

Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Pediatrik Hastalarda İnsan Metapnömovirus Prevalansının Saptanması*

Detection of Human Metapneumovirus Prevalence in Pediatric Patients with Lower Respiratory Tract Infections

Ayşegül AKSOY GÖKMEN¹, Candan ÇİÇEK², Eylem Ulaş SAZ³, Yeliz ÖZANANAR³, Muhterem DUYU³

¹ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

¹ Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Manisa, Turkey.

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey.

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

³ Ege University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, İzmir, Turkey.

* Bu çalışma, Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Fonu (No: 08TIP016) tarafından desteklenmiş ve "European Society for Clinical Virology (ESCV) Winter Meeting (January 13-15, 2011, London)"de poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 14.05.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 11.07.2012

ÖZET

Paramyxoviridae ailesinde yer alan insan metapnömovirusu (human metapneumovirus; hMPV), özellikle çocuklarda alt solunum yolu enfeksiyonu (ASYE) etkeni olarak 2001 yılında tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, ASYE olan olgularda hMPV prevalansının %2-25 arasında değiştiği, hMPV'nin çocukluk çağı ASYE'lerinin %10'undan sorumlu olduğu ve solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle hastaneye yatırılan üç yaşın altındaki çocukların %6'sında etken olarak saptandığı bildirilmektedir. Bu çalışmada, bölgemizde ASYE olan çocuklarda hMPV prevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ocak 2009-Aralık 2009 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran ve klinik olarak ASYE tanısı konulan 0-10 yaş arası (medyan yaş: 4.8), 59'u erkek olmak üzere 100 hastadan, semptomların ilk üç gününde alınan nazofarengeal sürüntü örnekleri dahil edilmiştir. Örneklerde hMPV varlığı, HEp-2 hücre dizilerinin kullanıldığı hızlı (shell vial) hücre kültürü yöntemi ve gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (rRT-PCR) ile araştırılmıştır. Yöntemler klinik örneklerle eş zamanlı olarak uygulanmış ve her iki yöntemde pozitif kontrol olarak, Erasmus Üniversitesinden sağlanan standart hMPV suşları ve

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Ayşegül Aksoy Gökmen, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 236 236 0330, **E-posta (E-mail):** aaksoygokmen@hotmail.com

dış kalite kontrol amacıyla QCMD-2009 hMPV paneli kullanılmıştır. Çalışmamızda hücre kültürü yöntemiyle 11 örnekte, rRT-PCR yöntemiyle ise iki örnekte pozitiflik saptanmıştır. Hücre kültürü ile pozitif bulunan 11 örneğin ikisi rRT-PCR yöntemiyle de pozitif bulunmuş; diğer dokuz örnek sadece hücre kültürüyle pozitif sonuç vermiştir. Uyumsuz sonuçları gidermek amacıyla her iki yöntem de tekrarlanmış ve aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan ticari rRT-PCR (RealAccurateTM, Pathofinder, Hollanda) testiyle QCMD-2009 panelinin beş standart örneğinde uyumlu sonuçlar bulunurken, pozitif olan bir standart örnek (hMPV A genetik grubu, Ct değeri: 37.31) negatif olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, ASYE olan pediatrik hasta grubunda hMPV prevalansı hücre kültürü yöntemiyle %11 oranında saptanmış; hMPV pozitif çocukların yaşlarının 6 ay-7 yaş arasında olduğu (medyan yaş: 20 ay), hastaların genellikle kış aylarında başvurduğu ve bronşiyolit tanısıyla izlendiği belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada kullanılan rRT-PCR testinin düşük viral yüke sahip hMPV A genetik grubunu içeren örneklerde virüsü saptamada yetersiz kaldığı düşünülmüştür. Dolayısıyla hMPV tanısında kullanılacak yeni geliştirilen moleküler yöntemlerin standardizasyonu sağlanıncaya kadar, hücre kültürü yöntemiyle birlikte uygulamasının yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Alt solunum yolu enfeksiyonu; insan metapnömovirusu; prevalans; gerçek zamanlı PCR; hücre kültürü.

ABSTRACT

Human metapneumovirus (hMPV) which is classified in *Paramyxoviridae* family has been identified in 2001 as the etiological agent of lower respiratory tract infection (LRTI) especially in children. Previous studies indicated that hMPV prevalence in LRTI is between 2-25%, being responsible for 10% of childhood LRTIs and its isolation rate is approximately 6% in hospitalized patients under age three years. The aim of this study was to investigate the hMPV prevalence in children with LRTI in our region. A total of 100 patients (41 female, 59 male) ages between 0-10 years old (median age: 4.8) and who were admitted to Pediatric Clinics of Ege University Medical Faculty Hospital with the diagnosis of LRTI between January-December 2009 were included in the study. Nasopharyngeal swab samples were taken from those patients during the first three days of their symptoms. The presence of hMPV in the samples were investigated by rapid (shell vial) cell culture method using HEp-2 cell line and by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (rRT-PCR). The methods were performed to the clinical samples simultaneously. In both methods, a standard strain of hMPV provided by Erasmus University was used as positive control and QCMD-2009 hMPV panel was used as external quality control. In our study, 11 and 2 samples were found positive with cell culture and rRT-PCR methods, respectively. Two of rRT-PCR positive samples were also positive in cell culture, while the other nine were positive by only cell culture method. Both of the methods were performed twice due to inconsistent results, however, the same results were obtained in both runs. Studies with QCMD-2009 panel yielded compatible results for five samples, however a positive standard sample (hMPV A subtype, Ct value: 37.31) was found as negative by rRT-PCR test used in this study (RealAccurateTM, Pathofinder, The Netherlands). Our data showed that the prevalence of hMPV detected by rapid cell culture method was 11% in pediatric patients with LRTIs, the age range of hMPV positive cases was 6 months to 7 years old (median age: 20 months), the majority of the admissions was in winter season and the main clinical picture was bronchiolitis. In addition, rRT-PCR assay used in this study was thought to be insufficient to detect the viral RNA in the event of low levels of hMPV A subtypes. Thereby the cell culture method should be used in addition to the new developing molecular methods for the detection of hMPV until standardization is achieved.

Key words: Lower respiratory tract infection; human metapneumovirus; prevalence; real-time PCR; cell culture.

GİRİŞ

Alt solunum yolu enfeksiyonları (ASYE) tüm dünyada enfeksiyon hastalıklarına bağlı mortalite ve morbiditenin en önemli nedeni olup, özellikle beş yaş altı çocuklarda en önemli ölüm nedenleri arasındadır¹. Çocukluk çağında solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan etkenler sıklıkla viruslardır. Akut solunum yolu enfeksiyonu klinik tablosuyla başvuran hastaların önemli bir kısmında etkenin saptanması zordur². Günümüzde yetişkinlerde toplum kökenli pnömonilerin %50'sinin, pediatrik yaş grubunda bronşiyolit ve pnömonilerin %15-35'inin etkeni hala saptanamamaktadır³. Son yıllarda solunum yolu enfeksiyonu etkenlerinin saptanmasına yönelik çalışmalar yoğunlaşmış, influenza virusları ve solunum sinsityal virusu (RSV) gibi klasik solunum viruslarının dışında yeni viral etkenler de araştırılmaya başlanmıştır^{3,4}. İlk kez 2001 yılında tanımlanan insan metapnömovirusu (human metapneumovirus; hMPV), özellikle 10 yaş altı çocuklarda ASYE'de etken olarak saptanmaktadır⁵⁻⁷. Enfeksiyonların tanısında gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (rRT-PCR) altın standart yöntem olarak kabul edilmekle birlikte, hücre kültürü yöntemi, direkt antijen testleri ve serolojik yöntemler de klinik virolojik tanıda sıklıkla kullanılmaktadır^{6,7}.

Bu çalışmada, rRT-PCR ve hücre kültürü yöntemleri kullanılarak bölgemizde alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda hMPV prevalansının araştırılması ve hMPV enfeksiyonlarının epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar ve Örnekler

Bu çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi. Ocak 2009-Aralık 2009 tarihleri arasında, ASYE (semptomları üç gündür devam eden, yandaş hastalığı olmayan ve önceden immünyetmezlik tanısı almayan hastalar) yakınmasıyla Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve Çocuk Acil Servisine başvuran 0-10 yaş arasındaki (medyan: 4.8) 100 hastadan (41 kız, 59 erkek) dakron eküvyonla nazofarengeal sürüntü örnekleri alındı. Örnekler, viral taşıma besiyeri (Universal transport medium kit, Copan Diagnostics, İtalya) içinde soğuk zincir kurallarına uyularak birkaç saat içinde laboratuvara ulaştırıldı ve çalışılincaya kadar -80°C'de saklandı. Klinik örneklerin tümüne, hızlı (shell vial) hücre kültürü yöntemi ve rRT-PCR testi eş zamanlı olarak uygulandı.

"Shell Vial (SV)" Hücre Kültürü Yöntemi

hMPV izolasyonunda SV hücre kültürü yöntemi ve HEp-2 hücre dizisi (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ, Almanya) kullanıldı. Her hasta için bir hücre kültürü tüpü hazırlandı. Viral taşıma besiyerinde gelen örnekler 30 saniye vortekslelendikten sonra içindeki eküvyon atıldı ve tüpler 2000x g'de, +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan alınan örnek, 0.45 µm por çapında filtreden geçirilerek 0.2 ml hacminde olacak şekilde SV'ler üzerine inoküle edildi. SV tüpleri 1000x g'de, 25°C'de 60 dakika santrifüj edildi ve sonra 37°C'de 1 saat virusun hücreye adsorbe olması için bekletildi. Süre sonunda üstteki sıvı steril pastör pipetiyle alındı ve her tüpe 37°C'ye getirilmiş 1 ml hMPV izolasyon besiyeri (100 ml MEM, 2 ml FCS, 1 ml HEPES, 1 ml penisilin/strepto-

misin, 0.1 ml gentamisin 10 mg/ml, 0.4 ml amfoterisin B 0.25 mg/ml, 2 ml 200 mM L-glutamine; BiochromAG, Leonorenstr, Almanya) ilave edildi. Tüpler, %5 CO₂'li etüvde, 37°C'de 120 saat inkübe edildi. Beş günlük inkübasyon süresi sonunda SV tüplerindeki lameller -20°C'de 10 dakika aseton ile fikse edildi. Daha sonra lameller tüplerden çıkarılarak biri işaretsiz, diğeri floresan izotiyosianat (FITC) ile işaretli ardışık iki monoklonal antikor ile (Mouse anti-hMPV monoklonal antibody, Goat anti-mouse IgG monoklonal antibody) üretici firmanın (hMPV Screening Set, Light Diagnostic, Chemicon International, ABD) önerileri doğrultusunda boyandı. Monoklonal antikorlar 1/50 oranında sulandırılarak kullanıldı. İşlemlerin tümü ikinci düzey güvenlik kabinlerinde yapıldı.

rRT-PCR Yöntemi

Klinik örneklerden RNA ekstraksiyonu RTP DNA/RNA Virus Mini Kit (Invitak GmbH, Almanya) ile yapıldı. Ekstraksiyon aşamasında 5.0 µl'lik internal kontrol RNA'sı (Ensefalomyokardit virus RNA'sı, Pathofinder, Hollanda) eklendi. hMPV RNA'sını saptamak amacıyla rRT-PCR yöntemi kit üreticisinin (RealAccurateTM, Pathofinder, Hollanda) önerileri doğrultusunda uygulandı. Kitin içeriği; TaqMan primer [nükleoprotein (N) genini hedef alan] ve problemleri [5' ucunda 6-karoksifloresan (FAM; florofor), 3' ucunda tetrametilrodamin (TAMRA; quencher) ile işaretli], internal kontrol RNA'sı, pozitif kontrol RNA'sı ve negatif kontrolden oluşmaktaydı. Her örnek için, 1.0 µl enzim (Qiagen One Step RT-PCR, ABD), 1.0 µl dNTP, 5.0 µl Qiagen One Step RT-PCR solüsyonu ve 5.5 µl dH₂O karışımından oluşan toplam 12.5 µl hacminde "mastermix" hazırlandı. Plaklarda her örnek için ayrılan kuyucuklara ve internal kontrol kuyucuğuna; 12.5 µl "mastermix" solüsyonu, 7.5 µl primer ve prob karışımı ve 5.0 µl miktarında örnekten ekstrakte edilen RNA ilave edildi (toplam hacim: 25.0 µl). Pozitif kontrol RNA'sı için kit içeriğinde bulunan hMPV hedef RNA'sı ve standart pozitif kontroller, negatif kontrol olarak "RNase free" su kullanıldı.

Amplikonların saptanmasında ABI 7500 (Applied Biosystems, ABD) sistemiyle floresans ışımalar ölçüldü. Testte, FAM floresans sinyali elde edilen örnek sonuçları pozitif olarak kabul edildi. Sinyalin döngülere göre açılımında, cycle threshold (Ct) değeri 25-30 arasında olan örnekler güçlü pozitif, 30-35 arasında olanlar pozitif, 35-40 arasında olanlar düşük pozitif, 40 ve üzerinde olanlar negatif olarak kabul edildi. Örnekte, FAM floresans sinyali yokken sadece internal kontrolde floresans varsa, pozitif ve negatif kontroller doğru olarak sonuçlandıysa, test negatif olarak kabul edildi (internal kontrolün Ct değeri: 29-31). Örnekte, internal kontrolde ve/veya pozitif kontrollerde (pozitif kontrollerin Ct değeri: 33-35 arasında) floresans yoksa test geçersiz kabul edildi ve tekrar edildi.

Standart hMPV Pozitif Kontroller ve Kalite Kontrolleri

Hücre kültürü yönteminde kullanılan pozitif kontroller Erasmus Üniversitesi Viroloji Bölümünden (Rotterdam, Hollanda) sağlandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan suşların üçü hMPV tip A, üçü hMPV tip B idi. Her çalışmada, biri A, diğeri B olacak şekilde iki pozitif kontrol kullanıldı.

İç kalite kontrolde, kit içeriğinde bulunan etken RNA'sı ve standart pozitif hMPV suşları kullanıldı. Dış kalite kontrolde, "Quality Control for Molecular Diagnostics"den (QCMD, Glasgow, Scotland) sağlanan örnekler kullanıldı.

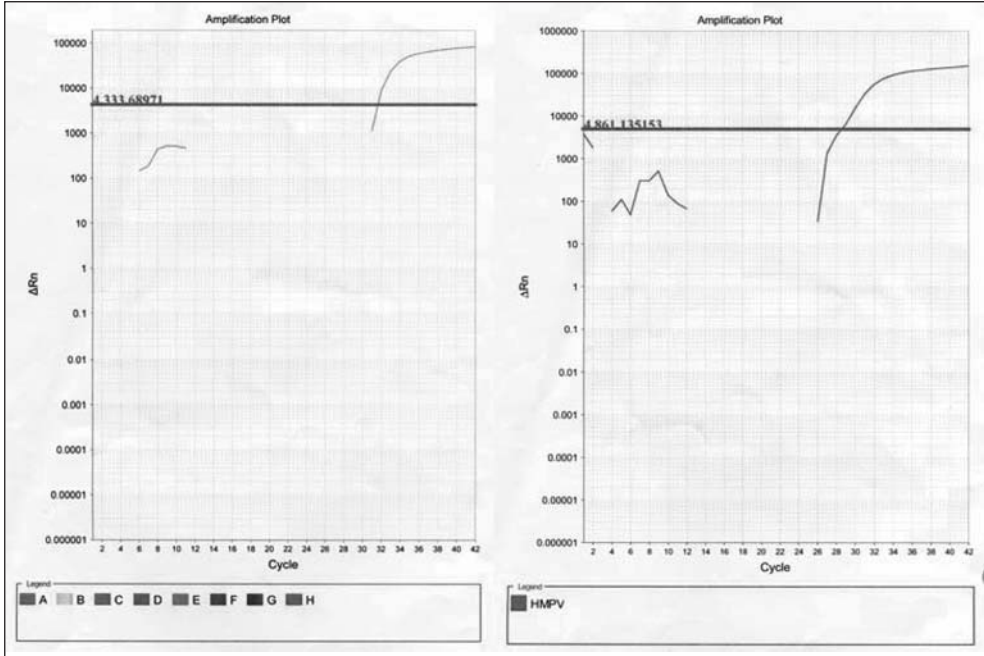
BULGULAR

ASYE olan 100 hastanın klinik örneklerinde hücre kültürü yöntemiyle 11 örnek pozitif, 89 örnek negatif bulunurken, rRT-PCR ile iki örnek pozitif, 98 örnek negatif saptanmıştır (Şekil 1). Hücre kültürü ile pozitif bulunan 11 örneğin ikisi rRT-PCR yöntemiyle de pozitif sonuç vermiştir. Diğer dokuz örnek ise sadece hücre kültürü yöntemiyle pozitif bulunmuştur.

Her iki test arasında dokuz örnekte saptanan uyumsuz sonuçları gidermek amacıyla hücre kültürü yöntemiyle pozitif bulunan 11 örneğe ikinci kez SV hücre kültürü yöntemi ve örneklerin tümüne (n= 100) tekrar rRT-PCR testi uygulanmış ve yine ilk çalışmadaki sonuçlar elde edilmiştir. Örneklerin hiçbirinde inhibitör madde saptanmamıştır. Bu çalışmada kullanılan rRT-PCR testi ile QCMD 2009 hMPV paneli test edilmiş ve beş sonuç (dört pozitif, bir negatif) benzer, ancak pozitif olan bir örnek negatif bulunmuştur (Tablo I, Şekil 2).

Çalışmaya alınan olguların %61'i bronşiyolit, %20'si krup, %11'i astım alevlenmesi ve %8'i pnömoni tanısıyla izlenen hastalardır. Pozitiflik saptanan hastaların dördü kız, yedisi erkek olup, ortalama yaş 20 ay (yaş aralığı: 6 ay-7 yaş) olarak belirlenmiştir. On bir hastanın, biri pnömoni, 10'u bronşiyolit tanısıyla, üç hasta yatarak, sekiz hasta ayaktan izlenmiştir. Hastaların eşlik eden başka ek hastalıkları yoktur.

Klinik örneklerin 20'si hastaların şikayetleri başladıktan sonra ilk günde, 35'i ikinci günde, 45'i üçüncü günde alınmıştır. Pozitif bulunan 11 hastanın ise, 1 (%9)'inden birinci günde, 5 (%45.5)'inden ikinci günde ve 5 (%45.5)'inden üçüncü günde alınan ör-

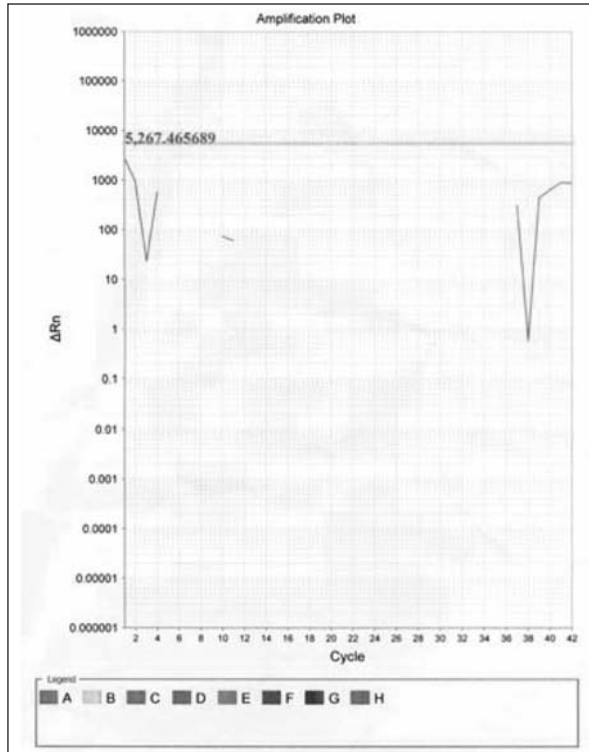


Şekil 1. rRT-PCR ile pozitif bulunan iki hastanın amplifikasyon eğrileri.

Tablo I. QCMD 2009 hMPV Paneli Sonuçları ile Bu Çalışmada Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması

Örnek kodu	Örnek içeriği	Hedef Ct değeri	Bulunan Ct değeri	Hedef sonuç	Bulunan sonuç
hMPV-RSV 09-02	hMPV-B2	33.80	34.48	Pozitif	Pozitif
hMPV-RSV 09-03	hMPV-B2	38.43	37.70	Pozitif	Pozitif
hMPV-RSV 09-05	hMPV-B2	36.18	34.14	Pozitif	Pozitif
hMPV-RSV 09-06	hMPV-A1	31.22	33.34	Pozitif	Pozitif
hMPV5-RSV 09-08	hMPV negatif	-	-	Negatif	Negatif
hMPV6-RSV 09-10	hMPV- A1	37.31	-	Pozitif	Negatif

QCMD: Quality Control for Molecular Diagnostics; hMPV-A1: Human metapneumovirus tip A; hMPV-B2: Human metapneumovirus tip B.



Şekil 2. QCMD “hMPV6-RSV09-10” no’lu örneğinin bu çalışmada elde edilen amplifikasyon eğrisi.

neklerde hMPV pozitifliği saptanmıştır. Hastaların çoğunluğunun kış aylarında başvurduğu izlenmiştir (Tablo II).

TARTIŞMA

Bu çalışmada, ASYE olan çocuklarda hMPV prevalansının saptanmasında en doğru sonuca ulaşmak için klinik örneklerle hem moleküler hem de hücre kültürü yöntemi eş za-

manlı uygulanmıştır. Yapılan çalışmalarda, klinik örneğin transportu, kullanılan hücre dizisi ve inkübasyon süresine göre hMPV'nin hücre kültüründe saptanmasında duyarlılık oranları değişmektedir^{8,9}. Viral transport koşulları yerine getirildiği ve hMPV'yi izole edebilen bir hücre dizisi kullanıldığı zaman SV hücre kültürü yönteminin duyarlılığı oldukça yüksektir⁹⁻¹². Ancak viral üremenin yavaş ve kısıtlı olması nedeniyle, direkt immüno floresans (DFA) ve RT-PCR testlerine göre kültür yönteminin zaman alıcı (yaklaşık beş gün) ve zahmetli olması, değerlendirme ve saptama aşamasında uzman personele gereksinim olması gibi nedenlerle kullanımı sınırlıdır^{6,12}. Reina ve arkadaşlarının¹¹ yaptığı bir çalışmada, hMPV izolasyonunda değişik hücre dizileri kullanılmış ve saptama aşamasında hMPV monoklonal antikorla ile indirekt immüno floresans yöntemi uygulanmıştır. Tüm hücre dizilerinde klinik örnekler (n= 2029) beş gün boyunca inkübe edilmiş; etkenin izolasyonunda LLC-MK2, HEp-2, Vero, MDCK ve MRC-5 hücre dizilerinin duyarlılığı sırasıyla; %100, %68.7, %28.1, %3.1 ve %0 olarak saptanmıştır. İnkübasyon süresi 72 saate indirildiğinde tüm hücre dizilerinin saptama duyarlılıklarının da düştüğü gözlenmiştir¹¹. Bizim çalışmamızda, hMPV'nin izolasyonunda HEp-2 hücre dizisi ile SV hücre kültürü yöntemi uygulanmıştır. İnkübasyon süresi, çalışma başlangıcında pozitif kontrol örneklerine iki gün olacak şekilde denenmiş, zayıf floresan ışımaların görülmesi nedeniyle beş güne uzatılmış ve tüm örnekler bu inkübasyon süresi uygulanmıştır.

Günümüzde, hMPV tanısında altın standart yöntem RT-PCR testidir; ancak örneklerde inhibitör maddelerin bulunması yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. Ayrıca, nükleik asit testlerinde etkene yönelik seçilen primer ve prob bölgeleri de testin duyarlılığını etkilemektedir¹³. Cote ve arkadaşları¹⁴ gen amplifikasyonunda N ve L genini hedef alan nükleik asit testlerinin diğerlerine göre daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise, 143 hasta örneği değerlendirilmiş ve en duyarlı yöntemin "nested" PCR olduğu (13 hastada pozitiflik), rRT-PCR'nin (sekiz hastada pozitiflik) konvansiyonel RT-PCR'ye (beş hastada pozitiflik) göre daha duyarlı bulunduğu rapor edilmiştir¹⁵. Bizim çalışmamızda, N gen bölgesinin çoğaltıldığı ve saptandığı rRT-PCR yöntemi kullanılmış ve örneklerin hiçbirinde inhibitör madde varlığına rastlanmamıştır.

Örneklerin, hastalarda klinik semptomlar ortaya çıktıktan sonra kaçınıcı günde alındığı, hem hücre kültürü hem de rRT-PCR testinin duyarlılığını etkilemektedir^{7,8,13}. Duyarlılığın klinik semptomların başlamasından itibaren dördüncü günden sonra alınan örneklerde düştüğü bildirilmiştir¹⁴. Sunulan bu çalışmada tüm örnekler, klinik semptomların başlangıcından itibaren ilk üç günde alınmış, daha geç başvuran hastalar çalışma dışında bırakılmıştır.

Tablo II. Ocak 2009-Aralık 2009 Tarihleri Arasında Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan ve hMPV Saptanan Hastaların Aylara Göre Dağılımları

	Aylar												Toplam
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Pozitif örnek/	2/20	4/15	1/14	0/11	0/5	0/1	0/1	1/2	2/5	1/6	0/9	0/11	11/100
Toplam örnek													

Çalışmamızda rRT-PCR ile iki örnekte hMPV pozitifliği saptanmış; hücre kültürü yöntemiyle rRT-PCR ile pozitif bulunan bu örnekler dışında dokuz örnekte daha hMPV pozitif olarak tespit edilmiştir. Testler arasındaki uyumsuzluğu gidermek için her iki yöntemle de testler tekrarlanmış ve yine aynı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, rRT-PCR testinin dış kalite kontrolü amacıyla QCMD'nin 2009 yılında hMPV için hazırladığı altı standart örneğe de rRT-PCR testi uygulanmıştır. Beş standart örnekte QCMD'nin ulaştığı sonuçlara ulaşılmış, ancak bir standart örnek (hMPV A genetik grubu, Ct değeri: 37.31) QCMD sonuçlarında pozitif iken, bu çalışmada kullanılan rRT-PCR testi ile negatif bulunmuştur. Ayrıca QCMD'den elde edilen bilgilere göre, 11 rRT-PCR kiti ile bu suşa yönelik uygulanan testlerde, sadece 5 (%45.5) ticari kitin bu standart suşu saptayabildiği görülmüştür (Tablo I). Bu çalışmada hücre kültürü yöntemiyle hMPV'nin A ve B genetik grupları ayırt edilememiştir. Yapılan bir çalışmada, akut solunum yolu enfeksiyonu olan 322 pediatrik hastanın 46 (%14.3)'sında hMPV pozitif bulunmuş ve suşların %72'sinin A, %28'inin B genetik grubunda olduğu saptanmıştır¹⁶. Bizim çalışmamızda hMPV'nin genetik grupları ayırt edilmemiş olmasına karşın, hastalarının tümünün çocuk olması, diğer pozitif suşların hücre kültürüyle saptanması ve QCMD 2009 standart örneklerinde elde edilen sonuçlar nedeniyle, çalışmada kullanılan testin düşük viral yüke sahip hMPV A genetik grubunu içeren klinik örneklerde, hMPV'yi saptamada yetersiz olabileceği kanısına varılmıştır. Bu durum hMPV "primer-probe" diziliminden veya primerlerin moleküler ağırlığından kaynaklanmış olabilir. Ancak dizilim bilgilerine ulaşamadığı için herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır. Bu nedenle üretici firma (Pathofinder, Hollanda) "Real Accurate" rRT-PCR testini, QCMD 2009 hMPV standart suşlarına uygulamış ve firma yetkilisi (Mr Guus Simons, guus.simons@pathofinder.com) ile yapılan kişisel görüşmede, tüm standart örneklerde, bu çalışmada elde edilen sonuçların aynısının saptandığı anlaşılmıştır. Literatürde, bu çalışmada uygulanan testin kullanıldığı başka bir kaynak bulunmamaktadır. Günümüzde hMPV'yi rRT-PCR yöntemiyle saptayan diğer kitlerin çoğunluğunun da viral yükü düşük hMPV A genetik grubunu içeren örneklerde etkeni saptamada başarısız olması, bu alanda kullanılan testlerde genel bir sorun olduğunu düşündürmüştür.

hMPV, özellikle 0-10 yaş arası çocuklarda sık olarak üst ve alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olur. Hastanede yatarak izlenen 668 çocukta hMPV'nin saptandığı hastaların medyan yaşı 11.5 ay olarak bildirilmiştir¹⁷. Yapılan diğer araştırmalarda da, hMPV enfeksiyonlarında medyan yaş 6 aydan 24 aya kadar değişmektedir^{3,5,12,16}. Bizim çalışmamızda, hMPV pozitif saptanan hastaların medyan yaşı 20 ay olarak bulunmuştur.

Akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda çeşitli ülkelerden bildirilen hMPV prevalansı, Amerika Birleşik Devletleri'nde %6.4; Yunanistan, Çin ve Güney Afrika'da %6; İtalya'da %7; Finlandiya ve Japonya'da %9; İspanya'da %11 ve Kore'de %16 oranlarındadır¹⁸⁻²⁶. Ülkemizde Hatipoğlu ve arkadaşları²⁷, akut ASYE tanısı alan hastanede yatan 147 hastada hMPV prevalansını %13 olarak bildirmişlerdir. Altındiş ve arkadaşları²⁸ ise, bronşit ve bronşiyolit ön tanılı 46 hastanın nazofarengeal örneklerinde hMPV prevalansını %10.8 oranında tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ASYE olan çocuklarda saptanan %11 oranındaki hMPV prevalansı ülkemiz verileriyle uyumludur.

Çalışma sırasında mevsimsel dönem izlenmemiş, kriterlere uygun hastalar yıl boyunca kaydedilmiş ve literatürde yer alan “kış aylarında başvuru sıklığı” gözlenmiştir^{6,12,18}. Etkin, en fazla ocak ve şubat aylarında izole edilmiş, bahar ve erken yaz aylarında saptanmamıştır (Tablo II). Daha sonra ağustos sonu ile ekim başı arasında tekrar hMPV izolasyonu yapılmış; ancak 2009 yılı sonuna kadar, muhtemelen pandemik influenza A H1N1v salgını nedeniyle bir daha tespit edilmemiştir. Günümüzde, hMPV’ye bağlı enfeksiyonların hangi mevsimde en sık görüldüğü üzerine henüz bir fikir birliğine varılmamıştır. İleri dönemde yapılacak olan tüm yıla yayılan çalışmalar bu konuda aydınlatıcı olacaktır.

Bu çalışma, bölgemizde hMPV prevalansının farklı iki yöntemle araştırıldığı ilk çalışmadır ve ASYE olan çocuklarda hMPV prevalansı %11 olarak bulunmuştur. hMPV saptanan hastaların yaş ortancasının 20 ay olduğu, hastaların genellikle kış aylarında başvurduğu ve bronşiyolit tanısıyla izlendiği belirlenmiştir. Mevsimsel özellikler göz önüne alındığında, bu sonuç Akdeniz ülkeleriyle uyumludur. Her ne kadar hMPV tanısında nükleik asit testlerinin hücre kültürü yönteminden daha duyarlı olduğu belirtiliyorsa da, bu virusa yönelik geliştirilen moleküler tanı testlerinin kullanımda daha ilk dekadına yeni girdiği dikkate alınmalıdır^{4,29}.

Sonuç olarak, klinik viroloji laboratuvarlarında hMPV’yi saptayan RT-PCR testlerinin sonuçları doğrulanıncaya kadar hücre kültürü yöntemiyle birlikte kullanılmasının, ayrıca iç ve dış kalite kontrolleriyle sonuçların devamlı test edilmesinin gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, standart hMPV suşlarını sağlayan Prof. Dr. Martin Schutten’e (Erasmus MC, Department of Virology, Rotterdam, Hollanda) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Acute respiratory infection in children. Available at: http://www.who.int/fch/depts/cah/resp_infections/en/
2. Devrim İ, Seçmeer G. Yeni tanımlanan solunum yolu virüsü insan metapnömovirüslerine bağlı enfeksiyonlar. Hacettepe Tıp Derg 2005; 36(3): 163-7.
3. Hamelin ME, Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. Clin Infect Dis 2004; 38(7): 983-90.
4. Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. Clin Infect Dis 2011; 52(Suppl 4): S284-9.
5. Van Den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human metapneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat Med 2001; 7(6): 719-24.
6. Broor S, Bharaj P, Charar HS. Human metapneumovirus: a new respiratory pathogen. J Biosci 2008; 33(4): 483-93.
7. Robinson CC. Respiratory viruses, pp: 203-20. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, Wiedbrauk DL (eds), Clinical Virology Manual. 2009, 4th ed. ASM Press, Washington DC.
8. Tollefson SJ, Cox RG, Williams JV. Studies of culture conditions and environmental stability of human metapneumovirus. Virus Res 2010; 151(1): 54-9.

9. Landry ML, Ferguson D, Cohen S, Peret TC, Erdman DD. Detection of human metapneumovirus in clinical samples by immunofluorescence staining of shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4): 1950-2.
10. Percivalle E, Sarasini A, Visai L, Revello MG, Gerna G. Rapid detection of human metapneumovirus strains in nasopharyngeal aspirates and shell vial cultures by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3443-6.
11. Reina J, Ferres F, Alcoceba E, Mena A, de Gopegui ER, Figuerola J. Comparison of different cell lines and incubation times in the isolation by the shell vial culture of human metapneumovirus from pediatric respiratory samples. *J Clin Virol* 2007; 40(1): 46-9.
12. Hermos CR, Vargas SO, McAdam AJ. Human metapneumovirus. *Clin Lab Med* 2010; 30(1): 131-48.
13. Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(4): 716-47.
14. Cote S, Abed Y, Boivin G, et al. Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2003; 41(8): 3631-5.
15. Kaïda A, Kubo H, Shiomi M, Kohdera U, Iritani N. Evaluation of real time RT-PCR compared with conventional RT-PCR for detecting human metapneumovirus RNA from clinical specimens. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61(6): 461-4.
16. Canducci F, Debiaggi M, Sampaolo M, et al. Two year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *J Med Virol* 2008; 80(4): 716-23.
17. Mullins JA, Erdman D, Weinberg GA, et al. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(4): 700-5.
18. Somer A. Metapneumovirus. *ANKEM* 2006; 20(Ek 2): 234-9.
19. Esper F, Boucher D, Weibel C, et al. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 2003; 111(6 Pt 1): 1407-10.
20. Xiao N, Xie Z, Zhang B, et al. Prevalence and clinical and molecular characterization of human metapneumovirus in children with acute respiratory infection in China. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29(2): 131-4.
21. Ebihara T, Endo R, Kikuta H, et al. Human metapneumovirus infection in Japanese children. *J Clin Microbiol* 2004; 42(1): 126-32.
22. Kim Y, Lee HJ. Human metapneumovirus associated lower respiratory tract infections in Korean infants and young children. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24(12): 1111-2.
23. Ludewick HP, Abed Y, van Niekerk N, et al. Human metapneumovirus genetic variability, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(7): 1074-8.
24. Garcia-Garcia ML, Calvo C, Pérez-Breña P, et al. Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41(9): 863-71.
25. Gioula G, Chatzidimitriou D, Melidou A, Exindari M, Kyriazopoulou-Dalaina V. Contribution of human metapneumovirus to influenza-like infections in North Greece, 2005-2008. *Euro Surveill* 2010; 15(9): pii=19499.
26. Fabbiani M, Terrosi C, Martorelli B, et al. Epidemiological and clinical study of viral respiratory tract infections in children from Italy. *J Med Virol* 2009; 81(4): 750-6.
27. Hatipoğlu N, Somer A, Badur S, et al. Viral etiology in hospitalized children with acute lower respiratory tract infection. *Türk J Pediatr* 2011; 53(5): 508-16.
28. Altındış M, Kandemir Ö, Kalaycı R ve ark. Metapnömovirüs ve diğer solunumsal virüslerin multiplex PCR ile tanısı. XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 14-18 Mart 2007, Antalya. Kongre Kitabı, P01-002.
29. Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G. Ten years of human metapneumovirus research. *J Clin Virol* 2012; 53(2): 97-105.