



Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Çocuklarda Respiratory Syncytial Virus (RSV) Enfeksiyon İnsidansının Araştırılması

Hatice Hale Gümüş¹, Fügen Yarkın²

1 Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dr Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezi, Adana, Türkiye

2 Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

Gelis: 16.10.2021; Revizyon: 25.01.2022; Kabul Tarihi: 26.01.2022

Öz

Amaç: Respiratory syncytial virus (RSV) bütün dünyada infant ve çocuklarda yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden alt solunum yolu enfeksiyonlarının majör sebebidir. Bu çalışmada amacımız hastanede yatan ve alt solunum yolu enfeksiyonu olan infant ve çocuklarda RSV enfeksiyonlarının insidansının araştırmak ve tanı yöntemi olarak direkt immunfloresan test ile ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (Reverse Transcription Polymerase Chain Recation; RT-PCR) testlerini karşılaştırmaktır.

Yöntemler: Çalışmaya Ocak 2011 ve Ocak 2012 tarihleri arasında alt solunum yolu enfeksiyonu olup hastaneye yatırılan toplam 323 hastayı (0-15 yaş) dahil ettik. Floklueküvyon (Copan Diagnostics, Italy) ile alınan nazofaringeal sürüntü örneklerinde RSV antijenini direkt immunfloresan test (Argene SA, France) ile, RSV RNA varlığını ise in-housenested RT-PCR yöntemi ile araştırdık.

Bulgular: Toplam 323 örneğin 95'inde (%29,4) RT-PCR ile RSV RNA, 88'inde (%27,6) ise direkt immunfloresan test yöntemi ile RSV antijen pozitifliği tespit ettik. Örneklerin 80'inini (%25) her iki yöntem ile pozitif, 220'sini (%68) ise her iki yöntem ile negatif bulduk. RT-PCR testine göre kıyasladığımızda direkt immunfloresan testinin sensitivitesini %84,2, spesifitesini %96,5, pozitif prediktif değerini %91 ve negatif prediktif değerini %93,6 bulduk.

Sonuç: Çalışma grubunda RSV enfeksiyonlarının insidansının (%29,4) oldukça yüksek olduğunu tespit ettik. Sonuç olarak antiviral tedavinin erken başlanması ve nozokomiyal yayılımın azaltılması için %84 gibi yüksek sensitivite gösteren, daha hızlı bir test (2.5 saate karşılık 12 saat) olan direkt immunfloresan testinin ilk tanı testi olarak kullanılmasını ve test sonucu negatif bulunan örneklerin RT-PCR ile çalışılmasını öneriyoruz.

Anahtar kelimeler: Pnömoni, Respiratory syncytial virus, Direkt immunfloresan test, Polimeraz zincir reaksiyonu, Adana, Türkiye

DOI: 10.5798/dicletip.1086358

Yazışma Adresi / Correspondence: Hatice Hale Gümüş, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana Dr Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye e-mail: hhaleag01@hotmail.com

The Investigation of Respiratory syncytial virus (RSV) Infection Incidence in Children with Lower Respiratory Tract Infection

Abstract

Objective: Respiratory syncytial virus (RSV) is a leading cause of lower respiratory tract infections in infants and children worldwide. In this study, our aim is to investigate the incidence of RSV infections in hospitalized infants and children with lower respiratory tract infections, and to compare direct immunofluorescence test and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) tests as a diagnostic method.

Methods: We conducted the study with a total of 323 patients (0-15 years old) hospitalized with lower respiratory tract infections between January 2011 and January 2012. We investigated the RSV antigen by direct immunofluorescence test (Argene SA, France), and the presence of RSV RNA by in-house nested RT-PCR method in nasopharyngeal swab samples taken with a flocced swab (Copan Diagnostics, Italy).

Results: We detected RSV RNA positivity in 95 (29.4%) of 323 samples by RT-PCR, and RSV antigen positivity in 88 (27.6%) samples by direct immunofluorescence test method. We found that 80 (25%) of the samples were positive, and 220 (68%) were negative with both diagnostic methods. We found that the direct immunofluorescence test had a sensitivity of 84.2%, a specificity 96.5%, a positive predictive value 91%, and a negative predictive value 93.6% when compared to the RT-PCR test.

Conclusion: We found that the incidence of RSV infections (29.4%) in the study group was quite high. We recommend that the direct immunofluorescence test, which is a faster test (2.5 hours vs 12 hours) with a high sensitivity of 84%, should be used as the first diagnostic test for early initiation of antiviral treatment and reduction of nosocomial spread, and the samples with negative results should be studied by RT-PCR.

Keywords: Pneumonia, Respiratory syncytial virus, Direct immunofluorescence test, Polymerase chain reaction, Adana, Turkey.

GİRİş

Alt solunum yolu enfeksiyonları (ASYE), bütün dünyada özellikle gelişmekte olan ülkelerde süt çocuğu ve okul öncesi yaş gruplarında en önemli mortalite ve morbidite sebeplerinden biridir. Dünyada Respiratory syncytial virus'un (RSV) küçük çocuklarda yılda 30 milyondan fazla akut ASYE'ye neden olduğu ve üç milyondan fazla ağır vaka ile en sık hastaneye yatış nedeni olduğu tahmin edilmektedir^{1,2}. Ülkemizde ise Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı verilerine göre 0-1 yaş grubunda bebek ölümlerinin %48,4'ünden, 1-4 yaş arasında %42,1'inden ASYE sorumludur³. Çocukluk çağı ASYE'lerinin en önemli sebebi solunum yolu virusları olup en sık etken RSV'dir. Küçük çocuklarda RSV'ye bağlı ASYE'larına atfedilen küresel ölüm oranı yılda 150.000 kadar yüksek olduğu tahmin edilmektedir².

RSV, Mononegavirales takımındaki Paramyxoviridae ailesine ait, segmentsiz, tek

zincirli bir RNA virusudur⁴. RSV çok bulaşıcı bir virus olduğu için ve immun yetmezliği olan enfekte çocuklarda virüs saçılım süresi uzun olduğu için hastane kaynaklı enfeksiyon oranları yüksektir. RSV'ye bağlı mortalite oranı yüksek risk grubundaki bebeklerde (6 haftadan küçük bebekler, prematüre bebekler, bronkopulmoner displazi, kistik fibrozis, konjenital veya immun yetmezliği, konjenital kalp hastalığı, kemik iliği ve solid organ transplantasyonu, nörolojik ve metabolik hastalığı olan bebekler) %30'un üzerindedir. Bu sebeple nozokomiyal salgınların önlenmesinde enfekte kişilerin hızlı tanısı esastır^{5,6}. RSV tanısında hastalardan alınan nazofaringeal sürüntü veya aspirat, balgam ve bronko alveolar lavaj gibi solunum yolu örneklerinde hücre kültürü tekniği ile virusun izolasyonu, direkt veya indirekt immunfloresan testler, seroloji, kromatografik teknikler ile antijen veya antikor

tespiti, moleküler testler ile viral genomun tespiti gibi yöntemler kullanılmaktadır^{1,5}.

Çalışmamızda amacımız hastanede yatan ve ASYE olan infant ve çocuklarda RSV enfeksiyon insidansını araştırmak ve tanı yöntemi olarak direkt immunfloresan test (DFA) ile ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (Reverse Transcription Polymerase Chain Recation; RT-PCR) testlerini karşılaştırmaktır.

RSV enfeksiyonlarının, duyarlılık ve özgüllük açısından en uygun laboratuvar testleri kullanılarak hızlı ve doğru tanısının konması sayesinde virus yayılımının önlenmesine yönelik enfeksiyon kontrol önlemlerinin zamanında alınması, gereksiz antibiyotik tedavisinin önüne geçilmesi, gecikmeksizin doğru antiviral tedavinin başlanması, bunun sonucunda hastanede yatış sürelerinin kısalması ve mali yükün azalması mümkün olacaktır.

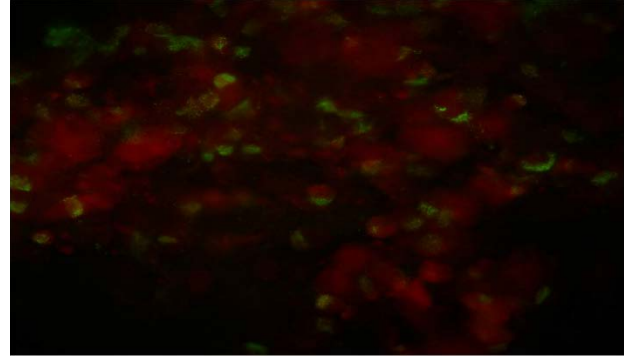
YÖNTEMLER

Bu çalışmaya Ekim 2011 - Ekim 2012 tarihleri arasında, üçüncü basamak bir üniversite hastanesinde alt solunum yolu enfeksiyonu (bronşit, bronşiolit, pnömoni, astım) tanısı alarak tedavi edilmek üzere yatışı yapılan 0-15 yaş grubundaki 323 hasta dahil edildi. Çocuklar ve bebekler, aşağıdaki semptomlardan bir veya daha fazlasına sahip oldukları tespit edildi ise çalışmaya uygun kabul edildi: solunum sıkıntısı, burun akıntısı, burun tıkanıklığı, öksürük, ateş.

Hastalardan hastaneye yatışın ilk 48 saatinde sterilnazofaringeal naylon floklueküvyon (Copan Diagnostics, Brescia, Italy) ile nazofaringeal sürüntü (NFS) örnekleri toplanarak 3ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PhosphateBufferedSaline; PBS) bulunan transport tüpünde en kısa sürede laboratuvara taşındı.

Direkt İmmunfloresan Test (DFA) ile antijen tespiti: Toplanan NFS örnekleri (0.5ml) 5ml PBS ile resüspanse edilerek 180g'de (2000rpm) 10 dakika (+4°C) santrifüj edildi. Sediment 10ml

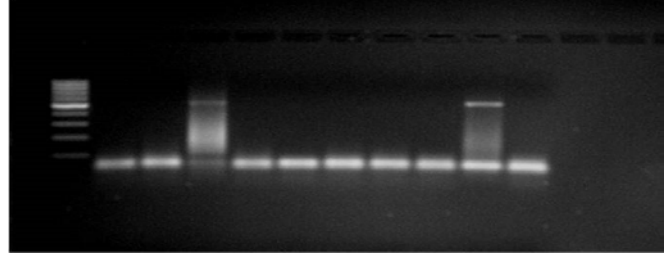
PBS ile mukus içeriğine göre iki veya üç kez yıkandı. Her hastaya ait sediment (30µl) immunfloresan preparatlarına yayıldı. Preparatlar etüvde (35-37°C) tamamen kuruyuncaya kadar inkübe edildikten sonra soğuk aseton (+4°C) ile en az 10 dakika fikse edildi ve oda ısısında kurumaya bırakıldı. Preparatlar mikroskopik incelemeye kadar -20°C'de saklandı. RSV antijeninin DFA yöntemi ile tespiti, doğrudan NFS örneğinde üretici firmanın önerileri doğrultusunda spesifik floresan işaretli konjugemonoklonal antikor (Argene RSV DFA Kit, Varilhes, France) kullanılarak gerçekleştirildi. Preparatlar floresan mikroskopunda 25X veya 40X büyütme ile antijen (sitoplazmik inklüzyonlar) varlığı açısından incelendi (Şekil 1).



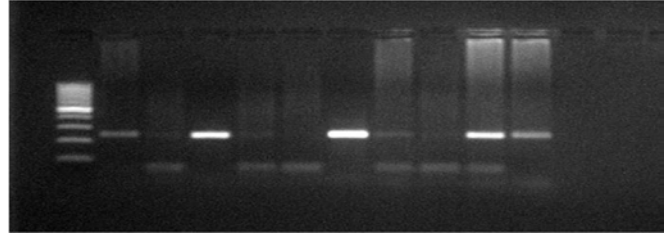
Şekil 1. Direkt immunfloresan test ile RSV antijenini pozitif saptadığımız bir hastanın floresan mikroskopundaki (40X) görüntüsü

RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Sentezi: Hasta örneklerinden (200µl) RNA ekstraksiyonu yüksek saflıkta viral RNA ekstraksiyon kiti (High PureViral RNA Extraction, Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen RNA ekstraktları 50µl elüsyon tamponu (Roche Diagnostics, Germany) içinde çözülerek analize kadar -20°C'de saklandı. RNA ekstraktlarından cDNA sentezi yapmak için; 5µl RNA ekstraktı, F1-F2 primerleri (25pmol), RT Buffer, 20IU RNasin, her bir dNTP'den 10mM ve ters-transkriptaz (Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; M-MuLV RT, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Canada) içeren reaksiyon karışımı 42°C'de 60 dakika, 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA'lar amplifikasyon işlemine kadar -80°C'de saklandı.

Nested RT-PCR: İlk aşamada RSV'nin F geninde bulunan 6090-6628 nukleotidleri arasındaki 539 bp uzunluğundaki bir bölgenin amplifikasyonu yapıldı, sonra bu bölgenin içindeki 6222-6463 nukleotidleri arasında bulunan 243 bp uzunluğundaki bölgenin tekrar amplifikasyonu ile nested RT-PCR gerçekleştirildi (Şekil 2). İlk amplifikasyon 10xTaq Buffer [100 mMTris-HCl (pH 8.8), 500 mMKCl], 1.5 mM MgCl₂, her bir dNTP'den 200mM, her bir primerden 25pmol (0.5pmol/μl), 2U (5U/μl) Taq DNA polymerase (Fermentas) ve 5μl cDNA içeren toplam 50μl PCR karışımında gerçekleştirildi. PCR reaksiyon karışımı içeren tüpler MJ Mini Personal Thermal Cycler Cihazında (Bio-Rad Life ScienceResearch, France) ön denatürasyon için 94°C'de 3 dakika, 40 siklus şeklinde sırası ile denatürasyon için 94°C'de 1 dakika, bağlanma için 55°C'de 1 dakika, uzama için 72°C'de 1 dakika ve final uzama için 72°C'de 10 dakika ısı döngüsü programında işleme alındı. Amplikonla retidyum bromürlü %2 agaroz jel elektroforez ile yürütüldü ve jel görüntüleme sisteminde 539 bp bantlar incelendi. İlk aşama amplifikasyonda pozitif çıkan amplikonlar ikinci aşama PCR işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon 10X TaqBuffer [100mM Tris-HCl (pH 8,8), 500mM KCl], 1,5mM MgCl₂, herbirdNTP'den 200mM, her bir primerden 25pmol (0,5pmol/μl), 2U (5U/μl) Taq DNA polymerase (Fermentas) ve 2μl amplikon içeren toplam 50μl PCR karışımında gerçekleştirildi. PCR reaksiyon karışımı içeren tüpler MJ Mini Personal Thermal Cycler Cihazında (Bio-Rad Life ScienceResearch, France) ön denatürasyon için 94°C'de 3 dakika, 40 siklus şeklinde sırası ile denatürasyon için 94°C'de 1 dakika,bağlanma için 45°C'de 1 dakika, uzama için 72°C'de 1 dakika ve final uzama için 72°C'de 10 dakika olan ısı döngüsü programında işleme alındı. Amplikonlaretidyum bromürlü %2 agaroz jel elektroforez yöntemi ile yürütüldü. Bantlar jel görüntüleme sisteminde (DNR Bio-ImagingSystemsVisible&UltravioletTransilluminator, Mini BIS Bio-Imaging System) görüntülenerek 539bp veya 243bp'de band veren RSV pozitif örneklerin varlığı analiz edildi (Şekil 2).



Şekil 2 a: Nested RT-PCR'nin ilk aşaması sonrası amplifikasyon ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi (Soldan sağa doğru: 1; 100bp DNA ladder. 2-11; Hastaların amplikonları. 4 ve 10 numaralı hastaların amplikonlarında 539bp band varlığı ile RSV pozitifliği mevcuttur).



Şekil 2 a: Nested RT-PCR'nin ikinci aşaması sonrası amplifikasyon ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi (Soldan sağa doğru: 1; 100bp DNA ladder. 2-10; Hastaların amplikonları. 11; Pozitif kontrol. 3, 6 ve 8 numaralı hastalarda, 11 numaralı pozitif kontrol örneğinde 243bp band varlığı ile RSV pozitifliği görülmektedir).

İstatistiksel Analiz: Çalışmamızın istatistiksel analizinde Statistical Packagefor the Social Sciences (SPSS version 11.5; SPSS Inc, Chicago, USA) ve EpiInfo Software (EpiInfoversion 6.0; CentersforDisease Control and Prevention, Atlanta, USA) kullanıldı. Veriler arasında karşılaştırma yaparken Pearson Chi Square, Yates Continuity Correction ve Fisher'sExact testlerinden yararlanıldı. p değeri <0.05 olan sonuçlar anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma grubundaki 0-15 yaş aralığında olan toplam 323 hastanın 208'i (%64,4) erkek, 115'i (%35,6) kız idi. Bunların %49,3'ü 0-2 yaş (%61,7'si erkek), %23,8'i 3-5 yaş (%70,1'i erkek), %26,9'u yaş 6-15 yaş grubunda (%63,1'i erkek) idi. ASYE olan çocukların cinsiyetlerinin yaş grubuna göre dağılımı istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bir fark saptanmadı (χ^2 değeri=0.106; $p>0.05$) (Tablo I).

Tablo I: Hastaların demografik, klinik ve tanı özelliklerinin RSV ile ilişkisinin analizi.

	RSV (+)		RSV (-)		Toplam		p değeri	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%		
Yaş								
0-2	64	39.5	98	60.5	162	50	<0.05	
3-5	19	24.7	58	75.3	77	24		
6-15	12	14.3	72	85.7	84	26		
Cinsiyet								
Kız	32	27.8	83	72.2	115	35.6	>0.05	
Erkek	63	30.3	145	69.7	208	64.4		
Mevsim								
Sonbahar	33	41	47	59	80	25	>0.05*	
Kış	43	29	105	71	148	46		
İlkbahar	12	17.6	56	82.4	68	21		
Yaz	7	26	20	74	27	8		
Aylar								
Ocak	13	22.4	45	77.6	58	17.9	**	
Şubat	13	27.7	34	72.3	47	14.5		
Mart	4	16	21	84	25	7.7		
Nisan	5	22	18	78	23	7.2		
Mayıs	3	15	17	85	20	6.2		
Haziran	2	33	4	67	6	1.8		
Temmuz	2	25	6	75	8	2.5		
Ağustos	5	38.5	8	61.5	13	4.1		
Eylül	2	40	3	60	5	1.5		
Ekim	15	43	20	57	35	10.9		
Kasım	16	40	24	60	40	12.4		
Aralık	15	34.8	28	65.2	43	13.3		
Belirtiler								
Ateş	58	31.4	127	72.6	185	57.3		>0.05
Öksürük	79	36.4	138	63.6	217	67.2		
Burun akıntısı	64	34.6	121	66.4	185	57.3		
Solunum sıkıntısı	57	39.6	87	60.4	144	44.6		
Morarma	3	5.9	48	94.1	51	15.8		
Kusma	18	82	4	18	22	6.8		
Beslenme yetersizliği	30	34.5	57	65.5	87	26.9		
Diğer***	6	16.2	31	83.8	37	11.5		
Ek hastalıklar								
Yok	35	27.3	93	72.7	128	39.6	>0.05	
Kronik akciğer hastalığı	8	36.4	14	63.6	22	6.8		
Hematolojik hastalık	15	27.8	39	72.2	54	16.7		
İmmunolojik hastalık	5	38.5	8	61.5	13	4.0		
Kardiak hastalık	12	38.7	19	61.3	31	9.6		
Metabolik hastalık	6	27.3	16	72.7	22	6.8		
Nörolojik hastalık	7	20.6	27	79.4	34	10.5		
Onkolojik hastalık	7	36.8	12	63.2	19	5.9		
Klinik tanı								
Bronşiyolit	59	57.3	44	42.7	103	31.9	<0.05	
Pnömoni	30	21.4	110	78.6	140	43.3		
Bronşit	4	7.7	48	92.3	52	16.1		
Astım	2	7.1	26	92.9	28	8.7		
Örnek alınma zamanı								
≤ 5 gün	69	54.3	58	45.7	127	39.3	<0.05	
6-10 gün	24	23.1	80	76.9	104	32.2		
11≤ gün	2	2.2	90	97.8	92	28.5		
Tanı testi								
DFA	88	27.6	235	72.4	323	100	-	
RT-PCR	95	29.4	228	70.6	323	100		

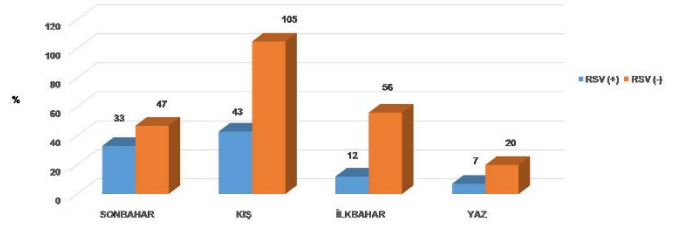
*Yaz mevsiminde hasta sayısının az (29 vaka) olması oranın yüksek (%37.9) gözlenmesine sebep olduğu için yaz mevsimi hariç tutularak yapılan ileri istatistiksel analizde %39.7 RSV pozitifliği ile sonbaharın birinci sırada, %27.7 ile kışın ikinci sırada ve %17.6 ile ilkbaharın üçüncü sırada yer aldığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($\chi^2= 8.800$; $sd=2$; $p<0.05$).

** Cochran ilkelerine göre en küçük beklenen değer 1.47 ile uygun olsa da, vaka sayısı 5'in altında beklenen hücre sayısı (%25) %20'yi aştığı için ki-kare sonuçları değerlendirmeye tabi tutulamamıştır.

***Diğer; ishal ve bilinç bulanıklığı belirtilerini içermektedir.

ASYE olan 323 çocuğun %29,4'ünde (95/323) RSV RNA pozitifliği tespit edildi. Bu hastaların %67,4'ü (64/95) erkek, %32,6'sı (31/95) kız idi. RSV RNA pozitifliğinin cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde erkek ve kızlarda RSV pozitifliği açısından istatistiksel olarak fark saptanmadı (Yates=0.351; sd=1; p>0.05). RSV RNA pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı incelendiğinde RSV pozitifliğinin yaş arttıkça anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($\chi^2= 20.053$; sd=2; p<0.001). Bu azalmanın her iki cins için de geçerli olduğu saptandı (Tablo I).

Hastaların ASYE sebebi ile hastaneye başvurduğu mevsimler sıklık sırasıyla kış, sonbahar, ilkbahar ve yaz olmak üzere tüm yılı içermekte idi (Tablo I). RSV pozitifliğinin mevsimlere göre dağılımı incelendiğinde en yüksek pozitifliğin %39,7 (31/78) ile sonbaharda görüldüğü, bunu %37,9 (11/29) ile yaz, %27,7 (41/148) ile kış ve %17,6 (12/68) ile ilkbahar mevsimlerinin izlediği ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($\chi^2= 9.766$; sd=3; p<0.05). Yaz mevsiminde hasta sayısının az (29 vaka) olması oranın yüksek (%37,9) gözlenmesine sebep olduğu için yaz mevsimi hariç tutularak yapılan ileri istatistiksel analizde %39,7 RSV pozitifliği ile sonbaharın birinci sırada, %27,7 ile kışın ikinci sırada ve %17,6 ile ilkbaharın üçüncü sırada yer aldığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($\chi^2= 8.800$; sd=2; p<0.05). RSV vakalarının aylara göre dağılımına bakıldığında pik yaptığı aylar 15'er vaka ile (%15,8; %15; %15,8) Ekim, Kasım ve Aralık olarak tespit edildi. Ocak ve Şubat aylarında da (%13,6; %13,6) yüksek RSV RNA pozitifliği gözlemlendi (Grafik 1).



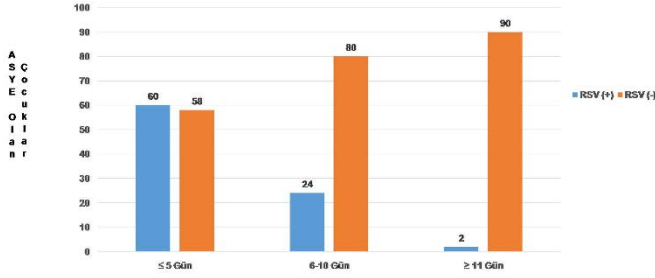
Grafik 1. Alt solunum yolu enfeksiyonu ile olan çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin mevsimlere göre dağılımı

RSV RNA pozitif olan 95 ASYE'li çocuğun başvuru anındaki semptomları sorgulandığında 58'inde (%61) ateş, 79'unda (%83) öksürük, 64'ünde (%67) burun akıntısı, 57'sinde (%60) solunum sıkıntısı, 3'ünde (%3) morarma, 18'inde (%19) kusma, 30'unda (%31) beslenme yetersizliği, 5'inde (%5) ishal ve 1'inde (%1) bilinç bulanıklığı vardı (Tablo I). Hastalık belirtileri yönünden RSV pozitif ve RSV negatif hastalar arasında morarma ve kusma şikayetleri dışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($\chi^2= 8.290$; sd=5; p>0.05).

ASYE olan 323 çocuğun klinik tanıları ve RSV ile ilişkisi Tablo I'de özetlenmiştir. RSV pozitif hastalarda en çok görülen hastalık %57,3 oran (59/103) ile bronşiyolit olup bu oran; %21,4'lük pnömoni (30/140), %7,7'lik bronşit (4/52), %7,1'lik astım (2/28) görülme sıklığına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ($\chi^2=61.336$; df=3; p<0.001).

Hastaların klinik örneklerinin belirtilerin başlamasından sonra alınma zamanı ve RSV varlığı ile ilişkisi Tablo I'de özetlenmiştir. İlk beş günde alınan örneklerin %54,3'ü (69/127) RSV RNA pozitif iken, 6-10 günde %23,1'i (24/104), on bir günden sonra alınan örneklerin ise %2,2'si (2/92) pozitif. İlk beş günde örnek alınan hastalardaki RSV pozitifliği (%54,3) ileri dönemlerde örnek alınanlara göre (%23,1 ve %2,2) anlamlı ölçüde yüksekti ($\chi^2=73.96$; df=2; p<0.001). İlk 5 güne göre 6-10 gün arasında

örnek alınanlarda RSV pozitifliği %25'e, 11 gün ve sonrasında ise %2'ye düştüğü gözlemlendi (χ^2 teğim=71.746, $p<0.001$) (Grafik 2).



Grafik 2. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda RSV pozitifliğinin örnek alınma zamanına göre dağılımı

ASYE olan 323 hastanın %60,4'ünün (195/323) altta yatan bir hastalığı mevcut idi. Bu hastalıklar lösemi, talassemi gibi hematolojik hastalıklar, nöroblastom, medullablastom, yolk sac tümör gibi onkolojik hastalıklar, kistikfibrozis, histiositosis gibi kronik akciğer hastalığı, ventrikülerseptaldefekt, atrialseptaldefekt, kardiyak hastalıklar, nötrofil fonksiyon bozukluğu, prematürite gibi immünojenik hastalıklar, ensefalit, menenjit gibi nörolojik hastalıklar veya tirozinemi, glikojen depo hastalığı gibi metabolik hastalıkları içermekte idi. RSV pozitif hastaların ise %63,2'sinde (60/95) ek bir hastalık mevcuttu. Herhangi bir hastalığın varlığı RSV pozitifliğini etkilememekte idi (Yates $\chi^2= 0.287$; $sd=1$; $p>0.05$). Hastalık gruplarına göre değerlendirildiğinde ise ("hastalık yok" karşılık akciğer hastalığı, hematolojik hastalık, immünojenik hastalık, kalp hastalığı, metabolik hastalık, nörolojik hastalık, onkolojik hastalık varlığı) yine bir fark bulunmadı ($\chi^2= 4.478$; $sd=7$; $p>0.05$).

DFA testi ile 323 örneğin %27,6'sında RSV antijen pozitifliği bulundu. Örneklerin 80'i (%25) hem DFA testi hem de RT-PCR testi ile pozitif bulunurken, 220'si (%68) her iki yöntemle negatif bulundu. RT-PCR testine göre kıyaslandığında DFA testinin sensitivitesi %84,2, spesifitesi %96,5, pozitif prediktif değeri (PPV) %91 ve negatif prediktif değeri (NPV) %93,6 olarak bulundu.

Nested RT-PCR yönteminde ekstraksiyon işlemi için 130 dakika, cDNA sentezi aşaması için 90 dakika, ilk amplifikasyon işlemi için 190 dakika, elektroforezde görüntüleme için 60 dakika, ikinci amplifikasyon işlemi için 190 dakika ve elektroforezde tekrar görüntüleme için 60 dakika gerekmekte idi. Nested RT-PCR aralıksız çalışıldığında sonuç alma süresi toplam 12 saat idi. DFA testinde ise örneklerden preparatların hazırlanarak fikse edilmesi işlemi 60 dakika, direkt floresansmikroskopisi için hazırlık ve mikroskopik inceleme 90 dakika sürdü. DFA testi ile 2.5 saatte sonuç alınabildiği gözlemlendi.

TARTIŞMA

RSV, özellikle küçük çocuklarda ağır hastalık ve ölümlere neden olan önemli bir solunum patojeni olarak uzun zamandır bilinmektedir. RSV ile ilişkili ASYE'lerin küresel yükünün yıllık 33 milyon olduğu, 5 yaşın altındaki çocuklarda 3 milyondan fazla hastaneye yatış ve 59.600 hastane içi ölümlerle sonuçlandığı tahmin edilmektedir⁷.

ASYE olan çocuklarda RSV insidansı bölgeden bölgeye değişmektedir. Çocuklarda RSV sıklığı Avrupa ülkelerinde yapılan bir meta-analizde %46, İngiltere'de %53 rapor edilmiştir^{8,9}. Amerika'da 4 yaş altındaki çocuklarda RSV ile ilişkili hospitalizasyon oranı %13,4 bildirilmiştir¹⁰. Brezilya'da 5 yaş altındaki çocuklarda RSV insidansı %27-64 bildirilmiştir^{11,12}. Orta Doğu ve Kuzey Afrika bölgelerinde yıllık RSV prevalansı 2001-2002 sezonunda %15-40 iken, 2016-2017 sezonunda %20-50 bildirilmiştir¹³. Avustralya'da RSV insidansı %65,9 bildirilmiştir¹⁴. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise ASYE olan çocuklarda RSV enfeksiyonu insidansı %19,6-63 arasında rapor edilmiştir¹⁵⁻²⁰.

Çalışmamızda ASYE sebebi ile hastaneye yatışı yapılan 0-15 yaş aralığındaki çocuklarda RSV RNA pozitifliğini %29,4 tespit ettik. Antalya'da Sağlık ve arkadaşlarının hücre kültürü yöntemi

ile yaptıkları çalışmada da RSV pozitifliği %26,5 bildirilmiştir¹⁶. Bununla birlikte, İstanbul'da Şık ve arkadaşları ASYE olan çocuklarda RSV sıklığını PCR yöntemi ile daha yüksek (%45) bildirmiş olup, bu yüksek oranın çalışma grubunun yoğun bakım gerektiren sınırlı bir hasta topluluğunu (n=80) içermesinden ve bölgesel farklılıktan kaynaklanmış olabileceğini düşündürmüştür¹⁷. Pelit ve arkadaşları İstanbul'da ASYE olan 1 ay - 5 yaş aralığındaki 260 olguda yaptıkları çalışmada RSV sıklığını %35,3 bildirmişlerdir¹⁸. Ankara'da Koyuncu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da %38,1 gibi yüksek bir insidans bildirilmiş olup, bu yüksek oran metodolojik farklılıktan (hızlı antijen testi) kaynaklanmış olabilir¹⁹. İzmir'de Karakoyun ve arkadaşları da hızlı antijen testi ile ASYE olan çocuklarda yaptıkları çalışmada RSV sıklığını %63 bildirmiş olup, bu yüksek oranın bölgesel farklılık, yöntem farklılığı ve çalışma grubunun küçük yaşları (<2 yaş) içermesinden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür²⁰. Alan ve arkadaşları ise Türkiye'de çok merkezli olarak yürüttükleri çalışmada yoğun bakım ünitelerinde (n=1277) RSV sıklığını %19,6 olarak rapor etmiş olup, bu düşük oranı yoğun bakımların heterojen olması ile açıklamışlardır¹⁵.

ASYE'ler özellikle gelişmekte olan ülkelerde erken çocukluk döneminde (0-4 yaş) hospitalizasyonun en sık sebebidir. Hastaların üçte birini bir yaşından küçük çocuklar oluşturmaktadır ve erkeklerde hospitalizasyon oranı kızlardan fazladır¹. Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak ASYE olan çocukların yaklaşık olarak yarısı (%49,2) 2 yaşın altındaydı ve %64,4'ü erkekti. RSV RNA pozitif olan hastalar arasında da cinsiyeti erkek olanların ve yaşı 2'den küçük olanların oranı %67,4 idi. Her iki cinsiyet için de RSV pozitifliği riskinin yaş arttıkça azaldığını ve aynı zamanda 2 yaş altındaki RSV enfeksiyon oranının (%40,3) ileri yaşta olanlardan daha yüksek olduğunu gözlemledik. Sağlık ve arkadaşları da benzer

şekilde hastaların çoğunun (%62,7) 2 yaş altı çocuklardan oluştuğunu, hastaların %56,2'sinin erkek olduğunu bildirmişlerdir¹⁶. Alan ve arkadaşları da çok merkezli çalışmalarında bütün çocukların 2 yaşından önce en az bir kez RSV ile enfekte olduğunu bildirmişlerdir¹⁵. Avrupa verileri de RSV enfeksiyonlarına bağlı hastaneye yatış oranı ile yaş arasında ters orantılı bir ilişki olduğunu ve yaşamın ilk aylarında hastaneye yatışın maksimum olduğunu bildirmişlerdir⁸. Orta Doğu ve Kuzey Afrika bölgelerinde de RSV ile enfekte çocukların %68,6'sının on iki aydan küçük olduğu rapor edilmiştir¹³.

RSV enfeksiyonları ılıman bölgelerde (kış salgınları) belirgin bir mevsimsel patern izlerken, yağışlı mevsimlerde veya tropik bölgelerde tüm yıl boyunca ortaya çıkabilir². Çalışmamızda RSV RNA pozitifliğini en sık kış (%45,3) ve sonbahar (%32,6) mevsimlerinde tespit ettik. Ek olarak, RSV'ye bağlı ASYE'lerin yıl boyunca görülebildiğini, olguların en çok Ekim, Kasım ve Aralık'ta olduğunu, bu ayları Ocak ve Şubat aylarının takip ettiğini gözlemledik. RSV pozitifliği İstanbul'da en sık Aralık ve Şubat'ta, Ankara'da Ocak ve Şubat'ta, Antalya'da Ocak, Şubat, Mart aylarında bildirilmiştir¹⁶⁻¹⁹. Alan ve arkadaşları çok merkezli çalışmalarında RSV ile ilişkili ASYE sebebi ile hastaneye yatışların en sık sırası ile Şubat, Mart ve Ocak aylarında olduğunu rapor etmişlerdir¹⁵. Avrupa'nın çeşitli ülkelerinde de RSV'nin mevsimsel dağılımı özellikle kış mevsiminde olmak üzere, bazılarında Ocak-Şubat, bazılarında Aralık-Şubat, bazılarında Ocak-Mart veya Şubat-Mayıs aylarında maksimum zirvesine ulaştığı bildirilmiştir⁸. Orta Doğu ve Kuzey Afrika bölgelerinde de RSV pozitifliğinin en sık Kasım, Aralık, Ocak ve Şubat aylarında olduğu bildirilmiştir¹³.

Çalışmamızda RSV RNA pozitif bulunan çocuklarda en sık görülen belirtiler öksürük (%83), burun akıntısı (%67), ateş (%61) ve solunum sıkıntısı (%60) idi. Morarma ve kusma

şikayetleri RSV varlığından ziyade altta yatan kardiyak ve metabolik hastalıklara bağlı gelişen belirtilerdi. Koyuncu ve arkadaşları ASYE sebebi ile başvuran çocuklar arasında RSV pozitif olanlarda çalışmamıza benzer şekilde öksürük, hırıltı, burun akıntısı, ateş, solunum sıkıntısı gözlendiğini rapor etmişlerdir¹⁹. Alan ve arkadaşları da en sık belirtilerin benzer şekilde öksürük ve burun akıntısı olduğunu, bunları siyanoz, apne ve ateşin takip ettiğini rapor etmişlerdir¹⁵.

Viral solunum yolu enfeksiyonların davirus saçılımı özellikle ilk 3 gün yoğun miktarda olmak üzere bir hafta kadar sürmektedir. Bu süre infantlarda ve genç çocuklarda 3-4 haftaya kadar uzayabilmektedir. Çalışmamızda nazofaringeal örneklerin toplanma zamanı RSV RNA pozitif hastaların %73'ünde semptomların başlangıcından sonraki ilk 5 gün, %25'inde 6-10 günler arasında idi. Semptomların başlangıcından sonraki 6-10 gün arasında alınan 24 örneğin pozitif çıkması bu hasta grubunun %50'sinin (12/24) 0-6 ay ve %41,7'sinin de (10/24) 7-24 ay yaş grubunda olmak üzere toplam %91,7'sinin 24 ayın altında olması ile ilişkilidir. Bu sonuçlar RSV ilişkili ASYE olan küçük çocuklarda uzun süreli virüs saçılımı olmasını desteklemektedir. Çalışmamızda ilk 5 güne göre 6-10 gün arasında örnek alınanlarda RSV pozitifliğin %25'e, 11 gün ve sonrasında ise %2'ye düştüğünü gözledik. Koyuncu ve arkadaşları da RSV pozitifliğini semptomların ilk 5 gününde başvuranlarda anlamlı olarak daha yüksek bulduklarını bildirmişlerdir¹⁹.

RSV ile ilişkili ASYE'lere bağlı mortalite oranı %7-40 olarak tahmin edilmektedir¹. Hastane ortamında RSV'nin bir aya kadar sürebilen yayılımı söz konusu olduğu için hızlı tanı hem hasta yönetimi hem de enfeksiyonun nozokomiyal yayılımının önlenmesi için önemlidir. Çalışmamızda RT-PCR testine göre kıyaslandığında DFA testinin sensitivitesini %84,2, spesifitesini %96,5, PPD %91 ve NPD

%93,6 olarak tespit ettik. Sağlık ve arkadaşları hücre kültürü yöntemi referans alınarak DFA testinin duyarlılığını %88,4, spesifitesini %96,6, PPD %90,5 ve NPD %95,8 olarak çalışmamız ile benzer oranlar saptadıklarını bildirmişlerdir¹⁶. RSV tanısında kullanılan metodların sensitivite ve spesifitesinin yüksek olması kadar işlem için gereken sürenin kısa olması da önemlidir. Çalışmamızda DFA testinde örneklerin işlenmesinden sonuç alınmasına kadar gereken sürenin yaklaşık olarak 2.5 saat olduğunu tespit ettik. PCR metodunda ise ekstraksiyon danamplikonların görüntülenmesine kadar olan aşamalar için gereken süre aralıksız çalışılırsa toplam 12 saat idi. RSV'nin hızlı tanısı için öncelikle yüksek sensitiviteye sahip DFA testi ile örneklerin analiz edilmesi uygun olacaktır.

RSV enfeksiyonları ile ilgili bir başka dikkat çeken nokta ikinci bir solunum yolu virüsü ile mikst enfeksiyonu kolaylaştırıyor olmasıdır. Human rhinovirus (hRV), parainfluenza virus (PIV), influenza virus ve humanmetapneumo virus (hMPV) ile RSV koenfeksiyon oranları %5-10 olarak bildirilmiştir¹³. Human coronavirus'ların (hCoVs) %11-46 oranında diğer solunum yolu virüsleri ile koenfeksiyon yaptıkları bilinmektedir²¹. COVID-19 pandemisi devam ederken diğer solunum yolu virüsleri ile koenfeksiyon ihtimali göz önünde tutulmalı ve ayırıcı tanı yapılmalıdır²². Bu konuda daha geniş ölçekli, çoklu etkenlerin tarandığı seroepidemiolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak çalışmamızda RSV enfeksiyonlarının insidansını %29,4 tespit ettik. RSV enfeksiyonlarının hızlı tanısı antiviral tedaviye erken başlanması, rasyonel antibiyotik kullanımı, hastanede yatış sürelerinin azaltılması, hasta yönetimi, maliyetin azaltılması, korunma ve kontrol önlemlerinin erken alınabilmesi, hastane enfeksiyonlarının yayılımının azaltılması için son derece önemlidir. RT-PCR testine göre %84,2 sensitivite ve %96,5 spesifite gösteren DFA

testinin RSV enfeksiyonlarının rutin tanısında ilk tarama testi olarak kullanılması ve test sonucu negatif bulunan örneklerin RT-PCR ile çalışılması öneriyoruz.

Teşekkür: İstatistiksel analize katkılarından dolayı Prof. Dr. Hakan Demirhindi'ye, çalışmaya desteklerinden dolayı Tıbbi Mikrobiyoloji, Çocuk Onkoloji ve Çocuk Yoğun Bakım hocalarımıza ve çalışma arkadaşlarımıza teşekkür ederiz.

Etik Kurul Kararı: Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınarak (Tarih: 04.10.2012 ve Karar No:12) gerçekleştirildi.

ıkar atışması Beyanı: Yazarlar çıkar atışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma TF2011 LTP11 no'lu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by Cukurova University Research Projects with the Project Number of TF2011 LTP11.

KAYNAKLAR

1. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, et al. RSV Global Epidemiology Network. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet*. 2017; 390: 946-58.
2. The World Health Organization. Available at: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-standardization/respiratory-syncytial-virus-\(rsv\)-vaccines/annex_2_rsv_vaccines_trs_1024.pdf?sfvrsn=5d7aefa7_3&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-standardization/respiratory-syncytial-virus-(rsv)-vaccines/annex_2_rsv_vaccines_trs_1024.pdf?sfvrsn=5d7aefa7_3&download=true) (Accessed date: October 5, 2021).
3. TC Hükümeti-UNICEF 2001-2005 İşbirliği Programı. Türkiye'de çocuk ve kadınların durumu raporu. 2000; 103-85.

4. Rima B, Collins P, Easton A, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *J Gen Virol*. 2017; 98: 2912-13.
5. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, et al. Global Burden of Acute Lower Respiratory Infections due to Respiratory Syncytial Virus in Young Children: a Systematic Review and Meta-analysis. *Lancet*. 2010; 375(9725): 1545-55.
6. Ohuma EO, Okiro EA, Ochola R, et al. The natural history of respiratory syncytial virus in a birth cohort: the influence of age and previous infection on reinfection and disease. *Am J Epidemiol*. 2012; 176: 794-802.
7. The World Health Organization. WHO Strategy for Global Respiratory Syncytial Virus Surveillance Project Based On The Influenza Platform. Available at: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/rsv-surveillance/who-rsv-surveillance-strategy-phase-26mar2021-final.pdf?sfvrsn=d8b1c36a_9 (Accessed date: October 5, 2021).
8. Suleiman-Martos N, Caballero-Vázquez A, Gómez-Urquiza JL, et al. Prevalence and Risk Factors of Respiratory Syncytial Virus in Children under 5 Years of Age in the WHO European Region: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Pers Med*. 2021; 11: 416.
9. Zylbersztejn A, Pembrey L, Goldstein H, et al. Respiratory syncytial virus in young children: community cohort study integrating serological surveys, questionnaire and electronic health records, Born in Bradford cohort, England, 2008 to 2013. *Euro Surveill*. 2021; 26: 2000023.
10. Tong S, Amand C, Kieffer A, et al. Incidence of respiratory syncytial virus related health care utilization in the United States. *J Glob Health*. 2020; 10: 020422.
11. Nascimento-Carvalho AC, Vilas-Boas AL, Fontoura MSH, et al. PNEUMOPAC-E_cacy Study Group. Respiratory viruses among children with non-severe community-acquired pneumonia: A prospective cohort study. *J Clin Virol*. 2018; 105: 77-83.

12. Da Silva Mesquita F, de Oliveira DBL, Crema D, et al. Rapid antigen detection test for respiratory syncytial virus diagnosis as a diagnostic tool. *J Pediatr*. 2017; 93: 246-52.
13. Yassine HM, Sohail MU, Younes N, et al. Systematic Review of the Respiratory Syncytial Virus (RSV) Prevalence, Genotype Distribution, and Seasonality in Children from the Middle East and North Africa (MENA) Region. *Microorganisms*. 2020; 8: 713.
14. Ching NS, Kotsanas D, Easton ML, et al. Respiratory virus detection and co-infection in children and adults in a large Australian hospital in 2009–2015. *J Paediatr Child Health*. 2018; 54: 1321-28.
15. Alan S, Erdeve O, Cakir U, et al. The TurkNICU-RSV Trial Group (2016) Outcome of the Respiratory Syncytial Virus related acute lower respiratory tract infection among hospitalized newborns: a prospective multicenter study. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016; 13: 2186-193.
16. Sağlık İ, Mutlu D, Öngüt G, et al. Çocuklarda Respiratuvar Sinsityal Virüs (RSV) Enfeksiyonlarının Tanısında Hücre Kültürü ve Direkt Floresan Antikor Testi Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2015; 45: 22-9.
17. Şık G, Demirbuğa A, Annayev A, et al. Çocuk Yoğun Bakım Ünitesinde Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Tanısıyla Yatan Hastalarda Viral Patojen Sıklığı ve Hastaların Klinik Özellikleri. *J Pediatr Inf*. 2020; 14: 27-32.
18. Pelit S, Bayraktar B, Bulut ME, et al. Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Çocuk Hastalarda Viral Etkenlerin İmmunofluoresan ve İmmunokromatografik Yöntemler ile Araştırılması. *Şişli Etfal Hastanesi Tıp Bülteni*. 2015: 49: 118-21.
19. Koyuncu E, Arı ME, Yoldaş T, et al. Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Nedeni ile Hastaneye Yatırılan İki Yaş Altı Çocuklarda RSV Enfeksiyonu Sıklığı ve Risk Faktörleri. *Mustafa Kemal Üniv Tıp Derg*. 2017; 8: 1-9.
20. Karakoyun M, Ataoğlu EA, Büyükkayhan D, et al. Solunum Yolu Enfeksiyonu Bulguları ile Başvuran 2 Yaş Altı Çocuklarda Respiratory Syncytial Virus Enfeksiyonlarının Sıklığı ve Klinik Özellikleri. *Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2018; 3: 56-69.
21. Zimmermann P, Curtis Nigel. Coronavirus Infections in Children Including COVID-19. *Pediatr Infect Dis J*. 2020; 39: 355-68.
22. Kurt NG, Çamcı M. COVID-19 and Other Viral Pneumonias. *Dicle Med J*. 2021; 48: 40-6.