

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

**BÖLGEMİZDE AKUT GASTROENTERİTLİ ÇOCUKLARDA
ROTAVİRUS İNFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER
EPİDEMİYOLOJİSİ**

Esin TORUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Fügen YARKIN

ADANA- 2009

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

**BÖLGEMİZDE AKUT GASTROENTERİTLİ ÇOCUKLARDA
ROTAVİRUS İNFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER
EPİDEMİYOLOJİSİ**

Esin TORUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Fügen YARKIN

TEZ No: TF2008YL5

ADANA-2009

TEŞEKKÜR

Tezimin konusunun seçilmesinde ve hazırlanmasında bana yol gösteren ve her türlü desteği veren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fügen YARKIN'a, ayrıca hocam Sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Pediatrik Enfeksiyon Bilim Dalı, Çocuk Acil Tıp Birimi ve Adana Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinin Çocuk Servisindeki doktorlara teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma	4
2.3. Virusun yapısı	7
2.3.1 Rotavirusun yapısal proteinleri	9
2.3.2 Rotavirusun yapısal olmayan proteinleri	11
2.4. Replikasyon	12
2.5. Patogenez	14
2.5.1. Enterosit harabiyetine bağlı olarak gelişen malabsorbsiyon	14
2.5.2. Rotavirus enterotoksini	15
2.5.3. Enterik sinir sisteminin uyarılması ve diğer sekretuvar faktörler	17
2.5.4. Barsak motilitesi	18
2.6. İmmunoloji	18
2.7. Bulaşma	21
2.8. Hastalık belirtileri	22
2.9. Epidemiyoloji	23
2.10. Tanı	27
2.11. Tedavi	30
2.11.1. Beslenme	31
2.11.2. Antiemetikler	32
2.11.3. Diare tedavisi için kullanılan konvansiyonel antidiarel ilaçlar	32
2.12. Rotavirus hastalığının ekonomik yükü	33
2.13. Korunma	33
2.13.1. Pentavalan Human-Bovine Rotavirus Aşısı	35
2.13.2. Monovalan Human Rotavirus Aşısı	36
3.GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Rotavirus antijen ELISA Testinin yapılışı	39
3.2. Rotavirus RNA'nın RT-PCR ile araştırılması	42
3.3. Dışkı örneklerinden RNA'nın ekstraksiyonu	42
3.4. Rotavirus VP7 ve VP4 genomunun tespiti için	
iki aşamalı RT-PCR testi	43
3.4.1. Rotavirus G genotiplemesi için RT-PCR testi	43
3.4.1.1. G genotiplemesi için multipleks seminested PCR testi	44
3.4.2. Rotavirusun P genotiplemesi için RT-PCR testi	45
3.4.2.1. P genotiplemesi için multipleks seminested PCR testi	46
3.5. Agaroz jel elektroforezi	47
4. BULGULAR	49

5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	68
7. KAYNAKLAR	70
8. ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Rotavirusun 11 genomik segmentinin poliakrilamid jel elektroforezindeki görünümü	9
Şekil 2.2. Rotavirusun yapısı	10
Şekil 3.1. ELISA mikropıağı	41
Şekil 3.2. Spektrofotometre	41
Şekil 3.3. ELISA yıkama cihazı	41
Şekil 3.4. Rotavirusun VP7 bölgesine ait 1062 bp uzunluğundaki genom bölgesi	44
Şekil 3.5. Rotavirusun VP4 bölgesine ait 876 bp uzunluğundaki genom bölgesi	45
Şekil 3.6. Rotavirus G tiplerinin görünümü	53
Şekil 3.7. Rotavirus P tiplerinin görünümü	53

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. Grup A rotaviruslarının yapısal ve yapısal olmayan proteinlerinin yeri ve fonksiyonu	12
Tablo 4.1. Akut gastroenteriti sahip beş yaş altı çocukların yaş gruplarına göre dağılımı	49
Tablo 4.2. Rotavirus enfeksiyonu olan akut gastroenteritli çocukların yaş gruplarına göre prevalansı	50
Tablo 4.3. Rotavirus enfeksiyonlarının aylara göre dağılımı	51
Tablo 4.4. Rotavirus enfeksiyonunun klinik belirtileri	52
Tablo 4.5. Bölgemizde 5 yaş altı akut gastroenteriti olan 41çocukta grup A rotavirusların G/P genotiplerinin dağılımı	54
Tablo 4.6. Rotavirus enfeksiyonu olan 41 vakada G ve P genotiplerin dağılımı	55
Tablo 4.7. Rotavirus enfeksiyonu olan 41 vakada G/P genotiplerinin dağılımı	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa:	amino asit
Bp:	base pair
ELISA:	Enzyme-Linked İmmunsorbent Assay
ELISPOT:	Enzyme-Linked İmmunosorbent Spot
EM:	Elektron mikroskobi
ENS:	Enterik Sinir Sistemi
HT :	Hidroksi triptamin
IFA:	İmmunoflorasan
IFN:	İnterferon
IL:	İnterlökin
mAb:	Monoklonal antikor
ORS:	Oral Rehidrasyon Solüsyonu
PCR:	Polymerase Chain Reaction
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RPHA:	Revers Pasiv Hemaglutinasyon Assay
SG I:	Subgrup I
SG II:	Subgrup II
SGI:	Genogroup I
SGII:	Genogroup II
TLP:	Triple-Layered Particle

ÖZET

Bölgemizde akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus infeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisi

Rotavirus bütün dünyada yeni doğan ve küçük çocuklarda akut gastroenteritin major etkeni olup çocuk ölümlerinin en önemli sebebidir. Bölgemizde akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus infeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisini araştırmak amacıyla 2008 yılında 5 yaş altı akut gastroenteriti olan 188 çocuktan dışkı örnekleri toplandı. Dışkı örnekleri Grup A rotavirus antijen tespiti için ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) testi ile analiz edildi. RT-PCR (Reverse-transcription-polymerase chain reaction) ve multipleks semi-nested PCR testi ile rotavirus G ve P genotipleme yapıldı. Toplam 188 hastanın 41'inde (%21.8) rotavirus antijeni pozitif bulundu. En baskın rotavirus genotipi G1P[4] %26.8 oranında olup bunu G4P[4] %17, G9/P[4] %7.4 ve G1P[6] ve G1P[10] genotiplerinin herbiri %2.4 oranlarında izledi. Rotavirus diarezi olan çocuklarda miks infeksiyonların görülme oranı %36.6 olarak tespit edildi. G1 genotipi (%70.7) en çok görülen G genotipi olup ardından G4 (%19.5) ve G9 (%17) bulundu. En yaygın P genotipi %85.3 oranla P[4] olup P[10] %29.2, P[8] %12.2, P[11] %7.4 ve P[6] %4.9 oranlarında tespit edildi. Bölgemizde akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus G ve P genotiplerinin dağılımının belirlenmesi rotavirusa karşı aşı geliştirme stratejilerinin oluşturulmasına katkıda bulunacaktır.

Anahtar sözcükler: Rotavirus, Gastroenterit, Genotip, RT-PCR, Moleküler epidemiyoloji

ABSTRACT

Molecular epidemiology of rotavirus infections in children with acute gastroenteritis in our region.

Rotavirus is the major cause of acute gastroenteritis in infants and young children worldwide and is the important agent of child deaths. To investigate the molecular epidemiology of rotavirus infections in children with acute gastroenteritis in our region, 188 stool samples were obtained from children under 5 years old with acute gastroenteritis during the year 2008. Stool samples were analyzed by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) for group A rotavirus antigen. RT-PCR (reverse-transcription-polymerase chain reaction) multiplex semi-nested PCR were used for rotavirus G and P genotyping. From a total of 188 stool samples, 41 (21.8%) were found to be positive for rotavirus antigen. The most prevalent rotavirus genotype was G1P[4] with the rate of 26.8%, followed by G4P[4] 17%, G9/P[4] 7.4%, G1P[6] and G1P[10] genotypes with 2.4% rate of each. The prevalence of mixed infections was 36.6%. The predominant G genotype was G1 (70.7%), followed by G4 (19.5%) and G9 (17%). The most common P genotype was P[4] (85.3%), followed by P[10] (29.2%), P[8] (12.1%), P[11] (7.4%) and P[6] (4.9%). The detection of distribution of rotavirus G and P genotypes among children with acute gastroenteritis in our region will contribute to the development of rotavirus vaccine strategies.

Key Words: Rotavirus, Gastroenteritis, Genotype, RT-PCR, Molecular epidemiology

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Rotavirus bütün dünyada yeni doğan ve küçük çocuklarda görülen gastroenteritlerin en yaygın ve önemli sebeplerinden biridir. Her yıl yaklaşık 2 milyon çocuk gastroenterit sebebiyle kaybedilmektedir ve bu ölümlerin 600.000 kadarı rotavirus gastroenteritine bağlıdır¹.

Çocuklarda rotavirus enfeksiyonunun klinik spektrumu asemptomatik enfeksiyondan ölüme sebep olan dehidratasyonla seyreden ciddi diareye kadar değişir. Rotavirus enfeksiyonunda ciddi diare sıklığı diğer etkenler ile olan gastroenteritlerdekine göre daha fazladır. Rotavirus 5 yaşın altında özellikle 6- 24 ay arası çocuklarda en yüksek insidansla görülür².

İnsanda sadece grup A, B ve C rotavirus enfeksiyonları görülür. En yaygın görülen grup A rotavirus enfeksiyonları ciddi infantil gastroenteritlerinin %21-65'ine sebep olur. İnsan grup A rotavirus suşları arasında en az 10 G genotipi (G1-G6, G8-G10, G12) ve 9 P genotipi (P[3], P[4] ve P[8] gibi) bulunur. Dünyadaki epidemiyolojik çalışmalarda G1, G2, G3, G4 ve G9 tiplerinin bütün rotavirus suşlarının % 90'dan fazlasını oluşturduğu gösterilmiştir³.

Beş yaş altı çocuklarda akut ciddi gastroenteritin başlıca sebebi olan rotavirus enfeksiyonları hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde benzer insidansla görülür. Ancak sonuçları farklıdır. Gelişmiş ülkelerde mortalite düşük olmasına rağmen morbidite oranı yüksektir ve hospitalizasyon oranları da %20-60 gibi oldukça yüksek olup gelişmekte olan ülkelere benzer bulunmuştur. Rotavirus enfeksiyon oranlarının benzer olması kişisel ve toplumsal hijyenin iyileştirilmesi ve sanitasyon uygulamalarının rotavirus enfeksiyonunu önlemede çok etkili olmadığını göstermektedir. Bu sebeple rotavirus enfeksiyonuna karşı başlıca korunma yöntemi aşılama değildir. Günümüzde insan rotavirusuna karşı P1A[8]G1 tipinden oluşan monovalan ve G1, G2, G3, G4 ve P1A[8]'den oluşan pentavalan 2 tip oral canlı atenué rotavirus aşısının kullanımı ülkemiz dahil çok sayıda ülkede onaylanmıştır. Her iki aşının koruyucu etkinliği ciddi diareye karşı %85-98 arasındadır⁴.

Rotavirus aşısından beklenen; ciddi rotavirus hastalığından koruması, hastaneye yatışları ve ekonomik kayıpları azaltması ve ölümleri en aza indirmesidir. Rotavirus aşısı ABD, Venezuela, Brezilya, Meksika ve Avusturya gibi ülkelere çocukluk çağı aşı takvimine girmiştir. Buna karşılık Avrupa ve birçok ülkede rotavirus aşısı lisans almasına rağmen ulusal aşılama programına henüz konulmamıştır ve rotavirus aşısının immunizasyon programına

konulmasından önce çocuklarda görülen gastroenteritlerde rotavirus infeksiyonlarının önemini ortaya koyan epidemiyolojik çalışmalar devam etmektedir⁵.

Grup A rotaviruslarının G ve P genotiplenmesi, rotavirus aşısı yapımından önce prevalan suşların tespiti ve aşılama programları sonrası aktif sürveyans çalışmaları ile genotipik değişimlerin izlenmesinde önem taşır. Buna ilaveten rotavirus aşısının rutin uygulamaya girişinden önce her ülke için rotavirus morbidite ve mortalite oranları, rotavirus gastroenterit prevalansı, yaş spesifik insidans ve hospitalizasyon oranlarının analiz edilmesi gerekir^{4, 5}.

Bu çalışmanın amacı bölgemizde akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus infeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisini araştırmak ve ileride yapılacak aşılama ve sürveyans çalışmalarına ışık tutmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Gastroenteritler tüm dünyada özellikle yeni doğan ve küçük çocuklarda önemli bir sağlık sorunu olmasına rağmen 1970'li yıllarda diareye sebep olan bakteriyel, viral veya parazitik ajanlar üzerine yapılan çalışmaların önemi tam anlaşılamamış ve özellikle virologlar için ödüllendirilmeme düş kırıklığı yaratmıştır. Hücre kültürü teknolojisinin gelişmesi ile 1950 ve 1960'lı yıllarda enterik viruslar keşfedilmesine rağmen infeksiyöz diarenin sebebi bulunamasa da 1940'lardan beri etyolojisi açıklanamayan vakalarda gastroenteritin sebebi olarak viruslardan şüphelenilmiştir⁶.

Gastroenterit etkeni olarak virusların önemi 1972 yılında Kapikian ve arkadaşlarının bir gastroenterit salgınına ait dışkı örneklerinde Norwalk virusu keşfetmesiyle başlamıştır. Bu gelişmeyi takiben 1973 yılında Bishop ve arkadaşları yeni doğan ve küçük çocuklarda ciddi diare ile ilişkili 70 nm büyüklüğünde human rotavirusu keşfetmiştir. Bu müşkülpesent ajanlar hücre kültürü teknolojisinin yardımı olmadan sadece elektron mikroskopisi (EM) kullanılarak identifiye edilmiştir. Human Norwalk virusları hala hücre kültüründe üretilmemektedir. Rotavirus dışkıda Flewett ve arkadaşları, Bishop ve arkadaşları ve diğerleri tarafından EM yöntemi ile tespit edilmiştir⁷. Noroviruslar büyük çocuklar ve erişkinlerde epidemik gastroenteritlerin en önemli sebebidir, fakat yeni doğan ve küçük çocuklarda ciddi gastroenteritlerden sorumlu olan rotavirustan sonra ikinci sırada gelir. Rotavirus yeni doğan ve küçük çocuklarda görülen diarenin en önemli etyolojik ajanıdır ve yaşamın ilk iki yılı boyunca ortalama %35-%50 oranında hastaneye yatışlara sebep olmaktadır⁸.

Rotavirus 1973 yılında bulunmasına rağmen, 1963 yılında Adams ve Kraft EM yöntemini kullanarak diare salgınında infekte olmuş farelerin barsak dokularında virus benzeri partikülleri tanımlamıştır. Bu partiküller Bishop ve arkadaşlarının çocukların dışkı örneklerinde gözlemledikleri partiküllerle benzer bulunmuştur. Ayrıca Malherbe ve Harwin 1963 yılında SA11 (Simian agent 11) olarak adlandırılan 70 nm büyüklüğündeki virusun izolasyonunu tanımlanmıştır. Bu virus, sağlıklı bir maymunun rektal sürüntüsünden elde edilmiş monkey kidney hücre kültüründe üretilmiştir. Mebus ve arkadaşları 1969 yılında diareli bir buzağının dışkısında 70 nm olan virus partiküllerinin bulunduğunu göstermiştir. Mebus ve arkadaşları 1971 yılında ilk olarak fetal bovin hücre kültüründe Nebraska buzağı diare virusun (NCDV; Nebraska calf diarrhea virus) kültürünü başarılı bir şekilde

gerçekleştirmiştir. Flewett ve arkadaşları 1974 yılında teker gibi görünüşünden dolayı virusa “rotavirus” ismini vermiştir. Daha sonra fare, sıçan, maymun ve sığır türlerinde ki rotavirusların morfolojilerinin benzer ve diğer rotaviruslar ile bir grup antijenlerinin de benzer olduğu gösterildi. İlerleyen yıllarda daha kolay ve uygun tanısal tekniklerin gelişmesi ile çocukluk çağı ishalinin en yaygın sebebi olarak bilinen rotavirus hakkında önemli bilgiler kaydedilmiştir⁹.

2.2. Sınıflandırma

Rotavirus Reoviridae familyasının Rotavirus genusu üyesidir. Reoviridae familyası Orthoreovirus, Orbivirus, Coltivirus, Aquareovirus, Cypovirus, Fijivirus, Phytoreovirus, Oryzavirus, Seadornavirus, Idnoreovirus ve Mycoreovirus genuslarını da içermektedir¹⁰. Rotaviridae familyasının üyeleri ortak morfolojik ve biyokimyasal özellikleri paylaşırlar. Rotavirus zarfsız, 70 nm çapında, kapsidi ikosahedral, segmentli çift sarmallı bir RNA virusudur. Elektronmikroskopi ile incelendiğinde tekerleğe benzer görünümünden dolayı Latince tekerlek anlamına gelen “rota” ismi verilmiştir. Rotavirus 11 segmentli, çift zincirli RNA genomu ve 3 tabakalı partikülden (triple-layered particle; TLP) oluşur. Bu tabakalar, dış kapsid, iç kapsid ve kordur. İç kapsid VP6 proteininden oluşur ve koru çevreler. Virusun en önemli immunojenik proteinidir³.

Rotavirus kapsid proteinin antijenik özelliğine göre serolojik olarak grup, subgrup ve serotiplere sınıflandırılır. Rotaviruslar her bir grup içinde serogrupların ve serotiplerin belirlenmesi için serolojik olarak sınıflandırılır. Rotavirusların enzyme-linked immunsorbent assay (ELISA), immunoflorasan (IFA) gibi serolojik metodlarla kros reaksiyon gösteren antijenleri belirlenebilir. Rotaviruslar VP6 proteinindeki farklılıklara göre A’dan G’ye (A, B, C, D, E, F, G) kadar adlandırılan 7 gruba ayrılır¹¹.

Rotavirus grup A, B ve C hem insanlarda hem de hayvanlarda bulunurken rotavirus grup D, E, F ve G yalnızca hayvanlarda bulunur. Grup A, B ve C rotavirusları %20-60 arasında değişiklik gösteren amino asit homolojisine sahiptir. Grup A rotavirusuna karşı hazırlanmış hiperimmun serum grup B veya C rotavirusu ile tepki göstermez. Birkaç nongrup A rotavirus suşları; domuzlarda görülen grup B ve C ve insan grup C rotavirusu hücre kültüründe başarılı bir şekilde üretilebilir. Pek çok nongrup A rotavirusların üretilmemesi ise bu viruslar hakkında yeterli bilgi edinmemizi engellemektedir. Grup A rotavirusları yine VP6’da bulunan farklı epitoplara ile subgruplara (SG) ayrılabilir. Bu farklı subgruplar SG I, SG II, SG I + II veya SG non-I, non-II iki monoklonal antikorlar ile reaktivitesine göre

birbirinden ayırt edilmektedir. Son zamanlarda moleküler karakterizasyon bazında insan grup A rotavirüsleri arasında (genogroup I: SGI; genogroup II: SGII, SGI + II, ve SG non-I, non-II) yalnızca iki grup ayırt edilir. İnsan rotavirüs suşlarının çoğu subgrup I ve II'ye aittir. Grup A subgrup II, subgrup I'e göre daha sık görülür¹².

Rotavirüs genomunun segmentleri tek bir hücrede 2 farklı rotavirüs suşunun ko-infeksiyonu ile "reassortment" oluşmasına izin verir. Bu özelliği G ve P proteinlerinin pek çok kombinasyonlarının (teorik olarak 211 farklı kombinasyon) oluşmasına aracılık eder. Böylece genotip çeşitliliği meydana gelir. Ancak pratikte G ve P kombinasyonlarının sayısı teorik olarak mümkün olan reassortant sayısından daha azdır. Her bir rotavirüs grubu genetik reassortment yeteneğine sahiptir, fakat reassortment farklı gruplar arasında ortaya çıkmaz. Grup antijenik determinantlar veya ortak antijenler daha çok yapısal proteinlerde görülürken yapısal olmayan proteinlerde de görülebilir¹.

Grup A rotavirüsleri özellikle yeni doğan ve küçük çocuklarda, ayrıca çeşitli memeli ve kuş türlerinde ciddi diare hastalığının en önemli sebebidir. Grup B rotavirüsleri yetişkinlerde görülen ciddi epidemik salgınlara sebep olur. İlk olarak Çin'de yetişkinlerde görülmüştür. Grup C rotavirüsleri çocuklarda sporadik diare vakalarıyla ilişkilidir ve nadiren aile içi salgınlara sebep olduğu gösterilmiştir. Grup A rotavirüsleri jel elektroforezisinde 11 RNA segmentinin mobilitesine göre iki farklı elektroferotip paterni gösterir. Hızlı göç edenler uzun (long) elektroferotip ve yavaş göç edenler kısa (short) elektroferotip olarak adlandırılır. Grup A rotavirüs G1, G3 ve G4 serotipleri genellikle tipik olarak subgrup II ve uzun elektroferotip, G2 ise subgrup I ve kısa elektroferotip profili gösterir¹³.

Monoklonal antikorlar kullanılarak yapılan nötralizasyon testi ile rotavirüsler her bir grup içinde serotiplere sınıflandırılır. Hücreye bağlanma ve girişten sorumlu olan serotip spesifik antijenler iki dış kapsid proteini olan VP4 ve VP7 dir. VP7, bir glikoproteindir ve VP7 ile G serotipleri (G; glikoprotein) belirlenir. Virüsün yüzeyindeki "spike" proteini olan VP4 proteazı parçalayan P tip antijenini belirleyen bir proteindir. Nötralizasyon testi ile iki dış kapsid nötralizan antijenleri olan VP4 ve VP7'ye karşı antikorların reaktivitesi ölçülebilir. Hem VP4 hem de VP7 tip spesifik koruyucu nötralizan antikor oluşumunu uyarır. Rotavirüslerin sınıflandırılmasında VP4 ve VP7 tipleri ikili sistem olarak kullanılır¹⁴.

Grup A rotavirüslerin şimdiye kadar 19 G genotip (G1-G19) ve 14 G (G1-G14) serotipi tespit edilmiş olup en az 11 G serotipinin (G1-G6, G8-G12) insanları infekte ettiği belirlenmiştir. Fakat bütün dünyada sadece 4 serotip; G1, G2, G3 ve G4 yaygın olarak bulunur ve tespit edilen bütün serotiplerin %95'ini oluşturur. G1 en baskın olanıdır¹⁵.

Rotavirusun VP4 segmentine göre en azından 27 farklı P genotipi bulunmaktadır. İnsanlardan izole edilen 12 P tipi (P1A[8], P1B[4], P2A[6], P2C[6], P3[9], P4[10], P5A[3], P6[1], P8[11], P11[14], P12[19] ve P[25]) vardır¹⁰.

P serotiplerinin tanısı için baculovirus'ta eksprese edilen VP4 antijenine karşı geliştirilen tip spesifik antikorlar kullanılarak Grup A rotaviruslarının şimdiye kadar en az 17 P serotipi tanınmıştır, bunlardan 3 tanesi subtipdir (14 P serotip, 1A, 1B ve 2-14). İnsanları infekte ettiği bulunan P serotipleri ise şimdilik sekiz tane olup P1A, P1B, P2A, P3, P3B, P4, P5 ve P8'dir. İnsanlarda en yaygın P genotipleri, P[8] ve P[4]'dür, sırasıyla P1A ve P1B serotiplerine karşılık gelir. P1A[8] insan rotavirus P tiplerin %90'dan fazlasını oluşturur. P[8] ve P[4] genotipleri P1 serotipinin iki subtipi P1A ve P1B ile benzer kros reaktivite gösterir. P[4] suşları daha çok G2 serotip ile ilişkili olmasına rağmen bütün dünyada hemen bütün rotavirus P[8] suşları G1, G3, G4 ve G9 serotipleri ile ilişkilidir¹⁶.

P serotipleri ve P genotipleri arasında korelasyon tam kurulmamış olduğundan P serotipleri sadece numara ile yazılırken P genotiplerinin numarası parantez içinde belirtilir. P tiplerinin isimlendirilmesinde alternatif olarak P1A[8] gibi hem serotip hem de genotip numarası yazılabilir. G serotipleri ve genotipleri arasında korelasyon olduğundan dolayı her ikisinde de sadece numarası yazılır¹³.

Serotiplerin gösterimi, hem VP4 hem de VP7 üzerindeki nötralizan epitopların ifadesini yansıtmaktadır. Bu dış kapsid proteinleri VP4 ve VP7 spesifik kombinasyonlar halinde bulunur. Bu etkileşim moleküler bazlı olmasına rağmen henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Proteinlerdeki epitopların antijenik yapısı oldukça karmaşıktır ve muhtemelen dış kapsid üzerindeki çözülebilir proteinler belirlenene kadar anlaşılamayacaktır.

VP4'ün dış kapsidin minor proteini olması, zayıf immunojenite göstermesi, bazı kros reaktif epitoplar göstermesi ve monoklonal antikor üretimindeki zorluklar nedeniyle virus nötralizasyonu gibi geleneksel yöntemlerle P serotiplerini belirlemek zordur. Bu yüzden P serotipleme yerine alternatif olarak VP4 genom segmentinin nükleik asit dizisindeki farklılıklara göre P genotipleme yapılmaya başlanmıştır. Grup A rotavirus G serotipleme için de monoklonal antikorların kullanıldığı ELISA ile birçok suşlar tiplendirilemediğinden daha çok genotipleme metodları kullanılır¹³.

Yakın geçmişte rotavirus suşlarının dizilerinin direk karşılaştırılmaları ile bütün homolog genom segmentleri arasındaki genetik akrabalık RNA-RNA arasındaki hibridizasyon ile tespit edilmektedir¹⁷. RNA-RNA hibridizasyon insan ve hayvan suşları arasında yakın tür içi ilişkileri göstermede veya doğal olarak ortaya çıkan rotavirus reassortant

suşları doğrulamada kullanılır. Referans suşlar olarak üç insan A genogrubu rotavirus suşu olan [Wa (P1A[4], G1), DS-1 (P1B[4], G2) ve AU-1 (P3[9], G3)] kullanılmaktadır. Farklı genogruplar arasında reassortment oluşmaz. Genetik reassortment sırasında virusun genomik segmentleri kısmen veya tamamen ayrılabilir ve prototip virustan oldukça farklı olabilir. Farklı genogruplar arasındaki reassortmentlar şimerik viruslar oluşturabilir ve kolayca bir genogruba yerleştirilemez. Buna ilaveten genom segmentlerinin takımı prototip viruslardan kısmen veya tamamen farklı olabilir ve kolayca tanısı yapılamaz.

Pek çok hayvan genogrupları identifiye edilmiştir, fakat bunların birbirleri ve insan suşları ile ilişkileri tamamen açıklanmamıştır. İnsan ve hayvan rotavirus suşlarının dizi analizinde olağan dışı rotavirus suşlarının sayısının nadir olduğu açığa çıkarılmıştır ve bazı suşların nükleik asit hibridizasyon yöntemleri kullanılarak etkili bir şekilde taranamayan reassortant olaylardan türemiş şaşırtıcı genom kompozisyonuna sahip olduğu gösterilmiştir. Rotavirus genom segmentlerinin dizi analizi bazı çalışmalarındaki hedef rotavirusun evrimi ile ilgili veriler elde etmektir. Rotavirus suşları analiz edildiğinde ve bir diğer suşun 11 segmentinin kısmi veya tam dizisi ile kıyaslandığında bütün rotavirus suşları arasındaki genetik ilişkiler belirlenebilir. Rotavirus genomunun dizilerinin karşılaştırılması, evrimsel rotavirus paternlerinin açıklanması ve genotipin ayırımı açısından önemlidir¹⁸. Son zamanlarda filogenetik analiz çalışmaları gerçekleştirilmiş ve grup A rotaviruslarının 11 genom segmentinin her birinin dizisi tanımlanmıştır. Bu analiz temeline dayanarak VP4, VP7 ve NSP4 için önerilen sınıflandırma sistemi değiştirilmiş ve VP1, VP2, VP3, VP6, NSP1, NSP2, NSP3 ve NSP5/6 için yeni sınıflandırma sistemi uluslararası standartizasyonda gerçekleştirilmiştir¹⁹. Bu sistem türler arası evlusioner ilişkiler, bulaşma ile yeni rotavirus suşlarının ortaya çıkması, reassortant kuşakta fonksiyonel gen segmentlerinin oluşması ve genetik reassortment olayların (genetik shift) analizi için önemli bir temel oluşturur².

2.3. Virusun yapısı

Rotavirus partikülünün morfolojik görünümü EM ile kolaylıkla ayırt edilebilir. Rotavirus partikülü tekerleği andıran yapıda düzgün bir dış kenara sahiptir. Rotavirus adı latince tekerlek anlamına gelen rota isminden gelmekte olup morfolojisi temel alınarak belirlenmiştir.

Rotavirus yaklaşık 70nm çapında, zarfsız, ikozohedral simetridir. Rotavirusun kapsidi 11 segmentli çift zincirli (dsRNA) bir RNA genomuna sahiptir. Segmentler 667 bp

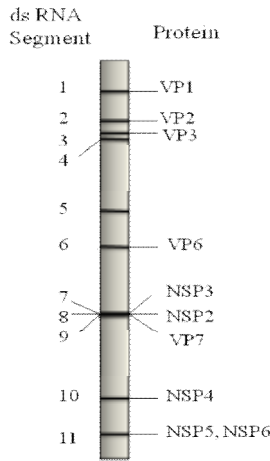
(11. segment)'den 3.302 bp (1. segment)'e kadar değişen farklı formdadır. Toplam genom yaklaşık olarak 18.522 bp uzunluğundadır. Bütün rotavirus gen segmentlerinin A+T (% 58-67) oranı zengindir. Çift sarmallı RNA (dsRNA) mRNA olarak görev yapmadığından rotavirusun kapsitsiz, çıplak dsRNA'sı infeksiyöz değildir. RNA genomu büyük oranda partikül içinde düzenlenir. Rotavirus dsRNA yapısı "dodekahedral" görünümündedir ve VP1-VP3 kompleksini çevreler. Virus partikülleri kendi RNA'larını aktif mRNA'ya transkrip etmek için RNA bağımlı RNA polimeraz enzimine sahiptir.

İnfeksiyöz partikülün tamamı (virion) üç tabakalı partikül (TLP "Triple-layered particle") olarakta adlandırılır. TLP yapısının ayırt edici özelliği VP7'nin çevrelediği 132 tane geniş kanallarının bulunması ve yaklaşık olarak 140 Å derinlikte olmasıdır²⁰.

Pek çok rotavirus suşu (SA11, human KU, bovine RF, human B4106) için 11 rotavirus RNA segmentinin hepsinin nükleotid dizisi bilinmektedir. Prototip simian SA11 suşunun genomu tamamen analiz edilen ilk suştur. Farklı rotavirus suşlarının dizileri her bir genom segmenti yapısının genel özelliklerini göstermektedir. Her bir pozitif-sense RNA segmentinin 5' ucu guanidin ile başlar, bunu takiben 5' ucu kodlanmayan dizi olan korunmuş bir bölgeden, protein ürünleri için kodlanan bir open reading frame (ORF) bölgesinden oluşur ve sonunda bir durdurma kodonu ile sonlanır. Hemen hemen bütün mRNA'lar konsensus dizi 5'-UGUGACC-3' ile sonlanır. Bu diziler gen ekspresyonu ve genom replikasyonu için önemli sinyaller içerir ve mRNA'nın son dört nükleotidi translasyonu artırıcı olarak fonksiyon görür. Bütün gen dizileri en azından başlangıç kodonundan sonra uzun bir ORF bölgesine sahiptir.

Rotavirusun replikasyon döngüsü oldukça karmaşık gözükmetedir. Rotavirusun 11 mRNA'sı ortak cis-acting sinyaller paylaşır, çünkü bütün mRNA'lar aynı polimeraz tarafından replike olur. Genellikle genom segmentinin uç dizileri korunmuştur ve cis-acting sinyaller içerir. Bu sinyaller viral RNA genom segmentlerinin kapsitle çevrelenmesi, replikasyonu, RNA transportu, RNA translasyonu ve transkripsiyonu için önemlidir²¹.

Rotavirus genom segmentleri virus partiküllerinde bulunan yapısal proteinleri ve infekte hücrelerde bulunan fakat matür partiküllerde bulunmayan yapısal olmayan proteinleri de kodlar. Genom segmentinin altısı virus partiküllerinde bulunan yapısal proteinleri (Viral proteinler; VP1,VP2, VP3, VP4, VP6 ve VP7) diğer altı segment ise yapısal olmayan proteinleri (Non-strüktürel protein; NSP1-6) kodlar. Her bir rotavirus genom segmenti en azından yapısal olan veya yapısal olmayan viral bir protein kodlar. Yalnızca 11. segment 2 protein kodlar. Birden fazla rotavirus suşu ile miks infeksiyon olduğunda parental virusların gen segmentleri bağımsız olarak reassortment olabilir. Bu viral çeşitliliğin kaynağıdır^{1,2}.



Şekil 2.1. Rotavirusun 11 genomik segmentinin poliakrilamid jel elektroforezindeki görünümü.

2.3.1 Rotavirusun yapısal proteinleri

Rotavirusun iç kapsidi viral genom, VP1, VP2 ve VP3 polipeptitlerinin bulunduğu viral kor ve VP6'dan oluşur. Minor kor proteini olan VP1 proteini 1. segment tarafından kodlanır. Merkezi korun küçük bir bileşeni olup toplam virion kütlelerinin %2'sini oluşturur. Farklı rotavirusların karşılaştırılması ile VP1'in amino asit ve protein seviyelerinin yüksek derecede korunmuş olduğu görülmüştür. VP1 en büyük polipeptittir. VP1 viral RNA bağımlı RNA polimerazdır. Çünkü VP1 bütün RNA polimerazların ortak dizisini içerir. Son zamanlarda VP1'in az miktarda replikaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir, fakat bu aktivitede VP2 uyarıcıdır²².

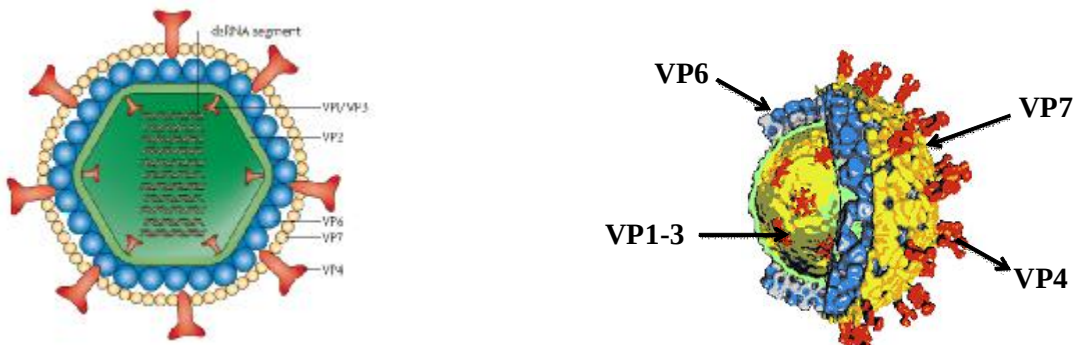
VP2 yapısal proteini 2. segment tarafından kodlanır ve iki minör protein olan VP1 ve VP3 ile birlikte rotavirusun iç korunu oluşturur. VP2 iç korda en bol bulunan proteindir ve dsRNA ile etkileşim halindedir. RNA'nın çevresini kuşatan her bir beş katlı eksen ile VP2'nin içeri doğru uzanan kısımları arasında pek çok nokta temas halindedir. Yine VP2, VP6 ile etkileşim halinde olup 780 VP6 molekülü tarafından çevrelenmiştir. VP2 proteini rotavirus kor yapısının oluşumunda ve fonksiyonunda önemli bir rol oynar. Viral RNA'ya bağlanarak çift zincirli RNA'nın kapsidle kaplanmasında ve replikasyonun gerçekleşmesinde görevi vardır. Nükleik asit ile VP2 veya VP1 arasındaki etkileşimin ortaya çıkması korun endojen enzimatik aktivitesi için önemli olabilir²³.

VP3 yapısal proteini 3. segment tarafından kodlanır. Korun minor bileşenidir. Diğer viral polimerazlar ile dizi homolojisine sahiptir ve guaniltransferaz ve metiltransferaz aktivitesine sahiptir.

VP4 yapısal proteini 775 amino asit uzunluktadır ve 4. segment tarafından kodlanır. VP4 rotavirusun yüzeyinde bulunan çıkıntı “spike” proteinidir ve dış kapsid yüzeyinden yaklaşık 80Å içeri uzanır. VP4 hücreye bağlanma, penetrasyon, hemaglutinasyon, nötralizasyon ve virulans gibi pek çok önemli fonksiyona sahiptir. Çıkıntıların stabilizasyonu ve viral infektivite için VP4’ün VP5 ve VP8 fragmentlerine ayrılması gereklidir²⁴. VP4 spike proteininin distal küresel baş bölgesi farklı bir yapıya sahiptir. Bir merkezi gövde ve VP7 içine sıkışmış içteki bir küresel bölgeden oluşur. VP4’ün bu farklı bölgeleri tripsin enzimiyle VP8 ve VP5 olarak adlandırılan fragmentlere ayrılır. VP4’ün distal küresel bölgesi VP8’den ve gövde içinde kalan bölgesi ise VP5’den oluşmuştur. VP5 rotavirusun korunmuş hidrofobik bir bölgesine yerleşmiş ve virusun hücreye girişinde önemli bir rol oynayan proteindir²⁵.

VP6 proteini 6. segment tarafından kodlanır. VP6 genomun transkripsiyonu için önemlidir. VP6 yapısal ve immunolojik role sahip olup virus kapsid bütünlüğünün sağlanmasında ve korunmasında önemli bir rol oynar. VP6’nın direk olarak enzimatik aktivite göstermemesine rağmen transkripsiyon için kesinlikle gerekli bir major iç kapsid polipeptidi olduğu belirlenmiştir. VP6, VP4 ve VP7’den daha fazla korunmuştur. VP6 grup spesifik antijenik determinanttır. Bu bölge grup (A-G) ve subgrup antijenlerin (genogroup I: SGI; genogroup II: SGII, SGI + II, ve SG non-I, non-II) belirlenmesinde kullanılan değişken bölgeler içerir.

VP7 yapısal proteini 9. segment tarafından kodlanır ve yalnızca glikoproteindir. Viral kapsidin dış katmanını ve toplam virion kütesinin %30’unu oluşturur. VP7 hücreye bağlanma ve girme sürecinde VP4’ü modüle eder ve aynı zamanda VP4’ün bağlanmasından sonra hücrenin yüzey molekülleri ile etkileşime girer. Yapılan çalışmalarda amino asit farklılığı gösteren VP7 içinde en azından 6 (A-F) veya 9 (VR1-9) ayrı bölge tanımlanmıştır. Bu bölgeler nötralizan antikorların ve tip spesifik antikorların hedefidir ve rotavirus serotiplerinin (G tip) belirlenmesinde kullanılır.



Şekil 2.2. Rotavirusun yapısı

2.3.2. Rotavirusun yapısal olmayan proteinleri

NSP1 proteini 5. segment tarafından kodlanır. Şimdilik rolü tam olarak bilinmemekle birlikte doğal immün cevabın modülasyonunda bir role sahip olduğu düşünülmektedir. NSP1 interferon regülatör faktörler IRF3, IRF5 ve IRF7'yi antagonize ederek tip I interferon ekspresyonunu inhibe eder. Ayrıca NSP1'in yakınlarda yeni bir mekanizma olarak Tip I interferonun antagonizmini için nükleer faktör kappa B (NF-kB) aktivasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir. Bütün rotaviruslar arasında NSP1'in 88 amino asitlik bir dizisi korunmuş bulunmasına rağmen dizi analizi sonuçları bu bölgenin yaygın dizi varyasyonları içerdiğini de gösterir.

NSP2 proteini 8. segment tarafından kodlanır. RNA replikasyonunda ve paketlenmesinde bir role sahip olduğu ileri sürülmüştür. Yapılan çalışmalar nükleozit trifosfataz aktivitesine de sahip olduğunu göstermiştir.

NSP3 proteini 7. segment tarafından kodlanır. Protein sentezinin translasyonunu artırıcı, viral replikasyonda ve virusun barsak ve diğer dokulara yayılımında bir role sahiptir. Dizi analiz sonuçlarına göre NSP3'ün memelilere ait rotavirus şuşlarında %75 oranında korunmuş olduğu görülmüştür.

NSP4 proteini 10. segment tarafından kodlanır ve 175 amino asitten oluşan bir glikoproteindir. Pek çok çalışmada NSP4'ün viral enterotoksin olduğu kanıtlanmıştır. NSP4'ün enterotoksin aktivitesi, belirli hasar yokluğunda ishal oluşturan değişikliklere veya infekte olmayan bölgelerdeki değişikliklere aracılık etmeyi sağlar. Viral partikülün olgunlaşmasında önemli bir adım olan endoplazmik retikulumdan subviral çift katmanlı partikülün tomurcuklanması için intraselüler reseptör olarak görev yapar. NSP4 membran destabilizasyonuna sebep olarak plazma membranının permeabilitesini değiştirir ve epitel hücrelerin yüzeyleri arasındaki sıkı bağlantıları "tight junction" bozarak intraselüler kalsiyum seviyesini artırır. NSP4'ün VP4 ve VP6 ile etkileşimde bulunduğu gösterilmiştir. Rotavirusun virulansı ve toksijenik aktivitesinde ki modifikasyonlar bu bölgedeki amino asit değişiklikleri ile ilişkilendirilmiştir. İnsan ve hayvan rotaviruslarının NSP4 genlerinin dizileri belirlenmiş ve kıyaslanmıştır. Dizi analizleri birbirinden farklı 5 NSP4 genotipinin [A (KUN), B (Wa), C (AU-1), D (EW) and E (avian-like)] olduğunu göstermektedir. Genotip A, B, C ve D memelilerden elde edilirken genotip E avian rotavirus suşundan identifiye edilmiştir. Genotip A, B ve C insanlarda tespit edilmiştir. NSP4 geninin A ve B genotiplerin immün cevaptaki rolü henüz tam tanımlanamamıştır ve rotavirus aşısının stratejisinde bu genin önemli olup olmadığı hala bilinmemektedir.

NSP5 proteini 11. segment tarafından kodlanır. Yalnızca 11. segment birden fazla Open Reading Frame (ORF) bölgesine sahiptir. ORF1 198 amino asit (aa) ve ORF2 92 amino asit uzunluğundadır. ORF1 NSP5 proteinini kodlar. NSP5 virus ile infekte hücrelerde molekül ağırlığı 26 kDa ve 28 kDa olan iki polipeptit olarak bulunur. NSP5’in fosforilasyon ve glikolizasyon olmak üzere iki post-translasyonel modifikasyonu tanımlanmıştır. ORF2 NSP6 proteinini kodlar ve NSP6’nın rolü tam olarak açık değildir, fakat rotavirus replikasyonunda anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir²⁶.

RNA segmenti	Gen ürünü	Yeri ve Fonksiyonu
1	VP1	İç kor proteini: RNA polimeraz aktivitesi
2	VP2	İç kor proteini: RNA’nın kapsidle kaplanması
3	VP3	İç kor proteini: Guaniltransferaz, Metiltransferaz aktivitesi
4	VP4	Dış kapsid proteini: Hücreye bağlanma, virulans, penetrasyon, hemagglütinasyon
5	NSP1	Yapısal olmayan proein: İnterferon antagonisti
6	VP6	İç kapsid proteini: Grup ve subgrup antijen
7	NSP3	Yapısal olmayan protein; Translasyon enhancer
8	NSP2	Yapısal olmayan protein; Replikasyon ve paketlenme
9	VP7	Dış kapsid proteini: Yüzey glikoproteini, serotip spesifik nötralizan antijen
10	NSP4	Yapısal olmayan protein; Viral enterotoksin
11	NSP5 ve NSP6	NSP5: Yapısal olmayan protein; Fosoprotein NSP6: Yapısal olmayan protein; Replikasyon?

Tablo 2.1. Grup A rotaviruslarının yapısal ve yapısal olmayan proteinlerinin yeri ve fonksiyonu.

2.4. Replikasyon

Rotavirusun hücreye bağlanma ve hücre içine girme mekanizması oldukça karmaşıktır ve kesin olmayan pek çok detaylara sahiptir. Rotavirusun ilk olarak hücreye bağlanması enterositlerin yüzeyinde bulunan muhtemelen integrin ve sialik asit içeren gangliosid gibi reseptörlerle sağlanmaktadır. Sadece üç tabakalı partiküller (TLP) hücreye bağlanabilir. Hücreye giriş birçok hücresel molekülün dahil olduğu kompleks bir prosesdir. Rotavirus suşlarının ilk olarak sialik asit içeren reseptörlere bağlandığı ileri sürülmüştür. İlk temas VP8 aracılığıyla oluşur. VP8’in aynı zamanda epitel hücreler arasındaki yeni oluşan sıkı bağlantıların “tight junction” gelişimini inhibe ederek virusun tight junctionlarının altında gizli kalan integrin reseptörlerine ulaşmasını sağladığı da bulunmuştur²⁷.

Rotavirus ve hücre arasındaki ikinci bir etkileşim VP5 ve hücre reseptörü $\alpha\beta1$ integrin arasında olur. Bu etkileşim VP5'in 308-310 residülerinde bulunan integrin bağlayan motif DGE (Asp-Gly-Glu) aracılığı ile olur ve yakınlarda VP5'in bağlanması için $\alpha2$ integrin subunitinin I bölgesinin gerekli ve yeterli olduğu gösterilmiştir. Bu iki etkileşime ilaveten $\alpha\beta2$, $\alpha\beta3$ ve heat shock protein olan hsc 70'in de rotavirusun hücreye girişindeki sonraki adımlardan sorumlu olduğu bildirilmiştir. VP7'nin de $\alpha\beta3$ 'e bağlandığı gösterilmiştir^{28, 29}.

Prodüktif infeksiyon için dış kapsid yüzey proteini VP4'ün proteolitik enzimle ayrışması gerekir. Rotavirusun infektivitesi tripsinin VP4'ü (88kDa) polipeptit VP8 (28 kDa) ve VP5'e (60kDa) ayrıştırması ile artar. Bu ayrılma rotavirusun hücreye bağlanması için gerekli değildir, fakat hücrenin içine penetrasyonunu artırır. Tripsinin virusun penetrasyonunu nasıl artırdığı bilinmemektedir. Buna karşılık ayrılmamış virusda füzyonu uyurabilir. VP8 proteini hemagglütinin bölgesi içerir, hücreye bağlanmadan sorumludur. VP5 füzyon proteini içerir, hidrofobik bölgeye sahiptir ve hücreye girişte rol alır. Rotavirusun hücreye penetrasyon mekanizması tam bilinmemektedir, füzyon ile direk giriş ve Ph bağımsız reseptör aracılı endositozis (Ca^{2+} bağımlı endositoz) ile olmaktadır. Ca^{2+} bağımlı endositoz süreci en çekici giriş modudur ve veziküllerden stoplazmaya kadar Ca^{2+} akışına yol açan çok düşük bir Ca^{2+} konsantrasyonu ile birlikte infeksiyöz rotavirusun sitoplazmaya endositoz ile alınmasına bağlıdır. Bir kez endozom Ca^{2+} konsantrasyonu dış kapsidin stabilitesi için kritik seviyenin altında sitoplazma ile dengeyi sağladığı zaman, virus dış kapsid proteinlerini kaybeder ve sonra virusun sitoplazmaya kaçışına izin veren vezikül membranı lizise uğrar³⁰. Hücre kültürü ortamında tripsin ile ayrılmamış rotavirus hücreye yavaş internalize olur ve infeksiyöz değildir. Tripsin ile aktive olan rotaviruslar ise hücreye direk membrandan geçerek girer, hızla internalize olur ve prodüktif infeksiyon gelişir. Rotavirus enterositlerin sitoplazmasında çoğalır. TLP'den dış kapsidin ayrılması intraselüler düşük kalsiyum Ca^{2+} konsantrasyonu ortamında gerçekleşir ve transkripsiyonel olarak aktif çift tabakalı partiküller (double-layered particle; DLP) haline dönüşür. Viral RNA polimerazın aktivasyonu ile bu partiküller içinde viral RNA, mRNA'ya (+ssRNA) transkribe olur. Bu mRNA'lar DLP'nin hem VP2 ve VP6 protein tabakaları boyunca uzanan kanallarından geçerek sitoplazmaya çıkar. Viral mRNA'lar hem proteinlerin sentezi hem de minus RNA (-RNA) sentezi için kalıp görevi görür. Yeni sentez edilen viral proteinler VP1, VP3 ve mRNA segmentleri sitoplazmadaki viroplazma içinde yeni korları oluşturmak için paketlenir. Çift sarmallı RNA genomu oluşturmak üzere (-)RNA replikasyonu korların içinde gerçekleşir. Ardından viroplazm içinde VP6 proteini korları çevreleyerek yeni çift tabakalı partiküllerin (DLP) montajı olur. Yüzeyinde VP6

proteini ve iç kısmında kor bulunan bu çift tabakalı yeni subviral partiküller endoplazmik retikulumun (ER) membranında bulunan NSP4 reseptörlerine VP6 proteini ile bağlanır ve tomurcuklanma ile geçici bir zarf kazanıp endoplazmik retikulumun lümenine girer. Bu sırada ER’da bulunan integral membran glikoprotein VP7 protein de tomurcuklanma sırasında kazanılır. VP4 proteini muhtemelen sitoplazmik bir proteindir ve bu protein de tomurcuklanma sırasında kazanılır. Rotavirusun morfogenezinin son safhasında, partiküller ER içinde ilerlerken geçici zarfını ve NSP4’ü kaybeder ve ardından VP4 ve VP7 virusun dış kapsidini yapmak üzere organize olur ve virusun olgunlaşması sonucu üç tabakalı partiküler (TLP) oluşur. ER’da tomurcuklanma ve virusun olgunlaşması yüksek Ca konsantrasyonu gerektirir. Daha sonra hücrenin lizisi ile virionlar serbest kalır. Rotavirusun ER’dan intestinal hücrelerin apikal yüzeyine veziküller içinde taşındığı ve bu veziküllerin muhtemelen plazma membranı ile füzyonu sonucu virionların hücre lizisinden önce de hücreden salınabildiği bildirilmiştir¹³.

2.5. Patogenezi

Rotavirus, ince barsağın villuslarının olgun enterositlerini infekte eder. Virus partikülleri hücre sitoplazmasında replike olarak kansız bol miktarda noninflamatuvar ishale yol açar. Rotavirus enfeksiyonu, ince barsak epitel fonksiyonunu değiştirerek, su absorpsiyonunu önleyip su ve iyon kaybına yol açarak sulu ishale sebep olur³¹.

Rotavirus enfeksiyonunda patolojik değişiklikler hemen daima ince barsağa sınırlıdır ve enterosit vakualizasyonu ve kaybı gibi hafif lezyonlar veya villus küntleşmesi ve kript hiperplazi gibi daha belirgin değişikliklerdir. Hastalığın semptomları ile histolojik lezyonlar arasında korelasyon gözükmemektedir. Rotavirus diarezinin önceleri sadece enterosit hasarı sonucu gelişen malabsorpsiyona bağlı ozmotik diare olduğu kabul edilirdi. Oysaki günümüzde rotavirus diarezinin birçok mekanizmalarla geliştiği bilinmektedir ve hem viral hem de konak faktörleri hastalığın oluşmasında etkilidir.

Bu faktörler;

2.5.1. Enterosit harabiyetine bağlı olarak gelişen malabsorpsiyon

Enterosit harabiyeti ile Na, su ve mukozal disakkaridlerin emilimi azalırken, mukozal cAMP’in (cyclic adenosine monophosphate) değişmediği görülür. Malabsorpsiyon; sindirilmemiş monosakkarid ve disakkaridler, karbohidratlar, yağlar ve proteinlerin kolona geçmesi ile sonuçlanır. Rotavirus enfeksiyonu sırasında gözlenen ishalde oluşan sıvı ve

elektrolit kaybı sebebiyle elektrolit replasmanı yapılmazsa ciddi dehidratasyon ve ölüm görülebilir³².

Villus enterositlerinin infeksiyonu sonucu kalsiyum permeabilitesi hem plazma membranında hem de endoplazmik retikulumda artınca hücre lizisi ile sonuçlanan mekanizmalar tetiklenir. NSP4'ün hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyumu serbest bırakacak olan mekanizmaları uyardığı saptanmıştır. Kalsiyum artışı sonucu kalsiyuma duyarlı olan F-aktin, tubulin gibi proteinlerin etkilenecek mikrovillus hücre iskeletinin harab olması NSP4'e bağlı etkiler sonucu bariz doku harabiyeti gözlenmeden oluşan diare mekanizmasında rol oynayabilir. Ayrıca inaktif rotavirus partiküllerinin de diareyi indükleyebildiği bilinmektedir. Rotavirusun infeksiyonu esnasında infekte enterositlerin apikal yüzeylerinde lokalize olan laktaz, sükras ve maltaz gibi disakkaridaz enzimlerinde yapımı azalmakta ve böylece glikoz ve diğer şekerlerin absorpsiyonu bozulmaktadır. Glikozun malabsorpsiyonunda rol alan diğer önemli bir faktör de NSP4 proteinin SGLT'yi (sodyum bağımlı glikoz transpoter) inhibe etmesidir. İnfekte olmayan villus enterositlerinde ise sodyum pompası, ATP'nin (adenozin triphosphate) parçalanması ile elde edilen enerjiyi sodyumun aktif olarak hücre dışına transportu için kullanır ve böylece barsak hücresi sitoplazmasında sodyum konsantrasyonu düşer. Olayı dengelemek için barsak lümeninde bulunan sodyum, taşıyıcı protein olan SGLT ile barsak hücresine girerken beraberinde glikozu da taşır. NSP4 enterotoksini SGLT'yi inhibe ederek glikoz absorpsiyonunu bozar. Bu tarz mekanizmalarla virus villus epitelinde bir seri değişime yol açarak malabsorpsiyon oluşmasına yol açar^{32, 33}.

2.5.2. Rotavirus enterotoksini

Rotavirusun yapısal olmayan proteinlerinden biri olan NSP4, bir transmembran, endoplazmik retikulum-spesifik glikoproteini olup Ca^{2+} u endoplazmik retikulumdan mobilize ederek intrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonunu artırır. NSP4 rotavirus patogeneğinde en ilgi çekici faktörlerden biri olup viral enterotoksindir. Olgun infektif virus partikülünde NSP4 bulunmaz, NSP4'ün virusla infekte villus enterositlerinde sentez edilmesi gerekir.

NSP4 başlangıçta bir endoplazmik retikulum transmembran glikoproteini olarak N-terminus'da iki glikolizasyon yeri olan 175 aa uzunluğunda sentez edilir. Sonra farklı intrasellüler ve ekstrasellüler fonksiyonları olan farklı formlara ayrılır. NSP4'ün barsakta histolojik değişikliklerin yokluğunda neonatal farelerde diareyi enterotoksin olarak artırdığı gösterilmiştir.

Ekstraselüler NSP4'ün enterotoksin aktivitesi ya tam uzunluktaki protein veya NSP4'ün sitoplazmik kuyruğunun küçük bir bölgesine (amino asit 114-135) uyan 22 amino asitlik sentetik peptidin yeni doğan farelere verilmesiyle diareyi uyarmasından sonra 1996'da keşfedilmiştir. Bu ilk çalışmalarda NSP4'ün enterotoksik formunun rotavirus ile infekte hücreden salınabileceği ve infekte olmayan hücrelerin reseptörlerine bağlanarak diare oluşturarak sinyal yolunu aktive edeceği öngörülmüştür. Yakınlarda NSP4'ün sekrete edilen ayrışma ürünü (NSP4 aa 112-175) tespit edilmiştir. Sekrete edilen NSP4 insan intestinal hücre dizisi olan HT-29 hücrelerinde fosfolipaz C (PLC) bağımlı sinyali uyararak intraselüler $[Ca^{+2}]$ i düzeylerini artırır ve sonra cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) bağımlı kanalların regülasyonu veya aktivasyonu aracılığıyla klor sekresyonunu uyarır. Yeni çalışmalar $\alpha 1$ veya $\alpha 2$ integrinlerin I domainlerini tanımlamıştır ve integrin $\alpha 2\beta 1$ eksprese eden hücrelere NSP4'ün bağlanması hem PLC hem de phosphoinositide-3 kinase (P13K) sinyal transdüksiyon yollarını aktive eder. İntegrin I domainine bağlanmaya, kalsiyum bağlanma yeri olduğu varsayılan NSP4'deki glutamik asit 120 aracılık eder³⁴.

İntegrin sinyali NSP4'ün 130-140 aa ile başlatılır ki bu durum bölgedeki spesifik mutasyonların hem PLC aracılı sinyali hem de NSP4'ün enterotoksin aktivitesini azalttığını gösteren önceki çalışmalarla uyumludur. I domaine bağlanmayan veya integrin aracılığıyla sinyal oluşturmamayan NSP4 muntantları yeni doğan farelerde diareyi uyaramaz ki bu etkileşimin NSP4'ün enterotoksin aktivitesi için önemli olduğunu doğrular. Bu sonuçlar heyecan vericidir. NSP4'e bağlı diarenin temelindeki ilk moleküler etkileşimi tanıtır ve bu etkileşimin inhibisyonu hastalığı önleyebilir.

İntraselüler NSP4 (iNSP4) rotavirus enfeksiyonunda, hücre içi $[Ca^{+2}]$ i seviyesini artırma ve virus montajını kolaylaştırma gibi iki önemli role sahiptir. Bu aktiviteler rotavirus replikasyonu için önemlidir, çünkü NSP4'ün small interfering RNA (siRNA) aracılı yıkımı mRNA üretimini artırır, viral protein sentezi ve genomik dsRNA replikasyonunu azaltır. iNSP4 produktif virus replikasyonu için gerekli olan kalsiyumun 2-6 kat artırılmasını uyarır. Kalsiyumun $[Ca^{2+}]$ şelasyonu veya siRNA aracılı NSP4'ün yıkımı sitopatik etkileri ve virus yükünü azaltır. iNSP4'ün kalsiyum homeostazını nasıl değiştirdiği bilinmemektedir. Fakat rotavirusun replikasyon sürecinde önemli bir prostestir. NSP4'ün endoplazmik retikulumun geçirgenliğini artırması intraselüler kalsiyumu artırır, kalsiyum giriş kanallarının bulunduğu plazma membranı aracılığıyla kalsiyumun hücreye girişi artar. İlgi çekici bir yön de NSP4'ün muhtemelen kalsiyum kanalları oluşturarak plazma membranının permeabilitesini artırmasıdır, fakat bu daha kesinleşmemiştir. Virion montajı sitoplazmada ve endoplazmik retikulumda yüksek kalsiyum konsantrasyonunu gerektirir³⁵.

Yüksek kalsiyum virus montajının dışında rotavirus replikasyonu için önemli olabilir. NSP5'de Ca^{2+} bağlayan yer vardır ki viral RNA replikasyonunun olduğu viroplazma denilen hücre içi yapıların anahtar komponentidir ve kalsiyumun NSP5'e bağlanması ile viroplazma formasyonunun regüle edildiği gözükmemektedir. NSP4 aynı zamanda viroplazma ile ilişkisi olan bir veziküler kompartmanda kalsiyumu artırır. Bu durum NSP4'e bağlı hücre içi Ca^{2+} artışını gösterir³⁶.

NSP4'ün VP6'ya bağlandığı ve transkriptlerin oluştuğu kanalları bloke ettiği speküle edilmiştir. Alternatif olarak DLP'leri dış kapsid proteinleri ile tekrar kaplama çalışmaları VP4'ün VP7'den önce partiküller üzerine montaj olması gerektiğini göstermiştir ki bu durum VP4'ün VP6'nın yüzeyi ile etkileşmesini gösterir. NSP4 birbirine çok yakın duran VP4 ve VP6 için bağlanma yerlerine sahip olması NSP4'ün dış kapsid montajı sırasında VP6 ve VP4'ün uygun yönlendirilmesi için bir protein olduğunu gösterir. Böylece NSP4'ün temel intraselüler fonksiyonları yıllardır bilinmesine rağmen yeni çalışmalar NSP4'ün fonksiyonlarının ilk bilindiğine göre daha karmaşık olduğunu gösterir. Bu mekanizmalar çok ilgi çekicidir, çünkü rotavirus, infeksiyon için Ca^{2+} sinyalinin anahtar hücresel hedef olduğu viruslardan biridir ve ilerde kalsiyum aracılı terapötik stratejiler için çalışmalar yapılabilir³⁷.

2.5.3. Enterik sinir sisteminin uyarılması ve diğer sekretuar faktörler

Rotavirus diarezinin sekretuar komponenti villus epitelyumunda virusa bağlı fonksiyonel değişikliklere bağlı gözükmemektedir. Sekresyonda temel oyuncular NSP4 ve ENS dir. Sekrete edilen NSP4'ün kesin rolü ve hedefi bilinmemektedir. NSP4 basitçe enterosit epitelyumunda infeksiyonunun etkilerini artırır. Buna karşılık NSP4 kript epitelyumuna da etki eder. Kript hücrelerinde hücre içi kalsiyumu artırarak Cl^- sekresyonunu aktive eder ve suyun dışarı akışına sebep olur. Bu Cl^- sekresyonunun kript hücrelerinin cAMP bağımlı Cl^- kanalı ile ilişkisiz olduğu bilinir. Çünkü CFTR-knockout fareler rotavirus veya NSP4'e bağlı diareye duyarlıdır. CFTR-knockout farelerde rotavirus diareisindeki Cl^- kanalının yapısı hala bilinmemektedir. NSP4'ün kendisinin bir kanal yaptığı veya NSP4'ün aktif olmayan Ca^{+2} ile aktive olan iyon kanallarını aktive ettiği ileri sürülür. İlginç olan bu çalışmalar aynı zamanda yaşa bağımlı rotavirus diarezinin NSP4 reseptörünün yaşa bağımlı ekspresyonu veya yaşa bağımlı Ca^{+2} metabolizasyonuna bağlı olmayıp daha çok yaşa bağımlı Cl^- permeabilitesine bağlı olduğunu göstermiştir. Sekrete edilen NSP4'ün diğer muhtemel hedefi ENS'dir ki bu aynı zamanda klasik kolere toksinine bağlı diarenin de hedefidir. Aslında ENS villus epitelyumunun hemen altına yerleşmiştir. NSP4'ün ENS'yi uyarması deneysel olarak gösterilmemesine rağmen ENS'nin rotavirus diareisinden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Canlı

infekte hayvanlarda ENS stimulasyonunu bloke eden lidokainin sürekli verilmesi sıvı kaybını önemli ölçüde engellemiştir. Böylece RV infeksiyonu sırasında ENS'nin aktive olduğu açıktır. Bu aktivasyon, elektrolit ve su sekresyonu için villus uçlarında az sayıda infekte hücrenin kript hücrelerini nasıl uyardığını açıklar³⁸.

NSP4'ün ENS'yi direk stimüle edip etmediği bilinmemesine rağmen ENS'nin enterositlerden salınan birçok moleküle cevap verdiği bilinir. Kolera toksini villus epitelyumunda enterokromafin hücrelerden hydroxytrptamine (5-HT) salımını uyarır ve 5-HT bir ENS stimülatörüdür. Sekrete edilen NSP4'ün enterokromafin hücrelere bağlanarak 5-HT salımına sebep olup ENS'yi stimüle etmesi mümkündür. Benzer şekilde infekte enterositler tarafından sekrete edilen kemokinler ve prostaglantinler ENS'yi stimüle edebilir. Şimdilik ENS ve NSP4 rotavirus infeksiyonuna karşı sekretuar cevapta major rollere sahip gözükmemektedir³⁹.

2.5.4. Barsak motilitesi

Bazı infeksiyonlarda gelişen ishallerde barsak motilitesi belirgin olarak artmıştır. John Stephen ve araştırma grubu 1980'lerin sonunda yenidoğan sıçanlarda rotavirusla indüklenen intestinal sekresyona ilişkin çalışmalarında; villus tepe hücrelerinin rotavirus ile invazyonunun "nöroaktif/hormonal maddelerin" salınımını tetiklediğini ve bu durumun villus iskemisine ve villusların kışalmasına sebep olduğunu ve böylece absorpsiyon kapasitesinin düştüğü hipotezini öne sürmüştür. Villus iskemisi aynı zamanda hücre bölünmesinin artmasına sebep olur, proliferatif bölgeyi genişletir. Bu bölgede, hipertonik intrasellüler kompartmanı olan hücreler mevcuttur. Aşırı iyonlarını atarken sıvı sekresyonu için ozmotik kuvvet yaratırlar. ENS'de genelde motiliteyi kontrol etmektedir, ancak moleküler stimülatörü kesin olarak bilinmemektedir^{39,40}.

2.6. İmmunoloji

Rotavirusa karşı immun cevap, hem doğal hem de hücresel ve humoral bağışıklığı kapsayan adaptif (kazanılmış) immun cevabı içermektedir.

Hayatın ilk birkaç yılında rotavirus ile birçok infeksiyonlar oluşabilir. İlk infeksiyon genellikle daha şiddetli geçmekte ve infeksiyonun sayısı arttıkça şiddeti de azalmaktadır. İlk infeksiyon, özellikle ciddi rotavirus diareisine karşı yüksek oranda korur. Semptomatik veya asemptomatik geçirilen ilk rotavirus infeksiyonu sonraki rotavirus ile ilişkili diareye karşı %73-87 arasında korur⁴¹.

İkinci bir rotavirus enfeksiyonundan sonra gerek asemptomatik gerekse semptomatik olsun hafif veya şiddetli enfeksiyona karşı tamamen (%100) koruma sağlanır. Asemptomatik neonatal rotavirus enfeksiyonu sonradan meydana gelecek ciddi rotavirus hastalığına karşı koruyabilir, fakat enfeksiyona karşı koruyamaz. Yeni doğan ve küçük çocuklarda (2 yaşından daha küçük) ilk enfeksiyon sonucu oluşan immun koruma reinfeksiyon sonucunda oluşan diarenin şiddetini hafifletir⁴².

Bazı rotavirus enfeksiyonları asemptomatik olup hastalığın ciddiyetini hem viral hem de konağa ait faktörler etkileyebilir. Viral faktörler arasında VP4'ün bazı alellerinin asemptomatik hastalıkla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Malnutrisyon ve yaş gibi konak faktörleri de rotavirus enfeksiyonunun ciddiyetini etkilemektedir. Malnutrisyon ince bağırsağın düzelmesini geciktirir.

Semptomatik rotavirus enfeksiyonu genellikle yaşa bağlıdır. Yaş ilerledikçe rotavirus enfeksiyonlarının ciddiyeti ve sayısı azalır. Villus epitel hücreleri üzerindeki rotavirus bağlayan reseptörlerin miktarının yaşla birlikte azaldığı hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Buna karşılık erişkinlerde enfeksiyonun asemptomatik veya az belirtilerle seyretmesi daha çok immunitenin kazanılmasıyla ilişkilidir. Nötralizan antikorlar yaş ve virus ile karşılaşma ile artar. Çocukların 3 yaşına kadar %90'ında bir veya daha fazla rotavirus tipine karşı antikorlar bulunmaktadır ve 4 yaşına kadar bu oran %100'ü bulur. Rotavirus antikor düzeyleri doğumda yüksektir, 3-6 aya kadar azalır, 2-3 yaşında pik yapar. Rotavirus antikorlarının erişkinlerde de yüksek prevalansta seyretmesi virus ile subklinik enfeksiyonların oluştuğunu gösterir. Yaşlılar ise muhtemelen immunitenin azalmasına bağlı olarak ciddi hastalığa karşı duyarlıdırlar⁴³.

Rotavirus enfeksiyonuna karşı başlıca serotip spesifik homotipik nötralizan antikorlar enfeksiyonunun ilk iki haftası içinde gelişir. Bu immuniteye rotavirusun 2 dış kapsid proteini olan VP4 ve VP7 antikorları aracılık eder. Her iki protein de dış kapsidin bileşenleri olup nötralize edici antikorların üretimini harekete geçirmede birbirlerinden bağımsızdır.

Farklı serotiplere karşı da düşük düzeyde heterotipik antikor cevabı oluşur. Fakat çoğunlukla infekte eden suşa göre değişir. Örneğin: G2 serotipleri başlıca homotipik antikor cevabı oluştururken G1, G3 ve G4 homotipik ve heterotipik antikor cevabı oluşturur. Homotipik antikor cevabı muhtemelen heterotipik antikora göre daha uzun sürelidir. Buna karşılık aynı serotiple reinfeksiyonların ortaya çıktığı gösterilmiştir, ancak primer enfeksiyona göre daha az ciddidir. Heterotipik koruma için muhtemel birkaç açıklama vardır. Birincisi, lokal IgA antikorları VP4 ve VP7'deki çapraz reaksiyon gösteren epitoplara tanımlar ve diğeri ise, iç kapsid proteini olan VP6'daki antikorların korumayı sağlamasıdır ve üçüncü bir ihtimal ise, çapraz reaksiyon veren virus-spesifik sitotoksik T lenfositlerinin korumada yer almasıdır,

ancak rotavirus infeksiyonunda sitotoksik T lenfositlerinin rolü henüz tam olarak bilinmemektedir^{44,45}.

Rotavirus ile infeksiyon yaşam boyu süren güçlü bir humoral IgG immun yanıtı harekete geçirir. IgG yanıtı kolayca oluşurken, genellikle rotavirus infeksiyonundan korunma lokal IgA antikorları tarafından sağlanır. Velazquez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada çocukların total serum rotavirus IgA titresi $>1:800$ ise rotavirus infeksiyonu geçirme riski oldukça düşük olup hafif veya şiddetli diareye karşı tamamen koruduğu bildirilmiştir. Buna karşılık çocukların IgG titresi $>1:6400$ ise rotavirus infeksiyonuna karşı korur, ancak rotavirus diariesine karşı korumaz. Yapılan bir diğer çalışmada total serum rotavirus IgA titresinin $>1:200$ olması ve IgG titresinde $>1:800$ olmasının infeksiyon ve hastalığa karşı koruma ile korele olduğu gösterilmiştir. Rotavirus spesifik total serum IgG titreleri değil, fakat total serum rotavirus IgA'nın özellikle ciddi diareye karşı koruyuculuğu ile ilgili olarak total rotavirus serum IgA varlığının sekratuvar komponente bağlı serum immunglobulinlerin (Ig) varlığı ile korele olduğu bulunmuştur. Bu antikorlar büyük ihtimalle barsaktan orjin alan polimerik IgA'dır ve barsakta fazla olan IgA seruma ulaşır. Spesifik olarak sekratuvar komponente bağlı olan rotavirus IgA antikorları infeksiyondan sonra 4 aydan kısa bir süre içinde serumdan kaybolur. Üstelik infeksiyondan yaklaşık 1 hafta sonra serumda bulunan immunglobuline bağlı rotavirus sekratuvar komponentinin miktarı duodonal sıvıdaki miktar ile koreledir. Böylece infeksiyondan sonraki 4 ay içinde bulunan total rotavirus spesifik serum IgA varlığının intestinal IgA ile iyi korele olduğu gözükmemektedir^{46,47}.

Kreşlerde ve bazı toplu yaşam yerlerinde yapılan çalışmalarda dışkı örneklerinde yüksek rotavirus IgA antikor titrelerinin olması hastalık ve infeksiyona karşı koruma ile ilişkilendirilmiştir. Yeni doğan çocuklarda yapılan bazı çalışmalarda da dışkıdaki IgA'nın anne sütü orjinli olabildiği ve muhtemelen pasif olarak ortaya çıkan bu IgA'nın viral bir infeksiyon sonucu oluşmadığı için düşük bir koruyucu etkinlik sağladığı gösterilmiştir⁴⁸.

Rotavirus tarafından infeksiyona karşı korunmadan sorumlu immun mekanizmalar hala iyi bilinmemektedir. En son yapılan çalışmalarda rotavirus VP6 spesifik naif B lenfositlerinin önemli bir popülasyonu tanımlanmıştır. Yeni doğanlarda olduğu gibi rotavirus infeksiyonuna maruz kalan yetişkinlerde rotavirus spesifik naif B hücrelerin adaptif immun cevapta önemli rol oynayabildiği gösterilmiştir⁴⁹. Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda homolog murin rotavirusu ile infeksiyondan sonra, primer infeksiyonun iyileşmesinde $CD8^+$ T hücrelerinin rolünün olduğu ve rotavirus infeksiyonundan uzun dönem korumada temel efektör olan rotavirus spesifik intestinal IgA üretilmesinde $CD4^+$ T hücrelerinin önemli fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir. Rotavirus infeksiyonu viremik bir

faz içermektedir, farelerde hem intestinal hem de sistemik rotavirus spesifik B-hücre yanıtı gözlenirken, sadece barsaktaki rotavirus spesifik plazma hücrelerinin antiviral etkisi olduğu görülmektedir, bu da mukozal antikorların koruma sağladığını düşündürmektedir⁵⁰.

İntrasellüler sitokin flow-sitometri assay ve ELISPOT (Enzyme-linked immunosorbent spot) kullanılarak yapılan insan rotavirus spesifik T-hücre yanıtı çalışmalarına göre; hem sağlıklı hem de rotavirus ile infekte erişkinlerde interferon (IFN)- γ salgılayan CD4⁺ ve CD8⁺ rotavirus-spesifik T hücreleri bulunur. Rotavirus gastroenteritli çocuklarda bu hücrelerin sayısı düşüktür veya tespit edilemez. Sonuçta, rotavirus spesifik CD4⁺ T hücreleri tarafından salgılanan sitokin paterni açık değildir, fakat hem T-helper 1 (TH1) hemde TH2 paterni olabilir⁵¹.

2.7. Bulaşma

Rotavirus insandan insana en yaygın fekal oral yolla bulaşır. Bulaşma oyuncaklar gibi kontamine eşyalarla da olabilir. Çocuklar rotavirus enfeksiyonu ve hastalığı için büyük risk grubunu oluşturmalarına rağmen rotavirus enfeksiyonu yetişkinlerde de ortaya çıkabilir. Bu kişiler özellikle küçük çocuklar ile yakından ilişkili bulunan, kişisel hijyenin zayıf olduğu çocuk yuvaları ve yaşlıların bulunduğu bakım evlerinde olan, sık seyahat eden veya hastanede yatan erişkinlerdir^{3,52}.

Virus oldukça bulaşıcı olmasından dolayı rotavirusun yayılmasını kontrol altına almak çok zordur. Infekte insanların dışkıında 10^{10} - 10^{12} /ml kadar enfeksiyon partikülü bulunur ve enfeksiyonun olabilmesi için yaklaşık 1-10 kadar partikülün olması yeterlidir. Virusun yayılmasında kusma da önemli bir rol oynamaktadır. Hem semptomatik hem de asemptomatik hastalar genellikle 7-10 gün boyunca rotavirus partiküllerini etrafa yayarlar. Bu süre özellikle immun yetmezliği olan kişilerde bazen birkaç haftayı bulabilir. Anne sütü beslenen çocuklarda hastalığın ciddiyeti ve süresi azalır.

Virus oda ısısında dışkıda aylarca, çevresel yüzeylerde ise günlerce canlı kalabilir. Rotavirus ile infekte olmuş metal ve plastik gibi yüzeylerde virus canlılığını uzun süre koruyabilir. Rotavirusun transmisyonunda en etkili yüzeyler tuvalet ve lavabodur²¹.

Rotavirus çevrede uzun süre stabil kaldığından kontamine yüzeylere temas veya kontamine su ve yiyeceklerle de rotavirus bulaşabilir. Rotavirus partikülleri insan eli üzerinde saatlerce canlılığını koruyabilir. Musluk suyu zayıf bir dezenfektandır. Bu yüzden eller kesinlikle sabunla yıkanmalıdır. Temiz su kullanımı ve dikkatli el yıkama virusun bulaşmasını azaltmada önemlidir. Kontamine yüzeylerin hemen dezenfekte edilmesi gerekir.

Rotavirus dezenfektanlara oldukça dirençlidir. Fenol, %2 formalin, %5 lysol, %6 H₂O₂ ve %80-95 etanol etkili dezenfektanlardır. Ayrıca %1 sodyum hipoklorid etkilidir, ancak fekal materyal aktivitesini azaltabilir, bu sebeple dezenfeksiyondan önce yüzeyler deterjanla temizlenmelidir. Klorheksidin, klorform, eter ve pH 4-9'a dirençlidir².

2.8. Hastalık Belirtileri

Rotavirus enfeksiyonu genellikle 6-24 ay arası çocuklarda özellikle kış aylarında ortaya çıkmaktadır. Hemen her çocuk 5 yaşından önce semptomatik veya asemptomatik olarak rotavirus ile enfekte olmaktadır. Çocuklarda rotavirus enfeksiyonlarının klinik spektrumu asemptomatik enfeksiyondan dehidratasyon ile seyreden ciddi diareye kadar değişir. Rotavirus hastalığının inkübasyon süresi 1-4 gündür. Rotavirus gastroenteritin klinik belirtileri 4-8 gün sürer. Rotavirus çocuklarda hafif ateş (%60-65) ve kusma (%60-70) ile başlar. Genellikle 1-3 gün süren kusmayı ani başlayan sulu diare izler. Sulu diare 5-8 gün sürer ve genellikle günde 10-20 kez dışkılama görülür ve sonuç olarak ciddi dehidratasyona sebep olur. Ateş genellikle 38.5-39.5°C'de 1-2 gün sürer. Önemli dehidratasyon varsa ateş daha yüksek olabilir. Abdominal ağrı da görülebilir.

Bazı vakalarda hızlı ve ciddi dehidratasyon özellikle 2 yaşından küçük çocuklarda ölümlere sebep olmaktadır. Gelişmiş ülkelerde hastanede yatan premature bebeklerin büyük risk altında olduğu gösterilmiştir^{53,54}.

Maternal antikorun koruyucu etkisinden dolayı 4-6 aydan küçük yeni doğanlarda enfeksiyonlar sıklıkla asemptomatik olup vakaların sadece %10-20'sinde semptomatiktir ve genellikle hafiftir. Ancak prematüre bebeklerde ciddi enfeksiyonlar görülebilir.

Rotavirus ile sekonder enfeksiyonlar klinik olarak daha hafif veya asemptomatik şekildedir. Yetişkinler çocuklara kıyasla daha sık asemptomatik rotavirus enfeksiyonuna maruz kalmalarına rağmen semptomlar olduğunda genellikle ishal, ateş, baş ağrısı, halsizlik, mide bulantısı ve kramp görülebilir^{52,55}.

Yetişkin gönüllüler üzerinde yapılan bir çalışmada rotavirus inokulumu ağızdan verildiğinde enfekte kişilerin %67'sinde serolojik değişiklik gözlenirken yalnızca %33'ünde belirgin semptomlar gözlenmiştir. Inkübasyon süresi 2-4 gün sürmüştür. İnce barsakta hem makroskopik değişiklikler (ince barsak duvarında kalınlaşma) hemde mikroskopik değişiklikler (villuslarda küntleşme, mikrovilluslarda azalma, mononükleer hücrelerin infiltrasyonu ve intestinal hücrelerde kolumnar yapıdan kuboidal yapıya değişim) hastalığın göstergesidir^{56,57}.

Akut gastroenteritlerin yaygın görülen özellikleri arasında dehidratasyon, elektrolit kaybı, metabolik asidoz, beslenme yetersizliği ve diaper dermatiti (çocuk bezi dermatiti) gibi belirtiler rotavirus infeksiyonunuda görülebilir. İmmun yetmezliği olan çocuklarda barsak dışı yayılım oldukça yaygındır².

Rotavirus infeksiyonu kemik iliği transplantasyonu olacak immün sistemi baskılanmış hastalar özel bir tedavi gerektirir. Kemik iliği transplantı olan gastroenteritli hastalarda yapılan bir çalışmada 78 hastanın 8'inde rotavirus tespit edilmiş ve bu hastaların 5'i rotavirus gastroenteriti sebebiyle kaybedilmiştir. Bunun yanında rotavirus infeksiyonu yetişkin böbrek transplant alıcılarda ciddi diare ile ilişkili nosokomial infeksiyon olarak da ortaya çıkabilir.

Rotavirus infeksiyonlarının genel olarak sadece gastrointestinal yolla sınırlı olduğu düşünülürdü, fakat yeni çalışmalarda hem immün kompetan kişiler hem de immün eksikliği olan infekte çocuklarda rotavirus antijen veya viral RNA'nın kan, beyin omurilik sıvısı, karaciğer, safra kanalı, mezenterik lenf nodülleri, dalak, böbrek, boğaz ve akciğer gibi birçok ekstraintestinal yerlerde tespit edildiği bildirilmiştir, ancak bu bulguların klinik önemi açık değildir ve aktif araştırma altındadır. Rotavirus gastroenteritine sahip çocuklardan alınan serum örneklerinin %43-66'sında viremi görülür. Birçok çalışmada rotavirus gastroenteriti olan çocuklarda santral sinir sistemi infeksiyon sıklığı %2-5.7 arasında değişmektedir^{13,58}.

Rotavirus infeksiyonu ile ilişkili olabilecek olası diğer hastalıklar tip 1 diabet hastalığı ve Çölyak hastalığıdır. Tip 1 diabet hastalığı için Avusturalya'dan bir grup araştırmacı rotavirusun yüzey proteini VP7 ve iki otoantikorun immundominant epitopu arasında moleküler benzerlik olduğunu bildirmiştir. Bu otoantikorlar pankreatik adacıkların yıkımına aracılık eden T hücreler için gereklidir ve tirozin fosfat IA-2 ve GAD65 olarak isimlendirilirler. Daha sonra Avusturalya'lı araştırmacılar rotavirus serokonversiyonu ve diabet riski olan çocuklarda IA-2, insulin ve GAD65 antikor seviyesinin artması arasında bir ilişki olduğunu bulmuşlardır. Ancak yapılan en son çalışmalar bu bulguları desteklememiştir. Aynı şekilde Çölyak hastalığında rotavirus VP7 ve transglutaminler arasında moleküler benzerlik olduğu belirtilmiştir^{59,60}.

2.9. Epidemiyoloji

Rotaviruslar hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde 5 yaşın altındaki çocuklarda ciddi gastroenteritin başlıca etkeni olup viral gastroenterit vakalarının %50-80'nine sebep olur. Genellikle endemiktir, fakat nadiren salgınlardan sorumlu olabilir.

Rotavirus bütün dünyada diareye bağılı ölümlerin yaklaşık %25'inden sorumludur. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO, World Health Organisation) 2000-20004 yılları arasındaki verilere göre 5 yaş altındaki çocukların diare sebebiyle tahmini ölüm sayısı (1.566.000/yıl) dikkate alındığında her yıl rotavirusa bağılı ortalama 611.000 (454.000-705.000) ölüm olduğu bildirilmiştir ve bu oran tüm 5 yaş altı çocuklarda görülen ölümlerinin %20'sini oluşturmaktadır⁶¹. Bu ölümlerin büyük çoğunluğu, %82'i gelişmekte olan ölkelerde görülür ki her gün yaklaşık 1.205 çocuk rotavirus sebebiyle hayatını kaybeder. Gelişmiş ölkelerde ise mortalite düşük olmasına rağmen morbidite yüksektir ve her yıl 220.000 çocuk rotavirus gastroenteriti sebebiyle hastaneye kaldırılırki bu oran yaklaşık 50 çocukta 1'e denk gelir⁶².

Dünyanın çeşitli bölgelerinde 1986-2000 yılları arasında yapılan çalışmalardaki verilere göre ise her yıl 5 yaşın altında ortalama 2.100.000 çocuk diare sebebiyle kaybedilmiştir ve bunların 440.000 (352.000-592.000) kadarı rotavirus gastroenteritine bağılıdır⁶³. Dünyada gelişmiş ve gelişmekte olan ölkelerde 1986-2000 yılları arasında 5 yaş altı her yıl rotavirusun sebep olduğu 138 milyon diare vakası görölmüştür. Bu vakaların 111 milyonu evde tedavi edilmiş, 25 milyonu kliniklere başvurmuş, 2 milyonu hastaneye yatırılmış ve ortalama 440.000 çocuk hayatını kaybetmiştir. Başka bir deyişle 5 yaşına kadar rotavirus gastroenteritine sahip olan hemen her 5 çocuktan 1'i kliniklere başvurmakta, her 65 çocuktan 1'i de hastaneye yatırılmakta ve yaklaşık olarak her 293 çocuktan 1'ide rotavirus gastroenteriti sebebiyle ölmektedir. Beş yaş altı çocuklarda diareye bağılı ölümlerin oranı gelir seviyesinin artması ile azalan bir eğilim göstermektedir. Bu oran az gelişmiş ölkelerde %21; gelişmekte olan ölkelerde %17; gelişmiş ölkelerde %9 ve çok gelişmiş ölkelerde %1 dolayındadır. Az gelişmiş ölkelerde diareden görülen 2.1 milyon ölümün ortalama %85'i (N=1,805,000) çocuklarda görölmektedir^{62,63}.

Rotavirus ölümlerinin %80'den fazlası Güney Asya ve Afrika gibi az gelişmiş ölkelerde görölmektedir. Örnek olarak bir yıl içinde rotavirusa bağılı Asya ölkelerinde yaklaşık olarak 230.000, Afrika ölkelerinde 183.000 ölüm görülürken, Latin Amerika ölkelerinde 15.000 ölüm görölmektedir. Bu yıllık ölüm oranları Pakistan'da >25.000, Çin'de >30.000, Hindistan'da >100.000 dolayındadır⁶⁴. Böylece hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ölkelerde yaşamın ilk 5 yılı boyunca hemen hemen her çocukta rotavirus diareisi gelişmektedir. Fakat rotavirus infeksiyonun sonuçları oldukça farklıdır. Gelişmekte olan ölkelerde ölümler daha sık görölmektedir. Çünkü kötü beslenme, sanitasyon koşullarının uygun olmaması, sınırlı tedavi imkanlarının olması gibi pek çok faktör buna sebep olmaktadır⁶¹.

Rotavirus tüm dünyada çocuklar arasında diareye bağlı hospitalizasyonun en önde gelen sebebidir. Hastaneye yatırılması gereken gastroenterit vakalarının %20-60'ından rotavirusun sorumlu olduğu gösterilmiştir. Pek çok gelişmiş ülkede hastaneye yatışlara sebep olan yıllık rotavirus insidansının her 100.000 çocukta ortalama 445 (100.000 de 283-715) olduğu hesaplanmıştır⁶⁵. Bu insidans ile gelişmiş ülkelerde 5 yaş altı çocukların total popülasyonunun çarpımı sonucunda toplamda 223.000 (ortalama 142,000–358,000) vakanın rotavirusla ilişkili hastaneye yatışa sebep olduğu ortaya çıkmıştır.

Rotavirus diareesine bağlı hospitalizasyonların oranı gelir seviyesinin artması ile artan bir eğilim göstermektedir. Bu oran az gelişmiş ülkelerde %20; gelişmekte olan ülkelerde %25; gelişmiş ülkelerde %31 ve çok gelişmiş ülkelerde ise %34 dolayındadır⁶³.

Rotavirus hastaneye yatırılan akut gastroenteritli çocuklarda en çok izole edilen etken olup büyük ekonomik kayıplara yol açar. CDC'nin (Centers Disease Control) 2001-2008 yılı raporunda bütün dünyada 5 yaş altı çocuklarda diareten dolayı hastaneye yatışların %40'ından rotavirusun sorumlu olduğu açıklanmıştır. Bu oran daha önce yapılan çalışmalardan daha yüksektir. Beş yaş altı çocuklarda rotavirus enfeksiyonunun sebep olduğu hastaneye yatış oranları 1986-1999 yıllarında %22, 1990-2004 yıllarında %29'dur⁶⁶.

Beş yaş altı çocuklarda yalnızca evde tedavi gerektiren rotavirus gastroenteriti vakalarının toplam sayısının 7,122,000 (ortalama 2,123,000–17,881,000) olduğu tahmin edilmektedir⁶¹.

Rotavirus enfeksiyonu ılıman iklimlerde tipik olarak kış mevsiminde görülür, oysa tropikal bölgelerde rotavirus diareisi bütün yıl boyunca gözlenir. Ancak rotavirus enfeksiyonun mevsimsel olarak kış aylarından bahar aylarına doğru kaydığına yönelik de çalışmalar vardır. Buna sebep olan etkenler bilinmemektedir. Nemin enfekte bir yüzey üzerinde virusun hayatta kalmasında etkili olduğu bilinmesine rağmen rotavirus enfeksiyonlarında görülen mevsimsel değişiklik nemden ziyade sıcaklık ile daha çok ilişkilidir. Güney Kaliforniya, Nevada ve Yeni Meksika'da Kasım ve Aralık aylarında rotavirus gastroenterit insidansı pik yapmaya başlar. Kuzey ve Doğu Amerika'da hastalığın pik yaptığı aylar kış ve bahar aylarıdır².

Rotavirus diareisi başlıca yeni doğan ve küçük çocuklarda 6-24 aylarında pik insidans yapar. Dünyada, hem gelişmekte olan ülkeler hem de gelişmiş ülkelerde her çocuk 5 yaşına kadar rotavirus ile enfekte olmuştur. Her doğal enfeksiyon, sonraki hastalığa karşı daha fazla koruma sağlar. Üç yaşından sonra ciddi diare nadirdir, 5 yaşından büyük çocuklarda semptomatik hastalık yaygın değildir. Rotavirus öncelikle infantil diarenin etkeni ise de erişkinlerde hafif hastalığa sebep olabilir. Reinfeksiyon bütün yaşlarda ortaya çıkabilir, fakat

semptomlar yaşı bağı olarak değişiklik gösterir. Rotaviruslar ayrıca turist diarezi vakalarının %20-25'inde tespit edilir^{2,13}.

Rotaviruslar nozokomiyal infeksiyonların çok önemli bir sebebidir. Çocuklarda görülen nozokomiyal diare vakalarının %31-87'sinden rotavirus sorumludur. Nozokomiyal rotavirus infeksiyonları çoğunlukla 5 aylıktan küçük bebeklerde ve özellikle hospitalizasyonun 2. ve 6. günleri arasında ortaya çıkar. Rotavirus infeksiyonların %20-40 kadarı asemptomatiktir. Asemptomatik infeksiyonlar sıklıkla 3 aylıktan küçük bebeklerde görülür.

İnsanlarda sadece rotavirus grup A, B ve C hastalık yapar. Çocuklarda rotavirus infeksiyonlarının çoğuna grup A rotavirus sebep olur. Grup A rotavirusları bütün dünyada ciddi infantil gastroenteritin %25-65'ine sebep olur. Grup A rotavirus infeksiyonlarının çoğu endemik olmasına rağmen özellikle hastane, kreş ve yaşlıların bakım evlerinde salgınlara sebep olabilir. Hastenelerde immün sistemi bozuk hastalar arasında da salgınlara oluşturabilir. Global olarak en çok görülen epidemiyolojik önemi olan 5 rotavirus tipi G1P[8], G3P[8], G4P[8] ve G2P[4] ve G9P[8] bütün suşların % 90'dan fazlasını oluşturur. Epidemiyolojik çalışmalar bir bölgede her yıl baskın rotavirus tiplerinin değişebildiğini göstermiştir.

Grup B rotavirusu ilk kez 1982 ve 1983'de Çin'de bir milyondan fazla erişkinde su orijinli ciddi diare salgınlara sebep olmuştur. Bu sebeple grup B rotavirusuna "adult diarrhea rotavirus; ADRV" da denir. ADRV isminden anlaşıldığı gibi en çok erişkinlerde hastalık yapar, yeni doğan ve çocuklarda semptomatik infeksiyonlarda nadiren tespit edilir. Çin dışında ilk kez 1997 ve 1998'de Hindistan'da ve 2000 ve 2001 yılında Bangladeş'te erişkinlerde sporadik gastroenterit vakalarından izole edilmiştir¹³.

Grup C rotavirus, sporadik diare vakaları ile ilişkilidir, salgınlara nadiren sebep olur. Başlıca yiyecek orijinli çocukluk çağı diarezi ile ilişkilidir. Grup C rotavirusları tüm dünyada bulunmaktadır. İngiltere, Japonya, Asya, Brezilya ve Avrupa'da Grup C rotavirus diare salgınları bildirilmiştir fakat grup A rotaviruslarından daha az yaygındır. Birçok seroepidemiyolojik çalışmalar insanların %3-45'inin grup C rotavirusuna karşı antikorları olduğunu göstermiştir. Grup C rotavirusuna karşı antikor prevalansı Japonya'da %30, İngiltere'de %43 ve Güney Afrika'daki bir çalışmada %34.4 bulunmuştur. Ancak akut gastroenterili vakalarda grup C rotavirusun tespiti sınırlıdır. Brezilya'da yapılan bir çalışmada akut gastroenteriti olan hastaneye başvuran 5 yaşın altındaki çocukların %1'inde tespit edilmiştir.

Grup D, E, F ve G rotavirus infeksiyonları insanlarda gastroenterit ile ilişkili değildir.

Rotavirusun geniş konak dağılımı vardır. İzolatların çoğu yeni doğan hayvanlarda diareye sebep olmaktadır. Grup A rotavirüsleri hemen hemen bütün hayvanları infekte eder. Sığır ve domuz grup B ve C rotavirüsleri tespit edilmiştir. Bu durum influenzaya benzer şekilde genetik reassortment için potansiyel sağlar⁶⁷.

2.10. Tanı

Rotavirus ve diğer spesifik enterik patojenleri klinik belirtilerle birbirinden ayırt etmek mümkün değildir. Yapılan çalışmalarda farklı enterik patojenlerin klinik belirtileri arasında önemli farklılıklar gösterilmiş, fakat kesin kriterler belirlenememiştir.

Ateş, dışkıdaki asidik azalma ve serumdaki bikarbonat düşüklüğü gibi semptomlar rotavirus akut gastroenteritinde diğer akut gastroenteritine sebep olan organizmalara oranla daha belirgin şekilde görülür².

Dışkıda rotavirusun tespiti için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Konvansiyonel yöntemler (EM veya ELISA) kullanarak virüsün belirlenmesi için dışkı örneklerinin hastalığın ilk 4 günü içinde alınması uygundur. Semptomların başlangıcından 8 gün sonra toplanan örnekler nadiren virüs içerir. Ancak virüs atılımı semptomların süresine bağlı olarak 3 haftaya kadar da sürebilir ve bu süre içinde daha yüksek sensitiviteye sahip moleküler yöntemlerle (RT-PCR; reverse transcription polymerase chain reaction) virüs tespit edilebilir. Viral atılım genellikle diarenin olduğu süre ile aynı zamanda meydana gelir⁶⁸.

Rotavirusun tespiti için dışkı materyalinin direk görüntülenmesi EM (elektron mikroskopi) kullanarak gerçekleştirilir. Elektron mikroskobu patognomonik iki ve üç tabakalı rotavirus partiküllerinin hızlı idendifikasyonu için uygundur. Rotavirus partikülleri akut gastroenteritine sebep olan enterik adenovirüsler, norovirüs, sapovirüs ve astrovirüslerden farklı bir morfolojik görünüme sahip olduklarından bu yöntem yüksek bir avantaja sahiptir⁶⁹.

Rotavirusun tespiti için yalnızca birkaç örnek araştırılmak istenildiğinde EM en hızlı tanı metodudur, çünkü dışkı örnekleri direk olarak fosfotungstik asit ile boyanarak birkaç dakika içinde incelenebilir, ancak genellikle rutinde kullanılmaz.

Grup A rotavirüsü önceden proteolitik enzim olan tripsin ile muamele edilirse veya besiyerine düşük düzeyde tripsin ilave edilirse hücre kültüründe üretilebilir, ancak daha çok araştırma amacıyla bazı merkezlerde yapılmaktadır. Virüs izolasyonu için en sık kullanılan hücreler maymun böbrek hücre dizisi MA104 ve insan kolon karsinoma hücre dizisi CaCo-2'dir. Sitopatik etki minimaldir. Hücre kültüründe rotavirusun üretilmesi nötralizasyon yöntemiyle rotavirus serotiplerinin belirlenmesine izin verir⁷⁰.

Çeşitli otomatize yöntemler dışkı örneklerinde rotavirusun belirlenmesi için uygundur. Pek çok laboratuvar da ELISA ve lateks aglutinasyon testleri (LA) oldukça yüksek sensitiviteye sahip olması, özel ekipmanlara gereksinim duyulmadan kolay uygulanabilir olması, hızlı sonuç vermesi ve spesifik olmayan reaksiyonlar için bir kontrol grubuna sahip olması sebebiyle rotavirus tanısında yaygın olarak kullanılan testlerdir.

Dışkı örneklerinde rotavirus antijenlerinin tespiti için ELISA ve LA kitleri ticari olarak mevcuttur. Rotavirus LA testinin ELISA testine göre sensitivitesi daha düşük olup ELISA testinin sensitivitesi %98-100, spesifitesi %100'ü bulurken LA testini sensitivitesi %85-90, spesifitesi %100'dür. Ticari ELISA ve LA testleriyle gastroenteritlerin en yaygın sebebi olan sadece rotavirus Grup A tespit edilir⁷¹.

Serolojik testlerden özellikle ELISA testi rotavirus spesifik IgM, IgA ve IgG antikor cevabının tespiti için kullanılabilir. Bir çalışmada >3 aydan büyük çocukların %81'inde konvelesan serumunda rotavirusa karşı IgG antikor cevabında dört kat artış tespit edilmiş ve akut enfeksiyonun en iyi göstergesi olarak bildirilmiştir. Rotavirusa karşı spesifik IgA antikor cevabı akut fazda %18 ve konvelesan fazda %62 oranında tespit edilmiştir. Akut fazda IgM cevabı ise >6 aydan büyük çocukların %50-83, <6 aydan küçüklerde ise %28'inde pozitif bulunmuştur¹³.

Grup A rotavirusları G serotiplerinin tespiti için G1-G4 tip spesifik monoklonal antikorlara dayanan ticari ELISA testleri epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak diğer G serotiplerinin tayini için ticari ELISA testi yoktur. G5, G8, G9 ve G10 gibi diğer tiplerinin belirlenmesi için genotipleme testleri kullanılır. Grup A rotavirus subgrup I ve II tespiti için VP6 üzerindeki iki farklı epitop için spesifik monoklonal antikorların kullanıldığı ELISA testi geliştirilmiştir. Akut gastroenteritli hastalardan en çok izole edilen grup A rotavirus P1A ve P1B serotiplerinin araştırılması için de ELISA testleri vardır. Ancak VP4 antijeninde kros reaktif epitoplar bulunduğu için ELISA ile serotip ayırımı tam olmayabilir. Bu sebeple daha çok genotipleme metodları tercih edilir⁶.

Grup B ve C rotavirusların tanısı için VP6 antijenlerine karşı grup spesifik monoklonal antikorların kullanıldığı ELISA testleri geliştirilmiştir.

Hücre kültürü, poliakrilamid jel elektroforezi ve PCR gibi testler tanıda nadiren kullanılır. Serolojik tanı için kompleman fiksasyon, nötralizasyon, immunfloresan testleri tanı için tavsiye edilmemesine rağmen araştırma amaçlı kullanılabilir. Önceleri rotavirus serotiplendirilmesi için hiperimmun serum ile yapılan nötralizasyon testleri kullanılmış, ancak nötralizan antikorlar daha çok dış kapsidin majör proteini olan VP7'ye yönelik olduğundan VP4 serotiplerinin ayırımı etkin bir şekilde yapılamamıştır².

Rotavirusun tespiti için dot hibridizasyon yöntemi membran üzerinde ısı ile denatüre olmuş ve işaretlenmiş tek zincirli rotavirus transkriptlerinin insitu hibridizasyonu temel alınarak geliştirilmiştir. Yöntem oldukça yüksek spesifiteye sahiptir ve elde edilen sonuçlar EM, ELISA ve RNA analizi gibi diğer testler ile elde edilen sonuçlar ile uygundur. Dışkı örneklerinin çeşitli dilüsyonlarında rotavirusun tespiti için ELISA ve dot hibridizasyonun karşılaştırıldığı çalışmalarda dot hibridizasyon yönteminin doğrulayıcı ELISA yöntemine göre 10-100 kez daha fazla sensitiv olduğu görülmüştür⁷².

Rotavirus grup A'nın tespit edildiği tanı testleri arasında RT-PCR en önemlisidir ve antijen tespit metodlarına göre çok daha duyarlıdır. Bu yöntem standart elektroferotip yöntemlerinden 100.000 kez, hibridizasyon yönteminden ise 5000 kez daha sensitivdir. Bu yöntemle diarenin başlangıcından 4-57 gün sonrasına kadar virusun atılımı belirlenebilir⁷³.

Rotavirus tespiti için RT-PCR testinin kullanımı ELISA yöntemi ile tiplendirilemeyen rotavirus pozitif örneklerin genotiplendirilmesi için uygundur. Rotavirus aşısı yapımından önce prevalan suşların tespiti ve sonra yeni rotavirus tiplerinin ortaya çıkışının izlenmesinde grup A rotaviruslarının G ve P genotiplemesi önem taşır. Grup A rotaviruslarının G ve P genotiplemesi için spesifik cDNA problemleri ile nükleik asit hibridizasyon testi, RFLP (restriction fragment length polymorphism), tip spesifik primerler ile yapılan RT-PCR, nested RT-PCR, multiplex RT-PCR ve oligonükleotid mikroarray hibridizasyon testleri kullanılır. Genotipleme testlerinden en çok RT-PCR kullanılmaktadır. Grup A rotavirus G genotiplerinin tespiti için en çok seçilen VP7 konsensus primerleri Gouvea ve Das primerleridir^{13,74}.

Grup B ve C rotavirusların tanısı için RT-PCR testi birçok çalışmada kullanılmıştır.

Rotavirus genomunun poliakrilamid jel elektroforezisi (polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE) ile nongrup A rota virusları, grup A rotaviruslarından ayırt edilebilir. Sensitivitesi %90'dan fazla ve spesifitesi %100'dür. Grup A rotavirusun kısa elektroferotipleri genellikle subgrup I ve uzun elektroferotipleri ise subgrup II ile ilişkili bulunmuştur. Epidemiyolojik çalışmalarda elektroferotipleme viral bulaşmayı izlemede faydalıdır^{6,75}.

Rotavirus infeksiyonunun serolojik cevabının ölçümünde kompleman fiksasyon (KF) testi, immunfloresan (IF) testi, immun adherence hemaglutinasyon testi, ELISA, nötralizasyon, hemaglutinasyon inhibisyon ve immunositokimyasal boyama testleri de uygundur. KF testi 6-24 aylık hasta çocuklar arasında antikor cevabını belirlemede diğer testler kadar etkili iken 6 aydan küçük yeni doğanlarda ve yetişkinlerde etkili bir test değildir. Bu yaş grubunda IF, ELISA IgG, ELISA IgM ve ELISA IgA daha etkilidir. Çünkü IgA plasentaya geçemez. Rotavirus ELISA IgA özellikle pasif olarak elde edilmiş anneye ait IgG

antikorlarına sahip olan yenidoğanlarda serolojik cevabın gösterilmesinde oldukça etkilidir. Fekal rotavirus IgA antikor seviyesi duodenal IgA antikor seviyesi ile ilişkilidir. Bunun yanında ELISA ile tespit edilen fekal rotavirus IgA antikor seviyesindeki yükselme barsaktaki nötralizan antikor cevabını yansıtır⁷⁶.

Rotavirusun endemik olduğu aylar boyunca çocuklarda rotavirus akut gastroenteritinde görülebilecek veya fiziksel bulguları bulunan hastalıklar dikkate alınmalıdır. Basili dizanteri, hemolitik-üremik sendrom, miyokardit, konjestif kalp yetmezliği, barsak tıkanması, intrakranial basıncın artması, sepsis, ensefalit ve menenjit gibi hastalıklar benzer şikayetlere sebep olan fakat farklı durumları gerektiren ciddi rahatsızlıklardır. Buna ek olarak potansiyel olarak daha önemli enteropatojenlerin bulunması rotavirusun bulunmasını engellemez².

2.11. Tedavi

Rotavirus gastroenteritinin tedavisindeki ilk hedef diare ve kusma sonucu oluşan sıvı ve elektrolit kaybını yerine koymaktır. Tedaviye erken başlamak ciddi dehidratasyonun gelişmesini önlemek için çok önem taşır.

Dehidratasyon tedavisinde intravenöz sıvı verimi yıllardır başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Sıvı tedavisi, rotavirus akut gastroenteritine sahip hastalarda kişisel belirtilere, yaşa ve hastalığın şiddetine göre yapılır. Dehidrate olmayan ve kusması devam etmeyen çocuklara yaşına uygun olarak diyetler verilebilir. Dehidrate olmayan fakat kusması devam eden çocuklara evde sıvı alımını veya oral rehidrasyon solüsyonunun (ORS) alınmasını önermede fayda vardır. Evde alınması tavsiye edilen sıvılar; anne sütü, solüsyonlar (su, tuz, ve şeker) çorba ve sıkılmış meyve sularıdır. Buna ek olarak her bir sulu dışkıda 10mL/kg ve her bir kusmada 2mL/kg kaybedilen gastrointestinal kaybı yerine koymak için oral rehidrasyon solüsyonu ile birlikte uygun sıvıların alımı dehidretasyonun önlenmesinde ki yaklaşım da büyük önem taşır⁷⁷.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) standartlarına göre oral glukoz elektrolit formülü: sodyum 90mmol/L; klorür 80 mmol/L; potasyum 20mmol/L, sitrat 10mmol/L ve glikoz 110mmol/L olmak üzere toplam ozmolaritesi 310 mOsm/L'dir. Son zamanlarda içeriğindeki sodyum konsantrasyonunun azaltıldığı oral rehidrasyon solüsyonlarının WHO'nun önerdiği solüsyon standartlarına göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Böylece solüsyon konsantrasyonunda sodyum 75mmol/L; klorür 65 mmol/L; potasyum 20mmol/L, sitrat 10mmol/L ve glikoz 75mmol/L olmak üzere toplam ozmolaritesi 245 mOsm/L şeklinde

formül oluşturularak kolerası olmayan yeni doğan bebekler üzerinde yapılan çalışmalarda WHO oral rehidrasyon solüsyon standartları karşılaştırılmıştır⁷⁸.

Eğer oral rehidrasyon, sıvı ve elektrolit kaybını yerine koymaz veya hastada ciddi dehidratasyon var ve şokta ise derhal intravenöz sıvı verilmelidir. Bazı çocuklar şiddetli dehidrate olduğunda eğer abdominal distasyon, barsak tıkanması, aşırı kusma veya letarjiden dolayı oral rehidrasyon solüsyonları alamıyorsa intravenöz rehidrasyona ihtiyaç duyabilir. Genellikle hemodinamik stabilite sağlanıncaya kadar normal tuzlu su veya laktatlı ringer solüsyonu 10-20 mL/kg verilir.

Daha önceden klinik denemeler sonucu pek çok çocuğun başlangıçta 30 mL/kg intravenöz sıvının alınımından sonra oral rehidrasyon sıvılarını tolere etmeye başlayabildiği belirlenmiştir. Şiddetli dehidrate olan çocuklar intravenöz sıvı alınımına kadar oral sıvı alınımını sürdürebilirler².

2.11.1. Beslenme

Ciddi diareli hastalıklar ile ilişkili ölümler oral rehidrasyon tedavisi ile başarılı bir şekilde azalmasına rağmen bazı çocuklar için bir problem olmaya devam etmektedir. Çünkü oral rehidrasyon tedavisi düşük kalorilidir ve rehidrasyon ortaya çıktıktan mümkün olduğu kadar kısa bir sürede beslenmeye başlaması tavsiye edilir. Rehidrasyona rağmen bol miktarda kusma devam ettiğinde kusma azalana kadar kaybedilen sıvının yerine konulması için alınan oral rehidrasyon solüsyonları veya evde alınması önerilen çeşitli sıvıların alınımının devam etmesi yüzünden normal beslenmeye yeniden dönülmesinin geciktiği görülmektedir. Klasik diyet olarak akut gastroenterit tedavisi için muz, pirinç ve elma püresi alınması bazı uzmanlar tarafından eleştirilmiş ve bu besinlerin düşük enerjili, az yağlı ve düşük proteinli olduğu belirtilmiştir⁷⁹.

Rotavirus diareisini de kapsayan çeşitli patojenler ile ilişkili diare hastalığı olan ve hastanede yatan yeni doğan ve küçük çocuklarda pirinç bazlı solüsyonlar ile glikoz bazlı oral rehidrasyon solüsyonları kıyaslanmıştır. Her biri etkili bulunmuştur, fakat pirinç bazlı solüsyonun toplam dışkı atılımını azaltma, absorpsyonu artırma ve sıvı ve elektrolit oranını dengede tutma açısından daha etkili olduğu görülmüştür⁸⁰.

Sınırlı çalışmalarda meyve pektinlerinin (örneğin muz ve elma püresi) ve nişastanın (örneğin pirinçte bulunur) kolon florasında bulunan kısa zincirli ağır asitler tarafından yıkıldığı belirtilmiştir. Kısa zincirli ağır asitler kolon mukozası üzerinde besinsel etkiye sahiptir, kolonda enerji kaynağı olarak korunur ve sodyum emilimini uyarır. Pirinç içerikli oral rehidrasyon solüsyonları ve diyet tedavisinin bir parçası olan yeşil muz ve pektinin

diareye bağlı sıvı kaybını azalttığı ispatlanmıştır. Şimdilik çocukların yaşına uygun olarak kompleks karbonhidrat, et, yoğurt ve meyveleri içeren diyetleri tüketmeleri tavsiye edilmektedir⁷⁹.

Anne sütü sağlıklı infantların beslenmesi için en iyi kaynak olmasına rağmen oral rehidrasyon solüsyonlarından daha fazla ozmolariteye ve daha az sodyuma sahiptir. Ayrıca anne sütünün karbonhidrat kaynağı olan laktoz, akut gastroenterite eşlik eden ciddi disakkaridaz eksikliğinin olduğu vakalarda uygun olmayabilir. Yine de antirotaviral özellikleri olan laktoferrin ve laktadherin ve antirotaviral IgA anne sütünde bulunduğundan rotavirus akut gastroenteritine sahip bebeklerin anne sütü ile beslenmesinin tedavide yararı vardır. Böylece akut gastroenterit boyunca yeni doğan bebeklerin anne sütü ile beslenmeye devam etmesi tavsiye edilmektedir. Yeni doğan dehidrate ve anne sütünde doğal olarak bulunan faydalı özellikler yetersiz ise oral rehidrasyon solüsyonları veya intravenöz sıvı tedavisi gereklidir⁸¹.

2.11.2. Antiemetikler

Dopamin reseptör antagonist sınıfının antiemetikleri oral rehidrasyonu bozabilen (sedasyon, akatizi ve distoni) yan etkiye sahiptir. Ondansentron'un klinik denemeleri kusmayı azalttığı ve intravenöz rehidrasyona çok gerek duyulmadığını göstermiştir. Hala rutinde kullanılan bu ilaçlar üzerine yeterli çalışmalar yapılmadığı için akut gastroenteritlerin tedavisinde kullanılması önerilmemektedir⁸².

2.11.3. Diare tedavisi için kullanılan konvansiyonel antidiareel ilaçlar

Diarenin semptomatik tedavisi kusmanın tedavisinden daha fazla tartışılmaktadır. Antimotilite ve antisekretuar ilaçlar diareye karşı kullanılması için tavsiye edilmemektedir. Opiat ve antikolinergik bazlı ilaçların çocuklar üzerindeki toksitesi, letarji, barsak düğümlemesi, koma ve hatta ölüm gibi yan etkileri belirlenmiştir⁸¹.

Pek çok geniş spektrumlu antiviral ilaçların etkinliği in vivo şartlarda rotavirus replikasyonunun inhibitörü olarak araştırılmıştır. Antirotavirus aktivitesine sahip çeşitli adenozin analogları bulunmuştur. Bu analogların viral mRNA'nın olgunlaşması için gerekli metilasyonu düzenlemede görevli olan S-adenozin homosisteinin hidroliz enziminin aktivitesini engelleyerek işlev gördüğü ileri sürülmüştür⁸³. Yapılan çalışmalarda raceadotril'in (enkephalinaz inhibitörü) rotavirus diaresinin de içinde bulunduğu sulu ishali olan pediatrik hospitalize hastaların tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir, ancak bu konu ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır⁸⁴.

2.12. Rotavirus Hastalığının Ekonomik Yüğü

Ekonomik açıdan ÷lkeye zarar veren bütün önemli hastalıklar düşün÷ldüğünde, direk maliyet (medikal ve medikal dışı) ve indirek maliyetlerden birey ve topluma kadar her şey düşün÷lmelidir¹. Direk medikal maliyetler; doktor, hastaneye yatış ve laboratuvar tanısının maliyeti; diğer medikal dışı maliyetler ve buna ek olarak çocuk bezi, taşıma maliyeti ve bebek bakımı maliyeti gibi birçok gideri içermektedir. İndirek maliyetler kazanç kaybından çalışma zamanının kaybı ve hasta çocuğa bakmak gibi ve diğer maliyetleri de içine alan ailenin yaşam kalitesinin düşmesi ve stres yaşaması gibi birçok olumsuz şartları da beraberinde getirmektedir.

Finlandiya’da 1990 yıllarında yapılan bir çalışmada rotavirus hastalığının toplam maliyetinin %89’u için direk maliyet hesabı açıklanmıştır ve bunun %75’inin hastaneye yatışla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Diğer ÷lkelerde medikal maliyet, medikal dışı maliyetle (çalışma kaybının olması, verimin düşmesi, ulaşım ile ilişkili maliyetler) kıyaslanmış ve birbirinden farklı olabildiği bildirilmiştir. İngiltere’de 1994 rakamlarına göre, hastane ve doktor masraflarını karşılamak için gerekli olan medikal dışı maliyet hastalığın toplam maliyetinin %47’sini oluşturmuştur⁸⁵.

Avrupa’da 25 ÷lkede 2000-2003 yılları arasında 5 yaş altı çocuklarda rotavirus gastroenteritinden dolayı hastaneye yatan çocukların yıllık ortalama sayısının 87.713 olduğu düşün÷lürse hastaneye yatışların toplam yıllık maliyeti 106 milyon doları geçmektedir⁸⁶. Hastalığın sağlık bakım kaynakları üzerindeki yükü özellikle kış ayları boyunca yüksek oranda görülür. Rotavirus vakalarının pik yaptığı mevsimlerde tesadüfi olarak influenza ve RSV (respiratory syncytial virus) gibi diğer hastalıklarında insidansının pik yaptığı döneme rastlamaktadır⁸⁶. Nozokomiyal rotavirus enfeksiyonu; virusun yayılımının önlenmesi için yeni hastaların kabul edilememesinin maliyeti ve hastanede yatışların uzamasından dolayı önemli bir ekonomik yüke sebep olmaktadır⁸⁷.

2.13. Korunma

Rotaviruslar, gelişmekte olan ÷lkelerde olduğu gibi gelişmiş ÷lkelerde de 5 yaş altı çocuklarda gör÷len akut enfeksiyöz ishallerin en önde gelen sebebidir. Rotavirus gastroenteriti sebebiyle dünya genelinde her yıl yaklaşık 25 milyon çocuk kliniklere başvurmakta ve 2 milyon çocuk rotavirus gastroenteriti sebebiyle hospitalize edilmektedir. Üstelik uygun rehidratasyon tedavilerinin yapılması ve tedaviye erken başlanması çabalarına rağmen

rotavirus hospitalizasyon oranları geçen 15 yılda çok azalmamıştır. Bu ağır hastalık yükü sebebiyle rotavirus gastroenteritinden korunma gereksinimi vardır. Akut gastroenteritlerden korunmada, anne sütü, el yıkama ve oyuncakların dezenfeksiyonu gibi önlemlerin yeri yatsınamaz. Ancak, bakteriyel gastroenteritlerden korunmada önemli olan kişisel ve toplumsal hijyen kuralları, rotavirus infeksiyonlarının önlenmesinde çok etkili değildir. Demokratik virus olarak da tanımlanan rotavirusların sebep olduğu gastroenteritler, hijyen koşullarından bağımsız olarak, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde benzer sıklıkta görülür. Bu sebeple rotavirus ishalinin önlenmesinde tek yöntem rotavirusa karşı aşılama¹⁶.

Rotavirus aşısından beklenen doğal rotavirus infeksiyonuna benzer immunité oluşturarak, orta/ciddi infeksiyona karşı koruması, hastane yatışları, ölümleri önlemesi, morbidite ve ekonomik kayıpları azaltması ve hastalığın süre ve ciddiyetini hafifletmesidir⁷⁷.

İlk rotavirus aşısı çalışmalarında değişik hayvan rotavirusları attenüe edilmiştir. İnsanda kullanılan hayvan kökenli ilk rotavirus aşısı “bovine Nebraska calf diarrhea virus” (P6[1]G6) suşu ile çalışmalar 1971 yılında başlatılmıştır⁸⁸. İlk olarak canlı oral rotavirus aşısı olan RIT 4237 bovine rotavirus aşısı ile hayvan çalışmaları daha sonra 1982 yıllarından itibaren ise insan çalışmaları başlatılmıştır⁸⁹. Ancak, hayvan orjinli olan RIT 4237 aşısı beklenen etkiyi göstermediğinden 1986 yılında üretimi durdurulmuştur. Daha sonraki yıllarda aşı çalışmaları, RIT 4237’ye göre daha fazla pasajın yapıldığı, bu sebeple daha immunojen olacağı düşünülen WC-3 bovine rotavirus aşısı ile sürdürülmüştür⁹⁰.

Hayvan orjinli aşılarla ilgili başarısız deneyimlerin ardından reassortant aşı çalışmaları başlatılmıştır. Serotipik olarak birbirinden ayrı dört VP7 komponentini içeren bir insan-simian reassortant rotavirus aşısı (RotaShield) 1990’larda geliştirilmiş olup Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Venezuela’da küçük çocuklarda şiddetli rotavirus diareisini önlemede güvenli ve etkili olduğu gösterilmiştir. Rotavirusa karşı ilk canlı oral reassortant aşı olan Rotashield rhesus rotavirus tetravalan vaccine (RRV-TV) insanlarda en yaygın görülen 4 rotavirus G tipinden (G1-G4) oluşur⁹¹.

Rotashield (Wyeth Laboratories; ABD), bir rhesus maymun rotavirusu ve üç rhesus maymun-insan reassortant rotavirusdan oluşan tetravalan bir aşıdır. Rhesus rotavirusu attenuasyonu sağlamaktadır. Rhesus rotavirusu G3 spesifitesi taşır, üç rhesus-human reassortant rotavirusdan her biri ise G1, G2 veya G4 genlerinden her birini taşır. ABD’de FDA 31 Ağustos 1998’de canlı oral RRV-TV aşısının yeni doğanlarda 3 doz halinde kullanılmasını onaylamıştır¹³. Klinik çalışmalar aşının hastaların %48-68’inde yeni rotavirus infeksiyonunu önlediğini ve ciddi diareye karşı ise %64-91’inde koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. İmmünizasyon 2. 4. ve 6. aylarda önerilmiş olup iki aşı arasında en fazla 3 hafta

süre olmalıdır. Diğer çocukluk çağı aşıları ile aynı zamanda verilmiş ve lisans almasından sonra yaklaşık 600.000 bebeğe 1.2 milyon doz aşı uygulanmıştır. Ancak aşılanan çocuklarda barsak tıkanması vakalarının bildirilmesinden sonra Temmuz 1999'da aşı geri çekilmiştir. Aşıya bağlı yan etki 15 vakada bildirilmiş ve 12'si aşı verilmesinden sonraki 1 haftada ortaya çıkmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar aşılamaı izleyen ilk 1-2 haftada gelişen barsak tıkanması ilişkisini doğrulamıştır⁹².

Rotashield aşısının geri çekilmesi yeni aşı geliştirme çabalarını artırmıştır. Birçok rotavirus aşı adaylarının klinik denemeleri yapılmaktadır ve birkaçı yeni doğanların aşılamaı için onaylanmıştır^{13,93}. Son zamanlarda lisans almış iki yeni rotavirus aşısı RIX4414 suşundan hazırlanan monovalan Human Rotavirus Aşısı (HRV) olan Rotarix (GlaxoSmithKline Biologicals, Belçika) ve Pentavalan Human-Bovine Reassortant Rotavirus Aşısı (PRV) olan RotaTeq farklı yaklaşımlar kullanılarak dizayn edilmiştir. Her iki aşı içinde güvenlikle ilgili durumları belirlemek için büyük faz III klinik çalışmalar yapılmış, herbir çalışmaya 60.000'den fazla infant dahil edilmiştir. Her iki aşının da güvenilir olduğu ve barsak tıkanması ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir ve herhangi bir rotavirus diareesine karşı %70, şiddetli rotavirus diareesine karşı ise %90 koruma sağladığı gösterilmiştir⁹⁴.

Rotavirus aşıları, hastane yatışlarını (%96), acil servis başvurularını (%93), iş gücü kayıplarını (%87) azaltır^{13,95}.

2.13.1. Pentavalan Human-Bovine Reassortant Rotavirus Aşısı (PRV, RotaTeq)

Beş insan-sığır reassortant rotavirus suşundan oluşan pentavalan, canlı attenüe bir aşıdır. İnsan barsağında Rotarix suşlarına göre daha az replike olur. Reassortant suşlarda hayvan rotavirusundan gelen 10 genomik segment ve insan rotavirusundan gelen epidemiyolojik önemi olan G ve P tiplerini kodlayan bir genomik segment bulunur. RotaTeq aşısı beş insan-sığır reassortant rotavirus suşundan oluşmakta olup sığır rotavirus suşu WC3 (P7[5]G6) kullanılmıştır. Bu aşının fazla sayıda serotip içerecek şekilde formüle edilmesindeki yaklaşım yüksek koruyucuk sağlamanın düşünülmesidir. Aşıda dolaşımda en sık görülen insan rotavirus gerotipleri (G1, G2, G3, G4 ve P1A[8]) bulunur⁹⁶.

RotaTeq 2 ml sıvı formdadır ve oral yolla 3 doz (2, 4 ve 6 aylık) halinde uygulanır. İki doz arasında en az 4 hafta olması önerilir. Aşılamaya 6-12 haftada başlanmalıdır. İlk dozun 12 haftadan büyük bebelere uygulanmasının güvenilirliği yoktur. Aşılama 32. haftaya kadar tamamlanmalıdır³⁴.

PRV aşısının barsak tıkanması riskini değerlendirmek amacıyla, 2001 yılında Finlandiya ve ABD' de plasebo kontrollü bir çalışma uygulanmıştır. Bu çalışmada, 6- 12

haftalık bebeklere 4-10 hafta arayla 3 doz (en son aşı dozu 32 haftayı geçmeyecek şekilde) PRV veya plasebo uygulanmıştır. Daha sonra, Orta Amerika ülkeleri, İsveç, Almanya, Belçika, İtalya ve Tayvan'ın da katılımıyla çalışmaya alınan bebek sayısı 70.301'e ulaşmıştır. Bu geniş çalışma grubunda, her hangi bir aşı dozundan sonraki 42 gün içinde plasebo grubunda 5, aşı grubunda 6 barsak tıkanması vakası saptanmıştır. PRV'nin ilk dozundan sonra 1 yıllık izlem periyodunda aşı grubunda 12, plasebo grubunda ise 15 barsak tıkanması vakası bildirilmiştir. Barsak tıkanması için relatif risk 42 gün içinde 1.6 (%95 CI, 0.4-6.4) ve 1 yılda 0.9 (%95 CI, 0.4-1.9) dur⁹⁷.

RotaTeq Avrupa ve Amerika'da lisans almış olup yapılan ilk çalışmalarda rotavirus ile ilişkili diareye karşı yaklaşık %75 koruyucu ve ciddi diareye karşı %90'dan fazla etkili olduğu bulunmuştur. Hospitalizasyonu %96 ve kliniklere başvuruları %86 oranında azaltmaktadır⁹⁸.

2.13.2. Monovalan Human Rotavirus Aşısı (HRV, RIX4414 suşu, Rotarix)

İnsan rotavirus suşu G1P1A[8] tipinden oluşan canlı attenüe monovalan bir aşı olup virulan rotavirus suşu G1P1A[8] tipi doku kültürlerinde birçok pasaj yapılarak attenüe edilmiştir. Barsakta iyi replike olur ve dışkı ile atılır. Rotarix korunmada homotipik antikor yanıtı kadar heterotipik antikor yanıtını uyarır. Monovalan human rotavirus aşısı (HRV) ile G1'in yanı sıra G2, G3, G4 ve G9 gibi diğer serotiplere karşı da nötralizan antikor yanıtı oluşmaktadır⁹⁹.

Rotarix aşısının 6 haftalıktan itibaren oral yolla 2 doz (minimum 4 hafta arayla) uygulanması önerilir. HRV, 2- 8°C'de depolanmalı ve saklanmalıdır. Diğer çocukluk aşıları ile birlikte uygulanabilir.

Monovalan human rotavirus aşısının immunojenisitesi ve güvenilirliği ilk kez Belçika'da erişkinlerde ve Almanya'da 1 yaş üstü çocuklarda denenmiştir. Daha sonra, Finlandiya'da bebeklerde bir pilot çalışma başlatılmıştır. Bu çalışmada; 2 ve 4. ay şemasıyla 2 doz uygulandığında, HRV'nin etkinliğinin %73, ağır rotavirus gastroenteritine karşı koruyuculuğunun ise %90'dan fazla olduğu olduğu gösterilmiştir¹⁰⁰.

Güney Amerika'da yapılan daha geniş, çift kör, plasebo-kontrollü çalışmada ise HRV aşısının etkinliği ve barsak tıkanması riski değerlendirilmiştir. Onbir Güney Amerika ülkesinin katıldığı ve 63.225 bebeğe aşı (31.673 bebek aşı grubu) ve plasebo (31.552 bebek plasebo grubu) verilen çalışmada HRV, 2 ve 4. ayda bebeklere 2 doz uygulanmıştır. Her hangi bir aşı dozundan sonraki 31 gün içinde plasebo grubunda 9, aşı grubunda 3 barsak tıkanması vakası saptanmıştır. HRV'nin ilk dozundan sonra 100 günlük izlem periyodunda

(bebekler 6 aylık olduğunda) aşı grubunda 9, plasebo grubunda ise 16 barsak tıkanması vakası görülmüştür. Çalışma grubundaki 20.000 infantın 1 yıllık izleminde, aşının ağır rotavirus gastroenteritine karşı koruyuculuğunun %85, ağır dehidratasyonla seyreden rotavirus gastroenteritine karşı koruyuculuğunun ise %100 olduğu saptanmıştır. Monovalan human rotavirus aşısı, G1 serotipine karşı (%92) etkili olduğu gibi G3 (%88), G4 ve G9 (%91) serotiplerine karşı da yüksek oranda koruyuculuk sağlamaktadır. G2 tipine karşı ise %41-67 koruyuculuk sağladığı gösterilmiştir¹⁰¹.

Sonuç olarak, yaklaşık 130.000 bebek üzerinde yapılan çalışmalar her iki yeni rotavirus aşısının da (monovalan HRV ve PRV) diare, özellikle ciddi diareye karşı etkin ve güvenli bir korunma sağladığını göstermektedir.

İki yeni rotavirus aşısı Rotarix ve Rotateq 2008 yılı itibariyle 100'den fazla ülkenin bulunduğu Avrupa, Amerika, Meksika, Latin Amerika ülkeleri, Orta Doğu, Asya ve Afrika ülkelerinde lisans alarak kullanıma girmiştir. Ülkemizde de bu iki yeni rotavirus aşısı için lisans başvurusu bulunmaktadır. Türkiye'de yapılan çalışmalarda, 5 yaş altı çocuklarda görülen ishallerin %15-40'ından rotavirusların sorumlu olduğu gösterilmiştir⁹⁸.

İzmir'de ishal nedeniyle hastaneye başvuran 920 çocukta yapılan bir çalışmada, rotavirusların 5 yaş altı çocuklarda görülen ishalin, özellikle de hastane yatışlarına sebep olan ağır ishalin %39.8 oranında en sık etkeni ve izole edilen suşların %91'inin serotip G1-4 ve en sık G1 serotipinin (%75.1) görüldüğü belirlenmiştir. Çataloluk ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, en sık G4P[8] (%42.2) serotipi tespit edilmiş ve serotip G1P[8], G2P[4], G3P[8] ve G4P[8] serotiplerinin rotavirus ishallerinin %73.4'ünden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu iki çalışmanın sonuçları her iki aşının da ülkemizde etkili olacağını göstermektedir. Ancak, bu konuda yapılacak daha geniş seroepidemiolojik çalışmalara ve aşı etkinlik ve yan etki çalışmalarına gereksinim vardır.

Bu iki aşı dışında, dünyanın birçok bölgesinde (Çin, Kore, Endonezya, Almanya ve Brezilya) rotavirus aşı geliştirme çalışmaları sürdürülmektedir. Lanzhou lamb rotavirus (LLR) aşısı 2000 yılında Çin'de Lanzhou Enstitüsü tarafından üretilen monovalan canlı attenüe oral aşısıdır. LLR aşısında kullanılan kuzu rotavirusu P[12]G10 tipinde olup ilk kez 1985'de izole edilmiştir ve hücre kültüründe pasajlar yapılarak attenüe edilmiştir. Çin'de lisans alan bir aşısıdır, Aşı tek doz oral yolla 2-24 aylık çocuklara verilir. Tek doz aşının etkinliği %73.3 bulunmuştur ve 12-23 aylık çocuklarda etkinliğin %80.9 oranla 2-11 aylık çocuklara göre (%60) daha yüksektir¹³.

Aşı gelişimine başka bir yaklaşım yeni doğanlarda asemptomatik infeksiyona sebep olan bazı rotavirus suşlarının kullanılmasıdır. İnsan neonatal rotavirus P2A[6]G3 suşu faz II çalışmasında 3, 5 ve 7 aylık bebeklere üç doz oral olarak verilmiş ve koruyuculuğu %54 bulunmuştur. Aşının etkinliğinin artırılması için çalışmalar sürmektedir. Diğer neonatal suşlardan ikisi Hindistan'da yeni doğanlardan izole edilen 116E suşu P8[11]G9 ve I321 suşu P8[11]G10 canlı aşı adayları olup preklinik çalışmaları yapılmaktadır. Bu neonatal aşı suşları (Bharat BioTech, Ltd) 116E ve I321 doğal olarak oluşan insan-sığır reassortant rotaviruslarıdır¹³.

Rotavirus infeksiyonlarına karşı inaktif rotavirus suşları veya baculovirus'ta eksprese edilen virus benzeri partiküllerin kullanılarak oral aşılarda geliştirilmesi için çalışmalar da vardır ve hayvan modellerinde test edilmektedir. Ayrıca rotavirusun bakterilerde eksprese edilen birçok yapısal proteinlerinden oluşan subünit aşılarda üretimi ve DNA aşılarda için de çalışılmaktadır.

Sonuç olarak rotavirus aşılarda reinfeksiyonu önlememekle beraber ağır gastroenterite karşı koruyucudur. Canlı aşı olduğu için immün yetersizliği veya şüphesi olan çocuklara yapılmaz. Anne sütü alan bebeklerde antirotavirus antikorları nedeniyle ilk aşı dozundan sonra elde edilen humoral immün yanıtta hafif azalma saptanmasına karşın, tekrarlanan dozdan sonra anne sütü alan ve almayanların yanıtları arasında fark bulunmamıştır. Aşı sonrası gelişen sistemik antikor yanıtı daha uzun süre devam eder. Eş zamanlı yapılan oral polio aşısı ve maternal antikorlarla interferansa karşı heterotipik korumayı artırmak için 2 veya 3 doz rotavirus aşısının uygulanması gerekmektedir⁹⁷.

Yeni rotavirus aşılarda maliyeti oldukça yüksek olup (ortalama 100 TL) aşının yaygın kullanıma girmesi için engel oluşturmaktadır. Ancak, çok yakın bir gelecekte aşı fiyatının düşeceği umut edilmektedir. Böylece, universal rotavirus bebek aşılması mümkün olacak ve çocukluk çağı gastroenteritlerinin bu en önemli etkenine karşı korunma ve kontrol sağlanarak yüz binlerce bebeğin yaşamı kurtulacaktır¹³.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Çocuk Enfeksiyon Bilim Dalının Polikliniğine, Çocuk Acil Tıp Birimine ve Adana Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinin Çocuk Servisine 1 Ocak 2008 ile 31 Aralık 2008 tarihleri arasında başvuran ve 5 yaş altı akut gastroenteritli çocuklara ait dışkı örnekleri dahil edildi. Ayrıca hastaların demografik verileri (adı, soyadı, yaşı, cinsiyeti ve aile özellikleri gibi) ve klinik bilgileri ile ilgili bilgiler alındı.

Akut gastroenteritli olan çocuklardan toplanan dışkı örnekleri test edilinceye kadar -80°C’de saklandı. Dışkı örnekleri öncelikle Grup A rotavirus antijen tespitine yönelik Rotavirus Antigen ELISA (DRG; kat. No: EIA-3509, Lot No: LN579 DRG International Inc, USA) kiti ile değerlendirildi. Rotavirus antijen pozitif bulunan dışkı örneklerinin eş zamanlı olarak RNA ekstraksiyonları gerçekleştirildi. Ekstrakte edilen RNA örnekleri RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction) ile değerlendirilene kadar -80°C’de bekletildi. Rotavirus G genotiplemesi için (G1- G4, G8- G10) rotavirusun VP7 bölgesine ait Beg9- End9 ve P genotiplemesi için (P[4], P[6], P[8-11]) ise VP4 bölgesine ait Con2 - Con3 konsensus ve tip spesifik primerler ile RT-PCR testi yapıp ardından multipleks semi nested PCR testi ile tiplendirme yapıldı.

3.1. Rotavirus antijen ELISA Testinin yapılışı:

Dışkı örnekleri uygulama öncesi dondurucudan çıkarılıp çözülmesi için oda ısısında bekletildi.

Kitin içindekiler:

1. ELISA plağı: Rotavirus antijeni ile kaplı 96 kuyulu plak
2. Reagen 1: Anti- rotavirus monoklonal antikor; bir şişe 11 mL
3. Reagen 2: Anti- Mouse antikora konjuge horseradish proxidase; bir şişe 11mL
4. Pozitif kontrol: Bir şişe 2 mL
5. Negatif kontrol: Bir şişe 2 mL
6. 20X Wash Buffer: Bir şişe 25 mL

7. Substrat solüsyonu: Tetramethylbenzidine (TMB) ve organik peroxide; bir şişe 11 mL

8. Stop solüsyonu: 1M H₂SO₄; bir şişe 11 mL

ELISA testinin uygulanması:

1. ELISA kiti kullanılmadan önce yarım saat oda ısısında bekletildi.

2. Wash Buffer hazırlamak için 25 mL 20X Wash Buffer ile 475 mL DS (Distile su) karıştırıldı.

3. Örneklerin, kontrollerin ve kalibratörün hazırlanması: Üzeri numaralandırılan tüplere yaklaşık 1 gr dışkı örneği konuldu. Örneklerin üzerine 4mL 1X wash buffer ilave edildi ve yaklaşık 5 dakika vorteksenerek örneğin çözünmesi sağlandı.

4. Mikroplağın A1 kuyusuna 100 µl negatif kontrol, B1 kuyusuna 100 µl pozitif kontrol ve mikroplağın diğer kuyularına 100 µl dilüe edilmiş dışkı örneklerinden ilave edildi. Oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.

5. İnkübasyonun ardından plak ELISA yıkama cihazında (Medispec ESW300 ELISA Plate Washer) 3 kez 1X Wash Buffer solüsyonu ile yıkandı ve sonunda 2 kez aspire edilip iyice kurutuldu. Hiç sıvı kalmaması için kurutma kağıdı üzerinde plak ters çevrilip birkaç kez tap yapıldı.

6. Her bir kuyucuğa Reagen 1'den 2 damla (anti-rotavirus monoklonal antikor) damlatıldı.

Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Ardından 3 kez 1X Wash Buffer solüsyonu ile yıkandı ve sonunda 2 kez aspire edilip iyice kurutuldu. Hiç sıvı kalmaması için kurutma kağıdı üzerinde plak ters çevrilip birkaç kez tap yapıldı.

7. Her bir kuyucuğa Reagen 2'den 2 damla (anti-Mouse antikora konjuge horseradish peroxidase) damlatıldı. Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Ardından 3 kez 1X Wash Buffer solüsyonu ile yıkandı ve sonunda 2 kez aspire edilip iyice kurutuldu. Hiç sıvı kalmaması için kurutma kağıdı üzerinde plak ters çevrilip birkaç kez tap yapıldı.

8. Her bir kuyucuğa 2 damla kromojen substrat damlatıldı ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi ve örnekler mavi renge dönüşmeye başladığı gözlemlendi.

9. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 2 damla stop solüsyonu damlatıldı. Maviden sarıya dönen renk değişimi görüldü (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. ELISA mikroplağı

10. Plaklar hafifçe sallanarak homojen bir solüsyon elde edilmeye çalışıldı.

11. Sonuçlar spektrofotometrede (Denley We Scan) 450 nm dalga boyunda okunarak değerlendirildi.

12. ELISA kiti protokolünün önerisine göre optik yoğunluğu $0.50 >$ büyük olan örnekler pozitif, $0.50 <$ olan örnekler negatif kabul edildi.



Şekil 3.2. Spektrofotometre



Şekil 3.3. ELISA yıkama cihazı

3.2. Rotavirus RNA'nın RT-PCR ile araştırılması

ELISA testi sonucu rotavirus Grup A pozitif olan dışkı örneklerinden rotavirus RNA'sının ekstraksiyonu Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kiti (Lot No: 14290100, Kat. No: 11 858 882 001) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3. Dışkı örneklerinden RNA'nın ekstraksiyonu

1. Ekstraksiyon için -80°C'de saklanan dışkı örnekleri çıkarıldı ve çözünmesi için oda ısısında bekletildi. Çözünen dışkı örnekleri %10 oranında PBS (fosfat tamponlu su) ile sulandırıldı. Sulandırılan örnekler 5 dakika vortekslenerek ardından 10.000 X g'de 10 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrası üstte kalan sıvı kısımdan mikropipetle 200µl alınarak steril 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine aktarıldı.
2. Bunların üzerine 5ml Binding buffer ve 50 µl Poly A çalışma solüsyonu karışımından 400 µl eklendi ve vortekslendi.
3. Oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
4. Kit içerisindeki toplama kapları ve filtreli tüpler iç içe geçirilerek birleştirildi ve bir sonraki aşama için hazırlandı.
5. Örneklerin bulunduğu eppendorf tüpündeki karışım, hazırlanan toplama kaplarına üstten yavaşça döküldü ve 8000 X g'de 15 saniye santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası alttaki sıvı biriken toplama kabı atıldı. Üstteki filtre tüpü yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi.
7. Üzerine 500 µl İnhibitor Removal Buffer (Guanidinium HCl) eklenip 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası alttaki sıvı biriken toplama kabı atıldı. Üstteki filtre tüpü yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi.
9. Üzerine 450 µl Wash Buffer eklendi ve 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki sıvı biriken toplama kabı atıldı. Üstteki filtre tüpü yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi. Bu basamak bir kez daha tekrarlandı.
10. Sonra 13000 X g'de 10 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki sıvı biriken toplama kabı atıldı. Üstteki filtre tüpü 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine yerleştirildi.
11. Üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi ve 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Eppendorf tüp içindeki filtre tüpü atıldı ve daha sonra içinde RNA ekstraktı bulunan bu tüpler araştırılacak olan RNA'nın amplifikasyonları tamamlanıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

3.4. Rotavirus VP7 ve VP4 genomunun tespiti için iki aşamalı RT-PCR testi

Amplifikasyon aşamalarının gerçekleştirilmesi için Thermal Cycler (MJ Mini Gradient Thermal Cycler) kullanıldı.

Rotavirus G genotiplemesi için rotavirusun VP7 bölgesine ait 1062 bp uzunluğundaki genom bölgesini hedef alan Beg9B (5'- GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G-3') End9B (5'-GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG-3') ve P genotiplemesi için ise için rotavirusun VP4 bölgesine ait 876 bp uzunluğundaki genom bölgesini hedef alan Con2 (5'-ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC-3') ve Con3 (5'- TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A-3') konsensus primerler kullanılarak iki aşamalı RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction) testi yapıldı. İki aşamada yapılan RT-PCR testinin I. aşamasında; RT (Reverse transcription) işlemi ile cDNA'lar elde edildi. İkinci aşamasında ise, bu cDNA'lar kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi.

3.4.1. Rotavirus G genotiplemesi için iki aşamalı RT-PCR testi

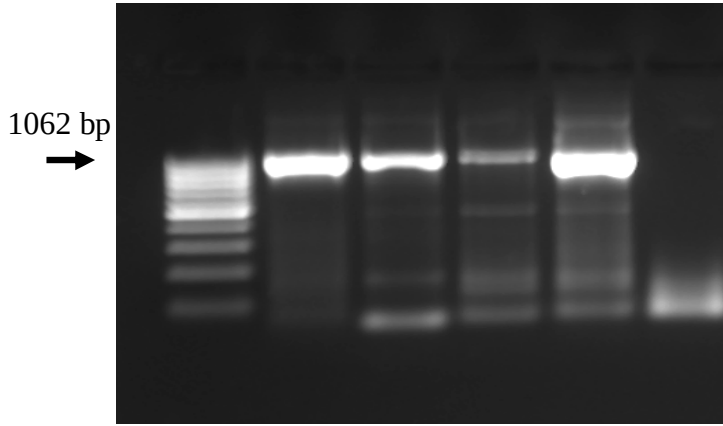
Rotavirus G genotiplemesi için rotavirusun VP7 bölgesine ait 1062 bp uzunluğundaki genom bölgesini hedef alan Beg9 - End9 konsensus primerler kullanılarak iki aşamalı RT-PCR testi gerçekleştirildi.

Çalışmada II aşamadan oluşan RT-PCR testinin I. (RT) aşamasında her bir PCR tüpüne rotavirusun G genotipini belirleyen her bir primerden 0.5 µl 25 pmol (1pmol/ µl), 7 µl deiyonize distile su (ddH₂O) ve 5 µl RNA ekstraktı olmak üzere toplam 13 µl RT karışımı 95 °C' de 5 dakika ve ardından 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Daha sonra bu PCR tüplerinin üzerine 4 µl 5 X RT-Buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 500 mM KCl), 2 µl dNTP (10mM), 0.5 µl RNasin (40U/ µl), 0.5 µl 2U RT enzim ilave edilerek toplam 20 µl'lik karışım 55 C^o'de 30 dakika ve ardından 85 C^o'de 5 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi.

İkinci aşamada, amplifikasyon ayrı bir PCR tüpünde, 10X PCR Taq Buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP, her bir primerden 25pmol (1pmol/ µl), 2U Taq DNA polymerase (Fermentas) ve elde edilen cDNA ürününden 5 µl olmak üzere toplam 50 µl PCR karışımında gerçekleştirildi. II. PCR aşamasında yine Beg9 ve End9 primerleri kullanıldı ve amplifikasyon aşağıdaki şekilde tamamlandı:

1.	94 C'de	3 dk	} 35 siklus
2.	95 C'de	1 dk	
	55C'de	2 dk	
	72 C'de	1 dk	
3.	72 C'de	10 dk	

Birinci amplifikasyon ürünleri 1062 bp varlığı yönünden etidyum bromürlü % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile incelendi (Şekil3.4).



Şekil 3.4. Rotavirusun VP7 bölgesine ait 1062 bp uzunluğundaki genom bölgesi

3.4.1.1. G genotiplemesi için Multipleks Semnested PCR testi

İlk PCR sonucu elde edilen ampliconlar rotavirusun VP7 bölgesine ait tip spesifik primerler (G1, G2, G3, G4, G8, G9 ve G10) ve RVG9 konsensus primer ile multipleks semi-nested PCR testi gerçekleştirildi. G genotiplemesi için PCR testi sonuları G1 genotipi için 749 bp, G2 652 bp, G3 374 bp, G4 583 bp, G8 885 bp, G9 306 bp, G10 397 bp varlığı yönünden değerlendirildi. Tip spesifik primerlerin gen dizisi; aşağıda verilmiştir.

G1 (5'- CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G -3')

G2 (5'- CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G -3')

G3 (5'- CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG -3')

G4 (5'- CGT TTC TGG TGA GGA GTT G -3')

G8 (5'- GTC ACA CCA TTT GTA AAA TTC G -3')

G9 (5'- CTA GAT GTA ACT ACA ACT AC -3')

G10 (5'- ATG TCA GAC TAC AGA TAC TGG -3')

RVG9 (5'- GGT CAC ATC ATA CAA TTC T -3')

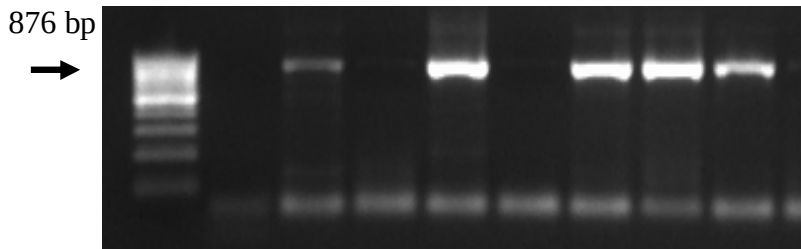
Multipleks seminested PCR için amplifikasyon ayrı bir PCR tüpünde, 5 µl 10X PCR Taq Buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 500 mM KCl), 4 µl 1.5 mM MgCl₂, 4 µl 2.5 mM dNTP, her bir primerden (G1, G2, G3, G4, G8, G9, G10 ve RVG9) 1 µl 20pmol (1pmol/ µl), 0.4 µl 2U *Taq* DNA polimeraz ve ilk elde edilen PCR ürününden 2 µl olmak üzere toplam 50 µl PCR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşağıdaki gibi tamamlandı:

- | | | | |
|----|---------|-------|-------------|
| 1. | 94 C'de | 3dk | } 30 siklus |
| 2. | 94 C'de | 1 dk | |
| | 42C'de | 2 dk | |
| | 72 C'de | 1 dk | |
| 3. | 72 C'de | 10 dk | |

3.4.2. Rotavirusun P genotiplemesi için iki aşamalı RT-PCR testi

Rotavirus P genotiplemesi için rotavirusun VP4 bölgesine ait 876 bp uzunluğundaki genom bölgesini hedef alan Con2- Con3 konsensus ile yukarıda anlatılan G genotiplemesi için kullanılan aynı protokol gerçekleştirildi (Şekil 3.5). PCR için amplifikasyon aşağıdaki şekilde tamamlandı:

- | | | | |
|----|---------|-------|-------------|
| 1. | 94 C'de | 3dk | } 35 siklus |
| 2. | 95 C'de | 1 dk | |
| | 50 C'de | 2 dk | |
| | 72 C'de | 1 dk | |
| 3. | 72 C'de | 10 dk | |



Şekil 3.5. Rotavirusun VP4 bölgesine ait 876 bp uzunluğundaki genom bölgesi

3.4.2.1. P genotiplemesi için Multipleks Seminested PCR testi

İlk PCR sonucu elde edilen ampliconlar rotavirusun VP4 bölgesine ait tip spesifik primerler (P4, P6, P8, P9, P10 ve P11) ve Con3A konsensus primer ile multipleks semi-nested PCR testi ile P genotiplemesi gerçekleştirildi. P genotiplemesi için PCR testi sonuları P4 genotipi için 483 bp, P6 267 bp, P8 345 bp, P9 391 bp, P10 583 bp ve P11 312 bp varlığı yönünden değerlendirildi. Tip spesifik ve konsensus primerlerin gen dizisi aşağıdaki gibidir.

P4 (5'- CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC -3')

P6 (5'- TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA -3')

P8 (5'- TCT ACT TGG ATA ACG TGC -3')

P9 (5'- TGA GAC ATG CAA TTG GAC -3')

P10 (5'- ATC ATA GTT AGT AGT CGG -3')

P11 (5'- GTA AAC ATC CAG AAT GTG -3')

Con3A (5'- TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A-3')

Rotavirusun VP4 bölgesine ait primerler ile yukarıda anlatılan G genotiplemesi için kullanılan protokol uygulandı. Her bir primerden (P4, P6, P8, P9, P10 ve P11) tip spesifik primer ve Con3A konsensus primerden 1 µl 20pmol (1pmol/ µl) olmak üzere toplam 50 µl PCR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşağıdaki gibi tamamlandı:

1.	94 C'de	3dk	} 30 siklus
2.	94 C'de	1 dk	
	42C'de	2 dk	
	72 C'de	1 dk	
3.	72 C'de	10 dk	

DNA ekstraksiyonu, PCR ana karışımının hazırlanması ("master mix"), ve örneklerin ana karışıma eklenmesi izole edilmiş 3 ayrı odada yapıldı. RT-PCR aşamasında ana karışımın hazırlanması ve örneklerin ana karışıma eklenmesi buz üzerinde gerçekleştirildi. PCR kontaminasyonunu engellemek için reagenler, küçük hacimlerde tüplere bölündü. Aerosol bariyerli pipet uçların kullanımı, eldivenlerin sık sık değiştirilmesi ve yüzeylerin

dekontaminasyonu için UV ışık ve sodyum hipokloritle silinmesi gibi kontaminasyona karşı genel önlemler alındı.

3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyon ürünleri etidyum bromürlü % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile araştırıldı. Hem tank tamponu olarak, hem de agaroz jelinin hazırlanmasında TAE tamponu kullanıldı. TAE (Tris Asetat EDTA) konsantre (40x TAE) stok solüsyonu olarak hazırlandı ve gerektiğinde 1 x TAE olacak şekilde sulandırıldı.

40x TAE tamponunun hazırlanması

38.72 gr Tris-Base (1.6 M) (Sigma)

21.78 gr Na Asetat x3 H₂O (0.8 M)

3.04 gr EDTA (40 M) (Sigma)

Maddeler eritilip distile su ile 200 ml'ye tamamlandı (pH 7.2).

Uygulama:

1. Elektroforez için kullanılan tampon 1x TAE solüsyonu elde etmek için 40x TAE solüsyonu distile su ile dilüe edildi.
2. Eridiğinde % 2'lik jel oluşturacak şekilde agaroz (Sigma) tartılıp bir balon içerisine konuldu.
3. Üzerine 1x TAE tamponu ilave edilerek mikrodalga fırında eritildi.
4. Bir süre 60 °C'nin altına düşmeyecek şekilde soğutuldu.
5. Jelin içerisine etidyum bromid 0.5µg/ml konsantrasyonda eklendi.
6. Önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş kalıp tepsisinin üzerine jel yavaşça döküldü.
7. Oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletilerek katılaşması sağlandı.
8. Elektroforez tankındaki (OWL Separation Systems Model B2 Mini Gel Electrophoresis System) taraklar yavaşça çıkarıldı.
9. Örneklerden 10'ar µl alınıp 1µl yükleme tamponu (% 20 süzkroz, % 0.25 brom fenol mavisi (1xTAE ile hazırlanmış)) ile karıştırılarak, her kuyuya dağıtıldı. İlk kuyuya 100 bp'lik DNA ladder (BBI, Bio Basic Inc. Kanada) yüklendi.
10. Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300) çalıştırılarak 100 V akım verildi.

11. Brom fenol mavisinin migrasyonu takip edilerek jelin 2/3'lik kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.
12. Jel tanktan çıkarıldı ve jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Imaging Systems Visible & Ultraviolet Transilluminator, MiniBIS Bio-Imaging System) ile görüntülenerek rotavirus pozitif örneklerin varlığı yönünden incelendi.

4. BULGULAR

Bölgemizde akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus infeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisini araştırmak amacıyla Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Çocuk Enfeksiyon Bilim Dalı Polikliniğine, Çocuk Acil Tıp Birimine ve Adana Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinin Çocuk Servisine 1 Ocak 2008 – 31 Aralık 2008 tarihleri arasında başvuran 5 yaş altı akut gastroenteritli çocuklara ait toplam 188 dışkı örneği çalışmaya dahil edildi. Çalışma grubundaki çocukların hiçbirine rotavirus aşısı uygulanmamıştı.

Çalışmaya dahil edilen toplam 188 hastanın 86'sı (%45.74) kız 102'si (%54.26) erkek çocuklardan oluşmakta idi. Hastaların 61'i (%32.4) 0-5 ay, 57'si (%30.3) 6-12 ay, 33'ü (%17.6) 13-24 ay, 20'si (%10.6) 25-36 ay, 11'i (%5.9) 37-48 ay ve 6'sı (%3.2) 49-60 ay yaş grubunda yer almaktaydı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Akut gastroenteriti olan beş yaş altı çocukların yaş gruplarına göre dağılımı (n=188)

Yaş grupları (ay)	Sayı	%
0-5	61	32.4
6-12	57	30.3
13-24	33	17.6
25-36	20	10.6
37-48	11	5.9
49-60	6	3.2

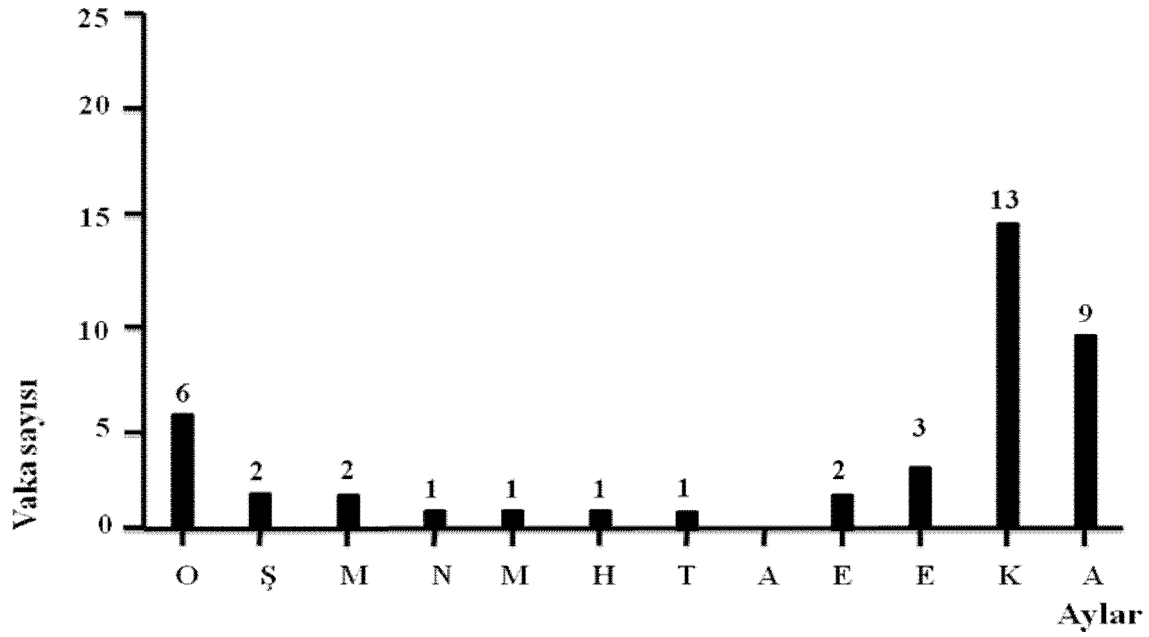
ELISA testi sonucunda toplam 188 hastanın 41'inde (%21.8) rotavirus grup A antijeni pozitif bulundu. Rotavirus antijeni pozitif 41 hastanın 31'i erkek (%76), 10'u (%24) kız çocuklarından oluşmakta idi. Rotavirus diarezi olan hastaların yaş grupları 10 günlükten 4 yaş arasında değişmekte idi. Toplam 188 hastadan 0-5 ay grubundaki 61 hastanın 9'u (%14.7), 6-

12 ay grubundaki 57 hastanın 15'i (%26.3), 13-24 ay grubundaki 33 hastanın 11'i (%33.3), 25-36 ay arasındaki 20 hastanın 4'ü (%20) ve 37-48 ay grubundaki 11 hastanın 2'si (%18) rotavirus antijeni pozitif bulundu. Sadece 49-60 ay arasında bulunan 6 hastanın hiçbirinde rotavirus antijeni tespit edilmedi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Rotavirus infeksiyonu olan akut gastroenteritli çocukların yaş gruplarına göre prevalansı

Yaş grupları (ay)	Örnek sayısı	Rotavirus pozitif örnek sayısı	%
0-5	61	9	14.7
6-12	57	15	26.3
13-24	33	11	33.3
25-36	20	4	20
37-48	11	2	18
49-60	6	-	-

Ocak ayında toplanan 14 hastanın 6'sı (%42.8), Şubat ayında 14 hastanın 2'si (%12.5), Mart ayında 13 hastanın 2'si (%15.4), Nisan ayında 8 hastanın 1'i (%12.5), Mayıs ayında 8 hastanın 1'i (%12.5), Haziran ayında 9 hastanın 1'i (%11.1), Temmuz ayında 11 hastanın 1'i (%9), Eylül ayında 19 hastanın 2'si (%10.5), Ekim ayında 21 hastanın 3'ü (%14.2), Kasım ayında 36 hastanın 13'ünde (%36), Aralık ayında 20 hastanın 9'unda (%45) rotavirus antijeni pozitif bulunurken Ağustos ayında toplanan 6 hastanın hiçbirinde rotavirus antijeni pozitif bulunmadı. Rotavirus infeksiyonunun pik yaptığı aylar Kasım-Ocak ayları arasında bulundu (Tablo 4.3).



Tablo 4.3. Rotavirus infeksiyonlarının aylara göre dağılımı

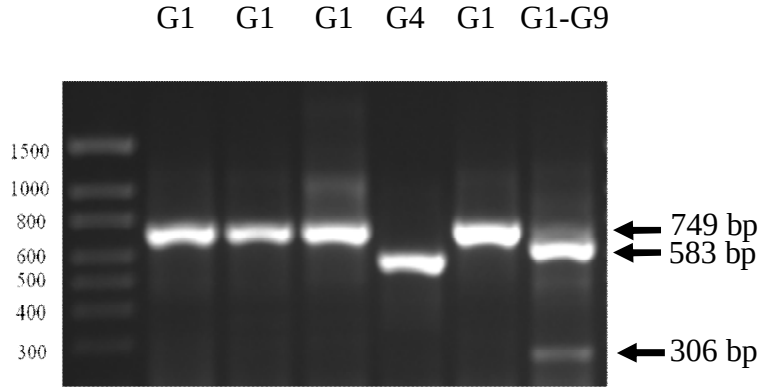
Çalışılan 41 hastanın 40'ında (%97) diare, 33'ünde (%80) kusma, 24'ünde (%58) ateş görülen en yaygın semptomlardı. Akut rotavirus diare süresi dikkate alındığında vakaların %20'sinde <2 gün, %35'inde 2-4 gün, %45'i 4> gün idi. Vakaların bir gündeki diare sayısı incelendiğinde; %29'unda günde 1-4 kez, %47'sinde günde 6-10 kez ve %24'ünde günde 10-15 kez tespit edildi. Yine rotavirusa bağlı diareleri olan hastaların hepsi dehidrate olup %17'sinde hafif, %54'ünde orta, %29'unda ciddi dehidratasyon gözlemlendi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Rotavirus infeksiyonunun klinik belirtileri

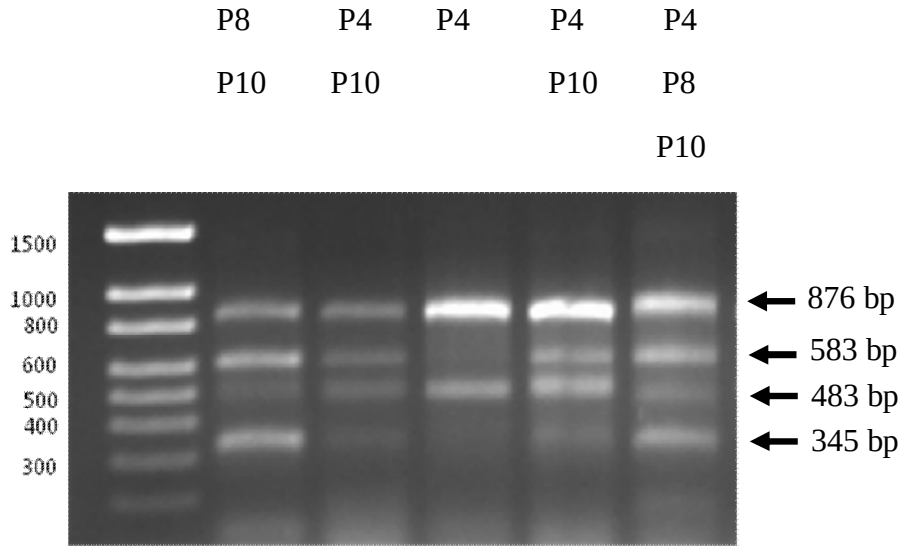
Klinik belirtiler	Sayı	(%)
Diare	40	97
Diare süresi (gün)		
< 2	8	20
2-4	14	35
4 >	18	45
Diare sayısı (1 günde)		
4-6	12	29
6-10	19	47
10-15	10	24
Kusma	33	80
Kusma sayısı (1 günde)		
-	8	20
2-4	17	41
4-8	13	32
8-12	3	7
Ateş	24	58
37 C°	5	21
38 C°	10	42
39 C°	9	37
Dehidrate	41	100
Hafif	7	17
Orta	22	54
Ciddi	12	29

Çalışmaya dahil edilen toplam 188 hastanın 132'si (%70.2) hastanede yatan çocuklardan oluşmakta idi. Bu 132 hastanın 34'ü (%25) rotavirus antijeni pozitif bulunurken, polikliniklere ve acil servislere başvuran 56 (%29.8) hastanın 7'si (%12) rotavirus antijeni pozitif bulundu. Rotavirus gastroenteriti olan hastaların 34'ü (%83) hastanede yatan ve 7'si (%17) polikliniklere ve acil servise başvuran hastalardan oluşmakta idi.

Dışkı örneklerinden önce RT-PCR testi ile VP4 ve VP7 rotavirus genomları ve ardından semi-nested multipleks PCR testi ile G ve P genotipleri tespit edildi (Şekil 3.6-3.7).



Şekil 3.6. Rotavirus G tiplerinin görünümü



Şekil 3.7. Rotavirus P tiplerinin görünümü

Akut gastroenteriti olan çocuklardan 2008 yıllı boyunca toplanan 188 dışkı örneğinden rotavirus antijeni pozitif 41 örneğin hepsi de hem VP7 (G genotip) hem de VP4 (P genotip) varlığı yönünden pozitif bulundu. Çalışılan 41 örnekten 38'i (%92.6) G ve P için genotiplendirilirken geriye kalan 3 (%7.4) örneğin G (VP7) veya P (VP4) genotipi belirlenemedi. Rotavirusun VP7 bölgesine ait G genotiplerinden G1 %61 oranla tek başına 25 örnekte, G4 %17 oranla tek başına 7 örnekte ve G9 %9.8 oranla tek başına 4 örnekte tespit edildi. G genotiplerinden G1+G9 %7.4 oranla tek başına 3 örnekte ve G1+G4 %2.4 oranla tek başına 1 örnekte bulundu. Geriye kalan 1 örnekte (%2.4) G genotipi belirlenemedi. Rotavirusun VP4 bölgesine ait P genotiplerinden P4 %61 oranla tek başına 25 örnekte, P[6] ve P[10] %2.4 oranla tek başına 1 örnekte, P[4]+P[8]+P[10] %9.8 oranla tek başına 4 örnekte, P[4]+P[10] %7.4 oranla tek başına 3 örnekte, P[4]+P[10]+P[11] %4.9 oranla tek başına 2 örnekte ve P[4]+P[11], P[6]+P[10], P[8]+P[10] %2.4 oranla tek başına 1 örnekte bulundu. Geriye kalan 2 örnekte (%4.9) P genotipi belirlenemedi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Bölgemizde 5 yaş altı akut gastroenteriti olan 41 çocukta grup A rotavirusların G/P genotiplerinin dağılımı

G-Tip	P tip (%)										
	P[4]	P[6]	P[10]	P[4] P[10]	P[4] P[11]	P[6] P[10]	P[8] P[10]	P[4]+P[8] P[10]	P[4]+P[10] P[11]	P Tiplendi- rilemeyen	Toplam
G1	11 (26.8)	1 (2.4)	1 (2.4)	3 (7.4) ^a		1 (2.4) ^a	1 (2.4) ^a	4 (9.8) ^a	2 (4.9) ^a	1 (2.4) ^b	25 (61)
G4	7 (17)										7 (17)
G9	3 (7.4)				1 (2.4) ^a						4 (9.8)
G1+G4										1 (2.4) ^b	1 (2.4)
G1+G9	3 (7.4) ^a										3 (7.4)
G Tiplendi- rilemeyen	1 (2.4) ^b										1 (2.4)
Toplam	25 (61)	1 (2.4)	1 (2.4)	3 (7.4)	1 (2.4)	1 (2.4) ^a	1 (2.4) ^a	4 (9.8) ^a	2 (4.9) ^a	2 (4.9)	41 (100)

^a Miks infeksiyon; ^b Tiplendirilemeyen G ve P genotipler

Toplam 41 vakada hem tek G/P genotip infeksiyonunun hem de miks infeksiyonun dahil olduğu 29 vakada G1 %70.7 oranla en yüksek bulunan G genotipi olup bunu takiben G4 %19.5 oranla 8 vakada ve G9 %17 oranla 7 vakada bulundu. Tek G/P genotip infeksiyonu içinde G1 %31.7 oranla 13 vakada, G4 %17 oranla 7 vakada ve G9 %7.4 oranla 3 vakada belirlendi. Miks infeksiyon içinde ise G1 %34.2 oranla 14 vakada ve G9 ise %9.8 oranla 4 vakada izlendi (Tablo 4.6).

Toplam 41 vakada hem tek G/P genotip infeksiyonunun hem de miks infeksiyonun dahil olduğu 35 vakada P4 %85.3 oranla en yüksek bulunan P genotipi olup bunu takiben P10 %29.2 oranla 12 vakada, P8 %12.2 oranla 5 vakada, P11 %7.4 oranla 3 vakada ve P6 %4.9 oranla 2 vakada bulundu. Tek G/P genotip infeksiyonu içinde P4 %51.2 oranla 21 vakada, P10 ve P6 %2.4 oranla 1 vakada belirlenirken miks infeksiyon içinde P4 %31.7 oranla 13 vakada, P10 %26.8 oranla 11 vakada, P8 %12.2 oranla 5 vakada, P11 %7.4 oranla 3 vakada ve P6 %2.4 oranla 1 vakada belirlendi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Rotavirus infeksiyonu olan 41 vakada G ve P genotiplerin dağılımı

G genotipleri	Tek G/P genotip infeksiyonu		Miks İnfeksiyon		G veya P tiplendirilemeyen		Toplam	
	No	%	No	%	No	%	No	%
G1	13	31.7	14	34.2	2	4.8	29	70.7
G4	7	17			1	2.4	8	19.5
G9	3	7.4	4	9.8			7	17
P genotipleri								
P4	21	51.2	13	31.7	1	2.4	35	85.3
P10	1	2.4	11	26.8			12	29.2
P8			5	12.2			5	12.2
P11			3	7.4			3	7.4
P6	1	2.4	1	2.4			2	4.9

Rotavirus pozitif 41 örneğin 38'inde (%92.6) her iki G ve P tipleri belirlendi ve sonuçta 8 farklı rotavirus G/P kombinasyonu elde edildi. Çalışma serimizde rotavirus infeksiyonları arasında tek bir G/P genotip infeksiyonu %56 oranla 23 vakada ve miks infeksiyon ise %36.6 oranla 15 vakada tespit edildi. Rotavirus tek G/P genotip infeksiyonları arasında G1P[4] en yüksek prevalansta %26.8 oranla 11 vakada bulundu ve bunu %17 oranla 7 vakada G4P[4], %7.4 oranla 3 vakada G9P[4], %2.4 oranlarında 1 vakada G1P[6] ve

G1P[10] kombinasyonları izledi. Miks infeksiyon formunda G1/P[4]+P[8]+P[10] en yüksek prevalansta %9.8 oranla 4 vakada bulundu ve bunu %7.4 oranla 3 vakada G1/P[4]+P[10] ve G1+G9/P[4], %4.9 oranla 2 vakada G1/P[4]+P[10]+P[11] ve %2.4 oranla 1 vakada G1/P[6]+P[10] ve G9/P[4]+P[11] kombinasyonları takip etti (Tablo 4.7).

Tablo: 4.7. Rotavirus infeksiyonu olan 41 vakada G/P genotiplerinin dağılımı

Tek G/P genotip infeksiyonu			Miks infeksiyon			G veya P tiplendirilen		
No (%)			No (%)			No (%)		
G1P[4]	11	26.8	G1/P[8]+P[10]	1	2.4	G1/P?	1	2.4
G4P[4]	7	17	G1/P[4]+P[8]+P[10]	4	9.8	G1+G9/P?	1	2.4
G9P[4]	3	7.4	G1/P[4]+P[10]	3	7.4	P4/G?	1	2.4
G1P[6]	1	2.4	G1+G9/P[4]	3	7.4			
G1P[10]	1	2.4	G1/P[4]+P[10]+P[11]	2	4.9			
			G1/P[6]+P[10]	1	2.4			
			G9/P[4]+P[11]	1	2.4			
Toplam:	23	56		15	36.6		3	7.4

4. TARTIŞMA

Rotavirus bütün dünyada çocukluk çağı akut gastroenteritlerin en yaygın sebebidir. Ilıman bölgelerde rotavirus enfeksiyonu genellikle endemik olup özellikle kış ayları boyunca görülür, oysa tropikal bölgelerde rotavirus diarezi bütün yıl boyunca gözlenir. Nadiren salgınlardan sorumlu olabilir.

Akut ciddi gastroenteritin başlıca sebebi olan rotavirus enfeksiyonları beş yaş altı çocuklarda hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde benzer insidanda görülür. Ancak mortalite sonuçları farklıdır. Dünyada her yıl rotavirus enfeksiyonuna bağlı 600.000 ölümden %80'den fazlası tıbbi bakımın zayıf olduğu Güney Asya ve Güney Afrika gibi gelişmekte olan ülkelerde görülürken Avrupa'da yılda rotavirus enfeksiyonuna bağlı 231 ölüm görülür ki bu sayı 14.000'de 1'e karşılık gelir. Gelişmekte olan ülkelerde ise bu oran 250'de 1'dir. Buna karşılık morbidite, kliniğe başvuru ve hospitalizasyon oranları benzerdir⁴⁷.

Gelişmiş ülkelerde mortalite düşük olmasına rağmen morbidite oranı yüksektir ve hospitalizasyon oranları da %20-60 gibi oldukça yüksek olup gelişmekte olan ülkelere benzer bulunmuştur. Ancak rotavirus enfeksiyon oranlarının benzer olması kişisel ve toplumsal hijyenin iyileştirilmesi ve sanitasyon uygulamalarının rotavirus enfeksiyonunu önlemede çok etkili olmadığını göstermektedir. Tüm dünyada hemen hemen çocukların hepsi 5 yaşına kadar rotavirus ile enfekte olur. İlk enfeksiyonun sıklıkla iki yaşından önce görülmesi, dehidratasyon ve malnutrisyonla seyretmesi hastalığın mortalitesini artırmaktadır. Bu sebeple rotavirus enfeksiyonuna karşı başlıca korunma yöntemi aşılama değildir. Hastalığın önlenmesinde aşı kullanımının gündemde olması etkenin genotiplendirilmesini önemli kılmaktadır^{1,4,7}.

Rotavirus Reoviridae familyası içinde rotavirus genusuna ait olup altı yapısal ve altı yapısal olmayan protein kodlayan 11 segmenli çift zincirli bir RNA genomuna sahiptir. Her segment bir protein kodlar, ancak 11. segment iki protein kodlar. Yapısal proteinler çift sarmallı RNA genomunu çevreleyen üç katmanlı kapsid yapısını oluşturur. Yapısal olmayan proteinler gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ve genom replikasyonunda görev alır.

Genomik meteryal üçlü kapsid katmanıyla çevrilidir. Her bir katman antijenite ile ilişkili önemli proteinler içerir. Rotavirusun sınıflandırılmasında kapsid proteinlerine göre grup, subgrup ve serotip ayırımı yapılır. Rotavirusların A'dan G'ye kadar birçok grubu tanımlanmıştır. İnsanlardaki enfeksiyonların çoğuna grup A rotavirusları sebep olur.

Subgurup ve serotip sınıflandırmaları genellikle araştırma amaçlı gerçekleştirilir. Serotipler insan ve diğer türler arasında olduğu gibi coğrafik olarak da çeşitlilik göstermektedir^{2,3}.

Virus alınımından sonra rotavirus ince barsak villus uçlarındaki olgun enterositleri infekte eder. Virus partikülleri hücre sitoplazmasında replike olur ve ardından sürekli olarak hücrede hasara yol açar. Epitelyal hasarı karşılamak için sekreatuar kript hücrelerinin çoğalarak olgun absortif enterositlerin yerine geçmesi barsak lümenine önemli sıvı ve elektrolit sekresyonuna sebep olur. İntestinal epitelyal hücrelerin hasarına bağlı absorbsiyon yüzeyinde azalma ve absorbsiyonun bozulması da su ve elektrolit kaybı ile sonuçlanır. Ayrıca epitel hücrelerinin disfonksiyonu ile laktaz ve maltaz gibi disakkaridaz enzimlerinin ekspresyonunun azalması sonucu ince barsakta sindirilemeyen şekerlerin birikmesi ozmotik basıncı yükselterek sıvı kaybını daha da artırır. Rotavirusun NSP4 proteini de enterik sinir sistemini stimüle ederek intestinal su ve elektrolit sekresyonuna sebep olur. Böylece rotavirus diarezinin patofiyolojisi ozmotik ve sekreatuar mekanizmaların bir kombinasyonudur^{2,5,9}.

Rotavirus kan dolaşımına geçebilir. Ancak ekstra intestinal bölgede çoğaldığına dair deliller yoktur. Rotavirusun serebrospinal sıvıda ve hatta santral sinir sistemi ile ilişkili hastalık belirtisi olan vakalarda saptandığı rapor edilmiştir. Ancak sistemik yayılımın klinik önemi bilinmemektedir.

Rotavirus özellikle 6-24 ay arası çocuklarda görülür ve tüm dünyada hemen hemen çocukların hepsi 5 yaşına kadar rotavirus ile infekte olur. Rotavirus infeksiyonlarının klinik spektrumu asemptomatik infeksiyondan ciddi diareye kadar değişir. Çocuklar rotavirus ile infekte olduktan 1-4 gün sonra tipik olarak semptomların başlaması ani bir şekilde olmaktadır. Rotavirus gastroenteritin klinik belirtileri 4 ile 8 gün sürmektedir. Kansız sulu ishal, kusma ve ateş görülür. Rotavirus infeksiyonlarında ciddi diare sıklığı diğer etkenlerle olan gastroenteritlerdekine göre daha fazladır. Erken tedavi yapılmaması durumunda hızla dehidratasyona sebep olabilir. Rotavirus ile sonraki infeksiyonlar ise klinik olarak daha hafif veya asemptomatik şekildedir. Reinfeksiyon bütün yaşlarda ortaya çıkabilir, fakat semptomlar yaşa bağlı olarak değişiklik gösterir. Yetişkinlerde rotavirus infeksiyonu daha çok asemptomatik görülür. Yeni doğanlarda ise hastalık belirtileri asemptomatik veya hafif semptomatik şekilde olur^{3,8,11,14}.

Rotavirusa karşı homotipik koruma spesifik G serotipleri ile infeksiyonu önler, oysaki heterotipik koruma farklı G tipleriyle olan infeksiyonun önlenmesi ile ilişkilidir.

Rotavirus infeksiyonunun tanısı için ELISA, lateks aglutinasyon testi (LA) ve RT-PCR ile viral genom tespiti ve ELISA ile spesifik rotavirus antikorlarının tespiti gibi

metodların kullanımı yaygındır. Tanıda en çok kullanılan dışkı örneklerinde rotavirus antijenlerinin ELISA ve LA ile tespiti.

Rotavirus tespiti için RT-PCR antijen tespit metodlarına göre daha duyarlıdır. Ayrıca rotavirus aşısı yapımından önce prevalan suşların tespiti ve sonra yeni rotavirus tiplerinin ortaya çıkışının izlenmesinde grup A rotavirusların G ve P genotiplemesi önem taşır. Bu amaçla RFLP (restriction fragment length polymorphism), tip spesifik primerler ile yapılan RT-PCR, nested RT-PCR, multiplex RT-PCR ve oligonükleotid mikroarray hibridizasyon testleri kullanılır. Genotipleme testlerinden en çok RT-PCR kullanılmaktadır. Grup A rotavirus G ve P genotiplerinin tespiti için en çok seçilen VP7 konsensus primerleri Gouvea ve Das primerleridir⁷³.

Hastalığın önlenmesinde aşı kullanımının gündemde olması herhangi bir aşılama stratejisinin uygulanması öncesinde ve sürecinde rotavirus infeksiyonlarının araştırılması ve rotavirusların G ve P genotiplendirilmesi rotavirus infeksiyonundan korunma açısından önemlidir.

Dünya genelindeki araştırmalara göre grup A rotavirusunun sebep olduğu diareli çocuklardan izole edilen G1-G4 ve P1A[8] ve P1B[4] (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8]) en yaygın G ve P genotip kombinasyonlarıdır. Grup A rotavirusun baskın genotipleri yıldan yıla ve bölgeden bölgeye değişiklik göstermektedir. Kuzey Amerika, Avrupa ve Avusturalya'da 1973-2003 yılları arasında toplanan rotavirus suşlarında infeksiyonların %90'dan fazlasına G1-G4, P1A[8] ve P1B[4] tiplerinin sebep olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık bu genotipler Güney Amerika ve Asya ülkelerinde %68 ve Afrika'da % 50 oranında tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalarda 1973 ve 2003 yılları arasında yapılan araştırmalarda en yaygın G1P[8] tipi rotavirus infeksiyonlarının %69.4'ünü oluşturmaktadır. Avrupa'da 2004-2005 yılları arasında rotavirus gastroenterit vakalarının %98'den fazlasını G1, G2, G3, G4, ve G9 tiplerinin oluşturduğu gösterilmiştir.

Farklı tipler farklı coğrafik bölgelerde baskındır. Rotavirus G ve P genotiplerinin global dağılımı ile ilgili olarak 1989-2004 yılları arasında 52 ülkeden 124 çalışmanın verileri G1P[8] tipinin Kuzey Amerika, Avrupa ve Avusturalya'da suşların %70'inden fazlasını oluşturduğunu oysa Güney Amerika ve Asya'da ise suşların yalnızca %30'nu oluşturduğunu göstermektedir^{9,10}.

Bir ülke genelinde baskın olan suşlar yıldan yıla da değişiklik gösterebilmektedir. Yoshinaga ve arkadaşlarının Japonya'da 2000-2003 yılları arasında beş farklı bölgede akut gastroenteritli çocuklarda ve yeni doğanlarda rotavirus grup A infeksiyonunun insidansını belirlemek ve rotavirus genotiplerine göre karakterizasyonunu tespit ederek gruplar arasındaki

genetik farklılıkları tanımlamak amacıyla yaptıkları çalışmada 2000-2001 yılları arasında en yüksek prevalansı sırasıyla G1 %45.5, G2 %32.5, G3 %12,3 ve G4 %2.6 oluştururken G9'u yalnızca 9 (%5.9) vakada tespit ettiklerini ancak 2001-2002 yılları arasında ise bu oranların değişerek en baskın suş olarak G2 tipini %40, ardından G1 tipini %20 oranında bulduklarını belirtmişlerdir. G9 oranı ise %17.8'e yükselmiştir. Yine Japonya'da 2002-2003 yılları arasında da G tiplerinden G3 %34 ve G4 %28 oranında tespit edilmiştir. Önceki yıllarda çok yüksek bulunan G1 %6 ve G2 ise %5.2 oranında tespit edilerek hızla bir düşüş olduğu görülmüştür. Yine 2000 yılından önce Avrupa'da en yaygın G1 iken 2005 yılında pek çok Avrupa ülkesinde dışkı örneklerinin %50'sinden fazlasında G9 baskın olarak bulunmuştur⁴⁷.

Dünya genelinde 1990'ların erken dönemlerinde pek çok epidemiyolojik çalışma G1-G4 suşlarının yüksek prevalansta olduğunu göstermiştir, fakat daha sonra G9P[8] veya G9P[6] suşları tüm dünyada görülmeye başlamıştır. Afrika'da G8P[6], Brezilya'da G5P[8] ve Hindistan'da yeni G10P[11] ve G12P[6] suşları artan sıklıkta tespit edilmeye başlanmıştır. Bu suşlar yeni ortaya çıkan rotavirus genotiplerini temsil etmektedir. Bu durumda görülen insan ve hayvan rotavirusları arasında reassortment'ın daha fazla olması günümüzdeki ve gelecekteki aşı çalışmaları için zorluk yaratacaktır¹⁰.

Rotavirus iki mekanizma ile çeşitlilik göstermektedir. Nokta mutasyonları antikordan kaçan mutantların ortaya çıkmasına sebep olur. Rotavirusun iki farklı suşunun bir hücreyi infekte etmesiyle rotavirusun gen segmentlerinin değişmesi sonucu reassortant virus oluşabilir. Rotavirusun reassortment özelliği daha önce hiç görülmemiş antijenik yapısı farklı yeni rotavirus genotiplerinin ortaya çıkmasına sebep olur ki bu aşı gelişimi için oldukça önemlidir.

Dünyadaki hemen hemen bütün rotavirus suşlarına ait G1, G3, G4 ve G9 serotipleri tercihen P[8] ile ilişkili olmasına rağmen G2 serotip suşları daha çok P[4] genotipi ile ilişkilidir.

ABD ve Japonya'da pek çok salgın G2 tipi ile (çoğu P1B[4] suşları) ortaya çıkmıştır. Rotavirus serotipleri ve virulansı arasındaki ilişki tam olarak anlaşılmamasına rağmen, çocuklarda G2 virusu ile infeksiyonun daha şiddetli geçtiği ile ilişkili bazı çalışmalar vardır ve bu virusun P1A[8], G1, G3, G4 ve G9 viruslarından farklı bir genogrup oluşturduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar P1B[4]G2 olmayan viruslar ile infeksiyonların P1B[4]G2 infeksiyonlarına karşı uzun süreli koruma sağlamayacağını ve P[4]G2 tiplerin monovalan aşılar için problem oluşturacağını ileri sürmüştür^{9,13}.

Tcheremenskaia ve arkadaşları 2004-2006 yılları arasında Roma, Çek Cumhuriyeti, Slovenya, Hırvatistan, Arnavutluk ve Bulgaristan'da hastanede yatan ve kliniklere başvuran

ciddi akut gastroenteriti olan çocuklarda rotavirus insidansını ve rotavirus genotiplerinin dağılımındaki coğrafik farklılıkları araştırmak amacıyla toplam 1500 rotavirus pozitif dışkı örneğinde RT nested PCR ile G ve P genotipleri belirlemiştir. Çalışma sonucunda katılımcı ülkeler arasında rotavirus genotiplerinin dağılımında coğrafik olarak önemli farklılıklar bulunmuştur. En yaygın genotip kombinasyonları olarak G1P[8], G3P[8], G4P[8] ve G2P[4] %50-85 arasında değişen oranlarda tespit edilmiştir. G9 genotipi % 2-35 oranları arasındadır. G1 veya G4 ile P[4] ve G2 ve P[8] arasında oluşan kombinasyonlar hastaların %3-20'sinde görülen ve muhtemelen reassortment sonucu oluşan nadir görülen kombinasyonlar olarak bildirilmiştir. Nadir görülen genotipler olarak belirlenen G8P[8] ve G10P[6] suşlarının muhtemelen hayvan orjinli olabileceği sonucuna varılmıştır. İki rotavirus suşu ile meydana gelen miks infeksiyonlar çalışılan hastaların %1.7-14'ünü oluşturmuştur¹⁰².

Yang ve arkadaşlarının Çin'de Ekim 2005-Eylül 2006 tarihleri arasında rotavirus insidansını ve prevalan suşları belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 322 dışkı örneğinin 101'inde (%31.4) grup A rotavirusları identifiye edilmiştir. En yaygın rotavirus genotiplerini G3P[8] (%62.6) bunu takiben G1P[8] (17.6%), G1+G3P[8] (8.8%), G3P[4] (6.6%), G1P[4] (2.2%) ve G9P[8] (2.2%) olarak belirlemişlerdir. Çalışılan 101 suşun G tiplerinden 67'si G3 (%66.3), 19'u G1 (%18.8), 8'i G1 ve G3 miks infeksiyon (%7.9), 1'i G4 (%1) ve 2'si G9 (%2) olarak bulunmuş ve 4'ü (%4) tiplendirilememiştir. Her iki G ve P tipleri 91 örnekte belirlenebilmiş ve 6 farklı kombinasyon elde edilmiştir¹⁰³.

Espul ve arkadaşlarının rotavirus aşısının ortaya çıkmasından önce rotavirus sirkülasyonunun antijenik çeşitliliği hakkında bilgi edinmek amacıyla Arjantin'de yaptıkları çalışmada toplanan 151 rotavirus pozitif dışkı örneğinin 92'sinin G ve P tipleri RT-PCR testi ile belirlenmiştir. Bu 92 örneğin %89'unun tek bir G/P kombinasyonuna sahip olup %9'u G1[P4], %1'i G1[P6], %24'ü G1[P8], %70'i G2[P4] ve %2'si G2[P6] suşlardan oluştuğunu bulmuşlardır. Dokuz örneğin birden fazla G tipi ile tek bir P tipi, 1 örnek iki P tipi ile bir G tipi ve 1 örneğin birçok G ve P tipleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir¹⁰⁴.

Amerika'da Detroit'de Abdel-Haq ve arkadaşlarının çocuklar arasında rotavirusla ilişkili gastroenteriti araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada ise 100 çocuktan toplanan dışkı örnekleri ELISA yöntemi ile çalışılmıştır. Rotavirus pozitif örneklerin rotavirus G ve P genotiplemesini RT-PCR testi ve nükleotit dizi analizi ile belirlenmiştir. En yaygın genotip prevalansını G1[P4] (%41), bunu takiben G1[P8] (%16) ve G4[P4] (%14) bulunmuştur. G genotiplerinden G1 (%73), G4 (%17.4), G9 (%6.3) ve G2 (%2.8) tespit edilmiştir. P genotipleri ise P[4] (%71) ve P[8] (%29) olarak gözlenmiştir. Örneklerin %20'sinde birden

fazla G genotipi olduğunu ve bunlardan 7 tanesinin G1/G9, 3'ünün G1/G2 ve 2'sinin G1/G4 olduğunu bildirmişlerdir. Buldukları bütün miks infeksiyonlar G1 genotipi içermiştir¹⁰⁵.

Rotavirus G9 serotipi bütün dünyada 1996 yılından beri pek çok ülkede yeni doğan ve çocuklarda şiddetli akut gastroenteritlerde yüksek oranlarda bildirilmektedir. Japonya'da 1998-1999 yıllarında G9 suşu %11.6 ve 1999-2000 yıllarında %15.6 oranında bulunmuştur. Orta ve Güneydoğu Avrupa'da rotavirusun moleküler epidemiyolojisi ile ilgili çalışmada G9 genotipleri farklı ülkelerde %2-35 arasında tanınmış olup yalnızca Bulgaristan'da G9 suşunun prevelansı %34.3'tür¹⁰⁶.

Dünya genelinde G9 rotavirusları son zamanlardaki yapılan çalışmalarda tüm izolatların %4.1'ini oluşturmaktadır. Çalışmamızda ise dünyada artan sıklıkla görülen G9 rotavirus suşu %17 oranında identifiye edildi.

Son yıllarda Avrupa dahil birçok ülkede rotavirus G9 genotipinden başka diğer G1P[4], G2P[8], G6P[9] gibi yaygın olmayan yeni rotavirus suşları sirküle etmekte olup oldukça yüksek oranda bildirilmiştir. Avrupa ülkelerinde bu yaygın olmayan rotavirus tiplerinin sıklığı %0-11.3 arasında değişmektedir¹¹. Arguelles ve arkadaşları Arjantin'de 1996-1998 yılları arasında akut diarezi olan çocuklardan alınan 500 dışkı örneğinin %62'sinde ELISA ile rotavirus antijenini pozitif bulmuştur. En yaygın G tipleri G1 %39, G2 %43, G4 %4, P8 %16 ve P4 %71 oranlarında gözlenmiştir. Beklenmeyen en yaygın G-P kombinasyonu G2P[4] %43, oysa dünyada en yaygın bulunan G1P[8] ise %12 oranında bulunmuştur. G1P[4] gibi pek rastlanmayan suşların oranı %14 olup örneklerin %10'unda miks infeksiyon görülmüştür¹⁰⁷. Antunes ve arkadaşları ise Portekiz'de 2007 kış sezonunda 424 çocukdan %55.2'sinde rotavirus pozitifliğini tespit etmişlerdir. En prevalan rotavirus genotipini %68.6 oranla G2P[4] olarak açıklamışlardır. Çalışma popülasyonu aşısız olduğundan G2P[4] baskınlığının aşılama ile ortaya çıkmayacağını ve bu yüksek prevalan rotavirus genotiplerinin normal dolaşımdaki suşlar olduğunu ileri sürmüşlerdir. Rotavirus genotiplerinin taranmasının rotavirus aşı programlarını bilgilendirmek yönünden önemli olduğunu savunmuşlardır¹⁰⁸.

Kim ve arkadaşlarının Kore'de 2002-2004 yılları arasında rotavirus aşısının etkinliğini araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada Kore'nin farklı bölgelerinde çeşitli hastane, acil servis ve kliniklerinde aktif sürveyans çalışması yürütülmüştür. Çalışmaya dahil edilen 2232 dışkı örneğinin 460'ı (%20.6) rotavirus pozitif bulunmuştur. Rotavirus infeksiyonunun pik yaptığı ay Şubat (%49.5) ayı olarak belirlenmiştir. Rotavirus pozitif olan 460 örneğin 366'sı kliniklere başvuran ve 94'ü hastanede yatan hastalardan oluşmuştur. Genotipleme yapılan rotavirus suşlarının %39'u G9P[8], %24'ü G1P[8], %17'si G3P[8] ve %13'ü G2P[4] olarak bulunmuştur. Rotavirus diarezinin pik yaptığı yaş grubu 13-24 aylık çocuklar olup vakaların

%94'ü yaşamın ilk 3 yılında görülmüştür. Kore gibi ılıman iklime sahip ülkelerde rotavirus enfeksiyonu tipik olarak Aralık, Ocak aylarında görülürken bu çalışmada rotavirus enfeksiyonunun Şubat ayında pik yapması ile rotavirusun transmisyonunun gecikmiş olduğunu ve rotavirus transmisyonunun yavaş bir şekilde her yıl kış aylarından bahar aylarına doğru kaydığını ileri sürmüşlerdir¹⁰⁹.

Rotavirus diarezinin mevsimsel karakterizasyonu iyi bilinmekte olup ABD'de bu enfeksiyon tipik olarak sonbaharın başlarında başlar ve bahar aylarının başına kadar devam eder. Avrupa'da ise kış ayları boyunca görülür. Karadağ ve arkadaşları Ankara'da rotavirus enfeksiyonunun dağılımını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada rotavirus enfeksiyonunu en yüksek Aralık ayında %55.4 oranında bulmuşlardır¹¹⁰. Bizim çalışmamızda da rotavirus enfeksiyonu yine kış ayları boyunca özellikle Kasım-Ocak ayları arasında olup rotavirus pozitif 41 örneğin %31.7'si Kasım ayında, %21.9'u Aralık ayında ve %14.6'sı Ocak ayında tespit edildi.

Dünya çapında yapılan çalışmalarda rotavirus enfeksiyonunun daha çok yaşamın ilk iki yılında ortaya çıktığı belirlenmiştir. Genel olarak iki yaşa kadar görülen rotavirus enfeksiyonu bütün rotavirus enfeksiyonlarının %71'ini oluşturmaktadır. Ülkemizde Kurugöl ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada rotavirus pozitif 366 örneğin %80.7'si <2 yaş hastalardan oluşmakta idi¹¹¹. Bizim çalışmamızda da 41 rotavirus pozitif örneğin %74.3'ü 2 yaşından küçük hastalardan oluşmakta olup rotavirus enfeksiyonu en çok 6-24 ay arasında 26 vakada %59.6 oranında gözlemlendi (Tablo 4.2.).

Çalışmamıza dahil edilen toplam 188 hastanın 132'si (%70.2) hastanede yatan çocuklardan oluşmakta idi. Bu 132 hastanın 34'ü (%25) rotavirus antijeni pozitif bulunurken, polikliniklere ve acil servislere başvuran 56 hastanın ise 7'si (%12) rotavirus antijeni bakımından pozitif bulundu. Rotavirus pozitif olan 41 hastanın 34'ü (%83) hastanede yatan ve 7'si (%17) polikliniklere ve acil servise başvuran hastalardan oluşmuştu. Bütün bu sonuçlar oldukça yüksek oranda hastaneye yatışlara sebep olan rotavirus enfeksiyonunun önemini göstermektedir.

Rotavirus genomunun doğal segmentli yapısından dolayı multiple enfeksiyon sırasında virus değişime uğrayabilir. Gen segmentleri reassortment sırasında farklı G ve P tipi kombinasyonları oluşturabilirler. Populasyonda rotavirus miks enfeksiyonun ortaya çıkması aşımın etkinliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Miks enfeksiyonun görülmesi genetik çeşitliliğin artmasına yol açan ve nadir görülen G ve P genotip kombinasyonlarının ortaya çıkmasına sebep olan genetik reassortment için dikkate alındığında oldukça önemli olabilir¹¹¹.

Rotavirus grup A miks infeksiyonu belirlemek amacıyla Freitas ve arkadaşları Brezilya’da yaptıkları çalışmaya 81 rotavirus pozitif dışkı örneğini dahil etmişlerdir. Semi-nested RT-PCR testi ile P genotipleri tanımlamışlar ve sonuçlarını dizi analizi ile doğrulamışlardır. Çalışma sonunda 81 rotavirus pozitif örneğin 25’inde (%30) birden fazla P genotipine rastlanmış ve 25 örneğin 12’sinin (%48) P miks genotip sonuçları dizi analizi ile doğrulanmıştır. Bu örneklerin 10’u (%12) P[6]P[8], biri P[4]P[6] ve yine biri P[4]P[6]P[8] bulunmuştur. Fischer ve arkadaşları Danimarka’da miks infeksiyon sıklığını belirlemek için yaptıkları çalışmada analiz edilen bütün örneklerin %21’inin miks P genotipine sahip olduğunu ve P[4]P[8] ve bunu takiben P[4]P[6] ve P[6]P[8] suşlarının görülen en yaygın suşlar olduğunu bildirmişlerdir¹¹².

Ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda 5 yaş altı çocuklarda %15-48.9 arasında rotavirusa bağlı gastroenterit insidansı bildirilmiştir. Ülkemizde akut gastroenterit etyolojisinin araştırıldığı çalışmalardan Kurugöl ve arkadaşları İzmir’de akut gastroenteritli vakalarda %39.8, Karadağ ve arkadaşları Ankara’da %36.8, Gül ve arkadaşları Kahramanmaraş’ta %25.7 oranlarında ile rotavirus pozitifliği saptamışlardır^{110,111,113}. Çiçek ve arkadaşları İzmir’de 2007 yılında 219 çocukta %48.9’unda rotavirus infeksiyonu tespit etmişlerdir¹¹⁵. Çalışmamızda ise toplam 188 hastanın %21.8’inde rotavirus infeksiyonu tespit edildi.

Ülkemizde rotavirus genotiplerinin dağılımı ile ilgili ise çok az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan Kurugöl ve arkadaşları 2003 yılında İzmir’de gastroenterit sebebiyle hastaneye başvuran 5 yaş altı 920 çocukta %39.8’inde rotavirus tespit etmiştir. İzole edilen suşların %91’inin genotip G1-4 olduğu ve en sık oranla G1 genotipini %75.1 bunu takiben G4 genotipini %6.3, G3 genotipini %3 ve G2 genotipini ise %0.8 olduğunu belirtmişlerdir¹¹¹. Çataloluk ve arkadaşları 2005 yılında Gaziantep’te yaptıkları çalışmada akut gastroenteritli 508 çocukta en sık G4P[8] genotipini saptamışlardır ve G4P[8] (%42.2), G1P[8] (%26.6), G2P[4] (%3.1) ve G3P[8] (%1.5) genotiplerinin rotavirus diarelerinin %73.4’ünden sorumlu olduğu belirtilmiştir. Az görülen G9P[8] ise örneklerin %3.2’sinde bulunmuştur. Miks infeksiyonlar %7.3 oranında rastlanmıştır¹¹⁴. Bozdayı ve arkadaşlarının Eylül 2004-Aralık 2005 yılları arasında Ankara’da yaptıkları çalışmada ise akut gastroenteritli 322 çocukta alınan dışkı örneklerinin %39.7’sinde rotavirus tespit edilmiştir. En baskın genotiplerin G1P[8] (%55.5) ve G9P[8] (%10.1) olduğu gözlenmiştir. Miks genotipler infeksiyonların %2.4’ünden sorumlu bulunmuştur¹¹⁶. Ancak bu konuda yapılacak daha geniş moleküler epidemiyolojik çalışmalara gereksinim vardır.

Bölgemizde 2008 yılında beş yaş altı akut gastroenteritli çocuklardan toplanan 188 dışkı örneğinden ELISA testi sonucu 41'i (%21.8) rotavirus antijeni pozitif bulundu. Rotavirus pozitif örneklerin rotavirus G ve P genotipleme RT-PCR testi ile belirlendi. Çalışılan örneklerin 38'i (%92.6) tiplendirildi. Yalnızca 3 (%7.4) örneğin G (VP7) veya P (VP4) genotipi belirlenemedi. Bölgemizde rotavirus gastroenteriti olan çocuklarda tek başına en baskın G genotip infeksiyonu toplam 41 örneğin 25'inde %61 oranla G1 genotipi olup bunu takiben G4 %17 oranla tek başına 7 örnekte ve G9 %9.8 oranla tek başına 4 örnekte tespit edildi. Miks infeksiyona sebep olan G genotiplerinden G1+G9 %7.4 oranla tek başına 3 örnekte ve G1+G4 %2.4 oranla tek başına 1 örnekte bulundu. Geriye kalan 1 örnekte (%2.4) G genotipi belirlenemedi (Tablo 4.5).

Rotavirusun P genotiplerinden ise tek başına P[4] 41 örneğin 25'inde %61 oranla en baskın genotipti. Ardından 1 örnekte P[6] %2.4 ve 1 örnekte P[10] %2.4 genotipleri daha düşük sıklıkta tespit edildi. Miks infeksiyona sebep olan P genotipler P[4]+P[8]+P[10] %9.8 oranla tek başına 4 örnekte, P[4]+P[10] %7.4 oranla tek başına 3 örnekte, P[4]+P[10]+P[11] %4.9 oranla tek başına 2 örnekte ve P[4]+P[11], P[6]+P[10], P[8]+P[10] %2.4 oranla tek başına 1 örnekte bulundu. Geriye kalan 2 örnekte (%4.9) P genotipi belirlenemedi (Tablo 4.5).

Rotavirus pozitif 41 örneğin 38'inde (%92.6) her iki G ve P tipleri belirlendi ve sonuçta 8 farklı rotavirus G/P kombinasyonu elde edildi. Çalışma serimizde G1P[4] 11 vakada %26.8 oranla en baskın rotavirus genotipi olup bunu 7 vakada %17 oranla G4P[4], 3 vakada %7.4 oranla G9P[4] ve 1'er vakada %2.4 oranlarında G1P[6] ve G1P[10] genotipleri izledi. Rotavirus diarezi olan çocuklarda miks infeksiyonun görülme oranı ise 15 vakada %36.6 olarak tespit edildi. Tek bir G/P genotip infeksiyonu 23 (%56) vakada bulundu (Tablo 4.7).

Rotavirus G1 genotipi en yüksek oranda 29 vakada %70.7 oranında tespit edilen G genotipi olup ardından G4 vakaların 8'inde %19.5 oranla ve G9 vakaların 7'sinde %17 oranla bulundu. En yaygın P genotipi 35 vakada %85.3 oranla P[4] olup vakaların 12'sinde %29.2 oranla P[10], 5'inde %12.2 oranla P[8], 3'ünde %7.4 oranla P[11] ve 2'sinde %4.9 oranla P[6] bulundu (Tablo 4.6). Bizim çalışma serimizde bulduğumuz G1 prevalansı %70.7, Kurugöl ve arkadaşlarının 2003 yılında İzmir'de gastroenteritli 5 yaş altı 920 çocukta buldukları G1 genotipinin %75.1 prevalansı ile uyumludur. Akut diareli çocuklarda rotavirus P[4] tipinin yaygınlığı ilgili olarak bizim %85.3'lük P[4] bulgumuza benzer şekilde Arjantin'de Arguelles ve arkadaşları 1996-1998 yılları arasında akut diarezi olan 500 çocukdan %71'inde P[4] tespit etmişlerdir¹⁰⁷. Amerika'da Detroit'de Abdel-Haq ve arkadaşları da gastroenteriti olan 100 çocuktan en yaygın genotip prevalansının %41 oranla

G1[P4] olduğunu bildirmişlerdir. En yüksek prevalansda rastlanan P genotipi ise yine %71 oranla P[4]'dür¹⁰⁵. Antunes ve arkadaşları ise Portekiz'de 2007 kış sezonunda 424 çocukdan en baskın rotavirus genotipini %68.6 oranla G2P[4] olarak açıklamışlardır¹⁰⁸.

Bölgemizde G1P[4] (%26.8) en baskın genotip olup bunu %17 oranla G4P[4] izlemiştir. Oysa Çataloluk ve arkadaşları 2005 yılında Gaziantep'te yaptıkları çalışmada akut gastroenteritli 508 çocukta en yaygın genotipin G4P[8] (%42.2) olduğunu bildirmişlerdir¹¹⁴. Ankara'da Bozdayı ve arkadaşları ise Eylül 2004-Aralık 2005 yılları arasında akut gastroenteritli 322 çocukta en baskın genotiplerin G1P[8] (%55.5) ve G9P[8] (%10.1) olduğunu tespit etmişlerdir¹¹⁶. Bu bulgular ülkemizde rotavirus infeksiyonunun epidemiyolojisi ve G/P genotip kombinasyonlarında farklılıkların olduğunu göstermektedir. Rotavirusun genelde nadir görülen G1P[4] kombinasyonu Amerika'da Detroit'de Abdel-Haq ve arkadaşları¹⁰⁵ tarafından %41 oranında bulunmuş olup bu oran bizim %26.8'lik G1P[4] oranından oldukça yüksektir.

Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalar kıyaslandığında G1 %70.7 oranla en yüksek bulunan G tip olarak belirlendi ve daha önceki çalışmalarla uyumlu bulundu, ancak çalışmamızda ülkemizde yapılan önceki çalışmalarda bulunan G2 ve G3 suşlarına rastlanmadı. Aynı zamanda yine farklı olarak ülkemizde daha önce bildirilmeyen G1P[10], G1P[11], G4P[4], G9P[4] ve G9P[11] gibi genotipler gözlemlendi. Bu sonuçlar hem yaygın hemde yaygın olmayan genotipler arasında kosirkülasyon olduğunu ve miks infeksiyon sonucu yeni rotavirus suşlarının ortaya çıktığını göstermektedir.

Günümüzde kullanımda olan pentavalan rotavirus aşısı RotaTeq G1, G2, G3, G4 ve P1A[8] rotavirus suşları ve monovalan rotavirus aşısı Rotarix P1A[8]G1 rotavirus suşu ile ciddi diareye karşı %85-98 oranlarında homotipik koruma sağlamaktadır. Bölgemizde 2008 yılında beş yaş altı akut gastroenteriti olan 188 çocukta rotavirus infeksiyon insidansı %21.8'dir. Rotavirus G1 genotipi %70.7 oranla en yaygın G genotipi olup ardından G4 vakaların %19.5 ve G9 %17'sinde bulunmuştur. En yaygın P genotipi ise %85.3 oranla P[4] olup vakaların %29.2'inde P[10], %12.2'sinde P[8], %7.4'inde P[11] ve %4.9'unda P[6] tespit edilmiştir. Aşıların G1-G4 ve P[8] genotiplerine karşı homotipik ve G9'a karşı da heterotipik koruyuculuk sağladığı bilinmesine rağmen aşıların P[4] gibi rotavirus suşları için koruyuculuğunu az sayıda çalışma desteklemiştir¹¹⁵. Çalışma popülasyonumuzda en baskın genotip G1P[4] (%26.8) olup genelde az rastlanan bir rotavirus G-P kombinasyonudur. Son yıllarda koinfeksiyonlar sonucu ressortment ile insanlar için patojenik olan nadir görülen yeni rotavirus genotip kombinasyonları ortaya çıkmaktadır ve böylece değişen moleküler epidemiyolojik verilere göre rotavirus aşılarının modifikasyonu gerekebilir. Bu sebeple

rotavirus aşılarının potansiyel etkinliğinin değerlendirilmesi için ülkemizde sürekli devam eden moleküler epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak bölgemizde akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus infeksiyonunun insidansı ve rotavirus G ve P genotiplerinin dağılımının belirlenmesi rotavirusa karşı aşı geliştirme stratejilerinin oluşturulmasına katkıda bulunacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bölgemizde 2008 yılında 5 yaş altı akut gastroenteriti olan 188 çocukta rotavirus enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisini araştırmak amacıyla yapılan çalışma sonunda;

- 1- Beş yaş altı akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus enfeksiyonunun insidansı %21.8 olup hemen hemen her çocuk beş yaşına kadar rotavirus enfeksiyonuna maruz kalmıştır.
- 2- Çalışmaya dahil edilen toplam 188 hastanın yaş grupları 10 günlükten 4.5 yaşına kadar değişmekte olup rotavirus enfeksiyonu en çok 6-24 ay arasında %59.6 oranında görülmekte idi. Rotavirus enfeksiyonunun pik yaptığı aylar Kasım-Ocak ayları arasında belirlenmiş olup 20 hastanın 9'unda (% 45) rotavirus pozitif bulunması ile Aralık ayı en yüksek rotavirus prevalansının görüldüğü ay idi. Bunu takiben Kasım ayında 36 hastanın 13'ünde (%36) rotavirus pozitif bulundu.
- 3- Çalışılan 41 hastanın 40'ında (%97) diare, 33'ünde (%80) kusma, 24'sinde (%58) ateş gözlemlendi. Yine rotavirusa bağlı diareesi olan hastaların hepsi dehidrate olup %17'sinde hafif, %54'ünde orta, %29'unda ciddi dehidratasyon tespit edildi. Çalışmaya dahil edilen toplam 188 hastanın 132'si (%70.2) hastanede yatan 56'sı (%29.8) polikliniklere ve acil servise başvuran hastalardan oluşmakta idi. Bu 132 hastanın %25'i rotavirus antijeni pozitif bulunurken, polikliniklere ve acil servislere başvuran 56 hastanın %12'si rotavirus antijeni pozitif bulundu. Rotavirus gastroenteriti olan hastaların 34'ü (%83) hastanede yatan ve 7'si (%17) polikliniklere ve acil servise başvuran hastalardan oluşmakta idi.
- 4- Toplam 188 hastanın 41'i (%21.8) ELISA testi sonucunda rotavirus grup A antijeni pozitif bulundu. Pozitif bulunan dışkı örnekleri RT-PCR testi ile VP4 ve VP7 rotavirus genomları ve ardından semi-nested multipleks PCR testi ile G ve P genotipleri tespit edildi. Çalışılan 41 pozitif örnekten 38'inin (%92.6) G ve P genotipleri belirlenirken yalnızca 3 (%7.4) örneğin genotipi belirlenemedi. En yüksek oranda tespit edilen G genotipi G1 %70.7 olup ardından G4 %19.5 ve G9 %17 bulundu. En yaygın P genotipi %85.3 oranla P[4] olup ardından %29.2 oranla P[10], %12.2 oranla P[8], %7.4 oranla P[11] ve %4.9 oranla P[6] takip etti.

5- Çalışma serimizde G1P[4] %26.8 oranla en baskın rotavirus genotipi olup bunu %17 oranla G4P[4], %7.4 oranla G9P[4] ve %2.4 oranlarında G1P[6] ve G1P[10] genotipleri izledi. Rotavirus diarezi olan çocuklarda miks infeksiyonun görülme oranı ise 15 vakada %36.6 olarak tespit edildi. Tek bir G/P genotip infeksiyonu 23 (%56) vakada bulundu.

Ülkemizde rotavirus gastroenteritinin moleküler epidemiyolojik özellikleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu proje bölgemizde rotavirus G ve P genotiplerinin belirlendiği ilk kapsamlı çalışma olup akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus infeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisi açısından veri sağlayacak ve ulusal aşı politikasının yönlendirilmesine katkıda bulunacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. **Gray J, Vesikari T, Van Damme P, Giaquinto C, Mrukowicz J, Guarino A, Dagan R, Szajewska H, Usonis V.** Rotavirus. *J Pediatr Gastroenterol Nu*, **2008**;46:S24-31.
2. **Ellen S, Dante A, Sharon, Humiston, Dante A, Sharon G.** Rotavirus. *Pediatrics in Review*, **2007**; 8 No.5.
3. **Parez N.** Rotavirus gastroenteritis: why to back up the development of new vaccines? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **2008**;31(2-3):253-69.
4. **Franco MA, Angel J, Greenberg HB.** Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*, **2006**;24(15):2718-31.
5. **Hyser JM, Estes MK.** Rotavirus vaccines and pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol*, **2009**;25(1):36-43.
6. **Estes MK, Kapikian AZ.** Virology. *Hong Kong*, **2007**; 1917-1957
7. **Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH.** Dedection of a new virus by electron microscopy of fecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet*, **1974**; 1:149-151.
8. **Bishop RF.** Natural history of human rotavirus infections. *Arch Virol Suppl*, **1996**; 12:119-128.
9. **Flewett T, Bryden A, Davies H.** Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*, **1974**;2:61-63.
10. **Matthijssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M.** Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol*, **2008**; 153:1621-1629.
11. **Desselberger U, Wolleswinkel-van den Bosch J, Mrukowicz J.** Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *Pediatr Infect Dis J*, **2006**;25:S30-41.
12. **Iturriza Gomara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J.** Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation, *J Virol*. **2002**;76:6596-6601
13. **Yarkın F.** Gastroenterit virusları. Moleküler, klinik tanısal viroloji, **2006**; S233-262.
14. **Shaw AR.** The rotavirus vaccine saga. *Annu Rev Med*, **2006**;57:167-80.
15. **Yoshinaga M, Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Müller WE, Ushijima H.** Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. *Arch Virol*, **2006**;151(1):183-92.
16. **Manuel A. Franco a., Angel J, Harry B. Greenberg.** Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines, *Vaccine*, **2006**; 2718-2731.
17. **Nakagomi O, Nakagomi T, Akatani K, Ikegami N.** Identification of rotavirus genogroups by RNA-RNA hybridization. *Mol Cell Probes*, **1989**; 3:251-261.
18. **Matthijssens J, Rahman M, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Kabue JP, Muyembe JJ, Van Ranst M.** G8 rotavirus strains isolated in the Democratic Republic of Congo belong to the DS-1- like genogroup. *J Clin Microbiol*, **2006**; 44:1801-1809.
19. **Matthijssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo AE, Iturriza-**

Go'mara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*, **2008**; 82:3204–3219.

20. **Prasad BV, Rothnagel R, Zeng CQ.** Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature*, 1996; 382:471-473.

21. **Fischer TK, Bresee JS, Glass RI.** Rotavirus vaccine and the prevention of hospital acquired diarrhea in children. *Vaccine*, **2004**;1: S49-54.

22. **Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N.** Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J*, **1989**; 8:3867–3874.

23. **Mansell EA, Patton JT.** Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *J. Virol*, **1990**; 64:4988–4996.

24. **Crawford, S. E., S. K. Mukherjee, M. K. Estes, J. A. Lawton, A. L. Shaw, R. F. Ramig, and B. V. Prasad.** Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J. Virol*, **2001**; 75:6052–6061.

25. **Denisova E, Dowling W, LaMonica R, Shaw R, Scarlata S, Ruggeri F., Mackow ER.** Rotavirus capsid protein VP5 permeabilizes membranes. *J. Virol.* 1999; **73**:3147–3153.

26. **Rodríguez-Díaz J, Rubilar-Abreu E, Spitzner M, Hedlund KO, Liprandi F, Svensson L.** Design of a multiplex nested PCR for genotyping of the NSP4 from group A rotavirus. *J Virol Methods*, **2008**; 149(2):240-5.

27. **Nava P, López S, Arias CF, Islas S, González-Mariscal L.** The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Sci*, **2004**; 1;117(Pt 23):5509-19.

28. **Zárate S, Romero P, Espinosa R, Arias CF, López.** VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin $\alpha\beta3$ through a novel integrin-binding site. *J.Virol.* **2004**; 78(20):10839-47.

29. **Graham KL, Takada Y, Barbara S.** Coulson Rotavirus spike protein VP5 binds $\alpha2\beta1$ integrin $\alpha\beta3$ on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity. *Journal of General Virology*, 2006; 87, 1275–1283.

30. **Ruiz M.C., Cohen J., Michelangeli F.** Role of Ca^{2+} in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium*, 2000; 28(3):137–149.

31. **Cheng AC, McDonald JR, Thielman NM.** Infectious diarrhea in developed and developing countries. *J Clin Gastroenterol*, **2005**; 39:757-73

32. **Ramig R.** Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *J Virol*, **2004**; 78: 10213-10220.

33. **Homaidan F.R, Torres A, Donowitz M, Sharp G.W.G.** Electrolyte transport in piglets infected with transmissible gastroenteritis virus, *Gastroenterology*, **1991**; 895–901.

34. **Hyser JM, Estes MK..** Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008. *Curr Opin Gastroenterol*, **2009**;25(1):36-43.

35. **Silvestri LS, Tortorici A, Patton JT.** The rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *J Virol* **2005**; 79:15165–15174.

36. **Hyser JM, Zeng CQ-Y, Beharry Z.** Epitope mapping of the rotavirus SA11 NSP4 cytoplasmic tail. *Virology*, **2008**; 373:211–228.

37. **Chami M, Oules B, Paterlini-Brechot P.** Cytobiological consequences of calcium-signaling alterations induced by human viral proteins. *Biochim Biophys Act*, **2006**; 1763:1344–1362.

38. **Lundgren, O., A. Timar-Peregrin, K. Persson, S. Kordasti, I. Uhnöo, and L. Svensson.** Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*, **2000**; 287:491 495.

39. **Lundgren, O., and L. Svensson.** Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect.* **2001.** 3:1145–1156.
40. **Molla A, Molla A, Sarker S.A, Khatun .** Whole-gut transit time and its relationship to absorption of macronutrients during diarrhoea and after recovery. *Scand. J. Gastroenterol*, **1983**; 537–543
41. **Velazquez F. R.** Protective Effects of Natural Rotavirus Infection. *Pediatr Infect Dis J*, **2009**;28: S54–S56.
42. **Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ.** Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med*, **1996**;335:1022–8.
43. **Rota S, Fidan I.** Noninflamatuvar ishallerin patogenezi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **2007**; 37 (4) :234-241.
44. **Chiba S, Yokoyama T, Nakata S, Morita Y, Urasawa T, Taniguchi K.** Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *Lancet*, **1986**;2(8504):417–21.
45. **Ward L.A, Rosen B.I, Yuan L, Saif L.J.** Pathogenesis of an attenuated and a virulent strain of group A human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *J. Gen. Viro*, **1996**; 1431–1441.
46. **Hjelt K, Grauballe PC, Schiotz PO, Andersen L, Krasilnikoff PA.** Intestinal and serum immune response to a naturally acquired rotavirus gastroenteritis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **1985**;4(1):60-6.
47. **Brown KA, Kriss JA, Moser CA, Wenner WJ, Offit PA.** Circulating rotavirus-specific antibody-secreting cells (ASCs) predict the presence of rotavirus-specific ASCs in the human small intestinal lamina propria. *J Infect Dis*, **2000**; 182(4):1039–43.
48. **Espinoza F, Paniagua M, Hallander H, Svensson L, Strannegard O.** Rotavirus infections in young Nicaraguan children. *Pediatr Infect Dis J*, **1997**; 16(6):564–7.
49. **Martella, V.** Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology*, 2006; **344**,509–519
50. **Blutt, SE, Conner ME.** Rotavirus: to the gut and beyond. *Curr. Opin. Gastroenterol*, **2007**; .**23**, 39–43
51. **Vellenga L, Egberts HJA, Wensing T, Van Dijk J, Breukink HJ.** Intestinal permeability in pigs during rotavirus infection. *Am. J. Vet. Res*, **1992**; 53, 1180–1183.
52. **Anderson EJ, Weber SG.** Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis*, **2004**; 4:91–9.
53. **Dennehy PH, Cortese MM, Begue RE.** A case-control study to determine risk factors for hospitalization for rotavirus gastroenteritis in US children. *Pediatr Infect Dis J*, **2006**;25:1123–31.
54. **Newman RD, Grupp-Phelan J, Shay DK, Davis RL.** Perinatal risk factors for infant hospitalization with viral gastroenteritis. *Pediatrics*, **1999**; 103:E3.
55. **Dennehy PH, Cortese MM, Begue RE.** A case-control study to determine risk factors for hospitalization for rotavirus gastroenteritis in US children. *Pediatr Infect Dis J*, **2006**;25:1123–31.
56. **Rahman M, Matthijnsens J, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Taniguchi K, Iturriza-Go'mara M, Iftekharuddin N, Azim T, Van Ranst M.** Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. *J Virol*, **2007**; 81:2382–2390.
57. **Santos N, Hoshino Y.** Global distribution of rotavirus serotypes/ genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*, **2005**;15:29-56.
58. **Iturriza-Gomara M, Auchterlonie IA, Zaw W.** Rotavirus gastroenteritis and central nervous system (CNS) infection: characterization of the VP7 and VP4 genes of rotavirus strains isolated from paired fecal and cerebrospinal fluid samples from a child with CNS disease. *J Clin Microbiol*, **2002**;40, 4797–9.
59. **Makela M, Varala O, Hermann R.** Enteral virus infections in early childhood and an enhanced type 1

diabetes-associated antibody response to dietary insulin. *J Autoimmun* **2006**; 27:54–61.

60. **Blomqvist M, Juhela S, Erkkila S.** Rotavirus infections and development of diabetes-associated autoantibodies during the first 2 years of life. *Clin Exp Immunol* **2002**;128:511–5.

61. **Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI.** Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*, **2003**; 9(5):565-72.

62. **Grimwood K, Buttery JP.** Clinical update: rotavirus gastroenteritis and its prevention. *Lancet*, **2007**; 28;370(9584):302-4.

63. **Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI.** Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*, **2006**; 12(2):304-6.

64. **Bresee JS, Hummelman E, Nelson EA.** Rotavirus in Asia: the value of surveillance for informing decisions about the introduction of new vaccines. *J Infect*, **2005**; 192:1-5.

65. **Visser LE, Cano Portero R, Gay NJ, Martinez Navarro JF.** Impact of rotavirus disease in Spain: an estimate of hospital admissions due to rotavirus. *Acta Paediatr*, **1999**; 88:S72–6.

66. **Parashar UD, Burton A, Lanata C.** World Health Organization estimates of the global mortality from rotavirus in children in the year 2004. *J Infect Dis*, **2009**;20-21.

67. **Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Ohata R, Ogura H, Yamada M.**Seroepidemiology of human group C rotavirus in Japan based on a blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* **2001**; 8(1):161-5.

68. **Cook S, Glass R, Lebaron C.** Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Org.* **1990**; 68:171–177.

69. **Middleton PJ, Szymanski MT, Petric M, Abbott GD.** Orbivirus acute gastroenteritis of infancy. *Lancet*, **1974**; 1:1241-1244.

70. **Kapikian AZ, Hoshino Y, Flores J.** Alternative approaches to the development of a rotaviru vaccine. 11.th *Nobel Conf. Stockholm*, **1985**; 192-214.

71. **Buser J, Risch L, Rutz T, Manang S, Munzinger J.** Comparison of rota virus latex agglutination test with two rapid immunochromatographic test devices for detection of rotavirus in human feces. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2001**; 20: 295-296.

72. **Altindis M, Yavru S, Simsek A, Ozkul A, Ceri A, Koc H.** Rotavirus Infection in Children with Acute Diarrhea as Detected by Latex Agglutination, ELISA and Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Indian Pediatr.* **2004**; 41(6):590-4.

73. **Gouvea V, Glass RI, Woods P.** Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol*, **1990**; 28:276–82.

74. **Clark HF, Borian FE, Bell LM,Modesto K, Gouvea V, Plotkin SA.** Protective effect of WC3 vaccine against rotavirus diarrhea in infants during a predominantly serotype 1 rotavirus season. *J Infect Dis* **1988**;158:570–87.

75. **Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M.** Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis* **1996**;174(Suppl 1): S30–6.

76. **Coulson BS, Masendycz PJ.** Measurement of rotavirus neutralizing coproantibody in children by fluorescent focus reduction of serotype G9 rotaviruses. *J Clin Microbiol*, **1990**;28:1652-1654.

77. **Angel J, Franco MA, Greenberg HB.** Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol*, **2007**; 5(7):529-39.

78. **Choice Study Group.** Multicenter, randomized, double-blind clinical trial to evaluate the efficacy and safety of a reduced osmolarity oral rehydration salts solution in children with acute watery diarrhea. *Pediatrics*, **2001**; 107:613-618.
79. **King CK, Glass R, Bresee JS, Duggan C.** Centers for Disease Control and Prevention. Managing acute gastroenteritis among children: oral rehydration, maintenance, and nutritional therapy. *MMWR Recomm Rep*. **2003**;52(RR-16):1-16.
80. **Molina S, Vettorazzi C, Peerson JM.** Clinical trial of glucose-oral rehydration solution (ors), rice dextrin-ors, and rice flour ors for the management of children with acute diarrhea and mild or moderate dehydration. *Pediatrics*, **1994**; 95: 191-197.
81. Practice parameter: the management of acute gastroenteritis in young children. American Academy of Pediatrics, Provisional Committee on Quality Improvement, Subcommittee on Acute Gastroenteritis. *Pediatrics*. **1996**; 97:424-435.
82. **Ramsook C, Sahagun-Carreón I, Kozinetz C.** A randomized clinical trial comparing oral ondansetron with placebo in children with vomiting from acute gastroenteritis. *Ann Emerg Med*, **2002**;39:397-403.
83. **Snodgrass DR, Fitzgerald TA, Campbell I.** Homotypic and heterotypic serological responses to rotavirus neutralization epitopes in immunologically naive and experienced animals. *J Clin Microbiol*, **1991**; 29: 2668-2672.
84. **Salazar-Lindo E, Santisteban Ponce J, Chea-Woo E.** Racecadotril in the treatment of acute watery diarrhea in children. *N Engl J Med*, **2000**; 343:463-467.
85. **Vesikari T, Rautanen T, Von Bonsdorff CH.** Rotavirus gastroenteritis in Finland: burden of disease and epidemiological features. *Acta Paediatr Suppl* **1999**;88:24-30.
86. **Soriano-Gabarro M, Mrukowicz J, Vesikari T.** Burden of rotavirus disease in European Union countries. *Pediatr Infect Dis J*. **2006**; 25:S7-11.
87. **Gleizes O, Desselberger U, Tatochenko V.** Nosocomial rotavirus infection in European countries: a review of the epidemiology, severity, and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J*, **2006**; 25:S12-21.
88. **Mebis CA, Kono M, Underdahl NR, Twiehaus MJ.** Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. *Can Vet J*, **1971**; 12:69-72.
89. **Enturia YD, Peckham CS, Cordery M.** Live attenuated oral rotavirus vaccine. *Lancet* **1987**;2:1091-2.
90. **Bernstein DI, Smith VE, Sander DS.** Evaluation of WC3 rotavirus vaccine and correlates of protection in healthy infants. *J Infect Dis* **1990**;162:1055-62.
91. **Perez-Schael I.** Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N. Engl. J. Med.* **1997**; 337,1181-118.
92. **Murphy T, Gargiullo PM, Massoudi MS.** Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N Engl J Med*, **2001**; 344:564-72.
93. **Bresee JS, Parashar UD, Widdowson MA, Gentsch JR, Steele AD, Glass RI.** Update on rotavirus vaccines. *Pediatr Infect Dis, J* **2005**;24:947-52.
94. **Vesikari, T.** Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2006**; 354, 23-33.
95. **Clark A.** The cost-effectiveness of rotavirus vaccine in Peru and Bangladesh. 7th International Rotavirus Symposium, Lisbon; **2006**. p.12-3.
96. **Vesikari T.** Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant

rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants. *Vaccine* 24, **2006**; 4821–4829.

97. **Wood D.** WHO informal consultation on quality, safety and efficacy specifications for live attenuated rotavirus vaccines Mexico City, Mexico, 8-9 February 2005. *Vaccine*, **2005**; 23:5478-87.

98. **Dennehy PH,** Rotavirus Vaccines: an Overview. *Clin Microbiol Rev*, **2008**;21(1):198-208.

99. **Buttery JP, Kirkwood C.** Rotavirus vaccines in developed countries. *Curr Opin Infect Dis.* **2007**; 20(3):253-8.

100. **Vesikari T, Karvonen A, Puustinen L.** Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in Finnish infants. *Pediatr Infect Dis J*, **2004**;23:937-43.

101. **Ruiz Palacios G, Perez Schael I, Velazquez FR.** Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med*, **2006**; 354:11-22.

102. **Tcheremenskaia O, Marucci G, Ruggeri FM, Dovecar D.** Molecular Epidemiology of Rotavirus in Central and Southeastern Europe. *J. Clin. Microb.***2007**; 2197-2204, Vol. 45, No. 7.

103. **Wuhan, China. Yang J, Wang T, Wang Y, Lu B, Bai X, Zhang L, Wang M, Wang H.** Emergence of human rotavirus group A genotype G9 strains. *Emerg Infect Dis.* **2007**;13(10):1587-9.

104. **Iturriza-Gómara M, Isherwood B, Desselberger U, Gray J.** Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol.* **2001**;75(8):3696-705.

105. **Abdel-Haq NM, Thomas RA, Asmar BI, Zacharova V, Lyman WD.** Increased prevalence of G1P[4] genotype among children with rotavirus-associated gastroenteritis in metropolitan Detroit. *J Clin Microbiol.* **2003**; 41(6):2680-2.

106. **Zhou, Y, Okitsu S, Maneekarn N.** Distribution of human rotaviruses, especiall G9 strains, in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol. Immunol*, **2003**; **47**:591–599.

107. **Arguëlles MH, Vilegas GA, Castello A.** VP7 and VP4 genotyping of human group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol*, **2000**; 38:252–259.

108. **Antunes H, Afonso A, Iturriza M, Martinho I, Ribeiro C, Rocha S, Magalhães C, Carvalho L, Branca F, Gray J.** G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. *J Clin Virol*, **2009**; 45(1):76-8.

109. **Kim JS, Kang JO, Cho SC, Jang YT, Min SA, Park TH, Nyambat B, Jo DS, Gentsch J, Bresee JS, Mast TC, Kilgore PE.** Epidemiological profile of rotavirus infection in the Republic of Korea: results from prospective surveillance in the Jeongeub District, *J Infect Dis.* **2005**; 1:S49-56.

110. **Karadag A, Acikgoz ZC, Avci Z, Catal F, Gocer S, Gamberzade S, Ura.** Childhood diarrhoea in Ankara, Turkey: epidemiological and clinical features of rotavirus-positive versus rotavirus-negative cases. *J Infect Dis*, **2005**;37(4):269-75.

111. **Kurugöl Z, Geylani S, Karaca Y, Umay F, Erensoy S, Vardar F, Bak M, Yaprak I, Ozkinay F, Ozkinay C.** Rotavirus gastroenteritis among children under five years of age in Izmir, Turkey. *Turk J Pediatr.* **2003**; 45(4):290-4.

112. **Freitas ER, Soares CM, Fiaccadori FS, Souza M, Parente JA, Costa PS, Cardoso DD.** Occurrence of group A rotavirus mixed P genotypes infections in children living in Goiânia-Goiás, Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2008**; 27(11):1065-9.

113. **Gül M, Garipardýç M, Çýraðil P, Aral M, Karabiber H, Güler Ý.** 0-5 Yaş Arası Gastroenteritli Çocuklarda Rotavirüs ve Adenovirüs Tip 40/41 araştırması. *ANKEM Derg*, **2005**; 19: 64-7.

114. **Cataloluk O, Itturriza M, Gray J.** Molecular characterization of rotaviruses circulating in the population in Turkey. *Epidemiol. Infect.* **2005**; 133, 673–678.
115. **Cicek C, Karatas T, Altuglu I, Koturoglu G, Kurugol Z, Bilgic A.** Comparison of ELISA with shell vial cell culture method for the detection of human rotavirus in fecal specimens. *New Microbiol.* **2007**; 30(2):113-8.
116. **Bozdayi G, Dogan B, Dalgic B, Bostanci I, Sari S, Battaloglu NO, Rota S, Dallar Y, Nishizono A, Nakagomi O, Ahmed K.** Diversity of human rotavirus G9 among children in Turkey. *J Med Virol*, **2008** ;80(4):733-40.
117. **Vesikari T, Karvonen A, Prymula R, Schuster V, Tejedor JC, Cohen R, Meurice F, Han HH, Damaso S, Bouckennooghe A.** Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. *Lancet*, **2007**; 24;370(9601):1757-63.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kırşehir’de 1983 yılında doğmuştur. Eğitimini Kırşehir Vali Mithat Saylam İlkokulunda, ortaokul eğitimini Kırşehir Cumhuriyet İlköğretim Okulunda ve daha sonra lise eğitimini Kırşehir Lisesinde 2000 yılında tamamlamıştır. Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2006 yılında mezun olmuştur. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine 2007 yılında başlamıştır.

Yük. Lis. Öğr. Esin TORUN

Tlf:0-322-2327578

esintrn@hotmail.com