

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

**ÇOCUKLARDA VİRAL SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARININ
MULTİPLEKS REAL-TİME POLYMERASE CHAIN REACTION
(PCR) VE DİREKT İMMUNFLORESAN TEST İLE
ARAŞTIRILMASI**

Deniz ÖZDOĞRU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN

ADANA-2013

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

**ÇOCUKLARDA VİRAL SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARININ
MULTİPLEKS REAL-TİME POLYMERASE CHAIN REACTION
(PCR) VE DİREKT İMMUNFLORESAN TEST İLE
ARAŞTIRILMASI**

Deniz ÖZDOĞRU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fügen YARKIN

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TF2012YL9
numaralı proje olarak desteklenmiştir.**

ADANA-2013

KABUL VE ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
"Çocuklarda Viral Solunum Yolu Enfeksiyonlarının Multipleks Real-Time Polymerase Chain Reaction
(PCR) ve Direkt Immunfloresan Test ile Araştırılması."
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 29 / 07 / 2013

TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof. Dr. Egehan YARKIN
Çukurova Üniversitesi
Başkan


Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Çukurova Üniversitesi
Raportör


Prof. Dr. Rıza Dinçer YILDIZTAŞ
Çukurova Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 01/08/2013 tarih ve 19/7-7 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tez konumun seçilmesinde ve hazırlanmasında, tüm çalışmalarında bana yol gösteren,engin bilgisi ve tecrübesiyle yardım ve desteğini esirgemeyen, ileriki eğitim ve öğretim hayatım boyunca kişiliği ve çalışma prensibini kendime örnek edineceğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum sevgili hocam Prof. Dr. Fügen Yarkın'a, yetişmemde emeği geçen Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatih Köksal'a, değerli hocalarım Prof. Dr. Akgün Yaman'a ve Prof. Dr. M. Macit İlkit'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilimdalı'nda görevli hocalarıma ve doktorlarına tez çalışmama katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Viroloji laboratuvarında büyük bir keyifle birlikte çalıştığım viroloji ekibi; Seher Öksüz, Buket Şeflek, Gülcan Bozan, Mehmet Çimentepe ve Deniz Yıldırım'a, teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde bana büyük bir özveriyle destek vererek bugünlere gelmemde en büyük rol sahibi olan, evlatları olmaktan gurur duyduğum canımdan çok sevdiğim anneme ve babama, uzakta da olsa sevgisini her zaman hissettiğim canım kardeşime ve bu uzun süreçte her zaman yanımda olarak desteğini esirgemeyen Sercan Sağdıç'a sonsuz teşekkürler...

Deniz ÖZDOĞRU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Respiratory syncytial virus	3
2.1.1. Virusun yapısı	3
2.1.2. Epidemiyoloji ve patogeneZ	3
2.1.3. Virolojik tanı	5
2.1.4. Tedavi	8
2.2. Adenovirus	8
2.2.1. Virusun yapısı	8
2.2.2. Epidemiyoloji ve patogeneZ	9
2.2.3. Virolojik tanı	11
2.2.4. Tedavi	12
2.3. Human parainfluenza virus	13
2.3.1. Virusun yapısı	13
2.3.2. Epidemiyoloji ve patogeneZ	14
2.3.3. Virolojik tanı	16
2.3.4. Tedavi	17
2.4. Human metapneumovirus	17
2.4.1. Virusun yapısı	17
2.4.2. Epidemiyoloji ve patogeneZ	18
2.4.3. Virolojik tanı	19

2.4.4. Tedavi	21
2.5. Human coronavirus	21
2.5.1. Virusun yapısı	21
2.5.2. Epidemiyoloji ve patogeneze	24
2.5.3. Virolojik tanı	27
2.5.4. Tedavi	28
2.6. Human rhinovirus	28
2.6.1. Virusun yapısı	28
2.6.2. Epidemiyoloji ve patogeneze	29
2.6.3. Virolojik tanı	31
2.6.4. Tedavi	32
2.7. Human bocavirus	32
2.7.1. Virusun yapısı	32
2.7.2. Epidemiyoloji ve patogeneze	33
2.7.3. Virolojik tanı	34
2.8. İnfluenza virus	35
2.8.1. Virusun yapısı	35
2.8.2. İnfluenza A virus	36
2.8.2.1. Virusun yapısı	36
2.8.2.2. Avian influenza A virus	36
2.8.2.3. Swine influenza A virus	37
2.8.3. Epidemiyoloji ve patogeneze	37
2.8.4. Virolojik tanı	39
2.8.5. Tedavi	40
2.9. Enterovirus ve parechovirus	41
2.9.1. Virusun yapısı	41
2.9.2. Epidemiyoloji ve patogeneze	41
2.9.3. Tedavi	42
2.10. Parvovirus tip 4, tip 5 ve mimivirus	43
2.10.1. Virusun yapısı	43
2.10.2. Epidemiyoloji	43
2.10.3. Virolojik tanı	43

2.11. KI ve WU polyomavirus	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Nazofaringeal sürüntü örneklerinin toplanması	46
3.2. Direkt immunfloresan test (DFA) ile antijen tespiti	47
3.2.1. Örneklerin işlenmesi ve preparatların hazırlanması	47
3.2.2. Mikroskopta değerlendirme öncesi yapılan işlemler	48
3.3. Multipleks real-time PCR	48
3.3.1. RNA/DNA ekstraksiyonu	49
3.3.2. cDNA sentezi	50
3.3.3. Multipleks real-time PCR amplifikasyonu	50
3.3.4. Sonuçların değerlendirilmesi	52
4. BULGULAR	53
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
7. KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	103

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Örneklerin ve kontrol karışımlarının dağıtımı	51
Şekil 2. ASYE olan 158 çocukta solunum yolu viruslarının dağılımı	55
Şekil 3. Solunum yolu virus pozitif vakaların yaş gruplarına dağılımı	58
Şekil 4. Solunum yolu viruslarının cinsiyetlere göre dağılımı	60
Şekil 5. Tekli, ikili ve üçlü viral enfeksiyonların aylara göre dağılımı	63
Şekil 6. Real-time PCR ile tespit edilen virusların aylara göre dağılımı	64
Şekil 7. Solunum yolu viruslarının aylara göre dağılımı	65

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Multipleks real-time PCR ısı döngüsü	52
Tablo 2. ASYE olan hastaların cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı	53
Tablo 3. ASYE olan 114 hastada bulunan solunum yolu virusları	54
Tablo 4. Tekli viral solunum yolu enfeksiyonu ve koenfeksiyonu olan 114 hastanın yaşa göre dağılımı	56
Tablo 5. Tekli viral solunum yolu enfeksiyonu ve koenfeksiyonu olan 114 hastanın cinsiyetlere göre dağılımı	57
Tablo 6. Solunum yolu viruslarının 114 hastada yaş gruplarına göre dağılımı	58
Tablo 7. Viral solunum yolu enfeksiyonların cinsiyete göre dağılımı	59
Tablo 8. Viral solunum yolu enfeksiyonu olan ve olmayan hastaların klinik tanıları	60
Tablo 9. Viral solunum yolu enfeksiyonu olan ve olmayan hastalarda görülen klinik belirtiler	61
Tablo 10. Solunum yolu virusu pozitif örneklerin kliniklere göre dağılımı	62
Tablo 11. Tekli viral solunum yolu enfeksiyonu ve koenfeksiyonu olan 114 hastanın aylara göre dağılımı	63
Tablo 12. Real-time PCR ile tespit edilen solunum yolu viruslarının aylara göre dağılımı	64
Tablo 13. RSV, hMPV, adenovirus ve PIV için real-time PCR testi ve DFA testi sonuçları	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADV	Adenovirus
ASYE	Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu
A549	Adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücre dizisi
BGMK	Buffalo Green Monkey Kidney Cells
cDNA	Complementary DNA
Ct	Cycle threshold
DFA	Direct Fluorescent Antibody Test
DNA	Deoksiribonükleik asit
EIA	Enzym immunoassay
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM	Elektron mikroskobu
FDA	Food and Drug Administration
H	Hemagglutinin
HBov	Human bocavirus
HCoV	Human coronavirus
HEK	Human Embryonic Kidney Cells
HeLa	Human servikal karsinom hücre dizisi
Hep-2	Human Larynx Epidermoid Carsinom cell line
hMPV	Human metapneumovirus
IFA	Immunofluorescence Assay
Ig	Immunoglobulin
LAIV	Live attenuated influenza vaccine
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
MRC-5	Normal Human Fetal Lung Fibroblast cell line
N	Nöraminidaz
NAAT	Nükleik asit amplifikasyon testleri
NASBA	Nucleic acid sequence based amplification
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Polymerase Chain Reaction
PMK	Primary Rhesus Monkey Kidney cell line
RV	Rhinovirus
KIPyV	Polyoma virus KI
WUyV	Polyoma virus WU
PIV	Parainfluenza virus
RNA	Ribonükleik asit
RSV	Respiratory syncytial virus
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
TCID₅₀	%50 tissue culture infectious dose
TIV	Trivalent inactivated influenza vaccine
ÜSYE	Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu

ÖZET

Çocuklarda Viral Solunum Yolu Enfeksiyonlarının Multipleks Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) ve Direkt İmmunfloresan Test ile Araştırılması

Viral solunum yolu enfeksiyonları, bütün dünyada çocuklarda morbidite ve mortalitenin önemli bir sebebidir. Bu çalışmanın amacı alt solunum yolu enfeksiyonu sebebiyle hastaneye yatırılan çocuklarda viral enfeksiyonların sıklığının multipleks real-time PCR ve direkt immunfloresan assay (DFA) ile araştırılmasıdır. Eylül 2012 ve Mart 2013 tarihleri arasında 17 yaş ve altındaki 158 çocuktan flocked eküvyon (Copan Diagnostics, Italy) ile nazofaringeal sürüntü örnekleri toplanmıştır. Örnekler 13 solunum yolu virusunun tespiti için multipleks real-time PCR (ARVI Screen Real-TM, Sacace, Italy) ve respiratory syncytial virus (RSV), human metapneumovirus (hMPV), adenovirus ve parainfluenza virus (PIV) antijeni tespiti için DFA testi (Argene SA, France) ile analiz edilmiştir. Multipleks real-time PCR test ile 158 hastadan 114'ünün (%72.2) en az bir virus için pozitif olduğu bulunmuştur. Koenfeksiyon bütün hastaların 49'unda (%31) gözlenmiştir. Rhinovirus en yaygın virus olup 44 (%27.8) hastada tespit edilmiştir, bunu RSV (%17.7), adenovirus (%17.7), hMPV (%10.1), PIV 4 (%9.4), PIV 1 (%7.5), human bocavirus (%6.3), human coronavirus (HCoV) OC43/HKU1 (%4.4), PIV 2 (%3.1), PIV 3 (%3.1) ve HCoV 229E/NL63 (%1.8) izlemiştir. Real time PCR testine göre DFA testinin sensitivitesi RSV, hMPV, adenovirus ve PIV için sırasıyla %85.7, %75, %46.4 ve %70.4 ve spesifitesi %96.2, %96.5, %89.4 ve %94.7 bulunmuştur. Sonuç olarak çalışma grubumuzda viral solunum yolu enfeksiyonları %72.2 gibi yüksek bir oranda tespit edilmiştir. Gereksiz antibiyotik tedavisinin azaltılması ve nozokomiyal virus yayılımının önlenmesi için viral solunum yolu enfeksiyonlarının erken tanısında multipleks real-time PCR testinin yapılması önerilir ve daha hızlı test olan DFA testi de özellikle RSV ve hMPV için kullanılabilir.

Anahtar Sözcükler: Alt solunum yolu enfeksiyonu, solunum virusları, multipleks real-time PCR test, direkt immunfloresan test, çocuklar

ABSTRACT

The Investigation of Viral Respiratory Tract Infections in Children by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) and Direct Immunofluorescence Test

Viral respiratory tract infections are the major cause of morbidity and mortality in children worldwide. The aim of this study was to determine the frequency of viral infections in hospitalized children with lower respiratory tract infections by multiplex real-time PCR test and direct immunofluorescence assay (DFA). Nasopharyngeal swab specimens were collected from 158 children 17 years old and under by using flocked swabs (Copan Diagnostics, Italy) between September 2012 and March 2013. Samples were analysed for 13 respiratory viruses by multiplex real-time PCR test (ARVI Screen Real-TM, Sacace, Italy) and for respiratory syncytial virus (RSV), human metapneumovirus (hMPV), adenovirus and parainfluenza virus (PIV) antigen by DFA test (Argene SA, France). Of 158 patients, 114 (72.2%) were found to be positive for at least one virus by multiplex real-time PCR test. Coinfection was observed in 49 (31%) of all patients. Rhinovirus was the most common virus and detected in 44 (27.8%) patients, followed by RSV (17.7%), adenovirus (17.7%), hMPV (10.1%), PIV 4 (9.4%), PIV 1 (7.5%), human bocavirus (6.3%), human coronavirus (HCoV) OC43/HKU1 (4.4%), PIV 2 (3.1%), PIV 3 (3.1%) and HCoV 229E/NL63 (1.8%). Compared to real-time PCR test, the sensitivity of DFA test for RSV, hMPV, adenovirus and PIV were 85.7%, 75%, 46.4% and 70.4% and the specificity 96.2%, 96.5%, 89.4% and 94.7%, respectively. In conclusion, viral respiratory infections were identified with a high rate of 72.2% in our study group. To reduce unnecessary antibiotic use and to prevent nosocomial virus transmission, multiplex real-time PCR test should be performed in the early diagnosis of viral respiratory tract infections and DFA test could be also used as a rapid assay especially for RSV and hMPV.

Key Words: Lower respiratory tract infection, respiratory viruses, multiplex real-time PCR test, direct immunofluorescence test, children

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut solunum yolu enfeksiyonları bütün dünyada çocuklarda görülen en yaygın enfeksiyonlardır ve mortalitenin major sebebidir. Klinik belirtiler soğuk algınlığı gibi üst solunum yolu enfeksiyonundan (ÜSYE), pnömoni, bronşit ve bronşiolit gibi alt solunum yolu enfeksiyonuna (ASYE) kadar değişir. ASYE başlıca pnömoni olmak üzere yenidoğan ve küçük çocuklarda hastaneye yatışın en önemli sebebidir ve 5 yaş altındaki çocuklarda tüm ölümlerin yaklaşık %20'sinden sorumludur. Küçük çocuklar her yıl 3-8 kez ÜSYE geçirir. ÜSYE'leri astım alevlenmesi, bronşit, bronşiolit ve pnömoni gibi ASYE'larına yol açabilir. ASYE daha az sıklıkla görülmesine rağmen daha yüksek mortalite ile ilişkilidir^{1,2}.

Viruslar bütün dünyada akut solunum yolu enfeksiyonlarının morbidite ve mortalitesine katılan major etkenlerdir. Akut solunum yolu enfeksiyonlarının yaklaşık %80'i virus kaynaklıdır. En yaygın tanınan solunum yolu virusları respiratory syncytial virus (RSV), human metapneumovirus (hMPV), adenovirus (ADV), parainfluenza virus (PIV) tip, PIV 2, PIV 3, influenza virus tip A ve B virusları, rhinovirus (RV) ve human coronavirustur (HCoV). HCoV NL63 ve HCoV HKU1, human bocavirus (HBoV), parvovirus tip 4, tip 5 ve mimivirus gibi yeni keşfedilen bazı virusların klinik önemi henüz tam bilinmemektedir^{3,4}.

Çocuklarda viral ve bakteriyel solunum yolu enfeksiyonları benzer klinik tabloya sebep olduğundan sadece klinik belirti ve bulgulara dayanarak spesifik etkenin tanısı yapılamaz. ASYE'lerinin çoğundan viruslar sorumlu olsa da, genellikle antibiyotik tedavisi verilmektedir. Oysa bu enfeksiyonlarda sıklıkla kullanılan antibiyotiklerin çoğu gereksizdir. Bu sebeple solunum yolu viruslarının hızlı ve doğru laboratuvar tanısı, antiviral tedavinin erken başlatılması ve gereksiz antibiyotik kullanımının azaltılması için esastır. Viral respiratuvar enfeksiyonların erken tanısı, aynı zamanda klinik seyrin tahmini, nozokomiyal enfeksiyon yayılımının önlenmesi, hastanede kalış süresini kısaltma ve diğer laboratuvar araştırmalarının azaltılarak maliyetin düşürülmesinde de önemli rol oynar^{5,6}.

Respiratuvar virusların tanısı hasta yönetiminin ayrılmaz bir parçasıdır. Solunum yolu viruslarının tanısı için konvansiyonel hücre kültürü veya hızlı hücre kültüründe

(shell vial kültürü) virus izolasyonu, antikor tespiti için serolojik testler, antijen testleri (enzim immunoassay, immunfloresan test) ve nükleik asit tanı testleri kullanılır. Viral solunum yolu enfeksiyonların çoğunun tanısında hücre kültüründe virus izolasyonu mükemmel spesifitesine bağlı olarak altın standart olarak kalmaktadır. Yaygın respiratuvar viruslarının tespiti için primer, diploid ve devamlı hücre kültürleri kombine kullanılır. Ancak, viral kültür zaman alıcıdır. Ayrıca HBoV'lar ve HCoV'lar gibi bazı virusların kültürü yapılamaz veya rutin kültür işlemleri henüz mevcut değildir. Önemli respiratuvar virusların tespiti için direkt immunfloresan assay (DFA) ve enzim immunoassay (EIA) gibi hızlı viral antijen testlerinin kullanımı ile zamanında sonuç verilebilir⁷. Ancak, sensitivite ve spesifitesi genellikle düşüktür. Oldukça yüksek spesifite ve düşük sensitiviteli hızlı antijen testlerinin kullanımları solunum yolu virus enfeksiyonları yüksek prevalansta olduğunda güvenilirdir. Serolojik testler ise öncelikle epidemiyolojik çalışmalar için kullanılır ve viral solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında uygulanmaları sınırlıdır⁸. Moleküler tanı testlerinde teknolojik ilerlemeler diagnostik viroloji alanında bir devrim başlatmıştır. Viral solunum yolu enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı için polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction; PCR) ve real-time PCR gibi moleküler yöntemler, yüksek sensitivite ve spesifite göstermesi, sonuçların kısa sürede alınması, kültürü zor veya üremesi yavaş olan virusları belirleyebilmesi sebebiyle hücre kültürü gibi konvansiyonel metodlara göre çok daha yaygın kullanılmaktadır. Günümüzde artan sayıda solunum yolu viruslarının tanısı için tek bir testte birden fazla virusun aynı anda tespit edilebildiği birçok multipleks PCR testi geliştirilmiştir^{9,10}.

Bu çalışmamızın amacı ASYE olup hastaneye yatırılan çocuklarda etken virusların multipleks real-time PCR ve direkt immunfloresan test ile araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Respiratory syncytial virus

2.1.1. Virusun yapısı

RSV, ilk olarak bir insandan değil ÜSVE belirtileri olan bir laboratuvar şempanzesinden 1956 yılında izole edilmiştir. Daha sonra solunum yolu enfeksiyonu belirtileri gösteren bebeklerde tespit edilen RSV, o zamandan beri tüm dünyada 5 yaşından küçük çocuklarda akut ÜSVE'nun başlıca sebebi olarak kabul edilmiştir^{11,12}.

RSV, Paramyxoviridae familyası, Pneumovirinae subfamilyası, Pneumovirus genusuna ait, zarflı, genomu segmentsiz, tek sarmallı, negatif polariteli ribonükleik asit (RNA) virusudur. RSV genomu sadece enfekte olmuş hücrelerde bulunan yapısal olmayan iki protein ve virionlarda bulunan sekiz protein olmak üzere 10 protein kodlar. RSV'un antijenik analizi ile monoklonal antikorların paneline karşı reaktivitesine dayalı olarak RSV-A ve RSV-B subgrupları tanımlanmıştır. B suşu B1 ve B2 olmak üzere ikiye ayrılmaktadır¹³.

Adından da anlaşılacağı gibi, RSV enfeksiyonunda hedef hücreler solunum yolu epitel hücreleridir. RSV, human larynx epidermoid carsinom cell line (Hep-2), human servikal karsinom hücre dizisi (HeLa), Vero, fibroblastlar dahil olmak üzere birçok hücre dizisinde iyi ürer ve ayrıca primer insan burun ve bronş epitel hücrelerinde çoğalır.

2.1.2. Epidemiyoloji ve patogenezi

İnsanlar RSV'un doğal konakları olarak kabul edilmektedir. Enfekte kişilerin sekresyonları ile direk temas sonucu enfeksiyon gelişir, kontamine ellerin göz ve burun mukozasına teması ve aerosoller ile de bulaş olabilir. İnkübasyon süresi normal olarak yaklaşık bir haftadır (ortalama 4.4 gün). Enfekte olduktan sonra virus nazofarinkste lokal olarak replike olur ve enfekte çocukta üç haftaya kadar devam edebilir. Virus üst solunum yolundan solunum yolunun alt bölümlerine solunum epiteli yoluyla veya enfekte sekresyonların aspirasyonu yoluyla yayılabilir. Virus atılımı enfekte çocukta birkaç gün sürebilir.

RSV enfeksiyonlarına genellikle tropikal iklimlerdeki ülkelerde yağışlı mevsimlerde rastlanır. RSV, ılıman iklimleri olan ülkelerde geç sonbaharda başlayıp kış aylarında pik yaptıktan sonra erken ilkbahara kadar devam eden soğuk aylar boyunca yıllık salgınlara sebep olur. RSV A ve RSV B alt grupları genellikle alt grup A'nın üstünlüğü ile aynı coğrafi bölgede birlikte sirküle olur^{14,15,16}.

Hastane ortamında yayılımı genellikle 3-8 gün olan ve bazen 3-4 hafta kadar uzun sürebilen RSV, major problem olarak hastane enfeksiyonlarının patlak vermesine sebep olabilir. RSV, hem immun sistemi baskılanmış ve bağışık yetişkinlerde ASYE'larından hem de yüksek riskli birimlerdeki yetişkinler ve çocuklar arasındaki nozokomiyal salgınlardan sorumludur¹⁷.

Çocuklar arasında bronşiolitin en sık sebebi olan RSV, aynı zamanda farenjit, otitis media, astım, trakeobronşit ve pnömoni de dahil olmak üzere ÜSYE ve ASYE ile ilişkilidir. RSV enfeksiyonunda akut otitis media çocuklar arasında sık görülen bir komplikasyondur. Yaşamın ilk yılında hastaneye yatış gerektiren ağır bronşiolitlerin, çocukluk dönemi boyunca ve erken yetişkinlikte tekrarlayan hırıltı ve astım gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğu görülmektedir^{15,16,18,19}.

Sıklıkla 10-14 gün süren hastalık çoğunlukla rinitle başlar ve öksürük, hırıltı ve solunum sıkıntısı ile seyreden pnömoniye veya bronşiolite doğru ilerler, fakat diğer respiratuvar viruslarda olduğu gibi önceden virusa maruz kalmış veya immun sistemi baskılanmış olan çocuklarda farklı klinik tablolar ortaya çıkabilir. Öksürük, ateş, burun akıntısı, hırıltılı solunum ve solunum sıkıntısı RSV enfeksiyonu olan çocuklarda en sık saptanan klinik bulgulardır.

Artan hastalık şiddeti ve hastaneye yatışlar için risk faktörleri prematürite, prematürlerin kronik akciğer hastalığı, konjenital kalp hastalığı, immun yetmezlik, Down sendromu, genç yaş, RSV sezonu başlangıcına yakın doğum, düşük doğum ağırlığı, anne sütü eksikliği ve yüksek RSV viral yüküdür.

Tüm dünyada çeşitli çalışmalarda kış sezonunda bronşiolit ve pnömoni olmak üzere ciddi ASYE sebebi ile hastanede yatarak tedavi gören 3 yaşın altındaki çocuklarda en sık görülen etken olarak RSV tespit edilmiştir. Bebeklerin %50-%70'i yaşamlarının ilk yılında enfekte olur ve en fazla üç yaşına kadar tüm çocuklar RSV ile enfekte olmaktadır. Primer enfeksiyonların çoğunluğu genellikle hafiftir, ancak RSV bronşiolit ve pnömoni gibi hastaneye yatış gerektirecek kadar ciddi ASYE'larına sebep

olabilir. RSV yenidoğanlarda solunum yolu hastalıklarına sebep olan en önemli etyolojik ajandır. RSV, çoğu 6 aydan küçük yaşlarda olan çocuklarda akut solunum yolu enfeksiyonu sebebi ile tüm hastaneye yatışların %20'sine varan kadarından sorumludur. Yaşamın ilk birkaç ayı içinde RSV ile enfekte olup pnömoni ve bronşiolit sebebiyle hastaneye yatırılan bebeklerin sayısında her yıl artış olur. Bazı yıllarda, RSV vakalarının sayısı diğer bütün respiratuvar virus enfeksiyonlarının toplamına yaklaşabilir^{15,16,20}.

RSV, 12 aydan büyük çocuklarda primer enfeksiyon sebebiyle hastaneye yatışlarda (%0-%1.6) ve ASYE'unun olgularında (%5.9-%21.6) bu yaştan önceki dönemlere göre daha az oranda görülmektedir.

RSV enfeksiyonunda tam koruyucu bağışıklık oluşmaz. Yaşamın ilk yılında enfekte olan çocukların %75'inden fazlasının bir sonraki yıl yeniden enfekte olması ile RSV re-enfeksiyonu yaşamın ilk beş yılında sık görülür. Önceki enfeksiyonların ve nötralize antikor titresinin artması ile re-enfeksiyon riski ve hastalığın şiddeti azalmıştır.

RSV enfeksiyonu sebebiyle ölüm oranı %0 ve %4.3 arasında olup bu ölümlerin çoğunun altta yatan kronik hastalığı olan çocuklarda meydana geldiği, hospitalize olan yenidoğanlarda ise bu oranının %0.5-%1 olduğu bildirilmiştir. RSV, 3.4 milyon hastaneye yatış ve 5 yaşından küçük çocuklarda yıllık 66000-190000 ölümden sorumludur. Gelişmekte olan ülkelerde meydana gelen bu ölümlerin %99'u ile akut ASYE'larının tahmini olarak 33.8 milyonunun sebebi RSV'dur^{11,16}.

2.1.3. Virolojik tanı

RSV, solunum yolu virusları arasında en hassas virustur, bu yüzden örnek alındıktan sonra hücre kültürüne en kısa sürede inoküle edilmelidir. Sinsitiyal hücre şeklinde sitopatik etki 36°C'de inkübasyonun 2 ve 7 gün sonrasında görülür. RSV birçok hücre hattını enfekte edebilir, ancak Hep-2, HeLa ve A549 hücreleri (Adenocarcinomic Human Alveolar Basal Epithelial cell line) RSV izolasyonu için yüksek sensitivitesi sebebiyle yaygın olarak kullanılır^{21,22}.

Tüp kültürü ile kıyaslandığında yüksek sensitiviteye sahip olan shell vial kültür yöntemi sonuçların bildirilmesinde gerekli süreyi kısaltmıştır. Shell vial kültür metodu klinik laboratuvarların çoğunda uygulanmaktadır ve DFA, Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay (ELISA) veya konvensiyonel kültür ile kıyaslandığında sensitivitesi %67 ve %92 arasında değişmektedir. Ticari mevcut R-Mix hücreleri (Diagnostic Hybrids Inc., Athens, OH) sonuç verme süresini azaltmış ve konvensiyonel kültüre göre sensitiviteyi arttırmıştır. Direkt antijen tespitinde DFA ve shell vial kültür kombinasyonu da kullanılmaktadır. Konvensiyonel tüp kültürünün sensitivitesi hızlı antijen tespit yöntemi immunfloresan test (immunfloresan assay; IFA) ile kıyaslandığında oranların %57 ve %90 arasında olduğu görülmektedir^{23,24,25,26}.

Sensitivitesi ve spesifitesi sırasıyla %70-%95 ve %90-%100 olan IFA ve ELISA gibi ticari hızlı antijen saptama testleri günümüzde birçok hastane ve sağlık merkezlerinde kullanım için mevcuttur. Mükemmel monoklonal antikorların varlığı DFA'nın sensitivitesini %80 ve %97 oranları arasında arttırmıştır. Hızlı ELISA testleri RSV tespiti için yıllardır kullanılmaktadır ve sonuçları 15-30 dakikada verme avantajı sağlamaktadır²².

Çoğunun performansları benzer olan yaklaşık bir düzine hızlı test RSV tanısı için onay almıştır, ancak sensitiviteyi DFA ve/veya RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) ile kıyaslandığında sadece %80-%85'dir. Bu testlerin spesifitesi, prevalansın daha düşük olduğu yaz aylarında çok daha düşük olmaktadır. Erişkinlerin genellikle çocuklara göre daha düşük titrelerde virus yaymaları sebebiyle sensitivitenin çocuklara göre erişkinlerde daha düşük olması diğer dikkat edilmesi gereken noktadır.

RSV tespiti için 20 yıldan bu yana geliştirilen konvensiyonel nükleik asit amplifikasyon yöntemleri (PCR) ve real-time platformu tüm dünyada RSV tanısında standart haline gelmiştir. Amplikon analizi için, jel elektroforezi, restriction fragment length polymorphism, hybridizasyon, dizi analizi ve EIA dahil farklı formatları kullanan çeşitli PCR (RT-PCR) testleri bulunmaktadır. RT-PCR yönteminde füzyon, nükleokapsid ve large polimeraz subunit genleri hedeflenmektedir. Geliştirilen testlerin çoğu kültürden daha sensitiftir. Yakın zamanda 508 örnek kullanan bir çalışmada F genini hedefleyen ticari nükleik asit sekansına dayalı amplifikasyon testi (Nucleic acid sequence based amplification; NASBA, NucliSens Easy Q RSV A ve B; BioMerieux) ayrıca DFA ve kültür yöntemleri kullanılmıştır. NASBA testinin, kültür ve DFA'dan daha sensitif olduğu ve %99 sensitivite ve %87 spesifiteye sahip olduğu gözlenmiştir^{23,31,32}.

RSV ve diğer birçok respiratuvar virusu tespit etmek için birçok multipleks test geliştirilmiştir. RSV'un 254 örnekte araştırıldığı bir çalışmada Hexaplex yönteminin (Prodesse Inc.) sensitivitesi %91 ve spesifitesi %98.6 bulunmuştur. Hexaplex testi ile 363 örneğin değerlendirildiği ikinci bir çalışmada sensitivite %98.6 ve spesifite %97.9'dur. Syrmis ve ark.³¹ influenza A virus, influenza B virus, RSV A, RSV B, PIV 1, PIV 3 ve adenovirus dahil yedi respiratuvar virusu içeren bir multipleks test geliştirmişlerdir. RSV pozitif olduğu bilinen 123 örnek ve 598 örnek kullanılarak değerlendirilen bu test kültür ve IFA yöntemlerine göre daha sensitif bulunmuştur. Yakın zamanda Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nden (Food and Drug Administration; FDA) onay almış olan ProFlu assay (Prodesse Inc.) influenza A virus, influenza B virus, RSV A ve RSV B tespiti için kullanılan multipleks real-time yöntemidir.

Son yıllarda birçok solunum yolu virusunu tespit etmek amacıyla ResPlex II assay (Qiagen), MultiCode-PLx RVP assay (EraGen Biosciences), Seeplex RV assay (Seegene Inc., Seoul, South Korea), NGEN RVA ASR kit (Nanogen Inc., San Diego, CA) ve xTAG RVP (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Ontario, Canada) gibi ticari testler geliştirilmiştir. RSV A ve B için sensitivitesi %100 olan xTAG RVP yönteminin bu viruslar için spesifitesi sırasıyla %98.4 ve %97.4'dür. MultiCode-Plx RVP yönteminin RSV tespiti için sensitivite ve spesifite oranları DFA ve R-Mix kültürü oranlarına yakın olup sırasıyla %91.7 ve %99.4'dür^{31,33}.

Birçok firma (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland; Abbott Molecular Diagnostics, North Chicago, IL; Cepheid, Sunnyvale, CA; ve Prodesse Inc., Waukesha, WI) RSV tespiti için analit spesifik reagenler (primer ve prob) geliştirmiştir, ancak bu testler yaygın olarak değerlendirilmemiştir ve performans özellikleri büyük oranda bilinmemektedir.

Özet olarak, RSV tespiti için en sensitif metod nükleik asit testleridir. Bu yöntemleri daha az sensitif olan DFA, shell vial kültür, tüp kültürü ve ELISA izlemektedir.

2.1.4. Tedavi

Aerosol olarak uygulanan ribavirin, RSV ile enfekte ASYE olan bebeklerin spesifik tedavisi için onaylanmıştır, ancak ağır hastalığı olan veya yüksek riskli ciddi hastalığı olan hastalarda tedavi için dikkat edilmesi gereken kurallar belirtilmektedir.

Yüksek riskli gruplarda RSV sebebiyle hastaneye yatış, RSV füzyon glikoproteinine karşı, monoklonal antikor olan palivizumabın kas içi uygulanması ile önlenabilir. Bu gruplarda RSV sebebiyle hastaneye yatış oranı %39-%78 azaltılabilmektedir³⁴.

Amerikan Pediatri Akademisi'ne göre kronik akciğer hastalığı ya da tıbbi tedavi gerektiren önemli konjenital kalp hastalığı olan 2 yaşında küçük çocuklar, 32 haftalık gebelik süresinden önce doğan prematüre bebekler ve ek bir risk faktörü olan ve gebeliğin 32-35 haftası arasında doğan prematüre bebeklerin RSV sezonunda palivizumab kullanması uygundur.

2.2. Adenovirus

2.2.1. Virusun yapısı

İlk adenovirus Rowe ve arkadaşları tarafından adenoid ve tonsiller doku parçalarından doku kültürü hücre hattı oluşturmaya çalışırken 1953 yılında izole edilmiştir.

Adenoviruslar, Mastadenovirus ve Aviadenovirus olmak üzere iki cinsi bulunduran Adenoviridae ailesine aittir. Aviadenovirus cinsi kuş virusları ile sınırlıdır, oysa tüm insan adenovirusları Mastadenovirus cinsine aittir. Adenovirus orta büyüklükte, zarfsız, lineer çift zincirli litik bir DNA virusudur. Yapısal olarak adenoviruslar 70-100 nm çapında, fiber benzeri çıkıntıları olan ikosahedral kapsid ile çevrili partiküllerdir. Protein kapsid 240'ı hekzon ve 12'si penton olmak üzere toplam 252 kapsomerden oluşur. Her penton tabanından çıkan anten gibi yapılar fiber olarak adlandırılmaktadır. Hekzon, penton ve fiberler viral sınıflandırma ve tanıda önemli adenoviral antijenleri oluşturmaktadır³⁵.

İnsan adenovirusların insan, sıçan ve maymun eritrositlerini aglütine etme kapasitesine ve kemirgenlerde onkojenitesine bağlı olarak A'dan F'ye kadar türlere (veya alt grup) ayrılan 51 serotipi vardır. Tüm adenovirusların genomlarında aynı

organizasyon vardır, diğer bir deyişle spesifik işlevleri kodlayan genler kromozom üzerinde aynı konumda bulunur. Adenoviral serotipler arasında yaygın işlevlere sahip proteinler için kodlama yapan DNA dizisi farklı olabilir. Bu farklılık adenoviral filogeni ve genetik çeşitlilik analizi için kullanılabilir^{35,36}.

Zarfsız viruslar gibi adenovirus da fiziksel ve kimyasal maddelere karşı oldukça dirençlidir ve yayılması için yüksek bir potansiyel oluşturan oda sıcaklığında uzun süre kalabilmektedir (en fazla 3 hafta). Virus düşük pH, mide ve safra salgılarına karşı stabildir, böylece barsakta replike olabilmektedir³⁷.

Devamlı insan hücre kültürlerinde sitopatik etki yapan adenovirus, insan hücresi olmayan kültürlerde çok düşük ya da zayıf verimde çoğalabilmektedir. Adenovirus, HeLa, KB, HEp-2, A549 ve primer human embriyonik böbrek hücreleri (human embriyonic kidney; HEK) gibi insan hücre dizilerinde çoğalmaktadır. İnsan hücresi olmayan Graham-293 hücre kültürü ve Cynomolgus maymunu böbrek hücrelerinde zayıf üreme gözlenmektedir.

2.2.2. Epidemiyoloji ve patogenezi

Adenoviruslar çok stabil olduğundan çevrede kolaylıkla yayılır. Adenovirus enfeksiyonlarına özellikle insanların yakın etkileşimde bulunduğu derslik ve askeri kışlalar gibi yerlerde sık rastlanmaktadır. Adenovirus solunum serotiplerinin bulaşması aerosoller yoluyla gerçekleşir, ancak virusun genellikle akut enfeksiyondan sonra uzun süre dışkı ile atılması fekal-oral yolun da bulaş için önemli bir yol oluşturmasını sağlamaktadır. Akut enfeksiyonu takiben adenovirus, konakta günlerce veya yıllarca latent enfeksiyon olarak kalabilmektedir. Erişkinlerde gözden birçok hafta, üst solunum yolundan bir haftaya kadar virus yayılımı gözlenmektedir. Çocuklar respiratuvar yol enfeksiyonunu takiben enterik adenovirus serotipleri 40 ve 41'i boğaz veya dışkı yoluyla 3-6 hafta yayar²².

Adenovirus enfeksiyonları bahar, erken yaz ve erken kış aylarında sık sık bildirilen salgınlar ile yıl boyunca gözlenir³⁷.

Adenovirus enfeksiyonlarının çoğuna hayatın erken döneminde rastlanır ve 10 yaşına kadar çocukların çoğu en az bir serotip ile enfekte olmaktadır. Çocuklar, immun sistemi baskılanmış hastalar, bakım evleri ve askeri kışla gibi yerlerde yaşayan kişiler

adenovirus enfeksiyonları için hasta profilini oluşturmaktadır. T hücre-aracılı bağışıklık akut enfeksiyon sonrası iyileşme için önemlidir ve etkili hücresel bağışıklığı olmayan hastalar adenovirus enfeksiyonları için yüksek risk altındadır. Organ nakli yapılan hastalarda ve özellikle hematopoetik kök hücre nakli yapılan alıcılarda ciddi yaygın adenovirus enfeksiyonu gelişebilir. Adenoviruslar hem organ hem de kemik iliği transplant hastalarında önemli ölçüde artış göstermektedir. Pediatrik transplant hastalarında adenovirus enfeksiyonlarına %60 kadar yüksek mortalite oranı ile %22'yi aşan oranda rastlanabilmektedir. İmmun sistemi baskılanmış çocukların, immün sistemi baskılanmış yetişkinlere göre adenovirus enfeksiyonuna daha duyarlı olduğu görülmektedir. Çocuklar transplantasyon sonrası ilk 30 gün içinde adenovirus ile ilişkili hastalık geliştirme eğiliminde olduğu halde yetişkinlerin transplantasyon sonrası 90 günden fazla sürede enfeksiyon geliştirdiği bildirilmiştir^{37,38,39}.

Çeşitli serotipleri ve farklı doku tropizmleri sebebiyle adenoviruslarla ilişkili hastalıklar geniş bir yelpazede gözlenmektedir. Birçok organda hastalığa sebep olmasına rağmen adenovirus yaygın olarak solunum yolu, göz ve gastrointestinal sistemi enfekte eder.

Adenovirus 1954 yılında ilk olarak atipik pnömonili bir askerden izole edildiğinde akut solunum yolu enfeksiyonu ile ilişkili bulunmuştur. O zamandan beri adenovirus, ÜSVE ve ASVE'ları, akut otitis media, faringokonjunktival ateş, sistit, konjunktivit, keratokonjunktivit ve akut gastroenterit dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyonlar ile ilişkilendirilmiştir.

Adenovirus enfeksiyonlarında sık bildirilen semptomlar ateş, öksürük, burun tıkanıklığı ve burun akıntısıdır. Serotip 1-7,11, 12, 14, 16, 18, 21, 31, 34, 35 ve 50 solunum yolu hastalıkları ile ilişkilidir. Çoğu adenovirus enfeksiyonları bağışık erişkinlerde nispeten hafif seyreder, ancak serotip 3, 7, 14 ve 21 sağlıklı yetişkinlerde şiddetli solunum yolu hastalıklarının sebep olduğu salgınlara sebep olmuştur. Adenovirus tip 1, 2, 3, 5 ve 7 üst ve alt solunum yolu hastalıklarının önemli bir sebebidir. Serotip 1-5, 7, 14, 19 ve 37 solunum yolunu enfekte ederek ateş, rinit, faranjit, öksürük ve konjunktivit dahil bir çok hafif belirti ve nadiren daha ciddi hastalıklar olan larinjit, krup, bronşiolit veya pnömoniye sebep olur. Toplum kökenli ve nozokomiyal adenovirus solunum yolu enfeksiyonu salgınları çocuk yuvaları ve bakım

evlerinde bildirilmiştir. Serotip 3 ve 7 bunların çoğundan sorumlu bulunmuştur ve ölüm oranının %12 ve %29 arasında olduğu belirlenmiştir^{40,41,42}.

Çocuklarda akut gastroenteritlerin %5-%15'i adenovirus orjinlidir ve aynı zamanda bu yaş grubunda adenovirus respiratuvar enfeksiyonunun prevalansı %2 ve %14 arasındadır. Genelde bütün solunum yolu enfeksiyonların %1-%5'inden adenovirus sorumlu olmuştur. Popülasyona bağlı olarak akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda adenovirus %4.2-%21 oranlarında tespit edilmiştir. Adenovirus, 5 yaş altındaki çocuklarda ÜSYE'lerinin yaklaşık %5'inden sorumludur, bu enfeksiyonlar sık sık hafif ve kendi kendini sınırlayan enfeksiyonlardır. ASYE ile başvuran çocuklarda ise %12.6 oranına kadar adenovirus belirlenmiştir ve üçte birinden azında başka bir solunum virusu ile birlikte koenfeksiyon şeklinde tespit edilmiştir. Adenovirus viral pnömoni sebebi olarak RSV'den sonra ikinci olarak yer almıştır. Adenoviruslar çocukluk döneminde pnömonilerin yaklaşık %10'undan sorumlu olabilir ve çoğu hastada bu ASYE'leri tedavi edilmektedir. Ancak, bazı salgınların belirli bir ölçüde ölüm ile sonuçlandığı gözlenmiştir. Tedavi olan bazı kişilerde primer enfeksiyondan yıllar sonra bronşektazi gelişebilmektedir^{35,43}.

Adenovirus enfeksiyonunun sebep olduğu pnömoni, ölüm ile sonuçlanan akciğerlerde geniş nekroz, ayrıca bronşektazi ve bronşiolitis obliterans gibi ciddi hastalıklara yol açabilir. Akciğer transplantasyonu yapılan çocuklarda akciğerlerde adenovirus enfeksiyonu gelişmesi greft kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Bronşiolitis obliterans gelişimi için risk faktörleri, hastanede uzun süreli kalış, mekanik ventilasyon ile yoğun bakım ünitesine kabul ve sistemik β -agonist ve kortikosteroid kullanımıdır⁴⁴.

2.2.3. Virolojik tanı

Adenovirus persistensi ve uzun süreli yayılımı, tanı testlerinin klinik materyalde virusun düşük düzeylerini tespit edebilmesi anlamına gelmektedir. Adenovirus enfeksiyonları birçok geleneksel ve moleküler metodlar ile tespit edilebilmektedir.

Serolojik testler adenovirus-spesifik immunglobulin (Ig) M veya artan IgG antikor düzeylerini ölçmek için yıllardır kullanılmaktadır. Ancak günümüzde seroloji, yavaş ve DNA tespitine göre daha az spesifik olması sebebiyle tanı için artık kullanılmamaktadır.

Adenovirus elektron mikroskop (EM) ile tespit edilmiştir, fakat görülmesi için 10^6 virion/ml gerektirdiğinden bu yöntem sensitif değildir. Bu sebeple virus miktarının yüksek olduğu ve EM ile kolayca tespit edildiği dışkı örneği hariç klinik örneklerde adenovirus tespiti için EM kullanılmamaktadır.

Direk antijen tespiti hızlı ve oldukça hassas olduğu için solunum yoluyla ilgili virus tanısında yaygın kullanılmaktadır. Antijen belirleme testlerinden ELISA ve lateks aglütinasyon testi genellikle dışkı örneklerinde adenovirus tespiti için kullanılmaktadır^{37,45}.

Hücre kültürü klinik laboratuvarlarda adenovirus tespiti için altın standarttır. Adenovirus çeşitli heteroploid epitelyal hücre dizilerinde iyi üremektedir. A549, Hep-2 ve HeLa gibi insan kökenli hücre kültürleri tüm klinik örneklerden adenovirus üretimi için kullanılır. Sitopatik etki oluşumu 28 güne kadar sürebilmesine rağmen genellikle 2 ile 7 günde görünür hale gelmektedir^{35,37,45}.

Ticari hazır R-Mix hücrelerini kullanan shell vial kültür yönteminde antijenler 18-48 saat sonra monoklonal antikorlar kullanılarak tanınır. Yapılan bir çalışmada, adenovirusların tespiti için 2 günde boyanan shell vial kültür yönteminin 14 günlük tüp kültürü ile kıyaslandığında sensitivitesinin sadece %50-%85 olduğu ve shell vial kültüründe adenovirusun optimal tespiti için 5 günün gerektiği gösterilmiştir^{21,22}.

Moleküler yöntemler klinik örneklerde adenovirus tespiti için en sensitif metottur. Bu testler son derece hassas ve özellikle viral yük kültür tarafından tespit edilemeyecek kadar düşük olduğunda veya hızlı bir şekilde sonuç vermek gerektiğinde uygulanabilir özelliktedir.

Çeşitli klinik örneklerin kullanılabilirdiği konvensiyonel, end-point ve real-time PCR platformları birçok klinik laboratuvarıda tanı için mevcuttur. Bazı real-time PCR protokolleri adenovirus alt tipi analizi için ticari olarak olarak mevcuttur. Bu testlerin çoğu hekzon geninin korunan bölgelerini amplifiye etmektedir^{35,46,47,48,49}.

2.2.4. Tedavi

Günümüzde adenovirus enfeksiyonu için onaylanmış bir antiviral tedavi yöntemi yoktur. Cidofovir, in vitro olarak iyi bir antiviral etkinliğe sahiptir ve bazı hayvan modelleri için kullanıldığı rapor edilmiştir. İnsanlarda cidofovirin klinik deneyimi olgu

sunumlarına dayanmaktadır. Cidofovir ciddi adenovirus enfeksiyonu olan çocuk ve erişkin hematopoetik kök hücre nakil hastalarında elde edilen farklı sonuçlar ile yaygın olarak kullanılmıştır^{50,51}.

2.3. Human parainfluenza virus

2.3.1. Virusun yapısı

PIV'lar Respirovirus (PIV 1 ve PIV 3) ve Rubulavirus (PIV 2 ve PIV 4) olmak üzere iki cinsten oluşan Paramyxoviridae ailesine aittir.

PIV'lar görünüm ve biyofiziksel özellikleri bakımından benzerdir. PIV'lar helikal bir kapsid ile çevrili, 15500 nükleotid uzunlukta, negatif polariteli, tek sarmallı, segmentsiz RNA genomu içeren zarflı partiküllerdir. Bu viruslar ortalama 150-200 nm çapa sahip, büyük, pleomorfik, küresel virionlardır. Bazı vakalarda PIV 2 ipliksi formda görülmüştür. Virus zarfının yüzeyinde hemaglutinin ve nöraminidaz glikoproteini veya F transmembran glikoprotein çıkıntıları bulunur⁵².

PIV'ların insanlarda hastalığa sebep olan beş alt tipi vardır (tip 1-3, 4a ve 4b) ve PIV 1-3 insanlarda en önemli olan tiplerdir. Bu üç alt tip tüm dünyada ve her yaş grubundan kişiler arasında gözlenmektedir. PIV 4A ve 4B çok daha az görülen alt tiplerdir.

PIV 2, ilk olarak akut laringotrakeobronşiti (krup) olan iki bebekten 1956 yılında izole edilmiştir. PIV 3, ilk olarak akut solunum yolu hastalığı olan 35 çocuktan izole edilirken PIV 1, krup ile başvuran üç bebekten izole edilmiştir. PIV 4 ilk kez 1960 yılında akut ÜSYE belirtileri olan erkek üniversite öğrencisinden izole edilmiştir.

PIV, primer rhesus maymun böbrek hücrelerinde veya LLC-MK2 (rhesus maymun böbrek hücresi) devamlı hücre dizisinde üretilir. PIV 1, 2 ve 3 embriyolu tavuk yumurtasında çoğalabilir, ancak yumurta, hasta örneklerinden virus izolasyonu için güvenilir ve duyarlı değildir^{24,52}.

2.3.2. Epidemiyoloji ve patogenezi

Ilıman iklimlerde salgınlar çoğunlukla sonbahar aylarında olmaya meyillidir. PIV'ların mevsimsel epidemiyolojisi tipine bağlıdır.

PIV 1, genellikle iki yılda bir sonbahar ve kış başlarında salgın meydana getirmektedir. Sonbahardan erken kışa kadar geçen iki yıllık dönemde PIV solunum yolu enfeksiyonu vakalarının %9.5 ile %36.4'ünde PIV 1 tespit edilmiştir.

PIV 2, sporadik olarak ortaya çıkar ve geç sonbahar ve kış aylarında daha küçük pikler ile benzer mevsimsel dağılıma sahiptir ve olguların %3.1-%12'sinden sorumlu olmuştur.

PIV 3, yıl boyunca endemik olarak görülebilir, fakat ılıman iklimlerde kış ve ilkbahar aylarında yıllık salgınlar oluşturma eğilimindedir. Her yıl yaz ve bahar aylarında pik ile PIV 3 en sık tespit edilen PIV (%74.4-%37.5) olmuştur.

Daha düzensiz ve nadiren meydana geldiği bildirilen PIV 4, PIV 1 ve PIV 2'ye benzer olarak, sonbahar ve kış aylarında daha sık tespit edilebilmektedir. PIV 4, %1.1-%15.6 tespit oranları ile en azından PIV 2 kadar yaygın olabilmektedir⁵³.

PIV'lar hafif ÜSVE'larından yatış gerektiren ciddi ASYE'larına kadar çok çeşitli hastalıklara sebep olabilmektedir. Grup olarak PIV'lar, hospitalizasyon gerektiren nonbakteriyal respiratuvar hastalıkların %15-%30'undan sorumludur. Hastalığın başlangıcı akut spazmodik öksürük ile ani veya hafif belirtilerle başlayıp 1-3 günde alt solunum yolunu tutar. Akut hastalığın süresi 1-3 hafta arasında değişir, fakat genellikle 7-10 gün sürmektedir. Önemli bir kısım (%30-%50) akut otitis media ile ilişkili olmasına rağmen PIV enfeksiyonlarında klinik bulgular geneldir ve çoğu ÜSVE ile sonuçlanır. PIV enfeksiyonlarının yaklaşık %15'i akut ASYE'larına sebep olmaktadır. Soğuk algınlığı benzeri semptomlar ile ÜSVE'larından sorumlu olan PIV, vakaların yaklaşık %25'inde alt solunum yolu solunum yolunun aşağı kısımlarına yayılarak ve bronşiolit, pnömoni gibi hastaneye yatış gerektiren ciddi ASYE'larına sebep olmaktadır. Birçok solunum virusu gibi PIV, bağışıklık sistemi baskılanmış özellikle hematopoetik kök hücre nakil ve solid organ nakil hastalarında görülen ciddi hastalıklarda rol oynamaktadır. RSV'a benzer olarak PIV'lar, küçük çocuklarda, aynı zamanda yaşlılarda ve kemik iliği alıcıları dahil immun yetmezlikli hastalarda ASYE'na sebep olan etkenlerdir^{52,54,55}.

PIV 1, yenidoğanlarda ve küçük çocuklarda akut krupun major sebebidir, ancak aynı zamanda bütün yaş gruplarında hafif ÜS YE, farenjit ve trakeobronşite sebep olur.

PIV 2 genellikle PIV 1 veya PIV 3'e göre daha düşük enfeksiyon oranları ile ilişkilidir ve çocuklarda bronşiolit, hafif ÜS YE, krup ve nadiren ASYE'larında rol oynamaktadır. Bazı çalışmalar, krup sebebiyle hastaneye yatışta oranlarında en yüksek seviye ve aynı zamana rastlayan PIV aktivitesinde pik ile özellikle PIV 1 ve PIV 2 olmak üzere PIV enfeksiyonları ve krup enfeksiyonu arasında bir ilişki kaydetmiştir.

Serolojik araştırmalar çocukların en az %60'ının 2 yaşlarında PIV 3 ile ve yaklaşık %80'inin 4 yaşlarında enfekte olduğunu göstermektedir. PIV 3 ile enfekte çocuklarda, PIV 1 veya PIV 2 enfeksiyonu olanlardakine göre daha sık akut otitis media geliştirmektedir. PIV 3 yenidoğanlar ve küçük çocuklarda ciddi ASYE'nun major sebebidir, sıklıkla 1 yaş altı çocuklarda krup, bronşit ve viral pnömoniye sebep olur. Daha büyük çocuklarda ve erişkinlerde ASYE veya trakeobronşite sebep olmaktadır. Pnömoni ve bronşiolit gibi ASYE'ları ile ilişkili olan PIV 3, pnömonisi olan çocuklarda %73.6 oranına kadar tespit edilmiştir. PIV 3, yenidoğan ünitesinde menenjit salgınından sorumlu olmuştur. PIV 3'ün sebep olduğu hem ÜS YE hem de ASYE'ları hematopoetik kök hücre ve solid organ transplantasyon hastaları dahil immun sistemi baskılanmış çocuklarda ve yetişkinlerde tespit edilmiştir⁵².

Parainfluenza grubunun en az yaygın olanı PIV 4 hafif ÜS YE ile ilişkilidir. Genellikle burun akıntısı, farenjit ve öksürük gibi üst solunum yolu hastalıklarının hafif belirtileri PIV 4 enfeksiyonlarında görülmektedir. PIV 4, febril konvulsiyon veya aseptik menenjiti olan çocuklarda da tespit edilmiştir⁵⁶.

PIV'ların bulaşma yolları influenza virusunkine benzer, buna karşılık genetik yapıları antijenik drift veya shifte uğramaz. PIV, aynı koğuştta tedavi gören çocuk hastalar arasında nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olabilmektedir.

PIV ile primer enfeksiyon bir ölçüde bağışıklık sağlar, ancak bu bağışıklık tam veya uzun süreli değildir ve tekrarlayan enfeksiyonlar sık olarak ortaya çıkar ve genellikle hafif seyreden hastalık nadiren primer enfeksiyonda görülen hastalıklar kadar şiddetli olmaktadır.

2.3.3. Virolojik tanı

PIV enfeksiyonları virus izolasyonu, DFA ile viral antijen tespiti, nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) ile RNA tespiti veya hemaglutinasyon inhibisyon testi gibi serolojik testlerle belirlenmektedir⁵⁷.

Primer rhesus maymun böbrek hücreleri, devamlı maymun böbrek hücre dizisi LLC-MK2, Buffalo yeşil maymun böbrek hücreleri (BGMK), A549 ve MRC-5 hücreleri dahil birçok yaygın kullanılan hücre dizileri PIV'ların üremesini desteklemektedir. R-Mix hücrelerinin kullanıldığı shell vial kültür ve viral antijenler için sitopatik etki öncesi boyama klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. PIV klinik izolatları, doku kültürlerinde primer izolasyon sırasında nadiren sitopatik etki gösterir. Bazı PIV'lar, inokülasyondan 7 ila 10 gün sonra değişen derecelerde sitopatik etkiye sebep olur. PIV varlığı, tek tabakalı hücre kültürü üzerine kobay kırmızı kan hücrelerinin hemadsorbsiyonu ile gözlenmektedir. İmmunfloresan ile PIV, hücre kültürlerinde erken tespit edilir ve bu yöntem daha güvenilirdir. Dört hücre dizisini (BGMK, A549, MRC-5 ve primer maymun böbrek hücreleri) kullanan shell vial kültür geleneksel hücre kültürü ile kıyaslandığında 38 PIV-pozitif örnekten 33'ünü (87%) tespit etmiştir.

Nazofaringeal örneklerde doğrudan PIV antijen tespiti ELISA ve immunfloresan yöntemleri gibi immunolojik testler ile yapılmaktadır. Araştırmacılar bu testlerin sensitivitesinin %75-90 arasında değiştiğini bildirmiştir. Birçok laboratuvar da viral antijenler, nazofaringeal epitelyum hücrelerinde monoklonal antikorların panelini kullanan DFA ile tespit edilmektedir. Hücre kültürü ile kıyaslandığında DFA'nın sensitivitesi kullanılan reagentlere bağlı olarak laboratuvarlar arasında %70-%83 arasında değişmektedir. Dunn ve ark.²⁶ yakın zamanda yaptıkları bir çalışmada yedi respiratuvar virus için R-Mix hücrelerini kullanan shell vial kültür yöntemi ve DFA'nın sensitivitesini karşılaştırdıklarında DFA testinin %70.5, oysa shell vial kültürün %96.7 sensitivitesi olduğunu göstermişlerdir. İki floresan boya kullanan monoklonal antikor havuzları PIV tip 1, 2 ve 3 (SimulFluor reagents; Chemicon International, Temecula, CA) tespiti için kullanılmaktadır. Bu reagentler direk örnek testi ve kültürün doğrulanmasında FDA tarafından onaylanmıştır. SimulFluor reagentleri tek antikorla kıyaslandığında mükemmel sensitivite ve spesifiteye sahiptir. Antijen tespiti için

spesifik antikorlar henüz onaylanmadığından PIV 4 laboratuvarların çoğunda tespit edilememektedir⁵².

Moleküler amplifikasyon yöntemleri, klinik örneklerde PIV saptanması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle RT-PCR, farklı örneklerde az sayıda virus tespit etmek için kolay ve verimli bir şekilde kullanılabilir. Son zamanlarda PIV ve aynı zamanda RSV, influenza A ve B virus ve adenovirus gibi diğer solunum yolu viruslarını da tespit etmek için multipleks RT-PCR kullanılmaktadır. PIV tespiti için bildirilen çoğu NAAT'nin sensitivitesinin kültür ile kıyaslandığında yüksek olduğu görülmüştür^{22,58,59}.

Yakın zamanda, influenza virus ve diğer respiratuvar virusların tespiti için ResPlex II assay (Qiagen), MultiCode-PLx RVP assay (EraGen Biosciences), Seeplex RV assay (Seegene Inc., Seoul South Korea), NGEN RVA ASR kit (Nanogen Inc., San Diego, CA) ve xTAG RVP assay (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Ontario, Canada) olmak üzere ticari multipleks testler geliştirilmiştir. xTAG RVP test PIV 1 ve PIV 2 için %100, PIV 3 için %84.2 sensitif ve üç tip için %99 üzerinde spesifiktir.

2.3.4. Tedavi

Günümüzde PIV için spesifik bir antiviral tedavi kullanılmamaktadır.

2.4. Human metapneumovirus

2.4.1. Virusun yapısı

HMPV, ilk olarak Hollanda'da solunum yolu enfeksiyonu olan 28 çocuğun nazofarinks salgılarından virus izole edildikten sonra van den Hoogen ve ark.⁶⁰ tarafından 2001 yılında tanımlanmıştır. HMPV'unun dünyada yayılmış ve en az 50 yıldır dolaşan, keşfedilmemiş bir virus olduğu gösterilmiştir. HMPV, 2001 yılından bu yana ÜSYE ve ASYE olan çocuk ve yetişkinlerden tüm dünyada izole edilmiştir^{15,61}.

RSV ile birlikte Paramyxoviridae ailesi ve Pneumovirinae alt familyasının (en önemli üyesi RSV) bir üyesi olarak bulunan hMPV Metapneumovirus cinsinin ilk insan patojenidir. HMPV, nükleokapsidinde negatif polariteli, tek zincirli RNA içeren pleomorfik zarflı bir virustur. HMPV virionları 150-600 nm büyüklüğündedir. Genom

sekanslama ve filogenetik analizlere dayanarak hMPV'unun A ve B olmak üzere adlandırılan en az iki farklı alt gruba (A1 ve A2, B1 ve B2) sahip iki genotipi vardır^{60,62}.

HMPV, rhesus LLC-MK2 hücreleri veya Afrika yeşil maymun vero hücrelerinde izole edilebilmektedir, ancak üreme yavaş ve sitopatik etki RSV'dan daha az belirgindir.

2.4.2. Epidemioloji ve patogenezi

Tüm dünyada yıl boyunca görülebilen hMPV enfeksiyonlarında en yüksek insidans kış ve bahar aylarında meydana gelmektedir. HMPV salgınları sıklıkla RSV kış salgınları ile birlikte veya birbirini izleyen salgınlar şeklinde görülür. HMPV tespitinin yapıldığı çalışmalarda birkaç mevsim boyunca karşılaştırma yapılmış ve araştırmacılar yıldan yıla anlamlı farklılıklar bulmuştur. Genotiplemenin yapıldığı çalışmalarda baskın genotip yıldan yıla değişmiştir. Ancak bazı çalışmalarda, sporadik hMPV enfeksiyonlarının yıl boyunca oluşabildiği gösterilmiştir^{15,53,61,63}.

HMPV enfeksiyonlarında inkübasyon süresi 3 ile 5 gündür. Viral yayılma dönemi tespit edilmemiştir, ancak bebeklerde primer enfeksiyon sonrasında izleyen haftalarda görülebilmektedir. Bulaşma büyük parçacıklı aerosoller, damlacıklar veya kontamine olmuş yüzeylerden alınan respiratuvar salgıları ile temas sonucu olur.

HMPV enfeksiyonları RSV'a göre biraz daha büyük yaş gruplarında ortaya çıkmaktadır. Çoğu çalışma RSV enfeksiyonu olan çocukların yaş ortalamasının altı aydan az iken hMPV enfeksiyonunda 6 ile 24 ay arasında olduğunu göstermiştir. Hollanda'da yapılan seroprevalans çalışmaları populasyonun çoğunun 5 yaşına kadar hMPV ile enfekte olduğunu göstermiştir, ancak enfeksiyonlar tüm yaş gruplarında ortaya çıkabilmektedir⁶³.

HMPV enfeksiyonları, hafif ÜSVE, bronşiolit ve mekanik ventilasyon gerekebilen pnömoni arasında değişen belirtiler ile tüm yaş gruplarında yaygındır. HMPV, soğuk algınlığı ile ilişkili hafif nezleden, şiddetli öksürük, ateş, hırıltı, bronşiolit ve pnömoniyeye kadar değişen belirti ve bulgular ile RSV enfeksiyonlarındakine benzer klinik tablolara sebep olmaktadır. Astım alevlenmeleri olan hastaların önemli bir sayısında hMPV enfeksiyonu olmasına rağmen, hMPV'unun uzun vadeli hırıltıda oynadığı rol belli değildir^{64,65}.

HMPV immun sistemi baskılanmış hastalarda, malignite ve hematopoetik kök hücre nakil hastalarında şiddetli ve fetal enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Bir çalışmada human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) ile enfekte ve HIV-1 ile enfekte olmayan çocuklarda hMPV enfeksiyonu incelenmiştir. ASYE olan HIV-1 ile enfekte çocukların HIV-1 ile enfekte olmayan gruba göre daha küçük bir yüzdesinde (%11.1 karşı %5.4) hMPV tespit edilmiş olmasına rağmen hastaneye yatış HIV-1 ile enfekte grupta 5.4 kat daha fazla olmuştur^{66,67}.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda prevalansda varyasyonlar kaydedilmiştir. Moleküler tanı testleri kullanılan son yayınlar ikili enfeksiyonlarda %4.8 ve %30 arasında değişen önemli oranlarda sıklıkla hMPV'unun varlığını göstermiştir^{68,69}. HMPV ile en sık tespit edilen viruslar RSV, influenza virus ve rhinovirus olmuştur. Semple ve ark.⁷⁰ tarafından yapılan bir çalışmada, ağır bronşiolit ile yoğun bakım ünitesine başvuran çocukların %72'si hMPV ve RSV ile ikili olarak enfekte olurken, genel pediatri bölümündeki orta şiddete hastalığı olan çocukların sadece %10'unda koenfeksiyon görülmüştür^{15,22}.

Çocuklarda ASYE etkeni olarak hMPV, RSV ve influenza A'dan sonra ikinci veya üçüncü sırada yer almaktadır. HMPV enfeksiyonu, pediatrik alt solunum yolu hastalıklarının yaklaşık %2-%12'sini ve erişkinlerde daha az bir yüzdesini oluşturmaktadır.

2.4.3. Virolojik tanı

HMPV enfeksiyonları seroloji, virus izolasyonu ve antijen veya nükleik asit tespiti dahil çeşitli yaklaşımlar kullanılarak tanımlanabilmektedir.

HMPV, tertiary maymun böbrek veya LLC-MK2 hücrelerinde iyi ürer ve küçük yuvarlak, granüler ve büyük sinsityum oluşturmaksızın refraktil hücrelerden oluşan orta düzeyde bir sitopatik etki oluşturur. Hücre kültürlerinde izolasyon birçok laboratuvar da rutin olarak kullanılmamaktadır. Hücre kültürünün en büyük dezavantajı, virus tanımlamak için gerekli olan sürenin uzunluğu ve zayıf sensitivitesidir. Ebihara ve ark.⁷¹ 637 örnek kullanarak PCR ve kültür yöntemlerini karşılaştırdıkları bir çalışma yapmışlardır. Bu uygulamada 637 örneğin 57'si (%8.9) RT-PCR ile hMPV-pozitif, kültür ile 268 örneğin sadece 7 si (%2.6) virus pozitif bulunmuştur. Landry ve ark.⁷²

shell vial kültürde A549, HEp-2 ve LLC-MK2 hücrelerini değerlendirmek için ticari olarak satılan monoklonal antikor (MAB8510, Chemicon) kullanmışlardır. Sonuç olarak her üç hücre dizisinin de eşit olarak 2. günde hMPV'ünü tespit ettiğini göstermişlerdir. HMPV için R-Mix hücreleri ve spesifik monoklonal antikor kullanan shell vial kültür metodu (Diagnostic Hybrids Inc., Athens, OH) yakın zamanda getirilmiştir. Bir çalışmada, shell vial kültürün sensitivitesi tüp kültürü ile kıyaslandığında %100 oranında bulunmuştur⁷³.

HMPV antikorı tespiti için ELISA kullanılır, ancak enfeksiyonların tanısı için serolojinin kullanışlılığının sınırlayıcı olması sebebiyle antikor tespiti RT-PCR sonuçları ile iyi bir korelasyon göstermemiştir.

Moleküler testler hMPV tespiti için kullanılan en sensitif methodur. Konvensiyonel ve real-time RT-PCR yöntemleri yüksek sensitivite ve spesifiteleri sebebiyle tanı için birçok laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Günümüzde RT-PCR testleri hMPV tespiti için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Polimeraz (L), matriks (M), füzyon (F) veya nükleoproteini (N) genlerini içeren çeşitli amplifikasyon hedeflerini kullanan birçok NAAT tarif edilmiştir. Van den Hoogen ve ark.⁷⁴ hMPV tespiti için ilk RT-PCR testini tarif etmiştir. Bu PCR polimeraz (L) geninin 171 bp fragmanı amplifiye eder. Boivin ve ark.⁷⁵ hMPV'unun 38 izolatını tanımlamak için F gen (759 bp) ve M gen (780 bp) bölgesini amplifiye eden RT-PCR testlerini bildirmiştir. Ertesi yıl, MacKay ve ark.⁷⁶ N gen primerlerini kullanarak plate hibridizasyon assay ve real-time LightCycler yöntemini bildirmişlerdir. Co'te' ve ark.⁷⁷ beş hedef gen için PCR testleri geliştirmiş ve pozitif 20 örnek kullanarak N ve L gen testlerinin M, P ve F genleri ile yapılan testlere göre daha sensitif olduğunu göstermişlerdir. Greensill ve ark.⁷⁸ tarama testi olarak M gen testini (120 bp) ve bu testi izleyen F (134 bp), N (325 bp) ve M (331 bp) genlerini hedefleyen doğrulayıcı testi kullanmışlardır. İyi optimize edilmiş NAAT'ler ile hMPV'unun 0.01 %50 doku kültürü enfektif dozunu (%50 tissue culture infectious dose; TCID₅₀) tespit mümkün olmuştur. HMPV için NASBA testi RT-PCR'a göre biraz daha az sensitiftir. RT-PCR için 50 kopya ile karşılaştırıldığında NASBA, 100 kopyalık bir eşik değere sahiptir. HMPV için farklı PCR testlerinin sensitivite ve performanslarını değerlendiren çalışmalardan Maertzdorf ve ark.⁷⁹ N geni için bir real-time test geliştirmişlerdir. Bu real-time testinin orjinal L gen (171 bp) testinden 10 kat daha sensitif olduğunu ve dört genotipin hepsini

eşit sensitivitede tespit edebildiğini göstermişlerdir. Dare ve ark.⁸⁰ N genini hedefleyen real-time RT-PCR yöntemi ile dört genotipin tespit edilebileceğini göstermişlerdir. Kantitatif real-time PCR testleri aynı zamanda respiratuvar örnekte viral yükleri ölçmek için kullanılmaktadır. Kuypers ve ark.⁸¹ her ml'de hMPV viral yükünün 4.4×10^4 ve 6.7×10^7 kopya arasında değiştiğini göstermişlerdir.

DFA testleri olarak Diagnostic Hybrids D3 Ultra 8 DFA respiratuvar virus tespiti, MPV-spesifik DFA testi (Diagnostic Hybrids Inc., Athens, OH), Imagen hMPV DFA test (Thermo Fisher Scientific, Ely, United Kingdom) ve Chemicon SimulFluor hMPV DFA testi (Millipore Corporation) kitleri bulunmaktadır. PCR için mevcut problemler ve primerler NucliSens hMPV primer-prob karışımı (BioMerieux, Durham, NC), Nanogen RVA ASR (Nanogen Inc., San Diego, CA), Pro hMPV Real Time test RUO (Prodesse Inc.), Qiagen RUO ResPlex II panel (Qiagen, Hamburg, GmbH) ve Seeplex RV kiti (Seegene Inc., Seoul, South Korea) bulunmaktadır.

Birçok respiratuvar virusu belirleyebilen ticari multipleks testler kullanarak hMPV tespit edilebilmektedir. Bu testler ResPlex II (Qiagen), MultiCode-PLx respiratuvar virus panel (EraGen Biosciences), Nanogen RVA ASR (Nanogen) ve xTAG RVP testidir (Luminex Molecular Diagnostics). HMPV için XTAG RVP testi tek FDA onaylı moleküler testtir ve ayrıca %96 sensitivite ve %98.6 spesifiteye sahiptir.

2.4.4. Tedavi

HMPV enfeksiyonları için kullanılan özel bir antiviral tedavi yoktur, ancak Ribavirin durumu ağır olan hastalarda kullanılmıştır. Ribavirin in vitro çalışmalarda hMPV ve RSV'una karşı eşit antiviral aktivite göstermiştir⁸².

2.5. Human coronavirus

2.5.1. Virusun yapısı

HCoV, Torovirus cinsi ile birlikte bulunduğu Coronaviridae ailesinde iki cinsten biri olarak sınıflandırılmıştır.

HCoV'un adı, 1967'de tarif edildiği gibi elektron mikroskopunda görülen zarfın yüzeyindeki uzantılar taç benzeri bir görünümde olduğundan verilmiştir. HCoV'lar,

segmentsiz, pozitif polariteli, tek sarmallı RNA virusları olup, 27 ila 32 kb'lık bir genom ile bütün RNA viruslarının en büyüğüdür. Yaklaşık 100-160 nm çapında küresel, zarflı partiküller olan HCoV'ların nükleokapsidi helikal bir şekle sahiptir. Virus kapsid dışında belirgin iki farklı yüzey çıkıntısı bulunan bir lipoprotein zarf ile çevrelenmiştir. Hemaglutinin esterase glikoproteinden oluşan kısa çıkıntılar sadece bazı HCoV'larda mevcutken yaklaşık 20 nm uzunluğunda olan uzun çıkıntılar tüm HCoV'lar üzerinde bulunmaktadır. Zarf, transmembran glikoprotein (M glikoprotein) ile bir zarf proteini (Protein E) içermektedir^{83,84}.

HCoV'ların ilk olarak 1965 yılında Tyrell ve Byone tarafından kültürü yapılmıştır. Bugüne kadar global yayılımı olan altı insan HCoV türü tarif edilmiştir.

Hafif, kendi kendini sınırlayan ÜSYE etkeni olarak ilk iki HCoV, HCoV OC43 ve HCoV 229E 1960'ların ortalarında soğuk algınlığı geçiren kişilerden izole edilmiştir İlk olarak 1965-1967 yılında HCoV 229E ve kısa bir süre sonra HCoV OC43 keşfedilmiştir. Her iki suşun sağlıklı erişkin gönüllüleri içeren çalışmalarda soğuk algınlığı benzeri hastalıkların yaklaşık üçte birinin sebebi olduğu kanıtlanmıştır. Gönüllülerde aşılama sonrası halsizlik ve burun akıntısı gibi tipik soğuk algınlığı belirtileri gelişmiş ve belirtiler genellikle bir haftadan daha az sürmüştür. HCoV 229E'nin kuru katı yüzeyler üzerinde 3 saate kadar ve oda sıcaklığında, tuzlu su çözeltisinde 6 güne kadar yaşayabilmesi enfeksiyon kontrol hekimlerini endişelendirmektedir.

Çin'in güneyinde Guangdong eyaletinde 2002-2003'de kış boyunca hızla dünyaya yayılarak insanlarda ağır akut solunum yolu sendromuna (Severe acute respiratory syndrome; SARS) sebep olan ölümcül yeni bir virus ortaya çıkmıştır. HCoV olarak hızlı bir şekilde tanımlanan bu etken daha sonra SARS-CoV olarak isimlendirilmiştir. SARS-CoV, alt solunum yolunu enfekte eden, ateş, kuru öksürük, dispne, baş ağrısı ve hipoksemiye sebep olan bir HCoV olarak belirlenmiştir. Mart 2003 tarihinde, hastalık tüm dünyada yayılmış ve Temmuz ayında 32 ülkede 800'den fazla ölüme yol açmış ve 8000'in üzerinde kişi enfekte olmuştur. Salgın Ağustos 2003'de kontrol altına alınmış ve ek sporadik vakalar 2003 kış ve 2004 erken ilkbahar döneminde meydana gelmiştir. SARS-CoV'un keşfi ile human HCoV'larına ilgi artmıştır⁸⁵.

SARS-CoV'un keşfi yeni HCoV'lar için yapılan sistematik araştırmaları tetiklemiştir. Hollanda'da 2004 yılında yeni bir HCoV nezle, konjunktivit, ateş ve

bronşiolit ile tutarlı akciğer grafisi olan 7 aylık bir erkek çocuktan izole edilmiştir ve bu virus HCoV NL63 olarak adlandırılmıştır. Virus, HCoV OC43 ve HCoV 229E'den ayrımını yapan tertiary maymun böbrek hücrelerinde üremektedir. Genomun dizi analizi, rekombinant bir virus olmadığını göstermiş, ancak bilinen bütün HCoV'lardan genetik olarak farklı olduğu bildirilmiştir. HCoV NL63, aynı yıl Hollanda'da bağımsız bir araştırmada, pnömonisi olan bir çocuktan da izole edilmiştir. İlk vakayı takiben, NL63 beş çocuk ve ikisi immun yetmezliği olan üç erişkinde tespit edilmiştir.

Temmuz 2003'de geçmeye başlayan SARS salgınından sonra, araştırmacıların HCoV'lara genel olarak artan ilgisi ek olarak HCoV NL63 ve HCoV HKU1'in tanımlanmasını sağlamıştır. HCoV'un sonradan tanımlanan alt tiplerinin her ikisi de insanlarda hastalığa sebep olduğunun gösterilmesinden bu yana tüm dünyada bir yayılım göstermiş ve filogenetik analizler onların eski virusların yerine yeni ortaya çıkan viruslar olduğu kanıtlanmıştır^{86,87}.

Üçüncü bir yeni HCoV, HCoV HKU1, 2005 yılı Ocak ayında bir iki günlük ateş ve öksürük öyküsü ile başvuran kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan yaşlı bir yetişkinden Hong Kong'da izole edilmiştir. Bu kişide ateş, öksürük ve düzensiz infiltratlar gösteren akciğer grafisi gözlenmiştir. Virus üretmeye yönelik girişimler başarısız olmuştur, fakat pol gen konsensus primerleri kullanılarak RT-PCR yöntemiyle nazofaringeal aspiratta HCoV RNA tespit edilmiştir. İkinci bir Hong Kong vakası bilinmeyen etyolojili 35 yaşında pnömonili bir kadında görülmüştür. İzleyen yılda Avustralya Brisbane'den bir rapor kış boyunca solunum yolu enfeksiyonlu 10 çocukta HKU1 tespit edildiğini belirtmiştir. Her iki yeni insan HCoV keşfinden bugüne tüm dünyada ÜSYE ve ASYE olan hem yetişkinler hem de çocuklardan izole edilmiştir^{88,89}.

Yakınlarda keşfedilen Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) ise Betacoronavirus cinsine ait yeni bir HCoV'tur. İlk olarak ağır pnömonisi olan iki hastada Eylül 2012'de Suudi Arabistan'da izole edilmiştir. MERS-CoV enfeksiyonu 7 Mayıs 2013 günü, Birleşik Arap Emirlikleri gezisinden dönen bir hastadan Fransa'da tespit edilmiştir. Olası diğer durumlarda virüsü tespit ve insandan insana geçişini önlemek amacıyla olayla ilgili araştırma Birleşik Arap Emirlikleri'ne bu hastayla birlikte seyahat eden kişiler arasında ve hastalık başlangıcından bu yana temasta bulunduğu kişiler arasında gerçekleştirilmiştir. Diğer bir amaç hastanın yaptığı seyahat sırasında virusa maruz kalmasında herhangi bir olası durumu belirlemek olmuştur.

MERS-CoV enfeksiyonu 30 Mayıs 2013 itibariyle, laboratuvar testleri ile doğrulanmış 50 vakayla tüm dünyada meydana gelen bir enfeksiyon haline gelmiştir. Yüksek vaka-ölüm oranı (%60; 30 ölüm) ve insandan insana artan bulaş ile MERS-CoV küresel sağlık için bir tehdit oluşturmaktadır.

Genotipik ve serolojik özelliklerine göre, HCoV'lar üç ayrı gruba ayrılır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, yeni keşfedilmiş HCoV'ların kısmi ve tam genom dizilerinin filogenetik analizlerine dayanarak grup 1 ve 2 içinde yeni alt gruplar gözlenmiştir. Grup 1 ile 2 memelilerden ve grup 3 kuşlardan izole edilmiştir. Ayrıca, Güney Çin'de Pars kedisi (*Prionailurus bengalensis*) ve Çin porsuğundan (*Melogale moschata*) tanımlanan yeni HCoV'un kısmi genom dizilerinin filogenetik analizleri, spike protein grup 1 HCoV'lar ile yakınken, yapısal proteinler ve replikaz genlerinin grup 3 HCoV'lar ile en yakın ilişkide olduğunu göstermiştir. HCoV 229E, HCoV OC43, SARS-CoV, HCoV NL63, HCoV HKU1 ve MERS-CoV olmak üzere altı HCoV vardır. HCoV 229E ve HCoV NL63 Grup 1 HCoV, HCoV OC43, SARS-CoV, HCoV HKU1 ve MERS-CoV grup 2 HCoV'lardır. Üç farklı HCoV HKU1 genotipi (genotip A, B ve C) identifiye edilmiştir. İtalya ve Avustralya'daki çalışmalarda genotip A ve B, genotip C'den daha yaygın olarak tespit edilmiştir. Çoğu HCoV'lar sadece bir hayvan türünü veya sınırlı sayıda yakın ilişkili türleri enfekte eder. SARS-CoV bir istisnadır. İnsan dışı primatlar, Himalaya palmiye misk kedisi, rakun köpek, kedi, köpek, kemirgenler ve insanlar da dahil olmak üzere memelilerin geniş bir yelpazesinin bu virus ile enfekte olduğu gösterilmiştir^{90,92}.

2.5.2. Epidemiyoloji ve patogeneze

İnsanlarda HCoV enfeksiyonu solunum salgıları ile virusun üst solunum yolu mukoz membranına inokülasyonu veya enfekte damlacık inhalasyonu ile oluşmaktadır.

HCoV'larının en yüksek enfeksiyon oranları kış ve erken ilkbaharda kaydedilmektedir. Tropikal iklimlerde HCoV'ları yıl boyunca tespit edilmiştir. Ilıman iklimlerde HCoV OC43 ve HCoV HKU1 enfeksiyonları daha sık geç sonbahar ve erken kış, HCoV NL63 enfeksiyonları ise Kasım'da pik ile kış ve erken ilkbahar aylarında ağırlıklı olarak meydana gelmektedir. Mevsimsellik subtropikal Hong Kong'da daha sık yaz ve sonbaharda saptanan HCoV NL63 dışında çok benzerdir. Hollanda'daki ilk

raporlardan beri tüm dünyada bulunan, HCoV NL63 sadece Hong Kong'da bahar ya da yaz aylarında görülmektedir. Bu durum NL63 enfeksiyonlarının mevsimselliğinin tropikal ve subtropikal iklimlerde farklı olabileceğini düşündürmektedir⁹³.

Diğer HCoV vakalarında olduğu gibi HCoV NL63 için viral atılım uzun süreli olabilmektedir. Virus enfekte çocukların %50'sinde ilk enfeksiyondan sonra 3 hafta süre ile solunum yolu örneklerinde bulunmaktadır. Bu gözlem, nozokomiyal enfeksiyonların kontrolü için önemlidir⁹⁴.

HCoV tüm yaş gruplarını etkiler, fakat çocuklarda daha sık görülmektedir. Çoğu çalışmada enfeksiyonların en yüksek oranı 5 yaşın altındaki çocuklarda tespit edilmiştir. Brisbane'de 2 yaşın altındaki çocukların HCoV HKU1 enfeksiyonlarına çok duyarlı olduğu belirlenmiştir.

SARS-CoV diğer HCoV enfeksiyonları ile karşılaştırıldığında farklı klinik tabloya sebep olmaktadır. Hastalığın odağı akciğer olmasına rağmen lökopeni, panlenfopeni ve trombositopeni gibi laboratuvar bulguları, ateş ve kas ağrısı ile sistemik bir yayılma ilk klinik tablodur. Öksürük ve nefes darlığı genellikle birkaç gün sonra oluşur ve yetişkin solunum sıkıntısı sendromu gibi ciddi solunum semptomları hastalığın seyri süresince geç gelişebilmektedir. HCoV'un inkübasyon süresi diğer viruslara göre daha uzun olup 4-7 gündür (en fazla 10-14 gün).

HCoV'ların, immun sistemi baskılanmış hastalar dışında insanlarda soğuk algınlığına sebep olduğu bilinmektedir. Çoğu HCoV enfeksiyonları hafif bir ÜSİYE'na sebep olsa da bebeklerde bronşiolit ve pnömoni, çocuklarda ve yetişkinlerde astım atağı ve sağlıklı yetişkinlerde, yaşlılarda ve immun sistemi baskılanmış kişilerde pnömoni gibi daha ciddi ÜSİYE'larına sebep olduğunun kanıtları vardır⁹⁵.

İnsanlarda SARS-CoV enfeksiyonu hemen her zaman hastaneye yatış gerektiren ciddi bir alt solunum yolu hastalığı ile sonuçlanmıştır. Genel ölüm oranı %10 civarında görülür, fakat yaşlı hastalarda veya altta yatan hastalığı olan yaşlılarda bu oran %50'ye ulaşmaktadır⁸⁴.

SARS-CoV olmayan HCoV'lar ortalama 3 günlük inkübasyon döneminden sonra nazofarinks epitel hücrelerinde çoğalır ve nispeten hafif ÜSİYE'larına sebep olur.

HCoV 229E ve HCoV OC43'ün sebep olduğu enfeksiyonlar genellikle hafif ve ÜSİYE'ları ile sınırlıdır. Öksürük, burun akıntısı ve ateşten oluşan kendini sınırlayan nezleden bronşiolit veya pnömoniyeye değişen çeşitli belirti ve semptomlar HCoV OC43

ve HCoV 229E enfeksiyonlarında gözlenebilmektedir. HCoV 229E çocuk ve yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde nozokomiyal viral solunum yolu enfeksiyonu salgınları ile ilişkilendirilmiştir^{84,95}.

Son zamanlarda tanımlanan HCoV NL63 ve HCoV HKU1, akut ÜSVE ve ASVE olan kişilerde tespit edilmiştir. Birçok çalışmanın klinik bulgularının analizi NL63'ün bazı çalışmalarda krup hastalığıyla bir ilişkisi olmasına rağmen genellikle hafif solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olduğunu göstermektedir. Daha yeni çalışmalarda NL63 enfeksiyonu ve krup arasında güçlü bağlantı kurulmuştur. Almanya'da yapılan bir çalışmada HCoV NL63 enfeksiyonu olan hastaların neredeyse yarısında krup tanımlanmış ve kruplu hastaların örneklerinde krupsuz hastaların örneklerine göre daha yüksek oranda HCoV NL63 elde edilmiştir. Almanya'da üç yaşından küçük çocukların oluşturduğu popülasyona dayalı bir çalışmada HCoV NL63 ve krup arasındaki net ilişki gösterilmiştir. Tek başına HCoV NL63 için pozitif olan hastaların %45'inde, bunun aksine HCoV NL63 negatif grubun sadece %6'sında krup gözlenmiştir. Regresyon analizi, krup riskinin HCoV NL63 pozitif çocuklarda HCoV NL63 negatif çocuklardan 6.6 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Bu ilişki Uzak Doğu'da birçok çalışmada doğrulanmıştır. HCoV NL63 enfeksiyonu son zamanlarda Kawasaki hastalığı ile ilişkili bulunmuştur. Esper ve ark.⁹⁶ HCoV NL63 ve Kawasaki hastalığı arasında ilişkili olabileceğini bildirmiş, fakat bu ilişki Japonya ve Tayvan'da yapılan çalışmalarda bulunmamıştır. Hong Kong'da HKU1 enfeksiyonu olan çocuklarda pnömoni, bronşiolit ve akut astım alevlenmeleri görülmüştür⁹⁷.

Genel olarak HCoV'lar respiratuvar sistem enfeksiyonlarının %5 ile %30'undan sorumludur ve salgınlar 3-4 yıllık aralıklarla oluşmaktadır. HCoV'ların en yoğun viral aktivite sırasında tüm ÜSVE'lerinin %35'i kadarından sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca yetişkinlerde HCoV'ların sebep olduğu soğuk algınlığının genel oranı %15'dir.

HCoV'lar ile diğer solunum virüsleri arasında koenfeksiyonlar yaygındır. Tüm dünyada %30.5 ve %50 arasında değişen oranlarla diğer solunum yolu virüsleri ile koenfekte olan hastaların %10.3'e varan kadarı HCoV pozitif bulunmuştur.

2.5.3. Virolojik tanı

Solunum yolu virusları için moleküler testler bildirilmeden önce, HCoV enfeksiyonları seroloji veya virus izolasyonu ile tespit edilmektedir.

Sitopatik etki genellikle 7-10 günde gelişmektedir. HCoV antijenleri, HCoV spesifik monoklonal antikorların kullanıldığı immunfloresan boyama yöntemi ile nazofaringeal veya boğaz yıkama örneklerinin inoküle edildiği hücre kültüründe tespit edilmiştir. Bazı suşlar hücre kültüründe yetersiz ürettiği için kültür, HCoV'ların primer izolasyonu için güvenilir olarak gösterilmiştir. Ayrıca hücre kültüründe SARS-CoV izolasyonu biyogüvenlik seviye 3 laboratuvarında yapılmalıdır ki bu laboratuvarlar çoğu hastanede mevcut değildir^{83,98}.

ELISA ve IFA gibi bazı serolojik testler SARS hastalarının serumlarında antikor tespiti için geliştirilmiştir. Bu testler hastalığın başlangıcından 10-21 gün sonra olumlu sonuçlar verebilmektedir. SARS-CoV antijenleri ELISA ile belirlenmiş, fakat bu yöntem diğer HCoV'lar için bildirilmemiştir. HCoV HKU1 antijenleri, yeni geliştirilmiş grup spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak nazofarinks ya da boğaz yıkama hücrelerinde DFA ile tespit edilmiştir. Bununla birlikte DFA, RT-PCR'dan daha az duyarlıdır, RT-PCR pozitif 10 örnekten sadece 8'ini tespit etmiştir. Serolojik yöntemler enfeksiyon tanısında değil sadece epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmıştır^{92,99}.

Amplifikasyon tekniklerine dayalı RT-PCR, NASBA ve LAMP (loop-mediated isothermal amplification) gibi çeşitli moleküler testler geliştirilmiştir ve SARS dahil olmak üzere insanlarda HCoV enfeksiyonların tespiti için kullanılmıştır. Ayrıca moleküler yöntemler insanlarda ve hayvanlarda HCoV enfeksiyon tanısı için standart hale gelmiştir. Bu yöntemlerde kontaminasyon sebebiyle yanlış pozitif test sonuçlarını önlemek ve ayırt edebilmek için büyük önlemler alınmalıdır^{22,84}.

HCoV'ları tespit etmek için pol 1a, pol 1b veya nükleokapsid genlerini amplifiye eden konsensus primerleri ile yapılan konvensiyonel PCR testi, tek aşamalı veya iki aşamalı real-time PCR yöntemleri kullanılmıştır. İki basamaklı PCR için, rastgele heksamer primerleri kullanılarak komplementer DNA (complementary DNA; cDNA) hazırlanmış ve cDNA sonraki PCR amplifikasyonu için kullanılmıştır. Birçok iki basamaklı yöntemler sensitivitede bir kayıp olmadan kolayca tek basamaklı RT-PCR yöntemine dönüştürülebilmektedir^{100,101}.

HCoV NL63 hem konsensus hem de NL63 spesifik primerleri kullanılarak belirlenmiştir. Van der Hoek ve ark.⁸⁶ biri 1b gen (237-bp) diğeri 1a genini (525-bp) hedefleyen 2 nested PCR yöntemini kullanmışlardır. İlki tarama amaçlı PCR ve ikincisi doğrulayıcı PCR olarak uygulanmıştır. Her iki RT-PCR yöntemi de tek basamaklı reaksiyondur ve her bir durumda ilk tur ürününün 1 µl'si nested PCR'a konulmuştur^{93,102}.

Beş HCoV (229E, OC43, SARS, NL63 ve HKU1) içeren 19 solunum yolu virusunun tespiti için Luminex xMap system kullanan bir multipleks RT-PCR yöntemi tanımlanmıştır. xTAG RVP yöntemi (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Ontario, Canada) HCoV tespiti için FDA onayı almamıştır. xTAG RVP yöntemi her bir HCoV için 50 genomu tespit gibi düşük bir eşik değere sahiptir ve HCoV enfeksiyonlarının epidemiyolojik çalışmalarında kullanılmıştır. Luminex xMap ve MultiCode-PLx (EraGen Biosciences, Madison, WI) sistemlerini kullanan diğer bir multipleks PCR yöntemi HCoV HKU1 hariç 17 farklı solunum yolu virusunu tespit edebilmektedir^{33,89}.

2.5.4. Tedavi

Ribavirinin arasında bulunduğu çeşitli antiviral ilaçlar SARS-CoV salgını sırasında kullanılmış olmasına rağmen, HCoV enfeksiyonları için herhangi bir spesifik antiviral tedavi yoktur.

2.6. Human rhinovirus

2.6.1. Virusun yapısı

İlk rhinovirus 1953 yılında embriyonik insan fibroblastlarında başarıyla üretilmiştir. Rhinoviruslar Enterovirus cinsi, Picornaviridae ailesine ait, pozitif polariteli, tek sarmallı RNA genomu olan, küçük 30 nm çapında zarfsız viruslardır.

Rhinoviruslar genetik olarak son derece heterojendir. Keşifinden bu yana A ve B olmak üzere iki ayrı tür olarak sınıflandırılan rhinovirusların 1980'lerin sonunda yüz serotipi tespit edilmiştir. Rhinovirus A'nın bilinen 74 serotipi ve rhinovirus B'nin

bilinen 25 serotipi vardır. Son zamanlarda rhinoviruslarda yeni bir tür olan rhinovirus C karakterize edilmiştir^{103,104}.

Rhinovirus, aside labilitesi ve hücre kültüründe üreme için 37°C'yi değil 33°C'yi tercih etmesi bakımından enteroviruslardan farklıdır. Diğer enteroviruslar mide pH ortamında yaşar. Çoğu rhinovirus serotipleri burun mukozasının sıcaklığı olan 33°C'de optimum üreme gösterir ve genel olarak üreme 37°C üzerinde bir sıcaklıkta sınırlanmıştır. Rhinovirus, çevresel yüzeylerde 24-37°C'de saatlerce ve soğuk koşullarda yıllarca yaşayabilir, ama asidik koşullarda (pH<6) inaktive olur ve dolayısıyla insan gastrointestinal sisteminde enfektivitesini kaybeder. Rhinovirus, lipid zarfı olmaması sebebiyle eter, kloroform, florokarbon ve deterjanlara karşı dayanıklıdır.

2.6.2. Epidemiyoloji ve patogenezi

Rhinovirus enfeksiyonları aerosolize damlacıklarla veya virus ile kontamine solunum salgıları yoluyla kişiden kişiye yayılmaktadır. Nazal salgılar yüksek konsantrasyonda virus içerir ve enfekte kişilerin ellerini kolayca kontamine eder. Kontamine eşyalara direk temas sonrası kişi gözüne veya burnuna virusu oto-inokülasyon ile bulaştırabilir^{22,105}.

Rhinovirus enfeksiyonu burun veya göz içine virus girişi ile başlar ve daha sonra posterior nazofarinkste epitel hücrelerinde enfeksiyon meydana gelir. Doğrudan ağız veya boğaz içine rhinovirus girişi ile enfeksiyon etkili bir şekilde gözlenmemektedir. Rhinoviruslar, diğer birçok solunum yolu viruslarına göre daha düşük sıcaklıklarda çoğalmayı tercih ettiği için (33-34°C) buruna göre akciğerlerin daha yüksek sıcaklığında daha az üremektedir, bununla birlikte akciğerde enfeksiyon geliştirebilmektedirler.

Kısa inkübasyon süresi olup ortalama 2-4 gündür (ortalama kuluçka süresi 1.9 gün), ayrıca deneysel çalışmalarda 8-12 saat kadar kısa olduğu bildirilmiştir. Akut rinitde virus atılımı 1 ile 3 hafta devam edebilmektedir^{22,106}.

Rhinovirus üst solunum yolunu enfekte ettiği zaman genellikle enfekte ettiği epitel hücrelerine çok zarar vermez ve belirtiler virusun kendisinin sebep olduğu zarardan daha ziyade immun yanıtın kaynaklanır.

Rhinovirus enfeksiyonları ılıman iklimlerde geç ilkbahar ve erken Eylül ayında pik ile yıl boyunca meydana gelir^{22,105}.

Yaşamın ilk üç yılı içinde geçirilen rhinovirus enfeksiyonu sebebiyle oluşan hırıltı, altı yıl yaşına kadar gelişen astım riskinde neredeyse on kat artış ile ilişkiliyken RSV enfeksiyonu sebebiyle oluşan hırıltı sadece 2.6 kat artmış risk ile ilişkili bulunmuştur. Rhinovirus akut hırıltısı olan çocuklarda %58'e kadar tespit edilmiş, daha sonra tekrarlayan hırıltı gelişen bebeklerde %40 kadar oranda belirlenmiştir.

Rhinoviruslar akut otitis mediası olan çocukların orta kulak sıvısında tek patojen olarak tespit edilmiştir. Bebek ve çocuklarda orta kulak iltihabına sebep olan rhinoviruslar bakteriler için negatif subakut veya kronik olguların %10'unda orta kulak sıvısını enfekte etmektedir.

Astım ataklarının en önemli sebebi olan rhinovirus, astım atağı geçiren çocukların %48-%82'inde ve yetişkinlerin %10-%48'inde tespit edilmiştir. Rhinovirus ile ilişkili astım alevlenmeleri olan çocukların %25'inde ve küçük çocukların %11.4'ünde RT-PCR yöntemi ile rhinovirus viremişi tespit edilmiştir. Astım alevlenmesinin artan şiddeti ve 6 haftadan daha fazla süren rhinovirus enfeksiyonları arasında bir ilişki görülmüştür. Astım ataklarının sıklığının sonbahar ve ilkbaharda pik ile rhinovirus enfeksiyonlarıyla aynı mevsimsel dönemi izlediğinin gözlenmesi aradaki bu bağlantıyı daha da güçlendirilmiştir.

Küçük çocuklarda yapılan uzun süreli bir çalışmada, Winther ve arkadaşları her yıl rhinovirus enfeksiyonların ortalama sayısının 6 ve enfeksiyonların %20'sinin asemptomatik olduğunu bildirmişlerdir. Çoğu asemptomatik olan yıllık rhinovirus enfeksiyonlarının yüksek oranı ve çocuklarda uzun süreli virus atılımı dikkate alındığında akut solunum yolu hastalığı ile hastaneye gelen çocuklarda etyolojideki rolü iyi yorumlanmalıdır. Rhinovirusların soğuk algınlığı olgularının %30-50'sine sebep olduğu bildirilmiştir. Ancak yoğun sezon sırasında tüm ÜSVE'lerin %80 kadarında etken olabilmekte ve özellikle hafif bir hastalık ile sonuçlanan üst solunum yolu semptomlarına sebep olmaktadır. Boğaz ağrısı, öksürük, burun akıntısı, burun tıkanıklığı, hapşırma, halsizlik ve baş ağrısı şeklinde olan tipik belirtiler beş ve yedi gün arasında sürmektedir¹⁰⁷.

2.6.3. Virolojik tanı

Klinik laboratuvarların çoğunda önceleri birçok sebepten dolayı rhinovirus tanısı konulamamıştır. İlk sebep rhinovirus enfeksiyonlarının klinisyenler tarafından klinik olarak önemli kabul edilmemesi ve ikincisi rhinovirus kültürünün virus izolasyonu için 33°C'lik ikinci bir inkübatör gerektirmesidir. Optimal sensitivite için sıklıkla birden çok hücre dizisi kullanılması gerektiğinden ve farklı hücre dizilerinin değişen duyarlılık göstermesi rhinovirus izolasyonunu daha da güç kılmaktadır. Rhinovirusların doktorlar tarafından göz ardı edilmesi sebebiyle tanıya yardımcı monoklonal antikor geliştirmeye ihtiyaç duyulmaması üçüncü etken olmuştur. Son sebep ise rhinovirus serotiplerinin ortak grup antijeni olmaması geniş reaktivite gösteren antikorların yapılmasını mümkün kılmamasıdır.

Rhinoviruslar geleneksel olarak WI38 hücreleri ve HeLa hücreleri gibi insan diploid fibroblast hücre dizilerinden izole edilmiştir. En uygun izolasyon için birden fazla farklı hücre kültürü kullanımı gerekli olduğundan izolasyon nadiren yapılmıştır. RT-PCR, virus kültürü yöntemi ile karşılaştırıldığında yüksek sensitiviteye sahip olması sebebiyle rhinovirusların tanısı için tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir^{22,108,109,110}.

Rhinoviruslar ve enteroviruslar dahil picornavirusların tespiti için her ikisi de son derece korunan 5'-kodlanmayan bölgeyi (5'-noncoding region; NCR) hedef alan nükleik asit amplifikasyon metodları çalışılmıştır. Rhinovirus tespiti için RT-PCR ve NASBA testleri geliştirilmiştir ve bu testler kültüre göre daha sensitiftir. Rhinovirusların tespitinde 5'-NCR'yi hedefleyen NAAT'leri en sensitif metoddur, fakat aynı zamanda enterovirusları da tespit eden bu testler iki virus grubunu ayırt edememektedir. Bu durum nested PCR kullanımı, restriksiyon enzim bölgesi için primerler, özel problarla hibridizasyon veya enterovirus-spesifik ikinci PCR kullanılması ile başarılır. VP1 veya VP4 genlerini hedefleyen PCR testleri enterovirustan rhinovirusu ayırt etmek için kullanılmaktadır. Bir çalışmada Belçika'da hospitalize edilen çocuklardan alınan 517 örnek kullanılarak RT-PCR ile NASBA kıyaslandığında, NASBA ve RT-PCR uyumlu sonuçlar vermiş ve her iki yöntem de kültürden daha sensitif bulunmuştur. Blomqvist ve ark.¹¹² tüp kültürüne göre rhinovirusları iki kat fazla tespit eden RT-PCR testi geliştirmişlerdir. Aynı 5'-NCR'yi hedefleyen diğer bir RT-PCR %98 sensitivite gösterirken kültür için bu oran sadece %66 idi. TaqMan proplarını kullanan LightCycler assay dahil eşik değeri <1 fg

(femtogram) olan real-time PCR testleri geliştirilmiştir. Bu testler end-point testlerden daha sensitiftir^{111,113,114}.

Yeni tanımlanmış olan ResPlex II assay (Qiagen), MultiCode-PLx RVP assay (EraGen Biosciences), Seeplex RV assay (Seegene Inc., Seoul, South Korea) ve xTAG RVP assay (Luminex Moleküler Diagnostics, Toronto, Ontario, Canada) ticari multipleks testleri picornavirusları tespit etmektedir. xTAG RVP yöntemi rhinovirus tespiti için tek FDA onaylı testtir ve klinik değerlendirmelerde %100 sensitif ve %91.3 spesifiktir.

2.6.4. Tedavi

Şimdiye kadar rhinovirus enfeksiyonları için spesifik antiviral tedavi geliştirilmemiştir.

2.7. Human bocavirus

2.7.1. Virusun yapısı

HBoV, İsveç’de Allander ve arkadaşları tarafından Eylül 2005’de keşfedilmiştir. Orijinal çalışmada, hastanede yatarak tedavi gören hastalardan elde edilen 540 nazofaringeal örnek HBoV için test edilmiş ve %3.1’i pozitif bulunmuştur. Keşfinden bu yana HBoV tüm dünyada özellikle hem ÜSYE hem ASYE olan iki yaşın altındaki çocuklarda tespit edilmiştir¹¹⁵.

HBoV sığır ve köpek parvovirusu ile yakından ilişkilidir ve Bocavirus generu, Parvovirinae subfamilyası, Parvoviridae ailesinin bir üyesidir. Küçük, zarfsız, tek sarmallı DNA virusudur.

HBoV’un tüm dünyada dolaşan 2 genotipi vardır. VP1/VP2 açık okuma çerçevesinde “open reading frame” lokalize olmuş çoğu korunmuş aminoasit değişiklikleri ile genotip ST1 ve ST2 tüm genomda sadece 26 nükleotidde farklılık göstermektedir. Smuts and Hardie¹¹⁶ 980-nükleotid uzunluğunda VP1/2 geninin sekansını yaparak ST2 kökeninin 2 alttipini (3 nükleotid değişikliği) gösterebilmişlerdir. Bütün örnekler, solunum yolu sıkıntısı olan ve başlıca akut hırıltısı olup akciğer grafisinde interstisyel infiltrasyonlar bulunan pnömoni küçük çocuklardan alınmıştır.

2.7.2. Epidemiyoloji ve patogenezi

HBoV'lar sonbahar ve kışın Aralık ve Ocak ayında pik ile veya ilkbahar ve erken yaz dönemlerinde bildirilen oranlar ile yıl boyunca tespit edilmektedir. HBoV enfeksiyonlarında en sık görülen semptomlar öksürük, burun akıntısı ve ateştir¹¹⁷.

HBoV enfeksiyonları hem çocuklarda hem de yetişkinlerde meydana gelir, fakat 3 yaşın altındaki çocuklar enfeksiyon için daha yüksek riskte görülmektedir.

HBoV ASYE olan çocuklarda tespit edilmiştir. Solunum sıkıntısı olan bu küçük çocukların çoğunda akciğer grafisinde interstisyel infiltratlar gösteren pnömoni gözlenmiştir. HBoV ayrıca akut hırıltılı hastaların serum örneklerinde de tespit edilebilmektedir. Son yıllarda Allander ve ark.¹¹⁸ tarafından yapılan çalışmada, HBoV akut hırıltılı ile hastanede yatarak tedavi gören 259 çocuktan 49'unda (%19) tespit edilmiş ve bu çocukların 12'sinde nazofaringeal örneklerinde sadece HBoV belirlenmiştir. HBoV tek virus olarak bulunduğunda, yüksek viral yük akut hırıltılı çoğu çocukta tanımlanmıştır. Akut hırıltısı olan çocukların %19'una varan kadarında HBoV tespit edilmesi HBoV'u bu çocuklarda rhinovirus, RSV ve enterovirusdan sonra dördüncü en yaygın virus yapmıştır. Nadiren asemptomatik bireylerde İki yeni çalışmada HBoV ile ASYE ve özellikle akut hırıltılı arasında sıkı ilişki kanıtlanmıştır.

Birçok virusun sıklığının belirlendiği çoğu çalışmada HBoV, RSV ve rhinovirusdan daha az, yaklaşık olarak influenza virus, hMPV, PIV 3 ve adenovirus kadar yaygın ve muhtemelen HCoV'lar ve diğer PIV'lardan daha yaygın olarak tespit edilmiştir. Avrupa, Kuzey Amerika, Asya ve Avustralya dahil olmak üzere beş kıtada 12 üzerinde ülkede solunum yolu örneklerinde %2 ile %11 arasında değişen HBoV prevalansını bildiren çok sayıda çalışma yapılmış, bu virusun tüm dünyada yaygın olduğu belirtilmiştir. Akut solunum yolu hastalığı olan çocuklarda HBoV prevalansı %2.5 ve %19 arasındadır, ancak yetişkinlerde bu oran %0.8 -%1.2'dir²².

HBoV ayrıca gastroenteriti olan çocuklarda da bildirilmiştir. Yapılan iki çalışmada HBoV, akut gastroenteriti olan hastaların sadece %2.1 ve %0.8'inde tespit edilmiştir. Bu çalışmaların her ikisinde de aynı şekilde diğer barsak patojenleri olguların yarısından fazlasında birlikte tespit edilmiştir. Bu sebeple gastrointestinal hastalıklarında HBoV'un kesin rolünün belirlenmesi gerekmektedir^{119,120}.

HBoV DNA'sının tespiti için kontrol hastalarının dahil edildiği üç çalışmada asemptomatik kontrol grubunda HBoV tespit edilmezken diğer bir çalışmada kontrol

grubunda HBoV %8.6 oranında belirlenmiştir. Şaşırtıcı olarak, başka bir çalışmada asemptomatik kontrol grubunda %43 oranında HBoV tespit edilmiş, ancak semptomatik hastaların sadece %13.8 'inde tanımlanmıştır¹¹⁵.

HBoV tespit edilen vakaların %33 ila %90'ında diğer viruslar ile koenfeksiyon tespit edilmiştir. Koenfeksiyon olarak bulunan en yaygın viruslar rhinovirus, RSV, enterovirus, adenovirus ve hMPV olarak belirlenmiştir¹²¹.

2.7.3. Virolojik tanı

HBoV in vitro çoğaltılmamış, henüz hücre kültüründe izole edilmemiştir. HBoV enfeksiyonları moleküler yöntemler kullanarak belirlenmiştir^{22,122}.

HBoV'un genomik organizasyonu yapısal olmayan gen NS-1, bilinmeyen protein NP-1 ve iki kapsid VP1 ile VP2 protein geni diğer bocaviruslarınkine yakından benzemektedir. Birkaç PCR yöntemi HBoV için tanımlanmış ve çoğunda NS-1 ve NP-1 genleri amplifiye edilmiştir¹²³. Allander ve ark.¹²⁴ tarafından tanımlanan ilk PCR tes, NP-1 geninin N ucunu hedefleyen, 354-bp ürün veren konvensiyonel PCR yöntemidir. Smuts ve Hardie¹¹⁶ NP-1 geninin 368-bp'lik bölgesini ve VP1/VP2 kapsid geninin 980-bp fragmentini hedefleyen iki seminested PCR yöntemini kullanmışlardır. İlk test doğrulayıcı olarak uygulanmıştır. Diğer araştırmacılar 291-bp ürün veren PCR veya nested PCR kullanarak NS-1 genini hedeflemişlerdir. Manning ve ark.¹²⁵ nested PCR kullanarak 54 pozitif örneğin 53'ünü doğrulayabilmişlerdir. Bazı araştırmacılar biri tarama diğeri doğrulayıcı olmak üzere iki PCR yöntemi kullanmışlardır. NS-1 ve NP-1 hedeflerinin kullanıldığı birçok çalışmada, pozitif örneklerin çoğunluğu ikinci PCR yöntemi kullanılarak doğrulanmış, bu yöntemlerin benzer sensitiviteleleri olduğu gözlenmiştir. HBoV için FDA onaylı test bulunmamaktadır ve bununla birlikte xTAG RVP testinin ikinci versiyonu, sadece araştırma amaçlı test olarak HBoV tespit edebilmektedir^{126,127}.

2.8. İnfluenza virus

2.8.1. Virusun yapısı

İlk grip virusu 1930 yılında domuzdan izole edilmesine rağmen ilk insan grip virusu (influenza A virus) sadece üç yıl sonra grip semptomları olan hastaların nazal yıkantı örneklerinin dağ gelinciğine inokülasyonu ile başarılı bir şekilde izole edilmiştir. İnfluenza B virusu ilk olarak romatizmal kalp hastalığı olan çocuklarda grip benzeri bir hastalık salgını sırasında bir çocuktan 1940 yılında izole edilmiştir. İlk İnfluenza C virusu hafif solunum semptomları olan bir hastadan 1947 yılında izole edilmiştir.

İnfluenza virus, Orthomyxoviridae ailesine ait, büyük (çapı 80-120 nm) helikal kapsid ile çevrili segmentli, tek sarmallı, negatif polariteli RNA genomu içeren zarflı bir virustur. İnfluenza virusları antijenik farklılıklarına göre İnfluenza A, B ve C olmak üzere 3 tipe ayrılır. Bu tipler nükleoprotein ve matriks proteinlerindeki farklılıklara göre ayırt edilir. İnfluenza A ve B sekiz segmentli oysa influenza C yedi segmentli RNA içermektedir. Zarfın yüzeyinde hemagglutinin (H) ve nöraminidaz (N) glikoprotein çıkıntıları bulunur. Hemagglutinin konak epitelyal hücrelere girişten sorumludur ve enfeksiyonun başlatılmasını sağlamaktadır. Nöraminidaz yeni virionların konak hücrelerden tomurcuklanması sürecinde yer almaktadır. İki glikoprotein, bilinen 16 H ve 9 N alt tipleri ile influenza A virusları arasında antijenik varyasyon gösterir. İnfluenza B, H ve N glikoproteinlerin yalnızca bir tipine sahiptir^{22,128,129}.

Tüm dünyada yıllık influenza salgınları, H ve/veya N genlerinin aşamalı mutasyonundan kaynaklanan yüksek antijenik varyasyon sebebiyle olmaktadır. Antijenik drift olarak adlandırılan H veya N’da küçük değişiklikler gerçekleştiğinde şiddetli mevsimsel grip salgınları meydana gelebilmektedir. Antijenik drift tüm alt tiplerde görülebilir. Buna ek olarak, iki farklı influenza A virusunun aynı hücreyi enfekte etmesi sonucu influenza genomunun segmentli yapısından dolayı, genom segmentlerinin yeniden düzenlenmesi olan “reassortment” ile H veya N proteinleri veya her ikisinde de büyük antijenik değişiklikler olur ki buna “antijenik shift” denir. Yeni oluşan virusa karşı immun olmayan toplumlarda virus yayılarak tüm dünyada pandemiye sebep olur. Yüzey proteinlerinde oluşan minor veya major mutasyonlar sebebiyle virusun konak immun sistemi tarafından etkin bir şekilde tanınmaz.

2.8.2. İnfluenza A virus

2.8.2.1. Virusun yapısı

Genomik RNA'sı bilinen 11 proteini kodlayan sekiz segmentten yapılmış olan tipik influenza A virusu, içte matriks proteini ile kaplı ve dışta çubuk şeklinde glikoprotein H ve mantar şeklinde N molekülleri barındıran iki-tabakalı lipid zarfa sahiptir. İnfluenza A virusları, hemaglutinin ve nöraminidaz yüzey antijenine bağlı olarak alt tiplere (subtip) ayrılır ve şu ana kadar bilinen 16 hemaglutinin antijeni (H1-H16) ve 9 nöraminidaz antijeni (N1-N9) bulunmaktadır. Bu sebeple, her virus herhangi bir kombinasyonda bir H ve bir N antijeni içermektedir. İnsanlarda enfeksiyona sebep olan tanımlanmış sadece bazı influenza A virus alt tipleri vardır ve bu tipler H alt tipleri 1, 2, 3 ve N alt tipleri 1 ile 2'dir.

İnfluenza A virusları domuz, at, deniz hayvanları ve kuşlar gibi çeşitli hayvanları enfekte eder. İnsanlarda pandemilere sebep olduğu bilinen influenza A virusunun ilk alt tipi olan H1N1, 1918 yılında bulunmuş ve salgın sırasında ölen hastalardan elde edilen influenza suşlarının sekans verileri H1N1'in H sekansının, memeli viruslarındaki ile benzer, fakat avian viruslarındaki ile benzer olmadığını göstermiştir. Ardışık pandemilerden sorumlu influenza A viruslarının en önemli alt tipleri H2N2(1957), H3N2(1968) ve H1N1(1977)'dir. Domuz kökenli yeni alt tip H1N1 2009 yılında insanlarda pandemiye sebep olmuştur^{130,131,132}.

2.8.2.2. Avian influenza A virus

Su kuşlarının influenza viruslarının doğal rezervuarları olduğu bilinmektedir. Şu ana kadar bilinen influenza A virus 16 H ve 9 N alt tipleri özellikle göç eden su kuşlarından izole edilmiştir. Su kuşlarında enfeksiyonlar genellikle asemptomatik seyreder, ancak H5N1 ve H7N7 gibi bazı birkaç subtip ise sistemik enfeksiyonlara sebep olur ve ölüm oranı yüksektir. Su kuşlarında, influenza virusları barsak epitel hücrelerinde ve daha az miktarda solunum yolu hücrelerinde replike olur ve dışkı ile yüksek konsantrasyonlarda atılır. Kontamine su ve dışkı yabani su kuşları arasında influenza viruslarının bulaşında en önemli yoldur. Su kuşlarının uluslararası göçü kuş gribinin dünyanın diğer bölgelerine virusun yayılmasından sorumludur¹²⁸.

2.8.2.3. Swine influenza A virus

İnfluenza A virusunun iki alt tipi olan H1N1 ve H3N2 domuzlardan izole edilmiştir. Bunlar klasik domuz H1N1, kuş benzeri H1N1, insan ve kuş benzeri H3N2'yi kapsamaktadır. İnfluenza A virusunun H1N1 alt tipi (Hsw1N1) Amerika'da 1930 yılında domuzlardan izole edilmiştir. İnsan suşuyla benzer olan antijenik H3'e sahip H3N2 suşu 1988 yılından bu yana domuz populasyonunda dolaşmaktadır. Domuz H3N2 subtipi Avrupa ve Asya'daki diğer ülkelerde de domuzdan izole edilmiştir. Domuzların H1N1 ve H3N2 influenza virusları için önemli bir rezervuarı olduğu bilinmektedir. Domuzlar influenza viruslarının türler arası bulaşmasında rol oynamaktadır.

2.8.3. Epidemiyoloji ve patogenezi

Her yıl influenza salgınları ılıman iklimlerde kış aylarında meydana gelir, ancak bazı ülkelerde yağışlı mevsimlerde pik ile tropikal iklimlerde yıl boyunca tespit edilebilmektedir. İnfluenza A ve B, yıllık mevsimsel grip salgınlarından sorumludur. İnfluenza A yılda bir epidemilere ve bazen pandemilere sebep olurken lokal salgınlar genellikle influenza B'den kaynaklanmaktadır. Tekrarlayan influenza epidemileri son 400 yıldır meydana gelmektedir ve en ünlü pandemi influenzanın tüm dünyada yaklaşık 20 milyon kişinin öldümüne sebep olduğu 1918-1919 yıllarında gerçekleşmiştir¹³³.

Tipik komplike olmayan influenza enfeksiyonunda sık olarak ateş, öksürük, titreme, baş ağrısı, burun akıntısı, farenjit ve kas ağrısı gibi sistemik semptomlar görülmektedir. İnkübasyon süresi 1-4 gündür ve ateş gibi sistemik belirtiler genellikle 3 gün boyunca devam eder, fakat 4-8 gün sürebilir. Hastalığın bir parçası olan kuru öksürük, boğaz ağrısı, burun tıkanıklığı ve akıntısı genellikle ateş geçtikten sonra devam etmektedir. Ani başlangıç ve sistemik semptomların baskınlığı influenzayı diğer bazı solunum yolu viral enfeksiyonlarından ayırmaktadır^{106,133}.

Son 2009 H1N1 pandemisi sırasında influenzanın en yüksek atak hızı gençler arasında görülmüştür, oysa altta yatan kardiyovasküler ve akciğer hastalığı olan yaşlı insanlarda mortalite oranı yüksek idi. En yüksek hastaneye yatış oranı (100000'de 276) yaşı 6 aydan daha küçük olan çocuklarda görülmüştür ve tüm vakaların %50'den fazlası 2 yaşından küçük çocuklardan oluşmuştur^{134,135,136}.

Sadece influenza A ve B klinik olarak önemlidir. İnfluenza A ve influenza B enfeksiyonunda görülen mevsimsel dağılım influenza C enfeksiyonunda nadiren meydana gelmektedir. İnfluenza C genellikle hafif üst solunum yolu hastalığı ile ilişkilidir, nadiren bronşit veya pnömoniye sebep olmaktadır.

İnfluenza virus enfeksiyonu akut otitis media, krup, bronşiolit, pnömoni ve astım atakları da dahil olmak üzere çeşitli ASYE'lar ile ilişkilidir. İnfluenza ile ilişkili komplikasyonlar sekonder bakteriyel pnömoni, solunum yetmezliği, miyozit, Reye sendromu, miyokardit ve perikardit gibi rahatsızlıkları içermektedir. İnfluenza özellikle altta yatan hastalığı olan hastalarda tipik başlangıcın ardından hızla akciğer grafisinde yetişkin solunum sıkıntısı sendromu ile uyumlu bilateral infiltrasyonlar ile nefes darlığı, öksürük ve siyanoza ilerleyen primer viral pnömoniye sebep olabilmektedir. İnfluenza'nın diğer komplike klinik tablosu olan sekonder bakteriyel pnömoni ilk influenza enfeksiyonu (4-14 gün) sonrasında bir iyileşme süresinden sonra meydana gelir ve tipik olarak *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae* etkendir^{133,134}.

Çocuklarda %22.3 oranı gibi yüksek olabilen yıllık influenza atak hızı yıldan yıla değişmektedir. İnfluenza virusları Pogka ve ark.¹³⁷ tarafından yapılan bir çalışmada grip benzeri hastalığı olan 5 yaşından büyük çocuklarda baskın etken olarak vakaların sadece %30.4'ünden sorumlu olmuştur. Çocuklarda toplum kökenli bütün pnömoni vakalarına, çoğu 2 yaşından küçük çocuklar olmak üzere %4 ve %16 arasında oranla influenza virusları sebep olmuştur. İnfluenza virusları genellikle 5 yaşından daha büyük kruplu çocukların sadece küçük bir yüzdesinden izole edilmektedir. Bununla birlikte influenza virusunun sebep olduğu krup, PIV kaynaklı krupa göre daha şiddetli olma eğilimindedir¹³⁷.

İnfluenza virusunun sebep olduğu enfeksiyonlar yılda 100000 çocukta 36 ila 135 oranında hospitalizasyona yol açmaktadır. Çocuklar hastanede ortalama 3 gün kalır ve altta yatan kardiyak veya nörolojik ve nöromüsküler hastalıkları olanlar uzun süreli hastaneye yatış riski altındadır. Hastanede yatarak tedavi gören çocukların %25-%49'unda en sık rapor edilen klinik tablo astım olup en azından altta yatan ciddi bir hastalık görülmüştür. Çocukların yaklaşık %12'si yoğun bakıma alınmış ve %5.9'a varan kadarında mekanik ventilasyon gerekli görülmüştür^{133,134}.

Çocuklarda influenza enfeksiyonları sebebiyle mortalite %0.01 oranıyla nadirdir. Bununla birlikte bunların neredeyse yarısı influenza ilişkili komplikasyon riskini artıran altta yatan hastalığı olmayan çocuklarda ortaya çıkmaktadır^{134,136,138}.

Çeşitli çalışmalar influenza B virusunun büyük çocukları enfekte etme, miyalji ve gastrointestinal hastalıklara influenza A virusundan daha sık sebep olma eğiliminde olduğunu göstermektedir. İnfluenza A virusu akut solunum yolu hastalığı belirtileri olan çocuklarda %5.4 ve %13.4 oranları arasında tespit edilirken influenza B virus vakaların %1.4 ve %7.8'inden sorumludur¹³⁹.

2.8.4. Virolojik tanı

İnfluenza virusunun laboratuvar tanısı için hızlı ELISA, IFA, virus kültür yöntemleri ve sofistike moleküler testler gibi birçok test kullanır. Bu yöntemlerin her birinin potansiyel kullanımı yıllar içinde en dramatik pandemik H1N1 2009 grip virusunun ortaya çıkması ile değişmiştir. Hızlı ELISA testleri daha önce klinik ve acil servislerde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, 2009 H1N1 alt tipi için zayıf sensitivitesi bu testin uygulanması ile ilgili kaygı yaratmıştır. İnfluenza virusunun tespiti için antijen testleri yaygın olarak mevcuttur. Ancak bu testler kullanıldığında negatif sonuç olasılığı hastanın artan yaşıyla birlikte önemli ölçüde artar, oysa virus kültürü ve RT-PCR ile artmaz. Bu sebeple ileri yaştaki hastalarda yanlış negatif sonuçları önlemek için RT-PCR ve kültür gereklidir. İnfluenza viruslarını tespit etmek için moleküler yöntemler 1991'in başlarında bildirilmiştir. Matriks, H ve N genleri gibi çeşitli hedefler kullanılmıştır. İlk ticari olarak temin edilen test Hexaplex assay (Prodesse Inc, Waukesha, Wisconsin) RT-PCR testidir ve amplifikasyon sonrası tespit için enzim hibridizasyonu kullanılır. Bu test amplifikasyon sonrası purifikasyon gerektiren bir test olup tamamlanması 8-9 saat sürer. Testin analitik sensitivitesi influenza A için 10 kopya ve influenza B için 5 kopya olup influenza virusların tespiti için standart vardır. Günümüzde yeniden hazırlanan formatı ise influenza A (M geni), influenza B (NS1 ve NS2 genleri) ve RSV (polimeraz geni) tespiti için FDA onaylı multipleks real-time RT-PCR (Pro-Flu1, Prodesse Inc) testidir. Üreticiye göre, sensitivite ve spesifitesi sırasıyla influenza A için %100 ile %93 ve influenza B için %98 ile %99'dur. Her iki virus için analitik sensitivite 10^2 %50 doku kültürü enfektif dozu (%50 tissue culture infectious

dose;TCID₅₀)/ mL'dir. Diğer bir test xTAG Respiratory Virus Panel (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Canada) aynı zamanda diğer solunum viruslarının tespiti için FDA onaylı multipleks paneldir. Onyedili solunum virusunu tespit etme yeteneğine sahip olsa da sadece influenza, RSV, PIV 1, 2 ve 3, hMPV, adenovirus ve rhinovirus tespiti için FDA onaylıdır. Test Luminex teknolojisini kullanır. İnfluenza A için klinik duyarlılığın %100 ve 10 TCID₅₀ analitik duyarlılığa sahip olduğu rapor edilmiştir^{6,22}.

2.8.5. Tedavi

İnfluenza virus enfeksiyonu tedavisi ve kemoprofilaksisi için kullanılan nöraminidaz inhibitörleri ve adamantanlar şu anda mevcut olan iki çeşit antiviraldir. İnfluenza virus izolatlarının adamantanlara dirençli olması sebebiyle günümüzde gribin tedavisi veya önlenmesi için bu ilaçlar tavsiye edilmemektedir. Ayrıca adamantanlar influenza B virusuna karşı bir aktiviteye sahip değildir.

Oral yolla alınan nöraminidaz inhibitörü olan Oseltamivir, 1 yaşından büyük çocuklarda ve yetişkinlerde grip tedavisi ve önlenmesi için onaylanmıştır. Oseltamivir eğer semptom başlangıcından sonra 48 saat içinde başlanırsa, influenza ile enfekte olmuş çocuklarda semptomların ortalama süresini 1.5 güne azaltmaktadır. İkinci nöraminidaz inhibitörü ve inhale toz olan zanamivir, 7 yaşından büyük çocuklarda ve yetişkinlerde grip tedavisi için 5 yaşından büyük çocuklarda ve yetişkinlerde kemoprofilaksi için onaylanmıştır. Eğer semptomların başlangıcından 36 saat içinde zanamivir tedavisine başlanırsa zanamivir, çocuklarda grip belirtilerinin iyileşmesi için 1.25 gün ile ortalama süreyi azaltmaktadır^{140,141}.

Bu ilaçların önlem yerine tedavi için tercihen kullanımı, korunma amaçlı aşıların yaygın olarak kullanımı ve oseltamivire karşı direnç gelişmesi sebebiyle maruziyet sonrası kemoprofilaksinin yakın zamanda tanımlanmış başarısızlığın sonucu olarak nöraminidaz inhibitörlerinin kemoprofilaksi için kullanımı günümüzde tavsiye edilmemektedir. Antiviral kullanımı ile ilgili öneriler hem yerel hem de uluslararası influenza virusunun direnç verilerine göre değişmektedir¹⁴².

İnfluenza enfeksiyonunu önlemek için en etkili yol her yıl yapılan aşılama. Aşılamaya çocuklarda laboratuvar tanımlı influenza A virusa bağlı hastalıkları %95'e kadar

azaltabilmektedir. Trivalan inaktif grip aşısı (trivalent inactivated influenza vaccine; TIV) ve canlı zayıflatılmış grip aşısı (live attenuated influenza vaccine; LAIV) olmak üzere gribin önlenmesi için tüm dünyada mevcut olan iki aşı vardır. TIV, influenza A(H1N1), influenza A(H3N2) ve influenza B içerir. LAIV sadece altta yatan yüksek riskli durumu olmayan 2 ve 49 yaş arası insanlar için onaylanmış iken TIV, yetişkin ve 6 aylıktan büyük çocuklarda kullanım için onaylanmıştır. Önceden antikorları olmayan çocuklarda tek aşı sonrasında düşük antikor yanıt oranları olması sebebiyle daha önce aşılanmamış 9 yaşından küçük çocuklara bir ay arayla iki doz aşı uygulanmalıdır. Dünya Sağlık Örgütü küçük çocuklarda influenzanın önemli sağlık yükü oluşturması sebebiyle 6 ve 23 ay arası tüm çocuklar için yıllık grip aşısı uygulanmasını önermektedir¹⁴⁰.

2.9. Enterovirus ve parechovirus

2.9.1. Virusun yapısı

Rhinovirus ile aynı olarak Picornaviridae ailesine ait olan enterovirus ve parechovirus pozitif polariteli, tek sarmallı RNA viruslarıdır. Enterovirus genusunun 63 farklı üyesi ve Parechovirus genusunun tanınan dört üyesi vardır. Enteroviruslar, küçük, 30 nm çapında olan zarfsız viruslardır. Poliovirus, Coxsackie virus A ve B enterovirus türleridir. Rhinovirusun aksine enterovirus daha yüksek bir sıcaklıkta (37°C) çoğalır ve asit stabildir (pH 3-10). Bu sebeple gastrointestinal sistemde birçok hastalığa sebep olur.

2.9.2. Epidemiyoloji ve patogenezi

Enteroviruslar ve human parechoviruslar tüm dünyada yaygındır. Endemik olarak meydana gelen enfeksiyonlar ılıman iklimlerde geç yaz ve erken sonbaharda pik yaparak kış aylarında görülmektedir. Jacques ve ark.¹⁴⁶ Fransız çocuklar arasında yaptıkları çalışmada, enterovirus enfeksiyonlarının %47'sinin sonbahar ve ilkbahar aylarında meydana geldiğini bildirmiştir^{144,145}.

Enterovirus enfeksiyonu olan hastalarda semptomlar başlamadan iki gün önce ve enfeksiyon bitiminden sonra 3 haftaya kadar virus yayılımı görülmektedir. Bu sebeple 2

gün-2 hafta arasında olabilen, fakat genellikle 3-5 gün süren inkübasyon dönemini değerlendirmek zordur.

Human enterovirus enfeksiyonlarının çoğunluğu asemptomatik olmasına rağmen, hafif ateşli hastalıktan aseptik menenjit ve ciddi neonatal sepsise kadar hastalık belirtileri geniş bir yelpazede görülmektedir. Enteroviruslar hem çocuklar hem de yetişkinlerde pnömoni ve bronşiolit dahil ÜSYE ve ASYE'larına sebep olmaktadır. Echovirus 6, 11, 13, 16 ve 30, Coxsackie virus A2, A4, A16, B2 ve B3 ve enterovirus 68 dahil non-polio enterovirusların çoğu solunum salgılarında tespit edilmiştir, fakat enterovirus 68 sadece solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda saptanmıştır. Enterovirus 71 el-ayak ve ağız hastalığı, ciddi multisistem hastalığına eşlik eden herpangina ve hatta ölüme yol açar. Enteroviruslar, el-ayak-ağız sendromu (coxsackie A virus), herpangina (coxsackie A ve B, EV-71), pleurodynia (daha çok coxsackie B virus kaynaklı Bornholm hastalığı) ve küçük bebeklerde ateş ve döküntü ile ilişkilidir^{146,147}.

Enterovirusların her yıl 1 milyar veya daha fazla kişiyi enfekte ettiği tahmin edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 30-50 milyon enfeksiyon olduğu düşünülmektedir. Solunum yolu enfeksiyonu (%31) aseptik menenjitten (%47) sonra enteroviruslara bağlı en yaygın ikinci hastalık idi ve en sık tanınan respiratuvar hastalık ise bronşiolit idi. ÜSYE olan hastaların %14-%22'si ile ve ASYE olan hastaların %17-%19'u enterovirus enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Akut hırıltısı olan çocukların %25'inde ve bronşioliti olan çocukların %12-%21'inde enteroviruslar tespit edilmiştir^{148,149}.

2.9.3. Tedavi

Çocuklarda ciddi coxsackievirus enfeksiyonu tedavisinde Pleconaril kullanımı konusunda olgu sunumları olmasına rağmen enterovirus enfeksiyonları için özel bir antiviral tedavi onaylanmamıştır¹⁵⁰.

2.10. Parvovirus tip 4, tip 5 ve mimivirus

2.10.1. Virusun yapısı

Human parvovirus tip 4 ilk olarak 2005 yılında HIV-1 bulaşması için yüksek riskli davranışı izleyen akut viral sendromu olan bir hastanın plazmasında izole edilmiştir. Mimivirus, ilk olarak *Acanthamoeba polyphagia*'da keşfedilmiş büyük bir DNA virusudur ve solunum yolu patojeni olabileceği hakkındaki kanıtlar artmaktadır. Parvovirus tip 4 ve benzer olan parvovirus tip 5, HIV ile enfekte hastaların %70'inin serum da ya da plazma örneklerinde, üretilmiş plazma havuzlarının yaklaşık %4'ü ve sağlıklı kan vericilerinin plazmalarında belirlenebilmektedir. Diğer iki parvovirusun, parvovirus B19 ve HBoV'un ilk bulaşma yolu solunum yolu olmasından dolayı henüz ispatlanmamış olmasına rağmen parvovirus tip 4 ve 5'in solunum yolu patojeni olması mümkündür^{151,152,153}.

2.10.2. Epidemiyoloji

La Scola ve ark.¹⁵⁴ son zamanlarda sağlıklı kontrollerin %2.3'ünde ve pnömonili vakaların %9.7'si mimivirusa karşı antikor bulundurduğunu bildirmişlerdir. Yoğun bakım ünitesinde tedavi gören 26 hastanın 5'i mimivirus enfeksiyonunun serolojik kanıtına sahipken (50 kontrolden hiçbir antikor pozitif değil) mimivirus DNA'sı Fransa'da 32 yoğun bakım ünitesi hastasının bronkoalveolar lavaj örneklerinin 1'inde bulunmuştur. Real-time PCR kullanılarak 496 pnömonili hastanın mimivirus için test edildiği araştırmada hiçbir hastada virus tespit edilmemiştir. Daha ileri çalışmalar mimivirus ile parvovirus tip 4 ve 5'in insanlarda klinik olarak önemli solunum yolu patojenleri olup olmadığını belirlemeyi kapsayacaktır²².

2.10.3. Virolojik tanı

Parvovirus tip 4 ve 5 DNA'ları NS-1 genini hedefleyen konvensiyonel veya nested PCR yöntemleriyle tespit edilmektedir. Mimivirus enfeksiyonları serolojik olarak amip kültürlerinde virus izolasyonu, PCR ve mikroiimmunfloresan yöntemleriyle belirlenebilmektedir. Günümüzde Parvovirus tip 4, tip 5 veya mimivirus için ticari testler mevcut değildir^{151,152,154}.

2.11. KI ve WU polyomavirus

Solunum yolu hastalığı olan çocukların solunum yolu örneklerinde iki yeni insan virusu olan KI polyomavirus (KIPyV) ve WU polyomavirus (WUPyV) 2007 yılında keşfedilmiştir. Seroepidemiolojik çalışmalar bu virusların sebep olduğu enfeksiyonların insan popülasyonunda yaygın olduğunu göstermiştir ve keşfinden bu yana, KIPyV ve WUPyV özellikle solunum yolu belirtileri olan çocukların ve respiratuvar virus ile koenfekte hastaların solunum örneklerinde tespit edilmiştir. Bu bulguları takiben insan hastalıklarında KIPyV ve WUPyV'un patojenitesini araştırmak için farklı biyolojik örnekler real-time PCR test ile analiz edilmiştir. Her iki virus immun sistemi sağlam hastaların solunum yolu örneklerinde bulunmuş olmasına rağmen, solunum yolu enfeksiyonları ile kesin bir bağlantı kurulamamıştır. KIPyV ve WUPyV'un semptomatik hastalardan ve solunum semptomu olmayan kişilerin örneklerinde benzer oranlarda tespit edilmesi bu virusların bağışık çocuklarda solunum yolu hastalıklarına sebep olmayabileceğini düşündürmektedir¹⁵⁵.

Diğer iki insan polyomavirusu BK ve JC, sağlıklı kişilerde persistan, subklinik enfeksiyonları takiben yaşamın erken dönemlerinde hafif veya asemptomatik primer enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Bununla birlikte bu viruslar öncelikle böbrek, kemik iliği ve lenfoid dokuda reaktif olabilir, ayrıca immun sistemi baskılanmış hastalarda ciddi hastalıklara sebep olabilmektedir. Reaktivasyonun klinik sonuçları incelenmemesine rağmen benzer şekilde, HIV ile bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerin lenfoid dokusunda KIPyV ve WUPyV reaktivasyonu tanımlanmıştır.

KIPyV ve WUPyV'un sıklıkla solunum semptomları ile birlikte tespit edilmesi inhalasyonun bulaşmada potansiyel bir yol olduğunu düşündürmektedir. Solunum sistemine ait örneklerde KIPyV ve WUPyV'un prevalansı ile ilgili retrospektif çalışmalara çok sayıda immun sistemi baskılanmış hastalar dahil edilmiştir. Buna karşılık hiçbir prospektif veri, insidans, semptomlar, risk faktörleri ve hematopoetik hücre nakli alıcılarının solunum örneklerinde KIPyV ve WUPyV tespiti ile ilgili sonuçları kapsamlı bir şekilde tarif etmemiştir. Bu soru özellikle immun sistemi baskılanmış hastaların örneklerinde solunum viruslarının tespiti için multipleks PCR panellerinin artan kullanımı ile ilgilidir. Spesifik klinik veya radyolojik bulguların eksikliği, diğer solunum yolu patojenleri ile sık olarak birlikte tespit edilme, solunum hastalığı belirtileri veya semptomları olmayan olgularda izolasyon ve ölçülen viral yük

değişkenliği sonuçları kesin bir şekilde göstermeye izin vermemiştir. Solunum yolu enfeksiyonu semptomları olan ve olmayan hem immun sistemi baskılanmış hem de bağışık hastalara ait geniş bir örnek yelpazesi ile yapılan prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır¹⁵⁵.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Eylül 2012 ve Mart 2013 tarihleri arasında Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilimdalı'nın çocuk yoğun bakım, onkoloji, hematoloji, çocuk enfeksiyon, yenidoğan yoğun bakım, süt çocuğu ve büyük çocuk servislerinde ASYE tanısı ile yatan 17 yaş ve altındaki 158 hastadan alınan nazofaringeal sürüntü örnekleri solunum yolu viruslarının varlığını araştırmak için multipleks real-time PCR (ARVI Screen Real-TM, Sacace, Italy) ve DFA (Argene SA, France) testi ile çalışıldı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik verileri ve klinik belirtileri hazırlanan formlara dolduruldu ve yapılacak diğer işlemler ile ilgili hasta ve ebeveynleri bilgilendirilerek rızaları alındı.

İstatistiksel analiz için tabloların ki-kare hesapları Statistics Calculator StatPac., Inc1997-2011 ile yapıldı.

3.1. Nazofaringeal sürüntü örneklerinin toplanması

Hasta ve hasta yakını örnek alma işleminin basamakları ile ilgili bilgilendirildikten sonra hastanın işlem sırasında kendini arkaya doğru çekmemesi için yaslanarak oturması sağlandı. Yaş olarak küçük olan hastalarda ise yakınlarından hastalarını kucaklarına alarak kol ve bacak hareketlerini engelleyecek şekilde sabitlemesi istendi.

İşlem sırasında ağızdan nefes alması ve gözlerini kapaması söylenen hastanın alınından tutup steril nazofaringeal naylon floked eküvyon (Copan Diagnostics, Italy) yüze dik açıda burun deliğine yavaşça kondu. Eküvyon, kontaminasyonu engellemek amacıyla burun iç yüzeyine değdirilmeden burun ve kulak memesi arasındaki mesafe kadar nazal boşluğun tabanına paralel şekilde direnç hissedilinceye kadar arkaya doğru ilerletildi. Direnç hissedildiğinde eküvyon 10-15 saniye nazıkçe döndürülerek hücrelerin toplanması sağlandı. Hiçbir yere temas ettirilmeden yavaşça geri çekilen eküvyon, içinde 3 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) bulunan, hastanın adı ve soyadı

ile etiketlenmiş transport tüpüne kondu. DFA testi için örneğin 2 ml'si kullanıldı. Örneğin geri kalan 1 ml'si ise real-time PCR testi çalışılncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.2. Direkt immunfloresan test (DFA) ile antijen tespiti

Nazofaringeal sürüntü örnekleri RSV, hMPV, adenovirus ve PIV antijeni tespiti için DFA testi (Argene SA, France) ile analiz edildi. Testin yapım süresi 65 dakika idi.

3.2.1. Örneklerin işlenmesi ve preparatların hazırlanması

1. Çalışma öncesinde +4°C'de saklanan örnekler buzdolabından çıkarıldıktan sonra 20 saniye yavaş bir şekilde vortekslendi.
2. Tüp içerisindeki eküvyon, üzerindeki hücreleri besiyerine aktarmak için tüp duvarına yavaşça bastırılarak çıkarıldı.
3. Örnekler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Supernatant kısmı atıldıktan sonra kalan pellet üzerine 10 ml PBS eklendi.
5. Tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Mukuslu örnekler için bu aşama tekrarlandı.
6. Supernatant kısmı atılıp tüpte kalan pellet üzerine 400 µl PBS eklenerek pipetaj yapıldı.
7. Test edilecek dört virus için immunfloresan lamlarının dört kuyucuğuna hasta örneğinden 30 µl eklendi.
8. Lamalar 35-37°C'de tamamen kuruyuncaya kadar etüvde inkübe edildi.
9. Daha sonra hücrelerin fiksasyonu için lamalar soğuk aseton içerisinde en az 10 dakika bekletildi.
10. Lamalar oda ısısında kurumaya bırakıldı. Bu süre sonunda kuruyan lamalar çalışmaya devam edilmeyecekse ikinci aşama yapılncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.2.2. Mikroskopta değerlendirme öncesi yapılan iřlemeler

1. Çalışılacak örneklerin preparatları dondurucuda ise çıkartılıp kuruması için laminer flow kabin içerisinde karanlıkta 10-15 dakika bekletildi.
2. Steril endorf tüpleri antijen varlığı araştırılan viruslar (RSV, hMPV, adenovirus ve PIV) için etiketlendi.
3. Fluorescein isothiocyante ile konjuge virus spesifik monoklonal antikolar 1/40 oranında PBS ile dile edildi.
4. Lamdaki kuyucuklarda bulunan örnekler üzerine dile monoklonal antikordan 30 l eklendi.
5. Antikor eklenen preparatlar 37°C’de etüvde nemli ortamda 15 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyonun sonunda preparatlar 5 dakika PBS ile yıkandı.
7. Preparatlar distile su içine daldırılıp çıkarılarak PBS kristallerinin uzaklaşması sağlandı.
8. Preparatlar karanlık ortamda kurumaya bırakıldı.
9. Kuruyan preparatlarda örnek kuyuları üzerine 1-2 damla mounting media damlatıldı. Lameller preparatların üzerine arada hava boşluğu kalmaması için hafifçe kenarlarından bastırılarak kapatıldı.
10. Karanlık alanda floresan mikroskop ile 25X veya 40X büyütme ile antijen varlığı araştırıldı.

3.3. Multipleks real-time PCR

Nazofaringeal sürüntü örneklerinde multipleks real-time PCR (ARVI Screen Real-TM, Sacace, Italy) ile RSV, rhinovirus, hMPV, adenovirus, PIV 1, 2, 3 ve 4, HBoV, HCoV OC43/HKU1 ve HCoV 229E/NL63 olmak üzere toplam 13 solunum yolu virusunun varlığı araştırıldı. Örneklerden nükleik asit ekstraksiyonu, cDNA sentezi ve multipleks real-time PCR amplifikasyonu aşamalarından oluşan multipleks real-time PCR testi toplam 180 dakikada tamamlanmıştır.

3.3.1. RNA/DNA ekstraksiyonu

Nazofaringeal sürüntü örneklerinden viral genom eldesi için yapılan ekstraksiyon işleminde Ribo-Sorb ARVI Screen Real-TM RNA/DNA Extraction (ARVI Screen Real-TM, Sacace, Italy) kiti kullanıldı. RNA/DNA ekstraksiyonu üretici firmanın önerilerine göre aşağıdaki gibi yapıldı.

1. Lizis solüsyonu ve yıkama solüsyonu buz kristalleri kayboluncaya kadar 60-65°C'de bekletildi.
2. Negatif kontrol tüpü dahil olmak üzere hasta numarası ile etiketlenmiş ependorf tüpleri hazırlandı.
3. Her tüpe 450 µl lizis solüsyon ve 10 µl Internal Control RNA C+ (IC RNA) pipetaj yapılarak eklendi. Tüpler oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
4. C_{neg} olarak etiketlenmiş negatif kontrol tüpüne 100 µl C- Negative Control, diğer tüplere ise 100 µl örnek eklendi.
5. Tüpler vortekslendi ve 5000 g'de 5 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası erimeyen örnekler maksimum hızda (12000 g) tekrar 1 dakika santrifüj edildi.
6. Yeni tüpe aktarılan supernatant üzerine iyice vortekslenmiş sorbent'ten 25 µl eklendi.
7. Tüpler 5-7 saniye vortekslendi.
8. Oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakılan tüpler periyodik olarak vortekslendi.
9. Örnekler 1 dk 10000 g'de santrifüj işleminden sonra supernatant bariyerli pipet ucu kullanılarak pellete zarar verilmeden alınarak atıldı.
10. Her tüpe 400 µl yıkama solüsyonu konuldu. İyice vortekslenen tüpler 1 dakika 10000 g'de santrifüj edildi ve supernatant tekrar atıldı.
11. Tüplere %70'lik etanolden 500 µl eklendi. İyice vortekslenen tüpler 1 dakika 10000 g'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
12. Tüplere tekrar 500 µl %70'lik etanol eklendi. Tüpler iyice vortekslendi, 10000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı.
13. Her tüpe 400 µl aseton eklendi ve tüpler iyice vortekslenip 10000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
14. Tüpler kapakları açık olarak 60°C'de 10 dakika inkübe edildi.

15. Her tüpe 50 µl RNA-eluent eklenerek pellet tekrar süspanse edildi ve 60°C’de 10 dakika inkübasyona bırakılan tüpler periyodik olarak vortekslendi.
16. Tüpler 2 dakika maksimum hızda (12000 g) santrifüj edildi.
17. RNA içeren supernatant cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80°C’ye kaldırıldı.

3.3.2. cDNA sentezi

Elde edilen ekstraktlardan aynı gün içerisinde Reverta Reverse Transcription (ARVI Screen Real-TM, Sacace, Italy) kiti ile cDNA sentezi aşağıdaki gibi yapıldı:

1. Altı örneklik reaksiyon karışımı hazırlamak için 125 µl RT-mix içeren tüpe 5 µl RT-G-mix-1 eklendi. Karışım kısa bir süre santrifüj edildi ve 5-10 saniye vortekslendi.
2. Bu karışıma 6 µl M-MLV pipetaj yapılarak eklendi. Vorteks işlemi 3 saniye ve santrifüj işlemi 5-7 saniye yapıldı.
3. Hazırlanan reaksiyon karışımı, hasta numarasıyla etiketlenmiş PCR tüplerine 20 µl dağıtıldı.
4. Nükleik asit ekstraktları maksimum hızda (12000 g) 2 dakika santrifüj edilip supernatantların 20 µl’si dikkatli bir şekilde pipetaj yapılarak reaksiyon karışımı içeren tüplere eklendi.
5. Tüpler MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad Life Science Research, France) cihazında 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
6. Elde edilen cDNA örnekleri her tüpe 40 µl TE-buffer eklenerek 1:2 oranında dilüe edildi. Dilüe cDNA örnekleri real-time PCR işleminde kullanılmak üzere -70°C’ye kaldırıldı.

3.3.3. Multipleks real-time PCR amplifikasyonu

ARVI Screen Real-TM Multiplex RT-PCR kitinin gerektirdiği protokole uyarak cDNA örneklerinde araştırılan solunum viruslarına ait viral genom tespiti yapıldı.

1. ARVI Screen Real-TM kiti buzdolabından çıkarıldıktan sonra reagentlerin erimesi beklendi. Bu sırada 6 farklı PCR-mix-1 için 6 ependorf tüpü etiketlendi. Hasta

örnekleri için 9, kontroller için 3 olmak üzere toplam 12 tane 6 tüplü strip hazırlandı.

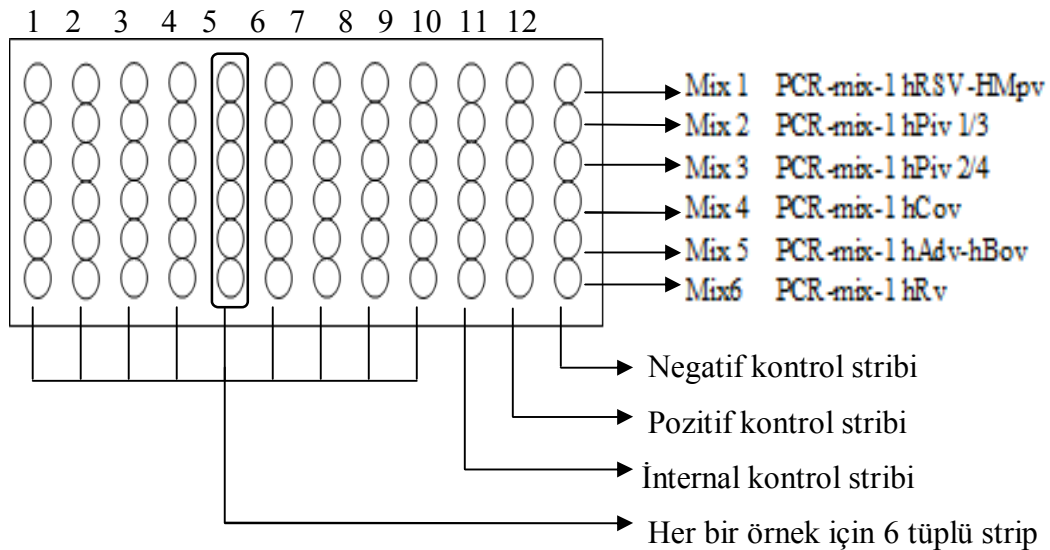
2. Reaksiyon karışımları; 9 cDNA örneği + 1 pozitif kontrol + 1 negatif kontrol + 1 internal kontrol için 12 ile çarpılarak hesaplandı.

$$5 \mu\text{l} \times 12 = 60 \mu\text{l PCR-mix-2-FRT}$$

$$10 \mu\text{l} \times 12 = 120 \mu\text{l PCR-mix-1}$$

$$0,5 \mu\text{l} \times 12 = 6 \mu\text{l TaqF polymerase}$$

3. Her bir ependorf tüpüne 60 µl PCR-mix-2-FRT eklendi.
4. Her bir PCR-mix-1 kendisi için işaretlenmiş tüpe 120 µl eklendi.
5. En son olarak karışıma 6 µl TaqF polymerase eklendi. Vortekslenen tüpler kısa bir süre santrifüj edildi.
6. Her hasta örneği için dikey sırada 6 kuyulu strip kullanıldı. Stripteki kuyulara farklı viruslar için hazırlanan PCR-mix-1 karışımlarının 15 µl'si sırayla dağıtıldı.
7. Her 6 kuyulu hasta örneği stribine cDNA örneği 10 µl eklendi.
8. Negatif kontrol stribinde her bir tüpe 10 µl DNA-buffer, internal kontrol stribine 10 µl Internal Control DNA C+ eklendi. Pozitif kontrol stribine virus spesifik Positive Control cDNA uygun kuyucuğa 10 µl eklendi. (Şekil 1)



Şekil 1. Örneklerin ve kontrol karışımlarının dağıtımı

9. Stripler yarım saat önceden açılmış BioRad iQ5 cihazının kuyularına yerleştirildi ve tablo 1’deki ısı döngüsü programında çalıştırıldı.

Tablo 1. Multipleks real-time PCR ısı döngüsü

Sıcaklık, °C	Zaman	Döngü
95°C	15 dakika	1
95°C	10 saniye	10
54°C	25 saniye	
72°C	25 saniye	
95°C	10 saniye	35
54°C	25 saniye floresan algılama	
72°C	25 saniye	

3.3.4. Sonuçların değerlendirilmesi

Bir saat sonunda sonuçlar değerlendirildi. RSV, HBoV, PIV 2, PIV 3 ve HCoV 229E/NL63 için Cy3 floresan kanalı, hMPV, adenovirus, rhinovirus, PIV 1, PIV 4 ve HCoV OC43/HKU1 için ROX floresan kanalı ve internal kontrol için FAM floresan kanalı kullanıldı.

Örnekler için siklus eşik değeri (cycle threshold; Ct) uygun floresan kanaldaki eşik çizgisinin üstünde bulunursa sonuç pozitif kabul edildi.

Örneklere ait Ct değeri yoksa ve internal kontrole ait FAM kanalındaki Ct değeri ≤ 32 ise sonuç negatif olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nın yoğun bakım, onkoloji, hematoloji, çocuk enfeksiyon, yenidoğan yoğun bakım, süt çocuğu ve büyük çocuk servislerinde ASYE sebebi ile yatırılan 17 yaş ve altındaki 158 çocuktan alınan nazofaringeal sürüntü örnekleri solunum yolu viruslarını tespit etmek amacıyla multipleks real-time PCR ve DFA testi ile çalışıldı.

ASYE olan toplam 158 hastanın 94'ü (%59.5) erkek, 64'ü (%40.5) kızdı. Erkeklerin kızlara oranı 1.46 idi. Toplam 158 hastada yaş gruplarına göre cinsiyet dağılımına bakıldığında 2 yaş ve altındaki 75 (%47.4) çocuğun 43'ü (%57.3) erkek ve 32'si (%42.7) kızdı. Yaşları 3-5 arasında olan 25 (%15.8) hastanın ise %88'i erkek, %12'si kızdı. ASYE, 14 yaşa kadar daha çok erkeklerde görülmekte iken 14 yaşından itibaren ise kızlarda daha çok görüldü. Fark istatistik olarak anlamlı bulundu. ($\chi^2=12.331$, sd=4, p=0.0151) (Tablo 2)

Nazofaringeal örneklerin 47'si (%29.8) çocuk yoğun bakım, 28'i (%17.7) çocuk onkoloji, 25'i (%15.8) büyük çocuk, 24'ü (%15.2) süt çocuğu, 15'i (%9.5) çocuk enfeksiyon, 10'u (%6.3) yenidoğan yoğun bakım ve 9'u (%5.7) çocuk hematoloji bölümlerinde yatırılan hastalara aitti.

Tablo 2. ASYE olan hastaların cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı

ASYE olan çocuklar	Yaş grupları											
	< 2 yaş		3-5 yaş		6-9 yaş		10-13 yaş		14-17 yaş		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Erkek	43	57.3	22	88	13	52	9	60	7	38.9	94	59.5
Kız	32	42.7	3	12	12	48	6	40	11	61.1	64	40.5
Toplam	75	47.4	25	15.8	25	15.8	15	9.5	18	11.4	158	100

$\chi^2=12.331$ sd=4 p=0.0151

ASYE olan toplam 158 hastadan real-time PCR yöntemi ile 114'ünde (%72.2) solunum yolu virusu tespit edildi. Bütün hastaların 49'unda (%31) koenfeksiyon bulundu. Respiratuvar viral enfeksiyonu olan 114 hastadan 65'inde (%57) tekli enfeksiyon, 39'unda (%34.2) ikili enfeksiyon ve 10'unda (%8.8) üçlü enfeksiyon vardı. (Tablo 3)

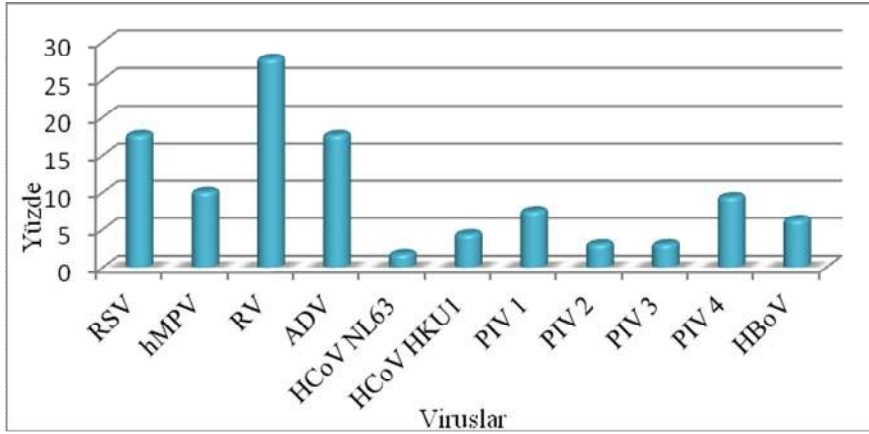
Tablo 3. ASYE olan 114 hastada bulunan solunum yolu virusları

Toplam virus pozitif 114 hasta	
Tekli enfeksiyonlar (65, %57)	
RSV	11
hMPV	8
RV	20
ADV	9
HCoV 229E/NL63	0
HCoV OC43/HKU1	1
PIV 1	2
PIV 2	3
PIV 3	2
PIV 4	2
HBoV	7

İkili enfeksiyonlar (39, %34.2)	
RSV + RV	6
RV + ADV	5
PIV 1 + PIV 4	4
RSV + ADV	3
hMPV + RV	3
ADV + HCoV OC43/HKU1	3
RSV + hMPV	2
RV + PIV 4	2
RSV + HCoV 229E/NL63	1
RSV + PIV 4	1
RV + HCoV 229E/NL63	1
ADV + HCoV 229E/NL63	1
ADV + PIV 1	1
ADV + PIV 4	1
ADV + HBoV	1
HCoV OC43/HKU1 + PIV 3	1
PIV 1 + PIV 3	1
PIV 1 + HBoV	1
PIV 2 + PIV 4	1

Üçlü enfeksiyonlar (10, %8.8)	
RSV + hMPV + RV	1
RSV + RV + ADV	1
RSV + ADV + PIV 1	1
RSV + PIV 3 + PIV 4	1
hMPV + RV + ADV	1
hMPV + RV + HCoV OC43/HKU1	1
RV + ADV + HBoV	1
RV + HCoV OC43/HKU1 + PIV 4	1
RV + PIV 1 + PIV 4	1
PIV 1 + PIV 2 + PIV 4	1

ASYE olan 158 hastada tek veya koenfeksiyon şeklinde RSV enfeksiyonu 28 hastada (%17.7), hMPV 16 (%10.1), rhinovirus 44 (%27.8), adenovirus 28 (%17.7), HCoV 229E/NL63 enfeksiyonu 3 (%1.8), HCoV OC43/HKU1 enfeksiyonu 7 (%4.4), PIV 1 enfeksiyonu 12 (%7.5), PIV 2 enfeksiyonu 5 (%3.1), PIV 3 enfeksiyonu 5 (%3.1), PIV 4 enfeksiyonu 15 (%9.4) ve HBoV 10 (%6.3) hastada tespit edildi. (Şekil 2)



Şekil 2. ASYE olan 158 çocukta solunum yolu viruslarının dağılımı

Solunum yolu virus enfeksiyonu olan 114 hastanın yaşa göre dağılımına bakıldığında 56'sı (%49.1) <2 yaş, 19'u (%16.7) 3-5 yaş, 19'u (%16.7) 6-9 yaş, 9'u (%7.9) 10-13 yaş ve 11'i (%9.6) 10-14 yaş grubunda idi. Tekli viral enfeksiyon %57, ikili %34.2, üçlü %8.8 oranlarında idi. Multiple enfeksiyon oranı %43 olarak bulundu. Tekli, ikili ve üçlü viral enfeksiyonların ($\chi^2=7.870$, $sd=8$, $p=0.4462$) veya virus pozitif ve negatif sonuçların ($\chi^2=2.799$, $sd=4$, $p=0.5920$) yaş gruplarına dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Ki-kare değerleri ve p değerleri tabloda uygun yapılan karşılaştırmaların altında verilmiştir. (Tablo 4)

Tablo 4. Tekli viral solunum yolu enfeksiyonu ve koenfeksiyonu olan 114 hastanın yaşa göre dağılımı

Yaş Grupları	Tekli enfeksiyonlar		İkili enfeksiyonlar		Üçlü enfeksiyonlar		Virus pozitif		Virus negatif	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<2 yaş	29	51.8	21	37.5	6	10.7	56	49.1	19	43.2
3-5 yaş	14	73.7	3	15.8	2	10.5	19	16.7	6	13.6
6-9 yaş	13	68.4	6	31.6	0	0	19	16.7	6	13.6
10-13 yaş	3	33.3	5	55.6	1	11.1	9	7.9	6	13.6
14-17 yaş	6	54.5	4	36.4	1	9.1	11	9.6	7	15.9
Toplam	65	57	39	34.2	10	8.8	114	100	44	100
	$\chi^2=7.870$ $sd=8$ $p=0.4462$						$\chi^2=2.799$ $sd=4$ $p=0.5920$			

Solunum yolu virus enfeksiyonu olan 114 hastanın 68'i (%59.6) erkek ve 46'sı (%40.4) kız idi. Tekli, ikili ve üçlü viral enfeksiyonlar kız çocukların sırasıyla %54.4, %39.4, %6.5'inde görüldü. Tekli, ikili ve üçlü viral enfeksiyonların ($\chi^2=1.087$, $sd=2$, $p=0.5807$) veya virus pozitif ve negatif sonuçların ($\chi^2=0.004$, $sd=1$, $p=0.9489$) cinsiyetlere göre dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Ki-kare değerleri ve p değerleri tabloda uygun yapılan karşılaştırmaların altında verilmiştir. (Tablo 5)

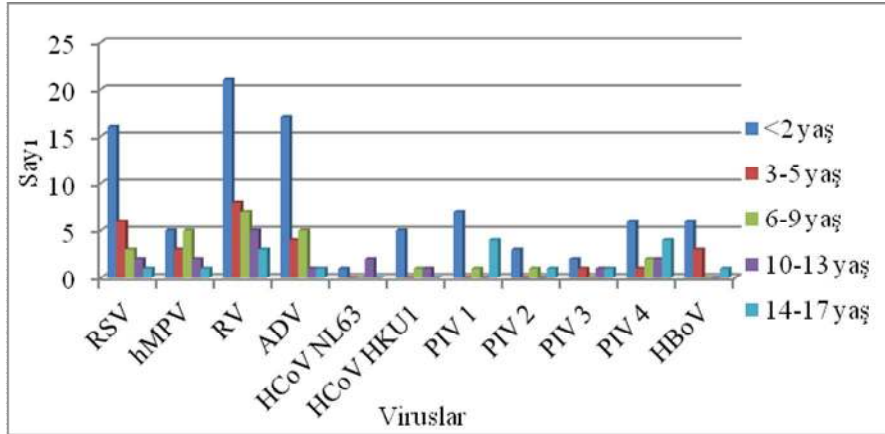
Tablo 5. Tekli viral solunum yolu enfeksiyonu ve koenfeksiyonu olan 114 hastanın cinsiyetlere göre dağılımı

Cinsiyet	Tekli enfeksiyonlar		İkili enfeksiyonlar		Üçlü enfeksiyonlar		Virus pozitif		Virus negatif	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Erkek	40	58.8	21	30.9	7	10.3	68	59.6	26	59.1
Kız	25	54.4	18	39.1	3	6.5	46	40.4	18	40.9
Toplam	65	57	39	34.2	10	8.8	114	100	44	100
	$\chi^2=1.087$ sd=2 p=0.5807						$\chi^2=0.004$ sd=1 p=0.9489			

Alt solunum yolu virus enfeksiyonu olan 114 hastada tek veya koenfeksiyon şeklinde RSV enfeksiyonu 28 hastada (%24.6), hMPV 16 (%14), rhinovirus 44 (%38.6), adenovirus 28 ((%24.6), HCoV 229E/NL63 enfeksiyonu 3 (%2.6), HCoV OC43/HKU1 enfeksiyonu 7 (%6.1), PIV 1 enfeksiyonu 12 (%10.5), PIV 2 enfeksiyonu 5 (%4.4), PIV 3 enfeksiyonu 5 (%4.4), PIV 4 enfeksiyonu 15 (%13.2) ve HBoV 10 (%8.8) hastada tespit edildi. Solunum yolu viruslarından RSV pozitif 28 vakanın %57.1'i <2 yaş, %21.4'ü 3-5 yaş, %10.7'si 6-9 yaş, %7.2'si 10-13 yaş ve %3.6'sı 14-17 yaş grubundaki çocuklar idi. Diğer virusların bulguları tablo 6'da verilmiştir. Her solunum yolu virusu için yaş gruplarındaki vaka sayısı şekil 3'de verilmiştir. Toplam 114 hastada solunum yolu viruslarının iki yaş ve altı ile 3 ve üstü grupta dağılımına bakıldığında ($\chi^2=7.421$, sd=10, p=0.6860) fark bulunmadı. (Tablo 6)

Tablo 6. Solunum yolu viruslarının 114 hastada yaş gruplarına göre dağılımı

Virus	<2 yaş n %	3-5 yaş n %	6-9 yaş n %	10-13 yaş n %	14-17 yaş n %	Toplam 114 n %
RSV	16 57.1	6 21.4	3 10.7	2 7.2	1 3.6	28 24.6
hMPV	5 31.3	3 18.6	5 31.3	2 12.5	1 6.3	16 14
RV	21 47.7	8 18.2	7 15.9	5 11.4	3 6.8	44 38.6
ADV	17 60.7	4 14.2	5 17.9	1 3.6	1 3.6	28 24.6
HCoV 229E/NL63	1 33.3	0 0	0 0	2 66.7	0 0	3 2.6
HCoV OC43/HKU1	5 71.4	0 0	1 14.3	1 14.3	0 0	7 6.1
PIV 1	7 58.3	0 0	1 8.3	0 0	4 33.4	12 10.5
PIV 2	3 60	0 0	1 20	0 0	1 20	5 4.4
PIV 3	2 40	1 20	0 0	1 20	1 20	5 4.4
PIV 4	6 40	1 6.7	2 13.3	2 13.3	4 26.7	15 13.2
HBoV	6 60	3 30	0 0	0 0	1 10	10 8.8



Şekil 3. Solunum yolu virus pozitif vakaların yaş gruplarına dağılımı

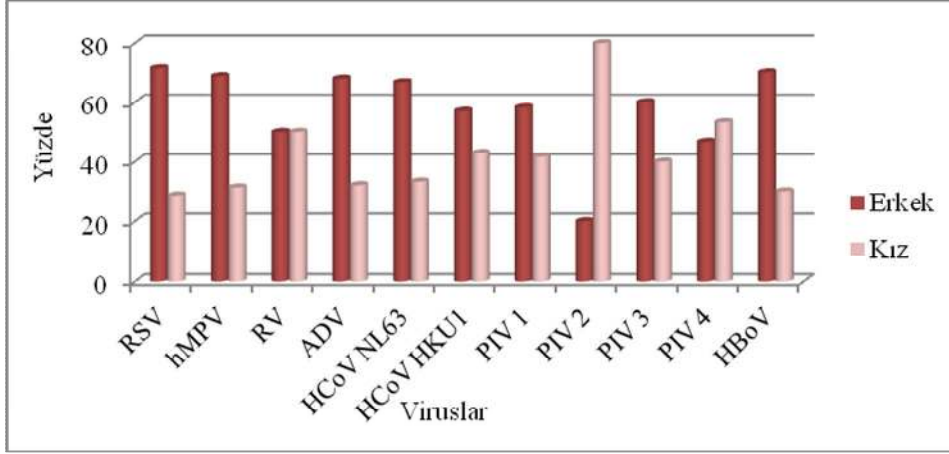
RSV enfeksiyonu olan 28 vakanın %71.4'ü erkek ve %28.6'sı kız, hMPV pozitif 16 vakanın %68.75'i erkek ve %31.25'i kız idi. Rhinovirus ile enfekte olan 44 hastanın %50'si kız ve %50'si erkek idi. (Tablo 7, Şekil 4)

Tablo 7. Viral solunum yolu enfeksiyonların cinsiyete göre dağılımı

Virus	Virus pozitif					
	Erkek		Kız		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
RSV	20	71.4	8	28.6	28	100
hMPV	11	68.7	5	31.3	16	100
RV	22	50	22	50	44	100
ADV	19	67.9	9	32.1	28	100
HCoV 229E/NL63	2	66.7	1	33.3	3	100
HCoV OC43/HKU1	4	57.1	3	42.9	7	100
PIV 1	7	58.3	5	41.7	12	100
PIV 2	1	20	4	80	5	100
PIV 3	3	60	2	40	5	100
PIV 4	7	46.7	8	53.3	15	100
HBoV	7	70	3	30	10	100

Virus (+) $\chi^2=9.491$ sd=10 p=0.4862
 Erkeklerde virus (+) $\chi^2=68.622$ sd=10 p=0.0000
 Kızlarda virus (+) $\chi^2=58.725$ sd=10 p=0.0000

Sadece virus pozitif hastalar değerlendirildiğinde viral etkenler ile cinsiyetler arasında fark bulunmadı ($\chi^2=9.491$, sd=10, p=0.4862). Ancak hem erkeklerde ($\chi^2=68.622$, sd=10, p=0.0000) hem kızlarda ($\chi^2=58.725$, sd=10, p=0.0000) en yaygın RSV, hMPV, RV ve ADV olmak üzere ilk dört virus grubunun görüldüğü saptandı. (Tablo 7, Şekil 4)



Şekil 4. Solunum yolu viruslarının cinsiyetlere göre dağılımı

ASYE olan toplam 158 hastanın 54'ü pnömoni, 12'si bronşiolit ve 92'si ASYE ön tanısı alan çocuklardan oluştu. Altta yatan hastalığı olup pnömonili, bronşiolitli ve ASYE belirtileri olan virus pozitif hastaların oranı sırasıyla %18.4, %0.9 ve %54.4 olup altta yatan hastalığı olmayan virus pozitif pnömonili ve bronşiolitli çocuklarda ise %20.2 ve %6.1 idi. Viral solunum yolu enfeksiyonu olan ve olmayan hastaların klinik tanıları arasında fark bulunmadı. ($\chi^2=4.257$, $sd=4$, $p=0.3723$) (Tablo 8)

Tablo 8. Viral solunum yolu enfeksiyonu olan ve olmayan hastaların klinik tanıları

Hastalık	Virus pozitif n	%	Virus negatif n	%	Toplam n	%
Pnömoni	23	20.2	4	9.1	27	17.1
Pnmömoni + Altta yatan hastalık	21	18.4	6	13.6	27	6.3
Bronşiolit	7	6.1	3	6.8	10	23.4
Bronşiolit + Altta yatan hastalık	1	0.9	1	2.33	2	1.3
ASYE + Altta yatan hastalık	62	54.4	30	68.2	92	58.2
Toplam	114	72.2	44	28.8	158	100

$\chi^2=4.257$ $sd=4$ $p=0.3723$

Alt solunum yolu viral enfeksiyonu olan 114 çocuktan 62'sinde (%54.4) ateş, 80'inde (%70.2) öksürük, 58'inde (%50.9) burun akıntısı, 56'sında (%49.1) takipne, 33'ünde (%29) bulantı ve kusma, 11'inde (%9.7) kas ağrısı vardı. Viral solunum yolu enfeksiyonu olan ve olmayan hastalarda görülen klinik belirtiler arasında fark bulunmadı. ($\chi^2=0.679$, sd=4, p=0.9538) (Tablo 9)

Tablo 9. Viral solunum yolu enfeksiyonu olan ve olmayan hastalarda görülen klinik belirtiler

Belirtiler	Virus pozitif 114 hasta		Virus negatif 44 hasta		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Ateş	62	54.4	25	56.8	87	55.1
Öksürük	80	70.2	30	68.2	110	69.6
B. Akıntısı	58	50.9	24	54.5	82	51.9
Takipne	56	49.1	18	40.9	74	46.8
Bulantı-Kusma	33	28.9	14	31.8	47	29.7
Kas ağrısı	11	9.6	11	25	22	13.9

$\chi^2=0.679$ sd=4 p=0.9538

ASYE olan hastalarda bulunan toplam 173 solunum yolu virusunun %25.4'ü (44) çocuk yoğun bakım, %17.9'u süt çocuğu bölümünde yatan hastalarda tespit edildi. Çocuk onkoloji, büyük çocuk, çocuk enfeksiyon ve çocuk hematoloji bölümlerinde yatan hastalarda rhinovirus sırasıyla %31, %28.5, %33.3, %38.4 oranlarında en yaygın virus iken adenovirus, PIV 4, PIV 1 ve RSV değişen oranlarda ikinci sırada izledi. Buna karşılık çocuk yoğun bakımda %22.7 ve süt çocuğu bölümünde %25.7 RSV ilk sırada iken rhinovirus sırasıyla %20.5 ve %19.4 oranlarla ikinci sırada bulundu. Yenidoğan yoğun bakımda ise %30 oranla adenovirus birinci sırada olup hMPV ve HBoV her biri %20 oranlarla ikinci sırada tespit edilen viruslar idi. (Tablo 10)

Tablo 10. Solunum yolu virusu pozitif örneklerin kliniklere göre dağılımı

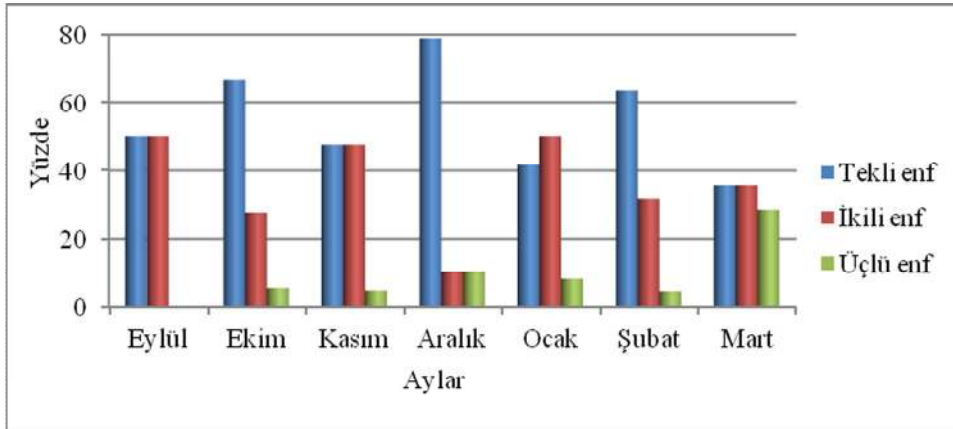
Virus	Çocuk yoğun bakım n %	Çocuk onkoloji n %	Büyük çocuk n %	Süt çocuğu n %	Çocuk enfeksi- yon n %	Yenido- ğan yoğun bakım n %	Çocuk hemato- loji n %
RSV	10 22.7	2 6.9	2 7.1	8 25.7	2 11.1	1 10	3 23.1
hMPV	6 13.6	2 6.9	3 10.7	1 3.2	2 11.1	2 20	0 0
RV	9 20.5	9 31	8 28.5	6 19.4	6 33.3	1 10	5 38.4
ADV	8 18.2	5 17.2	5 17.9	5 16.1	1 5.6	3 30	1 7.7
HCoV 229E/NL63	0 0	1 3.4	0 0	1 3.2	0 0	0 0	1 7.7
HCoV OC43/HKU1	4 9.1	0 0	1 3.6	2 6.5	0 0	0 0	0 0
PIV 1	3 6.8	3 10.4	1 3.6	2 6.5	3 16.6	0 0	0 0
PIV 2	1 2.3	1 3.4	0 0	2 6.5	1 5.6	0 0	0 0
PIV 3	1 2.3	0 0	2 7.1	0 0	1 5.6	1 10	0 0
PIV 4	0 0	3 10.4	5 17.9	3 9.7	2 11.1	0 0	2 15.4
HBoV	2 4.5	3 10.4	1 3.6	1 3.2	0 0	2 20	1 7.7
Toplam	44 25.4	29 16.8	28 16.2	31 17.9	18 10.4	10 5.8	13 7.5

Viral ASYE olan 114 hastada tekli viral enfeksiyon 65 (%57), ikili virus enfeksiyonu 39 (%34.2) ve üçlü enfeksiyon 10 (%8.8) hastada bulundu. Vakaların %7'si Eylül, %15.8'i Ekim, %18.4'ü Kasım, %16.7'si Aralık, %10.5'i Ocak, %19.3'ü Şubat ve %12.3'ü Mart ayında görüldü. Tekli ve çoklu viral enfeksiyonu olan hastaların aylara göre dağılımı şekil 5'de verilmiştir. Solunum yolu tekli viral enfeksiyon, ikili ve üçlü enfeksiyonu olan 114 hastanın aylara göre dağılımında fark bulunmadı. ($\chi^2=18.083$, $sd=12$, $p=0.1132$) (Tablo 11)

Tablo 11. Tekli viral solunum yolu enfeksiyonu ve koenfeksiyonu olan 114 hastanın aylara göre dağılımı

Aylar	Tekli enfeksiyonlar n %	İkili enfeksiyonlar n %	Üçlü enfeksiyonlar n %	Toplam n %
Eylül 2012	4 50	4 50	0 0	8 7
Ekim 2012	12 66.7	5 27.8	1 5.5	18 15.8
Kasım 2012	10 47.6	10 47.6	1 4.8	21 18.4
Aralık 2012	15 79	2 10.5	2 10.5	19 16.7
Ocak 2013	5 41.7	6 50	1 8.3	12 10.5
Şubat 2013	14 63.6	7 31.8	1 4.6	22 19.3
Mart 2013	5 35.7	5 35.7	4 28.6	14 12.3
Toplam	65 57	39 34.2	10 8.8	114 100

$\chi^2=18.083$ sd=12 p=0.1132

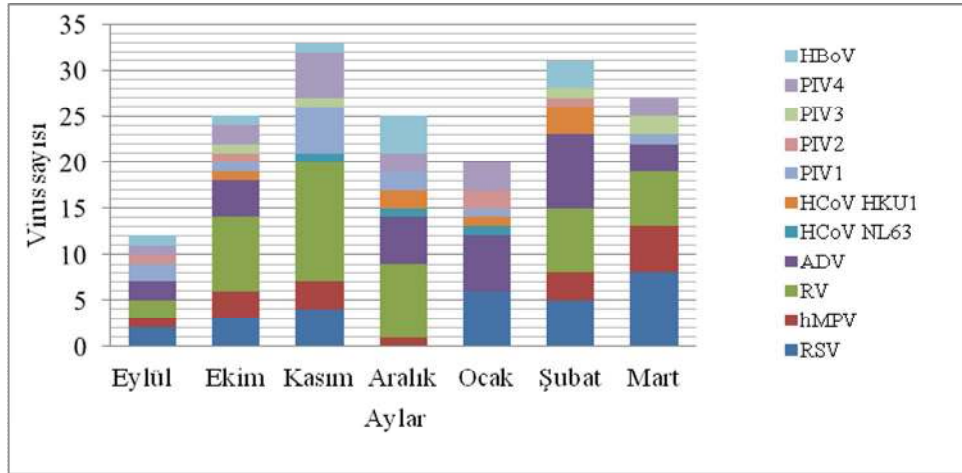


Şekil 5. Tekli, ikili ve üçlü viral enfeksiyonların aylara göre dağılımı

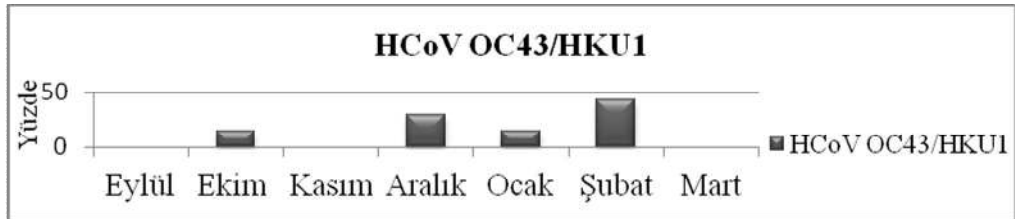
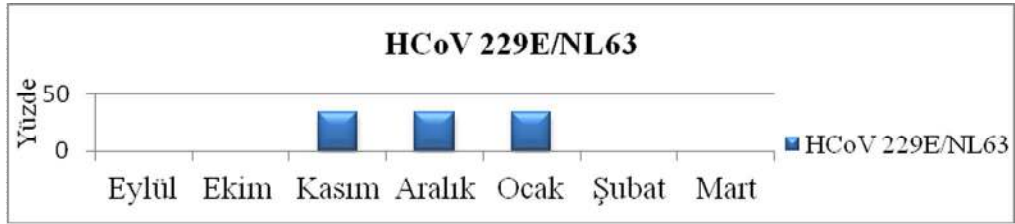
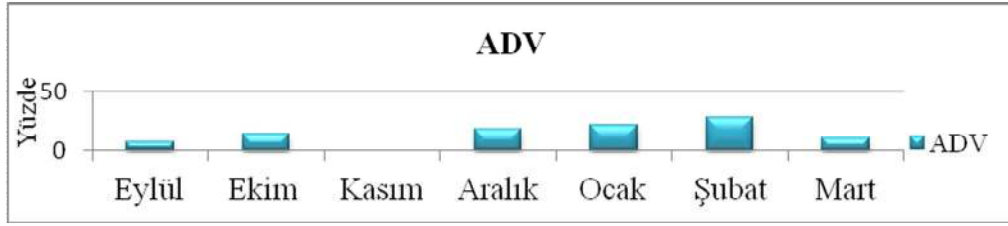
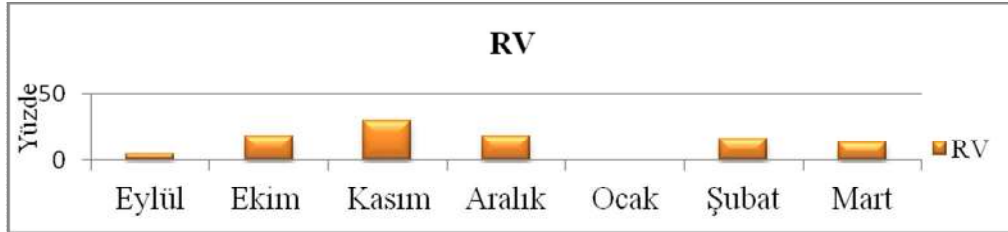
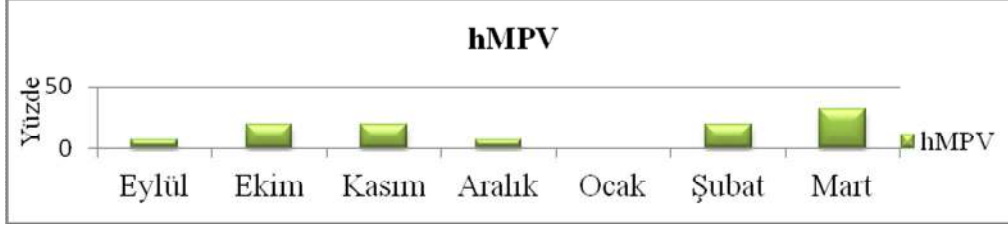
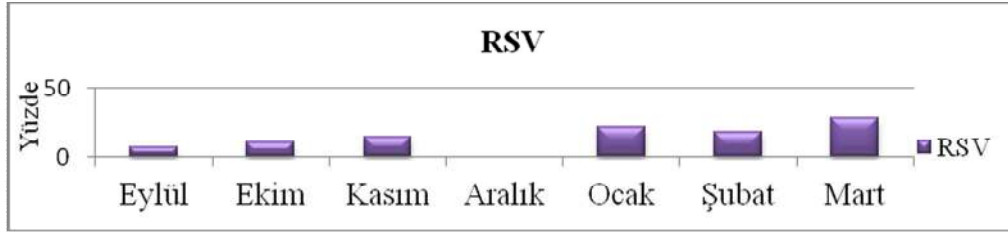
Viral ASYE olan 114 hastada tek veya koenfeksiyon şeklinde tespit edilen toplam 173 virusun (RSV, hMPV, rhinovirus, adenovirus, HCoV 229E/NL63, HCoV OC43/HKU1, PIV 1, PIV 2, PIV 3, PIV 4 ve HBoV) Eylül 2012 ve Mart 2013 döneminde aylara göre dağılımına bakıldığında 12'si Eylül ayında, 25'i Ekim, 33'ü Kasım, 25'i Aralık, 20'si Ocak, 31'i Şubat ve 27'si Mart ayında tespit edildi. (Tablo 12, Şekil 6 ve 7)

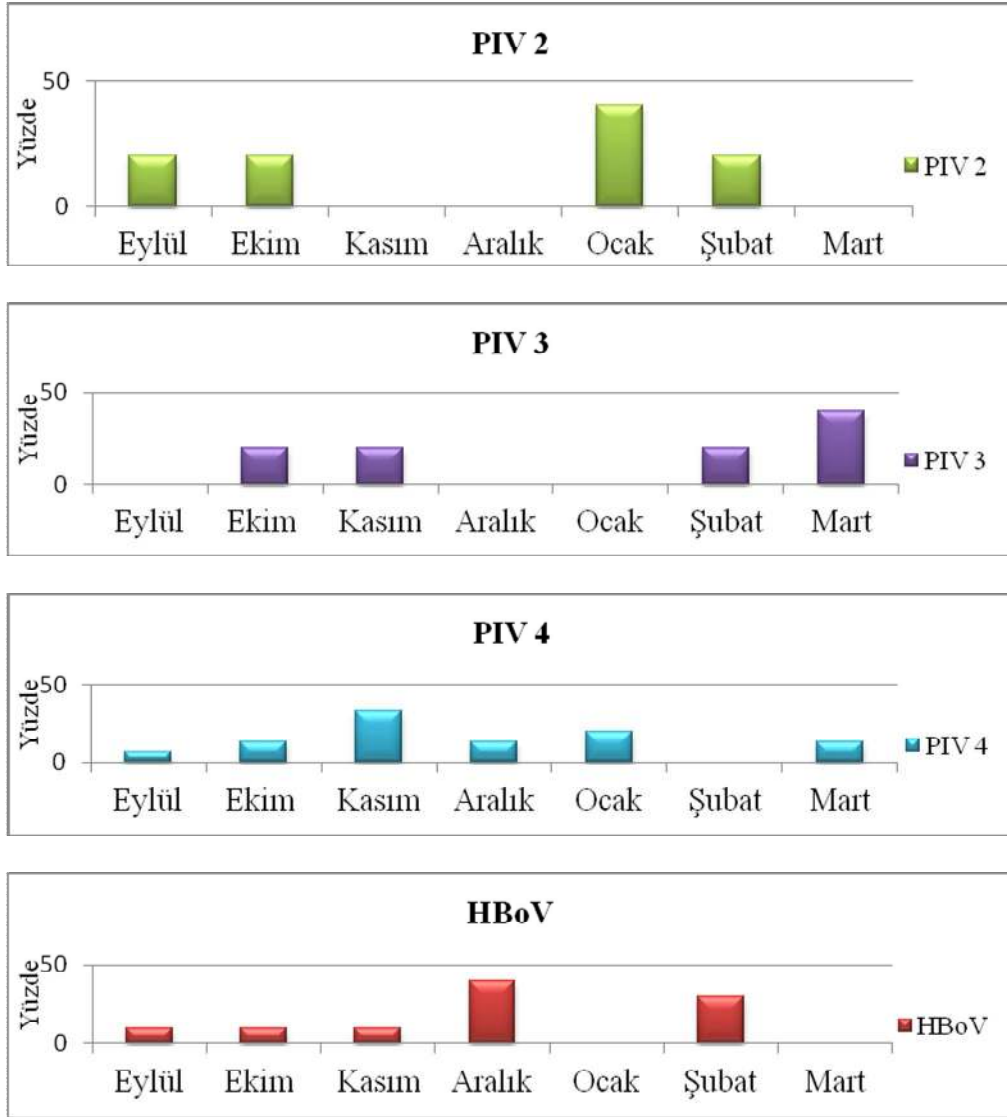
Tablo 12. Real-time PCR ile tespit edilen solunum yolu viruslarının aylara göre dağılımı

Virus	Eylül 2012 n %	Ekim 2012 n %	Kasım 2012 n %	Aralık 2012 n %	Ocak 2013 n %	Şubat 2013 n %	Mart 2013 n %	Toplam n %
RSV	2 7.1	3 10.7	4 14.3	0 0	6 21.4	5 17.9	8 28.6	28 16.2
hMPV	1 6.3	3 18.7	3 18.7	1 6.3	0 0	3 18.7	5 31.3	16 9.3
RV	2 4.5	8 18.2	13 29.6	8 18.2	0 0	7 15.9	6 13.6	44 25.4
ADV	2 7.1	4 14.3	0 0	5 17.9	6 21.4	8 28.6	3 10.7	28 16.2
HCoV 229E/NL63	0 0	0 0	1 33.3	1 33.3	1 33.3	0 0	0 0	3 1.7
HCoV OC43/HKU1	0 0	1 14.3	0 0	2 28.6	1 14.3	3 42.8	0 0	7 4.1
PIV 1	2 16.7	1 8.3	5 41.7	2 16.7	1 8.3	0 0	1 8.3	12 6.8
PIV 2	1 20	1 20	0 0	0 0	2 40	1 20	0 0	5 2.9
PIV 3	0 0	1 20	1 20	0 0	0 0	1 20	2 40	5 2.9
PIV 4	1 6.7	2 13.3	5 33.4	2 13.3	3 20	0 0	2 13.3	15 8.7
HBoV	1 10	1 10	1 10	4 40	0 0	3 30	0 0	10 5.8
Toplam	12 6.9	25 14.5	33 19.1	25 14.5	20 11.6	31 17.9	27 15.5	173 100



Şekil 6. Real-time PCR ile tespit edilen virusların aylara göre dağılımı





Şekil 7. Solunum yolu viruslarının aylara göre dağılımı

Real-time PCR testi referans test olarak kabul edildiğinde RSV, hMPV, adenovirus ve PIV için DFA testinin sensitivitesi sırasıyla %85.7, %75, %46.4, %70.4 ve spesifitesi %96.2, %96.5, %89.4, %94.7 bulundu. Pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerler tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 13. RSV, hMPV, adenovirus ve PIV için real-time PCR testi ve DFA testi sonuçları

Virus	DFA	Real-time PCR		Sensitivite	Spesifite	Pozitif Prediktif Değer	Negatif Prediktif Değer
		Pozitif	Negatif				
RSV	Pozitif	24	5	%85.7	%96.2	%82.8	%96.9
	Negatif	4	125				
hMPV	Pozitif	12	5	%75	%96.5	%70.6	%97.2
	Negatif	4	137				
ADV	Pozitif	13	4	%46.4	%89.4	%76.5	%89.4
	Negatif	15	126				
PIV	Pozitif	19	7	%70.4	%94.7	%73.1	%93.9
	Negatif	8	124				

5. TARTIŞMA

ASYE bütün dünyada çocuklarda görülen morbidite ve mortalitenin başlıca sebebidir. Çocuklarda ASYE'lerinin %90'a varan oranından viruslar sorumludur. Prematüre bebekler, immun yetmezliği olan çocuklar, kronik akciğer hastalığı, hematolojik, immunolojik, kardiyak, metabolik, nörolojik ve onkolojik hastalık gibi altta yatan hastalığı olan çocuklarda viral solunum yolu enfeksiyon riski çok daha artmaktadır^{1,156}.

Viral solunum yolu enfeksiyonları özellikle bebek ve küçük çocuklarda hastaneye yatışın önemli sebebidir. Solunum yolu viruslarından RSV, hMPV, rhinovirus, adenovirus, influenza virus tip A ve B, PIV 1, 2, 3 ve hMPV ASYE'lerinin çoğunda tanınan viruslar olarak kabul edilmiştir.

Viral solunum yolu enfeksiyonlarının tanısı önceleri sadece virus kültürü, antijen ve antikor tespiti ile yapılmıştır. Bu metodlar ile alt solunum yolu hastalığı olan çocukların sadece %40'dan azında virus tespit edilmiştir. Moleküler ampifikasyona dayalı tekniklerin (PCR) 1990'lı yıllarda geliştirilmesi ile yeni bir dönem başlamıştır. PCR bilinen virusların tanısında sensitiviteyi artırması yanı sıra son 10 yılda hMPV, yeni HCoV'lar (HKU1 ve NL63), HBoV ve rhinovirus C gibi birçok yeni solunum yolu viruslarının keşfini etkin kılmıştır^{157,158}.

Moleküler tanı metodları ile bronşiolit, akut hırıltılı veya astımı olan çocukların %95'e varan kadarında ve pnömonisi olan çocukların %72'ye varan kadarında bir veya daha fazla solunum yolu virusu tespit edilmiştir. Nükleik asit testleri asemptomatik çocuklarda solunum yolu viruslarının (pik mevsimi boyunca %40-%68 kadar) ve semptomatik çocuklardaki koenfeksiyon oranlarının yüksek (akut astımda %43'e varan) olduğunu göstermiştir^{110,159}.

ASYE'lerinde virusların sıklığı örnek alımı, hastalık şiddeti, tanı yöntemleri ve iklim gibi birçok faktöre bağlıdır. ASYE'lerinin major sebebi olarak virusların önemi giderek artmaktadır. Yüksek sensitiviteye sahip yeni moleküler tanı testleri

konvansiyonel tanı metodlarının yerine geçmiştir. Solunum yolu viral enfeksiyonların tanısında PCR standart metod haline gelmiştir¹⁶⁰.

Enfeksiyonların çoğu virüslara bağlıdır, ancak bakteriyel enfeksiyon olması yönünde endişe duyulması aşırı test yapılması, antibiyotiklerin fazla kullanımı ve hastanede kalış süresinin uzaması ile sonuçlanır. Bu sebeple hızlı ve doğru tanı tedavinin zamanında başlaması için esastır. Solunum yolu virüslerinin hızlı tanısı nozokomiyal enfeksiyonların yayılmasının azaltılması için korunma stratejilerinin uygulanması, gereksiz antibiyotik kullanımından kaçınma ve yüksek riskli hastalarda erken tedavi seçeneklerinin başlatılması için ilk adımdır¹⁶¹.

Viral solunum yolu enfeksiyonlarının doğru tanısı öncelikle örneklerin uygun toplanması, transportu ve saklanmasıyla bağlıdır. Nazofaringeal aspirat, nazofaringeal yıkantı, nazofaringeal sürüntü, boğaz sürüntüsü, nazal sürüntü gibi solunum yolu örnekleri ideal olarak enfeksiyonun akut fazında, klinik belirtilerin başlangıcından sonraki ilk 3 günde toplanmalıdır. Sürüntü örneklerinin toplanması için rayon, dacron, polyester ve naylondan yapılmış eküvyonlar kullanılabilir. Kalsiyum arjinat uçlu ve ahşap saplı eküvyonlar virüslerin tespitini inhibe edebilecek toksinler içerebilir.

Solunum yolu virüslerinin tanısı virus izolasyonu, antijen tespiti, antikor tespiti ve moleküler tabanlı testler ile gerçekleştirilebilir. Viral solunum yolu enfeksiyonlarının tanısı için hücre kültürü ve antijen tespiti için testlerin bazı dezavantajları vardır. Altın standart olarak kabul edilen hücre kültürü zaman alıcıdır. Bununla birlikte, hücre dizilerinin seçimi önemlidir, bir virus üretimi için uygun olan hücre dizisi diğer virüsleri çoğaltmak için uygun olmayabilir. Solunum yolu virüslerini izole etmek için özellikle primer böbrek hücreleri en etkili sistemdir. Daha çok LLC-MK2, NCI-H292 (insan akciğer hücre dizisi), A549, HuH7 (hepatokarsinoma hücre dizisi) veya hibrid hücre kültürleri gibi devamlı hücre dizileri kullanılmaktadır. Hücre kültüründe virus izolasyonu, sonuçların geç (15 gün kadar) alınması yanı sıra pahalı olup özel eğitim ve laboratuvar altyapısının iyi olmasını gerektirir. Virüslerin labilesi veya örnek toplanması ile ilgili sorunlar sebebiyle veya kültür işlemine bağlı olarak yalancı negatif sonuçlar siktir. Viral kültür referans laboratuvarlarında rutin olarak yapılmasına rağmen test süresi uzun olduğundan ve bazı virüsler tespit edilemediğinden hasta yönetiminde daha az yardımcıdır¹⁰⁸. Bu sebeple kısa zamanda güvenilir sonuçlar veren real-time PCR yöntemi ve direkt immunfloresan test pek çok laboratuvarda hücre kültür yöntemi

yerine tercih edilmektedir⁷. Antijen tespiti için testlerin ise sıklıkla sensitivite ve spesifitesi düşüktür. DFA testi hızlı bir teknik olup, virus izolasyonu ile korele sonuçlar verir. Ancak tanı, subjektif olduğundan yorumlama ile ilgili sorunlardan etkilenebilir. Çalışmalar, IFA ile antijen tespiti veya konvansiyonel viral kültürün NAAT ile kıyaslandığında sensitivitesinin özellikle HCoV, rhinovirus ve respiratuvar polyomavirus için düşük olduğunu göstermiştir. Son zamanlarda, çeşitli EIA testleri kullanarak hızlı tanı kitleri geliştirilmiştir ve bunlar RSV antijen tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu testlerin performansları da sınırlıdır ve sensitivite de hücre kültüründe izolasyona göre genellikle daha düşüktür⁴.

Günümüzde, RT-PCR testinin hücre kültüründe izolasyona göre daha yüksek sensitivite gösterdiği bildirilmiştir ve sensitivitenin yüksek olması özellikle örnek miktarı az olduğunda ve viral yayılım süresinin kısa olduğu durumlarda tanıda yararlıdır. Virus spesifik PCR yapılması her virus için ayrı amplifikasyon ister, zaman alıcı ve yorucudur. Nested PCR tekniği PCR'a göre daha duyarlı olarak kabul edilir. Bu teknikte ilk PCR ürünü ikinci bir amplifikasyona uğrar, fakat aşırı örnek kullanımı nedeniyle kontaminasyon sorunları ortaya çıkabilir. Bu sebeple rutin laboratuvar için nested PCR testi gibi verimli ve hızlı, ancak daha düşük kontaminasyon riski olan bir test ideal olacaktır. Birçok çalışma multipleks PCR testinin avantajlarını göstermiştir, tek testte solunum virusları paneli aynı anda tespit edilebilir. Solunum yolu viruslarının tanısı için yüksek sensitivite ve spesifitesine bağlı olarak multipleks RT-PCR testi günümüzde seçilen metoddur. Multipleks RT-PCR uygulaması aynı zamanda multiple enfeksiyonların tanısını sağlar^{9,162}.

Çocuklarda solunum yolu enfeksiyonlarının viral etyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalardan Almanya'da Temmuz 1996 ve Haziran 2006 arası 10 yıllık dönemde, Weigl ve ark.⁵³ tarafından akut solunum yolu enfeksiyonu olan ve 16 yaşından küçük 18899 çocuğa ait örnekler 19 solunum yolu patojeni için multipleks RT-PCR ile test edilmiştir. Pozitiflik oranı kullanılan test paneline göre %72.9 oranına kadar yükselmiştir. Örneklerin çoğunda picornaviruslar (%35-%39), paramyxovirus (%23-%28) ve influenza viruslar (%5.8-%12.5) bulunmuştur. RSV ve PIV tip 3, hMPV, PIV 1 ve PIV 2 ile zaman zaman birlikte bulunmuştur. Reoviruslar ile *Legionella pneumophila* hiç bulunmamıştır ve *Chlamydia pneumoniae* ile *Bordetella parapertussis* sadece nadiren tespit edilmiştir.

Jansen ve ark.¹⁶³ Hollanda'da 2007-2008 kış ayları boyunca akut solunum enfeksiyonu sebebiyle kabul edilen 133 çocuk hastadan aldıkları nazofaringeal aspirat örneklerini kullanarak solunum yolu viruslarının multipleks real-time RT-PCR yöntemiyle kapsamlı araştırılmasını hedeflemiştir. Multipleks PCR test ile 133 örnekten %68'inde (90/133) bir veya daha fazla virus için pozitif sonuç elde edilmiştir. Örneklerden %50'sinde tekli enfeksiyon ve %17'sinde ikili enfeksiyon belirlenmiştir. Rhinovirus %27 (36/133) oranla tespit edilen en yaygın virus olup RSV %16.5 (22), adenovirus %10.5 (14), influenza A %6.7 (9), hMPV %6 (8), HBoV %3 (4), HCoV %2.2 (3), influenza B %2.2 (3), PIV 1 ve PIV 3 her biri %1.5 (her biri 2 vaka), PIV 2 ve PIV 4 her biri %0.7 (her biri 1 vaka), enterovirus %0.7 (1 vaka) oranlarında bulunmuştur.

Çocuklarda ASYE'ları ile ilgili yapılan çalışmalardan Freymuth ve ark.¹⁶⁴ tarafından Fransa'da Kasım 2003 ve Mart 2004 döneminde akut ASYE olan hospitalize edilen 263 ve edilmeyen 186 olmak üzere toplam 449 çocukta virusların tespiti için dört multipleks PCR testinin performansları ile DFA ve HuH7 hücre kültürü karşılaştırılmıştır. Hospitalize edilen 263 çocuktan 150'sinde (%7.6) nazal aspirat DFA pozitif bulunmuştur. Örneklerin 188'i (%72.3) DFA ve HuH7 hücre kültürü ile pozitif bulunurken 242'si (%92) PCR pozitif idi. Moleküler metodlara göre pozitif 242 örnekten 158'inde (%65.2) RSV, 17'sinde (%7) hMPV, 20'sinde (%8.2) influenza virus, 9'unda (%3.7) PIV, 91'inde (%37.6) rhinovirus, 6'sında (%2.4) enterovirus, 11'inde (%4.5) HCoV ve 5'inde (%2) adenovirus bulunmuştur. Toplam 449 çocuktan ise 411'i (%91.5) PCR pozitif bulunmuştur. RSV, rhinovirus ve influenza virus en sık saptanan viruslar olup %43.6, %31.8 ve %8.8 oranlarında idi, diğer viruslar sırasıyla hMPV (%4.4), HCoV (%3.4), PIV (%3.2), adenovirus (%2.3), ve enterovirus (%2.1) idi. Toplam 263 çocukta ise RSV %60.1, hMPV %6.7, influenza A virus %6.8, influenza B virus %0.4, influenza C virus %0.4, PIV 1 %1.1, PIV 2 %0.4, PIV 3 %1.1, PIV 4 %0.8, rhinovirus %34.6, enterovirus %2.3, HCoV 229E %1.9, HCoV OC43 %1.1, HCoV NL63 %1.1 ve adenovirus %1.9 oranlarında bulunmuştur.

Zappa ve ark.¹⁶⁵ İtalya'da 2004 ve 2008 yılları arasında akut solunum yolu enfeksiyonu sebebiyle hastaneye yatırılan 3 yaşın altındaki 240 çocukta (130 erkek, 110 kız) hMPV ve HBoV enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisini araştırmışlardır. Çocukların %66.7'sinde ASYE (bronşit, bronşiolit, pnömoni veya astım) gözlenmiştir.

Hastalardan alınan faringeal sürüntü örnekleri moleküler yöntemlerle hMPV ve HBoV dahil olmak üzere solunum yolu virusları için test edilmiştir. PCR analizi ile örneklerin %54.6'sı (131/240) en az bir virus için pozitif bulunmuştur. Örneklerin 46'sı (%19.2) RSV A/B, %11.7'si adenovirus, %10'u rhinovirus, %4.6'sı influenza A/B, %2.9'u HCoV 229E/OC43 ve %0.4'ü PIV 3 için pozitif idi. HMPV enfeksiyonu %8.3 ve HBoV %12.1 oranında bulunmuştur. Her iki virus ASYE'ları ile ilişkili bulunmuştur. HMPV bronşioliti olan çocukların %7.2'sinde tek bir etken iken, HBoV pnömoni vakalarının %18.5 ile ilişkili tek bir etken olarak tespit edilmiştir. Koenfeksiyonlar akut viral solunum yolu enfeksiyonlarının %22.1'inde (29/131), bütün hastaların ise %12'sinde (29/240) bulunmuştur.

Culebras ve ark.¹⁶⁶ İspanya, Madrid'de akut solunum yolu enfeksiyonu olup hastaneye yatırılan çocuklarda birden fazla solunum yolu viruslarının tespiti için ticari array-tabanlı bir yöntem (CLART® PneumoVir Genomica, Coslada, İspanya) uygulamışlardır. Ekim 2008 ve Nisan 2009 tarihleri arasında 253 çocukdan elde edilen 281 nazofaringeal örnekten %80'inde (225) virus tespit edilmiştir. Çoklu viral enfeksiyon örneklerin %33.45'inde (94) bulunmuştur. RSV A 82 (%29.2), HBoV 42 (%14.94), RSV B 38 (%13.5), enteroviruslar 27 (%9.6) rhinovirus 26 (%9.25), hMPV A 18 (%6.4), influenza A virus 16 (%5.7), hMPV B 16 (%5.7), adenovirus 13 (%4.6), influenza B virus 8 (%2.8), PIV tip 3, 7 (%2.5), influenza C virus 3 (%1), HCoV 2 (%0.7) ve PIV 4, 1 (%0.35) örnekte bulunmuştur. PIV 1 ve PIV 2 tespit edilmemiştir. En yaygın bulunan viruslar RSV A, HBoV, RSV B, enteroviruslar ve rhinovirus olmuştur.

Ursic ve ark.¹⁶⁷ Slovenya'da, HBoV ve diğer solunum yolu viruslarının prevalansını değerlendirmek ve HBoV DNA viral yükü ile enfeksiyon şiddeti arasında ilişkili olup olmadığını araştırmak için 2 yıl süreli retrospektif bir çalışma yapmışlardır. Nisan 2007 ve Mart 2009 tarihleri arasında akut solunum yolu enfeksiyonu sebebiyle hastaneye başvuran 0-17 yaş arası 760 çocukdan 891 solunum yolu örneği real-time PCR veya DFA ile solunum viruslarının varlığı için test edilmiştir. Örnekler adenovirus, influenza virus A ve B ile PIV 1-3 antijenlerinin varlığı için rutin olarak DFA ile çalışılmıştır. Tüm örnekler, rhinovirus, hMPV ve HCoV için RT-PCR ile test edilmiştir. Çocukların çoğu 3 yaşın altında olup %36.2'si 0 ile 12 ay arası, %32.7'si 3 ile 24 ay ve %19.9'u 25 ve 36 ay arası yaş gruplarından oluşmuştur. Çalışma grubunun sadece

%11.2'si 3 yaşından daha büyüktü. Çocukların %56.1'i erkekti. Çalışma grubunun %96'sında ASYE saptanmıştır. Olguların %59.6'sında bronşiolit ve %19'unda pnömoni tanısı konmuştur. Olguların %27.3'ünde altta yatan hastalık (kalp ve akciğer hastalığı, prematürite ve doğuştan immun yetmezlik) gözlenmiştir. Tekrarlayan hırıltı ve astım sırasıyla vakaların %9 ve %6.7'sinde belirlenmiştir. Çalışmada çocukların %2.7'si yoğun bakım ünitesine transfer edilmiştir. Solunum yolu örneklerinin %75'inde (668/891) en az bir viral patojen saptanmıştır. Pozitif örneklerin %75.3'ünde (503/668) tekli virus enfeksiyonu ve %24.7'sinde (165/668) koenfeksiyon tespit edilmiştir. Rhinovirus ile enfeksiyon tüm hastaların %33.1'inde, RSV %23.5 ve HBoV %18.4'ünde tespit edilmiştir. HMPV ve HCoV enfeksiyonları daha az sıklıkta, sırasıyla hastaların sadece %9 ve %8.4'ünde tespit edilmiştir. Adenovirus, influenza virus A ve B ile PIV 1 ve 3 sırasıyla vakaların %0.8, %0.3, %0.6 ve %0.9'unda bulunmuştur. HBoV solunum yolu örneklerinin %7.4'ünde (66/891) tek patojen olarak tespit edilmiştir. Sadece HBoV enfeksiyonu olan çocukların %97'sinde (64/66) ASYE tanısı konmuştur. HBoV'un çocuklarda solunum yolu enfeksiyonlarında önemli ve sık görülen bir patojen olduğu ve hastalığın şiddetinin RSV'una bağlı hastalığın şiddetine benzediği bildirilmiştir.

Louie ve ark.'nın¹⁶⁸ çalışmasında Kaliforniya'da 21 Şubat ve 31 Ekim 2007 tarihleri arasında ciddi ASYE olan 18 yaş altındaki 43 hastadan real-time PCR testi ile 30'unda (%70) patojen tanınmıştır. Rhinovirus 21 (%49), hMPV 4(%9), PIV 3, 3 (%7), RSV 1 (%2) ve *Mycoplasma pneumoniae* 1 (%2) vakada tespit edilmiştir. Rhinovirus ile enfekte hastalar daha çok pnömoni tanısıyla hastaneye yatırılan (10, %48) altta yatan kronik hastalığı olan (15, %71), anormal akciğer grafisi olan (18, %86), mekanik ventilasyon gerektiren (12, %57) ve hastanede uzun süre kalan (ortalama süre, 7 gün, 1-29 gün) hastalardı. Diğer virus veya bakteriler ile koenfeksiyonlar yaygın (10, %47) idi. Rhinovirus'un çocuklarda önceden bilinene göre daha ciddi ASYE ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Bezerra ve ark.¹⁶⁹ Kuzey-Doğu Brezilya'da Recife'de bronşiolit, pnömoni, hırıltılı atak ile ÜSYE olan beş yaşın altındaki çocuklarda viral ve atipik bakteriyel etkenleri araştırmıştır. Nazofaringeal aspirat örneklerinde 17 solunum yolu viral ve atipik bakteriyel patojeni tespit etmek için multipleks PCR kullanılmıştır. Toplam 407 çocuğun yaş ortalaması sekiz ay olup %69'u 12 ayın altında idi. Çocuklarda özellikle

koenfeksiyon (%39.5) yüksek olup viruslar örneklerin %85.5'inde tespit edilmiştir. İki patojen 124 (%30.5) örnek ve üç patojen 33 (%8.1) örnekte saptanmıştır. RSV %37, adenovirus %25, rhinovirus %19, HBoV %19, hMPV %10 ve *Mycoplasma pneumoniae* %10 oranlarındadır. PIV'lar, çoğunluğu (%4.9) PIV 3 olmak üzere örneklerin %8.4'ünde tespit edilmiştir. HCoV'lar en fazla OC43 olmak üzere (%1.7) örneklerin %3.2'sinde bulunmuştur. *Mycoplasma pneumoniae* hastaneye başvuran çocukların %17'sinde saptanmıştır. Çalışmanın okul öncesi çocuklarda solunum yolu viral ve atipik bakteriyel patojenlerin önemini gösterdiği kaydedilmiştir. Genel olarak, RSV ve *Mycoplasma pneumoniae* sırasıyla bronşiolit ve pnömoni olmak üzere daha ciddi hastalıkla ilişkili bulunmuştur.

Zhang ve ark.'larının¹⁷⁰ çalışmasında Çin'de Şangay'da Mayıs 2009 ve Temmuz 2010 tarihleri arasında akut solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle hastaneye yatırılan 3 yaşın altındaki 164 çocuktan nazofarinks sürüntü örnekleri toplanmıştır. Çalışmada yaygın 10 solunum virusu için VRDAL multipleks PCR ile 15 solunum virusu için SeeplexH RV15 ACE Detection kit (Seegene Inc., Seoul, South Korea) karşılaştırılmıştır. VRDAL multipleks PCR ile 84 (%51.2) olguda virus tespit edilmiş ve 8 (%4.9) hastada miks enfeksiyon saptanmıştır. SeeplexH RV15 ACE detection kiti kullanarak, viruslar 129 (%78.7) ve koenfeksiyon 49 (%29.9) hastada tespit edilmiştir. Human rhinovirus 37 (vakaların %22.6'sı), influenza A virus 32 (%19.5), PIV 2, 30 (%18.3), PIV 3, 23 (%14), human enterovirus 15 (%9.1), PIV 1, RSV B ve adenovirus her biri 14 (%8.5), HCoV 229E/NL63, 8 (%4.9), HBoV 6 (%3.7), influenza B virus ve RSV A her biri 5 (%3), PIV 4, 3 (%1.8), HCoV OC43/HKU1, 2 (%1.2) ve hMPV 1 (%0.6) vakada bulunmuştur. Sonuç olarak Şangay'da akut solunum yolu enfeksiyonu belirtileri olan çocuklarda solunum yolu enfeksiyonları (%78.7) ve koenfeksiyonlar (%29.9) yüksek sıklıkta tespit edilmiştir. SeeplexH RV15 ACE yönteminin aynı anda birden fazla solunum virusunu tespit etmek için VRDAL yöntemine göre daha güvenilir olduğu bulunmuştur.

Chung ve ark.¹⁷¹ Kore'de Şubat 2006 ve Kasım 2006 ayları arasında akut hırıltı sebebiyle hastane yatırılan 5 yaşından küçük 231 çocukda hMPV, HBoV, HCoV NL63 ve HCoV HKU1 prevalansını tespit için IFA (DAKO, Cambridgeshire, UK) ve multipleks RT-PCR testi kullanmıştır. Rhinovirus, HCoV NL63, HCoV HKU1, HBoV ve hMPV için PCR testi yapılmıştır. Solunum virusları hastaların %61.5'inde (142/231)

ve %45.5'inde ise (105/231) tek bir virus bulunmuştur. Rhinovirus (%33.3), RSV (%13.8) ve HBoV (%13.8) en sık tespit edilen edilen viruslar olarak bulunmuştur. HMPV ve HCoV NL63 çocukların sırasıyla %7.8 ve %1.3'ünde tespit edilmiştir. Çalışma grubunun %16'sında (37) birden fazla virus tespit edilmiştir. Erkeklerin kızlara oranı 1.6/1 olarak gözlenmiştir. Akut hırıltısı olan çocuklarda en sık tespit edilen virusların rhinovirus, RSV ve HBoV olduğunu ve HBoV'unun klinik önemini tanımlamak için ileri çalışmalara gerek olduğunu bildirmişlerdir.

Do ve ark.⁵⁸ Güney Vietnam'da ciddi solunum yolu hastalığı olan 2 ay ve 13 yaş arası 309 çocukda Kasım 2004-Ocak 2008 süresinde üç yıllık prospektif bir çalışma yapmışlardır. Hastaların 181'i (%59) 2 yaşından küçüktür ve 309 hastanın 79'u (%26) çocuk yoğun bakım ünitesine başvurmuştur. Çocuklardan alınan burun, boğaz sürüntü ve nazofaringeal aspirat örneklerde 15 virus için multipleks RT-PCR kiti (Seeplex™ RV detection, Seegene) ve ayrıca Monoplex real-time RT-PCR kullanarak çalışılmıştır. RSV %24, influenza virus A ve B %17, HBoV %16, enterovirus %9, HCoV NL63 %7 ve HCoV OC43 %1 olmak üzere HCoV %8, hMPV %7, PIV 1-3 %6 (sırasıyla %3, %1, %3), adenovirus %5 ve human rhinovirus A %4 olmak üzere viruslar olguların %72'sinde (222/309) tespit edilmiştir. Birden fazla virus ile koenfeksiyonlar hastaların %20'sinde (62/309) gözlenmiştir. Burun ve boğaz sürüntüsü örneklerine ait bulgular birleştirildiğinde nazofaringeal aspirat örneklerinin sonuçlarına benzer bulunmuştur. Sonuç olarak dünyanın diğer bölgelerinde olduğu gibi, RSV ve influenza virusunun baskın viral patojenler olduğu, burun ve boğaz sürüntüsü örneklerinin kombine kullanılmasının moleküler testler için tercih edilebilir örnek olduğu kaydedilmiştir. Ciddi solunum yolu hastalığında tekli ve çoklu viral enfeksiyonların klinik önemini daha iyi anlamak için daha ileri araştırmalara gerekli olduğu rapor edilmiştir.

Chidlow ve ark.¹⁷² tarafından Papua Yeni Gine'de ASYE ile ilişkili virusları belirlemek için yapılan çalışmada yaşları 1 hafta ve 18 ay olan küçük çocuklarda multipleks real-time PCR ile nazal sürüntü örneklerinin %86'sında (69/80) solunum virusları tespit edilmiştir. Rhinovirus 50 (%62.5), RSV 18 (%22.5), adenovirus B-D 14 (%17.5), HBoV 18 (%22.5), hMPV 3 (%3.8), HCoV HKU1 3 (%3.8), HCoV NL63 3 (%3.8), HCoV OC43 5 (%6.2), influenza A virus 10 (%12.5), influenza B virus 2 (%2.5), PIV 1-4, 8 (%10) örnekte pozitif olup KI polyoma virus bulunmazken WU polyoma virus 16 (%20) vakada rastlanmıştır. Multiple enfeksiyonlar %49 oranında

bulunmuştur. Papua Yeni Gine'nin dağlık bölgelerinde yaşayan küçük çocuklarda solunum virusu enfeksiyon yükünün önemli olduğu belirtilmiştir.

Özcan ve ark.¹⁷³ Ankara'da Eylül 2009 ve 2010 tarihleri arasında astım atağı olan 3-17 yaş arası astımlı 104 çocukta multipleks real-time PCR yöntemiyle viral solunum patojenlerin varlığını araştırmıştır. Hastalardan alınan nazofaringeal ve nazal sürüntü örneklerinin %53.8'inde solunum virusları saptanmıştır. En sık karşılaşılan viral etken rhinovirus (%35.6) idi. Viral enfeksiyonu olan ve olmayan çocuklarda astım atağının ciddiyeti, sistemik steroid ihtiyacı ve yatış oranları yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Viral ÜSYE'leri astım ataklarının en yaygın sebebi olmakla birlikte alevlenme şiddetinin solunum virusu varlığından bağımsız olduğu belirtilmiştir.

Beka ve ark.¹⁷⁴ İstanbul'da yaptıkları çalışmada akut solunum yolu enfeksiyonu olan 109 çocuğa ait örnekler multipleks PCR testi ile RSV, rhinovirus, influenza virus, hMPV, adenovirus, PIV ve HCoV için test edilmiştir. Ayrıca *C. Pneumoniae* için real-time PCR, RSV antijeni için DFA ve influenza virusu için hücre kültürü metodu da yapılmıştır. Solunum virusları vakaların %39.4'ünde (43/109) tespit edilmiş olup sırasıyla rhinovirus %14.7, RSV B %7.3, influenza A %6.4, hMPV %3.6, adenovirus %3.6, HCoV %0.9, PIV 3 %0.9, PIV 4 %0.9 ve RSV A %0.9 oranlarında bulunmuştur. *C. pneumoniae* hiçbir örnekte tespit edilmemiştir. RSV enfeksiyonlarının tanısı için PCR ve DFA testinin sensitivitesi sırasıyla %100 ve %100, spesifitesi ise %97 ve %100 olarak tespit edilmiştir.

Midilli ve ark.¹⁷⁵ Şubat ve Mayıs 2009 tarihleri arasında İstanbul'da 114 çocuk ile yaptıkları çalışmada akut ASYE bulgularıyla başvuran 0-5 yaş arası çocukta Polyoma virus KI ve WU varlığını saptamayı amaçlamışlardır. Nazofaringeal sürüntü örneklerini Polyoma virus KI ve WU DNA'sına uygun primer dizilerinin kullanıldığı PCR yöntemi ile çalışmışlar ve pozitif sonuçları DNA dizi analizi ile doğrulamışlardır. Polyoma virus KI 1 (%0.88) örnekte ve Polyoma virus WU 1 (%0.88) örnekte olmak üzere aynı oranda tespit edilmiştir. Sonuç olarak akut ASYE olan 0-5 yaş arası çocuklarda Polyoma virus KI ve WU DNA'sının varlığının ilk kez gösterildiği bu çalışmada Polyoma virus KI ve WU'nun solunum yolu hastalıkları ile ilişkilerinin ve epidemiyolojik özelliklerinin daha iyi belirlenebilmesi için moleküler epidemiyolojik çalışmalara gereksinim olduğunu belirtmişlerdir.

Güvenç ve ark.¹⁷⁶ Antalya’da yaptıkları çalışmada ASYE olan 2 yaş altındaki çocuklarda viral etkenleri DFA ve PCR yöntemleri ile araştırmışlardır. Akut bronşiolit atağı tanısı konan 20 ve bronşiolitis obliterans tanısı ile takip edilen 10 olmak üzere 30 çocuktan nazofaringeal yıkama sıvı örneğinde adenovirus, HCoV, PIV, rhinovirus, RSV, influenza virus, HBoV, hMPV ve enterovirus varlığını belirlemek amacıyla multipleks PCR (Respiratory Viruses Detection Kit, Seegene, Italy) yöntemini kullanmışlardır. Aynı zamanda adenovirus, RSV, influenza virus ve PIV varlığını DFA yöntemi (Imagen Respiratory Screen Kit, Oxoid, UK) ile araştırmışlardır. DFA ile viral etken belirlenememişken PCR yöntemi ile 30 hastanın 29’unda en az bir virus tespit edilmiştir. PCR yöntemi ile örneklerin 11’inde RSV, 2’sinde PIV, 2’sinde HBoV, 1’inde rhinovirus, 1’inde adenovirus, 1’inde influenza virus, 1’inde hMPV izole etmişlerdir. Örneklerin 3’ünde rhinovirus ve RSV, 1’inde PIV ve HCoV, 1’inde RSV ve hMPV, 1’inde PIV ve adenovirus, 1’inde rhinovirus, RSV ve adenovirus, 1’inde rhinovirus, RSV ve hMPV, 1’inde rhinovirus, RSV ve PIV, 1’inde adenovirus, HBoV ve hMPV olmak üzere koenfeksiyon belirlemişlerdir. Sonuç olarak DFA yönteminin hızlı tanı yöntemi olmasına rağmen solunum yolu viruslarının tanısında duyarlılığının düşük olduğunu ve multipleks PCR yönteminin tercih edilebilir olduğunu bildirmişlerdir.

Sancaklı ve ark.¹⁷⁷ Aydın’da yaptıkları çalışmada ASYE tanısıyla yatırılan hastalarda, multipleks PCR testi ile nazofaringeal sürüntü örneklerinde viral etkenlerin yaşlara ve tanılara göre dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya Şubat 2010 ve Ağustos 2010 tarihleri arasında bronşiolit, bronkopnömoni ve pnömoni tanılarıyla izlenmiş 87 olgu alınmıştır. Nazofaringeal sürüntü örneklerinde virus taraması multipleks PCR Seeplex RV 15 ACE detection kiti (Seegene, Seoul, South Korea) ile yapılmıştır. Toplam 87 olgunun 59’unda (%67.8) PCR ile en az bir virus saptanmıştır. Olguların %58.6’sında tek virus ve %9.2’sinde birden fazla virus bulunmuştur. Viral etkenler sırasıyla rhinovirus 23 (%26.4), RSV A-B 9 (%10.3), hMPV 6 (%6.9), PIV 1-3 3 (%3.4), influenza A 3 (%3.4), adenovirus 2 (%2.3), HBoV 2 (%2.3), HCoV 2 (%2.3), enterovirus 1 (%1.1) örnekte pozitif idi. Koenfeksiyonlar rhinovirus+RSV A-B 4 (%4.6), rhinovirus+PIV 1-3 1 (%1.1), adenovirus+RSV A-B 2 (%2.3), HCoV+HBoV 1 (%1.1) hastada tespit edilmiştir.

Kandemir ve ark.¹⁷⁸ Ekim 2005 ve Mayıs 2006 tarihleri arasında Afyon'da Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Afyonkarahisar Zübeyde Hanım Doğum ve Çocuk Hastanesi'ne bronşit veya bronşiolit ön tanısı ile yatırılan 1 ay-13 yaş arasında olan toplam 46 hastadan (22 kız, 24 erkek) alınan nazofaringial sürüntü örneklerinde yedi farklı solunum yolu virusunu multipleks kantitatif RT-PCR Enzim Hibridizasyon Assay (Hexaplex Plus; Prodesse, USA) ile araştırmışlardır. Hastalardan alınan kan örneklerinde floresan antikor tekniği (FAT-Euroimmun GmbH, Almanya) ile de RSV, influenza A H1N1, influenza A H3N2, influenza B, PIV 1, PIV 2, PIV 3 ve adenovirusa karşı IgM antikorları araştırılmıştır. Toplam 46 hastadan 13'ü (%28.3) immunfloresan test ile (hMPV hariç), 8'i (%17.4) ise multipleks PCR yöntemi ile (adenovirus hariç) bir veya daha fazla respiratuvar virus için pozitif bulunmuştur. Multipleks PCR ile influenza A 8, influenza B 1, hMPV 5, PIV 3, 3 ve RSV 1 ve immunfloresan yöntemi ile influenza A H1N1, 9, influenza A H3N2, 8, influenza B 8, PIV 3, 3 ve RSV 2 hastada saptanmıştır.

ASYE olan çocuklarda solunum yolu viruslarının tespiti için yaptığımız bu çalışmada Eylül 2012 ve Mart 2013 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatan 17 yaş ve altındaki 158 çocuk hastadan nazofaringeal sürüntü örnekleri flocced eküvyon ile alındı. Solunum yolu viruslarının saptanmasında belki de en önemli yeniliklerden biri flocced eküvyonların kullanımıdır. Flocced eküvyon, dik naylon fiberlerden yapılmış olup hücreleri toplamak için yumuşak fırça gibi davranır ve hücreleri taşıma besiyerine kolayca serbest bırakırken diğer bazı fiber matriksten yapılan eküvyonların aksine örnek materyalinin çoğunu içinde tutmaz.

Önceleri nazofaringeal aspirat ve nazofaringeal yıkantı örneklerinin solunum viruslarının tespiti için sürüntü örneklerinden daha üstün olduğu kabul edilirdi. Ancak çocuklardan alınan nazofaringeal aspirat ile flocced eküvyonla alınan nazal sürüntü örneklerini karşılaştıran çalışmalar solunum yolu viruslarının tespiti için benzer sensitivite ve hatta bazıları daha yüksek sensitivite gösterdiğini bildirmiştir^{179,180}.

Çalışma grubundaki 158 ASYE'lu çocuğun %59.5'i erkek ve %40.5'i kızdı. Çocukların %47.4'ü 2 yaş ve altı, %15.8'i 3-5 yaş arasında olmak üzere toplam %63.3'ü 5 yaş ve altındaki grupta yer aldı. ASYE, 14 yaşa kadar daha çok erkeklerde görülmekte iken 14 yaşından itibaren ise kızlarda daha çok görüldü. (p<0.05)

Hasta örnekleri Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nın çocuk yoğun bakım, onkoloji, hematoloji, çocuk enfeksiyon, yenidoğan yoğun bakım, süt çocuğu ve büyük çocuk servislerinden gönderildi. Vakaların çoğu %29.8 oranla çocuk yoğun bakım bölümünde yatan hastalardı.

Multipleks real-time PCR testi ile ASYE olan 158 hastadan 114'ünde (%72.2) solunum yolu virusu tespit edildi. Bütün hastaların 49'unda (%31) koenfeksiyon bulundu. Respiratuvar viral enfeksiyonu olan 114 hastadan 65'inde (%57) tekli enfeksiyon, 39'unda (%34.2) ikili enfeksiyon ve 10'unda (%8.8) üçlü enfeksiyon görüldü. ASYE olan 158 hastada tek veya koenfeksiyon şeklinde rhinovirus en yaygın virus olup 44 (%27.8) hastada tespit edildi. Diğer viruslar sırasıyla RSV %17.7, adenovirus %17.7, hMPV %10.1, PIV 4 %9.4, PIV 1 %7.5, HBoV %6.3, HCoV OC43/HKU1 %4.4, PIV 2 %3.1, PIV 3 %3.1 ve HCoV 229E/NL63 %1.8 oranlarında bulundu.

Respiratuvar virus pozitif bulunan 114 hastanın %59.6'sı erkek, %40.4'ü kızdı. Viral enfeksiyonu olan çocuklarda yaş dağılımına bakıldığında %49.1'i 2 yaş altı ve %16.7'si 3-5 yaş olmak üzere %65.8 oranla çoğunluğunu 5 yaş ve altındaki çocuklar oluşturdu.

Solunum yolu virusu tespit edilen 114 hastanın 44'ü pnömoni, 8'i bronşiolit ve 62'si ASYE ön tanısı alan çocuklardan oluştu. Virus enfeksiyonu olan 114 hastanın 84'ünde (%73.6) ve virus enfeksiyonu olmayan 44 hastanın ise 37'sinde (%84) solunum yolu enfeksiyonuna eşlik eden hematolojik, immunolojik, kardiyak, metabolik, nörolojik ve onkolojik hastalık gibi altta yatan hastalık vardı.

Solunum yolu virusu tespit edilen 114 çocukta en sık görülen semptomlar öksürük (%70.2), ateş (%54.4), burun akıntısı (%50.9) ve takipne (%49.1) idi.

ASYE olan hastalarda bulunan toplam 173 solunum yolu virusunun %25.4 (44) olmak üzere çoğu çocuk yoğun bakımda yatan hastalarda tespit edildi. Çocuk onkoloji, büyük çocuk, çocuk enfeksiyon ve çocuk hematoloji bölümlerinde yatan hastalarda rhinovirus sırasıyla %31, %28.5, %33.3, %38.4 oranlarında en yaygın virus iken adenovirus, PIV 4, PIV 1 ve RSV değişen oranlarda ikinci sırada izledi. Buna karşılık çocuk yoğun bakımda %22.7 ve süt çocuğu bölümünde %25.7 RSV ilk sırada iken rhinovirus sırasıyla %20.5 ve %19.4 oranlarla ikinci sırada bulundu. Yenidoğan yoğun

bakımda ise %30 oranla adenovirus birinci sırada olup hMPV ve HBoV her biri %20 oranlarla ikinci sırada tespit edilen viruslar idi.

Çalışmamızda solunum yolu virusları ile enfekte hastalar en sık Şubat ayında 22 vaka ile %19.3, Kasım ayında 21 vaka ile %18.4 ve Aralık ayında 19 vaka ile %16.7 oranlarında tespit edildi.

Nazofaringeal sürüntü örnekleri DFA testi ile RSV, hMPV, adenovirus ve PIV antijenleri için değerlendirildiğinde RSV 24, hMPV 12, adenovirus 13 ve PIV 19 örnekte her iki yöntemle de pozitif bulundu. Real-time PCR testi referans test olarak kabul edildiğinde DFA testinin sensitivitesi RSV ve hMPV için sırasıyla %85.7 ve %75 olup, adenovirus ve PIV için sırasıyla bulunan %46.4 ve %70.4 oranlarına göre daha yüksektir. RSV, hMPV, adenovirus ve PIV için DFA testinin spesifitesi ise sırasıyla %96.2, %96.5, %89.4 ve %94.7 idi. Pozitif prediktif değerler sırasıyla %82.8, %70.6, %76.5, %73.1 ve negatif prediktif değerler %96.9, %97.2, %89.4 ve %93.9 olarak bulundu.

Çocuklarda ASYE'larında viral etyolojinin multipleks PCR testi gibi moleküler tanı metodları ile araştırıldığı çalışmalarda %53.8 ve %96 arasında değişen oranlarda solunum yolu virusları tespit edilmiştir^{173,176}. Çalışmamızda ASYE olan toplam 158 hastanın ise %72.2'sinde multipleks real-time PCR ile solunum yolu virusu bulundu. Bu oran ASYE'lu çocuklarda virus enfeksiyonlarının çalışıldığı Slovenya'daki %75, Vietnam'da %72 ve Kaliforniya'da %70'lik oranlara benzerdir^{58,167,168}. Bulgumuz Fransa'da yapılan çalışmada bildirilen %92, İspanya'da %80, Çin'de %78.7 oranlarından düşük, Kore'de %61.5 ve İtalya'da %54.6'lık oranlardan yüksektir^{164,165,166,170,171}. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise Güvenç ve ark.¹⁷⁶ 2 yaşın altındaki ASYE'lu 30 hastadan %96.6'sında, Ankara'da Özcan ve ark.¹⁷³ astım atağı olan 104 çocuktan %53.8'inde ve Afyon'da Kandemir ve ark.¹⁷⁸ ise ASYE ön tanılı 46 hastanın %39.1'inde viral enfeksiyon tespit etmişlerdir.

ASYE olan yenidoğan ve küçük çocuklarda multiple enfeksiyon oranı %70'e varan oranlarda bildirilmiştir^{108,110}. Çoklu viral enfeksiyonlar ile hastalığın ciddiyeti arasında ilişkiyi destekleyen veya desteklemeyen farklı raporlar vardır¹¹⁰. Çalışmamızda çoklu enfeksiyon oranı olan %31'lik bulgu İspanya'daki çalışmada bulunan %33.4 ve Çin'deki %29.9 oranlarına yakındır^{166,170}. Buna karşılık Papua Yeni Gine'de %49, Kaliforniya'da %47, Kore'de %45.5 ve Brezilya'da %39.5 olan koenfeksiyon

prevalansı bizim %31'lik bulgumuzdan daha yüksektir^{168,169,171,172}. Slovenya'daki %24.7, İtalya'daki %22.1 ve Vietnam'daki %20'lik koenfeksiyon oranları ise daha düşüktür^{58,165,167}. Ülkemizde Antalya'daki çalışmada %33.3, Afyon'da %17.4 ve Aydın'daki çalışmada ise %9.2 oranında multiple viral enfeksiyon gözlenmiştir^{176,177,178}.

Çalışma grubumuzda 158 hastada rhinovirus %27.8 oranla en yaygın virus iken ikinci sırada %17.7 oranlarla RSV ve adenovirus bulundu. Rhinovirusların tipik olarak soğuk algınlığı gibi ÜSYE'larına sebep olduğu kabul edilir. Buna karşılık son yıllarda yeni moleküler tanı testlerinin kullanımı ile önceden bilinenin aksine rhinovirusların ASYE'larında da önemli rolü olduğu gösterilmiştir. RSV ise bebeklerde ve küçük çocuklarda ciddi ASYE'larında en yaygın virustur. En baskın virus olarak rhinovirusun bildirildiği çalışmalarda Papua Yeni Gine'de %62.5, Kaliforniya'da %49, Kore'de %33.3 ve Çin'de %22.6 gibi oldukça yüksek oranlar tespit edilmiştir^{168,170,171,172}. Buna karşılık RSV, Fransa'da %60.1, İspanya'daki çalışmada %42.7, Brezilya'da %37, Vietnam'da %24 ve İtalya'da %19.2 gibi oranlarla en yaygın görülen virus olup rhinovirus Fransa'da %34.6 ile ikinci sırada iken diğer ülkelerden Brezilya'da %19, İtalya'da %10 ve İspanya'da %9.25 gibi değişen oranlarda bulunmuştur^{58,164,165,166,169}. Yine Ankara'da %35.6, Aydın'da %26.4 ve İstanbul'da %14.7 oranları ile en yaygın rhinovirus tespit edilirken Antalya'da %36.6 ile ilk sırada RSV bulunmuştur. RSV enfeksiyonu İstanbul'daki çalışmada %8.2 (RSV A %0.9 ve RSV B %7.3) ve Aydın'da %10.3 oranında olup ikinci sıraya yerleşmiştir^{174,177}.

Adenoviruslar özellikle farenjit, rinit gibi ÜSYE'larına ve nadiren bronşiolit ve pnömoni gibi ciddi ASYE'larına sebep olur. Adenovirus enfeksiyonunun pnömoni vakalarında %4-%10 ve bronşiolit vakalarında %2-%10 arasında görüldüğü bildirilmiştir¹⁸¹. Adenovirusların latensiye bağlı olarak genellikle koenfeksiyonlarda bulunduğu belirtilmiştir¹⁰⁸. Çalışmamızda da 28 (%17.7) vakada adenovirus tespit edilmiş olup bu vakaların %32'si (9) tekli enfeksiyon iken çoğuna, %68'ine (19) diğer viruslar eşlik etmekteydi. Çalışma grubumuzda %17.7'lik adenovirus enfeksiyon sıklığı Papua Yeni Gine'deki %17.5 oranına benzer, Brezilya'daki %25'lik orandan düşüktür^{169,172}. İtalya'da %11.7, Çin'de %8.5, Vietnam'da %5 ve Slovenya'daki %0.8 gibi oranlar bulgumuzdan düşüktür^{58,165,167,170}. İstanbul, Antalya ve Aydın'daki çalışmalarda ise sırasıyla %3.6, %3.3 ve %2.3 oranlarında adenovirus enfeksiyonu görülmüştür^{174,176,177}.

Birçok çalışmada hastaneye yatırılan ASYE olan çocuklarda hMPV enfeksiyon prevalansı %3-%18 arasında olup RSV'dan sonra genellikle ikinci en yaygın virus olarak bildirilmiştir^{110, 182}. Çalışmamızda hMPV sıklığı %10.1 oranında olup üçüncü sırada yer almıştır. HMPV pozitif 16 vakanın %50'sinde RSV ve/veya rhinovirus ile koenfeksiyon görülmüştür. Özellikle RSV ile birlikte hMPV'unun ikili enfeksiyonları bu iki virusun mevsimsel dağılımı aynı olduğundan çok sayıda çalışmada bildirilmiştir¹¹⁰. HMPV prevalansı olan %10.1'lik bulgumuz Brezilya'da %10, Kaliforniya'da %9 ve Slovenya'daki %9 oranları ile korele, İspanya'daki %12.1'den biraz düşüktür^{166,167,168,169}. İtalya'da %8.3, Kore'de %7.8, Papua Yeni Gine'de %3.8 ve Çin'deki %0.6 oranları ise bizim bulgumuzdan düşüktür^{165,170,171,172}. Ülkemizde ise hMPV enfeksiyon oranları Aydın, İstanbul ve Antalya'da sırasıyla %6.9, %3.6 ve %3.3 oranlarındadır^{174,176,177}.

Parainfluenza virus tiplerinden PIV 3 yenidoğan ve küçük çocuklarda ASYE'lerinin majör sebeplerinden biridir. PIV 1 daha çok akut krup ile ilişkilidir. PIV 2 genellikle PIV 1 veya PIV 3'e göre daha az oranlarda görülmekte olup çoğunlukla ÜSYE'lerinden izole edilir. Parainfluenza grubundan PIV 4 ise yıllardır hafif ÜSYE ile ilişkili olduğu bilinmesine rağmen yakınlarda yapılan çalışmalarda PIV 4'ün özellikle çocuklarda ciddi ASYE'lerinde etken olduğunu bildirilmiştir^{56,183}. Çalışmamızda da PIV 4 %9.4 oranla en yaygın dördüncü virus olup diğer PIV'lardan PIV 1 %7.5, PIV 2 ve PIV 3 her biri % 3.1 oranlarında bulunmuştur. PIV 4 enfeksiyon prevalansı Çin'de %1.8, Fransa'da %0.8, İspanya'da %0.35 gibi daha düşük sıklıkta bildirilmiştir^{164,166,170}. PIV 1 ve PIV 2 pozitifliği sırasıyla Çin'de %8.5, %18.3 ve Fransa'da %1.1, %0.4 oranlarındadır^{164,170}. PIV 3 prevalansı ise Brezilya'da %4.9, İspanya'da %2.5, Fransa'da %1.1 kadar düşük iken Kaliforniya'da %57 ve Çin'de %14 kadar daha yüksek orandadır^{164,166,168,169,170}.

Akut solunum yolu hastalığı olan çocuklarda HBoV prevalansı %2.5 ve %19 aralığındadır²². Çalışma grubumuzda HBoV enfeksiyonu %6.3 oranında olup Slovenya'da %18.4, Vietnam'da %16, İspanya'da %14.9, Kore'de %13.8 ve İtalya'daki %12.1 oranlarından düşüktür^{58,165,166,167,171}. Ayrıca bulgumuz Çin'de %3.7 oranından yüksektir¹⁷⁰. Antalya'daki çalışmada %6.6 oranında bulunan HBoV enfeksiyonu bizim bulgumuza benzer olup Aydın'daki %2.3 oranı ise daha düşüktür^{176,177}.

HCoV'lar respiratuvar enfeksiyonların %5 ile %30'undan sorumludur²². ASYE'lerinde HCoV'un daha çok diğer viruslarla birlikte bulunduğu bildirilmiştir¹⁸⁴. Çalışmamızda HCoV enfeksiyon oranı toplam %6.2 (10) idi. HCoV pozitif 10 örnekten 9'u diğer viruslarla koenfekte bulundu. HCoV OC43/HKU1 %4.4 ve HCoV 229E/NL63 %1.8 oranlarında tespit edildi. Çin'deki çalışmada ise HCoV 229E/NL63 %4.9 ve HCoV OC43/HKU1 %1.2 oranında olup toplam %6.1 oranla bizim bulgumuza benzerdir¹⁷⁰. Papua Yeni Gine'de HCoV enfeksiyonu %13.8 (HCoV OC43 %6.2, HCoV HKU1 %3.8 ve HCoV NL63 %3.8), Slovenya'da %8.4, Fransa'da %4.1 (HCoV 229E %1.9, HCoV OC43 %1.1 ve HCoV NL63 %1.1), Brezilya'da %3.2 (HCoV OC43 %1.7), İtalya %2.9 (HCoV 229E/HCoV OC43) oranlarındadır^{164,165,167,169,172}. HCoV prevalansı Aydın'da %2.3 ve İstanbul'da %0.9 oranlarında rapor edilmiştir^{176,177}.

Solunum yolu viruslarının tespiti için DFA testi ile PCR testinin karşılaştırıldığı çalışmalardan Kanada'da Gharabaghi ve ark.¹⁸⁵ tarafından yapılan bir araştırmada 2008 Kasım ve Nisan 2008 tarihleri arasında solunum yolu enfeksiyonu olan 17 yaş altındaki çocuklardan alınan 750 nazofaringeal sürüntü örneğinde solunum yolu virusları dört multipleks PCR testi, DFA ve hücre kültürü yöntemi ile test edilmiştir. Örneklerin 288'i (%38.4) DFA veya viral izolasyon ile pozitif iken multipleks PCR ile ek olarak 214 (%28.5) örnek pozitif bulunmuştur. Total pozitiflik oranı %66.9'dur. DFA testinin sensitivitesi PIV (1-4) için %72.4 (21), hMPV için %68.6 (24), RSV (A/B) için %93.5 (130), adenovirus için %38.1 (8) iken spesifitesi PIV (1-4) için %99.8, hMPV için %99.4, RSV (A/B) için %99.6 ve adenovirus için %100 bulunmuştur.

Diğer bir çalışmada ise Ebihara ve ark.¹⁸⁶ Japonya'da Nisan ve Mayıs 2004 tarihleri arasında solunum yolu belirtileri olup hastaneye yatırılan 48 çocuktan alınan nazofaringeal sürüntü örneklerinde hMPV varlığını RT-PCR ve indirek IFA yöntemleri ile araştırmışlardır. RT-PCR test ile 48 örnekten 15'i hMPV pozitif olup bu örneklerin 11'i IFA testiyle de pozitif bulunmuştur. IFA testinin hMPV için sensitivitesi ve spesifitesi sırasıyla %73.3 ve %97 oranlarında tespit edilmiştir. IFA testinin sensitivitesinin düşük olmasına rağmen çocuklarda hMPV enfeksiyon tanısı için hızlı ve faydalı bir test olduğu bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda multipleks real-time PCR testine göre DFA testinin RSV tespiti için sensitivitesi %85.7, adenovirus için %46.4, PIV için %70.4 bulunmuş olup Gharabaghi ve ark.'nın¹⁸⁵ bildirdiği sırasıyla %93.5, %38.1 ve %72.4 oranlarına

benzerdir. Çalışmamızda hMPV için ise DFA testinin sensitivitesi %75 olup yine aynı araştırmacıların bildirdiği %68.6 ve ayrıca Japonya'dan Ebihara ve ark.'nın¹⁸⁶ tespit ettiği %73.3 oranları ile uyumludur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi'nde Eylül 2012 ve Mart 2013 tarihleri arasında Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilimdalı'nın çeşitli servislerinde ASYE sebebi ile yatırılan 17 yaş ve altındaki 158 çocukta real-time PCR ve DFA testi ile solunum yolu viruslarının tespiti için yapılan çalışmanın sonuçları;

1. Toplam 158 hastanın %59.5'i erkek ve %40.5'i kızdı. Çocukların %47.4'ü 2 yaş ve altı, %15.8'i 3-5 yaş arasında olmak üzere toplam %63.3'ü 5 yaş ve altındaki grupta yer aldı.
2. Çoğunluğu %29.8 oranla çocuk yoğun bakım bölümünde yatan hastalara ait olmak üzere hasta örnekleri Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nın bölümleri olan çocuk yoğun bakım, onkoloji, hematoloji, çocuk enfeksiyon, yenidoğan yoğun bakım, süt çocuğu ve büyük çocuk servislerinden gönderildi.
3. Multipleks real-time PCR testi ile ASYE olan 158 hastadan 114'ünde (%72.2) solunum yolu virusu tespit edildi. Hastaların 49'unda (%31) koenfeksiyon bulundu. Respiratuvar viral enfeksiyonu olan 114 hastadan 65'inde (%57) monoenfeksiyon, 39'unda (%34.2) ikili enfeksiyon ve 10'unda (%8.8) üçlü enfeksiyon bulundu.
4. ASYE olan 158 hastada tek veya koenfeksiyon şeklinde en yaygın virus rhinovirus olup 44 (%27.8) hastada tespit edildi. Diğer viruslar sırasıyla RSV %17.7, adenovirus %17.7, hMPV %10.1, PIV 4 %9.4, PIV 1 %7.5, HBoV %6.3, HCoV OC43/HKU1 %4.4, PIV 2, %3.1, PIV 3 %3.1 ve HCoV 229E/NL63 %1.8 oranlarında bulundu.
5. Solunum yolu virusu tespit edilen 114 hastanın 44'ü pnömoni, 8'i bronşiolit ve 62'si ASYE ön tanısı alan çocuklardan oluştu.
6. Toplam 158 hastanın 131'inde (%82.9) solunum yolu enfeksiyonuna eşlik eden altta yatan hastalık vardı. Virus enfeksiyonu olan 114 hastanın 84'ünde (%73.6) ve virus enfeksiyonu olmayan 44 hastanın ise 37'sinde (%84) hematolojik,

immunolojik, kardiyak, metabolik, nörolojik ve onkolojik hastalık gibi altta yatan hastalık görüldü.

7. Solunum yolu virusu tespit edilen 114 çocukta en sık görülen semptomlar öksürük (%70.2), ateş (%54.4), burun akıntısı (%50.9) ve takipne (%49.1) idi.
8. ASYE olan hastalarda bulunan toplam 173 solunum yolu virusunun %25.4 (44) olmak üzere çoğu çocuk yoğun bakımda yatan hastalarda tespit edildi. Çocuk onkoloji, büyük çocuk, çocuk enfeksiyon ve çocuk hematoloji bölümlerinde yatan hastalarda rhinovirus sırasıyla %31, %28.5, %33.3, %38.4 oranlarında en yaygın virus iken çocuk yoğun bakımda %22.7 ve süt çocuğu bölümünde %25.7 RSV ve yenidoğan yoğun bakımda ise %30 oranla adenovirus ilk sırada idi.
9. Çalışmamızda solunum yolu virusları ile enfekte hastalar en sık Şubat ayında 22 vaka ile %19.3, Kasım ayında 21 vaka ile %18.4 ve Aralık ayında 19 vaka ile %16.7 oranlarında tespit edildi.
10. Real-time PCR testi referans test olarak kabul edildiğinde DFA testinin sensitivitesi RSV ve hMPV için sırasıyla %85.7 ve %75 olup, adenovirus ve PIV için sırasıyla bulunan %46.4 ve %70.4 oranlarına göre daha yüksektir. RSV, hMPV, adenovirus ve PIV için DFA testinin spesifitesi ise sırasıyla %96.2, %96.5, %89.4 ve %94.7 idi.

Sonuç olarak çalışma grubumuzda viral solunum yolu enfeksiyonları %72.2 gibi yüksek bir oranda tespit edilmiştir. Gereksiz antibiyotik tedavisinin azaltılması, nozokomiyal virus yayılımının önlenmesi ve hastanede kalış süresinin kısaltılması için viral solunum yolu enfeksiyonlarının erken tanısında multipleks real-time PCR testinin yapılması önerilir ve daha hızlı test olan DFA testi de özellikle RSV ve hMPV için tamamlayıcı bir test olarak kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Hegele RG.** Viruses and lower respiratory tract infections: does more mean worse? *Respiration*, **2010**; 80(6):443-444.
2. **Henrickson KJ, Hoover S, Kehl KS, Hua W.** National disease burden of respiratory viruses detected in children by polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J*, **2004**; 23(1 Suppl):S11-18.
3. **Pavia AT.** Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis*, **2011**; 52 Suppl 4:S284-289.
4. **Loeffelholz M, Chonmaitree T.** Advances in diagnosis of respiratory virus infections. *Int J Microbiol*, **2010**; 2010:1-5.
5. **Charles PG.** Early diagnosis of lower respiratory tract infections (point-of-care tests). *Curr Opin Pulm Med*, **2008**; 14(3):176-182.
6. **Kehl SC, Kumar S.** Utilization of nucleic acid amplification assays for the detection of respiratory viruses. *Clin Lab Med*, **2009**; 29(4):661-671.
7. **Sadeghi CD, Aebi C, Gorgievski-Hrisoho M, Mühlemann K, Barbani MT.** Twelve years' detection of respiratory viruses by immunofluorescence in hospitalised children: impact of the introduction of a new respiratory picornavirus assay. *BMC Infect Dis*, **2011** 7; 11:41.
8. **Carr J, Williams DG, Hatden RT.** Molecular detection of multiple respiratory viruses. Wayne W. Grody WW, Nakamura RM, Kiechle FL, Strom C. *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*. 1st ed, USA: Elsevier Inc., **2010**; 289-300.
9. **Yan Y, Zhang S, Tang YW.** Molecular assays for the detection and characterization of respiratory viruses. *Semin Respir Crit Care Med*, **2011**; 32(4):512-526.
10. **Caliendo AM.** Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens. *Clin Infect Dis*, **2011**; 52 Suppl 4:S326-330.
11. **Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL, Roca A, Wright PF, Bruce N, Chandran A, Theodoratou E, Sutanto A, Sedyaningsih ER, Ngama M, Munywoki PK, Kartasasmita C, Simões EA, Rudan I, Weber MW, Campbell H.** Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, **2010**; 375(9725):1545-1555.
12. **Krillov LR.** Respiratory syncytial virus disease: update on treatment and prevention. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **2011**; 9(1):27-32.

13. **Ogra PL.** Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immun response. *Paediatr Respir Rev*, **2004**; 5(A):119-126.
14. **Dawson-Caswell M, Muncie HL.** Respiratory syncytial virus infection in children. *Am Fam Physician*, **2011**; 83(2):141-146.
15. **Manoha C, Espinosa S, Aho SL, Huet F, Pothier P.** Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J Clin Virol*, **2007** 38(3):221-226.
16. **Rodríguez-Auad JP, Nava-Frías M, Casasola-Flores J, Johnson KM, Nava-Ruiz A, Pérez-Robles V, Caniza MA.** The epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection in children at a public pediatric referral hospital in Mexico. *Int J Infect Dis*, **2012** Jul; 16(7):508-513.
17. **Anak S, Atay D, Unuvar A, Garipardic M, Agaoglu L, Ozturk G, Karakas Z, Devocioglu O.** Respiratory syncytial virus infection outbreak among pediatric patients with oncologic diseases and/or BMT. *Pediatr Pulmonol*, **2010**; 45(3):307-311.
18. **Chonmaitree T, Revai K, Grady JJ, Clos A, Patel JA, Nair S, Fan J, Henrickson KJ.** Viral upper respiratory tract infection and otitis media complication in young children. *Clin Infect Dis*, **2008**; 46(6):815-823.
19. **Patel JA, Nguyen DT, Revai K, Chonmaitree T.** Role of respiratory syncytial virus in acute otitis media: implications for vaccine development. *Vaccine*, **2007**; 25(9):1683-1689.
20. **Fedorko DP, Nelson NA, McAuliffe JM, Subbarao K.** Performance of rapid tests for detection of avian influenza A virus types H5N1 and H9N2. *J Clin Microbiol*, **2006**; 44(4):1596-1597.
21. **Leland DS, Ginocchio CC.** Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev*, **2007**; 20(1):49-78.
22. **Mahony JB.** Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev*, **2008**; 21(4):716-747.
23. **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*, **2004**; 189(4):706-710.
24. **St George K, Patel NM, Hartwig RA, Scholl DR, Jollick JA Jr, Kauffmann LM, Evans MR, Rinaldo CR Jr.** Rapid and sensitive detection of respiratory virus infections for directed antiviral treatment using R-Mix cultures. *J Clin Virol*, **2002**; 24(1-2):107-115.
25. **Halstead DC, Todd S, Fritch G.** Evaluation of five methods for respiratory syncytial virus detection. *J Clin Microbiol*, **1990**; 28(5):1021-1025.

26. **Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC.** Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42(1):79-82.
27. **Borek AP, Clemens SH, Gaskins VK, Aird DZ, Valsamakis A.** Respiratory syncytial virus detection by Remel Xpect, Binax Now RSV, direct immunofluorescent staining, and tissue culture. *J Clin Microbiol*, **2006**; 44(3):1105-1107.
28. **Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Ukae S, Mori T, Hotsubo T, Tsutsumi H.** Comparison of an immunochromatography test with multiplex reverse transcription-PCR for rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42(10):4812-4814.
29. **Slinger R, Milk R, Gaboury I, Diaz-Mitoma F.** Evaluation of the QuickLab RSV test, a new rapid lateral-flow immunoassay for detection of respiratory syncytial virus antigen. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42(8):3731-3733.
30. **Zheng X, Quianzon S, Mu Y, Katz BZ.** Comparison of two new rapid antigen detection assays for respiratory syncytial virus with another assay and shell vial culture. *J Clin Virol*, **2004**; 31(2):130-133.
31. **Syrmis MW, Whiley DM, Thomas M, Mackay IM, Williamson J, Siebert DJ, Nissen MD, Sloots TP.** A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. *J Mol Diagn*, **2004**; 6(2):125-131.
32. **Moore C, Valappil M, Corden S, Westmoreland D.** Enhanced clinical utility of the NucliSens EasyQ RSV A+B Assay for rapid detection of respiratory syncytial virus in clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2006**; 25(3):167-174.
33. **Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoubian S, Sinha T, Lisle C, Janeczko R.** Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol*, **2007**; 45(9):2965-2970.
34. **Kassis C, Champlin RE, Hachem RY, Hosing C, Tarrand JJ, Perego CA, Neumann JL, Raad II, Chemaly RF.** Detection and control of a nosocomial respiratory syncytial virus outbreak in a stem cell transplantation unit: the role of palivizumab. *Biol Blood Marrow Transplant*, **2010**; 16(9):1265-1271.
35. **Lynch JP 3rd, Fishbein M, Echavarria M.** Adenovirus. *Semin Respir Crit Care Med*, **2011**; 32(4):494-511.
36. **Russell WC.** Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol*, **2009**; 90(Pt 1):1-20.
37. **Echavarría M.** Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev*, **2008**; 21(4):704-715.

38. **Symeonidis N, Jakubowski A, Pierre-Louis S, Jaffe D, Pamer E, Sepkowitz K, O'Reilly RJ, Papanicolaou GA.** Invasive adenoviral infections in T-cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: high mortality in the era of cidofovir. *Transpl Infect Dis*, **2007**; 9(2):108-113.
39. **Zheng X, Lu X, Erdman DD, Anderson EJ, Guzman-Cottrill JA, Kletzel M, Katz BZ.** Identification of adenoviruses in specimens from high-risk pediatric stem cell transplant recipients and controls. *J Clin Microbiol*, **2008**; 46(1):317-320.
40. **Gray GC, McCarthy T, Lebeck MG, Schnurr DP, Russell KL, Kajon AE, Landry ML, Leland DS, Storch GA, Ginocchio CC, Robinson CC, Demmler GJ, Saubolle MA, Kehl SC, Selvarangan R, Miller MB, Chappell JD, Zerr DM, Kiska DL, Halstead DC, Capuano AW, Setterquist SF, Chorazy ML, Dawson JD, Erdman DD.** Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. *Clin Infect Dis*, **2007**; 45(9):1120-1131.
41. **Binn LN, Sanchez JL, Gaydos JC.** Emergence of adenovirus type 14 in US military recruits--a new challenge. *J Infect Dis*, **2007**; 196(10):1436-1437.
42. **Castro-Rodriguez JA, Daszenies C, Garcia M, Meyer R, Gonzales R.** Adenovirus pneumonia in infants and factors for developing bronchiolitis obliterans: a 5-year follow-up. *Pediatr Pulmonol*, **2006**; 41(10):947-953.
43. **Larrañaga C, Kajon A, Villagra E, Avendaño LF.** Adenovirus surveillance on children hospitalized for acute lower respiratory infections in Chile (1988-1996). *J Med Virol*, **2000**; 60(3):342-346.
44. **Bridges ND, Spray TL, Collins MH, Bowles NE, Towbin JA.** Adenovirus infection in the lung results in graft failure after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **1998**; 116(4):617-623.
45. **McHardy AC, Adams B.** The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. *PLoS Pathog*, **2009**; 5(10):e1000566.
46. **Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF.** Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*, **2006**; 19(1):165-256.
47. **Claas EC, Schilham MW, de Brouwer CS, Hubacek P, Echavarria M, Lankester AC, van Tol MJ, Kroes AC.** Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43(4):1738-1744.
48. **Pehler-Harrington K, Khanna M, Waters CR, Henrickson KJ.** Rapid detection and identification of human adenovirus species by adenoplex, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42(9):4072-4076.

49. **Vabret A, Gouarin S, Joannes M, Barranger C, Petitjean J, Corbet S, Brouard J, Lafay F, Duhamel JF, Guillois B, Freymuth F.** Development of a PCR-and hybridization-based assay (PCR Adenovirus Consensus) for the detection and the species identification of adenoviruses in respiratory specimens. *J Clin Virol*, **2004**; 31(2):116-122.
50. **Muller WJ, Levin MJ, Shin YK, Robinson C, Quinones R, Malcolm J, Hild E, Gao D, Giller R.** Clinical and in vitro evaluation of cidofovir for treatment of adenovirus infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*, **2005**; 41(12):1812-1816.
51. **Yusuf U, Hale GA, Carr J, Gu Z, Benaim E, Woodard P, Kasow KA, Horwitz EM, Leung W, Srivastava DK, Handgretinger R, Hayden RT.** Cidofovir for the treatment of adenoviral infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Transplantation*, **2006**; 81(10):1398-1404.
52. **Henrickson KJ.** Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev*, **2003**; 16(2):242-264.
53. **Weigl JA, Puppe W, Meyer CU, Berner R, Forster J, Schmitt HJ, Zepp F.** Ten years' experience with year-round active surveillance of up to 19 respiratory pathogens in children. *Eur J Pediatr*, **2007**; 166(9):957-966.
54. **Madden JF, Burchette JL Jr, Hale LP.** Pathology of parainfluenza virus infection in patients with congenital immunodeficiency syndromes. *Hum Pathol*, **2004**; 35(5):594-603.
55. **Raboni SM, Nogueira MB, Tsuchiya LR, Takahashi GA, Pereira LA, Pasquini R, Siqueira MM.** Respiratory tract viral infections in bone marrow transplant patients. *Transplantation*, **2003**; 76(1):142-146.
56. **Lau SK, Li KS, Chau KY, So LY, Lee RA, Lau YL, Chan KH, Lim WW, Woo PC, Yuen KY.** Clinical and molecular epidemiology of human parainfluenza virus 4 infections in Hong Kong: subtype 4B as common as subtype 4A. *J Clin Microbiol*, **2009**; 47(5):1549-1552.
57. **Weinberg GA.** Parainfluenza viruses: an underappreciated cause of pediatric respiratory morbidity. *Pediatr Infect Dis J*, **2006**; 25(5):447-448.
58. **Do AH, van Doorn HR, Nghiem MN, Bryant JE, Hoang TH, Do QH, Van TL, Tran TT, Wills B, Nguyen VC, Vo MH, Vo CK, Nguyen MD, Farrar J, Tran TH, de Jong MD.** Viral etiologies of acute respiratory infections among hospitalized Vietnamese children in Ho Chi Minh City, 2004-2008. *PLoS One*, **2011**; 6(3):e18176.
59. **Lam WY, Yeung AC, Tang JW, Ip M, Chan EW, Hui M, Chan PK.** Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*, **2007**; 45(11):3631-3640.
60. **Van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA.** Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology*, **2002**; 295(1):119-132.

61. **Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE Jr.** Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med*, **2004**; 350(5):443-450.
62. **Kahn JS.** Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev*, **2006**; 19(3):546-557.
63. **Gaunt E, McWilliam-Leitch EC, Templeton K, Simmonds P.** Incidence, molecular epidemiology and clinical presentations of human metapneumovirus; assessment of its importance as a diagnostic screening target. *J Clin Virol*, **2009**; 46(4):318-424.
64. **Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Osterhaus AD.** Newer respiratory virus infections: human metapneumovirus, avian influenza virus, and human coronaviruses. *Curr Opin Infect Dis*, **2005**; 18(2):141-146.
65. **Walsh EE, Peterson DR, Falsey AR.** Human metapneumovirus infections in adults: another piece of the puzzle. *Arch Intern Med*, **2008**; 168(22):2489-2496.
66. **Englund JA, Boeckh M, Kuypers J, Nichols WG, Hackman RC, Morrow RA, Fredricks DN, Corey L.** Brief communication: fatal human metapneumovirus infection in stem-cell transplant recipients. *Ann Intern Med*, **2006**; 144(5):344-349.
67. **Sloots TP, Mackay IM, Bialasiewicz S, Jacob KC, McQueen E, Harnett GB, Siebert DJ, Masters BI, Young PR, Nissen MD.** Human metapneumovirus, Australia, 2001-2004. *Emerg Infect Dis*, **2006**; 12(8):1263-1266.
68. **Pierangeli A, Gentile M, Di Marco P, Pagnotti P, Scagnolari C, Trombetti S, Lo Russo L, Tromba V, Moretti C, Midulla F, Antonelli G.** Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy. *J Med Virol*, **2007**; 79(4):463-468.
69. **Chung JY, Han TH, Kim SW, Hwang ES.** Respiratory picornavirus infections in Korean children with lower respiratory tract infections. *Scand J Infect Dis*, **2007**; 39(3):250-254.
70. **Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, Shears P, Smyth RL, Hart CA.** Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis*, **2005**; 191(3):382-386.
71. **Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Ishiko H, Hara M, Takahashi Y, Kobayashi K.** Human metapneumovirus infection in Japanese children. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42(1):126-132.
72. **Landry ML, Ferguson D, Cohen S, Peret TC, Erdman DD.** Detection of human metapneumovirus in clinical samples by immunofluorescence staining of shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43(4):1950-1952.

73. **Reina J, Ferres F, Alcoceba E, Mena A, de Gopegui ER, Figuerola J.** Comparison of different cell lines and incubation times in the isolation by the shell vial culture of human metapneumovirus from pediatric respiratory samples. *J Clin Virol*, **2007**; 40(1):46-49.
74. **Van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, de Groot R, Osterhaus AD, Fouchier RA.** Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis*, **2003**; 188(10):1571-1577.
75. **Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Côté S, Peret TC, Erdman DD, Anderson LJ.** Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis*, **2002**; 186(9):1330-1334.
76. **Mackay IM, Jacob KC, Woolhouse D, Waller K, Syrmis MW, Whiley DM, Siebert DJ, Nissen M, Sloots TP.** Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol*, **2003**; 41(1):100-105.
77. **Côté S, Abed Y, Boivin G.** Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus. *J Clin Microbiol*, **2003**; 41(8):3631-3635.
78. **Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA.** Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis*, **2003**; 9(3):372-375.
79. **Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, Quinto JD, Chu M, de Graaf M, van den Hoogen BG, Spaete R, Osterhaus AD, Fouchier RA.** Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42(3):981-986.
80. **Dare R, Sanghavi S, Bullotta A, Keightley MC, George KS, Wadowsky RM, Paterson DL, McCurry KR, Reinhart TA, Husain S, Rinaldo CR.** Diagnosis of human metapneumovirus infection in immunosuppressed lung transplant recipients and children evaluated for pertussis. *J Clin Microbiol*, **2007**; 45(2):548-552.
81. **Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang ML, Cent A, Corey L, Morrow R.** Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J Clin Microbiol*, **2006**; 44(7):2382-2388.
82. **Wyde PR, Chetty SN, Jewell AM, Boivin G, Piedra PA.** Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res*, **2003**; 60(1):51-59.
83. **Cheng VC, Lau SK, Woo PC, Yuen KY.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev*, **2007**; 20(4):660-694.
84. **Kahn JS, Kenneth M.** History and Recent Advances in Coronavirus Discovery. *Pediatr Infect Dis J*, **2005**; 24:S223-S227.

85. **Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguière AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Müller S, Rickerts V, Stürmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW.** Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, **2003**; 348(20):1967-1976.
86. **Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B.** Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*, **2004**; 10(4):368-373.
87. **Fielding BC.** Human coronavirus NL63: a clinically important virus? *Future Microbiol*, **2011**; 6(2):153-159.
88. **Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden KE, Nissen MD, Mackay IM.** Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol*, **2006**; 35(1):99-102.
89. **Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY.** Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol*, **2005**; 79(2):884-895.
90. **Mailles A, Blanckaert K, Chaud P, van der Werf S, Lina B, Caro V, Campese C, Guery B, Prouvost H, Lemaire X, Paty M, Haeghebaert S, Antoine D, Ettahar N, Noel H, Behillil S, Hendrix S, Manuguerra J, Enouf V, La Ruche G, Semaille C, Coignard B, Levy-Bruhl D, Weber F, Saura C, Che D; investigation team.** First cases of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infections in France, investigations and implications for the prevention of human-to-human transmission, France, May 2013. *Euro Surveill*, **2013**; 18(24), pii: 20502.
91. **Cauchemez S, Van Kerkhove M, Riley S, Donnelly C, Fraser C, Ferguson N.** Transmission scenarios for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) and how to tell them apart. *Euro Surveill*, **2013**; 18(24), pii: 20503.
92. **Gerna G, Percivalle E, Sarasini A, Campanini G, Piralla A, Rovida F, Genini E, Marchi A, Baldanti F.** Human respiratory coronavirus HKU1 versus other coronavirus infections in Italian hospitalised patients. *J Clin Virol*, **2007**; 38(3):244-250.
93. **Han TH, Chung JY, Kim SW, Hwang ES.** Human Coronavirus-NL63 infections in Korean children, 2004-2006. *J Clin Virol*, **2007**; 38(1):27-31.
94. **Kaiser L, Regamey N, Roiha H, Deffernez C, Frey U.** Human coronavirus NL63 associated with lower respiratory tract symptoms in early life. *Pediatr Infect Dis J*, **2005**; 24(11):1015-1017.
95. **Gagneur A, Vallet S, Talbot PJ, Legrand-Quillien MC, Picard B, Payan C, Sizun J.** Outbreaks of human coronavirus in a pediatric and neonatal intensive care unit. *Eur J Pediatr*, **2008**; 167(12):1427-1434.

96. **Esper F, Shapiro ED, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS.** Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. *J Infect Dis*, **2005**; 191(4):499-502.
97. **Sung JY, Lee HJ, Eun BW, Kim SH, Lee SY, Lee JY, Park KU, Choi EH.** Role of human coronavirus NL63 in hospitalized children with croup. *Pediatr Infect Dis J*, **2010**; 29(9):822-826.
98. **Ng ML, Tan SH, See EE, Ooi EE, Ling AE.** Proliferative growth of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J Gen Virol*, **2003**; 84(Pt 12):3291-3303.
99. **Liu IJ, Chen PJ, Yeh SH, Chiang YP, Huang LM, Chang MF, Chen SY, Yang PC, Chang SC, Wang WK; SARS Research Group of the National Taiwan University College of Medicine-National Taiwan University Hospital.** Immunofluorescence assay for detection of the nucleocapsid antigen of the severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus in cells derived from throat wash samples of patients with SARS. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43(5):2444-2448.
100. **Bastien N, Anderson K, Hart L, Van Caesele P, Brandt K, Milley D, Hatchette T, Weiss EC, Li Y.** Human coronavirus NL63 infection in Canada. *J Infect Dis*, **2005**; 191(4):503-506.
101. **Bastien N, Robinson JL, Tse A, Lee BE, Hart L, Li Y.** Human coronavirus NL-63 infections in children: a 1-year study. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43(9):4567-4573.
102. **Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, Osterhaus AD.** A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2004**; 101(16):6212-6216.
103. **Lamson D, Renwick N, Kapoor V, Liu Z, Palacios G, Ju J, Dean A, St George K, Briese T, Lipkin WI.** MassTag polymerase-chain-reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in New York State during 2004-2005. *J Infect Dis*, **2006**; 194(10):1398-1402.
104. **Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM.** Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol*, **2006**; 78(9):1232-1240.
105. **Greenberg SB.** Update on rhinovirus and coronavirus infections. *Semin Respir Crit Care Med*, **2011**; 32(4):433-446.
106. **Lessler J, Reich NG, Brookmeyer R, Perl TM, Nelson KE, Cummings DA.** Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, **2009**; 9(5):291-300.
107. **Iwane MK, Prill MM, Lu X, Miller EK, Edwards KM, Hall CB, Griffin MR, Staat MA, Anderson LJ, Williams JV, Weinberg GA, Ali A, Szilagyi PG, Zhu Y, Erdman DD.** Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children. *J Infect Dis*, **2011**; 204(11):1702-1710.

108. **Jartti T, Jartti L, Ruuskanen O, Söderlund-Venermo M.** New respiratory viral infections. *Curr Opin Pulm Med*, **2012**; 18(3):271-278.
109. **Mackay IM.** Human rhinoviruses: the cold wars resume. *J Clin Virol*, **2008**; 42(4):297-320.
110. **Paranhos-Baccalà G, Komurian-Pradel F, Richard N, Vernet G, Lina B, Floret D.** Mixed respiratory virus infections. *J Clin Virol*, **2008**; 43(4):407-410.
111. **Loens K, Goossens H, de Laat C, Foolen H, Oudshoorn P, Pattyn S, Sillekens P, Ieven M.** Detection of rhinoviruses by tissue culture and two independent amplification techniques, nucleic acid sequence-based amplification and reverse transcription-PCR, in children with acute respiratory infections during a winter season. *J Clin Microbiol*, **2006**; 44(1):166-171.
112. **Blomqvist S, Skyttä A, Roivainen M, Hovi T.** Rapid detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates by a microwell reverse transcription-PCR-hybridization assay. *J Clin Microbiol*, **1999**; 37(9):2813-2816.
113. **Kiang D, Yagi S, Kantardjieff KA, Kim EJ, Louie JK, Schnurr DP.** Molecular characterization of a variant rhinovirus from an outbreak associated with uncommonly high mortality. *J Clin Virol*, **2007**; 38(3):227-237.
114. **Dagher H, Donniger H, Hutchinson P, Ghildyal R, Bardin P.** Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *J Virol Methods*, **2004**; 117(2):113-121.
115. **Longtin J, Bastien M, Gilca R, Leblanc E, de Serres G, Bergeron MG, Boivin G.** Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. *Emerg Infect Dis*, **2008**; 14(2):217-221.
116. **Smuts H, Hardie D.** Human bocavirus in hospitalized children, South Africa. *Emerg Infect Dis*, **2006**; 12(9):1457-1458.
117. **Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH.** Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin Infect Dis*, **2006**; 43(3):283-288.
118. **Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, Vuorinen T, Waris M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, van den Hoogen BG, Hyypiä T, Ruuskanen O.** Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis*, **2007**; 44(7):904-910.
119. **Lau SK, Yip CC, Que TL, Lee RA, Au-Yeung RK, Zhou B, So LY, Lau YL, Chan KH, Woo PC, Yuen KY.** Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. *J Infect Dis*, **2007**; 196(7):986-993.
120. **Lee JI, Chung JY, Han TH, Song MO, Hwang ES.** Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J Infect Dis*, **2007**; 196(7):994-997.

121. **McIntosh K.** Human bocavirus: developing evidence for pathogenicity. *J Infect Dis*, **2006**; 194(9):1197-1199.
122. **Allander T.** Human bocavirus. *J Clin Virol*, **2008**; 41(1):29-33.
123. **Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS.** Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis*, **2006**; 194(9):1276-1282.
124. **Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B.** Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2005**; 102(36):12891-12896.
125. **Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallam N, Templeton K, Simmonds P.** Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis*, **2006**; 194(9):1283-1290.
126. **Maggi F, Andreoli E, Pifferi M, Meschi S, Rocchi J, Bendinelli M.** Human bocavirus in Italian patients with respiratory diseases. *J Clin Virol*, **2007**; 38(4):321-325.
127. **Lu X, Chittaganpitch M, Olsen SJ, Mackay IM, Sloots TP, Fry AM, Erdman DD.** Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens. *J Clin Microbiol*, **2006**; 44(9):3231-3235.
128. **Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS, Grenfell BT.** Host species barriers to influenza virus infections. *Science*, **2006**; 312(5772):394-397.
129. **Webby RJ, Webster RG.** Emergence of influenza A viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **2001**; 356(1416):1817-1828.
130. **Khanna M, Gupta N, Gupta A, Vijayan VK.** Influenza A (H1N1) 2009: a pandemic alarm. *J Biosci*, **2009**; 34(3):481-489.
131. **Reid AH, Taubenberger JK.** The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma. *J Gen Virol*, **2003**; 84(Pt 9):2285-2292.
132. **Zar HJ.** Global paediatric pulmonology: out of Africa. *Paediatr Respir Rev*, **2006**; 7 Suppl 1:S226-228.
133. **Peltola V, Ziegler T, Ruuskanen O.** Influenza A and B virus infections in children. *Clin Infect Dis*, **2003**; 36(3):299-305.

134. Coffin SE, Zaoutis TE, Rosenquist AB, Heydon K, Herrera G, Bridges CB, Watson B, Localio R, Hodinka RL, Keren R. Incidence, complications, and risk factors for prolonged stay in children hospitalized with community-acquired influenza. *Pediatrics*, **2007**; 119(4):740-748.
135. Grijalva CG, Craig AS, Dupont WD, Bridges CB, Schrag SJ, Iwane MK, Schaffner W, Edwards KM, Griffin MR. Estimating influenza hospitalizations among children. *Emerg Infect Dis*, **2006**; 12(1):103-109.
136. Dawood FS, Fiore A, Kamimoto L, Bramley A, Reingold A, Gershman K, Meek J, Hadler J, Arnold KE, Ryan P, Lynfield R, Morin C, Mueller M, Baumbach J, Zansky S, Bennett NM, Thomas A, Schaffner W, Kirschke D, Finelli L; **Emerging Infections Program Network**. Burden of seasonal influenza hospitalization in children, United States, 2003 to 2008. *J Pediatr*, **2010**; 157(5):808-814.
137. Pogka V, Kossivakis A, Kalliaropoulos A, Moutousi A, Sgouras D, Panagiotopoulos T, Chrousos GP, Theodoridou M, Syriopoulou VP, Mentis AF. Respiratory viruses involved in influenza-like illness in a Greek pediatric population during the winter period of the years 2005-2008. *J Med Virol*, **2011**; 83(10):1841-1848.
138. Bhat N, Wright JG, Broder KR, Murray EL, Greenberg ME, Glover MJ, Likos AM, Posey DL, Klimov A, Lindstrom SE, Balish A, Medina MJ, Wallis TR, Guarner J, Paddock CD, Shieh WJ, Zaki SR, Sejvar JJ, Shay DK, Harper SA, Cox NJ, Fukuda K, Uyeki TM; **Influenza Special Investigations Team**. Influenza-associated deaths among children in the United States, 2003-2004. *N Engl J Med*, **2005**; 353(24):2559-2567.
139. Wishaupt JO, Russcher A, Smeets LC, Versteegh FG, Hartwig NG. Clinical impact of RT-PCR for pediatric acute respiratory infections: a controlled clinical trial. *Pediatrics*, **2011**; 128(5):e1113-20.
140. Fiore AE, Fry A, Shay D, Gubareva L, Bresee JS, Uyeki TM; **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza --- recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*, **2011**; 60(1):1-24.
141. Heinonen S, Silvennoinen H, Lehtinen P, Vainionpää R, Vahlberg T, Ziegler T, Ikonen N, Puhakka T, Heikkinen T. Early oseltamivir treatment of influenza in children 1-3 years of age: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis*, **2010**; 51(8):887-894.
142. Samson M, Pizzorno A, Abed Y, Boivin G. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res*, **2013** May;98(2):174-185.
143. Fiore AE, Uyeki TM, Broder K, Finelli L, Euler GL, Singleton JA, Iskander JK, Wortley PM, Shay DK, Bresee JS, Cox NJ; **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Recomm Rep*, **2010**; 59(RR-8):1-62.
144. Andréoletti L, Renois F, Jacques J, Lévêque N. Human enteroviruses and respiratory infections. *Med Sci (Paris)*, **2009**; 25(11):921-930.

145. **Harvala H, Simmonds P.** Human parechoviruses: biology, epidemiology and clinical significance. *J Clin Virol*, **2009**; 45(1):1-9.
146. **Jacques J, Moret H, Minette D, Lévêque N, Jovenin N, Deslée G, Lebargy F, Motte J, Andréoletti L.** Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005. *J Clin Microbiol*, **2008**; 46(1):206-213.
147. **Chen KT, Chang HL, Wang ST, Cheng YT, Yang JY.** Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998-2005. *Pediatrics*, **2007**; 120(2):e244-252.
148. **Hosoya M, Ishiko H, Shimada Y, Honzumi K, Suzuki S, Kato K, Suzuki H.** Diagnosis of group A coxsackieviral infection using polymerase chain reaction. *Arch Dis Child*, **2002**; 87(4):316-319.
149. **Nascimento MS, Souza AV, Ferreira AV, Rodrigues JC, Abramovici S, Silva Filho LV.** High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. *Clinics (Sao Paulo)*, **2010**; 65(11):1133-1137.
150. **Barnard DL.** Current status of anti-picornavirus therapies. *Curr Pharm Des*, **2006**; 12(11):1379-1390.
151. **Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F, Delwart E.** New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol*, **2005**; 79(13):8230-8236.
152. **Manning A, Willey SJ, Bell JE, Simmonds P.** Comparison of tissue distribution, persistence, and molecular epidemiology of parvovirus B19 and novel human parvoviruses PARV4 and human bocavirus. *J Infect Dis*, **2007**; 195(9):1345-1352.
153. **Fryer JF, Delwart E, Hecht FM, Bernardin F, Jones MS, Shah N, Baylis SA.** Frequent detection of the parvoviruses, PARV4 and PARV5, in plasma from blood donors and symptomatic individuals. *Transfusion*, **2007**; 47(6):1054-1061.
154. **La Scola B, Marrie TJ, Auffray JP, Raoult D.** Mimivirus in pneumonia patients. *Emerg Infect Dis*, **2005**; 11(3):449-452.
155. **Kuypers J, Campbell AP, Guthrie KA, Wright NL, Englund JA, Corey L, Boeckh M.** WU and KI polyomaviruses in respiratory samples from allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Emerg Infect Dis*, **2012**; 18(10):1580-1588.
156. **Van Woensel JB, van Aalderen WM, Kimpfen JL.** Viral lower respiratory tract infection in infants and young children. *BMJ*, **2003**; 327(7405):36-40.
157. **Brodzinski H, Ruddy RM.** Review of new and newly discovered respiratory tract viruses in children. *Pediatr Emerg Care*, **2009**; 25(5):352-360.

158. **Beck ET, Henrickson KJ.** Molecular diagnosis of respiratory viruses. *J Virol Methods*, 2010; 168(1-2):251-254.
159. **Jartti T, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Ruuskanen O, Mäkelä MJ.** New molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract infections in children. *Paediatr Respir Rev*, 2013; 14(1):38-45.
160. **Fox JD.** Nucleic acid amplification tests for detection of respiratory viruses. *J Clin Virol*, 2007; 40 Suppl 1:S15-23.
161. **Templeton KE.** Why diagnose respiratory viral infection? *J Clin Virol*, 2007; 40 Suppl 1:S2-4.
162. **Wu W, Tang YW.** Emerging molecular assays for detection and characterization of respiratory viruses. *Clin Lab Med*, 2009; 29(4):673-693.
163. **Jansen RR, Schinkel J, Koekkoek S, Pajkrt D, Beld M, de Jong MD, Molenkamp R.** Development and evaluation of a four-tube real time multiplex PCR assay covering fourteen respiratory viruses, and comparison to its corresponding single target counterparts. *J Clin Virol*, 2011; 51(3):179-185.
164. **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*, 2006; 78(11):1498-1504.
165. **Zappa A, Canuti M, Frati E, Pariani E, Perin S, Ruzza ML, Farina C, Podestà A, Zanetti A, Amendola A, Tanzi E.** Co-circulation of genetically distinct human metapneumovirus and human bocavirus strains in young children with respiratory tract infections in Italy. *J Med Virol*, 2011; 83(1):156-164.
166. **Culebras E, Betriu C, Vázquez-Cid E, López-Varela E, Rueda S, Picazo JJ.** Detection and genotyping of human respiratory viruses in clinical specimens from children with acute respiratory tract infections. *Rev Esp Quimioter*, 2013; 26(1):47-50.
167. **Uršič T, Jevšnik M, Zigon N, Krivec U, Beden AB, Praprotnik M, Petrovec M.** Human bocavirus and other respiratory viral infections in a 2-year cohort of hospitalized children. *J Med Virol*, 2012; 84(1):99-108.
168. **Louie JK, Roy-Burman A, Guardia-Labar L, Boston EJ, Kiang D, Padilla T, Yagi S, Messenger S, Petru AM, Glaser CA, Schnurr DP.** Rhinovirus associated with severe lower respiratory tract infections in children. *Pediatr Infect Dis J*, 2009; 28(4):337-339.
169. **Bezerra PG, Britto MC, Correia JB, Duarte Mdo C, Fonceca AM, Rose K, Hopkins MJ, Cuevas LE, McNamara PS.** Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *PLoS One*, 2011; 6(4):e18928.

170. **Zhang G, Hu Y, Wang H, Zhang L, Bao Y, Zhou X.** High incidence of multiple viral infections identified in upper respiratory tract infected children under three years of age in Shanghai, China. *PLoS One*, **2012**; 7(9):e44568.
171. **Chung JY, Han TH, Kim SW, Kim CK, Hwang ES.** Detection of viruses identified recently in children with acute wheezing. *J Med Virol*, **2007**; 79(8):1238-1243.
172. **Chidlow GR, Laing IA, Harnett GB, Greenhill AR, Phuanukoonnon S, Siba PM, Pomat WS, Shellam GR, Smith DW, Lehmann D.** Respiratory viral pathogens associated with lower respiratory tract disease among young children in the highlands of Papua New Guinea. *J Clin Virol*, **2012**; 54(3):235-239.
173. **Ozcan C, Toyran M, Civelek E, Erkoçoğlu M, Altaş AB, Albayrak N, Korukluoğlu G, Kocabaş CN.** Evaluation of respiratory viral pathogens in acute asthma exacerbations during childhood. *J Asthma*, **2011**; 48(9):888-893.
174. **Beka H, Kilic A, Unuvar E, Onel M, Oguz F, Sidal M, Aslan S, Bozkaya E, Badur S, Agacfidan A.** Frequency of common viruses in etiology of acute respiratory tract infections. *Indian J Pediatr*, **2013**; 80(2):91-96.
175. **Midilli K, Sirekbasan S, Akın Y, Demirci P, Kuşkucu MA, Ergin S, Kagusuz A.** Akut alt solunum yolu enfeksiyonu tanısı ile izlenen 5 yaş altı çocuklarda polyoma WU ve KI virus varlığının saptanması. 4. Ulusal Viroloji Kongresi. İstanbul, Türkiye, 23-26 Haziran **2011**: 221.
176. **Güvenç Hİ, Sağlık İ, Ateş BK, Mutlu D, Boz AB, Çolak D.** Bronşiyolit obliterans ve akut bronşiyolit tanılı çocuklarda etken virusların multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile belirlenmesi. 4. Ulusal Viroloji Kongresi. İstanbul, Türkiye, 23-26 Haziran **2011**: 219.
177. **Sancaklı Ö, Yenigün A, Kırdar S.** Results of Polymerase Chain Reaction in Nasopharyngeal Swab Specimens of Patients with Lower Respiratory Tract Infection. *J Pediatr Inf*, **2012**; 6:84-89.
178. **Kandemir Ö.** Solunumsal patojen virusların IFAT ve multiplex PCR yöntemleri ile tanısı. Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar, **2007**.
179. **Abu-Diab A, Azzeh M, Ghneim R, Ghneim R, Zoughbi M, Turkuman S, Rishmawi N, Issa AE, Siriani I, Dauodi R, Kattan R, Hindiyyeh MY.** Comparison between pernasal flocked swabs and nasopharyngeal aspirates for detection of common respiratory viruses in samples from children. *J Clin Microbiol*, **2008**; 46(7):2414-2417.
180. **Heikkinen T, Marttila J, Salmi AA, Ruuskanen O.** Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40(11):4337-4339.
181. **Hong JY, Lee HJ, Piedra PA, Choi EH, Park KH, Koh YY, Kim WS.** Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin Infect Dis*, **2001**; 32(10):1423-1429.

182. **König B, König W, Arnold R, Werchau H, Ihorst G, Forster J.** Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42(10):4632-4635.
183. **Ren L, Gonzalez R, Xie Z, Xiong Z, Liu C, Xiang Z, Xiao Y, Li Y, Zhou H, Li J, Yang Q, Zhang J, Chen L, Wang W, Vernet G, Paranhos-Baccalà G, Shen K, Wang J.** Human parainfluenza virus type 4 infection in Chinese children with lower respiratory tract infections: a comparison study. *J Clin Virol*, **2011**; 51(3):209-212.
184. **Jevšnik M, Uršič T, Zigon N, Lusa L, Krivec U, Petrovec M.** Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *BMC Infect Dis*, **2012**; 12:365.
185. **Gharabaghi F, Hawan A, Drews SJ, Richardson SE.** Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clin Microbiol Infect*, **2011**; 17(12):1900-1906.
186. **Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H.** Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent-antibody test. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43(3):1138-1141.

ÖZGEÇMİŞ

Konya’da 1986 yılında doğdu. Liseyi Seyhan Ç.E.A.Ş Anadolu Lisesi’nde tamamladı. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2010 yılında mezun oldu. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda 2011 yılında Yüksek Lisans Eğitimi almaya başladı.