pozitifliği 6 aydan küçük bebekler ve 6 ay-2 yaş arası çocuklar karşılaştırıldığında 6 aydan küçük bebeklerde daha sık görüldüğü (%61.8), fakat aralarında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. İnfeksiyonun mevsimsel özelliğine bakıldığında diğer ılıman iklimli bölgelerde olduğu gibi bizim bölgemizde de ilkbahar ve kış aylarında RSV infeksiyonunun sıklığının arttığını görmekteyiz.

Sonuç olarak küçük çocuklarda ve bebeklerde önemli morbidite ve mortalite nedeni olan RSV infeksiyonunun hızlı tanısının uygun tedavinin başlanarak gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesi, hastanede yatış süresinin azaltılması ve hastanın kısa sürede izole edilerek nozokomiyal infeksiyonun önlenmesi açısından gerekli olduğunu düşünmekteyiz. Bu amaçla hızlı, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan moleküler yöntemlerin rutin tanıda kullanılmasının yararlı olacağı görüşündeyiz.

SUMMARY

Respiratory syncytial virus is the most important causative agent in newborns and infants with lower respiratory tract infections across the world. This virus leads to severe bronchiolitis and pneumonia which requires hospitalization in infants.

Sixty nine children younger than 2 years old with lower respiratory tract infections hospitalized in pediatrics unit in our hospital were included. RSV-real time reverse transcriptase PCR was studied from nasopharyngeal samples of all patients. The frequency of RSV was 56.5 % in our study which is higher than previous studies reported in our country. We think that this detected high ratio is due to the high sensitivity of our PCR technique in comparison to others. In addition, we determined subgroup of RSV with this technique and found that RSV A and RSV B were 84.5 % and 15.5 %, respectively. These ratios suggest that these subgroup may be concordant and one may be more dominant than the other in epidemics.

In our study, RSV was more prevalent (61.8 %) in 0-6 months old infants than older children. However, this difference was not statistically significant. RSV infection has a seasonal predilection and is more prevalent in winter and spring months in our region like other regions with similar climates.

In conclusion, RSV infection is a significant cause of mortality and morbidity in infants and small children. We think that rapid diagnosis of RSV infections is essential in terms of starting appropriate treatment, avoiding unnecessary antibiotic use reducing hospitalization period and preventing nosocomial infections by isolating these patients . Therefore, we think that it will be beneficial using high sensitive, specific and rapid molecular techniques in the diagnosis of RSV infections in daily practice.

KAYNAKLAR

1. Abels S, Nadal D, Stroehle A, Bossart W. Reliable detection of respiratory syncytial virus infection in children for adequate hospital infection control management. J Clin Microbiol ; 39 : 3135-39 (2001)
2. Altuğlu İ, Özyurt S, Çetin N, Özer E, Özacar T, Bilgiç A. Akut bronşiolitli bebeklerde solunum virüslerinin araştırılması. İnfeks Derg ; 16: 87-90 (2002)
3. Aykut E, Özsan M. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan 0-1 yaş grubu bebeklerde solunum sinsityal virusun hücre kültürü ve direk immünoperoksidaz yöntemleriyle araştırılması. Mikrobiyol Bült ; 33 : 203-213 (1999)
4. Bellini WJ, Rota PA, Anderson LJ: Paramyxoviruses. Topley& Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Collier L, Balows A, Sussman M. S. 435-463, 9. baskı, Arnold (1998)
5. Bloomfield P, Dalton D, Karleka A, Kesson A, Duncan G, Isaacs D. Bacteraemia and antibiotic use in respiratory syncytial virus infections. Arch Dis Child ; 89 : 363-7 (2004)
6. Bont L, Kimpen JL. Immunological mechanisms of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. Intensive Care Med ; 28 : 616-21 (2002)
7. Bozkaya E: Solunum sistemi viral enfeksiyonları ve influenza. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S. S.101-112, Güneş kitabevi, Ankara (2004)
8. Brooks GF, Butel JS, Ornston LN . Jawetz, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology. S. 460-479, 20.baskı, Appleton& Lange (1995)
9. Calegari T, Queiroz DA, Yokosawa J, Silveira HL, Costa LF, Oliveira TF, Luiz LN, Oliveira RC, Diniz FC, Rossi LM, Carvalho CJ, Lima AC, Mantese OC. Clinical-

- epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. *Braz J Infect Dis*; 9: 156-61 **(2005)**
- 10.** Collins CL, Pollard AJ. Respiratory syncytial virus infections in children and adults. *J Infect*; 45 : 10-17 **(2002)**
 - 11.** Collins PL, Chanock RM, Murphy BR: Respiratory syncytial virus. *Fields virology*. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. S.1443-1486, 4.baskı, Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, USA(**2001**).
 - 12.** Çiçek C, Bilgiç A. Viral solunum yolu enfeksiyonlarının klinik, virolojik tanısına güncel yaklaşım. *Mikrobiyol Bült*; 37 : 195-204 **(2003)**
 - 13.** Devincenzo JP. Natural infection of infants with respiratory syncytial virus subgroups A and B: a study of frequency, disease severity, and viral load. *Pediatr Res*; 56 : 914-7 **(2004)**
 - 14.** Dewhurst-Maridor G, Simonet V, Bornand JE, Nicod LP, Pache JC. Development of a quantitative TaqMan RT-PCR for respiratory syncytial virus. *J Virol Methods*; 120 : 41-9 **(2004)**
 - 15.** Domachowske JB, Rosenberg HF. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clin Microbiol Rev*; 12 : 298-309 **(1999)**
 - 16.** Dominquez EA, Taber LH, Couch RB. Comparison of rapid diagnostic techniques for respiratory syncytial and influenza A virus respiratory infections in young children. *J Clin Microbiol*; 31 : 2286-90 **(1993)**
 - 17.** Durmaz R: Polimeraz zincir reaksiyonunun tipleri. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Editör: Durmaz R, 2. Baskı, S: 35-43, Nobel tıp kitabevleri **(2001)**
 - 18.** Erdman DD, Weinberg GA, Edwards KM, Walker FJ, Anderson BC, Winter J, Gonzalez M, Anderson LJ. GeneScan reverse transcription-PCR assay for detection of six common

- respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. *J Clin Microbiol*; 41 : 4298-303 **(2003)**
- 19.** Falsey AR, Formica MA, Treanor JJ, Walsh EE. Comparison of quantitative reverse transcription-PCR to viral culture for assessment of respiratory syncytial virus shedding. *J Clin Microbiol*; 41 : 4160-5 **(2003)**
 - 20.** Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, Gouarin S, Petitjean J, Eckart P, Brouard J: Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol* ; 78 : 1498-504 **(2006)**
 - 21.** Gueudin M, Vabret A, Petitjean J, Gouarin S, Brouard J, Freymuth F. Quantitation of respiratory syncytial virus RNA in nasal aspirates of children by real-time RT-PCR assay. *J Virol Methods*; 109 : 39-45 **(2003)**
 - 22.** Guney Ç, Kubar A, Yapar M, Besirbellioğlu AB, Dogancı L. An outbreak of respiratory infection due to respiratory syncytial virus subgroup B in Ankara, Turkey. *Jpn J Infect Dis*; 57 : 178-80 **(2004)**
 - 23.** Hacking D, Hull J. Respiratory syncytial virus--viral biology and the host response. *J Infect.* ; 45 : 18-24 **(2002)**
 - 24.** Hall CB, McCarthy CA: Respiratory syncytial virus. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. S. 2008-2026, 6. baskı, Elsevier Inc. **(2005)**
 - 25.** Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, Anderson LJ. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Infect Dis*; 162 : 1283-90 **(1990)**

26. Hall CB. Nosocomial Respiratory Syncytial Virus Infections: The "Cold War" Has Not Ended. Clin Infec Dis ; 31: 590-596 (2000)
27. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. N Engl J Med; 344 : 1917-28 (2001)
28. Handforth J, Friedland JS, Sharland M. Basic epidemiology and immunopathology of RSV in children. Paediatr Respir Rev; 1 : 210-4 (2000)
29. Hayden RT: İn vitro nükleik asit amplifikasyon teknikleri. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. Editörler: Tekeli A, Ustaçelebi Ş. S. 43-70, Palme yayıncılık, Ankara, (2006)
30. Heikkinen T, Marttila J, Salmi AA, Ruuskanen O. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. J Clin Microbiol; 40 : 4337-9 (2002)
31. Henrickson KJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. Pediatr Infect Dis J; 23(1 Suppl) : 6-10 (2004)
32. Hu A, Colella M, Tam JS, Rappaport R, Cheng SM. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. J Clin Microbiol; 41 : 149-54 (2003)
33. Ieven M, Goossens H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. Clin Microbiol Rev; 10 : 242-56 (1997)
34. Işık N, Ağaçfidan A. İnfeksiyon hastalıklarının tanısında real-time polimeraz zincir reaksiyonu kullanımı. İnfeks Derg; 18 : 125-130 (2004)
35. Johnston SL, Siegel CS. Evaluation of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, centrifugation culture, and conventional culture for the detection of respiratory syncytial virus. J Clin Microbiol; 28 : 2394-7 (1990)

36. Kanra G, Tezcan S, Yilmaz G; Turkish National Respiratory Syncytial Virus (RSV) Team. Respiratory syncytial virus epidemiology in Turkey. *Turk J Pediatr*; 47 : 303-8 (2005)
37. Kehl SC, Henrickson KJ, Hua W, Fan J. Evaluation of the Hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. *J Clin Microbiol*; 39 : 1696-701 (2001)
38. Kuypers J, Wright N, Morrow R. Evaluation of quantitative and type-specific real-time RT-PCR assays for detection of respiratory syncytial virus in respiratory specimens from children. *J Clin Virol*; 31 : 123-9 (2004)
39. Lee WK, Young BWY: Infectious diseases in children admitted from a residential child care centre. *Hong Kong Med J*; 12 : 119-24 (2006)
40. Macfarlane P, Denham J, Assous J, Hughes C. RSV testing in bronchiolitis: which nasal sampling method is best? *Arch Dis Child*; 90 : 634-5 (2005)
41. Mackie PL. The classification of viruses infecting the respiratory tract. *Paediatr Respir Rev*; 4 : 84-90 (2003)
42. Madhi SA, Ismail K, O'Reilly C, Cutland C. Importance of nosocomial respiratory syncytial virus infections in an African setting. *Trop Med Int Health*; 9 : 491-8 (2004)
43. Maggon K, Barik S, New drugs and treatment for Respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol*; 14 : 149-168,(2004)
44. Martinello RA, Chen MD, Weibel C, Kahn JS. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis*; 186 : 839-42 (2002)
45. Matthey S, Nicholson D, Ruhs S; Alden B, Knock M, Schultz K, Schmuecker A. Rapid detection of respiratory viruses by shell vial culture and direct staining by using pooled and individual monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* ; 30 : 540-544 (1992)

46. McNamara PS, Smyth RL. The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood. *Br Med Bull*; 61 : 13-28 **(2002)**
47. Meissner HC, Selected populations at increased risk from respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J*; 22 : S40-5 **(2003)**
48. Mentel R, Ilgert U, Wegner U, Zimmerman K, Bruns R, Gurtler L. Molecular and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections in hospitalized children. *Med Microbiol Immunol*; 194 : 67-71 **(2005)**
49. Mentel R, Wegner U, Bruns R, Gurtler L. Real-time PCR to improve the diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *J Med Microbiol*; 52 : 893-6 **(2003)**
50. Meqdam MM, Nasrallah GK. Enhanced detection of respiratory syncytial virus by shell vial in children hospitalised with respiratory illnesses in northern Jordan. *J Med Virol* ; 62 : 518-23 **(2000)**
51. Meqdam MM, subaih SH. Rapid detection and clinical features of infants and young children with acute lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 47 : 129-33 **(2006)**
52. Mlinaric-Galinovic G, Varda-Brkic D. Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 37 : 237-46 **(2000)**
53. Murray PR, Rosenthal KS, Phaller MA. *Medical Microbiology*. S. 597-609, 5. baskı, Elsevier Mosby, Philadelphia, USA **(2005)**
54. Myint S. Recent advances in the rapid diagnosis of respiratory tract infection. *Br Med Bull*; 61 : 97-114 **(2002)**
55. Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev*; 5 Suppl A : 119-26 **(2004)**

56. Openshaw PJ, Tregoning JS. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. Clin Microbiol Rev; 18 : 541-55 (2005)
57. Ozsan M, Kahraman H. Klinik olarak alt solunum yolu enfeksiyonu tanısı konulan 0-1 yaş grubu bebeklerde solunum sinsityal virus antijenlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bült; 32 : 51-56 (1998)
58. Özacar T, Zeytinoğlu A, Özdoğru E, Aydemir Ş, Tanaç R, Bilgiç A. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda respiratuvar sinsityal virus antijenlerinin araştırılması. İnfeks Derg; 10 : 25-27 (1996)
59. Özsan M. Çocukluk çağı solunum sistemi viral enfeksiyonları. Uluslar arası katılımlı 1. Ulusal Viroloji Kongresi konferanslar ve bildiriler kitabı. Editörler: Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H. S.235-237. (2003)
60. Paton AW, Paton JC, Lawrence AJ, Goldwater PN, Harris RJ. Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. J Clin Microbiol;30 : 901-4 (1992)
61. Pelaia G, Vatrella A, Gallelli L, Renda T, Cazzola M, Maselli R, Marsico SA. Respiratory infections and asthma. Respir Med; 100 : 775-84 (2006)
62. Perkins SM, Webb DL, Torrance SA, El Saleeby C, Harrison LM, Aitken JA, Patel A, DeVincenzo JP. Comparison of a real-time reverse transcriptase PCR assay and a culture technique for quantitative assessment of viral load in children naturally infected with respiratory syncytial virus. J Clin Microbiol; 43 : 2356-62 (2005)
63. Piedra PA, Englund JA, Glezen WP: Respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. Clinical Virology. Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. S.763-791, 2. baskı, Washington DC ASM press (2002)

- 64.** Savon C, Goyenechea A, Valdes O, Aguilar J, Gonzalez G, Palerm L, Gonzalez G, Perez Brena P. Respiratory syncytial virus group A and B genotypes and disease severity among Cuban children. Arch Med Res; 37 : 543-7 (**2006**)
- 65.** Simoes EA. Respiratory syncytial virus infection. Lancet; 354 : 847-52 (**1999**)
- 66.** Sinanotis CA. Viral pneumoniae in children: incidence and aetiology. Paediatr Respir Rev; 5 Suppl A : 197-200 (**2004**)
- 67.** Smith MC, Creutz C, Huang YT. Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by shell vial technique. J Clin Microbiol; 29 : 463-5 (**1991**)
- 68.** Smith TF, Espy MJ, Jones MF: Moleküler viroloji: Günümüzdeki ve gelecekteki yönü Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. Editörler: Tekeli A, Ustaçelebi Ş. S. 543-549, Palme yayıncılık, Ankara (**2006**)
- 69.** Smyth RL, Openshaw PJ. Bronchiolitis. Lancet; 368 : 312-22 (**2006**)
- 70.** Stensballe LG, Trautner S, Kofoed PE, Nante E, Hedegaard K, Jensen IP, Aaby P. Comparison of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for detection of respiratory syncytial virus in different settings in a developing country. Trop Med Int Health ; 7: 317-2(**2002**)
- 71.** Sullender WM. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. Clin Microbiol Rev; 13 : 1-15 (**2000**)
- 72.** Türkoğlu S: Respiratory Syncytial Virus. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Editörler: Wilke-Topcu A, Söyletir G, Doğanay M. Cilt 2, S.1289-1292. 3.baskı, Nobel tıp kitabevleri (**2002**)
- 73.** Van Elden LJ, Van Loon AM, Van der Beek A, Hendriksen KA, Hoepelman AI, van Kraaij MG, Schipper P, Nijhuis M. Applicability of a real-time quantitative PCR assay for

- diagnosis of respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *J Clin Microbiol*; 41 : 4378-81 **(2003)**
- 74.** Wahab AA, Dawod ST, Raman HM. Clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection in hospitalized healthy infants and young children in Qatar. *J Trop Pediatr*; 47 : 363-6 **(2001)**
- 75.** Walsh EE, McConnochie KM, Long CE, Hall CB. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J Infect Dis*; 175 : 814-20 **(1997)**
- 76.** Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR, Schwartz B; New Vaccine Surveillance Network Study Group. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. *J Infect Dis*; 189 : 706-10 **(2004)**
- 77.** Welliver RC. Detection, pathogenesis, and therapy of respiratory syncytial virus infections. *Clin Microbiol Rev*; 1 : 27-39 **(1988)**
- 78.** Welliver RC. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses. *Pediatr Infect Dis J*; 22(2 Suppl) : 6-12 **(2003)**
- 79.** Welliver RC. Respiratory syncytial virus infection: therapy and prevention. *Paediatr Respir Rev*; 5 Suppl A : S127-33 **(2004)**
- 80.** Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr*; 143(5 Suppl) : 112-7 **(2003)**
- 81.** Whiley DM, Mackay IM, Sloots TP. Detection and differentiation of human polyomaviruses JC and BK by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol*; 39 : 4357-61 **(2001)**
- 82.** White DO, Fener FJ; Solunum Sinsişya virusu (Respiratory Syncytial Virus- RSV). *Medikal Virology (Medical Virology)*. Çeviri editörü: Doymaz MZ. S.469-474, Nobel tıp kitapları **(2000)**

- 83.** Willson DF, Landrigan CP, Horn SD, Smout RJ. Complications in infants hospitalized for bronchiolitis or respiratory syncytial virus pneumonia. J Pediatr;143 (5 Suppl) : 142-9 (2003)
- 84.** Yarkın F, Alhan E, Kibar F, Karabay A, Köksal F. Çocuklarda alt solunum yolu enfeksiyonlarında viral ajanların seroepidemiolojik analizi. Mikrobiyol Bült; 29 : 149-156 (1995)
- 85.** Yılmaz G, Uzel N, Işık N, Uğur S, Aslan S, Badur S. Akut alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda viral etkenler ve respiratory syncytial virus alt grupları. İnfeks Derg; 14 : 157-164 (2000)