

# Akut Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Hastalarda Solunum Viruslarının Prevalansı ve Mevsimsel Dağılımı, 2002-2014\*

## Prevalence and Seasonal Distribution of Respiratory Viruses in Patients with Acute Respiratory Tract Infections, 2002-2014

Candan ÇİÇEK<sup>1</sup>, Ayşe ARSLAN<sup>1</sup>, Haydar Soydaner KARAKUŞ<sup>2</sup>, Mehmet YALAZ<sup>3</sup>, Eylem Ulaş SAZ<sup>3</sup>, Hüsnü PULLUKÇU<sup>4</sup>, Gürsel ÇOK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>1</sup> Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>2</sup> Ege University Faculty of Medicine, Department of Chest Diseases, Izmir, Turkey.

<sup>3</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>3</sup> Ege University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Izmir, Turkey.

<sup>4</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>4</sup> Ege University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Izmir, Turkey.

\* Bu çalışma, XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (12-16 Kasım 2014, Antalya)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 09.01.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 09.02.2015

### ÖZ

Bu çalışmanın amacı, yaklaşık 12 yıllık sürede, üst ve alt solunum yolu enfeksiyonu semptomları ile hastaneye başvuran, ayaktan veya yatarak izlenen, çocuk ve erişkin hastalarda solunum viruslarının prevalansının ve mevsimsel dağılımının belirlenmesidir. Çalışmada, 1 Ocak 2002-17 Temmuz 2014 tarihleri arasında laboratuvarımızda incelenen 5102 klinik örnek (4372 nazofarengeal sürüntü, 316 bronkoalveoler lavaj, 219 transtrakeal aspirat, 163 nazofarengeal aspirat, 20 balgam, 10 burun sürüntüsü) retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Örneklerin 1107 (%21.7)'si poliklinik, 3995 (%78.3)'ü yatan hastalara aittir. Hastaların 2251 (%44.1)'i kadın, 2851 (%55.9)'ü erkek olup, 1233 (%24.2)'ü erişkin ve 3869 (%75.8)'ü çocuk olgudan oluşmaktadır (yaş aralığı: 1 gün - 93 yıl; medyan: 3 yıl). Solunum yolu örnekleri; solunum sinsityal virüsü (RSV), influenza virus tip A ve B (INF-A, INF-B), adenovirus (AdV), parainfluenza viruslar (PIV tip 1-4), insan rinovirusları (HRV), insan koronavirusları (HCoV), insan metapnömovirusu (HMPV) ve insan bokavirusu (HBoV) varlığı açısından araştırılmıştır. Tüm örnekler; hem direkt immünofloresan antikor (DFA) hem de *shell vial* hücre kültürü (SVHK) yöntemleri uygulanmıştır. DFA yönteminde

**İletişim (Correspondence):** Prof. Dr. Candan Çiçek, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 390 2993, **E-posta (E-mail):** candanc2001@yahoo.com

örnekler önce floresanla işaretli poliklonal antikorların kullanıldığı kit ile taranmış, pozitif sonuç verenler monoklonal antikorların kullanıldığı kit (Light Diagnostics, Merck Millipore, ABD) ile tiplendirilmiştir. SVHK yönteminde virusların izolasyonu için HEp-2, MDCK, A-549 ve Vero hücre dizieleri kullanılmıştır. Bu yöntemlere ek olarak, 2007-2014 yılları arasında gelen klinik örnekler (n= 2104), gerçek zamanlı multiplex polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi de (RealAccurate®, Respiratory RT PCR, PathoFinder, Hollanda ve Seeplex® RV15 ACE Detection, Seegene, Güney Kore) uygulanmıştır. Çalışmamızda, 967 (%19)'si erkek, 738 (%14.4)'i kadın olmak üzere toplam 1705 (%33.4) hastada solunum virusları tespit edilmiştir. Hastaların %18.6 (318/1705)'sının birden fazla solunum virusu ile enfekte olduğu belirlenmiş; çoklu etken enfeksiyonlarında en sık RSV + INF-A (40/318; %12.6) ve RSV + PIV (33/318; %10.4) birlikteliği gözlenmiştir. Pediatrik grupta solunum viruslarının pozitiflik oranı %35.4 (1369/3869), erişkin grupta ise %27.3 (336/1233) olarak saptanmıştır (p< 0.000). Çocuk hastalarda en sık saptanan solunum virusu RSV (336/1369; %24.5) olmuş, bunu influenza virusları (314/1369; %22.9), PIV (197/1369; %14.4), HRV (118/1369; %8.6), AdV (75/1369; %5.5) ve diğerleri (49/1369; %3.6) izlemiştir. Erişkin hastalarda ise ilk sırayı influenza virusları (181/336; %53.8) almış; AdV %11 (37/336), RSV %7.1 (24/336), PIV %7.1 (24/336), HRV %6.8 (23/336) ve diğer viruslar %2.7 (9/336) oranında tespit edilmiştir. Çoklu enfeksiyon oranı çocuklarda %7.2 (280/3869), erişkinlerde ise %3 (38/1233) olarak saptanmış; çoklu enfeksiyonların %88 (280/318)'i pediatrik grupta görülmüştür. Solunum virusları, poliklinik hastalarının %40.2 (445/1107)'sinde, yatan hastaların %31.5 (1260/3995)'inde pozitif olarak bulunmuştur (p< 0.000). Pediatri poliklinik hastalarında en sık HRV, servis hastalarında en sık RSV saptanırken; erişkinler için hem poliklinik hem de servis hastalarında en sık influenza virusları tespit edilmiştir. Çalışma döneminde, Aralık 2004-Nisan 2005 tarihleri arasında PIV-3 salgını (n= 96), Kasım 2009-Ocak 2010 tarihleri arasında ise influenza A (H1N1)pdm09 salgını (n= 207) ortaya çıkmıştır. Mevsimsel dağılıma bakıldığında; pozitif bulunan 1705 solunum virusunun %44.4'ü kış, %27'si ilkbahar, %8.3'ü yaz ve %20.3'ü sonbahar aylarında izole edilmiştir. RSV'nin Aralık-Mart; influenza viruslarının Kasım-Mart, HRV'nin Kasım-Haziran ve çoklu etken enfeksiyonlarının Ocak-Şubat ayları arasında yoğunluk gösterdiği izlenmiştir. Sonuç olarak, yaklaşık 12 yıllık süre içinde elde edilen verilere göre, bölgemizde akut solunum yolu enfeksiyonlarında solunum viruslarının prevalansı %33.4 olarak bulunmuş, solunum viruslarının genellikle kış ve erken ilkbahar aylarında aktif olduğu izlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Solunum yolu enfeksiyonu; solunum virusları; prevalans; epidemiyoloji.

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the prevalence and seasonal distribution of respiratory viruses in pediatric and adult outpatients and inpatients who were admitted to hospital with the symptoms of upper and lower respiratory tract infections, during a 12-year period. A total of 5102 clinical samples (4372 nasopharyngeal swabs, 316 bronchoalveolar lavages, 219 transtracheal aspirates, 163 nasopharyngeal aspirates, 20 sputum, 10 nasal swabs) examined in our laboratory between January 1<sup>st</sup> 2002 and July 17<sup>th</sup> 2014, were evaluated retrospectively. Of the specimens, 1107 (21.7%) were obtained from outpatients and 3995 (78.3%) from hospitalized patients. Of the patients, 2851 (55.9%) were male and 2251 (44.1%) were female, while 1233 (24.2%) were adults and 3869 (75.8%) were children (age range: 1 day - 93 years; median: 3 years). Respiratory samples were investigated for the presence of respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus type A and B (INF-A, INF-B), adenovirus (AdV), parainfluenza viruses (PIV types 1-4), human rhinoviruses (HRV), human coronaviruses (HCoV), human metapneumovirus (HMPV) and human bocavirus (HBov). All specimens were tested by both direct immunofluorescence antibody (DFA) and shell vial cell culture (SVCC) methods. In DFA assay the samples were initially screened by fluorescent-labeled polyclonal antibodies, and the positive ones were typed by using monoclonal antibodies (Light Diagnostics, Merck Millipore, USA). In SVCC, HEp-2, MDCK, A-549 and Vero cell lines were used for the isolation of viruses. In addition to these methods, real-time multiplex PCR methods (RealAccurate®, Respiratory RT PCR, PathoFinder, Netherlands and Seeplex® RV15 ACE Detection, Seegene, South Korea) were used for the detection of respiratory viruses

in samples (n= 2104) obtained from 2007 to 2014. Respiratory viruses were detected in a total of 1705 (33.4%) patients, of them 967 (19%) were male and 738 (14.4%) were female. Three hundred and eighteen (18.6%) of the 1705 patients were infected with multiple respiratory viruses. The most frequently observed co-infections were RSV+INF-A (40/318; 12.6%), and RSV+PIV (33/318; 10.4%). The rate of positivity for the respiratory viruses in pediatric and adult groups were 35.4% (1369/3869) and 27.3% (336/1233), respectively (p< 0.000). The most frequently detected virus in pediatric group was RSV (336/1369; 24.5%), followed by influenza viruses (314/1369; 22.9%), PIV (197/1369; 14.4%), HRV (118/1369; 8.6%), AdV (75/1369; 5.5%) and the others (49/1369; 3.6%). On the other hand the most frequently detected virus in adult group was influenza viruses (181/336; 53.8%) followed by AdV (37/336; 11%), RSV (24/336; 7.1%), PIV (24/336; 7.1%), HRV (23/336; 6.8%) and the others (9/336; 2.7%). The rate of multiple virus infections in pediatric and adult groups were 7.2% (280/3869) and 3% (38/1233), respectively. Most of the coinfections (280/318; 88%) were detected in children. Respiratory viruses were detected positive in 40.2% (445/1107) of outpatients, and in 31.5% (1260/3995) of inpatients (p< 0.000). The most frequent viruses detected in pediatric outpatients and inpatients were HRV and RSV, respectively, while influenza viruses were the first in line among both adult outpatients and inpatients. During the study period, a PIV-3 outbreak (n= 96) have emerged between December 2004-April 2005, and an influenza A (H1N1)pdm09 outbreak (n= 207) between November 2009-January 2010. When the seasonal distribution was considered, the isolation rates of 1705 respiratory viruses in winter, spring, summer and autumn were 44.4%, 27%, 8.3% and 20.3%, respectively. RSV was most frequently detected from December to March, influenza viruses from November to March, HRV from December to June, and mixed infections from January to February. In conclusion, the data of our study obtained in about 12-year period indicated that the prevalence of respiratory viruses in acute respiratory infections is 33.4%, and they typically active during the months of winter and early spring in our region.

**Keywords:** Respiratory tract infections; respiratory viruses; prevalence; epidemiology.

## GİRİŞ

Dünyada solunum yolu enfeksiyonları (SYE), erişkin ve çocuklarda morbidite ve mortalitenin ilk dört nedeni arasında yer almaktadır. Özellikle çocuklarda yıl içinde tekrarlayan SYE, hem hastane enfeksiyonlarına neden olmakta hem de halk sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. SYE'na bakteri, virus ve parazitler neden olabilmekte birlikte, bu enfeksiyonların yaklaşık %20-60'ında virusların etken olduğu bildirilmiştir<sup>1-3</sup>. Akut SYE'nda solunum viruslarına ait epidemiyolojik veriler, ülkelere göre mevsimsel farklılıklar gösterdiği gibi, viral patojenlerin saptanmasında kullanılan yöntemlere göre de değişiklikler göstermektedir. Solunum sinsityal virusu (RSV), influenza tip A ve B (INF-A, INF-B), adenovirus (AdV), parainfluenza virus tip 1-3 (PIV 1-3) ve insan metapnömovirusu (HMPV) direkt floresan antikor (DFA) ve hücre kültürü yöntemleri ile saptanabilirken; moleküler yöntemler kullanıldığında, bu patojenlere ek olarak insan rinovirusları (HRV), insan koronavirusları (HCoV; OC43, HKU1, 229E, NL63), insan bokavirüsü (HBoV), PIV tip 4 ve RSV'nin A ve B serotipi ayrı olarak tanımlanabilmektedir. HMPV, HCoV ve HRV gibi solunum virusları hücre kültüründe geç ve güç üredikleri için genellikle bunların mikrobiyolojik tanılarında moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Son yıllarda, solunum viruslarının aynı anda saptandığı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (M-PCR) yöntemleri yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır<sup>4,5</sup>. Solunum viruslarının epidemiyolojisine yönelik daha önce yapılan araştırmaların çoğunda, alt solunum yolu enfeksiyonu

olan ve hastanede yatan pediatrik hastalarla ilgili veriler ağırlıkta olup, poliklinik hastaları ve erişkinlerle ilgili veriler daha az sayıdadır<sup>6-10</sup>. Bu çalışmada, yaklaşık 12 yıllık sürede, üst ve alt solunum yolu enfeksiyonu semptomları ile hastaneye başvuran, ayakta veya yatarak izlenen, çocuk ve erişkin hastalarda solunum viruslarının sıklığının ve mevsimsel dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, 1 Ocak 2002-17 Temmuz 2014 tarihleri arasında rutin viroloji laboratuvarına gelen klinik örneklerin arşiv materyali ile gerçekleştirildi. Çalışmada, üst (ÜSYE) veya alt (ASYE) solunum yolu enfeksiyonu olan 1233 (%24.2)'ü erişkin, 3869 (%75.8)'ü çocuk, yaş aralıkları 1 gün ile 93 yıl (medyan: 3 yıl) arasında değişen toplam 5102 [2251 (%44.1) kadın, 2851 (%55.9) erkek] hasta değerlendirildi. Solunum yolu örneklerinin 1107 (%21.7)'si poliklinik, 3995 (%78.3)'i yatan hastalardan alındı. Poliklinik hastalarının örnekleri ÜSYE ön tanısı ile, yatan hastaların örnekleri ise larenjit, bronşit, bronşiyolit ve pnömoni ön tanısı ile kabul edildi. Klinik örneklerin 4372 (%85.7)'si nazofarengeal sürüntü (NFS); 316 (%6.2)'si bronkoalveoler lavaj (BAL); 219 (%4.3)'ü transtrakeal aspirat (TTA), 163 (%3.2)'ü nazofarengeal aspirat (NFA), 20 (%0.4)'si balgam ve 10 (%0.2)'ü burun sürüntüsü (BS) idi. NFS ve BS örnekleri viral taşıma besiyeri (UTM, Copan Diagnostics, İtalya) içinde; BAL NFA, TTA ve balgam örnekleri ise steril taşıma kabında soğuk zincir kurallarına uyularak laboratuvara gönderildi. Örnekler vortekslendikten sonra 2000xg'de, 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, hücre kültürü ve M-PCR testinde; dipteki çökelti ise DFA testinde kullanıldı. Laboratuvara ulaşan ve hemen test uygulanmayacak örnekler -80°C'de saklandı.

### Direkt Floresan Antikor (DFA) Yöntemi

Örneklerin santrifüj edilmesini takiben dipte kalan çökeltiden alınan 100 µl örnek, 1000xg'de 5 dakika sitospinlendi. Örnekler özel lam üzerine konularak -20°C'de 10 dakika asetonda fikse edildi ve sonra floresan izotiyosyanat (FITC) ile işaretli poliklonal antikorlar (Respiratory Viral Screen and Identification DFA Kit, Light Diagnostics, Merck Millipore, ABD) ile boyandı. Preparatlar CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de, 30 dakika, nemli ve karanlık ortamda inkübe edildi ve sonra floresan mikroskopunda incelendi. Üç pozitif (+++) veya daha fazla floresan veren hücre görülen örnekler pozitif olarak kabul edildi ve RSV, AdV, INF-A, INF-B ve PIV 1-3 monoklonal antikorları ile yukarıda tarif edildiği gibi tekrar boyanarak tiplendirildi<sup>11</sup>.

### Shell vial Hücre Kültürü (SVHK)

Her örnek için, HEp-2, Vero, A-549 ve iki MDCK hücre dizisinden oluşan beş adet *shell vial* tüpü hazırlandı. Süpernatandan her hücre dizisine 0.2 ml inoküle edildikten sonra tüpler 3200xg'de, 35°C'de 30 dakika santrifüj edildi; 37°C'de 1 saat bekletildi ve daha sonra hücre dizileri üstündeki sıvı atılarak yerine 1 ml izolasyon besiyeri eklendi. Tüpler, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ve nemli ortamda 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplerden kültür sıvısı uzaklaştırıldı ve *shell vial*'ler -20°C'de 10 dakika asetonda fikse edildi. HEp-2 hücre dizisine inoküle edilen örnek RSV, A-549 hücre dizisi AdV, Vero hücre dizisi

PIV 1-3, MDCK hücre dizilerinin biri INF-A, diğeri INF-B'ye özgül FITC ile işaretli monoklonal antikorlar (Millipore, Light Diagnostic, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda boyandı<sup>11,12</sup>.

### Multipleks PCR (M-PCR)

Yaklaşık yedi yıllık sürede, virüsleri bir veya iki reaksiyonda multipleks olarak çoğaltan iki ayrı M-PCR kiti kullanıldı. Buna göre, 2007-2011 yılları arasında gelen 906 örnek ABI 7500 (Applied Biosystems, ABD) sisteminde gerçek zamanlı PCR temelli bir kit ile (Real Accurate<sup>®</sup> Respiratory RT PCR, PathoFinder, Hollanda); 2012-2014 yılları arasında gelen 1198 örnek ise otomatize poliakrilamid jel elektroforezini kullanan Screen Tape çoklu tanımlama sistemi ile (Seeplex<sup>®</sup> RV15 ACE Detection, Seegene, Güney Kore) değerlendirildi. Ayrıca birinci dönemde kullanılan M-PCR yöntemi ile influenza A (H1N1)pdm09 (H1N1) saptanamadığı için, Ekim 2009-Mart 2010 tarihleri arasında gelen örneklerin tümüne (n= 1044) H1N1 kantitatif gerçek zamanlı PCR (Invitrogen Corporation, ABD) testi de uygulandı.

Birinci dönemde klinik örneklerden nükleik asitlerin ekstraksiyonu RTP DNA/RNA Virus Mini Kit (Invitex GmbH, Almanya) ile yapıldıktan sonra TaqMan primer ve problemleri [5' ucunda 6-karboksifloresan (FAM; florofor), 3' ucunda tetrametilrodamin (TAMRA; quencher) ile işaretli], enzim, dNTP, Qiagen One Step RT-PCR solüsyonu ve dH<sub>2</sub>O karışımı örnek nükleik asidi ile yaklaşık 40 döngü yapıldı. Bu işlemle, cDNA'lar sentezlendi ve amplikonlar oluşturuldu. Amplikonların saptanmasında ABI 7500 sistemiyle floresans ışımalar ölçüldü. Testte, FAM floresans sinyali elde edilen örnek sonuçları pozitif 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. Örnekte, internal kontrolde ve/veya pozitif kontrollerde floresans yoksa test geçersiz kabul edildi ve tekrar edildi.

Ekim 2009-Mart 2010 tarihleri arasında gelen klinik örneklerden H1N1 virusunun ekstraksiyonunda, üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırma materyali ile birlikte iPrep PureLink Total RNA ve TRIzol Plus Kit (Invitrogen Corporation, ABD) kullanıldı. Haziran 2009'da CDC'nin<sup>13</sup> önerdiği primer ve prob setleri (Influenza A H1N1 primer and probe set, SuperScript<sup>™</sup> III Platinum<sup>®</sup> One-Step qRT-PCR kit Invitrogen Corporation, ABD) kullanılarak ABI 7500 sisteminde etken çoğaltıldı. Test protokolü, WHO Global Influenza Programme sitesinde yer alan öneriler doğrultusunda uygulandı<sup>13</sup>.

İkinci dönemde, nükleik asitlerin ekstraksiyonu, Viral DNA/RNA Extraction Kit (iNTRON, Güney Kore) ile yapıldı. Ekstraksiyon işleminden itibaren reaksiyona internal kontroller ilave edildi. Ekstraksiyon işleminden sonra, ters transkripsiyon ile cDNA'lar sentezlendi (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits, Fermentas, ABD). İçeriğinde; solunum virüslerine özgül DPO primerleri, DNA polimeraz enzimi, dNTPs, ana karışım (master-mix) ve 8-MOP solüsyonu bulunan Seeplex RV15 ACE Screening Kit (Seegene, Güney Kore) kullanılarak ısı döngü cihazında üretici firmanın önerileri doğrultusunda 40 döngü yapılarak cDNA'lar çoklu amplifiye edildi. Amplifiye ürün tam otomatize Screen Tape

çoklu tanımlama cihazına yüklendi. Bu cihazda, PCR ürününe otomatize poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve sonuçlar RV15 ACE Screening Software kullanılarak belirlendi.

Her iki testte de pozitif kontrol RNA'sı için kit içeriğinde bulunan hedef nükleik asitler ve standart pozitif kontroller; negatif kontrol olarak ise RNaz içermeyen (RNase free) su kullanıldı. Her iki yöntemle RSV, INF-A ve INF-B, PIV 1-4, AdV, HRV, HCoV ve HMPV üretici firmanın önerileri doğrultusunda saptandı. İkinci dönem kullanılan RV15 ACE Screening Kit ile diğer solunum viruslarına ek olarak HBoV da saptandı.

### İstatistiksel Analiz

Oranların belirlenmesi ve ki-kare testi (Pearson Chi-Square), SPSS v.21 kullanılarak yapıldı.

### BULGULAR

Çalışmamızda, yaklaşık 12 yıllık süre içinde değerlendirilen solunum örneklerinin 1705 (%33.4)'i pozitif, 3397 (%66.6)'si negatif bulunmuştur. Hastaların %5.5'inde ikili, %0.7'sinde üçlü, %0.07'sinde ise dördü etken saptanmıştır (Tablo I). Çoklu etken bulunan örneklerin %87.7'si çocuklara (medyan: 1 yıl), %12.3'ü erişkin hastalara aittir. Çoklu etkenlerle oluşan enfeksiyonların %57.5'i erkeklerde saptanmıştır. İkili etkenler arasında RSV ve INF-A birlikteliği %12.6 (n= 40), RSV ve PIV birlikteliği ise %10.4 (n= 33) oranında izlenmiştir. Üçlü etkenler arasında RSV, INF-A ve PIV birlikteliği %14.3 (n= 5); ADV, HBoV ve HRV birlikteliği ise %11.4 (n= 4) oranında belirlenmiştir (Tablo II).

Pediyatrik grubun %35.4'ünde, erişkin grubun ise %27.3'ünde bir veya birden fazla solunum virusu pozitifliği belirlenmiştir (p< 0.000). Değerlendirme döneminde; Aralık 2004-Nisan 2005 tarihleri arasında PIV-3 salgını (n= 96), Kasım 2009-Ocak 2010 tarihleri arasında ise H1N1 salgını (n= 207, biri Adv ile ikili etken) ortaya çıkmıştır<sup>14,15</sup> (Tablo I, II).

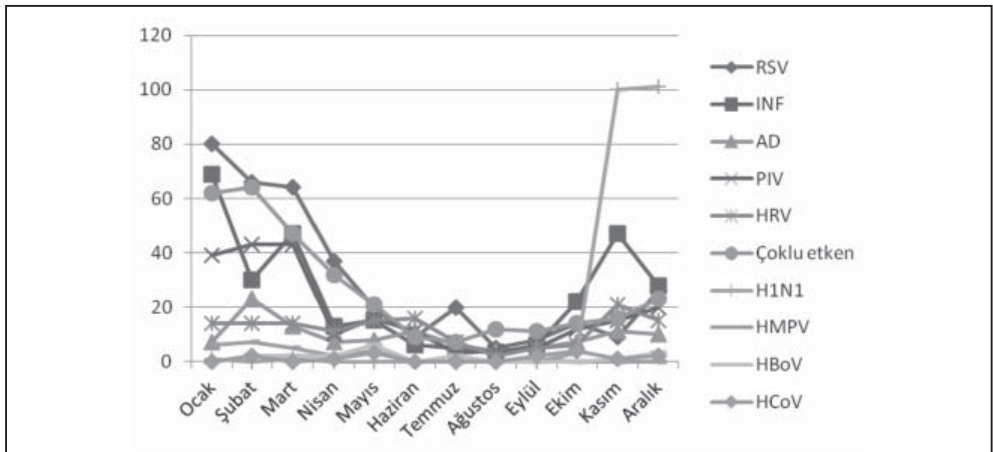
Solunum virusları, poliklinik hastalarının %40.2 (445/1107)'sinde ve yatan hastaların %31.5 (1260/3995)'inde pozitif bulunmuştur (p< 0.000). Bu oranlar pediyatrik grup için sırasıyla, %43.5 (293/673) ve %33.7 (1076/3196) (p< 0.000); erişkin grup için ise sırasıyla, %35 (152/434) ve %23 (184/799) (p< 0.000) olarak saptanmıştır. Pediyatri poliklinik hastalarında en sık HRV, servis hastalarında en sık RSV saptanırken, erişkinler için hem poliklinik hem de servis hastalarında en sık influenza virusları tespit edilmiştir (Tablo III). Çoklu etken enfeksiyonlarının %7 (285/3995)'si yatan, %3 (33/1107)'ü poliklinik hastalarında görülmüştür. Pediyatrik ve erişkin gruplarda poliklinik ve yatan hastalara göre solunum viruslarının dağılımı Tablo III'de sunulmuştur.

Pozitif bulunan 1705 solunum virusunun %44.4'ü kış, %27'si ilkbahar, %8.3'ü yaz ve %20.3'ü sonbahar aylarında izole edilmiştir. Çoklu etken enfeksiyonlarının, kış, ilkbahar, yaz ve sonbahar aylarında saptanma oranları sırasıyla; %46.9, %31.4, %8.8 ve %12.9 olarak belirlenmiştir. Cinsiyete göre dağılım incelendiğinde; solunum viruslarının 967 (%19) erkek ve 738 (%14.5) kadın hastadan izole edildiği izlenmiştir (p< 0.000). Solunum viruslarının mevsimlere göre dağılımı Şekil 1'de, cinsiyete göre dağılımı ise Şekil 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 1. Üst veya Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Hastalarda Solunum Virüslerinin Dağılımı**

Virüsler	Çocuk, n (%)	Erişkin, n (%)	Toplam, n (%)*
RSV	336 (8.7)	24 (1.9)	360 (7)
INF-A	169 (4.7)	81 (6.6)	250 (4.9)
INF-A (H1N1)pdm09**	117 (3)	89 (7.2)	206 (4)
INF-B	28 (0.7)	11 (0.9)	39 (0.8)
AdV	75 (1.9)	37 (3)	112 (2.2)
PIV (Tiplendirilemeyen)	51 (1.3)	11 (0.9)	62 (1.2)
PIV-1	11 (0.3)	2 (0.2)	13 (0.3)
PIV-2	1 (0.03)	0	1 (0.01)
PIV-3**	129 (3.3)	10 (0.8)	139 (2.7)
PIV-4	5 (0.1)	1 (0.1)	6 (0.1)
HRV	118 (3)	23 (1.9)	141 (2.8)
HCoV	13 (0.3)	2 (0.2)	15 (0.3)
HBoV	13 (0.3)	5 (0.4)	18 (0.4)
HMPV	23 (0.6)	2 (0.2)	25 (0.5)
İkili etken	249 (6.4)	30 (2.4)	279 (5.5)
Üçlü etken	27 (0.7)	8 (0.6)	35 (0.7)
Dörtlü etken	4 (0.1)	0	4 (0.07)
Toplam pozitif	1369 (35.4)	336 (27.3)	1705 (33.4)
Toplam negatif	2500 (64.6)	897 (72.7)	3397 (66.6)
Genel toplam	3869 (100)	1233 (100)	5102 (100)

\* Sütun yüzdesidir; \*\* 14 ve 15 no'lu kaynaklarda yayınlanmıştır. RSV: Solunum sinsityal virüsü; INF-A: İnfluenza A virüsü; INF-B: İnfluenza B virüsü; AdV.; Adenovirüs; PIV: Parainfluenza virüsü; HRV: İnsan rinovirüsü, HCoV: İnsan koronavirusu; HBoV: İnsan bokavirüsü, HMPV: İnsan metapnömovirüsü



**Şekil 1. Solunum virüslerinin mevsimlere göre dağılımı [RSV: Solunum sinsityal virüsü; INF-A: İnfluenza A virüsü; INF-B: İnfluenza B virüsü; H1N1: İnfluenza A (H1N1)pdm09; AdV.; Adenovirüs; PIV: Parainfluenza virüsü; HRV: İnsan rinovirüsü, HCoV: İnsan koronavirusu; HBoV: İnsan bokavirüsü, HMPV: İnsan metapnömovirüsü].**

Tablo II. Solunum Viruslarının Tekli ve Çoklu Etken Enfeksiyonlarındaki Dağılımı

Virus (Toplam sayı)	Tekli enfeksiyon, n	Ko-enfeksiyon, n (%)	RSV	INF-A	H1N1*	INF-B	AdV	PIV	HRV	HCoV	HBoV	HMPV
RSV (564)	360	204 (36.1)	50	-	10	32	41	40	5	10	16	
INF-A (378)	250	128 (33.8)	50	-	-	11	14	36	4	4	9	
H1N1* (207)	206	1 (0.4)	-	-	-	1	-	-	-	-	-	
INF- B (61)	39	22 (36)	10	-	-	2	4	3	-	1	2	
AdV (202)	112	90 (44.5)	32	11	1	2	12	14	-	12	6	
PIV (313)	221	92 (29.3)	41	14	-	4	12	12	-	1	8	
HRV (286)	141	145 (50.6)	40	36	-	3	14	12	7	19	14	
HCoV (34)	15	19 (55.8)	5	4	-	-	-	7	3	-	-	
HBoV (70)	18	52 (74.2)	10	4	-	1	12	1	19	3	2	
HMPV (82)	25	57 (69.5)	16	9	-	2	6	8	14	-	2	

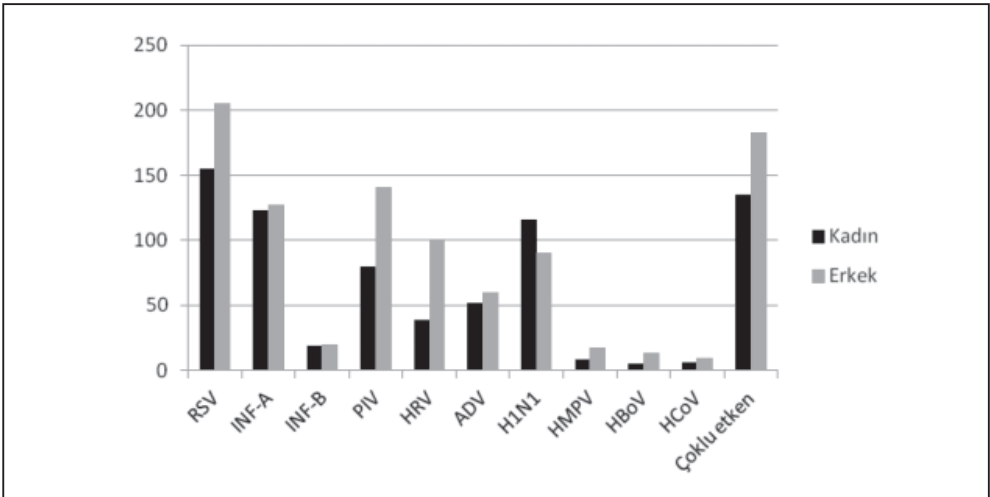
\* Influenza A (H1N1)pdm09; RSV: Solunum sinsiyal virusu; INF-A: influenza A virusu; INF-B: Influenza B virusu; AdV: Adenovirus; PIV: Parainfluenza virus; HRV: İnsan rino-  
virusu, HCoV: İnsan koronavirüsü; HBoV: İnsan bokavirüsü, HMPV: İnsan metapnömovirüsü



**Tablo III. Pediatrik ve Erişkin Gruplarda Poliklinik ve Yatan Hastalara Göre Solunum Virüslerinin Dağılımı**

Virüsler	Pediatrik grup			Erişkin grup		
	Poliklinik n (%)*	Servis n (%)*	Toplam n	Poliklinik n (%)*	Servis n (%)*	Toplam n
RSV	35 (10)	301(90)	336	1 (4)	23 (96)	24
INF-A	20 (12)	149 (88)	169	41 (51)	40 (49)	81
INF-B	7 (25)	21 (75)	28	1 (9)	10 (91)	11
H1N1	83 (71)	34 (29)	117	61 (69)	28 (31)	89
AdV	7 (9)	68 (91)	75	21 (57)	16 (43)	37
PIV	29 (15)	168 (85)	197	3 (13)	21 (87)	24
HRV	85 (72)	33 (28)	118	14 (61)	9 (39)	23
HMPV	2 (9)	21 (91)	23	0	2 (100)	2
HCoV	0	13 (100)	13	1 (50)	1 (50)	2
HBoV	0	13 (100)	13	1 (20)	4 (80)	5
Çoklu etken	25 (9)	255 (91)	280	8 (21)	30 (79)	38
Toplam pozitif	293 (21)	1076 (79)	1369	152 (45)	184 (55)	336
Toplam negatif	380 (15)	2120 (85)	2500	282 (31)	615 (69)	897
Genel toplam	673 (17)	3196 (83)	3869	434 (35)	799 (65)	1233

\* Satır yüzdesidir; yüzdeler tam sayıya yuvarlanmıştır. RSV: Solunum sinsityal virüsü; INF-A: İnfluenza A virüsü; INF-B: İnfluenza B virüsü; H1N1: İnfluenza A (H1N1)pdm09; AdV: Adenovirüs; PIV: Parainfluenza virüsü; HRV: İnsan rinovirüsü, HCoV: İnsan koronavirüsü; HBoV: İnsan bokavirüsü, HMPV: İnsan metapnömovirüsü



**Şekil 2. Solunum virüslerinin cinsiyete göre dağılımı [RSV: Solunum sinsityal virüsü; INF-A: İnfluenza A virüsü; INF-B: İnfluenza B virüsü; H1N1: İnfluenza A (H1N1)pdm09; AdV: Adenovirüs; PIV: Parainfluenza virüsü; HRV: İnsan rinovirüsü, HCoV: İnsan koronavirüsü; HBoV: İnsan bokavirüsü, HMPV: İnsan metapnömovirüsü].**

## TARTIŞMA

Viral solunum yolu enfeksiyonları (SYE), önemli morbidite ve mortalite nedeni olup, halk sağlığı sorunlarının başında yer almaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde mortalitenin yüksek olduğu ve 5 yaş altı çocuklarda yılda 5 milyon kişinin ölümüne yol açtığı

tahmin edilmektedir. Virus kaynaklı SYE, çocuklarda erişkinlere göre 2-3 kat daha fazla oranda görülmektedir<sup>3,16</sup>. Bu çalışmada, yaklaşık 12 yıllık sürede akut solunum yolu enfeksiyonu şikayetleriyle hastaneye başvuran hastalarda solunum viruslarının sıklığı araştırılmış ve mevsimsel dağılımı belirlenmiştir. Çalışmamızda, SYE'nin %33.4'ünde viral etkenler saptanmış; pediatrik grupta (%35.4) erişkin gruba (%27.3) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde solunum virusları daha yüksek bulunmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda pediatrik grupta solunum viruslarının pozitiflik oranları %30-96 arasında değişmektedir<sup>17,18</sup>. Özellikle 2 yaş altı ve ASYE olan hastalarda solunum virusları daha yüksek oranlarda saptanmakta; pediatrik grupta toplumdan kazanılmış pnömoni olgularında %43-67 oranında solunum viruslarının etken olduğu bildirilmektedir<sup>19</sup>. Ülkemizde yapılan çalışmalarda solunum viruslarının pozitiflik oranları, ÜSYE olan çocuklarda %29.8, ASYE olan çocuklarda ise %34.4-67.8 arasında değişmektedir<sup>8-10,20</sup>. Erişkin grupta yapılan araştırmalarda da, ÜSYE olan hastalarda %45, toplumdan kazanılmış pnömoni olgularında %15-56 oranında solunum virusları saptanmıştır<sup>18,19</sup>. Bizim çalışmamızda pediatri poliklinik hastalarında %43.5, yatan hastalarda %33.7; erişkin poliklinik hastalarında %35, yatan hastalarda ise %23 oranında solunum virusları tespit edilmiştir (Tablo III). Hem pediatrik hem de erişkin grupta solunum viruslarının saptanma oranı, poliklinik hastalarında yatan hastalara oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir.

RSV, INF-A/B, PIV, AdV ve HRV gibi klasik solunum viruslarına, 2000'li yıllardan sonra HRV'nin C serotipi, HCoV'nin yeni serotipleri, HMPV ve HBoV eklenmiştir<sup>21</sup>. Daha önce yapılan çalışmalarda, olguların %15-40'ında RSV, %24'ünde HRV, %6-7'sinde PIV, %7'sinde AdV, mevsimsel ve bölgesel olarak değişmekle birlikte ortalama %4-5'inde influenza virusları, %10-15'inde HCoV, %2-12'sinde HMPV ve %1-5'inde HBoV'nin etken olduğu bildirilmiştir<sup>3,6,7,16,22</sup>. Bizim çalışmamızda, 2002-2006 yılları arasında örneklerin tümüne (n= 1018) SVHK ve DFA yöntemleri uygulanarak RSV, INF-A/ B, PIV ve AdV tanımlanmıştır. 2007 yılının başından itibaren bu yöntemlere ek olarak 2104 örneğe M-PCR uygulanmış ve klasik solunum viruslarının yanında HCoV, HBoV, HRV ve HMPV de saptanmıştır. Solunum yolu örnekleri laboratuvara en fazla Kasım-Mart ayları arasında gelmiş ve en sık NFS klinik örnek olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmada, pediatrik grupta en sık RSV (%8.7) saptanmış, bunu PIV (%5), INF-A (%4.7) ve HRV (%3) izlemiştir (Tablo I). Erişkin grupta ise en sık saptanan virus INF-A (%6.6) olmuş, bunu AdV (%3) ve HRV (%1.9) izlemiştir (Tablo I). Poliklinik ve yatan hastalara göre virus dağılımına bakıldığında; pediatrik grup poliklinik hastalarında en sık HRV (%12.6), yatan hastalarda sırasıyla RSV (%9.4), PIV (%5.3), INF-A (%4.7) tespit edilmiştir (Tablo III). Erişkin grupta ise poliklinik (%9.4) ve yatan (%5) hastalarda en sık saptanan virus INF-A olmuştur (Tablo III). HCoV (%0.3), HBoV (%0.4) ve HMPV (%0.5) ağırlıklı olarak pediatrik ve yatan hasta grubunda saptanmıştır. Bu yeni solunum virusları ve HRV, çalışmamızda sadece M-PCR uygulanan hasta sonuçlarında (n= 2104) yer almaktadır. Buna göre -toplam hasta grubundan ayrı olarak- HRV, HCoV, HBoV ve HMPV'nin görülme oranları sırasıyla %13.6, %1.6, %3.3 ve %3.9'dur. Bu virusların daha ziyade çoklu enfeksiyonlarda etken olarak yer aldığı (HBoV %74.2, HMPV %69.5, HCoV %55.8, HRV %50.6) dikkati çekmiştir (Tablo II).

Influenza A (H1N1)pdm09 oranları, Ekim 2009-Mart 2010 ayları arasında salgına neden olduğu için INF-A oranlarından ayrı olarak gösterilmiştir. Salgın döneminde, erişkinlerin çocuklardan daha fazla oranda grip olduğu, her iki grupta da poliklinik hasta oranlarının yatan hastalardan fazla olduğu görülmüştür. Genel olarak bu çalışmada solunum virüslerine ait elde edilen veriler, uluslararası solunum virüsleri oranlarından düşük bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, ASYE olan çocuklarda RSV, influenza virüsleri veya HRV ilk sırayı almıştır<sup>8-10</sup>. Çalışmamızın sonuçları, HRV ve PIV dışında diğer solunum virüsleri açısından ülkemizdeki verilere uygun bulunmuştur. PIV'in, 2004-2005 yılları arasında çıkan salgın nedeniyle ulusal verilerden daha yüksek oranlarda bulunduğu, bu çalışmadaki olgu sayısı diğer çalışmalardan daha fazla olduğu için HRV'nin de görece olarak düşük bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Hastaların %6.2'sinde iki, üç veya dört solunum virusunun etken olduğu çoklu etken enfeksiyonları görülmüştür (Tablo I). Daha önce yapılan çalışmalarda, ko-enfeksiyon oranlarının %5-62 arasında değiştiği; bu enfeksiyonlarda en sık RSV'e rastlandığı ve en sık eşlik eden virüslerin AdV, HBoV ve INF-A olduğu bildirilmiştir<sup>17</sup>. Bizim çalışmamızda, çoklu etken enfeksiyonlarında en fazla RSV+INF-A ve RSV+PIV birlikteliği görülmüştür. Bununla birlikte, tekli enfeksiyona göre daha fazla oranda çoklu enfeksiyonlarda yer alan virusun HBoV olduğu dikkati çekmiştir. Bu çalışmada bulunan ko-enfeksiyon oranları ülkemizde yapılan çalışmalara benzer bulunmuştur<sup>8,9</sup>. Çoklu etkenlerin çoğunluğunun pediatrik grupta (%87.7), yatan (%90) ve erkek hastalarda (%57.5) olduğu izlenmiştir. Benzer sonuçlar daha önce yapılan bir çalışmada da bildirilmiştir<sup>22</sup>. M-PCR teknolojilerinin gelişimi ile birlikte yapılan son araştırmalarda, sıklıkla solunum virüslerinin birlikte enfeksiyona neden olduğu görülmektedir. M-PCR testlerinin duyarlılığı %90-99.5, özgüllüğü ise virus tipine göre bazı testlerde değişkenlik göstermekle birlikte %83.7-99.9 arasında bildirilmektedir<sup>23-26</sup>. Son yıllarda solunum virüslerini multipleks olarak saptayan testlerin semikantitatif ve kantitatif olanları kullanılmaya başlanmıştır. Bu testlerin özgüllük ve duyarlılıkları diğerlerine göre daha yüksektir ve aynı zamanda bu testlerle çoklu enfeksiyon etkenlerinin viral yükleri de saptanabilmektedir<sup>27,28</sup>.

Viral SYE'nin özellikle ılıman iklimi olan bölgelerde mevsimsel özellik gösterdiği, yıldan yıla pik yaptıkları dönemlerin değiştiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda solunum virüslerinin kuzey yarımkürede özellikle kış aylarında ve Kasım-Mart ayları arasında etkin oldukları bildirilmiştir<sup>29</sup>. RSV ve influenza virüslerinin pik yaptığı dönemler aynı olmakla birlikte her ikisi de kış aylarında; PIV-3 genellikle kış, PIV-1 ve PIV-2 sonbahar ve kış girişinde; HRV, RSV ve influenza virüslerinin etkin olduğu yıllarda bahar ve yaz aylarında, diğer durumlarda kış ve ilkbahar aylarında, AdV ise yıl boyunca solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır<sup>16,22,29,30</sup>. Bizim çalışmamızda, RSV ve PIV'in en sık Aralık ve Mart ayları arasında görüldüğü, RSV'nin Ocak ayında, PIV'in Şubat ve Mart ayında pik yaptığı, influenza virüslerinin Kasım-Mart ayları arasında görüldüğü ancak en fazla Ocak ayında etkin olduğu saptanmıştır (Şekil 1). HRV'nin Kasım ve Haziran ayları arasında hemen hemen aynı oranlarda enfeksiyona neden olduğu, AdV'nin yıl boyunca sporadik seyrettiği, HMPV'nin Ocak-Mayıs ayları arasında enfeksiyona neden olduğu; HCoV'nin yaz ayları dışında diğer aylarda aynı oranda görüldüğü, HBoV'nin de Şubat-Mayıs ayları

arasında sık görüldüğü belirlenmiştir. Çoklu etken enfeksiyonları ise en sık Ocak ve Şubat aylarında saptanmıştır. Mevsimsel döngüye ek olarak, Aralık 2004-Nisan 2005 tarihleri arasında bölgesel PIV-3 salgını (n= 96), Ekim 2009-Mart 2010 tarihleri arasında influenza A (H1N1)pdm09 salgını (n= 207) gerçekleşmiştir<sup>14,15</sup>. Salgın döneminde bu patojenler, diğer solunum virusları ile oluşan enfeksiyonları baskılamışlardır. Bölgemizde, solunum viruslarının tümünün en fazla kış ve ilkbahar aylarında etken olduğu görülmüştür. Diğer çalışmalardan farklı olarak, RSV ve influenza viruslarının pik yaptığı dönemin aynı olduğu ve HRV'nin kış, ilkbahar ve yaz ayları başlangıcında aynı oranlarda enfeksiyona neden olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, yaklaşık 12 yıllık verilerin değerlendirildiği bu çalışmada, akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda %33.4 oranında solunum virusları etken olarak saptanmıştır. Solunum yolu örnekleri en çok Kasım-Mart ayları arasında kabul edilmiş; çocuklarda en sık RSV, erişkinlerde ise influenza A virusu tespit edilmiştir. Çocuklardaki pozitiflik oranı erişkinlerden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Çoklu etken enfeksiyonları en sık bir yaşından küçük erkek çocuklarda, Ocak ayında ve RSV+INF-A birlikteliğinde görülmüştür. Poliklinik hastalarında yatan hastalara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla oranda solunum virusu saptanmıştır. Poliklinik hastalarında HRV, yatan hastalarda ise RSV en sık saptanan patojenler olmuştur. Solunum virusları erkeklerde kadınlara oranla daha fazla oranda etken olarak saptanmıştır. RSV, INF-A ve PIV en sık kış ayları ve ilkbahar girişinde, HRV kış aylarından yaz ayları başlangıcına kadar, HBoV ve HMPV kış sonu ve ilkbahar aylarında, AdV ve HCoV'nin de yaz aylarında azalmakla birlikte yıl boyunca sporadik enfeksiyonlara neden olduğu izlenmiştir. Dolayısıyla bölgemizde, solunum viruslarının genel olarak kış ve erken ilkbahar aylarında etken olduğu ve etkenlerin pik yaptığı ayların birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. World Health Organization. World Health Statistics 2011. WHO, Geneva. Available at: <http://www.who.int/whosis/whostat/2011/en/>
2. Zumla A. Killer respiratory tract infections: time to turn the tide. *Curr Opin Pulm Med* 2012; 18(3): 173-4.
3. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(1): 74-98.
4. Vallières E, Renaud C. Clinical and economical impact of multiplex respiratory virus assays. *Diag Microbiol Infect Dis* 2013; 76(3): 255-61.
5. Mahony JB, Blackhouse G, Babwah J, et al. Cost analysis of multiplex PCR testing for diagnosing respiratory virus infections. *J Clin Microbiol* 2009; 47(9): 2812-7.
6. Hak E, Rovers MM, Kuyvenhoven MM, Schellevis FG, Verheij TJ. Incidence of GP-diagnosed respiratory tract infections according to age, gender and high-risk co-morbidity: the Second Dutch National Survey of General Practice. *Fam Pract* 2006; 23(3): 291-4.
7. Jin Y, Zhang RF, Xie ZP, et al. Newly identified respiratory viruses associated with acute lower respiratory tract infections in children in Lanzou, China, from 2006 to 2009. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(1): 74-80.
8. Akçalı S, Yılmaz N, Güler Ö, Şanlıdağ T, Anıl M. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda solunum yolu viral etkenlerinin sıklığı. *Türk Ped Arş* 2013; 48(3): 215-20.

9. Sancaklı Ö, Yenigün A, Kırdar S. Alt solunum yolu enfeksiyonunda nazofaringeal örneklerde polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları. *Çocuk Enfeksiyon Derg* 2012; 6(3): 84-8.
10. Torun SH, Somer A, Kanturvardar M, Badur S, Salman N, Yekeler E. Respiratory viruses; today's troubled agents, candidates for marker of diagnosis and prognosis. *Indian J Applied Research* 2013; 3(10): 1-6.
11. Wiedbrauk DL, Johnston SLG. *Manual of Clinical Virology*. 1993. Raven Press, NewYork.
12. Çiçek C. Hücre kültürü teknikleri: Tek tabaka hücre kültürlerinin üretilmesi ve idame ettirilmesi, s: 10.3.1-9. Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT (Çeviri Ed), *Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı*. 3. baskı, 2013. Atlas Kitapçılık, Ankara.
13. World Health Organization. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1). Available at: [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR\\_SwineH1Assay-2009\\_20090430.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf)
14. Çiçek C, Pullukçu H, Saz EU, Çok G, Arda B, Bacakoğlu F. Distribution of respiratory viruses in influenza cases during pandemic H1N1 2009. *Near East Medical Journal* 2012; 2(2): 42-9.
15. Gülen F, Cicek C, Kurugol Z, et al. Parainfluenza type 3 outbreaks in Izmir children, Turkey. *Trop Doct* 2007; 37(4): 252-4.
16. Kesson AM. Respiratory virus infections. *Paediatr Respir Rev* 2007; 8(3): 240-8.
17. Goka EA, Vallely PJ, Mutton KJ, Klapper PE. Single and multiple respiratory virus infections and severity of respiratory disease: a systematic review. *Paediatr Respir Rev* 2014; 15(4): 363-70.
18. Leekha S, Irish CL, Schneider SK, et al. Viral detection using a multiplex polymerase chain reaction-based assay in outpatients with upper respiratory infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75(2): 169-73.
19. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet* 2011; 377(9773): 1264-75.
20. Ünüvar E, Yıldız İ, Kılıç A, et al. Viral etiology and symptoms of acute upper respiratory tract infections in children. *Turk J Med Sci* 2009; 39(1): 29-35.
21. Ivaska L, Niemela J, Heikkinen T, Vuorinen T, Peltola V. Identification of respiratory viruses with a novel point-of-care multianalyte antigen detection test in children with acute respiratory tract infection. *J Clin Virol* 2013; 57(2): 136-40.
22. Zhang D, He Z, Xu L, et al. Epidemiology characteristics of respiratory viruses found in children and adults with respiratory tract infections in southern China. *Int J Infect Dis* 2014; 25: 159-64.
23. Cho CH, Lee CK, Nam MH, Yoon SY, Lim CS, Cho Y, et al. Evaluation of the AdvanSure™ real-time RT-PCR compared with culture and Seeplex RV15 for simultaneous detection of respiratory viruses. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 79(1): 14-8.
24. Choudhary ML, Anand SP, Heydari M, et al. Development of a multiplex one step RT-PCR that detects eighteen respiratory viruses in clinical specimens and comparison with real time RT-PCR. *J Virol Methods* 2013; 189(1): 15-9.
25. Cho CH, Chulten B, Lee CK, et al. Evaluation of a novel real-time RT-PCR using TOCE technology compared with culture and Seeplex RV15 for simultaneous detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* 2013; 57(4): 338-42.
26. Mengelle C, Mansuy JM, Pierre A, et al. The use of a multiplex real-time PCR assay for diagnosing acute respiratory viral infections in children attending an emergency unit. *J Clin Virol* 2014; 61(3): 411-7.
27. Franz A, Adams O, Willems R, et al. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *J Clin Virol* 2010; 48(4): 239-45.
28. Jansen RR, Schinkel J, Dek I, et al. Quantitation of respiratory viruses in relation to clinical course in children with acute respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29(1): 82-4.
29. Eccles R. An Explanation for the seasonality of acute upper respiratory tract viral infections. *Acta Otolaryngol* 2002; 122(2): 183-91.
30. Jacobs SE, Lamson DM, George KS, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26(1): 135-62.