

Üçüncü Basamak Bir Hastaneye Başvuran Çocuk Hastalarda Rotavirüs Gastroenteritinin Saptanması ve Genotip Dağılımı

Determination and Genotype Distribution of Rotavirus Gastroenteritis in Pediatric Patients Admitted to a Tertiary Care Hospital

Fatime Habibe CANERİÇİ¹(ID), Birol ŞAFAK²(ID)

¹ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ.

¹ Namık Kemal University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Tekirdağ, Turkey.

² Gebze Anadolu Sağlık Merkezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Kocaeli.

² Anadolu Health Center Hospital, Clinic of Medical Microbiology, Kocaeli, Turkey.

Makale Atfı: Caneriçi FH, Şafak B. Üçüncü basamak bir hastaneye başvuran çocuk hastalarda rotavirüs gastroenteritinin saptanması ve genotip dağılımı. Mikrobiyol Bul 2022;56(2):304-314.

ÖZ

Akut enfeksiyöz gastroenterit, tüm dünyada görülen yaygın bir hastalıktır ve olguların çoğunda viral patojenler etken olarak yer alır. Rotavirüs (RV), Norovirüs, Adenovirüs ve Astrovirüsler dahil olmak üzere birçok farklı virüs, akut viral gastroenterit olgularının çoğunluğundan sorumludur. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri [Centers for Disease Control and Prevention (CDC)]'ne göre, viral gastroenterit enfeksiyonları dünya çapında her yıl 200 000'den fazla çocuk ölümüne neden olmaktadır. Bunlardan RV hastalığının küresel yükünü azaltmak için en iyi stratejilerden biri, etkili aşuların geliştirilmesi ve uygulanmasıdır. Ancak aşuların kapsamlarında farklılıklar bulunduğu için, bölgelere göre yerleşik genotipler için uygun aşı seçimi önemlidir. Bu çalışmada, bölgemizdeki RV enfeksiyonlarının tespit edilmesi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) ve yüksek çözünürlüklü erime [high resolution melting (HRM)] analizi ile genotip tayini yapılması amaçlanmıştır. Çalışmada çocuk hastalardan alınan toplam 341 dışkı örneği test edilmiştir. Antijen tespiti için immünookromatografik yan-akış ilkesiyle çalışan test kullanılmıştır. Genotip analizi için Rt-PCR ve HRM uygulanmıştır. Dışkı örneklerinde RV pozitifliği ülkemiz ve Doğu Akdeniz Bölgesi verilerine benzer olarak %23.1 bulunmuştur. Hastaların çoğunluğunun (%51) 0-2 yaş arasında, büyük çoğunluğunun ise %77 oranıyla 0-5 yaş arasında olduğu belirlenmiştir. En çok olgu şubat ayı olmak üzere kış aylarında tespit edilmiştir. G genotipi belirlenebilen 40 örneğin dağılımı; G2, 21 (%52.5); G1, 11 (%27.5); G9, 5 (%12.5); G3, 2 (%5); G4, 1(%2.5) olarak saptanmıştır. P genotipi belirlenebilen 53 örneğin dağılımı P4, 44 (%83.0); P9, 8 (%15.1); P10, 1 (%1.9) olarak belirlenmiştir. Genotipi tespit edilebilenlerin içinde en sık %52.5 oranıyla G2, %83 oranıyla P4 görülmüştür. RV, G ve P genotipinin birlikte tespit edildiği 25 numunenin dağılımı değerlendirildiğinde; sırasıyla G1P[4] 11 (%44), G2P[9] 5 (%20), G9P[4] 5 (%20), G2P[4] 2 (%8), G3P[10] 1(%4), G4P[4] 1 (%4) genotiplerinin varlığı tespit edilmiştir. En sık görülen genotip G1P[4] olarak belirlenmiştir. HRM analizinde G2 genotipine ait örneklerin dokuzunda, P4 ve P9 genotipine ait örneklerin 16'sında erime eğrisinin tepe noktaları farklı sıcaklıklarda görülmüştür.

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Birol Şafak, Anadolu Sağlık Merkezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Kocaeli, Türkiye.
Tel (Phone): +90 (262) 678 50 25, E-posta (E-mail): birolsafak@gmail.com

Bu nedenle HRM analizi ile özellikle G2 ve P için olmak üzere genotiplendirme tam olarak sonuçlandırılmamıştır. Ülkemizde isteğe bağlı olarak uygulanan Rota Teq® ve Rotarix™ aşılardan Rota Teq® ülkemiz ve bölgemizde görülen genotipleri en geniş olarak kapsayan aşı olarak görülmektedir. Bölgemizdeki tüm genotipleri (G1, G2, G3, G4, G9) içeren ROTASİLL® aşısı ise ülkemizde bulunmamaktadır. Aynı ülke içerisinde bile bölgeye ve yıllara göre farklı sonuçların elde edilmesi nedeniyle RV hastalığının mevcut yükünü artırma potansiyeline sahip suşların ortaya çıkışı sürekli olarak izlenmelidir. Böylece özellikle viral çeşitliliğin daha yüksek olduğu gösterilen ülkelerde aşya dirençli suşların ortaya çıkması takip edilebilecektir.

Anahtar kelimeler: Gastroenterit; Rotavirüs; genotip; yüksek çözünürlüklü erime analizi.

ABSTRACT

Acute infectious gastroenteritis is a prevalent disease worldwide, and most of the cases are caused by viral pathogens. Many different viruses, including Rotavirus (RV), Norovirus, Adenovirus, and Astroviruses, are responsible for most acute viral gastroenteritis cases. According to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), viral gastroenteritis infections cause more than 200 000 child mortalities each year worldwide. One of the best strategies to reduce the global burden of RV gastroenteritis is the development and administration of effective vaccines. However, since there are differences in the coverage of the vaccines, the choice of appropriate vaccine for localized genotypes based on regions is important. The aim of this study was to detect the RV infections in our region and to perform genotyping using real time polymerase chain reaction (Rt-PCR) and high resolution melting (HRM) analysis. A total of 341 stool samples collected from pediatric patients were tested. Lateral flow immunochromatographic assay principle based assay was used for antigen detection. RT-PCR and HRM were applied for genotype analysis. Similar to the data from our country and Eastern Mediterranean region, RV positivity in stool samples was 23.1%. The majority of the patients (51%) were aged 0-2 years and the vast majority of the patients, with a rate of 77%, were between the ages of 0-5. Most of the cases were detected in the winter months, especially in February. The distribution of 40 samples, whose G genotype could be detected, was as follows: G2, 21 (52.5%); G1, 11 (27.5%); G9, 5 (12.5%); G3, 2 (5%); G4, 1 (2.5%). The distribution of 53 samples, whose P genotype could be detected, was as follows: P4, 44 (83.0%); P9, 8 (15.1%); P10, 1 (1.9%). Among those whose genotype could be detected, the most prevalent genotypes were G2 with 52.5% and P4 with 83%. When the distribution of 25 samples was evaluated, in which RV G and P genotypes were detected simultaneously, G1P [4] 11 (44%), G2P[9] 5 (20%), G9P[4] 5 (20%), G2P[4] 2 (8%), G3P[10] 1 (4%), and G4P[4] 1 (4%) genotypes were determined, respectively. The most commonly observed genotype was G1P[4]. In the HRM analysis, it was observed that the melting curve peaks were at different temperatures in nine of the G2 genotype samples and 16 of the P4 and P9 genotype samples. Thus, genotyping with HRM analysis could not be fully finalized, especially for G2 and P. Of the Rota Teq® and Rotarix™ vaccines administered on demand in our country, Rota Teq® is considered the vaccine that has the widest coverage for the genotypes observed in our country and region. ROTASİLL® vaccine, which covers all the genotypes in our region (G1, G2, G3, G4, G9) is not available in our country. The emergence of the strains with the potential to increase the current burden of RV disease should be continuously monitored, as different results are obtained by region and year, even within the same country. Thus, the emergence of vaccine-resistant strains can be followed up, especially in countries with higher viral diversity.

Keywords: Gastroenteritis; Rotavirus; genotype; high resolution melting analysis.

GİRİŞ

Akut enfeksiyöz gastroenterit, tüm dünyada görülen yaygın bir hastalıktır ve çoğu olguya viral patojenler neden olmaktadır. Akut seyreden ishaller genellikle kendi kendini sınırlarken özellikle az gelişmiş ülkelerde bebeklerde önemli bir ölüm nedenidir. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri [Centers for Disease Control and Prevention (CDC)]'ne göre, viral gastroenterit enfeksiyonları dünya çapında her yıl 200 000'den fazla çocuk ölümüne neden olmaktadır. İzole olgular meydana gelebilir, ancak viral gastroenterit

daha çok gündüz bakım merkezleri, bakım tesisleri ve yolcu gemileri gibi topluluklardaki salgınlarda görülür. Rotavirüs (RV), Norovirüs, Adenovirüs ve Astrovirüs de dahil olmak üzere birçok farklı virüs, çoğu akut viral gastroenterit olgusundan sorumludur. Norovirüs en yaygın viral enterit nedenidir. Aşı uygulamaya geçmeden önce ise RV, ishalleri hastalıkların en yaygın nedeniydi¹. İshalin yaygın olmayan viral nedenleri ise *Kobuvirus*, *Enterovirus*, *Orthoreovirus*, *Adenovirus* (grup F dışındakiler), *Torovirus*, *Coronavirus*, *Parvovirus* (*Bocavirus* dahil)tür². İmmün yetmezliği olanlarda görülen etkenler ise insan bağışıklık yetmezliği virüsü [human immunodeficiency virus (HIV)], *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex virus*, *Picobirnavirus*tür. Çoğu, kontamine gıda ve su (fokal-oral yol) olmak üzere kontamine eşya, kusmuk ve hava yoluyla bulaşır. Semptomlar genellikle kısa sürer ve çoğunlukla 1-3 gün sonra düzelir.

Enzim immünoassay testi veya immünokromatografi kullanılarak dışkı örneklerinde antijen testi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) tanıda yaygın kullanılmaktadır³. Yüksek çözünürlüklü erime analizi [high resolution melting (HRM) analysis], yüksek verimli mutasyon taraması ve genotipleme için kullanılabilen basit ve uygun maliyetli bir PCR sonrası tekniktir. HRM cihazları, dsDNA'dan ssDNA'ya artan sıcaklıkla ampikonlar ayrıştıkça meydana gelen floresandaki değişiklikleri çizerek yüksek çözünürlüklü erime eğrileri üretir. Vahşi tip kontrollerle karşılaştırıldığında çoğu zaman, belirli bir genotipe özgü erime eğrisi elde edilir⁴. Viral nedene bakılmaksızın, tedavi genellikle tek tiptir ve hidrasyon durumuna odaklanılarak semptomatik iyileşmeye yöneliktir¹.

Rotavirüs, aşıyla önlenilebilir bir hastalıktır. Ancak aşılarda kapsamlarında farklılıklar bulunduğundan, bölgelere göre yerleşik genotipler için uygun aşı seçimi önemlidir. Çalışmamızda bölgemizde akut gastroenteritli çocuklarda RV enfeksiyonu tespiti ve uygun aşı seçimine veri sağlamak için Rt-PCR ve HRM analizi ile genotip tayini yapılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 25.10.2018 ve Karar No: 2018.134.09.10)

Hastanemize kusma ve ishal şikayetiyle başvuran çocuk hastalardan toplanan dışkı örneklerinde RV antijen tespiti yapıldıktan sonra RV genotip analizi yapılana kadar -80°C de saklandı.

Antijen Tespiti

RV tespiti için Laboquick Ag Test (In Vitro Diagnostic Test, İzmir, Türkiye) kullanıldı. Bu test immünokromatografik yan-akış testi ilkesiyle çalışan tek aşamalı monoklonal antikor içermektedir. Pozitiflik durumunda ilgili bölgede renk değişimiyle belirlenen bant oluşmaktadır. Her testte kontrol bantı oluşumu ve her lot değişiminde pozitif/negatif kontrol örnekleriyle testin kontrolü yapıldı.

Rotavirüs Genotip Analizi

DNA izolasyonu için RINA™-M14 dışkı robotik nükleik asit izolasyon kiti (Bio-Speedy® İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Örneklerdeki nükleik asit miktarı ve kalitesi spektrofotometrik yöntemlerle ölçülerek sonraki basamaklara uygunluğu test edildi.

RV G genotiplendirmesi için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün tanımladığı iş akışları RT-PCR ve HRM reaksiyonlarına entegre edildi. G genotiplendirmesinde PCR reaksiyonları ilk adımda yapıldı: İlk adımda RT-PCR ile RV RNA'sının 905 baz çifti (bp) uzunluğundaki VP7 (G) bölgesi (VP7-RNA) hedeflenerek Roche LightCycler® 96 cihazında cDNA'ya dönüştürüldü ve çoğaltıldı. İkinci PCR'de ilk RT-PCR'de çoğaltılan 905 bp uzunluğundaki VP7 (G) bölgesinin cDNA (VP7-cDNA)'sı 9con1 ileri ve 9T1, 9T1, 9T3P, 9T4, 9T9B geri primerleri ile kurulan multipleks qPCR ile Roche LightCycler® 96 cihazında çoğaltıldı. Genotiplendirme için %3'lük agaroz jelde PCR ürünlerinin boyut analizi gerçekleştirildi. Buna göre her bir örneğin kendine ait bir bp boyutu ve bu örneklerin hangi genotip grubuna dahil olduğu belirlendi.

RV P genotiplendirmesi için DSÖ'nün tanımladığı iş akışları RT-PCR ve HRM reaksiyonlarına entegre edildi. P genotiplendirmesinde PCR reaksiyonları iki adımda yapıldı: İlk adımda Rt-PCR ile RV RNA'sının 876 bp uzunluğundaki VP4 (P) bölgesi (VP4-RNA) hedeflenerek Roche LightCycler® 96 cihazında cDNA'ya dönüştürüldü ve çoğaltıldı. İkinci PCR'de ilk RT-PCR'de çoğaltılan 876 bp uzunluğundaki VP4 (P) bölgesi cDNA (VP4-cDNA)'sı con3 ileri ve 1T-1, 2T-1, 3T-1, 4T-1 ve 5T-1 geri primerleri ile kurulan multipleks qPCR ile Roche LightCycler® 96 cihazında çoğaltıldı. Genotiplendirme için %3'lük agaroz jelde PCR ürünlerinin boyut analizi gerçekleştirildi. Buna göre her bir örneğin kendine ait bir bp boyutu ve bu örneklerin hangi genotip grubuna dahil olduğu belirlendi.

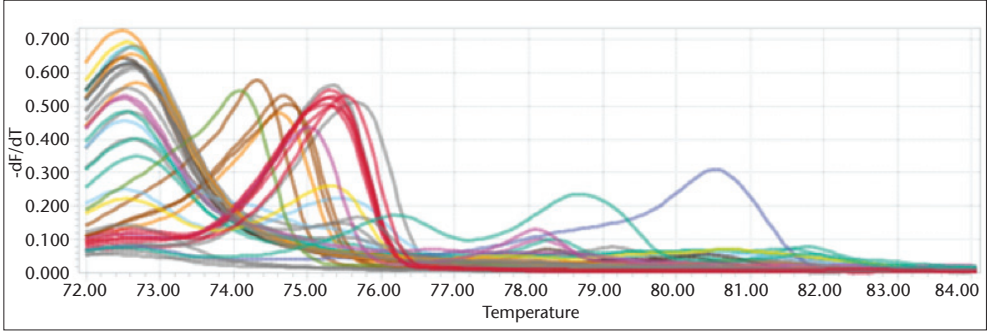
Sıcaklık etkisiyle denatüre olan DNA nedeniyle oluşan floresan değişikliği 'erime eğrisi (denatürasyon eğrisi)' olarak kaydedildi. Her örnek için DNA'nın %50'sinin denatüre olduğu sıcaklık değerleri (Tm) belirlendi. Örneklerin farklı sıcaklıklarda verdiği floresan pikler genetik varyasyonların olduğunu gösterdi. Bu sıcaklık değerlerine karşılık gelen genotipler belirlendi.

BULGULAR

Hastanemize Eylül 2018-Haziran 2019 tarihleri arasında başvuran akut gastroenteritli çocuklara ait toplam 341 dışkı örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların 153 (%44.9)'ü kadın, 188 (%55.1)'i erkek ve %51'inin 0-2 yaş arasında olduğu saptanmıştır.

Hastaların 79'unda RV antijeni için (%23.1) pozitiflik tespit edilmiştir. En az olgu Eylül ayında görülürken en çok olgu ise şubat ayında görülmüştür.

RV G genotiplendirmesi yapılan 79 örnekten G genotipi belirlenebilen 40 örneğin dağılımı: G2, 21 (%52.5); G1, 11 (%27.5); G9, 5 (%12.5); G3, 2 (%5); G4, 1 (%2.5) olarak belirlenmiştir. HRM analizinde örneklerin erime sıcaklığında değişkenlikler tespit edilmiş ve farklı sıcaklıklarda elde edilen floresan pikler genetik varyasyonların olduğunu göstermiştir (Şekil 1). HRM analizinde G1 genotipindeki tüm örneklerin Tm değeri



Şekil 1. G Genotipleri konvansiyonel erime eğrisi.

75.2°C olarak belirlenmiş ve Grup 1 altında toplanmıştır. G2 genotipindeki örneklerin Tm değeri 72-81°C arasında değişmiş ve altı farklı grup (Grup 2, 3, 4, 5, 6, 7) altında toplanmıştır. G3 genotipindeki örneklerin Tm değeri 80.2°C olarak ölçülmüş ve Grup 8 altında toplanmıştır. G4 genotipindeki örneğin Tm değeri 78.6°C olarak ölçülmüş ve Grup 9 altında toplanmıştır. G9 genotipindeki tüm örneklerin Tm değeri 74.2°C olarak ölçülmüş ve Grup 10 altında toplanmıştır. Örneklerin G genotipleri ve HRM analizi ile gruplandırılması Tablo I'de gösterilmiştir.

RV P genotiplendirmesi yapılan 79 örnekten 53'ünde P genotipi tespit edilebilmiştir. Dağılımı: P4, 44 (%83.0); P9, 8 (%15.1); P10, 1 (%1.9) olarak saptanmıştır. HRM analizinde örneklerin erime sıcaklığında değişkenlikler tespit edilmiştir ve farklı sıcaklıklarda elde edilen floresan pikler genetik varyasyonların olduğunu göstermiştir (Şekil 2). HRM analizinde Rotavirüs P4 genotipindeki örneklerin Tm değeri çoğu 79.5°C olmak üzere 77-82°C arasında ölçülmüş ve Grup 1, 2, 3, 4, 5 olarak beş grupta toplanmıştır. P9 genotipindeki örneklerin Tm değeri 77.5-81°C arasında değişmekteydi ve üç farklı grup (Grup 1, 2, 5) altında toplanmıştır. P10 genotipindeki örneğin Tm değeri 82.5°C ölçülmüş ve Grup 6 altında toplanmıştır. Örneklerin P genotipleri ve HRM analizi ile gruplandırılması Tablo II'de gösterilmiştir.

RV 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 saptanmıştır.

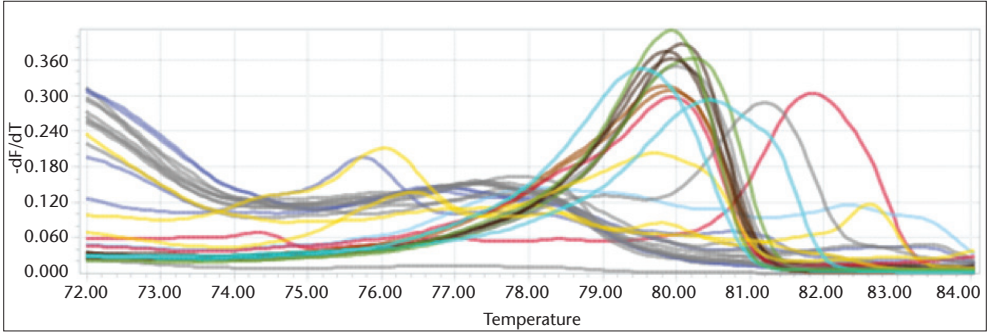
TARTIŞMA

Dünyada beş yaş altındaki çocukların büyük bir kısmı RV ile enfekte olur. Batı Avrupa'da beş yaşın altındaki çocuklarda görülen gastroenterit olgularının %63.5'e varan oranda toplumdan edinilmiş RV gastroenteritine bağlı olduğu bildirilmiştir⁵. Asya ve Afrika'dan bildirilen çalışmalarda da benzer olarak %34.3-41.6 arasında pozitiflik bildirilmiştir^{6,7}. Doğu Akdeniz Bölgesindeki verilerin incelendiği 2019 yılındaki çalışmada RV pozitifliği %19-78.2 arasında bulunmuştur⁸. Ülkemizde ise bu oran farklı çalışmaların gözden geçirildiği çalışmada %31.8 olarak bildirilmiştir⁹. Toplam 341 hastanın dahil olduğu bu çalışmada ise örneklerin 79 (%23.1)'unda RV antijeninin pozitif olduğu görülmüştür. Literatürdeki değerlerle çalışmamızda elde ettiğimiz RV pozitiflik değerlerini karşılaştı-

Tablo 1. G. Genotiplendirmesi ve Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi Grup Sonuçları

Örnek No	Bant Büyüklüğü	Genotip	Tm Değeri °C	HRM Grup	Örnek No	Bant Büyüklüğü	Genotip	Tm Değeri °C	HRM Grup
T1	159 bp	G1	75.2	Grup 1	B15	245 bp	G2	81	Grup 4
T16	159 bp	G1	75.2	Grup 1	B16	245 bp	G2	81	Grup 4
T19	159 bp	G1	75.2	Grup 1	B17	245 bp	G2	80	Grup 3
T20	159 bp	G1	75.2	Grup 1	B18	245 bp	G2	79	Grup 6
T25	159 bp	G1	75.2	Grup 1	B22	245 bp	G2	81	Grup 4
T26	159 bp	G1	75.2	Grup 1	B23	245 bp	G2	81	Grup 4
T30	159 bp	G1	75.2	Grup 1	B24	245 bp	G2	81	Grup 4
T32	159 bp	G1	75.2	Grup 1	B27	245 bp	G2	81	Grup 4
T35	159 bp	G1	75.2	Grup 1	B32	245 bp	G2	81	Grup 4
T38	159 bp	G1	75.2	Grup 1	B34	245 bp	G2	75	Grup 2
T41	159 bp	G1	75.2	Grup 1	B36	245 bp	G2	75	Grup 2
B1	245 bp	G2	75	Grup 2	B37	245 bp	G2	72	Grup 7
B2	245 bp	G2	75	Grup 2	T12	465 bp	G3	80.2	Grup 8
B4	245 bp	G2	75	Grup 2	T27	465 bp	G3	80.2	Grup 8
B6	245 bp	G2	80	Grup 3	T9	404 bp	G4	78.6	Grup 9
B7	245 bp	G2	81	Grup 4	T4	111 bp	G9	74.2	Grup 10
B8	245 bp	G2	80	Grup 3	T7	111 bp	G9	74.2	Grup 10
B9	245 bp	G2	74	Grup 5	T15	111 bp	G9	74.2	Grup 10
B11	245 bp	G2	75	Grup 2	T22	111 bp	G9	74.2	Grup 10
B13	245 bp	G2	79	Grup 6	T42	111 bp	G9	74.2	Grup 10

Tm: Erime sıcaklığı; HRM: Yüksek çözünürlüklü erime analizi; Bp: baz çifti



Şekil 2. P Genotipleri konvansiyonel erime eğrisi.

dığımızda ülkemiz ve Doğu Akdeniz Bölgesinde elde edilen sonuçlarla büyük oranda benzerlik görülmüştür. Ancak bu çalışmada duyarlılığı ve özgülüğü düşük immünokromatografik yan-akış testi kullanıldığından, tespit edilen sayının üzerinde RV gastroenterit olgusu olabileceği göz önüne alınmalıdır.

RV enfeksiyonu ile her yaşta karşılaşılmasına rağmen, çoğunlukla iki yaşın altındaki çocuklarda semptom görülmektedir¹⁰. Ülkemizde ve dünyada olguların çoğunluğu 0-2 yaş arasında saptanmaktadır¹¹⁻¹³. Çalışmamızda da benzer olarak hastaların çoğunluğu (%51) 0-2 yaş arasındaydı. Büyük çoğunluğu ise %77 oranıyla 0-5 yaş arasında bulunmuştur.

RV enfeksiyonunun mevsimsel dağılımına bakıldığında ılıman bölgelerde kış aylarında, tropikal bölgelerde ise yıl boyunca rastlandığı görülmektedir¹⁴. Farklı çalışmalarda RV olgularının genelde kış aylarında daha sık olarak görüldüğü bildirilmiştir^{15,16}. Bu çalışmada da, diğer çalışmalara benzer olarak en fazla olgu şubat ayı olmak üzere kış aylarında tespit edilmiştir.

Dış kapsid glikoproteini VP7 ve proteazla aktive edilen "spike (dikensi)" proteini VP4, sırasıyla glikoprotein (G) ve proteaz duyarlı (P) serotiplerini veya genotiplerini tanımlamak için kullanılmaktadır¹⁷. Günümüze kadar 35 adet G, 50 adet P genotipi saptanmıştır¹⁸. Rotavirüs serotiplerinin/genotiplerinin global dağılımının sürekli takip edilmesi etkili bir aşı geliştirme ve uygulanması açısından önemlidir. Dünyanın 52 ülkesinde 1989-2004 yılları arasında yapılan 124 çalışmanın değerlendirildiği raporda G1P[8] genotipi; Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da %70'in üzerinde, Asya ve Güney Amerika'da %30, Afrika'da ise %23 oranında görülmüştür¹⁹. Kuzey Amerika'da aşı sonrası dönemde en sık görülen genotipler G12P[8] ve G3P[8] olarak bildirilmiştir²⁰. Güney Amerika'da aşı sonrası dönemde G2P[4] %70 oranıyla baskın duruma gelmiştir²¹. Afrika'da 2006-2016 yılları arasında gözden geçirilen 27 çalışmanın verilerine bakıldığında en sık G1P[8] kombinasyonu görülmüştür²². Avrupa'dan bildirilen bir çalışmada G2P[4] genotipinin baskın olduğu bildirilmiştir²³. Asya ülkelerinde de G3P[8], G8P[8] ve G9P[8] gibi nadir görülen genotiplere değişim görülmektedir²⁴. Bir ülke genelinde baskın genotipler daha kısa sürelerde bile değişebilmektedir. Yoshinaga ve arkadaşlarının²⁵ Japonya'daki gözlemine göre 2000-2001 yıllarında G1, 2001-2002 yıllarında G2, 2002-2003 yıllarında ise G3 ve G4

Tablo II. G Genotiplendirmesi ve Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi Grup Sonuçları

Numune No	Bant Boyutu	Genotip	Tm Değeri °C	HRM Grup	Numune No	Bant Boyutu	Genotip	Tm Değeri °C	HRM Grup
T1	362	P4	79.5	Grup 1	T34	362	P4	79.5	Grup 1
T2	362	P4	79.5	Grup 1	T35	362	P4	79.5	Grup 1
T3	362	P4	79.5	Grup 1	T36	362	P4	79.5	Grup 1
T4	362	P4	79.5	Grup 1	T37	362	P4	79.5	Grup 1
T5	362	P4	79.5	Grup 1	T38	362	P4	79.5	Grup 1
T6	362	P4	79.5	Grup 1	T39	362	P4	79.5	Grup 1
T7	362	P4	79.5	Grup 1	T40	362	P4	79.5	Grup 1
T9	362	P4	79.5	Grup 1	T41	362	P4	79.5	Grup 1
T11	362	P4	79.5	Grup 1	T42	362	P4	79.5	Grup 1
T13	362	P4	79.5	Grup 1	B25	362	P4	79.5	Grup 1
T14	362	P4	79.5	Grup 1	B26	362	P4	77.5	Grup 2
T15	362	P4	79.5	Grup 1	B27	362	P4	82	Grup 3
T16	362	P4	79.5	Grup 1	B28	362	P4	77	Grup 4
T17	362	P4	79.5	Grup 1	B29	362	P4	81	Grup 5
T18	362	P4	79.5	Grup 1	B30	362	P4	82	Grup 3
T19	362	P4	79.5	Grup 1	B31	362	P4	77.5	Grup 2
T20	362	P4	79.5	Grup 1	B32	362	P4	77.5	Grup 2
T21	362	P4	79.5	Grup 1	B1	270	P9	79.5	Grup 1
T22	362	P4	79.5	Grup 1	B2	270	P9	79.5	Grup 1
T23	362	P4	79.5	Grup 1	B5	270	P9	81	Grup 5
T24	362	P4	79.5	Grup 1	B12	270	P9	77.5	Grup 2
T25	362	P4	79.5	Grup 1	B13	270	P9	79.5	Grup 1
T26	362	P4	79.5	Grup 1	B14	270	P9	77.5	Grup 2
T30	362	P4	79.5	Grup 1	B16	270	P9	81	Grup 5
T31	462	P4	79.5	Grup 1	B17	270	P9	81	Grup 5
T32	362	P4	79.5	Grup 1	T12	462	P10	82.5	Grup 6
T33	362	P4	79.5	Grup 1					

Tm: Erime sıcaklığı, HRM: Yüksek çözünürlüklü erime analizi, Bp: baz çifti.

baskın hale gelmiştir. Ülkemizden bildirilen çalışmaların incelendiği raporda yıllara göre değişim gösterilmiştir; 2000-2002 yılları arasında G4P[8], 2004-2006 yıllarında G1P[8], 2008-2010 yılları arasında karışık seyir izlense de G9P[8] ön plana çıkmaya başlamış, 2012-2014 yıllarında ise G9P[8] baskın hale gelmiştir⁹. Ülkemizden yakın zamanda yapılan bir çalışmada G1P[8] ve G9P[8] genotiplerinin yaygın olarak görülmeye devam ettiği bildirilmiştir^{11,26}. Ayrıca ülkemizde özellikle G12 genotipinin artışı dikkat çekmektedir²⁷. Bu çalışmada genotipi tespit edilebilenlerin içinde %52.5 G2, %83 P4 görülmüştür. G ve P genotiplerinin birlikte tespit edilebildiği örneklerde en sık G1P[4] tespit edilmiştir. Bulguların dünya ve ülkemiz verilerinden farklı olduğu görülmüştür. Bu sonucun bölgesel farklılıklar ve aşı uygulamasındaki yaklaşımlar nedeniyle olabileceği sonucuna varılmıştır. Aynı ülke içinde bile bölgeye ve yıllara göre farklı sonuçların elde edilmesi nedeniyle planlı bir şekilde sürveyans yapılması gerektiği düşünülmüştür. López ve arkadaşları²⁸ özellikle viral çeşitliliğin daha yüksek olduğu gösterilen ülkelerde epidemiyolojik bir sürveyans yapılmasıyla aşuya dirençli suşların ortaya çıkmasının takip edilebileceğini vurgulamıştır.

Ülkemizde bulunan ve isteğe bağlı olarak uygulanan Rota-Teq[®] ve Rotarix[™] olmak üzere iki Rotavirüs aşısı bulunmaktadır. Bunlardan Rota-Teq[®] ülkemiz ve bölgemizde görülen genotipleri en geniş olarak kapsayan aşı olarak görülmektedir. Bölgemizdeki tüm genotipleri (G1, G2, G3, G4, G9) içeren ROTASILL[®] aşısı ise ülkemizde bulunmamaktadır.

HRM'nin, şu anda mevcut olan ön tarama teknikleriyle karşılaştırılabilir veya daha üstün bir mutasyon saptama duyarlılığına sahip olduğu ileri sürülmektedir. Klinik tanısız ön tarama stratejilerine kolayca entegre edilerek mutasyon taraması için son derece hassas ve özgül bir teknik olduğu bildirilmektedir⁴. Rotavirüs varlığının araştırıldığı bir çalışmada HRM'nin konvansiyonel ve ticari RT-PCR ile %100 uyumlu olduğu, yüksek güvenilirliğe sahip olduğu bildirilmektedir²⁹. Çalışmamızda RV genotiplendirmesi için RT-PCR ile birlikte HRM analizi de kullanılmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır. G2 genotipine ait örneklerin dokuzunda erime eğrisinin tepe noktaları farklı sıcaklıklarda görülmüştür. Bu sonucun ortaya çıkması VP7 geninin G2 bölgesinin polimorfik olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. P4 ve P9 genotipine ait örneklerin 16'sında erime eğrisinin tepe noktaları farklı sıcaklıklarda görülmüştür. Bu sonucun ortaya çıkması VP4 geninin P4 ve P9 bölgelerinin polimorfik olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Çalışma sonuçlarımızdan anlaşılacağı üzere HRM analizi ile G2 ve P genotiplendirmesi tam olarak yapılamamıştır. Aynı HRM çalışması içindeki küçük hasta gruplarında birçok farklı ekzonu analiz edebilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu bildirilmektedir⁴. Ayrıca uygun deney tasarımı, numune kalitesi ve miktarı gibi faktörlere dikkat edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır³⁰. Tüm bunlar göz önüne alındığında RV genotiplendirmesinde HRM analizi yönteminin geliştirilmeye ihtiyacı olduğu düşünülmüştür.

RV hastalığının küresel yükünü azaltmak için en iyi stratejilerden biri, etkili aşuların geliştirilmesi ve uygulanmasıdır. Ancak aşuların kapsamlarında farklılıklar bulunduğundan, bölgelere göre yerleşik genotipler için uygun aşı seçimi önemlidir. Aynı ülke içerisinde bile bölgeye ve yıllara göre farklı sonuçların elde edilmesi nedeniyle RV hastalığının mevcut yükünü artırma potansiyeline sahip suşların ortaya çıkışı sürekli olarak izlenmelidir. Böyle-

ce özellikle viral çeşitliliğin daha yüksek olduğu gösterilen ülkelerde aşya dirençli suşların ortaya çıkması takip edilebilecektir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 25.10.2018 ve Karar No: 2018.134.09.10)

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Stuempfig ND, Seroy J. Viral Gastroenteritis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518995/>
2. Desselberger U. Viral gastroenteritis Key points. *Medicine (Baltimore)* 2017; 45(11): 690-4. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.08.005>
3. LeClair CL, McConnell KA. Rotavirus. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558951/>
4. National Health Service (NHS). Mutation scanning by high resolution melt analysis. Technology Assessment. Available from: <https://www.gene-quantification.de/white-pott-hrm-comp-2006.pdf> (Accessed date: 15 November 2021).
5. 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; 12(1): 62. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-62>
6. 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; 10(1): 1. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-302>
7. Purssem VN, Peeroo BMC, Mangar TI, Sohawon FM, Seheri LM, Mphahlele MJ, et al. 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; 33(Suppl 1): 49-53. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000051>
8. Shaheen MNF. Rotavirus gastroenteritis among hospitalized children under 5 years of age in the eastern mediterranean region: A review. *East Mediterr Heal J* 2019; 25(6): 422-30. <https://doi.org/10.26719/emhj.18.054>
9. Tapisiz A, Bedir Demirdag T, Cura Yayla BC, Gunes C, Ugraş Dikmen A, Tezer H, et al. Rotavirus infections in children in Turkey: A systematic review. *Rev Med Virol* 2019; 29(1): e2020. <https://doi.org/10.1002/rmv.2020>
10. M Ramsay DB. Epidemiology of group a rotaviruses surveillance and burden of disease studies. *Methods Mol Med* 2000; 34: 217-38. <https://doi.org/10.1385/1-59259-078-0:217>
11. Durmaz R, Kalaycioglu AT, Acar S, Bakkaloglu Z, Karagoz A, Korukluoglu G, et al. 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; 9(12): 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113674>
12. Van Damme P, Giaquinto C, Huet F, Gothefors L, Maxwell M, Van Der Wielen M. Multicenter prospective study of the burden of rotavirus acute gastroenteritis in Europe, 2004-2005: The REVEAL study. *J Infect Dis* 2007; 195(Suppl 1): 2004-5. <https://doi.org/10.1086/516714>
13. Kim JS, Kang JO, Cho SC, Jang YT, Min SA, Park TH, et al. 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; 192(Suppl 1): 2-7. <https://doi.org/10.1086/431506>

14. Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ* 1990; 68(2): 171-7.
15. Dereci S, Çiçek AÇ, Acar SS, Bakkaloğlu Z, Özkasap S, Kanber K, et al. Prevalence and genotype distribution of rotaviruses in children with gastroenteritis in rize province. *Bosn J Basic Med Sci* 2015; 15(3):35-39. <https://doi.org/10.17305/bjbm.2015.469>
16. Mohanty E, Dwivedi 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; 53: 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.04.016>
17. Javier M Rodríguez DL. Structural insights into Rotavirus entry. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1215: 45-68. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14741-9_3
18. Asma Sadiq, Nazish Bostan, Kwe Claude Yinda, Saadia Naseem SS. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Rev Med Virol* 2018; 28(6): e2003. <https://doi.org/10.1002/rmv.2003>
19. Norma Santos YH. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 2005; 15(1): 29-56. <https://doi.org/10.1002/rmv.448>
20. Staat MA, Payne DC, Halasa N, Weinberg GA, Donauer S, Wikswo M, et al. Continued evidence of the impact of Rotavirus vaccine in children less than 3 years of age from the United States New Vaccine Surveillance Network: A Multisite Active Surveillance Program, 2006-2016. *Clin Infect Dis* 2020; 71(9): e421-e429. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa150>
21. Santos VS, Nóbrega FA, Soares MWS, Moreira RD, Cuevas LE, Gurgel RQ. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before and after the National Rotavirus Vaccine Program: A review. *Pediatr Infect Dis J* 2018; 37(3): e63-e65. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001770>
22. Ouermi D, Soubeiga D, Nadembega WMC, Sawadogo PM, Zohoncon TM, Obiri-Yeboah D, et al. Molecular epidemiology of Rotavirus in children under five in Africa (2006-2016): A systematic review. *Pak J Biol Sci* 2017; 20(2): 59-69. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2017.59.69>
23. Hungerford D, Allen DJ, Nawaz S, Collins S, Ladhani S, Vivancos R, et al. Impact of Rotavirus vaccination on rotavirus genotype distribution and diversity in England, September 2006 to August 2016. *Euro Surveill* 2019; 24(6): 1700774. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.6.1700774>
24. Jingxin Li, Hong Wang, Dandi Li, Qing Zhang NL. Infection status and circulating strains of rotaviruses in Chinese children younger than 5-years old from 2011 to 2018: systematic review and meta-analysis. *Hum Vaccin Immunother* 2021; 17(6): 1811-7. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1849519>
25. M Yoshinaga, T G Phan, T A Nguyen, H Yan, F Yagyu, S Okitsu, W E G Müller HU. Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. *Arch Virol* 2016; 151(1): 183-92. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0604-z>
26. Gündeşlioğlu ÖÖ, Kocabaş E, Haytoğlu Z, Timurtaş Dayar G, Kiliç Çil M, Durmaz R. Rotavirus prevalence and genotype distribution in children with acute gastroenteritis in Adana Province. *Mikrobiyol Bul* 2018; 52(2): 156-65. <https://doi.org/10.5578/mb.66648>
27. Kahraman H, Altay Koçak A, Albakkour K, Muftah H, Dalgıç B, Çağlar K, et al. Investigation of Group A Rotavirus G10, G12 Genotypes Emerging in Patients with Acute Gastroenteritis in a Tertiary Care Hospital. *Mikrobiyol Bul* 2021; 55(4): 553-67. <https://doi.org/10.5578/mb.20219707>
28. Susana López CFA. Rotavirus genomics. Public health impact. *Salud Publica Mex* 2020; 62(1): 36-41. <https://doi.org/10.21149/9965>.
29. Wang HB, Mo QH, Wang Q, Wu BM, Feng ZL, Lin JC, et al. Probe-free and sensitive detection of diarrhea-causing pathogens using RT-PCR combined high resolution melting analysis. *Biologicals* 2016; 44(5): 360-6. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.06.012>
30. Jesse L Montgomery, Lindsay N Sanford CTW. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10(2): 219-40. <https://doi.org/10.1586/erm.09.84>