

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKUT SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARINDA
RHİNOVİRUSLARIN GENOTİPLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

DR. NESLİHAN EDA DEMİRKAN

DANIŞMAN

PROF.DR. SEVİN KIRDAR

**Bu araştırma Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında ADÜ Araştırma Fon Saymanlığı
tarafından TPF-14034 sayı ile desteklenmiştir**

AYDIN-2016

TEŞEKKÜR

Başta tez çalışmamda bilimsel desteğini gördüğüm değerli tez danışmanım Prof. Dr. Sevin KIRDAR olmak üzere, asistanlık sürem boyunca üzerimde emekleri olan hocalarım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Neriman AYDIN, Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN, Doç. Dr. Berna KORKMAZGİL, Doç. Dr. Murat TELLİ'ye, kısa süredir birlikte çalışmamıza rağmen desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Güneş ÖZÇOLPAN'a, teşekkürlerimi sunarım. Eğitim sürecinde Anabilim dalımızda beraber çalıştığım Dr. Nilgöl UZUN'a, asistanlık görevine aynı gün başladığım ve hemen kaynaştığım, sevimli Naz'ın annesi sevgili arkadaşım Dr. Pınar AKÇAY ÖZLÜER'e, Görev süresi boyunca benim için gerçek bir ağabey olan ve şu anda uzakta da olsa hep bizimle olduğunu bildiğim yüce gönüllü insan Dr. Rıfat BÜLBÜL'e, her türlü desteklerini benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Parazitoloji Anabilim Dalı Araş. Gör. Erdoğan MALATYALI ve Dr. İbrahim YILDIZ'a teşekkür ederim. Tez çalışmam ve uzmanlık eğitimim sırasında teknik tecrübeleriyle hep desteklerini gördüğüm ve birlikte güzel yıllar geçirdiğimizi düşündüğüm başta sevgili Dilek ERDEM olmak üzere tüm teknisyen arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca Güney Kıbrıs'ta rhinovirus genotiplendirme konusunda çalışan ve tez için pozitif kontrol gönderen Dr. Jan Richter'e teşekkür ederim.

Son olarak beni bugünlere getiren ve hayatım boyunca maddi ve manevi olarak hep arkamda durduklarını hissettiğim sevgili aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

DR. Neslihan Eda Demirkan

Aydın, 2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.Rhinovirus Tarihçesi	2
2.2. Rhinovirus Sınıflandırılması	3
2.3. Rhinovirus özellikleri	4
2.4. RV Replikasyon Döngüsü	5
2.5. RV Enfeksiyon Patogenezi.....	6
2.6. Rhinovirus Bulaşı ve Epidemiyoloji	7
2.7. Rhinovirus Enfeksiyonu Klinik Seyri	8
2.8. Rhinovirus Tanı Yöntemleri.....	9
2.9. Rhinovirus Enfeksiyonunlarında Tedavi.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Çalışma Grubu.....	22
3.2 Kantitatif gerçek zamanlı PZR	22
3.3 Konvansiyonel PZR.....	25
3.4. Konvansiyonel PZR ürünlerinin saflaştırılması	28
3.5. Dizi Analizi-Döngü (cycle-sekans) PZR.....	28
3.6. Dizi analizi-döngü PZR Sonrası Saflaştırma İşlemi	29
3.7 İstatistik analiz.....	30
3.8 Filogenetik Analiz.	30
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA.....	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	46
7. ÖZET	47
8. ABSTRACT	49
KAYNAKLAR.....	51

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

BAL	: Bronkoalveoler lavaj
BPD	: Bronkopulmoner displazi
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CCU	: Common cold research unit
CDHR3	: Kadherin ilişkili protein ailesi üyesi 3
dsRNA	: Çift zincirli RNA
EGF	: Epitelyal büyüme faktörü
ENA-78	: Epitelyal nötrofil ile aktive peptid 78
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
HBEC	: İnsan bronşial epitelyum hücreleri
ICAM-1	: Hücreler arası adhezyon molekülü
ICTV	: International Committee on Taxonomy of Viruses
IFNα/β	: İnterferon
IL-6	: İnterlökin 6
IP-10	: İnterferon gama'nın indüklediği protein
IRES	: İnternal ribozoma giriş bölgesi
ITAF	: IRES trans-aktive edici faktör
İNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
KF	: Kistik Fibrozis
KFTR	: Kistik fibrozis transmembran reseptör proteini
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LDLR	: Düşük dansiteli lipoprotein reseptörü
LRP	: LDRL ilişkili protein
MDA-5	: Melenoma farklılaşma ilişkili gen 5
MMP-9	: Matriks metalloproteinaz -9
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
mRNA	: Mesajcı RNA
NASBA	: Nükleik asit dizi temelli amplifikasyon
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B

NIAID	: <i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NO	: Nitrik oksit
ORF	: Açık okuma çerçevesi
PIV	: Parainfluenza virüs
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
RIG-1	: Retinoik asit indüklenebilir gen 1
RNA	: Ribonükleik asit
RSV	: Respiratuvar sinsityal virüs
RT-PZR	: Reverse-transkripsiyon PZR
RV	: Rhinovirus
ssRNA	: Tek zincirli RNA
TGF	: Transforme edici büyüme faktörü
TIMP-1	: Doku matriks metalloproteinaz inhibitörü-1
TKP	: Toplum kökenli pnömoni
TLR	: Toll benzeri reseptör
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
UTR	: Untranslated region
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VİPERİN	: Virus inhibitory protein, endoplasmic reticulum associated, IFN-inducible
VLDLR	: Çok düşük dansiteli lipoprotein reseptörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
SPSS	: Statistical Packages for Social Sciences

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Rhinovirus kapsid yapısı	5
Şekil 2. LightCycler®480 cihazında amplifikasyon eğrilerinin görünümü	24
Şekil 3. LightCycler®480 cihazında erime sıcaklığı(tm) eğrilerinin görünümü.....	24
Şekil 4. Konvansiyonel PZR sonrası bant görüntümleri	33
Şekil 5. Rhinovirus VP4/VP2 bölgesi dizi analizine göre filogenetik ağaç görünümü.....	39



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo I: “LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes” karışımı	23
Tablo II: “LightCycler®480 (Roche)” cihaz protokolü	23
Tablo III: ‘First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR’ kiti ile cDNA sentezi için PZR karışımı	25
Tablo IV: cDNA sentezi için ‘mastermix’ karışımı	26
Tablo V: “First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR kiti” ile cDNA sentez PZR protokolü.....	26
Tablo VI: “FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack” kiti ile konvansiyonel PZR karışımı	27
Tablo VII: “FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack” kiti ile Konvansiyonel PZR protokolü.....	27
Tablo VIII: Her bir amplifikasyon tüpü (10µl) için dizi analizi-döngü PZR karışımı	29
Tablo IX: Dizi analizi-döngü PZR reaksiyonu protokolü	29
Tablo X: Kantitatif gerçek zamanlı PZR ile RV pozitif örneklerdeki viral yükler	32
Tablo XI: Tüm Hastalarda dizi analizi sonuçları.....	34
Tablo XII: Erişkin hastalardaki RV tür oranları	34
Tablo XIII: Çocuk hastalardaki RV tür oranları.....	34
Tablo XIV: Çocuk hastalarda tür dağılımı ve klinik tanılar	35
Tablo XV: Erişkin hastalarda tür dağılımı ve klinik tanılar	36
Tablo XVI: Çocuk ve erişkin hastaların ki-kare testi sonuçları	37
Tablo XVII: Tüm hastalarda rhinovirusların mevsimsel dağılımı	37
Tablo XVIII: Tüm hastalarda belirlenen RV türlerinin mevsimsel dağılımı	38
Tablo XIX: Çocuk hastalarda belirlenen RV türlerinin mevsimsel dağılımı	38
Tablo XX: Erişkin hastalarda belirlenen RV türlerinin mevsimsel dağılımı	38

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Rhinovirus (RV) tüm dünyada yaygın olarak görülen bir solunum yolu patojenidir. Virüsün her yıl tüm dünyada, akut solunum yolu enfeksiyonlarının yaklaşık % 50'sinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (1). Virüsün 150'den fazla serotipi belirlenmiştir (2). Virüs genellikle hafif üst solunum yolu enfeksiyonu ve soğuk algınlığına neden olur (3). Soğuk algınlığı; işgücü kaybı ve gereksiz antibiyotik kullanımı ile toplumsal açıdan ekonomik kayıplara neden olmaktadır (4). Son zamanlarda RV'lerin astım, kistik fibrozis (KF) ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) hastalarında alevlenme, pnömoni, sinüzit, otit ve özellikle küçük çocuklarda hışıltı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (5). RV enfeksiyonları ılıman bölgelerde ilkbahar başlangıcı ve geç sonbahar dönemlerinde epidemik salgınlar yapabilir (6).

Rhinovirüsler insan diploid fibroblast hücre kültürlerinde tipik sitopatolojik etkisi ve asit ortama duyarlılığının gösterilmesi ile tanımlanabilir. Son yıllarda, virüsün hızlı tanımlanmasını sağlayan nükleik asit saptama testleri geliştirilmiştir. (7). VP4/VP2 ve VP1 bölgelerinin dizi analizi ile bilinen tüm serotiplerin RV-A ve RV-B olarak iki temel RV türü içinde yer aldığı gösterilmiştir (8). Ancak 2006 yılında genetik olarak farklı üçüncü bir tür olan RV-C tanımlanmıştır (9). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise RV-A ve RV-C'nin daha çok alt solunum yolu enfeksiyonu ve astım alevlenmeleri ile ilişkili olduğu, RV-B'nin ise bu türlere göre alt solunum yolu enfeksiyonlarında daha az oranda görüldüğü gösterilmiştir (10). Ayrıca RV-C'nin özellikle çocuk hastalarda daha şiddetli enfeksiyonlara neden olduğu da belirlenmiştir (5).

Bu çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Poliklinik veya Kliniğinden ve Göğüs Hastalıkları Kliniğinden Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilen daha önce multipleks real-time PZR yöntemi ile RV pozitifliği saptanan örneklerde rhinovirus tür dağılımı ve bu belirlenen rhinovirus türleri ile hastaların yaş, cinsiyet, viral yük ve klinik tanıları arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Rhinovirus Tarihçesi

Dünyada bilinen en yaygın enfeksiyonlardan biri olan soğuk algınlığının tarihi, eski Mısır uygarlığı dönemine kadar uzanmaktadır. Bazı hiyeroglif ve papirüslerde soğuk algınlığı semptomları gösterilmekte ve tedavi şekilleri tarif edilmektedir. Sonraki dönemlerde ise ilk kez M.Ö 5. yüzyılda Hipokrat tarafından burun akıntısı ve ateş semptomları ile seyreden bir hastalık olarak tanımlanmıştır. On sekizinci yüzyılda etken olarak soğuk ve üşütme düşünülmüş ve enfeksiyonun “soğuk algınlığı” olarak isimlendirmesi bu dönemde uygun görülmüştür (11).

Virüslerin varlığı gösterilene kadar enfeksiyondan bakteriler sorumlu tutulmuştur. 1914 yılında Dr. Kruse, Almanya’da hastalardan alınan nazal sekresyonları bakteri filtrelerinden geçirerek enfeksiyonu sağlıklı gönüllülere aktarmış ve gönüllülerin yaklaşık yarısında hastalığı göstermiştir. Dochez ve arkadaşları 1930 yılında insanlardan aldıkları filtrelenmiş nazal sekresyonları şempanzelere inoküle ederek, bu hayvanlarda enfeksiyonu göstermiş ve etkenin virüs olduğu kanıtlanmıştır. Şempanzeler arasında yayılan enfeksiyonu daha sonra tekrar insanlara bulaştırarak virüsü izole etmek isteyen araştırmacılar başarılı olamamışlardır (12).

İlk başarılı *in-vitro* izolasyon, virüsün insan embriyo akciğer dokusuna seri pasajlarla inoküle edilmesi ile sağlanmıştır. İngiltere’deki Soğuk Algınlığı Ünitesinde çalışan ve akut solunum yolu enfeksiyonu bulguları olan Dr. Donna Chaproniere’den alınan örnekten izole edilen virüse, onun adına ithafen D.C izolatu adı verilmiştir. Embriyo doku hücrelerinde dejenerasyon (sitopatik etki) görülmemiş fakat onuncu seri pasaja kadar kültür vasatından alınan sıvı sağlıklı bireylere nazal damla şeklinde uygulandığında soğuk algınlığı oluşturmuştur (13). Amerika’da 1956 yılında iki ayrı laboratuvarında, Rhesus maymunu böbrek doku kültürleri kullanılarak izole edilen iki kökenin (JH ve 2060) serolojik olarak aynı olduğu gösterilmiş ve bu kökenler RV 1A olarak adlandırılmışlardır (14). 1960’lı yıllarda dış ortamda burun dokusu koşulları (sıcaklık: 33°C, pH: 7.0) oluşturularak, insan embriyo böbrek hücre kültüründe (İEBH) izolasyon daha başarılı olmuştur (15). Ayrıca insan diploid embriyonik

akciğer fibroblast dokusu (WI-26) gibi yeni ve duyarlı hücre dizilerinin bulunması bir çok yeni kökenin saptanmasını sağlamıştır (16).

Etkenin sadece soğuk algınlığına neden olduğunun düşünülmesi yüzünden, saptanması ve tanımlanmasına gerek duyulmamıştır. Ancak 1990'lı yıllarda rhinovirüsleri saptayabilen PZR (polimerize zincir reaksiyonu) temelli yöntemlerin geliştirilmesi ile etkenin izolasyon oranı hızla artmıştır (17). Moleküler yöntemlerle RV'ler, RV-A, RV-B ve RV-C olarak üç tür içinde tanımlanmıştır (18). Bilinen tüm RV serotiplerinin tüm genom dizi analizi 2009 yılında yapılmış ve yayınlanmıştır (19).

2.2. Rhinovirus Sınıflandırılması

İlk izole edildikleri tarihten itibaren RV'lerin sınıflandırılması birçok kez değişikliğe uğramıştır. İlk çalışmalarda farklı hücre dizilerinde üreyebilme özelliklerine göre "H" veya "M" suşu olarak adlandırılmaları uygun görülmüştür. Bu yöntemle sınıflandırılan 29 suştan 27 tanesi sadece insan embriyonik böbrek hücresinde üreyebildiği için H suşu; iki tanesi hem insan hem maymun böbrek hücrelerinde üreyebildiği için M suşu olarak adlandırılmıştır. Hücre kültürü özelliklerine dayalı bu sınıflandırma günümüzde artık kullanılmamaktadır (20).

Rhinovirusların tanımlanmaları serolojik yöntemlerin kullanılmasıyla başlamıştır. Rhinovirus kökenlerini nötralize eden poliklonal antiserumlar, plak nötralizasyon yöntemi kullanılarak saflaştırılmış ve yeni izole edilen her köken için nötralizan potansiyelleri test edilmiştir. Tanımlanmış serotiplerle çapraz reaksiyon vermeyen kökenler yeni bir serotip olarak tanımlanmıştır (6).

Rhinovirus A ve B için, kullandıkları hücre yüzey reseptörü tipi de sınıflandırmada ek bir kriter olarak kullanılmıştır. RV reseptörlerini belirlemek için yapılan çeşitli çalışmalarda büyük çoğunluğunun aynı tip reseptörü kullandığı belirlenmiştir (21). Bu reseptörün, endotelial hücrelerde fazla miktarda sunulan bir hücre yüzey glikoproteini olan, hücreler arası adhezyon molekülü (intercellular adhesion molecule 1: ICAM-1) olduğu belirlenmiştir (22). Tüm bilinen RV-A ve B türleri kullandıkları reseptörlere göre iki gruba ayrılmıştır. Buna göre 91 serotip majör grup içerisinde; 9 serotip minör grup içerisinde yer almıştır. Daha sonra minör grup reseptörün düşük dansiteli lipoprotein reseptör ailesi (Low dansity lipoprotein: LDLR) üyelerinden olduğu gösterilmiştir (23). HRV-87 serotipinin ise bu iki reseptörden farklı olarak hücrelere bağlanabilmek için sialik aside ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Bu

serotip yeniden sınıflandırılarak enterovirus D (EV-D) türleri arasında Enterovirus 68 (EV-68) olarak yer almıştır (24).

Rhinoviruslar, bazı antiviral ilaç gruplarına karşı duyarlılıklarına göre sınıflandırılmışlar ve bilinen 100 serotipin tamamı, 15 antiviral bileşik içeren bir panel ile test edilmiş ve grup A ve B olmak üzere iki antiviral duyarlılık grubunun var olduğu gösterilmiştir (25).

Dizi analizi verilerine dayalı filogenetik yöntemlerin kullanılması tür tanımlamasını daha hızlı ve kolay bir hale getirmiştir (26). Daha önce tanımlanmış 100 serotip filogenetik analiz yöntemi ile RV-A ve RV-B olarak iki gruba ayrılmıştır. Bu ayrım; kapsid kodlayan bölge, 5' kodlanmayan bölge (5' untranslated region: 5'UTR) ve 3D pol bölgesinin 3' ucu kullanılarak yapılmıştır (27, 28). Bu iki gruptan farklı olarak, 2006 yılında üçüncü bir tür tanımlanmış ve Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV) tarafından 2009 yılında RV-C olarak adlandırılmıştır (29).

Rhinoviruslar yakın zamana kadar 'Human rhinovirus (HRV)' olarak adlandırılmakta iken 2013 yılında ICTV tarafından tür adının 'rhinovirus (RV)' olarak değiştirilmesi kabul edilmiştir. Buna göre üç rhinovirus türü RV-A, B ve C olarak tanımlanmıştır. Ancak her bir türün serotipleri hala 'HRV' şeklinde kısaltılarak kullanılmaktadır. Örneğin; Rhinovirus A türü serotip 2 HRV- A2 olarak kullanılmaktadır. Günümüzde RV-A türüne ait 80, RV-B türüne ait 32 ve RV-C türüne ait 55 olmak üzere toplam 167 genotip (tip) tanımlanmıştır. (30)

2.3. Rhinovirus özellikleri

Biyolojik Özellikleri

Filogenetik olarak birbirlerine en yakın türler olan enteroviruslar ve rhinoviruslar asidik ortama karşı dayanıklılıklarına göre birbirinden ayrılırlar (15). Rhinoviruslar 6.0 ile 8.0 arasındaki yüksek pH değerlerine karşı dayanıklı iken pH 6.0'ın altındaki asidik ortamlarda kolayca inaktive olabilirler. HRV-14 ile yapılan bir çalışmada pH 5.0'da 20 dakikada infektivitesi azalan virüsün, pH 3.0'da 10 saniyede tamamen inaktif olduğu gösterilmiştir (31).

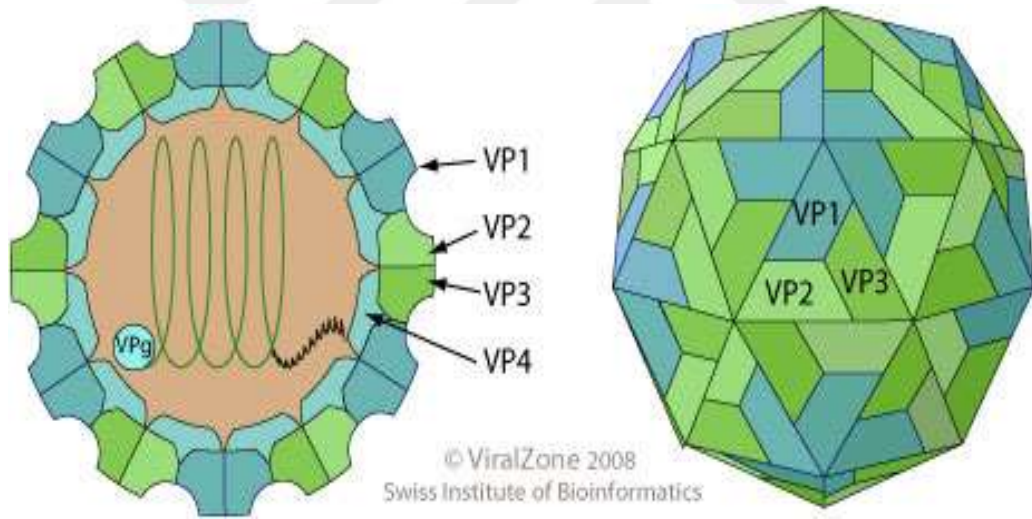
Zarf yapıları olmadığından dolayı RV'ler eter, kloroform, florokarbon ve deterjanlara dirençlidirler (32). 24-37°C arasında infektif oldukları için kapı kolları gibi cansız yüzeylerde

günlerce canlı kalabilirler (33). Çok düşük sıcaklıklarda ise yıllarca canlılıklarını koruyabilirler (34).

Yapısal Özellikler ve Genom Organizasyonu

Rhinovirus; *Picornaviridae* ailesi ve *Enterovirus* cinsi içerisinde yer alan, yaklaşık 7200 baz çiftinden oluşan, pozitif polariteli, tek zincirli (ssRNA) bir RNA virüsüdür (18).

Kapsid Yapısı: Virüs, 60 kapsomer (protomer)'den oluşan, yaklaşık 30 nm çapında ve ikozahedral simetri gösteren bir protein kılıf (kapsid) yapısına sahiptir. VP1, VP2, VP3 ve VP4 olmak üzere dört adet kapsid proteini bulunan virüste, VP4 proteini kapsidin iç kısmında bulunur ve genom ile etkileşim halindedir (1). VP1 proteini içerisinde; ‘‘kanyon’’ adı verilen, hidrofobik yapıda, reseptör ve bazı antiviral bileşikler ile bağlanan bir bölge bulunmaktadır (35).



Şekil 1: Rhinovirus kapsid yapısı (viralzone.expasy.org)

Genom Yapısı: Yaklaşık 7200 nükleotitten oluşan virüs genomu; bir 5' UTR bölgesi, onu takiben dört adet kapsid proteinini (VP1, VP2, VP3, VP4) ve yedi adet yapısal olmayan proteini (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) kodlayan uzun bir açık okuma çerçevesi (*open reading frame*: ORF) içerir ve kısa bir 3' kodlanmayan bölge (3'UTR) ve poli A kuyruğu ile sonlanır

(36). 5'UTR yaklaşık olarak 650 baz, ORF bölgesi yaklaşık 6500 baz (~2100 kodlanmış aminoasit) ve 3'UTR bölgesi yaklaşık 50 baz içermektedir

Tüm RV'ler 5'UTR bölgesinde, üridilasyona uğramış formu (VPgpUpUOH) genom replikasyonu için primer işlevi gören ve replikasyonun erken aşamalarında genomdan ayrılan 22-24 aminoasit içeren küçük bir viral proteine (VPg) kovalent bir bağ ile bağlanmış durumdadır (37). Yine bu bölgede translasyon için gerekli olan bir internal ribozoma giriş bölgesi (*internal ribosomal entry site*: IRES) bulunmaktadır. Tüm enterovirüsler 5' terminal kısımlarında 'yonca yaprağı benzeri' (*cloverleaf-like motifs* : CL) yapılar içerirler. Bu yapılar viral ve hücrel proteinlere bağlanarak viral translasyondan transkripsiyona geçişte rol alırlar (38).

Açık okuma çerçevesi, translasyon sonucunda yaklaşık 215 kD büyüklüğünde bir poliprotein oluşturmaktadır. ORF ;P1, P2 ve P3 olarak üç bölgeye ayrılır. P1 bölgesi dört kapsid proteinini (VP1-4) kodlarken, P2 ve P3 bölgeleri yapısal olmayan proteinleri (2A-C ve 3A-C) kodlamaktadır (37).

Kapsid kodlayan bölge içerisinde RNA replikasyonu için gerekli olan cis-acting replikasyon elementi (cre) yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda bu yapının VPg üridilasyonunda rolü olduğu gösterilmiştir (39). Cre yerleşim yeri RV genotipleri arasında farklılık göstermektedir. RV-A'da 2A ORF, RV-B'de VP1 ORF, RV-C'de ise VP2 ORF bölgesinde yer almaktadır. (40).

2.4. RV Replikasyon Döngüsü

Hücreye Bağlanma

Rhinovirüsler için hedef hücreler, alt ve üst solunum yolu silyalı epitel hücreleridir (41). Reseptör olarak; major grup RV'ler, ICAM-1'i, minör grup RV'ler ise düşük dansiteli lipoprotein reseptör (*low- density lipoprotein receptor* : LDLR) ailesi üyelerini kullanırlar (42). LDRL ailesi; LDLR (*low-density lipoprotein receptor* : LDLR), çok düşük dansiteli lipoprotein reseptör (*very-low density lipoprotein receptor* : VLDLR) ve LDLR-ilişkili protein'den (*LDRL-related protein*: LRP) oluşmaktadır (43). Bağlanma, ICAM-1 ve VLDL'nin N-terminal kısımlarının kanyon içerisindeki bazı bölgelere tutunması ile başlamaktadır (44). Bazı majör grup RV'lerin, bir proteoglikan olan heparan sülfatı alternatif

reseptör olarak kullanabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (45). RV-C türüne ait reseptörü tanımlamak için 2015 yılında yapılan bir çalışmada bir transmembran protein olan kadherin ilişkili protein ailesi üyesi 3 (*cadherin-related family member 3*: CDHR3)'ün normalde duyarlı olmayan hücrelere bağlanmayı ve replikasyonu sağladığı gösterilmiştir (46). Yapılan çalışmalar sonucunda RV-A türünde 71 genotipin (A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A15, A16, A18, A19, A20, A21, A22, A24, A27, A28, A32, A33, A34, A36, A38, A39, A40, A41, A43, A45, A46, A50, A51, A53, A54, A55, A56, A57, A58, A59, A60, A61, A63, A64, A65, A66, A67, A68, A71, A73, A74, A75, A76, A77, A78, A80, A81, A82, A85, A88, A89, A90, A94, A96, A100, A101, A102, A103, A104, A105, A106, A107, A108, A109) ICAM-1 reseptörünü, 12 genotipinde (A1A, A1B, A2, A23, A25, A29, A30, A31, A44, A47, A49, A62) reseptör olarak LDLR ailesi üyelerini kullandığı; RV-B türüne ait 32 genotipin tamamının (B3, B4, B5, B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91, B92, B93, B97, B99, B100, B101, B102, B103, B104, B105, B106) ICAM-1 reseptörünü ve RV-C türüne ait 55 genotipin tamamının (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C27, C28, C29, C30, C31, C32, C33, C34, C35, C36, C37, C38, C39, C40, C41, C42, C43, C44, C45, C46, C47, C48, C49, C50, C51, C52, C53, C54, C55) CDHR3 reseptörünü kullandığı belirlenmiştir (1).

Hücreye Giriş

Zarfsız virüslerin hücreye girişi için dört temel yol tanımlanmıştır. Bunlar: kltrin bağımlı endositoz, kaveola bağımlı endositoz, kltrin ve kaveola bağımlı olmayan endositoz ve makropinositozdur. Kltrin bağımlı endositoz ve makropinositozda içeri alınan veziküller lizozoma yönlendirilerek hızla asidifiye edilirler. Kaveola bağımlı endositozda ise veziküller kaveozom adı verilen nötral pH'a sahip organellere ve sonrasında endoplazmik retikulum'a taşınırlar (47).

Virüsler çeşitli ortam şartlarına ve konak hücrelerine adaptasyonlarına göre birden fazla yol kullanabilirler. Major grup RV'ler kltrin bağımlı veya kltrin ve kaveola bağımlı olmayan endositoz yolunu kullanırlar. Minor grup RV'ler ise tercihen LDRL ailesi üyelerinin aktive ettiği kltrin bağımlı endositoz yolunu kullanırlar (48).

Kapsid Soyulması

Kapsid soyulması, virüs RNA'sının sitoplazma içine geçmesi işlemidir. Tam virüs ve boş partiküllerin yapılarının kriyoelektron mikroskopisi ve X ışını kristallografi yöntemleri ile incelenerek karşılaştırılması ile, RNA'nın hücreden çıkış noktaları gösterilmiştir. Minör grup virüslerde kapsid soyulması reseptörden bağımsız olarak gerçekleşmektedir (49). HRV2'nin virion ve boş partikül yapısı incelendiğinde; boş partiküllerin daha büyük olduğu ve özellikle kanyon tabanında açılmış porlar olduğu gözlenmiştir. Bu por yapılarının RNA zinciri sığacak büyüklükte olduğu ve RNA'nın buradan çıkarak sitoplazmaya ulaştığı gösterilmiştir (50). Major grup virüslerde ise kapsid soyulması düşük endozomal pH yardımı ile reseptör tarafından indüklenmektedir (51). Yapılan bir çalışmada açıklanan mekanizmaya göre: öncelikle kapsomerler arası bağlantı noktaları geçici olarak açılmakta ve reseptör iki kapsomer arasındaki kanyon bölgesine bağlanarak virion yapısını açık halde sabitlemektedir (52). RNA'nın açık kanyon bölgesi yoluyla ayrılmasından sonra VP1 yapısında değişiklik meydana gelerek reseptör ile boş kapsid birbirinden ayrılmaktadır (53).

Gen ekspresyonu

Pozitif polariteli olduğu için rhinovirus RNA'sı sitoplazmaya ulaştıktan sonra doğrudan translasyon başlayabilir. Ökaryotik mesajcı RNA (*messenger RNA*: mRNA) yapısında bulunan 5' terminal kep yapısı rhinoviruslarda bulunmamaktadır. Translasyon 5'UTR bölgesinde yer alan IRES bölgesinden başlamaktadır (54). IRES, gerekli translasyon faktörlerini konak hücreden karşılamaktadır. Virüs, tek bir ORF içermektedir ve bu ORF'den bir poliprotein sentezlenmektedir. Viral proteazlar yardımıyla poliproteinden üç temel bölge oluşmaktadır. Bunlardan P1 bölgesi yapısal proteinlerin sentezinde; P2 ve P3 bölgeleri ise gen ekspresyonu, replikasyon ve konak hücre ile etkileşimi sağlayan proteinlerin sentezinde görevlidir (55).

Replikasyon

IRES bölgesinin stabilizasyonunu sağlayan IRES trans-aktive edici faktörün (*IRES trans-activating factor*: ITAF) translasyon sonrası proteazlarla yıkılması ile translasyon sona erip transkripsiyon başlatılır. Viral proteinler membranların içine doğru sokularak vezikül oluşumunu indükler ve viral replikasyon proteinleri mebranlara toplanarak membrana bağlı viral replikasyon kompleksi oluşur. RNA bağımlı RNA polimerazın öncülü ile viral genom

dairesel hale geldikten sonra, replikasyon için gerekli konak hücre proteinleri biraraya getirilir. VPg öncülü, viral replikaz tarafından üridilasyona uğrayarak, hem pozitif hem negatif RNA zinciri sentezinde primer olarak kullanılır. Üridilasyon işleminde; viral 3D polimeraz, bir cre'yi (cis-replicating element) kalıp olarak kullanarak VPg yapısındaki tirozin grubuna iki üridin monofosfat (UMP) bağlanmasını katalizler (56).

Biraraya Gelme, Olgunlaşma ve Salınım

Viral poliprotein P1 bölgesinden, VP0, VP1 ve VP3 proteinlerini sentezlenir. Kapsomerler kendiliğinden pentamerik subunitlere dönüşür ve 12 tanesi biraraya gelerek ikozahedral kapsid yapısını oluşturur. RV için litik olmayan bir salınım mekanizmasında; replikasyon kompleksi ile bağlı olan viral vezikül içe doğru katlanarak replikasyon kompleksi ve oluşturulan kapsid yapısını çift katlı membran halinde çevreler. Bu çift katlı membran yapısı plazma membranı ile birleşerek, tek katlı ve stabil olmayan bir hale geçerek dağılır ve virüs salınımı gerçekleşir (57).

2.5. RV Enfeksiyon Patogenezi

Rhinovirusların nazal mukoza içerisine girişi ve çoğalması ile ilgili bir çalışmada; sağlıklı gönüllülerin nazofarinks arka duvarına 25µl virüs içeren solüsyondan uygulanmış ve her gün inferior konka ve nazofarinks arka duvarından sürüntü örneği alınmıştır. Bu çalışma ile genellikle RV'lerin önce nazofarinks bölgesinde, daha sonra öne doğru yayılım göstererek inferior konka bölgelerinde görüldüğü belirlenmiştir (58). Bu yayılımı virüsü içeren mukus tabakasını ileri itecek şekilde burundan sümkürme işleminin kolaylaştırdığı ve nazofarinks bölgesinin mukosiliyer temizlenmenin bittiği noktada olması nedeniyle bu bölgede virüs yükünün fazla olduğu düşünülmektedir (59).

Rhinovirus A ve B türlerinin çoğunun, epitel hücrelerine ICAM-1 reseptörü yoluyla giriş yaptığı bilinmektedir (44). ICAM-1, normalde skuamoz epitel hücreleri ve silyalı epitel yüzeyinde sentezlenmemesine rağmen; sağlıklı çocuk ve erişkinlerin adenoid ve nazofarinks dokularında bulunan silyasız ve silyalı epitel hücrelerinin bazal tabakalarında düşük düzeylerde saptanmaktadır. RV'ler normal insan bronşiyal epitel hücrelerinde (*Human bronşial epitelial cells*: HBEC) nükleer faktör kappa B (NF-κB) bağımlı bir mekanizma aracılığı ile çözünebilir ICAM-1 salınımını azaltıp, membrana bağlı ICAM-1 ekspresyonunu

artırırlar (60). Bu ICAM-1 ekspresyonu artışı, sağlıklı bireylerde deneysel olarak oluşturulan RV-39 enfeksiyonu sonrasında da nazal epitel hücrelerinde *in vivo* olarak gösterilmiştir (61).

İnfluenza virüs gibi diğer solunum yolu virüsleri epitel hücrelerinde parçalanmaya neden olurken, RV'ler nadiren sitopatolojik etkiye yol açarlar. Elektron mikroskopi kullanarak nazal biyopsi örneklerinin incelendiği bir çalışmada, epitel hücrelerinde şekil değişikliği olmakla beraber hücre sınırlarının sağlam olduğu gösterilmiştir (62). Ancak RV hücreler arası bağlantıyı sağlayan zona okludens 1'in ayrılmasına yol açıp epitelyal hücre bariyer fonksiyonunu bozarak, toll benzeri reseptör (*Toll-like receptor*: TLR) gibi epitelyal hücre reseptörlerinin açığa çıkmasını sağlamakta ve bakterilerin hücrelere geçişini kolaylaştırmaktadır (63).

Alt solunum yolu patojeni olarak RV'nin rolü ile ilgili erken dönem deneysel çalışmalarda, viral replikasyonun 33°C'de optimal düzeyde olduğu ve 37-39°C 'de azaldığı düşünülmektedir. Ancak sekiz farklı RV kökeni ile yapılan bir çalışmada virüslerin replikasyon kapasiteleri arasında 33°C ve 37°C sıcaklıklarda minimal düzeyde bir farklılık olduğunu gösterilmiştir (64). HBEC hücre kültürlerinde, yüksek virüs titresi ile inokülasyon sonrasında büyük ya da küçük boyutlarda, yuvarlak, piknotik çekirdek ve hücresel debris içeren hücre kümeleri gibi karakteristik sitopatik etkiler gözlenmiştir.

Rhinovirus Enfeksiyonlarında Bağışıklık Yanıtı

Solunum epitel hücreleri üzerinde doğrudan etkinin yanı sıra, doğal ve adaptif konak cevabının da patogeneizde rolü vardır. Virüsün doğal bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını anlamak için HBEC kültürü ile *in-vitro* çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda RV-6 kapsid yapısının TLR-2 ile, tek zincirli RNA (*Single-stranded RNA*: ssRNA) yapısının ise hücre içine alındıktan sonra endozomlarda bulunan TLR-7 ve TLR-8 ile tanındığı gösterilmiştir. Çift zincirli RNA (*Double-stranded RNA*: dsRNA) yapısı oluştuktan sonra ise melanoma farklılaşma ilişkili gen 5 (*melanoma differentiation- associated gene 5*: MDA-5) ve retinoik asit indüklenabilir gen 1(*retinoic acid-inducible gene 1*: RIG-1) tarafından tip I interferon (IFN) cevabı indüklenmektedir (65). Bu reseptörlerin katılımı ile, virüsün indüklediği IFN- β , IFN- γ yanıtı ve RANTES (*Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*), İnterferon gamanın indüklediği protein (*Interferon gamma-induced protein 10*: IP-10), İnterlökin-6 (IL-6), İnterlökin 8 (IL-8) ve epitelyal nötrofil ile aktive peptid 78 (*epithelial*

cell-derived neutrophil-activating peptide 78: ENA-78) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı artırılır (66).

Bradikinin ve lizilbradikinin gibi kininler de semptomatik RV enfeksiyonu patogeneğinde önemli rol oynarlar. Deneysel olarak ya da doğal yolla gelişen RV enfeksiyonu olan hastalarda, sağlıklı kontrol grubuna göre nazal lavaj örneklerinde, bradikinin ve lizilbradikinin düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir (67).

Doğal yolla gelişen ya da deneysel olarak oluşturulan enfeksiyonlarda burun yıkama örneklerinde IL-6 düzeyleri yüksek bulunur (68). Enfeksiyon semptomlarının şiddeti ile IL-6 polimorfizmi arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışmada; deneysel RV-39 enfeksiyonu sonrasında düşük düzeyde IL-6 üretimi görülen hastalarda (pozisyon 174, C/C genotipi) nazal sekresyon miktarı ve mukosilyer aktivite hızı değişmemesine rağmen hastalık semptomlarının daha şiddetli olduğu gözlenmiştir. Ayrıca IFN- γ (pozisyon +874) polimorfizmi görülen hastalarda serokonversiyonun daha geç geliştiği gösterilmiştir. Buna karşın IL-10 ve tümör nekroz faktör α (*Tumor necrosis factor- α* : TNF- α) ile semptom şiddeti ve serokonversiyon ilişkisinin bulunmadığı belirlenmiştir (69).

Rhinoviruslar nazal epitelyal hücrelerde sitokin ve kemokin sentezi yoluyla solunum yolu inflamasyonuna neden olmalarının yanısıra bazı potansiyel antiviral moleküllerin sentezlenmesine yol açarlar (70). Tip-2 veya indüklenbilir nitrik oksit sentetaz (iNOS), epitel hücrelerinde yaygın olarak saptanan NOS formu olup önemli miktarda nitrik oksit (NO) sentezler. RV enfeksiyonunda iNOS sentezi *in-vivo* ve *in-vitro* olarak uyarılmaktadır. Sentezlenen NO hem RV replikasyonunu hem de virüsün uyardığı sitokin ve kemokin üretimini baskılamaktadır (71). Bu bulgulara dayanarak NO'nun enfeksiyona karşı koruyucu olduğu ve dışarıdan NO uygulamasının klinik olarak faydalı olabileceği düşünülmektedir (72). Enfeksiyona karşı koruyucu özellikleri olan bir başka protein de viperin (*virus inhibitory protein, endoplasmicreticulum associated, IFN-inducible*) dir. Viperin'in RV replikasyonunu hangi mekanizma ile inhibe ettiği bilinmemekle birlikte, viperin ekspresyonunun engellendiği hücrelerde virüsün replikasyonunun arttığı çalışmalarla gösterilmiştir (70).

Seronegatif bireylerde enfeksiyon sonrasında solunum yollarında sekretuar antikorlar (IgA) ve serotipe spesifik nötralizan antikorlar (IgG) oluşur. Seronegatif bireylerin deneysel

olarak RV-2 ile enfekte edildiği bir çalışmada, spesifik antikorların enfeksiyondan sonraki iki hafta içinde ortaya çıktığı ve yaklaşık bir yıl süre ile yüksek kaldığı saptanmıştır (73).

Antiviral bağışıklıkta T hücrelerinin rolü; viral antijenlerin tanınması ve sonrasında sitotoksik ve antikor aracılı bağışık yanıtın tetiklenmesi ile ilişkilidir. Virüs ile enfekte endotelial hücrelerden T hücre kemotaksisini aktive eden RANTES ve IP-10 salınımı olmaktadır (74).

Kronik Akciğer Hastalıkları Oluşum Mekanizmaları

Astım, solunum yollarında yumuşak kas tabakasında kalınlaşma, epitel altında matriks depolanması, angiogenez, goblet hücre hiperplazisi ve artmış mukus üretimi gibi değişikliklere yol açan bir hastalıktır (75). Rhinovirus'a bağlı solunum yolu enfeksiyonunun erken dönemlerinde doğal bağışık yanıt olarak virüs tarafından indüklenen IFN cevabının önemli olduğu bilinmektedir. Astımda virüsle uyarılan IFN tip 1 ve 3 sekresyonlarındaki azalmanın daha uzun süreli ve daha şiddetli bir enfeksiyona neden olduğu düşünülmektedir (74). Astım alevlenmesi sırasında, özellikle alt solunum yollarında nötrofil yanıtı ve vasküler endotelial büyüme faktörü (*vascular endothelial growth factor*: VEGF), NO, transforme edici büyüme faktörü (*transforming growth factor*: TGF) ve fibroblast büyüme faktörü (*fibroblast growth factor*: FGF) gibi solunum yolları yapılanması ve alveoler gelişimi düzenleyen faktörlerin sentezinin arttığı gösterilmiştir (76). Bu faktörlerin sentezinin artması ile birlikte enfeksiyona karşı daha şiddetli bir inflamatuvar cevabın oluşmasının, solunum yollarında ödem ve yumuşak kas kasılmalarına neden olarak astımı şiddetlendirebileceği öngörülmektedir (77).

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı, progresif hava akımı kısıtlılığı ve solunum yolu inflamatuvar yanıtında artışla seyreden, tedavi ile önlenabilir bir hastalıktır. KOAH alevlenmesi ise, hastalığın doğal seyri sırasında akut başlayan, tedavi değişikliği gerektirebilen, hastanın bazal dispne, öksürük ve/veya balgamında anormal bir değişiklik görülmesi durumudur (78).

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı alevlenmelerinin etyolojisinde solunum yolu virüsleri; özellikle de RV önemli yer tutmaktadır (18). KOAH alevlenmesi ve RV arasındaki ilişkiyi araştırmak için, deneysel olarak enfekte edilen 13 hasta ve eşit sayıdaki kontrol grubu kullanılarak yapılan bir çalışmada, hasta grubunda bronkoalveolar lavaj (BAL) örneklerinde nötrofil elastaz, IL-8 ve IL-6 düzeylerinde artış saptanırken; TNF düzeyleri her iki grupta

belirgin bir artış göstermemiştir. Hasta grubunun BAL örneklerindeki alveolar makrofajlarda kontrol grubuna göre IFN- β yanıtında azalma olduğu belirlenmiş ve bu durumun KOAH hastalarında RV enfeksiyonunun şiddetli geçirilmesinin sebebi olduğu düşünülmüştür (79).

Kistik fibrozis, en sık solunum ve gastroentestinal sistem olmak üzere birden çok sistemi etkileyen, otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalıktır. KF hastalarında RV tarafından indüklenen alevlenmelerin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan bir çalışmada IFN yanıtındaki azalmanın neden olabileceği belirlenmiştir (80).

2.6. Rhinovirus Bulaşı ve Epidemiyoloji

Bulaş

En yaygın bulaş yolu, parmak uçlarıyla virüsün alınıp burun ve gözlere temas ettirilmesidir (81). RV'nin parmak uçlarıyla bulaşı, tokalaşma yoluyla veya enfekte bir kişinin nazal sekresyonlarıyla ortamı kontamine etmesi ile gerçekleşir. RV ile kontamine yüzeyleri tespit etmek için, enfekte kişiler ile evler ve otellerde RT-PCR yöntemi ile yapılan bir çalışmada sık dokunulan yüzeylerin % 40-50'sinde viral RNA saptanmıştır (82). RV'nin genellikle nazal bölgeyi enfekte ettiği bilinmekle beraber, konjonktivaya bulaşından yirmi dört saat sonra virüsün nazofarenkste tespit edildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Virüsün gözyaşı kanalı yolu ile nazal kaviteye taşındığı ve burada nazofarenkse ulaştığı düşünülmektedir (83). Virüsün aerosollerle inhalasyonu daha az görülen bir bulaş yoludur (84).

Rhinoviruslar çoğunlukla solunum yolu enfeksiyonları ile ilişkili olmasına karşın, dışkı örneklerinde virüsün saptandığı çalışmalar da mevcuttur. İngiltere'de iki yaş altı çocuklardan alınan dışkı örnekleri ile yapılan bir çalışmada, saptanan EV ve RV viral yükleri birbirine yakın oranlarda yüksek bulunmuştur. RV'lerin bağırsakta çoğalabildiği ve fekal oral yol ile bulaş olabileceği düşünülmektedir (85).

Mevsimsel Dağılım

Epidemiyolojik çalışmalarda rhinovirusların ılıman iklimli bölgelerde genellikle erken sonbaharda ve bazen de baharda pik yaptığı gösterilmiştir (86). Yaz aylarında görülme oranı nispeten düşük olsa da RV'ler bu dönemde de en sık saptanan viral solunum yolu etkenidirler (87). Tüm RV tipleri ılıman, tropikal, subtropikal ve yarı kurak iklim bölgelerinde tüm

aylarda saptanabilmektedir (88). Rhinovirus-C ılıman ve subtropikal iklim bölgelerinde kış ve sonbaharda pik yaparken tropikal iklim bölgelerinde yağmurlu dönemlerde pik yapmaktadır. Rhinovirus-A ve B ‘nin de benzer mevsimsel özellikler gösterdiği düşünülmektedir. (89).

2.7. Rhinovirus Enfeksiyonu Klinik Seyri

Asemptomatik Enfeksiyon

Moleküler yöntemlerin kullanılmaya başlanması ile, asemptomatik RV enfeksiyonlarının özellikle çocuk yaş grubunda yaygın olarak görüldüğü belirlenmiştir. Çocuk hastalar ile yapılan çalışmalarda asemptomatik enfeksiyon oranının %12-22 arasında görüldüğü belirlenmiştir (90). Orta yaş ve üzeri erişkinlerde ise asemptomatik enfeksiyon oranı çocuklara göre oldukça düşüktür. Asemptomatik erişkinlerle yapılan iki çalışmada RV oranları sırasıyla %0 ve %2 olarak belirlenmiştir (91). İmmünyetmezlikli hastalarda ise asemptomatik enfeksiyon oranı %9 olarak belirlenmiştir (90).

Üst Solunum Yolu Enfeksiyonları

Moleküler yöntemler ve hücre kültürü yöntemi kullanarak yapılan çalışmalarda RV’nin soğuk algınlığı vakalarının %50-75’inden sorumlu olduğu gösterilmiştir (92). Bağışıklığı normal bireylerde soğuk algınlığı; genellikle yaklaşık iki günlük bir inkübasyon, 7-14 günlük semptomatik dönemle seyreden ve kendi kendini sınırlayabilen bir enfeksiyondur (93). Hastalığın yaygın semptomları; burun akıntısı, boğaz ağrısı, öksürük, baş ağrısı, subfebril ateş ve vücutta halsizliktir (18).

Çocuk yaş grubunda RV’nin soğuk algınlığı vakalarının yaklaşık üçte birinde komplikasyon olarak görülen otitis media (OM) ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (94). Finlandiya’da iki ay-iki yaş arası 329 çocuğun dahil edildiği bir çalışmada 458 OM atağı gözlenmiştir. Nazofaringeal aspirat veya orta kulak sıvısı örneklerinin gerçek zamanlı PZR ile incelenmesi ile atakların %41’inde RV saptanmıştır (95). Virüsün üst solunum yolu enfeksiyonları ve OM ile ilişkisini göstermek için adenoid doku örnekleri ile yapılan bir çalışmada, tekrarlayan OM ve adenoid hipertrofi öyküsü olan çocuklardan alınan adenoid doku örneklerinin *in-situ* hibridizasyon yöntemi ile incelenmesi sonucunda örneklerin %45’inde RV RNA tespit edilmiştir (96).

Soğuk algınlığı geçiren hastalarda sinüs anomalileri bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonanslı görüntüleme (MRG) ile gösterilmiştir (97). Akut sinüzit tanısı alan hastalarda maksiller sinüs aspirat ve nazofaringeal sürüntü örneklerinde RT-PZR yöntemi ile %50 oranında RV RNA saptanmıştır (98).

Alt Solunum Yolu Enfeksiyonları

Krup, yaygın olarak parainfluenza virüs (PIV) enfeksiyonlarında görülmesine karşın RV enfeksiyonlarında nadir olarak krup bildirilmiştir. Amerika’da akut solunum yolu enfeksiyonu tanısı ile hastaneye yatan beş yaş altı çocukların %10’unda krup gelişmiş ve bunların %3’ünün solunum yolu örneklerinden RV izole edilmiştir (99). Çocuk acil servisine krup semptomları ile başvuran çocuklar % ile yapılan bir çalışmada hastaların %12’sinde RV etken olarak saptanmıştır (100). Krup enfeksiyonları için solunum yolu virüsleri ile yapılan mikrobiyolojik sürveyans çalışmalarında PIV enfeksiyonları daha çok kış ve bahar aylarında (Aralık-Nisan), RSV enfeksiyonları kış aylarında (Aralık-Şubat) görülürken; RV enfeksiyonlarının daha çok sonbaharda (Eylül-Kasım) görüldüğü belirlenmiştir (18).

Bronşiolit, RV enfeksiyonu nedeni ile hastaneye yatan çocuklarda en sık görülen klinik durumdur. Pediatrik yoğun bakım ünitesine yatış gerektiren RV ile ilişkili alt solunum yolu enfeksiyonlarının %14’ünü oluşturur. (101). Çok merkezli prospektif bir çalışmada RV’nin, RSV’den sonra hastanede yatan çocuklarda en sık bronşiolit etkeni olduğu gösterilmiştir (102). RV ilişkili bronşiolit, hayatın ilk bir yılında tekrarlayan hışıltı atakları ve astım gelişimi için bağımsız bir risk faktörüdür (103). Hışıltı tanısı ile hastanede yatan 81 çocuğun altı yıllık takiplerinde, RV ilişkili hışıltı öyküsü olan çocuklarda, başka viral etkenlerle ilişkili hışıltı öyküsü olan çocuklara göre çocukluk çağı astım riskinin dört kat daha fazla olduğu saptanmıştır (104).

Toplum kökenli pnömoni (TKP) tanısı ile hastaneye yatan çocuklarda yapılan klinik çalışmalarda, RV’nin %18-26 oranı ile viral pnömoni etkenleri arasında yaygın olarak görüldüğü belirlenmiştir. (105). Erişkinlerde ise viral TKP oranı yaklaşık %5 olarak tespit edilmiştir (106).

İmmünyetmezlikli Hastalarda Enfeksiyonlar

Multipleks gerçek zamanlı PZR gibi moleküler yöntemlerin tanıda kullanılmaya başlanması ile RV'nin immünyetmezlikli hastalarda akut solunum yolu enfeksiyonlarında önemli bir etken olduğu anlaşılmaya başlanmıştır (107). İnfluenza benzeri hastalık nedeniyle acil servise yatan hastalarla yapılan bir çalışmada, immünyetmezlikli hastalarda RV enfeksiyonunun şiddetinin pandemik H1N1 influenza virüsüne benzer olduğu gösterilmiştir.

İsviçre'de yapılan bir çalışmada immünyetmezlikli üç akciğer transplant hastasında akut ve kronik (8-15 ay) RV enfeksiyonu RT-PZR yöntemi ile gösterilmiştir (108). İtalya'da 36 erişkin transplant alıcısı ile yapılan bir çalışmada iki yıllık süreçte 15 (%42) hastadan alınan tüm BAL örneklerinin %13'ünde RV tespit edilmiştir (109). Çocuklarda yapılan çalışmalarda ise erişkinlere göre transplantasyon sonrası ilk bir yıl içinde % 22, ilk 22 ay içinde %30 oranı ile RV enfeksiyonunun daha yaygın olarak görüldüğü saptanmıştır (110).

Hematolojik malignite hastalarında RV hem üst hem alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olmaktadır (111). Kök hücre nakli alıcılarında haftalık sürveyans için alınan nazofaringeal sürüntü örnekleri ile yapılan bir çalışmada nakilden sonraki ilk 100 gün için kümülatif RV insidansı %22 olarak bulunmuştur (112). Yaygın olmamakla birlikte RV ile ilişkili pnömoni gelişen hastalarda ise morbidite ve mortalite oranları yüksek bulunmuştur (111).

Kronik Akciğer Hastalık Alevlenmeleri

Doğumdan üç yaşına kadar olan dönemde RV ile ilişkili hışıltı atakları geçirmiş olan 259 çocuğun, altı yıllık takiplerinin yapıldığı bir prospektif kohort çalışmasında; bu çocuklarda ilk altı yaş döneminde astım gelişme riskinin 10 kat arttığı gösterilmiştir (113). Viral bronşiolit tanısı ile hastaneye yatan infantlarda da çocukluk döneminde astım gelişme riski iki-üç kat artmaktadır. Bu risk RSV, PIV ve influenza enfeksiyonları ile karşılaştırıldığında RV enfeksiyonlarında daha fazla bulunmuştur (114). Rhinovirus ayrıca astım alevlenmelerinden de sorumludur. Virüslerin neden olduğu astım alevlenmelerinin yaklaşık üçte ikisi RV ile ilişkilidir (115).

Viral solunum yolu enfeksiyonları ile KOAH alevlenmeleri arasında belirgin bir ilişki olduğu bilinmektedir. KOAH tanısı olan 62 hastanın ortalama 26 ay izlendiği bir çalışmada

hastaneye yatış gerektiren durumların %58'i, acil servise yatış gerektiren durumların %6 'sı viral solunum yolu etkenleri ile ilişkili bulunmuştur (116). Akut KOAH alevlenmesi olan hastaların %37'sinde, stabil KOAH enfeksiyonu olan hastaların %12'sinde ve obstrüksiyonu olmayan sigara içicilerinin %12'sinde viral etkenler saptanmıştır. Alevlenmesi olan hastalarda %24 oranı ile en sık RV izole edilmiştir (117).

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı alevlenmelerine benzer şekilde kistik fibrozis alevlenmelerinde de viral etkenler arasında en sık RV saptanmaktadır. Bir çalışmada tüm alevlenmelerin %16'sında RV gösterilmiştir (118).

2.8. Rhinovirus Tanı Yöntemleri

Solunum yolu örneklerinde semptomların başlangıcından sonraki iki gün içinde virüs titresi en yüksek düzeydedir; ancak semptomların başlamasından bir gün önce ve altı gün sonrasına kadar virüs saptanabilmektedir (119). Üst solunum yolu enfeksiyonları için naylon silgeç ile alınmış nazofaringeal sürüntü veya nazofaringeal aspirat örnekleri tercih edilmektedir (120). Örnekler viral taşıma vasatı içine konularak laboratuvara gönderilmelidir. Alt solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında; trakeal veya bronşial aspirat, BAL sıvısı ve akciğer biyopsi örnekleri kullanılmaktadır. Solunum yolu örnekleri alındıktan sonra eğer hastane dışına taşınması gerekiyorsa dondurulmalı ve kuru buz ile taşınmalıdır. Eğer örnek iki gün içerisinde çalışılmayacaksa -70°C'de dondurulmalıdır (18). RV tanısı için solunum yolu örnekleri dışında dışkı örnekleri ile yapılan bazı çalışmalar da mevcuttur (85).

Virüs Kültürü

Moleküler yöntemler virüsün tespiti için daha duyarlı yöntemler olmasına karşın; araştırmalarda virüs özelliklerini ve enfeksiyon patogenezi göstermek için kültür yöntemi daha çok tercih edilmektedir. RV-A ve B türleri için insan fetal embriyonik akciğer fibroblast hücreleri (WI-38, MRC-5), bazı HeLa hücre klonları (HeLa H, HeLa I, HeLa Ohio, HeLa R19) ve insan embriyonik böbrek hücreleri laboratuvarlarda en sık kullanılan RV hücre kültür dizileridir (121). RV-A ve RV-B enfeksiyonuna duyarlı hücre dizilerinde üretilmeyen RV-C'nin, sadece sinüs organ kültüründe üretilbildiği gösterilmiştir (122). RV aside duyarlı olduğu için kültürler nötral pH'da bekletilmektedir (119).

Hücre kültürlerinin 33°C’de inkübe edilmesinin 37°C’ye göre daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Hücre dizilerinin çoğunda sitopatik etki gözlenmekte olup sitopatik etki göstermeyen kökenler de bildirilmiştir. Morfolojik değişiklikler en iyi fibroblast hücre dizilerinde gözlenebilmektedir. Fibroblast hücrelerinde yuvarlaklaşma ve çekirdeğin piknotik görünüm alması gibi değişiklikler gözlenmektedir. Hücre kültürlerinin 14 gün süre ile inkübe edilmesi ve sitopatik etkinin belirlenmesi ile tanı konulmaktadır (121).

Konvansiyonel kültürün yanı sıra RV için hızlı kültür yöntemi de tanımlanmıştır. Bu yöntem; virüse duyarlı HeLa hücreleri ile kaplanmış lamalar üzerine, hastadan alınan örneğin inokülasyonu ve inkübasyon sonrası immünfloresan yöntemi ile virüs antijen tespitini kapsar (123).

Seroloji

Çok fazla sayıda rhinovirus serotipinin olması ve tüm serotipleri kapsayacak bir antijeninin bulunmaması nedeni ile RV için antijen testleri rutin tanı yöntemi olarak kullanılmamaktadır. Ancak epidemiyolojik çalışmalarda serum ve nazal sekresyon örneklerinde nötralizasyon, kompleman fiksasyon ve ELISA testleri ile antikor ölçümü yapılmaktadır(124).

Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemlerin tanıda kullanılmaya başlaması ile solunum yolu örneklerinde virüsü belirleyen PZR temelli testler ön plana çıkmıştır (125). Moleküler testlerin duyarlılığı yüksek olup ayrıca hücre kültürünün aksine tanı süresi daha kısadır. Multipleks RT-PZR ya da gerçek zamanlı RT-PZR yöntemlerinde, tüm RV ve EV’ler için korunmuş bir bölge olması sebebiyle 5’UTR bölgesi en çok kullanılan hedef bölgelerden biri olmuştur. Ancak bu bölgede RV ve EV arasındaki benzerlikten dolayı çapraz reaksiyonlar gözlenmekte ve ayrımları zor olmaktadır. 5’UTR bölgesi için PZR sonrasında RV ve EV ayrımı; RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) yöntemi ile ampikon boyutlarına göre ya da RV’e özgü problemler kullanılarak hibridizasyon yöntemi ile yapılabilir (126). VP4/VP2 kapsid kodlayan bölgenin iyi korunmuş bir bölge olması ve her üç RV türünün ayrımını da yapabilmesi nedeniyle RV epidemiyolojisi ve RV türleri ile klinik tanı arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (127).

Bazı çalışmalarda yüksek viral yük ile semptomatik hastalık arasında bir korelasyon olabileceğinin gösterilmesi, pozitif sonuçların klinik önemini değerlendirmek için kantitatif testleri ön plana çıkarmaktadır (128). Ancak örnek tipi ve örnek alma prosedürü, test yöntemi, hasta yaşı ve hastanın immün durumu gibi değişkenler kantitasyonu etkilemekte ve testlerin standardizasyonunu zorlaştırmaktadır (18).

RT-PZR'a alternatif olarak klinik laboratuvarlarda en sık kullanılan moleküler yöntem nükleik asit dizi temelli amplifikasyon (*nucleic acid sequence-based amplification: NASBA*)'dır. RT-PZR ve NASBA testlerinin karşılaştırıldığı bir klinik çalışmada duyarlılık ve özgüllük NASBA için sırasıyla %85.1 ve %98.3 olarak; RT-PZR için ise sırasıyla %82.9 ve %93.4 olarak bulunmuştur (129). Son yıllarda multipleks solunum virüs saptama testlerinin kullanıma girmesi solunum virüslerinin belirlenmesi daha da kolaylaşmıştır (130).

Genotiplendirme

Serotiplendirme yönteminde çapraz reaksiyon oranının fazla olması türler arasındaki ayrımı zorlaştırmaktadır. PZR temelli yöntemler ile farklı gen bölgeleri çoğaltılarak RV'ler tiplendirilebilmektedir (18). 3D (RNA bağımlı RNA polimeraz) bölgesi ve 5'UTR bölgelerine uygulanan dizi analizi ile RV tür ayrımı yapılabilirken, aynı tür içerisindeki farklı genotiplerin ayrımı yapılamamaktadır. VP4/VP2 bölgesi, iyi korunmuş olması ve üç RV türünün aynı primer seti ile çoğaltılabilmesi nedeniyle epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (131). Filogenetik analiz için RT-PZR sonrasında VP1 ve VP4/VP2 gen bölgeleri dizilenmektedir. VP4/VP2 bölgesi ile RV türlerinin ayrımı daha kolay yapılırken, VP1 bölgesinin dizi analizi ile bir tür içerisindeki genotipler de belirlenebilmektedir (18).

Tüm Genom Dizi Analizi

Yaklaşık 150 RV serotipinin tamamının tüm genom dizi analizi 2009 yılında yapılmıştır. Bu çalışma, genetik özelliklerin belirlenmesi yanında RV tiplendirme için kullanılan çok sayıdaki gen bölgesi dizilerinin karşılaştırılması için bir referans olmuştur (19). RV rekombinasyonunun gösterildiği çalışmalar ile tüm genom dizi analizinin önemi artmaya başlamıştır. Tek bir gen bölgesinin dizi analizi yöntemi ile RV tiplendirmesinde hatalı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Tüm genom dizi analizi verilerinin artması ile analiz için yeni gen bölgelerinin belirlenmesi sonucunda rekombinasyon gibi evrimsel değişiklikler daha iyi anlaşılacaktır (131).

2.9. Rhinovirus Enfeksiyonlarında Tedavi

Rhinovirus enfeksiyonlarının özgül bir tedavisi yoktur. Semptomatik tedavi uygulanmaktadır. Tedavide kullanılabilecek çok sayıda antiviral ajan bulunmaktadır, ancak bu ajanların hiçbirisi onay almamıştır (18).

Viral kapsid, replikasyon inhibitörleri geliştirilirken ilk hedeflenen viral proteinlerdendir. Kapside bağlanan bileşikler, virion stabilitesini artıran bir konformasyonel değişimi indükleyerek, virionun hücresel reseptörle etkileşimini engellerler (132). Virüsün bağlanmasını önleyen ilaçlar arasında pleconaril, vapendavir ve pirodavir bulunmaktadır.

Pleconaril; biyoyararlanımının fazla olması, uzun yarı ömürlü olması ve santral sinir sistemine iyi penetre olması nedeniyle EV enfeksiyonları için tercih edilebilen bir oral terapötik ajandır (133).

Vapendavir, VP1 kapsid proteinine bağlanarak viral RNA'nın salınmasını inhibe eden ve oral olarak kullanılan bir antiviral ajandır. Bilinen RV-A ve RV-B serotiplerine karşı antiviral etkinliği belirlenmiştir (134).

Rhinovirus serotiplerinin büyük çoğunluğunun ICAM-1 reseptörüne bağlanması nedeniyle, ICAM-1 reseptörüne karşı 'mAb 1A6' adı verilen bir monoklonal antikor ve 'CFY196' adı verilen bir multivalan rekombinant füzyon proteini geliştirilmiş ve yapılan hücre kültürü çalışmalarında CFY196'nın RV enfeksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (135).

Enfeksiyondan korunma

RV enfeksiyonunun kişiden kişiye bulaşı, küçük ve büyük partiküllü aerosoller, direk temas ya da enfekte yüzeylerle temas yolu ile gerçekleşmektedir (136). Kalabalık ortamlardan uzak durma, maske kullanma ve el hijyenine dikkat etmenin virüs bulaşını azalttığı bilinmektedir.

Enfekte ellerle bulaş RV enfeksiyonunun yayılmasında önemli yer tutmaktadır. Bu nedenle etkin el hijyeninin viral bulaşı engellemede önemli olabileceği düşünülmektedir (137).

Rhinovirus kökenleri için aşı geliştirme çalışmaları, antijenik heterojenite nedeniyle başarılı olamamıştır. Günümüzde 167 serotipi olan RV'ler için polivalan aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir (138).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada; Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında akut solunum yolu enfeksiyonlu hastalardan alınan nazofaringeal sürüntü örneklerinden daha önce iki ticari multipleks gerçek zamanlı PZR kiti [(FTD Respiratory pathogens 21 (Fast-track diagnostics Ltd., Malta) ve Anyplex™ II RV16 Detection V1.1 (Seegene Inc., Seoul, Korea)] ile RV pozitifliği belirlenmiş olanlarda, kantitatif gerçek zamanlı PZR ile RV viral yük miktarı araştırıldı. Viral yükü gösterilemeyen örnekler çalışmadan çıkarıldı. Viral yükleri belirlenen örneklerde RV tür dağılımı ve bu RV türleri ile hastaların yaş, cinsiyet, viral yük ve klinik tanıları arasındaki ilişki araştırıldı. Tanımlayıcı kesitsel bir çalışma olarak planlanan bu çalışma için Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul onayı (TF, 2013/268) alındı.

3.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubu, Ocak 2014-Ocak 2016 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Çocuk Hastalıkları ve Göğüs hastalıkları Polikliniklerine başvuran ve Çocuk Hastalıkları, Göğüs hastalıkları ve Hematoloji-Kemik İliği Servislerinde yatan, akut solunum yolu şikayetleri ile takip edilen ticari kitle RV pozitifliği belirlenmiş olan 46 erişkin ve 50 çocuk hastadan oluşmaktadır. Hastaların klinik, yaş ve cinsiyet gibi demografik verileri hastane veri tabanından alındı. Çocuk hastaların klinik tanıları; dokuz akut üst solunum yolu enfeksiyonu (ÜSYE), sekiz hışiltı, on üç akut bronşiolit, dokuz pnömoni ve on bir astım olarak ve erişkin hastaların klinik tanıları ise; 20 akut ÜSYE, 19 pnömoni, beş KOAH ve iki astım olarak belirlendi. Güney Kıbrıs'ta RV-A, RV-B ve RV-C olarak tanımlanmış üç tür pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edildi.

3.2 Kantitatif gerçek zamanlı PZR

Multipleks gerçek zamanlı PZR ile daha önce RV pozitifliği saptanmış olan örnekler viral yük tespiti için kantitatif gerçek zamanlı sistemi olan LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes kiti ile LightCycler®480(Roche) cihazında çalışıldı.

a) Primerler ve problemler için optimizasyon:

Öncelikle primerler kullanım klavuzlarında önerilen 100µM için gerekli su miktarı eklenerek 100 µM'a (yani 100pmol/ µl'ye) sulandırıldı. *Forward* (F) ve *Reverse* (R) primerden 10µM (100µM'lık ana stoktan 10ul alınıp üzerine 90ul su eklendi) ara stok oluşturulup çalışıldı. LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes ile cDNA sentezi ve gerçek zamanlı aşaması bir arada yapıldı.

b) Kantitatif gerçek zamanlı PZR karışımının hazırlanması

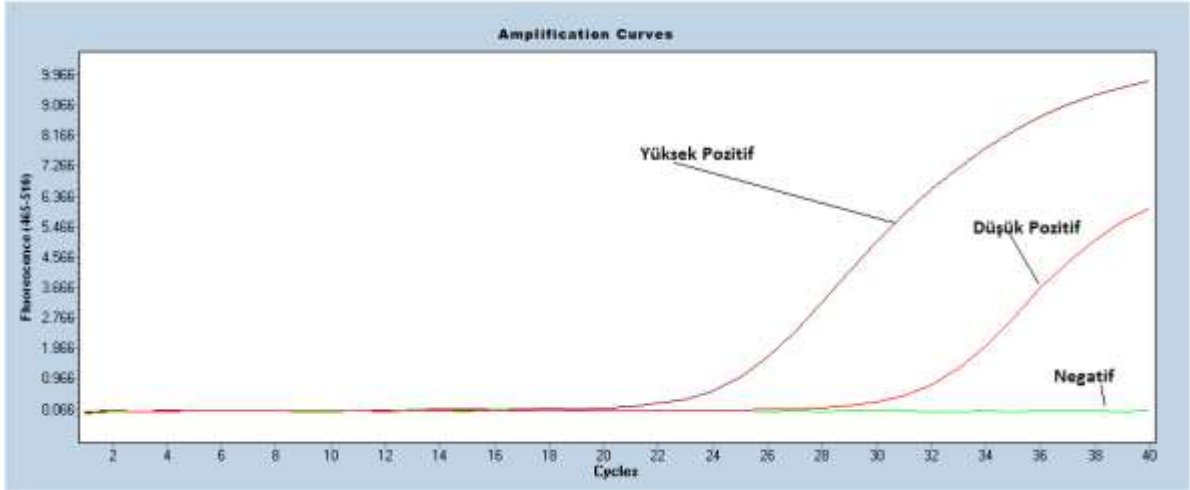
Tablo I: LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes karışımı

Tek reaksiyon (hacim)	Tek reaksiyon (konsantrasyon)	Bileşenler
5.3µl	-	Su, PCR-grade (Roche FastStart ile birlikte sağlanmaktadır)
1.3 µl	3.25mM	Aktivator
1 µl	1x	Enhancer
1 µl	1x	Eva Green(Dye)
1 µl	0,5 µM	<i>Forward</i> Primer (CCCCTGAATGYGGCTAA tm: 55-60) (ara stok 10 µM)
1 µl	0,5 µM	<i>Reverse</i> Primer (GAAACACGGACACCCAAAGTA tm: 59) (ara stok 10 µM)
7.4 µl	x	RNA master hydrolysis master (Roche)
2 µl		RNA
20µl		Toplam

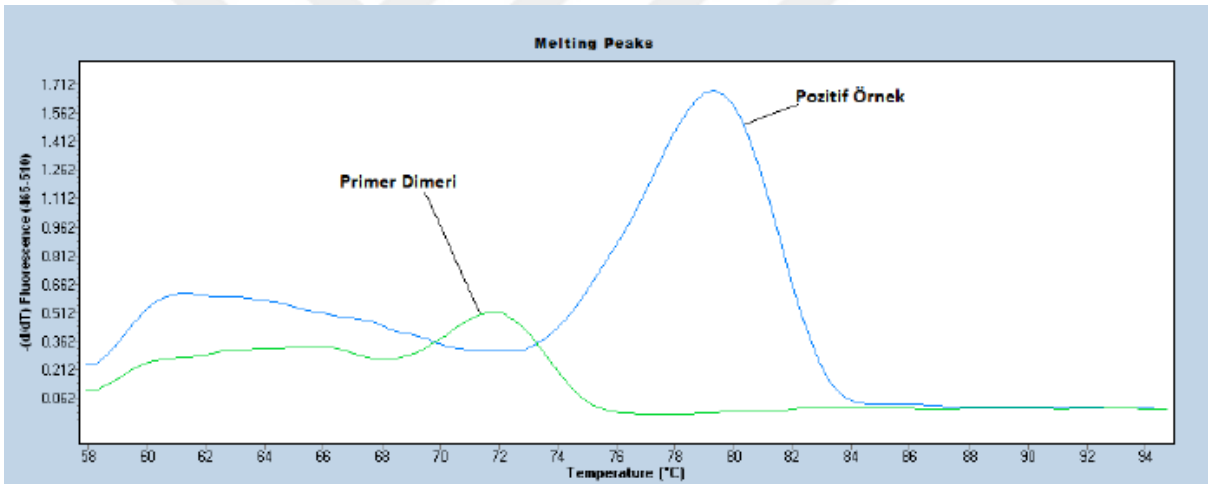
c) PZR reaksiyonunun Gerçekleştirilmesi

Tablo II: LightCycler®480 (Roche) cihaz protokolü

	cDNA	Denaturasyon	Amplifikasyon			Melting curve			Cooling
Parametre									
Analiz modu	yok	yok	Kuantifikasyon modu			Erime Eğrisi modu			Yok
Döngü	1	1	40			1			1
Hedef [°C]	63	95	95	57	72	95	58	95	40
Süre [hh:mm:ss]	00:04:00	00:00:30	00:00:10	00:00:30	00:00:05	00:00:10	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Acquisition Mode	yok	yok	yok	yok	single	yok	yok	Continuous	yok



Şekil 2: LightCycler®480 (Roche) cihazında amplifikasyon eğrilerinin görünümü



Şekil 3: LightCycler®480 (Roche) cihazında erime sıcaklığı(t_m) eğrilerinin görünümü

c) Data Analizi

LightCycler 480 yazılımında kantitasyon, 'absolute quantitation second derivative analizi' 530 kanalı kullanılarak belirlendi. 'CT' değerleri cihaz tarafından otomatik hesaplandı. Daha sonra melting (erime) analizi ile pozitif örneklerin verdiği erime ısısı pikleri değerlendirildi.

3.2. Konvansiyonel PZR

Kantitatif gerçek zamanlı PZR sonrasında elde edilen ürünlerdeki bantları göstermek için, “FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack” kiti kullanılarak konvansiyonel PZR yöntemi uygulandı. Çoğaltılan gen bölgesine ait bant (549 bp) görülen örnekler seçilerek dizi analizi aşamasına devam edildi.

a) Konvansiyonel PZR için cDNA sentezi

cDNA sentezi, “First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR” kiti ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı.

1. 0,2 µl’lik PZR tüpleri örnek sayısı kadar çıkarıldı ve soğutma kabına yerleştirildi.
2. Konvansiyonel PZR karışımı hazırlanarak tüplere eklendi.

b) Konvansiyonel PZR karışımının hazırlanması

Tablo III: ‘First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR’ kiti ile cDNA sentezi için PZR karışımı

Bileşenler (tek reaksiyon için)	Hacim	Son Hacim Konsantrasyonu
Total RNA veya mRNA	10 µl	Üretici firma tarafından önerilen; total RNA;10 -5000ng mRNA;1- 100ng
<i>Anchored oligo(dt)</i>	1 µl	2,5 µM
<i>Random Hexamer Primer</i>	2 µl	60 µM
Toplam	13 µl	

3. Tüpler ısı döngü cihazına yerleştirildi
4. 65°C ’de 10 dk’da denatüre edildikten sonar tüpler hızlı şekilde buz üzerine alınarak 2 dk beklendi.

5. ‘Mastermix’ hazırlandı. (Bu miktarlar örnek sayısıyla çarpılarak hazırlandı)

Tablo IV: cDNA sentezi için ‘mastermix’ karışımı

Mastermix Bileşenler (tek reaksiyon için)	Hacim	Son Hacim Konsantrasyonu
<i>Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer(5x)</i>	4 µl	1x (8 mM MgCl ₂)
<i>Protector RNase Inhibitor(40 U / µl)</i>	0,5 µl	20 U
<i>Deoxynucleotide mix(10 mM each)</i>	2 µl	1 mM
<i>Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U / µl)</i>	0,5 µl	10 U
Toplam	7 µl	

6. Her tüpe 7 µl ‘mastermix’ karışımından dağıtıldı ve pipetle 3-4 kez karıştırıldı.

7. Tüpler ısı döngü cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki protokole göre çalışıldı.

Tablo V: “First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR” kiti ile cDNA sentez PZR protokolü

Sıcaklık	Süre
25 °C	10 dk
50 °C	60 dk
85 °C	5dk
4 °C	bekleme

c) Konvansiyonel PZR reaksiyonu

Primerlerin optimizasyonu:

Primerler kullanım kılavuzlarında önerilen 100 µM için gerekli su miktarı eklenerek 100 µM’a (yani 100pmol/ µl’ye) sulandırıldı. *Forward* (F) ve *Revers* (R) primerden 10µM’lık (100µM’lık ana stoktan 10ul alınıp üzerine 90ul su eklendi) ara stok oluşturuldu.

Primer ara stok hazırlanışı:

F ve R primerden 4 µM (100µM'lık ana stoktan 10ul alınıp üzerine 240 ul su eklenerek) ara stok oluşturuldu.(C1.V1=C2.V2)

d) Konvansiyonel PZR reaksiyon karışımının hazırlanması

Tablo VI: “FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack” kiti ile konvansiyonel PZR karışımı

Bileşenler	Hacim
Distile su	28,5 ul
FastStart High Fidelity Reaction Buffer10x	5 µl
PCR Grade nucleotide mix(10 mM)	1 µl
*F primer(4 uM) (GGGACCAACTACTTTGGGTGTCCGTGT)	5 µl
*R primer(4 uM) (GCATCIGGYARYTTCCACCACCANCC)	5 µl
FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5 U/ul)	0.5 µl
Cdna	5 µl
Toplam hacim	50 µl

*VP4/VP2 gen bölgesi (Savolainen ve ark.), yaklaşık 549 bp

Tablo VII: “FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack” kiti ile Konvansiyonel PZR protokolü

Döngü	Sıcaklık	Süre
1	95°C	2 dakika
35	95°C	30 saniye
	55°C	30 saniye
	72°C	40 saniye
1	72°C	7 dakika
1	4°C	

e) PZR ürünlerinin jel elektroforezi

PCR örneklerinde bant oluşumunu gözlemlemek için %1 lik TAE içerisinde %1.2'lik agaroz jel hazırlandı. Örnekler, 100V 80A akım ile 50 dakika elektroforez yapıldı.

3.3. Konvansiyonel PZR ürünlerinin saflaştırılması

Bant görülen konvansiyonel PZR ürünleri “DNA Clean & Concentrator™-25 (ZYMO)” kiti kullanılarak aşağıdaki protokole göre kolon yöntemi ile saflaştırıldı.

“DNA Clean & Concentrator™-25 (ZYMO)” kiti ile saflaştırma protokolü

1. Öncelikle her bir PZR ürünü için 1,5 ml 'lik mikrosantrifuj tüpüne bir'e beş oranında binding buffer eklenip iyice karıştırıldı.(ürün / binding buffer=1/5)
2. Karışım kolon içerisindeki Zymo-Spin™ filtrele aktarıldı.
3. 30 sn 10.000g' de santrifüjlenir. Altta kalan kısım atıldı.
4. 200 µl DNA Wash Buffer eklendi; 30 sn 10.000g' de santrifüjlendi. Altta kalan kısım atıldı. (x2)
5. Filtreler temiz 1,5 µl 'lik mikrosantrifuj tüplerine kondu ,üzerlerine 25-50 µl 'DNA Elution Buffer' eklendi. 30 sn 10.000g' de santrifüjlendi.

3.4. Dizi Analizi-Döngü (cycle-sekans) PZR

Saflaştırma sonrasında elde edilen PZR ürünleri 'BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit' kullanılarak dizi analizi öncesi PZR uygulandı.

Dizi analizi öncesi PZR karışımının hazırlanması:

Tablo VIII: Her bir amplifikasyon tüpü (10µl) için dizi analizi öncesi PZR karışımı

Bileşen	Hacim
BigDye Ready Reaction Mix	1 µl
F veya R Primer (3.2pmol/µl) F: (GGGACCAACTACTTTGGGTGTCCGTGT) R: (GCATCIGGYARYTTCCACCACCANCC)	0.5 µl
Distile su	3.5 µl
1x dilution buffer	2 µl
Dye saving	2 µl
Saflaştırılmış PZR ürünü	1 µl

Tablo IX: Dizi analizi öncesi PZR reaksiyonu protokolü

Döngü	Sıcaklık	Süre
1	96°C	10 saniye
25	50°C	5 saniye
	60°C	4 saniye
1	4°C	10 dakika

3.5. Dizi analizi için PZR Sonrası Saflaştırma İşlemi

Elde edilen dizi analizi-döngü PZR ürünleri ‘ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™’ kit ile saflaştırıldı.

“ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ “kit protokolü:

- 1) 10 µl PZR ürünü üzerine 200 µl DNA binding buffer eklendi.
- 2) Hazırlanan karışım Zymo-spin kolona aktarılır ve 10000g ‘de 60 saniye santrifüjlendi.
- 3) Akan sıvı tüplerden uzaklaştırılarak kolona 200 µl Wash Buffer ilave edilir ve 10000g’de 60 saniye santrifüjlendi.

4) Zymo-spin kolon yeni temiz bir tüpe aktarılarak üzerine 20 µl distile su ilave edilir ve 10000g 'de 60saniye santrifüjlendi.

Saflaştırılmış dizi analizi-döngü PZR ürünleri ABI Prism 3100/3100 cihazına yüklenerek çift yönlü olarak dizi analizi gerçekleştirildi. Cihaz kapiller elektroforez tekniği ile Sanger dizi analizi yöntemine göre dizi analizini gerçekleştirmektedir.

3.6. İstatistik Analiz

Çalışmada veriler SPSS 17 (Inc, Chicago, IL, USA) paket programı ile değerlendirildi. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren nicel değişkenler için tanımlayıcı istatistikler $\pm$ standart sapma şeklinde belirtildi. Normal dağılım göstermeyen nicel değişkenler için ise medyan (25-75) persantil olarak belirtildi. Nicel değişiklikler bakımından gruplar arası farklılığı araştırırken; normal dağılım gösterenler için bağımsız iki örneklem T testi, normal dağılım göstermeyenler için Mann-Whitney U testi uygulandı. Nitel değişkenler bakımından gruplar arası farklılığın incelenmesinde ki-kare testi uygulandı ve tanımlayıcı istatistikler frekans olarak verildi. Tip 1 hata düzeyi $\alpha=0,05$ olarak alındı

3.7. Filogenetik Analiz

Filogenetik analizler Geneious 9.1.3 programı kullanılarak yapıldı. Analizlerde rhinovirusun VP4/VP2 kapsit kodlayan bölgesinin yaklaşık 400 bp uzunluğundaki kısmı kullanıldı. Türler VP4/VP2 proteini kodlayan referans dizilerin neighbour-joining metodu kullanılarak değerlendirilmesi ile filogenetik ağaç oluşturuldu. Referans sekanslar (RV-A12: EF173415, RV-A22: FJ445122, RV-A78: FJ445183, RV-B48: DQ473488, RV-B86: FJ445164, RV-C23: EU752424, RV-C pat10: EU590054) NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) web sitesinden indirildi. Test parametreleri minimum identifikasyon %70, Bootstrap değeri 1000 tekrar olarak ayarlandı. Referanslar ile aynı kümede (cluster) toplanan izolatların türleri belirlendi.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya, daha önce iki ticari multipleks gerçek zamanlı PZR testi ile RV pozitifliği belirlenmiş olan 50 çocuk ve 46 erişkin olmak üzere 96 hasta dahil edildi. Çocuk hastaların yaş median değeri 24 ay (6,19-72) ve erişkin hastaların yaş ortalamaları $57,63 \pm 15,68$ olarak belirlendi. Erkek/kadın hasta oranı birbirine eşit olarak (%50) bulundu.

Kantitatif gerçek zamanlı PZR sonuçları

Daha önce rhinovirus pozitifliği belirlenmiş olan 127 hastaya ait örneklerden viral yükleri belirlenemeyen 31 örnek çalışmadan çıkarıldı. Pozitiflik saptanan toplam 96 (46 erişkin ve 50 çocuk) örnekte viral yükler aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$VY(\text{kopya/ml}) = \text{ÖD} \times \text{EHF} \times \text{ÖF}$$

VY=Viral yük, ÖD=Ölçülen değer (reaksiyon başına kopya sayısı), EHF=Ekstraksiyon hacim faktörü (Son ekstraksiyon hacmi/örnek hacmi), ÖF=Örnek faktörü (1000 μ l/ örneğin ekstrakte edilen hacmi)

Tablo X’da örneklerdeki viral yükler gösterilmiştir.

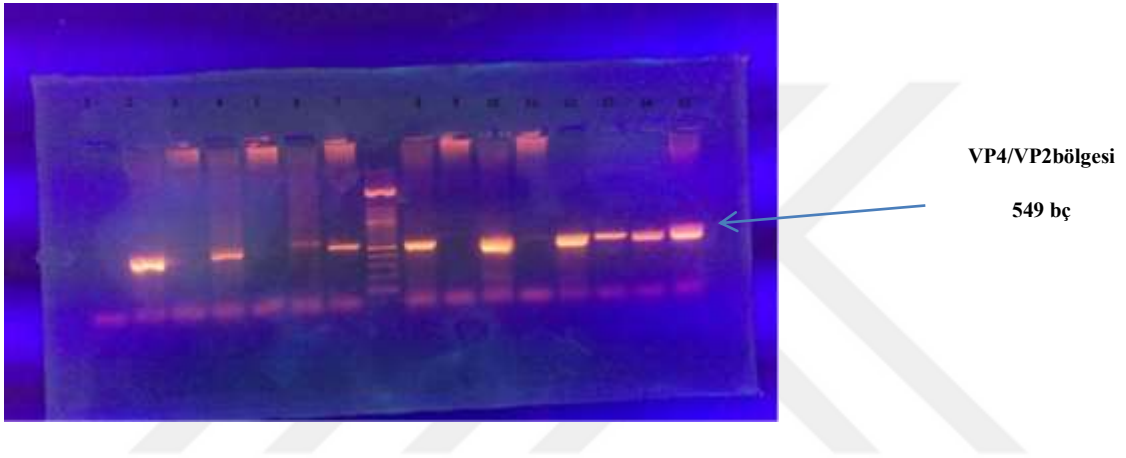
Tablo X: Kantitatif gerçek zamanlı PZR ile RV pozitif örneklerdeki viral yükler

YETİŞKİN HASTA	VİRAL YÜK (Kopya/mL)	ÇOCUK HASTA	VİRAL YÜK (Kopya/mL)
		1	1,20E+05
		2	1,18E+05
		3	1,63E+04
		4	6,72E+03
1	1,20E+06	5	5,28E+04
2	6,12E+06	6	1,10E+05
3	7,48E+02	7	1,13E+06
4	4,34E+05	8	1,92E+04
5	1,55E+05	9	2,69E+03
6	1,38E+04	10	8,57E+04
7	1,18E+05	11	1,40E+05
8	5,18E+03	12	8,57E+04
9	6,88E+03	13	2,41E+06
10	8,03E+05	14	1,85E+06
11	3,81E+03	15	4,24E+03
12	3,06E+05	16	4,09E+03
13	5,34E+05	17	1,47E+04
14	3,79E+05	18	1,99E+04
15	2,90E+06	19	2,77E+05
16	1,59E+05	20	5,79E+03
17	1,53E+04	21	1,04E+05
18	4,73E+04	22	8,95E+05
19	1,16E+04	23	1,17E+04
20	7,86E+06	24	1,77E+04
21	4,29E+04	25	1,98E+05
22	5,51E+05	26	1,80E+06
23	7,97E+05	27	2,89E+04
24	1,38E+04	28	1,14E+04
25	2,23E+06	29	1,57E+04
26	2,50E+04	30	1,41E+04
27	3,69E+06	31	1,92E+05
28	4,10E+04	32	1,63E+03
29	1,69E+04	33	4,58E+03
30	8,24E+03	34	5,62E+04
31	8,63E+04	35	5,46E+05
32	6,33E+04	36	1,43E+04
33	1,88E+04	37	1,95E+03
34	6,33E+04	38	1,76E+04
35	5,46E+04	39	2,73E+03
36	8,79E+03	40	9,77E+03
37	5,14E+03	41	4,21E+03
38	7,04E+03	42	2,93E+03
39	3,24E+03	43	9,17E+03
40	3,25E+03	44	3,52E+05
41	6,83E+03	45	7,32E+03
42	5,46E+03	46	8,63E+04
43	2,34E+03	47	6,72E+04
44	5,46E+03	48	5,46E+05
45	9,23E+03	49	5,73E+04
46	4,18E+04	50	5,51E+05

Konvansiyonel PZR Sonuçları

Viral yükleri belirlenen örneklerin çoğaltılan gen bölgesine (VP4/VP2) ait elektroforez sonrası 32'si erişkin ve 33'ü çocuk olmak üzere toplam 65 örnekte beklenen boyutlarda (~549 baz çifti) bantlar görüldü (Şekil 4). PZR sonucu bant görülen örnekler dizi analizi işlemine alındı.

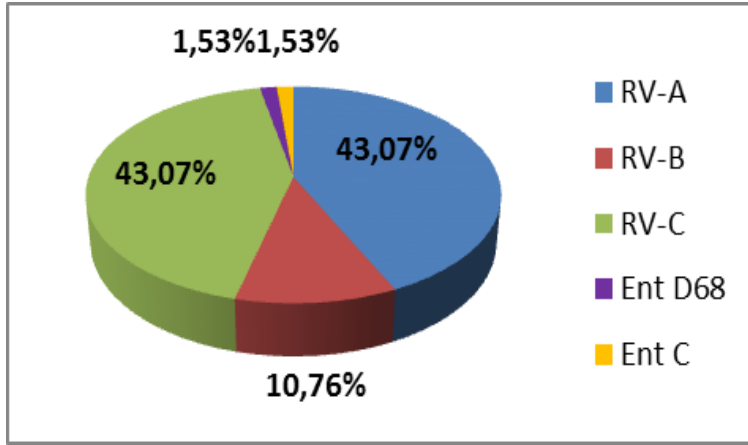
Şekil 4: Konvansiyonel PZR sonrası bant görünümleri



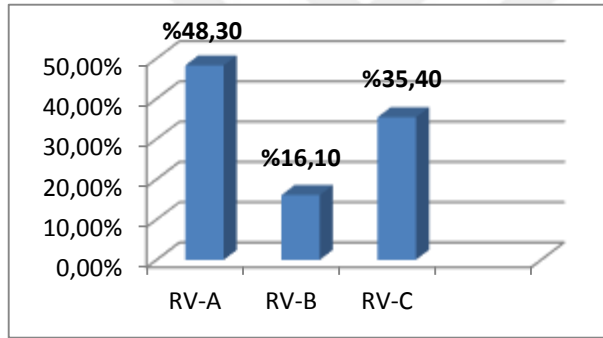
Dizi Analizi Sonuçları:

Dizi analizi uygulanan 65 örnekten elde edilen diziler, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nucleotide-BLAST programı kullanılarak referans kökenlerle karşılaştırıldı. Tüm hasta örneklerinde 28 (%43,07) RV-A, 7 (%10,76) RV-B ve 28 (% 43,07) RV-C ; birer örnekte ise EV-D68 (%1,53) ve EV-C (%1,53) belirlendi (Tablo XI). Erişkin hasta örneklerinde tür dağılımı 15 (%48,3) RV-A, 5 (%16,1) RV-B, 11 (%35,4) RV-C ve çocuk hasta örneklerinde 13 (%40,6) RV-A, 2 (%6,3) RV-B ve 17 (%53,1) RV-C olarak belirlendi (Tablo XII, XIII).

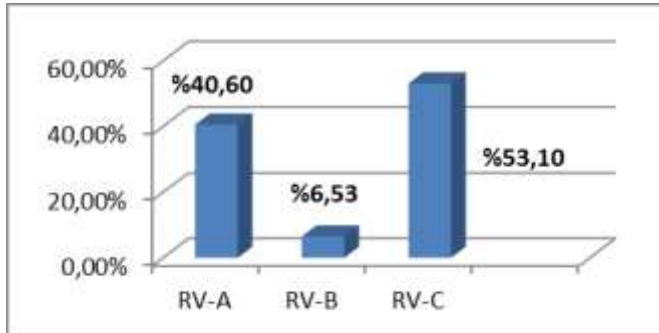
Tablo XI: Tüm Hastalarda dizi analizi sonuçları



Tablo XII: Erişkin hastalardaki RV tür oranları



Tablo XIII: Çocuk hastalardaki RV tür oranları



VP4/VP2 bölgesi dizi analizi yapılan 65 örnekte belirlediğimiz türler, hastaların yaş ve tanıları çocuk ve erişkin yaş grubunda olmak üzere tablo XIV ve XV’ da gösterilmiştir.

Tablo XIV: Çocuk hastalarda tür dağılımı ve klinik tanıları

Dizi Analizi No	Rhinovirus Türü	Yaş	Klinik Tanı
48	RV-C	1	Hışıltı
49	RV-B	1	pnömoni
50	RV-C	1	Akut bronşiolit
53	RV-A	1	Astım
54	RV-A	2 ay 15 gün	pnömoni
55	RV-A	2	Hışıltı
56	RV-A	6	Akut ÜS YE
57	Ent-C	3 ay 25 gün	Hışıltı
58	RV-A	10	Akut ÜS YE
59	RV-A	6 ay 16 gün	Akut bronşiolit
60	RV-C	3 ay 10 gün	Hışıltı
61	RV-A	2 ay 24 gün	Hışıltı
63	RV-C	9 ay 18 gün	pnömoni
64	RV-A	2	Akut bronşiolit
65	RV-C	4	pnömoni
66	RV-C	5 ay 5 gün	Akut bronşiolit
67	RV-C	1 ay 22 gün	Hışıltı
68	RV-A	6	Astım
69	RV-C	7	Astım
71	RV-A	7	Astım
72	RV-C	3	Akut ÜS YE
75	RV-B	1 ay 28 gün	Akut bronşiolit
76	RV-C	11	Akut ÜS YE
77	RV-C	22 gün	Akut bronşiolit
78	RV-C	3	Astım
79	RV-C	6	Astım
80	RV-A	1	Akut bronşiolit
82	RV-C	2	Akut ÜS YE
83	RV-C	1 ay 21 gün	Akut bronşiolit
84	RV-A	1	Astım
86	RV-A	10 ay 13 gün	Astım
90	RV-C	4 ay 7 gün	Akut bronşiolit
91	RV-C	9 ay 24 gün	Akut bronşiolit

Tablo XV: Erişkin hastalarda tür dağılımı ve klinik tanıları

Dizi Analizi No	Rhinovirus Türü	Yaş	Klinik Tanı
2	RV-A	65	Pnömoni
4	RV-C	68	KOAH
5	RV-C	82	KOAH
7	RV-A	61	Akut ÜSİYE
8	RV-B	73	Pnömoni
10	RV-A	71	Pnömoni
11	RV-A	56	Akut ÜSİYE
12	RV-C	52	Akut ÜSİYE
13	RV-B	69	Pnömoni
14	RV-B	36	Akut ÜSİYE
15	Ent-D68	28	Akut ÜSİYE
16	RV-B	77	Pnömoni
18	RV-A	43	Akut ÜSİYE
19	RV-C	86	Akut ÜSİYE
20	RV-A	58	Pnömoni
21	RV-C	70	Pnömoni
22	RV-C	62	KOAH
23	RV-C	52	Akut ÜSİYE
24	RV-C	38	Akut ÜSİYE
25	RV-A	44	Pnömoni
26	RV-C	74	KOAH
27	RV-A	67	KOAH
31	RV-C	51	Pnömoni
32	RV-A	38	Akut ÜSİYE
33	RV-A	82	Pnömoni
34	RV-C	52	Akut ÜSİYE
35	RV-A	50	Pnömoni
41	RV-A	47	Pnömoni
94	RV-B	18	Akut ÜSİYE
98	RV-A	55	Astım
99	RV-A	64	KOAH
100	RV-A	47	Akut ÜSİYE

Hastalarda belirlenen RV türleri ile klinik tanı, viral yük, yaş ve cinsiyet arasındaki ilişkinin ortaya konması için yapılan istatistik analizi sonucunda; hem çocuk hem erişkin hastalarda belirlenen türler ve hastaların klinik tanıları, yaş ve cinsiyet verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p > 0,05$)(Tablo XVI).

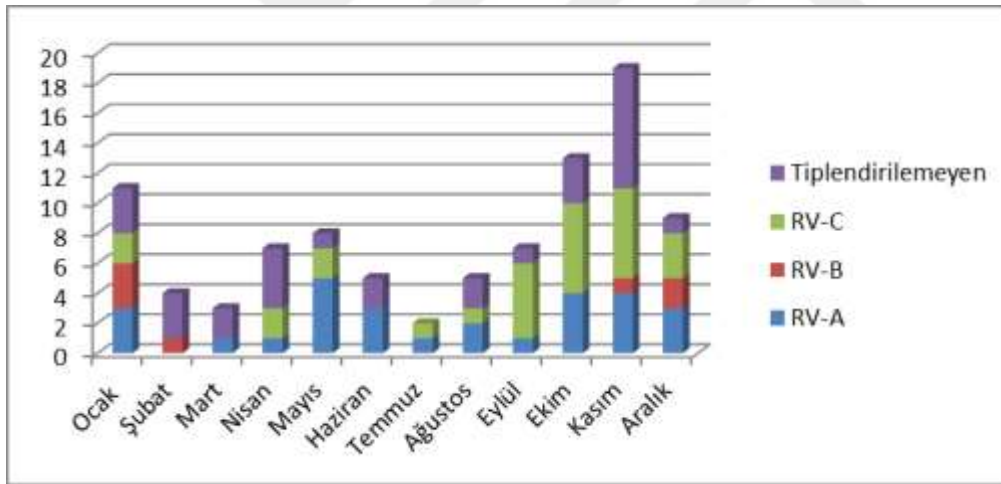
Tablo XVI: Çocuk ve erişkin hastaların ki-kare testi sonuçları

	Çocuk (p değeri)	Erişkin (p değeri)
RV türü-klinik tanı	0,796	0,444
RV türü-cinsiyet	1,000	1,000
RV türü-yaş	0,457	0,273
RV türü-viral yük	0,493	0,762

Mevsimsel Dağılım

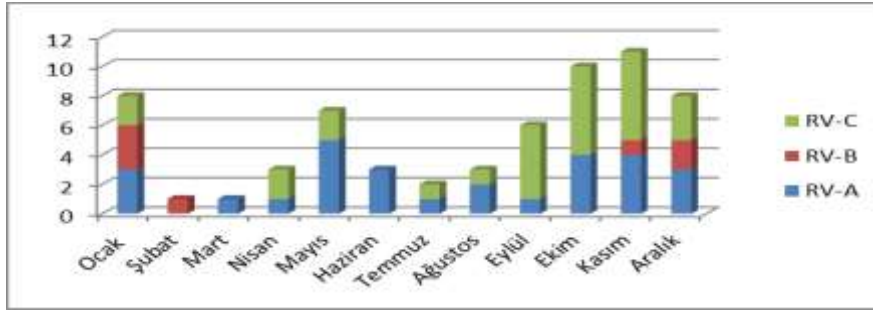
Çalışmamızda, tür ayrımı yapılmaksızın RV dağılımına bakıldığında virüsün en sık Eylül-Ocak ayları arasında ve en yüksek oranda Kasım ayında görüldüğü belirlenmiştir (Tablo XVII). Tür ayrımı yapıldıktan sonra RV türlerinin mevsimsel dağılımında ise yine her üç türün yıl boyunca saptandığı, en sık Eylül-Ocak ayları arasında görüldüğü ancak en fazla Kasım ayında görüldüğü belirlenmiştir (Tablo XVIII)

Tablo XVII: Tüm hastalarda rhinovirusların mevsimsel dağılımı



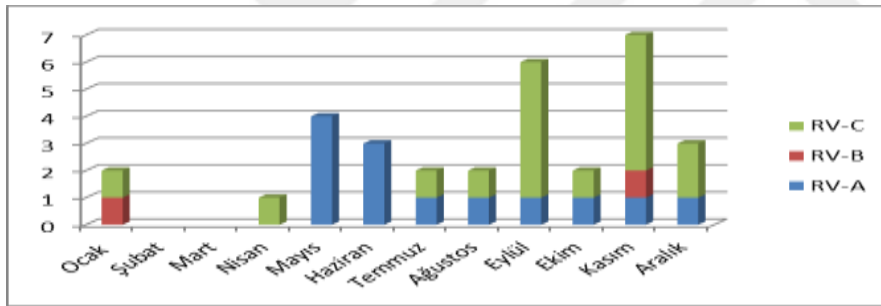
Türlerin mevsimsel dağılımı incelendiğinde, RV-A türünün Mayıs ve Ekim-Kasım aylarında, RV-B türünün Kasım- Şubat arasında ve RV-C'nin Eylül-Kasım arasında pik yaptığı gözlenmiştir.

Tablo XVIII: Tüm hastalarda belirlenen RV türlerinin mevsimsel dağılımı



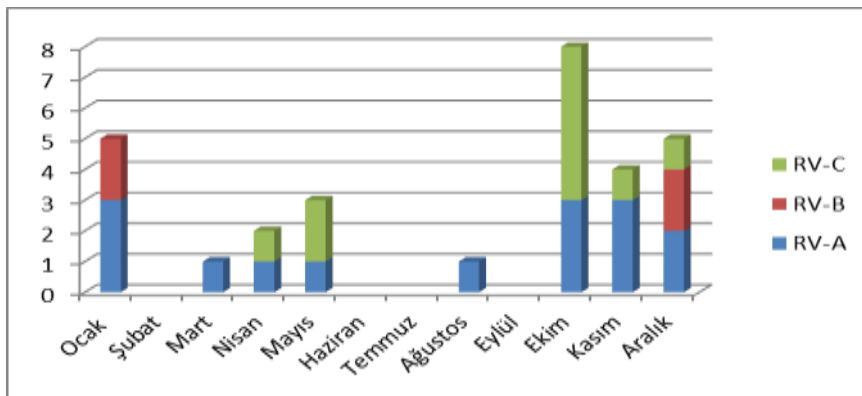
Çocuk hastalarda tüm RV türlerinin en fazla Kasım ve Eylül aylarında saptandığı belirlenmiştir. RV türlerin dağılımında; RV-A'nın Mayıs-Aralık ayları arasında, en sık olarak yaz aylarında (Mayıs-Haziran), RV-C'nin sonbahar ve kış aylarında özellikle Eylül ve Kasım aylarında daha yüksek oranda ve RV-B'nin ise sadece Ocak ve Ekim aylarında belirlendiği görülmüştür (Tablo XIX).

Tablo XIX: Çocuk hastalarda belirlenen RV türlerinin mevsimsel dağılımı

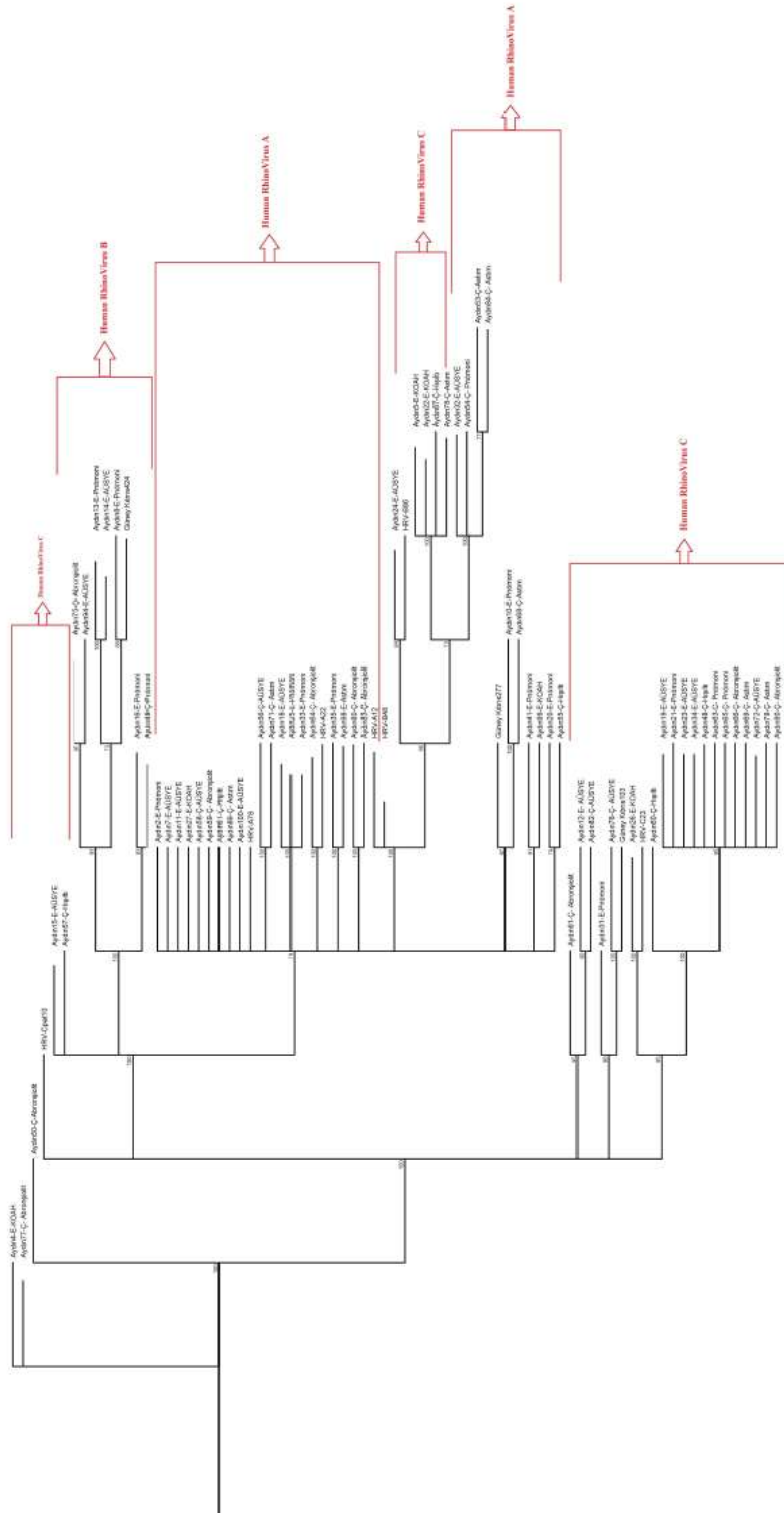


Erişkin hastalarda tüm RV'lerin sonbahar, kış ve ilkbahar aylarında, RV-A'nın en fazla sonbahar ve kış aylarında RV-C'nin ise en yüksek oranda Ekim ayında belirlendiği görülmüştür (Tablo XX).

Tablo XX: Erişkin hastalarda belirlenen RV türlerinin mevsimsel dağılımı



Filogenetik Analiz Sonuçları



Şekil 5: Rhinovirus VP4/VP2 bölgesini nükleik asit dizilerini temel alan filogenetik ağaç görünümü (400 bç, Neighbour-joining yöntemi, minimum identifikasyon=%70, Bootstrap değeri=1000 tekrar)

(Referans kökenler GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dan alınmıştır.RV-A12: EF173415, RV-A22: FJ445122, RV-A78: FJ445183, RV-B48: DQ473488, RV-B86: FJ445164, RV-C23: EU752424, RV-C pat10: EU590054. Güney Kıbrıs 103,277 ve 424 kökenleri Archbishop Makarios Hastanesi'nde izole edilmiş ve Güney Kıbrıs'tan sağlanmıştır.)

Filogenetik analiz sonucunda, dizi analizi ile belirlenen 28 kökenin RV-A, yedi kökenin RV-B ve 28 kökenin RV-C türü içerisinde yer aldığı gösterilmiştir. RV-C türleri arasında, Aydın 19, 21, 23, 34, 48, 63, 65, 66, 69, 72, 79 ve 90 kökenlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür. Aydın 26 kökeninin referans olarak alınan RV-C23 ile yakın olduğu görülmüştür. Aydın 76 kökeninin Güney Kıbrıs'dan alınan 103 nolu referans kökeni ile yakın olduğu görülmüştür. RV-B türleri arasında ise, Güney Kıbrıs 424 referans kökeni ile Aydın 8, 13, 14 kökenleri arasında diğerlerine göre daha fazla yakınlık bulunmaktadır. RV-A türü kökenler arasında, Aydın 2, 7, 11, 27, 58, 59, 61, 86, 100 kökenleri RV-A78 referans kökeni ile yakın bulunmuştur. Benzer şekilde Aydın 56, 71, 18, 25, 33, 64, 35, 98, 80 ve 83 nolu izolatlar RV-A22 ile yakın bulunmuştur. Gerçek zamanlı PZR ile RV olarak belirlenen iki örnek, filogenetik analiz sonucunda EV-D68 ve EV-C olarak tanımlanmıştır.

5. TARTIŞMA

Rhinovirus, çocuk ve erişkinlerde akut solunum yolu enfeksiyonlarında en sık saptanan viral etkindir. Birincil olarak soğuk algınlığı etkeni olmasına karşın, son yıllarda immün yetmezlikli hastalarda alt solunum yolu enfeksiyonları ile ilişkilendirilmekte; KOAH, astım, otitis media ve sinüzitte etken oldukları bildirilmektedir (1). Rhinoviruslar moleküler yöntemler ile RV-A, RV-B ve RV-C olmak üzere üç tür olarak tanımlanmışlardır. Bu türlerden RV-A ve RV-C türleri ile bronşiolit, astım ve pnömoni gibi ciddi akut solunum yolu enfeksiyonları arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (103). Özellikle RV-C türünün çocuk hastalarda daha şiddetli enfeksiyonlara neden olduğu belirlenmiştir (139).

Rhinovirus laboratuvar tanısında hücre kültürü, serolojik testler ve moleküler testler kullanılmaktadır. Virüsün 150'den fazla serotipinin olması ve tüm bu serotipleri kapsayacak bir antijenin olmaması nedeni ile RV tanısında serolojik testler rutin tanı yöntemi olarak kullanılmamaktadır (140). Hücre kültürü yöntemi, sitopatik etkilerin gözlenmesi için yedi ile 14 gün gerektirmesi nedeniyle zaman alıcı bir yöntemdir (119). Enteroviruslar da RV'ler ile aynı hücre dizilerinde üreyebilmektedir. RV ile EV ayrımının yapılabilmesi için farklı inkübasyon sıcaklıkları (RV için 33°C ve EV için 37°C) uygulanması ve aside duyarlılık testi yapılması gerekmektedir. Ayrıca bilinen hücre kültürlerinde tüm genotipler üretilmemekte, RV-C türünün çoğaltılabilmesi için sadece sinüs organ kültürleri gerekmektedir (140). RV belirlenmesinde, moleküler yöntemlerin hücre kültürü yöntemine göre duyarlılığı daha yüksektir. Moleküler yöntemler ile hücre kültürü yönteminin karşılaştırıldığı çalışmalarda PZR yöntemlerinin duyarlılığı %72-98 arasında belirlenirken; hücre kültürü yönteminin duyarlılığı %39-66 arasında değişmektedir (129, 141).

Çalışmamızda VP4/VP2 bölgesi dizi analizi uygulanarak RV türleri tanımlanmıştır. Dizi analizi sonucunda örneklerde eşit sayıda (n=28) RV-A ve RV-C ve daha az sayıda (n=7) RV-B bulunmuştur. İki örnekte ise EV-D68 ve EV-C saptanmıştır. Viral tanıda hücre kültürünün altın standard bir yöntem olmasına karşın uzun zaman alması ve viral yüklerin bu yöntem ile belirlenememesi nedeniyle daha önceden rhinovirüs pozitifliği belirlenmiş örneklerde önce kantitatif gerçek zamanlı PZR ile örneklerdeki viral yükler belirlenmiş daha sonra dizi analizi uygulanmıştır. İyi korunmuş bir bölge olması nedeni ile 5'-UTR bölgesi moleküler yöntemlerde uygun bir hedef bölgesidir. Ancak bu bölgede EV ve RV ayrımı

yapılamamaktadır (141). VP4/VP2 bölgesinin de iyi korunmuş bölge olması ve üç RV türün birlikte ayrımının yapılabilmesi nedeni ile RV tiplendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (142).

Erişkin ve çocuk hastalarda VP4/VP2 bölgesinin dizi analizinin yapıldığı araştırmalarda çalışmamızdan farklı olarak RV-A türü daha yüksek oranda bulunmuştur. Fransa’da yapılan bir çalışmada 58 erişkin ve çocuk hastanın RV pozitif örneğinde dizi analizi sonucunda 33(%52) RV-A, 6(%6) RV-B ve 24(%40) RV-C belirlenmiştir (143). Tayland’da yapılan bir çalışmada 225 RV pozitif erişkin ve çocuk örneğinde VP1 ve VP4/VP2 bölgesi dizi analizi sonucunda 91 RV-A, 31 RV-B, 82 RV-C saptanmıştır (90). Latin Amerika ülkelerinde 632 RV pozitifliği saptanan erişkin ve çocuk hasta örneklerinde dizi analizi sonucunda sırasıyla %58(278) RV-A, %38(192) RV-C ve %4(20) RV-B belirlenmiştir (144). Çalışmamızda hem erişkin hem de çocuk hasta grubunda klinik tanı ve RV türleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$). Çalışmamıza benzer şekilde, Fransa (143), Tayland (90) ve Latin Amerika’da (144) yapılan çalışmalarda da klinik tanı ve türler arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Rhinovirus türleri ile klinik tanı arasında ilişki bulunamayan çalışmaların yanısıra ilişki bulunduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (145-147). Amerika’da 84 RV pozitif erişkin ve çocuk hasta örneği ile yapılan bir çalışmada 54RV-A, 11RV-B, 19 RV-C belirlenmiştir. Erişkin hasta grubunda RV-A türü daha şiddetli solunum yolu enfeksiyonu ile ilişkili bulunmuş, çocuk hastalarda herhangi bir tür ile klinik tanı arasında ilişki gösterilememiştir (145). Çin’de yapılan bir çalışmada 220 RV pozitif erişkin ve çocuk örneğinin dizi analizi sonucunda 111 RV-A, 18 RV-B, 91 RV-C belirlenmiştir Erişkin hasta grubunda RV-C ciddi enfeksiyon ile ilişkili bulunmuş, yine çocuk hastalarda herhangi bir tür ile klinik tanı arasında ilişki gösterilememiştir (146). Brezilya’da 138 RV pozitif erişkin ve çocuk hasta örneğinde dizi analizi sonucunda 74 RV A, 21 RV B, 27 RV C saptanmıştır Hem erişkin hem çocuk yaş grubunda RV-A türünün daha şiddetli üst solunum yolu enfeksiyonu ile ilişkili bulunmuştur (147).

Çalışmamızda çocuk hastalarda RV-C türü daha yüksek oranda (%53.1) saptanmıştır. Dünyanın çeşitli ülkelerinde çalışmamıza benzer şekilde VP4/VP2 bölgesi dizi analizi ile sadece çocuk hastaların dahil edildiği çalışmaların bir kısmında RV-C türü yüksek olarak bulunmuştur. Kenya’da bir çalışmada 441 RV pozitifliği saptanan çocuk hasta örneklerinin

332'sinde dizi analizi sonucunda 155(%47) RV-A, 18(%5) RV-B ve 159(%48) RV-C türü saptanmıştır (148). İtalya'da yapılan bir çalışmada 517 RV pozitifliği saptanan çocuk hasta örneklerinin 326'sında dizi analizi sonucunda 72RV-A, 29RV-B ve 122RV-C belirlenmiştir (149).

Çocuk hastalar ile yapılan bazı çalışmalarda ise RV-A türü yüksek olarak belirlenmiştir (142, 150). Paraguay'da bir çalışmada 34 RV pozitifliği saptanan örneğin 18'inde dizi analizi sonucunda 13 RV-A, bir RV-B ve dört RV-C belirlenmiştir (150). Ülkemize en yakın coğrafya olarak Güney Kıbrıs'ta 68 çocuk ile yapılan çalışmada 5'UTR ve VP4/VP2 bölgesi dizi analizi sonucunda 36 RVA, 5 RV-B, 27 RV-C saptanmıştır (142). Bu çalışmalarda bizim çalışmamızda ($p>0.05$). olduğu gibi çocuk yaş grubunda RV türleri ve klinik tanıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. ($p>0.05$).

Çocuk hastalar ile yapılan bazı çalışmalarda ise türler ile klinik tanı arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Avustralya'da klinik olarak astım tanısı olan 128 çocuk ile yapılan bir çalışmada 5'UTR bölgesi dizi analizi sonucunda RV-C türünün çocuk hastalarda astım ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (139). Amerika'da çocuk hastalardan alınan 181 örnek ile yapılan bir çalışmada RV-A ve RV-C nin çocuklarda daha ağır solunum yolu enfeksiyonuna neden olduğu bildirilmiştir (151).

Erişkin yaş grubunda ise RV-A türü çalışmamızda daha yüksek oranda bulunmuştur. Çocuk yaş grubunda olduğu gibi bu grupta da RV türleri ile klinik tanıları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$). Çin'de 294 erişkin yoğun bakım hastasında, Amerika'da hematolojik maligniteli 110 erişkin hastada, Güney Kore'de 165 pnömoni tanılı hastalar arasında nötropenik olanlarda çalışmamıza benzer şekilde RV-A türü en yaygın tür olarak belirlenmiş, türler ve klinik tanıları arasında ise anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (146, 152, 153).

Çalışmamızda hem erişkin hem de çocuk yaş grubunda RV türleri ile hasta yaşları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamasına karşın ($p>0.05$) birkaç çalışmada RV-A'nın bebeklik döneminde RV-C'nin ise büyük çocuklarda daha yaygın olarak saptandığı bildirilmiştir (18, 90, 154). Hasta yaşlarında olduğu gibi çalışma grubunda cinsiyet ve RV türleri arasında daha önceki çalışmalara benzer şekilde anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (142, 143).

Rhinovirus, kışın en sık görülen İnfluenza ve RSV'nin aksine genelde ilkbahar ve sonbaharda akut solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur (18). Ilıman bölgelerde ise yıl boyunca görülür. Çalışmamızda, tür ayrımı yapılmaksızın tüm RV enfeksiyonları ele alındığında, en yüksek enfeksiyon oranının Eylül-Ocak arasında görüldüğü belirlenmiştir (Tablo XVII). RV türü belirlenebilen örneklerin mevsimsel dağılımına bakıldığında, her üç türün tüm yıl boyunca ve yine en sık Eylül-Ocak ayları arasında görüldüğü; ancak en fazla Kasım ayında etkin olduğu görülmüştür (Tablo XVIII). Tür tanımlaması yapılamayan RV'lerin mevsimsel dağılımı değiştirmedığı belirlenmiştir.

Rhinovirüs türlerinin hepsi ılıman, tropikal ve subtropikal bölgelerde yıl boyunca görülebilmektedir. Ancak, RV-C türü çoğu ılıman ve subtropikal bölgelerde sonbahar ya da kışın olmak üzere mevsimsel dağılım göstermeye eğilimliken, tropik bölgelerde en fazla yağmur sezonunda görülür (89). Çalışmamızda da RV-C'nin sonbahar ve kış aylarında en fazla, RV-A'nın tüm yıl boyunca ve RV-B'nin ise daha çok kış aylarında görüldüğü belirlendi (Tablo XVIII). Güney Kıbrısta yapılan bir çalışmada araştırmacılar, RV-C insidansının diğer aylarda daha az olmak üzere, sonbahar ve kış aylarında arttığını, RV-A türlerinin sonbahar ve ilkbaharda daha fazla, kışın daha düşük oranlarda görüldüğünü belirtmişlerdir (142). Çinde çocuk yaş grubunda yapılan bir çalışmada, üç RV türü ilkbahar ve kış aylarında en sık oranda belirlenmiş, RV-A türü Haziran ve Temmuz ayları hariç tüm yıl boyunca, RV-B türü yazın, sonbahar ve kışın, RV-C türünü ise en sık Aralık ve Nisan aylarında gözlenmiştir (155). İtalya'da 2007-2012 yılları arasında çocuk yaş grubunda yapılan diğer bir çalışmada, RV-A ve RV-B türleri herhangi bir mevsimsel dağılım göstermeksizin tüm yıl boyunca gözlenmiş, RV-A en sık Şubat-Mart aylarında görülmesine karşın RV-C en sık Aralık ayında belirlenmiştir (156).

Çalışmamızda dizi analizi yapılan örneklerin viral yükleri ile klinik tanıları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$). Örnek alma tekniği, hastanın immün durumu, yaşı, kullanılan PZR yönteminin etkinliği gibi faktörler viral yük tespitini etkileyebilmektedir. (157). Çalışmaya başlarken hedef hasta grubunun çok geniş tutulması nedeniyle çalışmamıza dahil edilen hastaların yaşları, immün durumları, klinik tanıları ve enfeksiyon süresi gibi bir takım verilerin homojen olmaması nedeni ile RV türleri ile örneklerdeki viral yükler arasında anlamlı bir ilişki bulunamadığını düşünüyoruz. Literatürde viral yük tespiti için yapılan diğer çalışmalarda, genellikle özel hasta grupları (yoğun bakım hastaları, pnömonili hastalar,

immünyetmezlikli, astımlı hastalar v.b) incelenmiş ve RV tür ayrımı yapılmaksızın, RV viral yükü ile enfeksiyon şiddeti arasındaki ilişki araştırılmıştır (157, 158).

Rhinovirusun VP4/VP2 gen bölgesinin filogenetik analizi ile genotiplendirilmesi altın standart bir yöntem olup bu yöntemin geliştirilmesi gelecekte yeni RV tür ve genotiplerinin tanımlanmasına olanak sağlayacaktır. Çalışmamızda VP4/VP2 gen bölgesi filogenetik analizi sonucunda iki yıllık süreçte, ilimizde her üç türün hastalar arasında etken olduğu ve bu üç tür içerisinde de farklı genetik özellikte bir çok genotip bulunduğunu belirlenmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde dünyanın başka bölgelerinde yapılan çalışmalarda da belirlenen türlere ait çok sayıda tipin görüldüğü saptanmıştır(88, 142, 148, 159).

Dizi analizi ile belirlenen 28 kökenin RV-A, yedi kökenin RV-B ve 28 kökenin RV-C türü içerisinde yer aldığı gösterilmiştir. RV-C türleri arasında, Aydın 19, 21,23, 34,48,63, 65, 66, 69, 72, 79 ve 90 kökenlerinin birbirine çok yakın olduğu görülmüştür. Aydın 26 kökeninin referans olarak alınan RV-C23 ile yakın olduğu görülmüştür. Aydın 76 kökeninin Güney Kıbrıs'dan alınan 103 nolu referans köken ile yakın olduğu görülmüştür. RV-B türleri arasında ise, Güney Kıbrıs 424 referans kökeni ile Aydın 8, 13, 14 kökenleri arasında diğerlerine göre daha fazla yakınlık bulunmaktadır. RV-A türü kökenler arasında, Aydın 2, 7, 11, 27, 58, 59, 61, 86, 100 kökenleri RV-A78 referans kökeni ile yakın bulunmuştur. Benzer şekilde Aydın 56, 71, 18, 25, 33, 64, 35, 98, 80 ve 83 nolu izolatlar RV-A22 ile yakın bulunmuştur.

Gerçek zamanlı multipleks PZR ile RV olarak belirlenen iki örnek, filogenetik analiz sonucunda EV-D68 ve EV-C olarak tanımlanmıştır. Benzer şekilde başka bir çalışmada gerçek zamanlı multipleks PZR ile RV olarak belirlenen bir örnek filogenetik ile EV-D68 olarak gösterilmiştir (148).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Çocuk Hastalıkları, Göğüs hastalıkları ve Hematoloji-Kemik İliği poliklinik veya servislerine Ocak 2014- Ocak 2015 tarihleri arasında başvuran ve RV pozitifliği saptanmış olan 46 erişkin ve 50 çocuk hastanın RV türlerini ve saptanan türler ile klinik tanı arasındaki ilişkiyi araştırdığımız çalışmamızda;

1.Eşit sayıda(n=28) RV-A ve RV-C, daha az sayıda RV-B türü saptanmıştır. Erişkin yaş grubunda RV-A, çocuk yaş grubunda RV-C daha yüksek oranda belirlenmiştir.

2.Belirlenen RV türleri ile hastaların klinik tanı, yaş ve cinsiyet verileri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.($p>0.05$)

3.Bu çalışma ile ülkemizde ilk defa RV türlerinin epidemiyolojisi ortaya konmaya çalışılmıştır. Elde edilen veriler, RV enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilecektir.

4.Klinik tanı ve RV türleri arasındaki ilişkinin gösterilebilmesi için daha geniş hasta popülasyonları ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Giriş: Rhinovirus (RV) tüm dünyada akut solunum yolu enfeksiyonlarında en sık belirlenen patojendir (1). Virüsün her yıl tüm dünyada akut solunum yolu enfeksiyonlarının yaklaşık % 50'sinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Genellikle hafif üst solunum yolu enfeksiyonu ve soğuk algınlığına sebep olur. Ancak, astım, kistik fibrozis ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) hastalarında alevlenme, pnömoni, sinüzit, otit ve özellikle küçük çocuklarda wheezing (hışıltı) ile ilişkisi bilinmektedir. Rhinoviruslar moleküler yöntemler ile RV-A, RV-B ve RV-C olarak üç tür altında tanımlanmışlardır. Yapılan çalışmalarda ise RV-A ve RV-C'nin daha çok alt solunum yolu enfeksiyonu ve astım alevlenmeleri ile ilişkili olduğu, RV-B'nin ise bu türlere göre alt solunum yolu enfeksiyonlarında daha az oranda görüldüğü gösterilmiştir. Rhinovirus-C'nin özellikle çocuk hastalarda daha şiddetli enfeksiyonlara neden olduğu da belirlenmiştir. Bu çalışmanın amacı, solunum yolu enfeksiyonu olan hastalardan alınan nazofaringeal örnekler içinde RV pozitif olarak saptanmış olanların dizi analizi yöntemi kullanılarak RV türlerinin belirlenmesidir. Ayrıca belirlenen türler ile hastaların klinik tanı, viral yük, yaş ve cinsiyetleri arasında bir ilişki olup olmadığının gösterilmesidir.

Gereç-Yöntem: Çalışma grubu, Ocak 2014-Ocak 2016 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesine akut solunum yolu şikayetleri ile başvurmuş ve daha önce iki farklı ticari mültepleks gerçek zamanlı PZR kiti ile(FTD Respiratory pathogens 21 (Fast-track diagnostics Ltd., Malta) ve Anyplex™ II RV16 Detection V1.1 (Seegene Inc., Seoul, Korea)) RV pozitifliği belirlenmiş olan 46 erişkin ve 50 çocuk olmak üzere toplam 96 hastadan oluşmaktadır. RV Pozitif örneklerin viral yükleri kantitatif gerçek zamanlı PZR kiti (LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes, USA) ile belirlendi. Kantitatif gerçek zamanlı PZR sonrasında elde edilen ürünlerdeki bantları göstermek için, FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack kiti kullanılarak konvansiyonel PZR yöntemi uygulandı. Saflaştırılan PZR ürünlerine BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit kullanılarak dizi analizi-döngü PZR uygulandı. PZR ürünleri tekrar saflaştırılarak ABI Prism 3100/3100 cihazına yüklendi çift yönlü dizi analizi gerçekleştirildi. Elde edilen diziler National Center of Biotechnology Information 'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) Nucleotide BLAST programı kullanılarak karşılaştırıldı. Çalışmada elde edilen veriler SPSS

17.0 (Inc, Chicago, IL, USA) paket programı ile değerlendirildi. Analitik analizlerde ki-kare testi kullanıldı. Filogenetik analizler Geneious 9.1.3 programı kullanılarak yapıldı. Analizlerde rhinovirusun VP4/VP2 kapsit kodlayan bölgesinin yaklaşık 400 bp uzunluğundaki kısmı kullanıldı. Türler, filogenetik ağaç ve VP4/VP2 proteini kodlayan referans dizilerin neighbour-joining metodu ile değerlendirilmesi ile belirlendi. Referans sekanslar GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dan indirildi. Test parametreleri minimum identifikasyon %70, Bootstrap değeri 1000 tekrar olarak ayarlandı. Referanslar ile aynı kümede (cluster) toplanan izolatların türleri belirlendi.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen çocuk hastaların yaşları 22 gün-16 yaş arasında değişmekte olup yaş ortalaması 24 ay (6,19-72), erişkin yaş grubundaki hastalarda ise yaş aralığı 18-86 yaş olup, yaş ortalaması $57,63 \pm 15,68$ olarak belirlendi. İki ticari multipleks gerçek zamanlı PZR testi ile RV pozitifliği saptanan 127 örneğe uygulanan kantitatif gerçek zamanlı PZR sonucunda, viral yükleri belirlenemeyen 31 örnek çalışmadan çıkarıldı. Viral yükleri belirlenen 96 örneğe uygulanan konvansiyonel PZR sonucunda 32 erişkin, 33 çocuk olmak üzere toplam 65 örnekte beklenen boyutlarda bant görüldü. Dizi analizine alınan 65 örnekte 28 (%43,07) RV-A, 7 (%10,76) RV-B ve 28 (% 43,07) RV-C ; birer örnekte ise EV-D68 (%1,53) ve EV-C (%1,53) belirlendi. Erişkin hastalarda tür dağılımı 15 (%48,3) RV-A, 5 (%16,1) RV-B, 11 (%35,4) RV-C; Çocuk hastalardaki dağılım ise 13 (%40,6) RV-A, 2 (%6,3) RV-B ve 17 (%53,1) RV-C olarak bulundu. Hem çocuk hem erişkin hastalarda belirlenen RV türleri ve hastaların klinik tanıları, viral yükleri, yaş ve cinsiyet verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Sonuç: Çalışmamızda tüm hasta grubunda RV-A ve RV-C eşit oranda, RV-B daha az oranda saptanmıştır. Çocuk hastalarda RV-C, erişkinlerde ise RV-A en sık tür olarak belirlenmiştir. Hem erişkin hem de çocuk hasta gruplarında, belirlenen RV türleri ve hastaların klinik tanıları, viral yükleri, yaş ve cinsiyet verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bu çalışma ile ülkemizde ilk defa RV türlerinin epidemiyolojisi ortaya konmaya çalışılmıştır. Elde edilen veriler, RV enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilecektir. Klinik tanı ve RV türleri arasındaki ilişkinin gösterilebilmesi için daha geniş hasta popülasyonları ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Rhinovirus türü, dizi analizi, akut solunum yolu enfeksiyonu

ABSTRACT

Introduction: Rhinovirus (RV) is the most frequent cause of acute respiratory illness. RV is usually the causative agent of upper respiratory infections with mild symptoms and cold. However, it is related with asthma, cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), pneumonia, sinusitis otitis and wheezing especially in children. RV was identified in three species by molecular methods which are RV-A, RV-B and RV-C. In most of the cases, it was reported that RV-A and RV-C were related to lower respiratory tract infections and asthma inflammation, while RV-B was rarely reported in lower respiratory tract infections. It was also reported that RV-C causes severe infections in children. The aim of the present study was detection of RV species by sequence analysis among the patients with respiratory tract infections and RV positive in nasopharyngeal samples. Additionally, the relation between species and clinical picture, viral load, age and gender was also in the purpose of study.

Materials and Methods: The study group was consisted of the patients who admitted to Adnan Menderes University Hospital with acute respiratory claims, totally 96 patents of them 46 were adults and 50 were children. Nasopharyngeal smears from patients were subjected to the viral RNA isolation with two commercial kits (Ribospin™ vRD II VIRAL RNA PURIFICATION and SEEPREP12™ viral NA). cDNA synthesis was performed with cDNA Synthesis Premix (SeeGene) then multiplex PCR was set with two kits (FTD Respiratory pathogens 21 RT-PCR, Luxemburg and Anyplex™ II RV16 Detection v1.1, South Korea). Viral loads of samples were determined with a quantitative Gerçek zamanlı PCR (LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes, USA). Following the Gerçek zamanlı in order to represent the amplicons FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack was used as a conventional PCR method. After purification of PCR products BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit was used in sequence analysis PCR. Purified PCR products were also loaded to ABI Prism 3100/3100 and sequencing was performed in two directions. Data from study was evaluated with SPSS 17.0 (Inc, Chicago, IL, USA) pocket program for Windows. Chi-square test was used for analytical comparisons. Phylogenetic analysis was performed with Geneious 9.1.3 program. In the analysis a 400 bp region of VP4/VP2 rhinovirus capsid protein coding region was included. Rhinovirus species were determined by analysing the sequences with references for VP4/VP2 coding region by neighbour-joining method.

References were downloaded from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Test parameters were set as minimum identification 70%, Bootstrap value 1000 replication. Clustering of sequences with references was the approach that we used to determine species of isolates.

Results: The age of children were changing from 22 days to 16 years and the mean was 24 months (6,19-72) and the age of adults were changing from 18 to 86 and the mean was 57,63±15,68. After the quantitative PCR analysis, 31 isolates were excluded from the study among 127 samples which were positive with commercial multiplex PCR. Of the 96 samples in which expected amplicons were observed in 32 of adults and 33 of children, totally 65 isolates. After sequence analysis, 28 were (43,07%) RV-A, 7 were (10,76%) RV-B and 28 were (43,07%) RV-C; moreover one sample was EV-D68 (1,53%) and one sample was EV-C (1,53%). The distribution of species in adults was: 15 (48,3%) RV-A, 5 (16,1%) RV-B and 11 (35,4%) RV-C. The distribution of species in children was 13 (%40,6) RV-A, 2 (%6,3) RV-B and 17 (%53,1) RV-C. There was statistically significant relations with RV species and clinical Picture, viral loads, age and gender in both of the age groups ($p > 0,05$).

Discussion: We detected RV-A and RV-B species in same rates, RV-B in lower rate. In child patients RV-C, in adult patients RV-A was the most common species. No statistically significant relationship was found with RV species and clinical severity, viral loads, age and gender in both of the age groups. This was the first study from Turkey that reported the RV species. The findings will have a contribution to understanding of rhinovirus epidemiology and pathogenesis. There is a gap in the field of clinical picture and RV species and that indicates the need for further studies including larger patient populations.

Keywords: Rhinovirus species, sequence analysis, acute respiratory infection

KAYNAKLAR

1. Royston L, Tapparel C. Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC. *Viruses* 2016; 8-16.
2. Chen W J, Arnold, J, Epidemiologic, clinical, and virologic characteristics of human rhinovirus infection among otherwise healthy children and adults. *Journal of Clinical Virology* 64 (2015) 74–82
3. Stephen B, Greenberg, MD. Respiratory Consequences of Rhinovirus Infection. *Arch Intern Med.* 2003;163(3):278-284
4. Fendrick AM, Monto AS, Nightengale B, Sarnes M. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Arch. Intern. Med.* 2003; 163:487– 494
5. Fuchs R, Blaas D. Productive Entry Pathways of Human Rhinoviruses. *Advances in Virology* 2012; 10.1155/2012/826301
6. Lee W M, Kiesner C, Pappas T. A Diverse Group of Previously Unrecognized Human Rhinoviruses Are Common Causes of Respiratory Illnesses in Infants. 2007 *PLoS ONE* 2(10): e966
7. Bozkaya E, Us A D viral solunum yolu enfeksiyonları Us A D, Ergünay K (Ed.). *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 1. Baskı.* Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi. 2012: 336-337
8. Bochkov Y A, Grindle K, Vang F. Improved Molecular Typing Assay for Rhinovirus Species A, B, and C. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 2461-2471
9. McErlean P, Shackelton L A, Andrews E, Webster D R, Lambert S B, Nissen M D, Sloots T P, Mackay IM.. Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, human rhinovirus C (HRV C). *PLoS One* 2008; 3:e1847
10. Linsuwanon P, Payungporn S, Samransamruajkit R, Posuwan N, Makkoch J, Theanboonlers A, Poovorawan Y.. High prevalence of human rhinovirus C infection in Thai children with acute lower respiratory tract disease. *J. Infect.* 2009; 59:115–121

11. Tyrrell D A J, Fielder M. Cold wars: the fight against the common cold. New York, Oxford University Press; 2002: 65-73
12. Crawford D H, The Invisible Enemy: The Natural History of Viruses. New York, Oxford University Press; 2000
13. Andrewes C H, Chaproniere D M, Gompels A M, Pereira HG, Roden A T. Propagation of common cold virus in tissue cultures. *Lancet* 1953; ii, 546
14. Price, W. H. The isolation of a new virus associated with respiratory clinical disease in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 1956; 42: 892-896.
15. Blomqwist S. Epidemiology of Human Rhinoviruses. e-thesis. National Public Health Institute. 2004.
16. Tyrrell N A J, Bynoe M L. Cultivation of a novel type of common cold virus in organ cultures. *British Medical Journal* 1965; 1467.
17. Savolainen C, Blomqwist S. Human rhinoviruses. *Paediatric Respiratory Reviews* 2003; 4: 91–98.
18. Jacobs S E, Lamson D M, George K. Human Rhinoviruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2013; 26: 135–162
19. Palmenberg A C, Spiro D, Kuzmickas R, Wang S, Djikeng A, Rathe J A, Fraser-Liggett CM, Liggett SB. 2009. Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science* 324:55–59
20. McIntyre C M, The Epidemiology, Classification and Evolution of Human Rhinoviruses. e-thesis. University of Edinburgh; 2013
21. Greve J M, Davis G, Meyer A M, Forte C P, Yost S C, Marlor C W. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*. 1989; 56 (5):839-47.
22. Uncapher C R, DeWitt C M, Colonno R J. The major and minor group receptor families contain all but one human rhinovirus serotype. *Virology*. 1991; 180 (2):814-7.

23. Hofer F, Gruenberger M, Kowalski H, Machat H, Huettinger M. Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(5):1839-42.
24. Ishiko H, Miura R, Shimada Y, Hayashi A, Nakajima H. Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular diagnosis. *Intervirology*. 2002; 45(3): 136-41
25. Andries K, Dewindt B, Snoeks J, Wouters L, Moereels H, Lewi PJ. Two groups of rhinoviruses revealed by a panel of antiviral compounds present sequence divergence and differential pathogenicity. *J Virol*. 1990; 64(3): 1117-23.
26. Horsnell C, Gama R E, Hughes P J, Stanway G. Molecular relationships between 21 human rhinovirus serotypes. *J Gen Virol*. 1995; 76 (10): 2549-55
27. Kiang D, Kalra I, Yagi S, Louie J K, Boushey H, Boothby J. Assay for 5' noncoding region analysis of all human rhinovirus prototype strains. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(11):3736-45
28. Savolainen C, Laine P, Mulders M N, Hovi T. Sequence analysis of human rhinoviruses in the RNA-dependent RNA polymerase coding region reveals large within-species variation. *J Gen Virol*. 2004; 85(8): 2271-7
29. Waman V P, Pandurang S, Mohan M. Population Structure and Evolution of Rhinoviruses. *PLoS ONE* 2014; 9(2): e88981. doi:10.1371.)
30. www.picornastudy.com/types/enterovirus/rv-a/rv-b/rv-c.htm
31. Hughes J H, Chema S, Lin N, Conant R M, Hamparian V V. Acid Lability of Rhinoviruses: Loss of C and D Antigenicity after Treatment at pH 3.0. *The Journal of Immunology* .1974; vol. 112 no. 3 919-925
32. Stott E J, Killington R A. Rhinoviruses. *Annu Rev Microbiol*. 1972; 26: 503–524
33. Hendley J O, Wenzel R P, Gwaltney J M Jr. Transmission of rhinovirus colds by self-inoculation. *N Engl J Med*. 1973; 288(26): 1361-4.

34. Schmidt A C, Couch R B, Galasso G J, Hayden F G, Mills J, Murphy B R. Current research on respiratory viral infections: Third International Symposium. *Antiviral Res.* 2001; 50(3):157-96
35. Kennedy J L, Turner R B, Braciale T, Heymann P W. Pathogenesis of rhinovirus infection. *Curr Opin Virol.* 2012; 2(3):287-93
36. Cox D W, Le Souëf P N. Rhinovirus and the developing lung. *Paediatr Respir Rev.* 2014; 15(3):268-74
37. Palmenberg A C, Rathe J A, Liggett S B. Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(6):1190-9
38. McKnight K L, Lemon S M. The rhinovirus type 14 genome contains an internally located RNA structure that is required for viral replication. *RNA.* 1998; 4(12): 1569-84
39. Cordey S, Gerlach D, Junier T, Zdobnov E M. The cis-acting replication elements define human enterovirus and rhinovirus species. *RNA.* 2008; 14(8):1568-78.
40. Goodfellow I, Chaudhry Y, Richardson A, Meredith J, Almond J W. Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J Virol.* 2000; 74(10):4590-600
41. Arruda E, Boyle T R, Winther B, Pevear D C. Localization of human rhinovirus replication in the upper respiratory tract by in situ hybridization. *J Infect Dis.* 1995; 171(5):1329-33
42. Gruenberger M, Wandl R, Nimpf J, Hiesberger T, Schneider W J, Kuechler E. Avian homologs of the mammalian low-density lipoprotein receptor family bind minor receptor group human rhinovirus. *J. Virol.* 1995; 69:7244–7247
43. Garriga D, Pickl-Herk A, Luque D, Wruss J, Castón J R. Insights into Minor Group Rhinovirus Uncoating: The X-ray Structure of the HRV2 Empty Capsid. *PLoS Pathog* 2012; 8(1):e1002473

44. Colonna R J, Condra J H, Mizutani S, Callahan P L, Davies M E, Murcko M A: Evidence for the direct involvement of the rhinovirus canyon in receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:5449-5453
45. Khan A G, Pichler J, Rosemann A. Human Rhinovirus Type 54 Infection via Heparan Sulfate Is Less Efficient and Strictly Dependent on Low Endosomal pH. *Journal OF Virology*. 2007; 4625–4632
46. Bochkov Y A, Watters K, Ashraf S; Griggs T F, Devries MK, Jackso DJ, Palmenberg A C, Gern, J.E. Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2015, 112, 5485–5490.
47. Sieczkarski S B, Whittaker G R. Viral entry. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 285: 1-23
48. Marsh M, Helenius A. Open Sesame. *Cell*. Volume 124, Issue 4, 24 2006; Pages 729–740
49. Brabec M, Baravalle G, Blaas D, Fuchs R: Conformational Changes, Plasma Membrane Penetration, and Infection by Human Rhinovirus Type 2. Role of Receptors and Low pH, *J. Virol*. 2003, 77: 5370–5377
50. Verdaguer N, Blaas D, Fita I. Structure of human rhinovirus serotype 2 (HRV2). *J Mol Biol* 2000; 300: 1179–1194
51. Nurani G, Lindqvist B, Casasnovas JM. Receptor priming of major group human rhinoviruses for uncoating and entry at mild low-pH environments. *J Virol* 2003; 77: 11985–11991
52. Lewis J K, Bothner B, Smith T J, Siuzdak G: Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 6774-6778
53. Xing L, Casasnovas J M, Cheng R H. Structural analysis of human rhinovirus complexed with ICAM-1 reveals the dynamics of receptor-mediated virus uncoating. *J Virol* 2003; 77: 6101–6107.

54. Golini F, Nomoto A, Wimmer E. The genome-linked protein of picornaviruses. IV. Difference in the VPg's of encephalomyocarditis virus and poliovirus as evidence that the genome-linked proteins are virus-coded. *Virology* 1978; 89: 112-118
55. Hayden F G.: Rhinovirus and the lower respiratory tract. *Rev Med Virol* 2004; 14: 17–31
56. Lin J Y, Chen T C, Weng K F, Chang S C, Chen L L, Shih S R. Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J Biomed Sci.* 2009; 16: 103
57. Richards A L, Jackson W T. Behind Closed Membranes: The Secret Lives of Picornaviruses? *PLoS Pathog.* 2013; 9(5): e1003262
58. Winther B, Gwaltney J M, Mygind N, Turner R B, Hendley J O. Sites of rhinovirus recovery after point inoculation of the upper airway. *JAMA.*1986; 256:1763–1767
59. Winther B. Rhinovirus infections in the upper airway. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2011; 8:79–89
60. Papi A, Johnston SL. Rhinovirus infection induces expression of its own receptor intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) via increased NF- κ B-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:9707–9720
61. Winther B, Arruda E, Witek T J, Marlin S D, Tsianco M M, Innes D J, Hayden F G. Expression of ICAM-1 in nasal epithelium and levels of soluble ICAM-1 in nasal lavage fluid during human experimental rhinovirus infection. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2002; 128:131–136.
62. Winther B, Brofeldt S, Christensen B, Mygind N. Light and scanning electron microscopy of nasal biopsy material from patients with naturally acquired common colds. *Acta Otolaryngol.* 1984; 97:309 –318
63. Sajjan U, Wang Q, Zhao Y, Gruenert D C, Hersenson M B. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 178:1271–1281.
64. Papadopoulos N G, Sanderson G, Hunter J, Johnston S L. Rhinoviruses replicate effectively at lower airway temperatures. *J. Med. Virol.* . 1999; 58:100 –104

65. Triantafilou K, Vakakis E, Richer E A J, Evans G L, Villiers J P, Triantafilou M. Human rhinovirus recognition in non-immune cells is mediated by Toll-like receptors and MDA-5, which trigger a synergetic pro-inflammatory immune response. *Virulence* 2011; 2:22–29.
66. Dahdaleh S, Clarke D L, Belvisi MG, Kon O M, Fujita T, Jeffery P K, Johnston S L, Edwards M R. Co-ordinated role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the innate response to rhinovirus in bronchial epithelium. *PLoS Pathog.* 2010. 6:e1001178.
67. Proud D, Naclerio R M, Gwaltney J M, Hendley J O. Kinins are generated in nasal secretions during natural rhinovirus colds. *J. Infect. Dis.* 1990; 161:120 –123.
68. Noah T L, Henderson F W, Wortman I A, Devlin R B, Handy J, Koren H S, Becker S. Nasal cytokine production in viral acute upper respiratory infection of childhood. *J. Infect. Dis.* 1995; 171:584 –592
69. Doyle W J, Casselbrant M L, Li-Korotky S, Doyle A P, Lo C Y, Turner R, Cohen S. The interleukin 6 -174 C/C genotype predicts greater rhinovirus illness. *J. Infect. Dis.* 2010; 201:199 –206.
70. Proud D, Turner R B, Winther B, Wiehler S, Tiesman J P, Reichling T D. Gene expression profiles during in vivo human rhinovirus infection: insights into the host response. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178:962-8
71. Proud D. Nitric oxide and the common cold. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:37-42.
72. Sanders S P, Proud D, Siekierski E S, Yachechko R, Liu MC. Role of nasal nitric oxide in the resolution of experimental rhinovirus infection. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113:697-702
73. Barclay W S, al-Nakib W, Higgins P G, Tyrrell D A. The time course of the humoral immune response to rhinovirus infection. *Epidemiol. Infect.* 1989; 103:659–669
74. Wark P A B, Bucchieri F, Johnston S L, Gibson P G, Hamilton L, Mimica J, Zummo G, Holgate ST, Attia J, Thakkestian A, Davies DE. IFN-gamma-induced protein 10 is a novel biomarker of rhinovirus induced asthma exacerbations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 120:586–593.

75. Proud D. Role of rhinovirus infections in asthma. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2011; 29:201-8
76. Gern J. 2009. Rhinovirus and the initiation of asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 9:73–78.
77. Bartlett N W, Walton R P, Edwards M R, Aniscenko J, Caramori G, Zhu J, Glanville N, Choy K J, Jourdan P, Burnet J, Tuthill T J, Pedrick M S, Hurle M J, Plumpton C, Sharp NA, Bussell J N, Swallow DM, Schwarze J, Guy B, Almond J W, Jeffery P K, Lloyd CM, Papi A, Killington R A, Rowlands D J, Blair E D, Clarke N J, Johnston S L. Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation. *Nat Med* 2008;14:199-204
78. Vestbo J, Hurd S, Agusti A, Jones P. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013; Vol. 187, No. 4 (347-365)
79. Mallia P, Message S D, Gielen V, Contoli M, Gray K, Keadze T, Aniscenko J, Laza-Stanca V, Edwards M R, Slater L, Papi A, Stanciu L A, Kon O M, Johnson M, Johnston S L. 2011. Experimental rhinovirusinfection as a human model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183:734 –742.
80. Vareille M, Kieninger E, Alves M P, Kopf B S, Möller A, Geiser T, Johnston S L, Edwards M R, Regamey N. 2012. Impaired type I and type III interferon induction and rhinovirus control in human cystic fibrosis airway epithelial cells. *Thorax* 67:517–525.
81. Hendley JO, Wenzel RP, Gwaltney JM. Transmission of rhinovirus colds by self-inoculation. *N Engl J Med* 1973;288:1361–1364.
82. Winther B, McCue K, Ashe K, Rubino J, Hendley J O. Enviromental contamination with rhinovirus and transfer to fingers of healthy individuals by daily life activity. *J Med Virol* 2007;79:1606–1610.
83. Winther B, Gwaltney JM, Mygind N, Turner RB, Hendley JO. Sites of rhinovirus recovery after point-inoculation of the upper airways. *JAMA* 1986;256:1763–1767.

84. Dick E C, Jennings L C, Mink K A, Wartgow C D, Inhorn S L. Aerosol transmission of rhinovirus colds. *J Infect Dis* 1987;156:442–448.
85. Harvala H, et al. High detection frequency and viral loads of human rhinovirus species A to C in fecal samples; diagnostic and clinical implications. *Journal of Medical Virology* 2012;84: 536–542.
86. Gwaltney JM, Hendley JO, Simon G, Jordan WS. 1966. Rhinovirus infections in an industrial population. *N. Engl. J. Med.* 275:1261–1268.
87. Monto A S. The seasonality of rhinovirus infections and its implications for clinical recognition. *Clin Ther.* 2002 Dec;24(12):1987-97
88. Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H. 2012. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species A, B and C from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J. Med. Microbiol.* 61:410–419.
89. Lau S K P, Yip C C Y, Woo P C Y, Yuen K-Y. 2010. Human rhinovirus C: a newly discovered human rhinovirus species. *Emerg. Health Threats J.* 3:e2. doi:10.3134/ehth.10.002.
90. Fry AM, Lu X, Olsen SJ, Chittaganpitch M, Sawatwong P, Chantra S, Baggett HC, Erdman D. 2011. Human rhinovirus infections in rural Thailand: epidemiological evidence for rhinovirus as both pathogen and bystander. *PLoS One* 6:e17780. doi:10.1371/journal.pone.0017780.
91. Peltola V, Waris M, Osterback R, Susi P, Ruuskanen O, Hyypiä T. 2008. Rhinovirus transmission within families with children: incidence of symptomatic and asymptomatic infections. *J. Infect. Dis.* 197:382–389.
92. Mäkelä M J, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, Blomqvist S, Hyypiä T, Arstila P. 1998. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J. Clin. Microbiol.* 36:539–542.
93. Brownlee J W, Turner R B. 2008. New developments in the epidemiology and clinical spectrum of rhinovirus infections. *Curr. Opin. Pediatr.* 20:67–71.

94. Winther B, Alper CM, Mandel EM, Doyle WJ, Hendley JO. 2007. Temporal relationships between colds, upper respiratory viruses detected by polymerase chain reaction, and otitis media in young children followed through a typical cold season. *Pediatrics* 119:1069–1075.
95. Blomqvist S, Roivainen M, Puhakka T, Kleemola M, Hovi T. 2002. Virological and serological analysis of rhinovirus infections during the first two years of life in a cohort of children. *J. Med. Virol.* 66:263–268.
96. Rihkanen H, Carpén O, Roivainen M, Vaheri A, Pitkäranta A. 2004. Rhinovirus in adenoid tissue. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 68:903–908.
97. Gwaltney J M, Phillips C D, Miller R D, Riker D K. 1994. Computed tomographic study of the common cold. *N. Engl. J. Med.* 330:25–30.
98. Pitkäranta A, Arruda E, Malmberg H, Hayden F G. 1997. Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute communityacquired sinusitis by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1791–1793.
99. Miller E K, Lu X, Erdman D D, Poehling K A, Zhu Y, Griffin M R, Hartert T V, Anderson L J, Weinberg G A, Hall C B, Iwane M K, Edwards K M. 2007. Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. *J. Infect. Dis.* 195:773–781.
100. Rihkanen H, Rönkkö E, Nieminen T, Komsu K-L, Rätty R, Saxen H, Ziegler T, Roivainen M, Söderlund-Venermo M, Beng A L, Anne L, Hovi T, Pitkäranta A. 2008. Respiratory viruses in laryngeal croup of young children. *J. Pediatr.* 152:661– 665.
101. Louie J K, Roy-Burman A, Guardia-Labar L, Boston E J, Kiang D, Padilla T, Yagi S, Messenger S, Petru AM, Glaser CA, Schnurr DP. 2009. Rhinovirus associated with severe lower respiratory tract infections in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28:337–339.
102. Mansbach J M, Piedra P A, Teach S J, Sullivan A F, Forgey T, Clark S, Espinola JA, Camargo C A. 2 April 2012. Prospective multicenter study of viral etiology and hospital length of stay in children with severe bronchiolitis. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* [Epub ahead of print]. doi:10.1001/archpediatrics.2011.1669.

103. Midulla F, Pierangeli A, Cangiano G, Bonci E, Salvadei S, Scagnolari C, Moretti C, Antonelli G, Ferro V, Papoff P. 2012. Rhinovirus bronchiolitis and recurrent wheezing: 1-year follow-up. *Eur. Respir. J.* 39:396–402.
104. Kotaniemi-Syrjänen A, Vainionpää R, Reijonen TM, Waris M, Korhonen K, Korppi M. 2003. Rhinovirus-induced wheezing in infancy the first sign of childhood asthma? *J. Allergy Clin. Immunol.* 111: 66–71.
105. García-García ML, Calvo C, Pozo F, Villadangos PA, Pérez-Breña P, Casas I. 2012. Spectrum of respiratory viruses in children with community acquired pneumonia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8:808–813.
106. Lieberman D, Shimoni A, Shemer-Avni Y, Keren-Naos A, Shtainberg R, Lieberman D. 2010. Respiratory viruses in adults with community acquired pneumonia. *Chest* 138:811–816.
107. Murali S, Langston AA, Nolte FS, Banks G, Martin R, Caliendo AM. 2009. Detection of respiratory viruses with a multiplex polymerase chain reaction assay (MultiCode-PLx Respiratory Virus Panel) in patients with hematologic malignancies. *Leuk. Lymphoma* 50:619–624.
108. Kaiser L, Aubert J-D, Pache J-C, Deffernez C, Rochat T, Garbino J, Wunderli W, Meylan P, Yerly S, Perrin L, Letovanec I, Nicod L, Tapparel C, Soccac PM. 2006. Chronic rhinoviral infection in lung transplant recipients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174:1392–1399.
109. Costa C, Bergallo M, Astegiano S, Sidoti F, Terlizzi ME, Gambarino S, Curtoni A, Simeone S, Solidoro P, Cavallo R. 2011. Detection of human rhinoviruses in the lower respiratory tract of lung transplant recipients. *Arch. Virol.* 156:1439–1443.
110. Liu M, Mallory G, Schecter M. 2010. Long-term impact of respiratory viral infection after pediatric lung transplantation. *Pediatr. Transplant.* 14:431–436
111. Ohrmalm L, Wong M, Aust C, Ljungman P, Norbeck O, Broliden K, Tolfvenstam T. 2012. Viral findings in adult hematological patients with neutropenia. *PLoS One* 7:e36543. doi:10.1371/journal.pone.0036543.

112. Milano F, Campbell A P, Guthrie K A, Kuypers J, Englund J A, Corey L, Boeckh M. 2010. Human rhinovirus and coronavirus detection among allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Blood* 115: 2088–2094.
113. Jackson D J, Gangnon R E, Evans M D, Roberg K A, Anderson E L, Pappas T E, Printz M C, Lee W-M, Shult PA, Reisdorf E, Carlson-Dakes K T, Salazar L P, DaSilva D F, Tisler C J, Gern J E, Lemanske R F. 2008. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178:667– 672.
114. Gern JE. 2010. The ABCs of rhinoviruses, wheezing, and asthma. *J. Virol.* 84:7418-7426.
115. Corne J M, Marshall C, Smith S, Schreiber J, Sanderson G, Holgate S T, Johnston S L. 2002. Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet* 359:831– 834.
116. Greenberg S B, Allen M, Wilson J, Atmar R L. 2000. Respiratory viral infections in adults with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162:167–173.
117. McManus T E, Marley A-M, Baxter N, Christie S N, O'Neill H J, Elborn J S, Coyle P V, Kidney J C. 2008. Respiratory viral infection in exacerbations of COPD. *Respir. Med.* 102:1575–1580.
118. Smyth A R, Smyth R L, Tong C Y, Hart C A, Heaf DP. 1995. Effect of respiratory virus infections including rhinovirus on clinical status in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* 73:117–120.
119. Landry M. 2011. Rhinoviruses, p 1400–1409. In Versalovic J, Carroll K C, Funke G, Jorgensen J H, Landry M L, WarnockDW(ed), *Manual of clinical microbiology*, 10th ed. ASM Press, Washington, DC.
120. Hernes S, Quarsten H, Hagen E, Lyngroth A, Pripp A, Bjorvatn B, Bakke P. 2011. Swabbing for respiratory viral infections in older patients: a comparison of rayon and nylon flocked swabs. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30:159 –165.

121. Tyrrell D, Parsons R. 1960. Some virus isolations from common colds. III. Cytopathic effects in tissue cultures. *Lancet* i:239 –242.
122. Bochkov Y A, Palmenberg A C, Lee W-M, Rathe J A, Amineva S P, Sun X, Pasic T R, Jarjour N N, Liggett S B, Gern J E. 2011. Molecular modeling, organ culture and reverse genetics for a newly identified human rhinovirus C. *Nat. Med.* 17:627– 632.
123. Al-Mulla W, el Mekki A, Al-Nakib W. 1994. Rapid culture-amplified immunofluorescent test for the detection of human rhinoviruses in clinical samples: evidence of a common epitope in culture. *J. Med. Virol.* 42:182–187.
124. Katpally U, Fu T-M, Freed DC, Casimiro DR, Smith TJ. 2009. Antibodies to the buried N terminus of rhinovirus VP4 exhibit crossserotypic neutralization. *J. Virol.* 83:7040 –7048.
125. Gama R, Hughes P, Bruce C, Stanway G. 1988. Polymerase chain reaction amplification of rhinovirus nucleic acids from clinical material. *Nucleic Acids Res.* 16:9346. doi:10.1093/nar/16.19.9346.
126. Coiras MT, Aguilar JC, García ML, Casas I, Pérez-Breña P. 2004. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J. Med. Virol.* 72:484–495.
127. McIntyre C., Knowles N, Simmonds P. Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. *Journal of General Virology* (2013), 94, 1791–1806
128. UtoKaparch S, Marchant D, Gosselink J V, McDonough J E, Thomas E E, Hogg J C, Hegele R G. 2011. The relationship between respiratory viral loads and diagnosis in children presenting to a pediatric hospital emergency department. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 30:e18–e23. doi:10.1097 /INF.0b013e3181ff2fac
129. Loens K, Goossens H, Laats C D, Foolen H, Oudshoorn P, Pattyn S, Sillekens P, Ieven M. 2006. Detection of rhinoviruses by tissue culture and two independent amplification techniques, nucleic acid sequencebased amplification and reverse transcription-PCR, in children with acute respiratory infections during a winter season. *J. Clin. Microbiol.* 44:166–171.

130. Mahony J B, Petrich A, Smieja M. 2011. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 48:217–249.
131. Huang T, Wang W, Bessaud M, Ren P, Sheng J, Yan H, Zhang J, Lin X, Wang Y, Delpeyroux F, Deubel V. 2009. Evidence of recombination and genetic diversity in human rhinoviruses in children with acute respiratory infection. *PLoS One* 4:e6355. doi:10.1371/journal.pone.0006355
132. Thibaut HJ, De Palma AM, Neyts J. 2012. Combating enterovirus replication: state-of-the-art on antiviral research. *Biochem. Pharmacol.* 83:185–192.
133. Webster ADB. 2005. Pleconaril—an advance in the treatment of enteroviral infection in immunocompromised patients. *J. Clin. Virol.* 32:1– 6.
134. Lambert J. 2011. BTA798 is an orally bioavailable and potent inhibitor of human rhinovirus both in vitro and in an experimental challenge virusinfection model in healthy volunteers, abstr D-1557. Abstr. 51st Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.
135. Fang F, Yu M. Viral receptor blockage by multivalent recombinant antibody fusion proteins: inhibiting human rhinovirus (HRV) infection with CFY196. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2004) 53, 23–25
136. Gwaltney JM, Moskalski PB, Hendley JO. 1978. Hand-to-hand transmission of rhinovirus colds. *Ann. Intern. Med.* 88:463– 467.
137. Jefferson T, Del Mar C, Dooley L, Ferroni E, Al-Ansary LA, Bawazeer GA, van Driel ML, Nair S, Foxlee R, Rivetti A. 2010. Physical interventions to interrupt or reduce the spread of respiratory viruses: a Cochrane review. *Health Technol. Assess.* 14:347– 476.
138. Hamory BH et al.: Human responses to two decavalentrhinovirus vaccines. *J Infect Dis* 1975, 132:623-629.
139. Bizzintino J, Lee W-M, Laing I A, Vang F. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur Respir J* . 2011 May ; 37(5): 1037–1042
140. Kuypers J. Laboratory Detection of Rhinoviruses *US Respiratory Disease*, 2010; 6:76–80

141. Dagher H, Donninger H. Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *Journal of Virological Methods* 2004; 117:113–121
142. Richter J, Nikolau E, Panayiotou C. Molecular epidemiology of rhinoviruses in Cyprus over three consecutive seasons. *Epidemiol. Infect.* 2015; 143: 1876–1883
143. Henquell C, Mirand A. Prospective genotyping of human rhinoviruses in children and adults during the winter of 2009–2010. *Journal of Clinical Virology* 53 (2012) 280– 284
144. Garcia J, Espejo V, Nelson M. Human rhinoviruses and enteroviruses in influenza-like illness in Latin America. *Virology Journal* 2013; 10:305
145. Chen W J, Arnold, J, Epidemiologic, clinical, and virologic characteristics of human rhinovirus infection among otherwise healthy children and adults. *Journal of Clinical Virology* 64 (2015) 74–82
146. Lau S K P, Yip C C Y, Woo P C Y, Yuen K-Y. 2010. Human rhinovirus C: a newly discovered human rhinovirus species. *Emerg. Health Threats J.* 3:e2.
147. Watanabe AS, Carraro E, Candeias JM, Donalisio MR, Leal E, Granato CF, et al. Viral etiology among the elderly presenting acute respiratory infection during the influenza season. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011;44:18-21.
148. Onyango CO, et al. Molecular epidemiology of human rhinovirus infections in Kilifi, coastal Kenya. *Journal of Medical Virology* 2012; 84: 823–831
149. Principi N, Zampiero A. Prospective evaluation of rhinovirus infection in healthy young children. *Journal of Clinical Virology* 66 (2015) 83–89
150. Espinola E, Russomando G. Phylogeny-Based Classification of Human Rhinoviruses Detected in Hospitalized Children With Acute Lower Respiratory Infection in Paraguay, 2010–2011. *Journal of Medical Virology* 85:1645–1651 (2013)
151. Lee W-M, Kiesner C, Pappas T, Lee I, Grindle K, et al (2007) A Diverse Group of Previously Unrecognized Human Rhinoviruses Are Common Causes of Respiratory Illnesses in Infants. *PLoS ONE* 2(10): e966.228.

152. Choi S H, Huh J V. Clinical characteristics and outcomes of severe rhinovirus-associated pneumonia identified by bronchoscopic bronchoalveolar lavage in adults: Comparison with severe influenza virus-associated pneumonia. *Journal of Clinical Virology* 62 (2015) 41–47
153. To K K, Lau S K, Chan K H, Mok K Y, Luk H K, Yip C C, Ma Y K, Sinn L H, Lam S H, Ngai C W, Hung I F, Chan K H, Yuen K Y. Pulmonary and extrapulmonary complications of human rhinovirus infection in critically ill patients; *J Clin Virol.* 2016 Apr;77:85-91.
154. Tran D N, Trinh Q D. Human rhinovirus infections in hospitalized children: clinical, epidemiological and virological features. *Epidemiology and Infection* 2016; (4) pp 346-354
155. Jin Y, Yuan X-H, Xie Z-P, Gao H-C, Song R-J. Prevalence and Clinical Characterization of a Newly Identified Human Rhinovirus C Species in Children with Acute Respiratory Tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology.* 2009; 47: 2895–2900
156. Daleno C, Piralla A, Scala A, Senatore L. Phylogenetic Analysis of Human Rhinovirus Isolates Collected from Otherwise Healthy Children with Community-Acquired Pneumonia during Five Successive Years. *PLoS ONE* 8(11): e80614. doi:10.1371/journal.pone.0080614
157. Schibler M, Yerly S. Critical Analysis of Rhinovirus RNA Load Quantification by Real-Time Reverse Transcription-PCR *Journal of Clinical Microbiology* 2012; p. 2868–2872
158. Takeyama A, Hashimoto K. Rhinovirus Load and Disease Severity in Children With Lower Respiratory Tract Infections. *Journal of Medical Virology* 2012; 84:1135–1142
159. Kiyota N, Kushibuchi I. Genetic analysis of the VP4/VP2 coding region in human rhinovirus species C in patients with acute respiratory infection in Japan. *Journal of Medical Microbiology* 2013; 62, 610–617