

T.C
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKUT GASTROENTERİTLİ HASTALARDA ROTAVİRUS, ADENOVİRUS,
NOROVİRUS TESPİTİ VE ROTAVİRUS GENOTİP TAYİNİ

Fatime Habibe CANERİĞİ

Tez Danışmanı

Doc. Dr. Birol ŞAFAK

Tekirdağ-2021

Dr. Öğretim Üyesi Birol ŞAFAK danışmanlığında, Fatime Habibe CANERİĞİ tarafından hazırlanan “AKUT GASTROENTERİTLİ HASTALARDA ROTAVİRUS, ADENOVİRUS, NOROVİRUS TESPİTİ VE ROTAVİRUS GENOTİP TAYİNİ ” başlıklı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından gg.aa.yyyy tarihinde Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans/ tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul/red edilmiştir.

Jüri Başkanı	:	Ünvan Ad SOYAD	İmza:
Üye	:	Ünvan Ad SOYAD	İmza:
Üye	:	Ünvan Ad SOYAD	İmza:
Üye	:	Ünvan Ad SOYAD	İmza:

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Enstitü Müdürü

ÖZET

AKUT GASTROENTERİTLİ HASTALARDA ROTAVİRUS, ADENOVİRUS, NOROVİRUS TESPİTİ VE ROTAVİRUS GENOTİP TAYİNİ

Akut enfeksiyöz gastroenterit, tüm dünyada görülen yaygın bir hastalıktır ve çoğu vakaya viral patojenler neden olur. Rotavirus (RV), Norovirus, Adenovirus (AdV) ve Astrovirusler dahil olmak üzere birçok farklı virus, çoğu akut viral gastroenterit vakasından sorumludur. Centers for Disease Control (CDC) göre, viral gastroenterit enfeksiyonları dünya çapında her yıl 200.000'den fazla çocuk ölümüne neden olmaktadır. Bunlardan RV, aşıyla önlenilebilir bir hastalıktır. Ancak aşılarda kapsamlarında farklılıklar bulunduğundan, bölgelere göre yerleşik genotipler için uygun aşı seçimi önemlidir. Bölgemizde akut gastroenteritli çocuklarda RV, AdV ve Norovirus enfeksiyonlarının tespiti ve RV genotip tayini yapmak amacıyla hastanemiz çocuk hastalıklarına ait birimlere başvuran çocuklara ait toplam 341 dışkı örneği çalışmaya dahil edildi. ELISA veya immunokromotografik yöntemlerle dışkıda antijen tespiti yapıldı. RV pozitif örneklerden ise genotip tayini yapıldı. Dışkı örneklerinde RV pozitifliği %23.1, Norovirus %7.3, AdV pozitifliği ise %12.9 olarak tespit edildi. Ülkemiz verileriyle karşılaştırıldığında RV görülme oranı ülkemizden bildirilen çalışmalara benzer, AdV görülme oranı daha yüksek ve NoV görülme oranı ise daha düşük bulunmuştur. RV genotip analizinde ise en sık görülen G tipi G2 (%52.5) olarak bulunmuştur. Bunun dışında G1, G9, G3, G4 genotipleri tespit edilmiştir. En sık görülen P tipi ise P4 (%83) olarak bulunmuştur. Ayrıca P9 ve P10 genotipleri tespit edilmiştir. G ve P genotipinin birlikte tespit edildiği numunelerin dağılımına bakıldığında; en sık olarak G1P [4], G2P [9], G9P [4] genotipleri görülmüştür. RV aşılardan Rota Teq[®], ülkemiz ve bölgemizde görülen genotipleri en geniş olarak kapsayan aşı olarak görülmektedir. Bölgemizde rastlanan RV genotiplerini %87.5 oranında kapsamaktadır. Genotiplerin ülke ve bölgelere göre değişkenlik göstermesi nedeniyle RV hastalığının mevcut yükünü artırma potansiyeline sahip suşların ortaya çıkışı sürekli olarak izlenmelidir.

Anahtar Kelimeler: Gastroenterit, Rotavirus, Adenovirus, Norovirus, Genotip

ABSTRACT

DETECTION OF ROTAVIRUS, ADENOVIRUS, NOROVIRUS, AND DETERMINATION OF ROTAVIRUS GENOTYPE IN PATIENTS WITH ACUTE GASTROENTERITIS

ABSTRACT

Acute infectious gastroenteritis is a common disease worldwide and most cases are caused by viral pathogens. Many different viruses are responsible for most cases of acute viral gastroenteritis, including Rotavirus (RV), Norovirus, Adenovirus (AdV), and Astroviruses. According to the Centers for Disease Control (CDC), viral gastroenteritis infections cause more than 200,000 child deaths worldwide each year. of these, RV is a vaccine-preventable disease. However, since there are differences in the scope of the vaccines, it is important to select the appropriate vaccine for the established genotypes according to the regions. A total of 341 stool samples from children who applied to the pediatric units of our hospital in order to detect RV, AdV and Norovirus infections in children with acute gastroenteritis in our region and to determine the RV genotype were included in the study. Antigen detection was performed in stool by ELISA or immunochromatographic methods. Genotype determination was made from RV positive samples. In stool samples, RV positivity was 23.1%, Norovirus 7.3%, and AdV positivity was 12.9%. When compared with the data of our country, the incidence of RV was similar to the studies reported from our country, the incidence of AdV was higher and the rate of NoV incidence was lower. In the RV genotype analysis, the most common G type was found to be G2 (52.5%). Apart from this, G1, G9, G3, G4 genotypes were determined. The most common P type was found to be P4 (83%). In addition, P9 and P10 genotypes were determined. Considering the distribution of the samples in which the G and P genotypes were determined together; the most common genotypes were G1P [4], G2P [9], G9P [4]. Among the RV vaccines, Rota Teq® is seen as the vaccine that covers the most genotypes seen in our country and region. It covers 87.5% of the Rotavirus genotypes found in our region. Because genotypes vary by country and

region, emergence of strains with the potential to increase the current burden of RV disease should be continuously monitored.

Keywords: Gastroenteritis, Rotavirus, Adenovirus, Norovirus, Genotype



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince hem akademik hem de kişisel yaşantımda bana her konuda yardımcı olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çalışmalarım da büyük katkısı olan değerli hocam ve danışmanım Doç. Dr. Birol ŞAFAK'a,

Akademik hayatımda eğitim sürecime katkılarından dolayı Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'nda görev yapan değerli hocalarım Prof. Dr. Nuri KİRAZ'a, Prof. Dr. Dumrul GÜLEN'e, Dr. Öğr. Üyesi BERNA ERDAL'a, Arş. Gör. Dr. Mine AYDIN KURÇ'a,

Laboratuvar çalışmalarım da bilgileri ve tecrübelerini esirgemeyen Sinem MUTLU'ya

Yüksek lisans eğitim süresince hep yanımda olan ve kıymetli arkadaşım Serdar IŞIK'a,

Hem meslek hayatımda hem de yüksek lisans eğitimim süresince hep bana güvenen, her zaman beni takdir ederek onore eden, yardımlarını hiç sevgili Ailem'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

BEYAN FORMU

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Fatime Habibe CANERİĞİ



ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
BEYAN FORMU	vi
TABLO DİZİNİ	ix
ŞEKİL DİZİNİ	x
GRAFİK DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Epidemiyoloji	1
1.2. Patofizyoloji	2
1.3. Klinik.....	3
1.4. Tanı.....	4
1.4.1. Ayırıcı Tanı	4
1.5. Tedavi	4
1.6. Rotavirus	5
1.7. Norovirus.....	12
1.8. Adenovirus	16
2. MATERYAL – METOD	20
2.1. Örneklerin toplanması ve ön hazırlık	20
2.2. Adenovirus- rotavirus tespiti	20
2.3. Norovirus tespiti	21
2.4. Rotavirus genotip tespiti.....	22
2.4.1. DNA İzolasyonu.....	22
2.4.2. Rotavirus G Genotiplendirilmesi	23

2.4.3. Rotavirus P Genotiplendirmesi	24
2.5. Jel Elektroforez ve Görüntüleme	26
3. BULGULAR	28
3.1. Rotavirus Tespiti	29
3.2. Norovirus Tespiti	29
3.3. Adenovirus Tespiti	29
3.4. Rotavirus G genotiplendirmesi sonuçları	30
3.5. Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) Analizi	33
3.6. Rotavirus P genotiplendirmesi sonuçları	34
3.7. Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) Analizi	38
4. TARTIŞMA	40
5. SONUÇ	56
6. KAYNAKLAR	57

Tablo dizini

TABLO 1: GENOM SEGMENTLERİ VE KODLADIĞI PROTEİNLER	6
TABLO 2: ADENOVİRUSLERİN ENFEKSİYON BÖLGELERİ	18
TABLO 3: RT-QPCR ISIL DÖNGÜ PROGRAMI	23
TABLO 4: RT-QPCR ISIL DÖNGÜ PROGRAMI	24
TABLO 5: AGARUZ JEL ÜRÜN BOYUTLARINA GÖRE G GENOTİPLERİ	24
TABLO 6: RT-QPCR ISIL DÖNGÜ PROGRAMI	25
TABLO 7: MULTİPLEKS QPCR ISIL DÖNGÜ PROGRAMI.....	26
TABLO 8: AGARUZ JEL ÜRÜN BOYUTLARINA GÖRE P GENOTİPLERİ.....	26
TABLO 9: HASTALARIN YAŞ GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMI VE POZİTİFLİK SAYILARI	28
TABLO 10: G GENOTİPLENDİRME AGARUZ JEL BANT BOYUTU, ERİME EĞRİSİ TM DEĞERİ VE HRM GRUP SONUÇLARI	30
TABLO 11: P GENOTİPLENDİRME AGARUZ BANT, ERİME EĞRİSİ VE HRM GRUP SONUÇLARI	35

Şekil dizini

ŞEKİL 1: 5 YAŞINDAN KÜÇÜK ÇOCUKLARDA ROTAVİRUS ÖLÜM ORANLARI.....	8
ŞEKİL 2: ROTAVİRUS – ADENOVİRUS AG COMBO TEST DEĞERLENDİRMESİ.....	21
ŞEKİL 3: G GENOTİPLENDİRME MULTİPLEKS QPCR SONUÇLARININ AGARUZ JEL BANT BOYUTLARI	30
ŞEKİL 4: P GENOTİPLENDİRME MULTİPLEKS PCR SONUÇLARININ AGARUZ JEL BANT BOYUTLARI	35



Grafik Dizini

GRAFİK 1: MULTİPLEKS QPCR AMPLİFİKASYON EĞRİLERİ.....	32
GRAFİK 2: NORMALİZE EDİLMİŞ YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME EĞRİSİ.....	33
GRAFİK 3: KONVANSİYONEL ERİME EĞRİSİ	33
GRAFİK 4: G2 GENOTİPİNDEKİ ÖRNEKLERE AİT ERİME EĞRİSİ SONUÇLARI	34
GRAFİK 5: MULTİPLEKS PCR AMPLİFİKASYON EĞRİLERİ	37
GRAFİK 6: NORMALİZE EDİLMİŞ YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME EĞRİSİ.....	38
GRAFİK 7: KONVANSİYONEL ERİME EĞRİSİ	38
GRAFİK 8: ROTAVİRUS P4 VE P9 GENOTİPİNDEKİ ÖRNEKLERE AİT ERİME EĞRİSİ SONUÇLARI	39

Simge ve Kısaltmalar

aa	:	amino asit
AdV	:	Adenovirus
Bp	:	baz çifti
cDNA	:	komplementer DNA
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	:	Enzim bağlı immünosorbent deneyi (Enzyme Linked İmmunosorbent Assay)
µL	:	Mikrolitre
HIV	:	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virusü
HRM	:	Yüksek özünürlükte erime analizi
NSP	:	Yapısal olmayan protein
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
RNA	:	Ribonükleik asit
RT-PCR	:	Reverz transkriptaz- Polimeraz zincir reaksiyonu (Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction)
RV	:	Rotavirus
TAE	:	Tris asetat etilen diamin tetra asetik asit (Tris acetate ethylene diamine tetra acetic acid)

1.GİRİŞ

Akut enfeksiyöz gastroenterit, tüm dünyada görülen yaygın bir hastalıktır ve çoğu vakaya viral patojenler neden olur. Akut ishal hastalığı genellikle kendi kendini sınırlar. Amerika Birleşik Devletleri'nde enfeksiyöz gastroenterit, özellikle genç veya yaşlı hastalar için önemli morbiditeye yol açabilir ve az gelişmiş ülkelerde, bu hastalıklar özellikle bebeklerde önemli bir ölüm nedenidir. Centers for Disease Control (CDC) göre, viral gastroenterit enfeksiyonları dünya çapında her yıl 200.000'den fazla çocuk ölümüne neden olmaktadır. Viral gastroenterit genellikle mide bulantısı, kusma, ishal, iştahsızlık, kilo kaybı ve dehidratasyona neden olur. İzole vakalar meydana gelebilir, ancak viral gastroenterit daha çok gündüz bakım merkezleri, bakım tesisleri ve yolcu gemileri gibi topluluklardaki salgınlarda görülür. Pek çok farklı virus semptomatolojiye yol açabilir, ancak rutin klinik uygulamada gerçek nedensel virus genellikle tanımlanmaz. Viral nedene bakılmaksızın, tedavi genellikle tek tiptir ve hidrasyon durumuna odaklanılarak semptomatik iyileşmeye yöneliktir.

Rotavirus, norovirus, adenovirus ve astrovirusler dahil olmak üzere birçok farklı virus, çoğu akut viral gastroenterit vakasından sorumludur. Çoğu, kontamine gıda ve su da dahil olmak üzere fekal-oral yolla bulaşır. Bulaşmanın kontamine eşya, kusmuk ve muhtemelen hava yoluyla gerçekleştiği de gösterilmiştir. Norovirus, klor ve etanol inaktivasyonuna diğer virüslere göre daha dirençlidir (1).

1.1.Epidemiyoloji

Norovirus en yaygın viral nedendir. Dünya çapında salgın ishal vakalarının %90'ından ve tüm viral gastroenterit vakalarının yaklaşık %50'sinden sorumludur. Norovirus, tüm gıda kaynaklı ishal salgınlarının %50'sine neden olur.

Rutin aşılardan önce, rotavirus, Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 3,5 milyon vaka ile pediatrik popülasyonda ishalleri hastalıkların en yaygın nedeniydi. 0-3 yaş arası neredeyse tüm çocuklar rotavirus antikorlarına sahipti. Dünya çapında rotavirus yılda 440.000 ölümüne neden oluyordu (1). Bununla birlikte, sekiz yüksek ve orta gelirli ülkelerin verilerine bakıldığında, aşının uygulanmasından sonraki 2 yıl içinde 5 yaşından küçük çocuklar arasında rotavirusle ilişkili hastane başvurularında

%49-89 ve tüm nedenlere bağlı gastroenteritle ilişkili hastane başvurularında %17-55 düşüş gösterdi (2). Daha fazla ülke standart rotavirus aşılama uygulamasını benimsedikçe, genel vaka sayısının azalmaya devam etmesi beklenmektedir. AdV grup F (serotip 40, 41), sapovirus ve astrovirus gibi diğer viral nedenler, dünya çapındaki vakaların %2 ila %9'unu oluşturur ve çocuklar için yetişkinlerden daha yüksek görülme sıklığı vardır (1).

İshalin yaygın olmayan viral nedenleri ise Kobuvirus (including Aichivirus), Enterovirus, Orthoreovirus, Adenovirus (group F dışındakiler), Torovirus, Coronavirus, Parvovirus (Bocavirus dahil)'dür. İmmün yetmezliği olanlarda görülen etkenler ise HIV, Sitomegalovirus, Herpes simpleks virus, Picobirnavirus'dür (3).

1.2. Patofizyoloji

Rotavirus ve Norovirus, fucosyltransferase 2 (FUT2) geni tarafından ifade edilen histo-kan grubu antijenlerini tanır ve bunlara bağlanır. Fonksiyonel bir FUT2 genine sahip bireyler "salgılayıcılar" olarak adlandırılır. FUT2 polimorfizmleri viral bağlanma modellerini etkileyebilir ve bu nedenle konakçının bu viruslerin neden olduğu enfeksiyona duyarlılığını etkileyebilir (4). Kan grubu A, B ve AB, norovirus enfeksiyonuna duyarlılığı etkilemeyebilir ancak O Kan grubu norovirus enfeksiyonuna daha duyarlı bulunmuştur (5).

Viral gastroenteritin klinik belirtileri, viruslerin spesifik sitotoksinlerle birlikte bağırsak enterositleri üzerindeki etkilerinden kaynaklanmaktadır. Virus, enterositi replike etmek için kullanır ve bağırsak fırça kenarı enzim üretimiyle etkileşime yol açar ve bu da malabsorpsiyona ve ozmotik ishale yol açar. Ek olarak, viral toksinler, bağırsakta transüdatif bir sıvı kaybına neden olarak, enterositlerin ve bağırsak hücrelerinin doğrudan hasar görmesine ve hücre lizisine yol açar. Hücre fonksiyonunun kaybı, transporter fonksiyonelliğinin kaybindan kaynaklanan elektrolit anormalliklerine yol açabilir. Bu, asit-baz bozukluklarına da yol açabilir. Virus daha sonra dışkı yoluyla ve bazen de kusmukla yayılır (1).

1.3. Klinik

Akut gastroenterit, günde 3 veya daha fazla bağırsak hareketinden oluşan gevşek veya sulu ishal ile tanımlanır. Diğer semptomlar mide bulantısı, kusma, ateş veya karın ağrısını içerebilir. Semptomlar genellikle haftadan daha kısa sürer ve çoğunlukla 1 ila 3 gün sonra düzelir. Son iki haftada devam eden herhangi bir hastalık belirtisi kronik olarak sınıflandırılır ve bu nedenle akut gastroenterit gereksinimlerini karşılamaz. Hastalar sıklıkla, genellikle 1 ila 2 saat süren, nispeten ani semptomların başlangıcı şikayetleriyle başvururlar. Ailedeki diğer kişilerin veya yakın temaslıların benzer şikayetleri olabilir. Hafif ateş ve hafif karın ağrısı yaygındır ve çoğu durumda kusma mevcuttur. Belirtiler arasında yüksek ateş, kanlı ishal, uzun süreli kusma veya şiddetli karın ağrısı yer alır. Bu bulgular başka hastalıklarda da görüldüğünden ayırıcı tanı önemlidir. Bakteriyel ajanlar veya akut apandisit, bağırsak tıkanıklığı ve divertikülit dahil diğer akut abdominal patoloji gibi viral gastroenterit dışındaki nedenlerle ilgili bilgileri ortaya çıkarmak önemlidir. Seyahat geçmişi, yakın zamanda antibiyotik kullanımı, hastalığa maruz kalma, mesleki maruziyet ve bağışıklık durumu dikkate alınmalıdır. Bebeklere, yaşlı hastalara ve hastalık veya ilaç kullanımı nedeniyle bağışıklığı baskılanmış bireylere özel dikkat gösterilmelidir.

Viral gastroenteritte hafif ateş yaygındır, ancak yüksek ateş (39° C'den yüksek), viral kaynaklı olmayan nedenler için endişeyi tetiklemelidir. Ek olarak, ateş ve dehidratasyona bağlı olarak taşikardi ve taşipne mevcut olabilir. Dehidratasyon için bir değerlendirme, özellikle aşırı yaş, kronik hastalık veya immünosupresyon gösteren hastalarda çok önemlidir. Bu hasta grupları, dehidratasyona bağlı ciddi komplikasyonlar açısından çok daha yüksek risk altındadır. Başka bir fiziksel muayene bulgusu, hafif, yaygın karın hassasiyetini içerebilir. Palpasyon, koruma, geri tepme veya noktaya özgü hassasiyete yönelik belirgin hassasiyet, klinisyeni semptomatolojinin diğer nedenlerini düşünmeye yönlendirmelidir (1).

1.4. Tanı

Çoğu klinikte ve acil serviste hazır viral test kitlerinin olmaması nedeniyle, akut viral gastroenterit klinik bir tanıdır. Bu nedenle, klinik olarak hidrasyonu iyi görünen ve ciddi hastalık için risk faktörlerinden yoksun hastalar, illa ki daha ileri testler gerektirmez. Hastanın semptomlarının diğer nedenlerini ortadan kaldırmaya yardımcı olmak için kullanılır. Tam kan sayımı hafif bir lökositozu ortaya çıkarabilir. Elektrolit dengesizliği, akut böbrek hasarına bağlı olarak BUN ve kreatinin artışı görülebilir.

Dışkı incelemesi, ancak kolayca elde edilebilen laboratuvar testleri yalnızca bakteriyel nedenleri değerlendirir ve spesifik viral nedenleri teşhis etmez. Kanlı dışkısı, yüksek ateşi, şiddetli karın ağrısı veya şiddetli dehidrasyonu olan hastalar, bu semptomlar basit viral gastroenterit ile tutarlı olmadığından dışkı çalışmalarını gerektirir (1).

1.4.1. Ayırıcı Tanı

- Besin zehirlenmesi
- Gastroenteritin bakteriyel ve protozoal nedenleri potansiyel olarak viral gastroenterit semptomlarını taklit edebilir (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Giardia lamblia* ve *Clostridium difficile*).
- Apandisit
- Divertikülit
- İltihaplı bağırsak hastalığı
- Bağırsak tıkanıklığı
- Kolesistit

1.5. Tedavi

Viral gastroenterit tedavisi semptomatik desteğe dayanmaktadır. Tedavinin en önemli amacı, hidrasyon durumunu korumak ve sıvı ve elektrolit kayıplarını etkili bir şekilde karşılamaktır.

Şiddetli dehidratasyon veya inatçı kusma gösteren hastalar, sürekli intravenöz sıvılar için hastaneye yatış ve elektrolit durumunun dikkatli bir şekilde izlenmesini gerektirebilir (1).

1.6.ROTAVİRUS

Rotavirus (RV) ilk olarak 1950-1960'larda maymunların rektal sürüntülerinde ve elektron mikroskobu ile farelerin bağırsak biyopsisinde keşfedildi. İnsanlarda RV, ilk olarak 1973 yılında Bishop ve meslektaşları tarafından akut ishalden muzdarip dokuz çocuğun duodenum biyopsilerinde keşfedildi ve başlangıçta ikili virus adını önerdi. Rotavirus daha sonra hastanede yatan çocuklardan alınan dışkı örneklerinde tespit edildi. Daha sonra elektron mikroskobu altında bakıldığında tekerlek benzeri görünümü nedeniyle Latince Rota (tekerlek) olarak adlandırıldı (6).

Rotavirus zarfsız, çift sarmallı bir RNA virusüdür. *Reoviridae* familyasının bir üyesidir. Reovirus (Respiratory, Enteric, Orphan) adı bazı solunum ve enterik virusler için Albert Sabin tarafından 1959 yılında ortaya atılmıştır (7, 8). 1973 yılında, rotavirus, duodenal biyopsiler ve akut ishalleri insanlardan alınan dışkı örneklerinden keşfedildi (7).

İç ve dış kapsit ile çevrelenmiş ~18,500 bp segmentli 11 çift sarmallı RNA'sı mevcuttur. Yapısal protein (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, and VP7) ve yapısal olmayan protein (NSP1-6) içerir. Genom segmentleri ve kodladığı proteinler **Tablo 1**'de gösterilmiştir (6). Elektron mikroskobu ile gözlemlendiğinde bir tekerleği andıran çapı ~ 100 nm olan zarfsız ikosahedral üç katmanlı bir partiküldür. VP1-VP2 etkileşimi RNA-dependent RNA polimerase (RdRp)'yi stabilize eder ve polimeraz aktivasyonunu sağlar. İç kapsitte bulunan VP6 proteinin antijenik ve genetik özelliklerine göre rotavirusler on ana gruba (A-J) ayrılmaktadır (6). Dış kapsitte bulunan yapısal proteinlerden VP4 ve VP7 glikoproteinleri sırasıyla virusün P (protease sensitive) ve G (glycosylated) genotipini belirlemektedir ve hücreye bağlanma ve girişi sağlamaktadır (8, 9). Günümüze kadar rotavirusün 35 G, 50 P genotipi ve 70 farklı G/P kombinasyonu saptanmıştır. İnsanlardaki enfeksiyonların %90'lık kısmını beş farklı G-P kombinasyonu (G1P8, G2P5, G3P8, G4P8, G9P8) içeren suşlar oluşturmaktadır (6, 8).

Tablo 1 . Genom segmentleri ve kodladığı proteinler

Genom segmenti	Kodlanan protein	Bulunduğu yer	Adı/Fonksiyon
1	VP1	Çekirdek	RNA- dependent RNA polymerase (RdRp)
2	VP2	Çekirdek	Core protein
3	VP3	Çekirdek	Methyltransferase
4	VP4	Dış tabaka	Protease sensitive
5	VP6	Orta tabaka	İç kapsid
6	VP7	Dış tabaka	Glycosylated
7	NSP1	Yapısal olmayan	İnterferon antagonisti
8	NSP2	Yapısal olmayan	NTPase
9	NSP3	Yapısal olmayan	Translation enhancer
10	NSP4	Yapısal olmayan	Enterotoksin
11	NSP5	Yapısal olmayan	Phosphoprotein

Epidemiyoloji: Rotavirus esas olarak beş yaşın altındaki küçük çocukları enfekte eder ve hastanelerde tedavi gerektiren tüm şiddetli gastroenterit vakalarının %20-30'undan sorumludur. Küresel olarak 5 yaşın altındaki çocuklarda yılda 1,3 milyon ölüm ve 9 milyon hastaneye yatıştan sorumludur. Özellikle Güney Asya ve Afrika ülkelerinde ölüm oranı çok yüksektir. Hindistan, Nijerya, Pakistan ve Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nde 2013 yılında Rotaviruse bağlı ölüm sayısı küresel olarak meydana gelen tahmini ölümlerin yaklaşık yarısı kadardı (6).

Demokrat virus denilen rotavirus görülme sıklığının gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde benzer olması, sanitasyonun hastalığı önlemeyle ilgili olmadığını göstermektedir (10). Gelişmekte olan ülkelerde hastalık 6 ila 12 aylık çocukları etkiler ve gelişmiş ülkelerde çoğunlukla 12 ila 14 aylık çocukları etkiler. Erkekler kadınlardan daha duyarlıdır. Rotavirus endemik ishale neden olur ve hastalığın klinik semptomları bulaşıcı doz, çocuğun beslenme durumu, emzirme (IgG ve IgA) ve doğal bağışıklık ile yakından ilişkilidir. Tek bir enfeksiyon, bağışıklık yeterliliğini

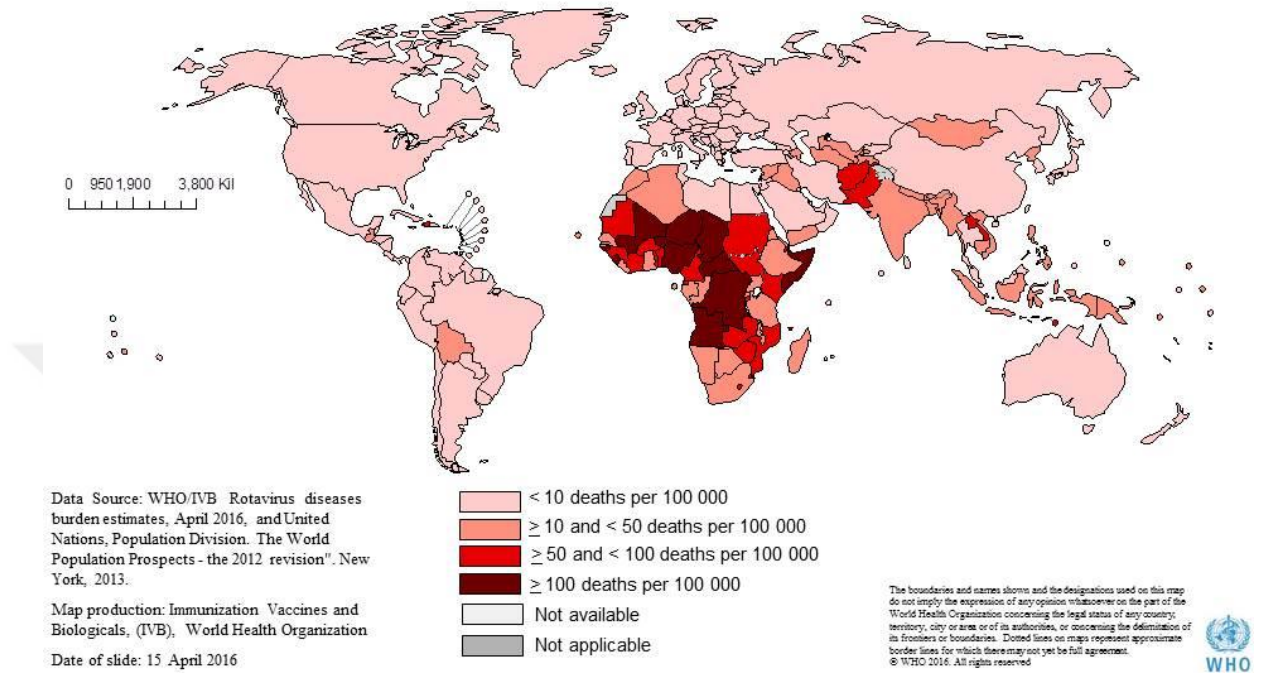
artıracak ve gelecekteki enfeksiyon olasılığını azaltacaktır. Bağışıklığı baskılanmış çocuklar, bağışıklığı yeterli olanlara göre daha fazla enfeksiyon riskine sahiptir (6).

Rotavirusler oldukça bulaşıcıdır ve çevre koşullarına karşı çok dirençlidir. Enfeksiyona neden olmak için çok az sayıda virus (10 bulaşıcı parçacık) yeterlidir. Kuluçka süresi 2-3 gündür. Dışkının gramı başına çok sayıda, yaklaşık 100 milyar virus parçacığı atılır. Bulaş esas olarak fekal-oral yolla gerçekleşir. Ayrıca kontamine su ve yiyeceklerin yenilmesi, kontamine eller ve eşyalar yoluyla da bulaş olmaktadır. Gelişmiş ülkelerde, Rotavirus enfeksiyonlarının yaklaşık 1/3'ünün nozokomiyal enfeksiyonlardan kaynaklandığı bildirilmektedir (6). Rotavirusler dünyanın her yerinde bulunur ve özellikle dünyanın daha ılıman bölgelerinde, bir kış hastalığı olarak düşünülmektedir. Tropikal iklimlerde, mevsimsel eğilim daha az belirgindir ve enfeksiyonlar yıl boyunca ortaya çıkma eğilimindedir (7).

Grup A rotavirus, çocukluk çağı enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir ve küresel olarak dolaşımdadır; B ve C grupları dünya genelinde daha küçük enfeksiyon yüzdesine neden olur (6, 7). Grup A rotavirus için en yaygın G genotipleri G1, G2, G3, G4, G9 ve G12, en yaygın insan P-genotipleri P [4], P [6] ve P [8]. Dünyada bulunan genotip kombinasyonlarının %90'ı G1P [8], G2P [4], G3P [8], G4P [8], G9P [8] ve G12P [8] olarak görülmektedir. Bunlardan en sık görüleni G1P [8]'dir (6). Rotarix aşılmasının rutin olarak kullanıldığı ülkelerde G2P [4] suşlarının görece üstünlüğü, aşı kullanımının neden olduğu potansiyel bir seleksiyon konusunda endişeleri artırmıştır. Ancak Rotavirus suş dolaşımı ve suş baskınlığı açısından doğal varyasyon, aşılama uygulamasından bağımsız olarak gerçekleşir (11).

DSÖ'nün 2013 tahminlerine göre her yıl 5 yaşın altındaki yaklaşık 215.000 çocuk aşıyla önlenemez rotavirus enfeksiyonlarından ölüyor; bu çocukların büyük çoğunluğu düşük gelirli ülkelerde yaşıyor (12). Dünya sağlık örgütü (DSÖ) tarafından bildirilen 5 yaş altı çocuklarda Rotavirus ölüm oranları **Şekil 1**'de gösterilmiştir (13).

Rotavirus mortality rate in children younger than 5 years, 2013



Şekil 1: 5 yaşından küçük çocuklarda Rotavirus ölüm oranları

GENOM REPLİKASYONU;

Hücreye bağlanma ve girişi: Rotavirusun konak hücreye bağlanması kompleks bir süreçtir. VP4 (RV spike proteini) ile spesifik konak reseptörleri (sialik asit) ve koreseptörler arasında gerçekleşir. Son çalışmalar, kan grubu antijenlerinin RV bağlanma reseptörleri olarak işlev gördüğünü ileri sürmektedir. İlk olarak VP4, tripsin benzeri proteazlar tarafından VP5 ve VP8 alt birimlerine bölünür. Bağlantıya, terminal veya subterminal sialik asit reseptörleri ile etkileşime giren VP4'ün VP8 alt birimi aracılık eder. Bağlandıktan sonra, konak hücre sitoplazmasına endositoz yoluyla girer. Hücreye girdikten sonra, kalsiyum seviyesinin düşmesi, dış kapsid proteininin çözünmesine neden olur. Yapısal olmayan proteinler aracılığıyla viroplazma (sitoplazmik inklüzyon cisimleri) oluşur. Viroplazma; viral dsRNA'nın

replikasyonu, genomun kapsüllemesi ve kapsid montajı için bir bileşen görevi yapmaktadır (6).

Transkripsiyon ve Replikasyon: Transkripsiyonel kompleks; 11 segment viral dsRNA ile VP3 komplekslerinde VP1'den oluşur. Pozitif ssRNA transkriptleri, sitoplazmada negatif genomik RNA dizisinden üretilir. Birkaç transkripsiyon turundan sonra, yeni sentezlenen pozitif RNA iplikçikleri, sitozole ekstre edilir. Pozitif sarmallı RNA'lar, dsRNA segmentlerinin ve virus kodlu proteinlerin replikasyonu ve translasyonu için bir şablon görevi görür (6).

Viryon birleşmesi ve salınımı: Üretilen viral proteinler, RNA ve viral yapısal proteinler (VP1-3 ve VP6) viroplazmada bir araya gelir. NSP4 ve VP6'nın koordineli hareketi ile viroplazmadan endoplazmik retikuluma tomurcuklanma olur. Dış kapsid proteininin (VP7 ve VP4) birleşmesiyle tamamen bulaşıcı rotavirus partikülleri oluşur. Bunlar hücre içinden liziz yoluyla veya apikal yüzeyden salgı yoluyla salınır. Hücreden çıkışının kesin mekanizmaları hala bilinmemektedir (6).

Patofizyoloji: Mide pH'ı alkaliye döndüğünde veya besinlerle alındığında proteazlar tarafından enfeksiyöz subviral partiküllere (ISVP) döner. ISVP, ince bağırsak villus yüzeyindeki kolumnar epitel hücrelerinden girerek replikasyona başlar. Mikrovilluslar kısalır ve lamina propria mononükleer infiltrasyon görülür. Suyun absorpsiyonu bozulur ve ishal meydana gelir (14).

NSP4, iki şekilde bulunur: rotavirus ile enfekte olmuş hücrelerde hücre içi bir form ve buradan salgılanan bir norotoksin. Rotavirus ile enfekte olmuş hücrelerde hücre içi Ca^{2+} dalgalarının indüksiyonundan sorumludur. Böylece adenozin difosfat (ADP) salgısına neden olur. Bu nedenle NSP4, hastalığın başlangıcı ve gelişimi için olağan şüpheli olmuştur. ADP, hücrelerarası Ca^{2+} dalgası geliştirilmesinden sorumlu hücre dışı habercidir. ADP, çevredeki hücrelerde ishale yol açan purinerjik reseptörleri aktive eder (15). VP7 ve VP4'e karşı oluşan antikorlar virüsü etkisiz hale getirir. Virüse karşı bağışık yanıt birincil olarak IgA ile oluşmaktadır (14).

Rotavirus enfeksiyonu veya aşılama, hem doğuştan gelen (spesifik olmayan) hem de adaptif (spesifik) bağışıklığı indükler. Rotavirus enfeksiyonunu takiben, nonspesifik bağışıklık tetiklenir. Nonspesifik bağışıklığa makrofajlar aracılık eder ve

virus enfeksiyonuna yanıt olarak tip I ve tip III interferonlar (IFN'ler) ve diğer sitokinler üretir. Nonspesifik bağışıklık, daha sonra ortaya çıkan etkili bir spesifik bağışıklık için çok önemlidir. Spesifik bağışıklık, humoral ve hücre aracılı bağışıklık tepkisini uyarır ve antijen özgüllüğü ve hafıza ile belirlenir (6).

Klinik: Rotavirus, 1 ila 3 gün arasında değişen bir kuluçka dönemine sahiptir, ardından semptomlar aniden ortaya çıkar. Ateş, ishal ve kusma en sık görülen semptomlardır. Sıklıkla solunum bulguları da bulunabilir. İlk enfeksiyonu 3 aydan sonra ortaya çıkan hastalarda semptomlar en şiddetlidir. Bebekler genellikle hafif semptomlarla gelir ve şiddetli enfeksiyon olasılığı daha düşüktür. Hastalık süresi 5 ila 7 gün arasındadır (6, 7).

Tanı: Rotavirus klinik olarak norovirusler, enterik adenovirusler, astrovirusler, Escherichia coli ve Salmonella gibi diğer gastrointestinal patojenlerin neden olduğu ishalleri hastalıklardan ayırt edilemez. Laboratuvar testleri genellikle yapılmaz, ancak rotavirus teşhisini doğrulamanın tek yolu budur. Laboratuvarca doğrulanmış bir tanı istendiğinde, enzim immünassay testi veya immünokromatografi kullanılarak dışkı örneklerinde rotavirus antijeni bulunabilir. Real time-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) daha duyarlıdır ve virus izolatlarının genotiplenmesine izin verir ve bu nedenle epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilir. Ek tespit yöntemleri arasında elektron mikroskobu ve virus izolasyonu yer alır (7). Ayrıca gen taraması, genotipleme, sekans eşleştirme ve metilasyon analizi dahil olmak üzere geniş kullanımı olan yüksek çözünürlükte erime (HRM) analizi, RT-PCR ile kombine olarak ishal etkenlerinin taranmasında kullanılmaktadır (16, 17).

Çift sarmallı DNA molekülünün iki tek sarmalına geçişi, DNA denatürasyonu veya erimesi, DNA yapısını ve bileşimini incelemek için uzun yıllardır kullanılmaktadır. Son teknolojik gelişmeler, özellikle DNA dizisindeki varyantları tespit etmek için bu teknolojinin potansiyelini geliştirmiştir. Doymuş DNA boyalarının geliştirilmesi ve erime davranışını ölçmek için enstrümantasyondaki gelişmelerle duyarlılık ve özgüllük önemli ölçüde artırılmıştır. Bu yeni araçları kullanan analizin adı yüksek çözünürlüklü erime (HRM) eğrisi analizi olarak belirlenmiştir. Erime eğrilerindeki farklılıklar, ampikon dizisi, uzunluk ve GC

içeriğindeki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Kullanım kolaylığı, basitliği, esnekliği, düşük maliyeti, üstün duyarlılığı ve özgülüğü nedeniyle HRM, patojenik varyantları taramak için hızla tercih edilen araç haline gelmektedir (18,19).

Tedavi: Rotavirus enfeksiyonunun tedavisi, semptomların giderilmesine ve ilişkili dehidratasyonun tedavisine ve önlenmesine yöneliktir (7).

Korunma: Lactadherin, anne sütünde müsinle ilişkili glikoproteindir. Sütle beslenen çocuklarda asemptomatik Rotavirus enfeksiyonuna karşı bir dereceye kadar koruma sağlayabilir. Bununla birlikte, anne sütünün RV enfeksiyonunu azaltmadaki rolü belirlenememiştir. Ayrıca anne sütündeki Rotavirus antikoları, düşük Rotavirus aşı etkinliğinde rol oynayan olası faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (6).

Rotavirus hastalığı, aşıyla önlenebilir bir hastalıktır. İki canlı oral rotavirus aşısı, DSÖ ön yeterliliğine sahiptir ve dünya çapında ticari olarak mevcuttur. Mevcut aşılar, pentavalan bir insan-sığır reassortant aşısı olan RotaTeq® (Merck & Co., West Point, PA, ABD) ve bir insan monovalan aşısı olan Rotarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belçika) 100'den fazla ülkede lisanslıdır. Rota Teq® G1, G2, G3, G4 ve P1 içerir; G1 dışında etkinlik görece düşüktür. Rotarix™ G1, P1A[8] içerir ve P1A içeriği nedeniyle G1 dışındaki suşlara da etkilidir. Her iki aşı için de ilk doz 6-12 hafta arasında yapılmalı, iki doz arası en az 4 hafta olmalı, son doz 6 aya kadar yapılmalıdır (10).

DSÖ 2009 yılında Rotavirus aşılarını tüm ülkelerin ulusal aşılama programına dahil etmesini tavsiye etti. Bugüne kadar, 82 ülkenin ulusal aşılama programına dahil edilmiştir. Klinik çalışmalarda hem Rotarix™ hem de RotaTeq® şiddetli rotavirus hastalığını azaltmada oldukça etkilidir (>%85). Düşük gelirli ülkelerde ise bu oran daha düşüktür. Rotavirus aşılarının uygulandığı gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelere rotaviruse bağlı ölümleri, ciddi rotavirus hastalığını ve hastaneye yatışları önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (20). Rotarix™ ve RotaTeq® aşılarının etkisine ilişkin çok sayıda çalışmanın meta-analizi, genel aşı etkinliğinin rotavirus enfeksiyonlarına karşı %53, rotavirusle ilgili hastaneye yatışlara karşı %73 ve şiddetli rotavirus hastalığına karşı %74 oranında gözlendiğini tahmin etmektedir (21). Ancak korumanın yaşamın ikinci yılında o kadar kalıcı veya tam olmadığına

dair endişeler vardır. Düşük gelirli ülkelerde neden aşı etkinliğinin daha düşük olduğu açık değildir, ancak bir dizi faktör öne sürülmüştür. Rotavirus enfeksiyonunun gelişmekte olan ülkelerde daha yüksek bulaşma oranları, bağırsak mikrobiyotasındaki varyasyonlar ve bağışıklama sırasında anne sütü bileşenlerinin varlığı gibi konakçı mukozal faktörlerin yanı sıra diğer konakçı faktörler ortaya çıkan bağışıklık tepkilerine müdahale edebilir. DSÖ ön yeterliliğine sahip 2 aşının yanı sıra, üç adet canlı-oral uygulanan rotavirus aşısı üretildiği ülkelerde ulusal lisans almıştır. Bunlar Bharat Biotech, India; Lanzhou Institute of Biological Products; China; PolyVac, Vietnam'dır (20).

Sonuç olarak birçok ülkede rotavirus aşısı uygulanmasıyla, rotavirusle ilişkili ölüm ve ishal nedeniyle hastaneye yatışta azalmalar görülmüştür. Düşük gelirli ülkelerde düşük aşı etkinliği görülmesi ve rotavirus aşı korumasının yaşamın ilk yılından sonra kalıcı olmadığına dair bulgular olması, aşı başarısının sürdürülebilirliği için zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Rotavirus aşılarının küresel arzını iyileştirmek üzere yeni rotavirus aşuları geliştirilmeye devam edilmektedir (20).

1.7. NOROVİRUS

Caliciviridae ailesine ait, zarfsız, tek zincirli RNA virusudur (22).

İlk olarak ABD'nin Ohio eyaleti Norwalk şehrinde 1968 yılında ortaya çıkan gastroenterit salgınında tanımlanmış ve Norwalk virus olarak isimlendirilmiştir. Bu viruse bağlı hastalık ilk olarak 1929'da mevsimsel görülme sıklığı ve birincil semptom olarak kusma görülmesi nedeniyle "kış kusma hastalığı" olarak tanımlandı (23). Rotavirus aşı programı uygulayan gelişmiş ülkelerde çocuklarda gastroenteritin en yaygın nedeni olarak Norovirus daha sık görülmeye başlamıştır (22).

VP1 ve ORF1 proteinlerindeki aminoasitler baz alınarak genogrup ve genotip olarak sınıflandırılır. Bilinen 7 genogrubu olmasına rağmen insanlarda görülen en major genogruplar I ve II'dir. Genogrup GII.4, insanlarda salgınlara sebep olan en sık genogruttur. Ayrıca bu genogrup daha ağır seyrederek ve yüksek mortalite oranlarıyla seyrederek. Su kaynaklı salgınlarda genogrup I, kış aylarında ve sağlık bakım ilişkili enfeksiyonlarda etken genogrup II'dir (22).

Epidemiyoloji: Tüm dünyada yaygın bulunan, hem yetişkin hem de pediatrik popülasyonlarda görülen epidemik gastroenterit nedenidir. CDC norovirusün her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde akut gastroenterit vakalarının %60'ından sorumlu olduğunu tahmin etmektedir. Gastroenteritli hastalar içinde RT-PCR ile tanı konan vakalar %5-36 arasında bildirilmektedir (23).

Primer geçiş yolu fekal-oral yoldur. Hastalığın kaynağı olarak kontamine su ve gıdaların yenmesi veya enfekte kişilerle ve kontamine yüzeylerle direkt temas sayılabilir. Virus çok dirençlidir ve dezenfeksiyon sonrası bile yüzeylerde kalabilir. Düşük viral inokulum (10 viral partikül kadar) enfeksiyona neden olabilir (22). Bir çalışmada enfekte kişinin kustuğu ortam havasından norovirus geçişi olabileceği gösterilmiştir. Submikrometre partiküllerde norovirus RNA'nın varlığı, havadan iletimin önemli bir iletim yolu olabileceğini göstermektedir (24). Gıda üretimi veya hazırlanması ile kontamine olan besinlerin yenmesiyle bulaş olur. Çiğ servis edilen sebze ve meyveler, istiridye ve balık norovirus kontaminasyonu için yüksek riskli besinlerdir. Akan suda 20 sn sabun ile etkili el hijyeni ve hipoklorit ile yüzeyin etkili temizliği hastalık oluşmasını önler (22).

İlk olarak 1982'de su kaynaklı bir gastrointestinal hastalık salgınının nedensel ajanı olarak bildirilmiştir. Salgın, Gürcistan'da koliform bakteri görülen su sistemlerine yakın bölgelerde yoğun olmak üzere yaklaşık 1.500 kişiyi etkiledi. Hastaların serumunda Norwalk virusüne karşı artan antikor titreleri Norovirusün kanıtı olarak belirlendi (25).

Norovirus ile kontamine sularda kış aylarında viral konsantrasyonlar artmaktadır. Üretim noktasında veya hazırlık sırasında gıdaya Norovirus bulaşmasıyla bulaş söz konusu olmaktadır. Meyveler, sebzeler ve kabuklu deniz ürünleri çiğ olarak tüketildikleri ve su kaynaklarından norovirus kontaminasyonuna maruz kalabilecekleri için hastalık bulaşması için önemli bir risk oluşturmaktadır. Kontamine suların gıda üretiminde kullanılması da etken olmaktadır. Hastane, huzurevi, okul, askeri birlik ve otel gibi yerler salgınların görüldüğü yerlerdir (23).

Patofizyoloji: Norovirus, insan bağırsağındaki birden çok hücre tipini etkileyen çok yönlü enfeksiyondur. Makrofajlar, dendritik hücreler ve B hücreleri

dahil olmak üzere bağışıklık hücrelerinde çoğalmaktadır. Norovirusler, insan histokan grubu antijenlerinin (HBGA) sakkaritlerini VP1 çıkıntılı 2 (P2) alanı içinde bağlar; bu, gastrointestinal sistemin epitel hücrelerine viral girişi kolaylaştırmak için önerilen bir mekanizmadır. Giriş yolu olarak öne sürülen başka bir mekanizma M hücrelerini kullanmasıdır. M hücreleri; bağırsaktaki Peyer plaklarını ve lenfoid foliküllerini örter, mikrovillus yoktur ve mukus salgılamaz. Giriş yoluyla ilgili yapılan başka çalışmalarda ise norovirusün bağırsak lümenini kaplayan enterositleri doğrudan istila edebileceğini düşündürmektedir. Virusün inokülasyonundan klinik semptomların gelişmesine kadar geçen ortalama süre 1-2 gündür ve norovirus semptomları genellikle 1 ila 3 gün içinde düzeler. Semptomlar düzelse de, insanlar virusü dışkılarında uzun süre, bazı durumlarda 60 güne kadar atmaya devam edebilirler. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar virusü aylarca veya yıllarca yaymaya devam edebilir (22).

Klinik: İleri yaş grubu mortalite için risk faktörüdür. Ayrıca 2 yaş altındaki çocuklarda hastalık daha uzun ve ağır seyretmektedir. İnkübasyon süresi ortalama 48 saattir (23). Norovirus ile enfekte olmuş hastalar tipik olarak gastroenterit ile uyumlu semptomlara sahiptir. Yaygın semptomlar arasında mide bulantısı, kusma, karın ağrısı ve kramp, ishal, miyalji, baş ağrısı ve titreme bulunur. Bazı hastalar ishalin baskın olduğunu bildirirken, diğerleri mide bulantısı ve kusmayı birincil semptomlar olarak rapor eder (22). Konjenital immün yetmezlik, bir organ allogreftini sürdürmek amacıyla immünsüpresif tedavi, kanser kemoterapisi ve insan immün yetmezlik virusü enfeksiyonu nedeniyle immünsüprese olan kişilerde uzun süreli norovirus hastalığı bildirilmiştir. Allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HSCT) geçiren hastaların 1 yıl içinde %18 oranında noroviruse yakalandığı bildirilirken, başka bir çalışmada böbrek nakli alıcılarının %17'sinin kronik olarak norovirus ile enfekte olduğu ve aralıklı ishal olduğu bildirilmiştir (26).

Nadir görülen diğer klinik manifestasyonlar; hemolitik üremik sendrom, iskemik kolit, geçici karaciğer hasarı, artrit, ensefalopati, konvülsiyon olarak görülebilmektedir (23).

Diğer bir klinik durum epidemiyolojik açıdan önemli olan asemptomatik taşıyıcılıktır. Çocuklarda ve yemek hazırlayıcılarda tespit edilen bu durumda klinik bulgu olmamasına rağmen dışkıda virus atılmaktadır (23).

Tanı: Klinik değerlendirme norovirus salgınlarını tespit etmede faydalı olsa da (22) Norovirus gastroenteritini tek başına klinik özelliklere dayanarak teşhis etmek zordur (26).

Norovirus enfeksiyonunun tanısı için en uygun örnek semptomlar ortaya çıktıktan sonraki 48-72 saat içerisinde toplanan ishalleri dışkıdır. Örnekler incelemeye kadar +4°C'de bekletilir. Uzun süre bekletilecekse -20°C ve daha düşük sıcaklıklarda saklanır. Alternatif numune ise hastaların kusmuğudur (23). Dışkıda antijen ve RNA tespiti tanıda kullanılır (27).

Enzim immunoassay ve hızlı immunokromotografik yöntemlerin kullanıldığı testlerle dışkıda antijen tespiti yapılmaktadır. Enzim immunoassay testinin duyarlılığı dışkıdaki viral yük ve genotipe bağlı olarak %31-92 arasında değişmektedir. Alternatif antijen arama metodu olarak kullanılan lateral immunokromotografik testin duyarlılığı ise %17-90,2 arasında değişmektedir. Pozitif test sonuçları güvenilirdir, ancak negatif test sonuçları nükleik asit amplifikasyon testi (NAAT) ile doğrulanmalıdır (23). Antijen saptama tahlilleri, enfeksiyonlu bireylerin tanımlanmasında kullanım için yeterli hassasiyetten yoksundur, ancak test için birden fazla dışkı örneğinin mevcut olması koşuluyla salgınları tanımlamak için faydalı olabilir (27).

Konvansiyonel ve RT-PCR testleri, Norovirus tespiti ve tiplendirmesi için altın standarttır. Diğer moleküler tanı yöntemi ise çok sayıda gastroenterit patojeninin aynı anda arandığı multipleks PCR / RT-PCR testleridir (23).

Tedavi: Norovirus enfeksiyonu yönetimi, hastanın semptomlarının tedavi edilmesini ve norovirus salgını riskinin azaltılmasını içerir. Tedavinin temel dayanağı oral rehidrasyon tedavisidir.

Korunma: Aşı geliştirme çabaları devam ederken, el hijyeni, yüzey temizliği ve vücut sıvısına maruz kalmanın önlenmesi enfeksiyon kontrolünün temelini

oluşturur. Norovirus aşısının geliştirilmesi, hem algılanan halk sağlığı yararları hem de ekonomik faydalar için bir öncelik olmaya devam etmektedir. Klinik deneyleri devam eden aşılardan olmasına rağmen Norovirusün karmaşık yapısı, insan bağışıklık tepkileri, virüsü kültürlemede zorluk ve aşı testi için sınırlı hayvan modelleri nedeniyle aşı geliştirmede zorluklar bulunmaktadır (22).

1.8. ADENOVİRUS

İnsan ve hayvanlarda yaygın bulunan zarfsız, çift zincirli DNA virusüdür. Hem yetişkin hem de çocuklarda enfeksiyon yapar. Serolojik olarak 100'den fazla tipi vardır. Bunlardan 49'u insanlarda hastalık yapar. Ayrıca hemagglutin özelliklerine, DNA homolojisine, klinik hastalığa dayalı olarak yedi türden (A-G) biri olarak sınıflandırılmıştır. Çok sayıda organ tutulumu yapabilir ama çoğunlukla asemptomatiktir. AdV enfeksiyonları immunkompetan bireylerde kendini sınırlarken immun suprese olanlarda ölümcül olabilir (26, 27).

Epidemiyoloji: Damlacık, konjonktivaya direkt inokülasyon, enfekte dokuya maruziyet ve fekal-oral yolla bulaşır. Yaygın soğuk algınlığı olanların boğazından 1-3 gün, faringokonjonktival ateşi olan hastalarda burun, boğaz, dışkı veya gözlerden 3-5 gün, keratokonjunktivit için göz kültürlerinden 2 hafta, solunum yolu veya genel hastalığı olanlarda boğazdan veya dışkıdan 3-6 hafta viral saçılma olur. Bu süreler immun suprese hastalarda uzamaktadır. Birincil enfeksiyon bölgesinden bağımsız olarak, dışkı kültürleri, hastalığın ilk iki haftasında çoğu klinik sendrom için genellikle pozitifdir (29). Çocuklar sıklıkla 6 ay-2yaş arası ve 5-9 yaş arası AdV enfeksiyonlarına duyarlıdır. İnkübasyonu 2-14 gündür. Latent olarak böbrek parankimi, lenfoid doku ve diğer dokularda yıllarca bulunabilir. İmmun suprese olanlarda reaktivasyon görülebilir. Asemptomatik seyirli AdV enfeksiyonu ise haftalarca/aylarca sürebilir (28).

Patofizyoloji: İkozohedral kapsidli çift zincirli DNA virusüdür. Giriş noktası genellikle enfeksiyonun yerini belirler; gastrointestinal sistem enfeksiyonu, fekal-oral geçişten kaynaklanırken, solunum yolu enfeksiyonu enfeksiyonları damlacık inhalasyonundan kaynaklanır (28).

Litik enfeksiyon; AdV insan epitel hücrelerine girdiğinde meydana gelir ve bu da sitokin üretimine ve konakçı enflamatuvar tepkisinin başlamasına yol açar (28).

Kronik veya gizli enfeksiyon; kesin süreç bilinmemektedir ve bu genellikle asemptomatik lenfoid doku enfeksiyonunu içerir (28).

Onkojenik transformasyon; sıçanlarda tespit edilmiştir, AdV hücrel transkripsiyonu değiştirerek ana kemirgen hücrelerini güçlendiren E1A proteinlerine yol açar ve sonunda malign transformasyona ve apoptoz deregülasyonuna neden olur (28).

Klinik: Çoğu AdV enfeksiyonu asemptomatiktir. Önemli mevsimsel varyasyon olmadan yıl boyunca çoğunlukla kendi kendini sınırlayan solunum, gastrointestinal, üriner veya konjonktival hastalık yapar. AdV semptomları arasında epidemik keratokonjunktivit, akut hemorajik sistit ve gastroenterit yer alır. Etkilenen organ sistemine bağlı olarak ateş, farenjit, servikal adenopati, nezle, gözde sulanma, ağır kanlı idrar ve nefes darlığı görülebilir. Fizik muayenede servikal adenopati, faringokonjunktivit ve bademcik iltihabı görülebilir (26, 27). AdV türleri ve serotiplerine göre primer enfeksiyon bölgeleri **Tablo 2**'de gösterilmiştir (29). Tüm dünyada yaygın olarak insanlarda hastalık ile ilişkili serotipler 1-5, 7, 21 ve 41'dir. AdV F türü (serotip 40 ve 41) tipik olarak çocuklarda gastroenterite ve ishal hastalığına neden olur (30).

Tablo 2: Adenoviruslerin enfeksiyon bölgeleri

Tür	Serotip	Enfeksiyon Bölgesi
A	12, 18, 31, 61	Gastrointestinal yol
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34–35, 50, 55, 66	Solunum Sistemi, Üriner Sistem
C	1, 2, 5, 6, 57	Solunum Sistemi
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56, 58-60, 63-67	Göz, Gastrointestinal yol
E	4	Solunum Sistemi
F	40, 41	Gastrointestinal yol
G	52	Gastrointestinal yol

Tanı: AdV teşhisi klinik görünümüne dayanır. Viral kültür, nükleik asit testi, viral antijen testi ve seroloji gibi diğer laboratuvar çalışmaları AdV teşhisinin konulmasına yardımcı olabilir (28).

Antijen testi: Gruba özgü hekson antijenine yönelik monoklonal ve poliklonal antikolar, tüm Adenoviruslerin doğrudan tespiti için kullanılabilir ve ticari olarak temin edilebilir. Duyarlılık %43-89 arasında değişmektedir ve enfeksiyonun ilk 5 gününde en yüksektir. Enfeksiyon sonrası 3 haftaya kadar antijen tespit edilebilir (29).

Hücre kültürü: A549, KB, HeLa, HEp-2 ve MRC-5 gibi sürekli hücre hatları daha yaygın olarak kullanılmasına rağmen insan embriyonik böbrek hücrelerinde en iyi şekilde üretilir. Özellikle, AdV 40 ve AdV 41, Graham 293 HEK hücrelerinde en iyi şekilde büyür ve bu nedenle, geleneksel hücre kültürlerinde gözden kaçabilir (29).

Histopatoloji: İmmünkompetan konakta az ihtiyaç duyulmasına rağmen bağışıklığı bozulmuş kişilerde invazif Adenovirusün saptanmasında çok yararlı olabilir (29).

Nükleik asit testleri: E1A'nın transaktive edici bölgeleri ve hekson geninin N terminal bölgesi iyi korunduğundan bu bölgelere yönelik primerleri olan PCR tahlilleri yaygın olarak kullanılmaktadır. AdV genomunda önemli genetik

heterojenite vardır (bazı türler arasında %80'den fazla sekans farklılığı). Bu nedenle çok sayıda geleneksel ve kantitatif gerçek zamanlı PCR tekniği açıklanmıştır. Ayrıca hastaların dışkısından Adenovirusün tespitinin de yapıldığı çok sayıda viral, bakteriyel ve paraziter diare etkeninin tespit edildiği multipleks PCR da vardır (29).

Tiplendirme: Geniş klinik kullanımda olmasa da AdV spesifik alt grupları ve serotipleri; onkojenik potansiyeli, klinik hastalığı ve antiviral ajanlara duyarlılığı tahmin etmek için kullanılabilir. Örneğin F türü AdV, GI hastalığına neden olur ve ribavirine dirençlidir. Tür ve serotip tayini; geleneksel serotipleme, dizileme ve serotipe özgü PCR ile gerçekleştirilebilir. Referans serumları kullanarak nötralizasyon veya hemaglutinasyon inhibisyon yöntemiyle yapılan serotipleme yöntemi artık tercih edilen bir yöntem değildir (29).

Tedavi: Çoğu durumda, AdV enfeksiyonunun tedavisi destekleyicidir. Hidrasyon, NSAID'ler ve birkaç gün yatak istirahati faydalı olabilir (28).

Korunma: Özellikle 17 ila 50 yaş arası askere alınanlarda önlemek için aşılama (oral, canlı, enterik kaplı) uygulanabilir. Yüzme havuzu suyunun klorlanması, damlacık ve temas önlemleri gibi diğer önlemler yararlıdır.

AdV enfeksiyonu, mükemmel bir prognoza sahiptir; bağışıklığı zayıflamış bireylerde ise ölüm oranları %70'e kadar çıkabilir (28).

2. MATERYAL – METOD

2.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE ÖN HAZIRLIK

Tekirdağ ilinin en fazla hasta potansiyeline sahip hastanelerinden Namık Kemal Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne kusma ve ishal şikâyetiyle başvuran 341 hastadan, gaita örneği gastroenterit etkeni viruslerin tespiti yönünden değerlendirilmek üzere toplandı. Antijen tespiti yapıldıktan sonra numuneler temiz bir ependorfa alındı ve PCR çalışması yapılana kadar -80⁰ C de saklandı.

2.2. ADENOVİRUS- ROTAVİRUS TESPİTİ

Örneklerden gastroenterit etkeni olan Adenovirus ve Rotavirus tespiti için Laboquick Rotavirus – Adenovirus Ag Combo Test (In Vitro Diagnostic Test, İzmir, Türkiye) kullanıldı. Testin ilkesi; Rotavirus hızlı test kasetinin içinde immunokromotografik ilkeyle çalışan A grubu Rotavirusun VP6 antijenine karşı kırmızı altın rengi konjuge monoklonal antikorlar kullanan bir membran bant ve katı faza özgü Rotavirus antikorları bulunur.

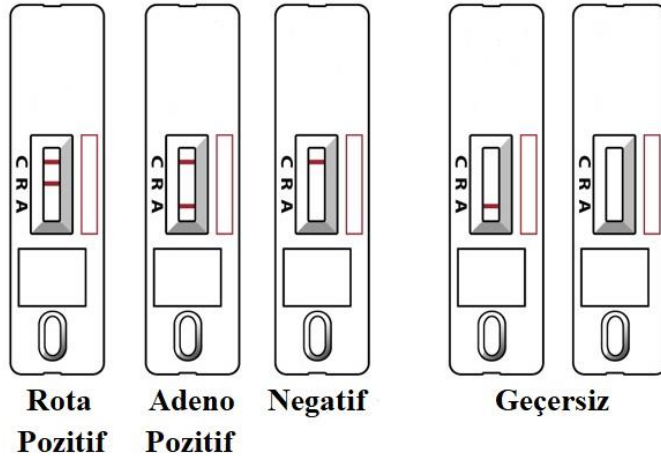
Rotavirus – Adenovirus Ag Combo Test Kiti içeriği;

- 1) Rotavirus- Adenovirus Ag Combo Test Cihazı
- 2) Numune alma cihazı
- 3) Silika jel poşeti

Üretici firma önerileri dikkate alınarak aşağıda belirtilen sıraya göre numunelerin çalışması gerçekleştirildi;

- 1) Numune alma şişesi homojen karışım olana kadar çalkalanarak karıştırıldı.
- 2) Dışkı numunesinden, numune alma şişesine bir miktar dışkı alındı ve iyice çalkalanıp homojen dağılması sağlandı.
- 3) Numune çözeltisinden 3-4 damla kaset üzerindeki örnek kuyucuğuna damlatıldı.
- 4) 10-15 dakika sonra test sonuçları okundu.
- 5) Kontrol (C) bölgesinde band oluşması testin geçerli olduğunu gösterdi. Adenovirus veya Rotavirusün ilgili alanında band oluşmasına göre

pozitiflik belirlendi. Kontrol (C) bölgesinde band oluşmazsa test geçersiz kabul edildi ve tekrarlandı. Testin değerlendirilmesi Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2: Rotavirus – Adenovirus Ag Combo Test değerlendirilmesi

2.3. NOROVİRUS TESPİTİ

Norovirus tespiti için; gaita örneklerinde norovirus genogruları GI ve GII'nin kalitatif tayini için bir enzim immünolojik test olan RIDASCREEN Norovirus 3rd Generation (R-Biopharm AG, Darmstadt, Almanya) kullanıldı.

Norovirus Kit içeriğinde ELISA test prensibine uygun olarak mikrokuyucuklu pleyt, buffer, konjugat, substrat, stop solüsyonu, pozitif ve negatif kontrol bulunmaktaydı.

Üretici firma önerileri dikkate alınarak aşağıda belirtilen sıraya göre numunelerin çalışması gerçekleştirildi;

- 1) Reaktifler ve kuyucuklar oda sıcaklığına getirildi. Wash buffer (yıkama solüsyonu) distile su ile 1/10 oranında dilüe edildi. Gaita örnekleri dilüent 1 ile 1/11 oranında dilüe edildi.

- 2) Mikrokuyucuklara biyotinlenmiş monoklonal norovirus antikorlar (konjugat 1) ile birlikte bir miktar gaita örneği süspansiyonu eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi.
- 3) Mikrokuyucuklar yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra streptavidin peroksidaz konjugatı (konjugat 2) eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Gaita örneğinde bulunan norovirus antijenleri, sabitlenmiş antikorların, norovirus antijenlerinin ve biyotin ile konjüge edilmiş monoklonal antikor komplekslerinde yakalanır ve daha sonra streptavidin peroksidaz konjugatları tarafından tanınır.
- 4) Bağlanmamış streptavidin peroksidaz konjugatı yıkama solüsyonu ile yıkandı ve kromojenik renksiz bir substrat solüsyonu (hidrojen peroksit / TMB) eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. Substrat, herhangi bir bağlı peroksidaz ile hidrolize edilerek kromojeni mavi renge dönüştürür.
- 5) 15 dakikanın sonunda her kuyucuğa stop solüsyonu eklendi. Reaksiyonun stop solüsyonu ile durdurulmasıyla kuyucukların rengi norovirus antijenlerinin varlığını gösterecek şekilde maviden sarıya döner.
- 6) Test sonuçları 620-650 nm’de fotometrik olarak okundu.

2.4. ROTAVİRUS GENOTİP TESPİTİ

2.4.1. DNA İzolasyonu

200 mg örnek içerisinde 200 µL tampon (200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM EDTA; 10% Triton X-100) bulunan tüplere transfer edilip vorteks ile karıştırıldı. Ardından karışım nükleik asit izolasyonu için RINA-M14™ nükleik asit izolasyon robotuna aktarıldı. “Bio-Speedy® RINA™-M14 Dışkı Robotik Nükleik Asit İzolasyon Kiti” kullanılarak robotik izolasyon gerçekleştirildi. Nükleik asitler analize kadar -20 °C de saklandı. Nükleik asit izolasyonu tamamlanmış örneklerdeki nükleik asit miktarı ve kalitesi spektrofotometrik yöntemlerle ölçülerek sonraki basamaklara uygunluğu test edildi. OD260/OD280 oranı 1.8-2.0, OD260/OD230 oranı 2.0-2.2 aralığında ve en az 10 ng/ul konsantrasyonuna sahip nükleik asitler ile diğer moleküler işlemler gerçekleştirildi.

2.4.2. Rotavirus G Genotiplendirilmesi

Rotavirus G genotiplendirmesi için DSÖ'nün tanımladığı iş akışları RT-qPCR ve HRM reaksiyonlarına entegre edildi. G genotiplendirmesinde PCR reaksiyonları 2 adımda yapıldı. İlk adımda RT-PCR ile rota virus RNA'sının 905 bp uzunluğundaki VP7 (G) bölgesi (VP7-RNA) hedeflenerek Roche LightCycler® 96 cihazında cDNA'ya dönüştürüldü ve çoğaltıldı. RT-PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ile miktarları aşağıda verildi. RT-qPCR ısıl döngü programı da Tablo 3 'de gösterildi.

RT-qPCR'de kullanılan bileşenler ve miktarı;

10 uL 2x qPCR EvaGreen mix, 0,6 uL RT-RIN(Reverse Transcriptase + Ribonuclease Inhibitor), 2 uL 9con1 ve 9con2 Primer Mix (10 uM), 2.4 uL Moleküler ölçekli su, 5 uL Nükleik Asit Ekstraktı kullanılarak toplamda 20 uL mix elde edilmiştir. Bu şekilde PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3: RT-qPCR ısıl döngü programı

İşlem	Derece – Süre	Döngü Sayısı
Ters Transkripsiyon	45 °C- 60 dk	1
İlk Denatürasyon	95 °C- 5 dk	1
Amplifikasyon	95 °C- 15 sn	25
	42 °C- 30 sn	
	72 °C- 45 sn	
Erime eğrisi analizi	65-95 °C arası	1

İkinci PCR' de ilk RT-PCR' de çoğaltılan 905 bp uzunluğundaki VP7 (G) bölgesinin cDNA'sı (VP7-cDNA) 9con1 ileri ve 9T1, 9T1, 9T3P, 9T4, 9T9B geri primerleri ile kurulan multiplex qPCR ile Roche LightCycler® 96 cihazında çoğaltıldı. Multiplex qPCR' de kullanılan bileşenler ile miktarları aşağıda verildi. Isıl döngü programı ise tablo 4 'de gösterildi.

Multipleks qPCR' de kullanılan bileşenler ve miktarları;

10 uL 2x qPCR EvaGreen Mix, 6 uL 9con1, 9T1, 9T2, 9T3P, 9T4, 9T9B Primer Mix (10 uM) , 3 uL Moleküler ölçekli su , 1 uL VP7-cDNA olmak üzere toplam 20 uL karışım elde edildi. Bu şekilde şekilde PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4: RT-qPCR ısı döngü programı

İşlem	Derece – Süre	Döngü Sayısı
İlk Denaturasyon	95 °C- 5 dk	1
Amplifikasyon	95 °C- 15 sn	30
	42 °C- 30 sn	
	72 °C- 45 sn	
HRM Analizi	65-95 °C arası	1

Genotiplendirme için %3'lük agaroz jelde multiplex qPCR ürünlerinin boyut analizi gerçekleştirildi ve agaroz jeldeki multiplex qPCR ürünlerinin boyutları ile HRM profilleri karşılaştırılıp genotiplendirme yapıldı. Rotavirus G genotiplerinin agaroz jelde beklenen ürün boyutları tablo 5' te verildi.

Tablo 5: Agaroz jel ürün boyutlarına göre G genotipleri

Genotip	Ürün Boyutu (bp)
G9	111
G1	159
G2	245
G4	404
G3	465

2.4.3. Rotavirus P Genotiplendirmesi

Rotavirus P genotiplendirmesi için DSÖ'nün tanımladığı iş akışları RT-qPCR ve HRM reaksiyonlarına entegre edildi. P genotiplendirmesinde PCR reaksiyonları 2 adımda yapıldı. İlk adımda RT-PCR ile rota virus RNA'sının 876 bp uzunluğundaki VP4 (P) bölgesi (VP4-RNA) hedeflenerek Roche LightCycler® 96 cihazında

cDNA'ya dönüştürüldü ve çoğaltıldı. RT-PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ile miktarları aşağıda verildi. RT-qPCR ısı döngü programı ise tablo 6'da gösterildi.

RT-PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ile miktarları;

10 uL 2x qPCR EvaGreen Mix, 0.6 uL RT-RIN (Reverse Transcriptase + Ribonuclease Inhibitor), 2 uL con3 ve con2 Primer Mix (10 uM), 2.4 uL Moleküler ölçekli su, 5 uL Nükleik Asit Ekstraktı olmak üzere toplam 20 uL karışım elde edildi. Bu şekilde PCR çalışması gerçekleştirildi

Tablo 6: RT-qPCR ısı döngü programı

İşlem	Derece – Süre	Döngü Sayısı
Ters Transkripsiyon	45 °C- 60 dk	1
İlk Denatürasyon	95 °C- 5 dk	1
Amplifikasyon	95 °C- 15 sn	25
	42 °C- 30 sn	
	72 °C- 45 sn	
Erime eğrisi analizi	65-95 °C arası	1

İkinci PCR' de ilk RT-PCR da çoğaltılan 876 bp uzunluğundaki VP4 (P) bölgesi cDNA'sı (VP4-cDNA) con3 ileri ve 1T-1, 2T-1, 3T-1, 4T-1 ve 5T-1 geri primerleri ile kurulan multiplex qPCR ile Roche LightCycler® 96 cihazında çoğaltıldı. Multiplex qPCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ile miktarları aşağıda gösterildi. Multiplex qPCR ısı döngü programı ise tablo 7'de verildi.

Multiplex qPCR' de kullanılan bileşenler ve miktarları;

10 uL 2x qPCR EvaGreen Mix, 6 uL con3, 1T-1, 2T-1, 3T-1, 4T-1 ve 5T-1 Primer Mix (10 uM), 3 uL Moleküler ölçekli su, 1 VP7-cDNA olmak üzere toplam 20 uL karışım elde edildi. Bu şekilde PCR çalışması gerçekleştirildi.

Tablo 7: Multipleks qPCR ısıl döngü programı

İşlem	Derece – Süre	Döngü Sayısı
İlk Denaturasyon	95 °C- 5 dk	1
Amplifikasyon	95 °C- 15 sn	30
	42 °C- 30 sn	
	72 °C- 45 sn	
HRM Analizi	65-95 °C arası	1

Genotiplendirme için %3'lük agaroz jelde PCR ürünlerinin boyut analizi gerçekleştirildi ve agaroz jeldeki PCR ürünlerinin boyutları ile HRM profilleri karşılaştırılıp genotiplendirme yapıldı. Rotavirus P genotiplerinin agaroz jelde beklenen ürün boyutları tablo 8' de verildi.

Tablo 8: Agaroz jel ürün boyutlarına göre P genotipleri

Genotip	Ürün Boyutu (bp)
P6	268
P8	346
P9	392
P4	484
P10	584

2.5. Jel Elektroforez ve Görüntüleme

Amplifikasyon ürünlerinin yürütülmesi ve görüntülenmesi için %3'lük Etidyum Bromürlü agaroz jel elektroforezi ile araştırıldı. Tank tamponunda ve agaroz jelinin hazırlanmasında TAE solüsyonu kullanıldı. TAE (Tris Asetat EDTA) konsantre (50x TAE) stok solüsyonu olarak hazırlandı.

50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu stok solüsyon hazırlanışı

Tris Base

242 g

Glacial Asetik asit	57.1 ml
EDTA (0.5 M pH:8)	100 ml

1. Elektroforez işlemi için kullanılan tampon solüsyonu 1X TAE elde etmek için 50X TAE (1:49 oranında distile su ile dilüe karıştırılmış ve 1000 ml'ye tamamlanmıştır.) solüsyonu ile dilüe edilerek hazırlandı. Hazırlanan solüsyon oda ısısında saklandı.
2. %3'lük jel oluşturacak şekilde agaroz eklenerek bir balon joje içerisine konuldu. Balon joje üzerine 1X TAE tampon solüsyonu eklenerek mikrodalgada eritildi.
3. Hazırlanan jel çözelti 50-60⁰ C'ye kadar bir süre hafif çalkalanarak soğutuldu.
4. Jel içerisinde 0.5µg/ml konsantrasyonunda etidyum bromid eklendi.
5. Tank içerisine uygun taraklar yerleştirildi ve hazırlanan jel tank içerisine döküldü.
6. Agaroz Jelin katılmaşması oda sıcaklığında 30-40 dakika bekletildi. Tank içerisindeki taraklar çıkarıldı.
7. İlk kuyucuğa 6X yükleme boyası kullanılarak 100 bp plus (Thermo sm0323) yüklendi. Diğer kuyucuklara da örnekler yükleme boyası kullanılarak yüklendi.
8. Tanka güç kaynağı bağlanarak TAE tamponunda 70V 210 dakika yürütüldü.
9. Jel tanktan çıkarıldı UV transilluminatörde (Vilber Lourmat, Infinity 1100) görüntülenerek boyut analizi gerçekleştirilmiş ve agaroz jeldeki multiplex qPCR ürünlerinin boyutları ile HRM profilleri karşılaştırılıp genotiplendirme yapılmıştır.

3. BULGULAR

Bölgemizde akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus AdV ve Norovirus enfeksiyonlarının tespiti ve rotavirus genotip tayini yapmak amacıyla Namık Kemal Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniğine, Çocuk Nefroloji, Çocuk Yoğun Bakım ve Çocuk Acil Tıp Birimine 15 Eylül 2018 – 15 Haziran 2019 tarihleri arasında başvuran 15 yaş altı akut gastroenteritli çocuklara ait toplam 341 dışkı örneği çalışmaya dahil edildi. Hastaların 153'ü(%44,9) kadın, 188'i(%55,1) erkek çocuklardan oluşmakta idi. Örneklerin kliniklere göre dağılımı ise şöyleydi; Çocuk acil tıp polikliniği 217(%63,6), Çocuk sağlığı ve hastalıkları polikliniği 113(%33,2), Çocuk Yoğun Bakım 11(%3,2).

Hastaların yarısından çoğu (%51) 0-2 yaş grubundaydı. Hastaların yaş grubuna göre dağılımı Tablo 9'da gösterildi.

Tablo 9: Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı ve pozitiflik sayıları

Yaş Grupları	Örnek Sayısı (%)	Rotavirus Pozitif	Norovirus Pozitif	Adenovirus Pozitif
0-1 Yaş	107(31,4)	24	5	12
2 Yaş	67(19,6)	12	7	10
3 Yaş	31(9,1)	10	1	4
4 Yaş	15(4,4)	8	1	-
5 Yaş	25(7,3)	7	1	4
6 Yaş	17(4,9)	2	3	3
7 Yaş	18(5,3)	5	1	-
8 Yaş	21(6,2)	3	3	6
9 Yaş	11(3,2)	1	1	2
10 Yaş	4(1,2)	-	1	1
11 Yaş	4(1,2)	2	-	-
12 Yaş	10(2,9)	1	-	1
13 Yaş	4(1,2)	3	-	-

14 Yaş	3(0,9)	-	1	-
15 Yaş	4(1,2)	1	-	1

3.1. Rotavirus Tespiti

Antijen testi sonucunda toplam 341 hastanın 79'unda (%23.16) Rotavirus antijeni pozitif bulundu. Hastalardan 41'i (%51) kadın, 38'i (%49) erkek çocuklarından oluşmaktaydı. Bunlardan 24'ü 0-1 yaş, 12'si 2 yaş, 10'u 3 yaş grubundaydı. Hastaların 60'ı (%76) Çocuk Acil Tıp Birimine, 18'i (%23) Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniğine, 1'i (%1) Çocuk Yoğun Bakım'a başvuran hastalardı. Pozitiflik sayılarının yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 9'da gösterildi.

Rotavirus antijeni pozitif olan hastaların mevsimlere göre dağılımı şöyleydi: kış %42, ilkbahar %33, sonbahar %25. En az vaka Eylül ayında görülürken , en çok vaka Şubat ayına aitti.

3.2. Norovirus Tespiti

ELISA testi sonucunda toplam 341 hastanın 25'inde (%7,3) norovirus antijeni pozitif bulundu. Norovirus antijeni pozitif 25 hastanın 13'ü (%52) kadın, 12'si erkek (%48) çocuklarından oluşmakta idi. Bunlardan 7'si 2 yaş, 5'i 0-1 yaş, 3'ü 6 yaş grubundaydı. Hastaların 16'sı(%64) Çocuk Acil Tıp Birimine, 8'i(%32) Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniğine, 1'i(%4) Çocuk Yoğun Bakıma başvuran hastalardı. Pozitiflik sayılarının yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 9'da gösterildi.

Norovirus antijeni pozitif olan hastaların mevsimlere göre dağılımı şöyleydi: ilkbahar %64, kış %20, sonbahar %16. Haziran ayında vaka gözükmezken, en çok vaka %44 ile mart ayına aitti.

3.3. Adenovirus Tespiti

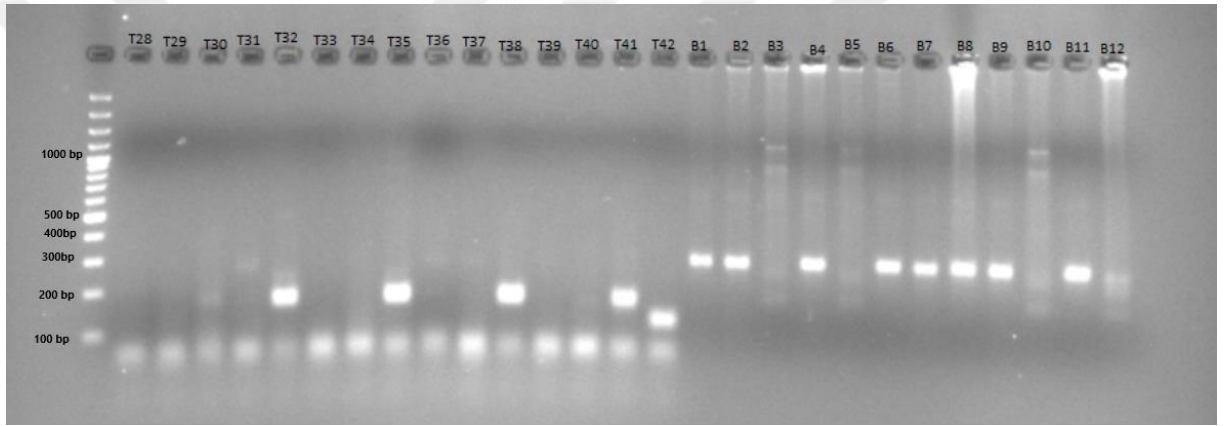
Antijen testi sonucunda toplam 341 hastanın 44'ünde (%12,9) AdV antijeni pozitif bulundu. Hastalardan 17'si (%39) kadın, 27'si (%61) erkek çocuklarından oluşmaktaydı. Bunlardan 12'si 0-1 yaş, 10'u 2 yaş, 6'sı 8 yaş grubundaydı. Hastaların 38'i(%86) Çocuk Acil Tıp Birimine, 6'si(%14) Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniğine başvuran hastalardı. Pozitiflik sayılarının yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 9'da gösterildi.

AdV antijeni pozitif olan hastaların mevsimlere göre dağılımı şöyledi: kış %46, ilkbahar %36, sonbahar %18. Haziran ayında vaka gözükmezken, en çok vaka ocak (%18) ve mart (%18) ayına aitti.

3.4. Rotavirus G Genotiplendirmesi Sonuçları

Genotip analizi yapılan 79 numuneden 39'unda G genotipi tespit edilemedi. Tespit edilen 40 numunenin G genotiplerin dağılımı ise şöyledi; G1, 11(%27,5); G2, 21(%52,5); G3, 2(%5); G4, 1 (%2,5); G9, 5 (%12,5).

Agaroz jel bant boyutları ile HRM sonuçları karşılaştırılmış ve sonuçlar Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3: G genotiplendirme multipleks qPCR sonuçlarının agaroz jel bant boyutları

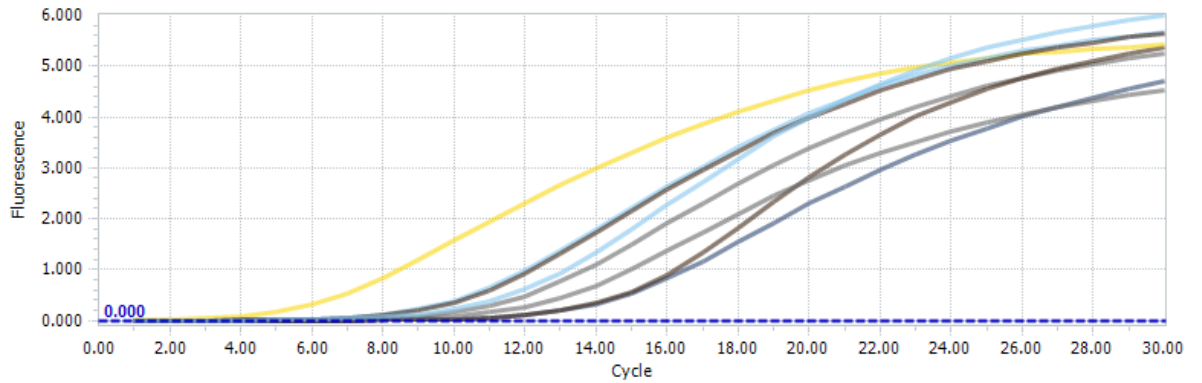
Tablo 10: G genotiplendirme Agaroz jel bant boyutu, erime eğrisi tm değeri ve HRM grup sonuçları

Numune	G Genotiplendirme			
	Agaroz Jel Bant Boyutu	Genotip	Tm Değeri °C	HRM Grubu
T1	159 bp	G1	75,2	Grup2
T4	111 bp	G9	74,2	Grup3
T7	111 bp	G9	74,2	Grup3

T9	404 bp	G4	78,6	Grup4
T12	465 bp	G3	80,2	Grup1
T15	111 bp	G9	74,2	Grup3
T16	159 bp	G1	75,2	Grup2
T19	159 bp	G1	75,2	Grup2
T20	159 bp	G1	75,2	Grup2
T22	111 bp	G9	74,2	Grup3
T25	159 bp	G1	75,2	Grup2
T26	159 bp	G1	75,2	Grup2
T27	465 bp	G3	80,2	Grup1
T30	159 bp	G1	75,2	Grup2
T32	159 bp	G1	75,2	Grup2
T35	159 bp	G1	75,2	Grup2
T38	159 bp	G1	75,2	Grup2
T41	159 bp	G1	75,2	Grup2
T42	111 bp	G9	74,2	Grup3
B1	245 bp	G2	75	Grup5
B2	245 bp	G2	75	Grup6
B4	245 bp	G2	75	Grup7
B6	245 bp	G2	80	Grup8
B7	245 bp	G2	81	Grup7
B8	245 bp	G2	80	Grup7
B9	245 bp	G2	74	Grup9
B11	245 bp	G2	75	Grup10
B13	245 bp	G2	79	Grup11
B15	245 bp	G2	81	Grup8
B16	245 bp	G2	81	Grup12
B17	245 bp	G2	80	Grup8
B18	245 bp	G2	79	Grup8
B22	245 bp	G2	81	Grup12
B23	245 bp	G2	81	Grup12

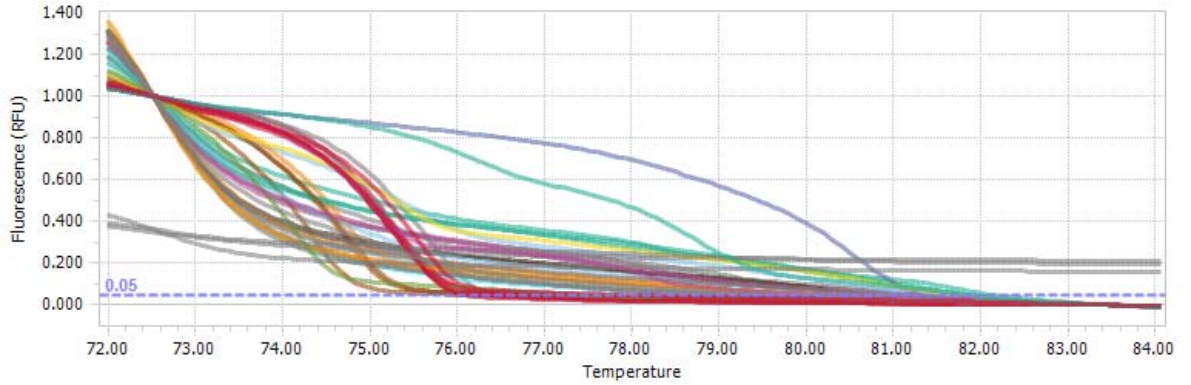
B24	245 bp	G2	81	Grup11
B27	245 bp	G2	81	Grup8
B32	245 bp	G2	81	Grup10
B34	245 bp	G2	75	Grup5
B36	245 bp	G2	75	Grup13
B37	245 bp	G2	72	Grup7

Tablo 10' da G genotiplendirilmesinde kullanılan her bir örneğin agaroz jel bant boyutu ve bu boyutlara göre beklenen G1, G2, G3, G4, G9 genotiplendirilmesi belirlenmiş olup, ayrıca bu örneklerin Tm değeri ve HRM gruplarına göre dağılımları da belirlenmiştir. Buna göre her bir örneğin kendine ait bir bp boyutu ve bu örneklerin hangi genotip gruba dahil olduğu ve örneklerin hangi erime sıcaklığı ile eridiği son olarak HRM analizi ile gruplandırılması gösterilmiştir.



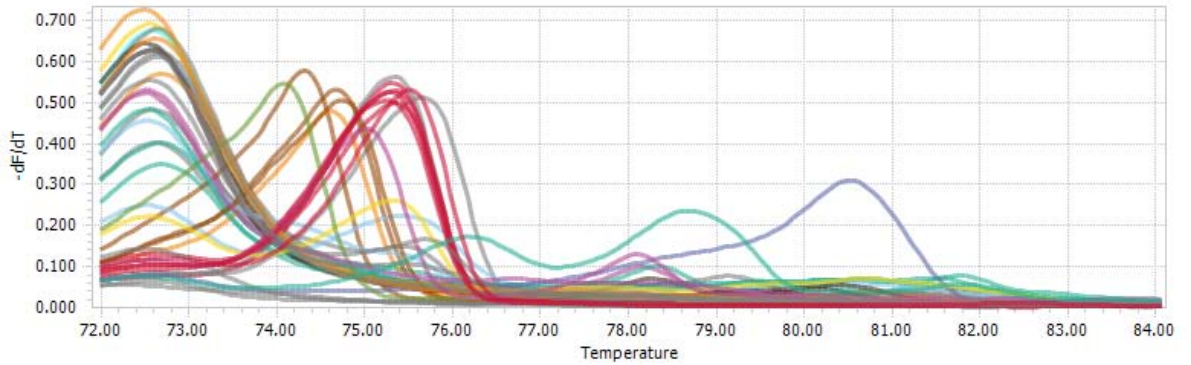
Grafik 1: Multipleks qPCR amplifikasyon eğrileri

G genotiplendirmesinde HRM analizinde kullanılan örneklerin hangi döngüden sonra amplifikasyonu gerçekleştirdiği Grafik 1'de gösterilmiştir. Burada her bir örnek farklı döngüde kendisini ifade edebilmiştir.



Grafik 2: Normalize edilmiş yüksek çözünürlüklü erime eğrisi

G genotiplendirmesinde HRM analizinde Grafik 2’de normalize edilmiş örneklerin erime sıcaklık değerleri gösterilmiştir. Buna göre her bir örneğin hangi sıcaklık arasında erime gösterdiği gösterilmiştir.



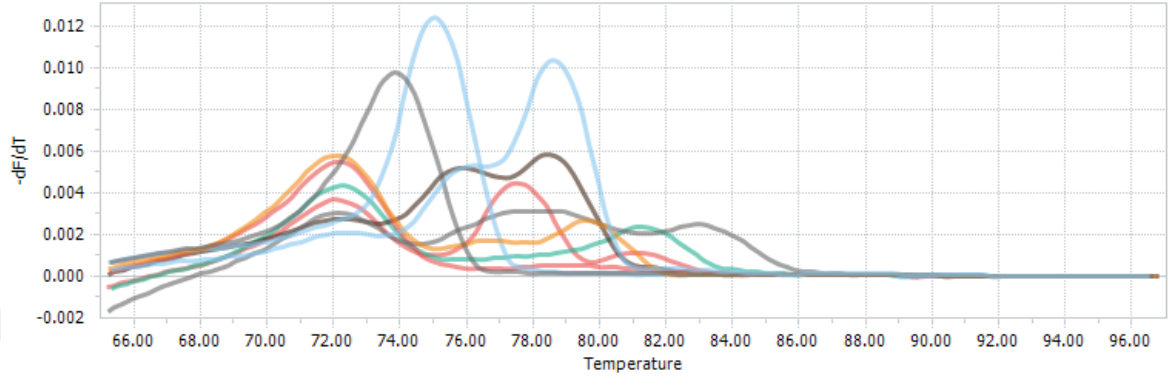
Grafik 3: Konvansiyonel erime eğrisi

G genotiplendirmesi için yapılan HRM analizinde kullanılan örneklerin erime sıcaklığı Grafik 3’te gösterilmiştir. Buna göre örneklerin erime sıcaklığı kendi aralarında değişkenlik gösterir. Örneklerin farklı sıcaklıklarda verdiği floresan pikler genetik varyasyonların olduğunu göstermiştir.

3.5. Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) Analizi

Tablo 10’ da görüleceği üzere G genotiplendirmesi için yapılan HRM analizinde 13 tane grup elde edilmiştir. HRM analizi G1 genotipindeki tüm örnekleri Grup 2 altında, G3 genotipindeki tüm örnekleri Grup 1 altında, G4 genotipindeki tüm

örnekleri Grup 4 altında ve G9 genotipindeki tüm örnekleri Grup 3 altında toplamıştır. Yapılan HRM analizi sonuçlarına göre G2 genotipindeki örnekler 9 farklı grup (Grup 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) altında toplanmıştır.



Grafik 4: G2 genotipindeki örnekler için erime eğrisi sonuçları

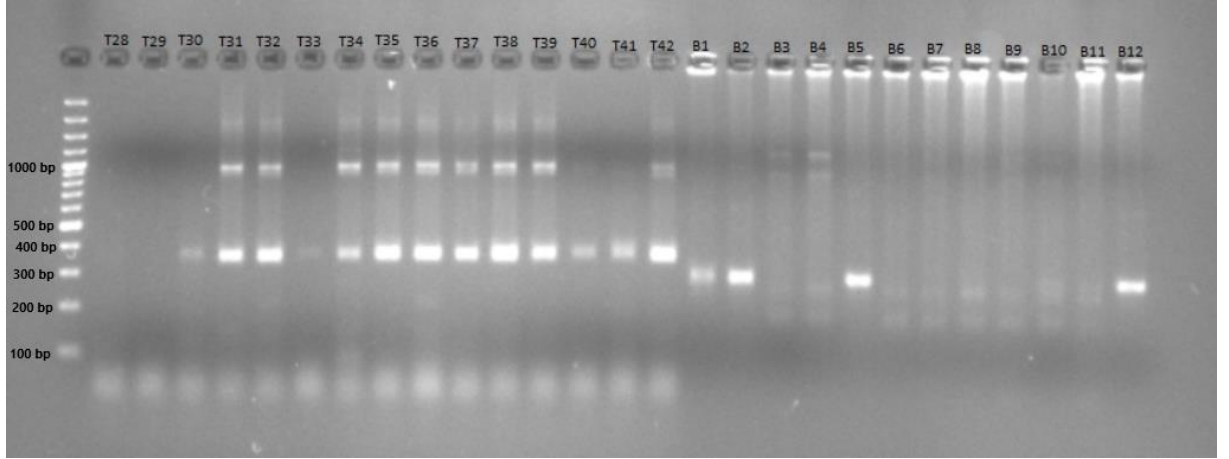
G2 genotiplendirmesinde kullanılan HRM analizinde örneklerin erime sıcaklığı Grafik 4'te belirtilmiştir. G2 genotipi için 9 farklı grup elde edildi. G2 genotipi için yapılan erime eğrisi grafiğinde her bir örneğin farklı erime sıcaklığı değerinde floresan pik verdiği gösterilmiştir.

3.6. Rotavirus P Genotiplendirmesi Sonuçları

Genotip analizi yapılan 79 numuneden 26'sında P genotipi tespit edilemedi. Tespit edilen 53 numunenin P genotiplerinin dağılımı ise şöyledir; P4, 44(%83,0); P9, 8(%15,1); P10, 1(%1,9).

G ve P genotipinin birlikte tespit edildiği 25 numunenin dağılımına bakıldığında; G1P [4], 11(%44); G2P [9], 5(%20); G9P [4], 5(%20); G2P [4], 2(%8); G3P [10], 1(%4); G4P [4], 1(%4) genotipleri görüldü.

Agaroz jel bant boyutları ile HRM sonuçları karşılaştırılmış olup aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4: P genotiplendirme multipleks PCR sonuçlarının agaroz jel bant boyutları

P genotiplendirmesinde kullanılan örneklerin agaroz jel elektroforezinde bp uzunlukları belirtilmiştir. Her bir örneğin kaç bp olduğu Şekil 4'te gösterilmiştir.

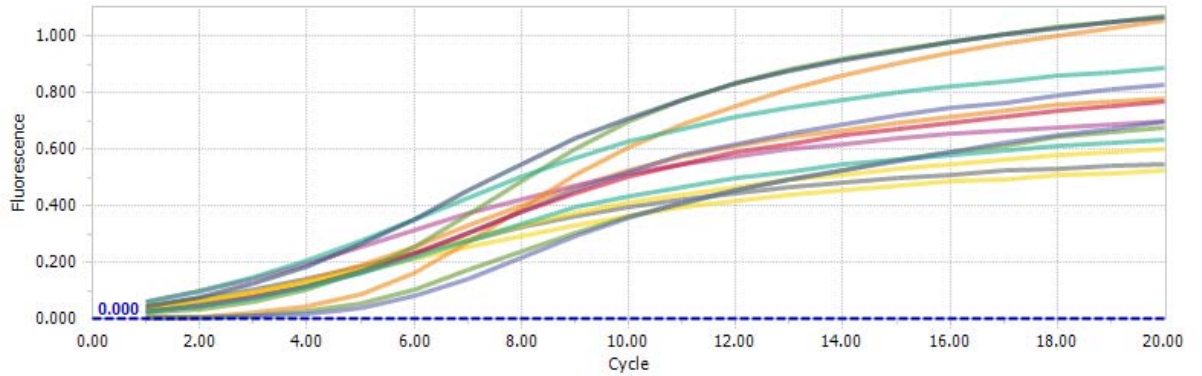
Tablo 11: P genotiplendirme Agaroz bant, erime eğrisi ve HRM grup sonuçları

Numune	P Genotiplendirme			
	Agaroz Jel Bant Boyutu	Genotip	Tm Değeri °C	HRM Grubu
T1	362	P4	79,5	Grup1
T2	362	P4	79,5	Grup1
T3	362	P4	79,5	Grup1
T4	362	P4	79,5	Grup1
T5	362	P4	79,5	Grup1
T6	362	P4	79,5	Grup1
T7	362	P4	79,5	Grup1
T9	362	P4	79,5	Grup1
T11	362	P4	79,5	Grup1
T12	462	P10	82,5	Grup2
T13	362	P4	79,5	Grup1
T14	362	P4	79,5	Grup1
T15	362	P4	79,5	Grup1

T16	362	P4	79,5	Grup1
T17	362	P4	79,5	Grup1
T18	362	P4	79,5	Grup1
T19	362	P4	79,5	Grup1
T20	362	P4	79,5	Grup1
T21	362	P4	79,5	Grup1
T22	362	P4	79,5	Grup1
T23	362	P4	79,5	Grup1
T24	362	P4	79,5	Grup1
T25	362	P4	79,5	Grup1
T26	362	P4	79,5	Grup1
T30	362	P4	79,5	Grup1
T31	462	P4	79,5	Grup1
T32	362	P4	79,5	Grup1
T33	362	P4	79,5	Grup1
T34	362	P4	79,5	Grup1
T35	362	P4	79,5	Grup1
T36	362	P4	79,5	Grup1
T37	362	P4	79,5	Grup1
T38	362	P4	79,5	Grup1
T39	362	P4	79,5	Grup1
T40	362	P4	79,5	Grup1
T41	362	P4	79,5	Grup1
T42	362	P4	79,5	Grup1
B1	270	P9	79,5	Grup3
B2	270	P9	79,5	Grup4
B5	270	P9	81	Grup4
B12	270	P9	77,5	Grup5
B13	270	P9	79,5	Grup6
B14	270	P9	77,5	Grup5
B16	270	P9	81	Grup4

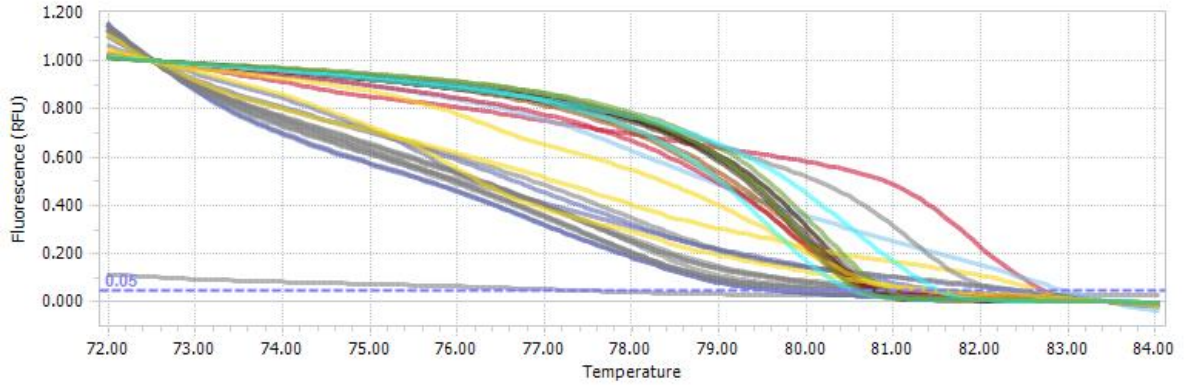
B17	270	P9	81	Grup4
B25	362	P4	79,5	Grup7
B26	362	P4	77,5	Grup5
B27	362	P4	82	Grup7
B28	362	P4	77	Grup4
B29	362	P4	81	Grup5
B30	362	P4	82	Grup6
B31	362	P4	77,5	Grup5
B32	362	P4	77,5	Grup5

Tablo 11’de P genotiplendirilmesinde kullanılan her bir örneğin agaroz jel bant boyutu ve bu boyutlara göre beklenen P4, P6, P8, P9, P10 genotiplendirilmesi belirlenmiş olup, ayrıca bu örneklerin Tm değeri ve HRM gruplarına göre dağılımları da belirlenmiştir. Buna göre her bir örneğin kendine ait bir bp boyutu ve bu örneklerin hangi genotip gruba dahil olduğu ve örneklerin hangi erime sıcaklığı ile eridiği son olarak HRM analizi ile gruplandırılması gösterilmiştir.



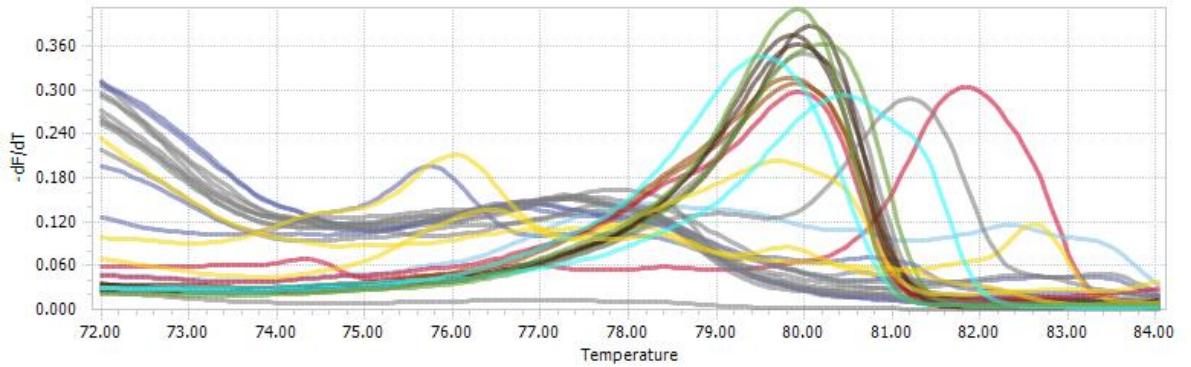
Grafik 5: Multipleks PCR amplifikasyon eğrileri

P genotiplendirmesinde HRM analizinde kullanılan örneklerin hangi döngüden sonra amplifikasyonu gerçekleştirdiği Grafik 5’de gösterilmiştir. Burada her bir örnek farklı döngüde kendisini ifade edebilmiştir.



Grafik 6: Normalized yüksek çözünürlüklü erime eğrisi

P genotiplendirmesinde HRM analizinde Grafik 6'de normalize edilmiş örneklerin erime sıcaklık değerleri gösterilmiştir. Buna göre her bir örneğin hangi sıcaklık arasında erime gösterdiği gösterilmiştir.

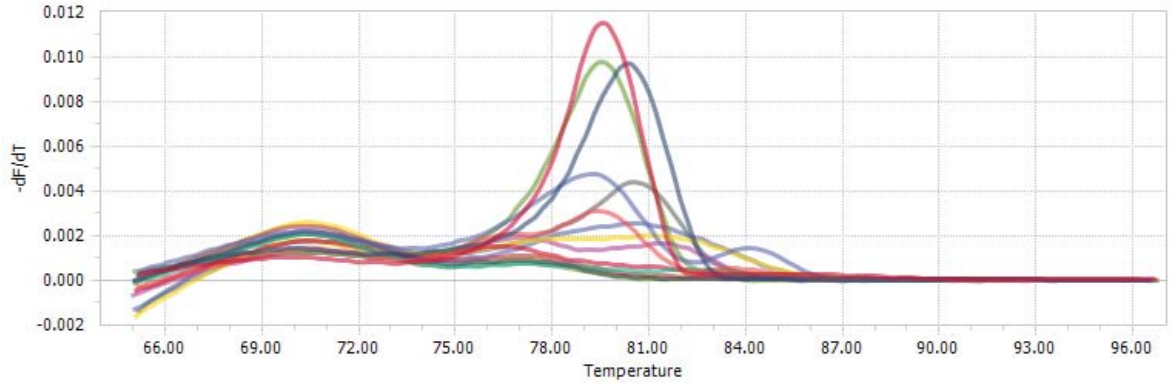


Grafik 7: Konvansiyonel erime eğrisi

P genotiplendirmesi için yapılan HRM analizinde kullanılan örneklerin erime sıcaklığı Grafik 7'de gösterilmiştir. Buna göre örneklerin erime sıcaklığı kendi aralarında değişkenlik gösterir. Örneklerin farklı sıcaklıklarda verdiği floresan pikler genetik varyasyonların olduğunu göstermiştir.

3.7. Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) Analizi

Tablo 11' den görüleceği üzere P genotiplendirmesi için yapılan HRM analizinde 7 tane grup elde edilmiştir. HRM analizi Rotavirus P4 genotipindeki örnekleri 5 grup (Grup 1, 4, 5, 6, 7) altında, Rotavirus P9 genotipindeki örnekleri 4 grup (Grup 3, 4, 5, 6) altında ve Rotavirus P10 tipindeki örneği Grup 2 altında toplamıştır.



Grafik 8: Rotavirus P4 ve P9 genotipindeki örneklerle ait erime eğrisi sonuçları



4. TARTIŞMA

Rotavirus hem ülkemizde hemde bütün dünyada çocukluk çağı akut gastroenteritlerin en yaygın sebebidir. Özellikle 5 yaş altı çocuklarda görülen rotavirus yüksek düzeyde sıvı kaybına neden olur. Yaş küçüldükçe hastalık tablosu ağırlaşır. Daha çok ılıman bölgelerde rotavirus enfeksiyonu genellikle endemik olup özellikle kış ayları boyunca görülür, tropikal bölgelerde ise rotavirus ishali yıl boyunca görülür. Bazen salgınlardan da sorumlu olabilir.

Rotavirus Reoviridae ailesi içinde rotavirus genomuna ait altı yapısal ve altı yapısal olmayan protein kodlayan 11 segmentli çift zincirli bir RNA genomuna sahiptir. Her segment bir protein kodlar, ancak 11. segment iki protein kodlar. Yapısal proteinler çift sarmallı RNA genomunu çevreleyen üç katmanlı kapsid yapısını oluşturur. Yapısal olmayan proteinler gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ve genom replikasyonunda görev alır.

Rotavirusun sınıflandırılmasında grup ayırımı yapılır. Rotavirusların A'dan G'ye kadar birçok grubu belirlenmiştir. İnsanlarda görülen rotavirus enfeksiyonlarının bir çoğuna grup A rotavirusları neden olur. Çalışma amaçlı olarak rotaviruslar serotip ve subgruplarına göre de ayrılır. Serotipler coğrafik olarak çeşitlilik gösterir (31, 32).

Virus vücuda girdikten sonra ince bağırsağın villus uçlarındaki enterositleri enfekte eder ve hücre sitoplazmasında kendini eşleyerek hücrede sürekli hasara yol açar. Bu hasarda vücutta dehidratasyona ve elektrolit kaybına neden olur (31).

Rotavirus tablosunu ve prevalansını gösteren pek çok çalışma hem dünyada hemde ülkemizde bir çok çalışma mevcuttur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda rotavirus enfeksiyonunu belirlemek için daha çok dışkılarından alınan örneklerden yapılan ELISA testleri ile rotavirus antijenlerinin belirlenmesi çalışmalarıdır. Aynı zamanda antijenlerin belirlenmesi için immunokromotografik yöntemler de kullanılmıştır. Bu yöntemlerle yapılan çalışmalarda rotavirus enfeksiyon sıklığının % 20 dolaylarında olduğu görülmüştür (33).

Dünyada her yıl rotavirus enfeksiyonuna bağlı 600.000 ölümden %80'den fazlası tıbbi bakımın zayıf olduğu gelişmekte olan Güney Asya ve Güney Afrika gibi ülkelerde görülürken, Avrupa'da yıl içerisinde rotavirus enfeksiyonuna bağlı 231 ölüm görülür bu sayı 14.000'de 1'e karşılık gelir. Gelişmekte olan ülkelerde ise bu

oran 250'de 1'dir. (34). Dünyada 5 yaş altındaki çocukların büyük bir kısmı rotavirus ile enfekte olur. Rotavirusun özellikle 2 yaş altındaki çocuklarda daha sık görülmesi dehidratasyon seyretmesi hastalığının mortalitesini arttırmaktadır. Rotavirus için ön tanı özellikle akut diareli 0-5 yaş arasında çocuk olmasıdır. Ancak bu sadece ön tanı için geçerlidir. Rotavirus A için tanı koyulabilmesi için dışkı örneklerinde ELISA yada immunokromotografik test yapılır. Rotavirusun P ve G genotiplerinin tespit edilebilmesi için polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR, G ve P genotipleme), poliakrilamid jel elektroforezi ve elektron mikroskopisi kullanılmaktadır. Tedavi için ise kaybedilen su ve elektrolitlerin yerine konulabilmesi için oral rehidrasyon yapılmaktadır. Oral rehidrasyon ilaçları kullanılmasına rağmen hastalık prevalansının azalmadığı durumlarda primer korunma için aşı uygulaması yapılmaktadır.

Hastalığın önlenmesi için en etkili korunma yöntemi aşılama değildir. Önlenme amaçlı aşı kullanımının önemli olması da rotavirus genotiplendirmesini önemli kılar. Rotavirus hastalığı, aşıyla önlenebilir bir hastalık olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür.

Özellikle 0-2 yaş arasındaki çocuklarda kullanılan aşının koruyuculuğunun yüksek olduğunu ancak yaşamın ilerleyen yıllarında bu koruyuculuğun etkisini yitirdiği gözlenmiştir. Virus için iki canlı oral rotavirus aşısı, DSÖ ön yeterliliğine sahiptir ve dünya çapında ticari olarak kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılan pentavalan bir insan-sığır reassortant aşısı olan RotaTeq® (Merck & Co., West Point, PA, ABD) ve bir insan monovalan aşısı olan Rotarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belçika) 100'den fazla ülkede lisanslıdır. Rota Teq® G1, G2, G3, G4 ve P1 içerir; G1 dışında etkinlik görece düşüktür. Rotarix™ G1, P1A[8] içerir ve P1A içeriği nedeniyle G1 dışındaki suşlara da etkilidir. Her iki aşı için de ilk doz 6-12 hafta arasında yapılmalı, iki doz arası en az 4 hafta olmalı, son doz 6 aya kadar yapılmalıdır (10).

Rotarix®(RV1), RotaTeq®(RV5) gibi aşılarda kullanıma girmesiyle Rotaviruse bağlı ishallerde yüksek gelirli ülkelerde daha fazla olmak üzere azalma görülmüştür (35, 36, 37). Ancak aşı etkinliği, aşırı parsiyel uygulayanlarda %62 iken tam uygulayanlarda %81 olarak bulunmuştur (38). Rotavac® ve RotaSIIL® gibi

aşılarda kullanımda olan diğer aşılardır (36). Bunların dışında protein bazlı aşı geliştirme çalışmaları da devam etmektedir (35).

Rotavirus enfeksiyon insidansı ile ilgili yapılan çalışmalardan rotavirus enfeksiyon sıklığının % 20 dolaylarında olduğu görülmüştür. Ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında rotavirus pozitiflik oranı en yüksek Altındiş ve arkadaşları 2016 yılında Afyon'da % 40 , en düşük oran ise Dereci ve arkadaşları 2014 yılında % 5,6 ile Rize ilinden bildirilmiştir (39, 40).

Özer ve arkadaşları ise Hatay ilinde yapmış oldukları çalışmada % 31,2 oran bildirmişlerdir (41).

Bunları takiben Malatya'da Bulut ve arkadaşları %21, Sivas'da Yalçın ve arkadaşları % 11 , Ordu'da Çalgın ve arkadaşları % 17 , Ankara'da yapılan iki çalışmada Yousefi Rad ve Gözalan %16.3 , Meral ve arkadaşları %21 , Konya'daki çalışmalarda ise İnci ve arkadaşları %21 , Tüzüner ve arkadaşları % 14,8 , Adana'da Tümgör ve arkadaşları %20.6 , Urfa'da Doğan ve arkadaşları % 12 , Kırıkkale'de Süzük ve arkadaşları % 16,65 , Sivas'ta Sümer ve arkadaşları %9.8 , Erzurum'da yapılan iki çalışmanın birinde Çelebi ve arkadaşları %24.4 diğerinde Balkan ve arkadaşları %25.8 oranında pozitiflik saptamışlardır (42-54).

2003-2005 yılında İstanbul'da yapılan çalışmada Nazik ve arkadaşları immunokromatografik yöntemle Rotavirus pozitifliğini %20.6 olarak belirlemişlerdir (55). Yine İstanbul'da yapılan farklı çalışmalarda İrvem ve arkadaşları % 21,7 , Bayraktar ve arkadaşları %23.7 değerleri bildirilmiştir (56, 57).

Kurugöl ve arkadaşları 2003 yılında İzmir'de akut gastroenterit sebebiyle hastaneye başvuran 5 yaş altı 920 çocuktan %39.8'inde rotavirus tespit etmiştir (58). Parashar ve arkadaşları 2008 yılında 0-5 yaş altı çocukların dahil edildiği dünya genelinde yapılan çalışmada 1,336 milyon çocuğun diyare nedeni ile hayatını kaybettiği açıklanmıştır. (59).

Ogilvie ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise en düşük pozitiflik oranının % 25 ile Yunanistan, en yüksek oranın ise % 63 ile Norveç olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında İsveç'de % 52, Portekiz'de % 45, Belçika'da % 44, İtalya'da % 44, Almanya'da % 43, Danimarka'da % 40, İspanya'da % 36, Fransa'da % 35, Ukrayna'da % 35 , Avusturya'da % 30, oranlarında rotavirus hastalığı bildirmişlerdir (60).

Portekiz’de Antunes ve arkadaşları 2007 yılında kış mevsiminde 424 numuneyi dahil ettikleri çalışmalarında rotavirus pozitifliğini %55.2 olarak tespit etmişlerdir (61).

Çin’de Sai ve arkadaşları 767 gaita örneği çalışmaya almışlardır. Bu örneklerin %34.3’ünde (263/767) rotavirus antijenine rastlamışlardır (62).

Mauritius’ta , Pursem ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 787 gaita örneği incelenmiş olup rotavirus pozitifliğini %41.6 tanımlanmıştır (63).

Malek ve arkadaşlarının Doğu Akdeniz bölgesinde inceledikleri 29 literatürde , % 23 oranında rotavirus pozitifliği tespit etmişlerdir. (64).

Toplam 341 hastanın dahil olduğu bizim çalışmamızda ise toplam örneklerin 79’unda (%23.16) rotavirus antijeni pozitif olduğu görülmüştür. Tüm bu literatürlerdeki değerlerle çalışmamızda elde ettiğimiz rotavirus pozitiflik değerlerini karşılaştırdığımızda Doğu Akdeniz bölgesinde elde edilen sonuçlarla büyük oranda benzerlik görülmüştür. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da bazı farklılıklar görülmüştür. Bu farklılıklar, coğrafik dağılım ,yıllar ve mevsimsel değişimler ,örneklerin toplanma zamanı, ve laboratuvar tanı yöntemlerinden kaynaklı olabilir.

Rotavirus hastalığının cinsiyet dağılımına bakıldığında Düzce’de Kızılırmak ve arkadaşlarının 1080 hastanın dahil edildiği çalışmada 650’si (%60,2) erkek, 430’u (%39,8) kız çocuklarından oluşmaktaydı. Pozitif hastaların cinsiyet dağılımı incelendiğinde anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür (65). Erzurum’da Balkan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise çalışmaya dahil edilen 340 hasta örneğinin 147’si (%43.2) kız , 193’ü (%56.8) erkek hastalardan oluşmaktaydı. Rotavirus pozitif olan 89 örneğin ise 32’si kız 57’si erkek hastalardan oluşmaktaydı (54). Balıkesir’de Şafak ve arkadaşlarının Eylül 2011-Mayıs 2013 tarihleri yapmış olduğu çalışmada 0-6 yaş arasındaki 986 dışkı örneği dahil edilmiş örneklerin 568’i erkek, 418’i kız çocuktan elde edilmiştir (66). Ankara’da Şimşek ve arkadaşlarının Ocak 2004-Aralık 2005 tarihleri arasında yapmış oldukları çalışmada 127 numune dahil edilmiş olup dahil edilen örneklerin 68’i (%53.5) erkek, 59’u (%46.5) kız hastalardan oluşmaktaydı. Antijen pozitif olguların 21’i (%55.8) erkek, 16’sı (%44.2) kız hastalardan oluşmaktaydı (67). İstanbul’da İrvem ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada kızlarda %39,8, erkeklerde %60,2 oranında rotavirus hastalığı

bildirilmiştir (56). Yapılan çalışmalarda istatistiksel olarak cinsiyet açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

Bizim çalışmamızda rotavirus pozitif 79 numunenin 41'i (%51) kız, 38'i (%49) erkek çocuklardan oluşmaktaydı. Cinsiyet farklılığı açısından Rotavirus pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmedi.

Rotavirus enfeksiyonu ile daha çok 0-2 yaş arası olmakla birlikte her yaşta karşı karşıya görülebilmektedir. Rotavirus enfeksiyonları daha hafif ya da asemptomatik olarak atlatılabilmektedir. Semptomlar yaşın artmasıyla beraber azalmaktadır.

Ramsay ve Brown yaptıkları araştırmalarda, enfeksiyonların semptom oranlarını daha çok iki yaşın altındaki çocuklarda olduğunu saptamışlardır. (68).

Altındış ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada en yüksek olarak sırasıyla 1-2 yaş grubu (%42.9), 0-1 yaş grubu (%21.4), 2-3 yaş grubunda (%14.3) görülmüştür. 3-4 ve 4-5 yaş grubunda ise %7.1 oranında görülmüştür (69).

Bayraktar ve arkadaşlarının akut gastroenteriti olan çocuklardan toplanan 1358 dışkı örneğinden yaptıkları çalışmada pozitif bulguların % 51'nin 0-2 yaş arası çocuklardan oluştuğunu bildirmişlerdir (57).

Bulut ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada akut gastroenteritli çocuklarda 250 dışkı örneğinde en yüksek pozitifliğin % 33 oranla 0-1 yaş arası çocuklarda olduğunu bildirmişlerdir (42).

İrvem ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada en yüksek oranı da yine 0-1 yaş grubu oluşturmuş (%47.8), bunu %39.4 oranla 1-2 yaş grubu takip etmiştir (56).

Kızılırmak ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada hastaların yaşlarına göre rotavirus pozitiflik oranları incelendiğinde 0-1 yaş (% 27), 1-2 yaş (%21.1), 2-3 yaş (%12.3) 3-4 yaş (%19.2), 4-5 yaş (%21.9) şeklinde oranlar gözlemlenmiştir (65).

Şafak ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada rotavirus pozitifliği, 0-12 aylık çocuklarda (35/350) %10, 13-24 aylık çocuklarda (38/231) %16.4, 25-36 aylık çocuklarda (23/106) %21.7, 37-48 aylık çocuklarda (11/55) %20, 49- 60 aylık çocuklarda (6/46) %13 ve >60 aylık çocuklarda (198) %6.6 olarak saptanmıştır (66).

Şimşek ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada rotavirus pozitif olguların yaş gruplarına göre dağılımı sırasıyla 0-12 ay arasında 26 (%70.3) , 13-24 ay 6 (%16.2), 25-36 ay 3 (%8.1), 37-48 ay 0, 49-60 ay 2 (%5.4) olarak saptanmıştır (67).

İstanbul, Ankara, İzmir ve Adana'da yapılan çok merkezli bir çalışmada 2005-2006 yıllarında diyare sebebiyle hastaneye yatırılan beş yaş altı çocukların yarısından fazlasında (%57) rotavirus tespit edilmiştir (70).

Van Damme ve arkadaşlarının yedi Avrupa ülkesinde yapmış oldukları çalışmada da rotavirus pozitiflik oranını en yüksek 13-23 ay aralığında olduğunu saptamışlardır (71).

Bahreyn'de Musawi ve arkadaşları 0-5 yaş arası çocuklardan topladıkları numunelerle yaptıkları çalışmada enfeksiyonun %76.6'sının 6-23 aylık çocuklarda görüldüğünü bildirmişlerdir (72).

Kore'de Kim ve arkadaşları da rotavirus enfeksiyonunun pik yaptığı yaş grubunu 13-24 aylık çocuklar olarak bildirmişler ve vakaların %94'ünün de 0-3 yaş arasındaki çocuklardan oluştuğunu belirtmişlerdir (73).

Bizim çalışmamızda da hastaların yarısından çoğu (%51) 0-2 yaş grubundaydı. Rotavirus pozitif olguların yaş gruplarına göre dağılımı 0-1 yaş %31.4, 1-2 yaş %19.6 şeklinde saptanmıştır.

Rotavirus enfeksiyonunu mevsimsel dağılımı araştırıldığında, ılıman bölgelerde genellikle endemik olup özellikle kış ayları boyunca görülür, tropikal bölgelerde ise rotavirus ishali yıl boyunca görülür. (74).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda rotavirus enfeksiyonunun mevsimsel dağılımı ile ilgili olarak İstanbul'da Nazik ve arkadaşlarının çalışmasında pozitiflik oranının en sık görüldüğü Mart ayında %35.7 olduğu saptanmış olup toplam vakaların daha çok kış mevsiminde ortaya çıktığını tespit etmişlerdir (55).

İstanbul'da Bayraktar ve arkadaşlarının çalışmasında vakaların daha çok kış ve ilkbaharda arttığını gözlemlemişlerdir (57). Malatya'da Bulut ve arkadaşlarının çalışmasında vakaların daha sık kış aylarında (%40) olduğunu saptamışlardır (42).

Ankara'da Yousefi Rad ve Gözalan 'ın çalışmasında daha çok kış aylarında rastlandığı görülmüştür (45). Düzce'de Kızılırmak ve arkadaşları rotavirusun

görülme sıklığının kış ve ilkbahar mevsimlerindeki görülme oranı , sonbahar ve yaz mevsimlerinde görülme oranından belirgin şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir (65).

Erzurum'da Balkan ve arkadaşlarının çalışmasında mevsimsel dağılım oranları ise en çok kış ve ilkbaharda görülürken , sonbahar ve yaz mevsiminde daha nadir görülmüştür (54). Balıkesir'de Şafak ve arkadaşlarının çalışmasında rotavirus antijeni pozitif olgu sayısında kış (%15.65; 53/338) ve ilkbahar (%15.2; 56/369) başında bir artış izlenmiş ve pozitif olgulara en sık Şubat ve Mart ayında rastlanmıştır (66). Ankara'da Şimşek ve arkadaşlarının çalışmasında mevsimsel dağılım yönünden ise rotavirus pozitifliği en sık sonbaharda 20 örnekte (%54.1) görülürken, kışın 7 örnekte (%18.9), ilkbaharda 2 örnekte (%5.4), ve yazın 8 örnekte (%21.6) saptanmıştır (67).

Ankara'da Karadağ ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada rotavirus pozitifliğini en yüksek Aralık ayında %55.4 oranında bulmuşlardır. (75).

Afyon'da Altındiş ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarında olgu sayısı kış mevsiminde artış gösterirken en çok vaka Şubat ayında görülmüş olup sonrasında ise azalmaya başlamış yaz aylarında hiçbir vakada rotavirus pozitifliği tespit edilmemiştir (76).

Rotavirus pozitif vakalara Ordu'da Çalgın ve arkadaşlarının çalışmasında ilkbahar , Hatay'da Özer ve arkadaşlarının çalışmasında kış , Ankara'da Oğuz ve arkadaşlarının çalışmasında kış, Konya'da Tüzüner ve arkadaşlarının çalışmasında da kış mevsiminde daha sık rastlanmıştır (44, 41, 77, 48).

Yurt dışı çalışmalarında da benzer sonuçlara rastlanmıştır. Pakistan'da Umair ve arkadaşlarının çalışmasında rotavirus enfeksiyonu yıl boyunca daha sık Ocak-Mart ve Kasım-Aralık aylarında görülmüştür (78). Doğu Akdeniz bölgesinde Malek ve arkadaşlarının bildirdiği 43 çalışmadan 29'unun , %67.4 oranla soğuk mevsimlerde daha sık olduğu tespit edilmiştir (64).

Hindistan'da Mohanty ve arkadaşlarının çalışmasında rotavirus enfeksiyon sıklığının kış mevsimindeki oranının (%66.9) , yaz mevsimine (%45.45) ve yağışlı mevsimlere (%45.32) kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur (79).

Çalışmamız süresince rotavirus pozitifliği en yüksek kış ve ilkbahar mevsiminde görülmüş olup rotavirus pozitiflik oranı sırasıyla %42 ve %33 olup en çok vaka Şubat ayına aitti. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler , ülkemizdeki çalışma verileri ve dünyadaki diğer verilerle uyumlu olduğu görülmüştür.

Rotavirus serotiplerinin ülkelere ve bölgelere göre dağılımlarının bilinmesi rotavirusa bağlı oluşabilecek mortalitenin azaltılmasında önemli rol oynar. Aynı zamanda serotip ve subgrupların bilinmesi aşılama stratejileri açısından da önem taşımaktadır (80, 71).

Rotavirus iki farklı mekanizma ile çeşitlilik göstermektedir. Rotavirusun nokta mutasyonları farklı mutantların ortaya çıkmasına neden olur. Rotavirusun iki farklı suşunun bir hücreyi enfekte etmesiyle rotavirusun gen segmentlerinin değişmesi sonucu reassortant virus oluşabilir. Rotavirusun reassortment özelliği daha önce hiç görülmemiş antijenik yapısı farklı yeni rotavirus genotiplerinin ortaya çıkmasına sebep olur buda aşı çalışması ve geliştirilmesi için çok önemlidir. Dünyadaki hemen hemen bütün rotavirus suşlarına ait G1, G3, G4 ve G9 serotipleri tercihen P[8] ile ilişkili olmasına rağmen G2 serotip suşları daha çok P[4] genotipi ile ilişkilidir.

Dünya çapında yapılan araştırmalara göre grup A rotavirusunun sebep olduğu akut gastroenteriti olan çocuklardan izole edilen G1-G4 ve P1A[8] ve P1B[4] (G2P[4], G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8]) en sık görülen G ve P genotip kombinasyonlarıdır. Bu kombinasyonların baskın genotipleri yıldan yıla ve farklı coğrafik bölgelerde değişkenlik gösterebilmektedir. Avrupa , Kuzey Amerika, ve Avustralya'da 1973-2003 yıllarında yapılan çalışmalarda toplanan rotavirus örneklerinde enfeksiyonların yaklaşık %90' ında G1-G4, P1A[8] ve P1B[4] genotiplerinin neden olduğu gösterilmiştir. Bu genotipler aynı zamanda gelişmiş olan Güney Amerika ve Asya ülkelerinde %68 ve gelişmekte olan Afrika'da % 50 oranında gösterilmiştir. Avrupa'da yapılan çalışmalarda 2004-2005 yıllarında rotavirus vakalarının %98'den fazlasını G1, G2, G3, G4, ve G9 genotiplerinin oluşturduğu gösterilmiştir. Rotavirus G ve P genotiplerinin dünya genelinde dağılımıyla ilgili olarak 1989-2004 yılları arasında 52 ülkede yapılan 124 çalışmanın

verileri sonuçları G1P[8] genotipinin Avrupa , Kuzey Amerika, ve Avusturalya’da tespit edilen suşların %70’inden fazlasını oluşturduğunu , Güney Amerika ve Asya’da ise bu genotipin tespit edilen suşların yalnızca %30’nu oluşturduğunu göstermektedir (81, 82).

Bir ülke genelinde baskın olan suşların yıldan yıla da değişiklik yaptığı gözlenmiştir. Yoshinaga ve arkadaşlarının Japonya’da yaptığı çalışmalarda 2000-2003 yılları arasında beş farklı bölgede akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus grup A enfeksiyonunun insidansını belirlemişlerdir. Bu çalışmada rotavirus genotiplerine göre karakterizasyonunu tespit ederek gruplar arasındaki genetik farklılıkları tanımlamışlardır. Çalışma sonucunda 2000-2001 yılları arasında en yüksek prevalansı sırasıyla G1 %45.5, G2 %32.5, G3 %12,3 ve G4 %2.6 oluştururken G9’u yalnızca 9 (%5.9) vakada tespit ettiklerini ancak 2001-2002 yılları arasında ise bu oranların değişerek baskın suş olarak G2 tipini %40, ardından G1 tipini %20 oranında bulduklarını belirtmişlerdir. G9 oranı ise %17.8’e yükselmiştir.

Yine Japonya’da 2002-2003 yılları arasında da G tiplerinden G3 %34 ve G4 %28 oranında tespit edilmiştir. Önceki yıllarda çok yüksek bulunan G1 %6 ve G2 ise %5.2 oranında tespit edilerek hızla bir düşüş olduğu görülmüştür. Yine 2000 yılından önce Avrupa’da en yaygın G1 iken 2005 yılında pek çok Avrupa ülkesinde dışkı örneklerinin %50’sinden fazlasında G9 baskın olarak bulunmuştur (83).

Mauritius’ta , Pursem ve arkadaşları tarafından yapılan genotip çalışmasında 2008, 2009 ve 2010 yıllarında sırasıyla G3P[8] %89, G4P[8] %76, G1P[8] %90 gibi bir oranla en çok görülen genotip kombinasyonları olduğunu belirlemişlerdir (63).

Tcheremenskaia ve arkadaşları 2004-2006 yılları arasında Roma, Çek Cumhuriyeti, Slovenya, Hırvatistan, Arnavutluk ve Bulgaristan’da hastanede yatan ve kliniklere başvuran akut gastroenteriti olan çocuklarda rotavirus insidansını ve rotavirus genotiplerinin dağılımındaki coğrafik farklılıkları araştırdıkları çalışmada toplamda 1500 rotavirus pozitif dışkı örneğinde RT nested PCR ile G ve P genotipleri belirlemiştir. Çalışmalarının sonucunda katılan ülkeler arasında rotavirus genotiplerinin dağılımında coğrafik olarak önemli farklılıklar bulunmuştur. En yaygın genotip kombinasyonları olarak G1P[8], G3P[8], G4P[8] ve G2P[4] %50-85 arasında değişen oranlarda tespit edilmiştir. G9 genotipi % 2-35 oranları arasındadır. G1 veya G4 ile P[4] ve G2 ve P[8] arasında oluşan kombinasyonlar hastaların %3-

20'sinde görülen ve muhtemelen reassortment sonucu oluşan az görülen kombinasyonlar olarak bildirilmiştir. Daha seyrek görülen genotipler olarak belirlenen G8P[8] ve G10P[6] suşlarının muhtemelen hayvan orjinli olabileceği sonucuna varmışlardır. İki rotavirus suşu ile meydana gelen miks enfeksiyonlar çalışılan hastaların %1.7-14'ünü oluşturmuştur (84).

Pakistan'da Umair ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 5 yaş altı çocuklardan 502 dışkı örneğini rotavirus varlığını ve genotip çeşitliliğini araştırmak amacıyla toplamıştır. Toplanan örneklerden 147 hastada rotavirus tespit etmişlerdir. Tespit edilen pozitif hastalardan yapılan genotiplerden en sık görülen G tipi prevalansı sırasıyla G1 %23.6 (31/131), G3 %22.9 (30/131), G12 %19.8 (26/131), G2 %19.08 (25/131) ve G9 %9.9 (13/131)'dir. Toplanan örneklerden 6 örnekte (%4.58) G genotipe ait koenfeksiyon tespit edilmiştir. En sık görülen P tipi sırasıyla P[8] %41.2 (54/131), P[6] %29 (38/113) ve P[4] %28.24 (37/131) tespit edilmiştir. Toplamda iki örnekte (%1.52) P tipi koenfeksiyon gözlenmiştir. Toplam 22 farklı G-P kombinasyonu bulunmuştur. En baskın görülen genotip kombinasyonu %17.55 ile G3P[8] olup bunu %16.7 ile G12P[6] (22/131), %15.2 ile G2P[4] (20/131) ve %14.5 ile G1P[8] (19/131) takip etmektedir. Her bir kombinasyondan bir vakada bulunmak üzere örneklerin %5.3'ünde G1P[6] (6/131) ve G9P[8] (7/131) bulunmuştur. 8 örnekte rotavirus G-P koenfeksiyonu gözlenmiştir (78).

Amerika'da Santos ve Hoshino, Avrupa, Asya, Afrika, ve Avustralya'da yer alan dünyanın 52 ülkesinde yapılan çalışmalarını değerlendirdikleri çalışmalarında 1989-2004 yılları arasında tüm dünyada % 88 oranıyla en yaygın genotiplerin P[8] ya da P[4] ile kombine olan G1, G2, G3 ve G4 olduğunu; ayrıca yine P[8] ya da P[4] ile kombine olan G9 viruslerinin %4.1 oranıyla küresel bir öneme sahip olduğunu rapor etmişlerdir (80).

Amerika'da Detroit'de Abdel-Haq ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise 100 çocuktan toplanan dışkı örneklerinde, rotavirus pozitif olan örneklerden G ve P genotiplemesini RT-PCR testi ve nükleotit dizi analizi ile belirlemişlerdir. G genotiplerinden en sık rastlanan sırasıyla ; G1 (%73), G4 (%17.4), G9 (%6.3) ve G2 (%2.8) tespit edilmiştir. En sık rastlanan P genotipleri ise sırasıyla; P[4] (%71) ve P[8] (%29) olarak gözlenmişlerdir. En yaygın genotip kombinasyonları ise sırasıyla G1[P4] (%41), 1[P8] (%16) ve G4[P4] (%14) bulunmuştur. Örneklerin %20'sinde

birden fazla G genotipi olduğunu ve bunlardan 7 tanesinin G1/G9, 3'ünün G1/G2 ve 2'sinin G1/G4 olduğunu bildirmişlerdir. Buldukları bütün miks enfeksiyonlarda G1 genotipi tespit edilmiştir (85).

Çin'de Yang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 322 dışkı örneği çalışmaya dahil edilmiş örneklerin 101'inde (%31.4) rotavirus tespit edilmiştir. Çalışılan 101 rotavirus pozitif örneğin G tiplerinden en sık rastlanan ; 67 örnekte G3 (%66.3), 19'unda G1 (%18.8), 8'inde G1 ve G3 miks enfeksiyon (%7.9), 2'sinde G9 (%2) , 1'inde G4 (%1) ve olarak bulunmuş ve 4 örnek (%4) tiplendirilememiştir. Her iki G ve P tipleri 91 örnekte belirlenebilmişve 6 farklı kombinasyon elde edilmiştir En yaygın rotavirus genotipleri sırasıyla G3P[8] (%62.6) , G1P[8] (17.6%), G1+G3P[8] (8.8%), G3P[4] (6.6%), G1P[4] (2.2%) ve G9P[8] (2.2%) olarak belirlemişlerdir (86).

Durmaz ve arkadaşları yaptıkları sürveyans çalışmalarında Türkiye genelinde bulunan rotavirus G ve P genotipleri için temel veriler elde etmeyi amaçlamışlardır. Çalışmalarına 2012-2014 yılları arasında 23 ilde bulunan 54 hastanede toplanan örnekleri dahil etmişlerdir. Rotavirus antijeni latex aglütinasyon, immunokromotografik test ve enzim immünassay testiyle pozitif bulunan, 5 yaş altı çocuklardan elde edilen 2102 örnek bu çalışmaya dahil edilmiştir. Rotavirus pozitifliği en sık 13-24 ay yaş grubunda bildirilmiştir. En yaygın G tipleri (%95.1) G1, G2, G3 ve G9, en yaygın P tipleri (%98.8) ise P[8] ve P[4] olarak bulunmuştur. En yaygın G/P kombinasyonu G9P[8] (%40.5) ve G1P[8] (21.6%) olarak bildirilmiştir (89).

Türkiye verilerinin gözden geçirildiği başka bir çalışmada ise 5 yaş altı Rotavirus saptama oranı %31.8 olarak bildirilmiştir. En yaygın genotiplerin ise G9[P8], 25%; G1[P8], 22%; olduğu görülmüştür (90).

Afyon ilinde yapılan çalışmada Altındış ve arkadaşlarının RT PCR ile çalışılan 95 dışkı örneğinin 15'i (%15.8) rotavirus pozitif olarak belirlenmiştir. En yaygın G genotipi G9 (%65) olup diğer G genotipleri sırasıyla G1 (%22), G2 (%10), G4 (%1), G8 (%1) ve G10 (%0.5) şeklindedir. P genotipleri ise sırasıyla %81 P[8], %19 P[4] olarak belirlenmiştir. En sık görülen G ve P kombinasyonları; G9P[8] (%52), G1P[8] (%18), G9P[4] (%13) olup, diğerleri (%13) G1P[4], G2P[8], G4P[4], G4P[8], G2P[4], G1G9P[4], G10P[8], G2G9P[8]'dir (76).

Kurugöl ve arkadaşları 2003 yılında İzmir’de akut gastroenterit sebebiyle hastaneye başvuran 5 yaş altı 920 çocuktan %39.8’inde rotavirus tespit etmiştir. Tespit edilen suşların %91’inin genotip G1-4 olduğu ve en sık oranla G1 genotipini %75.1 bunu takiben G4 genotipini %6.3, G3 genotipini %3 ve G2 genotipini ise %0.8 olduğunu belirtmişlerdir (58).

Çataloluk ve arkadaşları ise 2005 yılında Gaziantep’te yaptıkları çalışmada akut gastroenteritli 508 çocukta en sık G4P[8] genotipini saptamışlardır ve G4P[8] (%42.2), G1P[8] (%26.6), G2P[4] (%3.1) ve G3P[8] (%1.5) genotiplerinin rotavirus diarelerinin %73.4’üne sebep olduğu belirtilmiştir. G9P[8] genotipi ise örneklerin %3.2’sinde bulunmuştur. Miks enfeksiyonlara %7.3 oranında rastlanmıştır (87).

Bozdayı ve arkadaşlarının Eylül 2004-Aralık 2005 yılları arasında Ankara’da yaptıkları çalışmada ise en baskın genotiplerin G1P[8] (%55.5) ve G9P[8] (%10.1) , G9P[6] olduğunu gözlenmiştir. Miks genotipler enfeksiyonların %2.4’üne sebep bulunmuştur (88).

Ankara’da yapılan başka bir çalışmada Meral ve arkadaşları, Nisan 2009 - Şubat 2010 tarihleri arasında akut gastroenterit şikâyeti ile hastaneye başvuran 0-5 yaş arasındaki çocuklarda en baskın G genotipi olarak sırasıyla G3, G4 ve G1 olarak, en baskın P genotipi olarak sırasıyla P[8], P[6], P[9] ve en yaygın P/G genotip kombinasyonu olarak ise G3P[8], G2P[8], G4P[8] olarak bulmuşlardır (91). Yine Ankara’da Şimşek ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada 0-5 yaş grubu 127 numune dahil edilmiş olup, rotavirus pozitif olgularda yapılan genotiplendirme sonucunda 30 (%81) olguda G1-4 genotip pozitifliği belirlenmiştir. En sık bulunan genotip 26 (%86.0) olguyla G1 olmak üzere, G2 1 (%3.3), G3 1 (%3.3), G4 2 (%6.6) olguda pozitif olarak saptanmıştır. Olguların 7’sinde (%18.9) genotip belirlenememiştir (67).

Bizim çalışmamızda Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesine akut gastroenterit şikayetiyle başvuran 0-15 yaş grubu arasında toplanan örneklerden rotavirus pozitif olan 79 hastaya rastlanılmıştır. 79 numune üzerinde yapılan RT-PCR’la genotip analizi yapılan 79 numuneden 39’unda G genotipi tespit edilemedi. Tespit edilen 40 numunenin G genotiplerinin dağılımı ise şöyledir; G2, 21(%52,5); G1, 11(%27,5); G9, 5 (%12,5); G3, 2(%5); G4, 1 (%2,5). G genotipi için elde ettiğimiz bulgularımızı

Dünya’da ve Türkiye’de yapılan çalışmalarla karşılaştığımızda, en yüksek benzerlik oranına Yoshinaga ve arkadaşlarının 2001-2002 yılında elde etmiş olduğu verilerde (G2 (%40)) rastlanmıştır. Durmaz ve arkadaşlarının verilerinde ise en sık rastlanan genotipler arasında yine G1, G2, G3 ve G9 genotiplerine rastlanmıştır. Buda bizim çalışmamızda elde ettiğimiz G genotipleri ile benzerlik göstermektedir. Yine çalışmamızda genotip analizi yapılan 79 numuneden 26’sında P genotipi tespit edilemedi. Tespit edilen 53 numunenin P genotiplerin dağılımı ise şöyledi; P4, 44(%83,0); P9, 8(%15,1); P10, 1(%1,9). Elde edilen bu bulgular değerlendirildiğinde en sık rastlanan genotiplerden olan P4 genotipi bizim çalışmamızda da en sık rastlanan genotip olup yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür.

G ve P genotipinin birlikte tespit edildiği 25 numunenin dağılımına bakıldığında; % 44 oranla 11 numunede G1P[4], %20 oranla 5’er numunede G2P [9] ve G9P [4], %8 oranla 2 numunede G2P [4], %4 oranla 1’er numunede G3P [10] ve G4P [4] en çok tespit edilen G/P kombinasyonları olduğu gözlenmiştir. Genotip dağılımı ve kombinasyonları Ülkemizde ve tüm Dünya’da yapılan çalışmalara bakıldığında yıldan yıl, mevsimden mevsime ve coğrafik olarak farklılıklar içerdiği gözlenmiştir. Bizim çalışmamızla da diğer veriler karşılaştırıldığında tek başına G genotipinin ve P genotipinin benzerlik gösterdiği sürveyans çalışmalara rastlanmış olup farklılıkların olduğu da görülmüştür. Bu sonucun mevsimsel ve coğrafik farklılık olabileceği gibi aşı çalışmalarının etkilerinden kaynaklı olduğu da düşünülmüştür.

Grafik 4’ ten görüleceği üzere 9 farklı G2 örneğinin erime eğrisinin tepe noktaları farklı sıcaklıklarda görülmektedir. Bu sonucun ortaya çıkması VP7 geninin G2 bölgesinin polimorfik olmasından kaynaklanmaktadır. Sonuçlardan anlaşılacağı üzere G1, G3, G4 ve G9 Rotavirus tiplerini HRM analizini kullanarak tespit edip ayırmak mümkün iken G2 bölgesindeki polimorfizmden dolayı G2 tip Rotavirus diğer tip Rotavirus ile aynı erime analizi sonucu verdiğiinden tespit edilip ayırım yapılamaz. Bu sonuçlar doğrultusunda G2 tip Rotavirus G1, G3, G4 ve G9 ile aynı erime eğrisi sonucu verebileceğinden Rotavirus G genotiplendirmesinde G2 tipini hedefleyen primer kullanılırsa G genotiplendirme için HRM analizini kullanmak uygun değildir.

Grafik 8' den görüleceği üzere 16 farklı P4 ve P9 genotipindeki örneklerin erime eğrilerinin tepe noktaları farklı sıcaklıklarda görülmektedir. Bu sonucun ortaya çıkması VP4 geninin P4 ve P9 bölgelerinin polimorfik olmasından kaynaklanmaktadır. Elde edilen HRM sonuçlarından Rotavirus P4 ve P9 aynı gruplarda bulunabileceklerinden ve hem birbirleriyle ve Rotavirus G10 genotipi ile aynı erime eğrisi sonucu verebileceklerinden dolayı HRM analizi ile P genotiplendirmesi mümkün değildir.

Adenovirus için ; Çolak ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada 180 dışkı örneğinde AdV antijeni aranmıştır. İmmunokromotografik test ile % 5, enzim immunassay ile %6.1 pozitiflik tespit edilmiştir. Vakaların dağılımında yaş, cinsiyet ve mevsimsel farklılık bildirilmemiştir (92).

Aktaş ve arkadaşlarının 0-5 yaş ishali çocuklarda PCR yöntemiyle dışkıda AdV pozitifliğini %9.6 olarak bildirmiştir (93).

Özsarı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1154 gastroenteritli hastanın dışkı örneğinde immunokromotografik yöntemle %7.5 oranında AdV antijeni tespit edilmiştir. Mevsimsel farklılık görülmesi de yaş grubuna bakıldığında vakaların yarısından çoğunun 0-2 yaş grubunda olduğu bildirilmiştir (94).

Çelik ve arkadaşlarının akut gastroenteritli 5 yaş altı çocuklardan elde edilen 4702 dışkı örneğinin %2.4'ünde AdV antijeni pozitifliği bildirilmiştir. AdV enfeksiyonu ile hava koşullarındaki değişiklik arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bildirilmemiştir (95).

Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada ishali hastaların dışkısında %5.8 oranında AdV antijeni pozitif bulunmuştur (96).

Ülkemiz dışındaki verilere baktığımızda Subsaharan Afrika bölgesinde 5 yaş altı gastroenteritli hastalarda yapılan çok sayıda çalışmayı içeren bir meta-analizde AdV pozitiflik oranı %10.8 olarak bildirilmiştir (97). Multipleks tarama testinin kullanıldığı, 14 çalışmadaki 17815 gastroenteritli hastanın sonuçlarına göre AdV pozitiflik oranı %3.8 olarak bildirilmiştir (98). Farklı çalışmalarda gastroenterit etkeni en sık görülen AdV genotipi AdV40 ve AdV41 olarak bildirilmiştir (99, 100, 101, 30). Ülkemizde de gastroenterite etkeni AdVün en sık görülen genotipleri %88 oranında AdV40 ve AdV41 olarak bildirilse de AdV31, AdV7 gibi başka genotiplerin görülebileceği de bildirilmiştir (92).

Çalışmamızda 44 hastada (%12,9) dışkıda AdV antijeni pozitif bulundu. Ülkemizden bildirilen çalışmalarla karşılaştırıldığında daha yüksek pozitiflik saptanmıştır. Ancak kullandığımız kit ile AdV40 ve AdV41'i tespit edilmiştir. Diğer genotiplerin de gastroenterit yaptığı bilindiğinden bu oranın biraz daha yüksek olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda bildirilen çalışmalara paralel olarak çocuk yaş grubunda sık pozitiflik tespit edilmiştir.

Norovirus için ; Altay ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada 1000 dışkı örneğinde Norovirus antijeni aranmıştır. ELISA yöntemiyle ile %14.1 pozitiflik tespit edilmiştir. Yaş ve cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bildirilmemiştir (102).

Timurkan ve arkadaşları PCR yöntemiyle 427 numunede Norovirus varlığını araştırmış ve %20.1 pozitiflik bildirmiştir (103).

Çöl ve arkadaşları yaptığı çalışmada gastroenteritli 520 hastanın dışkısında immunokromotografi ve/veya PCR ile Norovirus varlığını %9.6 olarak bildirmiştir. Yaş gruplarına bakıldığında en sık 0-2 yaş grubunda pozitiflik tespit edildiği bildirilmiştir (104). Özkul ve arkadaşları ise 238 örneği ELISA ve PCR yöntemiyle incelemiş %15.1 pozitiflik tespit etmiştir (105). Altındış ve ark. yaptığı çalışmada PCR yöntemiyle %17 oranında Norovirus pozitif dışkı örneği tespit etmiştir (106).

Birçok çalışmanın 1995-2015 yılları arasındaki verilerinin gözden geçirildiği bir çalışmada Norovirus insidansı tahminleri, 1000 kişi-yılı başına 0.024 vaka ve 1000 kişi-yılı başına 60 vaka arasında değişmekteydi (107). Küresel olarak, her yıl Norovirus sağlık sistemi maliyeti toplam 4,2 milyar \$ ve toplumsal maliyeti 60,3 milyar \$ olarak bildirilmiştir (108).

Nguyen ve arkadaşları gelişmekte olan ülkelerde yapılmış, 148,867 hastayı içeren 178 çalışmayı gözden geçirmiş Norovirus görülme sıklığını %17 olarak tespit etmiştir. Üst-orta gelirli ülkelerde %18, alt-orta gelirli ülkelerde %15 ve alt gelirli ülkelerde %6 olmak üzere gelir seviyesinin düşmesiyle paralel olarak bu oranın azaldığı bildirilmiştir (109).

Çin için 2015 yılında tahmini Norovirus insidansı, 5 yaşından küçük çocuklarda yılda 100 çocukta 15.6 ile tüm nüfus için ise yılda 100 kişi başına 6.0'a

olarak bildirilmiştir (110). Avrupa Birliği'ne bağlı ülkelerdeki çocuklarda Norovirus hastalık yükü araştırılmış ve bunun için 12 çalışmanın verileri dahil edilmiştir. Gastroenteritli hastaların dışkıında Norovirus tespit oranı %5-30 arasında bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre Avrupa Birliği ülkelerinde her yıl 5,7 milyona kadar hastalık, 800,000 hastaneye başvuru, 53,000 hastaneye yatış ve 5 yaş altı çocuklarda 102 ölüme neden olduğu tahmin edilmiştir. Avrupa Birliğinde RV aşıları yaygınlaştıkça Norovirusün göreceli olarak öneminin artacağı bildirilmiştir (111).

Çalışmamızda 341 hastanın 25'inde (%7,3) norovirus antijeni ELISA testi ile pozitif bulunmuştur. Ülkemiz verileri ile karşılaştırıldığında daha düşük pozitiflik saptanmıştır. Bazı Avrupa ülkeleri ise benzer oranda pozitiflik tespit edilse de pozitiflik oranımız düşük bulunmuştur. Duyarlılığı daha yüksek olan PCR yönteminin gerçek pozitiflik oranlarını yakalamamıza yardımcı olabileceği düşünülmüştür. Kış kusması hastalığı olarak da adlandırılan Noroviruse bağlı gastroenteritler, bölgemizde en sık %44 oranıyla Mart ayında görülmüştür. Her yaş grubunda görülmesine rağmen, çalışmamızda bildirilen diğer çalışmalara paralel olarak çocuk yaş grubunda sık pozitiflik tespit edilmiştir.

5. SONUÇ

Yeniden enfeksiyon geçirildiğinde hastalığın şiddetini azalatacak koruyucu bağışıklığın gelişmesi için hastalığın geçirilmesi veya aşı olunması gerekmektedir. Bağışıklığı sağlamak, oral rotavirus aşısı geliştirmenin temelini oluşturmaktadır. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı rutin aşı takviminde Rotavirus aşısı yer almamaktadır. Ülkemizde bulunan ve isteğe bağlı olarak uygulanan Rota Teq® ve Rotarix™ olmak üzere 2 Rotavirus aşısı bulunmaktadır. Bunlardan Rota Teq® ülkemiz ve bölgemizde görülen genotipleri en geniş olarak kapsayan aşı olarak görülmektedir. Bölgemizde rastlanan Rotavirus genotiplerini %87.5 oranında kapsamaktadır. Bölgemizdeki tüm genotipleri kapsayan G1, G2, G3, G4, G9 içeren ROTASIIL® aşısı ise ülkemizde bulunmamaktadır. Genotiplerin ülke ve bölgelere göre değişkenlik göstermesi nedeniyle RV hastalığının mevcut yükünü artırma potansiyeline sahip suşların ortaya çıkışı sürekli olarak izlenmelidir.

6. KAYNAKLAR

- 1) Stuempfig ND, Seroy J. Viral Gastroenteritis. [Updated 2020 Nov 19]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518995/>
- 2) Bányai K, Estes MK, Martella V, Parashar UD. Viral gastroenteritis. *Lancet*. 2018 Jul 14;392(10142):175-186. doi: 10.1016/S0140-6736(26)31128-0.
- 3) Desselberger U. Viral gastroenteritis. *Medicine (Abingdon)*. 2017 Nov;45(24):690-694. doi: 10.1016/j.mpmed.2017.08.005.
- 4) Anita Kambhampati, Daniel C. Payne, Veronica Costantini, and Benjamin A. Lopman. Host Genetic Susceptibility to Enteric Viruses: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clin Infect Dis*. 2016 January 1; 62(1): 11–18. doi:10.1093/cid/civ873.
- 5) Liao Y, Xue L, Gao J, Wu A, Kou X. ABO blood group-associated susceptibility to norovirus infection: A systematic review and meta-analysis. *Infect Genet Evol*. 2020 Jul; 81:104245. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104245.
- 6) Sadiq A, Bostan N, Yinda KC, Naseem S, Sattar S. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Rev Med Virol*. 2018 Nov;28(6):e2003. doi: 10.1002/rmv.2003.
- 7) LeClair CE, Budh DP. Rotavirus. [Updated 2020 Nov 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558951>.
- 8) Özlem Özgür Gündeşlioğlu, Emine Kocabaş, Zeliha Haytoğlu, Gülperi Timurtaş Dayar, Merve Kılıç Çil, Rıza Durmaz. Rotavirus Prevalence and Genotype Distribution in Children with Acute Gastroenteritis in Adana Province. *Mikrobiyol Bul* 2018; 52(2): 156-165. doi: 10.5578/mb.66648.

- 9) Rodríguez JM, Luque D. Structural Insights into Rotavirus Entry. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1215:45-68. doi: 10.1007/978-3-030-14741-9_3.
- 10) Kocabaş E, Timurtaş Dayar G. Rotavirus Aşılıarı. *J Pediatr Inf* 2015; 9: 166-74. Doi: 10.5152/ ced.2015.2180
- 11) Bibera GL, Chen J, Pereira P, Benninghoff B. Dynamics of G2P[4] strain evolution and rotavirus vaccination: A review of evidence for Rotarix. *Vaccine.* 2020 Jul 31;38(35):5591-5600. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.06.059.
- 12) Immunization, Vaccines and Biologicals, Rotavirus. <https://www.who.int/immunization/diseases/rotavirus/en/#:~:text=Rotaviruses%20are%20the%20most%20common,live%20in%20low%2Dincome%20countries> (accessed March 15, 2021).
- 13) Rotavirus mortality rate in children younger than 5 years, 2013. https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavirus/rotavirus_deaths_map_b.jpg?ua=1 (accessed March 15, 2021).
- 14) M.A.P. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Reoviruses, in: M.A. Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., Pfaller (Ed.), *Medical Microbiology*, 8th edition, Elsevier Health Science, 2016: pp. 503–510.
- 15) Stanifer M, Boulant S. The origin of diarrhea in rotavirus infection. *Science.* 2020 Nov 20;370(6519):909-910. doi: 10.1126/science.abf1914.
- 16) Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010 Mar;10(2):219-40. doi: 10.1586/erm.09.84.

- 17) Wang HB, Mo QH, Wang Q, Wu BM, Feng ZL, Lin JC, Yang Z. Probe-free and sensitive detection of diarrhea-causing pathogens using RT-PCR combined high resolution melting analysis. *Biologicals*. 2016 Sep;44(5):360-6. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.06.012.
- 18) Vossen RH, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum Mutat*. 2009 Jun;30(6):860-6. doi: 10.1002/humu.21019.
- 19) Mutation scanning by high resolution melt analysis. <https://www.gene-quantification.de/white-pott-hrm-comp-2006.pdf> (accessed June 6, 2021).
- 20) Kirkwood CD, Ma LF, Carey ME, Steele AD. The rotavirus vaccine development pipeline. *Vaccine*. 2019 Nov 28;37(50):7328-7335. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.03.076.
- 21) Santos VS, Marques DP, Martins-Filho PR, Cuevas LE, Gurgel RQ. Effectiveness of rotavirus vaccines against rotavirus infection and hospitalization in Latin America: systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty*. 2016 Aug 12;5(1):83. doi: 10.1186/s40249-016-0173-2.
- 22) Capece G, Gignac E. Norovirus. [Updated 2020 Aug 11]. In *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL) StatPearls Publishing; 2021 Jan. PMID 30020637. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513265>.
- 23) Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jan;28(1):134-64. doi: 10.1128/CMR.00075-14.
- 24) Malin Alsved, Carl-Johan Fraenkel, Mats Bohgard, Anders Widell, Anna Söderlund-Strand, Peter Lanbeck, Torsten Holmdahl, Christina Isaxon, Anders

Gudmundsson, Patrik Medstrand, Blenda Böttiger, and Jakob Löndahl. Sources of Airborne Norovirus in Hospital Outbreaks. *Clin Infect Dis* 2020 May 6;70(24):2023-2028. doi: 10.1093/cid/ciz584.

- 25) Kaplan JE, Goodman RA, Schonberger LB, Lippy EC, Gary GW. 1982. Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. *J Infect Dis* 146:190–197. doi: 10.1093/infdis/146.2.190.
- 26) Karin Bok, Kim Y. Green. Norovirus Gastroenteritis in Immunocompromised Patients. *N Engl J Med*. 2012 November 29; 367(26): 2126–2132. doi:10.1056/NEJMra1207742.
- 27) Atmar RL, Ramani S, Estes MK. Human noroviruses: recent advances in a 50-year history. *Curr Opin Infect Dis*. 2018;31(5):422-432. doi: 10.1097/QCO.0000000000000476.
- 28) Usman N, Suarez M. Adenoviruses. [Updated 2021 Jan 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559072/>
- 29) Ison MG, Hayden RT. Adenovirus. *Microbiol Spectr*. 2016 Aug;4(4). doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0020-2015.
- 30) Lynch JP 3rd, Kajon AE. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin Respir Crit Care Med*. 2016 Aug;37(4):586-602. doi: 10.1055/s-0036-1584923.
- 31) Bass ES, Pappano DA, Humiston SG. Rotavirus. *Pediatr Rev*. 2007 May;28(5):183-91. doi: 10.1542/pir.28-5-183.

- 32) Parez N. Rotavirus gastroenteritis: why to back up the development of new vaccines? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2008 Mar;31(2-3):253-69. doi: 10.1016/j.cimid.2007.07.005.
- 33) Öngen B: Türkiye'de ishal etkenleri. *Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Dergisi*, 2006, 20:122-134
- 34) Brown KA, Kriss JA, Moser CA, Wenner WJ, Offit PA. Circulating rotavirus-specific antibody-secreting cells (ASCs) predict the presence of rotavirus-specific ASCs in the human small intestinal lamina propria. *J Infect Dis*. 2000 Oct;182(4):1039-43. doi: 10.1086/315808.
- 35) O'Ryan M, Lopman BA. Parenteral protein-based rotavirus vaccine. *Lancet Infect Dis*. 2017 Aug;17(8):786-787. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30244-X.
- 36) Folorunso OS, Sebolai OM. Overview of the Development, Impacts, and Challenges of Live-Attenuated Oral Rotavirus Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2020 Jun 27;8(3):341. doi: 10.3390/vaccines8030341.
- 37) Burnett E, Parashar UD, Tate JE. Real-world effectiveness of rotavirus vaccines, 2006-19: a literature review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2020 Sep;8(9):e1195-e1202. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30262-X.
- 38) Hungerford D, Smith K, Tucker A, Iturriza-Gómara M, Vivancos R, McLeonard C, A Cunliffe N, French N. Population effectiveness of the pentavalent and monovalent rotavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMC Infect Dis*. 2017 Aug 15;17(1):569. doi: 10.1186/s12879-017-2613-4.

- 39) Altındış, M., Küçükkurt, Ş., Kalaycı, R., Aslan, FG., Bükülmez, A., Yoldaş, Y., 2016. Akut gastroenteritli çocuklarda Rotavirus, enterik Adenovirus ve rotavirus sıklığı. *Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*,1(1), 1-12.
- 40) Dereci S, Çopur Çiçek A, Savaş Acar S, Bakkaloğlu Z, Özkasap S, Kanber K, Hacisalihoğlu Ş, Albayrak Y, Durmaz R. Prevalence and genotype distribution of rotaviruses in children with gastroenteritis in Rize province. *Bosn J Basic Med Sci*. 2015 Jul 9;15(3):35-9. doi: 10.17305/bjbms.2015.469.
- 41) Özer, B., Jenedi, K., Pehlivanoglu, C., Göçmen, M., 2014. Akut gastroenteritli hastaların dışkı örneklerinde Rotavirus ve Adenovirus sıklığı. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 5(20), 129-134. doi:10.17944/mkutfd.88293.
- 42) Bulut Y, İşeri L, Ağel E, Durmaz B. Akut gastroenterit ön tanılı çocuklarda rotavirus pozitifliği. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2003,10:143-145.
- 43) Yalçın, TY., Yıldırım, D., Alkan, S., 2016. Frequency of Rotavirus and Adenovirus in children with diarrhea in Sivas Numune Hospital. *Cumhuriyet Medikal Journal*, 38(4), 258-262. doi:10.7197/cmj.v38i4.5000183947.
- 44) Çalgın, MK., Çetinkol, Y., Yıldırım, AA., Erdil, A., Dağlı, A., 2015. Ordu ilindeki akut gastroenteritli çocuklarda Rotavirus ve enterik adenovirus sıklığının araştırılması. *Ankem Dergisi*, 29(2), 59-65. doi:10.5222/ankem.2015.059.
- 45) Yousefi Rad A, Gözalan A. Detection of rotavirus and enteric adenovirus antigens in outpatients with gastroenteritis. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 2010, 30:174- doi:10.5336/medsci.2008-9735.
- 46) Meral M, Bozdayı G, Ozkan S, Dalgıç B, Alp G, Ahmed K. Rotavirus prevalence in children with acute gastroenteritis and the distribution of serotypes and electropherotypes. *Mikrobiyol Bul*. 2011 ;45(1):104-12.

- 47) İnci A, Kutođlu MG, Baysal B. Bir eğitim ve araştırma hastanesinde rotavirus gastro-enteriti prevalansının araştırılması. İnfeksiyon Dergisi, 2009, 23:79-82.
- 48) Tüzüner, U., Gülcen, BS., Özdemir, M., Feyziođlu, B., 2016. Gastroenteritli çocukların dışkılarında Adenovirus ve Rotavirus sıklığı ve mevsimsel dağılımı. Klimik Dergisi, 29(3), 121-124. doi:10.5152/kd.2016.29.
- 49) Tümgör A. Çocuk Yaş Grubunda Görülen Gastroenteritlerde Viral ve Bakteriyel Etkenlerin Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2010.
- 50) Doğan, Y., Ekři, F., Karlıgil, T., Bayram, A., 2014. Akut gastroenteritli hastalarda Rotavirus ve Adenovirus varlığının araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 44(1), 18-22.
- 51) Süzük, S., Avcıküçük, H., Kavak, M., 2014. Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesine başvuran akut gastroenteritli çocuklarda Rotavirus enfeksiyonunun sıklığı. Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 72 (1), 11-16. doi:10.5505/TurkHijyen.2015.53386.
- 52) Sümer Z, Sümer H, Poyraz Ö. Sivas il merkezindeki çocuk ishallerinde Rotavirus pozitifliği. İnfeksiyon Dergisi, 1998, 12:211-212.
- 53) Çelebi S, Ayyıldız A, Babacan M, Tuncel ME. İvegen ishalleri 0-2 yaş grubu çocuklarda enteropatojenlerin bulunma oranı. İnfeksiyon Dergisi, 1992, 6:31-34.
- 54) Balkan ÇE, Çelebi D, Çelebi Ö, Altoparlak Ü. Among 0-5 Years Old Children with Acute Gastroenteritis in Erzurum. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2012; 42(2):51-54.

- 55) Nazik H, İlkaç M, Öngen B. Çocukluk yaş grubu gastroenteritlerinde rotavirus sıklığının araştırılması. *Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Dergisi*, 2006, 20:233-235.
- 56) İrvem, A., Yücel, FM., Yıldırım, M., Kadanalı, A., Dede, B., 2014. Akut gastroenteritli çocuk hastalarda Rotavirus görülme sıklığı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 44(3),98-100.
- 57) Bayraktar B, Toksoy B, Bulut E. Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus ve adenovirus saptanması. *Klinik Dergisi*, 2010, 23:15-17.
- 58) Kurugöl Z, Geylani S, Karaca Y, Umay F, Erensoy S, Vardar F, Bak M, Yaprak I, Ozkinay F, Ozkinay C. Rotavirus gastroenteritis among children under five years of age in Izmir, Turkey. *Turk J Pedia.*, 2003; 45(4):290-4.
- 59) Parashar UD, Burton A, Lanata C, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Steele D, Birmingham M, Glass RI. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J Infect Dis.* 2009 Nov 1;200 Suppl 1:S9-S15. doi: 10.1086/605025.
- 60) Ogilvie I, Khoury H, Goetghebeur MM, El Khoury AC, Giaquinto C. Burden of community-acquired and nosocomial rotavirus gastroenteritis in the pediatric population of Western Europe: a scoping review. *BMC Infect Dis.* 2012 Mar 19;12:62. doi: 10.1186/1471-2334-12-62.
- 61) Antunes H, Afonso A, Iturriza M, Martinho I, Ribeiro C, Rocha S, Magalhaes C, Carvalho L, Branca F, Gray J. G2P [4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. *J Clin Virol.* 2009 May;45(1):76-8. doi: 10.1016/j.jcv.2009.03.010.

- 62) Sai L, Sun J, Shao L, Chen S, Liu H, Ma L. Epidemiology and clinical features of rotavirus and norovirus infection among children in Ji'nan, China. *Virology*. 2013 Oct 8;10:302. doi: 10.1186/1743-422X-10-302.
- 63) Pursem VN, Peeroo BM, Mangar TI, Sohawon FM, Seheri LM, Mphahlele MJ, Mwenda JM, Manraj SS. Epidemiology of rotavirus diarrhea and diversity of rotavirus strains among children less than 5 years of age with acute gastroenteritis in Mauritius: June 2008 to December 2010. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 Jan;33 Suppl 1:S49-53. doi: 10.1097/INF.0000000000000051.
- 64) Malek MA, Teleb N, Abu-Elyazeed R, Riddle MS, Sherif ME, Steele AD, Glass RI, Bresee JS. The epidemiology of rotavirus diarrhea in countries in the Eastern Mediterranean Region. *J Infect Dis*. 2010 Sep 1;202 Suppl:S12-22. doi: 10.1086/653579.
- 65) K Arif, Çalışkan E, Temizkan CR. Rotavirus and Adenovirus Frequency in Children with Acute Gastroenteritis. *Konuralp Tıp Dergisi*. 2017; 9(2):35-39. doi:10.18521/ktd.296653.
- 66) Şafak B. The Frequency Of Rotavirus And Adenovirus In Pediatric Patients with Acute Gastroenteritis. *ACU Sağlık Bil Derg*. 2014; (2):121-124.
- 67) Şimsek Y, Bostancı I, Bozdayı G, Öner N, Kamruddin S, Rota S, Dallar Y. Frequency and serotype features of rotavirus in 0-5 age children with acute gastroenteritis. *Turkiye Klinikleri J Pediatr*. 2007, 16:165-170.
- 68) Ramsay M, Brown D. Epidemiology of group a rotaviruses surveillance and burden of disease studies. *Methods Mol Med*. 2000;34:217-38. doi: 10.1385/1-59259-078-0:217.

- 69) Altındaş, M., Beştepe, G., Çeri, A., Yavru, S. ve Kalaycı, R. (2008). Akut ishal yakınmalı çocuklarda rotavirus ve enterik adenovirus sıklığı. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 15(2), 17-20.
- 70) Kurugöl, Z., Salman, N. (2008). Rotavirus İnfeksiyonları ve Aşılı. Ankem Dergisi, 22(3), 160-170.
- 71) Van Damme P, Giaquinto C, Huet F, Gothefors L, Maxwell M, Van der Wielen M; REVEAL Study Group. Multicenter prospective study of the burden of rotavirus acute gastroenteritis in Europe, 2004-2005: the REVEAL study. J Infect Dis. 2007 May 1;195 Suppl 1:S4-S16. doi: 10.1086/516714.
- 72) Musawi MA, Zainaldeen H, Shafi F, Anis S, Deantonio R. Rotavirus gastroenteritis in children under 5 years in the Kingdom of Bahrain: hospital-based surveillance. Clin Epidemiol. 2013 Aug 6;5:269-75. doi: 10.2147/CLEP.S46822.
- 73) Kim JS, Kang JO, Cho SC, Jang YT, Min SA, Park TH, Nyambat B, Jo DS, Gentsch J, Bresee JS, Mast TC, Kilgore PE. Epidemiological profile of rotavirus infection in the Republic of Korea: results from prospective surveillance in the Jeongeub District, 1 July 2002 through 30 June 2004. J Infect Dis. 2005 Sep 1;192 Suppl 1:S49-56. doi: 10.1086/431506.
- 74) Cook, SM., Cam, RI., Le Baron, CW., Ho, MS., 1990. Global seasonality of rotavirus infections. Bulletin of the World Health Organization, 68 (2), 171-177.
- 75) Karadag A, Acikgoz ZC, Avci Z, Catal F, Gocer S, Gamberzade S, Uras N. Childhood diarrhoea in Ankara, Turkey: epidemiological and clinical features of rotavirus-positive versus rotavirus-negative cases. Scand J Infect Dis. 2005;37(4):269-75. doi: 10.1080/00365540410020983.

- 76) Altindis M, Yavru S, Simsek A, Ozkul A, Cerit A, Koc H. . Rotavirus infection in children with acute diarrhea as detected by latex agglutination, ELISA and polyacrylamide gel electrophoresis. *The Indian Journal of Pediatrics*, 2004, 41:590-594.
- 77) Oğuz, S., Kurt, F., Tekin, D., Kocabaş, BA., İnce, E., Suskan, E., 2014. burden of Rotavirus gastroenteritis in the pediatric emergency service. *Journal Pediatric Infections*, 8, 200-205. DOI: 10.5152/ced.2014.1770.
- 78) Umair M, Abbasi BH, Nisar N, Alam MM, Sharif S, Shaukat S, Rana MS, Khurshid A, Mujtaba G, Aamir UB, Zaidi SSZ. Molecular analysis of group A rotaviruses detected in hospitalized children from Rawalpindi, Pakistan during 2014. *Infect Genet Evol.* 2017 Sep;53:160-166. doi: 10.1016/j.meegid.2017.05.009.
- 79) Mohanty E, Dwibedi B, Kar SK, Acharya AS. Epidemiological features and genetic characterization of virus strains in rotavirus associated gastroenteritis in children of Odisha in Eastern India. *Infect Genet Evol.* 2017 Sep;53:77-84. doi: 10.1016/j.meegid.2017.04.016.
- 80) Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 2005 Jan-Feb;15(1):29-56. doi: 10.1002/rmv.448.
- 81) Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC, Derrick JM. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet.* 1974 Jul 13;2(7872):61-3. doi: 10.1016/s0140-6736(74)91631-6.
- 82) Matthijssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger

U, Van Ranst M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008;153(8):1621-9. doi: 10.1007/s00705-008-0155-1.

- 83) Yoshinaga M, Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Müller WE, Ushijima H. Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. *Arch Virol.* 2006 Jan;151(1):183-92. doi: 10.1007/s00705-005-0604-z. Epub 2005 Aug 8. PMID: 16086098.
- 84) Tcheremenskaia O, Marucci G, De Petris S, Ruggeri FM, Dovecar D, Sternak SL, Matyasova I, Dhimolea MK, Mladenova Z, Fiore L; Rotavirus Study Group. Molecular epidemiology of rotavirus in Central and Southeastern Europe. *J Clin Microbiol.* 2007 Jul;45(7):2197-204. doi: 10.1128/JCM.00484-07.
- 85) Abdel-Haq NM, Thomas RA, Asmar BI, Zacharova V, Lyman WD. Increased prevalence of G1P[4] genotype among children with rotavirus-associated gastroenteritis in metropolitan Detroit. *J Clin Microbiol.* 2003 Jun;41(6):2680-2. doi: 10.1128/JCM.41.6.2680-2682.2003.
- 86) Yang J, Wang T, Wang Y, Lu B, Bai X, Zhang L, Wang M, Wang H. Emergence of human rotavirus group a genotype G9 strains, Wuhan, China. *Emerg Infect Dis.* 2007 Oct;13(10):1587-9. doi: 10.3201/eid1310.070142.
- 87) Cataloluk O, Iturriza M, Gray J. Molecular characterization of rotaviruses circulating in the population in Turkey. *Epidemiol Infect.* 2005 Aug;133(4):673-8. doi: 10.1017/s0950268805003882.
- 88) Bozdayi G, Dogan B, Dalgic B, Bostanci I, Sari S, Battaloglu NO, Rota S, Dallar Y, Nishizono A, Nakagomi O, Ahmed K. Diversity of human rotavirus G9 among children in Turkey. *J Med Virol.* 2008 Apr;80(4):733-40. doi: 10.1002/jmv.21120.

- 89) Durmaz R, Kalaycioglu AT, Acar S, Bakkaloglu Z, Karagoz A, Korukluoglu G, Ertek M, Torunoglu MA; Turkish Rotavirus Surveillance Network. Prevalence of rotavirus genotypes in children younger than 5 years of age before the introduction of a universal rotavirus vaccination program: report of rotavirus surveillance in Turkey. *PLoS One*. 2014 Dec 1;9(12):e113674. doi: 10.1371/journal.pone.0113674.
- 90) Tapisiz A, Bedir Demirdag T, Cura Yayla BC, Gunes C, Ugraş Dikmen A, Tezer H, Baran Aksakal N, Bozdayi G, Ozkan S. Rotavirus infections in children in Turkey: A systematic review. *Rev Med Virol*. 2019 Jan;29(1):e2020. doi: 10.1002/rmv.2020.
- 91) Meral M, Bozdayi G, Ozkan S, Dalgıç B, Alp G, Ahmed K. Akut Gastroenteritli Çocuklarda Rotavirus Prevalansı, Serotip ve Elektroferotip Dağılımı [Rotavirus prevalence in children with acute gastroenteritis and the distribution of serotypes and electropherotypes]. *Mikrobiyol Bul*. 2011 Jan;45(1):104-12. Turkish.
- 92) Çolak M, Bozdayı G, Altay A, Yalaki Z, Ahmed K, Özkan S. Detection and molecular characterisation of adenovirus in children under 5 years old with diarrhoea. *Turk J Med Sci*. 2017 Nov 13;47(5):1463-1471. doi: 10.3906/sag-1510-94.
- 93) Aktaş O, Aydın H, Timurkan MO. A molecular study on the prevalence and coinfections of Rotavirus, Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in children with gastroenteritis. *Minerva Pediatr*. 2019 Oct;71(5):431-437. doi: 10.23736/S0026-4946.16.04304-X.
- 94) Ozsari T, Bora G, Kaya B, Yakut K. The Prevalence of Rotavirus and Adenovirus in the Childhood Gastroenteritis. *Jundishapur J Microbiol*. 2016 Apr 27;9(6):e34867. doi: 10.5812/jjm.34867.

- 95) Celik C, Gozel MG, Turkay H, Bakici MZ, Güven AS, Elaldi N. Rotavirus and adenovirus gastroenteritis: time series analysis. *Pediatr Int.* 2015 Aug;57(4):590-6. doi: 10.1111/ped.12592.
- 96) Demirel A. Evaluation of Rotavirus and Enteric Adenovirus Infection in Patients with Diarrhea. *J Immunol Clin Microbiol.* 2019;4(1):13-20.
- 97) Oppong TB, Yang H, Amponsem-Boateng C, Kyere EKD, Abdulai T, Duan G, Opolot G. Enteric pathogens associated with gastroenteritis among children under 5 years in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Infect.* 2020 Mar 2;148:e64. doi: 10.1017/S0950268820000618.
- 98) Meyer J, Roos E, Combescure C, Buchs NC, Frossard JL, Ris F, Toso C, Schrenzel J. Mapping of aetiologies of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis of pathogens identified using a multiplex screening array. *Scand J Gastroenterol.* 2020 Dec;55(12):1405-1410. doi: 10.1080/00365521.2020.1839128.
- 99) Qiu FZ, Shen XX, Li GX, Zhao L, Chen C, Duan SX, Guo JY, Zhao MC, Yan TF, Qi JJ, Wang L, Feng ZS, Ma XJ. Adenovirus associated with acute diarrhea: a case-control study. *BMC Infect Dis.* 2018 Sep 3;18(1):450. doi: 10.1186/s12879-018-3340-1.
- 100) Alain S, Denis F. Epidémiologie des diarrhées aiguës infectieuses en France et en Europe [Epidemiology of infectious acute diarrhoea in France and Europe]. *Arch Pediatr.* 2007 Oct;14 Suppl 3:S132-44. French. doi: 10.1016/s0929-693x(07)80017-0.
- 101) Portal TM, Reymão TKA, Quinderé Neto GA, Fiuza MKDC, Teixeira DM, Lima ICG, Sousa Júnior EC, Bandeira RDS, De Deus DR, Justino MCA, Linhares ADC, Silva LDD, Resque HR, Gabbay YB. Detection and genotyping of enteric viruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Belém,

Brazil: Occurrence of adenovirus viremia by species F, types 40/41. *J Med Virol.* 2019 Mar;91(3):378-384. doi: 10.1002/jmv.25321.

- 102) Altay A, Bozdayı G, Meral M, Dallar Bilge Y, Dalgıç B, Ozkan S, Ahmed K. Akut Gastroenterit Nedeniyle Ankara'da İki Farklı Hastaneye Başvuran 0-5 Yaş Arası Çocuklarda Norovirus Enfeksiyonu Sıklığının Araştırılması [Investigation of norovirus infection incidence among 0-5 years old children with acute gastroenteritis admitted to two different hospitals in ankara, Turkey]. *Mikrobiyol Bul.* 2013 Jan;47(1):98-108. Turkish. doi: 10.5578/mb.4082.
- 103) Timurkan MÖ, Aydın H, Aktaş O. Frequency and molecular characterization of human norovirus in Erzurum, Turkey. *Turk J Med Sci.* 2017 Jun 12;47(3):960-966. doi: 10.3906/sag-1509-87.
- 104) Cöl D, Biçer S, Ciler Erdağ G, Giray T, Gürol Y, Yılmaz G, Küçük Ö, Vitrinel A. Annual report on norovirus in children with acute gastroenteritis in 2009 and their genotypes in Turkey. *Infez Med.* 2013 Dec;21(4):261-9.
- 105) Ozkul AA, Kocazeybek BS, Turan N, Reuter G, Bostan K, Yılmaz A, Altan E, Uyunmaz G, Karaköse AR, Muratoglu K, Elevli M, Helps CR, Yılmaz H. Frequency and phylogeny of norovirus in diarrheic children in Istanbul, Turkey. *J Clin Virol.* 2011 Jul;51(3):160-4. doi: 10.1016/j.jcv.2011.03.004.
- 106) Altindis M, Bányai K, Kalayci R, Gulamber C, Koken R, Yoldas Y, Aykurt P, Martella V. Frequency of norovirus in stool samples from hospitalized children due to acute gastroenteritis in Anatolia, Turkey, 2006-2007. *Scand J Infect Dis.* 2009;41(9):685-8. doi: 10.1080/00365540903071342.
- 107) Inns T, Harris J, Vivancos R, Iturriza-Gomara M, O'Brien S. Community-based surveillance of norovirus disease: a systematic review. *BMC Infect Dis.* 2017 Sep 29;17(1):657. doi: 10.1186/s12879-017-2758-1.

- 108) Bartsch SM, Lopman BA, Ozawa S, Hall AJ, Lee BY. Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *PLoS One*. 2016 Apr 26;11(4):e0151219. doi: 10.1371/journal.pone.0151219.
- 109) Nguyen GT, Phan K, Teng I, Pu J, Watanabe T. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis in developing countries. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Oct;96(40):e8139. doi: 10.1097/MD.00000000000008139.
- 110) Zhou H, Wang S, von Seidlein L, Wang X. The epidemiology of norovirus gastroenteritis in China: disease burden and distribution of genotypes. *Front Med*. 2020 Feb;14(1):1-7. doi: 10.1007/s11684-019-0733-5.
- 111) Kowalzik F, Riera-Montes M, Verstraeten T, Zepp F. The burden of norovirus disease in children in the European Union. *Pediatr Infect Dis J*. 2015 Mar;34(3):229-34. doi: 10.1097/INF.0000000000000546.