

**T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÜLKEMİZDE AKUT GASTROENTERİTLİ HASTALARDA YENİ
GÖRÜLMEMEYE BAŞLAYAN A GRUBU ROTAVİRÜS G10, G12
GENOTİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. HANDE KAHRAMAN DURAK**

**TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. GÜLENDAM BOZDAYI**

**ANKARA
MART 2019**

**T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÜLKEMİZDE AKUT GASTROENTERİTLİ HASTALARDA YENİ
GÖRÜLMEMEYE BAŞLAYAN A GRUBU ROTAVİRÜS G10, G12
GENOTİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. HANDE KAHRAMAN DURAK**

**TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. GÜLENDAM BOZDAYI**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2017-11
proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
MART 2019**



**Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Sınav Tutanağı**

Adı ve Soyadı	HANDE KAHRAMAN DURAK
Baba Adı	HASAN
Doğum Yeri/Tarihi	ÇORUM / 02.02.1990
Diploma Tarihi / Diploma No	04.07.2014 / 1404.A-054
Mezun Olduğu Fakülte	ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
İhtisas Süresi	Yıl: 4 Ay: –
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: ÜLKEMİZDE AKUT GASTROENTERİTLİ HASTALARDA YENİ GÖRÜLMEMEYE BAŞLAYAN A GRUBU ROTAVİRÜS G10,G12 GENOTİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI

JÜRİ KARARI:

BAŞARILI BULUNMUŞTUR.

JÜRİ ÜYELERİ


Prof.Dr. Kayhan ÇAĞLAR
BAŞKAN

Prof.Dr. Güldenay BOZDAYI


ÜYE

Prof.Dr. Koray ERGÜNAY
ÜYE



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca ve asistanlık eğitimimde bilgi birikimini benimle paylaşan, manevi desteğiyle her daim yanımda olan ve desteklerini her zaman hissettiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Gülendamar Bozdayı'ya çok teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini aktaran, bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Kayhan Çağlar, Prof. Dr. Nedim Sultan, Prof. Dr. Ayşe Kalkancı, Prof. Dr. Meltem Yalınay, Prof. Dr. Işıl Fidan ve Prof. Dr. Funda Doğruman Al'a çok teşekkür ederim.

İş ve eğitim ortamını keyifli hale dönüştüren, bilgisini ve sevgisini her daim paylaşan asistan arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Zeynep Koç, Arş. Gör. Dr. E. Ayça Ünal, Arş. Gör. Dr. Tuğba Çuhadar, Arş. Gör. Dr. Gamze Gizem Duman, Arş. Gör. Dr. Sidre Erganiş'e her zaman yanımda oldukları için çok teşekkür ederim. PhD. Ülker Abdülmecit, Bio. Selin Yiğit, doktora öğrencisi Shakhnoza Sarzhanova, PhD. Katren Al Bakkour, doktora öğrencisi Hager Muftah ve PhD. Aylin Altay Koçak, doktora öğrencisi Fakhriddin Sarzhanov'a yardımları ve arkadaşlıkları için çok teşekkür ederim.

Mikrobiyoloji Laboratuvar'ında birlikte çalıştığım ve çalışmaktan keyif aldığım adeta aileden biri gibi olan abla ve abilerime, iyi günde kötü günde her zaman varlıklarını hissettirdikleri için çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, her türlü fedakarlığını gösteren canım anneme, canım babama, canım ablama ve biricik eşime, varlıklarıyla hayatımı anlamlandıran, dünyanın en güzel duygusunu her gün bana yaşatan, gülücükleri ile günümü aydınlatan METE'me ve TUNA'ma çok teşekkür ederim.

Tez konumu proje olarak kabul eden Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	i
İçindekiler	ii
Kısaltmalar	iii
Şekiller dizini	iv
Tablolar dizini	v
Resimler dizini	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Virüsün Yapısı	4
2.2.1. Yapısal Proteinler.....	6
2.2.2. Yapısal olmayan proteinler (Non-structural protein=NSP)	8
2.3. Sınıflandırma	12
2.4. Viral Replikasyon	14
2.5. Patogenez	16
2.6. İmmünoloji	20
2.7. Klinik Bulgu ve Belirtiler	24
2.8. Epidemiyoloji	26
2.9. Tanı	28
2.10. Tedavi	32
2.11. Rotavirüs aşılıarı	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1. Örneklerin toplanması ve çalışma planı	38

3.2. İmmunokromatografik yöntemle dışkıda rotavirüs antijeninin saptanması	39
3.3. Rotavirus antijeninin ELISA testi ile saptanması	41
3.4. Dışkıdan çift zincirli rotavirüs RNA'sının ekstraksiyonu	44
3.4.1. Reagenlerin hazırlanışı:	44
3.4.2. Protokolün uygulanışı:	45
3.5. Rotavirus G ve P tiplerinin belirlenmesi	46
3.5.1. VP7 amplifikasyon basamakları:	47
3.5.2. Nested PCR ile G Tiplendirme	48
3.5.4. VP4 amplifikasyon basamakları:	51
3.5.5. Nested PCR ile P Tiplendirme	52
3.6. Agaroz jel elektroforezi	53
3.6.1. Agaroz jelin hazırlanışı ve jel elektroforezinin uygulanışı	53
3.7. İstatistiksel Analiz	55
4. BULGULAR	56
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇ	82
7. KAYNAKLAR	84
8. ÖZET	105
9. SUMMARY	107
10. EKLER	109
11. ÖZGEÇMİŞ	111

KISALTMALAR

μL	Mikrolitre
5-HT	Hidroksitriptamin
Ark	Arkadaşları
Ca^{+2}	Kalsiyum
CaCo-2	İnsan kolon adenokarsinom
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CFTR	Kistik fibrozis transmembran regülatör
Cl^-	Klor
DLP	Double-layerede particle
dpi	Enfeksiyondan gün sonra
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dsRNA	Double-strand RNA
eIF4G	Translation inatiation factor 4G
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent testi
ENS	Enterik sinir sistemi
ER	Endoplazmik Retikulum
GDP	Guanozin difosfat
GMP	Guanozin monofosfat
GT	Guaniltransferaz
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H_2SO_4	Sülfirik asit
HBGA	Histo blood antigen
Hpi	Enfeksiyondan saat sonra
Hsc70	Heat shock cognate protein
IFN	İnterferon
IRF-3	İnterferon Regulatory Factor-3
ISG	İnterferon uyarıcı gen
K^+	Potasyum

kDa	kilodalton
M	Marker
MA104	Rhesus maymun böbreği
MAVS	Mitokondriyal antiviral sinyal proteini
MDA-5	Melanoma differentiation-associated gene-5
mRNA	Messenger RNA
MT	Metiltransferaz
Na⁺	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
NDP	Nükleozit difosfat
NF- κB	Nüklear factor kappa B
NO	Nitrik oksit
NSP	Non-structural protein
NTPaz	Nükleosit trifosfataz
ORF	Açık okuma çerçevesi
ORS	Oral rehidrasyon sıvısı
PABP	PoliA Bağlayıcı Protein
PBS	Fosfat tamponlu su
PGE2	Prostaglandin E2
PGF2	Prostaglandin F2
RIG-1	Retinoic acid-inducible gene-1
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAM	S-adenosil-L-metionin
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrophorez
SG	Subgrup
siRNA	Small interfering RNA
ssRNA	Single-stranded RNA
STAT-1	Signal transducer and activator of transcription proteins
TBE	Tris Borat Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid

TLP	Triple-layered particle
TLR	Toll like receptor
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Rotavirüs partiküllerinin transmisyon elektron mikroskobu ile görünümü	4
Şekil 2. Rotavirüsün taksonomik sınıflandırılması	5
Şekil 3. (a) Rotavirüsün 11 segmentinin sds-page’de (sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforez) görünümü (b,c) rotavirüsün yapısal proteinlerinin yerleşimi	6
Şekil 4. Rotavirüsün replikasyon döngüsü	16
Şekil 5. Rotavirüs enfeksiyonu sırasında bağırsak epitel hücrelerinde görülen histopatolojik değişiklikler (domuz rotavirüsü ile enfekte olmuş domuzlarda yapılan çalışmalara dayanan diyagram) hpi:enfeksiyondan saat sonra, dpi:enfeksiyondan gün sonra	17
Şekil 6. Rotavirüs enfeksiyonunda görülen ishal oluşum mekanizmaları (ens=enterik sinir sistemi, cfr=kistik fibrozis transmembran regülör klorür kanalı)	20
Şekil 7. Rotavirüs enfeksiyonuna karşı konakta oluşan doğal bağışıklık yanıt mekanizması	23
Şekil 8. Dünya genelinde 0-5 yaş arası çocuklarda rotavirüs ile ilişkili ölüm oranlarının 2016 yılındaki coğrafi dağılımı	28
Şekil 9. ELISA ve immünokromatografik (İMK) test sonuçları	57
Şekil 10. Agaroze jel elektroforezinde G0 pozitif ve negatif olan hastalar (m=marker)	58
Şekil 11. Agaroze jel elektroforezinde G tip görüntüleri-1.....	59
Şekil 12. Agaroze jel elektroforezinde G tip görüntüleri-2.....	59

Şekil 13. Agaroz jel elektroforezinde P0 pozitif ve negatif olan hastalar (m=marker)	60
Şekil 14. Agaroz jel elektroforezinde P tip görüntüleri.....	61
Şekil 15. Cinsiyetlere göre rotavirüs pozitifliğinin dağılımı	63
Şekil 16. Rotavirüs pozitif hastaların mevsimlere göre dağılım yüzdeleri	64
Şekil 17. Rotavirüs pozitif olguların yaş gruplarına göre dağılım yüzdeleri	64

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin kodlandığı segment, bulunduğu yer ve görevleri.....	11
Tablo 2. Rotavirüs VP7 gen bölgesi için kullanılan primerler ve baz dizilimleri.....	46
Tablo 3. VP7 amplifikasyonu için RT-PCR karışımının hazırlanması	47
Tablo 4. VP7 amplifikasyon sıcaklık dereceleri, süreleri ve döngü sayısı.....	48
Tablo 5. Rotavirus G tiplendirme için kullanılan primerler ve baz dizilimleri.....	48
Tablo 6. G tiplendirme için PCR Mastermix hazırlanması	49
Tablo 7. G tiplendirme için amplifikasyon sıcaklık dereceleri, süreleri ve döngü sayısı	50
Tablo 8. Rotavirus VP4 gen bölgesi için kullanılan primerler ve baz dizilimleri.....	50
Tablo 9. VP4 amplifikasyonu için RT-PCR karışımının hazırlanması	50
Tablo 10. VP4 amplifikasyon sıcaklık dereceleri, süreleri ve döngü sayısı.....	51
Tablo 11. Rotavirus P tiplendirme için kullanılan primerler ve baz dizilimleri.....	52
Tablo 12. P tiplendirme için PCR Mastermix hazırlanması.....	52
Tablo 13. P tiplendirme için amplifikasyon sıcaklık dereceleri, süreleri ve döngü sayısı.....	53
Tablo 14. Hastaların ELISA ve immünokromatografik test sonuçları.....	56
Tablo 15. ELISA ve PCR sonuçları	57
Tablo 16. G ve P genotip kombinasyonları	62
Tablo 17. Hastaların cinsiyet, mevsimler ve yaş gruplarına göre rotavirüs pozitiflik yüzdelerinin dağılımı.....	65
Tablo 18. Farklı yaş gruplarında görülen G genotiplerinin dağılımı	66

Tablo 19. Farklı yaş gruplarında görülen P genotiplerinin dağılımı67

Tablo 20. En sık görülen G ve P genotip kombinasyonlarının ve G10, G12'nin farklı yaş gruplarındaki dağılımı.....68

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. İmmunokromatografik yöntemle dışkıda rotavirüs antijen pozitifliğinin gösterilmesi	40
Resim 2. ELISA kitinin içindekiler	41
Resim 3. ELISA plağı (pozitif hastalar; sarı ve negatif hastalar; renksiz)	44

1. GİRİŞ

Rotavirüs, *Reoviridea* ailesi içerisinde yer alan 11 segmentli bir RNA virüsüdür. Dünyada 0-5 yaş arasındaki çocuklarda en sık karşılaşılan, mortalite ve morbidite oranı en yüksek olan viral gastroenterit etkenidir (1-3). Enfeksiyonların çoğu toplum kökenlidir, ancak rotavirüs özellikle 6 aylıktan küçük bebeklerde nazokomiyal ishalin başlıca nedenidir (4). Tüm çocuklar ilk birkaç yıl içinde enfekte olurlar, bu enfeksiyonlar genellikle semptomatiktir ve tekrarlayan enfeksiyonların kliniği daha hafiftir (5). Rotavirüs enfeksiyonları yetişkinlerde genellikle yavaş seyirlidir, ancak bağışıklık sistemi baskılanmış (organ transplantasyonu, AIDS vs.) kişilerde klinik şiddetli olabilir (6-8). Rotavirüs enfeksiyonu, 2016 yılında dünya genelinde 0-5 yaş arasındaki çocuklarda, 104.733'ü Sahra altı Afrika'da görülen, tahminen 128.500 ölüme ve 258 milyondan fazla ishal atağına neden olmuştur (9). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) rotavirüs enfeksiyonundan korunmak için canlı, oral iki rotavirüs aşısını önermektedir: Rotarix® ve RotaTeq® (10). Aşılama programının Avrupa'da uygulanmasından önce 5 yaşından küçük çocuklarda 3.6 milyon rotavirüse bağlı ishal atağının meydana geldiği ve >87.000 hastaneye yatış, yaklaşık 700.000 ayaktan tedavi ve 231 ölüm gerçekleştiği raporlanmıştır. Rotavirüs aşı programı uygulanan ülkelerde, 0-1 yaş bebeklerde rotavirüs gastroenteriti nedeniyle hastaneye yatışlarda % 70-90'lık bir düşüş görülmüştür (11).

Türkiye'de, akut gastroenterit ciddi bir halk sağlığı problemidir ve yılda 5 yaşın altındaki >352.000 çocuğu etkilemektedir (10, 12). Ülkemizde, TC. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü başkanlığında yürütülen iki sürveyans

programı sonrası, akut gastroenteriti olan 0-5 yaş arası çocuklarda, 2012-2014 yılları arasında %78.2, 2014-2016 yılları arasında %85.3 rotavirüs pozitif bulunmuştur (13, 14).

Rotavirus genotiplerinden G1, G2, G3, G4 ve G9 dünya genelinde en yaygın görülen tiplerdir (15). Virüsün segmentli genomik yapısından dolayı yeni genotipler oluşabilmekte ve bu genotiplerin dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılık gösterebilmektedir. Dünyada yeni önem kazanan, G12 ilk kez Filipinler'de 1990 yılında insanda tanımlanmıştır ve 2002'den itibaren birçok çalışmada bildirilmiştir (16-19). İnsanda ilk kez G10, Birleşik Krallık'ta 1992 yılında görülmüş olup öncesinde çoğunlukla hayvanlarda saptanmıştır. Son zamanlarda insanlarda da G10 genotipi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (20-24).

Ticari olarak mevcut antijen saptama testleri; immünokromatografik hızlı tanı testleri rutin olarak ve enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) gerek duyulduğunda kullanılmaktadır (6). Dışkı örneklerinden G ve P tipleri nested reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle tespit edilebilmektedir (25, 26).

Bu tezin amacı; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ishal etiyolojisi araştırılması için dışkı örnekleri gönderilen hastalarda, rotavirüs enfeksiyonu sıklığını belirlemek, bölgemizde yaygın olan rotavirus genotiplerini saptamak ve özellikle son zamanlarda dünya genelinde görülmeye başlayan G10 ve G12 genotiplerini araştırmaktır.

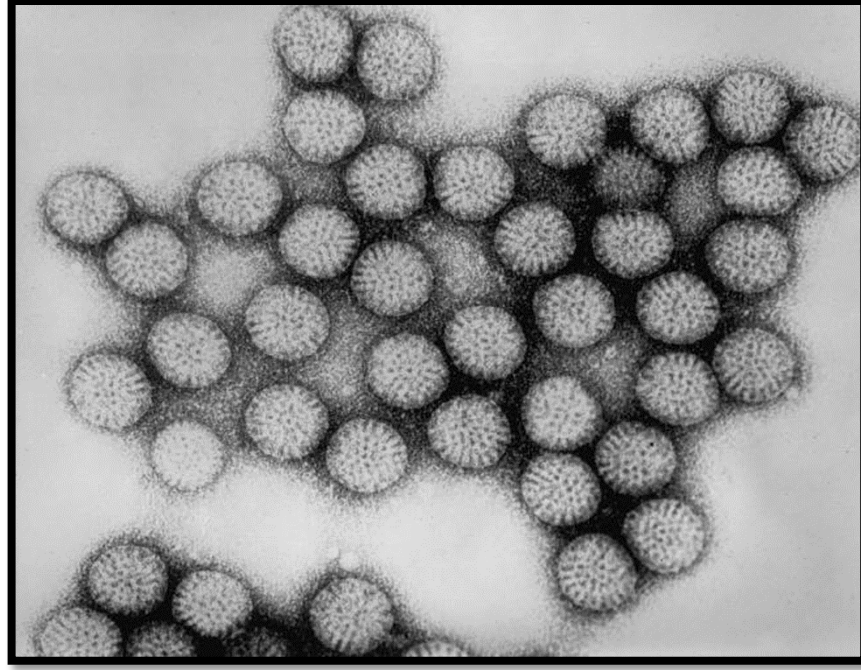
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Rotavirüs ilk olarak 1963 yılında farelerde ishal etkeni olarak tanımlanmıştır. İnsanlardaki akut gastroenteritte etken olarak kabul edilmesi 1973 yılında Bishop ve ark. tarafından, Avustralya'nın Melbourne şehrindeki Royal Çocuk Hastanesi'ne akut gastroenterit şikayeti ile başvuran altı çocuğun duodenal mukoza biyopsisinin elektron mikroskobu ile tanımlanması ile olmuştur. Flewett ve ark. 1974'te, "tekerlek benzeri" görünümüne göre "rotavirüs" adını geliştirmişlerdir (rota=tekerlek) (27). İsmi resmen tanınması ise Uluslararası Virüslerin Taksonomisi Komitesi tarafından dört yıl sonra olmuştur (28). Resmi olarak rotavirüs adını almadan önce, "orbivirüs benzeri", "reovirüs benzeri" ve "duo-virüs" olarak adlandırılmıştır (29). Rotavirüs partiküllerinin elektron mikroskobu ile görünümü Şekil 1'de gösterilmiştir (12).

Bu çalışmalara yakın zamanlarda, çok sayıda örneği incelerken maliyet ve verimsizlik nedeniyle elektron mikroskobunun yerini alacak birçok teknik araştırılmıştır. Bu yöntemler arasında immün elektron mikroskobu ve floresan virüs presipitasyon testi (Peterson 1976), counter immünoelektroforez (Middleton 1976; Tufvesson ve Johnsson, 1976; Birch 1977), indirekt immünofloresan (Bryden 1976), serbest viral immünofloresan (Yolken 1977), reovirüs benzeri RNA'nın elektroforez paterninde görülmesi (Espejo 1977), radyoimmunoassay (Kalica 1977), kompleman fiksasyonu (Zissis 1978) ve enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) (Yolken 1977) (30, 31) bulunmaktadır. Lateks aglütinasyon testleri 1980'lerde, ardından

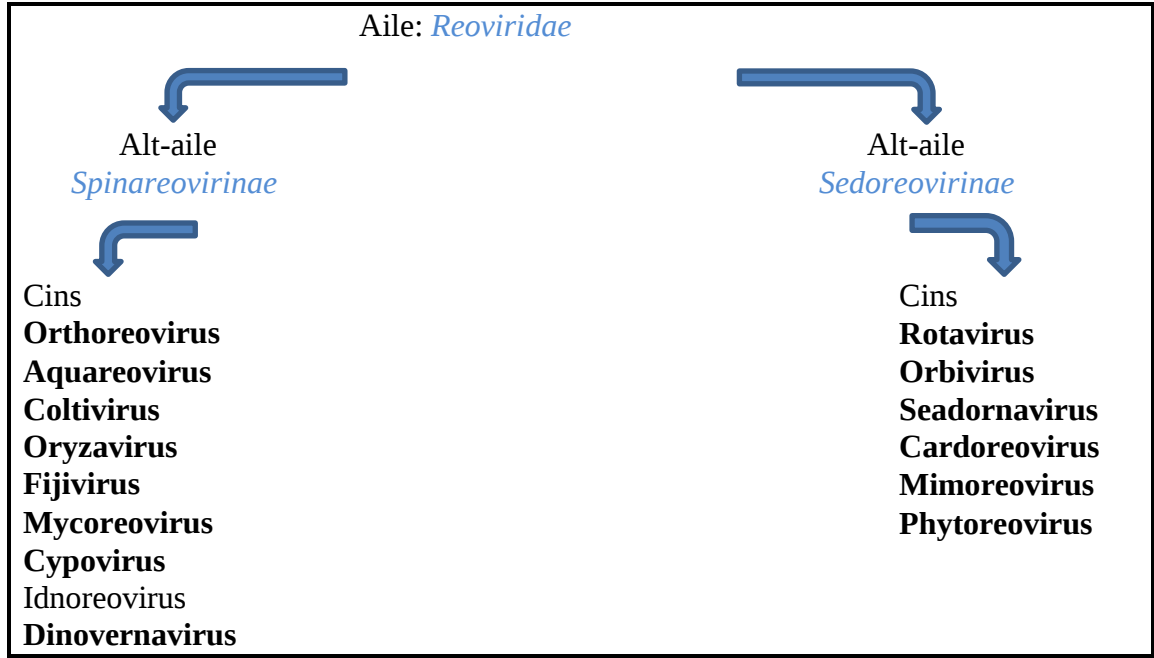
immünokromatografik testler ve sonrasında viral genomun saptandığı yöntemler geliştirilmiştir (31).



Şekil 1. Rotavirüs partiküllerinin transmisyon elektron mikroskobu ile görünümü (12)

2.2. Virüsün Yapısı

Rotavirüs, ikozahedral kapside sahip, 60-80 nm çapında, *Reoviridae* ailesinin 15 üyesinden biri olan, 11 segmentli, çift zincirli, zarfsız bir RNA virüsüdür (32-34). Rotavirüsün taksonomik sınıflandırması Şekil 2’de gösterilmiştir (35).

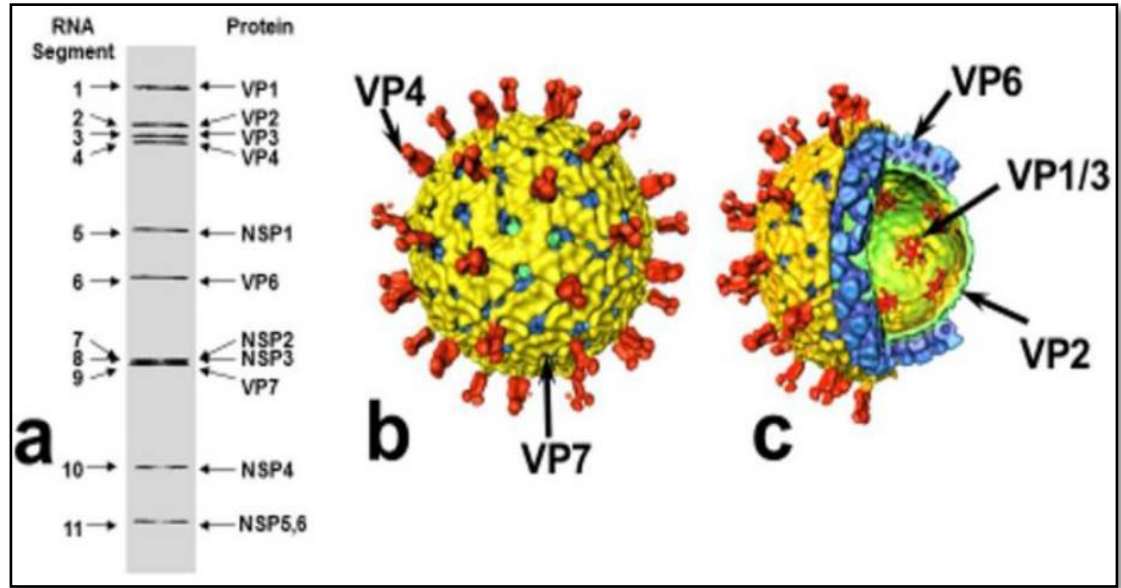


Şekil 2. Rotavirüsün taksonomik sınıflandırılması (35)

Rotavirüsler, 6 yapısal proteinin (VP1-VP4, VP6, VP7) ve 6 yapısal olmayan proteinin (NSP1-NSP6) kodlandığı segmentli bir genoma sahiptir. NSP5 ve NSP6'ı kodlayan 11. segment hariç, tüm RNA segmentleri mono-sistroniktir. Diğer rotavirüs NSP'lerinden farklı olarak NSP6, Grup C Rotavirüsler tarafından kodlanmaz (Şekil 2) (36). NSP6 proteini, segment 11'deki +1 alternatif açık okuma çerçevesi (open reading frames=ORF) tarafından sentezlenir (37). Rotavirüsün segmentli genomu ve yapısal proteinlerinin yerleşimi Şekil 3'te gösterilmiştir (36).

Enfeksiyöz rotavirüs, triple-layered particle (TLP) olarak adlandırılan üç protein tabakadan oluşmaktadır (32). Viral genom, VP1 ve VP3 bir iç protein tabakası (VP2) ile birlikte kor kısmını oluşturur. Bu yapı VP6 ile çevrelenerek

double-layered particle (DLP)'ı oluşturur. DLP, dış kısımda bulunan VP7 ve VP4 proteini (spike proteini) ile bir araya gelerek TLP'yi oluşturur (36).



Şekil 3. (a) Rotavirüsün 11 segmentinin sds-page’de (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez) görünümü (b,c) rotavirüsün yapısal proteinlerinin yerleşimi (36)

2.2.1. Yapısal Proteinler

Yapısal proteinler rotavirüsün üç tabakalı kapsidini oluşturur. Moleküler ağırlıklarına göre adlandırılmaktadırlar. Protein VP1 (125 kDa) en büyük ve VP8 (28 kDa) en küçük yapısal proteindir (38). Yapısal proteinlerin kodlandığı segment, bulunduğu yer ve görevleri Tablo 1’de özetlenmiştir (39).

RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesi olan VP1 proteini segment 1 tarafından kodlanır. Bu protein transkriptaz ve replikaz fonksiyonlarına sahiptir (38, 40). Protein VP3’ün VP1 ile etkileşimi, polimerazın transkriptaz olarak görev yapmasına neden olur. Ayrıca bazı çalışmalarda replikaz aktivitesi için VP2 proteini

gerektiği, transkriptaz aktivitesinin hem VP2 hem de VP6 proteinlerine bağlı olduğu gösterilmiştir (28, 41).

Segment 2 tarafından kodlanan 60 dimer yapısındaki 120 adet VP2 (102 kDa) proteini, T=1 simetride ve ikozahedron yapıdaki koru oluşturur (39, 42). Protein VP1, VP3'ten oluşan yapılar ve genom VP2'nin altında bulunur. (42).

Segment 3 tarafından kodlanan VP3 (98 kDa) proteininin capping aktivitesine ek olarak ribonükleazı aktive eden sinyal molekülleri olan 2',5'-oligoadenilatları kopardığı gösterilmiştir. Protein VP3 önce ssRNA'ya (single-stranded RNA=tek iplikçikli RNA), sonra GMP'ye bağlanır ve guaniltransferaz (GT) aktivitesi ile GMP'yi pirofosfata ve/veya GDP'ye dönüştürür. S-adenosil-L-metionin (SAM) varlığında metillenmiş uçlar üretilebilir; böylece VP3, SAM'a bağlı metiltransferaz (MT) aktivitesini gerçekleştirir (43).

Virüsün hücreye tutunmasını, penetrasyonunu ve hemaglutinasyonunu sağlayan VP4 (87 kDa) proteini segment 4 tarafından kodlanır. Aynı zamanda VP4, nötralizasyonu sağlayarak virulansta da rol alır (28, 38). Virüsün konağa girişi ve enfektivitesi, trimerik VP4'ün bağırsakta bulunan tripsin enzimi tarafından proteolitik olarak bölünmesi sonucunda oluşan VP5 ve VP8 proteinleri ile sağlanır. Protein VP8 hücreye tutunmaya aracılık eder, VP5 hücre zarına penetrasyonu kolaylaştırır (44).

Kapisidin orta tabakasında bulunan ve segment 6 tarafından kodlanan VP6 (44 kDa) proteini, virüsün sınıflandırılmasını, hücre içi nötralizasyonu sağlar ve transkripsiyon için gereklidir (32).

Trimerik bir kalsiyum bağlayıcı yüzey glikoproteini olan VP7 (34 kDa) proteini segment 9 tarafından kodlanır (38, 45). VP7, VP4 trimerini yerinde tutar ve Ca^{+2} azalması, iki proteinin DLP'den ayrılmasına neden olur (44). Bu proteinler nötralizan antikorları uyarak koruyucu bağışıklık sağlamaktadırlar (46).

2.2.2. Yapısal olmayan proteinler (Non-structural protein=NSP)

Rotavirüs replikasyonu sırasında NSP2, NSP3, NSP4 ve NSP5 proteinlerinin rolleri nispeten iyi karakterize edilmiş olmasına rağmen, NSP1 ve NSP6'nın rolleri daha az açıklanabilmiştir (36). Yapısal olmayan proteinler, IRF-3 (interferon regulatory factor-3) ile etkileşime giren bir RNA bağlayıcı protein olan NSP1 dışında virüs replikasyonu için gereklidir (47). Yapısal olmayan proteinler, enfekte olmuş hücrelerden sentezlenir. Viral replikasyonun bazı aşamalarında direkt görev alırlar veya konaktaki proteinlerle etkileşime girerek patogenezi, enfeksiyona karşı bağışıklık yanıtını etkilerler (3). Yapısal olmayan proteinlerin kodlandığı segment, bulunduğu yer ve görevleri Tablo 1'de özetlenmiştir (39).

Segment 5 tarafından kodlanan E3 ubikuitin ligaz olarak kabul edilen NSP1'in (57 kDa), doğuştan gelen konak antiviral yanıtın karşılanmasını, enfeksiyonun erken evrelerinde apoptozisin indüklenmesinin bastırılmasını ve viral büyümeyi teşvik ettiği, interferon (IFN) cevabını inhibe ettiği gösterilmiştir (36, 43).

Heliks çözülmesi gibi genom replikasyonu sırasında kritik işlevleri yerine getiren, ssRNA bağlama özelliği olan ve nükleosit trifosfataz (NTPaz), nükleosit

difosfat (NDP) kinaz aktivitesi sergileyen NSP2 (35 kDa), segment 8 tarafından kodlanan bir proteindir (48). Protein NSP2, RNA'ya bağlanmada birlikte rol aldığı NSP5 proteini ile birlikte viroplazma oluşumunda önemlidir ayrıca VP1 ve VP2 ile etkileşimleri sonucu RNA replikasyonunda ve paketlenmesinde de rol oynamaktadır (49).

Nonstruktürel protein 3 (36 kDa) segment 7 tarafından kodlanmaktadır (50). Viral mRNA'nın 3' ucuna ve eIF4G (translation initiation factor 4G)'ye bağlanarak, hücresel poliadenilatlanmış mRNA'lar ile hücresel poliA bağlayıcı protein (PABP) gibi rotavirüs benzeri raportör mRNA'ların translasyonu arttırdığı gösterilmiştir (51). Protein NSP3 ekspresyonunun siRNA (small interfering RNA) tarafından inhibisyonu, konak hücrendeki mRNA translasyonu üzerindeki etkisini baskılar ancak viral RNA translasyonu bozulmaz (32).

İlk viral enterotoksin olarak tanımlanan NSP4 (20 kDa) 10. Segmentten kodlanmaktadır (28, 52). Protein NSP4, konak hücrenin endoplazmik retikulumu (ER), sitoplazmik membranı ve ER-Golgi ara bölmesi farklı bölümlerinde lokalize olabilen bir transmembran glikoproteinidir (52). Memeli hücrelerinde ER'den sitoplazmaya kalsiyum (Ca^{+2}) geçişini sağlayan bir viroporin görevi görerek sitozolik Ca^{+2} 'u artırır, böylece fosfolipaz C'yi içeren bir sinyal iletim yolağını tetikler ve bu ishale neden olan klor (Cl^-) iyon sekresyonu ile sonuçlanır (52, 53). Protein NSP4, VP6 için bir hücre içi reseptör görevi görerek, DLP'lerin endoplazmik retikulum içine tomurcuklanması sırasında, geçici viral membran ve viral partikülün olgunlaşmasının elde edilmesi için kritik bir görev sağlar. Protein NSP4'ün

enterotoksin benzeri aktivitesini sağlayan bölgedeki değişiklikler, rotavirüsün toksijenik aktivitesi ve virölansındaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (54).

Nonstruktürel protein 5'in (20kDa), NSP6 ile etkileşimi sonucu protein fosforilasyona uğrayarak 26-37 kDa arasında değişen izoformları oluşur (49, 50). Oligomerik yapıda ve serin, treonin aminoasitlerinden zengin bir proteindir (32). Segment 11'den kodlanan NSP5 proteinin genom replikasyonunda ve paketlenmesinde görevli olduğu tahmin edilmektedir. Protein NSP5'in viroplazma oluşumundaki rolü, proteinin fosforilasyon durumu ile ilişkilidir ve bu da proteinin NSP2 ile etkileşimlerine bağlıdır (49). Protein NSP5 ayrıca viroplazma oluşumu sırasında gerekli olan Ca^{+2} 'u bağlar (3).

Segment 11'de, NSP5'in kodlama dizisinin tamamen içinde olan alternatif bir ORF'den NSP6 proteini (12 kDa) sentezlenir. Protein NSP6, hem ssRNA hem de dsRNA'ya (Double-strand RNA=çift iplikçikli RNA) karşı benzer affinite gösteren bir RNA bağlanma proteindir (37).

Tablo 1. Yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin kodlandığı segment, bulunduğu yer ve görevleri (39)

Gen segmenti	Protein	Bulunduğu yer	Görevleri
1	VP1	Çekirdek	RNA bağımlı RNA polimeraz, ssRNA bağlama, VP3 ile kompleks halinde olma
2	VP2	Çekirdek	RNA bağlama, VP1'in RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesi için gerekli
3	VP3	Çekirdek	Guaniltransferaz, metiltransferaz, ssRNA bağlama, VP1 ile kompleks halinde
4	VP4	Dış kapsid	P tip, Hücreye tutunma, virülans, nötralizasyon, füzyon bölgesi, homotrimer, proteazla artırılmış infektivite
5	NSP1	Nonstruktürel	RNA bağlama, interferon antagonisti, viral E3 ligaz
6	VP6	İç kapsid	Subgrup antijen, trimer, koruma (hücre içi nötralizasyon), transkripsiyon için gerekli
7	NSP3	Nonstruktürel	Asidik dimer, viral mRNA'nın 3' ucuna bağlanır, protein sentezi inhibisyonu, PABP translasyonunu artırır
8	NSP2	Nonstruktürel	Oktamer, RNA bağlama, NTPaz, NDP kinaz, heliks destabilizasyonu, VP1 ve NSP5 ile viroplazma oluşumu
9	VP7	Dış kapsid	G tip, nötralizan antijen, glikoprotein kalsiyum bağımlı trimer
10	NSP4	Nonstruktürel	Transmembran glikoproteini, viroporin, DLP için hücre içi reseptör, TLP morfogenezi, viroplazma ve otofaji yolağı ile etkileşim, hücre içi kalsiyumu ve RNA replikasyonunu düzenleme, enterotoksin sentezi, virülans
11	NSP5	Nonstruktürel	Fosfoprotein, RNA bağlama, protein kinaz, NSP2 ile viroplazma oluşumu, VP2 ve NSP6 ile etkileşim
	NSP6	Nonstruktürel	NSP5 ile etkileşim, viroplazmada bulunma, çoğu virüs serotipinde bulunma, RNA bağlama

2.3. Sınıflandırma

Grup A Rotavirüsler; VP6, VP7 ve VP4'ün antijenik özelliklerine (sırasıyla grup, alt gruplar ve G, P serotipleri), poliakrilamid jel elektroforezinde genomun göç paternine (uzun, kısa, çok kısa, atipik elektroferotipler), RNA hibridizasyon modellerine (genogruplar), nükleotid dizi analizlerine (genotipler) göre farklı şekillerde sınıflandırılmıştır (55).

Rotavirüs, protein VP6' daki farklılıklara göre yedi gruba ayrılır (A-G) (56). Gruplar hem coğrafik olarak hem de insanlar ve diğer canlılar arasında değişim göstermektedir (27). Memeli ve kuşlarda da görülen grup A rotavirüsler insanda en sık enfeksiyon yapan gruptur (57, 58). Yapılan son çalışmalarda H (domuzlarda), I (köpeklerde) ve J (yarasalarda) grupları da tespit edilmiştir (58-60). Memelilerde, rotavirüs grup B, C, E ve H'nin hem endemik hem de epidemik enfeksiyonlar yaptığı görülmüştür. Grup D, F ve G sadece kuşlarda tanımlanmıştır (58). Grup B rotavirüs, "yetişkin ishal rotavirüsü" olarak anılırken, ilk olarak Çin ve Doğu Asya'da bildirilmiştir ancak bu bölge dışında da enfeksiyonlara sebep olduğu gösterilmiştir. Grup C rotavirüsler, dünya genelinde, sporadik olgularda ve birkaç salgında görülmüştür (27). Hindistan'da 2004-2016 yılları arasında, salgınlar sırasında ve sporadik olgulardan toplanan örneklerde sırasıyla % 8,6 ve % 0,7 oranında Grup C rotavirüs RT-PCR yoluyla tespit edilmiştir (61).

Protein VP6 üzerindeki epitopların varlığına göre rotavirüsler alt gruplara (subgrup=SG; SG I, II, I + II ve non-I, non-II) ayrılmıştır. İnsanlarda en yaygın bulunan rotavirüsler SG II'e aittir, SG I ise hayvan rotavirüsleri arasında daha yaygındır (62).

Grup A rotavirüsler Wa; genogrup I, DS-1; genogrup II, ve AU-1; genogrup III şeklinde üç ayrı genogruba ayrılır (63, 64). Genogrup I örnekleri sıklıkla G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8]; genogrup II G2P[4]; genogrup III G3P[9] ve G12P[9] gibi kombinasyonlarla gözlemlenmiştir (64).

Rotavirüsler isimlendirilirken G tipi için, serotipler ve genotipler G1, G2 gibi tek; P tipi için, P serotiplerini belirleyen referans serotipten çok daha fazla P genotipi olduğu için çift şekilde isimlendirme yapılır. Örneğin: P1A[8], P serotip 1A ve P genotip 8'i ifade etmektedir (32).

Grup A rotavirüsler için kullanılan çift isimlendirme sisteminin temelini oluşturan VP7 (glikoprotein, G tipi) ve VP4 (proteaza duyarlı protein, P tipi) proteinindeki dizi farklılıklarına göre grup A rotavirüsler farklı genotiplere ayrılırlar. Bugüne kadar, 32 G genotipi ve 47 P genotipine sahip grup A rotavirus tespit edilmiştir. Altı G tipi (G1, G2, G3, G4, G9 ve G12) ve üç P tipi (P[4], P[6] ve P[8]) en yaygın görülenlerdir. Ayrıca, G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] ve G12P[8] genotip kombinasyonları dünya genelinde görülen genotip kombinasyonlarının % 90'dan fazlasını oluşturmaktadır (57).

2.4. Viral Replikasyon

Replikasyon döngüsü virüsün hücreye tutunması ile başlar. Ardından penetrasyon ve kapsidin soyulması, VP1, VP2 ve VP3 proteinlerinin aracılık ettiği (+) iplikçikli ssRNA (mRNA) sentezi, viroplazma oluşumu, RNA paketlenmesi, (-) iplikçikli RNA sentezi (RNA replikasyonu) ve DLP oluşumu, virüs partiküllerinin olgunlaşması (TLP oluşumu) ve virüsün salınımı şeklinde gerçekleşir (32). Replikasyon döngüsü Şekil 4'te gösterilmiştir (57).

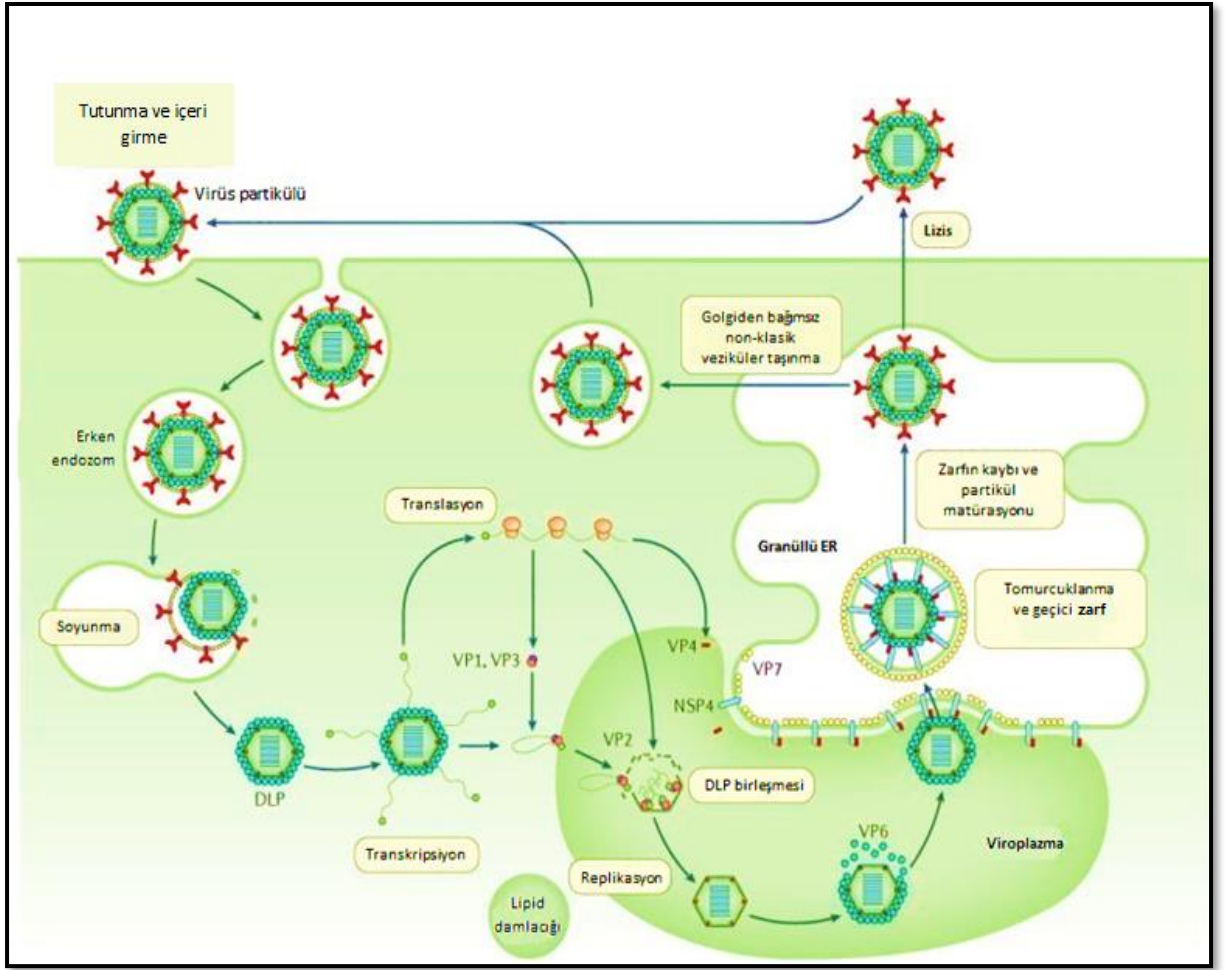
Virüs ilk olarak hücre yüzeyindeki siyalik asit veya kan grup antijeni (histo-blood antigen = HBGA) reseptörlerine tutunur ardından integrinler ve Hsc70 (heat shock cognate protein) gibi koreseptörlerle etkileşime girer (32). Sonrasında reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınır. Rotavirüsün hücrelere etkili bir şekilde girmesi için VP4 proteininin tripsin ile VP5 ve VP8'e parçalanması gerekmektedir. Virüs hücreye girince endozom oluşur. Protein VP7 ve VP4, endozomun membranını bozarak, endozomdaki Ca^{+2} konsantrasyonunu düşürür. Kalsiyumun azalması VP7 trimerlerinin ayrışmasına neden olur, bunun sonucunda DLP oluşur ve DLP'nin oluşması ile VP1 proteini aracılığıyla önce mRNA sentezlenir (28, 39). Viral mRNA'lar yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin sentezi, RNA replikasyonu ve DLP'lerin paketlenmesi için şablon olarak kullanılır (39).

Transkripsiyonun RNA replikasyonundan önce yapılması gerekir. Negatif iplikçikli RNA sentezi, pozitif iplikçikli RNA'nın çekirdek replikasyon ara maddesi partiküllerine paketlenmesiyle eş zamanlı olarak, viroplazmalar olarak bilinen perinükleer, nonmembranöz, elektrodens sitoplazmik yapılarda meydana gelmektedir.

(39, 65). Protein VP3 ve mRNA ile kompleks halinde olan VP1'in, VP2 ile etkileşime girerek replikasyonu başlattığı düşünülmektedir. Protein VP2'ye bağlandıktan sonra VP1, RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesinin oluşmasına ve dsRNA sentezinin başlatılmasına yol açar (49). Oluşan RNA daha sonra viroplazmalar içinde yeni DLP'ler halinde paketlenir (57).

Viroplazmada NSP2, NSP5, NSP6, VP1, VP2, VP3 ve VP6 proteinleri bulunur. Protein NSP2 ve NSP5 viroplazma oluşumunda gereklidir. Protein NSP2 ayrıca VP1, VP2 ve tubulinlerle etkileşerek viroplazma yapısındaki mikrotübülleri stabilize eder (48). Lipid damlacıkları ve proteozom viroplazmanın oluşması için gereklidir. Virüsün hücreye girişi ve kapsidin soyulmasından sonra proteozom aktivitesi inhibe olursa, virüs proteinlerinin yapımı, viroplazma oluşumu ve RNA replikasyonu olumsuz etkilenir (39).

Viroplazmalarda DLP'ler bir araya getirildikten sonra, VP7 ve VP4 proteinleri, enfeksiyöz TLP'yi oluşturmak üzere DLP'lere eklenir. Double-layered particle'ler, TLP'lerin yapımının son aşaması sırasında kaybedilen geçici bir zarf kazanarak, NSP4 proteini ile etkileşime girer ve viroplazmadan er'nin lümenine tomurcuklanırlar (57, 66). Yeni sentezlenen virüsler hücre lizisi ile veya polarize epitelyal hücrelerden golgi-bağımlı klasik olmayan veziküler transportla hücre dışına salınırlar(32).



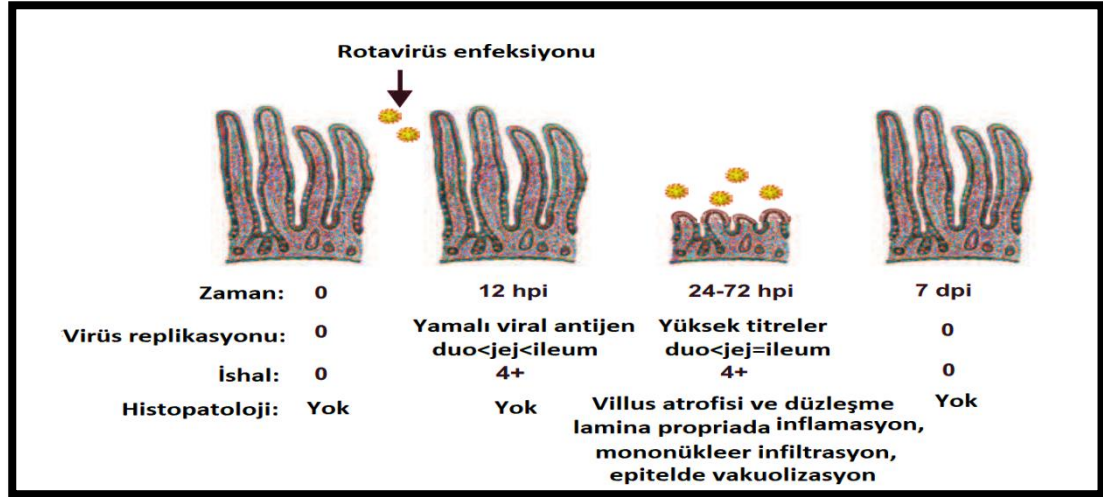
Şekil 4. Rotavirüsün replikasyon döngüsü (57)

2.5. Patogenez

Rotavirüs enfeksiyonları sırasında oluşan patolojik değişiklikler hakkındaki bilgilerin çoğu hayvanlar üzerindeki çalışmalardan elde edilmiştir. Bağırsak enfeksiyonunun şiddeti, lokalizasyonu, histolojik bulguları farklı hayvan türlerinde, farklı serolojik tiplerde ve yapılan farklı çalışmalarda farklılıklar göstermektedir. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda bağırsak duvarının incelendiği, kolumnar epitelden

küboidal epitele değişim olduğu ve villüslerin kısaldığı görülmüştür (67). Enfeksiyon sırasında oluşan histopatolojik değişiklikler Şekil 5'te gösterilmiştir (39).

Rotavirüs memelilerin ince bağırsağındaki villusların üstündeki olgun enterositleri enfekte ederek vakuolizasyon ve epitel kaybına sebep olur, ardından kript hiperplazisi görülür (32). Ancak bu değişikliklerin derecesi ile ishalin şiddeti arasında net bir korelasyonun olmadığı, her zaman bağırsakta yapısal değişikliklerin oluşmadığı gözlemlenmiştir (67).



Şekil 5. Rotavirüs enfeksiyonu sırasında bağırsak epitel hücrelerinde görülen histopatolojik değişiklikler (domuz rotavirüsü ile enfekte olmuş domuzlarda yapılan çalışmalara dayanan diyagram) hpi:enfeksiyondan saat sonra, dpi:enfeksiyondan gün sonra (39)

Rotavirüs birçok mekanizma ile ishale neden olmaktadır. 1) Enfeksiyon ile bağırsak sekresyonunun artması 2) villus iskemisi ve enterik sinir sisteminin uyarılması sonucu önemli patolojik lezyonların olmadığı enfekte olmuş epitelyal hücrelerden vazoaktif bir maddenin salınımı 3) epitelyal hücreler arası sıkı

bağlantıların kaybının neden olduğu transepitelyal sıvı dengesinde değişiklikler gözlenmesi 4) enterositlerin tahrip edilmesi sonucu oluşan emilim bozukluğu ishalin nedenleri arasındadır (68). Rotavirüs enfeksiyonunda görülen ishal oluşum mekanizmaları Şekil 6’da özetlenmiştir (67).

Enterosit hasarı ile sodyum (Na^+), su ve mukozal disakkaridazların emiliminin azaldığı görülmüştür. Malabsorbsiyon sonucunda sindirilmemiş mono-disakkaritler, karbonhidratlar, yağlar ve proteinler kolona geçer. Sindirilmemiş bu besinlerin etkisiyle kolon suyu yeterince absorbe edemez ve ozmotik ishal oluşur (69).

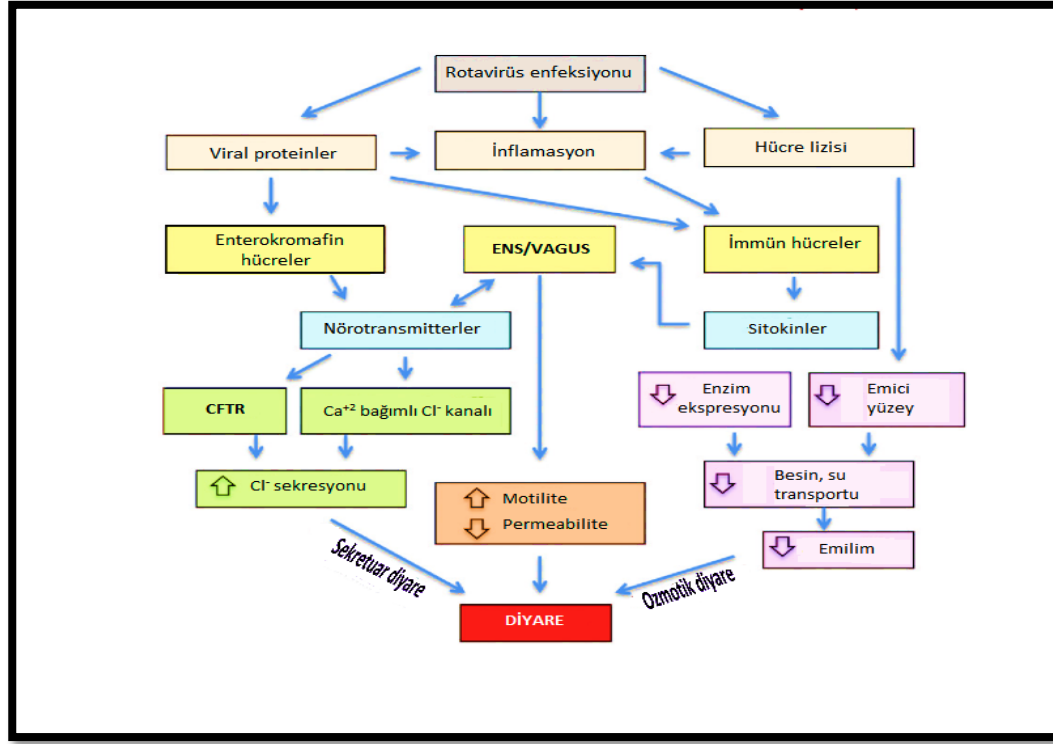
Protein NSP4’ün bağırsaktaki proteazlar tarafından modifiye edilen hücre dışı formu, enfekte olmamış hücreler üzerindeki integrin reseptörleri aracılığıyla görev yapan bir enterotoksindir. Protein NSP4, hücre içi kalsiyum iyonu konsantrasyonları artışına, sekretuar ishale ve otofajiye neden olur (28). Yüksek hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu Cl^- sekresyonunu uyarır. Bu klorid salgı mekanizması kript hücrelerinde gerçekleşir. Bağırsaktaki bu ana apikal klorür yolu, cAMP’ye bağlı fosforilasyon ile aktive edilen bir kistik fibrozis transmembran regülör (CFTR) klorür kanalıdır (67, 70). Ayrıca artan hücre içi kalsiyum seviyesi 5-HT (5-hidroksitriptamin, serotonin) salgısının artmasına neden olur. Bu sayede enterik sinir sistemini uyarılır ve bağırsak motilitesi artar. Ayrıca 5-HT salınımı vagus sinirini uyarır ve beyindeki ilgili bölgenin etkisi ile bulantı, kusma gerçekleşir (57).

Enfeksiyon sonucunda artmış plazma membran geçirgenliğine bağlı olarak hücre içindeki Na^{+} 'da artış ve potasyumda (K^{+}) azalma meydana gelir. Elektrolitlerin hücre içi seviyelerinde görülen bu değişiklikler, sodyum klorür (NaCl) ve Na^{+} 'a bağlı besin emilimini bozabilmekte bu da sıvı kaybına neden olabilmektedir (69). Ayrıca NSP4, villüslardaki Na^{+} ve glikoz ko-transportunu inhibe etmektedir (71).

Nitrik oksit (NO), NSP4 proteini sayesinde bağırsak epitel hücrelerinden salınarak sulu sekresyonun iletiminde ve hücrelerin bariyer görevinin sağlanmasında görev alır. Rotavirüs ile enfekte çocuklarda NO seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda bağırsak epitelinin hidrofilik maddelere karşı geçirgenliği artmıştır (67).

Enfeksiyon sırasında, NSP4 apoptozu uyarıcı ve NSP1 apoptozu önleyici rol oynar. Apoptozun uyarılması ile enterosit hasarı oluşarak yeni oluşan virüslerin hücreden dışarı salınması ve yayılımı kolaylaşır (68).

Rotavirüsle enfekte çocuklarda enfeksiyonu olmayanlarla kıyaslandığında serum ve dışkıdaki prostoglandin (PGE_2 , PGF_2) seviyelerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu da enterositlerden salınan prostaglandinlerin rotavirüs enfeksiyonunu indüklediğini düşündürmüştür (72).



Şekil 6. Rotavirüs enfeksiyonunda görülen ishal oluşum mekanizmaları (ENS=enterik sinir sistemi, CFTR=kistik fibrozis transmembran regülör klorür kanalı) (67)

2.6. İmmünoloji

Rotavirüs enfeksiyonu geçiren çocukların %38'inde tekrarlayan enfeksiyonlara karşı kısa süreli korunma sağlanır, ancak kalıcı bağışıklık gelişmez (73). İlk kez geçirilen rotavirüs enfeksiyonu akut gastroenterit ile sonuçlanır ancak sonraki enfeksiyonlara karşı koruma gelişerek hastalık geçirme riski daha düşük olur ve hastalık gelişse bile klinik daha hafif seyreder (57, 74).

Plasenta aracılığıyla anneden bebeğe geçen antikorlar ve emzirme, ilk aylarda rotavirüs enfeksiyonuna karşı bir miktar korur. Enfeksiyonla ilişkili ishal insidansı 7-15 ay arasında pik yapar ve enfekte beş bebekten sadece biri yaşamın ilk

iki ayında semptom geliştirir. Bu, yenidoğan döneminde maternal antikorlar tarafından koruyucu bir etki olduğunu gösterir (67).

Enfeksiyonun geçirilmesi ile oluşan serum anti-rotavirüs IgA antikorunun, sonraki rotavirüs enfeksiyonuna karşı bir koruma göstergesi olduğu ve koruyucu titrenin oluşması için ardışık iki semptomatik veya asemptomatik doğal enfeksiyonun geçirilmesi gerektiği gösterilmiştir (75). Serumda anti-rotavirüs IgA antikorlarının olması, aşılmanın göstergesi olarak değerlendirilir ancak antikor seviyeleri ile ağır enfeksiyondan korunma arasında kesin bir korelasyon yoktur (57).

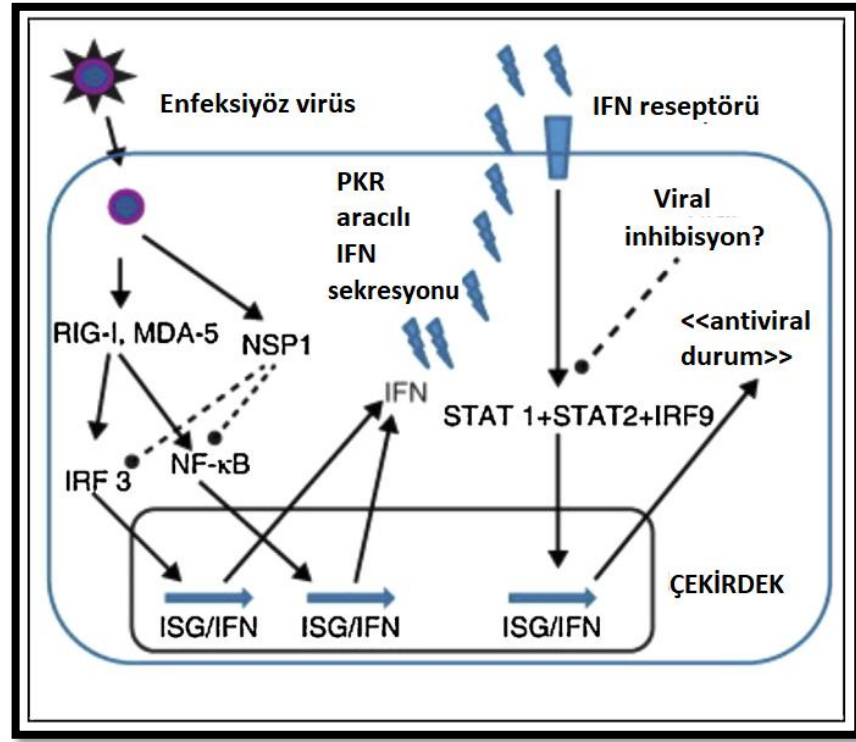
Enfeksiyonun sınırlandırılmasında doğal ve edinsel bağışıklık önemli rol oynamaktadır. Enfeksiyon konak hücrede interferon- α (IFN- α), IFN- β , tümör nekrozis faktör α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) ve dendritik hücrelerden salınan IL-8 gibi bazı interferon ve sitokinlerin üretimini tetikler (76). Protein NSP4, TLR-2 (Toll like reseptör-2) aracılığıyla TNF- α ve IL-6'nın makrofajlardan salınmasını uyarak doğal immün yanıtın oluşmasında rol almaktadır (77).

Hümmoral bağışıklık sonraki enfeksiyonlardan korunmayı, hümmesel bağışıklık ise enfeksiyonun ortadan kaldırılmasını sağlar. Nötrale edici antikorlar, VP4,VP7 proteinlerinin hücreye girişteki işlevini önler. Protein VP6'ya karşı oluşan non-nötralizan IgA ise virüs replikasyonunu engeller (77).

Farelerde yapılan çalışmalar, B hümmelerinin doğal enfeksiyondan sonra reinfeksiyondan korunmanın birincil belirleyicisi olduğunu gösterirken, CD8⁺T hümmelerinin, primer enfeksiyonun seyrini kısaltmaktan sorumlu olduğu görölmüştür. Genellikle B ve CD8⁺T hümmelerine yardım etmede rol oynayan CD4⁺ T hümmelerinin aynı zamanda rekombinant VP6 ile immünizasyondan sonra IFN'a bağlı yolla aktif

korunmaya aracılık ettiği gösterilmiştir. Düzenleyici T hücrelerinin ise primer enfeksiyon sırasında rotavirüs bağışıklığının düzenlenmesinde rol aldığı görülmemektedir (3).

Rotavirüs hücreye girince RIG-1 (retinoic acid-inducible gene-1) ve MDA-5(melanoma differentiation-associated gene-5) reseptörleri ile tanınır. Ttranskripsiyon faktörleri olan IRF3 (interferon regulatory factor-3) ve NF- B (Nuclear Factor kappa B)  ekirdekte IFN üretimini ve IFN uyarıcı genleri (ISG) aktive eder. Salgılanan interferon STAT-1 (Signal Transducer and Activator of Transcription proteins), STAT-2 ve IRF9 transkripsiyon faktörlerini uyarak çekirdekte IFN üretimini daha da arttırır. Protein NSP1, IRF3 ve NF- B'i inhibe ederek interferon yanıtını önler (32). Protein NSP1 ayrıca p53' n yapısını bozarak hücrenin apoptozisini önler (78). Konakta oluşan doğal bağışıklık yanıtı şekil 7'de gösterilmiştir (32).



Şekil 7. Rotavirüs enfeksiyonuna karşı konakta oluşan doğal bağışıklık yanıt mekanizması (32)

İnterferon-I, II ve III'ün antiviral etkisini gösterebilmesinde STAT1'in reseptör aracılı aktivasyonu rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada rotavirüsün in vitro IFN-I, II ve III reseptörlerini inhibe ettiği görülmüştür. Farelerde farklı IFN'lerin enjeksiyonu sonucunda rotavirüsün, STAT1 aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (79). Başka bir çalışmada IFN yapımını artıran MAVS'ın (mitokondriyal antiviral sinyal proteini) VP3 tarafından yıkıldığı bulunmuş ve bunun virüsün çoğalmasına ve patogeneze yardımcı olduğu gösterilmiştir (80).

2.7. Klinik Bulgu ve Belirtiler

Hastalığın şiddeti rotavirüsün alttipi ve serotipine göre değişebilmektedir. Konaktaki faktörlere ve hastanın yaşına göre değişen edinilmiş bağışıklıktaki farklılıklar kliniği daha çok etkilemektedir (27). Semptomlar hafiften şiddetliye kadar değişebileceği gibi hastalar asemptomatik de olabilmektedir (81). İshal kısa süreli, hafif olabileceği gibi elektrolit dengesizliği, şok ve ölümle sonuçlanan dehidratasyon tablosuna neden olacak kadar uzun süreli ve çok miktarda olabilir (6). Yetişkinlerde enfeksiyon genellikle asemptomatiktir ancak semptomatik hastalarda en sık ishal, ateş, baş ağrısı, halsizlik, bulantı, kusma ve karın ağrısı görülmektedir (82).

İnkübasyon süresi yaklaşık 1-3 gündür. Hastalık genellikle ani başlangıçlıdır. Şiddetli sulu ishalin ardından ateş ve kusma görülür (83). Kusma genelde 1-3 gün sonra sona ererken ishal 5-8 gün sürebilmektedir (84). Orta derecede ateş çocukların yaklaşık % 30-40'ında görülür (6). Semptomlar genellikle 4-8 gün içinde kendini sınırlar ve tamamen iyileşme görülür. Dışkıda eritrosit görülmez ve genellikle lökosit yoktur, dışkının yaklaşık %20'sinde mukus olabilmektedir (83).

İmmünyetmezlikli çocuklarda kronik ishal ve bağırsak dışı belirtiler görülmektedir. Kronik rotavirüs enfeksiyonu olan immün yetmezlikli çocukların otopsi sonuçlarında, hepatositlerinde ve renal tübüler hücrelerinde rotavirüs replikasyonu olduğu gösterilmiştir. Kemik iliği veya böbrek nakli gibi nedenlerle immün sistemi baskılanmış olan erişkinlerde de gastroenterit daha şiddetli görülmüştür (85).

Febril ve afebril konvülsiyonlar, meningoensefalit, ensefalopati ve serebellit gibi nörolojik bozukluklar en sık görülen bağırsak dışı komplikasyonlardır ve rotavirüse bağlı gastroenteriti olan çocukların yaklaşık % 2-6'sında görülmektedir (4, 86). Küçük çocuklardaki benign nöbetler, enfeksiyon sırasında görülebilen ateş nedeniyle olarak ortaya çıkabilmektedir (39).

Menenjit, ensefalopati veya ensefaliti olan çocukların beyin omurilik sıvısında rotavirüs RNA'sı saptanması, Grup C rotavirüsün biliyer atrezisi olan bebeklerde tespit edilmesi sonucu rotavirüsün sistemik yayılım yapabileceği gösterilmiştir (57). Ani bebek ölümü sendromu, nekrotizan enterokolit, Kawasaki hastalığı ve tip 1 diyabet gibi hastalıklar da rotavirüs enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiş ancak kesin bir ilişkisinin olduğu gösterilememiştir (6).

Rotavirüs enfeksiyonunda bağırsak duvarı kalınlığının sağlıklı gruba göre artması ve lenfadenitin olması invajinasyona neden olabileceğini düşündürmüştür ancak virüsün invajinasyon yaptığı kesinleştirilememiştir (87, 88). RotaShield aşı uygulamasından sonra invajinasyon vakaları görülmesi ile aşı piyasadan kaldırılmıştır. Rotavirüsün invajinasyon ile ilişkisi kesin kanıtlanmadığından, aşının sadece invajinasyon gelişimine yatkın çocuklarda tetikleyici olduğu düşünülmüştür (87).

Rotavirüse bağlı komplikasyonlar ve ölümler çoğunlukla dehidratasyon, elektrolit dengesizliği ve asidoz sonucunda meydana gelmektedir. Rotavirüs enfeksiyonu olan çocukların kanında antijen ve virüs tespit edilmiştir ancak bunun klinik önemi net bilinmemektedir (84). Yapılan bir çalışmada antijenemi ve vireminin

miktarının ateş ve kusmanın şiddetinin artması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (89). Serum C-reaktif protein ve fekal kalprotektin gibi inflamatuvar belirteçlerde rotavirüs enfeksiyonu olanlarda değişiklik görülmemiştir (57).

2.8. Epidemiyoloji

Gelişmiş ülkelerde hastanede yatış gerektirecek rotavirüs gastroenteriti en sık 6 ay ila 2 yaş arasında görülür (39). Gelişmekte olan ülkelere ise enfeksiyon daha küçük bebeklerde daha sık ortaya çıkmaktadır (85).

Rotavirüs enfeksiyonu ılıman iklime sahip bölgelerde soğuk aylarda daha sık görülür. Tropikal bölgelerde ise mevsimsel sıcaklık farkı çok olmamasına rağmen yine en soğuk ve kurak zamanlarda enfeksiyon yaygın görülmektedir. Virüs, yüksek nemde hızla inaktive olur ve kuru hava virüsün yayılımını kolaylaştırır. Bir bölgedeki en sık görülen serotipler her yıl değişim gösterir ve enfeksiyonun görüldüğü dönemde birkaç serotip birden görülebilmektedir (85).

Rotavirüsle enfekte kişiler bir gram dışkı ile 10^{10} viral partikül atabilmektedir (81). Virüs atılımı, enfekte olmuş çocukların yarısında semptomların başlamasından önce başlar, semptomların sona ermesinden bir hafta sonra çocukların üçte birinde devam eder (90). Bulaş çoğunlukla fekal-oral yolla ve kişiden kişiye temasla olmaktadır. Özellikle bakım evleri ve hastane gibi ortamlarda, dışkı ile kontamine olmuş nesneler virüsün bulaşmasına neden olmaktadır (57). Rotavirüs enfeksiyonundan korunmak için hastalarla temas önlenmeli, kontamine yiyecek ve su kullanımından kaçınılmalıdır. Elde rotavirüsün % 43'ü 60 dakika boyunca canlı

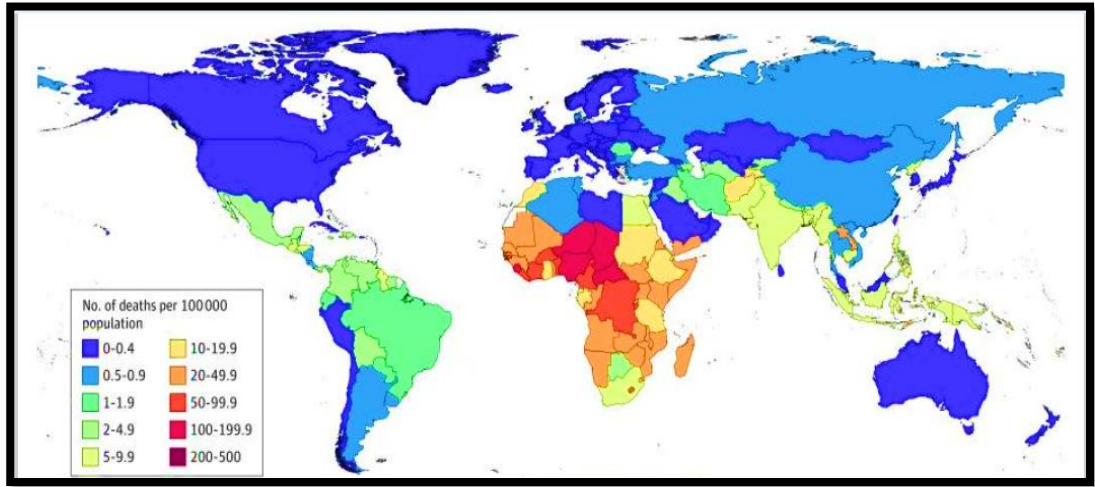
kalabildiğinden, el yıkama kritik bir öneme sahiptir. Hastanede, rotavirüs enfeksiyonu tanısı alan hastaların bakımında eldiven, önlük kullanımı ve sık sık el yıkama önemlidir (82).

Rotavirüs fenol, %2 formalin, %5 lizol, %6 H₂O₂ (hidrojen peroksit), %80-95 etanol gibi dezenfektanlara karşı duyarlı iken; klorheksidin, kloroform, eter ve pH 4-9'a dirençlidir (91). Klorlama ve ultraviyole (UV) ışınları ile rotavirüs partikülleri yeterli sürede temas ederse etkili bir şekilde ortadan kaldırılabilir. Daha spesifik olarak, 0.2 mg/L serbest klor ile 30 dakika temas eden veya 200-220 mJ/cm² UV ışınına 20 saniye maruz kalan su örneklerinde enfektif rotavirüslerin %99,99'u etkisiz hale getirilebilmektedir (92).

Rotavirüs kanalizasyon suları ve klorlu sulardan da bulaşabilmektedir. Türkiye'de 2011 yılında A grubu rotavirüsün neden olduğu su kaynaklı bir salgın görülmüştür. Rotavirüs antijeni immünokromatografik yöntemle, 3250 dışkı örneğinin 1714'ünde (% 52.7) pozitif bulunmuştur (39, 92). İçme suyu kaynakları ve sanitasyondaki iyileşmeler rotavirüs enfeksiyonunun prevalansını önemli ölçüde azaltmadığından, aşılanmanın rotavirüse bağlı akut gastroenteriti önlemek ve hastalık yükünü azaltmak için en etkili yöntem olduğu düşünülmektedir (74). Her yıl ABD'de 5 yaşından küçük çocuklarda rotavirüs nedeniyle 400.000'den fazla doktora başvuru, 200.000'den fazla acil servis başvurusu, 55.000-70.000 hastaneye yatış ve 20-60 ölüm olmaktadır (97). Aşı her yıl, ABD'de tahmini olarak 40.000-50.000 bebeğin hastaneye yatışını önlemektedir (98). Aşı kullanımının 5 yaşından küçük çocuklarda 28.000'den fazla ölümü, özellikle Sahra altı Afrika'da aşının yaygınlaştırılmasının 5 yaşından

küçük çocuklar arasında ishal ile ilgili tüm ölümlerin yaklaşık % 20'sini önleyebileceği tahmin edilmektedir (9). Başka bir çalışmada, 43 Asya ülkesinin tümünde rotavirüs aşı programı uygulanırsa, 710.000 daha az hastaneye yatışın ve 35.000 daha az ölümün olacağı tahmin edilmiştir (93).

Rotavirüs ile ilişkili ölüm oranının Sahra altı Afrika, Güneydoğu Asya ve Güney Asya'da en yüksek olduğu görülmüştür. Dünya genelinde 0-5 yaş arası çocuklarda rotavirüsle ilişkili ölüm oranlarının 2016'daki coğrafi dağılımı Şekil 8'de gösterilmiştir(9).



Şekil 8. Dünya genelinde 0-5 yaş arası çocuklarda rotavirüs ile ilişkili ölüm oranlarının 2016 yılındaki coğrafi dağılımı (9)

2.9. Tanı

İnsan rotavirüs suşları hayvanlardaki suşlara göre kültürde daha zor izole edilmektedir. Virüs, insan kolon adenokarsinom (CaCo-2) ve Rhesus maymun böbreği (MA104) hücrelerinde kültür ortamına tripsin ilavesi ile üretilebilmektedir.

Tanıda hücre kültürü zaman alıcı bir yöntem olduğu için rutin olarak kullanılmamaktadır (94-96). Elektron mikroskobu ile incelemede; dışkı fosfotungstik asit ile negatif boyandıktan sonra rotavirüs partikülleri karakteristik tekerlek görünümünden dolayı saptanabilmektedir. Virüsü tespit etmek için dışkının mililitresinde yaklaşık 10^7 viral parçacık bulunmalıdır. Elektron mikroskobu, pahalı cihaz kullanımının olması, çok sayıda örnekten rotavirüsün tespiti için zaman ve deneyimli personel gerektirmesi nedeniyle tanıda rutin olarak kullanılmamaktadır (96). Dot blot hibridizasyon yöntemi oldukça spesifiktir; elektron mikroskobu, PCR ve ELISA gibi testlerden elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir. Bu yöntem, ELISA'dan 10-100 kat daha duyarlı bulunmuştur ancak RT-PCR'a göre daha az pratik olduğu için yaygın kullanılmamaktadır (39).

Primer rotavirüs enfeksiyonu tanısını koyan en hassas ve hızlı serolojik test serumda virüse özgü IgM'nin tespit edilmesidir. Ancak, rotavirüs kaynaklı ishali olmayan çocuklarda da düşük antikor seviyeleri saptanabilmektedir. Primer enfeksiyonları teşhis etmek için akut faz serum IgA ve/veya IgG titrelerindeki dört kat artış da kullanılabilir (95).

Kompleman fiksasyon yöntemi, 6-24 ay arasındaki hastalarda antikor yanıtını tespit etmek için diğer yöntemler kadar etkilidir, ancak yetişkinlerde, 6 aydan küçük bebeklerde daha az verimlidir ve genellikle günümüzde kullanılmamaktadır. Bebeklerde ve yetişkinlerde ELISA ile IgG, IgA, IgM saptamak daha verimli ve hassas bir yöntemdir (39).

İmmünokromatografik testlerle, dışkıdaki rotavirüs antijeni, rotavirüse özgü VP6 proteinine karşı antikorlar kullanılarak sandviç immünokromatografi yöntemi ile kalitatif olarak saptanabilmektedir. Dışkı örneğindeki rotavirüs antijeni ilk önce membran şeridindeki antihuman antikoru ile reaksiyona girer, daha sonra rekombinant antikor tarafından yakalanarak renk değişimi gözlemlenir (96). İmmünokromatografik testlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada duyarlılık %80-100 ve özgüllük %54.3-100 olarak bulunmuştur (97).

Rotavirüs ELISA, radyoimmünoassay, counter immünoelektroforez gibi immünolojik yöntemlerle veya dışkı ve biyopsi örneklerinden floresan antikor boyama yöntemleriyle de saptanabilir. Katı fazlı sandviç ELISA yöntemi ile VP6 epitoplarına karşı antikor kullanarak rotavirüs antijeni kolorimetrik reaksiyonla saptanır. Reaksiyon sonucu oluşan optik dansite plak okuyucu kullanılarak kaydedilir. Bu yöntem dışkı örneklerinden rotavirüsün rutin laboratuvar tanısı için basit, hızlı, çok sayıda örnek çalışılmasına imkan veren hassas bir yöntemdir. Anti-rotavirüs antikorları ile kaplanmış lateks partiküllerinin kullanıldığı lateks aglütinasyon, ELISA'ya alternatif olarak kullanılabilen diğer antijen saptamaya yönelik serolojik yöntemdir (6, 25, 94). Farklı ticari kitlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada; ELISA'nın duyarlılığı 75-82, özgüllüğü ise %100 bulunmuştur (98).

Atılan RNA miktarı, çocuklarda rotavirüs ishalinin şiddeti ile doğrudan ilişkilidir, ancak yeni doğanlar için bu durum geçerli değildir. Hastalığın başlangıcından itibaren bir hafta içinde ELISA'nın virüs atılımını saptaması sona erer fakat virüs daha uzun süreler RT-PCR gibi daha duyarlı testlerle tespit edilebilir (57).

Nested multipleks Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) hastane bazlı sürveyans için DSÖ tarafından önerilmektedir (99). Reverse transkripsiyon sırasıyla; dsRNA'nın denatürasyonu, dsRNA'nın reverse transkripsiyonu ve cDNA amplifikasyonu aşamalarından oluşur (25). Nested PCR, ardışık iki PCR aşamasından oluşan, DNA şablonunun spesifik olmayan amplifikasyonunu azaltan bir yöntemdir (100). İlk aşamada, hedef dizinin dış bölgesine özgü iki dış primer kullanılarak uzun bir bölgenin, ikinci aşamada ise, ilk amplifikasyondan elde edilen bölgenin iç bölgesine bağlanan iki iç primer kullanılarak daha küçük alanın çoğaltılması sağlanır (101). Elde edilen amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezi ile pozitif kutba doğru uzunluklarına göre hareket ederek farklı boyutlarda bantlar oluşturur ve buna göre genotiplendirme yapılabilir (102).

Grup A dışındaki rotavirüsleri saptayamamaları çoğu ticari kitin en büyük kısıtlamasıdır (82). Ancak Grup B ve C rotavirüslerin tespiti için geliştirilmiş olan VP6 proteinine karşı monoklonal antikorların kullanıldığı ticari ELISA kitleri mevcuttur (91). Yine elektron mikroskobu ve poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile de bu testlerin kaçırılabilceği grup A rotavirüsler saptanabilmektedir (85). Poliakrilamid jel elektroforezi ile rotavirüsler genomun 11 segmentinin elektroforetik göç özelliğine göre uzun ve kısa olmak üzere iki elektroforetik patern oluşturmaktadır. Süper kısa paternler de daha az sıklıkla saptanmıştır. Kısa elektroforetik paternler, 9 ve 10. segmentler arasında yer alan daha yavaş göç eden segment 11'i göstermektedir (25).

2.10. Tedavi

Dünya Sağlık Örgütü ve Birleşmiş Milletler Çocuk Fonu, 1978 yılından itibaren dehidratasyon tedavisinde oral rehidrasyon sıvılarının (ORS) kullanılmasını önermiştir. Oral rehidrasyon tedavisiyle beş yaşından küçük çocukların dehidratasyona bağlı ölüm oranları yılda 4,5 milyondan 1,8 milyona düşmüştür. Buna rağmen ishal gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklarda önde gelen ölüm nedenidir. Düşük osmolariteli ORS, çinko takviyesi, rotavirüs aşısı çocukluk çağında akut gastroenterit kaynaklı morbidite, mortalite ve hastanede kalış süresinin azaltılmasında ana faktörlerdir (103).

Çinko, gastrointestinal sistemde mukozal bariyer bütünlüğünü geri kazandırır, bağırsak patojenlerine karşı antikor ve lenfosit üretimini teşvik eder. İshal başlar başlamaz çinko verilerek, ishalin süresi, ciddiyeti ve dehidratasyon riski azaltılabilir. Tedavi 10-14 gün boyunca (günde 10-20 mg) sürdürülerek sonraki 2-3 ay içinde oluşabilecek yeni ishal atağı riski azaltılabilir (104, 105).

Dünya Sağlık Örgütü 2002'de, kolera dışı ishalde düşük osmolariteli (sodyum 75 mmol/L, glikoz 75 mmol/L ve toplam osmolarite 224 mmol/L) solüsyonun rutin kullanımını önermiştir (6). Her dışkılamadan sonra dehidratasyonu olmayan 2 yaşın altındaki çocuklar için 50-100 mL (çeyrek ila yarım büyük bardak) ve 2-10 yaş çocuklar için 100-200 mL (yarım ila bir büyük bardak) ekstra sıvı ya da ORS verilmesini önerir. Dehidratasyon belirtileri olan çocuklarda ise, 75 mL/kg olacak şekilde dört saat boyunca hidrasyon uygulanmalı ve emzirmenin devam ettirilmesi sağlanmalıdır (104).

Lactobacillus, *Bifidobacterium* türleri ve *Saccharomyces boulardii* gibi probiyotiklerin rotavirüs enfeksiyonunun önlenmesine, ishal süresinin ve şiddetinin kısılmasına, reenfeksiyonların insidansının azaltılmasına, immün yanıtın düzenlenmesine yardımcı olduğu görülmüştür (106).

Rotavirüs enfeksiyonu için antiviral tedavinin yararı araştırılmış ancak çalışmalar daha çok prelinik aşamalarda kalmıştır. Viral morfogenezi engelleyerek rotavirüs replikasyonunu inhibe eden geniş spektrumlu bir antiviral ilaç olan nitazoksanitin ishal süresini ve hastanede yatış süresini kısalttığı bildirilmiştir. Ondansetron gibi antiemetikler kusma sayısını ve intravenöz rehidratasyon ihtiyacını azaltmakla birlikte ishali artırabildiği görülmüştür (57). Rasekadotril, endorfin metabolize edici enzim olan enkefalinaz inhibitörüdür ve CaCo2 hücrelerinde rotavirüs kaynaklı ishali inhibe ettiği gösterilmiştir (107). Diosmektit bakterilere, toksinlere (endotoksin ve ekzotoksin), rotavirüs partiküllerine bağlanıp su ve elektrolit Emilimini arttıran doğal adsorbandır (108).

2.11. Rotavirüs aşıları

İnsan rotavirüsüne karşı aşı geliştirme çalışmaları, 1980'lerin başında sığır rotavirüsünden (NCDV, [RIT 4237]) elde edilen oral zayıflatılmış monovalan aşı ile başlamıştır. İlk çalışmalarda “Jennerian” yaklaşımı kullanılmıştır. Bu yaklaşımda; insan rotavirüslerinin hücre kültürlerinde üremesi güç olduğu için, değişik hayvan rotavirüslerinin hücre kültürlerinde pasajları yapıp zayıflatılarak insanlarda kullanılabilir hale getirilmesi sağlanmıştır (3, 39). Bu yöntemle hazırlanan hayvan

kökenli 1. kuşak aşılardan (iki sığır RIT 4237; G6P6[1] , WC3; G6P7[5] ve bir rhesus maymun rotavirüsü-RRV; G3P[3]) özellikle gelişmekte olan ülkelerde yapılan etkinlik çalışmaları sonucunda kullanımı terkedilmiştir (3, 109).

İnsan rotavirus suşu M37, Venezüella'da bir bebeğin dışkılarından izole edilmiş ve bu suştan elde edilen aşının beklenildiği kadar etkili olmadığı görülmüştür (110). Maymun (G3) rotavirüsünün hücre kültüründe kolay üreme özelliği ve insan (G1, G2, G4) rotavirüsünün antijenik özelliği kullanılarak elde edilen ilk reassortan aşı olan RotaShield (RRTV, Wyeth, ABD), 1998 yılında ruhsat almıştır. Aşılanmayı takiben artmış invajinasyon riskinden dolayı (5.000-10.000 aşılanmış çocukta 1'den fazla vaka) aşı 1999 yılında üretici firma tarafından piyasadan geri çekilmiştir (3, 57, 111).

Rotavirüs aşı çalışmaları, 2004 yılında Rotarix aşısının Meksika'da ve daha sonra diğer Latin Amerika ve Avrupa ülkelerinde onaylanmasının ardından önemli ölçüde ilerlemiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2006'da Gıda ve İlaç Dairesi sığır-insan reassortan aşısı olan RotaTeq'i onaylamıştır (33).

Çin'de 2000-2001 yılları arasında, rotavirüs kuzu suşundan (G10P[12]), canlı attenüe, monovalan oral LLR (Lanzhou Institute of Biological Products, China) aşısı geliştirilmiştir. Bu aşının etkinliği, plasebo kontrollü faz III klinik çalışmasıyla doğrulanmamıştır, ancak büyük bir vaka kontrol çalışmasında 5 yaşın altındaki çocuklarda aşı etkinliğinin, hafif ile orta rotavirüs ishaline karşı %35 ve şiddetli rotavirüs ishaline karşı %53 olduğu tahmin edilmiştir (112, 113).

Rotavin-M1 (POLYVAC), 2003 yılında Vietnam'da akut gastroenterit nedeniyle hastanede yatan bir çocukta elde edilen G1P[8] suşundan üretilmiş oral

aşıdır (114). Bir çalışmada iki doz uygulanan aşının Vietnamlı bebeklerde güvenli ve immünojenik olduğu bulunmuştur (115).

Geçirilen bir rotavirüs enfeksiyonunun, insanları hem homotipik hem de heterotipik rotavirüslerin neden olduğu sonraki hastalıklara karşı koruduğu bildirilmiştir. Buna dayanarak, 89-12 isimli insan rotavirüsünün G1P[8] suşu hücre kültüründe pasajlanarak zayıflatılmış (attenüe) ve Rotarix aşısı geliştirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi, Nisan 2008'de Rotarix aşısının ABD'de kullanımını onaylamıştır. Bu aşının, gelişmekte olan ülkeler de dahil olmak üzere şiddetli rotavirüs hastalığı insidansında % 80'lik bir azalma sağladığı görülmüştür. Aşı uygulanması ile invajinasyon riskinde artış olmamıştır (116). Oral aşı iki doz şeklinde uygulanır. İlk doz en az altı haftalıkken, ikinci doz ilk dozdan en az dört hafta sonra uygulanır ve bebek 24 haftalık olana kadar dozlar tamamlanmalıdır (6).

RotaTeq, WC3 sığır rotavirüsü (G6 ve P7[5]) ve en yaygın serotipleri içeren (G1-4 ve P1A[8]) insan kökenli beş rotavirüs suşundan oluşan reassortan bir aşıdır. (33). Aşı, üç doz şeklinde oral olarak uygulanır. İlk doz 6-12 haftalıkken, ikinci ve üçüncü dozları 4-10 hafta ara ile uygulanır, 32 haftaya kadar tüm dozlar tamamlanmalıdır (6). RotaTeq'in bir çalışmada şiddetli rotavirüs hastalığına karşı %98 koruma sağladığı gösterilmiştir (117). Bu aşılar, evinde hamile veya immunsuprese kişi bulunan bebeklere uygulanabilir. Aşı olan kişilerden aşılınmamış kişilere virüsün geçmesi nadiren gözlenmiştir. Ağır kombine immün yetmezlik ve invajinasyon öyküsü olması durumunda Rotarix ve RotaTeq'in kullanımı kontrendikedir. Rotavirus aşıları, diğer rutin çocukluk çağı aşılarıyla birlikte

uygulanabilir. Bebek aşı uygulaması sırasında veya sonrasında tükürür veya kusarsa aşının tekrarlanmasına gerek yoktur (118). Hafif enfeksiyonu veya ishali olan bebeklerde aşı uygulanabilir. Orta ve şiddetli enfeksiyonu veya ishali olanlarda aşı enfeksiyon düzelince yapılmalıdır (111).

Rotavac (Bharat Biotech International Limited, Hindistan), monovalan insan-sığır rotavirüs aşısıdır. Aşı, sığır rotavirüsü geni P[11] ve insan rotavirüs genini içeren, reassortan suş olan G9P[11]'den meydana gelen 116E rotavirüs suşundan oluşmaktadır. Hindistan'da yapılan çift kör, randomize, plasebo kontrollü, çok merkezli bir çalışmada, aşının şiddetli rotavirüs gastroenteritine karşı, ilk yılda %56 etkili olduğu gösterilmiştir. Ruhsat alındıktan sonra 2014 yılında Rotavac'ın Hindistan'da rutin aşılması başlatılmıştır (119).

Sığır-insan reassortan pentavalan bir aşı olan Rotasiil (BRV-PV, Hindistan Serum Enstitüsü) G1,G2,G3,G4 ve G9 rotavirüs serotiplerini içerir. Nijer'deki bebeklerde ağır rotavirüs gastroenteritine karşı % 67'lik bir etkinliğe sahip olduğu görülmüştür. Oral, üç doz şeklinde uygulanmaktadır. Uygulamadan önce sitrat bikarbonat tamponu ile sulandırılması gerekir. Aşı ısıya dayanıklıdır ve iki yıl 37°C'de, altı ay 40°C'de saklanabilmektedir (120).

Yeni Zelanda ve Endonezya'da klinik faz 2 çalışmaları yapılan yenidoğan rotavirüs suşu RV3'ten (G3P[6]) elde edilen RV3-BB ve Güney Afrika'da çalışmaları süren parenteral P2-VP8-P[8] subünit aşısı rotavirüs aday aşılardır. Hayvan çalışmalarında antikor üretimini uyardığı gösterilen, CDC-9 suşu (G1P[8]) ile hazırlanan inaktive rotavirüs aşısının (IRV) insanlarda faz-1 klinik çalışması

planlanmaktadır. Norovirüs benzeri parçacıklardan (VLP'ler; GI.3 ve GII.4) ve rotavirüs VP6'dan oluşan, cansız, norovirüs-rotavirüs kombinasyon aşısı çalışmaları yapılmaktadır. Bu aşı için farelerde yapılan çalışmalarda, yüksek immünojeniklik ve heterolog rotavirüs enfeksiyonundan korunma sağlandığı gösterilmiştir. Ayrıca, rotavirüs VP6 oligomerik yapısal düzenekleri, in vivo norovirüs VLP'leri için adjuvan görevi görür. Bu sayede çocukluk çağı akut gastroenteritinin önlenmesi için umut verici bir aşı adayı olacağı düşünülmektedir (121).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin toplanması ve çalışma planı

Çalışmamızda Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne Kasım 2016 ve Şubat 2018 tarihleri arasında başvuran 476 hastanın laboratuvarımıza gönderilen dışkı örnekleri toplanmıştır. Her hasta için üçer adet olmak üzere örnekler 1.5 ml'lik ependorflara alınmış, -80°C'de çalışılacağı zamana kadar saklanmıştır.

Çalışmamıza Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 19.01.2017 tarih ve 01 karar no. ile onay verilmiştir.

Gelen dışkı örneklerinde, immünokromatografik yöntemle rotavirüs antijen tespiti için ALL TEST™ (MedNet GmbH, GERMANY) kiti kullanılmıştır.

Dışkı örnekleri, %10 oranında sulandırıldıktan sonra ELISA (Rotaclone®Meridien, ABD) yöntemi ile rotavirüs serotip A pozitifliği açısından incelenmiştir.

Rotavirüs antijeni ELISA testi ile pozitif bulunan hastaların dışkı örneklerinden Qiaamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak spin-kolon yöntemi ile çift zincirli viral RNA elde edilmiştir.

Protein VP4 ve VP7 gen bölgelerinin amplifikasyonu için 'ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), Access Quick RT-PCR kiti (Promega Corporation, Madison, WI, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Protein VP4 gen amplifikasyonu Con2 ve Con3 primerleri ile, VP7 gen amplifikasyonu ise Beg9 ve End9 primerleri ile çalışılmıştır.

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

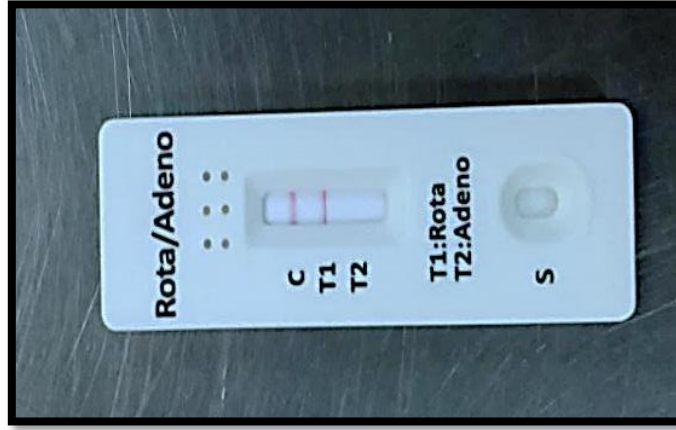
3.2. İmmunokromatografik yöntemle dışkıda rotavirüs antijeninin saptanması

1. Yeterince virüs partikülü elde etmek için örnek toplama kabında yeterli miktarda dışkı (1-2 ml, 1-2 g) toplanmıştır. Test dışkı laboratuvara ulaştıktan sonra 6 saat içinde gerçekleştirilir ise en iyi sonuçlar elde edilmektedir. (6 saat içinde test edilemeyeceği durumlarda örnek 2-8°C’de üç gün saklanabilmektedir. Uzun süreli saklama için örnekler -20°’nin altında tutulmalıdır.)
2. Kullanmadan önce solüsyon, kaset ve dışkı oda sıcaklığına getirilmiştir.
3. Katı örnekler için yaklaşık 50 mg dışkı toplanmış, sıvı örnekler için iki damla (yaklaşık 50 µL) dışkı alınmış ve ekstraksiyon solüsyonuna aktarılmıştır.
4. Dışkı ve ekstraksiyon solüsyonunu karıştırmak için kuvvetlice çalkalanmış, iki dakika kadar beklenmiştir.
5. Test tüpünden 2 tam damla (yaklaşık 80 µL) kasetteki örnek kuyucuğuna (S) kabarcık oluşmamasına dikkat edilerek damlatılmıştır.
6. Sonuçlar 10 dakika sonra okunmuş ve 20 dakikadan sonraki sonuçlar geçersiz sayılmıştır.

7. Testin doğru değerlendirilmesi için kontrol çizgisinde (C) kırmızı renkli çizgi oluşumu gözlenmiştir. Kontrol izgisi oluşmayan test geçersiz sayılmış ve tekrar edilmiştir.

❖ T1’de kırmızı çizgi oluşumu rotavirüs pozitif, T2’de kırmızı çizgi oluşumu adenovirüs pozitif, T1 ve T2’de kırmızı çizgi oluşumu rotavirüs ve adenovirus birlikte pozitif, T1 ve T2’de kırmızı çizginin oluşmaması durumunda rotavirüs ve adenovirüs negatif olarak değerlendirilmiştir (Resim 1).

8. Virüs yüküne bağlı olarak kırmızı çizginin yoğunluğu değişebileceği için hafif kırmızı çizgiler de pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Resim 1. İmmunokromatografik yöntemle dışkıda rotavirüs antijen pozitifliğinin gösterilmesi (S: rnek kuyucuğu, C: kontrol kuyucuğu, T1: rotavirüs, T2: adenovirüs)

3.3. Rotavirus antijeninin ELISA testi ile saptanması

3.3.1 ELISA (Rotaclone®Meridien, ABD) kitinin içindekiler; (Resim 2)

1. Monoklonal antikorla kaplı 48 kuyucuklu mikroplak
2. Enzim konjugat: Horseradish peroksidaz
3. Pozitif Kontrol: İnaktif simian rotavirus SA-11
4. Negatif Kontrol: Sample diluent
5. Substrat A: Üre peroksidaz
6. Substrat B: Tetrametil benzidin
7. Stop solüsyonu: 1N H₂SO₄ (sülfirik asit)

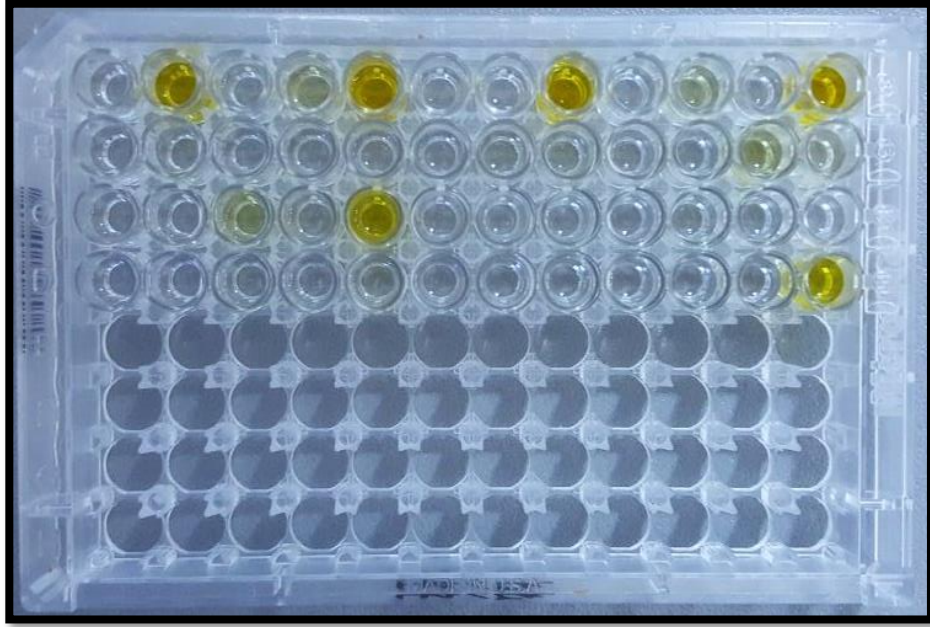


Resim 2. ELISA kitinin içindekiler

3.3.2 ELISA testinin uygulanışı

1. Eksi 80°C'lik dondurucuda saklanan dışkı örnekleri dondurucudan (Sanyo, Japonya) çıkartılarak oda sıcaklığına gelmesi için bekletilmiştir.
2. Kit kullanılmadan önce +4°C' den çıkartılarak oda sıcaklığına gelmesi için bekletilmiştir.
3. Fosfat tamponlu su (PBS), 100 ml steril distile suya 1 tablet olacak şekilde hazırlanmıştır.
4. 100 µL dışkı 900 µL PBS ile 1:10 oranında sulandırılmıştır.
5. Dilüe edilen örnekler homojenizasyon sağlanana kadar iyice vortekslendikten (Velp Scientifica, İtalya) sonra 1.5 dk'da 13.000 rpm'de santrifüj (Hermle Z 216 M, Almanya) edilmiştir.
6. Mikroplağın D12 kuyucuğuna 100 µL (2 damla) pozitif kontrol, D11 kuyucuğuna 100 µL (2 damla) negatif kontrol konulmuştur.
7. Diğer tüm kuyucuklara 100 µL sulandırılmış örnekler konulmuştur.
8. Tüm kuyucuklara enzim konjugattan 100 µL (2 damla) konulmuştur.
9. Oda sıcaklığında (plağı güneş ışığından koruyarak) bir saat inkübasyon yapılmıştır.
10. İnkübasyonun sonunda plağın içindeki sıvı boşaltılmıştır. Beş kez distile suyla kuyucuklar yıkanmıştır. Kuyucuklarda hiç sıvı kalmaması için plak birkaç kez gazlı bez üzerine ters çevrilerek vurulmuştur.

11. Her kuyucuğa subsrat A (üre peroksidaz) 100 µL (2 damla) eklenmiştir.
12. Her kuyucuğa subsrat B (tetrametilbenzidin) 100 µL (2 damla) eklenmiştir.
13. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyon (plağı gün ışığından koruyarak) yapılmıştır.
14. İnkübasyon bitince kuyucuklara durdurma solüsyonundan (H₂SO₄) 100 µL (2 damla) eklenmiştir.
15. Pozitif örneklerde antijen miktarıyla orantılı olarak mavi renk düzeyi artan kuyucuklarda, durdurma solüsyonu eklenmesiyle maviden sarıya dönen renk değişimi gözlenmiştir (Resim 3).
16. Mikroplak spektrofotometre cihazında (das Plate Reader, İtalya) 450 nm dalga boyunda okutularak değerlendirilmiştir.
17. Kitin önerisine göre optik yoğunluğu 0.150'den büyük olanlar pozitif, 0.150'ye eşit veya küçük olanlar ise negatif kabul edilmiştir.



Resim 3. ELISA plağı (pozitif hastalar; sarı ve negatif hastalar; renksiz)

3.4. Dışkıdan çift zincirli rotavirüs RNA'sının ekstraksiyonu

Rotavirus antijeni ELISA testi ile pozitif bulunan örneklerden Qiamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan örnekler PCR yapılana kadar -80°'de saklanmıştır.

3.4.1. Reagenlerin hazırlanışı:

1. 310 µL AVE solüsyona 310 µg liyofilize taşıyıcı RNA eklenmiş ve eksi 20°C'de saklanmıştır.
2. 50 örnek için AW1 ve AW2 solüsyonu hazırlanışı; 19 ml AW1'e 25 ml etanol (%96-100), 13 ml AW2'e 30 ml etanol (%96-100) eklenip karışım oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.4.2. Protokolün uygulanışı:

1. Önceden %10 oranında sulandırılmış dışkı örnekleri 30 saniye vorteks edilip, 12000 rpm’de bir dakika santrifüj edilmiştir.
2. Solüsyon AVL ve taşıyıcı RNA-AVE aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır. (örnek sayısının bir fazlası kadar örnek için hesaplama yapılmıştır.)

$$n \times 0.56 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

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

n: Örnek sayısı, **y:** Solüsyon AVL hacmi, **z:** Solüsyon AVL’e eklenecek taşıyıcı RNA- Solüsyon AVE hacmi

3. Hazırlanan solüsyon AVL-taşıyıcı RNA karışımından 560 μL kadar 1,5 ml’lik ependorfa eklenmiştir.
4. Sulandırılmış örneklerin üst kısmından almaya dikkat ederek 140 μL kadar örnek 1,5 ml’lik ependorfa eklenmiş ve 15 saniye vorteks yapılmıştır.
5. Vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiş ve sonrasında hafif bir şekilde spin yapılmıştır.
6. Etanolden 560 μL kadar örnekler eklenmiş, 15 saniye vorteks ve ardından spin yapılmıştır.
7. Önceki solüsyondan (basamak 6’daki) 630 μL alınıp QIAamp minikolon tüplerine eklenmiş 8000 rpm’de bir dakika santrifüj edilmiştir. Alt kısımdaki tüp atılmış üstteki tüp temiz yeni minikolon tüpüne alınmıştır.
8. Son basamak tekrar edilmiştir. (7. basamak)

9. AW1'den 500 µL eklenmiş ve 8000 rpm'de bir dakika santrifüj edilmiştir. Alt kısımdaki tüp atılmış üstteki tüp temiz boş minikolon tüpüne alınmıştır.
10. AW2'den 500 µL eklenmiş ve 14000 rpm'de üç dakika santrifüj edilmiştir.
11. Alt kısımdaki tüp atılmış üstteki tüp temiz boş minikolon tüpüne alınmıştır.
12. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
13. Altındaki tüp atılmış üst kısım 1,5 ml'lik ependorfa alınmıştır.
14. AVE'den 60 µL eklenmiş ve bir dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 8000 rpm'de bir dakika santrifüj edilmiştir.
15. Ekstraksiyon işlemi tamamlanan örnekler PCR yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.5. Rotavirus G ve P tiplerinin belirlenmesi

Tablo 2. Rotavirüs VP7 gen bölgesi için kullanılan primerler ve baz dizilimleri

Primerler	Baz dizilimleri (5'-3')
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG
End9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG

Tablo 3. VP7 amplifikasyonu için RT-PCR karışımının hazırlanması

	Hacim μL	Son konsantrasyon μM
2 x Access Quick Master Mix	25	
Beg9 (10 μM)	5	1
End9 (10 μM)	5	1
AMV (10 μM)	1	0.2
RNase free water	12	
Toplam	48	

3.5.1. VP7 amplifikasyon basamakları:

1. Kalıp dsRNA'dan 4 μL kadar yeni ependorflara alınmıştır.
2. Termal cycler cihazında 97°C'de 5 dakika bekletilerek denatürasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
3. Hızlı bir şekilde örnekler buz üzerine alınarak 5 dakika bekletilmiştir.
4. Her bir örnekten 2.5 μL alınarak, önceden hazırladığımız 48 μL mastermix bulunan ependorflara dağıtılmıştır.
5. Termal cycler cihazında Tablo 4'teki süreler ve sıcaklıklar ayarlanarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre bitiminde amplifikasyon ürünleri +4°C'de saklanmıştır.

Tablo 4. VP7 amplifikasyon sıcaklık dereceleri, süreleri ve döngü sayısı

45°C	45 dakika		1 Siklus
95°C	2 dakika		
50°C	1 dakika		
72°C	90 saniye		
94°C	1 dakika		39 Siklus
50°C	1 dakika		
72°C	90 saniye		
72°C	5 dakika		1 Siklus

3.5.2 Nested PCR ile G Tiplendirme

Tablo 5. Rotavirus G tiplendirme için kullanılan primerler ve baz dizilimleri

Primerler	Baz dizilimleri (5'-3')
VP7-R	AACTTGCCACCATTTTTTCC
G1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG
G2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG
G3	ACGAACTCAACACGAGAGG
G4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG
G9	CTTGATGTGACTAYAAATAC
G10	ATGTCAGACTACARATACTGG
G12	CCGATGGACGTAACGTTGTA

Tablo 6. G tiplendirme için PCR Mastermix hazırlanması

	Hacim μL	Son konsantrasyon μM
2 x PCR Master Mix (Promega)	25	
VP7-R (10 μM)	1	0.2
G1 (10 μM)	1	0.2
G2 (10 μM)	1	0.2
G3 (10 μM)	1	0.2
G4 (10 μM)	1	0.2
G9 (10 μM)	1	0.2
G10 (10 μM)	1	0.2
G12 (10 μM)	1	0.2
RNase free water	16	
Toplam	49	

- Her bir örnekten 2 μL cDNA alınarak, önceden hazırladığımız 49 μL mastermix bulunan ependorflara dağıtılmıştır.
- Termal cycler cihazında Tablo 7'deki süreler ve sıcaklıklar ayarlanarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sürenin sonunda oluşan amplifikasyon ürünleri $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

Tablo 7. G tiplendirme için amplifikasyon sıcaklık dereceleri, süreleri ve döngü sayısı

95°C	1 dakika	}	30 Siklus
42°C	2 dakika		
72°C	1 dakika		

3.5.3. RT-PCR ile VP4 amplifikasyonu:

Tablo 8. Rotavirus VP4 gen bölgesi için kullanılan primerler ve baz dizilimleri

Primerler	Baz dizilimleri (5'-3')
Con2	ATTTCGGACCATTTATAACC
Con3	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA

Tablo 9. VP4 amplifikasyonu için RT-PCR karışımının hazırlanması

	Hacim μL	Son konsantrasyon μM
2 x Access Quick Master Mix	25	
Con2 (10 μM)	1	0.2
Con3 (10 μM)	1	0.2
AMV (10 μM)	1	0.2
RNase free water	21	
Toplam	49	

3.5.4. VP4 amplifikasyon basamakları:

1. Kalıp dsRNA'dan 3 μ L alınmış, 97°C'de 5 dakika süre ile denatürasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
2. Hızlı bir şekilde örnekler buza konulmuş ve 5 dakika bekletilmiştir.
3. Her bir örnekten 2 μ L alınmış, önceden 49 μ L RT mastermix ile doldurulmuş tüplere dağıtılmıştır.
4. Termal cycler cihazında Tablo 10'daki süreler ve sıcaklıklar ayarlanarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sürenin sonunda oluşan amplifikasyon ürünleri +4°C'de saklanmıştır.

Tablo 10. VP4 amplifikasyon sıcaklık dereceleri, süreleri ve döngü sayısı

45°C	45 dakika		1 Siklus
95°C	2 dakika		
50°C	30 saniye		
72°C	1 dakika		
94°C	15 saniye		29 Siklus
50°C	30 saniye		
72°C	1 dakika		
72°C	5 dakika		1 Siklus

3.5.5. Nested PCR ile P Tiplendirme

Tablo 11. Rotavirus P tiplendirme için kullanılan primerler ve baz dizilimleri

Primerler	Baz dizilimleri (5'-3')
HumCom5	CTCTCGATGGTCCATATCAACC
P[4]	ATATATTGCCTATTTGTTTGAC
P[6]	GTATTACAGTTTCTACTTCAGA
P[8]	TGTACGTCTATTATAAAATTCATTT
P[9]	CGTCGCTCCTTGATACCAGT

Tablo 12. P tiplendirme için PCR Mastermix hazırlanması

	Hacim μL	Son konsantrasyon μM
2 x PCR Master Mix (Promega)	25	
HumCom5 (10 μM)	1	0.2
P [4] (10 μM)	1	0.2
P [6] (10 μM)	1	0.2
P [8] (10 μM)	1	0.2
P [9] (10 μM)	1	0.2
RNase free water	19	
Toplam	49	

- Önceden 49 μL master mix ile doldurulmuş ependorflara kalıp cDNA'dan 1.5 μL eklenmiştir.
- Termal cycler cihazında Tablo 13'teki süreler ve sıcaklıklar ayarlanarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre bitiminde PCR amplifikasyon +4°C'de saklanmıştır.

Tablo 13. P tiplendirme için amplifikasyon sıcaklık dereceleri, süreleri ve döngü sayısı

94°C	10 saniye	}	30 Siklus
42°C	30 saniye		
72°C	30 saniye		
72°C	5 dakika	→	1 Siklus

3.6. Agaroz jel elektroforezi

Elde edilen amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek oluşan bantlara göre örneklerin genotipleri belirlenmiştir.

3.6.1. Agaroz jelin hazırlanışı ve jel elektroforezinin uygulanışı

1. İlk olarak agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforez sırasında tankın içine koymak için TBE (Tris Borat Ethylene Diamine Tetra Acetic acid) solüsyonu hazırlanmıştır. Tris-Base (Merck, Almanya) 54 g, Borik Asit (AppliChem GmbH, Almanya) 27.5 g, ve EDTA (pH 8.0) (AppliChem GmbH, Almanya) 20 ml 0.5 M kadar karıştırılarak 5x stok TBE solüsyonu hazırlanmış, hacim distile suyla 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırladığımız 5xTBE stok solüsyonundan 100 ml alınarak, 400 ml distile su eklenmiş ve 1xTBE elde edilmiştir.

2. Agaroz (Sigma, Almanya) 2 g kadar hassas terazide (Radwag WTB 200) tartılmış ve erlenmayere konulmuştur.

3. Agaroz üzerine 100ml 1xTBE'den eklenmiş ve mikrodalga fırında (Beko MD1510S) en düşük sıcaklıkta agarozun tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

4. Agaroz homojenizasyonu sağlandıktan sonra katılaşmamasına dikkat edilerek yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulmuştur.

5. Hazırladığımız agaroz jele 0,2 µl kadar DNA boyası olan Etidyum Bromid (5µl/10ml, Metis,Kanada) eklenmiş ve jel yükleme kuyucuklarından oluşan taraklı kalıba dikkatli bir şekilde baloncuk oluşması önlenerek dökülmüştür.

6. Jel kalıba döküldükten sonra oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika kadar bekletilerek agarın katılaşması sağlanmıştır.

7. Agar tamamen katılaştıktan sonra taraklar dikkatlice çıkarılmış ve jel elektroforez tankının (CS Cleaver Scientific Inc. Warwickshire, İngiltere) içerisine yerleştirilmiştir.

8. Jelin üst kısmı kaplanana kadar tankın içine 1xTBE tamponu konulmuştur.

9. Parafilm üzerine her örnek için 2 µl Orange G yükleme boyasından (Metis, Kanada) dağıtılmıştır.

10. Herbir örnekten 6 µl alınarak Orange G ile pipetaj yapıp karıştırılmış ve marker konulacak olan ilk kuyucuk hariç her kuyucuğa bu karışımın tamamı dağıtılmıştır.

11. Jelin ilk kuyucuğuna 3 µl 100 bp'lik markerdan (GeneRuler™100 bp DNA Ladder Plus, LabAid™, Fermentas Inc, Ontario, Kanada) yüklenmiştir.

12. Güç kaynağı (Consort E833) 120 V'a ayarlanmış ve markerda iyice açılma olana kadar yaklaşık bir saat yürütme işlemi yapılmıştır.

13. Bir saatin sonunda jel tanktan çıkarılmış ve görüntüleme sisteminde (UVITEC Cambridge, İngiltere) ultraviyole ışık altında oluşan bantlar görüntülenerek kaydedilmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS Statics 22.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Rotavirüs pozitifliği açısından cinsiyet, mevsimler ve yaş grupları arasındaki istatistiksel farklılıklar Pearson Ki-kare testi ile değerlendirilmiş, tüm analizlerde $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

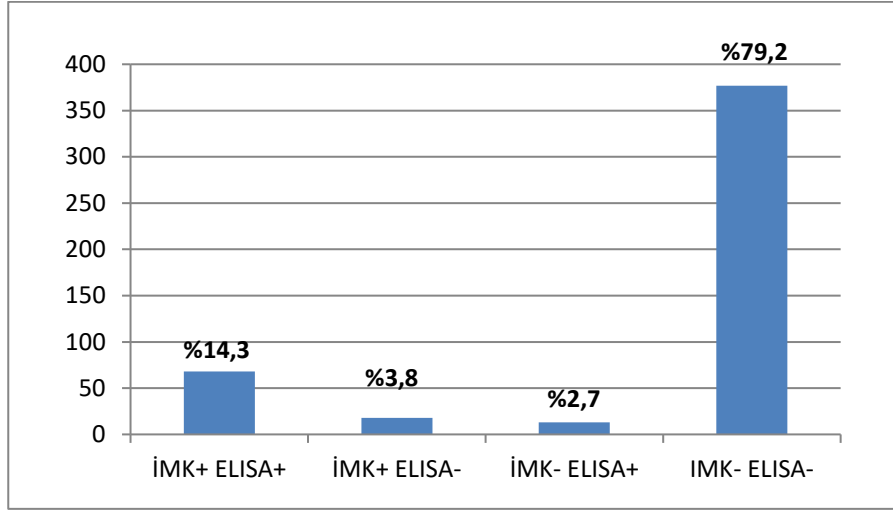
4. BULGULAR

Çalışmamızda Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne, Kasım 2016 ve Şubat 2018 tarihleri arasında başvuran, 0-92 yaş arasındaki 476 hastanın, farklı kliniklerden laboratuvarımıza gönderilen dışkı örnekleri çalışılmıştır.

Örneklerin 86'sında (%18.1) immünokromatografik test ile rotavirüs antijeni pozitif bulunmuştur. İmmünokromatografik test sonucu pozitif ve negatif olan 476 hastanın tümüne ELISA testi çalışılmış ve 81 hastada (%17) ELISA pozitif bulunmuştur. Örneklerin %14.3'ünde immünokromatografik test ve ELISA ile rotavirus antijeni pozitif bulunmuştur. %3.8'inde immünokromatografik test ile rotavirus pozitif bulunurken, ELISA testi ile negatif bulunmuştur (Tablo 14) (Şekil 10).

Tablo 14. Hastaların ELISA ve immünokromatografik test sonuçları

ELISA	İmmünokromatografik test pozitif	İmmünokromatografik test negatif
Pozitif	68 (%14.3)	13 (%2.7)
Negatif	18 (%3.8)	377 (%79.2)



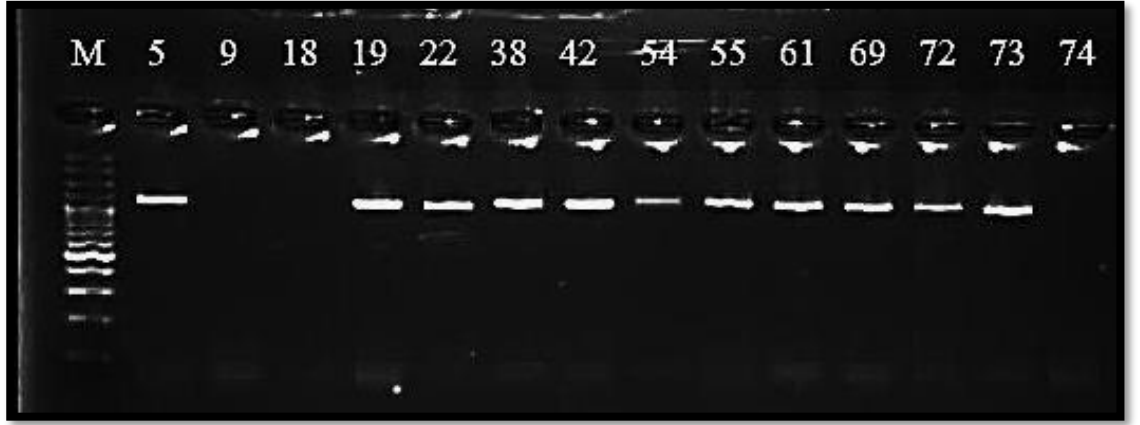
Şekil 9. ELISA ve immünokromatografik (İMK) test sonuçları

Tüm ELISA testi pozitif örneklerle RT-PCR çalışılmıştır. ELISA ile pozitif bulunan 81 hastanın tümünde PCR ile de rotavirus pozitif bulunmuştur (Tablo 15).

Tablo 15. ELISA ve PCR sonuçları

	PCR POZİTİF	PCR NEGATİF
ELISA POZİTİF (n=81)	81	0

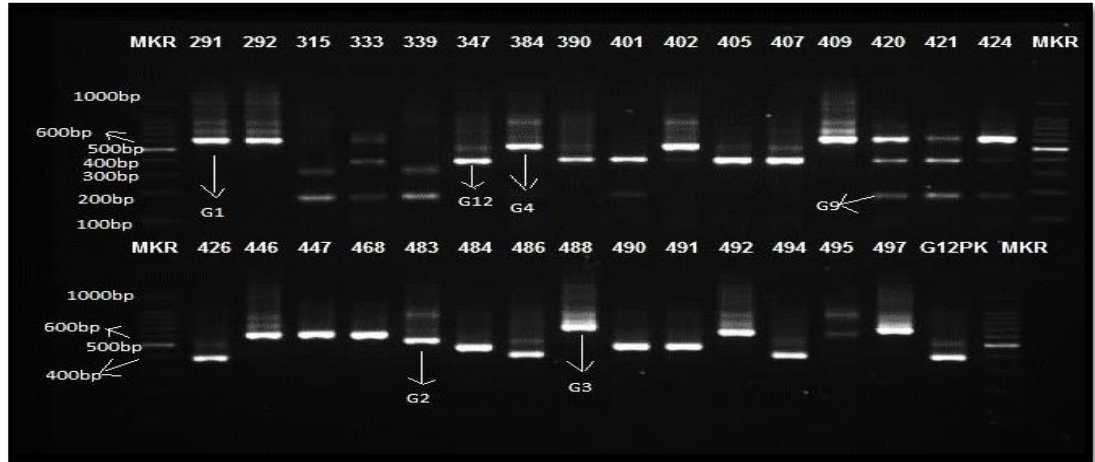
Enzim bağlı immünosorbent testi pozitif 81 hastanın 74'ünde (%91.4) G0 genotipi çalışılmıştır (Şekil 10).



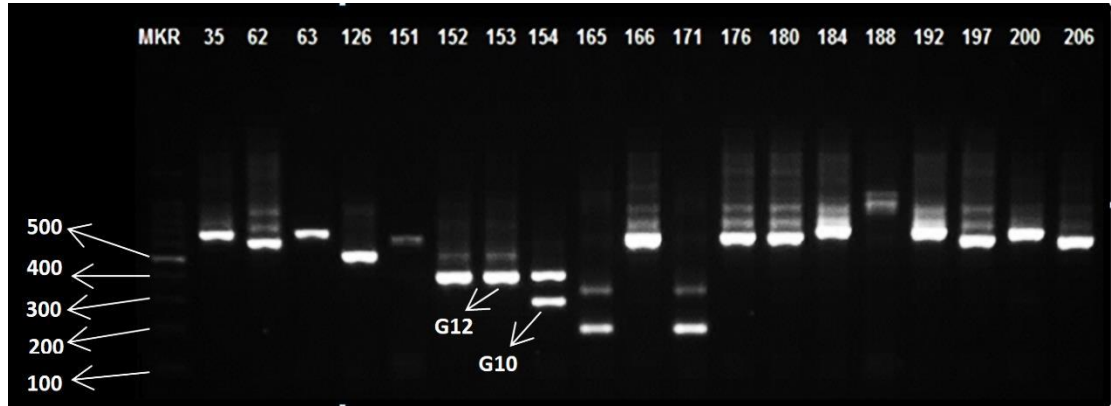
Şekil 10. Agaroz jel elektroforezinde G0 pozitif ve negatif olan hastalar (M=marker)

Örneklerden G0 pozitiflere ve nested PCR olduğu için G0 negatif olanlara da G tiplendirme için 2. tur PCR çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda 81 hastanın 80'inde G tiplendirmesi yapılırken, 1 hastada tiplendirme yapılamamıştır. Agaroz jelde görülen G tipleri ve bp değerleri Şekil 11 ve 12'de gösterilmiştir.

Çalışmamızda 7 farklı G tipi elde edilmiştir. Örneklerin sırasıyla %37, %7.4, %16.1, %6.2, %9.9, %2.5, %26'sında G1, G2, G3, G4, G9, G10 ve G12 saptanmıştır.

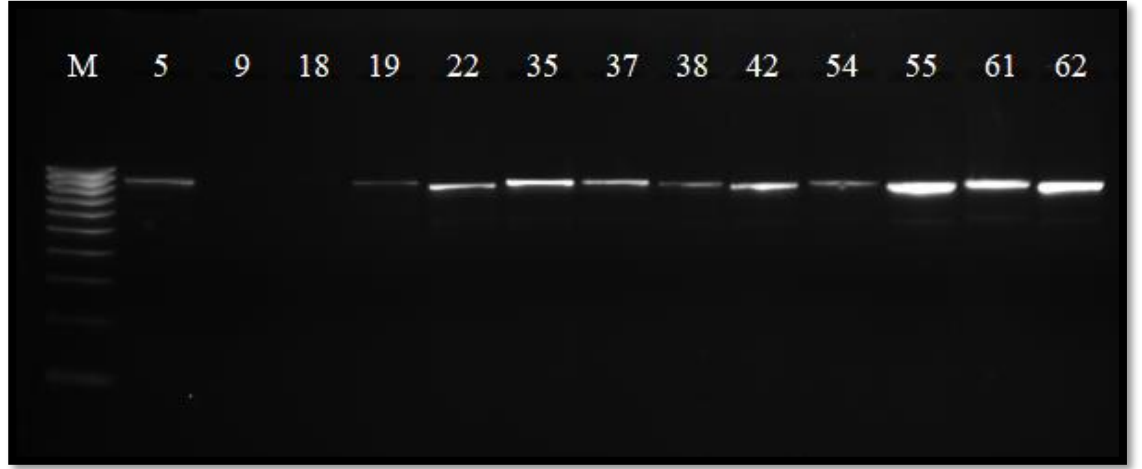


Şekil 11. Agaroz jel elektroforezinde G tip görüntüleri-1 (G1; 618 bp, G2 (521 bp), G3 (682 bp), G4 (452 bp), G9 (179 bp), G12 (387 bp))



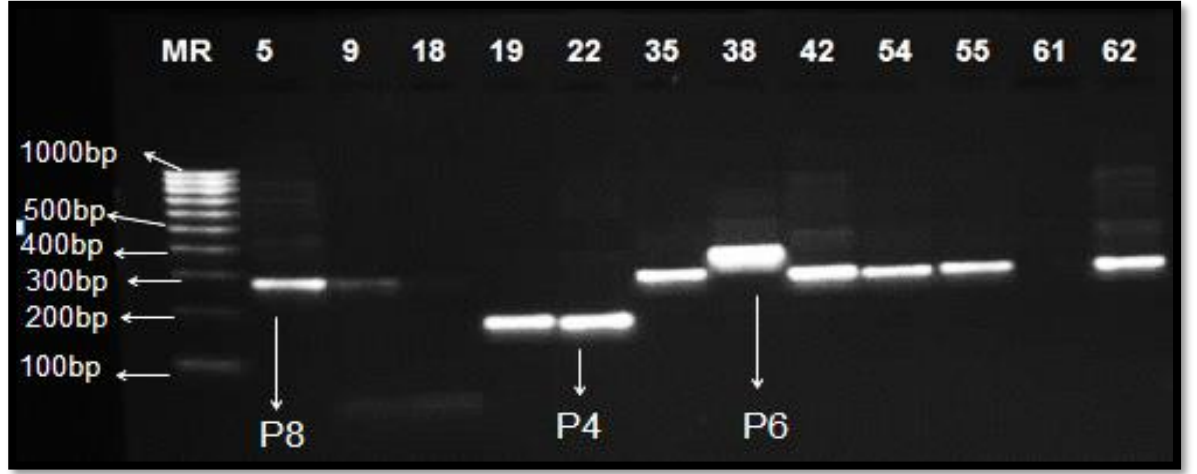
Şekil 12. Agaroz jel elektroforezinde G tip görüntüleri-2 (G10; 266 bp)

Enzim bağlı immünosorbent testi pozitif 81 hastanın 69'unda (%85) P0 genotipi çalışılmıştır (Şekil 13).



Şekil 13. Agaroz jel elektroforezinde P0 pozitif ve negatif olan hastalar (m=marker)

Örneklerden P0 genotipi pozitif ve nested PCR olduğu için P0 negatif örneklere de P tiplendirme için 2. tur PCR çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda 81 hastanın 59'unda P tiplendirmesi yapılırken, 22 hastada tiplendirme yapılamamıştır. Çalışmamızda 3 farklı P tipi elde edilmiştir. P genotipleri arasında P[8] (%53) dominant genotip iken bunu sırasıyla P[nt] (nt; tiplendirilemeyen) (%27,2), P[6] (%7,4), P[4] (%6,2), P[6][8] (%4,8), P[4][8] (%1,2) takip ettiği görülmüştür. Agaroz jelde görülen P tipler Şekil 14'te gösterilmiştir.



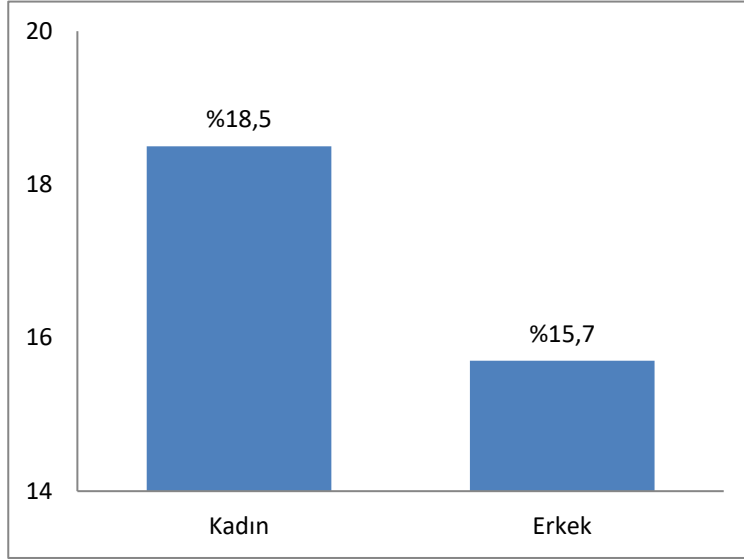
Şekil 14. Agaroz jel elektroforezinde P tip görüntüleri (p4; 186 bp, p6;381 bp ve p8; 280 bp)

Çalışmamızda 11 farklı G, P kombinasyonu saptanmıştır. En sık görülen G ve P genotip kombinasyonu G1P[8] olarak bulunmuştur (% 17,2). Bunu G12P[8] (%11,11), G3P[8] (%11,11), G1P[nt] (%9,87) , G9P[8] (%6,16), G2P[4] (%4,94) takip etmiştir (Tablo 16). Ayrıca, örneklerin %7,4'ünün G1G9P[8], G1G12P[8], G1G9G12P[6][8], G1G9G12P[nt], G10G12P[8] beş farklı tipte miks genotipe sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 16. G ve P genotip kombinasyonları

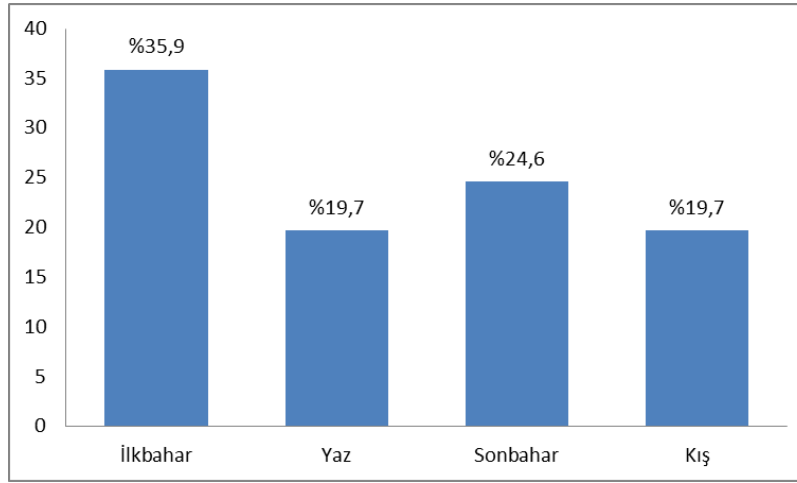
Tip	Sayı	Totale göre yüzde
G1P[8]	14	17,2%
G1P[4] ve P[8]	1	1,23%
G1P[nt]	8	9,87%
G1P[6] ve P[8]	2	2,47%
Subtotal G1	25	30,77%
G2P[4]	4	4,94%
G2P[nt]	2	2,47%
Subtotal G2	6	7,41%
G3P[6]	2	2,47%
G3P[8]	9	11,11%
G3Pnt	2	2,47%
Subtotal G3	13	16,05%
G4P[4]	1	1,23%
G4P[8]	3	3,70%
G4P[nt]	1	1,23%
Subtotal G4	5	6,16%
G9P[6]	1	1,23%
G9P[8]	5	6,16%
G9P[nt]	2	2,47%
Subtotal G9	8	9,86%
G10P[nt]	1	1,23%
Subtotal G10	1	1,23%
G12P[6]	3	3,70%
G12P[8]	9	11,11%
G12P[nt]	4	4,93%
Subtotal G12	16	19,74%
G1+G9P[8]	1	1,23%
G1+G12P[8]	1	1,23%
G1+G9+G12P[6] ve P[8]	2	2,47%
G1+G9+G12P[nt]	1	1,23%
G10+G12P[8]	1	1,23%
Subtotal Miks Tipler	6	7,40%
GntP[nt]	1	1,23%
Subtotal Gnt	1	1,23%
TOPLAM	81	

Kadın hastaların %18.5'i, erkek hastaların %15.7'si pozitif olarak saptanmış ve cinsiyet ve rotavirüs pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 15).



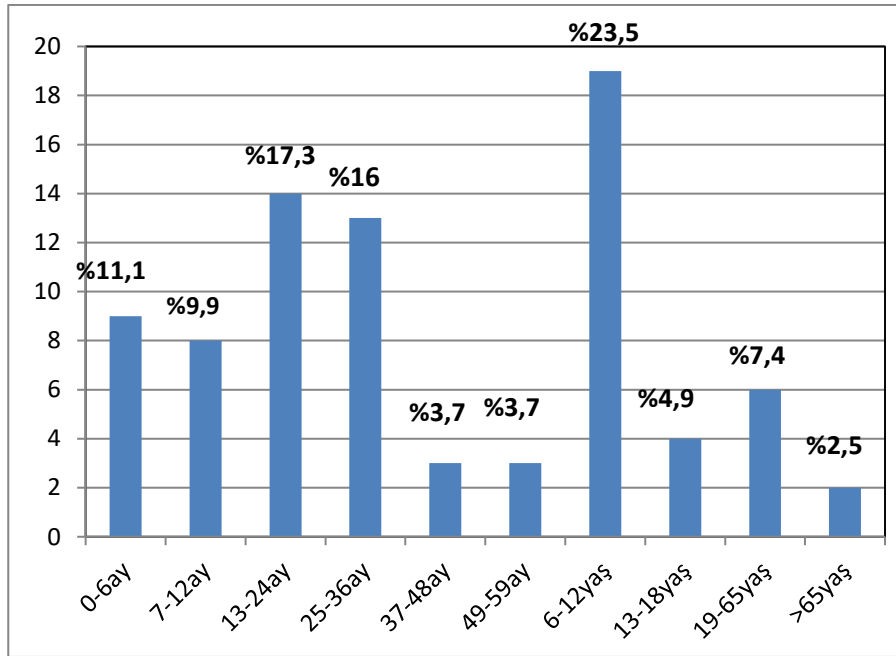
Şekil 15. Cinsiyetlere göre rotavirüs pozitifliğinin dağılımı

Rotavirüs pozitif olgular sırasıyla ilkbahar (%35,9), sonbahar (%24,6), kış (%19,7) ve yaz (%19,7) mevsiminde görülmüştür ve mevsimlere göre rotavirüs pozitifliği arasında istatistiki olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 16).



Şekil 16. Rotavirüs pozitif hastaların mevsimlere göre dağılım yüzdeleri

Rotavirüs pozitif olguların yaş gruplarına göre dağılımı şu şekildedir: 6-12 yaş (% 23.5), 13-24 ay (%17.3), 25-36 ay (%16) (Şekil 17). İstatistiki olarak anlamlı fark oluşturan yaş grubu 25-36 ay olmuştur ($p<0,05$)



Şekil 17. Rotavirüs pozitif olguların yaş gruplarına göre dağılım yüzdeleri

Tablo 17. Hastaların cinsiyet, mevsimler ve yaş gruplarına göre rotavirüs pozitiflik yüzdelerinin dağılımı

Özellik	Negatif		Pozitif		
	n	Yüzde (%)	n	Yüzde (%)	
Cinsiyet					
Kadın	181	81,5	41	18,5	p=0,431*
Erkek	214	84,3	40	15,7	
Mevsimler					
İlkbahar	136	81,9	30	18,1	p=0,036*
Yaz	127	88,8	16	11,2	
Sonbahar	55	73,3	20	26,7	
Kış	77	83,7	15	16,3	
Yaş Grupları					
0-6 ay	39	83	8	17	p=0,015*
7-12 ay	32	78	9	22	
13-24 ay	45	76,3	14	23,7	
25-36 ay	23	63,9	13	36,1	
37-48 ay	19	90,5	2	9,5	
49-59 ay	11	78,6	3	21,4	
6-12 yaş	93	83	19	17	
13-18 yaş	40	88,9	5	11,1	
19-65 yaş	82	93,2	6	6,8	
>65 yaş	11	84,6	2	15,4	
* = Pearson Ki-kare test ile bulunan değerler					

Farklı yaş gruplarında görülen G, P tipleri ve genotip kombinasyonları Tablo 18-20’de gösterilmiştir.

Tablo 18. Farklı yaş gruplarında görülen G genotiplerinin dağılımı

Yaş grupları/G Genotipleri	G1	G2	G3	G4	G9	G10	G12	G[nt]	Gmiks (G1+G9/ G1+G9+G12/ G1+G12/ G10+G12)
0-6 ay	5	1	2	0	2	0	4	0	2
7-12 ay	3	0	2	0	1	0	2	0	0
13-24 ay	7	1	3	0	2	0	3	0	1
25-36 ay	2	0	3	1	2	0	2	1	1
37-48 ay	1	0	2	0	0	0	0	0	0
49-59 ay	0	0	0	2	0	0	1	0	0
6-12 yaş	4	2	1	1	4	2	8	0	2
13-18 yaş	1	2	0	0	0	0	1	0	0
19-65 yaş	4	0	0	1	1	0	0	0	0
>65 yaş	1	0	0	0	0	0	1	0	0

Tablo 19. Farklı yaş gruplarında görülen P genotiplerinin dağılımı

Yaş grupları/P Genotipleri	P4	P6	P8	P4+P8	P6+P8	P[nt]
0-6 ay	1	1	5	0	0	3
7-12 ay	0	1	4	0	0	3
13-24 ay	1	0	9	0	2	2
25-36 ay	0	1	6	0	0	4
37-48 ay	0	1	2	0	0	0
49-59 ay	0	0	2	0	0	1
6-12 yaş	1	2	9	0	1	7
13-18 yaş	2	0	2	0	0	0
19-65 yaş	0	0	3	1	0	2
>65 yaş	0	0	1	0	1	0

Tablo 20. En sık görülen G ve P genotip kombinasyonlarının ve G10, G12'nin farklı yaş gruplarındaki dağılımı

Yaş grupları/Genotip kombinasyonları	G1P[8]	G3P[8]	G9P[8]	G10P[8]	G12P[6]	G12P[8]	G12P[nt]
0-6 ay	3	1	0	0	1	0	2
7-12 ay	1	2	0	0	1	1	0
13-24 ay	4	3	2	0	1	2	1
25-36 ay	1	1	1	0	0	2	0
37-48 ay	1	1	0	0	0	0	0
49-59 ay	0	0	0	0	0	1	0
6-12 yaş	2	1	2	1	2	5	2
13-18 yaş	1	0	0	0	0	1	0
19-65 yaş	1	0	1	0	0	0	0
>65 yaş	0	0	0	0	0	1	0

5. TARTIŞMA

Rotavirüsler, dünyada 0-5 yaş arasındaki çocuklarda en sık karşılaşılan, özellikle gelişmekte olan ülkelerde bebek ölümlerine neden olabilen önemli bir viral gastroenterit etkenidir. Virüsün akut gastroenterit etkeni olarak keşfedilmesinden sonra dünyada çok sayıda çalışma yapılmış ve rotavirus aşılı geliştirilmiştir. Aşılar birçok ülkede aşılama programına dahil edilmiş ve rotavirüsten korunmada önemli bir rol almıştır.

Ülkemizde de rotavirus sıklığını bildiren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların hemen hepsinde hasta grubu olarak çocuklar alınmış ve sonuçlar çoğunlukla immünokromatografik, ELISA gibi yöntemlerle değerlendirilmiştir. Ülkemizde yapılan son çalışmalarda, çocukluk çağı gastroenteritlerinin % 6-28'inden rotavirüsün sorumlu olduğu gösterilmiştir (122-125). Akan ve ark. İstanbul'da 2007-2008 yılları arasında, akut gastroenterit nedeniyle başvuran tüm yaşlardan 672 hastada yaptıkları çalışmada immünokromatografik testle %18,7 oranında pozitiflik saptamışlardır (126). Çelik ve ark. 2006-2012 yılları arasında, Sivas'ta 0-5 yaş arası çocuklarda yaptığı bir çalışmada, 4702 dışkı örneğinin %17'sinde immünokromatografik yöntemle rotavirus antijenini pozitif bulmuşlardır (127). Çoban ve ark. Alanya'da, Nisan 2008-Mart 2013 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada, 0-16 yaş arası 3106 çocuğun dışkı örneklerinin %13,6'sında immünokromatografik yöntemle rotavirus pozitifliği elde etmişlerdir (128). İnci ve ark. Artvin'de Ocak 2010-Ocak 2013 tarihleri arasında ishal şikayeti ile başvuran 0-5 yaş arası 302 çocuğun dışkı örneklerinde immünokromatografik test ile %10,6

oranında pozitiflik saptamışlardır (129). Aslantaş ve ark. Ocak 2013-Aralık 2016 tarihleri arasında akut gastroenterit tanısı olan 0-17 yaş arası çocuklardan çocuk acile gönderilen 1712 dışkının %17.5'inde immünokromatografik yöntemle rotavirüs pozitifliği saptamışlardır (130). Dhiman ve ark. 2013-2014 yılları arasında Hindistan'da 0-5 yaş arası akut gastroenterit tanısı konan 100 çocuğun %23'ünde immunokromatografik yöntemle rotavirüsü pozitif saptamışlardır (131). Okebugwu ve ark. Nijerya'da Mart 2015-Eylül 2015 tarihleri arasında çocuk hastanesine başvuran, 0-36 ay arası çocuklarda yaptıkları çalışmada immünokromatografik yöntemle 125 çocuğun %24.8'inde rotavirus antijenini pozitif bulmuşlardır (132).

Çalışmamızda immünokromatografik yöntemle %18.1 oranında rotavirus antijen pozitifliği saptadık. Ülkemizde ve yurtdışında yapılan bu çalışmalardan bildirilen sonuçlara göre rotavirüs pozitifliğinin benzer sıklıkta olduğunu gördük.

Kaşıfoğlu ve ark. 2005-2011 yılları arasında yaptıkları çalışmada 1241 dışkı örneğinde ELISA (ELFA; Vidas; Biomerieux, Fransa) ile %19.9 oranında pozitiflik saptamışlardır (133). Samancı ve ark. Diyarbakır'da Ocak 2010-Aralık 2015 yılları arasında, akut gastroenterit nedeni ile başvuran 0-18 yaş grubundaki 55035 çocukta yaptığı çalışmada ELISA (Triturus-Biomerieux) yöntemi ile %14.1 oranında pozitiflik elde etmişlerdir (134). Avcı ve ark. 2012-2014 yılları arasında, ELISA yöntemi ile (Premier™ Rotaclone® EIA, Meridian Diagnostics) rotavirüs pozitifliğini 0-5 yaş arası 982 çocuk hastada %19.6 olarak bulmuşlardır (135). Afrad ve ark. Haziran 2006-Mayıs 2012 tarihleri arasında Bangladeş'te yaptıkları çalışmada 9678 dışkının %20.3'inde ELISA (Dakopatts, Copenhagen, Denmark) ile rotavirus pozitif

bulmuşlardır (136). Çin’de Tian ve ark. 2011-2016 yılları arasında 0-5 yaş arası çocuklarda ELISA (ProSpectT Rotavirus microplate assay) ile 3668 dışkı örneğini incelediklerinde, %20.8’inde rotavirüs pozitifliği tespit etmişlerdir (137).

Çalışmamızda Premier™ Rotaclone® (Meridian Biosciences; Cincinnati, Ohio) kitiyle ELISA testi çalışılmış, % 17 oranında pozitiflik görülmüş ve bizim yöntemimizi kullanan çalışmayla elde ettiğimiz sonuç benzer olmuştur. Gelişmekte olan ülkelerde yapılan bu çalışmalara göre ise biraz daha düşük ancak yakın sonuçlar elde etmiş bulunmaktayız.

Artıran ve ark. Ekim 2012-Aralık 2013 tarihlerini kapsayan, Kayseri’de akut gastroenteriti olan 0-5 yaş arası çocuklarda topladıkları 101 dışkının %69.3’ünde immünokromatografik yöntemle, %59.4’ünde ELISA testi ile (DRG, Marburg, Germany), %57.4’ünde PCR ile rotavirus pozitif bulmuşlardır (138). Umair ve ark. 2014 yılında Pakistan’da 0-5 yaş arası 502 çocukta yaptıkları çalışmada ELISA ile (ProSpecT™ Rotavirus Microplate Assay. Oxoid Ltd., UK) %29.3’ünde pozitiflik saptamışlar, pozitif örneklerin de %89’unda PCR ile pozitiflik (%26.1) tespit etmişlerdir (139). Turner ve ark. 2008-2009 yılları arasında Malawi’de yaptıkları çalışmada 0-5 yaş arası 720 çocuğun %31’inde ELISA ile (RotaClone™, Meridian, Biosciences; USA) ve ELISA pozitiflerin hepsinde PCR ile rotavirüs pozitif bulmuşlardır (140).

Premier™ Rotaclone®, ProSpecT™ ve RIDASCREEN®, WHO’nun 2018 rehberinde önerdiği ELISA kitleridir. Bu testlerin duyarlılıkları %75-82, özgüllükleri %100 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda Premier™ Rotaclone® (Meridian

Biosciences; Cincinnati, Ohio) ELISA kiti ile pozitif bulunan örneklerin tamamında PCR ile de pozitiflik elde ettik. Bu kitin kullanıldığı çalışmalarda da gördüğümüz gibi, elde edilen sonuçların rotavirüsün tanısında kullanılan PCR gibi güvenilir moleküler yöntemlerle uyum gösterdiğini düşünmekteyiz.

Bulut ve ark. Ağustos 2012-Temmuz 2015 tarihleri arasında yaptığı bir çalışmada, 0-5 yaş arası çocuklardan toplanan 107 dışkının 83'ünde PCR ile rotavirüs pozitif bulmuş ve bunların 53'ünün (%63,8) kadın, 30'unun (%36,1) erkek olduğunu saptamıştır. Çalışmalarında cinsiyete göre rotavirüs pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (141). Burkina Faso'da Bonkougou ve ark.'nın Kasım 2008-Şubat 2010 tarihleri arasında 0-5 yaş arası 447 çocukta yaptığı çalışmada, kadınlardan daha fazla erkek olduğu fakat hastalar arasında istatistiksel olarak cinsiyet farkının anlamlı olmadığı görülmüştür (142).

Bizim çalışmamızda kadın hastaların %18.5'i, erkek hastaların %15.7'si pozitif olarak saptanmış ve bu çalışmalara benzer şekilde cinsiyetler arasında rotavirüs pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,431$).

Doğan ve ark. Temmuz 2012- Temmuz 2013 tarihleri arasında, Gaziantep'te yaptıkları çalışmada pozitifliğin en fazla kış (%17.1), 2. sıklıkla ilkbahar (%13.3) mevsiminde olduğunu görmüşlerdir. Mevsimlere göre rotavirüs pozitifliği arasında anlamlı ilişki bulmuşlardır (143). Konca ve ark. Mart 2012-Şubat 2013 tarihleri arasında Adıyaman'da yaptıkları çalışmada rotavirüsün en sık sonbahar mevsiminde görüldüğünü saptamışlardır (144). Sugeçti ve ark. Ocak 2014-Aralık 2014 tarihleri arasında Zonguldak'ta yaptıkları çalışmada rotavirus pozitifliğinin en sık ilkbaharda

(%37,15) olduğunu, mevsimlere göre rotavirüs pozitifliği bakımından anlamlı ilişki olmadığını göstermişlerdir (145). Shoeib ve ark. Mısır’da Ağustos 2011-Ağustos 2012 tarihleri arasında yaptıkları bir çalışmada rotavirus pozitifliğinin en sık kış mevsiminde olduğunu saptamışlardır (146).

Bizim çalışmamızda rotavirüs pozitif olgular sırasıyla ilkbahar (%35,9), sonbahar (%24,6), kış (%19,7) ve yaz (%19,7) mevsiminde görülmüştür ve mevsimlere göre rotavirüs pozitifliği arasında istatistiki olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). Rotavirüs enfeksiyonlarının bu çalışmalarda da gösterildiği gibi sonbahardan ilkbahara kadar enfeksiyonlara sebep olduğu gösterilmiştir. Ancak yine bu çalışmalarda en sık bu üç mevsimde görülse de, rotavirus aslında tüm yıl boyunca hastalık etkeni olmaktadır.

Borsa ve ark. Mayıs 2010-Nisan 2011 tarihleri arasında 0-5 yaş arası 944 çocukta yaptıkları çalışmada immünokromatografik yöntemle %19.9 oranında pozitiflik bulmuşlar ve pozitifliğin en sık 12-24 ayda (%28.2) olduğunu saptamışlardır (147). Dağı ve ark. Ocak 2010-Aralık 2013 tarihleri arasında Konya’da yaptıkları çalışmada tüm yaş grubundan 2795 hastanın dışkı örneklerini immünokromatografi yöntemi ile araştırmış ve %9.8 oranında pozitiflik saptamışlardır. Yaşlara göre pozitiflik sıklığı; 0-2 yaş %59.3, 5-18 yaş %19.4, 2-5 yaş %15.4, ≥ 18 yaş %5.9 olarak görülmüştür. Pozitifliği 0-2 yaş grubunda diğer yaş gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulmuşlardır (148). Kırdar ve ark. Aydın’da Ocak 2013-Aralık 2013 tarihleri arasında akut gastroenterit tanılı 0-5 yaş arası 502 çocuğun dışkı örneğinin %15’inde immünokromatografik yöntemle

pozitiflik bulmuşlar ve pozitifliğin en sık 12-24 aylık bebeklerde olduğunu saptamışlardır (149). Güreser ve ark. Ocak 2013-Eylül 2014 yılları arasında Çorum’da yaptıkları çalışmada immunokromatografik yöntem ile %17.5 oranında pozitiflik saptamışlardır. Çalışmada 0-18 yaş arası çocuklar, 0-6 ay, 7-24 ay, 25 ay-4 yaş, 5-10 yaş ve 11-17 yaş olmak üzere beş yaş grubuna ayrılmıştır. Rotavirüsün en sık 7-24 ay (%22) ve 25 ay-4 yaş (%21.2) arasında, en az 5-10 yaş (%14.8) ve 11-17 yaş (%3.1) arasında görüldüğü saptanmıştır (150).

Çalışmamızda yaşlar yapılan bu çalışmalardan farklı olarak; 0-6 ay, 7-12 ay, 13-24 ay, 25-36 ay, 37-48 ay, 49-59 ay, 6-12 yaş, 13-18 yaş, 19-65 yaş, >65 yaş şeklinde gruplandırılmıştır. Rotavirüs pozitif hastaların yaşlara göre yüzdeleri sıklık sırasına göre şu şekilde görülmüştür: 6-12 yaş (%23.5), 13-24 ay (%17.3), 25-36 ay (%16), 0-6 ay (%11.1), 7-12 ay (%9.9), 19-65 yaş (%7.4), 37-48 ay (%3.7), 49-59 ay (%3.7), 13-18 yaş (%4.9), >65 yaş (%2.5). Dağı ve ark. çalışmalarında yaptıkları gruplara göre pozitiflik oranına bakıldığı zaman 0-2 yaş arasındaki pozitiflik çalışmamızda da yüksek saptanmış ancak >18 yaş hasta grubunda bu çalışmaya göre daha yüksek pozitiflik elde etmiş bulunmaktayız. Güreser ve ark. çalışmasına benzer şekilde, çalışmamızda 25-36 ay aralığının diğer yaş gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu görülmüştür. Bu yaş grubu kreş yaşı olması ve elle virüs bulaşının yaygın olması nedeniyle beklenen bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. Kırdar ve ark., Borsa ve ark. en sık buldukları 13-24 ayda çalışmamızda 2. sıklıkta (%17.3) pozitiflik saptanmıştır. Çalışmamızda, okul çağı olan 6-12 yaş aralığındaki rotavirüs pozitiflik yüzdesinin (%23.5) en yüksek olduğu ve rotavirüsün

çocukluk yaşta en sık olmakla birlikte ileri yaşlarda da enfeksiyonlara sebep olduğu görülmüştür.

Dünya’da farklı kıtalarda genotiplerin sıklığında değişiklik görülebilmekte, yeni görülmeye başlayan farklı genotipler yıllar içinde ortaya çıkabilmektedir. Türkiye’nin coğrafi konumu, komşu ülkelerdeki genotiplerin ülkemize yayılmasında ve görülen genotiplerin yıllara göre değişim göstermesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Dünya’da en sık görülen rotavirus genotipleri 1995’ten önce G1, G2, G3, ve G4 iken, 1995’ten sonra G9 genotipi dünya çapında ortaya çıkmıştır (151). Ülkemizde ise yeni yapılan çalışmalarda G1 ve G9 sıklığının değiştiği ancak en yaygın görülen beş genotip içinde her ikisinin de yer aldığı saptanmıştır (13, 14). Günümüzde dünya genelinde G tiplerinden; G1, G2, G3, G4, G9, G12 ve P tiplerinden; P[4], P[6], P[8] en sık görülen rotavirüs genotipleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Genotip kombinasyonlarından G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] ve G12P[8] dünyada görülen genotiplerin % 90’ını oluşturmaktadır (57). Ülkemizde de bu genotip kombinasyonları sık görülmekte ancak bazı yıllarda en sık görülen genotipler değişebilmektedir. Örneğin; ülkemizde 2009-2010 yılları arasında yapılan bir çalışmada G3P[8] en yüksek oranda saptanmış onu G2P[8], G4P[8], G1P[8], G9P[8], G4P[6] ve G1P[6]’nın takip ettiği görülmüştür (152). Çataloluk ve ark.’nın 2000-2002 yılları arasında üç farklı bölgeden toplanan örneklerle yaptıkları çalışmada en sık G4P[8] (%42.2) ve sırasıyla G1P[8] (%26.6), G2P[4] (%3.1) ve G3P[8] (%1.5) genotipleri gözlenmiştir. G9P[8] (%3.2) ve G2P[8], G1P[6], G2P[6] ve G4P[6] gibi

daha az görülen genotipler sırasıyla %7.8, %3.1, %1.5 ve %6.3 oranında bulunmuştur. Miks enfeksiyonlar % 7.3 oranında; G1+G2, G1+G4, G1+G9 ve G4+G9 kombinasyonları şeklinde görülmüştür (153). Durmaz ve ark.'nın 2012-2014 yılları arasında, 0-5 yaş yaş arası çocukları kapsayan, Türkiye genelinde 23 ilde, 35 farklı hastanede gerçekleştirdikleri sürveyans çalışmasında rotavirüs antijeni, çalışmaya katılan hastanelerin laboratuvarlarında kullanılan lateks aglütinasyon, immünokromatografik test veya ELISA gibi testlerle tespit edilmiştir. Antijen pozitif bulunan 2102 örneğin 1644'ünde (%78.2) PCR ile rotavirus pozitif bulunmuştur. En yaygın genotip kombinasyonu G9P[8] (%40,5) iken bunu sırasıyla G1P[8] (%21.6), G2P[8] (%9.3), G2P[4] (%6.5), G3P[8] (%3.5) ve G4P [8] (%3.4)'in takip ettiği görülmüştür (14). Eylül 2014-Ağustos 2016 tarihleri arasında 15 ilde 20 farklı hastanede gerçekleştirdikleri sürveyans çalışmalarında ise, akut gastroenterit nedeniyle yatan 0-5 yaş arası çocukları kapsayan, 1639 rotavirüs antijeni pozitif dışkı örneğinin 1396'sında (%85,3) PCR ile rotavirus pozitif olarak bulmuşlardır. En yaygın genotipler sırasıyla G1P[8] %24.6, G3P[8] %19.6, G9P[8] %12.2, G2P[4] %9.5, G2P[8] %6.5 ve G4P[8] %4.8 olarak bulunmuştur (13). Bulut ve ark. 2012-2015 yılları arasında Tokat'ta, 0-5 yaş çocuklarda yaptığı bir çalışmada, en yaygın genotip kombinasyonlarını sırasıyla G9P[8] (%28.9), G1P[8] (%26.5), G2P [4] (%9.6), G2P[8] (%7.2) ve G3P[8] (%7.2) olarak saptanmıştır (141).

Santos ve Hoshino'nun Amerika, Asya, Afrika, Avrupa ve Avustralya kıtalarında yer alan 52 ülkede 1989-2004 yılları arasındaki verileri değerlendirdikleri bir çalışmada dört G tipinin (G1, G2, G3 ve G4), P[8] veya P[4] ile birlikte dünya

genelindeki suşların % 88'ini oluşturduğu görülmüştür. Beşinci sırada görülen G tipinin, P[8] veya P[6] ile birlikte olan G9 olduğu gösterilmiştir. Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da rotavirüs enfeksiyonlarının %70'inden fazlasını, Güney Amerika ve Asya'daki enfeksiyonların %30'unu ve Afrika'da ise % 23'ünü G1P[8]'in oluşturduğu görülmüştür. Afrika'da G8'in, genel olarak yaygın olan G3 veya G4'ünki kadar yüksek sıklıkta görüldüğü, P[6]'nın tüm P tiplerinin yaklaşık üçte birini oluşturduğu ve G8P[6] ya da G8P[4] gibi olağandışı genotip kombinasyonlarının %27 oranında görüldüğü saptanmıştır. Güney Amerika'da, nadir görülen G5'in, ishalleri çocuklar arasındaki epidemiyolojik öneminin arttığı görülmüştür (154).

Çin'de, 2000 yılına kadar G1 en yaygın genotip olmasına rağmen, 2000'den sonra G3 baskın hale geçmiştir. Brezilya'da G1, aşılama öncesi dönemde en yaygın genotip iken, aşılama sonrası G2 baskın genotip olmuştur (14). Danimarka'da, 2009'dan 2013'e kadar olan rotavirüs sürveyans çalışması, G9/G1 yer değişimine işaret etmektedir ve G9, Danimarka'da rotavirüs genotipleri arasında 2011'den beri en sık tespit edilen genotip olmuştur. Danimarka'daki bu çalışmada G4 ve G3 genotiplerinin sıklığında da bir artış olduğu gösterilmiştir (155). Belçika'da, G genotiplerinin prevalansı 1999'dan 2009'a kadar önemli farklılıklar göstermiştir. Örneğin, G1'in 1999-2000, 2001-2002, 2005-2006 ve 2007-2008'de suşların yarısından fazlasında tanımlanan en baskın genotip olduğu bildirilmiştir. Genotip G9, 2000-2001, 2002-2003 ve 2004-2005 yıllarında hakim olmuştur. Rotavirüs aşılarının eklenmesinden sonra G2, enfeksiyonların yaklaşık % 30'undan sorumlu olarak ortaya çıkmıştır (14). Konstantopoulos ve ark. Yunanistan'da Temmuz 2008 ile Mart 2010

arasında yapılan çok merkezli bir çalışmada G4'ün (%59.6) en sık görülen genotip iken G1'in (% 17.4) onu takip ettiği gösterilmiştir (156).

Dünya çapında hızla ortaya çıkan rotavirüs genotiplerinden biri olan G12 en sık P[6] ve P[8] genotipleriyle kombinasyon yapmaktadır. Bununla birlikte, kedilerden türler arası geçiş sayesinde dünyanın bazı bölgelerinde G12P[9] kombinasyonu görülmüştür. Çok sık reassortman yapması nedeniyle G12 genotipi dikkate değer bir çeşitliliğe sahiptir (157).

Go'mara ve ark. tarafından 2005-2008 yılları arasında yapılan bir süveyans çalışmasında G12[8]'i; Danimarka'da 2006-2007 ve 2007-2008'de sırasıyla %4.11 ve %0.8, Fransa'da 2006-2007 ve 2007-2008'de sırasıyla %0.24, %1.1, Slovenya'da 2005-2006'de %2.22, İspanya'da 2007-2008'de %0.3, Birleşik Krallık'ta sırasıyla %2.41, %1.01, %0.1 oranında saptanmıştır (158). George ve ark. Hindistan'da 2009-2011 yılları arasında yaptıkları bir çalışmada G1P[8] (%49.7), G9P[8] (26.4%), G2P[4] (5.5%), G9P[4] (2.6%), G12P[6] (1.3%) ve G12P[8]'i (%0.8) en sık görülen genotip kombinasyonları olarak bulmuşlardır (159). Yine Hindistan'da Islamuddin ve ark. tarafından, Eylül 2013-Ağustos 2014 tarihleri arasında yapılan çalışmada, en sık G1P[8] (%27.7) olmak üzere, G12P[6] (%13.2), G9P[4] (%7.2), G1P[6] (%6.8) ve nadir görülen genotiplerden G1P[9] (%0.9), G10P[nt] (%0.2) saptanmıştır (18). Luchs ve ark. 2012-2014 yılları arasında Brezilya'nın farklı bölgelerinden ve tüm yaş gruplarından topladıkları örneklerle yaptıkları süveyans çalışmasında; G3P[8]'in, 2012'de (%37,6) ve 2013'te (%40,1) en yaygın genotip kombinasyonu olduğunu, 2014'te belirgin bir şekilde azaldığını (%3,5) saptamışlardır. G12P[8] 2012'de en

yüksek ikinci genotipken (% 22.7), 2013'te hızlı bir şekilde azalmış (% 2.7) ve 2014'te baskın genotip olarak yeniden ortaya çıkmıştır (%86.6) (160). Azaran ve ark.'nın İran'da 2015-2016 yılları arasında, 0-5 yaş arası çocuklarda yaptıkları çalışmada, en sık genotip kombinasyonlarının sırasıyla G9P[8] (%28.5), G2P[4] (%18.8), G1P[8] (%9.4), G12P[8] (%9.4), G4P[8] (%9.4), G2G9P[4](%6.3), G9P[4]P[8] (%3.1), G3P[8] (%3.1), G9P[4] (%3.1), G2P[8] (%3.1), ve G9P[nt] (%3.1) olduğu görülmüştür (161). Moure ve ark. Orta Afrika Cumhuriyeti'nde, 2014-2016 yılları arasında, 0-5 yaş arası çocuklarda yaptıkları çalışmada G1P[8]'in tüm yıllarda en sık genotip kombinasyonu olduğu (%37.2, %45.4, %29.4), G12P[6]'in 2. sıklıkla onu takip ettiğini (%25.5, %31.8, %26.4) bulmuşlardır (162).

Dünyada çok sayıda yayında G12 genotipi bildirilmesine rağmen Türkiye'de yapılan çalışmalar az sayıdadır. Aydın ve ark.'nın Ocak 2012-Kasım 2013 tarihleri arasında Erzurum'da, 0-5 yaş arası çocuklarda yaptıkları çalışmada, G1P[8]'in en sık (%42.2) görülen genotip iken, G9P[8] (%21.1) ve G12P[6] 'in (%11.0) onu takip ettiğini, G12P[8]'in %4.6 oranında olduğunu saptamışlardır (163). Durmaz ve ark.'nın 2012-2014 yılları arasında yaptığı sürveyans çalışmasında G12P[8] (%0.42) , G12P[6] (%0.12) , G12P[11] (%0.12), G12P[6][8] (%0.06) G12P[nt] (%0.06); 2014-2016 yıllarında yaptığı sürveyans çalışmasında, G12P[8] %0.64, G12P[6] %0.21, G12P[nt] (%0.14) oranında saptamışlardır (13, 14). Gündeşlioğlu ve ark. 2012-2016 yılları arasında 0-5 yaş çocuklarda yaptığı bir çalışmada, G1P[8] (%29.9) en yaygın genotip kombinasyonu olarak bulunmuş, bunu G9P[8] (%21) ve G3P[8] 'in (%10.2)

takip ettiği görölmüştür. Bu çalışmada G12P[8] genotipi %0.6 oranında tespit edilmiştir (164).

Sığırlarda yaygın şekilde görölen G10 genotipinin, insanlarda da gastrointestinal enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. İnsanlardan izole edilen G10'un moleküler incelenmesi sonucunda, hayvanlardaki rotavirüslerin insandakilere anlamlı benzerliği ortaya çıkmış ve bu zoonotik geçişi düşündürmüştür. İnsan dışkısında G10 genotiplerinin son zamanlarda Afrika ve Hindistan'da ortaya çıktığı saptanmıştır. Genellikle G10 ile ilişkili P tiplerinin P[8], P[4], P[11] ve P[6] olduğu görölmüştür (157).

Santos ve ark. 1989-2004 yılları arasında beş kıtada 52 ülkeden bildirilen 124 çalışmadan yaptıkları derlemede, Asya kıtasında 44 vakada G10P[11], bir vakada G10P[14]; Güney Amerika'da bir vakada G10P[9] saptandığı belirtilmiştir (154). Rajendran ve ark. Hindistan'da Ocak 2003-Mayıs 2006 tarihleri arasında, 0-5 yaş arasındaki çocuklarda yaptıkları çalışmalarında en sık G2P[4] (%24.6) ve sırasıyla G1P[8] (%18.3), G9P[8] (%13.2), G1P[4] (%2.5), G10P[11] (%0.6) genotip kombinasyonunu bulmuşlardır (165). Van Damme ve ark. 2004-2005 yılları arasında Belçika, Fransa, Almanya, İtalya, İspanya, İsveç ve Birleşik Krallık'ta 0-5 yaş arası çocuklarda yaptıkları çok merkezli bir çalışmada, G10'u sadece İspanya'da üç, G12'i İtalya'da altı ve İsveç'te yedi çocukta saptamışlardır (166). Durmaz ve ark. 2012-2014 ve 2014-2016 tarihleri arasında yaptıkları süveyans çalışmasında sırasıyla G10P[8] (%0.3), G10P[4][8] (%0.06), G10P[4] (%0.14), G1G10P[4] (%0.06) genotip kombinasyonlarını bulmuşlardır (13, 14).

Çalışmamızda Türkiye’de yapılan çoğu çalışmaya benzer şekilde en sık genotip kombinasyonu olarak G1P[8]’i (%17,2) saptadık. Durmaz ve ark. 2012-2014, Bulut ve ark. 2012-2015, Azaran ve ark. 2015-2016 yılları arasında en sık saptadıkları G9P[8] genotipini 4. sıklıkta (%6,16); Meral ve ark.’nın 2009-2010, Luchs ve ark.’nın 2012-2014 yılları arasında en sık bulduğu G3P[8]’i 2. sıklıkta tespit ettik. Rajendran ve ark.’nın en sık bulduğu G2P[4] genotip kombinasyonu çalışmamızda az sıklıkta görülmüş, Brezilya ve Belçika’da aşılamadan sonra artış gösteren G2 genotipi çalışmamızda 5. sıklıkta tespit edilmiştir. Konstantopoulos ve ark.’nın 2008-2010, Çataloluk ve ark.’nın 2000-2002 yılları arasında en sık saptadığı G4P[8] genotipi ise yine daha az sıklıkta görülmüştür.

Çalışmamızda G10G12P[8] %1.23, G10P[nt] %1.23 oranında literatürdeki çalışmalara benzer şekilde az sıklıkta görülmüştür. Genotip G12 ise, G12P[8] %11,11, G12P[nt] %4,93, G12P[6] %3.7 oranında tespit edilmiş, G1G9G12P[6][8] (%2.47), G1G9P[8] (%1.23) ve G1G12P[8] (%1.23) miks enfeksiyonlar şeklinde görülmüştür. G12 özellikle gelişmekte olan ülkelerde yapılan çalışmalarla benzer oranda yüksek saptanmıştır. Türkiye’de daha önce yapılan çalışmalara göre daha yüksek oranda G12 genotipi saptamış bulunmaktayız. Çalışmamıza geniş yaş aralığında hasta grubu alınmış ve genotip G12 en sık 6-12 yaş grubunda görülmüştür. Yüksek G12 oranına, daha büyük yaş grubunda saptanması bu genotipin ileriki yaşlarda daha sık saptandığını düşündürmüştür.

6. SONUÇ

1. Hastanemize tüm yaş gruplarından başvuran hastalardan toplanan 476 örnekte rotavirüs sıklığı immünokromatografik, ELISA ve PCR yöntemleriyle çalışılmış, sıklık cinsiyete, mevsimlere, yaş gruplarına göre incelenmiştir.
2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay pozitif örneklere genotiplendirme için nested RT-PCR ve agaroz jel elektroforezi yöntemleri çalışılmıştır. Enzyme Linked Immunosorbent Assay pozitif örnekler PCR ile de pozitif saptanmıştır.
3. Ülkemizde yapılan çalışmalardaki rotavirüs sıklığının çalışmamızla benzer (%17) olduğu görülmüştür.
4. Rotavirüs enfeksiyonu ile cinsiyet arasında diğer literatürlerdeki gibi ilişkinin olmadığı saptanmıştır.
5. Çalışmamızda rotavirüs pozitif olgular tüm mevsimlerde saptanmakla birlikte en sık ilkbaharda görülmüştür.
6. Rotavirüs pozitif olguların yaş gruplarına göre dağılımı şu şekilde görülmüştür: 6-12 yaş (% 23.5), 13-24 ay (%17.3), 25-36 ay (%16). İstatistiksel olarak anlamlı farkı oluşturan yaş grubu 25-36 ay olmuştur.
7. Çocukluk çağı ishal etkeni olan rotavirüsün, ileri yaşlarda da karşımıza çıkabileceği ve hatta dünyada yeni görülen tipler ile olabileceği öngörümüzü destekleyen veriler elde ettik.
8. Çalışmamızda en sık genotip kombinasyonu G1P[8] (%17,2) olarak bulunmuştur. Bunu G12P[8] (%11.11) ve G3P[8]'in (%11.11) takip ettiği saptanmıştır.

9. Çalışmamızda özellikle aradığımız G12 genotipi; G12P[8] (%11.11), G12P[nt] (%8.64), G12P[6] (%3.7) kombinasyonları şeklinde 2. sıklıkta görülmüştür. Bundan sonraki moleküler epidemiyolojik çalışmalarda G12 genotipinin unutulmaması gereken genotip olarak araştırılmasının önemli olduğu kanaatine varmış bulunmaktayız.
10. Çalışmamızda özellikle aradığımız diğer bir genotip olan G10 ise G10G12P[8] (%1.23), G10P[nt] (%1.23) kombinasyonları şeklinde %2.46 oranında saptanmıştır.
11. P genotipleri içinde dünyada ve ülkemizde de olduğu gibi en sık P[8] genotipi görülmüştür.
12. Ülkemizde kullanılan aşılar G9, G10, G12 genotiplerini içermemektedir. Daha yüksek koruyuculuk sağlaması için epidemiyolojik çalışmalar artırılarak ülkemize en uygun aşı profili oluşturulabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Lopez AL, Raguindin PF, Esparagoza J, Fox K, Batmunkh N, Bonifacio J, et al. Impact of rotavirus vaccine on diarrheal hospitalization and outpatient consultations in the Philippines: First evidence from a middle-income Asian country. *Vaccine*. 2018;36(23):3308-14.
2. Akpınar O., Akpınar H., E. ŞK. Investigation of Group A Rotavirus Antigen Frequency in Children Who Have Acute Gastroenteritis with Immunochromatographic Methods. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Entitüsü Dergisi*. 2017.
3. Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*. 2009;136(6):1939-51.
4. Karampatsas K, Osborne L, Seah ML, Tong CYW, Prendergast AJ. Clinical characteristics and complications of rotavirus gastroenteritis in children in east London: A retrospective case-control study. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194009.
5. Glass RI, Bresee J, Jiang B, Parashar U, Yee E, Gentsch J. Rotavirus and rotavirus vaccines. *Adv Exp Med Biol*. 2006;582:45-54.
6. Parashar UD, Nelson EA, Kang G. Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. *BMJ*. 2013;347:f7204.
7. Stelzmueller I, Wiesmayr S, Swenson BR, Biebl M, Goegele H, Margreiter R, et al. Rotavirus enteritis in solid organ transplant recipients: an underestimated problem? *Transpl Infect Dis*. 2007;9(4):281-5.

8. Groome MJ, Madhi SA. Five-year cohort study on the burden of hospitalisation for acute diarrhoeal disease in African HIV-infected and HIV-uninfected children: potential benefits of rotavirus vaccine. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 1:A173-8.
9. Troeger C, Khalil IA, Rao PC, Cao S, Blacker BF, Ahmed T, et al. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea Among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatr*. 2018;172(10):958-65.
10. Rotavirus vaccines. WHO position paper - January 2013. *Wkly Epidemiol Rec*. 2013;88(5):49-64.
11. Poelaert D, Pereira P, Gardner R, Standaert B, Benninghoff B. A review of recommendations for rotavirus vaccination in Europe: Arguments for change. *Vaccine*. 2018;36(17):2243-53.
12. Available from: <http://tsim.saglik.gov.tr/tsim>.
13. Durmaz R, Bakkaloglu Z, Unaldi O, Karagoz A, Korukluoglu G, Kalaycioglu AT, et al. Prevalence and diversity of rotavirus A genotypes circulating in Turkey during a 2-year sentinel surveillance period, 2014-2016. *J Med Virol*. 2018;90(2):229-38.
14. Durmaz R, Kalaycioglu AT, Acar S, Bakkaloglu Z, Karagoz A, Korukluoglu G, et al. Prevalence of rotavirus genotypes in children younger than 5 years of age before the introduction of a universal rotavirus vaccination program: report of rotavirus surveillance in Turkey. *PLoS One*. 2014;9(12):e113674.
15. Umair M, Abbasi BH, Sharif S, Alam MM, Rana MS, Mujtaba G, et al. High prevalence of G3 rotavirus in hospitalized children in Rawalpindi, Pakistan during 2014. *PLoS One*. 2018;13(4):e0195947.

16. Dhital S, Sherchand JB, Pokhrel BM, Parajuli K, Shah N, Mishra SK, et al. Molecular epidemiology of Rotavirus causing diarrhea among children less than five years of age visiting national level children hospitals, Nepal. *BMC Pediatr.* 2017;17(1):101.
17. Ahmed S, Klena J, Albana A, Alhamdani F, Oskoff J, Soliman M, et al. Characterization of human rotaviruses circulating in Iraq in 2008: atypical G8 and high prevalence of P[6] strains. *Infect Genet Evol.* 2013;16:212-7.
18. Islamuddin M, Khan WH, Gupta S, Tiku VR, Khan N, Akdag AI, et al. Surveillance and genetic characterization of rotavirus strains circulating in four states of North Indian children. *Infect Genet Evol.* 2018;62:253-61.
19. Pongsuwanna Y, Guntapong R, Chiwakul M, Tacharoenmuang R, Onvimala N, Wakuda M, et al. Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1390-4.
20. Esona MD, Page NA, Akran VA, Armah GE, Steele AD. Characterization of 2 human genotype G10 rotavirus strains, 3008CM and 1784/CI/1999, isolated in Cameroon and Cote d'Ivoire during the 1999-2000 rotavirus season. *J Infect Dis.* 2010;202 Suppl:S212-9.
21. Santos N, Lima RC, Pereira CF, Gouvea V. Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 1998;36(9):2727-9.
22. Coluchi N, Munford V, Manzur J, Vazquez C, Escobar M, Weber E, et al. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1709-14.

23. Iturriza Gomara M, Kang G, Mammen A, Jana AK, Abraham M, Desselberger U, et al. Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2541-7.
24. Armah GE, Hoshino Y, Santos N, Binka F, Damanka S, Adjei R, et al. The global spread of rotavirus G10 strains: Detection in Ghanaian children hospitalized with diarrhea. *J Infect Dis.* 2010;202 Suppl:S231-8.
25. World Health Organization. (2009). Manual of rotavirus detection and characterization methods. Geneva : World Health Organization 2009 [Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/70122>.
26. Guntapong R, Tacharoenmuang R, Singchai P, Upachai S, Sutthiwarakom K, Komoto S, et al. Predominant prevalence of human rotaviruses with the G1P[8] and G8P[8] genotypes with a short RNA profile in 2013 and 2014 in Sukhothai and Phetchaboon provinces, Thailand. *J Med Virol.* 2017;89(4):615-20.
27. Bass ES, Pappano DA, Humiston SG. Rotavirus. *Pediatr Rev.* 2007;28(5):183-91.
28. Beards G. Rotavirus. *WikiJournal of Medicine.* 2017.
29. Grafe A. A History of Experimental Virology 1991. 217 p.
30. Espejo RT, Calderon E, Gonzalez N. Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 1977;6(5):502-6.
31. Pitkänen O. Rotavirus Whole Genome Sequencing with Next-Generation Sequencing. 2017.
32. Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res.* 2014;190:75-96.
33. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(7):529-39.

34. Patrick R. Murray P, Ken S. Rosenthal, PhD and Michael A. Pfaller, MD. Medical Microbiology, Reovirus. 8th Edition ed2016. 504 p.
35. License CCA-SI. Template for Taxonomic Proposal to the ICTV Executive Committee To create a new SubFamily in an existing Family 2017 [Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>].
36. Desselberger U. Differences of Rotavirus Vaccine Effectiveness by Country: Likely Causes and Contributing Factors. Pathogens. 2017;6(4).
37. Komoto S, Kanai Y, Fukuda S, Kugita M, Kawagishi T, Ito N, et al. Reverse Genetics System Demonstrates that Rotavirus Nonstructural Protein NSP6 Is Not Essential for Viral Replication in Cell Culture. J Virol. 2017;91(21).
38. Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Prasad BV. Rotavirus proteins: structure and assembly. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;309:189-219.
39. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fields Virology: Wolters Kluwer Health; 2013.
40. Vasquez-del Carpio R, Morales JL, Barro M, Ricardo A, Spencer E. Bioinformatic prediction of polymerase elements in the rotavirus VP1 protein. Biol Res. 2006;39(4):649-59.
41. Gridley CL, Patton JT. Regulation of rotavirus polymerase activity by inner capsid proteins. Curr Opin Virol. 2014;9:31-8.
42. McDonald SM, Patton JT. Rotavirus VP2 core shell regions critical for viral polymerase activation. J Virol. 2011;85(7):3095-105.
43. Morelli M, Ogden KM, Patton JT. Silencing the alarms: Innate immune antagonism by rotavirus NSP1 and VP3. Virology. 2015;479-480:75-84.

44. Harrison SC, Dormitzer PR. Chapter 2.1 - Structure and Function of the Rotavirus Particle. In: Svensson L, Desselberger U, Greenberg HB, Estes MK, editors. *Viral Gastroenteritis*. Boston: Academic Press; 2016. p. 89-102.
45. Nair N, Feng N, Blum LK, Sanyal M, Ding S, Jiang B, et al. VP4- and VP7-specific antibodies mediate heterotypic immunity to rotavirus in humans. *Sci Transl Med*. 2017;9(395).
46. Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J Health Popul Nutr*. 2000;18(1):5-14.
47. Graff JW, Mitzel DN, Weisend CM, Flenniken ML, Hardy ME. Interferon Regulatory Factor 3 Is a Cellular Partner of Rotavirus NSP1. 2002;76(18):9545-50.
48. Criglar JM, Hu L, Crawford SE, Hyser JM, Broughman JR, Prasad BV, et al. A novel form of rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly. *J Virol*. 2014;88(2):786-98.
49. Viskovska M, Anish R, Hu L, Chow DC, Hurwitz AM, Brown NG, et al. Probing the sites of interactions of rotaviral proteins involved in replication. *J Virol*. 2014;88(21):12866-81.
50. Suguna K, Chilakalapudi DR. Rotavirus nonstructural proteins: a structural perspective 2010. 352-9 p.
51. Gratia M, Sarot E, Vende P, Charpilienne A, Baron CH, Duarte M, et al. Rotavirus NSP3 Is a Translational Surrogate of the Poly(A) Binding Protein-Poly(A) Complex. *J Virol*. 2015;89(17):8773-82.

52. Kumar S, Ramappa R, Pamidimukkala K, Rao CD, Suguna K. New tetrameric forms of the rotavirus NSP4 with antiparallel helices. *Arch Virol*. 2018;163(6):1531-47.
53. Pham T, Perry JL, Dosey TL, Delcour AH, Hyser JM. The Rotavirus NSP4 Viroporin Domain is a Calcium-conducting Ion Channel. *Sci Rep*. 2017;7:43487.
54. Ben Hadj Fredj M, Ben Hamida-Rebai M, Zeller M, Heylen E, Van Ranst M, Matthijnssens J, et al. Sequence and structural analyses of NSP4 proteins from human group A rotavirus strains detected in Tunisia. *Pathol Biol (Paris)*. 2014;62(3):146-51.
55. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 2011;156(8):1397-413.
56. Chen S-C, Tan L-B, Huang L-M, Chen K-T. Rotavirus infection and the current status of rotavirus vaccines. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2012;111(4):183-93.
57. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17083.
58. Mihalov-Kovacs E, Gellert A, Marton S, Farkas SL, Feher E, Oldal M, et al. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(4):660-3.
59. Banyai K, Kemenesi G, Budinski I, Foldes F, Zana B, Marton S, et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect Genet Evol*. 2017;48:19-26.

60. Hull JJ, Marthaler D, Rossow S, Ng TF, Montmayeur AM, Magana L, et al. Genomic Sequence of the First Porcine Rotavirus Group H Strain in the United States. *Genome Announc.* 2016;4(2).
61. Joshi MS, Jare VM, Gopalkrishna V. Group C rotavirus infection in patients with acute gastroenteritis in outbreaks in western India between 2006 and 2014. *Epidemiol Infect.* 2017;145(2):310-5.
62. 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(13):6596-601.
63. Arnold MM, Patton JT. Rotavirus antagonism of the innate immune response. *Viruses.* 2009;1(3):1035-56.
64. Almeida TNV, de Sousa TT, da Silva RA, Fiaccadori FS, Souza M, Badr KR, et al. Phylogenetic analysis of G1P[8] and G12P[8] rotavirus A samples obtained in the pre- and post-vaccine periods, and molecular modeling of VP4 and VP7 proteins. *Acta Trop.* 2017;173:153-9.
65. Ayala-Breton C, Arias M, Espinosa R, Romero P, Arias CF, Lopez S. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J Virol.* 2009;83(17):8819-31.
66. Trejo-Cerro O, Eichwald C, Schraner EM, Silva-Ayala D, Lopez S, Arias CF. Actin-dependent non-lytic rotavirus exit and infectious virus morphogenetic pathway in non-polarized cells. *J Virol.* 2017.

67. Hagbom M, Svensson L. Chapter 2.6 - Rotavirus Disease Mechanisms. In: Svensson L, Desselberger U, Greenberg HB, Estes MK, editors. *Viral Gastroenteritis*. Boston: Academic Press; 2016. p. 189-218.
68. Sastri NP, Crawford SE, Estes MK. Chapter 2.4 - Pleiotropic Properties of Rotavirus Nonstructural Protein 4 (NSP4) and Their Effects on Viral Replication and Pathogenesis. In: Svensson L, Desselberger U, Greenberg HB, Estes MK, editors. *Viral Gastroenteritis*. Boston: Academic Press; 2016. p. 145-74.
69. Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol*. 2004;78(19):10213-20.
70. Banyai K, Estes MK, Martella V, Parashar UD. Viral gastroenteritis. *Lancet*. 2018;392(10142):175-86.
71. Bodur S. AH, Öngen B. Enfeksiyon Patogenezi ve Bağışıklık 2015. 1127 p.
72. Yamashiro Y, Shimizu T, Oguchi S, Sato M. Prostaglandins in the plasma and stool of children with rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1989;9(3):322-7.
73. Dennehy PH. Rotavirus Infection: A Disease of the Past? *Infect Dis Clin North Am*. 2015;29(4):617-35.
74. Desselberger U, Huppertz HI. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *J Infect Dis*. 2011;203(2):188-95.
75. Velazquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, et al. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis*. 2000;182(6):1602-9.

76. Hakim MS, Ding S, Chen S, Yin Y, Su J, van der Woude CJ, et al. TNF-alpha exerts potent anti-rotavirus effects via the activation of classical NF-kappaB pathway. *Virus Res.* 2018;253:28-37.
77. Hagbom M, & Svensson, L. Rotavirus Disease Mechanisms 2016. 189–218 p.
78. Bhowmick R, Halder UC, Chattopadhyay S, Nayak MK, Chawla-Sarkar M. Rotavirus-encoded nonstructural protein 1 modulates cellular apoptotic machinery by targeting tumor suppressor protein p53. *J Virol.* 2013;87(12):6840-50.
79. Sen A, Sharma A, Greenberg HB. Rotavirus degrades multiple type interferon receptors to inhibit IFN signaling and protects against mortality from endotoxin in suckling mice. *J Virol.* 2017.
80. Ding S, Zhu S, Ren L, Feng N, Song Y, Ge X, et al. Rotavirus VP3 targets MAVS for degradation to inhibit type III interferon expression in intestinal epithelial cells. *Elife.* 2018;7.
81. Hagbom M. Rotavirus Disease Mechanisms Diarrhea, Vomiting and Inflammation-How and Why? 2015.
82. Anderson EJ, Weber SG. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(2):91-9.
83. WHO. The Immunological Basis for Immunization Series Module 21:Rotavirus 2011.
84. Yen C, Cortese MM. 216 - Rotaviruses. In: Long SS, Prober CG, Fischer M, editors. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition)*: Elsevier; 2018. p. 1122-5.e3.

85. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2010.
86. Jalilvand S, Marashi SM, Tafakhori A, Shoja Z. Extraintestinal Involvement of Rotavirus Infection in Children. Arch Iran Med. 2015;18(9):604-5.
87. Warfield KL, Blutt SE, Crawford SE, Kang G, Conner ME. Rotavirus infection enhances lipopolysaccharide-induced intussusception in a mouse model. J Virol. 2006;80(24):12377-86.
88. Robinson CG, Hernanz-Schulman M, Zhu Y, Griffin MR, Gruber W, Edwards KM. Evaluation of anatomic changes in young children with natural rotavirus infection: is intussusception biologically plausible? J Infect Dis. 2004;189(8):1382-7.
89. Hemming M, Huhti L, Rasanen S, Salminen M, Vesikari T. Rotavirus antigenemia in children is associated with more severe clinical manifestations of acute gastroenteritis. Pediatr Infect Dis J. 2014;33(4):366-71.
90. Sengupta P. Rotavirus: the challenges ahead. Indian J Community Med. 2009;34(4):279-82.
91. Us D, Ergünay K. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 2012. 229 p.
92. Koroglu M, Yakupogullari Y, Otlu B, Ozturk S, Ozden M, Ozer A, et al. A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. New Microbiol. 2011;34(1):17-24.
93. Burnett E, Tate JE, Kirkwood CD, Nelson EAS, Santosham M, Steele AD, et al. Estimated impact of rotavirus vaccine on hospitalizations and deaths from rotavirus diarrhea among children <5 in Asia. Expert Rev Vaccines. 2018;17(5):453-60.

94. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 2010.
95. Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. Clinical virology. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2009. xvi, 1375 p., 24 p. of plates p.
96. Esona MD, Gautam R. Rotavirus. Clin Lab Med. 2015;35(2):363-91.
97. Ye S, Lambert SB, Grimwood K, Roczo-Farkas S, Nimmo GR, Sloots TP, et al. Comparison of test specificities of commercial antigen-based assays and in-house PCR methods for detection of rotavirus in stool specimens. J Clin Microbiol. 2015;53(1):295-7.
98. Gautam R, Lyde F, Esona MD, Quaye O, Bowen MD. Comparison of Premier Rotaclone(R), ProSpecT, and RIDASCREEN(R) rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens. J Clin Virol. 2013;58(1):292-4.
99. Lennart Svensson UD, Mary K Estes, Harry B Greenberg. Viral Gastroenteritis. Molecular Epidemiology and Pathogenesis. 1 ed: Academic Press; 2016. 285 p.
100. Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A. Chapter 12 - Overview of Molecular Diagnostics Principles. In: Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A, editors. Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology: Elsevier; 2017. p. 233-57.
101. Sevindik E, Murathan Z. Nested PCR ve Kullanım Alanları Nested PCR and Applications Area2013. 22-6 p.
102. Koontz L. Agarose gel electrophoresis. Methods Enzymol. 2013;529:35-45.

103. Telmesani AM. Oral rehydration salts, zinc supplement and rota virus vaccine in the management of childhood acute diarrhea. *J Family Community Med.* 2010;17(2):79-82.
104. WHO. The treatment of diarrhoea: a manual for physicians and other senior health workers. 2005.
105. Lazzerini M, Ronfani L. Oral zinc for treating diarrhoea in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012(6):Cd005436.
106. Gonzalez-Ochoa G, Flores-Mendoza LK, Icedo-Garcia R, Gomez-Flores R, Tamez-Guerra P. Modulation of rotavirus severe gastroenteritis by the combination of probiotics and prebiotics. *Arch Microbiol.* 2017;199(7):953-61.
107. Eberlin M, Chen M, Mueck T, Dabritz J. Racecadotril in the treatment of acute diarrhea in children: a systematic, comprehensive review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Pediatr.* 2018;18(1):124.
108. Das RR, Sankar J, Naik SS. Efficacy and safety of diosmectite in acute childhood diarrhoea: a meta-analysis. *Arch Dis Child.* 2015;100(7):704-12.
109. Kocabaş E, Timurtaş Dayar G. Rotavirus Vaccines. *Journal of Pediatric Infection.* 2015;9(4):166.
110. Ceyhan M. Rotavirüs Aşıları. *ANKEM.* 2006;20(Ek 2):52-5.
111. Kurugöl Z. Rotavirus aşıları *Türk Pediatri Arşivi.* 2007;42:36-42.
112. Zhen SS, Li Y, Wang SM, Zhang XJ, Hao ZY, Chen Y, et al. Effectiveness of the live attenuated rotavirus vaccine produced by a domestic manufacturer in China studied using a population-based case-control design. *Emerg Microbes Infect.* 2015;4(10):e64.

113. Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(1):198-208.
114. Anh DD, Van Trang N, Thiem VD, Anh NTH, Mao ND, Wang Y, et al. A dose-escalation safety and immunogenicity study of a new live attenuated human rotavirus vaccine (Rotavin-M1) in Vietnamese children. *Vaccine.* 2012;30:A114-A21.
115. Dang DA, Nguyen VT, Vu DT, Nguyen TH, Nguyen DM, Yuhuan W, et al. A dose-escalation safety and immunogenicity study of a new live attenuated human rotavirus vaccine (Rotavin-M1) in Vietnamese children. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 1:A114-21.
116. Ward RL, Bernstein DI. Rotarix: a rotavirus vaccine for the world. *Clin Infect Dis.* 2009;48(2):222-8.
117. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med.* 2006;354(1):23-33.
118. Kimberlin DW, Brady MT, Long SS, Jackson MA. *Red Book 2018: Report of the Committee on Infectious Diseases: American Academy of Pediatrics*; 2018.
119. Deen J, Lopez AL, Kanungo S, Wang XY, Anh DD, Tapia M, et al. Improving rotavirus vaccine coverage: Can newer-generation and locally produced vaccines help? *Hum Vaccin Immunother.* 2018;14(2):495-9.
120. Isanaka S, Guindo O, Langendorf C, Matar Seck A, Plikaytis BD, Sayinzoga-Makombe N, et al. Efficacy of a Low-Cost, Heat-Stable Oral Rotavirus Vaccine in Niger. *N Engl J Med.* 2017;376(12):1121-30.

121. de Hoog MLA, Vesikari T, Giaquinto C, Huppertz H-I, Martinon-Torres F, Bruijning-Verhagen P. Report of the 5th European expert meeting on rotavirus vaccination (EEROVAC). *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2018;14(4):1027-34.
122. Ozsari T, Bora G, Kaya B, Yakut K. The Prevalence of Rotavirus and Adenovirus in the Childhood Gastroenteritis. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;9(6):e34867.
123. Dereci S, Copur Cicek A, Savas Acar S, Bakkaloglu Z, Ozkasap S, Kanber K, et al. Prevalence and genotype distribution of rotaviruses in children with gastroenteritis in Rize province. *Bosn J Basic Med Sci*. 2015;15(3):35-9.
124. Coban B, Topal B. Evaluation of rotavirus gastroenteritis in children: five years' surveillance in Alanya, Antalya. *Turk J Pediatr*. 2014;56(3):280-4.
125. Bozdayi G, Altay A, Yahiro T, Ahmed S, Meral M, Dogan B, et al. Re-emergence of genotype G9 during a five-and-a-half-year period in Turkish children with rotavirus diarrhea. *Arch Virol*. 2016;161(10):2879-84.
126. Akan H, Izbirak G, Gurol Y, Sarikaya S, Gunduz TS, Yilmaz G, et al. Rotavirus and adenovirus frequency among patients with acute gastroenteritis and their relationship to clinical parameters: a retrospective study in Turkey. *Asia Pac Fam Med*. 2009;8(1):8.
127. Celik C, Gozel MG, Turkay H, Bakici MZ, Guven AS, Elaldi N. Rotavirus and adenovirus gastroenteritis: time series analysis. *Pediatr Int*. 2015;57(4):590-6.
128. Coban B, Topal B. Evaluation of rotavirus gastroenteritis in children: five years' surveillance in Alanya, Antalya. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2014;56(3):280-4.

129. İnci A, Urhan B. The Frequency of Rotavirus in Children with Acute Gastroenteritis. *Journal of Clinical and Analytical Medicine* 2015;6(4):449-51.
130. Aslantas M, Kilicaslan O, Engin MMN, Buyuk N, Yalcin G, Ankaralı H. Prevalence of Rotavirus and Adenovirus in children with acute gastroenteritis: a tertiary care hospital data. *Family Practice & Palliative Care*. 2017;2(3):1-5.
131. Dhiman S, Devi B, Singh K, Devi P. Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatography for Rotavirus Detection in Children Below Five Years with Acute Gastroenteritis. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(9):DC06-9.
132. Okebugwu QC, Adebolu TT, Ojo BA. Incidence of rotavirus infection in children with gastroenteritis in akure, ondo state, nigeria. *Futa Journal of Research in Sciences*. 2017;13(1):122-8.
133. Kasifoglu N, US T, Aslan FG, Akgun Y. 2005-2011 Yılları Arasında Saptanan Rotavirus Antijen Pozitiflikleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2011;41(3):111-5.
134. Samanci S, Kosker M, Celik M, Arac E. Akut Gastroenteritli Çocuk Hastalarda Rotavirüs Enfeksiyonu Sıklığı. *Van Tıp Derg*. 2018;25(4).
135. Alp Avcı G, Akbaba M. Beş Yaşın Altındaki Akut Gastroenteritli Çocuklarda Rotavirüs, Enterik Adenovirüs ve Norovirüs İnsidansı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2018;48(4):264-72.
136. Afrad MH, Hassan Z, Farjana S, Moni S, Barua S, Das SK, et al. Changing profile of rotavirus genotypes in Bangladesh, 2006-2012. *BMC Infect Dis*. 2013;13:320.

137. Tian Y, Chughtai AA, Gao Z, Yan H, Chen Y, Liu B, et al. Prevalence and genotypes of group A rotavirus among outpatient children under five years old with diarrhea in Beijing, China, 2011-2016. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):497.
138. Artiran S, Atalay A, Gokahmetoglu S, Ozturk MA, Balci N, Cakir N, et al. Investigation of Rotavirus with Various Methods in Children with Acute Gastroenteritis and Determination of Its Molecular Epidemiology in Kayseri Province, Turkey. *J Clin Lab Anal.* 2017;31(2).
139. Umair M, Abbasi BH, Nisar N, Alam MM, Sharif S, Shaukat S, et al. Molecular analysis of group A rotaviruses detected in hospitalized children from Rawalpindi, Pakistan during 2014. *Infect Genet Evol.* 2017;53:160-6.
140. Turner A, Ngwira B, Witte D, Mwapasa M, Dove W, Cunliffe N. Surveillance of rotavirus gastro-enteritis in children in Blantyre, Malawi. *Paediatr Int Child Health.* 2013;33(1):42-5.
141. Bulut Y, Yenisehirli G, Durmaz R. Molecular Epidemiology of Rotavirus Strains in Under Five Children. *Indian J Pediatr.* 2018;85(5):364-8.
142. Bonkougou IJ, Sanou I, Bon F, Benon B, Coulibaly SO, Haukka K, et al. Epidemiology of rotavirus infection among young children with acute diarrhoea in Burkina Faso. *BMC Pediatr.* 2010;10:94.
143. Dogan Y, Eksi F, Karsligil T, Bayram A. Akut Gastroenteritli Hastalarda Rotavirüs ve Adenovirüs Varlığının Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2014;44(1):18-22.

144. Konca C, Tekin M, Akgun S, Bulbul M, Coban M, Kahramaner Z. Prevalence of Rotavirus in Children with Acute Gastroenteritis, Seasonal Distribution, and Laboratory Findings in the Southeast of Turkey 2014. 7-11 p.
145. Sugeçti S, Çelen U, Azaklı Taşkın P, Yenice S, Koçer F. Akut Gastroenteritli Çocuklarda İmmünokromatografik Olarak Enterik Adenovirus ve Rotavirus Antijen Varlığının Mevsimsel Prevelansı. *Cocuk Enfeksiyon Dergisi*. 2015 9(4):p161-5.
146. Shoeib AR, Hull JJ, Jiang B. Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Cairo, Egypt, 2011-2012. *J Egypt Public Health Assoc*. 2015;90(3):121-4.
147. Borsa BA, Bahar Tokman H, Çağatay P. Mardin kadın doğum ve çocuk hastalıkları hastanesi'nde 0-5 yaş arası akut gastroenteritli çocuklarda rotavirüs ve adenovirüs sikliğinin belirlenmesi. *Ankem Derg* 2013;27(2):75-9.
148. Dağı Turk H, Fındık D. Akut gastroenteritli hastalarda rotavirüs ve adenovirüs antijenlerinin araştırılması. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 2014;5(2):256-60.
149. Kırdar S, Kahyaoglu F, Yazıcı V, Aydın N. Investigation of The Agents of Viral Gastroenteritis by PCR İn Stool Specimens with Rota/Adenovirus Positive by Antigen Test. *Journal of BSHR*. 2017;1(3):88-93.
150. Güreser A, Karasartova D, Tasci L, İlkay Boyacıoglu Z, Taylan Ozkan A. Rotavirus and Adenovirus Frequency in Children with Acute Gastroenteritis 2017. 58-66 p.
151. Matthijns J, Heylen E, Zeller M, Rahman M, Lemey P, Van Ranst M. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol*. 2010;27(10):2431-6.

152. Meral M, Bozdayi G, Ozkan S, Dalgic B, Alp G, Ahmed K. [Rotavirus prevalence in children with acute gastroenteritis and the distribution of serotypes and electropherotypes]. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45(1):104-12.
153. Cataloluk O, Iturriza M, Gray J. Molecular characterization of rotaviruses circulating in the population in Turkey. *Epidemiol Infect.* 2005;133(4):673-8.
154. 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(1):29-56.
155. Midgley S, Bottiger B, Jensen TG, Friis-Moller A, Person LK, Nielsen L, et al. Human group A rotavirus infections in children in Denmark: detection of reassortant G9 strains and zoonotic P[14] strains. *Infect Genet Evol.* 2014;27:114-20.
156. Konstantopoulos A, Tragiannidis A, Fouzas S, Kavaliotis I, Tsiatsou O, Michailidou E, et al. Burden of rotavirus gastroenteritis in children <5 years of age in Greece: hospital-based prospective surveillance (2008-2010). *BMJ Open.* 2013;3(12):e003570.
157. Jain S, Vashist J, Changotra H. Rotaviruses: is their surveillance needed? *Vaccine.* 2014;32(27):3367-78.
158. Iturriza-Gomara M, Dallman T, Banyai K, Bottiger B, Buesa J, Diedrich S, et al. Rotavirus surveillance in europe, 2005-2008: web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data. *J Infect Dis.* 2009;200 Suppl 1:S215-21.

159. George S, Radhakuttyamma G, Paulose A, Mathew MA. Prevalence and Genotype Distribution of Rotaviruses in Children Hospitalized with Acute Gastroenteritis. 2015;3(9):41-3.
160. Luchs A, Cilli A, Morillo SG, Gregorio Dde S, de Souza KA, Vieira HR, et al. Detection of the emerging rotavirus G12P[8] genotype at high frequency in brazil in 2014: Successive replacement of predominant strains after vaccine introduction. *Acta Trop*. 2016;156:87-94.
161. Azaran A, Makvandi M, Teimoori A, Ebrahimi S, Heydari F, Nikfar R. Distribution of Rotavirus Genotypes Circulating in Ahvaz, Iran in 2016. *Iranian Biomedical Journal* 2018;22(2):107-16.
162. Moure UAE, Banga-Mingo V, Gody JC, Mwenda JM, Fandema J, Waku-Kouomou D, et al. Emergence of G12 and G9 rotavirus genotypes in the Central African Republic, January 2014 to February 2016. *BMC Res Notes*. 2018;11(1):5.
163. Aydin H, Aktas O. Rotavirus genotypes in children with gastroenteritis in Erzurum: first detection of G12P[6] and G12P[8] genotypes in Turkey. *Prz Gastroenterol*. 2017;12(2):122-7.
164. Gundeslioglu OO, Kocabas E, Haytoglu Z, Timurtas Dayar G, Kilic Cil M, Durmaz R. [Rotavirus prevalence and genotype distribution in children with acute gastroenteritis in Adana province]. *Mikrobiyol Bul*. 2018;52(2):156-65.
165. Rajendran P, Kang G. Molecular epidemiology of rotavirus in children and animals and characterization of an unusual G10P[15] strain associated with bovine diarrhea in south India. *Vaccine*. 2014;32 Suppl 1:A89-94.

166. Van Damme P, Giaquinto C, Maxwell M, Todd P, Van der Wielen M, Group RS. Distribution of rotavirus genotypes in Europe, 2004-2005: the REVEAL Study. J Infect Dis. 2007;195 Suppl 1:S17-25.

8. ÖZET

Ülkemizde akut gastroenteritli hastalarda yeni görülmeye başlayan A grubu rotavirüs G10, G12 genotiplerinin araştırılması

Rotavirüsler dünyada 0-5 yaş arasındaki çocuklarda en sık karşılaşılan, mortalite ve morbidite oranı en yüksek olan viral gastroenterit etkenidir. Bu tezin amacı; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ishal etiyolojisi araştırılması için dışkı örnekleri gönderilen hastalarda, rotavirüs enfeksiyonu sıklığını belirlemek, bölgemizde yaygın görülen rotavirus genotiplerini ve son zamanlarda dünya genelinde görülmeye başlayan G10, G12 genotiplerini araştırmaktır.

Çalışmamızda Kasım 2016 ve Şubat 2018 tarihleri arasında başvuran, 0-92 yaş arasındaki 476 hastanın dışkı örnekleri immünokromatografik hızlı test ve ELISA ile çalışılmıştır. ELISA pozitif örneklerle nested RT-PCR çalışılarak agaroz jel elektroforezi yardımıyla genotiplendirme yapılmıştır.

Dışkı örneklerinin % 18.3'ünde ve % 17 'sinde sırasıyla immünokromatografik test ve ELISA ile rotavirüs pozitif bulunmuştur. Tüm ELISA pozitif örnekler RT-PCR ile de pozitif olarak tespit edilmiştir. Kadın hastaların %18.5'i, erkek hastaların %15.7'si pozitif olarak saptanmış ve cinsiyetler arasında rotavirüs pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Farklı yaş gruplarında rotavirüs sıklığı 6-12 yıl (% 23.5), 13-24 ay (% 17.3), 25-36 ay (% 16) şeklinde görülmüştür. Olguların mevsimsel dağılımı, vakaların ilkbaharda en yaygın olduğunu göstermiştir.

Örneklerin sırasıyla %37, %7.4, %16.1, %6.2, %9.9, %2.5, %26'sında G1, G2, G3, G4, G9, G10 ve G12 saptanmıştır. G12, G1'den sonra en sık görülen genotip olarak tespit edilmiştir. En yaygın G ve P genotip kombinasyonu G1P[8] olarak bulunmuştur (%17,2). Bunu G12P[8] (%11,11) ve G3P[8]'in (%11.11) takip ettiği saptanmıştır. P genotipleri arasında P[8] (%53) dominant genotip olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda çocukluk çağı ishal etkeni olan rotavirüsün, ileri yaşlarda da karşımıza çıkabileceği ve hatta dünyada yeni görülen tipler ile olabileceği, bundan sonraki moleküler epidemiyolojik çalışmalarda unutulmaması gereken rotavirus genotipi olarak araştırılmasının önemli olduğu kanaatine varmış bulunmaktayız.

Anahtar sözcükler: *G10, G12*, rotavirüs enfeksiyonu, nested PCR, RT-PCR

9. SUMMARY

Investigation of group A rotavirus G10, G12 genotypes in our country, in patients with acute gastroenteritis

Rotaviruses are the most common cause of viral gastroenteritis with the highest mortality and morbidity rates in children aged 0-5 years. The aim of this thesis is; to determine the frequency of rotavirus infection in the patients who were sent fecal samples for the study of the etiology of diarrhea in Gazi University Faculty of Medicine, to investigate the rotavirus genotypes which are common in our region and the G10, G12 genotypes which are being seen recently in the world.

In our study, fecal samples of 476 patients aged between 0-92 years who applied between November 2016 and February 2018 were studied with immunochromatographic rapid test and ELISA. ELISA positive samples were studied by nested RT-PCR and genotyping was performed by agarose gel electrophoresis.

18.3% of the stool samples and 17% of them had rotavirus positive by immunochromatographic test and ELISA, respectively. All ELISA positive samples were also detected as positive by RT-PCR. 18.5% of female patients and 15.7% of male patients were found to be positive and rotavirus positivity was not statistically significant between genders. The frequency of rotavirus in different age groups was 6-12 years (23.5%), 13-24 months (17.3%), 25-36 months (16%). Seasonal distribution of cases showed that cases were most common in spring.

G1, G2, G3, G4, G9, G10, and G12 were detected in 37%, 7.4%, 16.1%, 6.2%, 9.9%, 2.5%, 26% of the samples, respectively. G12 was the most common genotype after G1. The most common G and P genotype combination was G1P[8] (17.2%). This was followed by G12P [8](11.11%) and G3P[8] (11.11%). P[8] (53%) were found to be the dominant P genotype.

In our study, we concluded that rotavirus, which is the causative agent of childhood diarrhea, can be seen in advanced ages and may be with new types in the world, and it is important to investigate as rotavirus genotype which should not be forgotten in molecular epidemiological studies.

Key words: G10, G12, rotavirus infection, nested PCR, RT-PCR

10. EKLER

Evrak Tarih ve Sayısı: 06/02/2017-E.19037



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Etik Komisyonu



Sayı : 77082166-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Gülendam BOZDAYI
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Üniversitemiz Etik Komisyonu'na verilen "*Ülkemizde Akut Gastroenteritli Hastalarda Yeni Görülmeye Başlayan A Grubu Rotavirüs G10, G12 Genotiplerinin Araştırılması*" başlıklı araştırma öneriniz Komisyonumuzun 19.01.2017 tarih ve 01sayılı toplantısında görüşülmüş olup,

Çalışmanızın Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapılması ile yapılması planlanan Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan izin alınması koşuluyla, çalışmanızda etik açıdan bir sakınca bulunmadığına oybirliği ile karar verilmiş ve karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Alper CEYLAN
Komisyon Başkanı

Araştırma Kod No: 2017-51

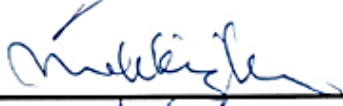
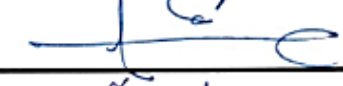
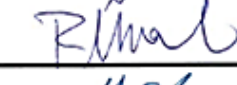
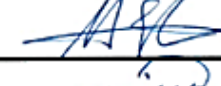
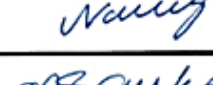
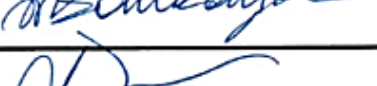
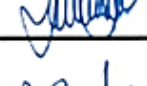
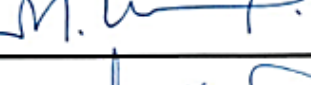
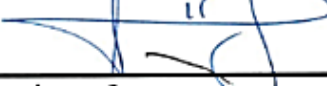
Ek:1 Liste

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 Faks:0 (312) 202 20 63
İnternet Adresi :<http://etikkomisyon.gazi.edu.tr/>

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
ETİK KOMİSYONU KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 19.01.2017		TOPLANTI SAYISI : 01	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Alper CEYLAN BAŞKAN			
Prof.Dr.Mustafa N.İLHAN BAŞKAN YRD.			
Prof.Dr.Mehmet KÜÇÜKKURT			
Prof.Dr.Fatma GÜMÜŞ			
Prof.Dr.Rahmi ÜNAL			
Prof.Dr.Mehmet Sayım KARACAN			
Prof.Dr.Naciye YILDIZ			
Prof.Dr.Mustafa SARIKAYA			
Prof.Dr.İbrahim DOĞAN			
Prof.Dr.C. Haluk BODUR			
Prof.Dr.Mustafa İLBAŞ			
Prof.Dr.Füsün DEMİREL			
Doç.Dr.Tuncay ÖNDER			

11. ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad: Hande KAHRAMAN DURAK

Doğum yeri ve tarihi: ÇORUM 02.02.1990

Eğitimi:

2016-2019 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD

2015-2016 Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD

2008-2014 Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi

2004-2007 Çorum Fen Lisesi

1997-2004 Çorum Albayrak İlköğretim Okulu

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği