

Beş Yaş Altı Çocuklarda Gastroenterite Neden Olan Yedi Farklı RNA Virusunun Araştırılması

Investigation of Seven Different RNA Viruses Associated with Gastroenteritis in Children Under Five Years Old

Shamim AKHTER¹, Buse TÜREGÜN¹, Mehmet KIYAN¹, Devran GERÇEKER¹, Haluk GÜRİZ², Fikret ŞAHİN¹

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Ankara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Cebeci Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

² Ankara University Faculty of Medicine, Cebeci Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 28.12.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 11.03.2014

ÖZET

Küçük çocuklarda ortaya çıkan gastroenteritlerde en sık rastlanılan etkenlerin viruslar olduğu bilinmektedir. Viral gastroenteritlerin klasik etkenleri olan rotavirus, norovirus, adenovirus tip 40/41, astrovirus ve sapovirus gibi virusların yanı sıra son yıllarda moleküler yöntemlerdeki gelişmelere bağlı olarak yeni tanımlanan bazı pikornavirusların (Aichi virus, parechovirus, enterovirus) da gastroenterit ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir. Ancak bu virusların direkt olarak gastroenterite neden olup olmadıkları ve hastalığındaki rolleri ile ilgili yeterince veri mevcut değildir. Bu çalışmada, ishali çocukların dışkı örneklerinde rotavirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, Aichi virus, parechovirus ve enterovirus varlığının ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Haziran-Aralık 2012 tarihleri arasında ishal şikayeti ile hastanemize başvuran, rutin bakteriyolojik ve parazitolojik incelemelerinde patojen etken saptanmayan, 5 yaş altındaki 50 çocuk olguya ait dışkı örneği dahil edilmiştir. Örneklerden RNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra, ters transkripsiyon ile elde edilen cDNA'larla öncelikle internal kontrol (İK) ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiş ve 31 örnekte (%62) İK pozitif olarak bulunmuştur. Bu örneklerle daha sonra rotavirus grup A ve C, norovirus (NoV) genogrup GI ve GII, sapovirus, astrovirus, Aichi virus, parechovirus ve enterovirus için özgül primer çiftleri kullanılarak PCR yöntemi uygulanmıştır. Öngörülen büyüklükte elde edilen PCR ürünleri, pBSK vektörüne klonlandıktan sonra dizi analizleri yapılmış ve BLAST programı kullanılarak GenBank veritabanında bulunan ilgili virusların genomlarıyla karşılaştırılarak viruslar tanımlanmıştır. Çalışmada, İK pozitif 31 örneğin 12 (%38.7)'sinde pozitiflik tespit edilmiş; bu örneklerin 6 (%19.3)'sında NoV GII, 2 (%6.5)'sinde NoV GI, 2 (%6.5)'sinde rotavirus grup A, 1 (%3.2)'inde astrovirus ve 1 (%3.2)'inde sapovirus RNA'larının varlığı belirlenmiştir. Çalışılan toplam örnek sayısı dikkate alındığında; en sık rastlanılan etkenin noroviruslar (8/50, %16) olduğu,

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Fikret Şahin, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Morfoloji Kampüsü, 3. Kat, 06100, Sıhhiye, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 595 8277, **E-posta (E-mail):** fsahin29@hotmail.com

bunu rotavirus (2/50, %4), astrovirus (1/50, %2) ve sapovirusun (1/50, %2) izlediği saptanmıştır. Sonuç olarak, gastroenterit etkeni RNA viruslarının moleküler epidemiyolojik araştırmalarında, çalışmamızda kullandığımız primerlerle yapılacak RT-PCR yönteminin etkin bir şekilde sonuç verdiği izlenmiş; farklı bölgelerimizde daha uzun zaman sürecinde ve daha fazla olgu sayısı ile yapılacak olan çalışmaların, bu virusların ülkemizdeki gerçek epidemiyolojilerini göstermesi açısından önemli olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Viral gastroenterit; çocuk; polimeraz zincir reaksiyonu; RT-PCR.*

ABSTRACT

Viruses are the most frequently detected etiologic agents of gastroenteritis seen in small children. In addition to classical gastroenteritis viruses namely rotavirus, norovirus, adenovirus type 40/41, astrovirus and sapovirus, some novel picornaviruses (Aichi virus, parechovirus, enterovirus) that have been identified in parallel to the developments in molecular diagnostic methods, thought to be associated with diarrhea in humans. However, the data are not enough to prove their actual roles in the pathogenesis of gastroenteritis. The aim of this study was to investigate the presence of rotavirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, Aichi virus, parechovirus and enterovirus in the stool samples of children with diarrhoea by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). A total of 50 samples from children admitted to our hospital with diarrhoea between June-December 2012 were included in the study. All the patients were under 5 years of age. Routine bacteriological and parasitological examinations of the patients' stool samples were negative. Total RNAs were extracted from each of the samples and cDNAs were obtained by reverse transcription. All cDNAs were investigated first with the internal control (IC) using PCR. Thirty-one of the 50 cDNAs (62%) were found IC positive. Those 31 samples were further investigated in terms of rotavirus group A and C, norovirus (NoV) genogroup GI and GII, sapovirus, astrovirus, Aichi virus, parechovirus and enterovirus by PCR using specific primer pairs. The predicted sized PCR products obtained were cloned into the pBSK cloning vector and were sequenced. Sequences obtained were subjected to a BLAST search with registered sequences in the GenBank database for the confirmation of the PCR product. Out of 31 RNA positive stool specimens, 12 (38.7%) were found positive for five types of the target viruses. NoV GII (6/31, 19.3%) were detected as the most prevalent virus, followed by NoV GI (2/31, 6.5%), rotavirus group A (2/31, 6.5%), astrovirus (1/31, 3.2%) and sapovirus (1/31, 3.2%). The results of this study revealed that the most frequently detected agents were noroviruses (8/50, 16%) followed by rotavirus (2/50, 4%), astrovirus (1/50, 2%) and sapovirus (1/50, 2%). It was concluded that RT-PCR performed with the primers used in this study could be applied effectively for the molecular epidemiological analysis of RNA viruses leading to gastroenteritis. Larger scale studies conducted in different areas for longer time periods and with a larger population size will provide data for the epidemiological properties of agents of viral gastroenteritis.

Key words: *Viral gastroenteritis; children; polymerase chain reaction; RT-PCR.*

GİRİŞ

Özellikle beş yaşın altındaki çocuklarda önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden olan akut gastroenteritler, yaygın bir halk sağlığı sorunu olarak önemini hala korumaktadır. Çocukluk çağı ishallerinin en sık rastlanan etkenleri viruslar olup, dört virus ailesinin [*Reoviridae* (rotavirus), *Caliciviridae* (norovirus ve sapovirus), *Astroviridae* (astrovirus), *Adenoviridae* (adenovirus tip 40,41)] gastroenteritlerden sorumlu olduğu bilinmektedir^{1,2}. Son yıllarda, özellikle moleküler yöntemlerdeki hızlı gelişmeler, gastroenterit ile ilişkili birçok yeni virusun tanımlanmasını sağlamıştır³⁻⁶. Ancak, çoğu *Picornaviridae* ailesine ait olan bu yeni virusların, patogenezi ile ilgili yeterli bilgi birikimi henüz mevcut değildir^{4,5}.

Gastroenterit viruslarının tanısında, elektron mikroskopi (EM), immün EM, hücre kültürü, enzim-işaretli immünolojik yöntemler (EIA), lateks aglütinasyon ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemler kullanılmaktadır². Tanıda geleneksel yöntemlerden olan EM ile virusun direkt olarak gösterilmesi yararlıdır, ancak referans laboratuvarlar ile sınırlıdır. Viral enfeksiyonların tanısında altın standart, virusun hücre kültüründe üretilmesi olmasına rağmen, bu yöntem zaman alıcı olması ve teknik zorluklar nedeniyle önerilmemektedir¹. Hızlı tanıda, pratik olması nedeniyle EIA veya immünokromatografik yöntemler tercih edilmektedir⁷. Buna karşın son yıllarda gerek tanı gerekse epidemiyolojik çalışmalarda, duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olması nedeniyle PCR (RNA virusları için ters transkripsiyon-PCR; RT-PCR) yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır⁸⁻¹⁰. Bu çalışmada, hastanemize ishal şikayeti ile başvuran, rutin bakteriyolojik ve parazitolojik analizleri negatif olan 5 yaş altındaki çocukların dışkı örneklerinde rotavirus, norovirus, sapovirus ve astrovirus gibi bilinen gastroenterit etkenlerinin yanı sıra, Aichi virus, parechovirus ve enterovirus gibi gastroenterit patolojisiyle ilişkisi henüz tam olarak netleşmemiş virusların varlığının PCR ile araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Dışkı Örnekleri

Çalışmaya, Haziran-Aralık 2012 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalına ishal şikayeti ile başvuran, rutin bakteriyolojik ve parazitolojik tetkiklerinde patojen etken saptanmayan, 5 yaş altı 50 çocuğa ait dışkı örnekleri dahil edildi. Çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yürütüldü.

RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Örneklerden RNA izolasyonu, Boom ve arkadaşlarının¹¹ tanımladığı yöntem ile gerçekleştirildi. Kısaca; dışkı örneği fosfat tampon (PBS) içerisinde süspanse edildikten sonra guanidin tiyosiyanat varlığında RNA'nın silika partiküllerine bağlanması ile izolasyon yapıldı. İzole edilen RNA peleti 40 µl RNaz içermeyen su ile sulandırıldı ve -70°C'de saklandı.

Komplementer DNA, cDNA sentez kiti (Fermentas, ABD) kullanılarak elde edildi. Toplam hacim 12 µl olacak şekilde 0.5 µg izole edilen RNA'ya 10 mM random hekzamer primerinden 1 µl eklendi, 65°C'de 5 dakika bekletildikten sonra buza alındı. 4 µl 5X RT tamponu, 2 µl 10 mM dNTP, 1 µl RNaz inhibitörü ve son olarak ters transkriptaz enzimi eklendikten sonra 42°C'de 1 saat inkübe edildi.

PCR Yöntemi

Araştırılacak olan gastroenterit viruslarının RNA-DNA amplifikasyonları için kullanılan ve daha önce tarif edilmiş primer dizileri ile beklenen PCR ürün büyüklükleri Tablo I'de gösterildi^{9,12-14}. Örneklerden elde edilen cDNA'lardan internal kontrol amacıyla RNaz-L cDNA'sını tanımlamak için bu gene ait primer çifti kullanıldı (Tablo I).

Tablo 1. Araştırılan Gastroenterit Virusları İçin PCR'de Kullanılan Primer Dizileri ve Beklenen Ürün Büyüklükleri

Virus	Primer dizisi 5'-3'	Sens	Ürün büyüklüğü (Baz çifti)	Kaynak no
Rotavirus A	AAAGGATGGCCAACAGGATCACT	+	569	13
	GTATARAHAHACTTGCCACCAT	-		
Rotavirus C	CAAATGATTGAGAATCTATTG	+	205	9
	GTTTCTGTACTAGCTGGTGAA	-		13
Norovirus GI	CTGCCCCGAATTGTAAATGA	+	330	12
	CCAACCCARCCATTTRTACA	-		
Norovirus GII	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	+	387	12
	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	-		
Sapovirus	CTCGCCACCTACRAWGCBTGGTT	+	100	12
	CMWWCCCCTCCATYTCAAACAC	-		9
Astrovirus	GGACTGCAAAGCAGCTTCGTG	+	719	12
	GTGAGCCACCAGCCATCCCT	-		
Aichi virus	GACTTCCCCGGAGTCGTCGTCT	+	158	14
	GCRGAGAATCCRCTCGTRCC	-		9
Parechovirus	CYCACACAGCCATCCTC	+	270	14
	TRCGGGTACCTTCTGGG	-		
Enterovirus	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	+	440	14
	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	-		
RNaz-L	GTGGAACCTCTGCTTCGTCATG	+	394	Bu çalışma
	CTCCACATCACTATCGTCAG	-		

PCR karışımı, son hacim 50 µl olacak şekilde; 2 µl cDNA'nın, 48 µl PCR bileşenlerinin (5X tampondan 5 µl, 50 mM MgCl₂'den 1 µl, 2.5 mM dNTP'den 1 µl, 10 pmol primer çiftlerinden 1'er µl, 5U taq polimerazdan 0.5 µl) içine konulmasıyla hazırlandı. Amplikasyon, 94°C'de 2 dakika ön denatürasyon sonunda, 30 döngü 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 58°C'de 45 saniye bağlanma, 72°C'de uzama şeklinde tekrarlandı ve 72°C'de 10 dakika bekledikten sonra reaksiyon tamamlandı. PCR ürünleri %1.5 etidyum bromür içeren jelde yürütüldükten sonra UV ışıktaki görüntülendi. 100-1000 baz çiftlik DNA belirteci yardımıyla pozitif sonuç veren örnekler belirlendi.

Klonlama ve Dizi Analizi

RT-PCR ile pozitif sonuç veren PCR ürünleri pBSK-T vektör içerisine ligasyonu yapıldıktan sonra *E.coli* DH5α kompetan hücrelerine transforme edildi^{15,16}. İçerisinde insert bulunduran plazmid ile transforme edilen kolonilerde β-galaktosidaz ekspresyonu, X-gal-izopropil β-D-1-tiyogalaktopiranozid (IPTG) karışımı kullanılarak araştırıldı ve mavi-beyaz koloniler ayırt edildi. Beyaz koloniler, tek koloni olarak, ampisilin varlığında 2 ml Luria-Bertani sıvı besiyerinde çoğaltılarak alkalik lizis yöntemiyle rekombinant plazmidler

elde edildi¹⁵. İçerisinde PCR ürünü bulunduran rekombinant plazmidler, pBSK plazmidine ait M13 primeri ve araştırılan virus genomuna ait primerler kullanılarak yapılan PCR ile rekombinant plazmidlerde virus genomları belirlendi. Elde edilen ve içerisinde araştırılan virus genomu bulunduran rekombinant DNA'ların dizi analizleri, pBSK vektörünün klonlama bölgesinin 5' bölgesini tanıyan M13 primerleri kullanılarak, BigDye Terminator (PE Applied Biosystems, ABD) dizileme kimyasallarının kullanıldığı otomatik DNA dizi analizi cihazında (ABI 377, Applied Biosystems, ABD) yapıldı. Elde edilen dizileme sonuçları BLAST programı kullanılarak GenBank veritabanında bulunan ilgili virusların genomlarıyla karşılaştırılarak araştırıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda, 50 çocuğa ait dışkı örneğinin 31 (%62)'inde internal kontrol pozitif olarak belirlenmiş; bu örneklerde çeşitli gastroenterit viruslarına özgül primer çiftleriyle PCR yapılarak özgül ampikonlar araştırılmıştır (Tablo I). Hedeflenen virus için beklenen büyüklükteki PCR ürünlerinin gen dizilemesi yapılarak bu ürünlerin hedeflenen virusa ait oldukları doğrulanmıştır. Elde edilen viral gen dizi analizi sonuçları, GenBank'ta bulunan ilgili virusların dizileriyle karşılaştırılmış ve beklenen PCR ürünlerine eşdeğer olarak; sapovirus için 100 baz çifti (bç), norovirus GI ve GII için sırasıyla 330 ve 387 bç, rotavirus grup A için 569 bç ve astrovirus için 719 bç büyüklüğünde bantlar gözlenmiştir (Şekil 1).

Internal kontrol pozitif bulunan 31 örneğin 12 (%38.7)'inde virüslara ait PCR ürünü tespit edilmiş ve dizi analizi sonucunda pozitiflik doğrulanmıştır. Tanımlanan virusların dağılımı Tablo II'de görülmektedir. Buna göre tanımlanan virusların %66.7 (8/12)'sinin norovirus GI + GII, %16.7 (2/12)'sinin rotavirus grup A, %8.3 (1/12)'ünün astrovirus ve %8.3 (1/12)'ünün sapovirus olduğu izlenmiştir.

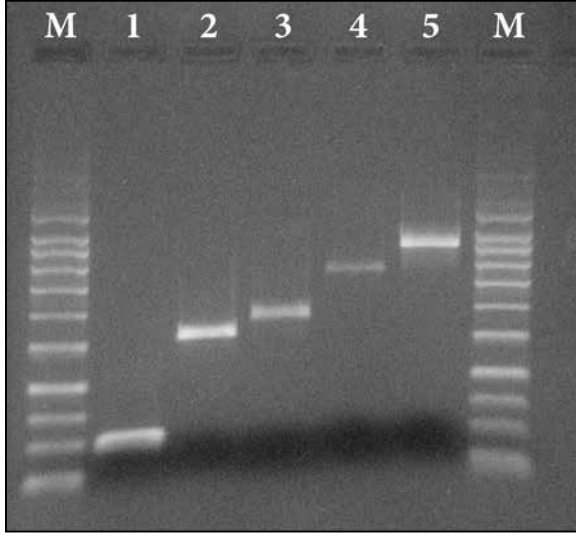
TARTIŞMA

Günümüzde çocukluk çağı gastroenteritlerine sebep olan etkenlerin çoğu virüslardır. Bunlar arasında rotavirusların, bebek ve çocuklarda en sık gastroenterit etkeni olduğu bilinmekte ve beş yaşına kadar tüm çocukların rotavirusla en az bir kez enfekte olduğu

Tablo II. Internal Kontrol Pozitif Örneklerde Tanımlanan Virüslerin Dağılımları (n= 31)

Tanımlanan virus (Sayı)	Tanımlanan virüslerin İK pozitif örnek sayısına oranı* (n= 31)	Tanımlanan virüslerin toplam örnek sayısına oranı* (n= 50)
Norovirus (8)		
GII (6)	19.3	12
GI (2)	6.5	4
Rotavirus grup A (2)	6.5	4
Astrovirus (1)	3.2	2
Sapovirus (1)	3.2	2
Toplam (12)	38.7	24

* Yüzde (%) olarak verilmiştir. İK: internal kontrol.



Şekil 1. RT-PCR yöntemiyle elde edilen PCR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü [M: Genişletilmiş 1000 bç belirteci (50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 bç); Hat 1: Sapovirus (100 bç); Hat 2: Norovirus GI (330 bç); Hat 3: Norovirus GII (387 bç); Hat 4: Rotavirus grup A (569 bç); Hat 5: Astrovirus (719 bç)].

ifade edilmektedir¹⁷. *Reoviridae* ailesinde sınıflandırılan rotavirusların sekiz türü (A-H) bulunmakta olup, en sık karşılaşılan etken, grup A'dır¹⁸. Akut gastroenteritlerden sorumlu olan diğer önemli virüsler, noroviruslardır. Noroviruslar beş genogrup (GI-GV) içermekte; GI grubunda Norwalk ve Desert Shield, GII'de Bristol ve Toronto gibi virüsler yer almaktadır¹⁹. Noroviruslar ile birlikte sapoviruslar, erişkinlerde akut viral gastroenteritin en sık etkenleri olarak bilinmektedir. Sapoviruslar da, noroviruslar gibi *Caliciviridae* ailesine ait virüslerdir; ancak noroviruslardan farklı olarak çocuklarda oluşturdukları gastroenterit tablosu daha az ciddidir². *Astroviridae* ailesinde yer alan astrovirusların gastroenterit ile ilişkisi ilk defa 1975 yılında ishalleri olan olguların dışkılarının elektron mikroskopunda incelenmesiyle ortaya konmuş, sonraki çalışmalarda bu virüslerin çocuk gastroenteritleri ile direkt ilişkisi gösterilmiştir²⁰. Moleküler yöntemlerdeki gelişmelere bağlı olarak son yıllarda tanımlanan Aichi virüs, parechovirus ve enteroviruslar da, gastroenterit ile ilişkili yeni virüsler olarak bildirilmiştir^{4,5}. *Picornaviridae* ailesine ait olan bu üç virüsün, ishalleri olan olgulara gösterilmelerine karşın, direkt olarak gastroenterit ile ilişkileri henüz netleşmemiştir⁹.

Sunulan bu çalışmada, patojen bir bakteriyel ve paraziter etken saptanmayan, beş yaş altındaki 50 ishalleri olan çocuğun dışkı örneğinde rotavirus A ve C, norovirus GI ve GII, sapovirus, astrovirus, Aichi virüs, parechovirus ve enterovirusların varlığı RT-PCR yöntemiyle araştırılmış; öngörülen büyüklükte elde edilen PCR ürünleri pBSK vektörüne klonlanarak dizi analizleri yapılmış ve BLAST programı kullanılarak virüsler tanımlanmıştır. Çalışmamızda Yan ve arkadaşlarının^{12,13} geliştirdiği iki ayrı multiplex RT-PCR (MRT-PCR) yöntemi uygulanmış; birinci MRT-PCR'de rotavirus A, B ve C'ye ait, ikincisinde ise norovirus GI ve GII, sapovirus ve astroviruslara ait primerler kullanılmıştır. Bunlara ek olarak,

Pham ve arkadaşları¹⁴ tarafından geliştirilen Aichi virus, parechovirus ve enterovirus primerleri eklenerek üçüncü set MRT-PCR hazırlanmıştır. Bu MRT-PCR setlerinin, adı geçen virusların tanımlanmasında etkin olarak çalıştığının gösterilmesinin yanı sıra, Khamrin ve arkadaşları⁹ da tüm bu virus ailesini tanıyacak MRT-PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Bizim çalışmamızda her ne kadar Khamrin ve arkadaşları⁹ tarafından geliştirilen tek tüp MRT-PCR sistemini uygulama imkanının olmasına karşın, multipleks PCR yöntemlerinde ortaya çıkan arka planda oluşabilecek kirliliği önlemek ve özellikle elde edilecek PCR ürününün dizi analizi ile tanımlanma gereğinden dolayı, her dışkı örneğinden elde edilen cDNA için, her virus için özgül primer çifti ile ayrı ayrı PCR işlemi yapılmıştır.

Çalışmamızda, internal kontrolü etkin şekilde çalıştığını tespit ettiğimiz 31 örneğin 12 (%38.7)'sinde viral etken saptanmıştır. Khamrin ve arkadaşları⁹, bizim kullandığımız primerler ile uyguladıkları MRT-PCR yöntemi ile, 0-5 yaş arası çocukların %42.9'unda etken virusa ait PCR ürünü saptamışlar; en sık rastlanılan etkenin rotavirus grup A (%12) olduğunu, bunu sırasıyla norovirus GII (%10.6), enterovirus (%5.9), parechovirus (%2.9), rotavirus grup C (%2), sapovirus (%1.3) ve astrovirusun (%0.8) izlediğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda elde edilen toplam pozitiflik oranı (%38.7), bu araştırmacıların⁹ sonucuna (%42.9) yakın olmasına karşın, viral etkenlerin sıklık derecelerinde farklılık gözlenmiş ve ilk sırayı noroviruslar (6 GII+2 GI; 8/31, %25.8) alırken onu rotavirus grup A (2/31, %6.5) izlemiştir. Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde ise, gastroenteritli çocuklarda rotavirus pozitiflik oranlarının (çoğu antijen testleri ile alınan sonuçlar olmak üzere) %18-53 arasında olduğu görülmektedir²¹⁻²⁸. Bizim çalışmamızda rotavirus saptanma oranının (%6.5) bu çalışmalardan daha düşük bulunması, kullanılan yöntemlerin farklılığından ve bölgesel farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

Noroviruslar, viral gastroenterit salgınlarına en sık neden olan etkenlerdir^{29,30}. Ancak bu çalışma için örneklerin toplandığı süre içerisinde herhangi bir gastroenterit salgını olmamıştır. Ülkemizde norovirus (NoV) ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, akut gastroenteritli olgularda prevalans ortalama %15 oranında bildirilmekte ve en sık saptanan genogrubun NoV GII olduğu ifade edilmektedir³¹⁻³⁴. Çöl ve arkadaşlarının³⁵ çalışmasında akut gastroenteritli 520 çocuğun 50 (%9.6)'sinde norovirus pozitifliği saptanmış ve bunların %50'sinin 0-24 aylık çocuklar olduğu vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda da, 31 örneğin 8 (%25.8)'inde norovirus varlığı belirlenmiş ve NoV GII'nin predominant olduğu izlenmiştir.

Çalışmamızda değerlendirilen 31 örneğin 1 (%3.2)'inde sapovirus, 1 (%3.2)'inde de astrovirus pozitifliği tespit edilmiştir. Astrovirus oranı; Özdemir ve arkadaşlarının²² çalışmasında %1.7, Mitui ve arkadaşlarının³⁴ çalışmasında Türk hasta grubunda %2.7 olarak belirlenmiştir. Astroviruslar ile ilgili olarak yaptığımız kaynak araştırmasında ülkemize ait başka veriye ulaşılamamıştır. Benzer olarak sapovirus varlığına ilişkin Türkiye'de yapılmış bir çalışmaya da ulaşılamamış ve bu çalışmanın ülkemizde sapovirusun ilk tespit edildiği araştırma olduğu düşünülmüştür. Ancak örnek sayısının azlığı nedeniyle bu oranların daha geniş kapsamlı çalışmalarla desteklenmesinin gerekli olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak, gastroenterit etkeni RNA viruslarının moleküler epidemiyolojik çalışmaları için çalışmamızda kullandığımız primerlerle yapılacak RT-PCR yönteminin etkin bir

şekilde sonuç verdiği gözlenmiştir. RT-PCR yöntemiyle birlikte, dizi analizi yöntemlerinin kombine olarak kullanımı ile, Norwalk virus, Norwalk benzeri viruslar ve gastroenterit ile ilişkili diğer etkenlerin nükleotid dizilerinin karşılaştırılması önemli olabilir. Dolayısıyla, farklı bölgeleri ve tüm yılı kapsayacak şekilde daha fazla sayıda örnekle yapılacak olan çalışmaların, ülkemizde adı geçen virusların gerçek epidemiyolojilerini göstermesi açısından önemli olacağı kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9(4): 247-62.
2. Clark B, McKendrick M. A review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17(5): 461-9.
3. Harvala H, Simmonds P. Human parechoviruses: biology, epidemiology and clinical significance. *J Clin Virol* 2009; 45(1): 1-9.
4. Reuter G, Boros A, Pankovics P. Kobuviruses - a comprehensive review. *Rev Med Virol* 2011; 21(1): 32-41.
5. Nielsen AC, Gyhrs ML, Nielsen LP, et al. Gastroenteritis and the novel picornaviruses aichi virus, cosavirus, saffold virus, and salivirus in young children. *J Clin Virol* 2013; 57(3): 239-42.
6. Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, Nakagomi O. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J Clin Virol* 2013; 56(3): 185-93.
7. Tran A, Talmud D, Lejeune B, et al. Prevalence of rotavirus, adenovirus, norovirus, and astrovirus infections and coinfections among hospitalized children in northern France. *J Clin Microbiol* 2010; 48(5): 1943-6.
8. Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. *J Virol Methods* 2007; 146(1-2): 36-44.
9. Khamrin P, Okame M, Thongprachum A, et al. A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea. *J Virol Methods* 2011; 173(2): 390-3.
10. Wolffs PF, Bruggeman CA, van Well GT, van Loo IH. Replacing traditional diagnostics of fecal viral pathogens by a comprehensive panel of real-time PCRs. *J Clin Microbiol* 2011; 49(5): 1926-31.
11. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28(3): 495-503.
12. Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods* 2003; 114(1): 37-44.
13. Yan H, Nguyen TA, Phan TG, Okitsu S, Li Y, Ushijima H. Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and C rotaviruses in diarrheal fecal specimens from children in China. *Kansenshogaku Zasshi* 2004; 78(8): 699-709.
14. Pham NT, Trinh QD, Chan-It W, et al. A novel RT-multiplex PCR for detection of Aichi virus, human parechovirus, enteroviruses, and human bocavirus among infants and children with acute gastroenteritis. *J Virol Methods* 2010; 169(1): 193-7.
15. Musich PR, Chu W. A hot alkaline plasmid DNA miniprep method for automated DNA sequencing protocols. *Biotechniques* 1993; 14(6): 958-60.
16. Vuran E, Karaarslan A, Karasartova D, Turegun B, Sahin F. Identification of malassezia species from pityriasis versicolor lesions with a new multiplex PCR method. *Mycopathologia* 2014; 177(1-2): 41-9.
17. Dennis AF, McDonald SM, Payne DC, et al. Molecular epidemiology of contemporary G2P[4] human rotaviruses co-circulating in a single U.S. community: Footprints of a globally transitioning genotype. *J Virol* 2014; 88(7): 3789-801.

18. Kindler E, Trojnar E, Heckel G, Otto PH, John R. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. *Infect Genet Evol* 2013; 14: 58-67.
19. Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, et al. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 2002; 186(1): 1-7.
20. Jakab F, Walter JE, Berke T, Matson DO, Mitchell DK, Szucs G. Molecular characterization and sequence analysis of human astroviruses circulating in Hungary. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 39(2): 97-102.
21. Gül M, Garipardıç M, Çırağıl P, Aral M, Karabiber H, Güler İ. 0-5 yaş arası gastroenteritli çocuklarda rotavirüs ve adenovirüs tip 40/41 araştırılması. *Ankem Derg* 2005; 19(2): 64-7.
22. Özdemir S, Delialioğlu N, Emekdas G. Investigation of rotavirus, adenovirus and astrovirus frequencies in children with acute gastroenteritis and evaluation of epidemiological features. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(4): 571-8.
23. Tapisiz A, Karahan ZC, Çiftçi E, İnce E, Doğru Ü. Changing patterns of rotavirus genotypes in Turkey. *Curr Microbiol* 2011; 63(6): 517-22.
24. Meral M, Bozdayı G, Ozkan S, Dalgıç 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.
25. Akan H, İzırak G, Gürol Y, 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.
26. Ceyhan M, Alhan E, Salman N, et al. Multicenter prospective study on the burden of rotavirus gastroenteritis in Turkey, 2005-2006: a hospital-based study. *J Infect Dis* 2009; 200 (Suppl 1): S234-8.
27. Cataloluk O, Iturriza M, Gray J. Molecular characterization of rotaviruses circulating in the population in Turkey. *Epidemiol Infect* 2005; 133(4): 673-8.
28. Karadağ A, Acikgoz ZC, Avci Z, et al. Childhood diarrhoea in Ankara, Turkey: epidemiological and clinical features of rotavirus-positive versus rotavirus-negative cases. *Scand J Infect Dis* 2005; 37(4): 269-75.
29. Uyar Y, Carhan A, Ozkaya E, Ertek M. Evaluation of laboratory diagnosis of the first norovirus outbreak in Turkey in 2008. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(4): 607-15.
30. Bitler EJ, Matthews JE, Dickey BW, Eisenberg JN, Leon JS. Norovirus outbreaks: a systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles. *Epidemiol Infect* 2013; 141(8): 1563-71.
31. Altindis M, Bányaı K, Kalaycı R, et al. Frequency of norovirus in stool samples from hospitalized children due to acute gastroenteritis in Anatolia, Turkey, 2006-2007. *Scand J Infect Dis* 2009; 41(9): 685-8.
32. Ozkul AA, Kocazeybek BS, Turan N, et al. Frequency and phylogeny of norovirus in diarrheic children in Istanbul, Turkey. *J Clin Virol* 2011; 51(3): 160-4.
33. Altay A, Bozdayı G, Meral M, et al. Investigation of norovirus infection incidence among 0-5 years old children with acute gastroenteritis admitted to two different hospitals in Ankara, Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(1): 98-108.
34. Mitui MT, Bozdayı G, Ahmed S, Matsumoto T, Nishizono A, Ahmed K. Detection and molecular characterization of diarrhea causing viruses in single and mixed infections in children: A comparative study between Bangladesh and Turkey. *J Med Virol* 2013 [Epub ahead of print].
35. Cöl D, Biçer S, Ciler Erdağ G, et al. Annual report on norovirus in children with acute gastroenteritis in 2009 and their genotypes in Turkey. *Infec Med* 2013; 21(4): 261-9.