

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

(YÜKSEK LİSANS)

**AKUT GASTROENTERİTLİ ÇOCUKLARDA HUMAN
BOCAVİRUS DNA'SININ ARAŞTIRILMASI**

SERHAT SİREKBASAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. ARİF KAYGUSUZ**


**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

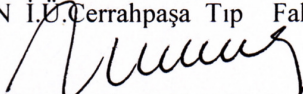
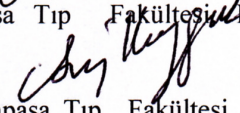
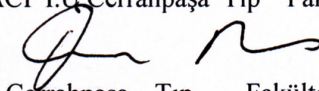
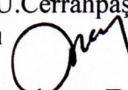

29 / 12 / 2009


Prof. Dr. Tamer DEMİRALP
Enstitü Müdürü (Vekil)

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : MİKROBİYOLOJİ
Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
Anabilim Dalı : MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Tez Sahibi : Serhat SİREKBASAN
Tez Başlığı : AKUT GASTROENTERİTLİ ÇOCUKLARDRA HUMAN
BOCAVİRUS DNA'SININ ARAŞTIRILMASI
Sınav Yeri : MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Sınav Tarihi : 25 / 12 / 2009

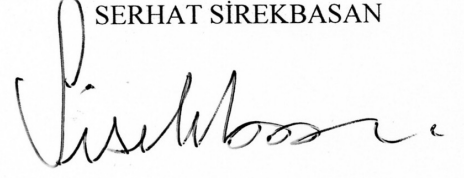
Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof. Dr. Müzeyyen MAMAL TORUN İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 
- 2.Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 
- 3.Doç.Dr.Ömer KÜÇÜKBASMACI İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 
- 4.Doç.Dr.Kenan MİDİLLİ İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 
- 5.Doç.Dr.Reşat ÖZARAS İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

SERHAT SİREKBASAN


İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Bilim uzmanlığı eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, hoşgörüsünü hiç esirgemeyen Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı, değerli hocam Prof. Dr. Müzeyyen Mamal TORUN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar olan süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan, tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, değerli danışman hocam Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ'a şükran ve saygılarımı sunarım.

Yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım; Prof. Dr. Kemal ALTAŞ, Prof. Dr. Yaşar BAĞDATLI, Prof. Dr. Mustafa SAMASTI, Prof. Dr. Bekir KOCAZEYBEK, Doç. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Doç. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI, Doç. Dr. Gökhan AYGÜN, Doç. Dr. Hrisi BAHAR ve Yrd. Doç. Dr. Erdal POLAT'a ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bana yardımcı olan, engin bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım, yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın Doç. Dr. Kenan MİDİLLİ'ye teşekkür ederim. Aynı şekilde öğrenciliğim süresince yakın ilgi ve desteklerini esirgemeyen Dr. (Ph.D.) Sevgi ERGİN başta olmak üzere Anabilim Dalı'mızdaki bütün uzmanlarımıza teşekkür ederim.

Örnekleri toplama aşamam sırasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Yücel TAŞTAN, Dr. Ayça ASLAN ve Dr. Pelin DEMİRCİ'ye teşekkür ederim.

Desteği, güveni, sevgisi ve sabrı ile her zaman yanımda olan Yüksek Lisans Öğrencisi Leyla CAFEROĞLU'na teşekkür ederim.

İlgi ve sıcaklığı ile desteklerini hiç esirgemeyen Yüksek Lisans Öğrencisi Hatice ŞEN başta olmak üzere diğer arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3728

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İ
BEYAN	İİ
İTHAF	İ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET.....	X
ABSTRACT.....	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İSHAL TANIMI.....	3
2.2. İSHAL EPİDEMİYOLOJİSİ	4
2.2.1. İshalle ilişkili risk faktörleri	5
2.3. İSHAL ETİYOLOJİSİ.....	5
2.4. İSHAL PATOGENEZİ.....	8
2.5. HUMAN BOCAVIRUS (HBoV).....	9
2.5.1. HBoV epidemiyolojisi.....	14
2.5.2. Human bocavirus ve gastroenterit	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. HASTALAR.....	16
3.2. HASTA ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI.....	16
3.3. VİRAL NÜKLEİK ASİTLERİN EKSTRAKSİYONU	22
3.4. VİRUS DNA'SININ AMPLİFİKASYONU.....	23
3.5. HBoV İÇİN KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ.....	24
3.6. KOİNFEKSİYON VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI	25
3.6.1. Nested PCR Revers Transkripsiyon Aşaması	25
3.6.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	26
3.6.3. Kullanılan primer dizileri	28

3.6.3.1. Rotavirus primer dizileri.....	28
3.6.3.2. Astrovirus primer dizileri	28
3.6.3.3. Norovirus primer dizileri	29
3.6.3.4. Adenovirus 40-41 primer dizileri.....	30
3.7. ÇALIŞMADA KULLANILAN ÇÖZELTİLER VE TAMPON SIVILARI	30
3.7.1. Elektroforez tamponu (10X TBE – Jel ve tanklar için tampon).....	30
3.7.2. Etidyum bromür (EB)	30
3.7.3. Yükleme tamponu (Loading Buffer).....	30
3.7.4. Jelin hazırlanması ve PCR ürünlerinin görüntülenmesi.....	31
4. BULGULAR	32
4.1. PCR sonuçları.....	36
5. TARTIŞMA	37
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	52

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 İshal nedenleri

Tablo 2.2 Akut infeksiyöz ishal etiyojisi

Tablo 2.3 İshal tipleri

Tablo 3.1 Hasta bilgi formu

Tablo 3.2 Hastalara ait bilgiler

Tablo 4.1 Demografik özelliklerine göre 101 hastanın dağılımı

Tablo 4.2 Klinik özelliklerine göre 101 hastanın dağılımı

Tablo 4.3 HBoV pozitif hastalara ait bilgiler

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 *Parvoviridae* ailesine ait taksonomik sınıflandırma

Şekil 2.2 HBoV'un izometrik kapsid yapısının şematik görünümü

Şekil 2.3 Filogenetik analiz

Şekil 2.4 A; ST1 izolatu, B; ST2 izolatu

Şekil 3.1 PCR için gerekli reaktif karışımı

Şekil 3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (3 kademededen oluşan 45 siklus)

Şekil 3.3 Revers transkripsiyon için gerekli reaktif karışımı

Şekil 3.4 Nested PCR'in 1. aşaması için gerekli reaktif karışımı

Şekil 3.5 Nested PCR'in 2. aşaması için gerekli reaktif karışımı

Şekil 4.1 HBoV pozitif hastaların aylara göre dağılımı

Şekil 4.2 HBoV pozitif hastalarda semptomların görülme sıklığı

Şekil 4.3 HBoV pozitif hastaların jel elektroforez sonucu

Şekil 4.4 HBoV pozitifliği yanında norovirus pozitifliği bulunan hastaların jel elektroforez sonucu

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HBoV: Human Bocavirus

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

DNaz: Deoksiribonükleaz

RNaz: Ribonükleaz

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)

ORF: Open reading frame (Açık okuma çerçevesi)

NS1: Nonstructural protein 1 (Yapısal olmayan protein 1)

PBS: Phosphate Buffered Saline (Fosfat tamponlu tuzlu su)

dNTP: Deoksiribonükleotid trifosfat

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

TBE: Tris-borik asit-EDTA

DEPC: Dietilpirokarbonat

ÖZET

Sirekbasan S. Akut Gastroenteritli Çocuklarda Human Bocavirus DNA'sının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2009.

Akut gastroenteritler, çocuklarda alt solunum yolu infeksiyonlarından sonra en sık morbidite ve mortalite nedenidir. Beş yaşın altındaki çocuklarda dünyada her yıl bir milyar çocuk ishale yakalanmakta ve yaklaşık altı milyon çocuk ishal nedeni ile kaybedilmektedir.

Gastroenterit etkenlerinin bilinmesi, doğru tanı ve etkin tedavi fırsatı sağlamanın yanı sıra antimikrobiyal tedavi gereken durumlarda antibiyotik seçimi için de yol gösterici olmaktadır.

İlk kez 2005 yılında İsveç'te alt solunum yolu infeksiyonu gözlenen çocukların klinik örneklerinden izole edilen Human Bocavirus (HBoV); Parvoviridae ailesine bağlı Parvovirinae alt ailesinin içerisinde bulunan, tek sarmallı lineer bir DNA genomu içeren zarfsız bir virustur. Önceleri HBoV'nin insan hastalıklarındaki rolünün tam olarak bilinmemesine rağmen bu konuda yapılan çalışmalar, bu virusun özellikle 5 yaşın altındaki çocukların akut alt solunum yolu infeksiyonlarında etken olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar HBoV'nin İsveç'ten sonra sırasıyla Avustralya, Japonya, Kanada, Fransa, Amerika'dan bildirilmesinin ardından Türkiye'de de rastlanabildiğini göstermektedir.

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.

Çalışmamızda, akut gastroenteritli çocuklarda Human Bocavirus DNA'sının araştırılması amaçlandı. 27 Ocak 2009 – 26 Mayıs 2009 tarihleri arasında yürütülen bu tezin çalışma grubunu, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk polikliniği ve Çocuk Acil polikliniğinden, klinik olarak akut gastroenterit tanısı konulan, 59'u (% 58,4) erkek, 42'si (% 41,6) kız olmak üzere toplam 101 çocuk hasta oluşturmuştur.

HBoV DNA'sı NP-1 gen bölgesine uygun primer dizilerinin kullanıldığı PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

İncelenen 101 örnekten 7'si (% 6,9) HBoV pozitif olarak saptanmıştır. HBoV pozitif hastaların yaş ortalaması 1.5 (1–2,5 yaş) olup % 71,4'ü 2 yaş altıdır. 7 pozitif örnekten de 2'sinde (% 28,6) birden fazla virus açısından (HBoV ve Norovirus) pozitiflik elde edilmiş ve eşzamanlı infeksiyon varlığı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: İnsan Bocavirusu, gastroenterit, çocuk, polimeraz zincir reaksiyonu, dışkı

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3728

ABSTRACT

Sirekbasan S. Investigation of Human Bocavirus DNA in children with acute gastroenteritis. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Microbiology and Clinical Microbiology. Master of Science. Istanbul. 2009.

Following lower tract infections acute gastroenteritis is one of the most common causes of morbidity and mortality in children. Among children under 5 years of age, 1 billion children contract diarrhea each year and approximately 6 million of them die.

The identification of the causative agent of gastroenteritis gives an opportunity for correct diagnosis and effective therapy and may be also helpful during the selection appropriate antimicrobial, if necessary.

Human Bocavirus (HBoV) which is a nonenveloped DNA virus with a single stranded linear DNA genome and isolated for the first time in 2005 from clinical specimens of Swedish children with lower respiratory tract infection belongs to the Parvovirinae subfamily of Parvoviridae virus family. Although the exact role of HBoV in human diseases was unknown at the beginning, subsequent studies revealed that HBoV is one of the causative agents of the lower respiratory tract infections, especially in children under 5 years of age. Subsequent studies show that HBoV is present in Sweden, Australia, Japan, Canada, France, USA, Turkey, etc.

Since Bovine parvovirus and Canine minute virus are taxonomically related with HBoV which cause gastroenteritis in animals, the role of HBoV in gastroenteritis has been also investigated.

In our study, children with acute gastroenteritis Human Bocavirus DNA aimed to research. The study group of this study conducted between January, 27.2009-May, 26 2009 consisted of 101 children attending to Ambulatory and Emergency Pediatrics Clinics of Cerrahpaşa School of Medicine. 59 (58.4%) of children were male and 42 (41.6%) were female.

HBoV DNA was investigated by PCR using primers from NP-1 gene of the virus.

Seven out of 101 specimens (6.9%) were found positive. The mean age of the HBoV DNA positive children was 1.5 years (1-1.5years) and 71.4% of them were younger than 2 years. In 2 (28.6%) of 7 positive samples we obtained positive results also for other gastroenteritis viruses (in both Noroviruses) indicating, mixed infections.

Key Words: Human Bocavirus, gastroenteritis, child, polymerase chain reaction, stool

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 3728

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut gastroenteritler, özellikle çocukluk çağında görülmekle birlikte tüm yaş gruplarını etkileyen ve ölüm nedeni olarak üst sıralarda yer alan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, akut gastroenteritler tüm dünyada çocuklarda morbidite nedeni olarak akut solunum yolu infeksiyonlarından sonra ikinci sıklıkta, mortalite nedenlerinin ise başında gelmektedir (1-3).

Gastroenteritin infeksiyöz etkenler dışında çeşitli nedenleri vardır fakat özellikle akut gastroenteritlerin büyük bir kısmından infeksiyöz etkenler sorumludur. Gastroenterit etkeni virusların sıklıkları yaş ile değişmekle birlikte en sık olarak rotavirus karşımıza çıkmaktadır. Bunu sırasıyla norovirus, enterik adenoviruslar, astrovirus, coronavirus, picabirnavirus, torovirus, enterovirus 22 izlemektedir (4, 5).

Gastroenterit etkenlerinin çok çeşitli olması ve günümüzde rutin olarak uygulanan laboratuvar testlerin sınırlı olması sebebiyle etken mikroorganizmaların birçoğu saptanamamaktadır. Akut gastroenteritlerin tedavisinde antibiyotikler yaygın olarak kullanıldığından, dirençli bakteri kökenlerinin ortaya çıkması da kaçınılmazdır. Bu durum yeni bildirilen viral etkenlere yönelik testlerin de dahil edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Çevre ve hijyen koşullarının iyi olmadığı bölgelerde bir takım infeksiyöz etkenler yaygın olarak toplum sağlığını ciddi ölçüde tehdit ederken, yeni tanımlanan pekçok mikroorganizma da hem sağlıklı popülasyonda hem de bağışıklık sistemi baskılanmış olan kişilerde gastroenterit etkeni olabilmektedir.

2005 yılında Allander ve arkadaşları özellikle akut solunum yolu infeksiyonu semptomları gösteren bir grup çocuktan aldıkları nazofarengeal aspirat örneklerinde yeni bir virusun varlığını ortaya koydular (6). Yapılan ileri genomik araştırmalar sonucunda *Bocavirus* cinsinde yer alan *Canine minute virus* ve *Bovine parvovirus* adı verilen bu virüslara çok yakın benzerlikler göstermesi nedeniyle bu virus *Bocavirus* cinsine alınarak *Human bocavirus* (HBoV) olarak isimlendirildi (7, 8).

Bocavirus cinsinde yer alan bu iki hayvan patojeni virusun hayvanlarda gastroenterit yapması nedeniyle, solunum yolları dışında gastrointestinal sistem üzerinde de etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. 2007 yılında yapılan bir çalışmada akut gastroenteritli 527 çocuk hastanın fekal örneklerinin 48'inde PCR ile HBoV pozitifliği saptanmıştır. HBoV pozitif hastaların 20'sinde tek başına etken iken, 28 hastada koinfeksiyon olarak değerlendirilmiştir (9).

HBoV'un gastrointestinal sistem infeksiyonlarındaki rolüne yönelik yapılan çalışmalar tedavi ve epidemiyolojik açıdan çok önemlidir. Daha önce solunum yolları infeksiyonu olan çocuklarda saptanmış olan bu virusun, ülkemizde gastroenteritteki rolüne ilişkin yapılmış herhangi bir çalışma yoktur. Varlığı ortaya yeni konulan bu virusun gastrointestinal sistem infeksiyonlarındaki yeri ülkemizde bilinmemektedir.

Bu nedenle yeni tanımlanan bu virusun ülkemizde çocukluk çağı gastroenteritlerindeki rolünü belirlemek amacıyla hastanemizin çocuk polikliniğine başvuran akut gastroenterit tanısı konulan çocuk hastaların dışkı örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile HBoV DNA'sının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

İnfeksiyon hastalıklarının yaygınlığı; ülkelerin iklim koşullarına, coğrafi özelliklerine, toplumun ekonomik, sosyal ve kültürel gelişimine bağlı olarak değişmektedir (10). Günümüzde tüm dünyadaki gelişmelere ve alınan sağlık tedbirlerine karşın akut gastroenteritler en önemli ölüm sebepleri arasında yer aldığından önemini korumaya devam ettirmektedir (1).

Akut gastroenteritler, çocuklarda alt solunum yolu infeksiyonlarından sonra en sık morbidite ve mortalite nedenidir (11). 1982 yılına dayanan ve 1950-1970 yılları arasındaki veriler gözden geçirilerek yapılan bir çalışmaya göre yılda 4,6 milyon çocuğun ishal nedeniyle öldüğü tahmin ediliyordu (12). 1992 yılında yapılan başka bir çalışma da ise 1980'lerdeki veriler bu sayının 3,3 milyona indiğini göstermekteydi (13). 2003 yılında yapılan bir araştırmaya göre günümüzde 1,6-2,5 milyon çocuk ishal nedeniyle ölmektedir (14). Bu ölümlerin çoğu gelişmekte olan ülkelerde; besin hijyenindeki eksiklik, kalabalık ev ortamı, fakirlik, hızlı şehirleşme ve yetersiz eğitim sonucu meydana gelmektedir (15).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yılda 25 milyon ishal olgusu görüldüğü ve yaklaşık % 20'sinin gastrointestinal şikayetlerle hekime başvurduğu tahmin edilmektedir. Bunlar arasında özellikle 5 yaş altı çocuklar ve yaşlılar olmak üzere 10.000'den fazla kişinin öldüğü bildirilmektedir (3, 16).

Nüfus yoğunluğunun fazla olduğu ve hijyen koşullarının kötü olduğu bölgelerde klasik olarak tanımlanabilecek etkenler gastrointestinal infeksiyonlara sebep olurken, teknolojik gelişmeler ışığında yeni tanımlanan birçok mikroorganizmanın hem sağlıklı bireylerde hem de immünsüpresif hastalarda gastroenterit etkeni olduğu görülmektedir (17).

2.1. İSHAL TANIMI

İshal; günde 3 kezden daha fazla sayıda sulu dışkılama ve günlük dışkı miktarının 200 gramın üzerinde olması şeklinde tanımlanabilir. İshal akut ve kronik olabilir. Akut ishaller 2 haftadan uzun sürmezken, kesintisiz veya aralıklı olarak 2-3 haftadan uzun sürmesi durumunda kronik ishal olarak kabul edilir (5).

İshal ile ilişkili olarak sık kullanılan klinik durumların tanımları aşağıda verilmiştir (5, 18):

Gastroenterit: Mide ve incebarsağın birlikte etkilendiği ve bu nedenle bulantı, kusma, ishal ile karın ağrısı gibi gastrointestinal semptomların birarada olduğu klinik tablodur.

Dizanteri: Kramp biçimi karın ağrısı, tenezm, kanlı-mukuslu sık sık ve az dışkılama ile karşımıza çıkan bu klinik tablo başta kolon olmak üzere barsakların inflamasyonu ile karakterize edilir.

Enterokolit: Hem kalın hem de ince barsak mukozasının inflamasyonu sonucu genellikle bulantı ve kusmanın eşlik etmediği, ateş, karın ağrısı ve de ishalin etkin olduğu klinik tablodur.

Tenezm: Sık sık ağrılı dışkılama ve dışkılamaya rağmen boşalamadığını hissedip rahatlayamama durumudur.

2.2. İSHAL EPİDEMİYOLOJİSİ

İshalli hastalıklar dünyanın her yerinde yaygın olarak görülmekle beraber, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ishal özellikle küçük çocuklar için son derece önemli bir sağlık sorunu ve ölüm nedenidir (19). 5 yaşın altındaki çocuklar gelişmiş ülkelerde yılda 2-3 kez ishal geçirirken, gelişmekte olan ya da az gelişmiş ülkelerde bu yaş grubundaki çocuklar 10-18 kez ishal olmaktadır. Bu çocukların % 15'i 3 yaşından önce ishal nedeniyle yitilmektedir (2, 5). Yurdumuzda ise 5 yaş altı çocuk ölümlerinin pnömoniden sonraki en sık nedeninin ishallere bağlı olduğu bildirilmektedir (20).

Şurası bir gerçektir ki, gelişmiş ülkeler için de ishalli hastalıklar sorun teşkil etmeye devam etmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1,5 milyon çocukta klinik tablo gösteren ishal doktora başvuruya neden olmaktadır. Hastaneye yatış nedenlerinin % 10'u ishalli hastalıklardan dolayıdır (21).

İshaller yurdumuzda tüm yıl boyunca görülmekte ve genellikle Nisan-Mayıs aylarında artıp, Temmuz-Ağustos aylarında en yüksek seviyeye ulaşır. Ekim ayında ise azalma eğilimi göstermektedir (22, 23).

2.2.1. İshalle ilişkili risk faktörleri

İshalle ilişkili; fiziksel, kimyasal, immünolojik, çevresel ve demografik olmak üzere birçok risk faktörleri bulunmaktadır. Bunların bir kısmı maddeler halinde aşağıda sıralanmıştır (24).

- Kısa süre önce seyahat yapmış olanlar; infeksiyöz ishal yönünden yüksek risk altındadır.
- Gündüz bakım evine (kreş, ana okulu vb.) giden çocuklar ve bunların aile bireyleri; çocukların kişisel temizlik kavramlarının tam olarak gelişmemiş olmasından dolayı yakın temas halinde olmaları yüksek risk faktörüdür.
- Sürekli bakım evinde (huzur evi, akıl hastanesi vb.) kalanlar; bağışıklık sistemi problemleri ve düşük durumda olmalarıyla risk altındadırlar.
- AIDS hastaları ve eşcinseller; seksüel geçişin sık olduğu bu ishallerde fekal-oral yolla infeksiyöz ishal gelişme oranının yüksek olmasından ötürü riski yüksek gruplar arasındadır.
- İlaç kullanan hastalar; son 4-6 hafta içerisinde geniş spektrumlu antibiyotik ve aşırı laksatif kullanımı büyük oranda ishale neden olur.
- Sağlıksız yiyeceklerin tüketilmesi; toplu halde üretilen yiyeceklerin hazırlanmasında yapılan hatalar risk faktörleri arasında yer alır.

2.3. İSHAL ETİYOLOJİSİ

Günümüz koşullarında rutin laboratuvar tetkikleri ile tüm ishal etkenleri bilinmemekte ve bu durum amprik antibiyotik kullanımında artışa yol açmaktadır (25, 26). Etiyolojinin bilinmesi, doğru tanı ve etkin tedavi fırsatı sağlamakla birlikte epidemiyolojik açıdan da önem taşır. Ayrıca antimikrobiyal maddelerin kullanılması konusunda klinisyeni yönlendirerek halk sağlığı açısından gerekli önlemlerin alınmasında rehberlik eder (Tablo 2.1) (1, 3, 4, 27, 28).

Tablo 2.1 İshal nedenleri

Akut ishaller

- İnfeksiyöz nedenler:
Bakteriler, viruslar, parazitler ve mantarlar
- Toksik ishaller:
Bakteri toksinleri-Gıda zehirlenmeleri: *S. aureus*, *Bacillus cereus*,
Clostridium perfringens, *E. coli* (ETEC), antibiyotikle ilişkili ishal (*C. difficile*)
- Şimik zehirler:
Arsenik, kurşun, civa vb.
- Diğer nedenler:
Gastrointestinal kanama, apendisit, divertikülit, iskemik kolit

Kronik ishaller

- İnflamatuvar bağırsak hastalıkları
Ülseratif kolit, Crohn hastalığı
- İnfeksiyonlar:
Paraziter hastalıklar (*E. histolytica*, *Giardia*, *Cryptosporidium*)
Bağırsak tüberkülozu
- Bağırsak tümörleri
- Endokrin hastalıklar
Hipertroidi, hipoparatiroidi, diabetes mellitus
- Kistik fibrozis
- Kısa bağırsak sendromu
- Emilim bozuklukları
- Gıda alerjisi

İnfeksiyöz ishal etiyolojisinde başta viruslar, daha sonra bakteriler ve daha az oranda da parazitler yer almaktadır (Tablo 2.2) (4, 29). Ancak bu oranlama genel olup hastanın demografik özelliklerine, bölgenin mevsimsel koşullarına ve iklimsel özelliklerine bağlı olarak değişiklikler gösterebilmektedir Ayrıca ulaşım olanaklarındaki gelişmeler göz önüne alındığında olağandışı etkenlerle karşılaşma potansiyeli artmaktadır (30-33).

Tablo 2.2 Akut infeksiyöz ishal etiyolojisi

Bakteriler

• **İnvazif**

- *Salmonella typhi*
- *typhi* dışı *Salmonella*
- *Shigella sp.*
- *Campylobacter sp.*
- Enteroinvazif *E. coli* (EIEC)
- *C. perfringens*
- *Yersinia enterocolitica*
- *S. aureus* (enterokolit)
- *Plesiomonas shigelloides*
- *Aeromonas sp.*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Tropheryma whippelii*
- *Edwardsiella tarda*
- *Hafnia alvei*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Citrobacter sp.*
- *Enterobacter sp.*
- *Bacterioides fragilis*

• **Toksijenik**

- **Önceden yapılmış toksin:**

- B. cereus*
- S. aureus* (enterotoksin)
- C. perfringens*

- **Enterotoksin:**

- Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)
- Vibrio cholerae*
- Aeromonas sp.*

- **Sitotoksin:**

- C. difficile*
- Enterohemorajik *E. coli* (EHEC)

Viruslar

- *Rotavirus*
- *Norovirus*
- *Astrovirus*
- *Torovirus*
- *Cytomegalovirus*
- *Parechovirus*
- *Pestivirus*
- *Adenovirus* (tip 31, 40 ve 41)
- *Calicivirus*
- *Enterovirus*
- *Coronavirus*
- *Picobirnavirus*
- *Sapovirus*
- *Human Bocavirus*

Parazitler

• **Protozoon**

- *E. histolytica*
- *Giardia lamblia*
- *Cryptosporidium*
- *Cyclospora*
- *Isospora belli*
- *Sarcocystis hominis*
- *Blastocystis hominis*
- *Balantidium coli*
- *Dientamoeba fragilis*
- *Microsporidia*
(*Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*)

• **Helmint**

- *Trichuris trichiura*
- *Hymenolepis nana*
- *Taenia saginata*
- *Taenia solium*
- *Strongyloides stercoralis*
- *Trichinella spiralis*
- *Schistosoma mansoni*
- *Capillaria philipiensis*

• **Mantar**

- *Candida albicans*

2.4. İSHAL PATOGENEZİ

İshal patogenezinde farklı mekanizmaların yol açtığı değişik tipte ishaller yer almaktadır. Vücut savunma sistemi ve mikroorganizma arasındaki etkileşim sonucu, ya bağırsak sıvı sekresyonunda artış (sekretuar ishaller) ya da mukoza hasarlanması sonucu (inflamatuvar ishaller) ishal gelişir. İshalin bir diğer ana mekanizması sıvı emiliminde azalma (ozmotik ishaller, emilim yüzeyinin azalması) olmasıdır (Tablo 2.3) (4, 34-38).

Tablo 2.3 İshal tipleri

Sekretuar ishaller:

Dışkı miktarının ve su içeriğinin fazla olduğu ishallerdir. Sıvı ve elektrolit transportunda bozukluk ve aktif anyon salınımında artış görülür.

Eksüdatif ishaller (İnflamatuvar ishaller):

İnflamasyon sonucu barsak hücrelerinin kaybı veya hasarı ile ortaya çıkar. Kolon absorpsiyonunda bozulma ve sekresyonda artma görülür.

Ozmotik ishaller:

Absorbe edilemeyen maddelerin barsak lümeni içerisinde bulunması ile birlikte kolonun normal ve kompanse edilmiş geri emme kapasitesini aşması sonucu ishal görülür.

Motilite bozukluğuna bağlı ishaller:

Barsak motilitesinin arttığı durumlarda lümendeki maddelerin emilim kapasitesine sahip hücreler ile temas süresinde azalma meydana gelir ve bu durum malabsorpsiyonla ishale neden olur.

Emilim yüzeyinin azalmasına bağlı ishaller:

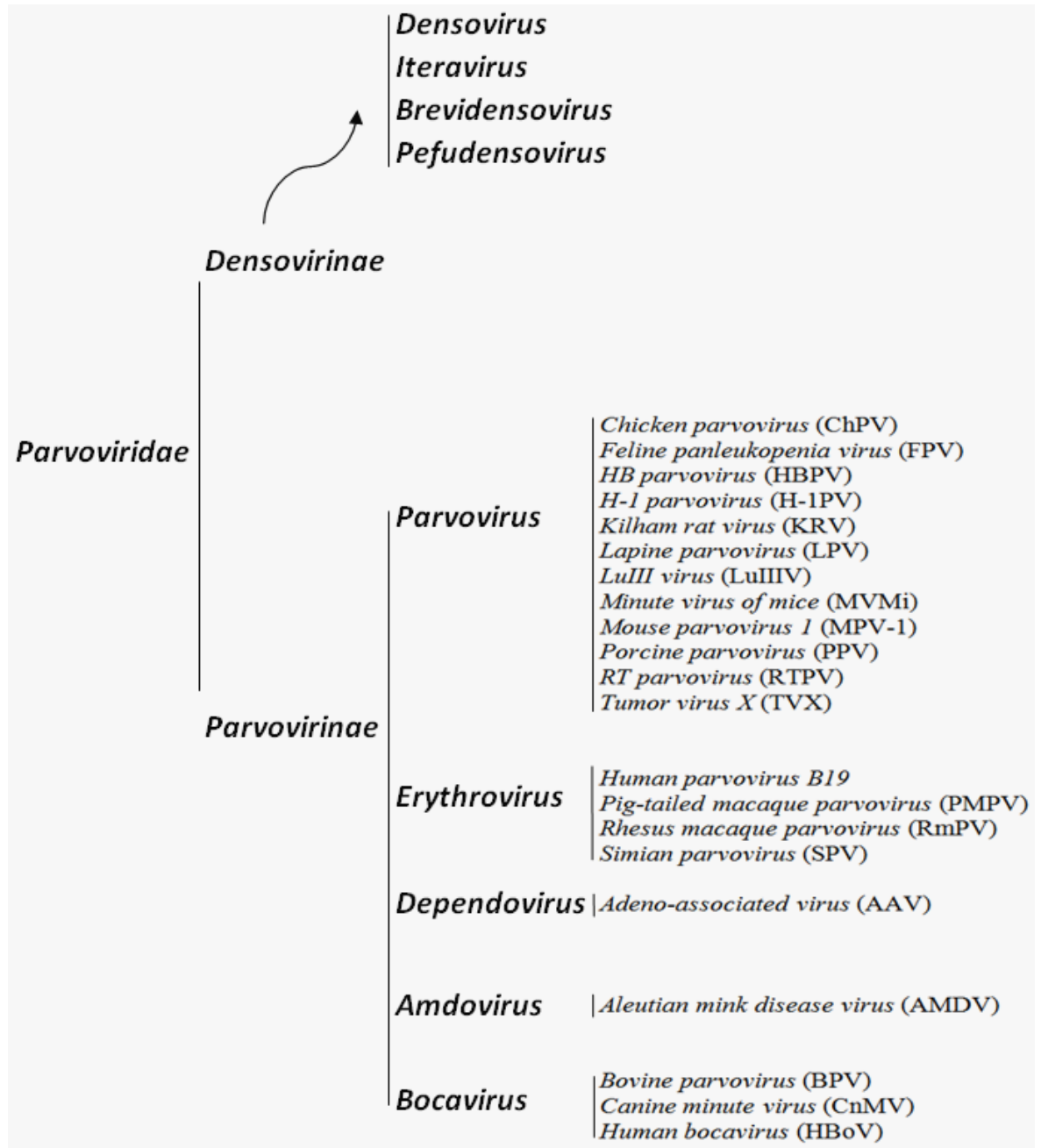
Barsak reaksiyonları ve fistüller; emilim yüzeyinin azalmasına, barsaktan geçiş süresinin kısalmasına ve malabsorpsiyona yol açarak ishale neden olabilir.

Suni ishaller:

Hasta kendi isteği ile örneğin laksatif kullanımına bağlı olarak ishal oluşturur.

2.5. HUMAN BOCAVIRUS (HBoV)

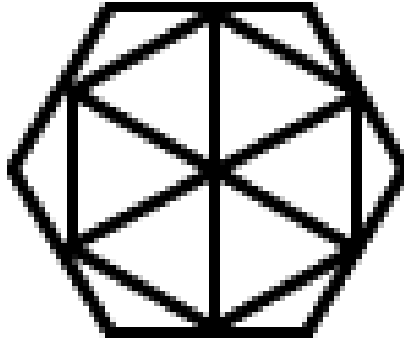
DNA virusları içerisinde yer alan *Parvoviridae* ailesine bağlı *Parvovirinae* alt ailesinde omurgalı hayvanlarda ve insanlarda hastalık yapan *Amdovirus*, *Bocavirus*, *Dependovirus*, *Erythrovirus* ve *Parvovirus* olarak adlandırılan 5 ayrı virus cinsi bulunmaktadır (Şekil 2.1). Bunlar 18-26 nm çapında, 4-6 kb uzunluğunda tek sarmallı lineer bir DNA genomu içeren, izometrik (ikozahedral) kapsidli ve zarfsız viruslardır (Şekil 2.2) (7, 39).



Şekil 2.1 *Parvoviridae* ailesine ait taksonomik sınıflandırma

Bocavirus cinsinde daha önceleri *Canine minute virus* ve *Bovine parvovirus* adı verilen ve hayvanlarda hastalık etkeni olduğu bilinen iki ayrı virus yer almaktaydı. Fakat 2005 yılında Allander ve arkadaşları özellikle akut solunum yolu infeksiyonu semptomları gösteren bir grup çocuktan aldıkları nazofarengeal aspirat örneklerinde yeni bir virusun varlığını ortaya koydular (6). 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 (7, 8). “boca” ismi Bovine ve canine sözcüklerinin ilk hecelerinin kombinasyonu olarak türetilmiştir (40).

Bocavirus cinsinde yer alan bu iki hayvan patojeni enterik viruslardır. *Bovine parvovirus* ishale sebep olurken, *Canine minute virus* yenidoğan solunum yolu hastalıklarına ve embriyopatiye sebep olmaktadır (40).



Şekil 2.2 HBoV'un izometrik kapsid yapısının şematik görünümü

Yakın zamanlara kadar *Parvovirinae* alt ailesinde insanda hastalık yapan tek virusun *Parvovirus* cinsi içerisinde yer alan 5. hastalık etkeni *Parvovirus B19* olduğu biliniyordu. HBoV'un çocuklarda alt solunum yolları infeksiyonu etkeni olarak saptanmasıyla birlikte HBoV'de ikinci bir insan patojeni olarak bu aileye katılmıştır (8).

Parvovirus'ler genellikle proliferasyona uğrayan hücreleri infekte eder ve sistemik infeksiyonlara neden olur. Dokuların iyileşmesi ile ilgili semptomlar uzun süre devam edebilir (6).

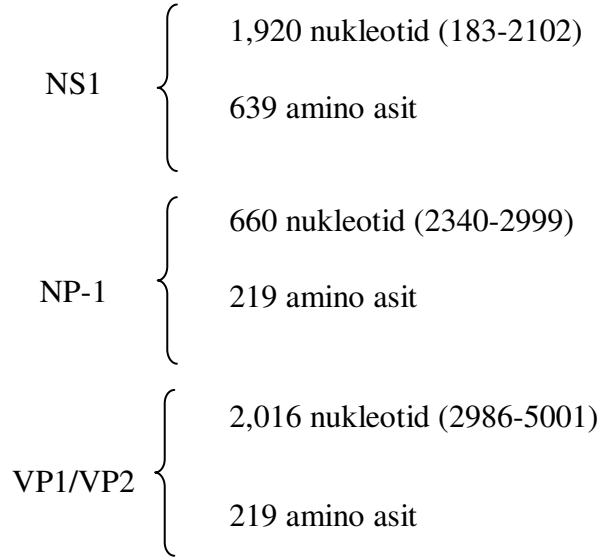
HBoV birçok özelliği bakımından *Parvovirus*'la benzerlik göstermesinin yanında bazı özellikler açısından bakıldığında bir takım farklılıklara rastlanmaktadır. Örneğin; HBoV genomu 5,5 kb olmasına karşın parvoviruslarda genom 5,1 kb uzunluğundadır (7).

Bovine parvovirus ve *Canine minute virus*'un genomik organizasyonu HBoV'un genomuna yakın benzerlik göstermektedir (Şekil 2.3) (8). *Parvovirinae* alt ailesinin tüm üyelerinde 2 büyük protein kodlayan bölge (open reading frame-ORF); biri yapısal olmayan protein (NS1) diğer ikisi iki farklı kapsid proteini (VP1, VP2) olmak üzere 3 proteini kodlar. Ancak *Bovine parvovirus* ve *Canine minute virus*, HBoV'de olduğu gibi bir üçüncü orta ORF bölgesine sahiptir. Bu üç büyük ORF bölgesi yapısal olmayan bir protein (NS1) ile 3 farklı kapsid proteininden (VP1/VP2, NP-1) oluşan toplam 4 büyük proteini kodlar. ORF bölgesinden kodlanan yapısal olmayan NP-1 olarak adlandırılan proteinin fonksiyonu bilinmemektedir (41, 42).

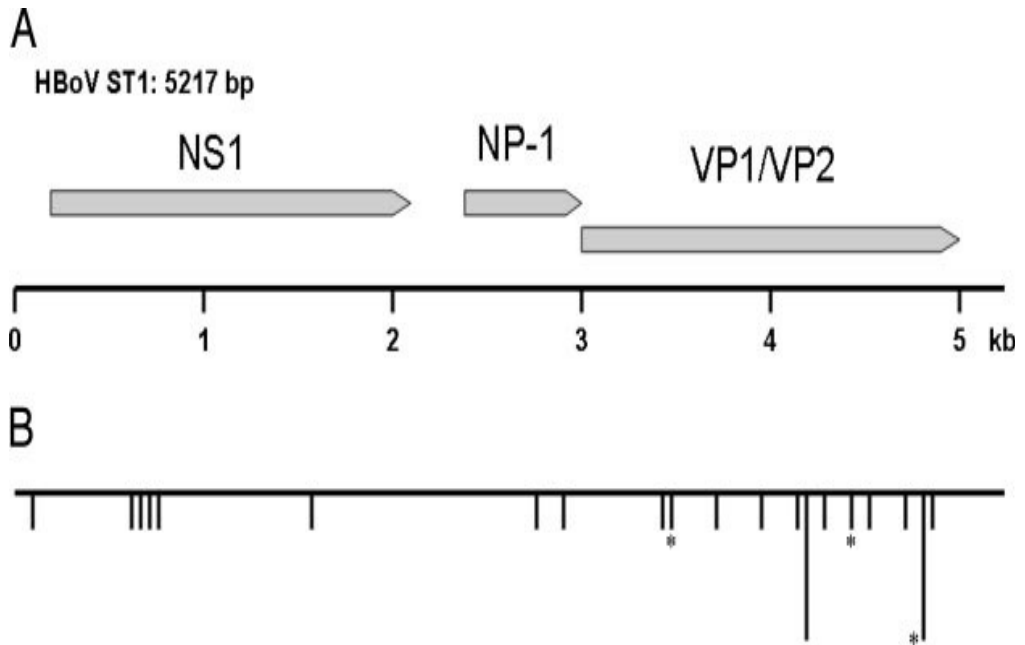
HBoV'de orta ORF'nin kodladığı NP-1 ile *Bovine parvovirus* ve *Canine minute virus*'un sahip olduğu NP-1 geninin amino asit düzeyi arasında %47 oranında benzerlik bulunmaktadır ve bu da HBoV'un sınıflandırmadaki yerini destekler niteliktedir (8).

HBoV genomunun tam uzunlukta dizi analizi yapıldıktan sonra iki farklı izolatu bulunmuştur. Bu izolatlar Stockholm 1 (ST1; 5,217 nukleotid) ve Stockholm 2 (ST2; 5,299 nukleotid) olarak isimlendirilmiştir (8).

HBoV'un ST1 izolatu aşağıda gösterilen bölgelerden oluşur;



ST2 izolatu ise ST1 izolatından 26 nukleotid farklıdır (şekil 2.3) (8).



şekil 2.4 A; ST1 izolatu, B; ST2 izolatu

HBoV için bugüne kadar kullanılan tek tanı yöntemi PCR'dır. Klinik araştırmalar için kullanılan kantitatif PCR uygulamasında ilerlemeler kaydedilmiştir fakat solunum yolu örnekleri için henüz standart bir prosedür yoktur. HBoV bazen solunum yolu sekresyonlarında 10^{10} kopya/ml kadar yüksek viral yüke ulaşabilir, fakat çoğu çalışmada pozitif olarak saptanan örneklerin viral yükü düşüktür. Bu nedenle kantitatif değerler dikkatle yorumlanmalıdır (6, 43-46).

HBoV hastalarda klinik olarak sıklıkla alt solunum yolu infeksiyonlarına daha az olarak da üst solunum yolu infeksiyonlarına sebep olmaktadır (47). HBoV DNA'sı semptomatik çocukların periferik kanlarından da saptanabilmektedir (6).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmaya göre Kawasaki hastalığı olan 16 hastada PCR ile HBoV genomu araştırılmıştır ve 5'inde (% 31,2) HBoV pozitifliği saptanmıştır. HBoV'un bazı Kawasaki hastalığı olgularında patojenik rolü olduğu düşünölmüştür (48).

Hamza ve arkadaşları Almanya'da bir yıllık periyotta yaptıkları çalışmada, nehirlerden topladıkları 120 su örneğinden 49 (% 40,8) HBoV pozitifliği bulmuşlardır. Bulunan yüksek yaygınlık oranı nehir sularının HBoV yayılımında rol oynayabileceğini düşöndürmüştür (49).

HBoV in vitro ortamda çoğalmaz ve HBoV'da bir hayvan modeli şimdiye kadar bildirilmemiştir (6).

2.5.1. HBoV epidemiyolojisi

HBoV ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında tüm dünyada saptandığı görölmektedir (8, 44, 50-60). Neredeyse şimdiye kadar tüm prevalans çalışmaları akut solunum yolu hastalarının solunum sekresyonlarından yapılmıştır. Bu çalışmalarda prevalans oranları % 1,5 ile % 19 arasında değişkenlik göstermektedir. Prevalans farklılıklarına bakıldığında hasta popülasyonları, örnekleme teknikleri ve deneylerin duyarlılıkları göz ardı edilmemelidir (6).

HBoV infeksiyonunun mevsimsel değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (44-47, 53, 55, 57-59). Fakat düzenli sabit bir mevsimselliği olup olmadığı henüz bilinmemektedir (6).

HBoV'e genellikle 2 yaş altı çocuklarda rastlanmıştır (8, 54, 56, 59, 62). Yapılan birçok çalışmada ise 6 aydan küçük çocuklar arasında yaygınlığın düşük olduğu bildirilmiştir. Bunun bir ölçüde anneden geçen antikorlara bağlı olduğuna işaret edilmektedir (44, 54, 59, 60, 62).

Filogenetik çalışmalara bakıldığında HBoV'un genetik çeşitliliği düşüktür. Dünya çapında birbirinden az farklı iki izolat dolaşmaktadır. Bu sınırlı dizi farklılıkları virusun epidemiyolojisinin izlenmesi ve prevalans çalışmalarında faydalı olabilir (46, 53, 63).

2.5.2. Human bocavirus ve gastroenterit

Hayvan bocavirusleri buzağı ve yavru köpeklerde sadece solunum semptomları ile değil bunun yanısıra gastroenteritle de ilişkilendirilmiştir (64, 65). Arnold ve arkadaşları 2006 yılında çocuk hastanesinde HBoV pozitif olan hastaların % 16'sında ishal olduğunu ilk kez bildirdi (51).

Vicente ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada akut gastroenteritli 527 çocuk hastanın dışkı örneklerinden PCR ile virus araştırmışlar ve 48'inde (% 9,1) HBoV pozitifliği saptamışlardır. HBoV pozitif hastaların 20'sinde tek başına etken iken, 28 hastada koinfeksiyon söz konusuydu (9).

Neske ve arkadaşları 2007 yılında solunum yollarında HBoV pozitif olan çocukların 31'inin fekal örneklerini araştırmışlar, bunların 14'ünü (% 45) pozitif bulmuşlardır (46).

Yapılan bu ve benzer çalışmalar ile HBoV'un gastroenteritli çocuklarda etken olabileceği sonucuna varılmıştır. Dışkı örneklerinde yaygın olarak HBoV genomuna rastlansa da gastroenterite yol açtığı kesin değildir. İshalin, sistemik infeksiyonlarda genel bir semptom olarak ortaya çıktığı da unutulmamalıdır (6, 66).

HBoV'un gastrointestinal sistem infeksiyonlarındaki yer, 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, çocuk ve erişkinlerdeki infeksiyon sıklığı ile ilgili verilerde kısıtlıdır. Bu nedenle HBoV'un gastrointestinal sistem infeksiyonlarındaki rolünün tam olarak belirlenebilmesi için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HASTALAR

27 Ocak 2009 – 26 Mayıs 2009 tarihleri arasında yürütülen bu çalışmaya, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Polikliniği ve Çocuk Acil Polikliniği'nden klinik olarak akut gastroenterit tanısı konulan, 59'u (% 58,4) erkek, 42'si (% 41,6) kız olmak üzere toplam 101 çocuk hastaya ait dışkı örnekleri toplandı. Örnekler semptomların başlanmasından sonra ortalama 2. ve 5. günler aralığında alındı.

Prospektif çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul Yönergesi'ne göre hastaların yasal temsilcilerinin bilgilendirilmiş onayları alındı. Çalışmaya katılan hastaların demografik verileri, yattıkları servis ve yatış nedeni, altta yatan hastalıklar, klinik semptomları ve aldığı tedavi protokolleri, aile ve servis doktorlarının verdiği bilgiler doğrultusunda hazırlanan formlara kaydedildi (Tablo 3.1). 101 çocuk hastaya ait genel bilgiler tablo 3.2'de verildi.

3.2. HASTA ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Dışkılar; hastanın steril numune kabına direkt dışkılanması ya da altbezlerinin naylon olan ters tarafından bağlatılarak sulu kısmın kaba aktarılması ile sağlandı. Dışkılamakta zorlanan hastalardan rektal sürüntü örnekleri alınarak taşıma sıvısına aktarıldı ve en kısa sürede buz üzerinde laboratuvara iletildi. Taşıma sıvısı olarak Hanks'in dengeli tuz solusyonu kullanıldı.

Örnekler laboratuvara ulaştığında vortekslenerek PCR yöntemiyle virus genomu araştırılmak üzere – 80 °C'de saklandı.

Akut gastroenteritli ve solunum yolu infeksiyonlu çocuklarda <i>Human Bocavirus</i> DNA'sının araştırılması	
Tarih:	Lab. No:
Adı Soyadı:	Yaşı:
Cinsiyeti: KIZ <input type="checkbox"/> ERKEK <input type="checkbox"/>	Tel:
Takip eden klinik/ Doktor adı ve tel:	
Klinik tanı: ASYE <input type="checkbox"/> GASTROENTERİT <input type="checkbox"/> ÜSYE <input type="checkbox"/> DİĞER <input type="checkbox"/>	
Klinik belirtilerin kaçınıcı günü:	
Çevresinde benzer hastalık belirtileri olan var mı?	
Kronik hastalık/bağışıklık sorunu/anomali:	
PCR Laboratuvarı tel: : 22335	

ATEŞ <input type="checkbox"/>	BURUN AKINTISI <input type="checkbox"/>	BOĞAZ AĞRISI <input type="checkbox"/>	POSTNAZAL AKINTI <input type="checkbox"/>
ÖKSÜRÜK <input type="checkbox"/>	BALGAM ÇIKARMA <input type="checkbox"/>	STRİDOR <input type="checkbox"/>	DİSPNE <input type="checkbox"/>
HIRILTI <input type="checkbox"/>	GÖZYAŞI ARTIŞI <input type="checkbox"/>	İSHAL <input type="checkbox"/>	SES KISIKLIĞI <input type="checkbox"/>
KARIN AĞRISI <input type="checkbox"/>	KUSMA <input type="checkbox"/>	BULANTI <input type="checkbox"/>	ANTB. KULLANIM <input type="checkbox"/>

Tablo 3.1 Hasta bilgi formu

TARİH	HASTA NO	AD SOYAD	YAŞ	CİNSİYET	TANI	ATEŞ	BURUN AKINTISI	BOĞAZ AĞRISI	ÖKSÜRÜK	BALGAM ÇIKARMA	HIRILTI	İŞHAL	KARIN AĞRISI	KUSMA	BULANTI	ANTİBİYOTİK KULLANIMI	ALTTA YATAN HASTALIK	ÇEVRESİNDE BENZER HASTALIK	KLİNİK SÜRE
27.01.2009	1	Z.M.D.	3,5 yaş	K	AGE	var						var	var	var	var				8. gün
27.01.2009	2	A.K.	10 aylık	E	AGE							var	var	var					3. gün
06.02.2009	3	S.Y.	12 aylık	E	AGE, ÜSYE	var	var		var		var	var		var		var	Ventriküler septal defekt		4. gün
07.02.2009	4	F.K.	4 yaş	K	AGE			var				var							1. gün
09.02.2009	5	S.U.	2,5 yaş	K	AGE							var		var					1. gün
09.02.2009	6	İ.Ö.	18 aylık	E	AGE							var		var	var				1. gün
12.02.2009	7	N.T.	3,5 yaş	K	AGE, İYE							var	var	var	var	var			3. gün
17.02.2009	8	E.K.	5 yaş	K	AGE							var		var	var	var			3. gün
19.02.2009	9	M.S.Ş.	11 aylık	E	AGE	var						var		var	var	var	preterm	var	7. gün
19.02.2009	10	H.Ü.	21 aylık	K	AGE	var			var			var		var	var				2. gün
23.02.2009	11	M.H.İ.	2 aylık	E	AGE							var	var	var				var	1. gün
23.02.2009	12	O.K.D.	2 yaş	E	AGE, ASYE	var	var		var		var	var							2. gün
24.02.2009	13	B.C.Ç.	2 yaş	E	AGE	var	var					var		var					3. gün
25.02.2009	14	P.N.Y.	9 aylık	K	AGE							var		var			Premature		3. gün
28.02.2009	15	F.M.B.	2,5 yaş	E	AGE							var		var	var				2. gün
01.03.2009	16	B.Y.	4,5 yaş	E	AGE	var						var		var	var				2. gün
01.03.2009	17	E.T.K.	2 yaş	E	AGE							var		var	var				2. gün
08.03.2009	18	Y.K.Y.	5 aylık	K	AGE							var		var					3. gün
09.03.2009	19	İ.Ö.	12 aylık	K	AGE							var		var					3. gün
09.03.2009	20	E.T.	18 aylık	K	AGE	var						var	var	var	var				3. gün

11.03.2009	21	B.K.	12 aylık	E	AGE							var							3. gün
12.03.2009	22	B.C.	2,5 yaş	E	AGE	var	var			var		var	var	var	var	var			4. gün
12.03.2009	23	C.K.	4,5 aylık	K	AGE		var		var	var	var		var		var				4. gün
12.03.2009	24	D.D.	2,5 yaş	K	AGE							var							2. gün
13.03.2009	25	E.C.	3 yaş	E	AGE,ÜSYE	var	var		var			var				var			2. gün
13.03.2009	26	I.O.Ü.	2,5 yaş	K	AGE							var		var	var				1. gün
13.03.2009	27	E.G.S.T	22 aylık	K	AGE							var		var	var			var	6. gün
13.03.2009	28	E.Ö.	11 aylık	E	AGE	var						var		var					5. gün
13.03.2009	29	S.A.	8 aylık	E	AGE,ÜSYE		var					var	var	var					2. gün
13.03.2009	30	M.G.	10 aylık	E	AGE		var		var		var		var					Menengit	3. gün
14.03.2009	31	E.G.	8 aylık	K	AGE	var						var		var					2. gün
16.03.2009	32	E.K.	4 yaş	E	AGE,ÜSYE	var	var		var			var		var	var	var		var	4. gün
16.03.2009	33	E.E.	2,5 yaş	K	AGE,ÜSYE	var	var		var	var		var		var		var			7. gün
16.03.2009	34	E.N.	8 aylık	K	AGE,ÜSYE	var	var		var	var		var		var				var	7. gün
16.03.2009	35	H.Y.	20 aylık	E	AGE,ÜSYE	var	var		var	var	var		var		var			Menengit, spastik	8. gün
16.03.2009	36	Y.Ö.	12 aylık	E	AGE,ÜSYE	var			var	var		var		var		var			4. gün
16.03.2009	37	B.G.	5 aylık	E	AGE	var						var		var					4. gün
17.03.2009	38	B.Y.Ş.	5 yaş	K	AGE							var	var	var					4. gün
19.03.2009	39	H.T.	15 aylık	E	AGE							var		var					3. gün
19.03.2009	40	B.K.	22 aylık	K	AGE	var						var		var	var	var			4. gün
19.03.2009	41	B.B.	4,5 yaş	K	AGE	var						var	var	var					3. gün
19.03.2009	42	E.Ş.	5 yaş	E	AGE	var			var			var		var					3. gün
19.03.2009	43	S.B.	5 aylık	K	AGE							var		var		var			2. gün
20.03.2009	44	S.Ö.	8 aylık	K	AGE,ÜSYE		var		var			var		var				var	2. gün
20.03.2009	45	B.E.	5 aylık	E	AGE							var		var					1. gün
21.03.2009	46	S.S.	2 yaş	E	AGE							var		var	var				10. gün
21.03.2009	47	B.G.	4,5 yaş	K	AGE	var	var					var		var	var				1. gün
21.03.2009	48	E.G.	5 aylık	E	AGE							var		var					15. gün
21.03.2009	49	E.İ.	12 aylık	E	AGE	var	var					var		var	var				3. gün

21.03.2009	50	Y.T.	13 aylık	E	AGE	var						var		var				2. gün
21.03.2009	51	N.S.	4 yaş	K	AGE							var		var	var			1. gün
21.03.2009	52	İ.I.D.	3 yaş	K	AGE							var		var	var			3. gün
21.03.2009	53	E.Y.	2 yaş	K	AGE							var		var	var			7. gün
23.03.2009	54	T.T.Ş.	4,5 yaş	E	AGE	var	var		var			var	var	var		var		5. gün
23.03.2009	55	B.Ö.	2 yaş	E	AGE		var					var		var	var			3. gün
26.03.2009	56	E.O.	4 yaş	E	AGE		var	var	var			var	var	var			Kalp hastalığı	2. gün
28.03.2009	57	D.A.	5 yaş	K	AGE							var		var	var			3. gün
29.03.2009	58	B.G.S.	12 aylık	E	AGE							var						4. gün
29.03.2009	59	B.K.	3 yaş	E	AGE,ÜSYE			var	var			var						1. gün
29.03.2009	60	Z.T.	2 yaş	K	AGE	var						var		var				3. gün
29.03.2009	61	E.D.D.	4 aylık	E	AGE							var						2. gün
29.03.2009	62	H.K.	10 aylık	K	AGE,ÜSYE	var						var		var	var	var	var	2. gün
29.03.2009	63	F.B.	12 aylık	K	AGE,ÜSYE	var	var		var			var					var	3. gün
29.03.2009	64	E.C.	7 aylık	E	AGE,ÜSYE	var	var		var			var						2. gün
30.03.2009	65	M.S.Y.	12 aylık	E	AGE							var						2. gün
31.03.2009	66	İ.K.	13 aylık	E	AGE		var			var		var		var			Mental retardasyon	4. gün
01.04.2009	67	S.Ç.	3 yaş	K	AGE	var						var	var					2. gün
01.04.2009	68	R.K.	10 aylık	K	AGE							var		var		var		1. gün
01.04.2009	69	M.K.T.	18 aylık	E	AGE	var			var			var		var				2. gün
01.04.2009	70	M.G.	11 aylık	K	AGE				var			var		var			var	3. gün
01.04.2009	71	O.G.	13 aylık	E	AGE							var		var			var	2. gün
01.04.2009	72	S.S.	16 aylık	E	AGE	var						var		var				7. gün
01.04.2009	73	A.K.K.	11 aylık	E	AGE,ÜSYE	var	var		var	var	var	var		var			var	3. gün
03.04.2009	74	Y.N.D.	2 yaş	K	AGE,ÜSYE				var			var		var			var	3. gün
04.04.2009	75	N.D.	3 yaş	K	AGE							var		var			var	2. gün
06.04.2009	76	H.Z.D.	21 aylık	E	AGE,ÜSYE	var	var		var	var		var		var			var	2. gün
06.04.2009	77	E.D.	2 yaş	E	AGE,ÜSYE	var	var		var			var		var				4. gün

06.04.2009	78	S.Ö.	12 aylık	E	AGE	var						var		var				3. gün
06.04.2009	79	H.B.	14 aylık	K	AGE							var		var			var	3. gün
06.04.2009	80	H.İ.Ö.	2 yaş	E	AGE	var						var		var				6. gün
06.04.2009	81	C.E.	4 aylık	E	AGE,ASYE	var			var	var	var	var		var		var		5. gün
06.04.2009	82	Y.S.	6 aylık	K	AGE,ÜSYE		var		var			var		var			var	3. gün
07.04.2009	83	O.B.	12 aylık	E	AGE,ÜSYE	var			var			var		var				3. gün
07.04.2009	84	Y.S.G.	2,5 yaş	E	AGE	var	var					var		var			var	3. gün
07.04.2009	85	E.D.K.	22 aylık	E	AGE	var						var		var				3. gün
07.04.2009	86	E.C.İ.	5 aylık	E	AGE	var					var	var		var				3. gün
09.04.2009	87	Ş.N.K.	2,5 yaş	K	AGE	var						var		var				3. gün
09.04.2009	88	A.B.	15 aylık	E	AGE,ÜSYE	var	var				var	var		var		var		3. gün
10.04.2009	89	İ.Ö.	12 aylık	E	AGE	var						var		var				3. gün
10.04.2009	90	C.E.	2,5 yaş	E	AGE				var			var		var				2. gün
11.04.2009	91	K.M.K.	18 aylık	E	AGE							var		var				7. gün
13.04.2009	92	K.Ö.	22 aylık	E	AGE							var		var			var	2. gün
13.04.2009	93	D.G.	19 aylık	K	AGE				var		var	var		var		var	Astım	4. gün
14.04.2009	94	B.T.	12 aylık	E	AGE							var		var				1. gün
15.04.2009	95	R.N.Ç.	18 aylık	K	AGE							var		var				1. gün
17.04.2009	96	İ.K.	11 aylık	E	AGE	var	var		var			var		var				2. gün
20.04.2009	97	S.S.	18 aylık	E	AGE		var					var	var	var				3. gün
05.05.2009	98	T.C.Ç.	11 aylık	K	AGE	var			var			var		var				7. gün
13.05.2009	99	N.A.	18 aylık	K	AGE,ÜSYE	var		var	var	var		var		var			Bronşiolit	4. gün
18.05.2009	100	Y.D.	10 aylık	E	AGE							var		var				2. gün
26.05.2009	101	E.G.	2,5 yaş	E	AGE							var		var			Kalp hastalığı	5. gün

Tablo 3.2 Hastalara ait bilgiler

3.3. VİRAL NÜKLEİK ASİTLERİN EKSTRAKSİYONU

Dışkıdan virus DNA'sının ekstraksiyonu için aşağıdaki hazırlık işlemleri uygulandı.

1. 2 ml'lik bir PCR tüpü içine 1.1 ml PBS konuldu. Üzerine yaklaşık 0,5 g dışkı örneği konularak süspansiyon hazırlandı.
2. Hazırlanan bu süspansiyon 1 dk boyunca vortekslendi.
3. Büyük partiküllerin çökmesi için 5 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
4. Üstteki kısım 1,5 ml'lik yeni bir PCR tüpü içine pipetle aktarıldı.
5. Son olarak 53300 g'de 30 dakika santrifüjde çevrildi. Üstteki kısım atılarak dipteki 200 µl'lik kısım PCR tüpüne aktarıldı.

Viral genom ekstraksiyonu High Pure Viral Nucleic Acid kiti (Roch Diagnostics, Almanya) ile üretici firmanın önerdiği talimatlara göre yapıldı. Her hasta örneğinden ekstraksiyon amacıyla 1,5 ml'lik PCR tüpüne 200 µl aktarıldı ve vortekslenerek homojen hale getirildi. Üzerine 400 µl binding buffer ve poly(A) eklenerek vortekslendi. Toplama tüpleri içine yerleştirilmiş olan kolonlara aktarıldı ve 2 dk 14000 RPM'de santrifüj edildi. DNA harici maddeleri uzaklaştırmak için 200 µl yıkama solusyonu eklenerek 11000 RPM'de santrifüj edildikten sonra alt sıvı atıldı. Ardından aynı şekilde yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı. Son santrifüjleme ve alt sıvı atımını takiben daha önceden 70 °C'de ısıtılmış elution bufferden 70 µl kolonun ortasına pipetlenerek genomun membrandan ayrılması sağlandı.

3.4. VİRUS DNA'SININ AMPLİFİKASYONU

Çalışmamızda araştırılacak olan HBoV DNA'sının amplifikasyonu için tek aşamalı PCR deneyi yapıldı (Şekil 3.1). Deneyde thermal cycler cihazı olarak PTC- 200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research, A.B.D.) kullanıldı.

PCR aşaması:

PCR karışımı	Miktar	Son konsantrasyon
DNaz-RNaz içermeyen deiyonize su	14.375 µl	-
10X PCR Buffer*	2.5 µl	1X
MgCl ₂ (25 mM)*	1.5 µl	1.5 mM
dATP**	Her bir dNTP'den 10 mM	200 mM
dCTP**		200 mM
dGTP**		200 mM
dTTP**		200 mM
Primer F	0.5 µl	0.25 µM
Primer R	0.5 µl	0.25 µM
Taq DNA polimeraz* (5 U/ µl)	0.125 µl	0.625 U
Toplam	20 µl	
Hedef DNA	5 µl	
TOPLAM REAKSİYON HACMİ	25 µl	

*MBI Fermantas (Litvanya), 10X Buffer, 100 mM Tris-HCl (pH 8.8),

500 mM KCl, MgCl₂ 25 mM,

**MBI Fermantas (Litvanya)

Şekil 3.1 PCR için gerekli reaktif karışımı

3.5. HBoV İÇİN KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ

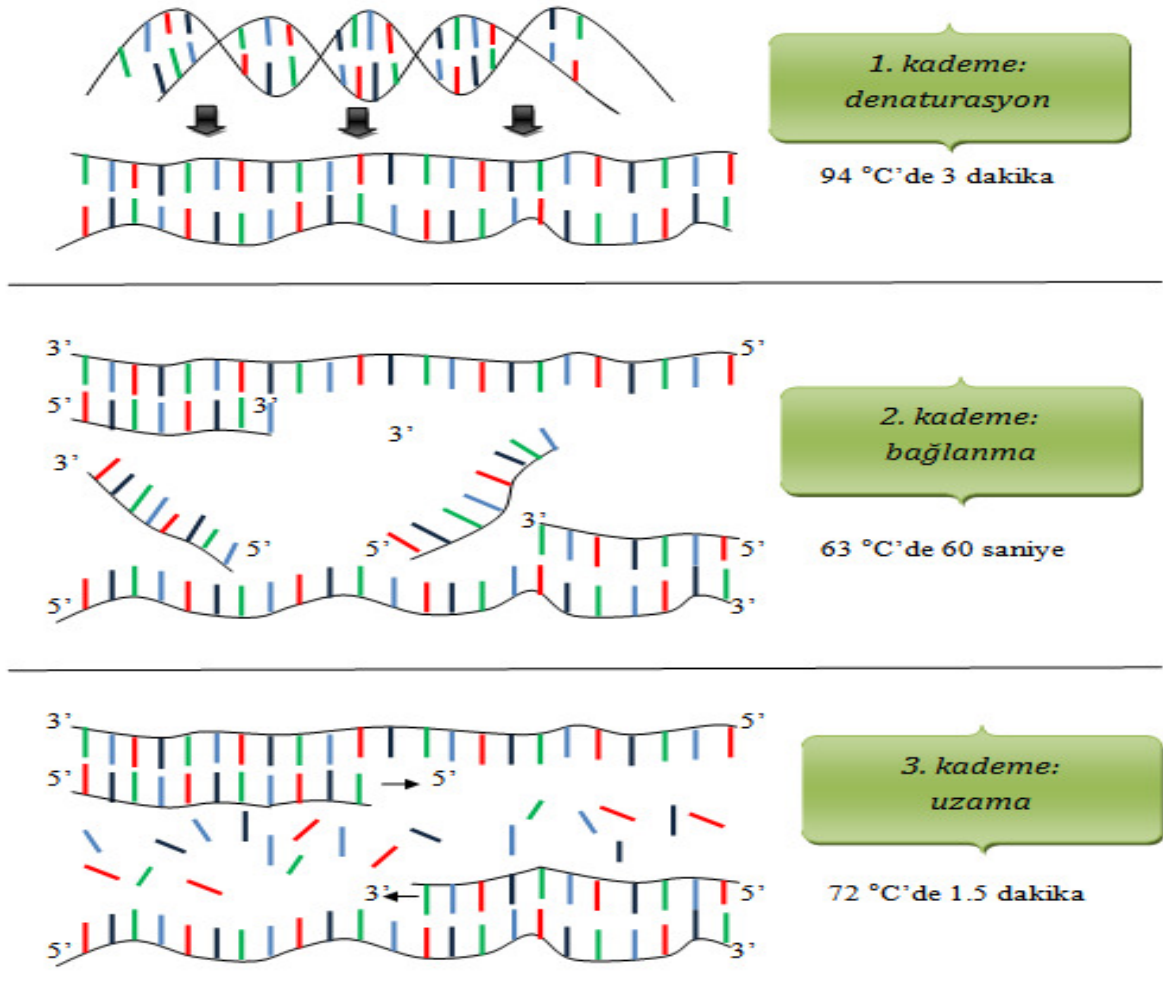
ORF bölgesinden kodlanan NP-1 gen bölgesine uygun primer dizileri kullanıldı.

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

Yukarıdaki primerler kullanılarak thermal cycler'da 94 °C'de 3 dakikalık başlangıç siklusu sonrası amplifikasyon için 94 °C'de 60 saniye denaturasyon, 63 °C'de 60 saniye bağlanma ve 72 °C'de 1,5 dakikalık uzama olmak üzere 45 siklus sonunda 72 °C'de 10 dakika ekstansiyon yaptırıldı (Şekil 3.2). HBoV NP-1 gen bölgesinden çoğaltılan PCR ürünleri 291 bp'dir (49).



Şekil 3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (3 kademedен oluşan 45 siklus)

3.6. KOİNFEKSİYON VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Çalışmamızda HBoV DNA'sı saptadığımız hasta örneklerinde koinfeksiyon varlığını araştırmak amacıyla diğer sık karşılaştığımız gastroenterit etkeni virusları da nested-PCR yöntemiyle inceledik. İlk önce araştırılacak olan RNA'lı etkenlere (*Rotavirus*, *Norovirus* ve *Astrovirus*) komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi için aşağıda belirtildiği şekilde revers transkripsiyon işlemleri gerçekleştirildi. DNA virüsü olan Adenovirus serotip 40 ve 41 için ise bu işlem yapılmadı. Revers Transkripsiyon PCR ve nested-PCR deneylerinde aynı thermal cyclus cihazı (PTC- 200, Peltier Thermal Cyclers, MJ Research, A.B.D.) kullanıldı.

3.6.1. Nested PCR Revers Transkripsiyon Aşaması

Revers transkripsiyon işlemi için örnekler, 25 °C'de 10 dakika, 42 °C'de 60 dakika ve 72 °C'de 10 dakika tutuldu. Daha sonra cDNA'ya çevrilen örnekler hemen PCR işlemine alındı.

PCR karışımı	Miktar	Son konsantrasyon
DNaz-RNaz içermeyen deiyonize su	2 µl	-
5X PCR Buffer*	4 µl	1X
DTT (0.1 M)*	1 µl	1.5 mM
dATP**	Her bir dNTP'den 10 mM	100 mM
dCTP**		100 mM
dGTP**		100 mM
dTTP**		100 mM
Random primer heksamerleri	1 µl	0.25 µM
RNaz inhibitörü (40 U/µl)	0.5 µl	30 U
MuLV RT* (200 U/µl)	0.5 µl	150 U
Toplam	10 µl	
Hedef RNA	10 µl	
TOPLAM REAKSİYON HACMİ	20 µl	

*MBI Fermantas (Litvanya), 5X Buffer, 100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, MgCl₂ 25 mM, MuLV RT (rekombinant)

**MBI Fermantas (Litvanya)

Şekil 3.3 Revers transkripsiyon için gerekli reaktif karışımı

3.6.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Revers transkripsiyon sonrasında *Rotavirus*, *Norovirus* ve *Astrovirus*'ların her birinin amplifikasyonu için bu karışımdan 5 µl, *Adenovirus* DNA'sının çoğaltılabilmesi için direkt ekstraksiyon örneklerinden 5 µl alınarak seçilen özgül primerlerle (Integrated DNA Technologies Inc., A.B.D.) çoğaltma işlemleri yapıldı. *Rotavirus*, *Norovirus* ve *Adenovirus* genomunun çoğaltılması için nested-PCR uygulandı. İnsan *Astrovirus* RNA'sının çoğaltılması için iki farklı bölge seçilerek RT-PCR uygulandı.

Tüm virusların çoğaltılmasında belirtilen reaktif karışımı kullanıldı (Şekil 3.4-3.5).

PCR karışımı	Miktar	Son konsantrasyon
DNaz-RNaz içermeyen deiyonize su	14.375 µl	-
10X PCR Buffer*	2.5 µl	1X
MgCl ₂ (25 mM)*	1.5 µl	1.5 mM
dATP**	Her bir dNTP'den 10 mM	200 mM
dCTP**		200 mM
dGTP**		200 mM
dUTP**		200 mM
Primer F	0.5 µl	0.25 µM
Primer R	0.5 µl	0.25 µM
Taq DNA polimeraz* (5 U/ µl)	0.125 µl	0.625 U
Toplam	20 µl	
Hedef DNA	5 µl	
TOPLAM REAKSİYON HACMİ	25 µl	

*MBI Fermantas (Litvanya), 10X Buffer, 100 mM Tris-HCl (pH 8.8),
500 mM KCl, MgCl₂ 25 mM,
**MBI Fermantas (Litvanya)

Şekil 3.4 Nested PCR'in 1. aşaması için gerekli reaktif karışımı

PCR karışımı	Miktar	Son konsantrasyon
DNaz-RNaz içermeyen deiyonize su	17.375 µl	-
10X PCR Buffer*	2.5 µl	1X
MgCl ₂ (25 mM)*	1.5 µl	1.5 mM
dATP**	Her bir dNTP'den 10 mM	200 mM
dCTP**		200 mM
dGTP**		200 mM
dTTP**		200 mM
Primer F	0.5 µl	0.25 µM
Primer R	0.5 µl	0.25 µM
Taq DNA polimeraz* (5 U/ µl)	0.125 µl	0.625 U
Toplam	23 µl	
Hedef DNA	2 µl	
TOPLAM REAKSİYON HACMİ	25 µl	

*MBI Fermantas (Litvanya), 10X Buffer, 100 mM Tris-HCl (pH 8.8),

500 mM KCl, MgCl₂ 25 mM,

**MBI Fermantas (Litvanya)

Şekil 3.5 Nested PCR'in 2. aşaması için gerekli reaktif karışımı

3.6.3. Kullanılan primer dizileri

3.6.3.1. Rotavirus primer dizileri

A grubu *Rotavirus*'un VP7 glikoproteinini kodlayan G9 bölgesinden uygun primer dizileri kullanıldı.

1. aşama:

RV9/1 5' GGC TTT AAA AGA GAG AAT T 3' (1-19)

RV9/2 5' GGT CAC ATC ATA CAA TTC T 3' (1044-1062),

primerleri thermal cycler'da 94 °C'de 2 dakikalık denaturasyon sonrası amplifikasyon için 94 °C'de 60 saniye, 45 °C'de 60 saniye ve 72 °C'de 3.5 dakikalık 45 siklus sonunda 72 °C'de 5 dakika sonlandırıcı yapılarak çoğaltıldı (67).

2. aşama:

RV9/3 F 5' TGG AAA ATC TAT TGG TAG GA 3' (110-129)

RV9/4 R 5' ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC 3' (868-887),

primerleri kullanılarak thermal cycler'da 94 °C'de 2 dakikalık denaturasyon sonrası amplifikasyon için 94 °C'de 60 saniye, 50 °C'de 60 saniye ve 72 °C'de 3 dakikalık 45 siklus sonunda 72 °C'de 5 dakika ekstansiyon yaptırılarak çoğaltıldı. 1. aşama PCR ürünleri 1043 bp (base pair=baz çifti), nested aşaması PCR ürünleri 758 bp'dir (68).

3.6.3.2. Astrovirus primer dizileri

2 farklı bölgenin primerleri kullanıldı;

ORF 1a bölgesinden:

MON 340 5' CGT CAT TAT TTG TTG TCA TAC 3' (1161-1182)

MON 348 5' ACA TGT GCT GCT GTT ACT ATG 3' (1449-1470),

PCR için yukarıda belirtilen primerler kullanılarak thermal cycler'da 94 °C'de 3 dakikalık denaturasyon sonrası çoğaltma için 94 °C'de 30 saniye, 50 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakikalık 45 siklus sonunda 72 °C'de 5 dakika ekstansiyon yaptırıldı (69).

ORF 1b bölgesinden:

MON 343 5' CCG GCT TAA CCC ACA T 3' (3708-3724)

MON 344 5' TAC AGA CAT GTG CAT GAC TGG 3' (4018-4039),

primerleri kullanılarak thermal cycler'da 94 °C'de 3 dakikalık denaturasyon sonrası çoğaltma için 94 °C'de 30 saniye, 42 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakikalık 45 siklus sonunda 72 °C'de 5 dakika ekstansiyon yaptırıldı. Astrovirus ORF 1a ve ORF 1b bölgesinden çoğaltılan PCR ürünleri sırasıyla 289 bp ve 316 bp'dir (69).

3.6.3.3. Norovirus primer dizileri

ORF 1 bölgesinden:

NV1a 5' ATG AAT ATG AAT GAA GAT GG 3'

NV6 5' TAC CAC TAT GAT GCA GAT TA 3'

NV4 5' GTT GAC ACA ATC TCA TCA TC 3'

NV7 5' ATT GGT CCT TCT GTT TTG TC 3'

ORF 3 bölgesinden:

NV4a 5' ACA AT(C/T) TCA TCA TCA CCA T 3'

NV6a 5' TAT CAC TAT GAT GCT GAC TA 3'

NV1 5' ATA AAA GTT GGC ATG AAC A 3'

Norovirus RT-PCR 1. aşamada kullanılan primerler; NV1a+NV1+NV7'dir.

2. aşamada kullanılan primerler; NV4+NV4a+NV6+NV6a'dır.

Bu primerler kullanılarak thermal cycler'da 94 °C'de 3 dakikalık denaturasyon sonrası çoğaltma için 94 °C'de 30 saniye, 42 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 45 saniyelik 45 siklus sonunda 72 °C'de 3 dakika ekstansiyon yaptırıldı. ORF 1 bölgesinden çoğaltılan PCR ürünleri 338 bp, ORF 2 bölgesinden çoğaltılan PCR ürünleri 312 bp'dir (70).

3.6.3.4. Adenovirus 40-41 primer dizileri

Adenovirus'un hekzon genlerinin korunmuş bölgesinden seçilen dejenere primerler kullanıldı.

1. aşama

AdV1 5' GCC SCA RTG GKC WTA CAT GCA CAT 3'

AdV2 5' CAG CAC SCC ICG RAT GTC AAA A 3'

2. aşama

AdV3 5' GCC CGY GCM ACI GAI ACS TAC TTC 3'

AdV4 5' CCY ACR GCC AGI GTR WAI CGM RCY TTGTA 3'

Her iki aşama için de aynı ısı siklusları kullanıldı. Bu primerler kullanılarak termal cykler'da 94 °C'de 3 dakikalık denaturasyon sonrası çoğaltma için 94 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 60 saniyelik 45 siklus sonunda 72 °C'de 5 dakika sonlandırıcı yapıldı. 1. aşama PCR ürünleri 301 bp, 2. aşama PCR ürünleri ise 171 bp'dir (71).

3.7. ÇALIŞMADA KULLANILAN ÇÖZELTİLER VE TAMPON SIVILARI

3.7.1. Elektroforez tamponu (10X TBE – Jel ve tanklar için tampon)

Tris base.....108 g

Borik asit.....55 g

EDTA 0,5 M, pH 8.0.....40 ml

1 litreye DEPC ile tamamlandı.

3.7.2. Etidyum bromür (EB)

10 mg/ml olarak hazırlandı. Distile suda manyetik karıştırıcı ile uzun sürede çözünmesi sağlandı. +4 °C'de ışıktan uzak muhafaza edildi.

3.7.3. Yükleme tamponu (Loading Buffer)

Bromfenol mavisi.....% 0,25

Gliserol.....% 30

Hazırlanan tampon +4 °C'de saklandı.

3.7.4. Jelin hazırlanması ve PCR ürünlerinin görüntülenmesi

Elektroforez tamponu 10 kat sulandırıldı ve 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, Hoefler 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 çekildi (Kodak 1D 3.5).

4. BULGULAR

İncelenen 101 örnekten 7'si (% 6,9) HBoV pozitif olarak saptandı. Yedi pozitif örnekten de 2'sinde (% 28,6) birden fazla virus açısından (HBoV ve *Norovirus*) pozitiflik elde edildi ve miks infeksiyon varlığı düşünüldü. İncelenen HBoV pozitif hastaların hiçbirinde *Rotavirus*, *Astrovirus*, *Adenovirus serotip 40 ve 41* saptanamadı.

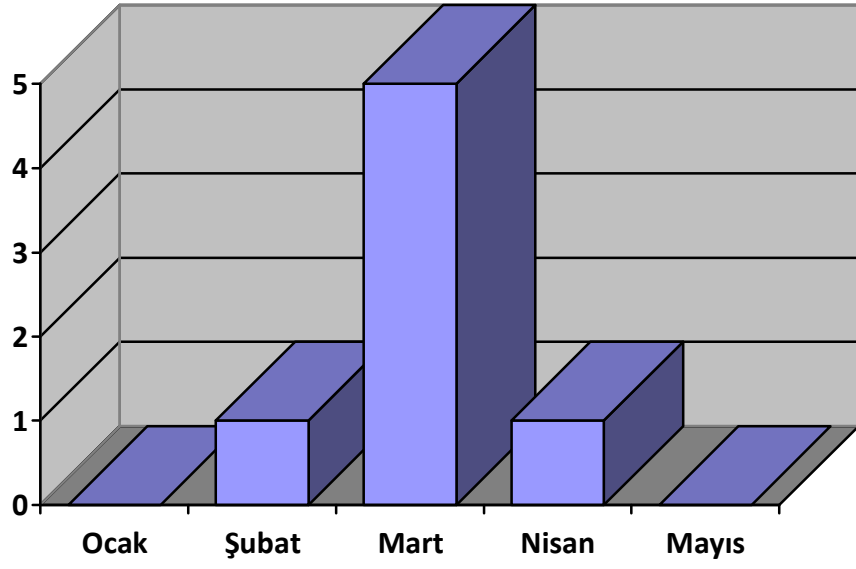
HBoV pozitif hastaların yaş ortalaması 1,5 (1–2,5 yaş) olup % 71,4'ü 2 yaş altındaydı. Erkek çocukların 4'ünde (% 57,1) HBoV pozitif olarak saptandı. İnfeksiyon oranının kız çocuklara (% 42,9) göre daha yüksek olduğu görüldü (Tablo 4.1). 7 hastanın hepsi poliklinik hastasıydı.

HBoV pozitif 7 hastanın aylara göre dağılımı Şubat 1, Mart 5, Nisan ayında 1 idi. Ocak ve Mayıs ayında pozitifliğe rastlanmadı (Şekil 4.1).

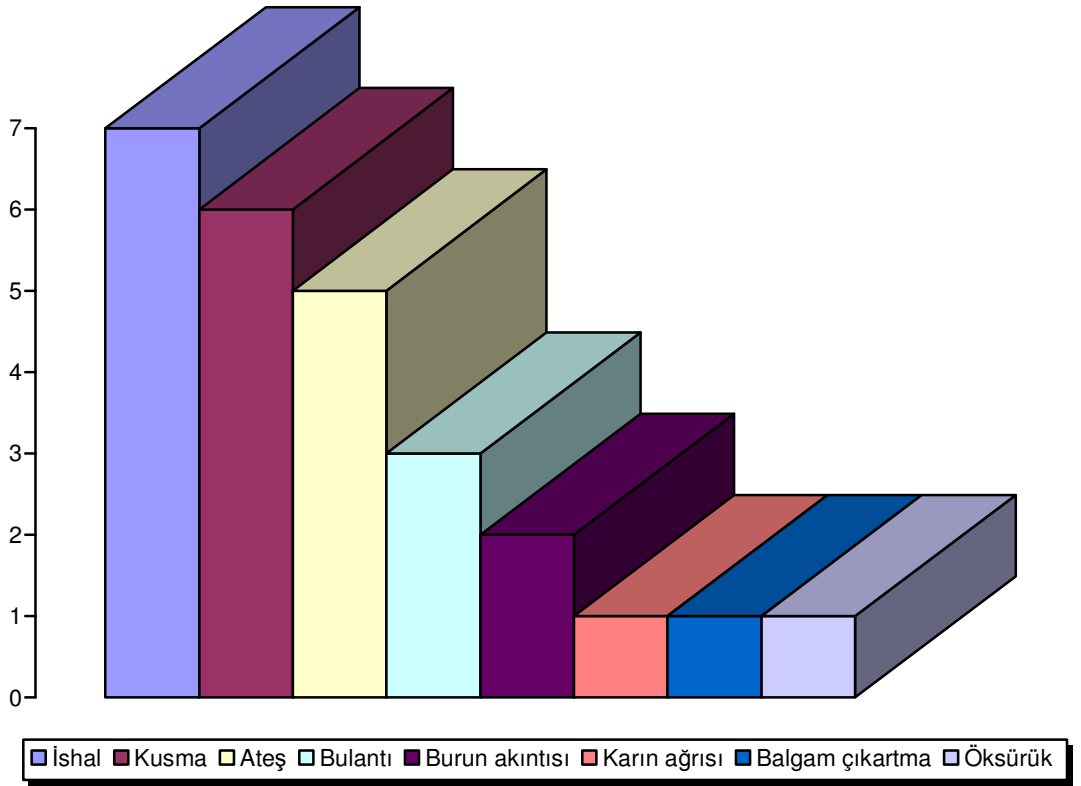
HBoV izole edilen hastalarda en sık gözlenen semptomlar sırasıyla; ishal, kusma, ateş, bulantı, burun akıntısı, karın ağrısı, balgam çıkarma ve öksürük idi (Şekil 4.2, tablo 4.2).

	HBoV pozitif n: 7 (%)	HBoV negatif n: 94 (%)
Cinsiyet (erkek)	4 (57,1)	55 (58,5)
Cinsiyet (kız)	3 (42,9)	39 (41,5)
Yaş ortalaması (min-max)	1,5 (1-2,5)	1,8 (0,16-5)
Yaşların dağılımı		
0-2 yaş	5 (71,4)	67 (71,3)
2-5 yaş	2 (28,6)	27 (28,7)
Süre (gün)	2,7	3,4
Antibiyotik kullanımı	1 (14,3)	16 (17)

Tablo 4.1 Demografik özelliklerine göre 101 hastanın dağılımı



Şekil 4.1 HBoV pozitif hastaların aylara göre dağılımı



Şekil 4.2 HBoV pozitif hastalarda semptomların görülme sıklığı

HBoV pozitif bulduğumuz 7 çocuk hastanın hepsine klinik olarak akut gastroenterit, 1 tanesine ise ek olarak üst solunum yolu infeksiyonu tanısı konmuştur.

	HBoV pozitif n: 7 (%)	HBoV negatif n: 94 (%)
Ateş	5 (71,4)	43 (45,7)
Burun akıntısı	2 (28,6)	27 (28,7)
Boğaz ağrısı	0	4 (4,3)
Öksürük	1 (14,3)	31 (33)
Balgam çıkarma	1 (14,3)	9 (9,6)
Hırıltı	0	11 (11,7)
İshal	7 (100)	94 (100)
Karın ağrısı	1 (14,3)	12 (12,8)
Kusma	6 (85,7)	83 (88,3)
Bulantı	3 (42,9)	21 (22,3)

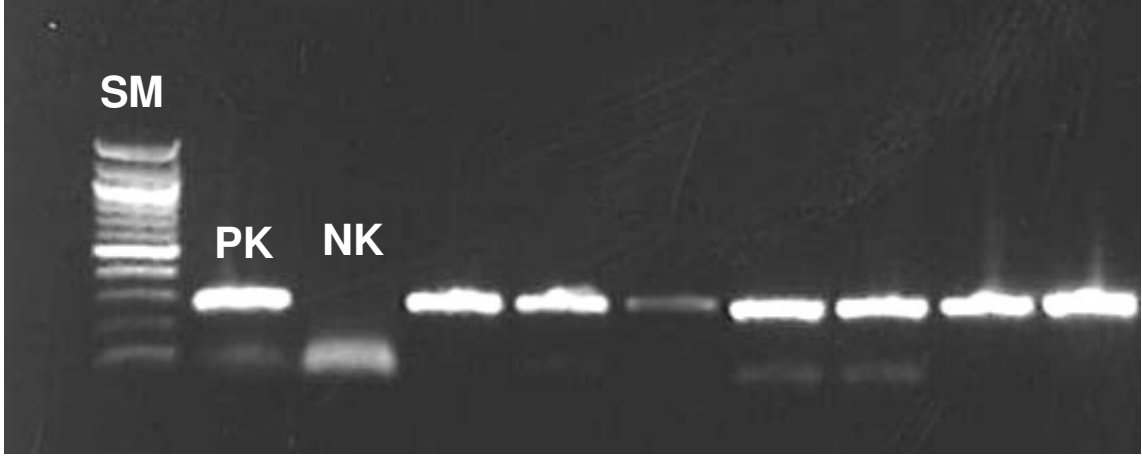
Tablo 4.2 Klinik özelliklerine göre 101 hastanın dağılımı

TARİH	HASTA NO	AD SOYAD	YAŞ	CİNSİYET	TANI	ATEŞ	BURUN AKINTISI	BOĞAZ AĞRISI	ÖKSÜRÜK	BALGAM ÇIKARMA	HIRILTI	İŞHAL	KARIN AĞRISI	KUSMA	BULANTI	ANTİBİYOTİK KULLANIMI	ALTTA YATAN HASTALIK	ÇEVRESİNDE BENZER HASTALIK	KLİNİK SÜRE
24.02.2009	13	B.C.Ç.	2 yaş	E	AGE	var	var					var		var					3. gün
09.03.2009	19	I.Ö.	12 aylık	K	AGE	var						var	var	var	var				3. gün
12.03.2009	24	D.D.	2,5 yaş	K	AGE							var							2. gün
13.03.2009	26	I.O.Ü.	2,5 yaş	K	AGE							var		var	var				1. gün
16.03.2009	36	Y.Ö.	12 aylık	E	AGE, ÜSYE	var			var	var		var		var		var			4. gün
21.03.2009	49	E.İ.	12 aylık	E	AGE	var	var					var		var	var				3. gün
10.04.2009	89	İ.Ö.	12 aylık	E	AGE	var						var		var					3. gün

Tablo 4.3 HBoV pozitif hastalara ait bilgiler

4.1. PCR sonuçları

İncelenen 101 örnekten 7'si (% 6,9) PCR ile HBoV pozitif olarak saptandı. HBoV pozitif hasta örnekleri jel elektroforezinde pozitif ve negatif kontroller ile eşzamanlı yürütüldü. Jel UV transilluminatöründeki fotoğrafı gösterilmiştir (Şekil 4.3).

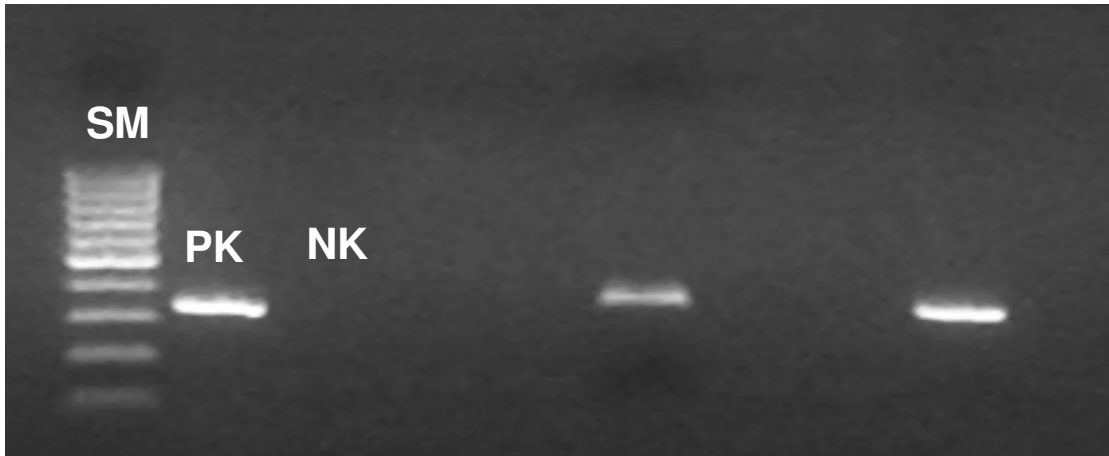


Şekil 4.3 HBoV pozitif hastaların jel elektroforez sonucu

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

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

İki hastada HBoV yanında Norovirus pozitifliği saptandı. Norovirus pozitif hasta örnekleri jel elektroforezinde pozitif ve negatif kontroller ile eşzamanlı yürütüldü ve 330 bp'de gösterildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 HBoV pozitifliği yanında norovirus pozitifliği bulunan hastaların jel elektroforez sonucu

5. TARTIŞMA

Akut gastroenteritler tüm dünyada genellikle çocuklarda görülmekle birlikte erişkinler arasında da en sık görülen infeksiyonlar içinde yer almaktadır. Çocuklarda alt solunum yolu infeksiyonlarından sonra en sık morbidite ve mortalite nedenidir. 5 yaşın altındaki çocuklarda dünyada her yıl bir milyar çocuk ishale yakalanmakta ve yaklaşık altı milyon çocuk ishal nedeni ile kaybedilmektedir.

Tanı, virusların birçoğu için rutin olarak kullanılabilir standart, hızlı, kolay uygulanabilir ve duyarlı yöntemlerin bulunmaması nedeniyle çoğunlukla laboratuvar testlerine değil klinik bulgulara dayandırılmaktadır. Ayrıca akut gastroenterit infeksiyonlarının genellikle kendiliğinden iyileşmesi vak'aların çoğunda etiyojinin aydınlatılmaması sonucunu doğurmaktadır.

Gastroenterit etkeni virusların sıklıkları yaş ile değişmekle birlikte en sık olarak karşılaşılan viruslar; rotavirus, norovirus, enterik adenoviruslar, astrovirus, coronavirus, picabirnavirus, torovirus, enterovirus 22 olarak sıralanmaktadır.

Gastroenterit infeksiyonlarında rutin olarak kullanılan laboratuvar testleri ile etken mikroorganizmaların ancak bir kısmı belirlenebilmektedir. Etkenin saptanamadığı durumlarda moleküler yöntemlerle yeni viruslar araştırılmakta ve bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi de 2005 yılında Allender ve arkadaşları tarafından tanımlanan human bocavirustur (8).

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.

Yakın zamana kadar yapılan prevalans çalışmaları akut solunum yolu hastalığı olan çocuklar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunun nedeni, özellikle akut solunum yolu infeksiyonu semptomları gösteren bir grup çocuktan alınan nazofarengeal aspirat örneklerinde bu virusun varlığının ortaya konulmasıdır. Tüm dünyada solunum yolu hastalarının solunum sekresyonlarından yapılan bu çalışmalara bakıldığında sıklık oranı % 1,5 ile % 19 arasında değişkenlik göstermektedir (6).

Son yapılan çalışmalarda gastrointestinal semptomlar gösteren çocukların dışkı örneklerinde yaygın olarak HBoV pozitifliğinin saptanması, bu virusun gastroenterite yol açtığı fikrinin ortaya atılmasını sağlamıştır. Çalışmaların bir kısmı akut gastroenterit infeksiyonlarında HBoV'un etiyolojik rolü olup olmadığı, bir kısmı akut gastroenterit infeksiyonlu çocuk hastalardaki yaygınlığı, diğer bir kısmı ise sağlıklı bireylerde bulunup bulunmadığı ile ilgilidir. Bunlara ek olarak bazı Kawasaki hastalığı olgularında HBoV'un patojenik rolü ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (48).

Ülkemizden HBoV ile ilgili, Klimik 2007 XII. Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresinde bir çalışma sunulmuştur. Kasım 2005- Şubat 2006 tarihleri arasında yapılan bu çalışmada solunum yolu infeksiyonu şüphesiyle başvuran 5 yaş altı 76 hastanın 5 tanesinde (% 6,5) HBoV pozitif bulunmuştur (72). Bunun dışında "Bahar ve Yaz Mevsimlerinde Görülen Çocukluk Çağı Akut Solunum Yolu İnfeksiyonlarında Bocavirus DNA'sının Saptanması" isimli bir doktora tezi bulunmaktadır. Mart 2007 Ağustos 2007 tarihleri arasında yürütülen çalışmada, akut solunum yolu infeksiyonu tanısı konulan 15 yaş altı 119'u erkek, 84' ü kız toplam 203 hastanın boğaz sürüntü örneği alınarak incelenmiştir. 203 örnekten 11'inde (% 5,4) HBoV pozitif olarak saptanmıştır (73). Araştırdığımız kadarıyla akut gastroenterit olgularında HBoV'la ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Biz yaptığımız bu çalışmada 101 çocuk hastanın 7 tanesinde (% 6,9) HBoV pozitif olarak saptadık. Bu oran dünya verilerininin takribi bir ortalamasını yansıtmaktadır.

Vicente ve arkadaşlarının İspanya'da yaptıkları çalışma sonucu ilk kez akut gastroenteritli çocukların dışkı örneklerinde HBoV pozitifliği bildirilmiştir ve 527 hastada 48 (% 9,1) HBoV saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada, HBoV oranının yüksek bulunması akut gastroenterit olgularında etken olabileceğini düşündürmüştür (74).

Szomor ve arkadaşlarının Macaristan'da 5 yaşın altındaki çocuklarda yaptıkları çalışmada, solunum yolu infeksiyonlu 35 hastadan alınan boğaz sürüntü örnekleri ve akut gastroenterit infeksiyonlu 61 hastadan alınan dışkı örnekleri HBoV yönünden incelenmiştir. Bu çalışmada, solunum yolu infeksiyonlu hastalardan alınan örneklerde HBoV bulunmazken akut gastroenterit infeksiyonlu 2 (% 3,3) hastada virus genomu saptanmıştır. HBoV pozitif hastalar 3 ve 5 yaşında idi (75).

Karalar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Almanya'da infeksiyon semptomları olan ve yaşları 1 ay-190 ay arasında değişen toplam 297 çocuk hasta üç gruba ayrılmıştır. 1. grupta yer alan hastalar solunum yolu infeksiyonu olan 156 kişiden oluşmaktadır. 2. grupta gastrointestinal semptomları olan 64 hasta yer almaktadır. 3. grupta ise solunum yolu infeksiyonu ve gastrointestinal semptomları olmayan, geniş bir infeksiyon aralığı gösteren (menenjit, ensefalit, üriner sistem infeksiyonu vb.) 77 hasta bulunmaktadır. Ayrıca bunların dışında infeksiyon hastalığı olmayan 60 çocuğun yer aldığı küçük bir grup da mevcuttur. Solunum yolu infeksiyonu olan 156 hastanın 15'i (% 9,6), gastroenterit infeksiyonu olan 64 hastanın 5'i (% 7,8) HBoV pozitif bulunmuştur. 3. grupta yer alan 77 hastada ve infeksiyon hastalığı olmayan 60 kişilik grupta HBoV saptanmamıştır (76).

Tozer ve arkadaşlarının Avustralya'da 96 adet solunum, 375 adet dışkı ve 229 adet kan örnekleri olmak üzere 3 grupta yaptıkları çalışmada sırasıyla 17 (% 18), 18 (% 4,8) ve 6 (% 2,6) HBoV pozitifliği bulunmuştur (77).

Chieochansin ve arkadaşlarının Tayland'da 4 ay-4 yaş arası 225 akut gastroenterit hastası ve 2 ay-5 yaş arası kontrol grubu olarak 202 sağlıklı çocukta yaptıkları çalışmaya göre akut gastroenterit olgularında 2 (% 0,9) HBoV pozitifliği bulunmuştur. Sağlıklı çocukların yer aldığı kontrol grubunda pozitiflik saptanmamıştır. Pozitif olarak bulunan 2 hastanın gastrointestinal semptomları mevcut iken solunum yolu hastalığına dair bir semptom görülmemiştir (78).

Campe ve arkadaşlarının Almanya'da gastroenterit salgınlarında HBoV infeksiyonlarının rolünü araştırmaya yönelik yaptıkları çalışmada, 48 bağımsız salgında topladıkları 307 adet dışkı örneğinin 14'ü (% 4,6) HBoV pozitif olarak bulunmuştur. Pozitif örneklerin 13'ü farklı salgınlarda tespit edildiği için HBoV'un gastroenterit salgınlarında etken rol oynamadığı düşünülmüştür (79).

Lau ve arkadaşlarının Hong Kong'ta yaptıkları çalışmada, 18 yaş altı akut gastroenteritli 1435 hastadan aldıkları dışkı örneklerinde 30 (% 2,1) HBoV pozitifliği saptamışlardır (80).

Cheng ve arkadaşlarının Çin'de 397 akut gastroenteritli ve 115 sağlıklı çocukta yaptıkları kontrollü çalışmada, semptomları olan çocuklarda 14 (% 3,5), sağlıklı çocukların yer aldığı kontrol grubunda 4 (% 3,5) HBoV pozitif olarak bulmuşlardır (81).

Nakanishi ve arkadaşları Japonya'da yaptıkları çalışmada, çocuk polikliniğine akut gastroenterit şikayetleri ile başvuran 877 hastadan aldıkları rektal sürüntü örneklerinde 4 HBoV pozitifliği saptanmışlardır (82).

Albuquerque ve arkadaşlarının Brezilya'da 15 yaşın altındaki 705 akut gastroenteritli çocuk üzerinde yaptıkları çalışmada, 14 (% 2) HBoV pozitifliği bulunmuştur (83).

Yu ve arkadaşlarının Çin'de yaptıkları bir çalışmada, akut gastroenterit nedeniyle hastanede yatan ve yaşları 1 ay-5 yaş arasında değişen 1216 çocuk hastanın 67'sinde (% 5,5) HBoV pozitifliği saptanmış ve bu çocukların yaş ortalaması 11 ay olduğu tespit edilmiştir (84).

Bizim çalışmamızda yaşları 4 ay-5 yaş arasında değişen ve akut gastroenterit infeksiyonu nedeniyle çocuk polikliniğine başvuran 101 hastanın 7'sinde (% 6,9) HBoV pozitif bulunmuştur. Yaş ortalaması 1.5 (1-2,5 yaş) olup, % 71,4'ünü 2 yaş altı çocuklar oluşturmaktadır. Dünya verilerinde olduğu gibi bizde de 2 yaş altı ön plana çıkmaktadır.

HBoV infeksiyonlarının kliniği konusundaki veriler hala oldukça sınırlıdır.

Lee ve arkadaşlarının Kore'de 5 yaşın altındaki hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada, akut gastroenterit nedeniyle hastaneye yatırılan 962 hastanın 8'inde (% 0,8) HBoV pozitifliği bulunmuştur. HBoV pozitif 8 hastanın 7-22 ay yaş aralığında olduğu belirlenmiştir ve bu hastaların tamamında ishal bulunurken, 5'inde ateş, 3'ünde kusma, 2'sinde rinore ve öksürük tespit edilmiştir (85).

Lau ve arkadaşlarının çalışmasında, HBoV'un saptandığı 30 akut gastroenteritli çocukta klinik bulguların; kanlı dışkılama (4 hasta), mukuslu dışkılama (2 hasta), kusma (8 hasta), ateş (17 hasta), burun akıntısı (14 hasta), akut bronşiolit (4 hasta) ve pnömoni (3 hasta) olduğu bildirilmiştir (80).

Yu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 67 HBoV pozitif hastanın tamamında ishal tespit edilmiştir. Diğer semptomlar arasında en sık kusma (% 73) ve ateş (% 52) görülmektedir (84).

Cheng ve arkadaşlarının çalışmasında bulunan 14 HBoV pozitif hastanın 7'sinde ateş, 11'inde de kusma belirtileri tespit edilmiştir ve günlük dışkılama sayısı ortalama 6,5 kez olduğu tespit edilmiştir (81).

Bizim çalışmamızda HBoV pozitif bulduğumuz 7 çocuk hastanın tamamına akut gastroenterit infeksiyonu, buna ek olarak bir hastada da ek olarak üst solunum yolu infeksiyonu tanısı konmuştur. HBoV pozitif çocuklarda öne çıkan semptomlar sırasıyla; ishal, kusma, ateş, bulantı, burun akıntısı, karın ağrısı, balgam çıkarma ve öksürük olmuştur. Dünyada bildirilen verilere bakıldığında buna benzer bilgilere rastlanmıştır.

HBoV infeksiyonlarının mevsimsel özelliği konusunda henüz bir görüş birliğine varılmamıştır.

Yu ve arkadaşlarının 2006 Ekim-2007 Temmuz ayları arasını kapsayan çalışmasında HBoV olguları her ay görülmekle birlikte kış aylarında biraz yüksek oranda saptanmıştır (84).

Cheng ve arkadaşlarının Temmuz 2006 ile Eylül 2007 ayları arası yaptıkları bir çalışmada HBoV pozitifliğinin kış aylarında yükseldiği ve 2007 baharında saptanmadığı tespit edilmiştir (81).

Bizim çalışmamız Ocak-Mayıs 2009 ayları arasında yapılmıştır. Toplanan 101 örnekte 7 HBoV tespit ettik ve pozitif 7 hastanın aylara göre dağılımı Şubat 1, Mart 5, Nisan ayında 1 idi. Ocak ve Mayıs ayında pozitifliğe rastlanmadı. Yapılan çalışmalara bakıldığında HBoV infeksiyonunun mevsimsel değişkenlik gösterdiği ve kış aylarında artış olduğu bildirilmiştir. Fakat bu bize düzenli bir mevsimsellik olduğunu göstermemektedir.

Gastroenterit etkeni virusler bir hastada aynı anda infeksiyon oluşturabilirler. Koinfeksiyon olarak tanımlanan bu durum yapılan çalışmalarda HBoV için de gösterilmiştir.

Hamalainen ve arkadaşlarının Finlandiya'da 15 yaşın altındaki 877 akut gastroenteritli hastada yaptıkları çalışmada, 44 (% 5) HBoV pozitifliği bulmuşlardır. HBoV pozitif tespit ettikleri 44 hastanın 33 tanesinde (% 75) koinfeksiyon saptamışlardır. Rotavirus birlikteliği % 36 olarak gözlenirken, % 30 *Norovirus*, % 7 *Rotavirus* ile *Norovirus* ve % 2 oranında *Sapovirus* koinfeksiyonu tespit edilmiştir (86).

Lee arkadaşları HBoV pozitifliği tespit ettikleri 8 hastanın 3'ünde *Rotavirus*, 1'inde *Astrovirus* ve 1'inde de *Norovirus* eşzamanlı olarak bulunmuştur.

Szomor ve arkadaşları Ekim 2007-Mart 2008 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada, 2 *Rotavirus* ve *Adenovirus* birlikte görülmüştür. HBoV pozitif 2 olguda koinfeksiyon saptanmamıştır.

Bizim çalışmamızda 7 pozitif örnekten 2'sinde (% 28,6) birden fazla virus varlığı açısından (HBoV ve *Norovirus*) pozitiflik elde edildi ve eşzamanlı infeksiyon varlığı düşünüldü. İncelenen HBoV pozitif hastaların hiçbirinde *Rotavirus*, *Astrovirus*, *Adenovirus serotip 40 ve 41* saptanamamıştır.

HBoV'un akut gastroenterit infeksiyonlarındaki rolünün tam olarak belirlenebilmesi için daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir. Çalışmamızın ülkemizde bu konuda yapılan ilk araştırma olması açısından, HBoV'un epidemiyolojik çalışmalarına katkısı olduğu kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Bishop WP, Ulshen MH. Bacterial gastroenteritis. *Pediatr Clin North Am.* 1988; 35(1):69-87.
2. Cleary TG, Pickering LK. Acute gastroenteritis, in Krugman S, Katz S, Grshon AA, Wilfert CM. (eds.) *Infections diseases of children.* 9. baskı. St. Louis: 1992;105-126.
3. Guerrant RL, Bobak DA. Bacterial and Protozoal Gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 1991;325(5):327-340.
4. Öztürk R. Akut diyare. Gastrointestinal sistem hastalıkları sempozyumu. İstanbul:2001;27-56.
5. Midilli K. İnfeksiyöz ishal ve besin zehirlenmelerinin etyolojisi ve epidemiyolojisi, in Öztürk R. (eds.) *İshal. İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği Yayın No:13,* İstanbul: 1998;19-35.
6. Allander T. Human bocavirus. *Journal of Clinical Virology* 41. 2008;29-33.
7. <http://www.dpvweb.net/notes/showfamily.php?family=Parvoviridae>
8. 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 USA*:2005;102:12891-12896.
9. Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis* 2007;13:636–637.
10. Arıtürk S. Gastroenteritlerden korunma ve tedavi. 1. Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongre Kitabı. İzmir: 1987; s: 201-209.
11. Ryan KJ. *Medical Microbiology.* 3. baskı. London: Appleton & Lange, 1994; s: 519-524.
12. Snyder JD, Merson MH. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bulletin of the World Health Organization* 1982;60:604-613.
13. Snyder JD, Martines J, de Zoysa I, Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bulletin of the World Health Organization* 1992;70:705-714.

14. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000: Bulletin of the World Health Organization 2003;81:197-204.
15. Salazar-Lindo E, Pinell-Salles P, Maruy A, Chea-Woo E. El Nino and diarrhoea and dehydration in Lima, Peru. Lancet 1997;350:1597.
16. Nolte FS. Practical Consideration in the Laboratory Diagnosis of Bacterial Enteric Infections. Am. J. Clin. Pathol. 1994;101(4 Supp. 1):14-17.
17. Roy CC, Silverman A, Alagille D. Diarrhoeal Disorders. Pediatric Clinical Gastroenterology. 4. baskı. St Louis Mosby: 1995;216-287.
18. Mert A. Erişkinde akut infeksiyöz ishelli hastaya klinik yaklaşım, in Öztürk R. (eds.) İshal. İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği Yayın No:13, İstanbul: 1998;50-92.
19. Roy CC, Silverman A, Alagille D. Diarrhoeal Disorders. Pediatric Clinical Gastroenterology. 4. baskı. St Louis Mosby: 1995;216-287.
20. Yücel A. Sunuş, in Öztürk R. (eds.) İshal. İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği Yayın No:13, İstanbul: 1998.
21. Pickering LK, Synder JD. Infectious Diseases, in Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. (eds.) Nelson Textbook of Pediatrics. 15. baskı. 1996;721.
22. Tek İlaç Sanayii A.Ş. İshal. Bülentek. No:1 İstanbul: 1987;1.
23. Yurdakök M. Dünyada ve Türkiye’de çocuk ishalleri sorunu. Katkı İshal 1. Hacettepe Pediatri Bölümü Başasistanlık Bülteni. Cilt 4, sayı 7-8: 1983;577-714.
24. Reese RE, Hruska JF. Gastrointestinal and Intrabdominal Infections, in Reese RE, Betts RF. (eds.) A Practical Approach to Infectious Diseases 4th edition, Little, Brown and Company, Boston: 1996;380-472.
25. Günseren F. Erişkinde akut infeksiyöz ishaller ve tedavileri. Ankem Dergisi: 2003;17(3)225-228.
26. Öztürk R. Reovirüsler-Calisivirüsler-Enterik Adenovirüsler, in Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M. (eds.) İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul: 2004;1226-1239.
27. Baron EJ, Finegold SM. Bailey and Scott’s Diagnostic Microbiology 8th edition, St. Louis, C.V. Mosby Company, London: 1990.
28. Yurdakök M. İshal. Öztürk Matbaası. İstanbul: 1983;1-121.

29. Aydın A, Çam H, Fıçioğlu C, Mikla Ş. Çocuklarda akut ishaller-1. Sendrom: 1996;8(3)52-58.
30. Butterton JR, Calderwood JE. Acute Infectious Diarrheal Disease and Bacterial Food Poisoning. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. (eds), Harrison's of Internal Medicine, 14th ed, vol:1, McGraw-Hill, New York:1998;796-801.
31. Hamer DH. IDCP guidelines: Infectious Diarrhea (Part 1), Infectious Disease in Clinical Practice: 1997;6:68-82.
32. Hamer DH. IDCP guidelines: Infectious Diarrhea (Part 2) and Food Poisoning. Infectious Disease in Clinical Practice: 1997;6:141-152.
33. Patz JA, Epstein PR, Burke TA, Balbus JM. Global climate change and emerging infectious diseases. JAMA:1996;275:217-223.
34. Çelik FA, Turna H. İshalde patogenez, in Öztürk R. (eds.) İshal. İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği Yayın No:13, İstanbul: 1998;36-49.
35. Lawrence S. Kurt J. Diarrhea and constipation, in Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. (eds.) Principles of Internal Medicine, 14th ed, vol:1, McGraw-Hill, New York:1998;796-801.
36. Newcomer AD. Physiologic and diagnostic approach to diarrheal disease, in Winawer SJ, Almy TP. (eds.) Management of Gastrointestinal Disease, Gower Medical, New York:1992;12.1-12.18.
37. Kenneth DF. Diarrhea, in Feldman M, Sleisenger MH, Scharschmidt BF. (eds.) Gastrointestinal and Liver Disease, 6th ed, Saunders, Philadelphia:1998;128-152.
38. Avunduk C, Eastwood GL. Diarrhea in Manuel Gastroentrology. Little Brown, Boston:1995;148-158.
39. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi Ltd. Şti. Ankara:1999;783-791.
40. McIntosh K. Human Bocavirus: Developing Evidence for Pathogenicity. J Infect Dis Boston:2006;194:1197-1199.
41. Schwartz D, Green B, Carmichael LE, Parrish CR. Virology. 2002;302:219-223.

42. Chen KC, Shull BC, Moses EA, Lederman M, Stout ER, Bates RC. *J Virol* 1986;60:1085-1097.
43. Lu X, Chittaganpitch M, Olsen SJ, Mackay IM, Sloots TP, Fry AM, Erdman DD. Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens. *J Clin Microbiol* 2006;44:3231-3235.
44. Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, Vuorinen T, Waris M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, van den Hoogen BG, Hyypia T, Ruuskanen O. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007;44:904-910.
45. Kleines M, Scheithauer S, Rackowitz A, Ritter K, Hausler M. High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol. *J Clin Microbiol* 2007;45:1032–1034.
46. Neske F, Blessing K, Tollmann F, Schubert J, Rethwilm A, Kreth HW, Weissbrich B. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol* 2007;45:2116–2122.
47. 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.
48. Catalano-Pons C, Giraud C, Rozenberg F, Meritet JF, Lebon P, Gendrel D. Detection of Human Bocavirus in Children With Kawasaki Disease. *CMI* 2007;13:1199-1222.
49. Hamza IA, Jurzik L, Wilhelm M, Überla K. Detection and quantification of human bocavirus in river water. *Journal of General Virology* 2009;90:2634-2637.
50. Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol* 2006;78:1232-1240.
51. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin Infect Dis* 2006;43:283–288.

52. Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, Eun BW, Kim NH, Lee JA, Lee JH, Song EK, Kim SH, Park JY, Sung JY. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children 2000–2005. *Clin Infect Dis* 2006;43:585–592.
53. Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 2006;194: 1276–1282.
54. 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.
55. Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallam N, Templeton K, Simmonds P. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis* 2006;194:1283–1290.
56. Smuts H, Hardie D. Human bocavirus in hospitalized children. *South Africa Emerg Infect Dis* 2006;12:1457–1458.
57. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human Bocavirus infection. *Canada Emerg Infect Dis* 2006;12:848–850.
58. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, Anderson LJ, Erdman D, Olsen SJ. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis* 2007;195:1038–1045.
59. Naghipour M, Cuevas LE, Bakhshinejad T, Dove W, Hart CA. Human bocavirus in Iranian children with acute respiratory infections. *J Med Virol* 2007;79:539–543.
60. Qu XW, Duan ZJ, Qi ZY, Xie ZP, Gao HC, Liu WP, Huang CP, Peng FW, Zheng LS, Hou YD. Human bocavirus infection People's Republic of China. *Emerg Infect Dis* 2007;13:165-168.
61. 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.
62. Foulongne V, Olejnik Y, Perez V, Elaerts S, Rodiere M, Segondy M. Human bocavirus in French children. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1251–1253.

63. Bastien N, Chui N, Robinson JL, Lee BE, Dust K, Hart L, Li Y. Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study. *J Clin Microbiol* 2007;45:610–613.
64. Durham PJ, Lax A, Johnson RH. Pathological and virological studies of experimental parvoviral enteritis in calves. *Res Vet Sci* 1985;38:209–219.
65. Carmichael LE, Schlafer DH, Hashimoto A. Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J Vet Diagn Invest* 1994;6:165–174.
66. Reisinger EC, Fritzsche C, Krause R, Krejs GJ. Diarrhea caused by primarily non gastrointestinal infections. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:216–222.
67. Gouvea V, Glass R I, Woods P, Taniguchi K, Clark H F, Forrester B, Fang Z. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1990;28:276–282.
68. Maunula L, Bonsdorff CH. Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotavirus. Analysis of finnish rotavirus strains. *J Clin Virol.* 2002;76:11793-11800.
69. Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch Virol.* 1997;142:1323-1334.
70. Schreier E, Döring F, Künkel U. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Arch Virol.* 2000;145:443-453.
71. Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):498-505.
72. 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.* 2007; 20: 298.

73. Çelebi E. Bahar ve Yaz Mevsimlerinde Görülen Çocukluk Çağı Akut Solunum Yolu İnfeksiyonlarında Bocavirus DNA'sının Saptanması. Uzmanlık tezi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. 2007.
74. Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis* 2007;13:636-637.
75. Szomor KN, Kapusinszky B, Rigo Z, Kis Z, Rozsa M, Farkas A, Szilagyi A, Berencsi G, Takacs M. Detection of Human bocavirus from fecal samples of Hungarian children with acute gastroenteritis. *Intervirology* 2009;52:17-21.
76. Karalar L, Lindner J, Schimanski S, Kertai M, Segerer H, Modrow S. Prevalence and clinical aspects of human bocavirus infection in children. *Clin Microbiol Infect* 2009; DOI:10.1111/j.1469-0691.02889.x.
77. Tozer SJ, Lambert SB, Whiley DM, Bialasiewicz S, Lyon MJ, Nissen MD, Sloots TP. Detection of Human Bocavirus in Respiratory, Fecal, and Blood Samples by Real-Time PCR. *J Med Virol*. 2009;81:488-493.
78. Chieochansin T, Thongmee C, Vimolket L, Theamboonlers A, Poovorawan. Human bocavirus infection in children with acute gastroenteritis and healthy controls. *Jpn J Dis*. 2008;61:479-481.
79. Campe H, Hartberger C, Sing A. Role of Human Bocavirus infections in outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Clinical Virology*. 2008;43:340–342.
80. Lau SKP, Yip CCY, Que TI, Lee RA, Au-Yeung RKH, Zhou B, So L, Lau Y, Chan K, Woo PCY, Yuen K. Clinical and Molecular Epidemiology of Human Bocavirus in Respiratory and Fecal Samples from Children in Hong Kong. *JID* 2007;196:986-993.
81. Cheng W, Jin Y, Duan Z, Xu Z, Qi H, Zhang Q, Yu J, Zhu L, Jin M, Liu N, Cui S, Li H, Fang Z. Human bocavirus in children hospitalized for acute gastroenteritis: A case-control study. *CID* 2008;47:161-167.
82. Nakanishi K, Tsugawa T, Honma S, Nakata S, Tatsumi M, Yoto Y, Tsutsumi H. Detection of enteric viruses in rectal swabs from children with acute gastroenteritis attending the pediatric outpatient clinics in Sapporo, Japan. *Journal of Clinical Virology* 2009;46:94–97.

83. Albuquerque MCM, Rocha LN, Benati FJ, Soares CC, Maranhao AG, Ramirez ML Erdman D, Santos N. Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 2007;13:11:1756-1758.
84. Yu J, Li D, Xu Z, Cheng W, Zhang Q, Li H, Cui S, Jin M, Yang S, Fang Z, Duan Z. Human bocavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in China. *Journal of Clinical Virology*. 2008;42:280–285.
85. Lee JI, Chung JY, Han TH, Song MO, Hwang ES. Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J Infect Dis* 2007;196:994-997.
86. Hamalainen M, Rasanen S, Halkosala A, Salminen M, Vesikari T. Human bocavirus and acute gastroenteritis in children. 12th ESCV, *Journal of Clinical Virology* 2009;46:38.



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı : 16796
Konu :

İstanbul / /

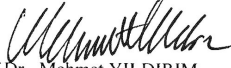
08 Haziran 2009

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

İLGİ: 28.04.2009 tarihli, 48 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.ARİF KAYGUSUZ'un danışmanlığında Biyolog SERHAT SİREKBASAN'ın yürütücülüğünde "Akut Gastroenteritli Çocuklarda Human Bocavirus DNA'sının Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 02 Haziran 2009 tarihinde toplanan Fakültemiz Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir. Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

EKİ:
1 dosya


Prof.Dr. Mehmet YILDIRIM
Dekan Yardımcısı ve Etik
Kurul Başkanı

Not: Yanıtlarda yazımın gün sayısının belirtilmesi rica olunur.Tel(0212)4143000

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SERHAT	Soyadı	SİREKBASAN
Doğ.Yeri	BAKIRKÖY	Doğ.Tar.	04.07.1985
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	14048526910
Email	serhat_tahres@hotmail.com	Tel	0554 359 6140

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Sağmalcılar Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Orta	Orta	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	81.043	82.990	85.405

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows 98,2000,XP, Vista	İyi
Microsoft Office 2003-2008 (Word, Excel, Outlook, PowerPoint)	İyi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

1. Köksal F, **Sirekbasan S**, Ak K, Küçükbasmacı Ö, Samastı M. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Oluşturan Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae Kökenlerinin Prevalansı ve Antimikrobiyal Direnç Patternleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2009;39:31-35.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. **Sirekbasan S**, Caferoglu L, Gonullu N, Kucukbasmaci O, Samasti M, Torun MM. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Bakteriler ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları. XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı. İstanbul:2008;611-612.
2. Polat E, Yıldırım Z, **Sirekbasan S**, Bağdatlı Y, Çepni İ, Balcan E, Baltalı ND. İstanbul'da Hayat Kadınları ile Hastanemiz Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği Hastalarında Trichomonas vaginalis Görülme Oranının 10 Yıl Önceki Oranla Kıyaslanması. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kongre Kitabı. Adana:2009;331.
3. Polat E, **Sirekbasan S**, Yıldırım Z, Bağdatlı Y, Çepni İ, Balcan E, Baltalı ND. İstanbul'da Hayat Kadınları ile Hastanemiz Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği Hastalarındaki Vaginal Kandidiazın Görülme Oranının 10 Yıl Önceki Oranla Kıyaslanması. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kongre Kitabı. Adana:2009;240.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Doğa sporları, müzik, sinema, kitap, seyahat