



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**İSHALLİ HASTALARDAN SOYUTLANAN ROTAVİRÜSLERİN
GENOTİPLERİNİN İNCELENMESİ VE G9 GENOTİP
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

KATREN ALBAKKOUR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞUBAT 2019



**İSHALLİ HASTALARDAN SOYUTLANAN ROTAVİRÜSLERİN
GENOTİPLERİNİN İNCELENMESİ VE G9 GENOTİP VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

Katren ALBAKKOUR

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2019

Katren ALBAKKOUR tarafından hazırlanan "İSHALLİ HASTALARDAN SOYUTLANAN ROTAVİRÜSLERİN GENOTİPLERİNİN İNCELENMESİ VE G9 GENOTİP VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Kalkancı

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu ~~onaylıyorum/onaylamıyorum~~

Başkan : Prof. Dr. Kayhan Çağlar

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu ~~onaylıyorum/onaylamıyorum~~

Üye : Prof. Dr. Koray Ergünay

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu ~~onaylıyorum/onaylamıyorum~~

Üye : Prof.Dr.Gülendam Bozdayı

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu ~~onaylıyorum/onaylamıyorum~~

Üye : Doç. Dr. Ebru Evren

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu ~~onaylıyorum/onaylamıyorum~~

Tez Savunma Tarihi: 18/02/2019

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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

bildirim, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.


Katren ALBAKKOUR

18/02/2019

İSHALLİ HASTALARDAN SOYUTLANAN ROTAVİRÜSLERİN GENOTİPLERİNİN
İNCELENMESİ VE G9 GENOTİP VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)

Katren ALBAKKOUR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Şubat 2019

ÖZET

Rotavirus, çocuk çağında görülen gastroenteritlerinin sebeplerindedir. Gelişmekte olan ülkelerde mortalite ve morbiditenin en yaygın nedenlerindedir. Bu çalışmanın amacı, Ankara'da üçüncü basamak bir hastaneye başvuran, 0-65 yaş arasında, akut gastroenteritli, rota virüs hızlı antijen testi pozitif hastaların dışkı örneklerinde rotavirüsün genotiplerinin RT PZR yöntemi ile belirlenmesidir. Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na Ocak 2013 ile Nisan 2018 tarihleri arasında gastroenterit şikayeti ile başvuran ve dışkıları Mikrobiyoloji laboratuvarına yollanan ve immünokromatografik yöntem ile pozitif bulunan, 0-65 yaş arasındaki 87 (40 kız, 47 erkek) hastanın dışkı örnekleri toplanarak gerçekleştirilmiştir. Rotavirus VP-7 amplifikasyonu Beg9 ve End9 primerleri kullanılarak, G genotiplendirme G1-G4 ve G9 için özgül primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. VP-4 amplifikasyonu con-2 ve con-3 primerleri kullanılarak yapılmıştır. P genotipleri P[8], P[4], P[6] ve P[9] için özgül primerler ile belirlenmiştir. VP4 ve VP7 gen amplifikasyonu için AccessQuick RT-PZR (Promega Corporation, Madison, WI), genotiplendirme için de PZR Mastermix (Promega, Madison, WI) kullanılmıştır. Rotavirus antijen pozitifliği saptanan olguların cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Rotavirus enfeksiyonu en sık 12-23 aylık çocuklarda saptanmıştır. Antijen pozitifliğinin en sık kış ve sonbahar mevsiminde yoğunlaştığı izlenmiştir. Tiplendirme sonucunda G1 (% 25,80), G2 (% 3,22), G3 (% 4,30), G4 (% 6,45), G9 (% 60,21) G tipi olarak belirlenmiştir. P4 (% 1,14), P8 (% 93,10), P6 (% 5,74) P tipi olarak belirlenmiştir. Hem G hem de P tipleri birlikte tespit edilmiştir. En sık görülen tipi G9P[8] (% 56,98) ve G1P[8] (% 22,58) olduğu saptanmıştır. Tüm dünyada olduğu gibi bizim çalışmamız'daki Rotavirüs enfeksiyonu olan olgularda da G9 ve P[8]'in en sık genotipler olduğu görülmüştür. Benzer çalışmalar en sık G9P[8] tespit edilmiştir. Ancak yıldan yıla G9 genotipinin Ankara 'da arttığı görülmüştür.

Bilim Kodu : 1039.4.101

Anahtar Kelimeler : Rotavirus, VP4, VP7, VP6, NSP4, RT-PCR.

Sayfa Adedi : 68

Danışman : Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

INVESTIGATION OF THE GENOTYPES OF ROTAVIRUS FROM ARTISTIC
PATIENTS AND INVESTIGATION OF G9 GENOTYP
(Ph. D. Thesis)

Katren ALBAKKOUR

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES
February 2019

ABSTRACT

Rota virus is the most common cause of gastroenteritis in children and is one of the most common cause of mortality and morbidity in developing countries. The aim of this study was to determine the genotypes of rotavirus rapid test antigen positive patients between 0-65 years old with acute gastroenteritis attended to a tertiary care hospital in Ankara. This study was conducted between January 2013 and April 2018 at Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Stool samples were collected from 87 (40 female, 47 male) patients aged between 0-65 years who presented with gastroenteritis and were sent to microbiology laboratory. Rotavirus VP-7 amplification was performed using specific primers for G typing G1-G4 and G9 using Beg9 and End9 primers. VP-4 amplification was performed using con-2 and con-3 primers. P types were determined by specific primers for P [8], P [4] and P [6]. Access Quick RT-PZR (Promega Corporation, Madison, WI) was used for VP4 and VP7 gene amplification, and PZR Mastermix (Promega, Madison, WI) was used for serotyping. No statistically significant difference was found between the sexes of patients with positivity of rotavirus antigen. Rotavirus infection was most common in children aged 12-23 months. Antigen positivity was most common in winter and autumn. Genotypes G1 (25,80 %), G2 (3,22 %), G3 (4,30 %), G4 (6,45 %), G9 (60,21 %) constituted G types. P4 (1,14 %), P8 (93,10 %), P6 (5,74 %) constituted P types. The combination of G and P types was most prevalent for G9P [8] (56,98 %) and G1P[8] (22,58 %). According to these results, G9 and P8 were the most common genotypes in our study. Similar to various studies in Turkey, serotype G9P[8] had the highest ratio in the present study and G9 increased year by year significantly in Ankara, probably due to a new circulating clone of G9.

Science Code : 1039.4.101

Key Words : Rotavirus, VP4, VP7, VP6, NSP4, RT-PCR.

Page Number : 68

Advisor : Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım süresince, ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü, sabır ve yardımlarından dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Gülendám BOZDAYI ' ya, eğitime başladığım andan itibaren yardımlarını ve desteğini hiçbir şekilde esirgemeyen, tez konumun belirlenmesi ve tezimin hazırlanması sırasında bana yol gösteren, çalışma sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan ve bugünlere gelmemde büyük emeği olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nedim SULTAN ' a, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR ' a, verdiği eğitim ve değerle her zaman örnek alacağım Sayın Prof. Dr. Ayşe KALKANCI ' ya eğitim hayatımın her döneminde ilim, bilim, eğitim ve dostluk adına ne varsa hepsini bulduğum Dr. Bio. Aylin ALTAY ' a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım da bana yardımcı olan Dr. Bio. Ülker ABDÜLMECİT, Uzm. Bio. Nesrin AYDOĞAN ve değerli dostlukları ile her zaman yanımda olan doktora arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca verdikleri emek ve sevgi ile beni bu günlere getiren ve fedakarlıklarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme ve son olarak bana varlıkları ile destek ve güç veren sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
RESİMLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Virüsün yapısı	3
2.3 Sınıflama.....	8
2.4 Patogenez.....	10
2.5. Replikasyon.....	13
2.6. Epidemiyoloji.....	16
2.7 Bulaşma	17
2.8. Klinik Bulgu ve Belirtiler.....	18
2.9. İmmünoloji.....	19
2.10. Tanı	20
2.11.Tedavi	22
2.12. Korunma.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27

Sayfa

3.1. Örneklerin Toplanması ve Çalışma Planı.....	27
3.2. İmmunokromatografik Yöntemle Gaitada Rotavirüs Antijeninin Saptanması..	27
3.3. Gaita Örneklerinden Nükleik Asit Ekstraksiyonu.....	29
3.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	31
3.4.1.VP-7 amplifikasyonu için RT PZR amplifikasyon karışımının hazırlanması 31	
3.4.1.a.VP-7 amplifikasyon basamakları.....	31
3.4.2 Con2 ve Con3 primerleri kullanılarak RT-PZR ile VP-4 amplifikasyonu	32
3.4.2.aVP-4 amplifikasyonu için RT mastermix hazırlanması.....	32
3.4.2.b VP-4 amplifikasyon basamakları:	33
3.5 Nested PZR ile G ve P Tiplendirme.....	33
3.5.1 Nested PZR ile G Tiplendirme	34
3.5.2. Nested PZR ile P Tiplendirme	35
3.5.2.a P-tiplendirme için PZR Mastermix hazırlanması:	35
3.6. Agaroz jel elektroforezi	36
3.6.1. Agaroz jelin hazırlanması:.....	36
3.6.2. Agaroz jel elektroforezinin uygulanışı:	36
3.7. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	67

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Rotavirüsün yapısal (VP) /yapısal olmayan (NSP) proteinlerinin özellikleri.....	8
Çizelge 2.2. Rotarix ve RotaTeq aşılarının özellikleri.....	26
Çizelge 3.1. VP7 primer dizileri	31
Çizelge 3.2. Rotavirus VP-4 amplifikasyon primerleri	32
Çizelge 3.3. Rotavirus G tiplendirme primerleri	34
Çizelge 3.4. Rotavirus P tiplendirme primerleri	35
Çizelge 4.1. Hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı	39
Çizelge 4.2. Çalışmaya dahil edilen 0-65 yaş arası akut gastroenteritli hastaların yaş gruplarına göre dağılımı	39
Çizelge 4.3 G genotiplerin dağılımı.....	42
Çizelge 4. 4. P genotiplerin dağılımı	43
Çizelge 4.5. Rotavirus antijeni saptanan örneklerde G ve P genotiplerinin dağılımı	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Poliakrilamid jel elektroforezinde Rotavirüs ün 11 genomik bölgesinin görünümü ve Rotavirüs yapısı	5
Şekil 2.2. Rotavirüsle enfekte olan barsak epitel hücrelerinde gerçekleşen olaylar	13
Şekil 2.3. Rotavirüsün Replikasyon aşamaları	15
Şekil 4.1. Çalışmaya dahil edilen 0-65 yaş arası akut gastroenteritli hastaların yaş gruplarına göre dağılımı.	40
Şekil 4. 2. Rotavirus pozitifliği aylara göre dağılımı	41
Şekil 4.3. Rotavirus pozitifliğinin mevsimlere göre dağılımı	41
Şekil 4.4. Rotavirus G tipi saptanan örneklerde G genotipi dağılımı	42
Şekil 4.5. Rotavirus P tipi saptanan örneklerde genotiplerin dağılımı	43
Şekil 4.6. Rotavirus G/P serotipi saptanan örneklerde genotiplerin dağılımı	44
Şekil 4.7. Rota virüs G tiplerinin Agaroz Jel Elektroforezindeki görüntüsü	45
Şekil 4.8. Rota virüs G tiplerinin Agaroz Jel Elektroforezindeki görüntüsü	45
Şekil 4.8. Rota virüs P tiplerinin Agaroz Jel Elektroforezindeki görüntüsü	45

RESİMLER LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 1.1. Dışkı örneğinde Rotavirüs parçacıklarının EM altındaki görüntüsü	4
Resim 3.1. İmmunokromatografik yöntemle gaitada Rotavirüs antijen pozitifliği	29
Resim 3.2. QIAamp® Viral RNA Kiti (QIAGEN, Almanya)	31



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
CD4+ TH	: Cluster of differentiation 4 T hepler(CD4+ pozitif T hücre)
CD8+ T	: Cluster of differentiation 8 T (CD8+ pozitif T hücre)
cDNA	: Komplementer deoksiribonükleik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsRNA	: Çift zincirli RNA
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENS	: Enterik sinir sistemi
CTL	: Sitotoksik T lenfosit
DLP	: Çift tabakalı partikül
ER	: Endoplazmik retikulum
IFA	: İmmunofloresan antikor testi
IRF	: İnterferon regülatör faktör
NSP	: Yapısal olmayan protein
NTPaz	: Nükleozit trifosfataz
ORF	: Açık okuma çerçevesi
P	: Proteaz sensitive
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PGE2	: Prostaglandin E2
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-PZR	: Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SLP	: Tek tabakalı partikül
TLP	: Üç tabakalı partikül
VP	: Yapısal protein
[Ca²⁺]_i	: Hücre içi kalsiyum
[K⁺]_i	: Hücre içi potasyum
[Na⁺]_i	: Hücre içi sodyum
5-HT	: 5-Hidroksi triptamin

1. GİRİŞ

Beş yaş altı çocuklarda ağır gastroenteritin en önemli etkeni olan rotavirüs, dünya genelinde her yıl 2 milyon hastane yatışına ve 527 000 ölümlle sonuçlanan olguya sebep olmaktadır (Parashar, Burton ve Lanata, 2009). Dünya genelinde her yıl milyonlarca çocuk rotavirüse bağlı ishal şikayetiyle hastanelere başvurmakta ve bunların 600000'ne yakınında rotavirüse bağlı ölüm gerçekleşmektedir. Beş yaş altı çocuklarda aşı ile önlenebilir hastalık ölümleri arasında rotavirüsler pnömokokların ardından 2.sırada yer almaktadır (Blutt vd., 2003).

İnsanlarda enfeksiyondan sorumlu olan rotavirüsler A, B ve C grubunda bulunur. Küçük yaşlardaki çocuk ishallerine daha çok grup A rotavirüsler neden olmaktadır. Nötralizan antikor üretimi viral kapsiti oluşturan VP4 ve VP7 antijenleri tarafından tetiklenir. Bu antijenler sırasıyla Rotavirüslerin P ve G serotip ve genotiplerini belirlemektedir (Sai vd., 2013). Rotavirüsler üzerine yoğunlaşan çalışmalar sonucunda 2010 yılına kadar 27 farklı G genotipi (G1-G27) ve en az 35 P genotipi (P[1] - P[35]) saptanmıştır(Matthijnssens vd., 2011). Rotavirüsler üzerine yoğunlaşan çalışmalar sonucunda 2018 yılına kadar 32 farklı G genotipi (G1-G27) ve en az 47 P genotipi (P[1] - P[35]) saptanmıştır (Anaya-Molina vd., 2018).

Kişisel ve toplumsal koşullar ile hijyen önlemlerinden bağımsız olarak tüm dünyada hemen hemen her çocuk 5 yaşına gelinceye kadar rotavirüs ile enfekte olur. Rotavirüs enfeksiyonu dünya genelinde ortak bir sorun olsa da gelişmekte olan ülkelerde mortalite daha yüksektir. Bu nedenle rotavirus "demokratik virus" olarak da adlandırılmaktadır (Leung, Kellner ve Davies, 2005). Dünyanın farklı bölgelerinde kullanılan iki çeşit rotavirüs aşısı, rotavirüs isheline bağlı mortalite ve morbiditenin azaltılmasında önemli rol oynamıştır. Pentavalan human-bovine reassortant aşısı G1, G2, G3, G4 ve P1[8] yüzey antijenlerinden oluşur. Monovalan özellikteki Rotarix aşısı ise birçok G tipine karşı etkilidir (De Vos, 2004). Rotavirüs enfeksiyonuna karşı koruma, hastalanma durumunda hastanede yatışı azaltma ve mortaliteyi en aza indirme Rotavirüs aşısının temel hedeflerini oluşturmaktadır (Franco, Angel ve Greenberg, 2006).

Bu çalışmanın amacı, Ankara'da üçüncü basamak bir hastaneye başvuran, 0-65 yaş arasında, akut gastroenteritli, rotavirüs hızlı antijen testi pozitif hastaların dışkı örneklerinde rotavirüsün genotiplerinin RT PCR yöntemi ile belirlenmesidir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Rotavirüs ilk olarak 1973 yılında Bishop ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada ishal şikayeti olan bir çocuğun duodenal sıvısından alınan numunenin mikroskopik incelemesi sırasında tespit edilmiş (Bishop, Davidson and Holmes, 1973) ve tekerleğe benzeyen morfolojisi sebebiyle “Rotavirüs”(rota: latince tekerlek) olarak adlandırılmıştır (Prasad, and Chiu, 1994).

1974 yılında Flewett ve ark. Akut gastroenteritli çocuklar hakkındaki çalışmalarında çocukların dışkıında reovirüs ile benzerlik gösteren ve ishali nedeni olduğunu düşündükleri partiküllerin boyut ve şekil olarak birbirinden ayırt edilebilir olmadığını bildirmişlerdir (Flewett, 1974).

Her ne kadar insanlarda bildirilen ilk rotavirüs enfeksiyon vakası 1973 tarihine dayansa da hayvan vakalarının daha eski tarihlere dayanması, rotavirüsün yalnızca insanlar üzerinde değil diğer hayvanların yenidoğanları üzerinde de etkili enfektif bir ajan olduğu gerçeğini gözler önüne sermektedir. Angel ve ark. 1963 yılında yavru farelerdeki ishal salgınına konu alan çalışmalarında saptamış oldukları rotavirüs partikülünün 1969 yılında Amerika'daki buzağılarda ortaya çıkan salgında tespit edilen partikülle aynı olduğunu belirtmektedir (Angel, Franco and Greenberg, 2008: 507-513). Sonraki yıllarda tanıda kullanılmak üzere daha ulaşılabilir ve uygulanabilir teknikler geliştirilmesiyle çocukluk çağı gastroenteritinin en yaygın etkeni olan rotavirüs hakkında pek çok bilgi elde edilmiştir.

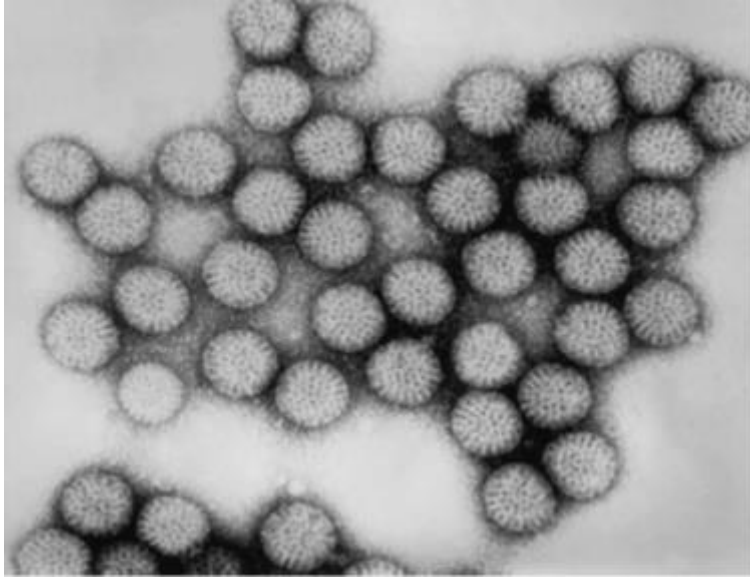
2.2. Virüsün yapısı

Rotavirüs elektron mikroskopide (EM) morfolojik olarak kolaylıkla incelenebilir. İsmindeki latince kökenli “Rota” kelimesi, viryonun EM’de negatif boyanması nedeniyle “tekerleği” andıran görüntüsünden kaynaklanmaktadır.

Rotavirüs, ortak özellik olarak zarfsız, ikozahedral yapıda ve protein kapsid içeren geniş yelpazedeki Reoviridae ailesinin bir üyesidir. Çapı yaklaşık 70 nm olup 11 adet segment içeren çift sarmallı bir RNA’ya (dsRNA) sahip olan rotavirüs, çekirdek ile birlikte dış ve iç

kapsid olmak üzere 3 farklı katmandan oluşmaktadır. Viral genom, Viral protein (VP) 1 ve VP3 e bağlı bir vaziyette santral yerleşim göstermektedir ve VP2 den oluşan iç tabaka tarafından çevrelenmektedir. Ayrıca VP7 ve VP4 şeklindeki 2 farklı protein yapıdan oluşan bir de dış tabakaya sahiptir. Rotavirüse ait her genom segmenti biri yapısal biri yapısal olmayan toplamda iki adet viral protein (VP) kodlar. Altı adet genom segmenti virüse ait 6 adet yapısal proteini (Viral protein: 1, 2, 3, 4, 6 ve 7), diğer segment ise 6 adet yapısal olmayan proteini (Non-structural protein: NSP1-6) kodlamaktadır. Özel bir durum olarak 11. segment 2 adet protein kodlar (Crawford, 2010).

Virion morfolojik özelliği nedeniyle üç tabakalı partikül (TLP: “Triple-Layered Particle”) şeklinde de adlandırılmaktadır. Her biri VP7 tarafından çevrelenen toplamda 132 adet kanal içermesi TLP ye özgü bir özelliktir (De Palma vd., 2010). Virüsün elektron mikroskoftaki görünümü Resim 1.1’de gösterilmiştir.

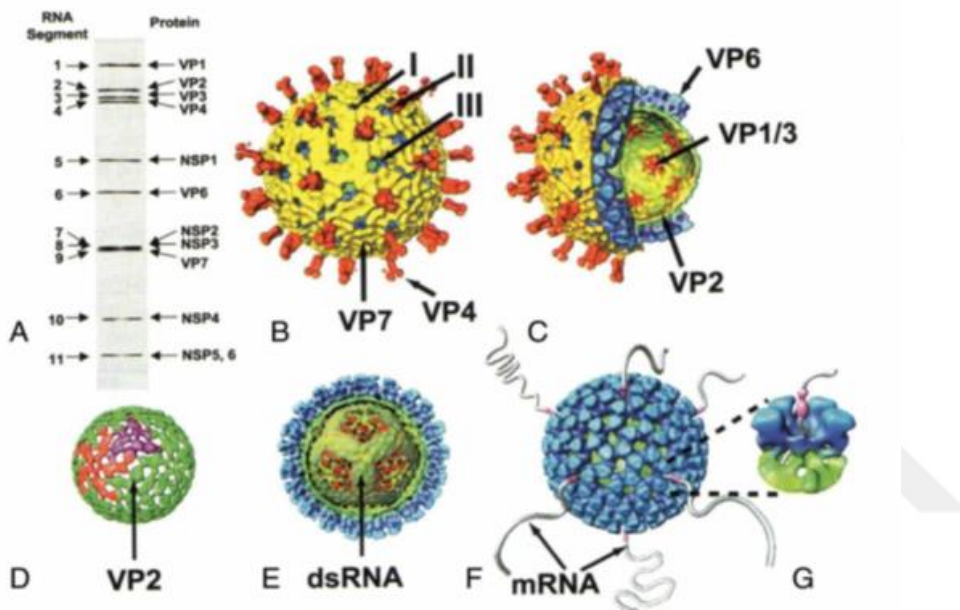


Resim 1.1. Dışkı örneğinde rotavirüs parçacıklarının EM altındaki görüntüsü

İçerdiği 11 adet RNA segmentinin tamamının nükleotid dizilişi rotavirüs suşlarının birçoğu için bilinmektedir. Farklı rotavirüs suşlarına ait nükleotid dizilişleri genom segmentinin genel yapısal özelliklerini gösterir. Bütün pozitif -sense RNA segmentlerinin 5’ ucu guanidin nükleotidi ile başlasa da devamında gelen 5’ uçtaki bir adet intron (kodlanmayan) bölge ve exon özellikteki (kodlanan) ORF bölgesinden oluşmaktadır. Nihayetinde bir stop kodonuyla sonlanan mRNA’ ların büyük bir kısmı 5’-U GU G A CC-3’ dizisi ile sonlanmaktadır. Bu diziler bünyelerindeki önemli sinyaller ile gen ekspresyonunda ve

replikasyonunda önemli rol oynar. mRNA' nın son dört nükleotidi translasyonu artırıcı olarak görev yaparken, gen dizilimlerinin tamamı, en azından başlangıç kodonundan sonra uzun bir ORF bölgesi içermektedir (Fischer, Bresee and Glass, 2004).

Yapısal Proteinler: Rotavirüs VP4 ve VP7 den oluşan bir dış kapsid ve VP6 dan oluşan bir orta kapsid oluştururken en içte yer alan viral kor molekülü viral genom, VP1, VP2, VP3 proteinlerinden meydana gelmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Poliakrilamid jel elektroforezinde rotavirüsün 11 genomik bölgesinin görünümü ve rotavirüs yapısı (Kaynak: <http://www.domnite.ro/rotavirusul-si-sarcina/>)

VP1 proteini 1. segment tarafından kodlanmakta olup minör çekirdek proteini olmakla birlikte toplam virion kütesinin % 2 sini oluşturur. Merkezi çekirdeğin küçük bir kısmını oluşturur. Farklı rotavirüsler karşılaştırıldığında VP1 aminoasit ve protein seviyelerinin büyük oranda aynı olduğu gözlemlenmektedir. En büyük VP1 5 polipeptitten oluşmaktadır. İkinci segment tarafından kodlanan yapısal protein olan VP2, minör protein olan VP1 ve VP3 ile birlikte rotavirüsün iç çekirdeğini meydana getirir. dsRNA ile etkileşim içerisinde olan VP2 çekirdeğin kütlece en büyük kısmını oluşturan proteindir. Çekirdek yapısının oluşumunda ve işlevsellik kazanmasında önemli yer tutmasının yanı sıra viral RNA'ya bağlanıp çift zincirli RNA'nın kapsidle çevrenmesi ve replikasyonda da görev alır (Mansell and Patton, 1990).

Çekirdeğin bir diğer minör bileşeni olan protein ise 3.segment tarafından kodlanan VP3 proteindir. Guaniltransferaz ve metiltransferaz aktivitesi gösteren bu protein diğer birtakım viral transferazlar ile dizi homolojisine sahiptir (Estes ve Kapikian, 2007).

Dördüncü segment tarafından kodlanan yapısal protein ise 775 aminoasit uzunluğunda olan ve rotavirüs yüzeyindeki çıkıntı "spike" yapısına katılan VP4 tür. VP4'ün görevleri arasında hemagglütinasyon, hücreye bağlanma, penetrasyon, nötralizasyon ve virülans gibi önemli birtakım görevler yer almaktadır (Shaw, 2006).

Beşinci segment tarafından kodlanan VP5 proteini virüsün hücreye penetrasyonunda rol oynar ve rotavirüsün korunmuş hidrofob kısmına yerleşik vaziyettedir.

Altıncı segment tarafından kodlanan yapısal protein olan VP6 genom transkripsiyonunda görev almasının yanı sıra, yapısal ve immünolojik özellik göstererek viral kapsid bütünlüğünü sağlamada ve kapsidin korunmasında kilit öneme sahiptir. VP6'nın her ne kadar doğrudan enzimatik aktivitesi olmazsa da, transkripsiyon için olmazsa olmaz bir majör iç kapsid proteini olduğu saptanmıştır. Ayrıca VP6 rotavirüsün grup spesifik antijenik determinantıdır.

Dokuzuncu segment tarafından kodlanan VP7 yapısal proteini, hücreye bağlanma sürecinde rol oynar. VP7, VP4 molekülünü modüle ederek onun hücreye bağlanmasını sağladıktan sonra hücre yüzeyinde bulunan moleküllerle etkileşime girer. Rotavirüs serotiplemesinde kullanılan VP4 (P proteini) ve VP7 (G proteini) birer dış kapsid elemanıdır ve bağışıklık sistemince üretilen nötralizan ve tip spesifik antikorlar bu proteinleri hedef alır (Pesavento, Crawford, Estes and Prasad, 2006).

Yapısal olmayan proteinler: Yapısal olmayan proteinler matür virüs partikülünde yer almayan ancak enfekte hücrede oluşturulan proteinlerdir. Genom replikasyonunda, interferon indüksiyonu gibi konakçı yanıtında, partikül birleşmesinde olduğu gibi viral gen replikasyonunun gerçekleşmesinde rolleri vardır (Patton, 2012).

Bu proteinlerden ilki olan NSP1, erken apoptozun engellenmesinde, antiviral cevap antagonizmasında ve viral olgunlaşmada görev alır (Hu, Crawford, Hyser, Estes and Prasad, 2012).

Sekizinci segment tarafından kodlanan NSP2 proteininin yapılan çalışmalar sonucunda nükleozis trifosfataz aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır ¹⁶. RNA replikasyonunda ve paketlenmesinde görevi olduğu düşünülmektedir.

Yedinci segment tarafından kodlanan NSP3 proteini konak hücrede protein sentezini inhibe ederek rotavirüsün translasyonunu kolaylaştırır böylece viral mRNA'yı yıkıma karşı korur (Montero, Arias, Lopez, 2006).

Rotavirüsün yapısal olmayan proteinlerinden NSP4 proteini 10.segment tarafından kodlanır ve yapılan birçok araştırma sonucunda viral enterotoksin özellikte olduğu saptanmıştır. NSP4 endoplazmik retikulumun subviral çift katmanlı partikülüne tomurcuklanması sırasında intraselüler reseptör görevi görür ki bu basamak partikülün olgunlaşmasında önemli bir basamaktır. NSP4 molekülü membran stabilizasyonunu bozarak hücre zarının geçirgenliğini artırmasının yanı sıra epitel hücrelerinin yüzeyindeki "tight junction" sıkı bağlantıları hasara uğratarak kalsiyumun hücre içine girişini artırır böylece hücre içi kalsiyum dengesi bozulur. Araştırmalar NSP4 ün VP4 ve VP6 ile etkileşim içerisinde olduğunu göstermiştir. Bu bölgedeki aminoasit değişiklikleri rotavirüsün toksijenik aktivitesi ve virülansındaki modifikasyonlarla ilişkilendirilmiştir (Tafazoli, Zeng, Estes, Magnusson, and Svensson, 2001).

NSP5 RNA'yı bağlar, ayrıca NSP2 ile birleşerek viruloplazmin oluşumunda görevlidir. NSP2 faal olduğu tüm basamaklarda çoğunlukla bağlayıcı özelliği olan ve diğer birçok rotaviral proteinlerle koordinasyon içerisinde olan NSP5 proteini ile birlikte etki eder (Tafazoli, Zeng, Estes, Magnusson and Svensson, 2001).

NSP6 nın görevi kesin olarak saptanamamış olsa da rotavirüs replikasyonunda kilit rol oynadığı ayrıca rotavirüs enfeksiyonunda düzenleyici olarak görev yaptığı düşünülmektedir (Desselberger, Wolleswinkel-van den Bosch, and Mrukowicz, 2006).

Çizelge 2.1'de Rotavirüsün Yapısal (VP) ve Yapısal Olmayan (NSP) proteinlerinin özellikleri özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Rotavirüsün yapısal (VP) /yapısal olmayan (NSP) proteinlerinin özellikleri

RNA Segmenti	Kodlanan Proteinler	Proteinin moleküler ağırlığı	Proteinlerin özellikleri
1	VP1	12,5	Yapısal protein, iç kor proteini, RNA bağımlı RNA polimeraz, ssRNA'ya bağlanma, VP3 ile kompleks oluşturma, VP2 ile etkileşim
2	VP2	9,4	Yapısal protein, kor proteini, dsRNA ve ssRNA'ya bağlanma, VP1 replikaz aktivitesi için gerekli
3	VP3	8,8	İç kor proteini, guanil transferaz, metil transferaz, VP1 ile kompleks oluşturma
4	VP4	8,7	Dış kapsid proteini, reseptör bağlama, virulans faktörü, nötralizasyon proteini, hemagglütinasyon füzogenik protein, VP5 ve VP8 oluşturma
5	NSP1	5,9	Yapısal olmayan protein, RNA'ya bağlanma, IRF 'ye antagonist
6	VP6	4,5	İç kapsid proteinin, grup ve subgrup antijeni, transkripsiyon için gerekli
7	NSP3	3,5	Yapısal olmayan protein, mRNA bağlayıcı, konak translasyonunu engelleme.
8	NSP2	3,7	Yapısal olmayan protein, RNA ve NSP5 bağlayıcı, viroplazma oluşturma
9	VP7	3,7	Dış kapsid glikoproteini, nötralizasyon proteini
10	NSP4	2,0	Yapısal olmayan protein, transmembran proteini, enterotoksin, hücrede Ca ²⁺ Toplama
11	NSP5	2,2	Yapısal olmayan protein, fosforillenmiş, NSP2 bağlayıcı, VP2 ve NSP6 etkileşimi
	NSP6	1,2	Yapısal olmayan protein, NSP5 dimerizasyonu ve fosforilasyonu

2.3 Sınıflama

Reoviridae familyasının rotavirüs genusun bir üyesi olan rotavirüs kapsid proteininin antijenik özelliğine göre grup, subgrup ve serotipler olmak üzere sınıflandırılır. Her bir rotavirüs grubu kendi içerisinde serolojik çalışmalara tabi tutularak serotip ve serogruplar belirlenir. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ve immunoflorasan (IFA) gibi birtakım serolojik yöntemlerle çapraz reaksiyon gösteren rotavirüs antijenleri saptanabilir. VP6 proteinindeki yapısal farklılıklara göre rotavirüsler A ile G arasında toplam 7 alt gruba ayrılır.

Yalnızca grup A, B, C rotavirüsleri insanda hastalık yapma yetisine sahipken D grubu ise sadece hayvanlarda hastalık etkenidir. Birtakım kuş türleri, memelilerin çoğu ve insanlar üzerinde etkili olan grup A rotavirüsü ciddi derecede önem arz eden bir bağırsak patojeni olmakla birlikte dünya genelinde çocukluk çağı gastroenteritinin en önemli nedenidir (Iturriza Gomara, Wong, Blome, Desselberger and Gray, 2002).

Onbir RNA segmentinin mobilitesine göre grup A rotavirüsleri jel elektroforezinde iki farklı elektroferotip patern sergiler. Hızlı göç eden segmentler uzun (long) elektroferotip ve yavaş göç eden segmentler ise kısa (short) elektroferotip olarak isimlendirilmiştir. Grup A rotavirüsüne ait G1, G3 ve G4 serotipleri tipik olarak subgrup II ve uzun elektroferotip özellik gösterirken G2 serotipi subgrup I ve kısa elektroferotip profil sergilemektedir (Matthijnssens, 2008).

Rotavirüsün G tiplerinin sahip oldukları serotip ve genotipler uyumlu olduğundan isimlendirmede genellikle yalnızca serotipler kullanılmaktadır. Dünya genelindeki insan enfeksiyonları ile ilişkili olan serotipler G1, G2, G3, G4 ve G9 dur (Ustaçelebi, 1999: 973-5).

VP6 proteininde bulunan farklı epitoplara sayesinde grup A rotavirüsleri daha ileri subgruplara (SG) ayrılabilir. Bu subgrupların birbirinden ayırt edilmesinde SG I, SG II, SG I + II veya SG non-I, non-II monoklonal antikorlarına karşı gösterdikleri reaktiviteler kullanılmaktadır. Moleküler özelliklerine göre insan grup A rotavirüsleri arasında sadece subgrup I ve subgrup II ayırt edilebilmektedir. Subgrup II' nin subgrup I' e göre daha sık görüldüğü tespit edilmiştir.

Rotavirüsler her bir grup içerisinde monoklonal antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen nötralizasyon testi ile farklı serotiplere sınıflandırılmaktadır. Dış kapsid proteini olan VP4 ve VP7'nin görevi hücreye bağlanma ve giriş olup serotipe spesifik antijenlerdir. VP7, G serotiplerinin (G: Glikoprotein) belirlenmesinde kullanılan bir glikoproteindir. Proteazı parçalayarak P tip antijeninin belirlenmesinde kullanılan protein ise virüs yüzeyinde bir "spike" proteini olarak bulunan VP4 tür. Mevcut bu iki dış kapsid antijenleri olan VP4 ve VP7 'ye karşı nötralizan antikorların reaktivitesi ölçülebilir. Her iki protein de tip spesifik nötralizan antikor oluşumunu uyarır. Rotavirüslerin sınıflandırılmasında VP4 ve VP7 ikili sistemi olarak kullanılmaktadır²³. Her ne kadar rotavirüsün VP4 segmenti baz alındığında en az 27 farklı P genotipi bulunsa da bunların yalnızca 12 tanesi (P1A[8], P1B[4], P2A[6],

P2C[6], P3[9], P4[10], P5A[3], P6[1], P8[11], P11[14], P12[19] ve P[25]) insanlarda izole edilmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılarak yapılan tiplendirme ve serotiplendirme birbirinden farklı sonuçlar ortaya koyduğu için rotavirüse ait P tiplendirmesi daha karışıktır. Günümüzde insanda enfeksiyon oluşturduğu bilinen 8 adet P serotipi bulunmaktadır: P1A, P1B, P2A, P3, P3B, P4, P5 ve P8. Bu P tipleri arasında en yaygın olanı P[8] ve P[4] olup sırasıyla P1A ve P1B serotiplerine tekabül etmektedir. Bilinen insan rotavirüs P tiplerinin % 90'ından fazlasını P1A[8] oluşturur. P[8] ve P[4] genotipleri ile P1 serotipinin iki subtipi P1A ve P1B arasında benzer çapraz reaktivite mevcuttur. P[4] suşları G2 serotipiyle ilişkili olma eğilimindedir ancak dünya genelindeki rotavirus P[8] suşlarının neredeyse tamamı G1, G3, G4 ve G9 serotipleriyle ilişkilidir ((Manuel, Franco a, Angel and Harry, 2006: 2718–2731).

P serotipleri sadece numara ile ifade edilirken P genotipi sayılar parantez içerisinde belirtilerek ifade edilir. Bunun nedeni henüz P serotipleri ile P genotipleri arasında kurulmuş tam bir korelasyonun bulunmamasıdır. Alternatif bir P tipi isimlendirmesi de hem genotip hem serotip numarası aynı anda kullanılarak 'P1A[8]' şeklinde yapılabilir. G tiplerinde korelasyon tam olarak sağlandığından tip ifade edilirken sadece numaranın yazılması yeterli olmaktadır (Öztürk R.2002: 1226-31).

Dünya genelinde rotavirüs insidansı incelendiğinde serotipler arasında karşılaşılma sıklığının G1P[8] (% 64), G2P[4] (% 12), G3P[8] (% 3), G4P[8] (% 9) ve G9P[8] ve G9P[6] (% 4) şeklinde olduğu görülmektedir. Aşılama çalışmaları için önemli olan bu serotipler nötralizasyon testleriyle birbirlerinden ayrılırlar. Günümüzde tespit edilmiş 23 G ve 31 P serotipi mevcuttur (Ursu, Kisfali, Rigo, Erdelyi, Ivanics and Van, 2009).

Rotavirüsün sahip olduğu segmentli yapısı onun miks enfeksiyon sırasında sıklıkla "reassortment" geçirmesini elverişli kılar. Bu nedenle gelecekte rotavirüse ilişkin G-P kombinasyonlarında artış beklenmektedir.

2.4 Patogenez

Rotavirüsler, 5 yaş altı çocuklarda ciddi dehidratasyonla seyreden, dünya genelinde tüm sosyo ekonomik kitlelerde yaygın olarak görülen ciddi bir gastroenterit etkenidir.

Rotavirüs ince bağırsak villusundaki olgun enterositleri enfekte eder ve bu hücrelerin fonksiyonunu bozar. Hücreye su girişi önlenir. Böylece su ve iyon kaybıyla seyreden ağır dehidratasyon tablosu sergileyen ciddi bir gastroenterite yol açar (Rota ve Fidan, 2007). Rotavirüs enfeksiyonu neredeyse her zaman ince bağırsakta sınırlı kalsa da, tablo enterosit vakuolizasyonu gibi hafif bulgulardan villus küntleşmesi ve kriptlerde hiperplazi oluşması gibi ağır tablolara varan bir spektrum içerisinde kendini gösterebilir. Histolojik lezyonlar hastalığın belirtileriyle bir korelasyon içerisinde değildir. Önceleri rotavirüse bağlı oluşan ishal tablosunun yalnızca enterosit hasarı sonucu oluşan malabsorbsiyona sekonder olduğu düşünülürdü ancak günümüzde buna ek olarak birçok farklı mekanizma sorumlu tutulmakta ve bu mekanizmaların oluşmasında virüs ve konağa ait faktörlerin önemi vurgulanmaktadır.

Kript hücrelerden oluşan kript epithelyum villus enterositlerinin progenitörüdür. Villus hücreleri absorpsiyonu dengelerken, kript hücrelerinin sekresyonu dengelemesiyle enterositler ve kript hücreler arasında oluşan bu koordinasyon sonucunda elektrolitlerin ve suyun epithelyum boyunca sabit iki yönlü akışı sağlanmış olur (Ramig, 2004).

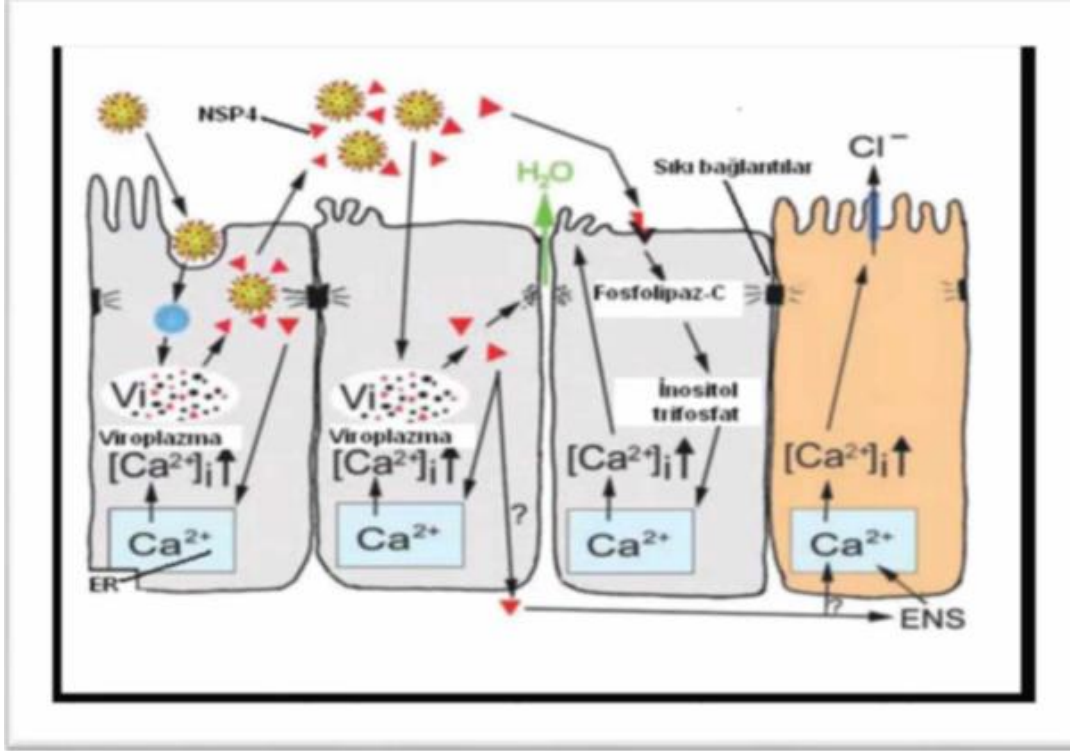
Villus enterositleri enfekte olursa aynı anda plazma membranında ve endoplazmik retikulum membranında kalsiyum geçirgenliği artar .Bu da intraselüler kalsiyum miktarının yükselmesine sekonder hücre ölümüyle sonuçlanan bir dizi reaksiyonu tetiklemiş olur. Mevcut intraselüler kalsiyum artışı F aktin, villin ve tubulin proteinlerini etkileyerek hücre iskeletinin bozulmasına neden olur. Rotavirüs enfeksiyonu sonucunda sodyum, su ve glukozun ince bağırsaktan emilimi azalırken; bağırsak laktaz, alkalen fosfataz ve sükroz düzeylerinde azalma meydana gelince mevcut ishal tablosu giderek ağırlaşmış olur.

Rotavirüs patogenezindeki ilginç faktörlerden biri de viral enterotoksin olarak görev yapan, rotavirüsün yapısal olmayan proteinlerinden biri olan NSP4 proteindir. Yapılan çalışmalarda farelere enjekte edildiğinde ishale sebep olduğu ve toksin benzeri aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. NSP4 endoplazmik retikulumdaki depo Ca^{2+} mobilizasyonunu sağlayarak intraselüler kalsiyum değerini artırmak suretiyle bozar. Kalsiyum dengesinin artmış yönde bozulmasıyla hücre iskelet yapısında değişiklikler meydana gelir, disakkaridazların sentezi azalır, ayrıca sodyum ve solüt transferi engellenir. Eş zamanlı olarak NSP4 enfekte hücreden ortama salınır ve enfekte olmamış diğer hücrelerde toksinin benzer etkileri görülür. Enterik sinir sisteminin uyarılması olası rotavirüs patogenez

mekanizmaları arasında düşünülebilir (Homaidan, Torres, Donowitz and Sharp, 1991: 895–901).

Her ne kadar sekrete edilen NSP4'ün kesin görevi ve hedefi bilinmese de, enterik sinir sistemi (ENS) ile birlikte NSP4 sekresyonda rol alan esas moleküldür. NSP4'ün tabloyu ağırlaştırıcı etkisinin olabileceği düşünülmektedir. NSP4 kript hücrelerinde Ca^{2+} artışı uyarıp Cl^- sekresyonunu aktifleştirerek hücrenin su kaybetmesine neden olmaktadır. NSP4'ün tek başına bir kanal oluşturarak veya Ca^{2+} artışı vasıtasıyla anyon kanalını aktifleştirerek etki edebileceği düşünülmektedir. NSP4'ün enterositler üzerindeki bir başka etkisi ise "tight junctionlar" üzerinedir. Böylece hücreler arasından bol miktarda sıvı ve elektrolit kaybı meydana gelmektedir. Gastrointestinal sistemde villus epitelinin altındaki katman sinir ağı bakımından oldukça zengindir ve enterik sinir sistemi (ENS) olarak adlandırılır. NSP4 enterokromafin hücrelere bağlanır ve bu hücrelerden 5-hidroksitriptamin (5-HT) salınmasını sağlayarak ENS'yi uyarır. Bunun yanı sıra enfekte hücrelerden salgılanan kemokin ve prostaglandinler tarafından ENS uyarılabilir. ENS'nin uyarılması kript hücrelerinden sıvı ve elektrolit salgılanmasının majör tetikleyicisidir. Böylece NSP4 ve ENS'nin rotavirüs enfeksiyonu sırasında ortaya çıkan sekretuar tabloda rol oynayan iki önemli molekül olduğu görülmektedir (Lundgren and Svensson, 2001).

Enfekte hücrelerin viral invazyonu ile birlikte lokal villüs iskemisi gelişeceğinden enterositler normal fonksiyonlarını yerine getiremeyeceklerdir. Villüslerde oluşan bu iskemik hasar kompanse edilebilir hücre bölünmesini stimüle eder ve rotavirüs enfeksiyonlarında barsak geçiş zamanı azalır bu durum barsak motilitesinin arttığı bir göstergesidir. Her ne kadar motilitenin ENS tarafından kontrol edildiği bilinen bir gerçek olsa da moleküler stimülatörünün ne olduğu gizliliğini korumaktadır (Molla, Molla, Sarker and Khatun, 1983).



Şekil 2.2. Rotavirüsle enfekte olan barsak epitel hücresinde gerçekleşen olaylar

2.5. Replikasyon

Rotavirüsün hücreye bağlanma ve hücre içine girme mekanizmaları birçok detay içerdiği için oldukça karmaşıktır ancak henüz tam olarak netlik kazanmış değildir. Hücreye ilk olarak bağlanmasını açıklayan muhtemel bir mekanizmada rotavirüsün enterosit yüzeyinde yer alan integrin ve sialik asit içeren gangliozid gibi reseptörlere bağlanması vurgulanmaktadır. Yalnızca üç tabakalı partiküller (TLP) reseptörlere bağlanabilmektedir. Hücreye giriş ise birden fazla hücrel molekülün aktif rol aldığı karmaşık bir süreçtir. Rotavirüs hücre ile ilk etkileşimini VP8 ile yapar. Güncel veriler arasında VP8'in epitel hücreler arasında yeni tight junctionların oluşumunu engellemek suretiyle virüsün daha derinlerdeki integrin reseptörlerine ulaşmasına olanak sağladığı da yer almaktadır (Nava, López, Arias, Islas and González-Mariscal, 2004).

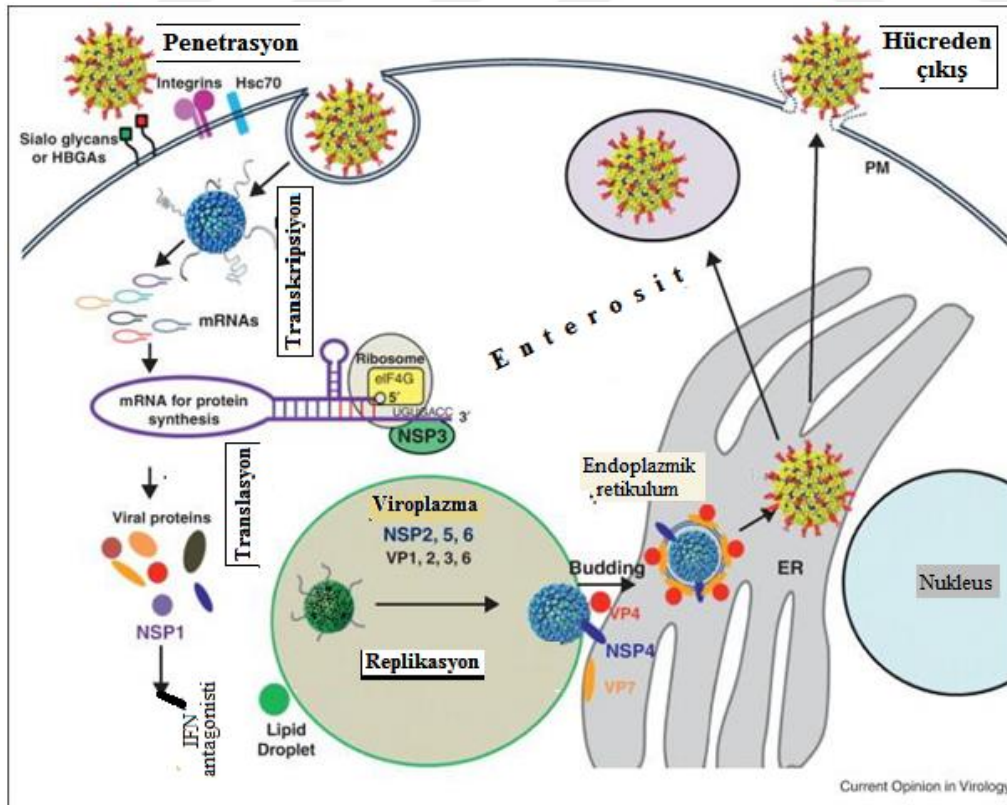
Rotavirüs ile hücre arasındaki bir diğer etkileşim ise VP5 proteini ile hücredeki a2b1 reseptörü arasında gerçekleşir. Etkileşimin ana karakteri VP5'in 208-310 residülerinde bulunan integrin bağlayan motif olan DGE (Asp-Gly-Glu) dir. Ayrıca kısa zaman önce a2 integrin subunitinin I bölgesinin hücrede var olması VP5 in bağlanması için gerekli ve yeter şart olduğu gösterilmiştir. Ayrıca axb2, avb3 ve bir ısı şok proteini olan hsc 70'in de

rotavirüsün hücreye girdikten sonra katettiği basamaklarda rol aldığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda VP7'nin avb3'e bağlandığı da gösterilmiştir (Graham, Takada and Barbara, 2006).

Prodüktif enfeksiyon oluşması VP4'ün proteolitik enzimle ayrışmasını gerektirir. VP4'ün (88kDa) tripsin tarafından polipeptid VP8'e (28 kDa) ve VP5'e (60kDa) ayrıştırılması rotavirüsün enfektivitesini artırır. Her ne kadar bu ayrılma rotavirüsün hücreye bağlanması için gerekli değilse de hücre içine penetrasyonunu artırdığı gibi ayrışmamış virüste de füzyonu uyarabilir. VP8 proteini bağlanmadan sorumlu olduğu gibi aglütinin bölgesi de içermektedir. Hidrofobik bölgeye sahip olan ve bünyesinde füzyon proteini içeren VP5'in hücre penetrasyonu sırasında önemli rolü vardır. Virüs hücre içine penetrasyonunu tamamladıktan sonra kendine özgü proteinleri sentezletmesi ve kendi genomunun ekspresyonu için konak hücre fonksiyonlarını kendi lehine bozması gerekmektedir. Ca^{2+} hücre içine madde girişini ve hücre dışına madde atımını (influx/efflux) kontrol eden ana iyon olduğu için Ca^{2+} un sitoplazmadaki seviyelerinin bozulması virüs patogenezinin en önemli basamağıdır. Intrazitozolik Ca^{2+} seviyesi düştüğünde rotavirüsün dış kapsid proteinleri (VP4 ve VP7) çözünerek virüsün mevcut üç katmanlı yapısını değiştirip transkripsiyon yapabilmesi için aktif olan çift katman halini almasına ve böylece hücreye penetre olabilmesine yardımcı olur. Kendi dış katmanından kurtularak ve katmanlı yapısını değiştirerek hücre içine giren rotavirüs bu girişini ve transkripsiyon açısından aktifleşebilmesini intrazitozolik Ca^{2+} un azalmasına borçludur (Ruiz, Cohen and Michelangeli, 2000).

Rotavirüs çoğalmasını enterositin sitoplazmasında gerçekleştirir. Intraselüler düşük Ca^{2+} ortamında dış kapsid TLP den ayrılır ve transkripsiyonel olarak daha aktif olduğu için virüs çift tabakalı partikül (double-layered particle: DLP) haline transforme olur. Viral RNA polimerazın aktifleşmesiyle birlikte DLP partikülünün içindeki viral RNA'nın mRNA(ssRNA)'ya transkripsiyonu gerçekleşir. Oluşan bu yeni mRNA'lar DLP üzerindeki VP2 ve VP6 protein tabakaları boyunca uzanan kanallardan sitoplazmaya geçer. Hem protein sentezi hem de minus RNA (-RNA) sentezi bu mRNA'lar üzerinden gerçekleştirilir. Yeni sentezlenen VP1 ve VP3 viral proteinleri sitoplazmadaki viroplazma içinde mRNA segmentleriyle birlikte paketlenerek yeni viral koku oluşturur. (-)RNA'nın replikasyonu çift sarmallı RNA molekülü elde etmek için bu kolların içerisinde gerçekleşir. Hemen ardından viroplazm içindeki bu kolların VP6 proteini tarafından

çevrenmesiyle yeni çift tabakalı partiküller (DLP) oluşur. VP6 proteini ile çepeçevre sarılmış kordan oluşan bu çift tabakalı subviral partiküller üzerlerindeki VP6 proteini ile endoplazmik retikulum üzerindeki NSP4 proteinine bağlanarak tomurcuklanma ile geçici zarf kazanır ve endoplazmik retikulumun lümenine girer. Partikül tomurcuklanma sırasında endoplazmik retikulumda bulunan integral membran glikoprotein VP7'yi kazanır. VP4'ün bir sitoplazmik protein olduğu ve partikül bünyesine tomurcuklanma sırasında katıldığı düşünülmektedir. Morfogenezin son aşamasında ER içinde ilerleyen partikül geçici zarfını NSP4 ile birlikte kaybeder ardından dış kapsidi oluşturacak olan VP4 ve VP7 partikül etrafında organize olur ve olgunlaşma sonucunda üç tabakalı partiküller (TLP) oluşur. Endoplazmik retikulum içerisinde tomurcuklanma ve virüsün olgunlaşması yüksek Ca^{2+} konsantrasyonu gerektirir. Hücrenin parçalandıktan sonra virionların serbest kalması bilinen en yaygın hücreden salınma yöntemi olsa da Rotavirüsün endoplazmik retikulumdan hücrenin apikal membranına veziküller içinde taşındıktan sonra vezikülün plazma membranıyla füzyona uğraması sonrasında virionların hücre daha lizise uğramadan hücreden dışarı salılabildiği bildirilmiştir. Şekil 2.5.1'de rotavirüsün replikasyon aşamaları şematize edilmiştir.



Şekil 2.3. Rotavirüsün Replikasyon aşamaları(current opinion in virology)

- Önce Rotavirüs virion partikülü hedef hücredeki reseptöre bağlanır.
- Etrafını çepeçevre sarar hücre zarından oluşmuş vezikül içerisinde hücre sitoplazmasına penetre olur (endositoz). Endozom içerisinde 3 tabakalı partikül halindeyken dış kapsidini bırakarak iki tabakalı partiküle dönüşür ve oluşan bu yeni RNA içeren çift katlı kor partikülü sitoplazmaya çıkar.
- Viral RNA polimerazın etkinleşmesiyle birlikte RNA'nın mRNA ya transkripsiyonu gerçekleşir ve oluşan bu yeni mRNA (+ssRNA)'lardan yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin yanı sıra negatif zincirler sentezlenir.
- Virioplazmada sentezlenen bütün proteinlerin ve RNA parçalarının paketlenmesinin hemen ardından paket içerisinde çift zincirli RNA molekülleri oluşur.
- VP6 proteinlerinin oluşan partiküllerin etrafını çevrelemesi ile virüsler artık çift tabakalı kor partikülü halini alır. Ardından ER'nin NSP4 reseptörlerine bağlanarak dış kapsid proteinleri olan VP4 ve VP7 proteinlerini kazanır.
- Üç tabakalı zarfsız viral partiküller olgunlaşarak hücrede tomurcuklanma yapar ve son olarak hücre lizisinin ardından hücreden çıkar.

2.6. Epidemiyoloji

2003 yılı verilerine göre dünya genelinde 5 yaş altı çocuklarda 114 milyon rotavirüs gastroenteriti vakası bildirilmiştir. Bu vakaların 24 milyonu ayakta tedavi edilmiş, 2.3 milyon olguya ise hastaneye yatırılarak tedavi uygulanmıştır. 2013 yılı verilerine göre rota virüslerin dünya genelinde 5 yaşın altındaki çocuklarda tahmini 200.000 üzerinde mortaliteye sahip olduğu düşünülmektedir. Her ne kadar dünya genelinde ishal ile hastaneye başvuran çocuklarda rotavirüs prevalansı benzer olsa da (~%30-50), sağlık hizmetlerine erişimin sınırlı olması, yetersiz hidrasyon tedavisi, malnütrisyon gibi komorbid durumların daha yüksek prevalansta görülmesinden dolayı rotavirüs enfeksiyonu ölümcül seyreden çocukların % 90'ı sosyoekonomik düzeyi düşük olan ülkelerde yaşamaktadır (Da Silva vd., 2017).

Rotavirüs aşılarının kullanımı öncesinde birçok ülkede yapılan global sürveyans çalışmalarına göre, 5 yaş altı çocuklarda ishal nedeniyle hastanede yatışların % 40'ının rotavirüs kaynaklı olabileceği belirtilmiştir.

Dünya genelinde dolaşımdaki rotavirüs suşlarının % 88'i G1, G2, G3, G4, G9 ve G12, P [8] veya P [4] suşlarından oluşmaktadır. Afrika'da yaygın olan kombinasyon tipleri ise G8P [6], G8P [8] ve G12P [6] dir. Hayvanlarla temasın sık olduğu toplumlarda türler arası geçişlerin gelişmekte olan ülkelerdeki rotavirüs türlerindeki büyük çeşitliliğin temel nedeni olabileceği düşünülmektedir (Iturriza-Gomara, Kang and Gray, 2004).

2.7. Bulaşma

Diğer birçok enterik patojende olduğu gibi rotavirüste de bulaş doğrudan kişiden kişiye veya kontamine su ve yiyeceklerle temas yoluyla mümkündür. Rotavirüs bulaşını önlemede çevresel kontrol çoğu kez etkili bir biçimde gerçekleştirilememektedir. Enfekte bireyler arası bulaş dozu düşüktür ve yayılma oranı yüksektir (Crawford vd.,2017).

Kişiden kişiye fekal oral yolla bulaşın mümkün olmasının yanısıra gelişmekte olan ülkelerde dışkı ile kontamine sular yoluyla da bulaş saptanmıştır. Ek olarak enfekte çarşaf , kumaşlar ve yüzeyler üzerinden veya kontamine bakıcı eli vasıtasıyla çocuklar arasında yayılım mümkündür. Solunum sekresyonlarında ve pnomoni olgularında rota virüs tespit edilen hasta sayısı azdır. Rotavirüs enfeksiyonu nedeniyle hastaneye yatırılmış çocukların odalarından elde edilen hava örneklerinde rotavirüs RNA bulgularının tespit edilmesi , hava yoluyla yayılımın günlük bakım ortamlarındaki önemli rotavirüs bulaş yolu olabileceğini düşündürmektedir (Dennehy, 2000).

Solunum yolundan izole edilen rotavirüs örnekleri mevcut olduğundan rotavirüs enfeksiyonlarına solunum sistemi belirtileri de eşlik edebilir. Hastalardaki aerosol oluşumunun solunum sistemi tutulumu kaynaklı mı yoksa kusma eylemi sırasındaki bir oluşum mu olduğu bilinmemektedir. Yapılan hayvan deneylerinde rotavirüs bulaşının aerosoller tarafından gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir.

Bulaşın önlenmesinde çevresel yüzeylerin etkili dezenfektanlarca temizlenmesi önem taşır. Bu amaçla yüksek oranda alkol içeren preparatlarda klorhekzidin glukonat ve kuarterner

amonyum bileşikleri kullanılması önerilir. Rotavirüsün inaktive olabilmesi için % 70 etanol içine % 0.5 w/v klorheksidin glukonat eklenmesi veya % 40 izopropil alkol içeren kuarterner amonyum bileşikleri, % 95' lik etanol yeterli olacaktır. Bulaşıcı rotavirüs ile kontamine olmuş cansız yüzeye % 70 etil alkol ve % 1 o-fenilfenol karışımı püskürtülerek yapılan deneysel çalışmada karışımın insanlara rotavirüs bulaşını başarılı bir biçimde önlediği gösterilmiştir. Sabunla el yıkamak rotavirüse karşı etkisiz olup, aksine virüsün daha geniş bir alana yayılmasına sebep olabilir. Ellerin yıkanmasında kullanılan hiçbir dezenfektan ellerin yıkanması için harcanan sürede rotavirüsü tamamen inaktive edemez. Enfekte olan çocukla temas öncesi ve sonrası el yıkamanın yanında mutlaka alkol bazlı susuz el dezenfeksiyon maddesi kullanılmalıdır.

2.8. Klinik Bulgu ve Belirtiler

Dünya genelinde gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde yaşayan neredeyse her çocuk 3-5 yaşına kadar rotavirüs ile mutlaka enfekte olur. Her ne kadar neonatal enfeksiyonlar mümkün olsa da anne sütündeki koruyucu antikolar sayesinde asemptomatik veya hafif atlatılır. İki yaş altı çocukların yaklaşık % 42'sinde üç veya daha fazla rotavirüs enfeksiyonu görülür. Tekrarlayan enfeksiyonlar yaygın olur. Belirtiler sonraki her enfeksiyonda daha hafif olur. Rotavirüs enfeksiyonları erişkinlerde genellikle subklinik veya hafif seyredir. Özellikle immün sistemi baskılanmış ve yaşlı kişilerde ciddi enfeksiyonlar görülebilir.(Parashar, Nelson and Kang, 2013)

Rotavirüs enfeksiyonlarının klinik özellikleri değerlendirildiğinde subklinik düzeyde hastalık veya hafif bir ishal tablosundan, kusma ve ateşle seyreden ağır ishal tablosu arasında değişen bir spektrumda olabildikleri görülebilir. Olası ağır ishal tablosu ölümlerle sonuçlanabilecek ciddi dehidratasyon ve elektrolit bozuklukları ile seyredebilir. Hastalık genelde akut ateş ve kusma başlangıçlı olup birkaç gün içerisinde sık ve sulu dışkılama ile karakterize bir seyir gösterir. Enfekte çocukların yaklaşık % 30-40'ında orta dereceli ateş beklenmektedir. Kusmanın genellikle bir veya iki gün sürmesi beklenirken eşlik eden diğer gastrointestinal belirtilerin üç ile yedi gün içerisinde düzelmesi beklenir.

Rotavirüs kaynaklı gastroenteritler kanlı olmayan ishal ile belirti vermesi, sınırlı inflamatuvar yanıtı neden olması ve nispeten daha kısa sürmesi gibi özellikler bakımından bakteri kaynaklı ishallerden ayrılmaktadır. Beklendiği üzere rotavirüs enfeksiyonu geçiren

bir çocuğun serum C reaktif protein ve fekal kalprotektin gibi inflamatuvar belirteçlerinde anlamlı artış gözlenmez. Bu yüzden rotavirüs kaynaklı gastroenteritin noninflamatuvar olduğu kabul edilir ve patogenezin olası iki mekanizma üzerinden işlediği varsayılmaktadır. Bu mekanizmalardan ilki enterosit hasarı ve ölümüne veya epitel hücrelerindeki emilim fonksiyonunda kayba bağlı oluşan malabsorpsiyon tablosudur. İkincisi ise NSP4 aracılı yolk üzerinden sekresyonun artması sonucu oluşan ozmotik diyare ve enterik sinir sisteminin (ENS) NSP4 tarafından uyarılmasıdır. Bunun yanı sıra, rotavirus enfeksiyonunun patolojik bir sonucu olarak hücrelerden 5-hidroksitriptamin (5-HT, ya da bilindiği üzere serotonin) salınması çeşitli yollar üzerinden kusma ve ishali tetiklemektedir.

Rotavirüs enfeksiyonlarının en sık belirtisinin ishal olmasına rağmen, benign konvülsiyonlar, beyincik iltihabı, ensefalopatiler ve ensefalitler gibi ağır tablolar da literatürde yer almaktadır. Örnek olarak Kanada'da yapılan çok merkezli bir çalışma raporuna göre rotavirüs enfeksiyonu laboratuvar tarafından onaylanmış 1359 çocuğun % 7'sinin nöbet geçirdiği bildirilmiştir. Rotavirüs gastroenteriti ile ilişkili olduğu saptanan ani bebek ölüm sendromu, nekrotizan enterokolit, intususepsiyon, Kawasaki hastalığı, ve Tip 1 diyabet gibi birçok hastalık mevcut olsa da, neden sonuç ilişkisi kesin değildir. Rotavirüs gastroenteriti geçiren hastalarda genellikle kısa bir süreliğine serum transaminaz düzeylerinde artış görülmektedir.

2.9. İmmünoloji

Hastalıktan korunma esas olarak bağırsak lümenindeki antikorlarla, özellikle IgA ile sağlanmaktadır. Aktif veya pasif olarak kazanılan antikorlar (kolostrum ve anne sütündeki antikorlar dahil) hastalığın ciddiyetini azaltmakta, ancak enfeksiyonu tam olarak engellememektedir. İlk olarak bir hafta sonra duodenum sıvısı ve serumda özgül IgM cevabı oluşmakta, 1-4 ay kadar sonra duodenum sıvısı ve serumda özgül IgG ve IgA cevabı gelişmektedir. Bir yıl sonra serumda özgül IgG cevabı devam etmekte ancak IgA saptanmamaktadır (Ustaçelebi, Ş, 1999).

Primer rotavirüs enfeksiyonu klasik akut gastroenterit tablosuyla sonuçlansa bile daha sonra gelişen rotavirüs enfeksiyonlarına karşı bağışıklık gelişir ve hastalık riski düşük olur. Yenidoğan rotavirüs enfeksiyonlarında bağışıklık olası tekrarlayıcı enfeksiyona karşı

koruyucu olmasa da bazı klinik vakalarda ağır tabloların oluşumunu önleyebilir (Desselberger ve Huppertz, 2011).

Rotavirüs akut gastroenteritine karşı bağışıklığın serotipe özgü gelişebileceği ve homotipik virüse karşı üretilen nötralizan antikor (NT) seviyelerine bağlı olabileceği ilk defa kanıtlayan Chiba ve ark olmuştur. Nötralizan antikor seviyesinin 1 / 128 ve üzerinde olması rotavirüs hastalığına karşı koruma için yeterlidir. Primer rotavirüs enfeksiyonundan sonra homotipik ve heterotipik nötralizan antikor oluşumunun saptanması çapraz reaktif nötralizan antikor epitoplalarının olabileceğini düşündürmektedir. Heterotipik yanıt yaşça daha büyük ve halihazırda rotavirüs spesifik antikorları taşıyan çocuklarda görülme eğilimindedir. Dışkı numunelerinde rotavirüse spesifik IgA varlığının saptamaya yönelik çalışmalar sonucunda spesifik IgA varlığının hastalığa karşı korumayla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Anne karnındayken plasenta yoluyla elde edilen antikorlar yaşamın ilk birkaç ayında rotavirüse karşı zayıf bir koruma sağlayabilir. Her ne kadar anne sütü bebeklerde hastalığa karşı pasif koruma sağlasa da bunun insanlarda hastalığa karşı korunma açısından ne derece önemli olduğu tartışma konusudur.

İnsan rotavirüsüne karşı gelişen T hücre yanıtını rotavirüs enfekte ve sağlıklı kişilerde karşılaştırmak üzere bir intraselüler sitokin akışı sitometri testi ve ELISPOT kullanılarak yapılan çalışmada göreceli olarak az sayıda CD4⁺ ve CD8⁺ rotavirüse özgü T hücre frekansları saptanmıştır ve bu T hücrelerin interferon (IFN) - γ salgılayabildiği ancak interlökin 13 (IL-13) veya interlökin-4 salgılayamadığı bildirilmiştir. Rotavirüs ile enfekte olmuş kişilerde bu hücrelerin sayısı ya düşük saptanmış ya da hiç saptanamamıştır. Salgılanan sitokinler çocuklarda rotavirüse özgü bir CD4⁺ T hücre paternine uyumlu bulunmamışken neonatal domuzlarda TH1 ve TH2 hücrelerinin birlikte bulunduğu karışık bir patern sergilendiğine ilişkin bulgulara ulaşılmıştır (Angel, Franco, and Greenberg, 2007).

2.10. Tanı

Rotavirüs, gastroenteritli çocukların dışkı örneklerinden elektron mikroskopu, poliakrilamid jel elektroforezi, antijen saptama analizleri, RT-PCR ve virüs izolasyonu gibi

çeşitli tetkikler kullanılarak tespit edilebilir. Radioimmunoassay, counter immunoelektro-ozmoforez, doku kültürü, poliakrilamid jel elektroforezi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemler virüs saptamada etkili olsa da kullanımları oldukça nadirdir. Serum akut ve konvelasan faz antikor titrelerinin, counter immunoelektro-ozmoforez, nötralizasyon ve kompleman fiksasyonu açısından değerlendirilmesi işe yarasa da tanıda önerilmemektedir. Dışkı örneğinin elektron mikroskobu altında tanı amaçlı incelenmesi klinik açıdan pratik değildir çünkü hem pahalı araçlara hem de deneyimli personellere gereksinim duyulmaktadır. (Greenberg and Estes 2009).

Grup A rotaviruslar önceden belirli oranlarda proteolitik enzim tripsin ile muamele edilirse veya besiyerine düşük düzeyde tripsin ilave edilirse hücre kültüründe üretilmektedir. Virus izolasyonu için en sık kullanılan hücreler maymun böbrek hücre dizisi MA104 ve insan kolon karsinoma hücre dizisi CaCo-2'dir. Sitopatik etki minimaldir. (Kirkwood ,Bishop ,and Coulson 1998).

Rotavirüs enfeksiyonunun tanısı ilk olarak serum agglütinasyonu ve elektron mikroskobu ile yapılmıştır. Enfeksiyonun akut fazı sırasında dışkıyla atılan rotavirüs partikülü sayısı yüksektir ($10^{11}/g$) ve ishalin şiddetlenmesiye bu sayı daha da artabilir. Dışkı örneklerinden doğrudan elde edilen rotavirüs RNA'sının tespitinde poliakrilamid jel elektroforezi kullanılmaktadır. Bu yolla dolaşımdaki suşlar ile çift sarmallı RNA genomunun 11 segmentinin elektoroforetik göç paterni arasındaki ilişki analiz edilebilir.(Parashar UD, Nelson EA and Kang G. 2013).

Sonucun tedaviye herhangi bir katkısı olmadığından gastroenteritli çocuklarda rotavirüs pozitifliği için rutin olarak test yapılmamaktadır (Telmesani, 2010). Pozitiflik saptandığı takdirde çocuk nozokomiyal yayılımın önlenmesi açısından izole edilebilecekse etken olarak rotavirüsün saptanması faydalı olabilir. Antijen testinin pozitif çıkması hekimlerin yanılıp seyahat ilişkili rotavirüs isheline yönelik gereksiz antibiyotik reçete etmelerini önlemede yardımcı olur (Anderson and Weber, 2004). Test etme sürecinde ticari olarak temin edilebilen enzime bağlı immunosorbent assay ELISA ve immunokromatografik antijen saptama testleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir (% 90-95). Pozitif sonuç elde edebilmek için minimum 10^4 - 10^7 virion gerektirmesi dışında ticari testler ucuz ve uygundur. Yalancı pozitiflik oranı % 3-5

arasında değişen ticari testlerin en büyük handikapı Grup A dışındaki rotavirüs suşlarını tespit edemeyişleridir.

ELISA yöntemiyle rotavirüs dışkıyla atımının tespiti ancak hastalıktan sonraki ilk bir hafta içerisinde mümkünken RT-PZR gibi daha duyarlı metotlar daha uzun süre tespit sağlayabilmektedir. Virüsün dışkıyla atımı 4 ile 57 gün arasında değişmektedir ve atılan RNA miktarı çocuklarda ishalin şiddetiyle doğru orantılıdır ancak yenidoğanlarda böyle bir durumdan söz edilemez. 1 yaş altı çocuklarda RT-PZR kullanarak rotavirüs enfeksiyonu tespit edildiğinde % 29 oranında asemptomatik enfeksiyon tespit edilse de teşhisin doğrulanması için atılan viral RNA miktarı dikkate alınıp detaylı bir biçimde değerlendirilmelidir.

Rotavirüs suşlarının sırasıyla G ve P tipi olarak ikili sınıflandırılmasında kullanılan VP4 ve VP7 genotipleri hakkında bilgi sağladığı için RT-PZR araştırma laboratuvarlarında viral genomu saptamak için sıklıkla kullanılmaktadır.

2.11.Tedavi

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Çocuk Fonu (UNICEF) Oral Replasman Tedavisi (ORT) kapsamında, oral rehidrasyon tuzlarını (ORS) dehidrasyonu önleme amacıyla 1978'te ilk tercih olarak kabul ettiğinden bu yana 5 yaş altı ölen çocuk sayısı 4.5 milyondan 1.8 milyona düşmüştür. Böylesine başarılı bir tedavi yöntemine rağmen gelişmekte olan ülkelerde çocuk ölüm nedenleri arasında ishal ilk sırada yer almaktadır. İshalin şiddetini azaltmak, süresini kısaltmak ve ishal oluşumunu önlemek için geliştirilen onlarca tedavi yöntemi arasından en önemli üç yöntem düşük osmolariteli ORS, çinko takviyesi ve rotavirüs aşısıdır.

Kolera dışı ishal için azaltılmış osmolariteli bir solüsyonun (sodyum 75 mmol / L, glukoz 75 mmol / L ve toplam ozmolarite 224 mmol / L) rutin tedavide kullanımı 2002 yılında WHO tarafından önerilmiştir. Tedavinin rehidrasyon ve bakım aşamalarında emzirmenin devam ettirilmesi büyük önem taşımaktadır. Mümkün olan en kısa sürede beslenmenin tekrar başlatılması ishalin süresini ve şiddetini azaltmaktadır. Planlanmamış intravenöz sıvı kullanımında, kusma atakları ve kalıcı ishal gelişim riskinin erken yeniden beslenme ile arttığını gösteren herhangi bir kanıt mevcut değildir. Hafif-şiddetli dehidratasyonu olan

çocukların beslenmesinde laktoz içeren besinlerin içermeyenlere kıyasla ishal süresini kısalttığı bildirilmiştir. Akut gastroenteritli çocuklarda laktoz içeren besinlerin zararlı olduğuna dair kanıta dayalı veri mevcut değildir.

Daha çok klinik öncesi çalışmalarda rotavirüs gastroenteritinin tedavisinde antiviral tedavi üzerine çalışılmış fakat klinik çalışmalarda rutin olarak kullanılmamıştır. Geniş spektrumlu bir antiviral ilaç olan Nitazoxanide ishal süresini ve hastanede yatış süresini azaltması nedeniyle kullanılabilir. Nitazoxanide'in etki mekanizması viral morfogenezin engellenmesi üzerinden rotavirüs replikasyonunun engellenmesidir.

Kusma epizodlarını azalttığı, intravenöz rehidrasyon ve hastaneye yatış ihtiyacını azalttığı tespit edildikten sonra antiemetiklerin rotavirüse bağlı ishal tedavisinde kullanımı bir önceki “önerilmemektedir” durumundan “muhtemelen tavsiye edilir” statüsüne taşınmıştır. Bir doz ondansetron intravenöz rehidratasyona olan ihtiyacı azaltabilir fakat ishal sayısını artırabilir. Yoğun kusma ataklarıyla seyreden bir rotavirüs gastroenteritli çocuğun tedavisinde ondansetronun sağlayacağı maksimum fayda ancak erken dönemde başladığında elde edilebilir.

Tedavi potansiyeli taşıyan diğer iki ajan ise racecadotril ve smektit'tir. Bağırsaktaki enkefalinazı inhibe ederek bağırsak lümenine su ve elektrolit atılımını azaltarak etki gösteren racecadotril tedavisinin 48 saat içerisinde ishal çıkış sayısının önemli ölçüde azalttığı, yan etki sıklığını ise arttırmadığı gösterilmiştir. Ek olarak yedi adet klinik çalışma üzerinden hazırlanan bir meta-analize göre racecadotril kullanımı plasebodan daha etkili iken hasta çocuklarda ishal çıktı süresi veya hastalık süresi üzerinde herhangi bir etkiye sahip değildir. Endotoksin, ekzotoksin, bakterilere ve viral partiküllere bağlanabilen bir adsorban olan smektit, akut ishali olan çocuklara uygulandığında ishal süresini % 18-29 oranında azaltmaktadır. Ayrıca smektitin istenmeyen belirtilerde herhangi bir artışa sebep olmaksızın 5. günde tedavi etkisini artırdığı gösterilmiş ve böylece rotavirüs gastroenteritinin tedavisinde fayda sağlayabileceği bildirilmiştir.

Lactobacillus ve *Bifidobacterium* türleri ve *Saccharomyces boulardii* gibi probiyotiklerin kullanılması rotavirüs enfeksiyonunu önlemede ve rotavirüs ishal süresini kısaltmanın yanı sıra ishal şiddetini ve tekrarlayan enfeksiyonların insidansını azaltmakta etkili bulunmuşlardır. İmmün yanıtın ve viral partikül atılımının modülasyonunu da sağlayan bu

probiyotiklerin aksine insan sütü oligosakkaritleri içeren sialik asit gibi prebiyotiklerin kullanımını indirgenmiş rotavirüs enfektivitesi ve replikasyonu ile yakından ilişkilendirilmiştir (Gonzalez-Ochoa vd., 2017).

2.12. Korunma

Rotavirüs aşı uygulamasından sonra birçok ülkede enfeksiyonlarda azalma gözlemlenmiştir. Ulusal çocukluk çağı aşı programına alınan ülkelerin 10 yıllık izlem raporlarında belirtildiği üzere 5 yaş altı çocuklarda tüm ishal nedenleriyle hastaneye yatış oranlarında ortalama % 38 (% 5-65 arasında değişen), özellikle rotavirüs isheline bağlı hastaneye yatışlarda ortalama % 67 (% 18-84 arasında değişen) ve tüm nedenlere bağlı ishal ölümlerinde % 42 (% 3-64 arasında değişen) oranında azalma meydana gelmiştir.

Doğum kohortlarına göre çocuklar yaşamın ilk iki yılında 4 veya 5 kere rotavirus ile enfekte olurlar. Tekrarlanan enfeksiyonlarda ciddi rotavirüs gastroenteriti insidansı giderek azalmaktadır. Oral yolla uygulanan canlı zayıflatılmış rotavirüs aşılarının geliştirilmesindeki temel amaçların doğal rotavirüs enfeksiyonunu taklit etmek ve böylece olası ciddi rotavirüs gastroenteritini önlemek olduğu söylenebilir.

1980'li yılların başında insanlarda gastroenterit etkeni olan rotavirüse karşı aşı geliştirme yönünde gösterilen ilk çabalar, normalde hayvanları enfekte eden suşlar hedef alınarak çocukları bu suşlara yönelik aşılama üzere "Jennerian" tekniği kullanılarak hazırlanmıştır (Tıpkı Edward Jenner'in çiçek hastalığına karşı ürettiği inek kökenli cowpox aşısı gibi). Zayıflatılmış bir sığır rotavirüs suşu gnotobiyotik buzağılara enjekte edildiğinde onları insan rotavirüsü 66-69 ile takipli tehdide karşı korumuştur. İlk aşı çalışmalarından elde edilen birkaç önemli bulgu şu şekilde özetlenebilir: RIT4237 sığır rotavirus aşısı adayı Finli çocuklarda şiddetli gastroenteriti önlemede güvenilir ve oldukça etkili (% 80 den fazla) olsa da Afrikalı ve Latin Amerikalı çocuklarla yapılan klinik çalışmalarda aynı etkiyi gösterme konusunda hatırı sayılır derecede eksik kalmıştır. RIT4237 aşısının ciddi hastalıkları önleme üzerine etkisi herhangi bir ishali önleme üzerine olan etkisinden daha fazlaydı (sonraki aşı adaylarında olduğu gibi). Korunmada aşı serotipinin rolü düşünüldüğünde şaşırtıcı bir biçimde, RIT aşısı dolaşımdaki bütün insan rotavirüs suşları ile antijenik açıdan uyumsuz olmasına karşın bağışıklık ve koruma açısından etkili olmayı

başarmıştır. Afrika’da yapılan klinik deneylerde başarısız olduğu için RIT4237 aşısı adayı çalışmalarına son verildi.

Bir simian rotavirüsün (RRV) ön çalışmalarda etkili olduğu tespit edilince monovalan bir aday olarak değerlendirmeye tabi tutulmuş ancak takip eden çalışmalarda etkinliğinde azalma meydana gelmişti. Bu başarısızlığın temelinde RRV aşısının (G3) serotipi ile dolaşımdaki insan serotipi arasındaki uyumsuzluktan kaynaklandığı öne sürülmüştür.

Dünyadaki ilk lisanslı rotavirüs aşısı (RotaShield, Wyeth, ABD) 1998 yılındaki bağışıklamanın ardından intussusepsiyon riskinde artış göstermiş (her 5 000 – 10 000 vakada 1 intussusepsiyon vakası) böylece üretici firma tarafından toplatılmıştır. Bunun olağan bir sonucu olarak rotavirüs enfeksiyonu ile intussusepsiyon arasında neden sonuç ilişkisi olduğuna inanılmaktadır.

2004 yılında rotarix aşısının önce Meksika’da daha sonra diğer Latin Amerika ve Avrupa ülkelerinde kullanım onayı alması üzerine rotavirüs aşısı alanı hatırı sayılır ölçüde genişlemiştir. Dahası 2006 yılında bir sığır-insan reasortant aşısı olan RotaTeq’in ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmasıyla aşısı sahası daha fazla ilerleme katetmiştir. RotaTeq her biri farklı bir ana WC3 sığır suşundan üretilen 5 adet "reassortant" rotavirus suşundan oluşmaktadır. Ayrıca aşıda kullanılan bu suşların her biri insan kökenli bir rotavirüsün VP4 veya VP7 proteinlerini kodlayan bir gen içermektedir. Bir çocuğun maruz kalabileceği virüslerin çoğunu tek bir aşıda toplamanın bağışıklık kazandırmada en etkili yöntem olacağı fikrinden hareketle bu aşısı hazırlanmıştır. RotaTeq aşısının "pentavalan" bir aşısı olarak adlandırılması yanıltıcıdır çünkü aşısı sığır rotavirusuna ait 2 adet nötralize edici antijene (G6 ve P7 [5]) ek olarak insan rotavirusuna ait beş adet gen ürünü içermektedir. Rotarix’in aşısı içeriği, doğal olarak rotavirüs gastroenteritine sahip bir çocuktan izole edilen 89-12 suşundan üretilmiştir. Benzer P1A [8] G1 suşları ile enfekte olduklarında çocukların oluşturduğu nötralizan antikorlar arasında çapraz reaksiyon geliştiğinden dolayı 89-12 suşu kullanılmak üzere seçildi. Ayrıca mevcut suşlara maruziyet sonucu oluşan semptomatik veya asemptomatik enfeksiyon, bir sonraki mevsimdeki rotavirüs ishaline karşı % 100 koruma sağlamaktadır. Tek bir insan rotavirüs soyundan üretilen bu aşısının temelinde "doğal bir rotavirüs enfeksiyonu geçirmek, ikinci bir enfeksiyonun önlenmesinde çok derecede etkili bir yoldur" fikri yatmaktadır.

Parashar vd., tarafından yayımlanan makaledeki çizelgeye göre hazırlanan Çizelge 2.2’de bilinen iki rotavirüs aşısı Rotarix ve RotaTeq’in özellikleri özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Rotarix ve RotaTeq aşılarının karşılaştırmak özellikleri

Özellik	Rotarix	RotaTeq
İçeriği	Tek insan rotavirüs suşu (P1A [8], G1)	Sığır rotavirüs suşu WC3 (P7 [5], G6): G1 x WC3 olan beş insan G / P reasortantı; G2 x WC3; G3 x WC3; G3 x WC3; P1A [8] x WC3
Doz miktarı ve sayısı	Her bir doz (1–1,5 mL) en az 10^6 adet hücre kültürü enfeksiyöz dozu içerir. 2 oral doz	Her bir doz (2 mL), reasortant başına en az $2.0–2.8 \times 10^6$ enfeksiyöz ünite içerir. 3 oral doz
Aşı programı*	Doz 1: en az 6 haftalık; Doz 2: en az 4 hafta sonra; 24 haftalık olana kadar tamamlanır	Doz 1: 6–12 haftalık; 2 ve 3. dozları: 4–10 haftalık aralıkla; 32 haftalık olana kadar tamamlanır.
Raf ömrü & Saklama koşulları	36 ay 2-8 °C’de ışıktan korunur.	24 ay 2-8 °C’de ışıktan korunur.

*Yaşa göre aşırı doz parametreleri, ayrı ayrı ülkelerin aşılama programlarına ve önerilerine göre değişiklik göstermektedir.

Uygulama sonrasında dünya çapında homotipik ve heterotipik bağışıklık sağlayan Rotavirüs aşılarının özellikle gelişmekte olan ülkelerde ne derecede heterotipik koruma sağladığı yönünde araştırmalar yapılmaktadır. Rotavirüs hastalığının prevalansını azaltmada içme suyu kaynakları ve sanitasyon konusunda uygulanan gelişmeler yeterli olmadığı için, rotavirüse bağlı akut gastroenteriti önleme ve hastalık yükünü azaltmada en etkili halk sağlığı stratejisinin aşılama olduğu düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması ve Çalışma Planı

Bu çalışmaya Ocak 2013 ile Nisan 2018 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran akut gastroenteriti olan ve dışkı örneklerinde immunokromatografik test ile rotavirüs antijeni pozitif saptanan hastalar dahil edilmiştir. Hastaların yaş, cinsiyet, başvurdukları poliklinik/servis, ön tanı, numune gönderilme tarihi, dışkı mikroskopisinde görülen lökosit, parazit bilgileri ve istenmişse dışkı kültür sonuçları, kusma, ishal ve ateş bilgileri kaydedilmiştir. Dışkı örnekleri Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi ile çalışılmaya kadar -80°C derin dondurucuda (Sanyo, Japonya) saklanmıştır.

VP4 ve VP7 gen amplifikasyonu 'Revers Transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR), Access Quick RT-PZR kiti (Promega Corporation, Madison, WI, ABD) ile yapılmıştır. VP4 gen amplifikasyonu con-2 ve con-3 primerleri ile, VP7 gen amplifikasyonu ise Beg 9 ve End 9 primerleri ile çalışılmıştır. G ve P spesifik genotiplendirme reaksiyonları PZR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, ABD) ve Termal Cykler (ThermoHybaid PZR Px2, İngiltere) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. İmmunokromatografik Yöntemle Gaitada rotavirüs Antijeninin Saptanması

Taze dışkı örneklerinde rotavirus ve enterik adenovirus antijenlerinin varlığı kalitatif immunokromatografik yöntem ile araştırılmıştır. Duyarlılığı; rotavirus için % 96,8-% 99,9 enterik adenovirus için % 95,6 - % 99,9 olarak bildirilen test (AllTest, Rotavirus ve Adenovirüs Combo Test Cassette (Feces), China) üretici firma önerileri doğrultusunda çalışılmıştır.

AllTest® Rota-Adeno kiti (AllTest, China) içindekiler (Resim 2):

- Test kaseti
- Dışkı sulandırma tamponu

- Tek kullanımlık dışkı damlalığı

İmmünokromatografik testin uygulanışı:

1. Fekal örnekleri toplamak için:

Yeterli virüs partikülleri elde etmek için temiz, kuru örnek toplama kabında yeterli miktarda dışkı (1-2 ml veya 1-2 g) toplandı. Test, toplamadan sonra 6 saat içinde gerçekleştirilirse, en iyi sonuçlar elde edilecektir. Toplanan numune, 6 saat içinde test edilmediğinde, 2-8 ° C'de 3 gün saklanabilir. Uzun süreli depolama için, örnekler -20 ° C'nin altında tutulmalıdır.

2. Fekal örnekleri işlemek için:

Katı Örnekler İçin : Örnek toplama tüpünün kapağını söküldü, daha sonra yaklaşık 50 mg dışkı (bir bezelyenin 1/4 eşdeğerine eşdeğer) toplamak için numune toplama aplikatörünü fekal numuneye en az 3 farklı yerde rasgele batırmıştı .

Sıvı Örnekler İçin : Damlalığı dikey olarak tutunmuştur, fekal örnekleri aspire edilmiştir ve daha sonra ekstraksiyon tamponu içeren numune toplama tüpüne 2 damla sıvı numunesi (yaklaşık 50 µL) aktarmıştır.

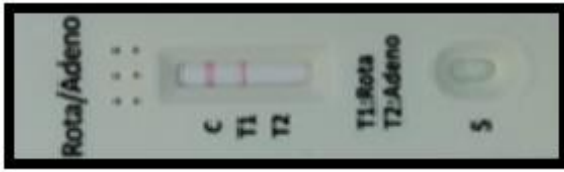
3. Kapağı örnek toplama tüpüne sıkıldı, ardından numune toplama tüpünü karıştırıp örnek toplama tüpünü karıştırmıştır. Toplama tüpünü 2 dakika boyunca reaksiyona bırakmıştır.

4. Açmadan önce poşeti oda sıcaklığına getirmiştir. Test kasetini folyo poşetten çıkarmıştır ve bir saat içinde kullanmıştır. Test, folyo kese açıldıktan hemen sonra gerçekleştirilirse en iyi sonuç alındı.

5. Örnek toplama tüpünü dik tutun ve uçtaki kapağı açıldı. Numune toplama tüpünü ters çevirin ve ekstrakte edilen numunenin 2 tam damlasını (yaklaşık 80µL) test kasetinin örnek kuyucuğuna (S) aktarın ve sonra zamanlayıcıyı başlatıldı. Numune kuyusundaki (S) hava kabarcıklarını hapsedmekten kaçındı.

6. Numuneyi dağıttıktan 10 dakika sonra sonuçları okuyundu. 20 dakika sonra sonuçları okumadık.

7. Testin doğru değerlendirilmesi için kontrol çizgisinde (C) kırmızı renkli çizgi oluşumu gözlenmiştir. Kontrol çizgisi oluşmayan test geçersiz sayılmış ve tekrar edilmiştir. T1’de kırmızı çizgi oluşumu Rotavirüs pozitif, T2’de kırmızı çizgi oluşumu adenovirüs pozitif, T1 ve T2’de kırmızı çizgi oluşumu rotavirüs ve adenovirüs pozitif, T1 ve T2’de kırmızı çizginin oluşmaması durumunda Rotavirüs ve Adenovirüs negatif olarak değerlendirilmiştir.
8. Virüs yüküne bağlı olarak kırmızı çizginin yoğunluğu değişebileceği için hafif kırmızı çizgiler de pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Resim 3.1. İmmunokromatografik yöntemle dışkıda rotavirüs antijen pozitifliği

3.3.Dışkı Örneklerinden Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Dışkı örneklerinden nükleik asit ekstraksiyonu QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak spin-kolon yöntemi ile üreticinin talimatları doğrultusunda yapılmıştır.

QIAamp® Viral RNA Kit (250) (QIAGEN, Almanya) içeriği (şekil 3.1):

- QIAamp Mini Spin Kolonlar, 250 adet
- Tüpler (2 ml’lik), 1000 adet
- Buffer AVL, 5 x 31 ml
- Buffer AW1 (konsantre), 98 ml
- Buffer AW2 (konsantre), 66 ml
- Buffer AVE, 10 x 2 ml
- Carrier RNA (poly A), 5 x 310 µg

QIAamp® Viral RNA Kit (250) (QIAGEN, Almanya) Çalışma Protokolü:

- 1- Liyofilize Carrier RNA (310 µg) içeren tüpe 310 µl Buffer AVE eklenir.

- 2- Buffer AW1'in içerisinde 130 ml %96-100 etanol eklenir.
- 3- Buffer AW2'in içerisinde 160 ml %96-100 etanol eklenir.
- 4- $n \times 0,56 \text{ ml} = y \text{ ml}$

$$y \text{ ml} \times 10 \mu\text{l/ml} = z \text{ ml}$$

n= Örnek sayısı y= Hesaplanan Buffer AVL miktarı

z= Carrier RNA-Buffer AVE karışımı miktarı

Yukarıdaki formüllere göre; gerekli miktarda Buffer AVL içerisinde, gerekli miktarda Carrier RNA-Buffer AVE karışımı eklenir ve ters-düz edilerek karıştırılır.

- 1- Hazırlanan Carrier RNA içeren Buffer AVL karışımı 1,5 ml'lik tüplerin her birine 560 μl olacak şekilde dağıtılır.
- 2- Hasta örnekleri tüplere 140 μl hacimde eklenir ve 15 saniye vortekslenir.
- 3- Oda sıcaklığında (15-25°C) 10 dakika inkübe edilir ve spin santrifüj yapılır.
- 4- Her bir tüpe 560 μl etanol (%96-100) eklenir ve 15 saniye vortekslenildikten sonra, spin santrifüj yapılır.
- 5- Spin-kolon filtreli tüpler hazırlanır ve 8. adımda hazırlanan solüsyondan her bir spin-kolon tüpüne 630 μl olacak şekilde aktarılır. 8 000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir ve filtreli tüpler temiz tüplere aktarılır. Kirli tüpler atılır.
- 6- Dokuzuncu adım (önceki adım) tekrarlanır.
- 7- Üzerine 500 μl Buffer AW1 eklenir ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir, filtreli tüpler temiz tüplere aktarılır. Kirli tüpler atılır.
- 8- Üzerine 500 μl Buffer AW2 eklenir ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenir, filtreli tüpler temiz tüplere aktarılır. Kirli tüpler atılır.
- 9- Filtrede Buffer AW2 kalıntısı kalmaması için, maksimum hızda 1 dakika santrifüjlenir ve filtreli tüpler temiz 1,5 ml'lik tüplere aktarılır, kirli tüpler atılır.
- 10- Filtreli tüplere 60 μl Buffer AVE eklenir ve 1 dakika inkübasyondan sonra 8 000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir. Filtreli tüpler atılır, alta geçen sıvı ekstrakte edilen nükleik asidi içermektedir. Bir sonraki çalışma aşamasına kadar -80°C derin dondurucuda saklanır.



Resim 3.2. QIAamp® Viral RNA Kiti (QIAGEN, Almanya)

3.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Rotavirusun VP7 ve VP4 genlerinin amplifikasyonu, Access Quick RT-PCR kiti kullanılarak (Promega Corporation, Madison, WI, ABD) kullanılarak LightCycler 2,0 (Roche, Almanya) cihazında çalışılmıştır. VP4 gen amplifikasyonu con-2 ve con-3 primerleri ile VP7 gen amplifikasyonu ise Beg 9 ve End 9 primerleri ile çalışılmıştır.

3.4.1. VP-7 amplifikasyonu için RT PZR amplifikasyon karışımının hazırlanması

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

Toplam 48 µL

Çizelge 3.1. VP7 primer dizileri

Beg9(1-28) Wa.28mer	5'GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG3'
End9 (1062-1036) SA11. 27mer	5'-GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG-3'

3.4.1.a. VP-7 amplifikasyon basamakları

- 1- Kalıp dsRNA'dan 4 µL kadar yeni ependorflara alınmıştır.
- 2- 97 °C'de 5 dakika'da denatürasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
- 3- Hızlı bir şekilde örnekler buz üzerine alınarak 5 dakika bekletilmiştir.

- 4- Her bir örnekten 2,5 µL alınarak, önceden hazırladığımız 48 µL mastermix bulunan ependorflara dağıtılmıştır.
- 5- Termal cyclus cihazında aşağıdaki süreler ve sıcaklıklar ayarlanarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

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

} x 1 Siklus

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

} x 39 Siklus

72°C'de 5 dakika

} x 1 Siklus

- Reaksiyon sonunda cDNA'lar elde edilmiş olur. Bir sonraki çalışma aşamasına kadar +4 °C derin dondurucuda saklanır.

3.4.2 Con2 ve Con3 primerleri kullanılarak RT-PZR ile VP-4 amplifikasyonu

Çizelge 3.2. Rotavirus VP-4 amplifikasyon primerleri

Primerler	Baz dizimleri
con2a(868-887)	5'-ATTCGGACCATTATAACC-3'
con3(11-32)	5'-TGGCTTCGCTCATTATAGACA -3'

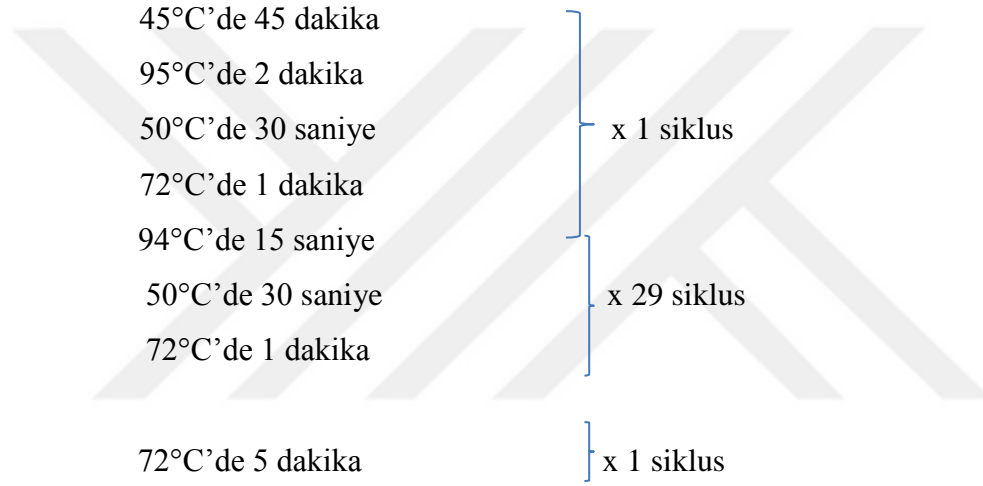
3.4.2.a VP-4 amplifikasyonu için RT mastermix hazırlanması

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

Toplam 49 µL

3.4.2.b VP-4 amplifikasyon basamakları

1. Kalıp dsRNA'dan 3 μ L alınarak 97 °C'de 5 dakika süre ile denatürasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
2. Hızlı bir şekilde örnekler buza konularak 5 dakika bekletilmiştir.
3. Her bir örnekten 2 μ L alınarak, önceden 49 μ L RT Mastermix ile doldurulmuş tüplere dağıtılmıştır.
4. Termal cycler cihazında aşağıdaki süreler ve sıcaklıklar ayarlanarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



- Reaksiyon sonunda cDNA'lar elde edilmiş olur. Bir sonraki çalışma aşamasına kadar +4 °C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.5 Nested PZR ile G ve P Tiplendirme

G ve P spesifik genotiplendirme reaksiyonları PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, ABD) ve Termal Cycler (ThermoHybaid PCR Px2, İngiltere) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.1 Nested PZR ile G Tiplendirme

Çizelge 3.3. Rotavirus G tiplendirme primerleri

Primerler	Baz dizilimleri
VP7-R (914-932) 20 mer	5'-AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC-3'
G1(aBT1): (314-335) Wa.22mer amplicon: 618bp	5'-CAAGTACTCAAATCAATGATGG-3'
G2(aCT2): (411-435)DS-1.25mer amplicon: 521 bp	5'-CAATGATATTAACACATTTTCTGTG-3
G4(aDT4): (480-498)ST3.19mer amplicon:452bp	5'-CGTTTCTGGTGAGGAGTTG-3'
G3 (250-269) 19mer amplicon: 682bp	5'-ACG AAC TCA ACA CGA GAG G-3'
G9 (757-776) 20mer amplicon: 179 bp	5'-CTT GAT GTG ACT AYA AAT AC-3'

2 X PCR Master Mix (Promega) 25 µL	
VP7-R (10 µM).....final 0.2 µL 1 µL	
aBT1 (10 µM).....final 0.2 µL 1 µL	
aDT4 (10 µM).....final 0.2 µL 1 µL	
G2 (10 µM).....final 0.2 µL 1 µL	
G3 (10 µM).....final 0.2 µL 1 µL	
G9 (10 µM).....final 0.2 µL 1 µL	
Nuclease free water	18 µL

Toplam 49 µL	

Her bir örnekten 2 µL alınarak, önceden hazırladığımız 49 µL mastermix bulunan ependorflara dağıtılmıştır.

Termal cyler cihazında aşağıdaki süreler ve sıcaklıklar ayarlanarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

95°C'de 1 dakika	} x 30 siklus
42°C'de 2 dakika	
72°C'de 1 dakika	

Süre bitiminde PZR ürünü +4°C'de saklanmıştır.

3.5.2. Nested PZR ile P tiplendirme

Çizelge 3.4. Rotavirus P tiplendirme primerleri

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

3.5.2.a P-tiplendirme için PZR Mastermix hazırlanması:

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

Önceden 49 µL Master Mix ile doldurulmuş ependorflara kalıp cDNA'dan 1.5 µL eklenmiştir.

Termal cycler cihazında aşağıdaki süreler ve sıcaklıklar ayarlanarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

94°C'de 10 saniye	} x 30 siklus
42°C'de 30 saniye	
72°C'de 30 saniye	
72°C'de 5 dakika	} x 1 siklus
Süre bitiminde PZR ürünü +4°C'de saklanmıştır.	

3.6. Agaroz jel elektroforezi

RT-PZR sonucunda oluşan amplifikasyon ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek rotavirüs pozitifliği saptandı ve pozitif bulunan örneklerin tiplendirmesi yapılmıştır.

3.6.1. Agaroz jelin hazırlanması:

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

54 g Tris -Base (Ambresco, ABD)

27,5 g Borik Asit (Merck, Almanya)

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

Tüm maddeler eritilerek distile suyla hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

3.6.2. Agaroz jel elektroforezinin uygulanışı:

Agaroz jelin malzemeleri:

-1X TBE

- Agaroz

- Etidyum Bromid

Agaroz jel elektroforezinin uygulanışı:

- 1- Hazırlanan 100 ml 5X TBE stok solüsyonu 400 ml distile suda dilüe edilerek 1X TBE'ye çevrilmiştir.
- 2- Hassas terazide (Schimadzu, Japonya) 2 g agaroz (AppliChem, Almanya) tartılıp erlenmayere konulmuştur.
- 3- Agaroz üzerine 100ml 1X TBE'den ilave ederek ve mikrodalga fırında en düşük sıcaklıkta agaroz tamamen çözülünceye kadar beklenerek ısıtılmıştır.
- 4- Agaroz tamamen çözüldükten sonra biraz soğuması beklenmiş, ancak agarozun katılaşmamasına dikkat edilmiştir.

- 5- Hazırlanan jeli elektroforez tankında bulunan kalıba dökmeden önce içine bir renklendirici olan 0,2 µl DNA boyası Etidyum Bromid (5µl/10ml AppliChem, Almanya) eklenmiştir.
- 6- Kalıp içerisine taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan jeli dikkatli bir şekilde dökerek baloncuk oluşması önlenmiştir.
- 7- Jeli oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika kadar bekleterek katılaşması sağlanmıştır.
- 8- Tamamen katılaştıktan sonra taraklar çıkartıldı ve jel elektroforez tankının (CS Cleaver Scientific Inc. Warwickshire, İngiltere) içerisine yerleştirilmiştir.
- 9- Tankın içine jelin üst kısmı kaplanana kadar 1X TBE tamponu konulmuştur.
- 10- Alüminyum folyo üzerine her örnek için 2 µl Orange G yükleme tamponundan (Metis, Kanada) örnek sayısı kadar dağıtılmıştır.
- 11- Herbir örnekten 6 µl alınarak Orange G ile pipetaj yapıp karıştırıldı ve ilk kuyucuktan hariç her kuyucuğa bu karışımının tamamı dağıtılmıştır.
- 12- İlk kuyucuğa 3 µl marker (GeneRuler™100 bp DNA Ladder Plus, LabAid™, Fermantas Inc, Ontario, Kanada) yüklenmiştir.
- 13- Güç kaynağı (LABNET International Power Station 300, Edison, İngiltere) çalıştırılarak güç 120 V'a ayarlanarak markerda iyice açılma olana kadar yaklaşık 1 saat yürütme işlemi yapılmıştır.
- 14- Süre sonunda jel tanktan çıkarıldı ve jel görüntüleme sisteminde (UVITEC Cambridge, İngiltere) UV ışığı altında bantlar değerlendirildi ve görüntüler kaydedilmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler aylar, yaş grupları, genotipler ve mevsimsel değişkenler arası ilişkiyi belirlemek amacıyla yapılmıştır. Analizlerde SPSS yazılımı kullanılmıştır ; X² (Ki-kare) testi sonuçlarına göre p<0.05 değerleri önemli kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin değişik polikliniklerine Ocak 2013 ile Nisan 2018 tarihleri arasında gastroenterit şikayeti ile başvuran ve gaitaları Mikrobiyoloji laboratuvarına rotavirüs araştırılması için yollanan ve immünokromatografik yöntem ile rotavirüs pozitif bulunan, 0-65 yaş arasındaki 87 hastanın gaita örnekleri toplanarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya alınan 87 olgununun 40'ı (%46) kadın, 47'si ise (%54) erkek hasta üzerinde yapılmıştır. (Çizelge 4.1).

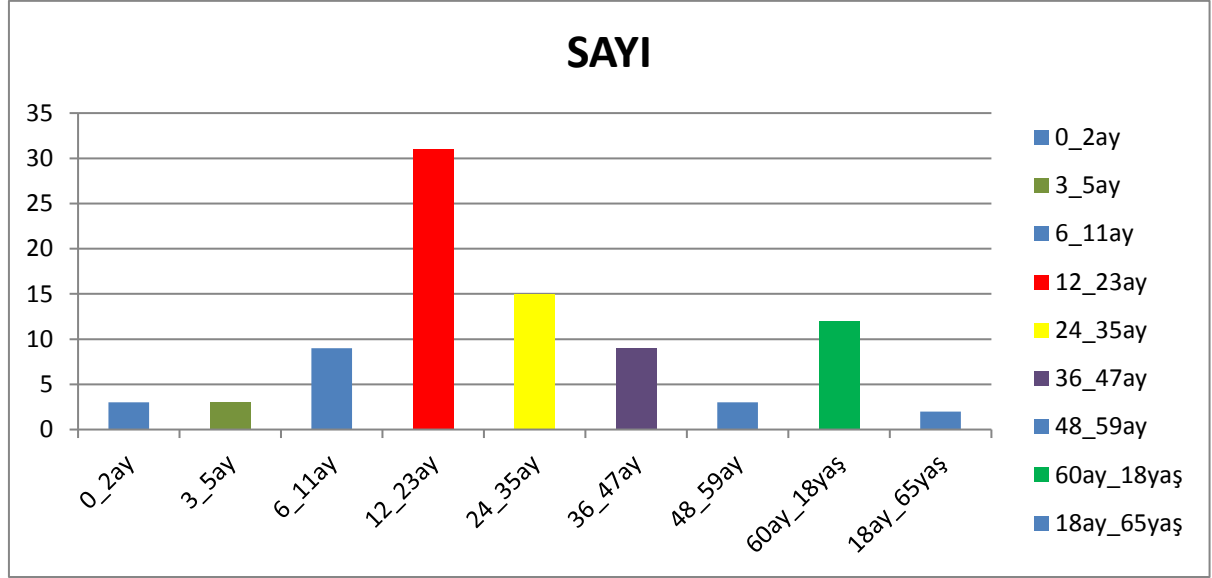
Çizelge 4.1. Hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı (n=87)

Cinsiyet	Sayı	Yüzde %
Kadın	40	% 46
Erkek	47	% 54
Toplam	87	% 100

Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı; 3' ü (% 3,44) 0-2 ay, 3' ü (% 3,44) 3-5 ay, 9'u (% 10,34) 6-11 ay, 31'si (% 35,63) 12-23 ay, 15'si (% 17,24) 24-35 ay, 9'u (% 10,34) 36-47 ay, 3' ü(% 3,44) 48-59 ay,12'si (% 13,79) 60 ay-18 yaş ve 2'si de (% 2,29) 18-65 yaş grubunda yer almaktadır (Tablo 8).

Çizelge 4.2. Çalışmaya dahil edilen 0-65 yaş arası akut gastroenteritli hastaların yaş gruplarına göre dağılımı (n=87)

Yaş grupları (Ay)	Sayı(%)
0-2	3 (% 3,44)
3-5	3 (% 3,44)
6-11	9 (% 10,34)
12-23	31 (% 35,63)
24-35	15 (% 17,24)
36-47	9 (% 10,34)
48-59	3 (% 3,44)
60ay-18yaş	12 (% 13,79)
18yaş-65yaş	2 (% 2,29)

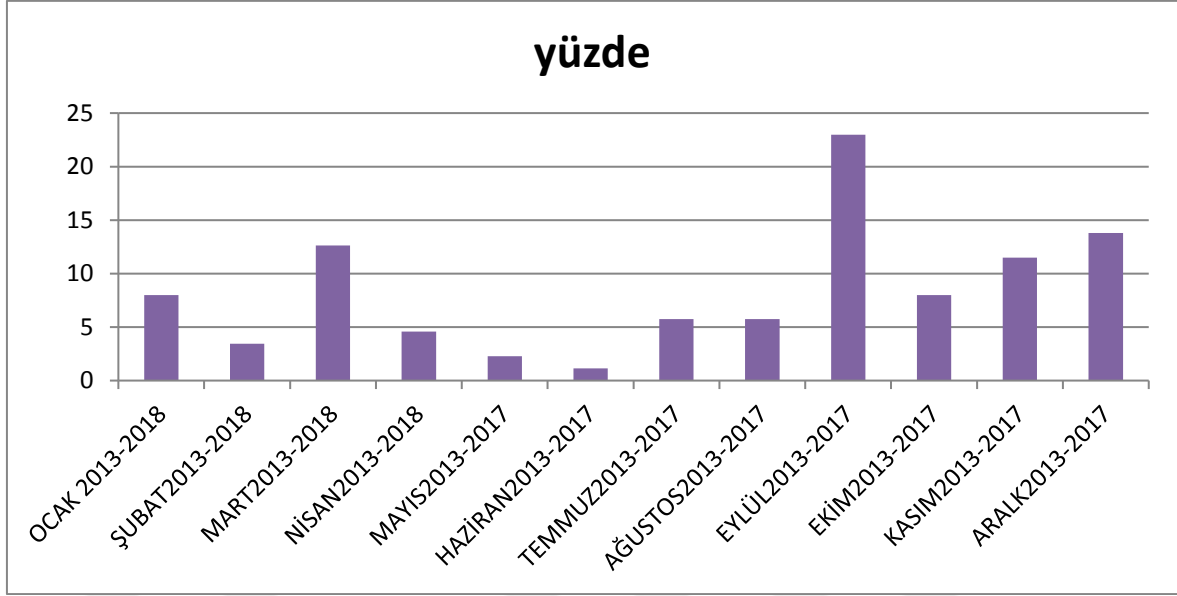


Şekil 4.1. Çalışmaya dahil edilen 0-65 yaş arası akut gastroenteritli hastaların yaş gruplarına göre dağılımı (n=87).

Not: 12-23 ay, çalışmaya alınan gruplar içerisinde istatistik anlam ilişkisi aranmaz, % olarak vermek yeterli.

Toplam 87 rotavirusa bağlı gastroenterit olgusunun aylara göre dağılımı;

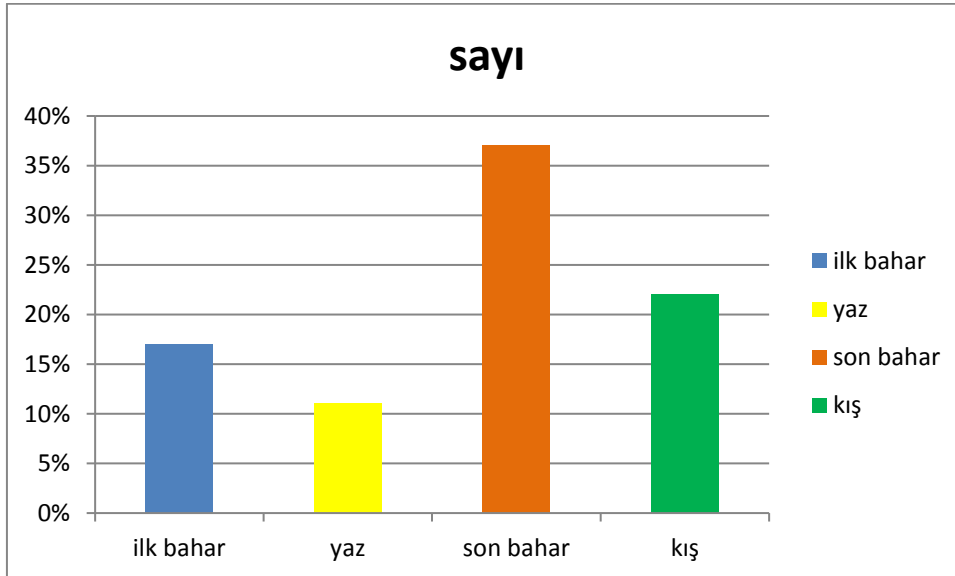
Olguların 7'si Ocak (% 8), 3'ü Şubat (% 3,44), 11'i Mart (% 12,64), 4'ü Nisan (% 4,59), 2'si Mayıs (% 2,29), 1'i Haziran (% 1,14), 5'i Temmuz (% 5,74), 5'i Ağustos (% 5,74), 20'si Eylül (% 22,98), 7'si Ekim (% 8), 10'u Kasım (% 11,49) ve yine 12'si Aralık (% 13,79) ayında belirlenmiştir. (Grafik 2).



Şekil 4. 2. Rotavirus pozitifliği aylara göre dağılımı (n=87)

Rotavirüs pozitifliği aylara göre dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$) ($p: 0,94$)

Toplam 87 olgunun mevsimlere göre dağılımı; 22'si (% 25,28) kış, 17'si (% 19,54) ilkbahar, 11'i (% 12,64) yaz ve 37'si (% 42,52) sonbahar da olacak şekilde gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Rotavirus pozitifliğinin mevsimlere göre dağılımı (n=87)

Rotavirüs pozitifliğinin mevsimlere göre dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$) ($p: 0,86$)

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

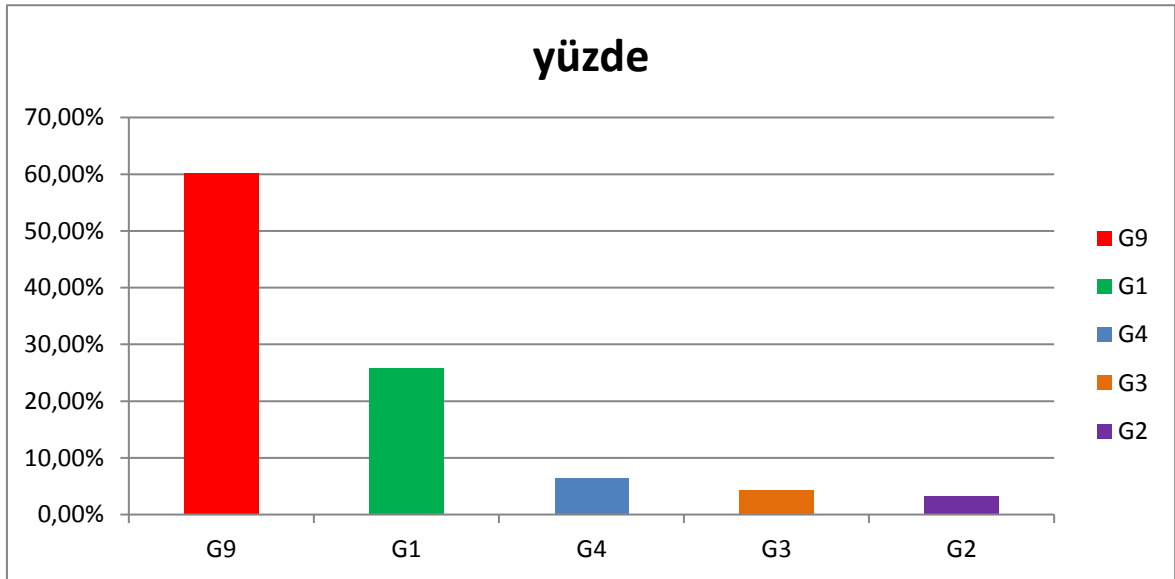
Rotavirus G serotipleri:

Hastaların 78'si G tip pozitif bulunmuştur. Negatif olanlar ise çalışma dışı bırakılmayıp nested PCR sonucu pozitif olabileceği düşünülerek G tiplendirmeye alınmıştır.

G tiplendirme sonucunda; G1, G9, G2, G3 ve G4 tipleri ve miks tip olmak üzere toplam 93 G genotip pozitifliği saptanmıştır. Sırasıyla 24(% 25,80), 56(% 60,21), 3(% 3,22), 4(% 4,30) ve 6'sını (% 6,45) oluşturmuştur (Grafik 4). G9 serotip pozitifliği diğer serotiplere kıyasla daha yüksek oranda saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). $p:0,04$

Çizelge 4.3 G genotiplerin dağılımı (n=93)

G TİPLERİ	
G9	56(% 60,21)
G1	24(% 25,80)
G4	6(% 6,45)
G3	4(% 4,30)
G2	3(% 3,22)

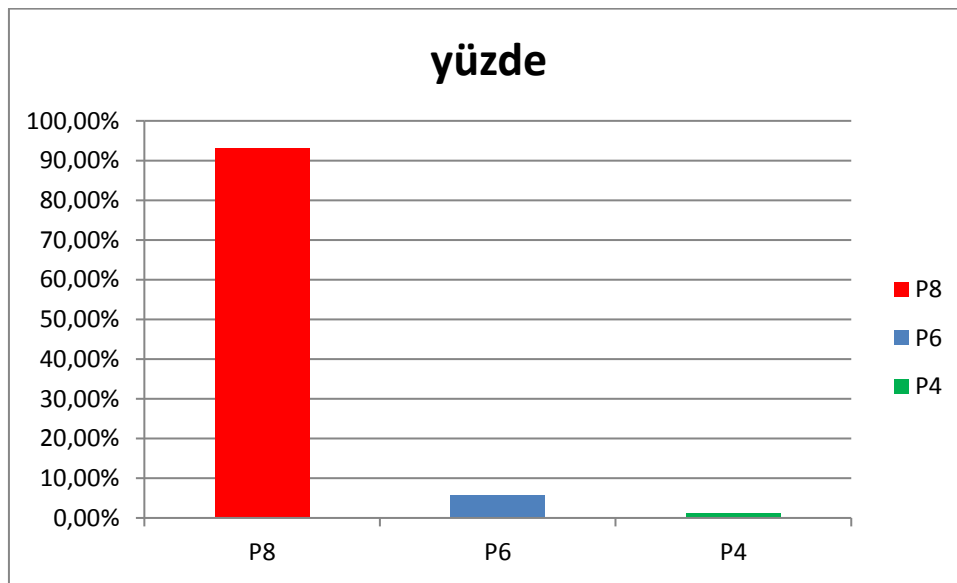


Şekil 4.4. Rotavirus G tipi saptanan örneklerde G genotipi dağılımı (n=93)

Bu çalışmada gözlenen P[8], P[4] ve P[6] tipleri ise 87 P tipinin sırasıyla 81 (% 93,10), 5 (% 5,74) ve 1'ini (% 1,14) oluşturmuştur. (Grafik 5). P[8] pozitifliği diğer tiplere kıyasla daha yüksek oranda saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4. 4. P genotiplerin dağılımı (n=87)

P TIPLERİ	
P8	% 93,10
P4	% 5,74
P6	% 1,14



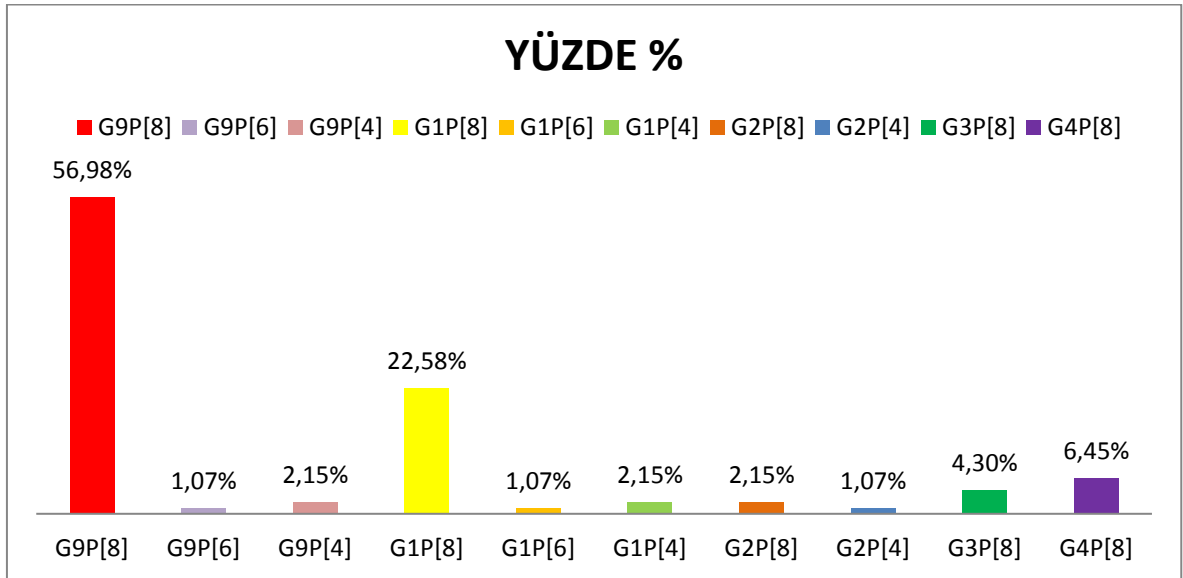
Şekil 4.5. Rotavirus P tipi saptanan örneklerde genotiplerin dağılımı, (n=87)

Rota virüsün G tiplerinden; G1, G2, G3, G4 ve G9 tipleri, P tiplerinden; P[8], P[6] ve P[4] tipleri saptanmıştır. Hem G hem de P tiplerinin birlikte görüldüğü örnekler G1P[8], G1P[6], G1P[4], G9P[8], G9P[6], G9P[4], G2P[8], G2P[4], G3P[4], G3P[8] ve G4P[8] tipleri gözlemlenmiştir. Bunların 87 rota virüs antijeni saptanan örnekteki dağılımı Tablo no'de gösterilmiştir.

Hem G hem de P tiplerinin birlikte görüldüğü örnekleri oluşturan G9P[8], G9P[6], G9P[4], G1P[8], G1P[6], G1P[4], G2P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] serotipleri 93 örnekte (87 pozitif örneklerde bazıları miks genotipler içerir) sırasıyla 53 (% 56,98), 1 (% 1,07), 2 (% 2,15), 21 (% 22,58), 1 (% 1,07), 2 (% 2,15), 2 (% 2,15), 1 (% 1,07), 4 (% 4,30) ve 6 (% 6,45%) olarak saptandı (Grafik 6). G9P[8] pozitifliği diğer birlikteliklere kıyasla daha yüksek oranda saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

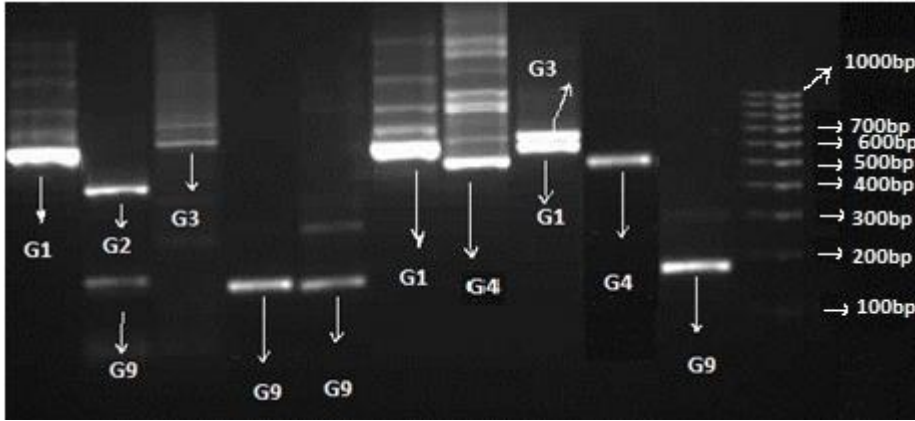
Çizelge 4.5. Rotavirus antijeni saptanan örneklerde G ve P genotiplerinin dağılımı (n=87)

Tip	SAYI	YÜZDE %
G9P[8]	53	56,98
G9P[6]	1	1,07
G9P[4]	2	2,15
SubtotalG9	56	60,21
G1P[8]	21	22,58
G1P[6]	1	1,07
G1P[4]	2	2,15
SubtotalG1	24	25,80
G2P[8]	2	2,15
G2P[4]	1	1,07
SubtotalG2	3	3,22
G3P[8]	4	4,30
SubtotalG3	4	4,30
G4P[8]	6	6,45
SubtotalG4	6	6,45
Total	93	100



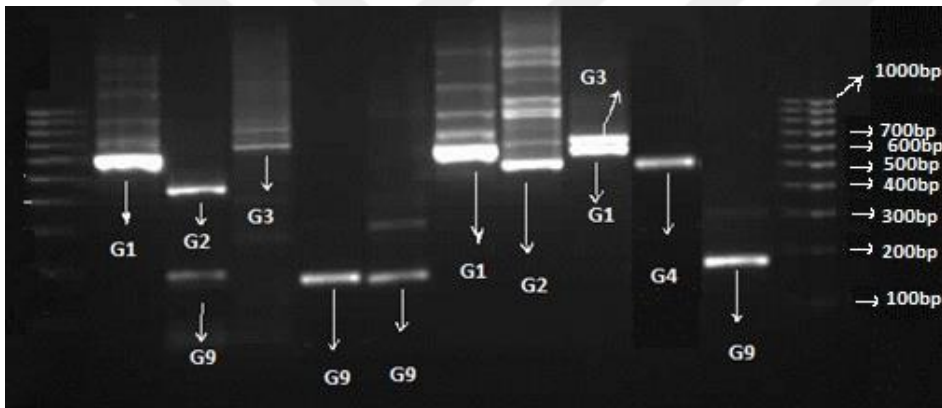
Şekil 4.6 Rotavirus G/P serotipi saptanan örneklerde genotiplerin dağılımı (n=86)

Çalışmamızda birden fazla G ve P tiplerinin birlikte görüldüğü miks genotiplere rastlanmıştır.

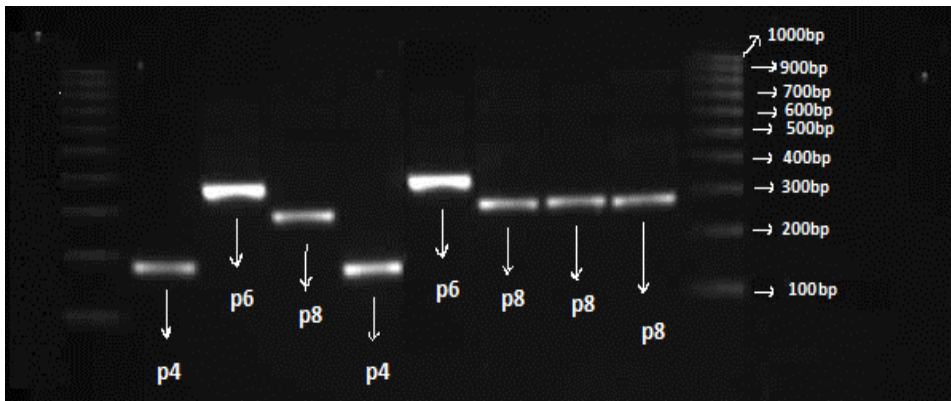


Şekil 4.7. Rota virüs G tiplerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

Not: Elde edilen ürünün büyüklüğüne göre G1 (618 bp), G2 (521 bp), G3 (682 bp bc), G4 (452 bp) ve G9 (179 bp) bantları tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. Rota virüs G tiplerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü



Şekil 4.9. Rota virüs P tiplerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

Not: Elde edilen ürünün büyüklüğüne göre P4 (186 bp), P6 (381 bp) ve P8 (280 bp) bantları tespit edilmiştir.



5. TARTIŞMA

Dünyada çocukluk çağında akut gastroenteritlerinin en yaygın sebebi rotavirüstür. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler ve Türkiye dahil olmak üzere akut gastroenteritler önemli bir sağlık sorunu olup çocuklarda morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerindendir. Beş yaşın altındaki çocuklarda 2015 yılında dünyada 500 000 çocuğun diyare nedeni ile öldüğü bildirilmiştir (GBD, 2017). Ülkemizde de 0-14 yaş grubu çocuk ölümlerinin % 8,4' ünden diyare sorumlu tutulmaktadır (Ministry of Health of Turkey, 2004).

Beş yaş altı çocuklarda akut gastroenterite en sık etkeni rotavirüstür. Dünya genelinde her yıl yaklaşık 10 milyon çocuğun ishal olmasına rotavirüs sebep olmaktadır. Bu enfeksiyon 118 000- 183 000 çocuğun ölmesine sebep olmaktadır. Tüm rotavirüs ölümlerinin neredeyse yarısı Asya'da meydana gelmektedir (Tate vd., 2016).

Dünya da her yıl 111 milyon ishal olgusuna rastlanmaktadır. Bunlar 25 milyon poliklinik başvurusu olup 2 milyon çocuk bu nedenle hastaneye başvurmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde %85 rotavirus ishali sebebi ile her yıl 611 000 çocuk hayatını kaybetmektedir. Bir başka deyişle, rotavirus gastroenteriti nedeni ile her bir dakika da bir çocuk hayatını kaybetmektedir (Parashar vd., 2006).

Rotavirus, gastroenterit etkenlerinden ayrılmakla birlikte enfeksiyonun sıklıkla görülmesi sosyo-ekonomik koşullar ve uygun hijyen önlemlerine bağlı değildir. Bu nedenle kontamine su ve gıdalar ile bulaşan, bakteri ve parazit kaynaklı diyarelerin önlenmesinde önemli bir yere sahip olan temiz içme suyu ve hijyen koşullarının sağlanması rotavirüs gastroenteritlerinin önlenmesinde etkili olmamaktadır. Gelişmiş ülkelerde sanitasyon, güvenilir su kaynakları temini ve oral rehidratasyon tedavisi ile diyareli hastalıkların morbidite ve mortalitesinde önemli azalma sağlanmasına rağmen, rotavirüsle ilgili morbidite ve mortalitede azalma olmamıştır. Bu nedenle rotavirüs "demokratik virüs" adı yakıştırılmaktadır (Kurugöl, 2006; Kurugöl ve Salman, 2008).

Rotavirus gastroenteritleri tedavi olanaklarının yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde mortaliteye, gelişmiş ülkelerde ise morbidite ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Yapılan seroprevalans çalışmalarında dünyada hemen hemen üç yaşın altındaki tüm çocukların rotavirüs enfeksiyonu geçirmiştir. 6-24 çocuklarda rotavirusun yüksek insidansa ulaştığını görülmüştür (Watanabe vd., 2001). Ülkemizde yapılan dışkı örneklerinde rotavirüs (RV) antijenlerinin ELISA, lateks aglütinasyonu ve immunokromatografik yöntemlerle araştırılmasına dayanmaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalara göre ortalama %20 RV enfeksiyonu dolaylarında olduğu tespit edilmiştir (Öngen, 2006).

Son yıllarda rotavirüsün öneminin anlaşılması, yöntemlerin gelişmesi ve ülkemizde önemli epidemiyolojik çalışmalar yapılmıştır. Çeşitli yöntemler kullanılarak rotavirüs pozitifliğinin belirlendiği bu çalışmalardan bazıları immunokromatografik incelemelere dayanmaktadır.

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin farklı polikliniklerine Ocak 2013 ile Nisan 2018 tarihleri arasında gastroenterit şikayeti ile başvuran ve dışkı örnekleri rotavirüs antijeni açısından mikrobiyoloji laboratuvarında immünokromatografik yöntem ile pozitif bulunan 87 hastanın dışkı örneklerinde rotavirüs genotiplemesi yapılmıştır.

1999-2002 yılları arasında Karadağ ve arkadaşları tarafından Ankara'da üç farklı hastanede yaşları 1-198 ay arasında 1099 diyareli çocukla çalışma yapılmıştır. Bu çalışma immunokromatografik yöntem kullanılarak % 36,8 rotavirüs pozitifliği saptanmıştır (Karadag vd., 2005).

Nazik ve arkadaşları 2003-2005 İstanbul'da çocuk hastalara ait 3618 dışkı örneğini immunokromatografik yöntem ile incelemiş ve örneklerin % 20,6 da rotavirüs saptamışlardır (Nazik, İlkaç ve Öngen, 2006).

Daha önceki yıllarda elektron mikroskopunda patognomonik tekerleğe benzer bir şekilde rotavirüs tanısı saptanması yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem oldukça yüksek fiyata sahip, zahmetli bir yöntem olmuştur. Ancak pahalı olmasına rağmen altın standart olarak kullanılmıştır.

Günümüzde daha kolay bir şekilde dışkıda rotavirüs antijenini saptayan yöntemler kullanılmaktadır. Uygulamada özel ekipmanlara gereksinim duyulmayan ve hızlı sonuç

veren yöntemler mevcuttur. Birçok laboratuvar rutininde kullanılan yöntemler bulunmaktadır (Güreser vd., 2010).

Günümüzde immunokromatografik test gastroenteritin tanısında hızlı ve pratik olması nedeniyle birçok merkez tarafından tercih edilmektedir. Bu testler genellikle rotavirüs, adenovirüs, ve norovirüse yönelik kullanılan tanı testleridir. Bu testlerin duyarlılığı % 86,7-100, özgülüğü ise % 87,5-95 arasında bulunmuştur (Kırdar, Kahyaoğlu, Yazıcı ve Aydın, 2017).

Konya'da 1 Kasım 2007-31 Ekim 2008 tarihleri arasında İnci ve arkadaşları arasında yapılan gastroenterit yakınması ile gelen vakalarda RV orijinli gastroenteritlerin mevsimsel ve yaş dağılımlarını saptamak hedefiyle yaptıkları retrospektif çalışmada dışkı örneklerinde kalitatif immunokromatografik yöntemle % 21 oranında RV saptamışlardır (İnci, Kutoğlu ve Baysal, 2009).

İstanbul'da Bayraktar ve arkadaşları Eylül 2008 - Temmuz 2009 tarihlerinde pediatri polikliniğine akut gastroenterit şikâyeti ile başvuran, 1358 olgunun dışkı örneğinde immünokromatografik test sonuçlarına göre RV antijenlerini % 23,7 (322/1358) oranında pozitif tespit edilmiştir (Bayraktar, Toksoy ve Bulut, 2010).

Ankara'da Durmaz ve arkadaşları Ağustos 2012- Temmuz 2014 tarihleri arasında rotavirüs sürveyans çalışmasında farklı kurumlarda immunokromatografik yöntem ile RV pozitifliği saptanan 2102 hastanın dışkı örneğinde moleküler yöntemlerle G ve P tiplerini araştırmış ve en yüksek rotavirüs enfeksiyon sıklığını % 38 ile 9-24 aylık çocuklarda bulmuşlardır (Durmaz vd., 2017).

Çorum'da Güreser ve arkadaşları Ocak 2013-Eylül 2014 tarihleri arasında akut gastroenteritli 3189 çocuğun 706'sında (% 22) immunokromatografik yöntem ile RV pozitifliği saptamışlardır.

Ankara'da Köksal ve arkadaşları Ocak 2005-Mayıs 2015 tarihleri arasında akut gastroenteritli 4126 dışkı örneğinde immunokromatografik yöntem ile % 21 oranında RV pozitifliği saptamıştır (Köksal vd., 2017).

Ankara’da Durmaz ve arkadaşları 1 Eylül 2014 – 31 Ağustos 2016 tarihleri arasında bir tarama programı çerçevesinde farklı kurumlarda immunokromatografik yöntemlerle RV pozitifliği belirlenen akut gastroenteritli 1639 çocuğun dışkı örneğinde rotavirus genotiplemesi yapmışlardır. Bu çalışmada en yüksek RV sıklığı % 38 ile 0-12 ay arasındaki bebeklerde belirlenmiştir (Durmaz vd., 2018).

Bu araştırmada gözetlenen rotavirüs antijeni pozitif dışkı örneklerinin 40’ı (%45,9) kadın ve 47’si (% 54) ise erkek olgulara aittir. Cinsiyet dağılımı yönünden istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir. Bu da rotavirüsün cinsiyete bağlı olmayan bir enfeksiyon etkeni olduğunu bir kez daha doğrulamaktadır.

Yapılan araştırmalarda RV gastroenteriti insidansının cinsiyetler arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir. Ancak bu konuyu anlamlı bulan çalışmalar mevcuttur. Bunlara Örnek vermemiz gerekirse Nafici ve arkadaşlarını gösterebiliriz (Naficy vd., 1999). Bu iki grupta RV pozitifliği yönünden anlamlı bir fark bulmadıklarını; Cardoso ve arkadaşları (Cardoso vd., 2013) ise RV pozitifliğini 1387 erkek bebeğin 229 (% 16,5)'unda 1218 kız bebeğin ise 145 (11,9)'inde pozitif olduğunu ve bu farkın istatistiksel açıdan önemli olduğunu belirtmişlerdir.

2012-2014 tarihleri arasında Ankara’da Durmaz ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada kadın ve erkek örneklerinde belirlenen RV pozitifliği açısından bir fark olmadığı görülmüştür.

Çorum’da Ocak 2013-Eylül 2014 tarihleri arasında yapılan bir çalışmada rotavirüs pozitifliği erkeklerde (% 17,4) ve kadınlarda (% 17,5) oran olarak benzer bulunmuş ve cinsiyetler arasında istatistiksel fark saptanmamıştır.

Ankara’da Durmaz ve arkadaşları 1 Eylül 2014 – 31 Ağustos 2016 tarihleri arasında gerçekleştirdikleri çalışmada da rotavirüs pozitifliği açısından erkek ve kadınlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Rotavirüs enfeksiyonları aslında her yaş gurubunda olabilmektedir. Ancak bununla birlikte altı ay ve iki yaş arasındaki çocukluk döneminde daha sık saptanmaktadır. En çok 0-5 yaş arası çocukları incelediğimiz zaman Rotavirüs %17-41 oranları arasında akut gastroenterit

etkeni olarak bildirilmektedir. Ülkemiz literatüre uygun ve araştırmalara uyumlu sonuçlara ulaşılmıştır. Rotavirüs enfeksiyonu en çok 12-23 aylık çocuklarda (%35,63) saptanmıştır.

Durmaz ve arkadaşları tarafından Ağustos 2012 ve Temmuz 2014 yılları arasında yapılan sörveyans çalışması yapılmıştır. Bu çalışma Ankara'da yapılan ve akut gastroenteritli 0-59 ay arasındaki 2102 çocuğu kapsayan bir çalışma olmuştur. Araştırma en yüksek insidansa (% 38,7) 13-24 aylık çocuklar arasında ulaşılmıştır. Durmaz ve arkadaşları tarafından 2014-2016 yıllarında Ankara' da yapılan ve akut gastroenteritli 0-59 ay arasındaki 1396 çocuğunu kapsayan başka bir çalışmada ise en yüksek insidans (% 38,2) 0-12 aylık çocuklarda saptanmıştır.

Tsolenyanu ve arkadaşlarının Togo'da 2012 yılında yapmış oldukları çalışmaya göre 5 yaş altı çocuklarda rotavirus prevalansı % 48 olarak bildirilmiş ve en yüksek insidansa 4-11 aylık çocuklar arasında bulunmuştur (Steenland vd., 2013).

Haiti'de 2012-2013 yılları arasında Steenland ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmaya göre 5 yaş altı çocuklarda rotavirus görölme sıklığı % 13,5 olarak belirtmişlerdir (Steenland vd., 2013). Bu çalışmaya yaşı 0-95 yaş arasındaki bireyler dahil edilmiştir. Ancak beş yaş üzerinde ki bireylerde rotavirüs enfeksiyonun oranı düşük bulunmuştur.

Güreser ve arkadaşları Ocak 2013-Eylöl 2014 yıllarında yaptıkları bir araştırmaya göre 18 yaş bireyler dâhil edilmiştir. 7-24 aylık çocuklarda rotavirüs görölme sıklığı % 13,5 olarak bildirilmiştir.

Ocak 2009- Aralık 2015 yıllarında Jianxing ve arkadaşları tarafından Çin' de yapılan ve akut gastroenteritli 5 yaşında ki çocukları kapsayan çalışmada, en yüksek insidans 6-23 aylık çocuklar arasında görölmüştür (Jianxing vd., 2019).

Konya 'da Tüzüner ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları bir araştırmaya göre 18 yaşa kadar bireyler dâhil edilerek 2-4 yaş çocuklarda rotavirüs görölme sıklığı % 42,1 olarak bildirilmiştir (Tuzuner, Gulcen, Özdemir ve Feyzioğlu, 2016).

Kırdar ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları bir araştırmada 1-60 ay arasındaki ishalleri çocukları incelemiş ve 12-24 aylık çocuklarda rotavirüs görölme sıklığını % 42,1 olarak bulmuşlardır.

Bu araştırmada farklı yaş gruplarındaki ishal olan hastalara ait dışkılar incelenmiştir. Büyük bir çoğunluk 12-23 aylık ocuklarda RV pozitif grlmştr. Farklı yaş grupları arasında yapılan istatikselsel araştırmaya göre rotavirüs pozitif olarak değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. RV pozitif olguların çok büyük bir bölümünü (% 35,63) 12-23 aylık bebekler oluşturmuştur. Bu bulgu beklenen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Ülkemiz gibi ılıman iklime sahip bölgelerde rotavirüs enfeksiyonları mevsimsel dağılım göstermekte ve genellikle kiş ve ilkbahar dönemlerinde daha sık görülmektedir (Biçer, vd., 2008).

ABD bu enfeksiyon tipik olarak sonbahar döneminde baş gösterdiği ve bahar döneminde devam ettiği grlmştr. Avrupa'da ise kiş ayları döneminde devam ettiği gözlenmiştir (Kim vd., 2005).

Bu çalışmada mevsimlere göre rotavirüs enfeksiyonlarının dağılımına baktığımızda 87 olgunun 22'si (% 25,28) kiş, 17'si (% 19,54) ilkbahar, 11'i (% 12,64) yaz ve 37'si (% 42,52) sonbahar mevsiminde olduğu saptanmıştır. Bu verilere baktığımızda mevsimler arasında Rotavirüs enfeksiyon dağılımını açısından istatistikselsel bir anlam gözlenmemektedir. Pozitif olguların sıklıkla sonbahar döneminde grldğu tespit edilmiştir.

Konya'da Tüzüner ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada Rotavirüse bağlı gelişen akut gastroenterit olgularının kiş ve ilkbahar mevsimlerinde arttığını belirlemişlerdir.

Rotavirüs enfeksiyon sıklığı ve dağılımının incelenmesi için Kaya ve arkadaşları RV pozitifliğini % 20,6 ile Ocak ayında en yüksek oranı belirlemiş ve Mart ayı ise % 14,8 ile ikinci sırada yer aldığını Isparta'da yaptıkları bir çalışmada belirtmişlerdir (Kaya, Ergün, Aynalı, ztrk, nal ve Arıdoğan, 2013).

Iraz ve arkadaşlarının İstanbul'da yaptıkları bir çalışmada da RV pozitifliği % 22,2 ile Ocak ayında en yüksek, % 20,1 ile Mart ayı ikinci sırada bulunmuştur (Atalay, Kandemir ve Gökahmetoğlu, 2013).

Atalay ve arkadaşları Kayseri'de yaptıkları çalışmada % 39,5 en yüksek RV pozitif oranını kiş mevsiminde olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmaya göre enfeksiyon oranları en sık

% 46,4 Ocak ayı, ikinci sırada da Kasım ayı % 32,3 üçüncü sırada Aralık ayı %40, yer verilmiştir (Atalay, Kandemir ve Gökahmetoğlu, 2013).

İlkaç ve arkadaşları İstanbul'da RV enfeksiyonlarının Aralık ayında başlayıp Mayıs ayından itibaren azaldığını, Ocak-Şubat aylarında ise pik yaptığını (% 28) tespit etmişlerdir (İlkaç, Şahin, Nazik ve Öngen, 2012).

RV enfeksiyon sıklığı Van bölgesinde sonbahar ve kış aylarında yüksek oranda olduğunu bununla birlikte Mardin'de Ekim, Kasım ve Aralık aylarında diğer aylara göre daha sık görüldüğü Gültepe ve arkadaşları daha sonra Bursa ve arkadaşları tarafından saptanmıştır (Gültepe, 2013).

Çorum'da Güreşer ve arkadaşları tarafından yapılan rotavirüs çalışmasında en çok ilkbahar (% 25,5) ve kış (% 25,2) mevsiminde saptanmıştır. Sonbahar döneminde (% 23,5) rotavirüs enfeksiyonu sık görüldüğü belirlenmiştir. Rotavirüs enfeksiyonlarını en yüksek oranda Kasım (% 38,5) ayında, en az Eylül (% 3,1) ayında saptamışlardır. Özellikle Kasım ve Nisan ayları arasında daha fazla sıklığına ulaşılmıştır.

Bizim çalışmamızda RV enfeksiyonunun dağılımı sırasıyla % 22,98 oranıyla Eylül ayı, ikinci sırada % 13,79 oranla Aralık ayı üçüncü sırada % 11,49 oranla Kasım ayı görülmektedir.

Bu araştırmanın sonuçlarına göre rotavirüs gastroenteritleri Eylül ve Aralık aylarında pik yapmaktadır. Günümüzde yapılan bir diğer çalışmada rotavirüs enfeksiyonları Eylül ayında daha sık görüldüğü belirtilmiştir. Yapılan çalışmalara göre Rotavirüs enfeksiyonları yaz ve sonbahar aylarına göre kış ve bahar aylarında daha sıklıkla görülmektedir.

Rotavirüs gastroenteritine neden olan baskın genotiplerin prevalansının ülkeden ülkeye ve yıldan yıla değiştiği bilinmektedir (Ogilvie vd., 2012: 12:62). Son yıllarda ülkemizde yapılan araştırmalar ve insanlarda görülen rotavirüs enfeksiyonlarında virüs genotiplendirmesiyle ilgili literatür giderek artmaktadır.

Rotavirüs hastalık insidansının gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde aynı olduğu saptanmıştır. Ancak fakirlik ve yetersiz beslenme gibi faktörler sebebiyle ölümlerin % 82'sinin yoksul ülke çocuklarında görüldüğü ifade edilmektedir (Parashar, 2003).

Torun (2009) tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada, 5 yaş altı akut gastroenteriti olan çocuklarda en baskın RV genotipleri sırasıyla G1, G4, G9; P[4], P[10], P[8]; G1P[4], G4P[4] ve G9/P[4] olarak bulunmuştur.

Bozdayı ve arkadaşları (Bozdayı vd., 2008). Ankara'da 2005 yılında yaptıkları çalışmada en sık görülen genotipleri sırasıyla G1P[8], G9P[8] ve G9P[6] olarak saptamışlardır. Ankara da 2009 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise Tapısız ve arkadaşları (Tapısız vd., 2011) en yaygın G genotipi G9 ve P genotipi ise P[8]; G ve P kombinasyonu olarak ise G9P[8], G1P[8] ve G4P[6] olduğunu belirlemişlerdir.

2010 yılında Ankara'da Meral ve arkadaşları (Meral vd., 2011) tarafından yapılan G genotipi olarak G3, G4 ve G1, en baskın P genotipi P[8], P[6], P[9] ve en yaygın P/G genotip kombinasyonu ise G3P[8], G2P[8], G4P[8] çalışmada Nisan 2009 - Şubat 2010 tarihleri arasında akut gastroenterit şikâyeti ile hastaneye başvuran 0-5 yaş arasındaki hastalarda tespit edilmiştir.

Adana'da 2010 yılında yapılan bir tez çalışmasında RV antijeni pozitif bulunan örneklerde en baskın genotipin % 30 oranıyla G9P[8] olduğu bulunmuştur. Bu genotipi G9P[11] % 20 ve G4P[8] % 10 oranıyla izlenmiştir. G genotiplerinden G9 % 60 ve P genotiplerinden P[8] % 50 oranı en yaygın genotipler olarak bulunmuştur (Tümgör, 2010).

Togo'da 2014 yılında Tsolenyanu ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada en sık saptanan genotipler sırasıyla G3P[6], G1P[8], G1P[6/8], G2P[6], G12P[6] G3/12P[6] saptamışlardır. Türkiye'de 2012-2014 yılları arasında yapılan bir çalışmada ise Durmaz ve arkadaşları en yaygın G genotipi G1 ve P genotipi ise P[8]; G ve P kombinasyonu olarak ise G9P[8], G1P[8], G2P[8], G2P[4], G3P[8] ve G4P[8] olarak belirlemişlerdir.

Bozdayı ve arkadaşları tarafından (Bozdayı vd., 2016) 2006-2011 Ankara'da yapılan bir çalışmada en yaygın G genotipi olarak G9 ve P genotipi olarak P[8]'i; G ve P kombinasyonu olarak ise G9P[8], G1P[8] ve G2P[8]'yi saptamışlardır.

Dünya genelinde ve geçmişten günümüze kadar yapılan rotavirusa bağlı gastroenteritler hakkında değişik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Endonezya'da 2013-2016 yılında en çok görülen genotipler sırasıyla G3P[8], G2P[6], G1P[8] ve G3P[6] bileşimidir (Cowley vd., 2018).

Çin'de 2009-2015 yılında yapılan bir çalışmada en yaygın G genotipi G9 ve P genotipi ise P[8]; G ve P kombinasyonu ise G9P[8], G3P[8], G1P[8], G2P[4] ve G3P[4] olarak bulunmuştur.

Rotavirüsler tüm dünyada bebek ve küçük çocuklardaki oluşan akut gastroenteritlerin en önemli nedeni olan dış kapsid de bulunan VP7 ve VP4 antijenlerine göre G ve P tiplerine göre ikiye ayrılmaktadırlar. Son yıllarda rotavirüs tipinin belirlenmesi, tanı konulması ve tetkikleri arasında RT-PCR'ın kullanıma girmiştir.

Günümüzde tüm ülkelerde insanlardaki enfeksiyonlarının tespit edilme sürecinde G tipleri içerisinde G1, G2, G3, G4 ve G9 tiplerinin büyük bir kısmı sorumlu tutulmuştur (Ellen, 2007). Ancak rotavirüs tiplerinin çok çeşitli olması nedeniyle genotipik değişimlerin devamlı olarak izlenmesi gerekmektedir. Her hangi bir ülkede rotavirüs aşısının kullanıma girmesinden önce hangi tiplerin olduğunu bilmek son derece önemli bir yer tutmaktadır.

Bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğunda G1 serotipi baskın bulunmuştur. Ancak bu çalışmada RT-PCR ile tiplendirme sonuçlarına göre en baskın serotip 87 hastanın % 60.21'inde G9 olarak bulunurken, en yaygın birleşim ise hastaların % 56.98'inde G9P[8] olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda çok sık rastlanılan G2P[4] kombinasyonuna az rastlanmıştır (Ceyhan vd., 2009). Ülkelere göre rotavirüs tiplerinin dağılımının bilinmesi oldukça önemli olmasının temel nedeni rotavirüse bağlı morbidite ve mortalitenin azaltılmasında aşılama stratejileri açısından önem taşımaktadır (Santos ve Hoshino, 2005).

Dünya genelinde G9P[8] birleşiminde görülen bu artış, bizim çalışmamızda da görülmüştür. Bizim çalışmamızda diğer yapılan çalışmalar gibi en yaygın G genotipi G9 ve P genotipi ise P8, G ve P bileşimi olarak en çok G9P[8], G1P[8] olarak görülmüştür.

Rotavirüs gastroenteritlerinin Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya'da % 90-95'inin, Güney Amerika'da % 68'inin ve Afrika'da ise % 50'sinin G1, G2, G3 ve G4 RV genotipleriyle bağlantılı olduğu bildirilmektedir (Linhares vd., 2006). G1P[8], G3P[8],

G4P[8] ve G2P[4] G-P bileşimleri prevalansının % 50-85 arasında değiştiği, G9 genotipinin ülkeden ülkeye değişmekle birlikte % 2-35 oranında tespit edildiği belirtilmektedir (Tcheremenskaia vd., 2007).

Dünya genelinde rotavirüs gastroenteritinden en sık soyutlanan tipler G1-G4 ve G9 serotipleridir. Bu araştırma, dünya üzerinde çocuk RV ishallerinin % 95'inden sorumludur. G1, özellikle Kuzey Amerika, Avustralya ve Avrupa'da % 70 oranıyla çok yoğun olduğu gözlemlenmiştir.

Son yıllarda önemli bir husus olarak ortaya çıkan G9 Güney Amerika ve Avustralya'da en yüksek orana ulaşmakla birlikte Güney Amerika, Asya ve Afrika'da ise % 20 -% 30 oranıyla daha az saptanmaktadır. Günümüzde G5, G8 ve G12 gibi diğer serotipler de ortaya çıkmaya başlamıştır.

Dünyanın 52 ülkesinde yapılan çalışmaların değerlendirildiği analitik analizlerde Santos ve Hoshino Amerika, Asya, Afrika, Avrupa ve Avustralya kıtalarında yer alan 1989-2004 yılları arasında tüm dünyada % 88 oranıyla en yaygın genotiplerin P[8] ya da P[4] ile kombine olan G1, G2, G3 ve G4 olduğunu; ayrıca yine P[8] ya da P[4] ile kombine olan G9 genotiplerinin % 4,1 oranıyla küresel bir öneme sahip olduğunu bildirmişlerdir (Santos ve Hoshino, 2005)

Rotavirüs enfeksiyonunun % 70'inden fazlası G1P[8] Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da gelişmektedir. Ancak bu bileşim Güney Amerika ve Asya'da enfeksiyonlarının sadece % 30 Afrika'da ise % 23'ünden sorumlu olduğunu belirtmektedirler. Ayrıca, Afrika'da genotip G8'in sık görüldüğü ve en az G3 veya G4 kadar yüksek olduğu; P[6]'nın tanımlanan tüm P tiplerinin neredeyse üçte biri kadar olduğu saptanmıştır. RV suşlarıyla ortaya çıkan enfeksiyonların % 27'sinin G8P[6] veya G8P[4] gibi alışılmadık bileşenlerle ilişkili bulunduğu belirtilmiştir.

Geçmişten günümüze kadar yapılan dünya genelinde ki araştırmalar bazı gelişmiş ülkelerde rotavirüs sıklığında azalma kaydedilmiştir. Bu oranların düşüş nedeninin aşı uygulamalarına bağlı olduğu bildirilmektedir. Aşı çalışmaları Epidemiyolojik çeşitlilikteki artış ve değişkenlik nedeniyle bu tür çalışmaların artırılarak devam etmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmada da rotavirüs enfeksiyonlarının 0-65 yaş arası hastalarda gastroenterite neden olan önemli bir etken olduğu gösterilmiştir.

Gastroenterite neden olan rotavirüs serotipleri arasında G tiplerinden en sık G9 ve G1 tipleri gözlenmiş ve daha önceki çalışmalarla kıyaslandığında G3 ve G4 ve G2 tipinde de azalma olduğu görülmüştür. Rotavirus P tiplerinden P[8] en sık gözlenen etken olarak saptanmıştır.

Rotavirüs G/P serotiplerinden en sık görülen G3P[8]'in ülkemizdeki G9P[8] serotipinin yerini aldığı düşünülmektedir.

Rotavirüs gastroenteriti görülme sıklığı yaş, mevsim ve coğrafi özelliklere bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak dünyada turizmin gelişmesi ile, ülkeler arasında seyahatlerin artması ve benzeri nedenler ile farklı suşlar taşınmakta ve farklı suşlar yaygınlaşmaktadır. Çalışmamızda da globalleşmenin sonucu olarak bölgemizdeki serotiplerin insidansında değişimler olduğu gösterilmiş, rotavirüs tedavi stratejilerinde rol oynayacak önemli bir epidemiyolojik veri elde edilmiştir.



KAYNAKLAR

- Parashar U. D., Burton, A., Lanata, C., Boschi-Pinto, C., Shibuya. K., Steele, D., Birmingham, M., and Glass, R.I. (2009). Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *The Journal Of Infectious Diseases* , 9-15.
- Blutt, S, E., Kirkwood, C, D., Parreño, V., Warfield, K, L., Ciarlet, M., Estes, M, K., Bok, K., Bishop, R, F., and Conner, M, E. (2003). Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event?. *London, England* , 1445-9.
- Sai, L., Sun, J., Shao, L., Chen, S., Liu, H., and Ma, L. (2013). Epidemiology and clinical features of rotavirus and norovirus infection among children in Ji'nan, China. *Virology Journal*, 10-302.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S, M., Attoui, H., Bányai, K., and Brister, J, R. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology*, 1397-413.
- Anaya-Molina, Y., Sergio Cruz Hernández, S,I., Andrés-Dionicio, A, E., Terán-Vega,H, L., Méndez-Pérez, H., Castro-Escarpulli, G., García-Lozano, H. (2018). *Diagnostic microbiology and infectious disease*,6.
- Leung, A, K., Kellner, J, D., and Davies, H, D. (2005). Rotavirus Gastroenteritis. *Advances in therapy*, 22.
- De ,Vos., Vesikari, T., Linhares, A, C., Salinas, B., Pérez-Schael, I., and Ruiz-Palacios, G, M. (2004). A rotavirus vaccine for prophylaxis of infants against rotavirus gastroenteritis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 179-182.
- Franco, M, A., Angel, J., Greenberg, H, B. (2006). Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*, 2718-2731.
- Bishop, R, F., Davidson, G, P., and Holmes, I, H. (1973). Virus particles in epithelial cells of mucosa duodenal from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *London, England*, 1281-1283.
- Prasad, B, V., and Chiu, W. (1994). Structure of rotavirus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 269-275.
- Flewett, T, H., Bryden, A, S., Davies, H., Woode, G, N., Bridger, J, C., and Derrick, J, M. (1974). Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *London, England*, 61-63.
- Angel, J., Franco, M, A., and Greenberg, H, B. (2008). Rotaviruses. In: Mahy J, Van Regenmortel MHV (eds). *Encyclopedia of Virology*, 3rd edn, Amsterdam, Academic Press Inc, 507-513.
- Crawford, S, E., Mukherjee, S, K., Estes, M, K., Lawton, J, A., Shaw, A, L., Ramig, R, F., and Prasad, B,V. (2001). Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *Journal of Virology*, 6052-6061.

- De Palma, O., Cruz, L., Ramos, H., de Baires, A., Villatoro, N., Pastor, D., and de Oliveira, L. H. (2010). Effectiveness of rotavirus vaccination against childhood diarrhoea in El Salvador: case-control study. *British Medical Journal*, 340.
- Fischer, T. K., Bresee, J. S., and Glass, R. I. (2004). Rotavirus vaccine and the prevention of hospital acquired diarrhea in children. *Vaccine*, 49-54.
- Mansell, E. A., Patton, J. T. (1990). Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *Journal of Virology*, 4988-4996.
- Estes MK, Kapikian AZ. (2007) .Rotaviruses. In Knipe DM, Howley PM et al. (eds) *Fields Virology*, 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkin. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine 48-51
- Shaw, A. R., (2006). The rotavirus vaccine saga. *Annual review of medicine*, 167-180.
- Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K., and Prasad, B. V. (2006). Rotavirus proteins: structure and assembly. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 309.
- Patton, J. T. (2012). Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discovery Medicine*, 85-97.
- Hu, L., Crawford, S. E., Hyser, J. M., Estes, M. K., and Prasad, V. (2012). Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Current Opinion in Virology*, 380-388.
- Montero, H., Arias, C. F., and Lopez, S. (2006). Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *Journal of Virology*, 9031-9038.
- Tafazoli, F., Zeng, C. Q., Estes, M. K., Magnusson, K. E., and Svensson, L. (2001). NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *Journal of Virology*, 1540-1546.
- Yarkın, F. (2006). *Gastroenterit virusları*. Molekuler, Klinik Tamsal Viroloji, 245-258.
- Desselberger, U., Wolleswinkel-van, den, Bosch, J., Mrukowicz, J. (2006). Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 25.
- Iturriza, Gomara, M., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U., and Gray, J. (2002). Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation, *Journal of Virology*, 6596-6601.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Banyai, K., Estes, M. K., Gentsch, J. R., and Iturriza-Gomara, M. (2008). Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Archives Of Virology* , 1621-1629.
- Ustaçelebi, Ş. (1999). Rotaviruslar. İçinde: Ustaçelebi Ş, editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji 1. baskı. Ankara: Güneş kitabevi, 973-5.

- Manuel, A., Franco, a., Angel, J., and Harry, B.(2006). Greenberg. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*, 2718-2731.
- Öztürk, R.(2002). *Roavirus Ailesi ve Diğer Gastroenterit Virusları*. İçinde; Topçu, A, W., Söyletir, G., Doğanay, M., editörler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Ursu, K., Kisfali, P., Rigo, D., Erdelyi, K., Ivanics, E., and Van, A. (2009). Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. *Archives Of Virology*, 1365-1369.
- Rota, S., Fidan, I.(2007). Noninflamatuvar diyarelerin patogenezi. *Türk Mikrobiyol Cem*, 234-241.
- Ramig, R, F.(2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of Virology*, 10213-10220.
- Homaidan, F, R., Torres, A., Donowitz, M., and Sharp, G ,W , G. (1991). Electrolyte transport in piglets infected with transmissible gastroenteritis virus. *Gastroenterology* ,895–901.
- Lundgren, O ., and L. Svensson.(2001). Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes And Infection*. 1145-1156
- Molla, A., Molla, A, M., Sarker, S, A., and Khatun, M.(1983). Whole-gut transit time and its relationship to absorption of macronutrients during diarrhoea and after recovery. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*,537-543.
- Nava, P., López, S., Arias, C, F., Islas, S., and González-Mariscal, L.(2004). The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 5509-5519 .
- Zárate, S., Romero, P., Espinosa, R., Arias, C, F., and López. (2004). VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin $\alpha\beta 3$ through a novel integrin-binding site. *Journal Of Virology*, 10839–10847 .
- Graham, K, L., Takada, Y., and Barbara, S. (2006). Coulson Rotavirus spike protein VP5* binds $\alpha 2\beta 1$ integrin on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity. *Journal Of General Virology*, 1275-1283.
- Ruiz, M, C., Cohen, J., and Michelangeli, F. (2000). Role of Ca^{2+} in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium*, 137-149.
- Da Silva, M, F., Fumian, T, M., de Assis, R, M., Fialho, A, M., Carvalho-Costa, F, A., da Silva Ribeiro de Andrade, J. (2017). VP7 and VP8* genetic characterization of group A rotavirus genotype G12P[8]: Emergence and spreading in the Eastern Brazilian coast in 2014. *Journal Of Medical Virology*,64-70 .
- Iturriza-Gomara, M., Kang, G., and Gray, J.(2004). Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *Journal Of Clinical Virology*,259-265.

- Crawford, S, E., Ramani, S., Tate, J, E., Parashar, U, D., Svensson, L., and Hagbom , M.(2017). Rotavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 17083 .
- Dennehy, P, H. (2000). Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, S103-S105 .
- Parashar, U, D., Nelson, E, A., Kang, G.(2013). Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. *BMJ*,347.
- Desselberger, U., Huppertz, H, I.(2011). Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *Infectious Diseases*, 188-195.
- Angel, J., Franco, M, A., and Greenberg, H, B. (2007). Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature Reviews Microbiology*, 529-539.
- Greenberg, H, B., Estes, M, K. (2009). Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*, 1939-1951.
- Kirkwood, C, D ., Bishop, R, F., Coulson, B, S.(1998) Attachment and Growth of Human Rotaviruses RV-3 and S12/85 in Caco-2 Cells Depend on VP4. *Journa of Virology*; 72 (11): 9348-52.
- Telmesani, A, M.(2010). Oral rehydration salts, zinc supplement and rota virus vaccine in the management of childhood acute diarrhea. *Journal Of Family Community Medicine*, 79-82.
- Anderson, E, J., Weber, S, G. (2004). Rotavirus infection in adults. *The Lancet Infectious Diseases*, 91-99.
- Gonzalez-Ochoa, G., Flores-Mendoza, L, K., Icedo-Garcia, R., Gomez-Flores, R., and Tamez-Guerra P.(2017). Modulation of rotavirus severe gastroenteritis by the combination of probiotics and prebiotics. *Archives Of Microbiology*,953-961 .
- GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a system- atic analysis for the Global burden of disease study 2015. *The Lancet Infectous Diseases*,909-948.
- Ministry of Health of Turkey. *Burden Of Disease Final Report 2004*. Ankara: Refik Saydam Hygiene Center School of Public Health, 2004.
- Tate, J, E., Burton, A, H., Boschi-Pinto, C., and Parashar, U, D.(2016). World Health Organization–coordinated global rotavirus surveillance N. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children < 5 Years of Age, 2000–2013. *Clinical Infectious Diseases*,96-105 .
- Parashar, U, D., Gibson, C, J., Bresee, J, S., and Glass, R, I.(2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, 304-306.
- Kurugöl, Z., Salman, N.,(2008). Rotavirus infeksiyonları ve aşıları. *ANKEM*, 13-17.
- Kurugöl, Z., Geylani, S., Karaca, Y, et al. (2003). Rotavirus gastroenteritis among children under five years of age in Izmir, Turkey. *Turkish J Pediatr*, 290-294.

- Watanabe, M., Nakagomi, T., Koshimura, Y., and Nakagomi, O.(2001). Direct evidence for genome segment reassortment between concurrently circulating human rotavirus strains. *Archives Of Virology*, 557-570.
- Öngen B: Türkiye'de ishal etkenleri.(2006) *ANKEM Dergisi*,122-34.
- Karadag, A., Acikgoz, Z, C., Avcı, Z., Catal, F., Gocer, S., and Gamberzade, S. (2005). Childhood diarrhoea in Ankara, Turkey: Epidemiological and clinical features of rotavirus-positive versus rotavirus-negative cases. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 269-275.
- Nazik, H., İlkaç, M., Öngen, B.(2006). Çocukluk yaş grubu gastroenteritlerinde rotavirus sıklığının araştırılması. *ANKEM Derg*, 25-29.
- Güreser, A., Karasartova, D., Taşçı, L., Boyacıoğlu, Z., ve Taylan, Ö, H. (2017).Çorum'da Akut Gastroenteritli Çocuklarda Rotavirüs ve Adenovirüs Saptanma Sıklığı. *FLORA*, 58-66.
- Kırdar, S., Kahyaoğlu, F., Yazıcı, V., ve Aydın, N.(2017). Antijen Testi İle Rotavirus Pozitif Bulunan Dışkı Örneklerinde PZR İle Viral Gastroenterit Etkenlerinin Araştırılması. *Journal of BSHR*, 88-93.
- İnci, A., Kutoğlu, M, G., ve Baysal, B.(2009). Bir eğitim ve araştırma hastanesinde rotavirus gastro-enteriti prevalansının araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* ,79-82.
- Bayraktar, B., Toksoy, B., ve Bulut, E.(2010). Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus ve adenovirus saptanması. *Original Dergisi*,15-7.
- Durmaz, R., Kalaycioglu, A, T., Acar, S., Bakkaloglu, Z., ve Karagoz, A. (2014). Prevalence of Rotavirus Genotypes in Children Younger than 5 Years of Age before the Introduction of a Universal Rotavirus Vaccination Program: Report of Rotavirus Surveillance in Turkey. *PLoS ONE*, 9(12): e113674.
- Koksal, T., Akelma, A., Koksal, A., Kutukoglu, I., Ozdemir, O., Yuksel, C., Bozkaya, D., Catal, F., and Sari, S.(2017). Cost-effectiveness of rotavirus vaccination in Turkey. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*,693-699.
- Durmaz, R., Bakkaloglu, Z., Unaldi, O., Karagoz, A., Korukluoglu, G., ve Atila, T.(2018). Prevalence and diversity of rotavirus A genotypes circulating in Turkey during a 2-year sentinel surveillance period, 2014-2016. *Journal of Medical Virology*, 229-238.
- Naficy, A, B., Abu-Elyazeed, R., Holmes, J, L., Rao, M, R., Savarino, S, J., and Kim, Y. (1999). Epidemiology of rotavirus diarrhea in Egyptian children and implications for disease control. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 770-77.
- Cardoso, D, d., Soares, C, M., Dias e Souza, M, B., de Azevedo Mda, S., Martins, R, M., and Queiróz, D, A. (2003). Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 25-29.

- Tsolenyanu, E., Seheri, M., Dagnra, A., Djadou, E., Tigossou, S., and Nyaga, M. (2014). Surveillance for rotavirus gastroenteritis in children less than 5 years of age in Togo. *The Pediatric Infectious Disease Journal*,14-18 .
- Steenland, M, W., Joseph, G, A., Lucien, M, A., Freeman, N., Hast, M., and Nygren, B, L. (2013). Laboratory-confirmed cholera and rotavirus among patients with acute diarrhea in four hospitals in Haiti, 2012-2013. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 641-646.
- Jianxing, Yu., Shengjie, Lai., Qibin, Geng., Chuchu, Ye., Zike, Zhang., and Yaming, Zheng.(2019). Prevalence of rotavirus and rapid changes in circulating rotavirus strains among children with acute diarrhea in China, 2009–2015. *The Journal of Infection*,66-74.
- Tuzuner, U., Gulcen, B, S., Özdemir, M., ve Feyzioğlu, B.(2016). Gastroenteritli Çocukların Dışkılarında Adenovirus ve Rotavirus Sıklığı ve Mevsimsel Dağılımı. *Klinik Dergisi*, 121-124.
- Biçer, S., Tunca Şahin, G., Koncay, B., ve ark. (2008). Çocuk acil servisinde saptanan rotavirus gastroenteriti olgularının sıklığı. *Journal of Pediatric Infection*,96-99.
- Kim, J, S., Kang, J, O., Cho, S, C., Jang, Y,T., Min, S, A., and Park, T, H. (2005). Epidemiological profile of rotavirus infection in the Republic of Korea: results from prospective surveillance in the Jeongeub District, 1 July 2002 through 30 June 2004. *The Journal of Infectious Diseases*, 49-56.
- Kaya, S., Ergün, A., Aynalı, A., Öztürk, T., Önal, S., ve Arıdoğan, B. (2013). Dışkı örneklerinde rotavirus pozitifliği ve mevsimsel sıklığının incelenmesi. *S.D.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*,16-20.
- Iraz, M., Ceylan, A. (2013). Akut Gastroenteritli 0-5 Yaş Arası Çocuklarda Rotavirus Sıklığı. *ANKEM Derg*, 101-106.
- Atalay, M, A., Kandemir, İ.,ve Gökahmetoğlu, S. (2013). Üçüncü basamak bir hastanedeki gastroenteritli çocuklarda rotavirus enfeksiyonu sıklığı. *Dicle Tıp Dergisi*, 212-215.
- İlkaç, M., Şahin, A., Nazik, H., ve Öngen, B. (2012). Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus sıklığının araştırılması ve rotavirus sezonunun takibi: beş yıllık sonuçların değerlendirilmesi. *ANKEM Derg*, 25-29.
- Gültepe, B., Güdücüoğlu, H., Çıkman, A., Parlak, M., ve Berktaş, M. (2013). Van Yöresinde Gözlenen Gastroenteritlerde Rotavirus ve Adenovirus Sıklığı. *Sakarya Medical Journal*, 131-134.
- Ogilvie, I., Khoury, H., Goetghebeur, M, M., El Khoury, A, C., and Giaquinto, C.(2012). Burden of community-acquired and nosocomial rotavirus gastroenteritis in the pediatric population of Western Europe: a scoping review. *BMC Infectious Diseases*, .1-14.

- Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A., and Glass, R. I. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases*, 565-572.
- Torun, E. (2009). *Bölgemizde akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus infeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisi*. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi
- Bozdayi, G., Dogan, B., Dalgic, B., Bostanci, I., Sari, S., and Battaloglu, N. O. (2008). Diversity of human rotavirus G9 among children in Turkey. *Journal of Medical Virology*, 733-740.
- Tapisiz, A., Karahan, Z. C., Çiftçi, E., İnce, E., ve Doğru, Ü. (2011). Changing patterns of rotavirus genotypes in Turkey. *Current Microbiology*, 517-522 .
- Mera, M., Bozdayi, G., Özkan, S., Dalgıç, B., Alp, G., ve Ahmed, K. (2011). Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus prevalansı, serotip ve elektroferotip dağılımı. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 104-112.
- Tümgör, A. (2010). *Çocuk Yaş Grubunda Görülen Gastroenteritlerde Viral ve Bakteriyel Etkenlerin Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması*. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi.
- Bozdayi, G., Altay, A., Yahiro, T., Ahmed, S., Meral, M., ve Dogan, B. (2016). Re-emergence of genotype G9 during a five-and-a-half-year period in Turkish children with rotavirus diarrhea. *Archives of Virology*, 2879-2884.
- Cowley, D., Nirwati, H., Donato, C. M., Bogdanovic-Sakran, N., Boniface, K., Kirkwood, C. D., and Bines, J. E. (2018). Molecular characterisation of rotavirus strains detected during a clinical trial of the human neonatal rotavirus vaccine (RV3-BB) in Indonesia. *Vaccine*, 5872-5878.
- Ellen, S., Bass, Dante, A. Pappano and Sharon G. Humiston. (2007). Rotavirus. *Pediatr Rev*, 183-191.
- Ceyhan, M., Alhan, E., Salman, N., Kurugol, Z., Yildirim, I., ve Celik, U. 2009. Multicenter prospective study on the burden of rotavirus gastroenteritis in Turkey, 2005-2006: a hospital-based study. *The Journal of Infectious Diseases*, 234-238.
- Santos, N., Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/ genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in Medical Virology*, 29-56.
- Linhares, A. C., Verstraeten, T., Wolleswinkel-van den Bosch, J., Clemens, R., and Breuer, T. (2006). Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, 312-314.
- Tcheremenskaia, O., Marucci, G., De, Petris, S., Ruggeri, F. M., Dovecar, D., and Sternak, S. L. (2007). Molecular epidemiology of rotavirus in Central and Southeastern Europe. *Journal of Clinical Microbiology*, 2197-2204.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KATREN Albakkour
 Uyuğu : Suriye
 Doğum tarihi ve yeri : 30/01/1987 HAMA
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 05545937821
 e-posta : katren-1987@hotmail.com



Eğitim

Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi /Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü	Devam ediyor
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü	2013
Lisans	Halep Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Hama	2004

İş Deneyimi

Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2010- 2017	Okul	Öğretmen

Yabancı Dili

Arapça/ İngilizce

Yayımlar

1. AYDIN, M., OĞUZ, İ., AL-BAKKOUR, K., ÇOLAK, M., DOĞRUMAN, F., MUMCUOĞLU, İ., KUŞTİMUR,S., ARSLAN, Y, K.(2018). Blastocystis spp.'nin Araştırılmasında Modifiye Formol-Eter Çöktürme Yöntemi, Ticari (Feconomics®) ve İki Farklı Modifikasyonunun Karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* ,247-255.
2. GDUMAN, G, G., ÇUHADAR1, T., YAMAK, A, S., ALBAKKOUR1, K., ÇAĞLAR1, K., KALKANCI, A.(2019). Düşük Düzeyde Klorhekzidin ile Karşılaştırılmış Klebsiella pneumoniae İzolatlarının Karakterizasyonu. *Mikrobiyoloji Bülenti* ,114-117.

Hobiler

Spor, Kitap okuma





GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

