

Otopsi Olgularında Viral Solunum Yolu Enfeksiyonu Etkenlerinin Multipleks PCR Yöntemi ile Araştırılması: Beş Yıllık Bir Çalışma

Investigation of Viral Respiratory Tract Infection Agents by Multiplex PCR Method in Autopsy Cases: A Five-Year Study

Nihan ZİYADE¹, Neval ELGÖRMÜŞ¹, Erdoğan KARA², Ferah KARAYEL³

¹ İstanbul Adli Tıp Kurumu, Postmortem Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.

¹ Council of Forensic Medicine, Postmortem Microbiology Laboratory, Istanbul, Turkey.

² İstanbul Adli Tıp Kurumu, Otopsi Şubesi, İstanbul.

² Council of Forensic Medicine, Autopsy Unit, Istanbul, Turkey.

³ İstanbul Adli Tıp Kurumu, Histopatoloji Şubesi, İstanbul.

³ Council of Forensic Medicine, Histopathology Unit, Istanbul, Turkey.

Makale Atfı: Ziyade N, Elgörmüş N, Kara E, Karayel F. Otopsi olgularında viral solunum yolu enfeksiyonu ajanlarının multipleks PCR yöntemi ile araştırılması: beş yıllık bir çalışma. Mikrobiyol Bul 2019;53(2):179-191.

ÖZ

Viral solunum yolu enfeksiyonları, çocuk ve erişkinlerde önemli morbidite ve mortalite nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Mortaliteye neden olan enfeksiyonların tanısına postmortem incelemelerin dahil edilmesi, yeni patojenlerin belirlenmesinde, tedavi ve önleme stratejilerinin geliştirilmesinde yarar sağlayabilir. Bu çalışmanın amacı, solunum yolu enfeksiyonu düşünülen otopsi olgularında multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile viral etiyolojinin araştırılması, histopatolojik bulgularla birlikte, tespit edilen virüslerin gerçek enfeksiyon etkeni olup olmadığı ve ölüm sebebine katkısını değerlendirmektir. Bu çalışmada, Ocak 2013-Mayıs 2017 tarihleri arasında otopsi yapılan olgulardan solunum yolu enfeksiyonu şüphesi olan erişkinler ile bebek-çocuk yaş grubunu kapsayan ani ölüm olguları değerlendirilmiştir. Toplam 834 olgunun 468 (%56.1)'i erkek, 366 (%43.9)'sı kadın olup; 0-1 ay arasında 191 (%22.9), 1 ay-18 yaş arasında 593 (%71.1), > 18 yaş grubunda 50 (%6) olgu incelenmiştir. Tüm olguların 728 (%87.3)'ünde postmortem alınan nazofarengeal/trakeal sürüntü örnekleri, 106 (%12.7)'sında parafine gömülü akciğer dokusu örnekleri multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) yöntemi ile incelenmiştir. Postmortem örnekler; insan rinovirüsü (HRV), parainfluenza virüsler (PIV) (1, 2, 3, 4), influenza virüs tip A ve B (INF-A, INF-B), enterovirüs (EV), insan bokavirüsü (HBoV), adenovirüs (AdV), insan koronavirüsleri (HCoV 229, 63, HKU, 43), insan metapnömovirüsü A ve B (HMPV-A/B), parekovirüs (PV), solunum sinsityal virüsü (RSV A/B) ve *Mycoplasma pneumoniae* varlığı açısından araştırılmıştır. Multipleks Rt-PCR yöntemi ile "FTD Respiratory 21 (Fast-track Diagnostics, Luxemburg)" kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda Rotor Gene (Qiagen, Almanya) cihazında amplifiye edilmiştir. Çalışmada olguların 379 (%45.4)'unda Rt-PCR ile en az bir solunum virüsü saptanırken, 455 (%54.6)'inde herhangi bir viral etken saptanmamıştır. Olguların 278 (%33.3)'inde bir viral etken pozitif saptanırken, 83 (%9.94) olguda iki viral etken, 18 (%2.16) olguda da üç viral etken pozitif olarak saptanmıştır. Olguların tümünde ilk sırada HRV 110 (%13.2), ikinci

sırada AdV 39 (%4.7), üçüncü sırada ise RSV A/B 33 (%4) olgu ile en sık saptanan viral etkenler olmuştur. Çocuk olgularda solunum virüslerinin pozitiflik oranı %31.8, erişkin grupta ise %20 olarak tespit edilmiştir (p= 0.032). Çocuklarda en sık HRV saptanırken, erişkinlerde en sık saptanan patojen INF-A olmuştur. Olguların 101 (%12.1)'inde iki veya üçlü etken enfeksiyonları tespit edilmiştir. İkili etken enfeksiyon oranı 0-1 ay yaş grubunda %2.6 (5/191), 1 ay-18 yaş grubunda %13 (77/593), > 18 yaş grubunda ise %2 (1/50) oranında saptanmıştır. İkili etken ile gelişen enfeksiyonlarda HRV ve INF-B, HRV ve PIV, HRV ve HBoV, HRV ve AdV birlikteliği sırasıyla en sık görülmüştür. Üçlü etken enfeksiyonlarının tamamı 1 ay-18 yaş grubunda [%3 (18/593)] tespit edilmiştir. Çalışmamızda akciğer dokularının postmortem histopatolojik incelemesinde 318 (%38.1) olguda enfeksiyon bulgusu saptanmazken, en sık saptanan bulgular 233 (%28) olguda lobüler pnömoni, pürülan bronşit ve 168 (%20.1) olguda interstisyel pnömoni olarak saptanmıştır. Olguların tamamı enfeksiyon açısından değerlendirildiğinde 469 (%56.2) olguda enfeksiyon lehine bulgu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; solunum yolu enfeksiyonu düşünülen olguların otopsi ve histopatolojik incelemelerle birlikte postmortem mikrobiyolojik incelemelerinin de yapılması, ölüme neden olan enfeksiyon etkenlerinin tespit edilmesini sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Solunum yolu enfeksiyonu; multipleks PCR; solunum virüsleri; postmortem tanı.

ABSTRACT

Viral respiratory infections are one of the leading causes of morbidity and mortality, especially in children, elderly and immunocompromised patients. The inclusion of post-mortem studies to diagnose the infection causing mortality could be beneficial in specifying new pathogens and determining strategies for treatment and prevention. The aim of this study was to research viral etiology by applying multiplex real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR) method in autopsy cases who have been considered to have a respiratory infection and to assess whether the viruses detected are the primary cause of the infection and whether they have any contributory effect on the mortality together with histopathological evidence. In this study, we included a total of 834 cases consisting of sudden death cases from infantile-pediatric age group and autopsy cases from > 18 year age group with suspected respiratory tract infection in our laboratory between January 2013 and May 2017. Of 834 cases, 468 (56.1%) were male and 366 (43.9%) were female, there were 191 (22.9%) cases between 0-1 months, 593 (71.1%) cases between 1 month-18 years, and 50 (6%) cases in the > 18 years age group. In 728 of 834 (87.3%) cases nasopharyngeal/tracheal swab samples and in 106 (12.7%) of them paraffin-embedded lung tissue samples were studied by the use of "FTD Respiratory 21 (Fast-Tract Diagnostics Luxembourg)" kit, with multiplex Rt-PCR method. The post-mortem samples were evaluated for human rhinovirus (HRV), parainfluenza viruses (PIV) (1, 2, 3, 4), influenza virus type A and B (INF-A, INF-B), enterovirus (EV), human bocavirus (HBoV), adenovirus (AdV), human coronavirus (HCoV 229,63,HKU,43), human metapneumovirus A ve B (HMPV-A/B), parechovirus, respiratory syncytial virus (RSV A/B) and *Mycoplasma pneumoniae*. In our study, at least one respiratory virus was detected by Rt-PCR in 379 (45.4%) of total 834 cases, whereas no viral agent was identified in 455 (54.6%) of the cases. One viral agent was detected in 278 (33.3%), two viral agents were detected in 83 (9.94%) and three viral agents were detected in 18 (2.16%) cases. Overall, the most common viral agent was HRV 110 (13.2%) followed by AdV 39 (4.7%) and RSV A/B 33 (4%). In pediatric cases the rate of positive results for respiratory viruses was 31.8% and in adult group it was 20% (p= 0.032). The most common virus detected among children was HRV and INF-A in adult group. In 101 (12.1%) cases infections caused by two or three agents were diagnosed. Infections with two causative agents were detected as 2.6% (5/191) in 0-1 month age group, 13% (77/593) in 1 month-18 year age group and 2% (1/50) in > 18 age group. The most frequently observed co-infections with double causative agents were HRV and INF-B, HRV and PIV, HRV and HBoV, HRV and AdV combinations. Infections with three causative agents were detected completely among 1 month-18 year age [3% (18/593)] group. In our study, 318 (38.1%) cases had no signs of infection in the postmortem histopathological examination of the lung tissues, while the most common finding was lobular pneumonia/purulent bronchitis in 233 (28%) cases and the second was interstitial pneumonia in 168 (20.1%) cases. When all cases were evaluated in terms of infection, positive results were detected in 469 (56.2%) cases. As a result; postmortem microbiological diagnosis with autopsy and histopathological detection of the patients who are thought to have respiratory tract infection will also determine the infectious agents causing death.

Keywords: Respiratory tract infections; multiplex PCR; respiratory viruses; post-mortem diagnosis.

GİRİŞ

Akut solunum yolu enfeksiyonları, tüm dünyada önemli bir halk sağlığı problemidir ve her yaşta insanda enfeksiyon hastalıklarına bağlı mortalite ve morbiditenin en önemli nedenleri arasındadır¹. Solunum yolu enfeksiyonları (SYE)'nin dünya genelinde 2-6 milyondan fazla ölüme neden olduğu ve bu enfeksiyonların en sık beşinci ölüm nedenini oluşturduğu ortaya konmuştur¹. Günümüzde erişkinlerde toplum kökenli pnömonilerin %50'sinin, pediatrik yaş grubunda bronşiyolit ve pnömonilerin %15-35'inin etkeni hala saptanamamaktadır².

Ölüm olgularının doğru incelenmesi ve postmortem örneklerin uygun mikrobiyolojik yöntemlerle test edilmesi, ciddi bulaşıcı enfeksiyonların etkisini değerlendirmek açısından önemlidir. Bu incelemelerle premortem dönemde şüphelenilmeyen enfeksiyonlar tespit edilebilmektedir. Ayrıca otopsilerden elde edilen veriler yeni ve mevcut antemortem tanı yöntemlerini geliştirmeye de yardımcı olabilir. Bazı akciğer enfeksiyonlarında özellikle de mantar veya virüslerin neden olduğu enfeksiyonların antemortem tanısında şüphelenilse bile etkenin kültürde üretilmesi zordur. Otopsi, postmortem muayenenin özgüllüğünün artması nedeniyle alta yatan enfeksiyonu saptamada önemli patojenlerin pnömoni etiyojisine katkısının daha doğru tahmin edilmesine de olanak sağlamaktadır³.

Viral ve fungal patojenleri tanımlamak için dondurulmuş veya formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü dokulardan in situ veya ekstraksiyon sonucu yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleri moleküler tanı testleri olarak uygulanmaktadır^{4,5}. Benzer şekilde, postmortem dönemde klinik örneklerin moleküler analizi de tanıda giderek daha fazla kullanılmaktadır⁶. 16s rRNA dizi analizi ile patojen tanımlanması veya postmortem örnekler üzerinde multipleks PCR kullanılarak viral etkenlerin tanımlanması, ölüm nedenini ve/veya antemortem tanıyı doğrulamak için de kullanılabilir⁷.

Bu çalışmada, bebek ve çocuk yaş grubunu içeren beklenmedik ölüm olgularından ve enfeksiyon şüphesi olan erişkin otopsilerden gönderilen nazofarengeal/trakeal sürüntü örnekleri ile histopatolojik incelemede SYE şüphesi olan olguların parafine gömülü akciğer dokuları multipleks PCR yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmada SYE düşünülen otopsi olgularında multipleks PCR yöntemi ile viral etiyojinin araştırılması, histopatolojik bulgularla birlikte, tespit edilen virüslerin gerçek enfeksiyon etkeni olup olmadığı ve ölüm nedenine katkısının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, T.C. Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurum Başkanlığı Bilim Kurulu Etik Kurul onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 03.09.2013 ve Karar no: B.03.1.ATK.0.01.00.08/518).

Olgular ve Postmortem Örnekler

Ocak 2013-Mayıs 2017 tarihleri arasında SYE şüphesi olan olgular ile bebek ve çocuk yaş grubunda ani ölüm gerçekleşen olgulardan otopsi sonucu alınan ve Adli Tıp Kurumu

Postmortem Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen 834 örnek çalışma kapsamına alındı. Bu olgulardan histopatolojik incelemesinde SYE şüphesi olan 106 (%12.7) olgunun parafine gömülü akciğer dokularından alınan kesitler ile 728 (%87.3) olgudan otopsi sırasında dakron eküvyonla alınan nazofarengeal/trakeal sürüntü örnekleri viral taşıma besiyeri olan “universal transport medium (UTM) (Copan Diagnostics, İtalya)” kiti içinde soğuk zincir kurallarına uyularak birkaç saat içinde laboratuvara ulaştırıldı. Laboratuvar testleri uygulanıncaya kadar nazofarengeal/trakeal sürüntü örnekleri -70°C’de saklandı.

Mikrobiyolojik Değerlendirme

Nazofarengeal/trakeal sürüntü örnekleri ve parafine gömülü akciğer dokusu örneklerinde solunum yolu patojenlerini [insan rinovirüs (HRV), parainfluenza virüsler (PIV) (1, 2, 3, 4), influenza virüs tip A ve B (INF-A, INF-B), enterovirüs (EV), insan bokavirüsü (HBoV), adenovirüs (AdV), insan koronavirüsleri (HCoV 229, 63, HKU, 43), insan metapnömovirüsü A ve B (HMPV-A/B), parekovirüs (PV), solunum sinsityal virüsü (RSV A/ B) ve *Mycoplasma pneumoniae*] belirlemek için multiplaks Rt-PCR yöntemi uygulandı. Nükleik asitler “QIASymphony DSP Virus/Pathogen midi” kiti kullanılarak QIASymphony (Qiagen/Almanya) cihazında ekstrakte edildi. “FTD Respiratory 21 (Fast-track Diagnostics, Lüksemburg)” kiti kullanılarak multiplaks Rt-PCR yöntemi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda Rotor Gene (Qiagen, Almanya) cihazında amplifiye edildi⁸.

Ayrıca formalinle fikse edilmiş tüm parafine gömülü akciğer dokularından nükleik asitler ekstrakte edildi. Her bloğun üç veya dört adet 10 mm kalınlığındaki kesiti bir mikrotom vasıtasıyla kesildi. Parafine gömülü akciğer dokularına, ksilen ve etil alkol deparafinasyon prosedürü uygulandı. Ardından 24 saat süreyle 20 ml proteinaz K ve 600 ml ATL tampon çözeltisi eklenerek inkübe edildi⁹.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel veri analizi için SPSS 20.0 programı kullanıldı. Veriler arasında karşılaştırma yaparken ki-kare testlerinden (Pearson Chi-Square ve Fisher’s Exact) yararlanıldı. İstatistiksel olarak p değeri < 0.05 olan sonuçlar anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 834 olgunun 468 (%56.1)’i erkek, 366 (%43.9)’sı kadın olgulardan oluşmuştur. Olguların yaş dağılımı 0-1 ay (yenidoğan), 1 ay-18 yaş ve > 18 yaş (erişkin) olarak üç gruba ayrılarak değerlendirilmiştir. Yaş grupları ve cinsiyet dağılımları Tablo I’de gösterilmiştir.

Solunum virüsleri toplam 834 olgunun 379 (%45.4)’unda pozitif, 455 (%54.6) ’inde ise negatif bulunmuştur. Olguların 278 (%33.3)’inde bir, 83 (%9.94)’ünde iki, 18 (%2.16)’inde üç viral etken pozitif olarak saptanmıştır. Çoklu etken bulunan örneklerin %94’ü 1 ay-18 yaş arasındaki olgu grubuna, %4.9’u erişkin yaş grubuna, %1.1’i de 0-1 ay arası yenidoğan grubuna ait bulunmuştur. Solunum virüslerinin dağılımı Tablo II’de gösterilmiştir. Yaş gruplarına göre saptanan solunum virüslerinin dağılımı da Tablo III’te özetlenmiştir.

Tablo I. Cinsiyet ve Yaş Gruplarına Göre Olguların Dağılımı

Yaş grubu	Kadın		Erkek		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
0-1 ay	88	10.6	103	12.4	191	22.9
1 ay-18 yaş	262	31.4	331	39.7	593	71.1
> 18 yaş	16	1.9	34	4.1	50	6
Toplam	366	43.9	468	56.1	834	100

En sık saptanan viral etkenler sırasıyla, 110 (%13.2) olgu ile HRV, 39 (%4.7) olgu ile AdV, 33 (%4) olgu ile RSV A/B olarak tespit edilmiştir.

Tüm olguların 784 (%94)'ünün 0-18 yaş arası çocuk yaş grubunda, 50 (%6) olgunun ise erişkin yaş grubunda yer aldığı gözlenmiştir. Çocuk olguların %31.8'inde, erişkin olguların %20'sinde en az bir solunum virüsü pozitifliği saptanmıştır. Çocuklarda erişkin olgulara göre viral solunum yolu patojenleri ile enfekte olma oranı istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p= 0.032). Çocuklarda en sık etken olarak HRV [%15.7 (93/593)] saptanırken, erişkinlerde en sık saptanan patojen INF-A virüsü [%6 (3/50)] olmuştur.

Akciğer dokusunun postmortem histopatolojik incelemesinde en sık saptanan bulgular 233 (%28) olguda saptanan lobüler pnömoni/pürülan bronşit ve 168 (%20.1) olguda saptanan interstisyel pnömoni olmuştur. Erken dönem lobüler pnömoni saptanan 46 olgu da ilk grup içerisinde değerlendirilmiştir. Toplamda 318 (%38.1) olguda enfeksiyon bulgusu saptanmamıştır. Diğer histopatolojik bulgular Tablo IV'te gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Solunum yolu enfeksiyonları (SYE), çocukluk çağıında en sık geçirilen ve en çok ölüme neden olan enfeksiyon hastalıklarıdır ve SYE'lerin %80-90'ında virüsler etken olarak gözlenmektedir^{10,11}. Solunum yolu virüslerinin tanısında hücre kültürü, hızlı antijen testleri, serolojik testler ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Viral kültür altın standart yöntemdir ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda nükleik asit amplifikasyon testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri geleneksel yöntemlerden daha üstün bulunmuştur. Multipleks PCR yöntemi ile bir veya birden fazla solunum virüsünü eş zamanlı saptamak mümkün olmaktadır^{12,13}. Bu çalışmada, SYE düşünülen otopsi olgularının, postmortem örneklerinden multipleks PCR ile etiyolojinin araştırılması planlanmıştır.

Akçalı ve arkadaşları¹⁴ çocuklarda viral solunum yolu etkenlerinin araştırıldığı 160 olgu ile yaptıkları araştırmalarında, olguların 67 (%41.8)'sinde PCR ile en az bir etken açısından pozitif sonuç saptamışlardır. RSV (%61.2) en sık saptanan virüs olup, bunu %35.8 ile rinovirüsler izlemiştir. Do ve arkadaşları¹⁵ Hollanda'da yaptıkları çalışmalarında, 309 çocuktan alınan örneğin %72'sini multipleks PCR yöntemiyle pozitif bulmuşlar, RSV'yi 73 (%24) örnekte en sık etken olarak saptamışlardır. Brezilya'da beş yaş altı 407 çocukta aynı

Tekli ve Çoklu Etken Enfeksiyonlarında Solunum Virüslerinin Dağılımı										İkili Etken Enfeksiyonlarında Patojen Dağılımı									
Patojen (n)	Tek etken		İkili etken		Üçlü etken		İkili Etken Enfeksiyonlarında Patojen Dağılımı												
	n	%	n	%	n	%	INF-A	HRV	INF-B	HCoV	PIV	HMPV A/B	HBoV	MP	RSV	PV	EV	AdV	
INF-A (31)	19	6.8	6	3.7	6	11.1	1			2		1							1
HRV (159)	110	39.6	42	25.3	7	13	1	7	7	4	3	7			3	2	1	7	
INF-B (14)	3	1	10	6	1	1.9				2									
HCoV (52)	25	9	18	10.8	9	16.6	2	4	2	2*		1			4				1
PIV (37)	17	6.1	16	9.7	4	7.4		7		2		2			1				4
HMPV A/B (16)	6	2.2	9	5.4	1	1.9	1	3				1				2			2
HBoV (32)	12	4.3	18	10.8	2	3.7		7		1	2				2				5
MP (8)	7	2.6	1	0.6															
RSV (52)	33	11.9	13	7.8	6	11.1		3		4	1	2							3
PV (11)			7	4.2	4	7.4	1	2			2			1					1
EV (12)	7	2.5	3	1.8	2	3.7		1	1										
AdV (74)	39	14	23	13.9	12	22.2	1	7		1	4	2	5		3				
Toplam	278	100	166	100	54	100													

* HCoV grubundaki 2 olguda 2 farklı tip HCoV birlikte saptanmıştır.

HRV: İnsan rinovirüsü; AdV: Adenovirüs; RSV: Solunum sinsiyal virüsü; INF-A: İnfluenza A virüsü; INF-B: İnfluenza B virüsü; HBoV: İnsan bokavirüsü; PV: Parainfluenza virüsler; HMPV: İnsan metapnömovirüsü; EV: Enterovirüs; MP: Parekovirüs, MP: *Mycoplasma pneumoniae*.

Tablo III. Yaş Gruplarına Göre Solunum Virüslerinin Dağılımı

Virüsler	0-1 ay n (%)	1 ay-18 yaş n (%)	> 18 yaş n (%)	Toplam n (%)
HRV	17 (9)	93 (15.7)	-	110 (13.2)
AdV	3 (1.6)	34 (5.7)	2 (4)	39 (4.7)
RSV A/B	8 (4.2)	24 (4)	1 (2)	33 (4)
INF-A	2 (1)	14 (2.4)	3 (6)	19 (2.3)
HBoV	1 (0.5)	10 (1.7)	1 (2)	12 (1.5)
Cor 229	1 (0.5)	9 (1.5)	-	10 (1.1)
PIV-3	-	8 (1.3)	-	8 (1)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	7 (1.2)	-	7 (0.8)
HMPV A/B	-	6 (1.1)	-	6 (0.7)
Cor 63	1 (0.5)	6 (1.1)	-	7 (0.8)
EV	-	6 (1.1)	1 (2)	7 (0.8)
PIV-4	-	5 (0.8)	1 (2)	6 (0.7)
INF-B	-	3 (0.5)	-	3 (0.4)
Cor HKU	-	3 (0.5)	-	3 (0.4)
Cor 43	2 (1)	2 (0.3)	1 (2)	5 (0.6)
PIV-2	-	2 (0.3)	-	2 (0.2)
PIV-1	-	1 (0.1)	-	1 (0.1)
İkili etken	5 (2.6)	77 (13)	1 (2)	83 (10)
Üçlü etken	-	18 (3)	-	18 (2.1)
Toplam pozitif	40 (20.9)	328 (55.3)	11 (22)	379 (45.4)
Toplam negatif	151 (79.1)	265 (44.7)	39 (78)	455 (54.6)
Genel toplam	191 (100)	593 (100)	50 (100)	834 (100)

HRV: İnsan rinovirüsü; AdV: Adenovirüs; RSV A/B: Solunum sinsityal virüsü A/B; INF-A: İnfluenza A virüsü; INF-B: İnfluenza B virüsü; HBoV: İnsan bokavirüsü; Cor 229, Cor 63, Cor HKU, Cor 43: İnsan koronavirüsleri; PIV-1-2-3-4: Parainfluenza virüsler; HMPV: İnsan metapnömovirüsü; EV: Enterovirüs.

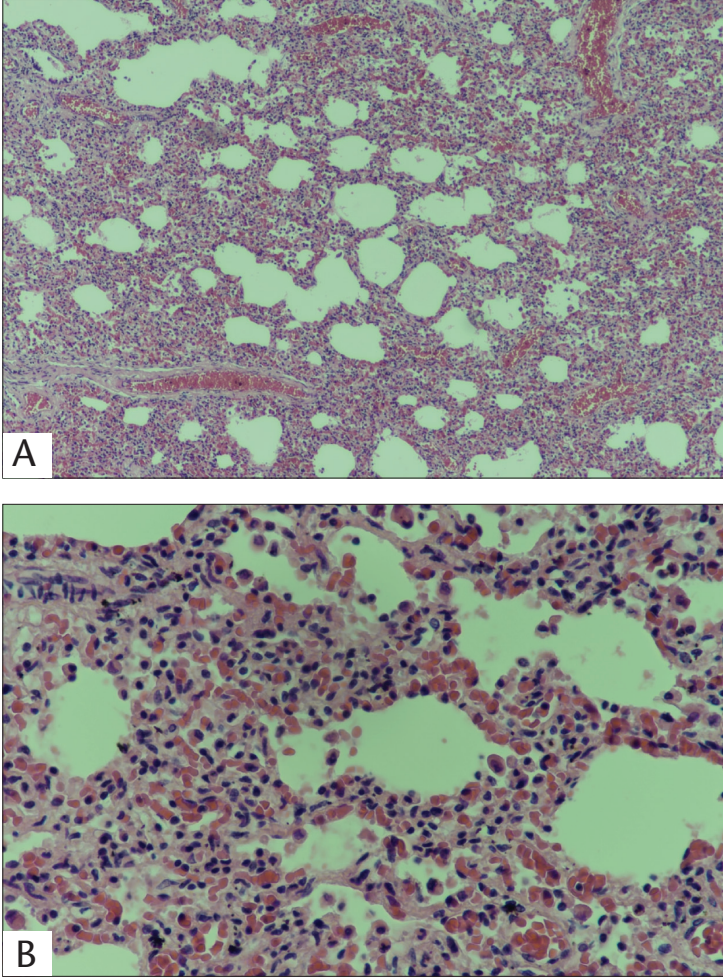
yöntemle yapılan bir diğer çalışmada ise örneklerin %85.5'inde viral patojen saptanmış olup, hastaların %37'sinde en sık saptanan virüs RSV olmuştur¹⁶. Bizim çalışmamızda da multiplex PCR ile 379 (%45.4) olguda en az bir viral etken pozitifliği saptanmıştır. İnsan rinovirüsü (HRV) 110 (%13.2) olguda en fazla saptanan etken olmuştur. Klinik çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda HRV daha fazla saptanmıştır. Çalışmamızda olgu grubu oluşturulurken postmortem mikrobiyolojik örnekleme protokolü örnek alınmıştır¹⁷. Bu protokole göre bebeklik ve çocukluk dönemine ait beklenmedik ölümler (klinik belirtisi olan ve olmayan) ile SYE şüphesi olan erişkin olgulardan alınan postmortem örnekler çalışmaya dahil edilmiştir. Bu nedenle de alınan ilk gruptaki ölümlerin sebebinin hepsini SYE'lerin oluşturmayacağı göz önünde bulundurulursa, olguların bir kısmında saptanan HRV'nin asemptomatik taşıyıcılık nedeniyle saptandığı düşünülmüştür. Bununla birlikte,

Tablo IV. Akciğer Dokularının Postmortem Histopatolojik Değerlendirmesi

	Sayı	%
Enfeksiyon bulgusu saptanmayan	318	38.1
İnterstisyel pnömoni	168	20.1
Lobüler pnömoni, pürülan bronşit	233	28
Neonatal pnömoni	27	3.2
Allerjik bronşit, bronşiyolit	3	0.4
Nekrotizan granüloamatöz enflamasyon	2	0.3
Neonatal hiyalen membran hastalığı	8	1
İnterstisyel pnömoni üzerine eklenmiş bakteriyel enfeksiyon	38	4.5
Otoliz	8	1
Ulaşılamayan	29	3.4
Toplam	834	100

HRV uzun süredir hafif üst SYE'lere neden olan benign bir virüs olarak kabul edilmesine rağmen, HRV'nin akut SYE'lerde ve daha ciddi anlamda bronşiyolit etkeni olduğuna dair çalışmalar bulunmakta, ancak pnömoni etkeni olarak rolü henüz tam olarak kanıtlanmamıştır¹⁸⁻²⁰. Türkiye'de SYE olan çocuklarda tespit edilen viral etkenlerin klinik sonuçlarının özetlendiği, 143 olgunun yer aldığı bir çalışmada; HRV ve RSV'nin etken olduğu hastalıkların şiddetinin diğer virüslerden daha yüksek olduğu ve HRV'nin de alt SYE'ler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir²¹. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar HRV-C'nin yeni genotipi ile görülen enfeksiyonlarının, üst solunum yolu semptomları ile birlikte daha sıklıkla bronşit, bronşiyolit ve pnömoni ile ilişkili olduğunu göstermektedir²². Çalışmamızda da HRV saptanan 110 olgu akciğerdeki histopatolojik bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde, 41 (%37.3) olguda enfeksiyon lehine bulgu saptanmazken, 35 (%31.8) olguda interstisyel pnömoni, 29 (%26.4) olguda lobüler pnömoni, pürülan bronşit, 3 (%2.7) olguda interstisyel pnömoni üzerine eklenmiş bakteriyel enfeksiyon, 1 (%0.9) olguda neonatal pnömoni, 1 (%0.9) olguda da allerjik bronşit, bronşiyolit tespit edilmiştir. HRV saptanan 110 olgunun 69 (%62.7)'unda enfeksiyon lehine bulgu saptandığı göz önünde bulundurulduğunda bizim çalışmamızın da son literatürü desteklediği sonucuna varılmıştır (Resim 1).

Çalışmamızda, olguların 101 (%12.1)'inde iki veya üç solunum virüsünün etken olduğu çoklu enfeksiyon etkenleri görülmüştür (Tablo III). On dokuz farklı merkez verilerinin değerlendirildiği bir çalışmada ko-enfeksiyon oranlarının %5-62 arasında değiştiği; en sık RSV'ye rastlandığı ve RSV'ye en sık eşlik eden virüslerin Adv, HBoV ve INF-A olduğu gösterilmiştir²³. Bizim çalışmamızda, ikili etken saptanan enfeksiyonlarda en fazla HRV + INF-B, HRV + PIV, HRV + HBoV ve HRV + Adv birlikteliği görülmüştür. Üçlü etken



Resim 1. Hematoksilen-Eozin (HE) boyama sonrası akciğer kesitlerindeki histopatolojik bulgular. HRV enfeksiyonuna bağlı intraalveoler septumlarda mononükleer hücre infiltrasyonu ve ödem ile kalınlaşma (interstisyel pnömoni ile uyumlu) [A (HE, x100); B (HE, x400)].

enfeksiyonlarda ise spesifik bir birliktelik gözlenmemiştir. Bununla birlikte, tekli enfeksiyona göre daha fazla oranda ikili ve üçlü enfeksiyonlarda yer alan virüsün HBoV olduğu saptanmıştır. Türkiye’de solunum yolu virüslerinin prevalansının 12 yıllık bulgularının değerlendirildiği bir çalışmada da bizim bulgularımıza benzer sonuçlar saptanmış ve çalışmamızda saptanan ko-enfeksiyon görülme sıklığı ülkemizde yapılan diğer klinik çalışmaların sonuçlarıyla benzer olarak bulunmuştur^{14,24}.

Viral etkenler çocukların bir kısmında doğrudan enfeksiyona ve ölüme neden olduğu gibi bakteriyel kolonizasyona ve buna bağlı sekonder enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde viral pnömonilere bağlı ölüm oranı %1-7.3 iken, bakteriyel pnömonilerde bu oran %10-14, karma enfeksiyonlarda ise %16-18 olarak bildirilmektedir²⁵. Çocuklarda ani ölümün ortalama %50'sinde (çalışmalara göre bu oran %15-86 arasında değişmektedir) enfeksiyöz bir etken olduğu saptanmıştır. Bu enfeksiyonlar genellikle solunum sistemi ile ilgili olarak tespit edilmiştir²⁶⁻²⁸. Çalışmamızda da 834 olgunun 784 (%94)'ü çocuk yaş grubundadır ve bu olguların %31.8'inde en az bir solunum yolu virüsü pozitif olarak saptanmıştır. Elde edilen bu sonuç diğer çalışmalarını destekler niteliktedir. Çocuklar ve erişkinlerin viral solunum yolu patojenleri ile enfekte olma sıklığına göre karşılaştırma yapıldığında, çocuklarda saptanan pozitif sonuç sıklığı istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p=0.032$) yüksek bulunmuştur. Çocuklarda HRV en çok gözlenen etken olarak saptanırken, erişkinlerde INF-A virüsü en sık saptanan patojen olmuştur. Yapılan çalışmalarda pediatrik yaş grubunda solunum yolu virüslerinin pozitif saptanma oranlarının %30 ila %96 arasında değiştiği gözlenmiştir²³. Virüs kaynaklı SYE'ler çocuk yaş grubunda erişkinlere göre iki üç kat daha fazla görülmektedir.

Yapılan postmortem araştırmalarda SYE viral etiyojisi, olguların %20-48'inde tespit edilmektedir^{29,30}. Bizim çalışmamızda da saptanan oran (%45.4) yapılan çalışmalara benzer olarak bulunmuştur.

Histolojik veya mikrobiyolojik tanıyla ilgili olası bir problem, bir mikroorganizmanın (özellikle karışık bir enfeksiyonda) saptanmasının, hastalığın veya ölümün doğrudan etkeni olduğu anlamına gelmemesi durumunda gözlenmektedir. Örneğin, grippe başlıca ölüm genellikle sekonder piyojenik bakteriyel pnömoni nedeniyle olmaktadır³¹. Bununla birlikte, hastalığın histolojik bulgularının mikrobiyolojik sonuçlarla ilişkilendirildiği ikili bir yaklaşım, neden-sonuç ilişkisini güçlendirecektir. Çalışmamızda akciğer dokularının postmortem histopatolojik incelemesinde 318 (%38.1) olguda enfeksiyon bulgusu saptanmazken, en sık saptanan bulgulardan ilki 233 (%28) olguda lobüler pnömoni, pürülan bronşitken, ikinci sırada saptanan bulgu 168 (%20.1) olguda interstisyel pnömoni olmuştur. Olguların 38 (%4.5)'inde interstisyel pnömoni üzerine eklenmiş bakteriyel enfeksiyon, 27 (%3.2)'inde neonatal pnömoni, 3 (%0.4) olguda allerjik bronşit, bronşiyolit tespit edilmiştir. Olguların tamamı enfeksiyon açısından değerlendirildiğinde 469 (%56.2) olguda enfeksiyon lehine bulgu tespit edilmiştir. Ayrıca en az bir viral etken saptanan 379 olgunun otopsi raporları değerlendirildiğinde 160 (%42.2)'inde ölüm sebebi olarak akciğer enfeksiyonu ya da buna bağlı gelişen komplikasyonlar sebebiyle ölümün meydana gelmiş olabileceği sonucuna varılmıştır. Postmortem mikrobiyolojik incelemelerin, histopatolojik verilerle birlikte değerlendirilmesinin ölüm sebebine büyük oranda katkısı olduğunu düşünmekteyiz.

Başka bir nedenle ölen çocuklarda sıklıkla viral hastalıklar saptanabildiği gibi aniden ölen çocuklarda virüsün saptanması, mutlaka bu viral hastalıktan dolayı öldükleri anla-

mına gelmemektedir. Ölüm ve viral hastalık arasındaki ilişki mutlaka otopsi, histolojik mikroskopik inceleme ve virolojik testlerde yapılan makroskopik incelemeyi de içeren standart multidisipliner yaklaşım gerektirmektedir^{32,33}. Ölümle sonuçlanan, SYE olan olgularda yapılan postmortem incelemeler, ölümcül SYE'nin nedenlerini anlamamızı sağlamaktadır. Antemortem mikrobiyolojinin başarısız olduğu veya yapılamadığı durumlarda otopsi örneği, etken patojenin kültür, histoloji veya PCR teknikleriyle kesin bir şekilde teşhis edilmesine olanak sağlayacaktır³. SYE olan kişilerin akciğer dokusunun postmortem incelenmesi, ölümden önce tanı konulamamış olgularda tanı koymak veya kesin olmayan antemortem tanıyı doğrulamak için bir şans sunmaktadır³.

Sonuç olarak, otopsi, mikrobiyolojik ve histopatolojik incelemelerle birlikte postmortem solunum yolu viral enfeksiyonlarının tanısının sistematik olarak değerlendirilmesi oldukça yararlı görünmektedir. Her ne kadar postmortem tanı tüm olgularda ölüm nedenlerini ortaya çıkarmasa da, elde edilen bilgiler, ölümcül hastalığı olan popülasyon içinde bulunan patojenleri tanımlayarak ileride solunum yollarından kaynaklanan ölümlerin önlenmesine yardımcı olacaktır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. HGBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015;385(9963):117-71.
2. Hamelin ME, Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 2004;38(7):983-90.
3. Turner GD, Bunthi C, Wonodi CB, Morpeth SC, Molyneux CS, Zaki SR, et al. The role of postmortem studies in pneumonia etiology research. *Clin Infect Dis* 2012;54(Suppl 2):165-71.
4. Denison AM, Blau DM, Jost HA, Jones T, Rollin D, Gao R, et al. Diagnosis of influenza from respiratory autopsy tissues detection of virus by real-time reverse transcription-PCR in 222 cases. *J Mol Diagn* 2011;13(2):123-8.
5. Munˆoz-Cadavid C, Rudd S, Zaki SR, Patel M, Moser SA, Brandt ME, et al. Improving molecular detection of fungal DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: comparison of five tissue DNA extraction methods using panfungal PCR. *J Clin Microbiol* 2010;48(6):2147-53.
6. Muldrew KL. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Curr Opin Pediatr* 2009;21(1):102-11.
7. Rogers GB, Carroll MP, Bruce KD. Studying bacterial infections through culture-independent approaches. *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 11):1401-18.
8. Diagnosis of Infections Caused by Viruses, Chlamydia, Rickettsia and Related Organisms. Chapter 23. In: Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC et al. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Wolters Kluwer, 6th Edition, 2017. p.1500-87.
9. Chan PKS, Chan DPC, To K-F, Yu MY, Cheung JLK, Cheng AF. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *J Clin Pathol* 2001;54:401-3.
10. Yılmaz G, Uzel N, Işık N, Uğur S, Aslan S, Badur S. Akut alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda viral etkenler ve respiratory syncytial virüs alt grupları. *İnfek Derg* 2000;14(2):157-64.

11. Akşit S. Acute respiratory tract infections-1. *STED* 2002;11(4):132-5.
12. Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods* 2005;126(1-2):53-63.
13. Coiras M T, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Brena P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 2004;72(3):484-95.
14. 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;215-20.
15. Do AH, van Doorn HR, Nghiem MN, Bryant JE, Hoang TH, Do QH, et al. Viral etiologies of acute respiratory infections among hospitalized Vietnamese children in Ho Chi Minh City, 2004-2008. *PLoS One* 2011;6(3):18176.
16. Bezerra PG, Britto MC, Correia JB, Duarte Mdo C, Fonceca AM, Rose K, et al. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *PLoS One* 2011;6(4):18928.
17. Fernandez-Rodriguez A, Cohen MC, Lucena J, Van de Voorde W, Angelini A, Ziyade N, et al. How to optimise the yield of forensic and clinical post-mortem microbiology with an adequate sampling: a proposal for standardisation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34(5):1045-57.
18. Papadopoulos NG, Bates PJ, Bardin PG, Papi A, Leir SH, Fraenkel DJ, et al. Rhinoviruses infect the lower airways. *J Infect Dis* 2000;181(6):1875-84.
19. Richard N, Komurian-Pradel F, Javouhey E, Perret M, Rajoharison A, Bagnaud A, et al. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27(3):213-7.
20. Broberg E, Niemela J, Lahti E, Hyypia T, Ruuskanen O, Waris M. Human rhinovirus C--associated severe pneumonia in a neonate. *J Clin Virol* 2011;51(1):79-82.
21. Bicer S, Giray T, Cöl D, Erdag GC, Vitrinel A, Gürol Y, et al. Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. *Ital J Pediatr* 2013;39:22.
22. Renwick N, Schweiger B, Kapoor V, Liu Z, Villari J, Bullmann R, et al. A recently identified rhinovirus genotype is associated with severe respiratory-tract infection in children in Germany. *J Infect Dis* 2007;196(12):1754-60.
23. Goka EA, Valley 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):363-7.
24. Çiçek C, Arslan A, Karakuş HS, Yalaz M, Saz EU, Pullukçu H, et al. Prevalence and seasonal distribution of respiratory viruses in patients with acute respiratory tract infections, 2002-2014. *Mikrobiyol Bul* 2015;49(2):188-200.
25. Simoes EAF, Cherian T, Chow J, Shahid-Salles SA, Laxminarayan R, John TJ. Acute respiratory infections in children. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, (eds). *Disease control priorities in developing countries*. 2nd ed. 2006, World Bank, Washington (DC).
26. Eisenstein EM, Haklai Z, Schwartz S, Klar A, Stein N, Kerem E. Investigation of unexplained infant deaths in Jerusalem, Israel 1996-2003. *Arch Dis Child* 2007;92(8):697-9.
27. Sadler DW, Nakano R. The value of a thorough protocol in the investigation of sudden infant deaths. *J Clin Pathol* 1998;51(9):689-94.
28. Vennemann MM, Bajanowski T, Butterfass-Bahloul T, Sauerland C, Jorch G, Brinkmann B, et al. Do risk factors differ between explained sudden unexpected death in infancy and sudden infant death syndrome? *Arch Dis Child* 2007;92(2):133-6.
29. An SF, Gould S, Keeling JW, Fleming KA. Role of respiratory viral infection in SIDS: detection of viral nucleic acid by in situ hybridization. *J Pathol* 1993;171(4):271-8.
30. Bajanowski T, Rolf B, Jorch G, Brinkmann B. Detection of RNA viruses in sudden infant death (SID). *Int J Legal Med* 2003;117(4):237-40.

31. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis* 2008;198(7):962-70.
32. Desmons A, Terrade C, Boulagnon C, Giusti D, Nguyen Y, Androletti L, et al. Post-mortem diagnosis, of cytomegalovirus and varicella zoster virus co-infection by combined histology and tissue molecular biology, in a sudden unexplained infant death. *J Clin Virol* 2013;58(2):486-9.
33. la Grange H, Verster J, Dempers JJ, de Beer C. Review of immunological and virological aspects as contributory factors in sudden unexpected death in infancy (SUDI). *Forensic Sci Int* 2014; 245:12-6.