

Akut Solunum Yolu Enfeksiyonlu Çocuk ve Erişkin Hastalarda Rinovirüs Genotiplerinin Belirlenmesi

Genotypes of Rhinoviruses in Children and Adults Patients with Acute Respiratory Tract Infections

Eda DEMİRKAN¹, Sevin KIRDAR², Emel CEYLAN³, Ayşe YENİGÜN⁴, İmran KURT ÖMÜRLÜ⁵

¹ Erzurum Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Erzurum.

¹ Erzurum Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Erzurum, Turkey.

² Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

² Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Aydın, Turkey.

³ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın.

³ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Chest Diseases, Aydın, Turkey.

⁴ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji ve Allerji Bilim Dalı, Aydın.

⁴ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Child Health and Diseases, Discipline of Immunology and Allergy, Aydın, Turkey.

⁵ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Aydın.

⁵ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Biostatistics, Aydın, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 03.08.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 07.10.2017

ÖZ

Rinovirüs (RV), tüm dünyada akut solunum yolu enfeksiyonlarında en sık saptanan etkenlerden biridir. Virüs, hafif seyreden soğuk algınlığının yanı sıra bağışıklık sisteminin etkilendiği veya eşlik eden hastalığı olan kişilerde daha ciddi klinik tablolara neden olabilmektedir. RV'ler moleküler yöntemlerle RV-A, RV-B ve RV-C olarak üç tür altında tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda RV-A ve RV-C türlerinin daha çok alt solunum yolu enfeksiyonu ve astım alevlenmeleriyle ilişkili olduğu, RV-B'nin ise bu türlere göre alt solunum yolu enfeksiyonlarında daha az sıklıkta yer aldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, akut solunum yolu enfeksiyonu tanısı almış ve RV pozitif olarak saptanmış örneklerde dizi analizi yöntemiyle RV türlerinin belirlenmesi, RV türleriyle hastaların klinik tanı, yaş ve cinsiyetleri arasındaki ilişkilerin ortaya konulması amaçlanmıştır. Ek olarak, RV türlerinin belirlenmesinde dizi analizi yönteminin verimliliğinin vurgulanması planlanmıştır. Üniversite hastanemizde Ocak 2014-Ocak 2016 tarihleri arasında akut solunum yolu enfeksiyonu tanısıyla takip edilen çocuk ve erişkin olmak üzere 127 hasta değerlendirilmiştir. Ticari kit ile nazofarengeal sürüntü örneklerinde RV pozitifliği belirlenmiş olan hastalarda kantitatif gerçek zamanlı po-

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Sevin Kırdar, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye.

Tel (Phone): +90 256 212 1850, E-posta (E-mail): sevikirdar@yahoo.com

limeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile viral yükler belirlenmiştir. Viral yükleri belirlenemeyen 31 örnek çalışma dışı bırakılmıştır. Viral yükleri uygun bulunan 96 (46 erişkin, 50 çocuk) örnek, VP4/VP2 gen bölgesinin hedef alındığı konvansiyonel PCR ile yeniden değerlendirilmiştir. Konvansiyonel PCR sonrası 549 baz çifti (bp) büyüklüğünde bant görülen 32'si erişkin ve 33'ü çocuk olmak üzere toplam 65 örneğe DNA dizi analizi yapılmıştır. "Neighbour-joining" yöntemi kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Dizi analizi yapılabilen 65 örnek değerlendirildiğinde; 28 (%43.07) örnekte RV-A, 7 (%10.76) örnekte RV-B, 28 (%43.07) örnekte RV-C; birer örnekte ise enterovirüs (EV) türleri EV-D68 (%1.53) ve EV-C (%1.53) belirlenmiştir. Erişkin hasta örneklerinin 15 (%48.3)'ünde RV-A, 5 (%16.1)'inde RV-B, 11 (%35.4)'inde RV-C olarak tanımlanırken, çocuk hastaların 13 (%40.6)'ünde RV-A, 2 (%6.3)'sinde RV-B ve 17 (%53.1)'inde RV-C olarak tiplendirilmiştir. RV-C enfeksiyonu bronşiyolit tanılı ya da hışılıtlı çocuklarda, RV-A enfeksiyonu pnömoni tanısı almış erişkin hastalarda saptanmıştır. Hastalarda belirlenen RV türleri ile klinik tanı, viral yük, yaş ve cinsiyet arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde; hem çocuk hem de erişkin hastalarda belirlenen türler ve hastaların klinik tanıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p > 0.05$). Sonuç olarak, akut solunum yolu enfeksiyonlu çocuk ve erişkin hastalarda RV türlerinin ilk kez gösterildiği bu çalışmada; tüm yaş gruplarına ait örneklerde, RV-A ve RV-C türleri eşit oranlarda ve RV-B türünden daha fazla saptanmıştır. Çocuk hastalarda RV-C türü, erişkin hastalarda ise RV-A türü en yüksek oranlarda belirlenmiştir. Toplumda dolaşan RV türleri ve bunların yol açtığı enfeksiyonların öneminin ortaya konmasına yönelik daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: Rinovirüs; PCR, dizi analizi; filogenetik ağaç.

ABSTRACT

Rhinovirus (RV) is one of the most frequent causative agent of acute respiratory tract infections in the world. The virus may cause a mild cold, as well as more serious clinical symptoms in patients with immune system deficiency or comorbidities. Rhinoviruses have been identified by molecular methods under three types: RV-A, RV-B and RV-C. In most of the cases, it was reported that RV-A and RV-C were related with lower respiratory tract infections and asthma exacerbations, while RV-B was rarely reported in lower respiratory tract infections. The main objective of this study was to investigate RV species by sequence analysis in nasopharyngeal samples in pediatric and adult patients who were admitted to hospital with acute respiratory tract infections and to establish the relationship between species and age, gender and clinical diagnosis of the patients. Secondly, it was planned to emphasize the efficiency of the sequence analysis method in the determination of RV species. One hundred twenty seven patients (children and adults) who were followed up with acute respiratory tract infections in our university hospital were evaluated between January 2014 and January 2016. Viral loads were determined by quantitative real-time PCR in RV positive patients detected by a commercial kit in nasopharyngeal swab specimens. Thirty-one samples whose viral loads could not be determined were excluded from the study. The remaining 96 samples (50 children and 46 adults) were retested by conventional PCR using the target of VP4/VP2 gene region. A total of 65 samples (32 adults and 33 children) with the bands (549 bp) corresponding to the VP4/VP2 gene regions after the conventional PCR were analyzed by DNA sequencing. A phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method. After sequence analysis it was determined that 28 (43.07%) were RV-A, 7 (10.76%) were RV-B and 28 (43.07%) were RV-C; and moreover one of each enterovirus (EV) species EV-D68 (1.53%) and EV-C (1.53%) were detected. The distribution of the species in adults was: 15 (48.3%) RV-A, 5 (16.1%) RV-B and 11 (35.4%) RV-C. The distribution of the species in children was 13 (40.6%) RV-A, 2 (6.3%) RV-B and 17 (53.1%) RV-C. RV-A is more frequent in adults, while RV-C is more frequent among children. It has been observed that RV-C infection is detected in children with bronchiolitis, while RV-A infection is detected in adults with pneumonia. There was no statistically significant difference between RV species and clinical diagnosis, age and gender in both of the age groups ($p > 0.05$). In conclusion, this is the first study that reports the frequency of RV species in children and adult patients with acute respiratory tract infections; the frequency of RV-A and RV-C species were found to be similar but higher than RV-B species in all age groups. RV-C and RV-A was the highest species seen in children and adult patients, respectively. There is a need for further research to identify the types of RV circulating in the community and the prevalence of infections caused by the species.

Keywords: Rhinovirus; PCR; sequencing; phylogenetic tree.

GİRİŞ

Akut solunum yolu hastalıkları toplumda en yaygın görülen enfeksiyon hastalıklarından biri olup çocuklar, yaşlılar ve immün yetmezlikli hastalarda ciddi ve yaşamı tehdit eden klinik bulgulara neden olabilmektedir. Akut solunum yolu enfeksiyonlarında %50'den fazla oranda virüsler sorumlu olup bunlar arasında en sık rinovirüsler (RV), solunum sin-sityal virüsü (RSV), influenza (INF) ve parainfluenza (PIV) virüsleri yer almaktadır^{1,2}.

RV, genellikle hafif üst solunum yolu enfeksiyonu ve soğuk algınlığına neden olmaktadır³. Soğuk algınlığı olgularının yaklaşık %50'sinden RV'lerin sorumlu olduğu bilinmektedir. Son yıllarda, astım, kistik fibrozis (KF) ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) alevlenmelerinde, yaşlı ve immün yetmezlikli erişkin hastalarda ölümcül seyredabilen pnömoni, bebeklerde bronşiyolit gibi alt solunum yolu enfeksiyonlarında da RV'ler etken olarak tanımlanmaktadır⁴.

RV'lerin nötralizasyon testiyle belirlenebilen 100'den fazla serotipi ve kapsid prote-inlerinin dizi analiziyle saptanmış RV-A, RV-B ve RV-C olmak üzere üç türü vardır⁵. Bun-lardan RV-A ve RV-C türleriyle bronşiyolit, astım ve pnömoni gibi ciddi akut solunum yolu enfeksiyonları arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir^{5,6}. Özellikle RV-C türünün çocuk hastalarda daha şiddetli enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir^{7,8}. Günümüzde RV-A türüne ait 80, RV-B türüne ait 32 ve RV-C türüne ait 54 olmak üzere 150'nin üzerinde genotip belirlenmiştir³.

Günümüzde solunum yolu örneklerinden virüslerin belirlenmesinde moleküler yön-temler, özellikle en fazla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) yöntemi kullanılmaktadır. İyi korunmuş bir bölge olması nedeniyle RV genomunun 5'-UTR ve VP4/VP2 bölgeleri moleküler yöntemlerde hedef bölgeler olarak kullanılmaktadır³. Son yıllarda VP4/VP2 bölgesini hedef alan moleküler PCR yöntemleri ile üç farklı RV türünü belirleyen çok sayıda çalışma yapılmıştır^{3,4,9,10}.

Bu çalışmada, akut solunum yolu enfeksiyonu tanısı almış ve RV pozitif olarak sap-tanmış örneklerde dizi analizi yöntemiyle RV türlerinin belirlenmesi, RV türleri ile hastala-rın klinik tanı, yaş ve cinsiyetleri arasındaki ilişkilerin ortaya konulması amaçlanmıştır. Ek olarak, RV türlerinin belirlenmesinde dizi analizi yönteminin verimliliğinin vurgulanması planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hasta Grubu ve Örnekler

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul onayı (27.08.2013/268) alınarak gerçekleştirildi. Çalışmada, Ocak 2014-Ocak 2016 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Çocuk Hastalıkları ve Göğüs Hastalıkları polikliniklerine başvuran ve çocuk hastalıkları, göğüs hastalıkları ve hematoloji-kemik iliği servislerinde akut solunum yolu enfeksiyonu tanısıyla takip edilen hastalar değerlendirildi. Hastaların klinik, yaş ve cinsiyet gibi demografik verileri ve klinik tanıları hastane veri tabanından alındı.

İki ticari kit; “FTD Respiratory pathogens 21 (Qiagen, Lüksemburg)” ve “Anyplex™ II RV16 Detection V1.1 (SeeGene, Güney Kore)” kullanılarak RV pozitifliği belirlenmiş 127 hastaya ait nazofarengeal sürüntü örneği çalışmaya dahil edildi. Örneklerdeki viral yükleri belirlemek amacıyla kantitatif gerçek zamanlı PCR uygulandı ve viral yükleri belirlenemeyen 31 örnek çalışma dışı bırakıldı. Viral yükleri uygun bulunan 96 (46 erişkin, 50 çocuk) örnek, VP4/VP2 gen bölgesinin hedef alındığı konvansiyonel PCR ile yeniden değerlendirildi. Konvansiyonel PCR sonrası 549 bp büyüklüğünde bant görülen 32’si erişkin ve 33’ü çocuk olmak üzere toplam 65 örneğe DNA dizi analizi yapıldı.

RV PCR

Nazofarengeal sürüntü örneklerinden RNA izolasyonu, ticari RNA izolasyon kiti “Ribospin™ vRD II Viral RNA Purification (GeneAll Biotechnology, Güney Kore)” ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapıldı. Örneklerdeki RV’lerin viral yükleri, kantitatif gerçek zamanlı PCR sistemi olan LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes kiti (Roche Diagnostics, Almanya) ile LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Almanya) cihazında melting analiziyle belirlendi. Rt-PCR için seçilmiş primerler; öncül primer (5’-CCCCTGAATGYGGCTAA-3’, tm: 55-60) ve revers primer (5’-GAAACACGGACACC-CAAAGTA-3’, tm: 59) kullanılarak tek aşamalı olarak çoğaltıldı. cDNA sentezi sonrasında 95°C’de 30 saniye denatürasyonu takiben, 95°C’de 10 saniye denatürasyon, 57°C’de 30 saniye primer birleşmesi ve 72°C’de 5 saniye uzamayı içeren 40 PCR döngüsü uygulandı. LightCycler 480 yazılımında CT değerleri cihaz tarafından otomatik hesaplandı ve pozitif örneklerin melting analizi ile verdiği melting pikleri kontrol edildi.

Dizi Analizi

Kantitatif PCR sonrasında elde edilen ürünlerdeki bantlar uygulanan konvansiyonel PCR ile gösterildi. PCR için VP4/VP2 gen bölgesine ait öncül primeri (5’GGGACCA-ACTACTTTGGGTGTCCGTGT-3’) ve revers primeri (5’ GCATCIGGYARYTTCCACCAC-CANCC-3’) kullanılarak, 95°C’de 2 dakika ilk denatürasyonu takiben, 95°C’de 30 saniye denatürasyon, 55°C’de 30 saniye birleşme ve 72°C’de 40 saniye uzamayı içeren 35 döngü uygulandı¹⁰. PCR ürünleri %1.2’lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Çoğaltılan gen bölgesine ait 549 bp büyüklüğünde bant saptanan PCR ürünleri “DNA Clean & Concentrator™-25 (Zymo Research Corp, Irvine, ABD)” kiti ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırıldıktan sonra, elde edilen PCR ürünlerine “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ABD)” ile ikinci tür sens primeri kullanılarak dizi analizi gerçekleştirildi. Dizi analizi uygulanan PCR ürünleri “ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research Corp, Irvine, ABD)” kit ile ikinci kez saflaştırıldı ve ABI Prism 3100/3100 (Thermo Fischer Scientific) cihazına yüklenerek çift yönlü olarak dizi analizi gerçekleştirildi. VP4/VP2 kapsid kodlayan bölgesinin yaklaşık 400 bp uzunluğundaki kısmı “BioEdit v7.0.5 (CA, ABD)” yazılımı kullanılarak referans dizilerle karşılaştırıldı ve RV-A, RV-B ve RV-C türleri belirlendi. Bu dizilerin filogenetik karşılaştırması Geneious 9.1.3 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Filogenetik ağaç “Neighbour-Joi-

ning" yöntemiyle oluşturuldu. Filogenetik analize dahil edilen suşlara ait dizilerin Gen Bankası erişim numaraları; RV-A12: EF173415, RV-A22: FJ445122, RV-A78: FJ445183, RV-B48: DQ473488, RV-B86: FJ445164, RV-C23: EU752424, RV-C pat10: EU590054 olarak belirlendi. Çalışmada RV-A, RV-B ve RV-C türlerine ait pozitif kontrol olarak, Güney Kıbrıs Archbishop Makarios Hastanesinden sağlanan Güney Kıbrıs 103, 277 ve 424 suşları kullanıldı.

İstatistiksel Analiz

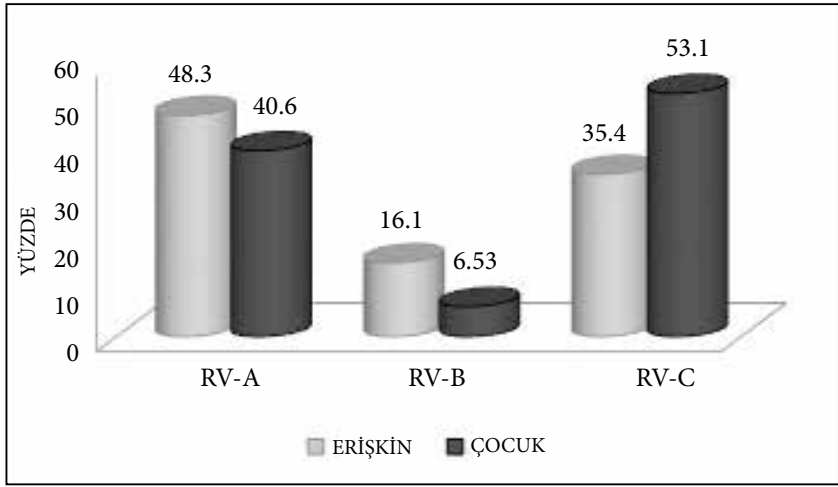
Kantitatif değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Kantitatif değişkenler bakımından gruplar arası farklılığı araştırırken; normal dağılım gösterenler için bağımsız iki örneklem T testi, normal dağılım göstermeyenler için Mann-Whitney U testi uygulandı. Normal dağılım gösteren kantitatif değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde belirtildi. Normal dağılım göstermeyen kantitatif değişkenler için ise medyan (%25-75) olarak belirtildi. Kalitatif değişkenler bakımından gruplar arası farklılığın incelenmesinde kesin olasılıklı ki-kare testi uygulandı ve tanımlayıcı istatistikler frekans olarak verildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda 33 çocuk hastanın yaş medyan değeri 12 ay (4.44-45), 32 erişkin hastanın yaş ortalamaları 57.63 ± 15.68 yıl olarak belirlenmiştir. Erkek/kadın (33/32) olgu oranı birbirine eşit olarak bulunmuştur. Çocuk hasta grubunu; akut üst solunum yolu enfeksiyonu (ÜSYE) ($n=5$), akut bronşiyolit/hışiltı ($n=16$), pnömoni ($n=4$) ve astım ($n=8$) tanısı olan olgulara ait örnekler oluşturmuştur. Erişkin olgu grubunu 20'si akut ÜSYE, dördü pnömoni, sekizi astım-KOAH tanısı olan hasta örnekleri oluşturmuştur.

Tüm hasta örnekleri değerlendirildiğinde; 28 (%43.07) örnekte RV-A, 7 (%10.76) örnekte RV-B, 28 (%43.07) örnekte RV-C; bir örnekte ise EV-D68 (%1.53) ve bir örnekte EV-C (%1.53) belirlenmiştir. Erişkin hasta örneklerinin 15 (%48.3)'i RV-A, 5 (%16.1)'i RV-B, 11 (%35.4)'i RV-C olarak tanımlanırken, çocuk hastaların 13 (%40.6)'ü RV-A, 2 (%6.3)'si RV-B ve 17 (%53.1)'si RV-C olarak tiplendirilmiştir (Şekil 1). Çocuk hasta grubu örneklerinde RV-C diğer RV türlerinden daha yüksek oranda iken; erişkin hasta grubunda RV-A'nın daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir. Erişkin ve çocuk olgu grupları ile ayrı ayrı yapılan değerlendirmelerde, belirlenen RV'lerin türü ile yaş arasında anlamlı bir ilişki (sırasıyla $p=0.273$; $p=0.457$) saptanmamıştır.

Çocuk olgu grubunda akut ÜSYE tanısı alan 5 (%15) hastanın nazofarenks örneklerinden 2 (%6)'sinde RV-A, 3 (%10)'ünde RV-C belirlenirken RV-B saptanmamıştır. Dört (%12) pnömonili olgudan 1 (%3) örnekte RV-A, 1 (%3) örnekte RV-B ve 2 (%6) örnekte RV-C belirlenmiştir. On altı (%48) adet bronşiyolit/hışiltı olgulara ait örneklerde RV-A %15, RV-B %3 ve RV-C %28; 8 (%24) astımlı olgu örneğinde RV-A %15 ve RV-C %10 oranlarında belirlenmiştir (Tablo I).



Şekil 1. Erişkin ve çocuk hastalarda RV tür oranları.

Tablo I. Çocuk Hasta Grubunda RV Tür Dağılımı, Cinsiyet ve Klinik Tanıları

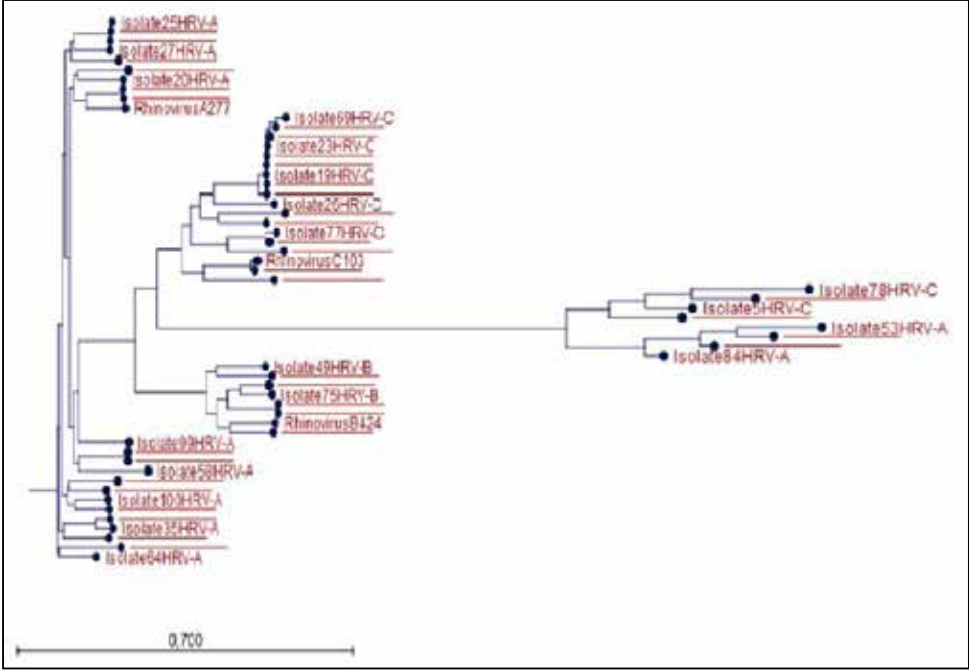
Klinik tanı n (%)	Cinsiyet E/K	RV-A n (%)	RV-B n (%)	RV-C n (%)
Akut ÜSYE 5 (15)	4/1	2 (6)	0	3 (10)
Pnömoni 4 (12)	3/1	1 (3)	1 (3)	2 (6)
Bronşiyolit/Hışiltılı* 16 (48)	8/8	5 (15)	1 (3)	9 (28)
Astım 8 (24)	4/4	5 (15)	0	3 (10)
Toplam 33	19/14	13 (40.6)	2 (6.3)	17 (53.1)

RV: Rinovirüs, ÜSYE: Üst solunum yolu enfeksiyonu.
* Hışiltılı grupta bir hastada Enterovirus-68 saptanmıştır.

Tablo II. Erişkin Hasta Grubunda RV Tür Dağılımı; Cinsiyet ve Klinik Tanıları

Klinik tanı n (%)	Cinsiyet E/K	RV-A n (%)	RV-B n (%)	RV-C n (%)
Akut ÜSYE 13 (40)	3/10	5 (38)	2 (15)	5 (38)
Pnömoni 12 (37)	6/6	7 (58)	3 (25)	2 (17)
Astım-KOAH 7 (21)	5/2	3 (14)	0	4 (19)
Toplam 32	19/13	15 (48.3)	5 (16.1)	11 (35.4)

RV: Rinovirüs, ÜSYE: Üst solunum yolu enfeksiyonu, KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı.



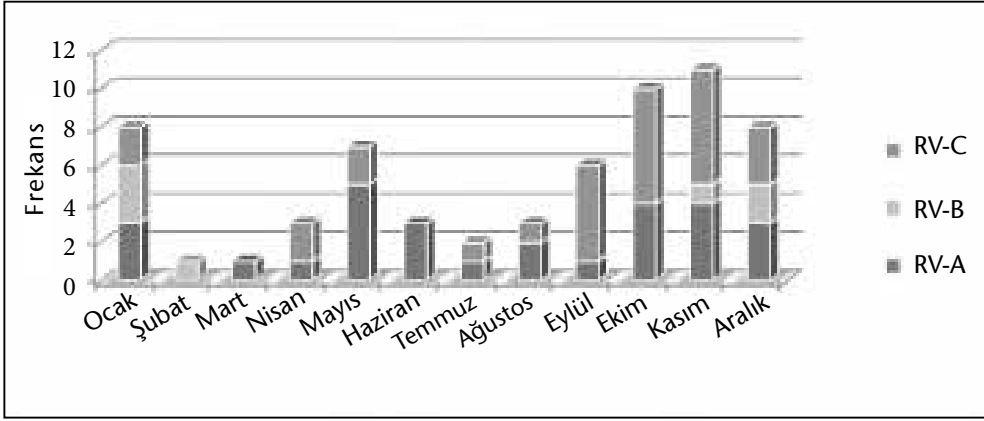
Şekil 2. Çalışma grubunun filogenetik analiz sonucu.

Erişkin olgu grubunda akut ÜSYE tanısı alan 13 (%40.6) hastanın nazofarengeal örneklerinden 5 (%38)'inde RV-A, 2 (%15) hastada RV-B ve 5 (%38) hastada RV-C saptanmamıştır. On iki (%37) pnömonili olguya ait 7 (%58) örnekte RV-A, 3 (%25) örnekte RV-B ve 2 (%17) örnekte RV-C belirlenmiştir. Yedi (%21) KOAH-astım olgusunda 3 (%14) örnekte RV-A ve 4 (%19) örnekte RV-C saptanmıştır (Tablo II).

Filogenetik analiz sonucunda RV-A, RV-B ve RV-C türlerinde izolatların kendi grupları içerisinde birbirlerine yakın yerleştiği görülmüştür. RV-A izolatları iki dikey grupta ayrılarak birbirinden uzak iki grup oluşturmuştur. Ayrıca, bazı A ve C izolatlarının tüm gruptan ayrı ve evrimsel olarak biraz uzakta dallanmış oldukları gözlenmiştir (Şekil 2).

Hastalarda belirlenen RV türleri ile klinik tanı, viral yük, yaş ve cinsiyet arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde, hem çocuk hem de erişkin hastalarda belirlenen türler ve hastaların klinik tanıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p > 0.05$).

RV enfeksiyonunun tüm hasta grubunda ve tür ayırımı yapıldıktan sonra en fazla Eylül-Ocak ayları arasında ve en yüksek oranda Kasım ayında görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 3). RV türlerinin mevsimsel dağılımı incelendiğinde, RV-A türünün Mayıs ve Ekim-Kasım aylarında, RV-B türünün Kasım-Şubat arasında ve RV-C'nin Eylül-Kasım arasında pik yaptığı gözlenmiştir. Erişkin hasta grubunda tüm RV'ler sonbahar, kış ve ilkbahar aylarında, çocuk hasta grubunda ise en fazla kasım ve eylül aylarında saptanmıştır.



Şekil 3. Hastalarda belirlenen RV türlerinin mevsimsel dağılımı.

TARTIŞMA

RV enfeksiyonları, diğer solunum yolu virüsleri ile gelişen enfeksiyonlara oranla daha hafif seyirlidir, ancak bağışıklık sisteminin etkilendiği veya eşlik eden hastalığı olan kişilerde daha ciddi klinik tabloya neden olabilmektedir. Çok sayıda serotipinin olması nedeniyle koruyucu aşının geliştirilememiş olması, toplumda enfeksiyonun kontrolünü zorlaştırmaktadır¹¹. Bu çalışmada, akut solunum yolu enfeksiyonu ile takip edilen hastalardan alınan nazofarenks örneklerinde saptanan RV türleri araştırılmıştır. Dizi analizi için uygun olan 65 örnekten 28 (%43.07)'inde RV-A, 7 (%10.76)'inde RV-B, 28 (%43.07)'inde RV-C türleri; birer örnekte enterovirüs (EV) türleri, EV-D68 (%1.53) ve EV-C (%1.53) belirlenmiştir.

RV tüm dünyada akut solunum yolu enfeksiyonlarının yaklaşık %50'sinden sorumlu olan bir patojendir¹. Ülkemizde yapılan araştırmalarda, RV görülme sıklığının %21.4-35.8 arasında olduğu bildirilmiştir¹²⁻¹⁴. RV türleri, virüsün prevalansı ve saptanma oranları araştırmalarının yapıldığı coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Son yıllarda Avrupa ülkelerinde dizi analizi ile RV türlerinin belirlendiği birçok araştırmada, olguların %45-60'ında RV-A, %35-45'inde RV-C ve %5-10'unda RV-B türleri etken olarak saptanmıştır¹⁵⁻¹⁷. Çalışmamızda saptanan RV-A ve RV-C görülme sıklığı (%43.07), Onyongo ve arkadaşlarının¹⁸ araştırmalarında belirlemiş oldukları (%47 HRV-A, %48 HRV-C) oranlarıyla benzer bulunmuştur. RV türlerinin sıklığının araştırıldığı farklı çalışmalarda da RV-A ve RV-C türlerinin görülme sıklığı RV-B'ye göre daha yüksek oranlarda belirlenmiştir¹⁹⁻²¹. Bahsedilen araştırmalarda bildirilenlere benzer şekilde olgu grubumuzun tümü ele alındığında, çalışmamızda da RV-A ve RV-C türleri, RV-B'ye göre daha sık olarak saptanmıştır. Bununla birlikte, bulgularımızdan farklı olarak RV-A türünün RV-B ve RV-C'den daha yaygın olarak saptandığı çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir^{3,4,22}.

Erişkin ve çocuk olgu gruplarımız ile ayrı ayrı yapılan değerlendirmelerde, belirlenen RV'lerin türü ile yaş arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p > 0.05$). Çocuk hasta

grubunun örneklerinde RV-C diğer RV türlerinden daha yüksek sıklıkta bulunurken; erişkin hasta grubumuzda RV-A'nın daha yüksek sıklıkta olduğu belirlenmiştir. Avustralya ve İtalya'dan bildirilen iki çalışmada, çalışmamızdaki sonuçlarla uyumlu olarak çocuk hastalarda RV-C, diğer RV türlerinden yüksek oranda bulunmuştur^{7,23}. Bazı çalışmalarda ise RV-A'nın çocuklarda daha yaygın olarak saptandığı bildirilmiştir^{3,24}. Cinsiyet ile RV türleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, literatürde bildirilen araştırmalar ile benzer şekilde anlamlı bir ilişki saptanmamıştır^{3,25}.

Çalışmamızda, hem erişkin hem de çocuk hasta gruplarında ayrı ayrı yapılan değerlendirmede, klinik tanı ile RV türleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p > 0.05$). Bu çalışmadaki sonuçlarla benzer şekilde, Fransa²⁶, Tayland²⁷ ve Latin Amerika'da²⁸ yapılan çalışmalarda da klinik tanı ve türler arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bunun yanı sıra, RV türleri ile klinik tanı arasında ilişki bulunduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır^{4,29}. Bazı araştırmacılar, RV-C'nin özellikle astım ve kistik fibrozisli küçük çocuklarda diğer RV türlerine göre daha ağır kliniğe neden olduğunu ileri sürmüşlerdir^{4,30,31}. Çocuk grubumuzda RV'ler %48 olguda bronşiyolit, %24 olguda astım ve %12 olguda pnömoni gibi ciddi klinik tablolara yol açtığı halde ancak %15'inde akut ÜSYE kliniği bulunmuştur. RV-C, astım dışı grupta daha yüksek oranda iken, RV-A astımda daha sık saptanan etken olmuştur.

Bazı çalışmalar, erişkin hasta grubunda RV-A türü ile ciddi solunum yolu enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişkili saptadığı halde çocuk hastalarda böyle bir ilişki bulunamamıştır^{4,25}. Brezilya'da yapılan bir çalışmada ise hem erişkin hem de çocuk yaş grubunda RV-A türünün daha şiddetli ÜSYE ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür²⁵. Erişkin hasta grubumuzda RV'ler %40 oranında akut ÜSYE; %60 oranında ise astım, KOAH ve pnömoni gibi ciddi klinik tablolarla ilişkili bulunmuştur. RV türleri klinik tanıya göre değerlendirildiğinde, pnömoni tanısında RV-A türü yüksek oranda bulunmuştur; diğer klinik tablolarda RV-A ve RV-C eşit oranlarda saptanmıştır.

RV genomunun 5'-UTR ve VP4/VP2 bölgeleri moleküler yöntemlerde kullanılan uygun hedef bölgeleri olarak belirlenmiştir. VP4/VP2 bölgesi kullanılarak yapılan dizi analizi ile RV tür/alt tür ayrımı yapılabilirken, 5'-UTR bölgesi ile oluşturulan filogenetik ağaç HRV-A ve HRV-C türlerinden oluşan karışık grupları göstermekte ve ayırım yapamamaktadır. VP4/VP2 bölgesi, iyi korunmuş olması ve üç RV türünün aynı primer seti ile çoğaltılabilmesi nedeniyle epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır³. Çalışmamızda VP4/VP2 gen bölgesi filogenetik analizi sonucunda, ilimizde her üç türün hastalar arasında etken olduğu, dolaşımda bulunan türlerden farklı olarak nadir kökenlerin bulunduğu ve üç RV türü ile klinik tanı arasında filogenetik ilişki olmadığı belirlenmiştir. Ek olarak RV türlerinin filogenetik analizinde VP4/VP2 gen bölgesinin, RV türlerinin ayırımında değerli olduğu saptanmıştır.

Gerçek zamanlı multipleks PCR ile RV olarak belirlenen iki örnek, filogenetik analiz sonucunda EV-D68 ve EV-C olarak tanımlanmıştır. Benzer şekilde Kenya'da ve Amerika'da

yapılan iki çalışmada gerçek zamanlı multipleks PCR ile RV olarak belirlenen hastalara ait örneklerde filogenetik analiz ile EV-D68 gözlenmiştir^{2,18}. Çalışmamızda ilk kez akut ÜSYE olan bir erişkin hastada EV-D68 belirlenmiştir. Bilgilerimize ve ulusal yayınlara göre EV-D68'in hava yolu örneklerinde saptandığına ilişkin ulusal bir veri bulunmamaktadır³².

RV türlerinin mevsimsel dağılımı ile ilgili çalışmalarda, türler arasında bazı farklılıklar gözlenmiştir. RV-A türünün ilkbahar ve sonbaharda, RV-C türünün sonbahar ve kış aylarında daha fazla görülebildiği bildirilmektedir². Çalışmamızda ise, RV-A Mayıs ve Ekim-Kasım aylarında, RV-B Kasım-Şubat aylarında, RV-C Eylül-Kasım ayları arasında en fazla gözlenmiştir. Çocuk grubunda yapılan değerlendirmelerde genellikle RV-A'ların yıl boyunca; RV-C'nin sonbahar ve kış aylarında daha yoğun görülebildiği bildirilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile ülkemizde ilk defa RV türlerinin bulunduğumuz şehirdeki epidemiyolojisi ortaya konmaya çalışılmıştır. Tüm yaş gruplarına ait örneklerde, RV-A ve RV-C türleri eşit oranda ve RV-B türünden daha fazla saptanırken; çocuk hastalarda RV-C türü, erişkin hastalarda ise RV-A türü en yüksek oranlarda belirlenmiştir. RV-C enfeksiyonunun bronşiyolit tanılı ya da hışıltılı çocuklarda, RV-A enfeksiyonunun pnömoni tanısı almış erişkin hastalarda saptandığı gözlenmiştir. Ayrıca, RV türlerinin filogenetik analizinde VP4/VP2 gen bölgesinin dizi analizinin üç RV türünü ayırt etmek için uygun bir yöntem olduğu belirlenmiştir. RV enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamak amacıyla farklı merkezlerde ve daha geniş hasta popülasyonları ile yapılacak çalışmalar ile verilerimizin desteklenmesine gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Royston L, Tapparel C. Rhinoviruses and respiratory enteroviruses: not as simple as ABC. *Viruses* 2016; 8(1): 16.
2. Troy NM, Bosco A. Respiratory viral infections and host responses; insights from genomics. *Respir Res* 2016; 17: 156.
3. Richter J, Nikolaou E, Panayiotou C, Tryfonos C, Koliou M, Christodoulou C. Molecular epidemiology of rhinoviruses in Cyprus over three consecutive seasons. *Epidemiol Infect* 2015; 143(9): 1876-83.
4. Chen WJ, Arnold JC, Fairchok MP, et al. Epidemiologic, clinical, and virologic characteristics of human rhinovirus infection among otherwise healthy children and adults: Rhinovirus among adults and children. *J Clin Virol* 2015; 64: 74-82.
5. To KKW, Yip CCY, Yuen KY. Rhinovirus-from bench to bedside. *J Formos Med Assoc* 2017; 116: 496-504.
6. Midulla F, Pierangeli A, Cangiano G, et al. Rhinovirus bronchiolitis and recurrent wheezing: 1-year follow-up. *Eur Respir J* 2012; 39(2): 396-402.
7. Bizzintino J, Lee WM, Laing IA, et al. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur Respir J* 2011; 37(5): 1037-42.
8. Dagher H, Donninger H, Hutchinson P, Ghidyal R, Bardin P. Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *J Virol Methods* 2004; 117(2): 113-21.
9. Xiang Z, Gonzalez R, Zhengde X, et al. Human rhinovirus group C infection in children with lower respiratory tract infection. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(10): 1665-7.
10. Savolainen C, Mulders MN, Hovi T. Phylogenetic analysis of rhinovirus isolates collected during successive epidemic seasons. *Virus Res* 2002; 85(1): 41-6.

11. Fendrick AM, Monto AS, Nightengale B, Sarnes M. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Arch Intern Med* 2003; 163(4): 487-94.
12. Akçalı S, Yılmaz N, Güler Ö, Şanlıdağ T, Anıl M. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda solunum yolu viral etkenlerinin sıklığı. *Türk Pediatri Ars* 2013; 48(3): 215-20.
13. Sancaklı Ö, Yenigün A, Kırdar S. Alt solunum yolu enfeksiyonunda nazofaringeal örneklerde polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları. *J Pediatr Inf* 2012; 6(3): 84-9.
14. Çicek C, Bayram N, Anıl M, et al. Simultaneous detection of respiratory viruses and influenza A virus subtypes using multiplex PCR. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(4): 652-60.
15. Wisdom A, Leitch EM, Gaunt E, Harvala H, Simmonds P. Screening respiratory samples for detection of human rhinoviruses (HRVs) and enteroviruses: comprehensive VP4-VP2 typing reveals high incidence and genetic diversity of HRV species C. *J Clin Microbiol* 2009; 47(12): 3958-67.
16. Peltola V, Jartti T, Putto-Laurila A, et al. Rhinovirus infections in children: A retrospective and prospective hospital-based study. *J Med Virol* 2009; 81(10): 1831-8.
17. Calvo C, Casas I, García-García ML, et al. Role of rhinovirus C respiratory infections in sick and healthy children in Spain. *Pediatr Infect Dis* 2010; 29(8): 717-20.
18. Onyango CO, Welch SR, Munywoki PK, et al. Molecular epidemiology of human rhinovirus infections in Kilifi, coastal Kenya. *J Med Virol* 2012; 84(5): 823-31.
19. Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, et al. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species A, B and C from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol* 2012; 61(Pt 3): 410-9.
20. Franco D, Delfraro A, Abrego L, et al. High genetic diversity and predominance of rhinovirus A and C from Panamanian hospitalized children under five years with respiratory infections. *Virol J* 2012; 9: 257.
21. Naoko Kiyota, Kobayashi M, Tsukagoshi H, et al. Genetic analysis of human rhinovirus species A to C detected in patients with acute respiratory infection in Kumamoto prefecture, Japan 2011-2012. *Infect Genet Evol* 2014; 21: 90-102.
22. To KK, Lau SK, Chan KH, et al. Pulmonary and extrapulmonary complications of human rhinovirus infection in critically ill patients. *J Clin Virol* 2016; 77: 85-91.
23. Pierangeli A, Ciccozzi M, Chiavelli S, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of human rhinovirus affecting hospitalized children in Rome. *Med Microbiol Immunol* 2013; 202(4): 303-11.
24. Espinola E, Russomando G, Aquina C, Basualdo W. Phylogeny-based classification of human rhinoviruses detected in hospitalized children with acute lower respiratory infection in Paraguay, 2010-2011. *J Med Virol* 2013; 85(9): 1645-51.
25. Watanabe ASA, Carraro E, Candeias JM, et al. Viral etiology among the elderly presenting acute respiratory infection during the influenza season. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44(1): 18-21.
26. Henguell C, Mirand A, Deusebis AL, et al. Prospective genotyping of human rhinoviruses in children and adults during the winter of 2009-2010. *J Clin Virol* 2012; 53(4): 280-4.
27. Fry AM, Lu X, Olsen SJ, et al. Human rhinovirus infections in rural Thailand: epidemiological evidence for rhinovirus as both pathogen and bystander. *PLoS One* 2011; 6(3): e17780.
28. García J, Espejo V, Nelson M, et al. Human rhinoviruses and enteroviruses in influenza-like illness in Latin America. *Virol J* 2013; 10305.
29. Iwane MK, Prill MM, Lu X, et al. Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children. *J Infect Dis* 2011; 204(11): 1702-10.
30. Almeida MB, Zerbinati RM, Tateno AF, et al. Rhinovirus C and respiratory exacerbations in children with cystic fibrosis. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(6): 996-9.
31. Huang T, Wang W, Bessaud M, et al. Evidence of recombination and genetic diversity in human rhinoviruses in children with acute respiratory infection. *PLoS One* 2009; 4(7): e6355.
32. Altındış M, Dal T. Yeni bir viral tehdit: Enterovirüs D68. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2016; 73(3): 293-302.