

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**( UZMANLIK TEZİ )**

**BAHAR VE YAZ MEVSİMLERİNDE GÖRÜLEN ÇOCUKLUK ÇAĞI  
AKUT SOLUNUM YOLLARI İNFEKSİYONLARINDA  
BOCAVİRUS DNA'SININ SAPTANMASI**

**DR. EMEL ÇELEBİ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. MUSTAFA SAMASTI**

**İSTANBUL-2007**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık öğrenimim süresince, bilgi ve hoşgörüsünü hiç esirgemeyen Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı, değerli hocam Prof. Dr. Müzeyyen Mamal TORUN'a içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında, desteğini ve bilgisini sunan, öğrenim sürecimde emeği geçen ve her aşamada engin bilgi ve birikimi ile bana ışık tutan sayın danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Samastı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenimim sırasında bilgi ve deneyimleri ile desteklerini gördüğüm, değerli hocam Prof. Dr. Kemal ALTAŞ'a ayrıca teşekkür ederim.

Yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım, Prof. Dr. Yaşar BAĞDATLI, Prof. Dr. Bekir KOCAZEYBEK, Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ, Doç. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Doç. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI, Doç. Dr. Gökhan AYGÜN, Doç. Dr. Hrisi BAHAR ve Yard. Doç. Dr. Erdal POLAT'a ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

Örnekleri toplama aşamam sırasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Yücel TAŞTAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bana yardımcı olan ve bilgisini esirgemeyen Uzm. Dr. Kenan MİDİLLİ ve Dr. (Ph.D.) Sevgi ERGİN başta olmak üzere Dr. Filiz YARIMÇAN SAĞLAM, Lab. Canan KANBAK, Lab. Şerife BOZYEL, ve Lab. Nutulah YILDIZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerini hiç esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Güldehan ATIŞ, Dr. Fadimana ÇATAL, Dr. (Ph.D.) Pelin YÜKSEL ve MSc. Tıb. Biy. Reyhan ÇALIŞKAN'A teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımda attığım her adımda beni koşulsuz destekleyen ve sonsuz sevgileriyle güç veren anneme, babama, eşime ve kızıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1263

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	2
İÇİNDEKİLER	3
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	5
ÖZET	6
ABSTRACT	7
1.GİRİŞ VE AMAÇ	7
2.GENEL BİLGİLER	10
2.1. Viral solunum yolu infeksiyonlarının epidemiyolojisi	10
2.2 Viral solunum yolu infeksiyonlarının fizyopatolojisi	14
2.3. Viral solunum yolu infeksiyonlarında risk faktörleri	15
2.4. Viral solunum yolu infeksiyonlarında mevsimsellik	15
2.5.Klinik Tablolar	17
2.5.1 Soğuk Algınlığı	17
2.5.2 Farenjitler	17
2.5.3 Akut Laringotrakeobronşit (Krup)	18
2.5.4 Akut Bronşiyolit	19
2.5.5.Viral pnömoniler	19
2.6. Viral solunum yolu infeksiyonlarının tanısı	22
2.7. Viral solunum yolu infeksiyonlarında tedavi	23
2.8.Human Bocavirus (HBoV)	25
3.GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1.Hasta örneklerinin toplanması ve taşınması	39
3.2.Viral genomun ekstraksiyonu	39
3.3.Viral DNA'nın amplifikasyonu	39
3.4.Kullanılan HBoV Primer Dizileri	40
3.5.Koinfeksiyonların araştırılması	41
3.5.1.Nested-RT-PCR Revers Transkripsiyon Aşaması	41
3.5.2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	42
3.5.3.Kullanılan Primer Dizileri	46
3.5.3.1.HRSV primer dizileri	46
3.5.3.2.İnfluenza A primer dizileri	46

3.5.3.3.İnfluenza B primer dizileri	47
3.5.3.4.Adenovirus primer dizileri	47
3.6.Çalışmada kullanılan çözeltiler ve tampon sıvıları	48
3.6.1.Elektroforez tamponu (10xTBE- Jel ve tanklar için tampon)	48
3.6.2.Etidiyum bromür (EB)	48
3.6.3.Yükleme tamponu (Loading Buffer)	48
3.6.4.Jelin Hazırlanması	48
4.BULGULAR	50
4.1.PCR SONUÇLARI	55
5.TARTIŞMA	57
K AYNALAR	62

## **SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

- HBoV: Human Bocavirus  
HRSV: Human Respiratory Syncytial Virus  
PIV: Parainfluenza Virusu  
HMPV: Human Metapneumovirus  
WHO: World Health Organization  
CMV: Cytomegalovirus  
VZV: Varicella zoster virus  
PCR: Polimeraz Chain Reaction  
DNA: Deoksiribonükleik asit  
RNA: Ribonükleik asit  
RNaz: Ribonükleaz  
DFA: Direkt Floresan Antikor testi  
IFA: İndirekt Floresan Antikor testi  
EIA: Enzim İmmun Assay  
EB: Etidyum bromür  
TBE: Tris-borik asit EDTA

## ÖZET

### **Bahar Ve Yaz Mevsimlerinde Görülen Çocukluk Çağı Akut Solunum Yolları İnfeksiyonlarında Bocavirus DNA'sının Saptanması**

Akut solunum yolu infeksiyonları, çocukluk çağında mortalite, morbidite ve hastaneye yatışın en önemli nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu grup hastalarda solunum yolu infeksiyonları daha çok viral kaynaklı olurken, önemli bir kısmında sebep belirlenememektedir.

Human Bocavirus (HBoV), ilk kez 2005 yılında İsveç'te alt solunum yolu infeksiyonu gözlenen çocukların klinik örneklerinden izole edilmiştir. HBoV'nun tüm genomunun filogenetik analizleri sonucunda, virusun *Parvoviridae* ailesinde bulunan *Bocavirus* cinsindeki canine minute virus ve bovine parvovirus ile yakın ilişkili olduğu gözlenmiştir. Yakın zamana kadar bu virusun solunum yolu infeksiyonlarındaki rolü bilinmiyordu. Fakat, son zamanlardaki çalışmalarla bu virusun özellikle 5 yaş altı çocukların akut solunum yolu infeksiyonlarında etken olduğu gösterilmiştir.

Mart 2007- Ağustos 2007 tarihleri arasında yürüttüğümüz çalışmamızda, hastanemizin çocuk ve çocuk acil polikliniğinde akut solunum yolu infeksiyonu tanısı konulan 15 yaş altı 119'u erkek, 84' ü kız toplam 203 hastanın boğaz sürüntü örneği alınarak incelenmiştir. Eküvyonla alınan örnekler taşıma sıvısına aktarılarak kısa sürede buz üzerinde laboratuvara getirilmiştir. Vortekslenen örnekler çalışılncaya kadar -70°C' de bekletilmiştir.

HBoV DNA'sı, kapsid olmayan protein 1 genini (NP1) hedefleyen primer dizilerinin kullanıldığı PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

Sonuç olarak, 203 örnekten 11'inde (% 5.4) HBoV pozitif olarak saptanmıştır. HBoV pozitif hastaların yaş ortalaması 3 (1-10) olup bunların %72.6' sı 5 yaş altıdır.

HBoV pozitif 11 hastanın aylara göre dağılımı ise şöyledir: Mart 1, Nisan 5, Mayıs 2, Haziran 2, Temmuz 1 . Ağustos ayında pozitifliğe rastlanmamıştır.

HBoV DNA'sı tespit edilen hastaların 1'inde birden fazla virus açısından (HBoV ve adenovirus) pozitiflik elde edilmiş ve koinfeksiyon varlığı düşünülmüştür.

## ABSTRACT

### **Detection of Bocavirus DNA of Childhood Acute Respiratory Tract Infections that Seen at Spring and Summer Seasons**

Acute respiratory tract infections are a leading cause of hospitalization, illness, and death in infants and young children. Some of the most important viral agents for this group of patients. However, in a substantial proportion of children with respiratory tract diseases, no pathogen could be identified.

Human Bocavirus (HBoV) was firstly isolated from clinical samples of children with lower respiratory tract infections in Sweden in 2005. Phylogenetic analyses of the complete genome of HBoV showed that the virus is most closely related to canine minute virus and bovine parvovirus which are members of the genus *Bocavirus* family *Parvoviridae*. Recently the role of HBoV in respiratory tract illness was unknown however with recent studies it was demonstrated that this virus is a cause of acute lower respiratory tract infections especially in children younger than five years.

In our study, performed between March and August 2007, we analyzed throat swabs of 119 boys and 84 girls, totally 203 children younger than 15 years of age with clinical diagnosis of acute respiratory tract infection, having been admitted to general pediatrics and emergency pediatrics polyclinics of our Hospital. Samples in special transport medium were carried on ice during transport. Samples that were vortexed were kept at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

A PCR detection method was devised that targeted the noncapsid protein-1 (NP-1) gene.

Consequently, the HBoV was found positive in 11(5.4 %) out of 203 samples. The average age of children who have the HBoV positive was 3(1-10) and 72.6 % of them were under 5.

The distribution of the 11 patients who have the HBoV positive was as follows: March 1, April 5, May 2, June 2, July1, and August 0.

In one of the patients who has the HBoV DNA, more than one virus were found positive (HBoV and adenovirus) and a coinfection was considered.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut solunum yolu infeksiyonları, çocukluk çağında en sık karşılaşılan infeksiyonlardır. Bunların çoğu üst solunum yolu infeksiyonları şeklinde olup hemen her ülkede benzer oranlarda görülmektedir. Buna karşılık akut alt solunum yolu infeksiyonları tüm dünyada infeksiyon hastalıklarına bağlı mortalitenin en önemli nedenidir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre her yıl 5 yaşın altında 3 milyon çocuk akut alt solunum yolu infeksiyonu nedeniyle hayatını kaybetmektedir (1,2).

Viral solunum yolu infeksiyonlarının en sık etkeni human respiratory sinsityal virus (HRSV) olup bunu influenza virusları, parainfluenza virusları, adenoviruslar, rhinoviruslar, coronaviruslar ve human metapneumovirus (HMPV) izlemektedir (3,4).

Ayrıca kemik iliği veya solid organ transplantasyonu, kanser, lösemi gibi yüksek riskli hasta gruplarında başta cytomegalovirus(CMV) olmak üzere herpesviruslar, adenovirus, bakteriler, mantarlar, Pneumocystis jiroveci ve değişik fırsatçı patojenler ciddi solunum yolu infeksiyonları yapabilmektedirler (5).

Akut solunum yolu infeksiyonlarının laboratuvar tanısında HRSV. influenza viruslar, parainfluenza virusları, adenoviruslar ve yaygın bakteriyel etkenlerin temel olarak incelendiği rutin laboratuvar testleriyle etkenlerin ancak %30-60 kadarı belirlenebilmektedir. Bu durum yeni bildirilen solunum yolu viruslarının da testlere dahil edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (6).

Alt solunum yolu infeksiyonu tanısıyla hastaneye yatırılan çocukların da %12-39 kadarında etken saptanamadığı bildirilmektedir (7,8). Bu durumu göz önüne alan İsveç'li araştırmacılar, 2005 yılı ortalarında, bilinmeyen patojenler açısından çok sayıda örneğin hızla taranmasını sağlayan bir randomize PCR yöntemi geliştirdiler. Bu yöntemle solunum yolu örneklerinden yeni bir virus saptadılar. Nükleotid düzeyinde bir benzerlik olmamasına karşılık aminoasit sekansları, bovine parvovirus ile canine minute viruse anlamlı derecede uyan bu virusun *Bocavirus* cinsinden, daha önce karakterize edilmemiş ve ilk kez insanlarda infeksiyon etkeni olarak saptanan bir virus olduğu sonucuna vararak human bocavirus (HBoV) adını verdiler (9).

Bu gelişmeden sonra retrospektif olarak incelenen bir çalışmayla 540 nazofarengeal aspirat örneğinin 17'sinde (% 3.1) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle HBoV pozitifliği saptandı. Bu 17 hastanın 14'ünde bilinen başka bir viral etkenin bulunmaması nedeniyle, HBoV'nun solunum yolu infeksiyonlarının olası bir sebebi olduğu sonucuna varıldı (9).

Yakın zamanda keşfedilen bu solunum yolu virusunun ülkemizdeki durumu bilinmemektedir. Solunum yolu infeksiyonları başlığı altında toplanan değişik klinik tabloların etkenlerinin bilinmesi hem epidemiyolojik ve hem de tedavi açısından çok önemlidir.

Solunum yolu viruslarının tanımlanması gereksiz antibiyotik kullanımını azaltarak ülke ekonomisine yarar sağlayacağı gibi ayrıca toplumda dirençli bakteriyel suşların gelişmesini de önleyecektir.

Bu çalışmada hastanemizin çocuk polikliniğine başvuran solunum yolu infeksiyonu semptomları gösteren çocuk hastaların orafarengeal sürüntü örneklerinde spesifik polimeraz zincir reaksiyonu ile HBoV DNA'sı araştırılması amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Viral Solunum Yolu İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

Solunum yolu infeksiyonları tüm dünyada çocuklar ve erişkinler arasında en sık rastlanan, en çok aktif iş ve okul günü kaybına neden olan hastalıklarının başında gelmektedir. Özellikle akut solunum yolu infeksiyonları gerek dünyada gerekse ülkemizde morbidite ve mortalitenin en önemli nedenleri arasında yer alır (10,11).

Çocukların yaklaşık 1/3'ünün yaşamlarının ilk yılında alt solunum yolu infeksiyonu geçirdiği belirlenmiştir. Bu oran okul döneminde % 5-10'a, erişkinlerde ise % 5'e inmekte ve yaşlılarda tekrar % 17'ye kadar yükselmektedir. Erkek çocukların alt solunum yolu infeksiyon insidansı ilk 10 yaşta daha yüksek iken, adolesan dönemde oran eşitlenir (3,4).

Solunum yolu infeksiyonları en sık viral etkenlerle gelişir. Bu infeksiyonlar etkenin cinsine, konağın yaş ve immun durumuna göre farklı klinik tablolara yol açabilir (12).

Solunum yolu infeksiyonlarında en sık izole edilen viruslar, HRSV, influenza virusları, parainfluenza virusları (PIV), adenoviruslar ve coronaviruslardır. Bu viruslar küçük çocuklarda ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi solunum yolu infeksiyonlarına yol açabilmektedir. Sağlıklı kişilerde bu viruslarla oluşan infeksiyonlar hafif ateş ve öksürük belirtileriyle belli bir süre içerisinde kendiliğinden iyileşirken, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ve iki yaşın altındaki çocuklarda (bilhassa HRSV infeksiyonları) bronşiolit, pnömoni ve ağır solunum yetersizliğinden ölüme kadar değişen tablolara seyredebilmektedir (13,14).

En sık karşılaştığımız solunum yolu virusu olan HRSV aynı zamanda önemli bir hastane infeksiyonu etkenidir. Özellikle pediatri servislerinde her yıl epidemiler yapabilmektedir. Altta yatan kalp, pulmoner veya bağışıklık yetersizliği olan çocuklarda mortalite ve morbidite yüksektir. Hastane personeli, hastalarla ilgilenirken sekresyon veya kontamine objelere dokunarak HRSV infeksiyonunun yayılmasına neden olurlar (15,16).

İnfluenza virus infeksiyonları karakteristik olarak epidemiler şeklinde görülmektedir. Bu infeksiyonlar küçük çocuklardan yaşlılara kadar hemen her yaş grubunu etkiler. Epidemiler genellikle 1-3 yıl aralıklarla görülür. Daha seyrek olarak ortalama 10 yılda bir pandemiler yapabilmektedir. Muhtemelen 20 milyona yakın kişinin ölümüne neden olmuş 1917-18 İspanyol gribi dünyadaki en büyük pandemisi kabul edilmektedir (13,14).

Parainfluenza virüsleri (PIV) en sık krup etkeni olarak bilinir. Bunlar üst solunum yolu hastalıkları dışında bronşit, bronşiolit ve pnömoni gibi ciddi alt solunum yolu infeksiyonlarına da

yol açabilmektedir (14). Parinfluenza tip1 ve tip 2 daha çok toplum kökenli, tip 3 ise nozokomiyal infeksiyonlara neden olmaktadır. Yeni doğan servislerinde ve bakım evlerinde tip 3 ile oluşan salgınlar bildirilmiştir (17).

Solunum yolu infeksiyonları viruslar dışında birçok bakteri, mantar ve parazit etkeniyle de oluşabilmektedir (14) (tablo 2-1 ve 2-2 ).

**Tablo2.1 ÜST SOLUNUM YOLU İNFEKSİYON ETKENLERİ (14)**

<b>VİRUSLAR</b>	<b>BAKTERİLER</b>	<b>MANTARLAR</b>	<b>PARAZİTLER</b>
<i>Rhinovirus</i>	<i>Streptococcus A ve B grupları</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Entemoaba histolytica</i>
<i>Coronavirus</i>	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Paragonimus westermani</i>
<i>Influenza virüsleri</i>	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Dirofilaria immitis</i>
<i>Parainfluenza virüsleri</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>
<i>Respiratory sincityal virus</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Paracoccidioides</i>	<i>Echinococcus</i>
<i>Metapneumovirus</i>	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>multilocularis</i>
<i>Adenovirus</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Penicillium marneffeii</i>	
<i>Enteroviruslar</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	
<i>Herpes simpleks virusu</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>		
<i>Ebstein- Bar virusu</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Adenovirus</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>		
<i>Cocsaxie A virusu ve diğer</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>enteroviruslar</i>	<i>Diğer gram negatif bakteriler</i>		
<i>Varicella-zoster virusu</i>			
<i>Cytomegalovirus</i>			
<i>Measles virus</i>			

Tablo 2.2 ALT SOLUNUM YOLU İNFEKSİYON ETKENLERİ (14)

VİRUSLAR	BAKTERİLER	MANTARLAR	PARAZİTLER
<i>Parainfluenza virusu 1</i>	<i>Bordetella pestussis</i>	<i>Aspergillus spp</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
<i>Parainfluenza virusu 2</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Strongyloides stercoralis</i>
<i>Influenza virusu</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Zygomycetes</i>	<i>Toxocara spp</i>
<i>Adenovirus</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Fusarium spp</i>	<i>Paragonimus westermani</i>
<i>Ebstein-Bar virusu</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Scedosporium apiospermium</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Respiratory syncytial virus</i> (bebeklerde)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Trichosporon spp</i>	<i>Ancylostoma braziliense</i>
<i>Metapneumovirus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	
<i>Parainfluenza virusu 3</i> (bebeklerde ve okul çocuklarında)	<i>Streptococcus A grubu</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	
<i>Varicella-zoster virusu</i> (erişkinlerde veya immünsüpressif hastalarda)	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Coccides immitis</i>	
<i>Cytomegalovirus (immünsüpressif hastalarda)</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Paracoccides brasiliensis</i>	
<i>Measles virus</i>	<i>Actinomyces türleri</i>	<i>Pneumocystis jiroveci</i>	
	<i>Nocardia türleri</i>	<i>Candida spp</i>	
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
	<i>Neisseria meningitidis</i>		
	<i>Chlamydia trachomatis</i>		
	<i>Chlamydophila psittaci</i>		
	<i>Burkholderia türleri</i>		
	<i>Legionella türleri</i>		
	<i>Francisella tularensis</i>		
	<i>Rhodococcus equi</i>		
	<i>Coxiella burnetii</i>		
	<i>Rickettsia rickettsii</i>		

## 2.2. Viral Solunum Yolu İnfeksiyonlarının Patofizyolojisi

Viral solunum yolu infeksiyonları ağız ve solunum yoluyla bulaşır. Öksürük, aksırık ve konuşma sırasında saçılan aerosoller, tükürük parçacıkları, su ve gıdalar, ayrıca kontamine eller aracılığı ile bulaşmalar olabilmektedir (14).

Solunum yollarında mikroorganizmaların infeksiyon oluşturmalarını engelleyecek konağa ait koruyucu mekanizmalar bulunur. Bu mekanizmalar üst ve alt solunum yollarına ait olmak üzere ikiye ayrılabilir. Üst solunum yollarına yerleşik mukosilyer sistem sayesinde büyük mikroorganizmalar elimine edilir. Buruna çekilen havadaki mikroplar, kıllarla örtülü mukoza tarafından filtre edilebilir ve silialı epitelin örten mukus tarafından yakalanır. Silia hareketiyle birlikte yüklü mukus tabakası ile farekse doğru itilir, burada ya yutulur ya da dışarı doğru atılır. Alt solunum yollarında mukus ve silialı epitel yoktur, buraya ulaşabilen 5 mikrometreden küçük mikroorganizmalar immun sistemin yardımıyla, özellikle de makrofajlar tarafından fagosite edilir.

Viral etkenler, solunum yolları üzerindeki epitel hücrelerine kendilerine ait protein yapılarıyla tutunarak mukosilyer savunmayı aşarlar. Ayrıca bazı solunum yolu virusları (influenza virus, parainfluenza virus) viral nöraminidazlarını kullanarak mukusun vizkozitesini düşürürler. Viruslar epitele tutunduktan sonra hücre bütünlüğünü bozar ve bakterilerin yerleşmesine zemin oluştururlar, böylece sekonder bakteriyel infeksiyonların oluşmasına yol açarlar (18).

Soğuk algınlığına en sık neden olan rinoviruslar nazal mukozaya tutunarak hücre içine girer ve replike olur. Replikasyon sonucu binlerce kopya oluşur ve hücrenin parçalanmasına neden olurlar. Viruslar burun boşluğuna atılır ve diğer nazal hücreleri infekte ederler. Çalışmalarda nasal mukozada ve sekresyonlarda polimorf nüveli lökosit artışı ve olası bir IL-8 artışı gösterilmiştir (12).

Viral farenjitler çoğunlukla soğuk algınlığının bir komponentidir. Patofizyolojisi de benzer mekanizmalarla oluşur, konağın oluşturduğu immun yanıt ve direkt viral hasar farekste varolan inflamasyonun şiddetini artırır (12).

Akut laringotrakeobronşitte viral infeksiyona bağlı inflamasyon hem üst solunum yollarında hem de akciğer parankimindedir. Krupun havlar tarzındaki öksürüğü ve inspiratuar stridorunun en büyük sebebi larenks ve trakeadaki inflamasyondur. Larenks ve trakea mukoza ve submukoza epitelinde inflamatuvar değişiklikler görülür. Mukozal ve submukozal hücrelerde histiosit, lenfosit, plazma hücreleri ve polimorf nüveli lökosit infiltrasyonu bulunur. Bu inflamasyon hava yolunun en dar olduğu subglottik bölgede obstrüksiyona yol açar (12).

Bronşiyolitte temel patoloji, HRSV'nun solunum yolları epitelinde sebep olduğu nekrozdur. HRSV komşuluk yoluyla diğer epitel hücrelerini de infekte eder. Goblet hücrelerindeki

proliferasyon, artmış mukus sekresyonuna yol açar ve lenfosit infiltrasyonu ve submukozal ödem gelişir. Oluşan inflamasyon sonucunda bronşiyollerde ödem ve obstrüksiyon gelişir. Değişik derecelerde ve yama tarzında tıkanmalar akciğerin bazı bölgelerinde atelektaziler oluştururken diğer bölgelerde aşırı havalanmaya neden olur (12).

Viral pnömonide inflamasyon trakea epiteli, bronş ve alt solunum yollarında geniş bir hücre hasarıyla başlar. Trakea, bronş ve bronşiolerde submukozal hiperemi fokal hemoroji, ödem ve hücrel infiltrasyon mevcuttur. Alveolar kapiller, intra alveolar hemoroji nedeniyle hiperemik görünür (12).

### **2.3. Viral Solunum Yolu İnfeksiyonlarında Risk faktörleri**

Solunum yolu hastalıkları için fiziksel, immunolojik, demografik ve çevresel olmak üzere bir çok risk faktörü vardır. Bağışıklığı baskılanmış hastalar, yeni doğanlar, küçük çocuklar, ileri yaşta olanlar, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar, ayrıca kongenital kalp hastalığı ve ya bronkopulmoner displazisi olanlar yüksek risk grubunu oluştururlar (14,19).

Diğer risk faktörleri arasında; düşük sosyoekonomik durum, kalabalık yaşam ortamı, anne sütüyle beslenememe, yetersiz beslenme , çevre kirliliği ve çevrede sigara kullanımı sayılabilir (15,16).

Sağlıklı kişilerde viruslarla oluşan solunum yolu infeksiyonları hafif ateş ve öksürükle seyrederek belli bir süre içerisinde kendiliğinden iyileşirken, bağışıklık sistemi baskılanmış ve ya diğer risk faktörleri bulunan kişilerde bronşiolit, pnömoni ve ağır solunum yetersizliğinden ölüme kadar değişen tablolar ortaya çıkabilmektedir. Bu infeksiyonlar kistik fibroz ve astım gibi kronik hastalıkların alevlenmesine yol açabilmektedir .

HRSV'nun neden olduğu alt solunum yolu infeksiyonlarının erkek çocuklarda kız çocuklara göre daha sık görüldüğü ve daha ağır seyrettiği saptanmıştır (16).

### **2.4. Viral Solunum Yolu İnfeksiyonlarında Mevsimsellik**

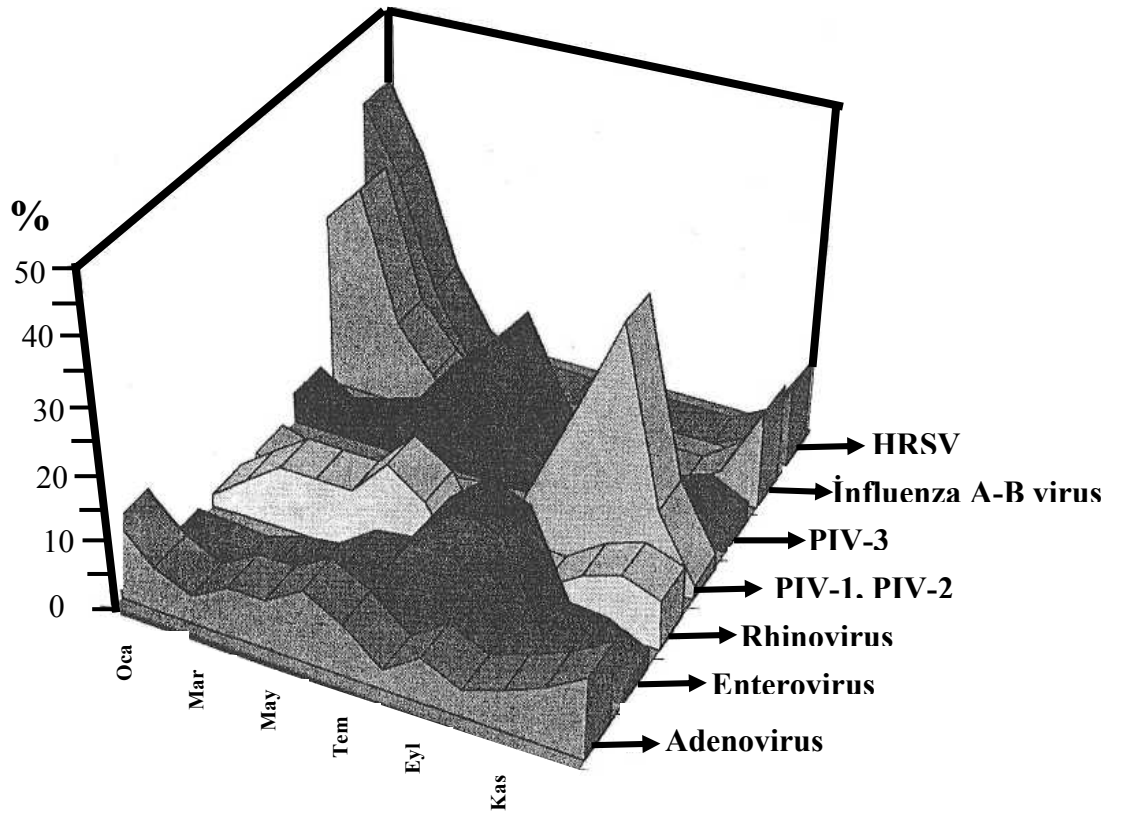
Akut solunum yolu hastalıkları mevsimsel özellikler gösterirler. Bu durum hastalığın tanısı ve kontrol stratejileri bakımından önemlidir (12).

İnfluenza ve HRSV salgınları genellikle, kış ve ilkbahar aylarında görülür. Tropikal bölgelerde ise salgınlar yağışların daha çok olduğu Haziran ve Aralık ayları arasında ortaya çıkmaktadır. Örneğin, Hawaii'de HRSV ile infeksiyonlar daha çok yaz aylarında bildirilmektedir. İnfluenza salgınları ılıman ülkelerde kışın, tropik ülkelerde ise yılın her mevsiminde görülebilmektedir (20,21).

Parainfluenza tip 1 ve 2 birbiriyle dönüşümlü şekilde sonbahar ve kış aylarında 2-5 yaşlarındaki çocuklarda krup salgınları oluşturur. Tip 3 daha seyrek olarak ve genellikle 1 yaşın altındaki çocuklarda bronşiolit ve pnömoniye neden olur. İnfeksiyonlar kış ve yaz aylarında görülebilmektedir (12).

Rhinovirus enfeksiyonları daha çok bahar aylarında coronavirus enfeksiyonları ise kış aylarında sık görülür. Enteroviruslar ise ekseri yaz sonu döneminde enfeksiyon oluştururlar. VZV enfeksiyonları çoğunlukla geç kış ve erken bahar döneminde görülür. Adenovirus enfeksiyonları da belirgin bir mevsimsellik göstermezler (12).

Solunum yolu viruslarının mevsimselliği şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1: Solunum yolu viruslarının mevsimsel dağılımı (12)

## **2.5.Klinik Tablolar**

### **2.5.1 Soğuk Algınlığı**

Soğuk algınlığı çeşitli viruslar tarafından oluşturulan, üst solunum yolları bulgu ve belirtileriyle seyreden bir hastalık tablosudur. Dünyada çocuk ve erişkinlerde en sık rastlanan bu infeksiyon hastalığı muhtemelen gereksiz antibiyotik kullanımının en fazla olduğu klinik durumdur. Hastalık her yaş grubunda görülebilmekle birlikte özellikle 3 aylıkla 3 yaş arası çocuklarda sık ortaya çıkmaktadır. Çocukların yılda ortalama 3-6 soğuk algınlığı atağı geçirdiği tahmin edilmektedir (13,22,23).

Soğuk algınlığı özellikle okulların açılması ile eş zamanlı olarak sonbahar mevsiminde görülmeye başlar. Genellikle kış mevsimiyle ilişkilendirilen bu hastalık daha seyrek de olsa yazın da görülebilmektedir (23).

Kalabalık yaşama koşullarında infeksiyon sıklığı artar. Aile, okul ve askeri birlikler infeksiyonun sık rastlandığı gruplardır. Uzun süren toplu taşıma faaliyetlerinin ve soğutma sistemlerinin de infeksiyonların oluşmasına katkısı vardır (13,23).

Rhinoviruslar soğuk algınlığı olgularının %40-50 sinden sorumludur. Bu virüslerin 100' den fazla serotipi bulunmaktadır. Ayrıca coronavirus, HRSV, adenovirus, PIV, influenza virus, enterovirus, rubella, rubeola virus ve diğerleriyle beraber 200'e yakın virus etiyojiden sorumlu tutulmaktadır ( 12, 23).

Klinik olarak inkübasyon süresi yaklaşık 2 gündür. En sık görülen belirtiler burun akıntısı, burun tıkanıklığı, hapşırma, boğazda yanma ve öksürüktür. Baş ağrısı ve halsizlik görülebilir. Yüksek ateş bebeklerde, ileri yaşlılarda ve bağışıklığı baskılanmış bireylerde sıktır. Gözlerde yaşarma ve yanma olabilir. Semptomlar 7 gün sürmekle birlikte %25 hastada 2 haftaya kadar uzayabilir. Süt çocuklarının %25 inde komplikasyon olarak otitis media gelişir (12, 24, 25).

### **2.5.2 Farenjitler**

Akut farenjit, sıklıkla soğuk algınlığının bir komponenti olarak ortaya çıkan genellikle viral bazen de bakteriyel etkenlere bağlı bir hastalıktır. Farenjit olgularının büyük bir kısmı kış aylarında meydana gelir. Aile bireyleri arasında yüksek bir bulaş söz konusudur (23).

Farenjitte öne çıkan semptom boğaz ağrısıdır. Fizik muayenede farenks inflamasyonu gözlenir. Klinik belirtiler infeksiyonun viral mi yoksa bakteriyel mi olduğu hakkında ipucu verebilir. Eğer nazal şikayetlerin eşlik ettiği bir farenjitse genellikle viruslar, nazal şikayetlerin olmadığı bir farenjitse genellikle bakteriler etkindir (12).

İnfluenza viruslarıyla gelişen farenjitte miyalji, öksürük, baş ağrısı ve ateş gibi sistemik belirtiler dikkati çeker (12,23).

Adenoviruslara bağlı farenjitin tipik özelliği, hastaların %29-50'sinde foliküler tip konjunktivitinin gelişmesidir. Halsizlik, miyalji, üşüme, titreme, ateş ve baş dönmesi görülür. Ateş 5-6 gün sürer. Boğaz ağrısı belirgindir ve eksudasyon saptanabilir (23).

Epstein Barr virusuna bağlı infeksiyöz mononükleozda hastaların yaklaşık yarısında eksudatif farenjit ve tonsillit söz konusudur. Ateş, halsizlik, yorgunluk ve servikal lenfadenopati sıklıdır. Lenfadenopati yaygın olabilir ve splenomegaliye %50 olguda rastlanır. Benzer klinik tablo CMV ile de gelişebilir, ancak farenks bulguları daha siliktir.

*S.pyogenes*'e bağlı farenjit hafif veya ağır seyredebilir. Ağır olgularda ateş, farinkste şiddetli ağrı, lenfadenopati ve lökositoz klinik tabloyu oluşturur. Hafif olguları viral farenjitlerden ayırmak zordur. Viral farenjitler 3 yaşın altında sık görülür. Hastanın 5-15 yaşlarında olması, boğaz ağrısı ve ateşin ani başlaması, tonsillofarengeal eritem ve eksudasyon, ağrılı servikal lenfadenopati ve kızıl döküntüsünün saptanması *S.pyogenes*'e bağlı farenjiti düşündürürken konjunktivit, nezle, anterior stomatit ve viral ekzantemler varlığında viral etyoloji ön plana geçer (23).

### **2.5.3 Akut Laringotrakeobronşit (Krup)**

Laringotrakeobronşit veya daha sık kullanılan ismiyle krup 3 ay ile 6 yaş arasındaki çocuklarda, solunum yolu obstrüksiyonunun en sık nedenidir. Krup çocukluk çağının alt solunum yolu infeksiyonlarının %15 kadarını oluşturur. Erkeklerde kızlara oranla 1.5 kat fazla görülür. Vak'a sayısı, sonbaharın erken dönemlerinde belirgin olarak artarken, kış aylarında azalarak devam eder (23).

Vakaların % 65-75'inde parainfluenza virüsleri rol oynar. En sık etken PIV-1 dir. RSV, İnfluenza A ve B, rhinovirus, adenovirüs ve kızamık virüsleri sorumlu diğer etkenlerdir (12).

Hastalık tipik olarak burun akıntısı, farenjit, öksürük gibi nonspesifik viral üst solunum yolu infeksiyonu bulgularıyla başlar, 12-48 saat içinde solunum yolu obstrüksiyonuna ait belirtiler (karakteristik havlar gibi öksürük, sesin kabalaşması ve inspiratuar stridor) başlar. Hastalığın seyri ve obstrüksiyonun ciddiyeti oldukça değişkendir. Ateş başlangıçta vardır ve genellikle 36-40 °C arasındadır. Şiddetli vakalarda siyanoz, hava açlığı, burun kanadı solunumu, suprasternal, infrasternal ve interkostal çekilmeler görülebilir (22,24,25).

Ciddi krupların %80'inde hipoksemi görülür ve hastaneye yatışı gerektirir (12).

Ayrııcı tanıda en önemli hastalık; epiglottittir. Öksürüğün olması ve salya artışının gözlenmemesi viral krupu epiglottitten ayırmada oldukça yararlıdır. Epiglottit çocuklarda

genellikle *Hemofilus influenzae tip b* tarafından oluşturulur. Geliştirilen konjuge aşı sayesinde epiglottit olguları azalmıştır (12).

Kliniğinde stridor olan diğer infeksiyonlar peritonsiller apse, retrofarengeal apse ve difteridir. İnfeksiyon dışı stridora sebep olan travma ve ya yabancı cisim aspirasyonu da ayırıcı tanıda göz önünde bulundurulmalıdır (12).

#### **2.5.4 Akut Bronşiyolit**

Bronşiyolit, özellikle iki yaşın altındaki infantlarda küçük hava yollarının inflamatuvar daralması sonucu gelişen, hışıltı (wheezing) ile giden bir hastalık olarak tanımlanır. Bronşiyolit 2 yaş altında hastaneye yatış nedenleri arasında ilk sırayı alırken, mevsimsel olarak geç sonbahar ve erken ilkbahar aylarında epidemilere yol açabilir (23,24).

Hastalık seröz burun akıntısı ve hapşırma ile hafif bir üst solunum yolu infeksiyonu şeklinde başlar, 2-3 gün içerisinde alt solunum yollarına ilerler. Öksürük, dispne, beslenme güçlüğü, wheezing ortaya çıkar. Hastalığın ağır seyrettiği vak'alarda takipne, çekilmeler, iritabilite ve siyanoz görülebilir (12,24).

Özellikle 3 aylıktan küçük çocuklarda bronşiyolit apne ile kendini gösterebilir. Bu tabloya farenjit, otitis media, konjunktivit veya pnömoni eşlik edebilir (12,24).

Hastalığın en sık nedeni HRSV'dur. Bu nedenle hastalığın epidemiyolojisi, klinik belirtileri ve tedavisi genel olarak HRSV'nin özelliklerini yansıtır. Bununla birlikte PIV'lar, adenovirus, rhinoviruslar, influenza virus, enteroviruslar, coronaviruslar ve herpes viruslar da bronşiyolit oluşturabilirler (12).

#### **2.5.5. Viral pnömoniler**

Akciğer parankiminin inflamasyonu nedeniyle alveolar gaz değişiminin bozulduğu klinik bir durumdur (23).

Normal erişkin pnömonilerinin %8'inden viral etyoloji sorumludur. Bunun da büyük kısmını influenzae virus oluşturur. Başlangıçta kuru, daha sonra produktif bir öksürük vardır. Ciddi olgularda hipoksi ve siyanoz eşlik edebilir. Akciğer grafisinde bilateral interstisyel infiltrasyon görülür. İnfluenza pnömonilerinde seyrek olmayarak sekonder bakteriyel infeksiyonlar gelişebilir. Başlıca etkenler *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ve *Haemophilus influenzae*'dir. Sekonder bakteriyel pnömonilerde akciğer grafisinde lobar infiltrasyona rastlanır (12).

Yetişkinlerde ayrıca adenovirus, VZV, HRSV, PIV'lar, kızamık virusu ve EBV'u da pnömoni oluşturabilir. Adenovirus ve VZV pnömonileri erişkinlerde bazen ölüme yol açacak kadar ağır seyredebilir.

Çocuk hastalarda etkene göre değişmek üzere ateş, öksürük, nefes darlığı görülür. Fizik muayenede wheezing, takipne dikkati çeker. Hastanın kliniği krup veya bronşolit şeklinde başlayabilir (12).

Viral çocukluk çağı pnömonileri erişkin pnömonilerine göre nispeten daha yaygındır. Özellikle bronşiolitin eşlik ettiği HRSV pnömonileri viral çocukluk çağı pnömonilerinin büyük kısmını oluşturur. Tipik radyografik bulgu diffüz interstisyel pnömonidir. HRSV 5 yaş altı çocukları etkiler. Bu yaş grubunu etkileyen ikinci virus PIV'dur. PIV-3 pnömonileri pulmoner infiltrasyonla seyreder. Yapılan araştırmalar sonucu PIV tip 3 ile HRSV'nin bronşolit ve pnömoninin esas etkeni olduğu ve hastane infeksiyonlarına da yol açtığı bildirilmiştir. Influenzae A ve B virusları özellikle epidemik salgın zamanlarında pnömoniyeye neden olabilmektedir. Sekonder bakteriyel infeksiyonlar HRSV ve PIV'lerine göre daha sıktır (12,26).

Çocukluk çağı pnömonilerinin % 10'undan adenovirusler sorumludur. Rhinovirus toplumdaki edinilmiş viral pnömonilerin büyük kısmını oluştururken; enterovirus, rubella virus ve herpes simpleks virus nadir pnömoni etkenleridir (12).

Bağıışıklığı baskılanmış hastalarda CMV, HSV, kızamık virusu, HRSV, influenzae, PIV'ları, rhinoviruslar ve hantavirus ciddi pnömoni yapabilmektedir (12).

CMV özellikle de transplantasyon hastalarında ciddi pnömoniyeye sebep olur. Kızamık dev hücreli pnömonisi hematolojik ve diğer malignansilerde özellikle AIDS te önem kazanır. VZV hematolojik malignansilerde ve organ transplantasyonlarında önemli problemdir. Adenovirus pnömonileri dissemine olmaya eğilimliken, HRSV pnömonileri kemikiliği ve solid organ transplantasyonunda nozokomiyal etken olarak karşımıza çıkar (12).

**Tablo2.3 ; Solunum yolu viral infeksiyonlarında etken virusların görülme sıklığı (12)**

Virus	Soğuk algınlığı	Farenjit	Trakeo bronşit	Krup	Bronşiolit	Pnömoni		
						Çocuk	Yetişkin	Bağıışıklığı baskılanmış birey
<b>RNA virusları</b>								
İnfluenza A	+	++	+++	++	+	++	++++	+
İnfluenza B	+	++	++	+	+	+	++	+
PIV-1	+	++	+	++++	+			
PIV-2	+	++	+	++	+			
PIV-3	+	++	+	+++	++	+++	+	+
HRSV	++	+		++	++++	++++	+	++
Kızamık virusu			+	+		++	+	+
Rhinovirus	++++	++	+	+	+	+		
Enterovirus	++	++			+	+		
Coronavirus	++	+			+	+		
HIV		+	-					
<b>DNA virusları</b>								
Adenovirus		++	+	++	++	++	++	++
Herpes simplek virus		+			+	+		+
VZV						+	+	+
EBV		++						
CMV		+				++		++++

\*\* -; Nadiren , + ; %1-5, ++ ; %5-15, +++ ; %15-25, +++++; >%25

## 2.6.Viral solunum yolu infeksiyonlarının tanısı

Viral solunum yolu infeksiyonları genellikle etkene yönelik tanısı konulmadan kendi seyrine bırakılan hastalıklardır. Laboratuvar incelemeleri çoğunlukla yapılmamaktadır. Bunun başlıca sebepleri arasında bu infeksiyonların kısa ve görece hafif seyirli olması ve pekçok rutin mikrobiyoloji laboratuvarının gerekli donanım ve deneyime sahip olmaması sayılabilir. Bu da vak'aların çoğunda etiyojinin aydınlatılmaması sonucunu doğurmaktadır Bu nedenle gerek ülkemizde gerekse genel literatürde, viral solunum yolu etkenleri hakkındaki bilgiler kısıtlıdır.

Günümüzde viral infeksiyonların laboratuvar tanısı için hücre kültürü, direkt antijen arama, seroloji ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (13,14).

“Hücre kültürü” viral infeksiyonların tanısında altın standart olarak bilinen en duyarlı ve en özgül yöntemdir. Ancak yoğun emek ve donanımlı bir laboratuvar gerektirir. Hücre kültürü için örneğin zamanında ve uygun yerden alınması gerekirken en uygun örnek nazofarinks aspirasyon sıvısıdır. Bağışıklık yetersizliği olan kişilerden ise bronkoalveolar lavaj sıvısına gereksinim vardır. Örnekler alındıktan sonra özel transport besiyerinde buz içerisinde ve en kısa sürede laboratuvara iletilmelidir. Gelen örnekler hemen ekilmeyecek ise 24 saatten kısa süreli bekletmeler için + 2-4°C’de bekletilmeli, daha uzun süreli bekletmeler için -70°C’de dondurularak saklanmalıdır (14,27).

1980’li yıllardan beri viroloji laboratuvarında hızlandırılmış hücre kültürü yöntemi olarak bilinen santrifüj ile kültür (Shell-Vial) yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde sitopatik etki oluşumunu beklemeden enfekte hücrelerdeki viral antijenler işaretli monoklonal antikorlarla 1-3 gün içinde belirlenebilmektedir. Floresan işaretli antikorla boyandığında floresan mikroskopunda, peroksidaz ile işaretli antikor kullanıldı ise ışık mikroskopunda incelenerek enfekte hücre saptanır. Hücre kültüründe izolasyon için kullanılan en uygun hücreler: Hep-2, HeLa, RMK ve A549’dur. Hücre kültürünün kullanımı uzun süre alması yanında yoğun emek, tecrübeli ekip ve donanımlı laboratuvar gerektirmesi gibi dezavantajlar taşımaktadır (13).

Viral infeksiyonların tanısında en sık kullanılan yöntemlerden biri hasta materyalinden direkt olarak viral antijen tayinidir. Bu amaçla DFA, IFA ve EIA teknikleri kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin duyarlık sorunu bulunmaktadır (13).

Solunum yolu infeksiyonlarının tanısında spesifik antikor tayini yalnızca epidemiyolojik amaçlarla kullanılmaktadır (13).

Günümüzde viral solunum yolu infeksiyonlarının çok daha duyarlı ve özgül olan moleküler yöntemler tercih edilmektedir (6,16). 1985 yılında geliştirilen Polimeraz zincir reaksiyonu, kültür

yöntemleri ile saptanması zor veya immünoreaktif antijenin olmadığı dönemde birçok virus enfeksiyonunun saptanmasında başarıyla kullanılmaktadır (28).

PCR metodu ile viral solunum yolu enfeksiyonu etkenlerini araştırmada dikkat edilmesi gereken noktalar vardır. Bunların başında örneklerin zamanında ve doğru alınması , uygun taşıma sıvılarında laboratuvara ulaştırılması veya uygun ısı derecesinde saklanması gelir. Solunum enfeksiyonlarında viral atılım özellikle ilk üç gün yoğun olmaktadır, dolayısıyla enfeksiyonun erken döneminde alınan örnekler tercih edilir (12,14).

## **2.7. Viral Solunum Yolu İnfeksiyonlarında Tedavi**

Viral solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisi çoğunlukla semptomların giderilmesine yönelik yapılır. Viral etkenlere yönelik spesifik antiviral tedaviye genellikle ihtiyaç duyulmaz.

Rhinoviruslara yönelik henüz bir antiviral ajan bulunamamıştır, 100'ün üzerinde serotipi olması aşı çalışmalarını da güçleştirmektedir. Son dönemlerde rinovirusların nazal mukozaya adezyonunu önlemeye yönelik yeni moleküller üzerinde çalışmalar sürdürölmektedir (12).

İnfluenza hastalığından korunmada, profilaktik olarak inaktif aşı kullanılmaktadır. Aşılama en az altı ay süre ile koruyucudur (29,30). Aşılama için seçilen bireylerin bazı özelliklerinin olması gereklidir.

Ařılanma için hedef gruplar:

- 65 yaş üzeri sağlıklı kişiler
- Kronik kalp veya pulmoner hastalığı olanlar, bağışıklık yetersizliği, diyabet ve astım hastalığı olan yetişkin ve çocuklar
- Uzun süreli aspirin tedavisi alan çocuklar (Reye sendromu riski nedeni ile)
- Hastane ve bakım evi personeli
- Yüksek riskli kişilerle aynı evde yaşayanlar

Ayrıca yumurta, lateks ve timerosala allerjisi olan kişilere aşı önerilmemektedir.

İnfluenza virus enfeksiyonlarının tedavisi amantadin türevleri ve nöraminidaz inhibitörleri ile mümkün olmaktadır. Amantadinin mekanizması tam olarak bilinmemekte, fakat virus replikasyonunun erken aşamalarında etkili olduğu düşünölmektedir. Amantadin sadece influenza A'ya etkilidir, influenza B'ye etkisi yoktur . Nöraminidaz inhibitörü olan zanamavir ve oseltamivir hem influenza A hem de B'ye etkili antiviral ilaçlardır (14).

HRSV'nın tedavisinde gerekli durumlarda antiviral ajan olarak ribavirin kullanılmaktadır. Ribavirin sentetik nükleozid analogudur ve geniş bir antiviral etkiye sahiptir. Bu etkiyi muhtemelen viral protein sentezini inhibe ederek sağlar. Ribavirin in vitro ve in vivo şartlarda antiviral etkinlik gösteren geniş spektrumlu bir ajandır ve aerosol şeklinde uygulanır. HRSV immunglobulinleri ciddi bronşiolit durumlarında ve altta yatan kalp hastalığı varlığında uygulanabilir. HRSV için etkili bir aşı yoktur. Fakat bu konuda çalışmalar devam etmekte ve son yıllarda hız kazanmaktadır (12,14,16).

Günümüzde parainfluenza infeksiyonlarının tedavisinde kullanılacak etkili antiviral ilaç bulunmamaktadır. Araştırmalara göre ribavirinin etkili olduğu düşünülmektedir. Profilaktik olarak rutin aşısı yoktur. Aşı üzerinde çalışmalar devam etmektedir (13,14).

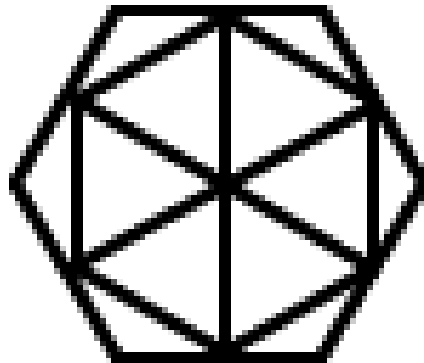
## 2.8.Human Bocavirus (HBoV)

DNA virusleri içerisinde yer alan *Parvoviridae* ailesine bağlı *Parvovirinae* alt ailesinde omurgalı hayvanlarda ve insanlarda hastalık yapan 5 ayrı virus cinsi bulunmaktadır. *Amdovirus*, *Bocavirus*, *Dependovirus*, *Erythrovirus* ve *Parvovirus* olarak adlandırılan bu cinslerde yer alan virusler, 18-26 nm çapında, 4-6 kb uzunluğunda tek sarmallı lineer bir DNA genomu içeren, ikozahedral kapsidli ve zarfsız viruslardır (13,31).

*Bocavirus* cinsinde daha önceleri Bovine parvovirus ile Canine minute virus adı verilen ve hayvanlarda hastalık etkeni olduğu bilinen iki virus yer almaktaydı. Ancak 2005 yılı ortalarında İsveç’li araştırmacılar, özellikle akut solunum yolu infeksiyonu semptomları gösteren bir grup çocuktan alınan solunum yolu örneklerinde yeni bir virusun varlığını gösterdiler. Yapılan ileri genomik araştırmalar sonucunda solunum yolu örneklerinden soyutlanan bu virus, yukarıda adı geçen iki viruse çok yakın benzerlikler göstermesi nedeniyle bu viruslerin bulunduğu *Bocavirus* cinsine alınarak human bocavirus (HBoV) olarak isimlendirildi (9,31). (Bovine ve canine sözcüklerinin ilk hecelerinin kombinasyonu olarak “ boca ” ismi kullanılmıştır (32).

*Bocavirus* cinsinde yer alan iki hayvan patojeni, enterik viruslardır. Bovine parvovirus diareye sebep olurken Canine minute virus yenidoğan solunum yolu hastalıklarına ve embriyopatiye sebep olmaktadır (32).

Bu zamana kadar *Parvovirinae* alt ailesinde insanda hastalık yapan tek virüsün *Parvovirus* cinsi içerisinde yer alan Parvovirus B19 olduğu biliniyordu. HBoV’un çocuk grubunda alt solunum yolları infeksiyonu etkeni olarak saptanmasıyla birlikte HBoV da ikinci bir insan patojeni olarak bu aileye katılmıştır (9).



Şekil 2.2 HBoV’un şematik görünümü (31)

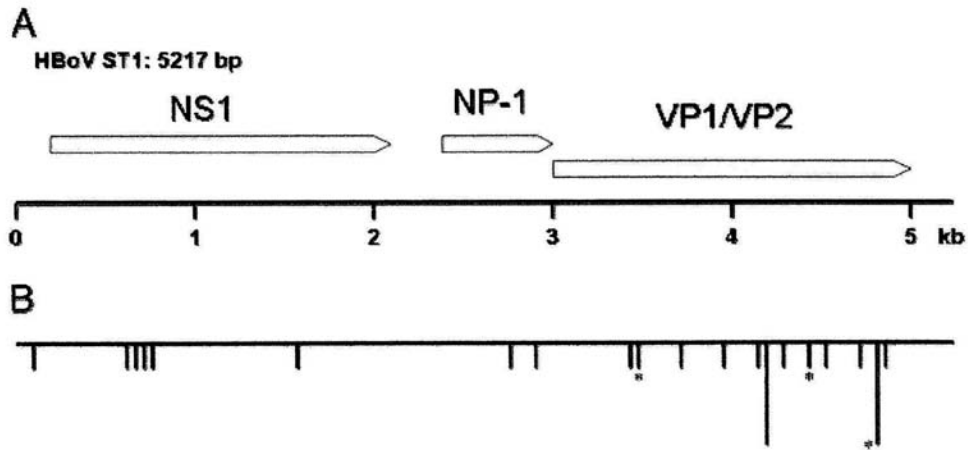
HBoV bir çok özelliğiyle parvovirusa benzerlik göstermesine rağmen bazı özellikler açısından farklılıklara da rastlanmaktadır. Bu farklılıklardan birisi HBoV genomunun 5.5 kb uzunluğunda olmasına karşın parvoviruslerde genomun 5.6 kb uzunluğunda olmasıdır. Bu virus cinsleri arasındaki ikinci bir farklılık parvovirus genomunda aynı sarmal üzerinde bulunan 2 büyük open reading frame (ORF) bölgesinin yapısal olmayan bir protein (NS1) ile 2 kapsid proteini (VP1,VP2) olmak üzere 3 protein kodlarken, bocavirus genomunda yine aynı sarmal üzerinde bulunan 3 büyük ORF bölgesinin yapısal olmayan bir protein (NS1) ile 3 farklı kapsid proteininden (VP1/VP2) oluşan toplam 4 büyük proteini kodlamasıdır (31).

Bovine Parvovirus ve Canine minute virus'un ORF bölgesinden kodlanan yapısal olmayan bir proteinin fonksiyonu bilinmez ve NP-1 olarak adlandırılır. HBoV'a ait NP-1 geni de %47 aminoasit düzeyinde benzerlik gösterir (9).

HBoV' un yapılan tüm genomik sekansı sonrasında 2 farklı izolatu bulunmuştur. Bu izolatlar Stockholm1 ( ST1; 5,217 nukleotid) ve Stockholm2 ( ST2; 5,299 nukleotid) olarak isimlendirilmişlerdir (9).

HBoV' un ST1 izolatu, NS1, 1,920 nukleotid (183-2102), 639 aminoasit; NP-1, 660 nukleotid (2340-2999),219 aminoasit; VP1/VP2, 2,016 nukleotid (2986-5001), 671 aminoasit' ten oluşur. ST2 izolatu ise ST1'den 26 nukleotid farklıdır ( Şekil 2.3) (9).

HBoV'un tanımı NP-1 gen bölgesinin PCR yöntemiyle çoğaltılarak belirlenmesiyle yapılır (9).



Şekil 2.3: A; ST1 izolatu, B; ST2 izolatu

HBoV'nun ilk kez insanlarda infeksiyon etkeni olarak identifikasyonundan sonra tanısıl amaçlı olarak geliştirilen PCR yöntemi kullanılarak retrospektif olarak planlanan bir çalışmada alt solunum yolu infeksiyonu olan 540 hastaya ait nazofarengreal aspirat örneklerinin 17'sinde (% 3.1) PCR testinin, HBoV için pozitif sonuç verdiği saptanmıştır. Bu 17 hastanın 14'ünde başka bir etkenin bulunmaması nedeniyle, HBoV'nun rastlantısal bir bulgudan çok alt solunum yolu infeksiyonlarının olası bir sebebi olduğu sonucuna varılmıştır (9).

Daha sonra yapılan, farklı ülkelerde ve çeşitli yaş gruplarında sürdürülen epidemiyolojik çalışmalarda HBoV'nun solunum yolu infeksiyonu gözlenen hastalardaki saptanma oranı %1.5 - %18.3 arasında değişkenlik göstermekte ve daha sık olarak 5 yaş altındaki çocuklarda saptandığını ve bu grupta hastaneye yatışa sebep olan solunum yolu infeksiyonları meydana getirdiğini göstermektedir (33,34).

Bastien ve arkadaşları %1.5, Kesebir ve arkadaşları %5.2, Sloots ve arkadaşları %5.6, Xaoiming ve arkadaşları %5.7, Weissbrich ve arkadaşları %10.3 ve Pozo ve arkadaşları %13.4, Kaplan ve arkadaşları ise %18.3 arasında oranlar bildirmiştir (34-40).

HBoV çocukluk çağı dışında, daha seyrek olmak üzere diğer yaş gruplarında da infeksiyona sebep olmaktadır. Yetişkinler de bilhassa bağışıklığı baskılanmış bireylerde ciddi alt solunum yolu infeksiyonları yaptığı gösterilmiştir (33,41).

HBoV hastalarda klinik olarak sıklıkla alt solunum yolu infeksiyonlarına daha az olarak da üst solunum yolu infeksiyonlarına sebep olmaktadır (38).

Foulongne ve arkadaşlarının 6 HBoV infeksiyonlu çocuk üzerinde yaptığı araştırma sonuçlarına göre tek başına HboV infeksiyonlu hastalarda hafif, orta düzeyde ateş gözlenmektedir. Bu hasta grubunda major bulgu bronşiolit iken, dispne, solunum gücü ve öksürük en sık rastlanılan solunum semptomları olarak dikkati çekmektedir (42).

HBoV'un taksonomik olarak ilişkilendirildiği *Bocavirus* cinsinde yer alan Bovine Parvovirus ile Canine minute virus'un hayvanlarda gastroenterit yapmaları nedeniyle, solunum yolları dışında gastrointestinal sisteme de etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Vicente ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada akut gastroenteritli 527 çocuk hastanın 48'inde (%9.1) HBoV pozitifliği saptamışlardır. HBoV pozitif hastaların 20'sinde tek başına etkenken, 28 hastada koinfeksiyon görülmüştür. Çalışma ile gastroenteritli çocuklarda olası bir etken olabileceği sonucuna varılmıştır (43).

Toplumda solunum yolu hastalıklarına yol açan viral etkenlerinin hastanelerde de infeksiyon oluşturma potansiyeli vardır ve her iki durumda da büyük bir çoğunluktan benzer

viral etkenler sorumludur (14,16). HRSV, influenza ve parainfluenza viruslarının önemli hastane infeksiyonları etkenleri olduğu bilinmektedir (44). HBoV' un da hastane infeksiyonu yaptığına dair çalışmalar vardır (35).

HBoV'la ilgili yapılan çalışmalarda mevsimselliği ile ilgili net bir veri elde edilmemesine rağmen sıklıkla soğuk mevsimlerde karşılaştığı ama tüm yıl boyunca infeksiyon yaptığı bildirilmiştir (35,39,45).

Solunum yolu virusları sıklıkla koinfeksiyonlara sebep olur. HBoV'la ilgili yapılan çalışmalarda da yüksek oranda HRSV, influenza virus, HMPV, PIV ve adenoviruslarla koinfeksiyon yaptığı bildirilmiştir (38,42,46).

HBoV'un solunum yolu infeksiyonlarındaki yeri, yaş ve cinsiyet dağılımı, mevsimsel özellik gösterip göstermediği, koinfeksiyonların sıklığı ve kliniğe etkisi, gibi konular hala tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Ayrıca sağlıklı bireyler, immun yetmezlikli hastalar ve daha büyük çocuk veya erişkinlerdeki infeksiyon sıklığı ile ilgili veri miktarı da çok azdır. HBoV'un akut solunum yolu infeksiyonlarındaki rolünün tam olarak belirlenebilmesi için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Mart 2007 – Ağustos 2007 tarihleri arasında yürütülen bu çalışmaya, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Polikliniği ve Çocuk Acil Polikliniğinden klinik olarak akut solunum yolu infeksiyonu tanısı konulan, 119'u (%58,6) erkek, 84' ü (%40,4) kız olmak üzere 203 çocuk hastaya ait boğaz sürüntü örnekleri alınmıştır. Örnekler semptomların başlanmasından sonra ortalama 2-4. günlerde alınmıştır. Prospektif çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul Yönergesi'ne göre hastaların yasal temsilcilerinin bilgilendirilmiş onayları alınmıştır. Çalışmaya katılan hastaların demografik verileri, yattıkları servis ve yatış nedeni, altta yatan hastalıklar, klinik semptomları ve aldığı tedavi protokolleri, ailelerin ve servis doktorların verdiği bilgiler doğrultusunda hazırlanan formlara kaydedilmiştir (Tablo 3- 1). 203 hastaya ait genel bilgiler tablo 3-2'de verilmiştir.

<b>Akut solunum yolu infeksiyonlarında viral etkenlerin araştırılması</b>	
<b>Tarih:</b>	<b>Lab. No:</b>
<b>Adı-Soyadı:</b>	<b>Yaşı:</b>
<b>Cinsiyeti:</b>	<b>Takip eden klinik/ Doktor adı ve tel:</b>
<b>Tel.:</b>	
<b>Klinik tanı :</b>	
<b>Klinik belirtilerin kaçınıcı günü :</b>	
<b>Kronik hastalık/ bağışıklık sorunu/ anomali:</b>	
<b>PCR Laboratuvarı Tel:22325/ 22462</b>	
<b>Boğaz sürüntüsü:</b> Laboratuvardan alınacak iki eküvyonla alınan örnek iki ayrı transporta koyulup buz üzerinde laboratuvara gönderilir.	

**Tablo 3-2: Hastalara ait bilgiler ( Toplam 203 hasta)**

TARİH	HASTA NO	ADI SOYADI	YAŞ	CİNSİYET	TANI	ATEŞ	BURUN AKINTISI	BURUN TIKANIK.	BOĞAZ AĞRISI	POSTNAZAL AKINTI	ÖKSÜRÜK	BALGAM ÇIKARMA	STRIDOR	DISPNE	HIRILTI	GÖZ YAŞI ARTIŞI	İSHAL	SES KISIKLIĞI	KARIN AĞRISI	KUSMA	ALTTA YATAN HST.LİK	ANTB. KULLANIM	SERVİS	KLİNİK SÜRESİ
23.03.2007	1	K.Ç.	5.6 yaş	K	üsye	var	var				var													2 gün
23.03.2007	2	M.C.T.	10 aylık	E	üsye		var				var					var	var	var						3-4gün
23.03.2007	3	Y.Y.	12 yaş	E	üsye						var								var					2-3gün
23.03.2007	4	O.Ç.	10 yaş	E	üsye						var			var							Krn. otit			3 gün
26.03.2007	5	H.H.Y.	2aylık	E	bronşiolit		var				var			var										3-4gün
26.03.2007	6	K.A.	23 aylık	E	üsye	var		var									var							2 gün
26.03.2007	7	A.D.	1yaş	E	üsye	var	var										var							7gün
26.03.2007	8	C.K.	7yaş	E	astım alev	var					var			var					var	var	astım	var		5-6gün
26.03.2007	9	M.I.	6.5 aylık	E	boğmaca	var					var												var	15 gün
26.03.2007	10	A.E.	2aylık	E	boğmaca						var												var	7-8gün
29.03.2007	11	S.Ç.	10 yaş	K	üsye	var	var				var													3-4gün
29.03.2007	12	R.Ç.	12 yaş	K	üsye		var				var													3-4gün
29.03.2007	13	N.A.	3aylık	K	üsye		var				var													2 gün
29.03.2007	14	A.E.	12yaş	K	sinüzit	var		var	var	var											Krn. sinüzit			4 gün
29.03.2007	15	M.Ş.	5 yaş	K	k.öksürük						var													7-8gün
30.03.2007	16	S.Ş.	6 yaş	K	k.öksürük						var													15 gün
30.03.2007	17	B.B.	1.5 ay	K	boğmaca						var													10 gün

30.03.2007	18	D.T.	10 yaş	K	tüberküloz?						var												1 aydır
30.03.2007	19	S.K.	2 aylık	E	bronşiolit			var			var	var											3-4gün
30.03.2007	20	Y.B.	7 yaş	E	üsye	var		var	var														3 gün
30.03.2007	21	K.B.	7 yaş	E	üsye				var		var									Krn. otit			15 gün
03.04.2007	22	S.Y.	4.2 yaş	K	üsye	var	var				var												2-3gün
03.04.2007	23	E.A.	5yaş	K	üsye		var				var												2-3gün
03.04.2007	24	Z.S.	3 yaş	K	üsye	var	var								var								3-4gün
04.04.2007	25	E.K.	13 yaş	E	k.öksürük						var												15 gün
04.04.2007	26	I.A.	6 yaş	E	sinüzit	var		var			var												2 gün
04.04.2007	27	B.B.	5yaş	E	k.öksürük						var									tonsillektomi			15 gün
04.04.2007	28	Y.H.A	22 aylık	E	üsye		var													epilepsi			7-8gün
04.04.2007	29	B.B.	5 yaş	E	pnömoni						var	var											15 gün
04.04.2007	30	E.E.	9 yaş	E	üsye						var												4 gün
04.04.2007	31	B.E.	8 yaş	E	tonsillit	var			var									var					2 gün
04.04.2007	32	A.H.T.	12 aylık	E	bronşiolit	var	var				var	var											2-3 gün
06.04.2007	33	K.D.	30 aylık	E	üsye	var	var								var				var				2-3 gün
03.04.2007	35	E.Y.	5 yaş	K	tonsillit				var														2-3 gün
06.04.2007	37	R.K.	18 aylık	E	üsye						var												2-3 gün
06.04.2007	38	E.B.K.	4.3 yaş	E	üsye	var					var												2-3 gün
06.04.2007	39	H.G.H.	9 yaş	K	tonsillit				var									var					3 gün
08.04.2007	40	A.Ç.	14 yaş	K	üsye		var										var						3-4 gün
08.04.2007	41	A.T.	18 aylık	E	tonsillit															febril konv.	var		2 gün
09.04.2007	43	N.A.	4.8 yaş	K	üsye	var					var												4-5 gün
09.04.2007	44	A.N.K.	4.9 yaş	K	sinüzit		var			var	var												3-4 gün
09.04.2007	45	E.L.	3.9 yaş	E	sinüzit					var	var												5 gün









01.06.2007	150	E.Y.K.	13 aylık	K	otit						var									var		6-7 gün
01.06.2007	151	K.Ç.	5.8 yaş	K	sinüzit	var			var	var												2gün
01.06.2007	152	A.B.B.	7 yaş	K	bronşit					var									suçiçeği			3 ay
01.06.2007	153		8 yaş		tonsillit	var				var												2-3 gün
01.06.2007	154	K.A.	6.6 yaş	K	tonsillit	var		var														5 gün
01.06.2007	155	E.U.	6 yaş	K	tonsillit	var		var														3-4 gün
25.05.2007	156	SÇ	19 aylık	K	astım alev					var		var							Astım			2-3gün
01.06.2007	157	Y.Y.	12 yaş	E	üsye	var				var												4-5 gün
01.06.2007	158	A.K.	5 yaş	K	pnömoni					var	var								anemi			3-4 gün
01.06.2007	159	H.D.	4 yaş	E	üsye	var								var								2-3 gün
01.06.2007	160	M.D.	7 yaş	E	üsye	var				var												4-5 gün
01.06.2007	161	E.Y.	4 yaş	E	astım atağı?	var																2-3 gün
08.06.2007	162	E.S.	3 yaş	K	üsye	var	var			var												2-3 gün
08.06.2007	163	H.T.	4 aylık	E	bordatella like		var			var												20 gün
08.06.2007	164	İ.Y.		K	astım atağı?	var	var			var												3-4 gün
08.06.2007	165	A.L.	8 yaş	E	tüberküloz?					var												10 gün
08.06.2007	166	M.A.M.	3.5 yaş	E	üsye		var			var												2-3 gün
08.06.2007	167	A.Y.	12 aylık	E	bronşiolit					var			var							var		7-8 gün
08.06.2007	168	P.F.	27 aylık	K	üsye	var	var															3 gün
08.06.2007	169	H.A.M.	4 aylık	K	üsye					var												2 gün
08.06.2007	170	K.M.	8 aylık	E	bronşiolit	var				var	var		var									2-3 gün
14.06.2007	171	M.K.	22 aylık	K	tonsillit			var														2 gün
15.06.2007	172	Z.İ.	4.3 yaş	K	üsye	var				var												2-3 gün
15.06.2007	173	D.A.	8 yaş	K	a.pnömoni														A.anemi			4-5 gün

20.06.2007	174	M.B.Ü.	24 aylık	E	üsyeye	var					var									var		5-6 gün
20.06.2007	175	E.B.G.	4.6 yaş	E	üsyeye	var																2-3 gün
20.06.2007	176	B.D.	4 yaş	E	üsyeye		var				var											4 gün
20.06.2007	177	B.N.T.	7 yaş	K	atipik pnömoni						var									var		30 gün
20.06.2007	178	G.D.	3.10 yaş	K	üsyeye		var													Astım		2-3 gün
20.06.2007	179	S.Z.	15 aylık	E	üsyeye	var				var	var											4 gün
20.06.2007	180	A.Ş.	4 yaş	E	membranöz tonsillit		var			var	var											7-8 gün
20.06.2007	181	A.Ç.	3.2 yaş	E	üsyeye	var	var															2-3 gün
20.06.2007	182	H.S.D.	7 yaş	K	üsyeye	var																5-6 gün
20.06.2007	183	D.U.Ç.	4 yaş	E	üsyeye	var			var		var											2-3 gün
02.07.2007	184	A.M.T.	3 yaş	E	tonsillit	var			var													2 gün
02.07.2007	185	M.F.	23 aylık	E	üsyeye	var	var	var														2-3 gün
02.07.2007	186	N.N.T.	5.6 yaş	K	üsyeye	var		var			var									var		2 gün
04.07.2007	187	A.Y.	13 aylık	E	üsyeye	var			var													2-3 gün
04.07.2007	188	Z.G.	4 yaş	K	üsyeye		var				var											3 gün
04.07.2007	189	R.H.	8 yaş	K	üsyeye																	2-3 gün
04.07.2007	190	A.H.T.	18 aylık	E	üsyeye																var	5-6 gün
04.07.2007	191	N.G.	18.5 aylık	K	üsyeye	var		var								var						4 gün
04.07.2007	192	F.O.	9 yaş	E	Astım alev						var			var						astım		5-6 gün
04.07.2007	193	Z.N.Y.	13 aylık	K	bronşiolit	var					var			var								2-3 gün
04.07.2007	194	S.C.	4 yaş	E	bronşit						var											7 gün
04.07.2007	195	S.A.	10 yaş	E	üsyeye					var	var											2-3 gün
04.07.2007	196	Ş.K.	3 yaş	K	krup	var					var			var								2gün

04.07.2007	197	E.A.	4.4 yaş	K	sinüzit	var				var									var				3 gün
10.07.2007	198	E.A.	15 aylık	E	üsye					var													2-3 gün
10.07.2007	199	G.A.	10 yaş	E	membranöz tonsillit	var			var														2gün
10.07.2007	200	İ.K.	11 aylık	K	üsye	var				var													2-3 gün
10.07.2007	201	Y.Y.	2.5 aylık	E	tonsillit																		2 gün
10.07.2007	202	E.K.	5 yaş	E	üsye	var			var														2 gün
10.07.2007	203	O.Ş.	4 yaş	E	farenjit	var				var				var					var		var		5 gün
10.07.2007	204	K.K.	3 aylık	E	tonsillit																		2-3 gün
04.08.2007	205	Ö.E.K.	13 aylık	E	tonsillit	var																	2-3 gün
04.08.2007	206	R.B.	4.4 yaş	E	tonsillit			var		var													2-3 gün
04.08.2007	207	C.Ç.	8 yaş	E	Alj.astım					var													2-3 gün
04.08.2007	208	A.Ş.	1 yaş	K	farenjit	var				var													2-3 gün
04.08.2007	209	M.B.	6 yaş	E	sinüzit	var			var														2-3 gün
17.08.2007	210	B.E.K.	2 yaş	E	üsye	var		var	var														2-3 gün
17.08.2007	211	K.Ç.	6 yaş	K	üsye																		2-3 gün
17.08.2007	212	R.Ç.	6 aylık	K	bronşiolit	var																	10 gün
17.08.2007	213	S.D.	9.2 yaş	K	Alj.astım					var													2-3 gün
17.08.2007	214	E.D.K.	9.1 yaş	E	üsye					var													3 gün
17.08.2007	215	O.K.	3 yaş	E	üsye					var				var									2-3 gün
17.08.2007	216	A.O.D.	15 aylık	E	üsye					var													2-3 gün
17.08.2007	217	H.İ.K.	5 yaş	E	üsye					var	var												3 gün

### **3.1.Hasta örneklerinin toplanması ve taşınması**

İki steril eküvyonla alınan örnekler taşıma sıvısına aktararak en kısa sürede buz üzerinde laboratuvara iletildi. Taşıma sıvısı olarak Hanks'in dengeli tuz solusyonu kullanıldı. Örnekler vortekslendikten sonra deneyler çalışılincaya kadar – 80 °C'da saklandı.

Hastalardan alınan boğaz sürüntüsü örneklerinde, HBoV DNA'sı PCR yöntemiyle araştırıldı

### **3.2.Viral genomun ekstraksiyonu**

Viral genom ekstraksiyonu High Pure Viral Nucleic Acid kiti (Roch Diagnostics, Almanya) üretici firmanın önerdiği talimata göre yapıldı. Her hasta örneğinden ekstraksiyon amacıyla 0.5 ml'lik PCR tüpüne 200 µl'den aktarıldı, sonra vortekslenerek homojen hale getirildi. Örnekteki hücreleri patlatmak için 400 µl binding buffer ve poly(A) eklenerek vortekslene ve santrifüj edildikten sonra nükleik asitlerin silica membranına yapışması sağlandı. Bu amaçla örnekler silica membranı içeren özel eppendorflara aktararak 2 dk 14000 RPM'de santrifüj edildi. 200 µl yıkama solusyonu eklenerek 11000 RPM'de santrifüj edildikten sonra alt sıvı atıldı. Yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlanmıştır. Son santrifüjleme ve alt sıvı atımını takiben daha önceden 72 °C'da ısıtılmış elution bufferden 50 µl eppendorfun ortasına pipetlenerek genomun silica membranından ayrılması sağlandı.

### **3.3.Viral DNA'nın amplifikasyonu**

Çalışmamızda araştırılacak olan HBoV DNA'sının amplifikasyonu için tek aşamalı PCR deneyi yapıldı. Deneyde thermal cycler cihazı (PTC- 200, Peltier Thermal Cycler, MJ Research, A.B.D.) kullanıldı.

1. Aşama PCR		Reaksiyon/	Son
Karışımı		Hacim	Konsantrasyon
DNaz RNaz içermeyen deiyonize su		14.375 µl	-
10X PCR Buffer*		2.5 µl	1 X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)*		1.5 µl	1.5 mM
dATP**	Her bir dNTP'den 10mM	0.5 µl	200 mM
dCTP**			200 mM
dGTP**			200 mM
dUTP**			200 mM
Primer A		0.5 µl	0.25 µM
Primer B		0.5 µl	0.25 µM
Taq DNA Polimeraz* (5 U/µl)		0.125 µl	0.625 U
Toplam		20 µl	
cDNA Eldesi		5 µl	
TOPLAM REAKSİYON HACMI		25 µl	

### 3.4.Kullanılan HBoV Primer Dizileri:

HBoV NP1 genini hedefleyen primer dizileri kullanıldı (6).

1.Aşama 3'→5'yönünde

Bovo 1-2 F TAT GGC CAA GGC AAT CGT CCA AG

Bovo 1-2 R GCC GCG TGA ACA TGA GAA ACA GA

Bölgeleri thermal cycler'da 94 °C'da 3 dakikalık denaturasyon sonrası amplifikasyon için 94 °C'da 60 saniye, 63 °C'da 60 saniye ve 72 °C'da 1.5 dakika'lık 45 siklus sonunda 72 °C'da 10 dakika ekstansiyon yapılarak çoğaltıldı , bocavirus NP1 gen bölgesinden çoğaltılan ürünler 291 bp büyüklüğündedir (6).

### 3.5.Koinfeksiyonların araştırılması

Çalışmamızda HboV DNA'sı saptadığımız hasta örneklerinde koinfeksiyon varlığını göstermek amacıyla diğer sık karşılaştığımız solunum yolu virüslerini de nested-PCR yöntemiyle inceledik. İlk önce araştırılacak olan RNA'lı etkenlere (HRSV, İnfluenza A, İnfluenza B) komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi için aşağıda belirtildiği şekilde revers transkripsiyon işlemleri gerçekleştirildi. Revers Transkripsiyon PCR ve nested-PCR deneylerinde aynı thermal cycler cihazı (PTC- 200, Peltier Thermal Cycler, MJ Research, A.B.D.) kullanıldı

#### 3.5.1.Nested-RT-PCR Revers Transkripsiyon Aşaması:

cDNA eldesi çözültüsü	Reaksiyon/ Hacim	Son Konsantrasyon
DNaz RNaz içermeyen deiyonize su	2 µl	-
5X PCR Buffer*	4 µl	1 X
DTT (0.1 M)*	1 µl	1.5 mM
dATP**	her bir dNTP'den 10mM	100 mM
dCTP**		100.mM
dGTP**		100 mM
dUTP**		100 mM
Random Primer heksamerleri	1 µl	0.25 µM
RNase inhibitörü(40U/ µl)	0.5 µl	30U
MuLV RT* (200U/µl)	0.5 µl	150 U
Toplam	10 µl	
RNA Eldesi	10 µl	
<b>TOPLAM REAKSİYON HACMİ</b>	<b>20 µl</b>	

\* MBI Fermantas (Litvanya), EP0402, 5 X PCR Buffer, 100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, MuLV RT (rekombinant) 200 U/µl

\*\* MBI Fermantas (Litvanya), R0191, 10 mM her bir dNTP

Revers transkripsiyon işlemi için örnekler, 25 °C’da 10 dakika, 42 °C’da 60 dakika, 72 °C’da 10 dakika thermal cycler’da tutuldu. Daha sonra cDNA’ya çevrilen örnekler hemen PCR işlemine alındı yada +4 °C’ de muhafaza edildi.

### 3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Revers transkripsiyon aşamasını takiben HRSV, İnfluenza A ve İnfluenza B’lerin her birinin amplifikasyonu için cDNA örneklerinden, adenovirus DNA’sının çoğaltılabilmesi için direkt ekstraksiyon örneklerinden 5 µl alınarak seçilen özgül primerlerle (Integrated DNA Technologies Inc. U.S.A.) Nested-PCR (MBI Fermentas, Litvanya) yöntemi uygulanmıştır.

#### Nested-RT-PCR

HRSV virusunun çoğaltılmasında aşağıda belirtilen reaktif karışımı kullanıldı.

1. Aşama RT-PCR	Reaksiyon/	Son
Karışımı	Hacim	Konsantrasyon
DNaz RNaz içermeyen deiyonize su	13.875 µl	-
10X PCR Buffer*	2.5 µl	1 X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)*	1.5 µl	1.5mM
dATP**	Her bir dNTP’den 10mM	200 mM
dCTP**		200 mM
dGTP**		200 mM
dUTP**		200 mM
Primer A	0.5 µl	0.25 µM
Primer B	0.5 µl	0.25 µM
Primer C	0.5 µl	0.25 µM
Taq DNA Polimeraz* (5 U/µl)	0.125 µl	0.625 U
Toplam	20 µl	
cDNA Eldesi	5 µl	
<b>TOPLAM REAKSİYON HACMİ</b>	<b>25 µl</b>	

<b>2. Aşama Nested-RT- PCR</b>		Reaksiyon/	Son
Karışımı		Hacim	Konsantrasyon
DNaz RNaz içermeyen deiyonize su		16.875 µl	-
10X PCR Buffer*		2.5 µl	1 X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)*		1.5 µl	1.5 mM
dATP**	Her bir dNTP'den 10mM	0.5 µl	200 mM
dCTP**			200 mM
dGTP**			200 mM
dUTP**			200 mM
Primer A		0.5 µl	0.25 µM
Primer B		0.5 µl	0.25 µM
Primer C		0.5 µl	0.25 µM
Taq DNA Polimeraz* (5 U/µl)		0.125 µl	0.5 U
Toplam		23 µl	
1. Aşama RT-PCR ürünü		2 µl	
<b>TOPLAM REAKSİYON HACMİ</b>		<b>25 µl</b>	

İnfluenza A, influenza B ve adenovirus çoğaltılmasında aşağıda belirtilen reaktif karışımı kullanıldı.

1. Aşama RT-PCR Karışımı	Reaksiyon/ Hacim	Son Konsantrasyon
DNaz RNaz içermeyen deiyonize su	14.375 µl	-
10X PCR Buffer*	2.5 µl	1 X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)*	1.5 µl	1.5 mM
dATP**	Her bir dNTP'den 10mM	200 mM
dCTP**		200 mM
dGTP**		200 mM
dUTP**		200 mM
Primer A	0.5 µl	0.25 µM
Primer B	0.5 µl	0.25 µM
Taq DNA Polimeraz* (5 U/µl)	0.125 µl	0.625 U
Toplam	20 µl	
cDNA Eldesi	5 µl	
<b>(Adenovirus için ekstraksiyon örneği)</b>		
<b>TOPLAM REAKSİYON HACMİ</b>	<b>25 µl</b>	

<b>2. Aşama Nested-RT- PCR</b>		Reaksiyon/	Son
Karışımı		Hacim	Konsantrasyon
DNaz RNaz içermeyen deiyonize su		17.375 µl	-
10X PCR Buffer*		2.5 µl	1 X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)*		1.5 µl	1.5 mM
dATP**	Her bir dNTP'den 10mM	0.5 µl	200 mM
dCTP**			200 mM
dGTP**			200 mM
dUTP**			200 mM
Primer A		0.5 µl	0.25 µM
Primer B		0.5 µl	0.25 µM
Taq DNA Polimeraz* (5 U/µl)		0.125 µl	0.5 U
Toplam		23 µl	
1. Aşama PCR ürünü		2 µl	
<b>TOPLAM REAKSİYON HACMI</b>		<b>25 µl</b>	

\* MBI Fermantas (Litvanya), EP0402, 10 X PCR Buffer, 100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, Taq DNA Polimeraz (rekombinant) 5 U/µl \*\* MBI Fermantas (Litvanya), R0191, 10 mM her bir dNTP

### **3.5.3.Kullanılan Primer Dizileri:**

#### **3.5.3.1.HRSV primer dizileri:**

HRSV virusunun G gen bölgesinden primer dizileri kullanılmıştır ve multipleks PCR ile aynı zamanda subgrup ayrımı da mümkün olmuştur (47).

1.Aşama 3'→ 5'yönünde

F- 164 GTTATGACACTGGTATAACCAACC

G- 32 GCAACCATGTCCAAACACAAG

G- 267 GATGCAACAAGCCAGATCAAG

bölgeleri thermal cycler'da 94 °C'da 2 dakikalık denaturasyon sonrası amplifikasyon için 94 °C'da 60 saniye, 45 °C'da 60 saniye ve 72 °C'da 3.5 dakika'lık 45 siklus sonunda 72 °C'da 5 dakika ekstansiyon yapılarak çoğaltıldı

2.Aşama: 3'→ 5'yönünde

F- 1 CAACTCCATTGTTATTTGCC

GB- 52 AATCAACGCACTGCCAGKACTC

283A CAAGAACACAACCCCAACAT

bölgeleri kullanılarak; thermal cycler ile 94 °C da 2dakikalık denaturasyon sonrası amplifikasyon için 94 °C'da 60 saniye, 50 °C'da 60 saniye ve 72 °C'da 3 dakika'lık 45 siklus sonunda 72 °C'da 5 dakika ekstansiyon yaptırılarak çoğaltıldı. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde subgrup A için 728 bp ve subgrup B için de 946 bp büyüklüğünde olup subgrup ayrımı için de uygundu.

#### **3.5.3.2.İnfluenza A primer dizileri:**

Influenza A virusunun matrix proteinini kodlayan gen bölgesinden uygun primer dizileri kullanıldı (48).

1.Aşama: 3'→ 5'yönünde

FLU-1 CAGAGACTTGAAGATGTCTTTGC

FLU-2 GGCAAGTGCACCAGCAGAATAACT

PCR için belirtilen primerler kullanılarak; 94 °C da 3 dakikalık denaturasyon sonrası çoğaltma için 94 °C'da 30 saniye, 50 °C'da 30 saniye ve 72 °C'da 1 dakika'lık 45 siklus sonunda 72 °C'da 5 dakika ekstansiyon yaptırıldı.

2.Aşama: 3' → 5' yönünde

FLU-3 GACCRATCCTGTCACCTCTGACT

FLU-4 ATTTCTTTGGCCCCATGGAATGT

PCR için yukarıdaki primerler kullanılarak; 94 °C da 3 dakikalık denaturasyon sonrası çoğaltma için 94 °C'da 30 saniye, 42 °C'da 30 saniye ve 72 °C'da 1 dk.'lık 45 siklus sonunda 72 °C'da 5 dakika ekstansiyon yaptırıldı. İnfluenza A matrix proteinini sentezleyen gen bölgesinden çoğaltılan ürünler 196 bp büyüklüğündedir.

### **3.5.3.3. İnfluenza B primer dizileri:**

1. aşama 3' → 5' yönünde

FLU B- 1 GTGACTGGTGTGATAACCACT

FLU B- 2 TGTTTTACCCATATTGGGC

2. aşama 3' → 5' yönünde

FLU B- 3 CATTTTGCAAATCTCAAAGC

FLU B- 4 TGGAGGCAATCTGCTTCACC

Her iki aşama için de aynı ısı siklusları kullanıldı. Termal blokta 94 °C da 3 dakikalık denaturasyon sonrası çoğaltma için 94 °C'da 30 saniye, 55 °C'da 30 saniye ve 72 °C'da 60 saniye'lik 45 siklus sonunda 72 °C'da 5 dakika ekstansiyon yapıldı. İnfluenza B HA proteinini kodlayan gen bölgesinden çoğaltılan ürünler 767 bp büyüklüğündedir (49).

### **3.5.3.4. Adenovirus primer dizileri:**

Adenovirusun hekson genlerinin korunmuş bölgesinden seçilen dejenere primerler kullanıldı.

1. aşama 5' → 3' yönünde

AdV1: GCC SCA RTG GKC WTA CAT GCA CAT (1-21)

AdV2: CAG CAC SCC ICG RAT GTC AAA (301-322)

2.aşama 3' → 5' yönünde

AdV3: GCC CGY GCM ACI GAI ACS TAC TTC ( 73-97)

AdV4: CCY ACR GCC AGI GTR WAI CGM RCY TTG TA (239-268)

Her iki aşama için de aynı ısı siklusları kullanıldı. Termal blokta 94°C da 3 dakikalık denaturasyon sonrası çoğaltma için 94 °C da 30 saniye, 55 °C da 30 saniye ve 72 °C da 60 saniye'lik 45 siklus sonunda 72'da 5 dakika ekstansiyon yapıldı. Birinci aşama ürünleri 301 bp, ikinci aşama ürünleri 171 bp büyüklüğündedir.

### **3.6.Çalışmada kullanılan çözeltiler ve tampon sıvıları**

#### **3.6.1.Elektroforez tamponu (10xTBE- Jel ve tanklar için tampon):**

Triz baz .....108 g

Borik asit..... 55 g

EDTA 0.5 M, pH:8.0.....40 ml

1 litre'ye DEPC ile tamamlandı.

#### **3.6.2.Etidium bromür (EB):**

10 mg/ml olarak hazırlandı. Distile suda manyetik karıştırıcı ile uzun sürede çözüldürüldü. + 4°C' de ışıktan uzak tutuldu.

#### **3.6.3.Yükleme tamponu (Loading Buffer):**

Bromfenol mavisi.....% 0.25

Gliserol.....% 30

Hazırlanan tampon + 4°C' de saklandı.

#### **3.6.4.Jelin Hazırlanması**

Elektroforez tamponu 10 kat sulandırıldı, içerisine % 1.5 oranında agaroz karıştırılıp tampon eritildi. 40- 50 °C' ye soğuduktan sonra içine 1 µl etidium bromür ilave edildi.Jelin yüksekliği 6.5 mm olacak şekilde gerekli hacimler ayarlandı. Taraklar yerleştirildikten sonra jel döküldü. Jel donduktan sonra taraklar çıkartılıp tampon ilave edildi ve örnekler jele yüklendi.

Çoğaltılan PCR ürünleri yatay agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Ürünler, moleküler ağırlık belirteci (DNA 100bp ladder, Promega, A.B.D) ve laboratuvarımızda daha önceden her bir virus için dizi analizi yapılarak pozitif olduğu bilinen örneklerle beraber jele yüklendikten sonra 100-150 V' da 20 dakika yürütülmüştür (Minnie the Gel Cicle HE33, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco). Araştırılan her bir virusa özgü büyüklükteki bantlar kontrollerle karşılaştırılarak UV transilluminatörde (Model Tuv 20 Owl Scientific, A.B.D) değerlendirilerek pozitif örneklerin fotoğrafları çekilmiştir (Kodak 1D 3.5).

#### 4.BULGULAR

İncelenen 203 örnekten 11'i (% 5.4) HBoV pozitif olarak saptanmıştır. 11 pozitif örnekten de 1'inde (%9. 9) birden fazla virus açısından (HBoV ve adenovirus) pozitiflik elde edilmiş ve miks infeksiyon varlığı düşünülmüştür. İncelenen HBoV pozitif hastaların hiçbirinde HRSV, influenza A ve influenza B virusu saptanamamıştır.

HBoV pozitif hastaların yaş ortalaması 3(1-10) olup %72.6' sı 5 yaş altıdır. Erkek çocukların 6 sında (%54.5) HBoV pozitif olarak saptanmıştır. İnfeksiyon oranının kız çocuklara (% 45.5) göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 4.1). 11 hastanın hepsi poliklinik hastasıdır.

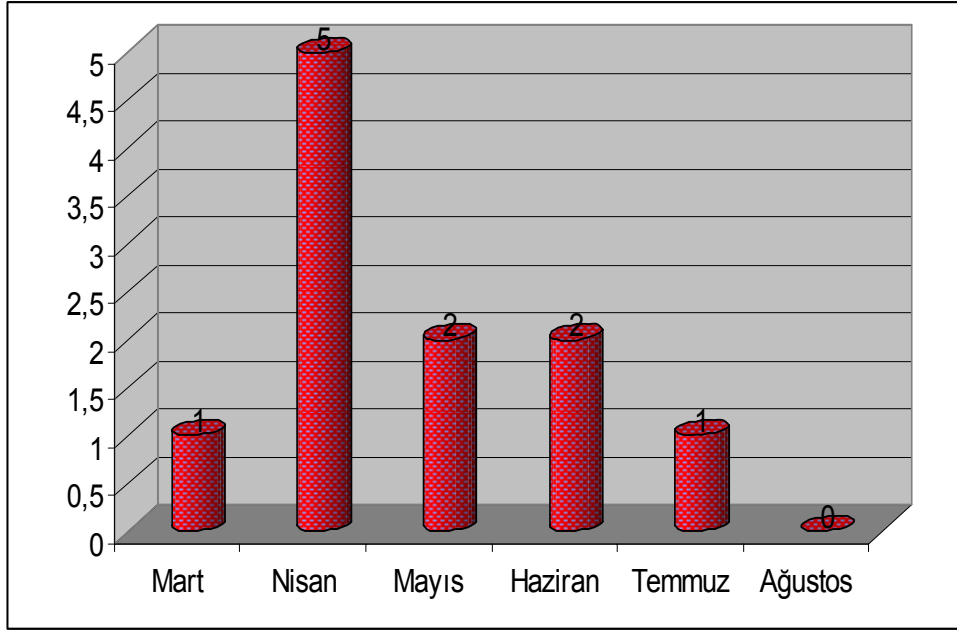
HBoV pozitif 11 hastanın aylara göre dağılımı Mart 1, Nisan 5, Mayıs 2, Haziran 2, Temmuz ayında1 olmuştur. Ağustos ayında pozitifliğe rastlanmamıştır (Şekil 4-1).

HBoV izole edilen hastalarda en sık gözlenen semptomlar sıklık sırasıyla; ateş, öksürük , rinore, burun tıkanıklığı,balgam, post nazal akıntı ve gözyaşı artışı, dispne , hırıltı ve ses kısıklığı olmuştur (Şekil 4- 2, tablo 4.2).

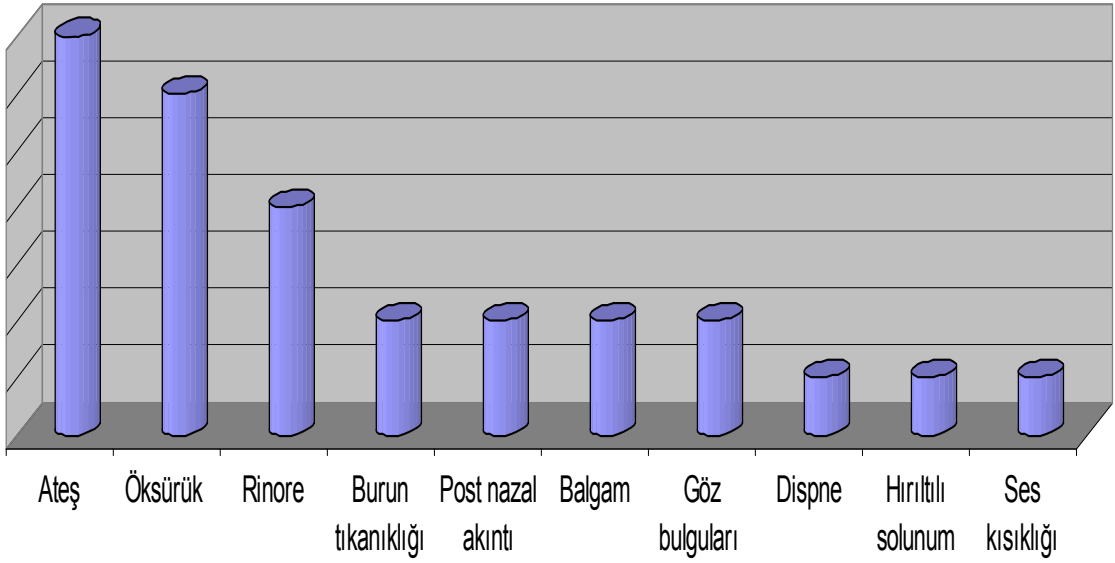
HBoV pozitif bulduğumuz 11 çocuk hastanın 7'sinde üst solunum yolu infeksiyonu (biri tane sinüzit ve tonsillit olmak üzere) 4 tanesi alt solunum yolu infeksiyonu (2 bronşiolit,1 astım alevlenmesi,1 larenjit) tanısı konmuştur (Tablo 4.4).

	HBoV pozitif n=11 (%)	HBoV negatif n=192 (%)	<i>p</i>
Cinsiyet (erkek olmak)	6 (54.5)	113 (58.3)	0.754
Ortanca yaş (min-max)	3 (1-10)	4.5 (0.16-14)	0.328
Yaşların dağılımı			
0-2 yaş	4 (36.3)	50 (26)	0.451
2-5	4 (36.3)	67 (35)	0.920
>5	3 (27.4)	75 (39)	0.434
Süre (gün)	3.8	5.1	0.573
Antibiyotik kullanımı	0	10 (5)	

**Tablo 4.1: Demografik özelliklerine göre 203 hastanın dağılımı**



**Şekil 4. 1: Pozitif olguların aylara göre dağılımı**



**Şekil 4.2: Pozitif olgularda semptomların görülme sıklığı**

	HBoV pozitif N=11 (%)	HBoV negatif N=192 (%)	<i>p</i>
Ateş	8 (72.2)	80 (41.6)	0.173
Rinore	5 (45.4)	51 (26.5)	0.171
Burun tıkanıklığı	2 (18.1)	29 (15.1)	0.783
Boğaz ağrısı	1 (9)	36 (18.7)	0.113
Post nazal akıntı	2 (18.1)	15 (7.8)	0.227
Öksürük	6 (54.5)	131 (68.2)	0.346
Balgam	2 (18.1)	17 (8.8)	0.302
Dispne	1 (9)	4 (2)	0.145
Hırıltılı solunum	1 (9)	17 (8.8)	0.979
Göz yaşı artışı	2 (18.1)	2 (1)	<0.001
İshal	0	6 (3.1)	0.552
Ses kısıklığı	1 (9)	5 (2)	0.217
Karın ağrısı	0	4 (2)	0.629
Kusma	0	4 (4)	0.629

**Tablo 4.2: Klinik özellikler**

	HBoV pozitif N=11 (%)	HBoV negatif N=192 (%)
ÜSYE	7 (%5.2)	134 (%94.8)
ASYE	4 (%6.8)	58 (%93.2)
Toplam	11	192

**Tablo 4.3: Klinik tanılarına göre dağılım**

	HBoV pozitif N=11 (%) 2/11	HBoV negatif N=192 (%) 19/192
Astım	1	5
Ventriküler septal defekt	1	0
Otit	0	2
Sinüzit	0	2
Tonsilektomi	0	1
Epilepsi	0	1
Febril konvülzyon	0	1
Ampiyem	0	1
Subaraknoid kanama	0	1
Hereditör sferositoz	0	1
Allerjik rinit	0	1
Suçiçeği	0	1
Anemi	0	1
Aplastik anemi	0	1

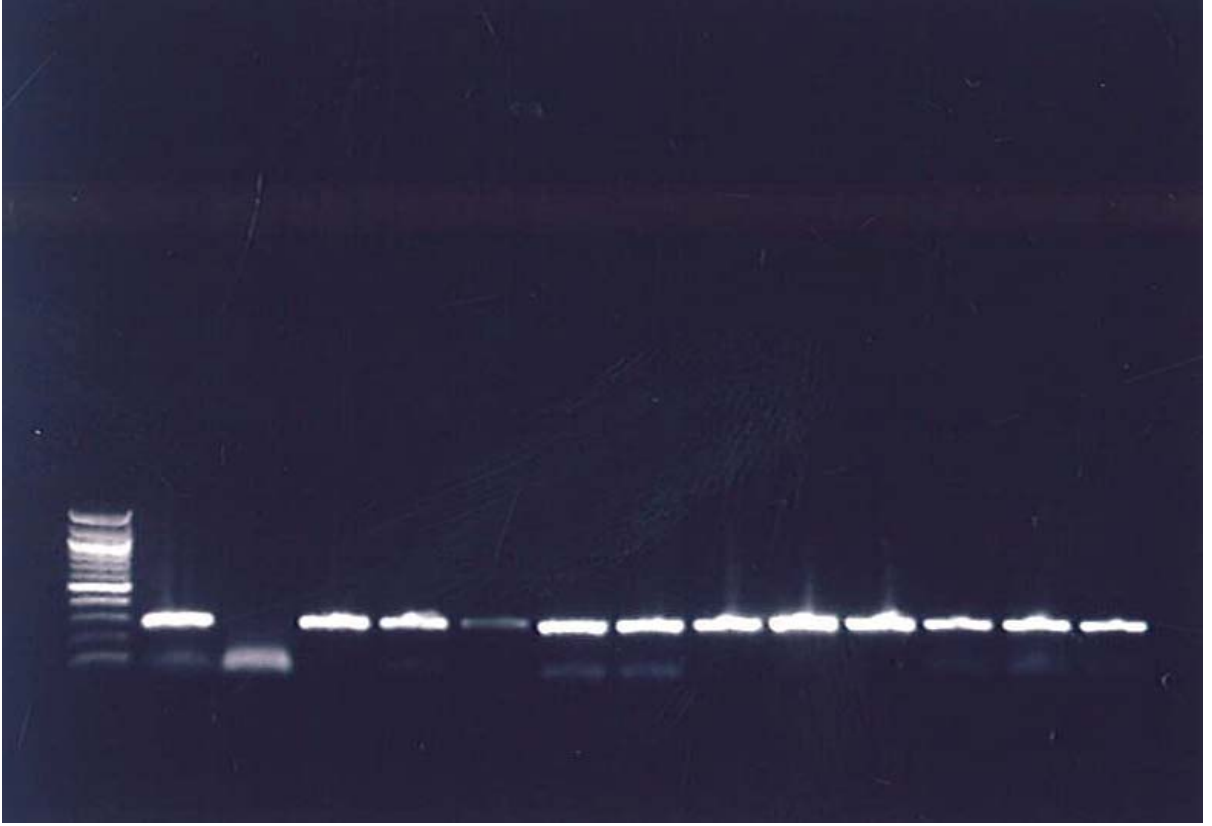
**Tablo 4.4: Altta yatan hastalıklar**

TARİH	HASTA NO	ADI SOYADI	YAŞ	CİNSİYET	TANI	ATEŞ	RİNORE	BURUN TIKANIK.	BOĞAZ AĞRISI	POST AKINTI	ÖKSÜRÜK	BALGAM	STRIDOR	DİSPNE	HIRILTI	GÖZ YAŞI ARTIŞI	İSHAL	SES KISIKLIĞI	KARIN AĞRISI	KUSMA	ALTTA YATAN HST.LİK	ANTB. KULLANIM	SERVİS	KLİNİK SÜRESİ
29.03.2007	11	S.Ç.	10 yaş	K	üsye	var	var				var													3-4gün
03.04.2007	24	Z.S.	3 yaş	K	üsye	var	var									var								3-4gün
04.04.2007	32	A.H.T.	12 aylık	E	bronşioit	var	var				var	var												2-3 gün
12.04.2007	52	A.Ç.	26 aylık	E	üsye	var	var																	2-3 gün
12.04.2007	55	S.B.D.	16 aylık	E	bronşiolit						var										VSD			2-3 gün
25.04.2007	87	M.E.B.	3.3 yaş	E	astımalev						var	var									Astım			2-3 gün
21.05.2007	135	M.S.	8 yaş	E	sinüzit	var		var		var	var													5 gün
25.05.2007	149	İ.A.	14 aylık	K	larenjit	var					var			var				var						2gün
20.06.2007	180	A.Ş.	4 yaş	E	membranöz tonsillit		var			var	var													7-8 gün
20.06.2007	182	H.S.D.	7 yaş	K	üsye	var																		5-6 gün
04.07.2007	191	N.G.	18,5 aylık	K	üsye	var		var							var	var								4 gün

Tablo4.5: HBoV pozitif hastaların klinik özellikleri

#### 4.1.PCR sonuçları

İncelenen 203 örnekten 11'i (% 5.4) PCR ile HBoV pozitif olarak saptanmıştır. HBoV pozitif hasta örnekleri jel elektroforezinde negatif ve pozitif kontroller ile eşzamanlı yürütüldü. Jel UV transilluminatöründeki fotoğrafı gösterilmiştir (Şekil 4.1.1 ).

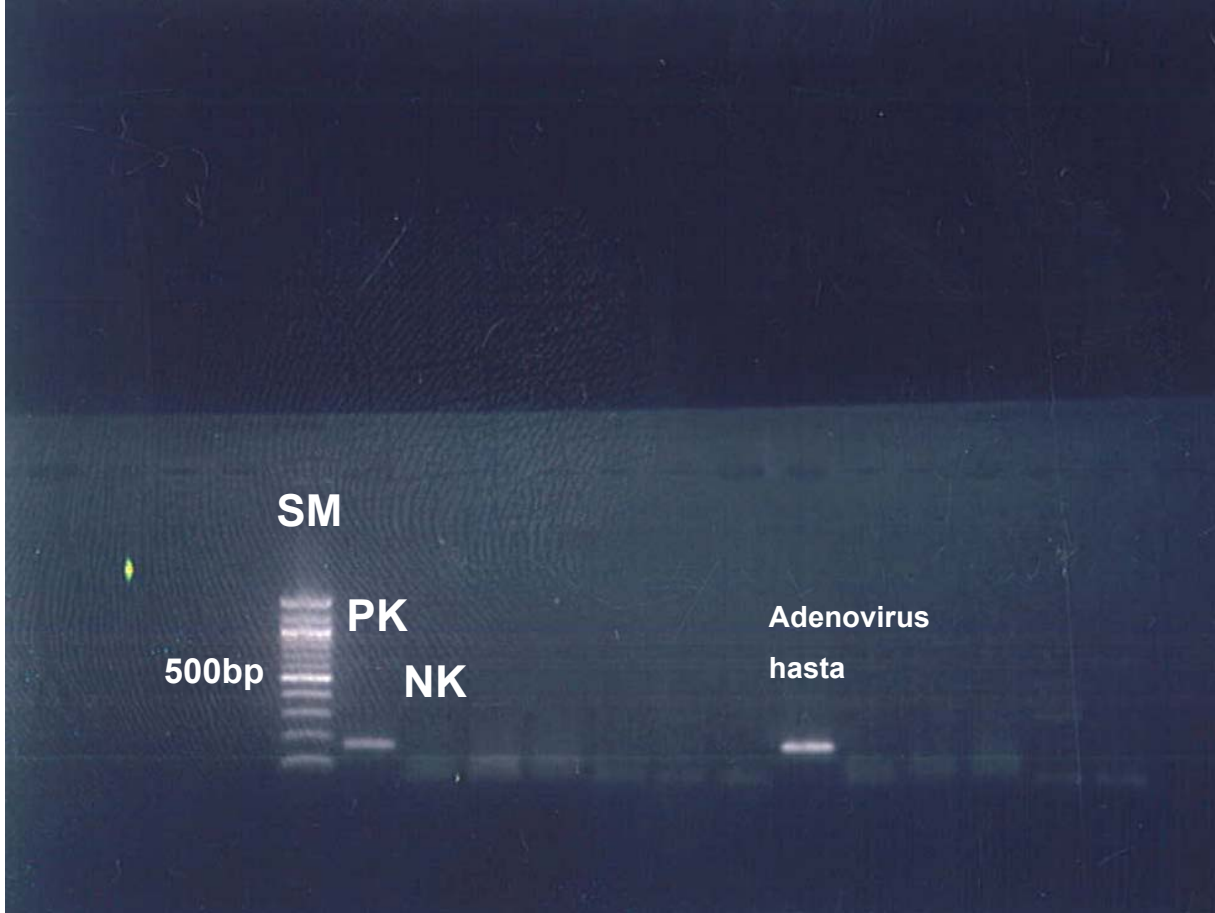


**Şekil 4.1.1: Bocavirus pozitif hastaların jel elektroforez sonucu**

(SM : Size marker, PK : Pozitif kontrol, NK : Negatif kontrol )

\*\*Bocavirus için tek aşamalı PCR sonrası ; 291 bp'de bantlar izlendi.

Bir hastada HboV yanında adenovirus pozitifliği saptandı. Adenovirus pozitif hasta örneği jel elektroforezinde negatif ve pozitif kontroller ile eşzamanlı yürütüldü. Jel UV transilluminatöründeki fotoğrafı gösterilmiştir (Şekil 4.1.2 ).



**Şekil 4.1.2: Bocavirus pozitifliği yanında adenovirus pozitifliği bulunan hastanın jel elektroforez sonucu**

(SM : Size marker, PK : Pozitif kontrol, NK : Negatif kontrol )

\*\* Adenovirus için 2. aşama (nested) PCR sonrası; 171 bp'de bant izlendi.

## 5.TARTIŞMA

Solunum yolu infeksiyonları, tüm dünyada hem çocuklar hem erişkinler arasında en sık görülen infeksiyonlar içinde yer almaktadır. Özellikle 5 yaş altı çocuklarda bu infeksiyonlar mortalite, morbidite ve ekonomik yükü arttıran önemli bir sağlık sorunudur. Tüm dünyada çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere yılda yaklaşık 3 milyon çocuk bu nedenle hayatını kaybetmektedir. Çocuklardaki solunum yolu infeksiyonlarından en sık viral etkenler sorumlu olmakla birlikte, tanı çoğunlukla laboratuvar testlerine değil klinik bulgulara dayandırılmaktadır. Bunun başlıca nedeni virusların birçoğu için rutin olarak kullanılacak standart, hızlı, kolay uygulanabilir ve duyarlı yöntemlerin bulunmamasıdır. Moleküler yöntemlerin uygulanabileceği donanımlı merkezler de kısıtlıdır. Ayrıca viral solunum yolu infeksiyonlarının genellikle kendiliğinden iyileşmesi vak'aların çoğunda etiyojinin aydınlatılmaması sonucunu doğurmaktadır.

Moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesi, viral infeksiyonların laboratuvar tanısında çok önemli gelişmeler sağlamıştır. Yeni bildirilen solunum yolu virusları da bu yöntemler sayesinde saptanmıştır.

Solunum yolu infeksiyonlarına yol açtığı bilinen 200'den fazla virus tipi bulunmaktadır (50). En sık karşılaşılan viruslar HRSV, influenza A ve B, parainfluenza tip1, tip2, tip3 ve adenovirus olarak sıralanmaktadır. Nadir olarak rhinovirus, coxsackievirus, Epstein-Barr virusu, echovirus, enterovirus, varicella-zoster virusu, kızamık virusu ve herpes simplex virusu da etken olabilmektedir (12).

Akut solunum yolu infeksiyonlarında rutin laboratuvar testleriyle etkenlerin ancak %30-60'ı belirlenebilmektedir. Etkenin saptanamadığı durumlarda moleküler yöntemlerle yeni viruslar araştırılmakta ve bulunmaktadır. Yakın zamanda bildirilen bu virusler arasında Human Metapneumovirus (HMPV) ve coronavirus ailesi içinde SARS, NL63 ve HKU1 virüsleri sayılabilir. HMPV 2001 yılında Hollanda'dan Van den Hoek ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Bu bildirilenlere en son eklenen virüslerden biri de 2005 yılında Allender ve arkadaşları tarafından tanımlanan human bocavirustur (9,51).

HBoV çalışmalarında başlangıçta randomize PCR kullanılırken, sonraki çalışmalarda spesifik primerlerin kullanıldığı tek aşamalı veya nested PCR yöntemi tercih edilmiştir. Ayrıca kantitatif değerlendirmenin de yapılabildiği real time PCR yönteminin kullanıldığı çalışmalar da vardır. Biz çalışmamızda tek aşamalı PCR yöntemini kullandık.

Tüm dünyada HBoV ile ilgili çalışmalarda insidans verileri %1.5 ila %18.3 arasında bildirilmektedir. Çalışmaların bir kısmı akut solunum yolu infeksiyonlarında HBoV'un etyolojik rolü olup olmadığı, bir kısmı ciddi solunum yolu infeksiyonlu çocuk hastalardaki yaygınlığı , diğer bir kısmı ise sağlıklı bireylerde bulunup bulunmadığı ile ilgilidir (33).

Ülkemizden HBoV ile ilgili, Klimik 2007 XII. Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresinde bir çalışma sunulmuştur. Kasım 2005- Şubat 2006 tarihleri arasındaki bu çalışmayla solunum yolu infeksiyonu şüphesiyle başvuran 5 yaş altı 76 hastanın 5 tanesinde (%6.5) HBoV pozitif bulunmuştur. Araştırdığımız kadarıyla bunun dışında HBoV'la ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır (52).

Biz çalışmamızda 203 çocuk hastanın 11 tanesinde (%5.4) HBoV DNA' sını saptadık. Bu oran dünya verilerininin takribi bir ortalamasını yansıtmaktadır.

Bastien ve arkadaşlarının retrospektif olarak yaptıkları Kanada çalışmasında, 10 ay-60 yaş arası seçilen 1209 kişiden oluşan hasta grubunda , HBoV infeksiyonu saptanan 18 hastanın 9'unun (%50) hastaneye yatırıldığı ve bunların da 8'inin (%89) 5 yaşın altındaki çocuklardan oluştuğu bildirilmiştir (34).

Fry ve arkadaşlarının Tayland'da 1ay- 65 yaş arası hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, pnömoni nedeniyle hastaneye yatırılan 1168 hastanın 53'ünde (%4.5), akut solunum yolu infeksiyonlu 512 poliklinik hastasının 20'sinde (%3.9) HBoV pozitifliği bulunmuştur. HBoV pozitif 53 pnömonili hastanın %70'inin 1-4 yaş arası iken, 20 poliklinik hastalarının %70'inin 5 yaş altı olduğu belirlenmiştir (45).

Mannig ve arkadaşlarının Edinburgda yaptıkları bir diğer çalışmada alt solunum yolu infeksiyonuyla hastanede yatan ve yaşları 1ay- 65 yaş arasında değişen 574 hastanın 47'sinde (%8.2) HBoV pozitifliği saptanmış, bu hastaların 41'inin 5 yaş altı olduğu tespit edilmiştir (41).

Weissbrich ve arkadaşlarının akut solunum yolu infeksiyonu ile hastaneye yatırılan ve yaşları 8gün-8 yaş arasında değişen 835 çocuk üzerinde yaptıkları çalışmada 87 (%10.3) çocukta HBoV pozitifliği saptanmıştır. HBoV pozitif hastaların yaş ortalaması 1.8 olup %60'ı 1-3 yaş arasında bulunmuştur (38).

Bizim çalışmamızda yaşları 15 gün- 14 yaş arasında değişen ve akut solunum yolu infeksiyonu nedeniyle çocuk polikliğine başvuran 203 hastanın 11'inde HBoV pozitif

bulunmuştur. Yaş ortalaması 3'(1-10) olup, %72.6 sını 5 yaş altı çocuklar oluşturmaktadır. Dünya verilerinde olduğu gibi bizde de 5 yaş altı ön plana çıkmaktadır.

HBoV infeksiyonlarının kliniği konusundaki veriler hala oldukça sınırlıdır.

Maggi ve arkadaşlarının İtalya'da yaptıkları bir çalışmada alt solunum yolu infeksiyonu nedeniyle hastaneye yatırılan 200 çocuk hastanın 9'unda (%4.5) HBoV pozitifliği bulunmuştur. Bu hastaların 5'inin klinik tanısı bronşiolit, 4'ünün ise bronkopnömoni olarak bildirilmiştir (33).

Weissbrich ve arkadaşları 87 HBoV pozitif hastanın %39.7'sinde (25 hasta) üst solunum yolu infeksiyonu (rinit, otit, tonsillit, laringotrakeit), %50.8'inde (32 hasta) alt solunum yolu infeksiyonu (3 bronşit, 4 wheezing bronşit ve 1 pnömoni), %9.5'inde de (6 hasta) ateş nöbetleri tespit etmişlerdir (38).

Xaoiming ve arkadaşlarının çalışmasında 18 HBoV pozitif çocuğun tanıları; pnömoni (6 hasta), bronşit (8 hasta), bronşiolit (2hasta), astım atağı (1hasta), ve laringotrakeit (1hasta) olarak saptanmıştır (37).

Bastien ve arkadaşlarının çalışmasında, HBoV'un saptandığı 9 hastada başlıca klinik semptomların öksürük, ateş ve boğaz ağrısı olduğu, daha seyrek olarak baş ağrısı, mide bulantısı ve kas ağrısı bulunduğu bildirilmiştir (34).

Bizim çalışmamızda HBoV pozitif bulduğumuz 11 çocuk hastanın 7'sinde üst solunum yolu infeksiyonu (biri tane sinüzit ve tonsillit olmak üzere) 4 tanesi alt solunum yolu infeksiyonu (2 bronşiolit, 1 astım alevlenmesi, 1 larenjit) tanısı konmuştur. HBoV pozitif çocuklarda öne çıkan semptomlar sırasıyla ateş, öksürük, burun akıntısı, burun tıkanıklığı, balgam çıkarma, post nazal akıntı, gözyaşı artışı, dispne, hırıltı ve ses kısıklığı olmuştur. Bocavirus negatif olan 192 solunum yolu infeksiyonlu çocukla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmezken gözyaşı artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Dünya verilerinde buna benzer bir bilgiye rastlanmamıştır.

HBoV infeksiyonlarının mevsimsel özelliği konusunda henüz bir konsensüs oluşmamıştır.

Foulunge ve arkadaşlarının 5 yaş altı 589 çocukta 2003 Kasım-2004 Ekim ayları arası yaptıkları bir çalışmada Ekim ve Ocak ayları arasında HBoV pozitifliğinin yoğunlaştığını, olasılıkla HRSV, HMPV veya influenza A virusuna benzer bir mevsimsel dağılım gösterdiğini bildirmişlerdir (46).

Fry ve arkadaşlarının 2004 Eylül-2005 Ağustos ayları arasını kapsayan çalışmasında HBoV olgularında dağılımında anlamlı bir mevsimsel dağılım görülmediği, pozitif olguların %47'sinin Şubat ve Mart ayında tespit edildiği belirtilmiştir (45).

Kesebir ve arkadaşları Ocak-Aralık 2004 tarihleri arasında yaptıkları bir çalışmada HBoV pozitif hastaların Ocak-Nisan ve Ekim-Aralık dönemlerinde görüldüğü, Mayıs-Ağustos aylarında HBoV pozitifliği gösterilememiştir (35).

Pozo ve arkadaşları 2004 Eylül-2006 Temmuz ayları arası yaptıkları bir çalışmada her iki yılda da, Kasım ve Aralık aylarında HBoV pozitifliğinde artış saptamışlardır (39).

Bizim çalışmamız Mart- Ağustos 2007 ayları arasında yapılmıştır. 6 aylık süreçte topladığımız 203 örnekte tespit ettiğimiz 11 hastanın aylara göre dağılımı Mart 1, Nisan 5, Mayıs 2, Haziran 2, Temmuz ayında 1 idi. Ağustos ayında pozitif olgu gözlenmedi. HBoV'lu olgularımızda ki bu dağılım bahar ve yaz aylarında anlamlı bir farklılık olmadığına işaret ederken, mevsimsel dağılımla ilgili bir saptamamız mümkün olmamıştır.

Solunum yolu virüsleri bir hastada aynı anda infeksiyon oluşturabilirler. Koinfeksiyon olarak tanımlanan bu durum yapılan çalışmalarda HBoV için de gösterilmiştir.

Weissbrich ve arkadaşları, 87 HBoV pozitif hastanın %39.1'inde koinfeksiyon saptamıştır. %16.1 HRSV ile birliktelik gözlenirken, %10.3 adenovirus, %10.3 influenza A, %1.1 influenza B ve %1.1 oranında parainfluenza viruslarıyla koinfeksiyon tespit edilmiştir (38).

Fry ve arkadaşları HBoV pozitifliği tespit ettikleri 53 pnömonili hastanın 44 (%83) tanesinde koinfeksiyon saptamışlardır. Rinovirüs en sık koinfeksiyon etkeniyken, HRSV ve parainfluenza viruslarla da birliktelik görülmüştür. HBoV pozitif bulunmuş 20 poliklinik hastasının 18'inde (%90) koinfeksiyon saptanmış. Bu grupta en sık koinfeksiyon etkeni olarak influenza A tespit edilmiştir (45).

Foulunge ve arkadaşları 589 çocuk hastanın 26'sında (%4.4) HBoV pozitifliği bulmuşlar, bunların 9'unda (%34.6) koinfeksiyon (5 HRSV, 2 HMPV, 2 adenovirus) saptamışlardır (46).

Bizim çalışmamızda 11 pozitif örnekten de 1'inde (%9.9) adenovirus pozitifliği elde edilmiş ve koinfeksiyon varlığı düşünülmüştür. İncelenen HBoV pozitif hastaların hiçbirinde HRSV, influenza A, influenza B virusu saptanamamıştır. Bu virüslerle koinfeksiyon

rastlamamızın olası sebebi, daha çok kışın infeksiyona sebep olmaları ve bizim çalışmamızın bahar ve yaz döneminde olmasındandır.

HBoV'un akut solunum yolu infeksiyonlarındaki rolünün tam olarak belirlenebilmesi için daha ileri çalışmalar gerekmektedir. Çalışmamızın HBoV'un epidemiyolojik çalışmalarına katkısı olduğu kanısındayız.

## KAYNAKLAR

1. World Health Organization: The World Health Report 2000-Health Systems: Improving Performance, World Health Organization, Geneva. 2000.
2. Devrim İ, Seçmeer G: Yeni tanımlanan solunum yolu virusu insan metapneumoviruslarına bağlı infeksiyonlar. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2005; **36**: 163-167
3. Denny FW, Clyde WQ Jr: Acute lower respiratory infection nonhospitalized children. *J Pediatr* 1986; **108**: 635-646.
4. Wright A L, Taussig L M, Ray C G, Harrison H R, Holberg C J: The Tucson children's respiratory study: II. Lower respiratory tract illness in the first year of life. *Am J Epidemiol* 1989; **129**: 1232-46.
5. Crooks B N, Taylor C E, Turner A S, Osman H K, Abinun M, Flood T S, Cant A S: Respiratory viral infections in primary immune deficiencies: significance and relevance to clinical outcome in a single BMT unit, *Bone Marrow Transplant* 2000; **26**: 1097-1102.
6. Katherine E. Arden, Peter McErlean, Michael D. Nissen, Theo P. Sloots, and Ian M. Mackay: Frequent Detection of Human Rhinoviruses, Paramyxoviruses, Coronaviruses, and Bocavirus During Acute Respiratory Tract Infections. *J Med Virol* 2006; **78**: 1232–1240.
7. Shay D K, Holman R C, Newman R D, Liu L L, Stout J W, Anderson L J: Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children. *JAMA* 1999; **282**: 1440–1446.
8. Juven T, Mertsola J, Waris M, Leinonen M, Meurman O, Roivainen M, Eskola J, Saikku P, Ruuskanen O: Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; **19**: 293–298.

9. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B: Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci* 2005; **102**: 12891–12896.
10. Garenne M, Ronsmans C, Campbell H: The magnitude of mortality from acute respiratory infections in children under 5 years in developing countries. *World Health Stat Q* 1992; **45**:180- 191.
11. Kanra G, Tezcan S, Yılmaz G and Turkish National Respiratory Syncytial Virus (RSV) Team: Respiratory Syncytial Virus epidemiology in Turkey. *Turk J Pediatr* 2005; **47**: 303-308.
12. Treanor J J, “Respiratory Infection”. Douglas D Richman, Richard J Whitley, Frederick G Hayden (eds). *Clinical Virology*. New York: Churchill Livingstone; 1997: pp.7-22.
13. Ustaçelebi Ş . *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd Şti; 1999: pp. 783-791, 913-919.
14. Murray P R, Rosenthal K S, Pfaller M A. *Medical Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: ASM press; 2005: pp. 177-183, 473-489, 697-707, 817-821, 935-939.
15. Blading J G, Hoshiko M C, Stutman H R: Routine viral culture for pediatric respiratory specimens submitted for direct immunofluorescence testing. *J Clin Microbiol* 1989; **27**: 1439-1442.
16. Ball C B. Respiratory Syncytial Virus. Zuckerman A J, Banatvala J E, Pattison J R (eds). *Princ Pract Clin Virol* Cnchester: John Wiley and Sons; 1994: pp. 270.
17. Nguyen- Van- Tam. Epidemiology of influenza. Nicholson G K, Webster R G, Hay A J (eds). *Textbook of influenza' s*. Oxford: Blackwell Science Ltd; 1998: pp.181-206.

18. Ramzi S, Cotran, Stanley L, Robbins, Vinay Kumar; *Temel Patoloji*. 6. ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2000: pp.414
19. Simoes E A: Respiratory syncytial virus infection. *Lancet* 1999; **354**: 847- 852.
20. WHO. Respiratory syncytial virus. (06.11.2007).  
[http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/ari/en/index3.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index3.html).
21. WHO. İnfluenza. (06.11.2007).  
[http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/ari/en/index.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index.html)
22. Çocuk İnfeksiyon Hastalıkları Derneği. *Çocuklarda Üst Solunum Yolu İnfeksiyonları* İstanbul: Çocuk İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Yayınları; 2002: pp. 3-76
23. Ünal S, Uzun Ö. *Güncel Bilgiler Işığında İnfeksiyon Hastalıkları Cilt 1*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2001: pp. 161-197.
24. Ertuğrul T, Tanman B, “ Solunum Sistemi İnfeksiyonları”. İçinde Neyzi O, Ertuğrul T . editörler. *Pediatric Cilt 2*. 3. ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002: pp. 870-916.
25. Kanra G. *Üst solunum yolu infeksiyonları*. Ankara: Güneş Kitabevi; 1993: pp. 66-91.
26. Lindquist S W, Darnule A, İstas A, Demmler G S: Parainfluenza virus type 4 infections in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 1997; **16**: 34-38.
27. Smith T F, Wold A D, Espy M J, Marshall W F: New developments in the diagnosis of viral diseases. *Lab Diag Infect Dis* 1993; 7: 183-201.
28. Coen D M, Richman D D, “Antiviral agents”. Knipe D M, Howley P M, Fields B N. (eds) *Fields Virology*. 15 th ed. USA: Lippincott- Williams and Wilkins; 2007: pp. 447-485

29. Dayan G, Nguyen V H, Debbag R, Gomez R, Wood S C: Cost- effectiveness of influenza vaccination in high- risk children in Argentina *Vaccine* 2001; **19**: 4204- 4213.
30. Kawai N, Ikematsu H, iwaki N: A prospective, internet- based study of the effectiveness and safety of influenza vaccination in the 2001- 2002 influenza season *Vaccine* 2003; **21**: 4507- 4513.
31. <http://www.dpvweb.net/notes/showgenusmembers.php?genus=Bocavirus>
32. McIntosh K: Human Bocavirus: Developing Evidence for Pathogenicity. *J Infect Dis* 2006; **194**: 1197-1199.
33. Maggi F, Andreoli E, Pifferi M, Meschi S, Rocchi J, Bendinelli M: Human Bocavirus in Italian patients with respiratory diseases. *J Clin Virol* 2007; **38**: 321-325.
34. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y: Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**: 848-850.
35. Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro E, Ferguson D, Landry M, Kahn j: Human Bocavirus in Young Children in the United States: Molecular Epidemiological Profile and Clinical Characteristics of a newly Emerging Respiratory Virus. *J Infect Dis* 2006; **194**: 1276-1282.
36. Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden KE, Nissen MD, Mackay IM: Evidence of Human Coronavirus HKU1 and Human Bocavirus in Australian children. *J Clin Virol* 2006; **35**: 99-102.
37. Ma X, Endo R, Ishiguro N, Ebihara T, Ishiko H, Ariga T, Kikuta H: Detection of Human Bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1132-1134.

38. Weissbrich B, Neske F, Schubert J, Tollmann F, Blath K, Blessing K, Kreth H: Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis* 2006; **6**: 109.
39. Pozo F, Garcia M, Calvo C, Cuesto Isabel, Brena Pilar, Casas I: High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol* 2007; **40**: 224-228.
40. Kaplan N, Dove W, Abu-Zeid A, Shamooun H, Abd-Eldayem S, Hart C: Human Bocavirus Infection among Children, Jordan. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**: 1418-1420.
41. Mannig A, Russel V, Eastick K, Leadbetter G.H., Halam N, Templeton K, Simmonds P: Epidemiological Profile and Clinical of Human Bocavirus and Other Human Parvoviruses. *J Infect Dis* 2006; **194**: 1283-1290.
42. Foulongne V, Rodiere M, Segondy M: Human Bocavirus in children. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**: 862-863.
43. Vicente D, Cilia G, Montes M, Yarza E, Trallero E: Human Bocavirus a Respiratory and Enteric Virus. *Emerg Infect Dis* 2007; **13**: 636-637.
44. Zuccotti G V, Gracchi N, Sala D, Salvini F: Nosocomial infections at pediatric age. *Pediatr Med Childr* 2002; **24**: 177-185.
45. Fry A. M., Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fisher J, Dowell S, Anderson L, Erdman D, Ofsen J: Human Bocavirus a Novel Epidemiologically Associated with Pneumonia Requiring Hospitalization in Thailand. *J Infect Dis* 2007; **195**: 1038-1045.
46. Foulongne V, Olejnik Yann, Perez V, Elaerts S, Rodiere M, Segondy M: Human Bocavirus in French children. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**: 1251-1253.

47. Venter M, Collinson M, Schoub B D: Molecular Epidemiological Analysis of Community Circulating Respiratory Syncytial Virus in Rural South Africa. Comparison of Viruses and Genotypes Responsible for Different Disease Manifestations. *J Med Virol* 2002; **68**: 452–461.
48. Van Elden L J, Nijbuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon A M: Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real- time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 196- 200.
49. Stockton J, Ellis J S, Saville M, Clewley J P, Zambon M C: Multiplex PCR for typing and suptyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 2990-2995.
50. Yılmaz G, Uzel N, Isık N, Baysal S U, Aslan S, Badur S: Viral lower respiratory tract infections in children in İstanbul. *T Ped Infect Dis J* 1999; **18**: 173.
51. Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen- Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout: Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004; **10**: 368–373.
52. Midilli K, Yılmaz G, Türkoğlu S, İskanova B, Ergin S, Yarımcam F, Yücel T, Altaş K: Akut solunum yolu infeksiyonu olan çocuklar ve erişkinlerde insan Bocavirusu DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. *Klimik 2007 XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongre Kitabı*. 14-18 Mart 2007: Belek- Antalya. 2007; **20**: 298.