



**T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI**

**ALT SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONU OLAN
ÇOCUKLARDA RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS
(RSV) ENFEKSİYON İNSİDANSININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. Hatice Hale GÜMÜŞ

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN**

ADANA 2013



**T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI**

ALT SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONU OLAN ÇOCUKLARDA RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (RSV) ENFEKSİYON İNSİDANSININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Hatice Hale GÜMÜŞ

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN**

**Bu çalışma TF2011 LTP11 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi
Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA 2013

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve öğrenimim süresince emeğini, bilgisini ve desteğini sonuna kadar benden esirgemeyen, bilimsel çalışma disiplini örnek aldığım, pozitif enerjisiyle hep yanımda olduğunu hissettirerek tez çalışmamı yönlendiren sevgili danışman hocam Prof. Dr. Fügen Yarkın'a, bilgi ve deneyimleri ile her zaman ufukumuzu açan, koruyucu ve kollayıcı kanatlarıyla güven ve huzur duygusu hissettirerek çalışma şevkimizi ateşleyen sayın bölüm başkanımız Prof. Dr. Fatih Köksal'a, sohbetinden keyif aldığım ve özellikle mikoloji konusunda derin bilgilerinden faydalandığım sayın Prof. Dr. M. Macit İlkit'e, sayın hocam Prof. Dr. Akgün Yaman'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmayı keyifli bir deneyim olarak yaşadığım viroloji ekibi; Deniz Özdoğru, Seher Öksüz, Buket Şeflek, ve Deniz Yıldırım'a, asistanlığım süresince desteğini esirgemeyen bölüm sekreterimiz Suna Gökmen'e, eğitim sürem boyunca hayatıma renk katan asistan hekim, biyolog, teknisyen, bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca özverileriyle, sevgileriyle her zaman yanımda olan ve bugünlere gelmemde en büyük yere sahip sevgili ailem; annem, babam, abim ve ablama sonsuz teşekkürler...

Dr. H. Hale Gümüş

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
KISALTMA LİSTESİ	VI
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Respiratory syncytial virus (RSV) sınıflandırması	6
2.3. RSV'nin yapısı	9
2.4. RSV'nin replikasyonu	14
2.5. RSV'nin patogenezi	16
2.6. RSV'nin immunolojisi	18
2.7. Klinik	21
2.8. Tanı	24
2.8.1. Klinik tanı	24
2.8.2. Laboratuvar tanısı	25
2.8.2.1. Hücre kültürü	26
2.8.2.2. Antijen tespiti	26
2.8.2.3. Seroloji	28
2.8.2.4. Moleküler yöntemler	29
2.9. Epidemiyoloji	30
2.10. Tedavi	35
2.11. Korunma	39
2.11.1. Aşı geliştirme çalışmaları	42

3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Nazofaringeal sürüntü örneklerinin toplanması	45
3.2. Direkt immunfloresan test (DFA) ile antijen tespiti	46
3.2.1. Örneklerin işlenmesi ve lamaların hazırlanması	46
3.2.2. Direkt immunfloresans	47
3.3. RNA ekstraksiyonu	48
3.3.1. Çözeltilerin hazırlanması	48
3.3.2. RNA ekstraksiyon aşamaları	49
3.4. Nested RT-PCR	50
3.4.1. cDNA sentezi	50
3.4.2. Nested PCR aşaması	50
3.5. Amplifiye edilen PCR ürünlerinin görüntülenmesi	51
3.5.1. Agaroz jel elektroforezi	52
3.6. İstatistiksel yöntemler	53
3.7. Etik komite onayı	53
4. BULGULAR	54
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	96

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Paramyxoviridae ailesinin sınıflandırması	7
Tablo 2. RSV'nin kodladığı proteinler ve bu proteinlerin fonksiyonu	14
Tablo 3. ASYE olan çocukların cinsiyetlerinin yaş gruplarına göre dağılımı	54
Tablo 4. ASYE olan çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin cinsiyete göre dağılımı	55
Tablo 5. ASYE olan çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin yaş grubuna göre dağılımı	56
Tablo 6. ASYE'li çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin klinik belirtilere göre dağılımı	60
Tablo 7. ASYE'li çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin ek hastalık varlığına göre dağılımı	60
Tablo 8. RSV tanısında kullanılan DFA ve RT-PCR testlerinin sonuçları	61
Tablo 9. ASYE olan çocuklarda RSV pozitifliğinin klinik tanılara göre dağılımı	63

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. RSV genomunun şematik görüntüsü	7
Şekil 2. RSV'nin yapısı	9
Şekil 3. RSV'nin replikasyonu	16
Şekil 4. Nazofaringeal sürüntü örneğinin alınma şekli	46
Şekil 5. DFA testi ile RSV antijenini pozitif saptadığımız bir hastanın floresan mikroskopundaki görüntüsü	48
Şekil 6. Nested RT-PCR'ın ilk aşaması sonrası amplifikasyon ürünlerinin % 2 agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi	53
Şekil 7. Nested RT-PCR'ın ikinci aşaması sonrası amplifikasyon Ürünlerinin % 2 agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi	53
Şekil 8. ASYE olan çocukların cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı	55
Şekil 9. RSV RNA pozitif bulunan 95 hastanın yaş gruplarına göre dağılımı	57
Şekil 10. ASYE'li çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin mevsimlere göre dağılımı	58
Şekil 11. ASYE'li çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin aylara göre dağılımı	59
Şekil 12. ASYE'li çocuklarda RSV test sonucunun örnek alınma zamanına göre dağılımı	62
Şekil 13. RSV pozitif çocuklarda yaş grubuna göre örnek alınma zamanının dağılımı	62

KISALTMA LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
AST	American Society of Transplantation
ASYE	Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu
A549	Adenocarcinomic Human Alveolar Basal Epithelial Cell Line
CCA	Chimpanzee Coryza Agent; Şempanze nezle ajanı
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CD4	Cluster of Differentiation 4
CX3CR1	CX3C Chemokine Receptor-1
DFA	Direct Fluorescent Antibody Test
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent assay
EtBr	Ethidium Bromide
FDA	Food and Drug Administration
FI-RSV	Formalin Inactivated RSV (lot 100)
HeLa	Human Cervix Carcinom Cell Line
Hep-2	Human Larynx Epidermoid Carcinom Cell Line
hMPV	Human metapneumovirus
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-I
IFN-γ	Interferon-gamma
Ig	Immune globuline
IL	Interleukin
IL-4R alpha	Interleukin-4 Receptor alpha
IP-10	Interferon-inducible protein 10
KCl	Potassium Chloride

LTC4	Leukotriene C4
MgCl₂	Magnesium Chloride
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
M2 ORF-1	Matrix 2 Open Reading Frame-1
MRC-5	Normal Human Fetal Lung Fibroblast Cell Line
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
M-MuLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
NAATs	Nucleic Acid Amplification Techniques
NaCl	Sodium Chloride
NK	Naturel Killer
NPV	Negative Predictive Value
PAMP	Pathogen-associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMK	Primary Rhesus Monkey Kidney Cell Line
PPV	Positive Predictive Value
PRR	Pattern Recognition Receptors
RANTES	Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted
RIA	Radio Immunoassay
RNA	Ribonucleic Acid
RNasin	Ribonuclease Inhibitor
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RSV-IGIV	RSV-Immunoglobuline Intravenosus; RespiGam
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
RT Buffer	Reverse Transcriptase Buffer
sIgA	Secretory Immune Globuline A
siRNA	Small Interfering RNA
SP-A	Surfactant Protein-A
SP-D	Surfactant Protein-D
TBE	Tris Borate EDTA
TCID₅₀	Median Tissue Culture Infective Dose

Th	T helper
TLR	Toll-like Receptors
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
χ^2	Chi square: Ki-kare
sd	Serbestlik derecesi

ÖZET

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

Respiratory syncytial virus (RSV) enfeksiyonu bütün dünyada infant ve çocuklarda yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden alt solunum yolu enfeksiyonlarının (ASYE) majör sebebidir. Bu çalışmanın amacı hastanede yatan ve ASYE olan infant ve çocuklarda RSV enfeksiyonlarının insidansının araştırılmasıdır. RSV enfeksiyonlarının hızlı ve doğru laboratuvar tanısı antiviral tedavinin başlanması, virusa karşı zamanında korunma ve kontrol önlemlerinin alınması için önemlidir. Ayrıca gereksiz antibiyotik tedavisini ve hastanede yatış süresini azaltacaktır. Çalışmaya Ocak 2011 ve Ocak 2012 tarihleri arasında alt solunum yolu enfeksiyonu olup hastaneye yatırılan toplam 323 hasta (0-15 yaş) dahil edilmiştir. Flocked eküvyon (Copan Diagnostics, Italy) ile alınan nazofaringeal sürüntü örneklerinde RSV antijeni direkt immunfloresan testi (DFA, Argene SA, France) ile, RSV RNA varlığı ise nested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) yöntemi ile araştırılmıştır. Toplam 323 örneğin 95'inde (% 29,4) RT-PCR ile RSV RNA, 88'inde (% 27,6) ise DFA yöntemi ile RSV antijen pozitifliği tespit edilmiştir. Örneklerin 80'i (% 25) her iki yöntem ile pozitif, 220'si (% 68) ise her iki yöntem ile negatiftir. RT-PCR testine göre kıyaslandığında DFA testinin sensitivitesi % 84,2, spesifitesi % 96,5, pozitif prediktif değeri % 91 ve negatif prediktif değeri % 93,6 olarak bulunmuştur. Çalışma grubunda RSV enfeksiyonlarının insidansının % 29,4 oran ile oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak antiviral tedavinin erken başlatılması ve nozokomiyal yayılımın azaltılması için % 84 gibi yüksek sensitivite gösteren, daha hızlı bir test olan DFA'nın ilk tanı testi olarak kullanılması ve test sonucu negatif bulunan örneklerin RT-PCR ile çalışılması önerilir.

Anahtar Kelimeler: Alt solunum yolu enfeksiyonu, çocuklar, direkt immunfloresan testi, respiratory syncytial virus, revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu

ABSTRACT

The Investigation of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection Incidence in Children with Lower Respiratory Tract Infection

RSV infection is the major cause of lower respiratory tract infections with high mortality and morbidity in infants and children worldwide. The aim of this study is to investigate the incidence of RSV infections in hospitalized infants and children with lower respiratory tract infection. The rapid and accurate laboratory diagnosis of RSV infection is important for the initiation of antiviral therapy and taking timely prevention and control precautions. In addition, it will reduce inappropriate antibiotic use and the duration of hospitalization. Total 323 hospitalized patients (0-15 years old) with lower respiratory tract infection were included in the study during January 2011- January 2012. In nasopharyngeal swab specimens collected from the patients by using flocked swabs (Copan Diagnostics, Italy), RSV antigen was investigated by direct immunofluorescent test (DFA, Argene SA, France) and RSV RNA analysed by nested RT-PCR. RSV RNA was found to be positive in 95 (29,4 %) of total 323 samples by RT-PCR and RSV antigen in 88 (27,6 %) samples by DFA. Of the samples, 80 (25 %) were positive and 220 (68 %) were negative by both of tests. Comparing with RT-PCR, the sensitivity of DFA test was 84,2 %, its specificity was 96,5 %, its positive predictive value was 91 % and its negative predictive value was 93,6 %. The incidence of RSV infections in the study group was rather high with the rate of 29,4 %. In conclusion, to start antiviral therapy early and to reduce the nosocomial transmission, it is suggested to use DFA test as the first diagnostic test which is more rapid and has high sensitivity with 84 % and the samples found to be negative should be tested by RT-PCR.

Keywords: Children, direct immunofluorescent test, lower respiratory tract infection, respiratory syncytial virus, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

1. 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. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2009 verilerine göre dünyada 5 yaş altı çocuklarda mortalitenin % 29'u pnömoni, bronşiyolit ve bronşit gibi alt solunum yolu enfeksiyonlarına bağlı olmaktadır^{1,2}. Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı verilerine göre 0-1 yaş grubunda bebek ölümlerinin % 48,4'ünden, 1-4 yaş arasında % 42,1'inden ASYE sorumludur³. Türk Toraks Derneği 2009 yılı verilerine göre ülkemizde 0-5 yaş grubundaki çocuklarda ASYE görülme oranı % 29'dur⁴. Bu veriler ışığında tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de özellikle 5 yaş altı çocuklarda akut ASYE'ler yüksek mortalite ve morbidite sebebidir. Çocukluk çağında ASYE'nin en önemli sebebi solunum yolu viruslarıdır. Viral ASYE'nin ise en sık sebebi Respiratory Syncytial Virus (RSV) olmakla beraber, rhinovirus, influenza virus tip A ve B, adenovirus, parainfluenza virus tip I, II ve III, human metapneumovirus ve coronaviruslar sorumlu etkenler arasındadır. Mononegavirales takımındaki Paramyxoviridae ailesine ait, segmentsiz, tek zincirli bir RNA virusu olan RSV çocuk yaş grubundaki pnömoni ve bronşiyolit gibi ASYE'lerin % 40-80'inde görülen en önemli viral etkidir^{5,6}. Çocukların % 50-70'i hayatın ilk bir yılında RSV ile enfekte olmaktadır. İki yaşına kadar çocukların hemen hemen hepsi primer RSV enfeksiyonu ile karşılaşmaktadır ve % 10-20'sinin birden çok defa virusla enfekte olduğu bildirilmektedir. Çocukların % 3'ü bir yaşından önce hastaneye yatırılmakta ve bunların % 10'u mekanik ventilasyona gereksinim duymaktadır. Mekanik ventilasyona gereksinim duyan çocukların % 5-10'u ölmektedir^{7,8}. Ülkemizde solunum yolları enfeksiyonlarında RSV sıklığı değişik çalışmalarda % 5,2-55,6 oranında bildirilmektedir⁹⁻¹¹.

RSV için yüksek risk grubunu 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 oluşturmaktadır. Risk grubundaki bebeklerde RSV'ye bağlı

mortalite oranı % 30'un üzerindedir. Önceden sağlıklı olup RSV enfeksiyonu sebebi ile hastaneye yatırılan bebeklerde mortalite % 0,5-1 iken kalp hastalığı olan çocuklarda % 3-37 ve akciğer hastalığı olanlarda % 44 olarak bildirilmektedir. Ribavirin ve palivizumab kullanılarak optimal tedavi ile bu oranlar % 3-10'a düşürülmektedir. RSV çok bulaşıcı bir virus olduğu için ve herhangi bir sebep ile immun yetmezliği olan infekte çocuklarda virus saçılım süresi uzun olduğu için hastane kaynaklı enfeksiyon oranları yüksektir. Bu sebeple nozokomiyal salgınlara önlenmesinde enfekte kişilerin hızlı tanısı esastır^{6,8,12}.

Mevsimsel olma özelliği taşıyan RSV'ye bağlı solunum yolu enfeksiyonlarında virusa özgün tipik bir klinik tablo oluşmadığı için şüpheli klinik tanının laboratuvar yöntemleri ile doğrulanması ve kesin tanısının konması gerekmektedir. Hastalardan alınan nazofaringeal sürüntü veya aspirat, balgam ve bronkoalveolar lavaj gibi solunum sekresyonları örneklerinde hücre kültürü tekniği ile virusun izolasyonu, direkt veya indirekt immunfloresan testleri, seroloji, kromatografik teknikler ile antijen veya antikor tespiti, moleküler testler ile viral genomun tespiti gibi yöntemler kullanılarak RSV tanısı konulmaktadır^{6,8}.

Çalışmamızın amacı hastanede yatan ve ASYE olan infant ve çocuklarda RSV enfeksiyon insidansının araştırılmasıdır.

RSV enfeksiyonlarının sensitivite ve spesifite açısından en uygun laboratuvar testleri kullanılarak hızlı ve doğru tanısının saptanması ile 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 da mümkün olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

İnfant ve küçük çocuklarda ciddi solunum yolu enfeksiyonu, ilk kez 150 yıl önce tanımlanmış ve adına "konjestif kataral ateş" (congestive catarrhal fever) denmiştir. Hastalığın viral etyolojisi olabileceği ve mevsimsel epidemiyolojik paterni ilk kez 1941'de medikal literatürde yerini almıştır^{13,14}.

RSV ilk kez 1956 yılında Morris ve arkadaşları tarafından Walter Reed Askeri Araştırma Enstitüsü'nde (the Walter Reed Army Institute of Research) öksürük, hapşırma ve mukopürülan burun akıntısı ile karakterize solunum yolu hastalığı olan 14 şempanzeden alınan boğaz materyallerinin birinden izole edilerek 'şempanze nezle ajanı' (CCA; Chimpanzee Coryza Agent) olarak isimlendirilmiştir. Bulunan yeni ajanın doku kültüründe dejeneratif değişikliklere sebep olduğu, ancak alışlagelmiş laboratuvar hayvanlarında patojenik olmadığı, aylar içinde diğer şempanzelerin de nezle ajanına karşı özgün antikor geliştirdiği saptanmıştır. O sırada bir laboratuvar çalışanında da solunum yolu hastalığı gelişmiş, ancak etkene özgün antikor oluşturması dışında insanlarda enfeksiyon yapabildiğine dair bir kanıt bulunamamıştır^{15,16}.

Chanock ve arkadaşları 1957 yılında laringotrakeobronşiti (krup) olan 12 infanttan alınan sürüntü örneklerinin 2'sinde Maymun Böbrek Doku Kültürü'nde sıradışı 'sünger gibi' bir sitopatojenik değişime sebep olan ve şempanze nezle ajanından (CCA) ayırt edilemeyen bir virus olduğunu saptayarak krup ile yeni bir sitopatojenik miksovirus türü arasındaki ilişkiyi yazmıştır¹⁶⁻¹⁸.

Etkenin major insan patojeni olduğu 1960 yılında çocuklarda görülen bronşit ve pnömoni salgınında virusun izole edilmesi ile netlik kazanmıştır. Şempanze nezle ajanı (CCA) isimlendirilmesinin insanlarda enfeksiyon etkeni olan bir virus için uygun olmadığı düşünülerek solunum yollarına olan eğiliminden ve hücre kültüründe ürerken oluşturduğu sinsityal sitopatolojik değişikliklerden yola çıkarak "Solunum Sinsityal Virus" (Respiratory Syncytial Virus; RSV) adı verilmiştir^{19,20}. RSV'nin tüm dünyada özellikle ılıman bölgelerde kış mevsiminde ve tropikal bölgelerde ise yağmurlu sezonlarda yaygın ve çok bulaşıcı olan, infant ve erken çocukluk döneminde ciddi

morbidite ve mortaliteye sebep olan solunum yolu hastalıklarının önemli bir sebebi olduğu 1960'lı yıllarda kabul edilmişti¹⁴.

RSV'ye karşı aşı geliştirme çalışmaları 1960'lı yılların ortalarında başlamıştır. Chanock ve Parrott tarafından formalin ile inaktive edilmiş RSV, *Mycoplasma pneumoniae* ve parainfluenza virusu içeren polivalan bir aşı geliştirilmiştir. Aşının 1966 yılında infant ve çocuklardan oluşan bir gruba uygulanması sonrası, aşı uygulanmayan kontrol grubunda gelişen RSV enfeksiyonu kadar aşılınmış grupta da enfeksiyonun geliştiği üstelik hospitalizasyon gerektiren bronşiyolit ve pnömoni gibi ciddi alt solunum yolu enfeksiyonlarının kontrol grubunun sadece % 5'inde gelişirken, aşılanan grubun % 80'inde geliştiği ve aşılanan 2 infantın da ölümle sonuçlandığı görülmüştür^{14,21}. Formalin ile inaktive edilmiş "lot100" olarak bilinen bir başka RSV aşısı (FI-RSV) 1969 yılında 6-23 aylık bebeklere uygulanmış, sonuçta aşı yapılanların % 69'unda, aşı yapılmayanların ise % 9'unda pnömoni geliştiği görülmüştür. Aşının sadece koruma yönünden sınıfta kalmadığı, aynı zamanda küçük yaş grubunda doğal enfeksiyonun kliniğinin şiddetlenmesine de yol açtığı bulunmuştur^{22,23}. Yine aynı yıl üç doz trivalan parainfluenza virus aşısı ile yapılan bir çalışmada aşının parainfluenza virusuna bağlı doğal hastalıktan korunma sağlamamakla beraber, 6-11 aylık bebeklerde hospitalizasyon gerektiren RSV enfeksiyonu insidansında da beklenmedik bir artışa sebep olduğu ve bu durumun aşıya bağlı gecikmiş aşırı duyarlılık sonucu gelişmiş olabileceği vurgulanmıştır^{24,25}. Aşılanan çocuklarda RSV virulansının artmasının sebebi halen net olarak anlaşılamamıştır ve çalışmaların olumsuz sonuçlanması son 40 yıldır RSV aşı çalışmalarına gölge düşürmüştür¹⁴.

Parainfluenza virus enfeksiyonu sonrası gelişen RSV'ye bağlı ASYE 1970'lerde, küçük çocuklarda solunum yolu enfeksiyonlarına bağlı hospitalizasyonun primer sebebi olarak kabul edilmekteydi ve yaşamın ilk 6 ayında enfeksiyon oranı % 70 olarak kayıtlara geçmişti. Yine aynı yıllarda RSV ile ilgili moleküler ve epidemiyolojik çalışmalar büyük bir hız kazanmıştır ve günümüzde de devam etmektedir²⁶⁻²⁸.

Antiviral ajan olarak Ribavirin'in (Virazole, Valeant Pharmaceuticals Inc, Canada) in vitro ortamda RSV çoğalmasını azalttığı ve enfeksiyonun erken döneminde kullanıldığında maksimum etkinlik gösterdiği 1980'lerde bulundu^{29,30}. Ancak 1990'larda ribavirinin etkinliğinin sorgulanması o yıllardaki ilaç kullanımını dramatik olarak azaltmıştır. Günümüzde ribavirin kullanımı sadece immun yetmezliği olan

hastalara ve kliniği mekanik ventilasyon gerektirecek kadar ağır geçiren hastalara önerilmektedir^{31,32}.

Kardiyak, pulmoner ve immun sistem hastalıkları olan çocuklarda RSV'ye bağlı ASYE'lerin daha ağır ve fatal seyrettiğini kanıtlayan çalışmalar 1990'lı yıllarda yoğunluk kazanmıştır³³⁻³⁵.

Profilaktik etkisi olan RSV-IGIV (Respiratory Syncytial Virus- Immune Globuline Intravenosus; RespiGam, Medimmune Inc, ABD) ve palivizumab (*Synagis*, Abbott Laboratories, ABD) adında iki immunglobulin (Ig) ürünü yine 1990'lı yıllarda geliştirilmiştir³⁶⁻³⁷. Günümüzde maliyeti yüksek olan bu Ig preparatlarının kullanımı, en yüksek risk grubunu oluşturan infantlarla sınırlandırılmıştır³⁸.

Waris'in 1991 yılında RSV'nin Paramyxoviridae familyasına ait Pneumovirus genusunun bir üyesi olduğunu, infant ve çocuklarda dünya çapında Ekim ayından Mart ayına kadar mevsimsel özellik gösteren ASYE'ye sebep olan major patojen olduğunu yazmasından sonraki 20 yılda yapılan birçok araştırma bunu kanıtlar nitelikteydi³⁹⁻⁴¹.

Dünya Sağlık Örgütü'nün sponsorluğu ile 1999 yılında gelişmekte olan on ülkede (Arjantin, Kolombiya, Guatemala, Kenya, Nijerya, Pakistan, Papua Yeni Gine, Filipinler, Tayland ve Uruguay) yapılan saha araştırmalarının sonuçlarına göre ASYE'lerin en sık sebebinin RSV (tüm vakaların % 70'i) olduğu tespit edilmiştir. Bu ülkelerin aynı zamanda polio aşısının yoğun olarak uygulandığı ülkeler olduğuna dikkat çekilip, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere RSV'nin kaynağının polio aşısı olabileceği iddia edilmiştir⁴².

Prober ve Sullender 1999 yılında RSV'nin A ve B olmak üzere iki major antijenik subgrubu olan zarflı bir RNA virusu olduğunu yazmıştır⁴³.

Vitamin A destek tedavisinin büyüme üzerine etkilerini araştıran Hadi ve arkadaşları 1999 yılında vitamin A destek tedavisinin yeterli beslenmeyen çocuklarda lineer büyümeyi artırdığını, ancak bu etkinin solunum yolu hastalıklarına bağlı olarak azaldığını göstermiştir⁴⁴.

Hoebee ve arkadaşlarının 2003 yılında RSV bronşiyoliti sebebi ile hastanede yatarak tedavi gören 6 aylık bebeklerde interlekin 4 (IL-4) ve IL-4 reseptör alfa (IL-4R alpha) zincirini kodlayan gen varyantlarının ilişkisini araştırdığı bir çalışmada, RSV bronşiyoliti olan hastalarda IL-4 590T genotipi ve IL-4R alpha allelinin sık olduğu bulunmuş ve hayatın ilk 6 ayında daha ön plana çıkan RSV'nin patojenitesinin

artmasında T helper tip 2 sitokin genlerinin rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. İnfantların çoğunda 6 aydan önce üç dozluk birçok aşı yapıldığı dikkate alındığında immun sistemin hasar görmesi sürpriz bulunmamıştır⁴⁵.

2.2. Respiratory syncytial virus (RSV) sınıflandırması

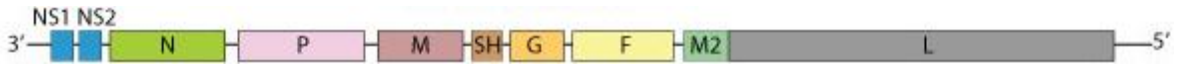
RSV, Mononegavirales takımındaki Paramyxoviridae ailesine ait olan segmentsiz negatif zincirli bir RNA virusudur. Paramyxoviridae ailesi iki alt aileden (Pneumovirinae, Paramyxovirinae) oluşmaktadır. Paramyxovirinae alt ailesinde insanlarda patojen olan; Measles virus'un bulunduğu Morbillivirus, Parainfluenza virus 2 ve 4'ü (4a ve 4b) içeren Mumps virus' un bulunduğu Rubulavirus, parainfluenza virus 1 ve 3'ü içeren Sendai virus' un bulunduğu Respiravirus olmak üzere üç cins bulunmaktadır. Pneumovirinae alt ailesinde ise insanlarda patojen olan RSV'yi içeren Pneumovirus cinsi ve Human metapneumovirus'u (hMPV) içeren Metapneumovirus cinsi bulunmaktadır^{46,47} (Tablo 1).

Morbillivirus, Rubulavirus ve Respiravirus cinsleri bir çok protein için kayda değer aminoasit homolojisi paylaştığından birbirleriyle yüksek derecede ilişkililer iken, Pneumovirus cinsi büyük ölçüde farklıdır. Pnömoviruslar füzyojenik aktiviteye sahipken diğer paramikzoviruslardan farklı olarak hemaglutinin veya hemolitik aktiviteye sahip değildirler ve ikinci bir matriks proteinine sahiptirler. Pnömoviruslarda konak hücreye bağlanmayı sağlayan G proteini ile paramikzoviruslarda bağlanmayı sağlayan HN ve N proteinleri yapısal olarak birbirinden farklıdır^{50,51}. Ayrıca hem Pneumovirus hem de Morbillivirus nörominidaz aktivitesi göstermezler. Pnömovirusların virionlarının şekilleri düzensiz olup, çapları 150 ile 300nm arasında değişir. Pnömoviruslar helikal nukleokapsid çapı (12-15nm) açısından da paramikzoviruslardan (18nm) farklıdır^{46,52}. Ayrıca pnömovirusların genomik RNA uzunluğu paramikzoviruslarınkı ile benzer olsa da, pnömoviruslar daha geniş sayıda mRNA kodlamaktadırlar. Pneumovirus genomu, sırasıyla 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5' olmak üzere iki yapısal olmayan gen (NS1, NS2) ve devamında nukleokapsid (N), fosfoprotein (P), matriks (M), küçük hidrofobik (SH), yüzey bağlanma glikoproteini (G), yüzey füzyon glikoproteini (F), ikinci matriks (M2), RNA-bağımlı RNA polimeraz (L) olan diğer sekiz geni içermektedir. Metapneumovirus genomu ise

NS genlerini içermeyip farklı bir gen sıralamasına (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') sahiptir⁵³ (Şekil 1).

Tablo 1. Paramyxoviridae ailesinin sınıflandırması (İnsan patojenleri)^{48,49}.

		Tür
Takım	Mononegavirales	
Aile	Paramyxoviridae	
Alt aile (1)	Paramyxovirinae	
Cins	Morbillivirus	Measles virus
	Mumps virus	Parainfluenza virus tip 2 Parainfluenza virus tip 4 (4a,4b)
	Respirovirus	Parainfluenza virus tip 1 Parainfluenza virus tip 3
Alt aile (2)	Pneumovirinae	
Cins	Pneumovirus	RSV
	Metapneumovirus	hMPV



Şekil 1. RSV genomunun şematik görüntüsü⁵³

RSV suşları P, F ve G proteinlerine karşı monoklonal antikor panellerine verdikleri reaksiyon paternlerine ve genleri arasındaki nukleotid sekans farklılıkları temeline bağlı olarak RSV-A ve RSV-B olmak üzere iki major antijenik subgruba ayrılmıştır. Subgruplar arasında F ve N proteinleri sırasıyla % 91 ve % 96 oranında aminoasit benzerliğine sahip olup yüksek derecede korunmuş durumdadırlar. Buna karşılık G proteini % 53 oranında aminoasit benzerliği ile son derece değişkendir^{54,55}. RSV subgruplarına ait olan RSV suşları arasındaki genetik çeşitlilik üzerine yapılan çalışmalar ‘genotipler’ adı verilen farklı genetik paternlerin varlığını ortaya çıkarmıştır⁵⁶. Şu ana kadar G genindeki farklılıklar baz alınarak RSV grup A için sekiz genotip (GA1, GA2, GA3, GA4, GA5, GA6, GA7, SAA1 genotipleri) ve RSV grup B için de sekiz genotip (BA, GB1, GB2, GB3, GB4, SAB1, SAB2, SAB3)

tanımlanmıştır⁵⁶⁻⁵⁸. RSV grup B'nin BA genotipi başlangıçta altı alt gruba (BA1-BA6) bölünmüşken, günümüzde dört alt grup (BA7-BA10) daha eklenerek toplam on alt grup tespit edilmiştir⁵⁹⁻⁶¹. RSV grup A'nın GA2 genotipinin iki yeni varyantı sadece Japonya'da tanımlanmıştır⁶².

A ve B subgrupları arasında antijenik benzerlik yaklaşık olarak % 25'tir. F protein için antijenik benzerlik oranı % 50, aminoasit dizi benzerliği % 89'dur. İki subgrup arasında G protein için aminoasit benzerliği % 53 kadar düşüktür ve antijenik benzerlik sadece % 5'dir. G proteini sekansları subgrup A suşları içinde % 20, subgrup B suşları içinde % 9 farklılık gösterir⁶³. Bu durum G proteininin fonksiyon kaybı olmadan mutasyonlara toleransı en yüksek olan protein olduğunu gösterir. G glikoproteinindeki değişkenlik en sık az korunan N- ve O- bağlı şeker akseptor (alıcı) bölgesi ile ilişkilidir. İki major nötralizan antijenden biri olduğu (diğeri F protein), hücre dışı komponent olduğu ve sekans-antijenik çeşitliliği korele olduğu için G proteinindeki değişkenliğe immun sistemin katkısı olabilir⁵³⁻⁵⁵. RSV suşları arasındaki G glikoprotein çeşitliliği virusa, popülasyonda önceden uyarılmış immuniteden kurtulmasında bir avantaj sağlar. Sekans çalışmaları aynı toplumda eş zamanlı birçok genotipin dolaşmakta olduğunu ve benzer genotiplerin farklı yıllarda farklı popülasyonlarda görüldüğünü göstermektedir^{56,64}.

Virusun epidemiyolojisinde antijenik farklılığın önemi henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, epidemilerin şiddetindeki yıllık değişimi ve yaşam boyunca olan reenfeksiyona duyarlılığı kısmen açıklayabildiği düşünülmektedir⁶⁵. Dünyanın bütün bölgelerinde yıllık salgınlar arasında RSV A ve B'nin sıklığı değişkendir. Epidemiler süresince iki subgrup da birlikte bulunabilir⁶⁶. Bir alt tipe bağlı enfeksiyon belirli bir coğrafik bölgede ya da dönemde belirgin olabilir. Enfeksiyonun klinik şiddeti genellikle epidemiyoloji ve konak faktörü ile ilişkilidir, fakat daha az oranda viral faktörlerin (suşlar gibi) etkileri de bulunmuştur⁶⁷. Çeşitli çalışmalarda A ve B subgruplarının yol açtığı enfeksiyonlar arasındaki klinik şiddetin farklılığı değerlendirilmiştir. Subgrup A suşlarının sıklıkla daha şiddetli hastalığa sebep olduğu düşünülmektedir. Subgrup A suşlarının daha şiddetli hastalığa sebep oluşunun mekanizması henüz bilinmemektedir. Genetik replikasyon ile ilgili proteinlerin (N, P, L, M2) suşa bağlı farklılıkları viral replikasyonun azalmasına ya da farklı üreme hızına sebep oluyor olabilir. Deneysel olarak kanıtlanmamasına rağmen subgrup B

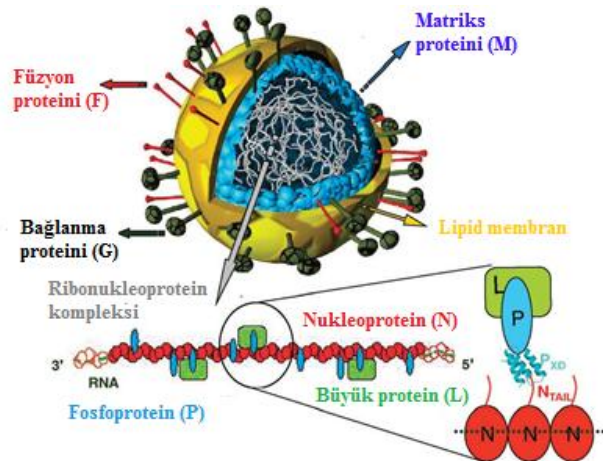
izolatlarının yavaş ürediği ve doku kültüründe düşük titrede bulunduğu düşünülmektedir^{68,69}. Ancak bazı çalışmalarda subgrup B suşlarının daha virulan olduğu görülmüştür⁴⁶.

RSV'nin yapısal özelliği ve genom segmentlerinin reassortmanı gibi bir durumu söz konusu olmadığı için influenza virus pandemilerindeki gibi antijenik shift gerçekleşmez. Ancak diğer RNA viruslarında olduğu gibi, virus hata düzeltme ve düzenleme kapasitesi olmayan bir RNA polimeraza bağımlı olduğu için oldukça değişken bir genoma sahiptir^{46,70}.

2.3. RSV'nin yapısı

RSV orta büyüklükte (150-300nm çapında), konak hücre plazma membranından köken alan çift katmanlı lipid yapıda bir zarfa ve helikal nukleokapsidi içinde 15.222bp (A2 suşu) uzunluğunda, segmentsiz, tek zincirli ve negatif polariteli genoma sahip olan bir RNA virusudur⁴⁶.

Dizi analizi 1997 yılında tamamlanan RSV genomu, virusa spesifik en az 10 viral proteini kodlamaktadır. Bu on proteinden üçü transmembran yüzey glikoproteinleri (G, F ve SH proteinleri), üçü nukleokapsid ile ilişkili protein (N, P ve L proteinleri), ikisi nonglikolize matriks proteini (M1 ve M2 proteinleri) ve ikisi yapısal olmayan proteinlerdir (NS1 ve NS2 proteinleri)^{46,71} (Şekil 2).



Şekil 2. RSV'nin yapısı⁷³.

F (füzyon) proteini, endoplazmik retikulumda 574 aminoasitlik inaktif öncül protein (Fo) olarak sentez edilen bir tip I membran glikoproteinidir. Fo öncül proteinin golgi cisimciğinde tripsin benzeri bir hücrel proteaz tarafından, 47kD olan F1 ve 20kD olan F2 olmak üzere birbirine disülfid bağ ile bağlı iki subünite hidroliz edilmesi ile protein biyolojik olarak etkinlik kazanır. F proteini, virusun konak hücreye penetrasyonuna ve hücreden hücreye membranların füzyonu yolu ile yayılımına aracılık eder. Yeterli füzyonun oluşabilmesi için F proteininin diğer iki transmembran yüzey glikoproteini olan G ve SH proteinleri ile birlikte bulunması gereklidir. Enfekte hücre ile komşu hücre membranlarının füzyonu çok çekirdekli dev hücreler (sinsitya) oluşumuna yol açar. Sinsitya, virusun sitopatik etkisinin bir göstergesidir ve virusun hücre zarından geçmek zorunda kalmadan hücreden hücreye direkt yayılımı için gereklidir. F proteini yapısal ve fonksiyonel olarak diğer paramikzoviruslar ile ilişkilidir^{72,73}. Ayrıca F proteini IL-1 Beta, IL-6, IL-8 sekresyonu, hücre motilitesi, hücre morfolojisi ve aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi gibi çeşitli rollere sahip bir guanozin trifosfataz olan Ras aile proteini olarak isimlendirilen, plazma membranı içinde bulunan Rho A ile etkileşime girer. RSV ile enfekte Hep-2 hücrelerinde viral reseptör gibi fonksiyon gören Rho A'nın ekspresyonunun arttığı ve sonuçta penetrasyonun sağlandığı ve sitopatik etkinin yani sinsitya oluşumunun kolaylaştığı düşünülmektedir^{46,47,63}.

G proteini (bağlanma, tutunma proteini) genetik, yapı ve fonksiyon açısından diğer paramikzoviruslar ve genel olarak virus bağlanma proteinleri arasında eşsiz özelliklere sahiptir⁷⁴. G proteini, virus suşuna bağlı olarak aminoasit sayısı değişen (292-299 aminoasit) 32kD'luk bir polipeptid öncülünden sentezlenir⁷⁵. Öncül polipeptid, golgi cisimciğinde translasyonel modifikasyon ile, sırasıyla yüksek mannozlu N-bağlı şekerler ve O-bağlı şekerler eklenerek önce 45kD olan ara forma ve sonra 90kD olan matür forma dönüştürülür. Matür G proteini yüksek oranda serin, treonin ve prolin içermekte olup, böylece proteinin ikincil yapısının aşırı katlanmasını azaltır⁷⁶. G proteini, sinyal peptidi ve membran habercisi (membran anchor) gibi işlev gören hidrofobik N-terminal bölgesi (38-66 aminoasit) olan bir glikolize tip II transmembran proteinidir^{77,78}. Membran habercisi bölgesinin proksimalinde ekstraselüler bir parçası bulunmakta olup, bu ekstraselüler parçanın ortasında bütün RSV izolatlarında yüksek derecede korunmuş olan kısa bir protein segmenti ve 4 sistein

rezidüsü yer almaktadır^{77,79}. Bu bölge, CX3C kemokin reseptör (CX3CR1) eksprese eden hücrelere bağlanmayı kolaylaştıran bir CX3C kemokin motifi (182-186 aminoasit) içermektedir⁸⁰. Bu bölgenin yanında, bütün RSV izolatlarında yüksek derecede farklı olan iki glikolizasyon yer almaktadır⁷⁵. G proteini, translasyonun başlangıcında hidrofobik transmembran bölgesinin ortasında yer alan bir alternatif çerçeve olan AUG kodonu (alternate in-frame AUG codon) sayesinde hem serbest halde sekrete edilip hem de membrana bağlı halde eksprese edilebilmektedir⁸¹. Enfekte hücrelerde G proteininin yaklaşık olarak % 15'i, sitoplazmik parçası ve sinyal haberci sekansı dışında diğer bütün özellikleri membrana bağlı olan form ile aynı olmak üzere eriyik (soluble) halde sekrete edilir⁸². G proteini fonksiyonel olarak virusun hücreye bağlanmasından sorumlu olup, F proteini ile birlikte enfektivite ve patogeneizde önemli bir rol oynarlar⁴⁶. G ve F proteinleri, taşıdıkları epitopları sayesinde nötralizan antikorların oluşumunu uyarak RSV'ye karşı immun cevaba sebep olurlar. F proteinine karşı yanıt, humoral ve hücrel (sitotoksik T-lenfosit) yanıt şeklinde iken, G proteini nötralizan antikorlar tarafından tanınmasına rağmen hücrel immun yanıtı yeterince uyaramamaktadır. Ayrıca F proteini daha çok çapraz reaksiyon veren antikorların oluşumuna sebep olur iken, G proteinine karşı oluşan antikor cevabı daha çok grup spesifiktir^{83,84}. Antijenik ve nukleotid sekans farklılıkları en fazla bulundurduğu için, RSV A ve B suşları arasındaki farklılığın en büyük sorumlusu G proteindir⁵⁴. Aynı suşun G proteinleri arasında % 20 farklılık var iken, A ve B suşlarının G proteinleri arasında bu oran % 47'den fazla olabilmektedir. Yine de insan RSV suşlarının G proteini, konak reseptörüne bağlanmak için bir aday olduğu düşünülen 13 aminoasitlik değişmez bir bölgeye sahiptir⁵³. RSV A ve B grupları arasında antijenik homoloji % 25, F proteini için antijenik homoloji % 50, G proteini için aminoasit homolojisi % 53 iken, antijenik homoloji sadece % 1-10'dur. Bu durum G proteininin mutasyonları fonksiyon kaybı olmadan en tolere edebilen protein olduğunu göstermektedir⁸⁵. G proteini için hücrel bir reseptör saptanamamıştır, fakat hücre yüzey glikozaminoglikanları olan heparan sülfat ve kondroitin sülfat B'nin enfeksiyon için önemli olabileceği gösterilmiştir⁴⁷.

SH (küçük hidrofobik, 1A) proteini, fonksiyonu bilinmeyen kısa (64 aminoasit) hidrofobik bir yüzey glikoproteinidir. SH protein molekülünün sadece üçte biri ekstraselüler yerleşimli olup, merkezinde lokalize olan haberci sekansı sayesinde bir membran-habercisidir. Enfekte hücrelerde çoğu glikolize olmayan SHo şeklinde olmak

üzere, SHg, SHp ve SHt olarak farklı formlarda bulunmaktadır⁸⁶. SHt hariç bütün formlar hücre yüzeyine transfer edilir ve sadece SHo ve SHp formları virion içine dahil edilir⁸⁷. Farklı formların önemi henüz tam olarak bilinmemekle beraber bağlanma, penetrasyon, viral soyunma veya virion morfogenezi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir^{88,89}. Ayrıca SH proteininin anti-apoptoz geni olan IEX-IL ekspresyonunu indükleyerek apoptozu regüle ettiği düşünülmektedir⁹⁰.

RSV'nin 4 adet nukleokapsid proteini vardır: N, P, L ve M2-ORF1 proteinleri. Nukleokapsid proteinleri genel olarak genomik RNA ile ilişkili olup transkripsiyon ve replikasyonda görev alırlar^{46,47}.

N (nukleoprotein) proteini, genomik RNA'yı sıkıca bağlanarak RNA'nın transkripsiyon ve replikasyonunda merkezi rol oynayan, orta büyüklükte (391 aminoasit) multifonksiyonel bir proteindir. Transkripsiyon ve replikasyonu başlatma işlevinin yanında, RNA'yı nukleazların litik etkisinden koruma fonksiyonu bulunmaktadır⁴⁷.

P (fosfoprotein) proteini, viral RNA-bağımlı RNA polimeraz kompleksinin temel komponenti olup, transkripsiyon ve replikasyon faktörü olmasının yanında eriyik formdaki L proteini için şaperon görevi de görür. N ve L proteinlerine bağlanır ve RNA sentezini arttırıcı etkisi vardır. İmmunfloresan incelemesinde intrastoplazmik inklüzyon cisimciklerini boyayan N ve P proteinlerine karşı oluşan monoklonal antikorlardır⁹¹. P proteini, çoğu paramikzovirusların P proteinlerine (391-602 aminoasit) göre daha küçüktür (241 aminoasit) ve in vitro ortamda virus replikasyonu için esansiyel değildir. Ancak, P proteininin yoğun fosforilasyonu in vitro ve in vivo ortamlarda etkin bir replikasyon için gereklidir⁹².

L (geniş viral polimeraz) proteini, çok büyüktür (250kD) ve yapısal proteinler arasında en az yoğunlukta bulunan proteindir. Çok büyük olması ve nukleokapsiddeki lokalizasyonu sebebi ile viral RNA-bağımlı RNA polimeraz olduğu düşünülmektedir. Uzunluk olarak diğer paramikzovirusların L proteinine benzer (yaklaşık 2200 aminoasit), fakat paramikzoviruslarla sınırlı sekans homolojisi bulunmaktadır^{46,93}.

Pneumoviruslar segmentsiz negatif polariteli RNA genomuna sahip olmalarına rağmen, matriks proteini olarak tek değil, iki adet protein içerirler: M1 ve M2 proteinleri⁹⁴. İkisi de nonglikolizedir ve virion ile ilişkili oldukları sanılmaktadır. M1 proteini, diğer paramikzovirusların M proteininden (335-375 aminoasit) daha küçüktür

(256 aminoasit) ve sınırlı sekans homolojisi vardır⁹⁵. M1 proteini, paketleme öncesinde nukleokapsid transkripsiyonunu inaktive eder ve nukleokapsid ile oluşmaya başlayan zarfı birbirine bağlar. Ayrıca, enfekte hücrelerin yüzeylerinden eksprese edilebilir. M2 protein, pnömoviruslara özgüdür ve polimerazın aktivitesini artıran bir transkripsiyon faktör olarak fonksiyon görür^{96,97}. M2 ORF-1 (Matrix2 Open Reading Frame-1) proteini, M2 geninde kodlanmasına rağmen bir matriks proteini olmayıp F ve N proteinleri ile birlikte bulunur. M2 ORF-1 proteini, viral replikasyonda tam uzunluktaki mRNA'nın etkin sentezi (transkripsiyon elongasyon faktör) için esansiyel bir komponenttir. Ayrıca transkripsiyonun kontrolünde negatif düzenleyici faktör olduğu düşünülmektedir^{47,53}.

Pnömovirus proteinleri arasında fonksiyonu en az anlaşılanı NS1 ve NS2 (yapısal olmayan, 1B ve 1C) proteinleridir. Bu proteinler, saf olarak elde edilmiş olan virionlarda eser miktarda tespit edilirler ve yalnızca enfekte hücrelerde bulunurlar⁹⁸. NS1 ve NS2 proteinlerinin transkripsiyon faktörü IRF-3'ü hedef alarak insan makrofajlarında interferon üretimini azalttığı düşünülmektedir^{99,100}. NS1 ve NS2 genleri delesyona uğratılan rekombinant RSV izolatları ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki; bu genler in vitro ortamda replikasyon için esansiyel olmasa da, in vitro ve in vivo ortamlarda etkin RSV replikasyonu için yardımcı fonksiyon görürler¹⁰¹ (Tablo 2).

RSV, çevresel değişikliklerden en çok etkilenen patojenlerden biridir. Beş dakika süreyle 55°C'de bekletilirse virusun sadece % 10'u canlı kalır. Virus 37°C'de bir saat stabil kalabilirken, 24 saat sonra infektivitesi % 10'a iner. Oda ısısında 48 saat bekletildiğinde % 10 infektivite kalırken, +4°C'de 7 gün bekletildiğinde % 1 infektivite kalır. Her dondurulma ve çözülme sonrası RSV infektivite titresi yaklaşık olarak % 90 etkilenir. Virus -30°C'de yavaşça dondurulup çözülmeye bırakılırsa infektivitesinin tamamını kaybeder^{46,115,116}. RSV'nin canlılığı kısmen ortamın nemine de bağlı olup, oda sıcaklığında masa ve steteskop gibi gözeneksiz yüzeylerde 3-30 saat canlılığını sürdürebilirken, giysi, kağıt gibi gözenekli yüzeylerde canlı kalma süresi 1 saatten azdır. Kişiden kişiye değişmekle beraber ellerde de infektivitesini genellikle 1 saatten az koruyabilmektedir^{46,102,103}. RSV zayıf asidik ortam ve optimal 7,5 pH'ya dayanıklıdır. Eter, kloroform ve çeşitli deterjanlar (% 0,1 Na deoksikolat, sodyum dodesil sülfat, triton X-100) ile hızla inaktive olur. Virusun depolanma süresi alkol ile kuru buz

banyosu içinde ani dondurma, gliserin ve süktroz gibi stabilize edici ajanların eklenmesi ile uzatılabilir^{46,103}.

Tablo 2. RSV'un kodladığı proteinler ve bu proteinlerin fonksiyonu^{46,47,53}

	Protein	Fonksiyon
Yapısal proteinler		
Zarf glikoproteinleri	G: bağlanma	Hücreye bağlanma
	F: füzyon	Hücreye giriş ve sinsitya oluşumu
	SH: küçük hidrofobik	Penetrasyon? Soyunma? Morfogenez?
Nukleokapsid proteinleri	N: nukleoprotein	Transkripsiyon ve replikasyonu başlatma
	P: fosfoprotein	Transkripsiyonel aktivite
	L: büyük	RNA polimeraz aktivitesi
	M2-ORF 1	Transkripsiyon elongasyon faktör
Yapısal olmayan proteinler		
	NS1	İnterferon üretiminin supresyonu?
	NS2	İnterferon üretiminin supresyonu?
	M2-ORF 2	Transkripsiyonun düzenlenmesi
	M1: matriks	Viral toplanma

2.4. RSV'nin replikasyonu

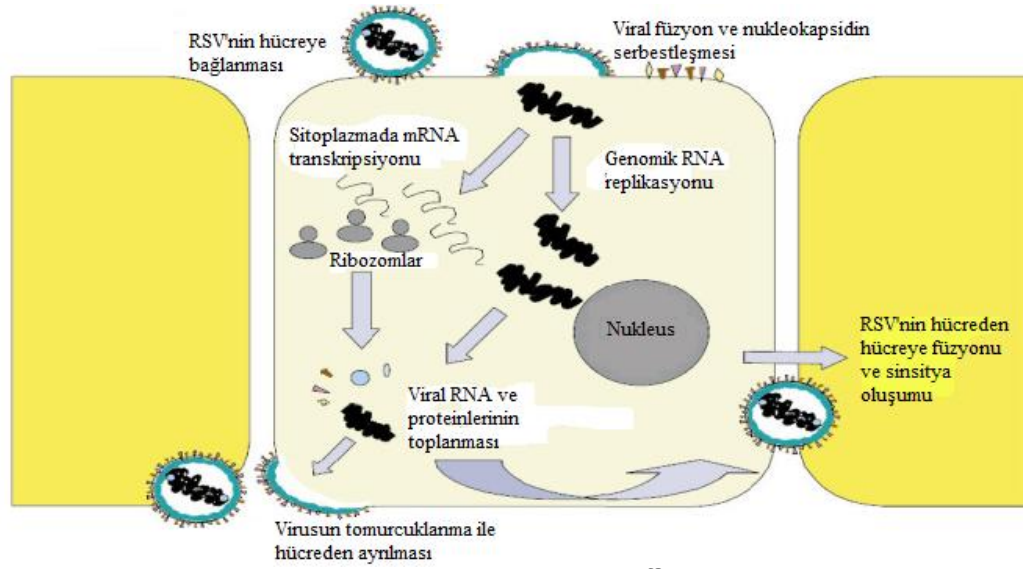
Enfekte salgılarla temas sonrası bulaşan RSV, 2-8 günlük kuluçka döneminden sonra nazofaringeal epitelde çoğalır. RSV önce zarf glikoproteinlerinden biri olan G proteinin heparin bağlayıcı parçası aracılığı ile duyarlı hücrenin yüzeyindeki glikozaminoglikan molekülleri ile etkileşime girerek konak hücreye tutunur^{104,105}. Ancak SH ve/veya G genini kaybetmiş mutant RSV suşlarının da F protein etkileşimleri sayesinde hücreleri enfekte edebildiği gösterilmiştir^{106,107}. Tutunma sırasında öncül formda inaktif bulunan bir başka zarf glikoproteini olan F proteini hücresel proteolitik enzimler tarafından parçalanarak aktive edilir. Etkinlik kazanan F proteini konak hücrede hücreler arası adhezyon molekülü (ICAM-I), anneksin-II, Toll-like reseptör 4 ile etkileşime girerek konak hücre membranını eritip viral zarfın, hücre membranı ile kaynaşmasını sağlar¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

RSV, memeli hücre zarında yer alan, omega harfi biçiminde, kolesterol ve sfingoglikolipitlerden zengin, "caveolin" (küçük mağara) adı verilen bir membran proteinini kullanarak pinositoz yolu ile pH'dan bağımsız olarak hücre içine girer¹¹¹.

Konak hücre sitoplazması içine geçen virus nukleokapsidi sitozolde kapsidinden soyunarak RNA'yı serbest bırakır. Serbest kalan viral RNA'dan virion içinde paketlenen RNA bağımlı RNA polimeraz enzimleri aracılığı ile monosistronik mRNA oluşturulur. mRNA sitozolde gerçekleşen genom replikasyonu için kalıp görevi görür ve viral proteinlerin translasyonunu sağlar^{63,112}.

L protein sitoplazmada gerçekleşecek olan viral transkripsiyon ve replikasyonu başlatır¹¹³. Pnömovirus mRNA'sının transkripsiyonu 3' ucuna yakın tek bir başlangıç (promoter) noktasından 5' ucuna doğru olur. Polimeraz aracılı transkripsiyon mRNA düzenleme veya ekleme desteği olmaksızın genlerin eş doğrusal kopyaları olan bir seri subgenomik mRNA'lar olarak sonuçlanır. RSV mRNA'larının sekans ve transkripsiyonel haritalama analizleri gen-başlangıç sinyalinin ilk nukleotidinde başlayan her transkriptin 5' ucuna bir cap ve 3' ucuna bir poliadenil kuyruğu eklendiğini göstermektedir¹¹⁴. Enfeksiyon sonrası 16-20 saatte mRNA sentezi ve protein ekspresyonu pik yapar ve hem mRNA'lar hem de proteinler enfeksiyon sonrası 4 saatte tespit edilebilmektedir. Eksprese edilen proteinin derecesi mRNA miktarına bağlıdır. Genel olarak promoter diziden uzaklık arttıkça mRNA miktarı azalır. RNA replikasyonu aktif protein sentezine bağımlıdır¹¹⁵.

Genetik maddenin replikasyonu, (-) RNA'dan komplementer (+) RNA kopyalanması ve kalıp görevi gören komplementer (+) RNA'dan (-) RNA'ların sentezi olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir. Negatif RNA'nın mRNA'ya transkripsiyonunda görevli RNA'ya bağımlı RNA polimerazın aktivitesinde P, L ve NP proteinlerinin de rolü vardır. Sentezlenen mRNA'lar konak hücre ribozomlarına giderek viral proteinlerin sentezini sağlarlar. Yeni oluşan (-) RNA dizileri viral proteinler ile çevrilerek konak hücrenin sitoplazma membranından zarfını kazanıp tomurcuklanarak hücreden ayrılırlar^{46,115} (Şekil 3).



Şekil 3. RSV'nin replikasyonu⁶³.

2.5. Patogenez

Solunum yolu kaynaklı büyük damlacıklar, kontamine eşyalar ve ellerle bulaşabilen virus, 2-8 günlük kuluçka süresini takiben nazofarengeal epitelde çoğalmaya başlar. Replikasyon nazofarinkste belli bir virus titresine ulaştığında, ki bu titre infantlar için 10^4 - 10^6 TCID₅₀/ml'dir (doku kültürünün % 50'sini infekte eden doz), hastalık belirtileri ortaya çıkmaya başlar. Burun akıntısı ve hafif ateşe sıklıkla eşlik eden öksürük ve hırıltı görülür. Virus titresi zamanla azalır ve çoğu hasta 1-2 hafta içinde iyileşir^{46,63,103}.

Primer RSV enfeksiyonlarının % 60'ı üst solunum yolları ile sınırlıdır, ancak 2-5 gün sonra enfeksiyon alt solunum yollarına da ilerleyebilir. Enfeksiyonun alt solunum yollarına nasıl yayıldığı kesin olarak henüz bilinmese de, üzerinde durulan olası mekanizmalar sekresyonların aspirasyonu, bronş, bronşiyol, alveol üzerinden solunum epitelini boyunca siliar aktivite ile direk yayılım, virusun ekstraselüler aralığa geçmeden yani sekresyonlardaki antikorlarla karşılaşmadan hücreden hücreye (sinsityum, sitopatik etki) yayılma kapasitesinin varlığı ve/veya infekte ettiği makrofajların göçü ile yayılımdır^{103,116}.

Enfeksiyonun patogenezinde bronşiyol epitelinin nekrozu, epitel hücrelerinin destrüksiyonu, konak hücre yanıtının göstergesi olan lenfosit ve mononükleer hücrelerin peribronşiyolar infiltrasyonu söz konusudur¹¹⁷. Epitel hücrelerin destrüksiyonunun

lokalizasyonuna göre klinik değişmektedir. Epitel hücrelerinin yıkımı arttıkça bu hücrelerden ortama kapiller permeabiliteyi artıran, sekresyon artışına yol açan proinflamatuvar mediatörler (histamin, interlökin-1, interlökin-6 gibi sitokinler) ve inflamasyon alanına makrofaji nötrofil, eozinofil ve doğal öldürücü hücreler (NK hücre) gibi proinflamatuvar hücreleri çeken kemokinler (TNF α , CC ve CXC kemokinleri) salınmaktadır. Bu kemokinlerden biri olan CX3C gibi davranabilen bir motife sahip olan G glikoproteini, kemokinin özgün reseptörüne (CX3CR1) bağlanarak lökosit kemotaksisini indükler ve virus enfeksiyonunu kolaylaştırır. Proinflamatuvar mediatörlerin ve kemokinlerin salınımı sonucunda alveollar arası kalınlaşma, ödematöz submukozal dokudan sızan hücre artıkları ve mukusdan oluşan sıvı ile küçük bronşiyollerin ve alveollerin dolması, düz kaslarda kasılmaya ve mukus sekresyonuna sebep olan lökotrienlerin (LTC4 ve D4) artması ile hava yollarının obstrüksiyonu söz konusu olabilmektedir^{118,119}. Obstrüksiyon ile hava akımının engellenmesi ekspirasyon sonrası hava birikmesine, biriken hava da lümenin daha fazla daralmasına sebep olur. Bu süreçte solunum güçlüğü çeken infantta akciğer hacmi artmıştır ve yer yer atelektezik alanlar oluşmuştur. Bu dönemde akciğer grafisi çekilecek olursa bir çok bölgede intersitisyel infiltrasyon ve hiperinflasyon, atelektazik bölgelerde konsolidasyon görülebilir. Hastada klinik olarak alt solunum yolu enfeksiyonunun göstergesi olan hava açlığı, hırıltı, solunum güçlüğü gibi semptomlar ortaya çıkar. Akciğer mekanizmasındaki düzensizlik, gaz değişiminde anormallikle sonuçlanır¹²⁰.

Bronşiyolitlerde en yaygın görülen kan gazı anormalliği hipoksemidir. Hipoksemi bozulmuş ventilasyon/perfüzyon dengesi sonucu meydana gelir¹²¹.

Prematür bebekler ve 6 aydan küçük infantlar daha küçük, daha kolay tıkanabilen hava yollarına, daha az sekresyonları temizleme yeteneklerine, hava yollarında daha çok mukus salgı bezlerine, kollateral ventilasyonu sağlayan daha az sayıda Kohn porlarına ve daha düşük sIgA'ya sahip oldukları için hastalıktan daha ağır etkilenmektedirler ve klinikleri dakikalar içinde kötüleşebilmektedir¹²¹⁻¹²³.

Akut bronşiyolitlerde iyileşme 3-4 gün içinde bronşiyol epitelinde rejenerasyonla başlar, silyalardaki iyileşme yaklaşık 15 gün içinde görülür. Oluşan mukus tıkaçları ve plaklar makrofajlar tarafından yok edilirler¹²⁴.

2.6. RSV'nin immunolojisi

RSV enfeksiyonu ile karşılaşan vücut immun bir yanıt oluşturur. Respiratuvar viruslar için doğal immunité ilk olarak solunum yolları boyunca uzanan membranlar tarafından sekrete edilen mukus aracılığı ile olmaktadır. Mukus, RSV'nin epitel hücrelere adherensini bloke eden koruyucu bir bariyer gibi işlev görür. Ayrıca öksürük, hapşırma sırasında siliyer hareket ile virus partiküllerinin dışarı atılmasına aracılık eder.

Yabancı karbonhidrat paternlerini tanıma, fagositoz yapan hücrelerle etkileşime girme ve yabancı karbonhidratı taşıyan partiküllerin opsonizasyonunu artırma gibi işlevleri olan, 'kollektinler' adı verilen bir protein ailesi bulunmaktadır¹²⁸. Kollektinlerden mannoz-bağlayan protein ve alveolar sürfaktan molekülleri (SP-A, SP-D) doğal immunitéde önemli ajanlardır. SP-A, RSV'nin F glikoproteinini bağlayarak kalsiyum bağımlı yol ile RSV enfeksiyonunu nötralize eder^{129,130}. Eğer virus solunum epitelini penetre ederse enfekte hücrelerden sitokinler ve enzimler gibi destrüktif sıvı faktörleri salınır. Enfekte epitel hücreleri ve alveolar makrofajlardan tümör nekrozis faktör (TNF α), interlökin 1, interlökin 6 ve interlökin 8, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF; vascular endothelial growth factor), interferon ile indüklenen protein 10 (IP-10/CXCL10; interferon-inducible protein 10), CC ve CXC kemokinleri ile proinflamatuvar sitokinler salınır. Bağışıklık sisteminde bu sıvı mediyatörlerinin sunumu hava yolu inflamasyonuna, immun sistem hücrelerinin uyarılmasına, bronşiyal aşırı yanıtılığına ve mukus sekresyonunun artmasına katkıda bulunur. Örneğin CC kemokinlerinden makrofaj inflamasyon proteinleri (MIP) ve RANTES ile CD4 pozitif T hücreleri için kemotaktiktir. Yine CC kemokinlerden eotaksin aynı zamanda çeşitli granüler hücrelerin (eozinofil, nötrofil gibi) inflamasyon alanına göçünü de sağlar. Bu sebeple RSV bronşiyolitinde periferik kan lökositlerinde ve hava yolu sekresyonlarında eozinofil yanında bu kemokinlerin de artması söz konusudur¹³¹⁻¹³³.

RSV ile ilişkili ASYE bulunan bir çocuğun hastaneye başvurusu sırasında ICAM-1, IL-6, IL-10 gibi proinflamatuvar mediatörlerin nazofaringeal sekresyonlardaki ve serumdaki düzeyleri inflamatuvar ve immun cevabın göstergesi olarak kullanılabileceği gibi, hastalığın ciddiyeti konusunda bir gösterge olarak kullanılabirler^{134,135}.

Alveolar makrofajlar ve dendritik hücreler virus ile enfekte epitel hücrelerini ve debrislerini tanıyarak ortama lizozim, interferon gibi faktörler salarak virus

replikasyonunu inhibe eder, inflamatuvar yanıtı uyarır ve aynı zamanda virus antijenlerini T hücrelerine sunarak kazanılmış bağışıklığı başlatırlar¹³⁶.

Fagositik hücreler tarafından patojenlerin tanınması "kalıp tanı reseptörleri" (pattern recognition receptors; PRR) ile olur. Bu reseptörler konak hücrede bulunmayan ve patojene özgü olan patojen-ilişkili moleküler kalıpları (pathogen-associated molecular patterns; PAMP) spesifik olarak tanır. PRR'ler tarafından enfeksiyonun moleküler imzaları olarak PAMP'ların tanınması doğal ve kazanılmış immunitenin aktivasyonu ile sonuçlanır^{137,138}.

PRR reseptörlerinin kan, lenf sıvısına salgılanan ve hücre yüzeyinde bulunanlar olmak üzere iki major grubu bulunmaktadır. Salgılanan PRR reseptörleri C2, C3 ve C4 gibi kompleman fiksasyon yolağının komponentlerini içerirken, hücre yüzeyindeki PRR reseptörleri Toll-like reseptörleri (TLR) içermektedir. Farklı PAMP kalıplarını tanımaya özelleşmiş bilinen on tane TLR reseptörü ve üç aday molekül vardır. Örneğin TLR2 reseptörü genel olarak gram-pozitif bakterilerin peptidoglikanını tanıırken, TLR4 reseptörü genellikle gram-negatif bakterinin dış tabakasındaki lipopolisakkaridi tanıır¹³⁹. İlginçtir ki RSV F glikoproteini, CD14 ve TLR4'lerin paylaşılmış komponentlerinin aktivasyonu üzerinden doğal bağışıklığı uyarmaktadır. TLR4 reseptörü RSV enfeksiyonuna karşı doğal immunitede önemlidir. Fagositik hücrelerin yüzeyindeki TLR reseptörlerinin uyarılması T hücreleri aktive eden sitokinlerin artması sonucunda kazanılmış bağışıklığı başlatabilir. Bu işlev sebebiyle fagositik hücreler özellikle dendritik hücreler doğal ve kazanılmış bağışıklıkta anahtar rolü oynar¹⁴⁰.

Kazanılmış bağışık yanıtın humoral ve hücre aracılı immunité olmak üzere iki komponenti vardır. Üst solunum yollarında RSV enfeksiyonuna karşı direnç lokal sekretuvar IgA aracılığı ile olur ve geçicidir. Erken lokal immunité enfeksiyonun ilk birkaç gününde ortaya çıkar. Enfeksiyona karşı daha uzun süreli direnç özellikle IgG antikorları ile olmaktadır. Anneden pasif yol ile kazanılan IgG antikorlarının varlığı sayesinde 8 haftadan küçük bebeklerde RSV enfeksiyonu nadiren görölmektedir¹⁴¹. Yaşamın ilk altı ayı süresince maternal antikor düzeyleri azalır ve infantları RSV enfeksiyonuna karşı korunmasız bırakır. Ancak primer RSV enfeksiyonu durumunda günler içinde düzeyleri düşük de olsa serum ve sekretuvar antikorlar ortaya çıkar ve bu antikorlar primer enfeksiyondan sonra birkaç ayda azalırlar¹⁴². Nötralizan antikor yanıtının eksikliği immunolojik immatürite yanında transfer ile kazanılan maternal

antikorların supressif etkisine de bağlanmaktadır. Yüksek antikor düzeyleri tekrarlayan RSV enfeksiyonundan uzun süre sonra kazanılır. Ancak RSV enfeksiyonu sonrasında gelişen antikorlar uzun süreli koruma sağlamamaktadır ve bu sebeple primer enfeksiyon hastalığın tekrarını önleyememektedir, sadece ilerde hastalığı daha hafif geçirmesini sağlamaktadır^{143,144}. İnfant büyüdükçe solunum sekresyonlarında bulunan, lokal nötralizan IgA antikorlarının varlığı serum antikorlarına göre korunmada daha önemli hale gelmektedir. RSV enfeksiyonuna cevapta doğal bağışıklık ve humoral yanıtın bir başka önemli komponenti kompleman sistemidir. RSV ile enfekte olan epitel hücreleri komplemanı hem klasik hem de alternatif yolak üzerinden aktive edebilmektedir. Kompleman antikor aracılı virus nötralizasyonunun gelişmesinde önemlidir¹⁰³.

Solunum yolu viruslarına karşı hücresel immunité CD8 sitotoksik lenfositleri, CD4 yardımcı T (T helper) lenfositleri ve NK (Naturel Killer; doğal öldürücü) hücreleri gibi doğal immun hücreleri içermektedir. Hücresel immunité ciddi RSV enfeksiyonundan korunma ve virus yayılımının sınırlandırılmasında merkezi rol oynar. RSV enfeksiyonu sebebi ile hospitalize edilen infantlarda yüksek düzeyde CD16⁺/CD56⁺ NK hücreleri, T-helper-1 (Th1) ve T-helper-2 (Th2) sitokinleri ve gelişmiş CC kemokin mRNA'lar saptanmaktadır. Ayrıca RSV ile enfekte hastaların nazofaringeal sekresyon ve periferik kanlarında NK hücreleri ile ilişkili antikor bağımlı hücresel sitotoksité (ADCC; Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) saptanmaktadır. Akut RSV enfeksiyonu olan infantların periferik kan mononükleer hücrelerinde RSV spesifik sitotoksik T lenfositleri enfeksiyonun başlangıcından sonra hızla tespit edilebilir düzeye ulaşır. RSV'ye karşı immun cevap yaşa bağımlıdır ve 6-24 ay arasındaki infantların % 65'inden fazlası ve 5 ayın altındaki infantların % 35'i RSV spesifik hücresel sitotoksité göstermektedir. Pulmoner hastalıkların çeşitliliği RSV'nin farklı proteinlerine karşı cevap veren fonksiyonel olarak farklı T hücre alt kümelerinin olması ile ilişkili olabilir. Primer RSV enfeksiyonu sınırlı hastalık patogenezi ile T-helper 1 (Th1) ve T-helper 2 (Th2) sitokinlerin karışımı bir immun yanıtı sebep olur. Th1/Th2 sitokin dengesinin kontrolünde CD4 yardımcı T lenfositlerinden köken alan erken interferon gama (IFN- γ), IL-4 ve IL-5 sunumu önemlidir. Primer veya sonraki RSV enfeksiyonlarında IFN- γ yokluğu durumunda Th2 tip sitokin cevabı baskın olmakta ve hastalığın ciddiyeti artmaktadır^{103,126}.

Humoral immunitesi sağlam, ama hücrel immunité defekti bulunan bireylerde morbiditenin ve virus yayılım süresinin artması söz konusudur. Bu, vücudun RSV enfeksiyonu ile mücadelesinde özellikle immun sistemin hücrel komponentinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir^{125,127}.

2.7. Klinik

RSV 56 yıl önce tanımlanmış olmasına rağmen halen önemli bir sağlık sorunudur. Tüm dünyada infant ve küçük çocuklarda üst solunum yolu enfeksiyonunun ve ciddi alt solunum yolu hastalığının başlıca sebeplerinden biridir^{145,146}.

RSV'ye bağlı klinik belirti ve bulgular genel olarak virusa özgün değildir. RSV enfeksiyonunun klinik şekli yaşa ve önceki sağlık durumuna göre çeşitlilik gösterir. Büyük çocuk ve yetişkinlerde soğuk algınlığı şeklinde üst solunum yoluna ile sınırlı iken, daha küçük çocuklar ve bebeklerde alt solunum yolları tutulumu ön plandadır. RSV kaynaklı enfeksiyonlar farenjit, konjonktivit, laringotrakeit, trakeobronşit, pnömoni, bronşiyolit ve otitis media olarak sayılabilir^{103,127}.

Primer enfeksiyonu olan infant ve küçük çocuklarda genellikle pnömoni veya bronşiyolit gibi bir alt solunum yolu enfeksiyonu mevcuttur. Bulaştan sonraki 4-6 günlerde (2-8 gün) semptomlar başlar ve 1-3 gün sonra bu çocukların % 98'inde öksürük, % 75'inde ateş, burun akıntısı, % 65-78'inde hışıltılı solunum, % 73-95'inde solunum güçlüğü ve bazen hipoksi görülür¹²⁵. Daha ağır hastalığı olan çocuklarda solunum güçlüğüne işaret eden yaygın hırıltılı solunum, burun kanadı ve interkostal çekilmelerin solunuma eşlik etmesi ve otitis media söz konusu olur. Ayrıca küçük infantlarda apne, irritabilite, azalmış aktivite tek semptom olarak ortaya çıkabilir. Daha önce sağlıklı olan zamanında doğan infantlarda RSV enfeksiyonu sırasında apne görülme insidansı % 1'den az iken RSV bronşiyoliti olan infantların % 20'sinde apne görülmektedir. Prematür veya altta yatan hastalık varlığında apne insidansı artmaktadır. Apne nadiren birkaç günden fazla sürer, ancak bu hastaların % 10'u entübasyon ve mekanik ventilasyon gerektirmektedir^{147,148}.

Alt solunum yolu enfeksiyonu gelişen çocukların % 0,5-2'si hastanede yatarak tedavi gerektirir. Buna karşılık prematürite, kronik akciğer hastalığı, konjenital kalp hastalığı, bronkopulmoner displazi gibi altta yatan risk faktörlerinin varlığı durumunda

vakaların % 50'sinde alt solunum yolu enfeksiyonu gelişmekte ve hospitalizasyon endikasyonu % 25 kadar artmaktadır^{42,103}.

Daha büyük çocuklarda ve yetişkinlerde RSV enfeksiyonu tipik olarak öksürük, nezle, burun akıntısı, boğaz ağrısı, baş ağrısı, halsizlik, konjonktivit gibi üst solunum yolları belirtileri ile seyreder^{149,150}. Ancak 35 haftalık gebelik süresinden önce doğan çocuklar için hastanede yatarak tedavi görme, yoğun bakım ünitesine başvurma, 60 günden daha erken yaşta hastalığın tekrarı, erkek cinsiyet, artmış solunum oranı (solunum işinin artışı), düşük sosyoekonomik düzey ve yetersiz beslenme gibi faktörlerle ilişkili olarak hastalık ağır seyredebilmektedir. Yetişkinlerde özellikle kemik iliği ve organ transplant hastaları gibi immun sistem baskılanması olanlarda hastalık ağır seyretmektedir^{151,152}.

RSV enfeksiyonu, epitelyal kolonizasyonu kolaylaştırdığı için sıklıkla bakteriyel koenfeksiyonlar ile birlikte görülür^{153,154}. Bu sebep ile hem hospitalizasyon hem de pediatri yoğun bakım ünitesinde tedavi gerektiren RSV enfeksiyonlarının insidansının % 17,5-44 kadar yüksek olduğunu belirlemiş pek çok araştırma bulunmaktadır¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Bakteriyel koenfeksiyonlarda izole edilen mikroorganizmalar sıklık sırasına göre *Haemophilus influenzae* (% 43,9), *Streptococcus pneumoniae* (% 36,6) ve *Moraxella catarrhalis* (% 29,3)'dir. Yapılan pek çok çalışmada üst solunum yolu tutulumunda olmasa da alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocukların % 30-70'inde bu patojen bakterilere karşı IgG antikor pozitif bulunmuştur^{158,159}.

Bronşiyoliti olan 60 günlük ve daha büyük çocuklarda başka bir sistemde eş zamanlı ağır bakteriyel enfeksiyon riski düşüktür. Bu sebep ile laboratuvar testleri ile araştırılması gerekmez^{160,161}. Bronşiyoliti olan 60 günden küçük infantlar hastaneye sıklıkla ateş şikayeti ile getirilir. Ancak bronşiyolit ile beraber ateşi olan bu infantlar, tek başına ateşi olan infantlara göre başka bir sistemde eş zamanlı bir bakteriyel enfeksiyon açısından daha düşük risk taşımaktadır. Eğer 60 günden küçük bir infantın eş zamanlı bir bakteriyel enfeksiyonu mevcut ise kaynak en sık üriner sistemdir^{126,162}.

Kilo kaybı, çarpıntı, tremor, taşikardi ve hipertansiyon ile kendini gösteren, mortalitesi % 20-30 olan tirotoksikozun (tiroid fırtınası) insidansı prepubertal dönemde 0,1/100,000 olup en sık Graves endokrinopatisine sekonder olarak ortaya çıkmaktadır. Onbir yaşında bir İspanyol kız çocuğunda Graves hastalığının RSV enfeksiyonu

tarafından tetiklenerek tirotoksiza sebep olduğu literatürde bir vaka raporu olarak yer almaktadır¹⁶³.

Hastane bakımı gerektirsin veya gerektirmesin normal şartlarda RSV ile enfekte infant ve çocukların çoğu genellikle 1-4 hafta içinde iyileşir. Histolojik olarak düzelme birkaç gün içinde gerçekleşir, ancak solunum yolu epitelin tekrar oluşması 2 haftaya kadar uzayabildiği için tamamen düzelme 4 hafta kadar sürer ki bu dönemde klinikte uzamış öksürük, hırıltı ve akciğer fonksiyonlarında bozulma görülebilir¹²².

Hospitalize edilen infantlarda fatalite oranı % 0,5-1 olarak tahmin edilmektedir¹²⁶. Küçük infantlar ve immun sistemi zayıf olan çocuklar iyileşmeye rağmen 1-3 hafta virusu yaymaya devam edebilmektedirler. Hastane ortamında uzun süreli virus saçılımı riski 3-8 gün olmakla beraber 3-4 haftaya kadar uzayabilmektedir. Bu sebep ile immun yetmezliği olan enfekte çocukların RSV'nin nozokomiyal transmisyonunda kaynak olduğu dikkate alınmalıdır¹⁶⁴.

Herhangi bir yaşta başka bir RSV enfeksiyonu kazanılabilir, ancak, sonraki enfeksiyonlar genellikle daha hafif seyreder. Fakat yaşlılar, immun sistemi baskılanmış çocuklar ve yetişkinlerde reenfeksiyonlar ağır seyredebilmektedir¹²⁶.

Yapılan bazı çalışmalara göre kreşe giden çocukların yaklaşık olarak % 70'i ilk yıllarında RSV enfeksiyonu geçirirler. Aynı çocukların ikinci yıl yine RSV enfeksiyonu geçirmeleri % 74-83 ve üçüncü yılda % 46-65 oranında görülebilmektedir¹²².

Bronşiyoliti olan çocukların yaklaşık olarak % 40'ında hırıltı epizodları beş yaşına kadar, % 10'unda daha ileri yaşlara kadar devam edebilmektedir¹⁶⁵. Başlangıç enfeksiyonu ve hırıltı astımın ilk manifestasyonları mı ya da hırıltı epizotları astımın takiben ortaya çıktığı postbronşiyolit hırıltı mı olduğu henüz bilinmemektedir¹⁶⁶. Tekrarlayan hışıltılı solunum problemi olan bebeklerde (RSV yanında diğer respiratuvar viruslar da etken olabilir) akciğerde yapısal değişiklikleri önlemek, atak sayısını azaltmak, atak şiddetini azaltmak için astım tedavisinde kullanılan inhale steroidler ve oral montelukast önerilebilmektedir¹²².

2.8. Tanı

2.8.1. Klinik tanı

RSV enfeksiyonu tanısında ilk ve en önemli basamak hastanın öyküsü ve fizik muayenesidir¹⁶⁷.

RSV'nin nazofaringeal epitele bulaşının ilk birkaç gününde hastalar genellikle nazal konjesyon, birkaç günde düzelen hafif ateş ve prodüktif öksürük belirtileri gösterir. Bu semptomlar özellikle daha önce RSV enfeksiyonu geçirmiş olanlarda birkaç hafta süren üst solunum yolu enfeksiyonu şeklinde devam eder. İnfantlarda ise daha sık olarak (% 30-50) üst solunum yolu enfeksiyonu belirtilerinin ortaya çıktığı 2-3 gün içinde alt solunum yolu enfeksiyonu geliştiği görülmektedir. Tipik olarak ciddiyeti artan öksürük, bol miktarda yoğun kıvamlı sekresyonlar ve etkilenen infantların yarısında farenjit belirtileri ortaya çıkmaktadır^{168,169}.

Fizik muayenede infantlarda takipne, burun kanatlarının solunuma katılması, interkostal retraksiyonlar ve ekspiratuar fazın uzaması gibi solunum sıkıntısı belirtileri görülebilmektedir. Fizik muayenede oskültasyon bulgusu olarak ral ve pek çoğunda hırıltı mevcuttur. Etkilenen infantların yarısında kusma görülmektedir^{126,168,169}.

Radyografi ve kan sayımı gerekli olmasa da eğer tercih edilirse, akciğer grafisinde tipik olarak havalanma artışı (hiperinflasyon), basık düzleşmiş diyafram ağır alt solunum yolu enfeksiyonu olan vakalarda sıklıkla sağ üst veya orta loblarda olmak üzere intersitisyel infiltrasyon alanları, segmental atelektaziler, kan sayımında lökositlerin normal veya hafif arttığı görülür. Ancak bu bulgular kliniğin ağırlığı ile korrele olmayıp rutin tanıda ve takipte önerilmemektedir^{126,167}.

RSV bronşiyoliti geçiren bebeklerde solunum fonksiyon testleri aylarca bozuk seyredebilmektedir. Bu sebeple tedavide henüz gelişimini tamamlamamış akciğerlerde RSV hasarını azaltmak amaçlanır¹²².

Çok küçük infantlar, solunum yolu enfeksiyonlarının tipik belirtileri yerine sadece letarji ve beslenme güçlüğü belirtileri gösterebilmektedir. Bradikardinin de eşlik ettiği apne özellikle prematür apnesi veya konjenital kalp hastalığı öyküsü olanlarda olmak üzere, çok küçük infantlarda oldukça sık görülen bulgulardır. Bu infantlara genellikle ciddi hipoksemi ve dehidratasyon da eşlik etmektedir⁷¹.

Söz konusu klinik belirti ve bulgular RSV enfeksiyonuna özgün olmayıp parainfluenza virus, adenovirus gibi bir çok virus, *Chlamydia trachomatis* gibi

bakteriler, yabancı cisim aspirasyonu, anafilaksi, konjenital kalp veya akciğer hastalıkları da benzer klinik tabloya sebep olabilmektedir. Ancak infantlarda özellikle altı aydan küçük olanlarda bronşiyolit veya bronkopnömoni varlığında, bu yaş grubunda en sık etken olan RSV enfeksiyonundan şüphelenilmelidir^{170,171}.

Klinik tanının confirmasyonu ve kesin tanı için laboratuvar tanı yöntemlerine başvurmak gerekir.

2.8.2. Laboratuvar tanısı

RSV'nin laboratuvar tanısında başlıca yöntem solunum yolu sekresyonlarında virusun saptanmasına dayanır. Solunum yolu sekresyonları steril şartlarda alınan nazofaringeal aspirat, nazofaringeal sürüntü, nazal yıkantı, nazal sürüntü, bronkoalveolar lavaj, boğaz sürüntüsü ve balgam örnekleri şeklinde elde edilebilir. Boğaz sürüntü örnekleri ve balgam RSV tanısı için tercih edilmemektedir. Esasında mantar veya bakterilere bağlı alt solunum yolu enfeksiyonlarında olduğu gibi örneğin alt solunum yollarından alınması gerekmez.

Pediyatrik yaş grubunda nazofaringeal sürüntü örneklerinin tercih edilmesi virusun ilk yerleşim yeri olması, işlemin hasta açısından daha az rahatsız edici olması, maliyetinin düşük olması ve aileler tarafından daha kabul edilir olmasındandır. Ayrıca yaş küçüldükçe nazofarinkste virus titresi daha yoğun ve daha uzun süre bulunmaktadır¹⁷².

RSV'nin tanı şansını artırmak seçilecek tanı yöntemine göre değişebilmekle beraber, örneğin enfeksiyonun akut döneminde, viral yükün en fazla olduğu ilk üç günde alınması tercih edilmelidir. RSV zarfsız bir RNA virusu olduğu için ısı değişimlerine çok hassas olup alınan örneğin mümkünse özel transport besiyerinde veya en azından PBS (Phosphate Buffered Saline) solusyonu içinde en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılması gerekir. Laboratuvarında örnek hemen çalışılmalı, eğer hemen çalışılamayacak ise bir güne kadar +4°C'de veya daha uzun süre bekletilecek ise -80°C'de saklanmalıdır.

Genel olarak doğru zamanda, uygun şekilde alınıp laboratuvara hemen ulaştırılan nazofaringeal aspirat veya sürüntü örnekleri RSV tanı testleri için idealdir.

RSV'nin laboratuvar tanısında en sık kullanılan metodlar virusun hücre kültüründe izolasyonu, viral antijenin gösterilmesi, seroloji ve viral genomun tespiti.

2.8.2.1. Hücre kültürü

İlk kez 1913 yılında bir virusun (vaccinia virus) hücre kültüründe üretilmesinden bu yana farklı hücre kültürü sistemlerinde birçok virusun izolasyonunun mümkün olduğu görülmüştür. Günümüzde hücre kültüründe virus izolasyonu çok zaman alması, pratik olmaması, yüksek maliyeti, kontaminasyon riski, retrospektif tanı aracı olmasına rağmen yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması sebebi ile halen viral enfeksiyonların tanısında "altın standart" olarak kabul edilmektedir¹⁷³.

RSV'nin hücre kültüründe izolasyonu için klasik hücre kültürü yönteminde PMK (Primary Rhesus Monkey Kidney cell line), Hep-2 (Human Larynx Epidermoid Carcinoma cell line), A549 (Adenocarcinomic Human Alveolar Basal Epithelial cell line) ve HeLa (Human Cervix Carcinoma cell line) hücreleri kullanılır. Daha hızlı bir kültür yöntemi olan Shell-vial tekniğinde ise ek olarak MRC-5 (Normal Human Fetal Lung Fibroblast cell line) hücreleri de kullanılabilir. Klasik hücre kültürü yönteminde virusun hücre kültürüne inokülasyonundan genellikle 3-6 gün sonra eozinofilik sitoplazmik inklüzyonlar ve RSV'nin karakteristik sitopatik etkisi (sinsityum) ortaya çıkmaktadır. Shell-vial hücre kültürü yönteminde virus tanısı spesifik monoklonal antikorları kullanarak DFA veya immunoperoksidaz boyama ile yapılmaktadır. Ayrıca Shell-vial hücre kültürü tekniğinde 1-3 günde sonuç alınabilmektedir. Hücre kültürünün avantajı hızlı antijen tespiti kitlerine göre daha sensitif olması, antijenik mutasyonlar ve nozokomiyal transmisyonun konfirmasyonu için genetik tiplendirme gibi ileri araştırmalara olanak tanınmasıdır^{173,174}.

RSV son derece hassas bir virus olduğu için ısı değişikliklerine, donma ve çözündürme işlemlerine çok duyarlıdır. Bu sebep ile RSV transport ve kültür ortamlarında hızla etkisizleşir, ek olarak yavaş ürettiği için hücre kültüründe izolasyonu güç olmaktadır. Ayrıca virus izolasyon süresinin uzun olması, tanının retrospektif olması ve maliyetin yüksek olması sebebi ile hücre kültüründe RSV izolasyonu özellikle akut enfeksiyon tanısında tercih edilmemekte, sadece referans laboratuvarlarında epidemiyolojik araştırmalar için kullanılmaktadır.

2.8.2.2. Antijen tespiti

Antijen saptama amacı ile kullanılan yöntemler DFA, ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay), kromatografik ve optik immun testlerdir.

Çocuklarda RSV enfeksiyonlarının rutin tanısında kullanım kolaylığı ve hastaneye başvuru anında RSV pozitif olanları ayırmadaki hızlılığı sebebi ile en sık kullanılan yöntem DFA veya ELISA ile antijen tespittir. Sensitivite % 75-94 arasındadır. Yetişkinlerde viral titre daha az yoğun olduğundan sensitivite düşmektedir. Günümüzde daha özgün monoklonal antikorların geliştirilmesi ile sensitivite % 80-97'ye kadar arttırılmıştır¹⁶⁴.

Direkt örnekler üzerinde immunfloresan metod ile viral antijen tespiti 1970'lerden bu yana kullanılmaktadır. Monoklonal antikorların 1980'lerde kullanılmaya başlaması ile virusların (Herpes simplex virus, varicella zoster virus, influenza virus, RSV, parainfluenza virus, adenovirus, cytomegalovirus, human metapneumovirus) tanısında immunfloresan testlerin kullanımı günümüze kadar büyük bir ilerleme göstermiştir. Başlangıçta, viral antijenlerin hızlı tanısı iki saat veya daha fazla süre gerektiren, iki aşamalı immunfloresan boyama temeline dayalı olan "indirekt" floresan antikor testi şeklinde yapılmakta iken, artık floresan boya ile işaretli sadece bir primer antikorun kullanıldığı, 20-30 dakikada hazırlanabilen tek aşamalı "direkt" floresan antikor testi tercih edilmektedir.

DFA tekniğinde floresan işaretli antikor kullanılarak solunum yolu sekresyonlarındaki epitel hücrelerinde bulunan RSV antijeni tespit edilir. DFA'da enfekte hücrelerin immunfloresan paterninin mikroskop ile direkt görülebilmesi tekniğe ek bir spesifite kazandırır¹⁷⁴. Hücre kültüründe virus izolasyonu ile karşılaştırıldığında, hızlı immunfloresan metodlar ile viral antijen tespiti genel olarak mükemmel bir spesifite ve çok iyi sensitivite göstermektedir. Performans özellikleri araştırılan virusun tipine, örnek türüne, hastanın yaşına, örneğin alınma zamanına ve muhafazasına, kullanılan monoklonal antikor reagenlerine ve laboratuvar deneyimine göre değişmektedir¹⁷⁵. Sonuç olarak immunfloresan testler, RSV ve varicella virus tanısı hariç tutulmak şartı ile, bir dereceye kadar hücre kültürüne göre daha az duyarlı ve daha az özgündür. Hücre kültüründe sitopatik etki az veya yavaş oluşturan respiratuvar virusların (RSV, influenza virus tip A-B, parainfluenza virus tip 1-3, adenovirus, human metapneumovirus) hızlı tanısında direkt floresan antikor testi (DFA) önemli bir yarar sağlamıştır¹⁷⁴. Bu özellikle daha yüksek titrede ve daha uzun süre virusu taşıyan pediatrik hastalarda geçerlidir. Respiratuvar viruslar içinde RSV'nin DFA ile tanısının sensitivitesi % 84, % 93 ve % 99 arasında değişen oranlar ile konvansiyonel hücre

kültüründen daha yüksektir¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. RSV tanısında DFA ve hızlı hücre kültürünü karşılaştıran çalışmalarda labil bir virus olması sebebi ile RSV tanısında DFA'nın daha sensitif bir metod olduğu bulunmuştur^{179,180}. DFA'nın diğer respiratuvar virusları için sensitivitesi ise çok değişken olarak rapor edilmektedir. RSV antijeninin DFA ile araştırılması sırasında floresan mikroskobunda intrasitoplazmik elma yeşili floresans veren inklüzyonlar görülmesi pozitif sonucu işaret eder¹⁷³.

ELISA (enzym immun assay) testinde eğer hasta örneğinde RSV antijeni varsa antijen virusa spesifik antikorlarla kaplanır ve enzimle işaretli bir başka antikor yardımı ile tespit edilir. Antijen saptama kitleri uygulaması kolay ve kısa zamanda sonuç alınan teknikler olduğu için sık olarak kullanılmaktadır. Sonuçları 15-30 dakikada almak mümkündür. Günümüzde pek çok pediatrik örneklerde antijen saptama kitleri bulunmaktadır ve bunların sensitiviteleri % 72-94, spesifiteleri ise % 95-100'dür. Oysa büyük çocuklar ve yetişkinlerde RSV reenfeksiyonları sırasında virus saçılımının kısa sürmesi ve viral titrenin düşük olması sebebi ile ELISA'nın sensitivitesi % 0-20'ye kadar düşmektedir. Ayrıca yaz sezonunda veya virusun toplumdaki prevalansının düşük olduğu bölgelerde kullanıldığında ELISA kitlerinin spesifitesi düşmektedir ve yanlış pozitif oranları artmaktadır¹⁷⁴.

RSV tanısı için 15-30 dakika süren immunokromatografik yöntemler de (lateral flow sistemler) kullanılmaktadır. Ancak DFA ve hücre kültürüne göre daha pahalı yöntemlerdir ve tanı için örneğin daha fazla virus partikülü içermesi gerekir. Buna karşılık RSV tanısında DFA gibi immunokromatografik testler de hücre kültürüne göre daha sensitiftir, spesifitesi ve pozitif prediktif değeri daha yüksektir¹⁷³.

RSV tanısı için kullanılan metoda göre örnek türünün seçilmesi önemlidir. Örneğin DFA ile RSV antijeni tespiti nazofaringeal sürüntü ve nazofaringeal aspirat örneklerinde eşit iken, hücre kültürü planlanıyorsa virus izolasyon şansı nazofaringeal sürüntü örneğinde % 47, nazofaringeal aspiratta ise % 72'dir¹⁸¹.

2.8.2.3. Seroloji

Serumda nötralizan antikor tayini, akut ve konvelesan dönemlerde ölçülen nötralizan antikor titrelerinde dört veya daha fazla artış varlığı büyük çocuklar ve yetişkinlerde RSV tanısında kullanılabilirken, 6 aydan daha küçük çocuklarda hem bu yaş grubunda daha ağır seyreden akut RSV enfeksiyonuna karşı tedaviye başlama

süresini yeterince kısaltmaması, hem de duyarlılığının düşük olması sebebi ile tercih edilmemektedir. Serokonversiyonun iki haftadan önce oluşmadığı, 4-6 haftaya kadar gecikebileceği göz önüne alındığında antikor ölçüm temeline dayanan serolojik yöntemlerin her yaş grubunda akut RSV enfeksiyonu tanısında kullanılması çok anlamlı bulunmamaktadır¹⁸².

Büyük çocuklarda ve yetişkinlerde akut enfeksiyon varlığında nötralizasyon veya ELISA ile serum veya tükürükte RSV spesifik IgM yüksekliği ve akut konvelesan dönemde IgG yüksekliği tespit edilmesi tanı koydurucudur. Aralıklı olarak takip edilen antikor ölçümlerindeki artış reenfeksiyonun da iyi bir göstergesidir. Ancak küçük çocuklarda hepsi RSV'ye karşı antikor yanıtı oluşturmadığı için tercih edilmemektedir^{183,184}.

RSV spesifik antikorlarının taranması daha çok seroepidemiolojik bilgi ve araştırma amaçlı kullanılmaktadır¹⁷⁴.

2.8.2.4. Moleküler Tanı Metodları

Moleküler metodlar virusların tanı prosedürlerinde devrim yaratan, RSV tespitinde en sensitif ve en spesifik tekniklerdir.

Klinik örneklerdeki veya hücre kültürü supernatanlarındaki viruslar çok düşük miktarda bulunsalar bile hedef RNA veya DNA'ya komplementer olan yüksek derecede spesifik nukleik asit problemleri ile veya nukleik asit çoğaltma teknikleri (NAATs; Nucleic Acid Amplification Techniques) ile saptanabilmektedir. Virus genomunun, in vitro ortamda belli uzunluktaki hedef bölgeyi tanıyan özgün primerler ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi kullanılarak kısa sürede milyon defa kopyasının oluşturulduğu polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction; PCR) nukleik asit çoğaltma tekniklerinin en sık kullanılan temel yöntemidir^{164,185}.

Araştırılması planlanan virus RSV gibi bir RNA virusu ise öncelikle RNA'nın reverse transkriptaz enzimi ile DNA'ya çevrilmesi ve sonra amplifikasyon işlemine geçilmesi gerekir. Yapılan son çalışmalar respiratuvar viruslar için revers transkripsiyon-PCR yönteminin hücre kültürü ve antijen saptama metodlarına göre daha sensitif olduğunu göstermiştir^{164,174,185}.

PCR'da amplifikasyon sonrası milyonlarca DNA kopyası elde edilerek tanı şansı artırılmaktadır. Bu sebep ile PCR sadece çocuklarda değil, aynı zamanda viral

replikasyonu azaltan nötralizan antikorların varlığı yüzünden reenfeksiyonlar sırasında düşük viral titresi olan yetişkinlerde de sensitif bir tekniktir. Eğer amplifikasyon iç ve dış olmak üzere iki çift primer seti kullanılarak iki aşamada yani nested PCR gerçekleştirilirse zaman alıcı olsa da testin duyarlılığı ve özgüllüğü daha da arttırılmış olur. Son on yılda RSV genomunun çeşitli gen segmentlerinin amplifikasyonunu amaçlayan pek çok in-house PCR protokolü geliştirilmiştir^{174,186}.

PCR tekniklerinden biri olan multipleks PCR ile klinik örneklerde aynı anda birden fazla virusun varlığı araştırılabilmektedir. Bu teknikte birbirine komplementer olmayan ve bağlanma (annealing) ısıları birbirine benzer olan özgün primerler kullanılmalıdır. Virusun solunum sekresyonlarından hücre kültürü ile izolasyonu veya antijen tespiti için DFA'nın sensitivitesinin nispeten düşük olduğu yetişkin hastalarda viral solunum yolu enfeksiyonunun etyolojisini araştırmak için duyarlılığı yaklaşık olarak % 98 olan multipleks PCR sık olarak tercih edilmektedir¹⁸⁷.

Günümüzde RSV tanısında kullanılmakta olan bir başka PCR testi ise DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı artış gösteren floresan sinyali sayesinde amplifikasyonun monitör aracılığı ile takip edilebildiği gerçek zamanlı PCR'dır. Gerçek zamanlı PCR'da amplifikasyon için cihaza yüklenen test tüplerine başka manuel müdahale gerekmediği için kontaminasyon riski azdır, amplifikasyon sonrası görüntüleme gerekmediği için zaman kaybı olmayıp kısa sürede sonuç alınabilmektedir ve kantitatif sonuç alabilme seçeneği de bulunmaktadır. Ayrıca multipleks gerçek zamanlı PCR ile birçok respiratuvar virusların tanısı aynı anda yapılabilir. Ancak, pahalı bir yöntemdir^{174,188}.

2.9. Epidemiyoloji

Küçük hava yollarının inflamatuvar obstrüksiyonu sonucu gelişen bronşiolit ve akciğer dokusunun inflamasyonu ile konsolidasyonu sonucu gelişen pnömoni gibi viral solunum yolu enfeksiyonları, dünya çapında infant (0-1 yaş grubu) ve erken çocukluk döneminde (1-5 yaş) hospitalizasyonun en sık sebebidir. RSV söz konusu alt solunum yolu enfeksiyonlarının infant ve erken çocukluk döneminde en önemli major sebebidir. ABD'de (Amerika Birleşik Devletleri) RSV, çocuklarda kış bronşiyolitinin yaklaşık olarak % 50-80'inden ve kış pnömonisinin % 30-60'ından sorumludur^{145,146,189}.

RSV enfeksiyonu çocukların % 50'sinde yaşamın ilk yılında görülmekte olup, bunların % 20-40'ında pnömoni ve bronşiyolit gibi ASYE şeklinde ortaya çıkmaktadır¹⁹⁰. ABD'de her yıl 5 yaş altındaki yaklaşık 1.650.000 çocuk bronşiyolit sebebi ile hospitalize edilmekte olup, bu çocukların % 57'sinin yaşı 6 aydan küçük olmaktadır. RSV enfeksiyonuna bağlı olarak hospitalize edilen infantların sayısı her yıl 85.000-144.000'i bulmaktadır. İlaveten her yıl RSV enfeksiyonu kaynaklı hospitalize edilen çocukların 372'si respiratuvar ve kardiyovasküler sebepler ile öldüğü, bunların da % 90'ının bir yaşından küçük olduğu tahmin edilmektedir. RSV enfeksiyonu sebebi ile beş yaş altı çocuklarda tahmin edilen yıllık medikal müdahale gerektiren vaka sayısı ise 21 milyondur. Yapılan çalışmalarda hastaneye yatış oranının erkek bebeklerde 1,3-1,4 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Hospitalize edilen çocukların % 20-25'i pnömoni ve % 70'i bronşiyolit vakaları olarak tanı almaktadır¹⁹¹⁻¹⁹³.

Küresel RSV hastalığının yıllık külfeti 64 milyon vaka ve 160.000 ölüm olarak tahmin edilmektedir. ASYE'ler 1990'lı yıllarda yılda 4 milyon çocuk ölümüne sebep olurken, bunun 2,6 milyonu infant, 1,4 milyonu 1-4 yaş grubu ölümlerdi¹³². DSÖ raporlarına göre 2000'li yılların başında pnömoni başta olmak üzere akut solunum yolu enfeksiyonlarına bağlı çocuk ölümleri 1,9 milyondur. ABD'de RSV enfeksiyonları yılda 90,000'den fazla hospitalizasyon gerektirmekte ve % 90'ı 1 yaşından küçük olmak üzere yılda tahminen 372 çocuğun solunum sistemi ve/veya kardiyovasküler sistem ile ilişkili ölüme yol açmaktadır¹³³.

RSV çocuklarda bütün bronşiyolit vakalarının yaklaşık olarak % 70'inin sebebi olup, infant ve erken çocukluk döneminde ASYE'lerin primer sebebidir. RSV enfeksiyonlarının çoğu semptomatiktir ve sıklıkla ASYE şeklindedir¹⁹⁴. RSV küçük çocuklarda pnömoni olgularının % 5-40'ından, bronşiyolit olgularının % 50-90'ından sorumludur¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Amerika'da 12 aydan küçük bebeklerde primer RSV enfeksiyon riski % 50-70'tir ve bunların yaklaşık % 30-40'ında alt solunum yolu hastalığı gelişmektedir^{200,201}. Serolojik çalışmalar bebeklerin yarısının ilk bir yaşta, tamamının ise iki yaşına kadar % 95 seropozitifliğe ulaştığını göstermiştir. Hayatın ilk 5 yılında alt solunum yolu hastalığı riski reenfeksiyonlar ile artmaktadır^{202,203}.

RSV epitel hücrelerinde çoğalabildiği ve öksürük, hapsirme ile yayılabildiği için bulaşıcılığı yüksek olan bir patojendir. Solunum salgılarında birkaç gün veya bazen haftalarca bulunur. İnsandan insana temas, kontamine eşyalara temas, kontamine ellerin

göz veya burun ile teması ve virus aerosol içinde inaktif olduğu için kısıtlı da olsa damlacık enfeksiyonu yolu ile bulaşır. İnkubasyon süresi 2-8 gün, virus saçılımı 3-8 gün olup bu süre immun yetmezliği olan infantlarda 4 haftaya kadar uzayabilmektedir^{204,205}.

RSV'nin nozokomiyal bulaşı sağlık personellerinin elleri aracılığı ile olmaktadır. Toplum ve/veya hastane kökenli RSV enfeksiyonu olan sağlık personeli genellikle hastalığından haberdar değildir, çünkü enfeksiyon hafif grip benzeri hastalık olarak da geçirilebilmektedir. Oda sıcaklığında RSV hastalarının sekresyonlarında, gözeneksiz yüzeylerde neme bağlı olarak 3-30 saat kadar yaşar, gözenekli yüzeyler üzerinde bir saat kadar yaşar. RSV'nin eller üzerindeki enfektivitesi kişiden kişiye değişir ve genellikle bir saatten azdır¹⁰³. RSV'nin nozokomiyal transmisyonunu kontrol altında tutmak için virusun doğası ile ilgili sağlık personelinin eğitime, hastaların aktif gözetimine, dikkatli el yıkamaya, maske ve koruyucu elbiseden ziyade eldiven ve bariyer kullanımına özen gösterilmesi gerekir²⁰⁶.

Ağır RSV enfeksiyonu riski altta yatan kardiyak, pulmoner veya immun sistem hastalığı olan durumlarda yüksektir. RSV özellikle prematür infantlar ve immunkompromize hastalarda nozokomiyal solunum yolu enfeksiyonlarının major sebeplerinden biridir^{207,208}. RSV salgınlarının toplum bazlı görülmesine rağmen hastalığın epidemiyolojisine RSV suş varyasyonunun etkisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır, ancak virusun genetik ve antijenik değişikliklerinin yıllık epidemi hareketlerinde ve populasyonun reenfeksiyonlarında önemli olduğu düşünülmektedir. RSV A ve B suşlarının sirkulasyon paternleri toplumlar arasında genotipik olarak farklı görülür, fakat bir toplumda aynı genotipin suşları arasında sınırlı dağılım varken farklı toplumlar arasında genotipte daha fazla farklılık vardır²⁰⁹. RSV subgruplarının her ikisi her yıl birlikte sirküle olabilir ve/veya ön plana çıkan grup sezondan sezona değişebilir. Ancak RSV subgrup A izolatlarının subgrup B'den daha sık görüldüğü bilinmektedir^{210,211}.

RSV sıklıkla toplum kaynaklı bir enfeksiyon olarak dikkate alınıyorsa da, nozokomiyal transmisyon da oldukça sık görülmektedir. Transplantasyon hastaları veya altta yatan herhangi bir hastalığı sebebi ile immnun yetmezliği olan çocuklar RSV ile enfekte olduğunda virüsü vücuttan temizlemede zorluk yaşadıkları için daha uzun süre virus saçılımına sebep olmaktadır. Bu hastalar izolasyon kurallarına uyulmadığı takdirde nozokomiyal bulaş yolu açacaktır. Nozokomiyal pnömoni çocuklarda sık

görülen bir hastane kaynaklı enfeksiyondur ve sıklıkla fatal seyreder. Predominant olarak RSV olmak üzere viruslar pediatrik nozokomiyal solunum yolu enfeksiyonlarının en sık sebebidir. Nozokomiyal pnömoni için risk faktörleri RSV sezonu süresince hospitalizasyon, yaş, altta yatan kronik hastalık varlığı, yoğun bakım ünitesinde yatış, entübasyon, yanık, ameliyat, immun baskılanma ve uzun süren hospitalizasyondur. İnfantlarda nozokomiyal RSV enfeksiyonuna bağlı morbidite ve maliyet hesapları dikkat çekicidir. Bu yaş grubunda nozokomiyal RSV enfeksiyonlarının % 40'ı alt solunum yolu hastalığı ile ilişkilidir. RSV salgını süresince hastaneye yatırılan bebeklerde ve çocuklarda nozokomiyal enfeksiyonun % 20-47 oranları arasında olduğu bildirilmektedir^{103,212}.

İnfluenza virusun aksine RSV her yıl epidemi yapabilmektedir. Epideminin tetikleyicisi net olmamakla birlikte virusun mevsim sıcaklığından etkilenmesi olasıdır²¹³. Mevsimsel bir özelliği bulunan RSV enfeksiyonlarının zaman ve süresi coğrafi bölgeye göre değişmektedir. Ilıman bölgelerde RSV salgınları Ekim ve Kasım aylarında başlamakta ve Mart ayının sonlarına kadar devam etmektedir. Sonbahar sonu, kış ve ilkbahar başında sık görülmekte olup kış aylarında pik yapmaktadır. Kentsel merkezlerde yıl içinde yağmurlu dönemde, kışın ve erken ilkbahar döneminde salgınlar görülür. Kuzey yarımkürede büyük salgınlar Şubat ve Mart aylarında pik yapar. Tropikal ve subtropikal bölgelerde yağmur sezonu boyunca epidemiler pik yapmaktadır. İklim değişiklikleri RSV sezonunun süresini değiştirebilmektedir^{127,214-216}.

ABD'de RSV sezonu sonbaharda başlayıp kışın pik yapmakta ve kış sonu ve erken ilk baharda sona ermektedir²¹⁷. RSV sezonunun zaman ve süresi coğrafi bölgeye göre değişmektedir. ABD'de 10 bölgeye ait 509 laboratuvar verilerinin toplandığı Ulusal Solunum Yolu ve Enterik Virus Surveyans Sistemi'nin (National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System; NREVSS) arşiv bilgilerine göre, Temmuz 2007-Haziran 2011 arasındaki 4 sezon için RSV sezonunun başlangıç zamanının Ekim ayının ortasından Ocak ayının başına kadar değişen aralıkta, sezonun bitiş zamanının Şubat ayının başından Mayıs ayının başına kadar değişen aralıkta, pik zamanının ise Aralık ayının ortası ve Şubat ayının başı olduğu ve ortalama sezon süresinin 21 hafta (13-23 hafta aralığında) olduğu tespit edilmiştir. Boston bölgesinin (10 bölgenin 1. bölgesi) 16 hafta ile en kısa sezona, Atlanta bölgesinin (4. bölge) 27 hafta ile en uzun sezona sahip olduğu bulunmuştur. Ulusal ve bölgesel veriler, klinisyenler ve toplum sağlığı

alışanlarının solunum yolu hastalığı salgınlarının tanısıl testlerini yönlendirme ve ciddi komplikasyonlar açısından yüksek riskli çocuklara ne zaman RSV immunoprofilaksisi başlanmasına karar vermede yardımcı olabilir²¹⁸⁻²²⁰.

RSV enfeksiyonunun şiddeti ve sıklığını artıran bazı etkenler vardır. Gelişmiş ülkelerde altta yatan akciğer veya kalp ile ilgili kronik bir hastalık varlığı, düşük sosyoekonomik düzey, prematürite, anne sütü ile beslenmeme, aile hikayesinde atopi ya da astım öyküsünün olması, kalabalık yaşam (kreş), sigara dumanına maruziyet arttırıcı etkenler olarak sayılabilir. Ayrıca yaklaşık 2500m'lik yüksek rakımın RSV'ye bağlı hastaneye yatış için orta düzeyde arttırıcı bir faktör olduğu gösterilmiştir. Düşük doğum ağırlığı, bronkopulmoner displazi, konjenital kalp hastalığı, immun yetmezliği olan risk gruplarında mortalite oranının % 0,15-43 arasında olduğu belirtilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde RSV enfeksiyonunun epidemiyolojik verileri azdır. Ancak kalabalık yaşam, malnutrisyon ve sigara dumanı gibi faktörlerin şiddetli RSV hastalığının gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. RSV'nin yaş dağılımı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde benzer olmakla beraber gelişmekte olan ülkelerde daha büyük çocukların daha şiddetli etkilenebildiği belirtilmektedir²²¹⁻²²³.

Prematür bebeklerde RSV enfeksiyonunun ağır seyretmesinin sebebi enfeksiyona karşı yetersiz direnç ve tam olmayan hava yolu gelişimidir. Maternal IgG antikorları bebeğe plasenta yoluyla gebeliğin üçüncü trimesterinde geçtiği için miadında doğan bir bebekte IgG antikor düzeyleri normal yetişkin düzeyinde olurken, erken doğumlarda nötralizan antikor düzeyleri düşüktür. Bu sebeple prematürite önemli bir risk faktrdr²²⁴.

RSV'nin replikasyon düzeyi ile hastalığın şiddeti arasında genellikle pozitif korelasyon olduğu dřnlmektedir¹⁶⁴. Virus büyük çocuklarda ve erişkinlerde sadece 3-4 gün bulunurken, bebeklerde 4 haftadan fazla, immun yetmezliği olanlarda ise aylarca bulunabilmektedir^{195,224}.

RSV enfeksiyonu kız ve erkeklerde yaklaşık olarak eşit oranda grlmektedir. Bununla birlikte erkeklerde daha ciddi seyretmekte ve daha sık alt solunum yolu enfeksiyonuna sebep olmaktadır^{127,225}.

2.10. Tedavi

RSV'ye bağlı solunum yolu hastalıklarında etkene yönelik spesifik bir tedavi bulunmamaktadır. Tedavinin temel prensibi destekleyicidir. Günümüze kadar bronkodilatörler, kortikosteroidler, antiviral ajanlar, nazal aspirasyon ve dekonjestanlar gibi pek çok rejim denenmiştir. Ancak hiç biri semptomların veya hastalığın kontrolünde anlamlı bir etkinlik göstermemiştir^{126,224}.

RSV tanısı ile hastaneye yatırılan infantlarda güncel yaklaşım yeterli oksijenasyon ve solunum desteğini sağlamak, hidrasyon durumuna dikkat ederek gerekirse intravenöz sıvı desteğinde bulunmayı içeren destekleyici tedavidir. RSV bronşiyoliti olan çocuklar, solunum güçlüğü ve nazal sekresyonlara bağlı olarak artan solunum oranı, ateş ve yetersiz beslenme sonucu dehidrate hale gelebilmektedir. Ciddi solunum zorluğu olan infantlar özellikle dakikada 80'den fazla solunum hızına sahip olan infantlar için intravenöz sıvı tedavisi gerektirir. Dakikada 60'dan az solunum hızına sahip olan infantlar da hastaneye başvurmalıdır. Oksijen saturasyonu % 90'nın altında olan infantlara oksijen desteği sağlanmalıdır. Virus tarafından tetiklenen inflamatuvar yanıtın kontrolünü amaçlayan daha spesifik tedavilerin önemli bir yararı olduğu bugüne kadar gösterilememiştir²²⁵⁻²²⁷.

Akut bronşiyolit reaktif solunum yolu hastalığını düşündüren küçük hava yollarının yaygın bronkospazmı ve hırıltısı ile kendini gösterir. Bu sebep ile RSV'ye bağlı alt solunum yolu hastalıklarının kontrolünde reaktif solunum yolu hastalığı tedavisi yer bulmaktadır.

RSV için antiviral tedavi literatürdeki birbiriyle çelişen çalışma sonuçları sebebi ile tartışmalı bir konudur.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, beta-adrenerjik ajanlar (albuterol, salbutamerol gibi) gibi bronkodilatörlerin sınırlı ve geçici etkiler göstermelerine rağmen hospitalizasyonu önleme ve hastanede kalış süresini kısaltma gibi klinik yararları olabilmektedir. Rutin kullanımları önerilmemekle beraber hırıltısı olan çocuklarda tek doz bronkodilatör denenebilir ve sadece bu tedaviye cevap alınıyorsa devam edilmelidir. Bronşiyoliti olan çocukların ancak % 50'si bir bronkodilatöre cevap vermektedir. Ancak akut RSV enfeksiyonu tedavisinde net etkinliği henüz tanımlanmamış olmasına rağmen yaygın kullanım alanı bulan bronkodilatörlerin kullanılması planlanıyorsa mutlaka klinik cevabın monitarizasyon ile yakından takip

edilmesi gerekir ve yarar görülüyorsa tedavinin sonlandırılması gerekir^{228,229}. Epinefrin, adrenalin gibi alfa-adrenerjik ajanlar oksijen saturasyonu ve kalp hızında kısa süreli olumlu etkiler göstermesine rağmen yeterli derecede etkin olduğu gösterilemediği için rutin tedavide yeri yoktur. Epinefrin, albuterole göre biraz daha fazla klinik yanıt sağlamaktadır. Sebebi alfa-adrenerjik aracılı vazokonstriksiyon etkisi ile nazal konjesyonu azaltmasıdır. Genel olarak güvenlik bilgisi yeterli olmadığı için epinefrinli buhar tedavisinin hastane ortamında monitorize edilerek uygulanması gerekmektedir^{230,231}. Eğer bir çocukta bronkodilatör tedavisine cevap alınmışsa, tedaviyi her dört-altı saatte bir olmak üzere solunum stresi bitene kadar devam edilmesi gerekir. Beraberinde nebulize % 3 hipertonic NaCl verilmesi hemen yanıt oluşturmaya da hastanede yatış süresini kısaltabilmektedir²³².

Kortikosteroidler (oral veya inhale) RSV'ye bağlı akut alt solunum yolu hastalıklarının tedavisinde rutin olarak kullanılmamalıdır. Sık kullanılmalarına rağmen bu enfeksiyonlarda ne semptomları hafifletmekte ne de hastalık süresini kısaltmaktadır. Astım öyküsü olan büyük çocuklarda yardımcı olabilir. Yapılan bir çalışmada, 30 aydan küçük 1200 hastaya akut bronşiyolit için sistemik kortikosteroid tedavisi verildiğinde kortikosteroidlerin hospitalizasyon sıklığı, hospitalizasyon süresi ve klinik iyileşmeye önemli bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir^{233,234}.

Akut bronşiyolitteki solunum yolları inflamatuvar yanıtını hedefleyerek tedavide bir lökotrien antagonisti olan montelukast denenmiş, ancak yapılan klinik çalışmalar montelukastın akut RSV bronşiyolitinde etkinliğinin olmadığı tespit edilmiştir²³⁵.

Antibiotiklerin eş zamanlı bir bakteriyel enfeksiyon mevcut değilse RSV enfeksiyonu tedavisinde yeri yoktur. Otitis media tüm yaş gruplarında en sık görülen eş zamanlı bakteriyel enfeksiyondur. Ancak 60 günden küçük olan bebeklerde en sık idrar yolu enfeksiyonu görülür²³⁶.

Vakum ile nazal aspirasyon RSV enfeksiyonu olan çocuklarda semptomatik bir iyileşmeye katkıda bulunabilir, ancak aşırı yapılması nazal ödem ve obstruksiyon ile sonuçlanabilir. Genellikle beslenme öncesi yapıldığında daha yararlıdır. Geçmişte nazal dekonjestan burun damlaları ve şurupları üst solunum yolu konjesyonu için kullanılmışsa da, herhangi bir yararı olduğunun kanıtı bulunmamaktadır. Amerika'da 2008 yılında bu tür ilaçların iki yaşın altında kullanımı FDA (Food and Drug Administration) tarafından yasaklanmıştır.

Sürfaktan uygulamasının solunum yetmezliği sebebi ile ventile edilen RSV pozitif çocuklarda mekanik ventilasyon süresini kısalttığı, mortaliteyi azalttığı ve yan etkisinin olmadığı rapor edilmiştir^{237,238}.

Bir guanozin analogu olan ribavirin (Virazole) hem RNA'da mutasyona yol açarak, hem de RNA bağımlı RNA polimerazı inhibe ederek RSV replikasyonunu önleyen ve dolayısıyla akciğerlerdeki virus titresinde azalmaya yol açarak hastalığın şiddetini ve süresini azaltan geniş spektrumlu sentetik bir virostatik ajandır. Bu sebep ile RSV'ye bağlı akut alt solunum yolu hastalığı tedavisinde FDA tarafından onay almış, mevcut olan tek spesifik antiviral ajandır. Maliyetinin yüksek olması, döküntü, baş ağrısı, konjonktivit, hemolitik anemi ve iskelet deformitelerine yol açabilen teratojenik yan etkileri sebebi ile risk faktörü olmayan bebeklerde rutin kullanımı önerilmemektedir. Ağır RSV bronşiyoliti veya bronkopnömonisi sebebiyle hastaneye yatırılan bebeklerde, özellikle konjenital kalp hastalığı, kronik akciğer hastalığı, bronkopulmoner displazi, kistik fibrozis, immün supresyon, nörolojik ve metabolik hastalığı olanlar ve prematüre bebeklerde kullanımı onaylanmıştır. Amerikan Pediatri Akademisi de ribavirini ciddi RSV bronşiolitinde veya ciddi hastalık geçirmesi beklenen immünyetmezlikli olgularda kullanılmasını önermektedir. Ribavirin aerosol olarak 12-20 saat süreyle 2-5 gün uygulanmaktadır. Toksik yan etkileri minimal olmakla birlikte eritrositlerde oksidatif hasara sebep olarak hemolitik anemiye yol açabilmektedir. Bazı hayvanlarda teratojen etkisi olduğu bilinmekte olup gebelerde ve eliminasyon yarılanma ömrü uzun olduğu için gebelik planlayanlarda kontrendikedir. Henüz direnç gelişimi saptanmamıştır^{227,238,239}.

İmmün sistem defekti olan RSV ile enfekte hasta grubunun tedavisinde kullanılmak üzere 2004 yılından bu yana üzerinde çalışılmakta olan, plazmadan elde edilen, Faz III klinik çalışma aşamasında yeni bir poliklonal intravenöz immünglobulin (RI-001,ADMA Biologicals, Inc.) bulunmaktadır²⁴⁰.

Sentetik çift sarmallı siRNA'lar (small interfering RNA) memeli hücrelerde mRNA transkriptlerini hedef alarak protein sentezini inhibe edebilmektedirler ve kanser, metabolik hastalık, viral enfeksiyonlar gibi pek çok hastalıkta etkin olabilecekleri düşünülmektedir^{241,242}. RSV için henüz çalışma aşamasında olan P protein²⁴³, NS1 protein²⁴⁴ ve N protein²⁴⁵ (ALNRSV01; Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA) genlerini hedef alan siRNA'lar değerlendirilmektedir.

Deneysel aşamadaki bir başka ilaç grubu olan füzyon inhibitörleri RSV'nin yaşam siklusunda kritik aşama olan füzyonu F proteine bağlanarak önlemektedir ve böylece sınırlı oluşumunu ve viral yükü azaltmaktadır. BTA9881 ve TMC-353121 faz I çalışmaları devam eden anti-RSV ilaç adayı olan füzyon inhibitörleridir²⁴⁶.

G, L ve N proteinlerini içeren RSV'nin spesifik epitoplarına bağlanarak RSV'yi inhibe eden bazı küçük molekül bileşikler üzerinde çalışmalar devam etmektedir. RSV G glikoproteinine bağlanarak konak hücrenin CX3CR1 reseptörüne bağlanmayı inhibe edip RSV'nin indüklediği inflamatuvar cevabı azaltan MBX-300²⁴⁷ (Microbiotix, Worcester, MA, US), viral RNA polimerazın bir komponenti olan L proteinine bağlanarak ribavirinden 76-105 kat daha etkin olan YM-53403²⁴⁸ (Yamanouchi Pharmaceutical Co, Deerfield, Illinois) ve N proteinini hedefleyerek viral RNA polimerazı inhibe eden bir oral benzodiazepin olan RSV604²⁴⁹ (Arrow Therapeutics, London, England ve Novartis, East Hannover, NJ) faz çalışmaları devam eden küçük molekül bileşikleridir.

RSV araştırmaları 50 yıldır devam etmesine rağmen infantlardaki RSV hastalığı ile ilişkili immunopatoloji ve immunité eksikliği etkin bir tedavi ve aşı geliştirme konusunda halen bir problem olarak varlığını korumaktadır. Direkt olarak virüsü hedef almaktansa RSV'ye karşı konak cevabını düzenlemek araştırmalarda yeni bir yaklaşımdır. MBX-300, fosfomisin ve leflunomidin aktif metaboliti olan A77-1726 bunlardan bir kaçıdır. Fosfomisin in vitro ve in vivo ortamlarda immunitéyi düzenleyici (immünmodülatör) aktivite gösteren yapısal olarak eşsiz bir antibiyotiktir²⁵⁰. Fosfomisin ile ilgili ilk bulgular göstermektedir ki, fosfomisin akciğer inflamasyonunda önemli bir rol oynayan RANTES'in transkripsiyonunun RSV tarafından indüklenmesini baskılamaktadır^{251,252}. RSV akciğerlerde etkin gaz değişimi için gerekli olan alveolar sıvı klirensinin azalmasına sebep olur. Deney hayvanlarında intranasal A77-1726 uygulamasının RSV'nin indüklediği alveolar sıvı klirensinin azalmasını ve arteriyel hipoksemiye önlediği gösterilmiştir²⁵³.

RSV ile aynı ailenin bir üyesi olan kızamık virüsü enfeksiyonunda çocukların serum A vitamini düzeyinin düşük olması ve A vitamini ile destek tedavisine iyi cevap alınıyor olmasından hareket ederek yapılan bazı çalışmalarda RSV enfeksiyonunun akut döneminde serum A vitamini düzeyinin benzer şekilde düşük olduğu ve tedavideki yeri tartışmalı olmakla birlikte olumlu etkisi olabileceği saptanmıştır^{254,255}.

2.11. Korunma

RSV damlacık inhalasyonu ile değil, primer olarak insandan insana veya enfekte sekresyonlar ile direkt temas ile bulaşmaktadır. Bu sebep ile RSV'nin yayılımı sık ve uygun şekilde el yıkayarak, izolasyon kurallarına uyarak önlenebilmektedir²⁰². Önlük, maske, eldiven veya gözlük kullanımının hospitalize hastalarda transmisyonu azaltmadığı saptanmıştır. RSV yayılımının önlenmesinde ellerin dekontaminasyonu önemlidir. Hasta veya hastanın çevresindeki cansız objeler ile temas öncesi ve temas sonrası eller yıkanmalıdır. Pasif olarak sigara dumanına maruziyet RSV enfeksiyonu için bir risk faktörü olduğu için ebeveynlerin sigara kullanmaması ve çocukları dumanlı hava sahasından uzak tutmaları gerekir²⁵⁶.

RSV enfeksiyonlarının küresel yükü ve yüksek derecede bulaşıcı doğası gereği aşıya ihtiyaç vardır²⁵⁷.

İntravenöz RSV immun globulini (RSV-IGIV; *RespiGam*, Medimmune Inc, ABD) sağlıklı bireylerin plazmasından saflaştırılarak elde edilen, yüksek konsantrasyonda poliklonal anti-RSV IgG antikorı içeren, RSV hastalıklarından korunmada FDA onayı almış ilk (1996) ajandır²⁵⁸. RSV ilişkili hospitalizasyonları ve yoğun bakım ünitelerine başvuruları azaltmasına rağmen, RSV-IGIV damar yolu gerektirmesi ve insan plazma derive ürünü olmasından dolayı enfeksiyon hastalıklarının yayılımı açısından risk oluşturmakta ve konjenital kalp hastalığı olan çocuklarda önemli yan etkilere sebep olmaktadır^{259,260}.

Palivizumab (Synagis, Abbott Laboratories, ABD) RSV'nin F proteinine karşı nötralize edici aktivitesi (virusun tek epitopunu hedefleyen) ile virusun konak hücreye girişini önleyen insan monoklonal antikorudur. Palivizumab prematürite, kronik akciğer hastalığı ve konjenital kalp hastalığı gibi altta yatan bir hastalığı olan yüksek riskli gruplara RSV enfeksiyonundan korunma amacı ile genellikle Kasım ayında başlayarak beş aydan fazla olmamak şartı ile RSV sezonu boyunca ayda bir kez 15mg/kg intramuskuler yol ile uygulanmak üzere 1998'de FDA tarafından onay almıştır. Amerikan Pediatri Akademisi'nin palivizumab kullanımı için endikasyonlarını, 2 yaş altında olup medikal tedaviye gereksinim duyan prematüriteliğe bağlı kronik akciğer hastalığı, 32 hafta veya daha erken doğmuş bebekler, ikiden fazla risk faktörü olan 32-35 gestasyon haftasında olan bebekler (ciddi nörolojik hastalık, hava yollarının konjenital anomalisi), 24 ay altında olan konjenital kalp hastalığı olan çocuklar olarak

belirlemiştir. Oysa ağır RSV enfeksiyonu ile ilişkili hospitalize edilen infantların % 70'ini risk faktörü olmayan term infantlar oluşturmaktadır. Profilaksinin primer yararı RSV ilişkili hospitalizasyon oranlarını % 50 azaltmasıdır^{38,261,262}.

Türk Neonatoloji Derneği'nin palivizumab ile RSV profilaksisi 2012 yılı önerileri:

1. Gebelik yaşı 29 haftanın (28 hafta +6/7 gün) altında doğmuş olan, RSV sezonu başlangıcında 1 yaşından küçük olan kronik akciğer hastalığı tanılı veya tanısız tüm bebekler
2. RSV sezonu başlangıcından önceki son 6 ay içinde kronik akciğer hastalığı için özgün tedavi (ek oksijen, bronkodilatör, diüretik veya kortikosteroid) gereksinimi olan, 2 yaşın altındaki çocuklar
3. RSV sezonu başlangıcında 1 yaşından küçük, siyanotik doğuştan kalp hastalığı, konjestif kalp yetmezliği tedavisi gerektiren asiyanotik doğuştan kalp hastalığı olan bebekler, ameliyat edildiği halde rezidü hemodinamik bozukluk nedeniyle konjestif kalp yetersizliği tedavisi almaya devam eden bebekler, önemli pulmoner hipertansiyonlu bebekler (sistemik basıncın % 50'sinden fazlası) ve hemodinamik bozukluk nedeniyle tedavi alması gereken kardiyomiyopatili bebeklerde kullanılır.
4. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde aynı anda en az 3 vakada RSV enfeksiyonu gösterildiği takdirde serviste yatan gebelik yaşları 29 haftanın (28 hafta +6/7 gün) altında doğmuş diğer tüm prematüre bebeklere ve kronik akciğer hastalığı olan 29 hafta ve üzerindeki tüm prematüre bebeklere profilaktik olarak palivizumab verilebilir.
5. Palivizumab kullanımında israfı en aza indirmek amacıyla, RSV profilaksisi verilecek bebeklerin aynı gün çağrılması önerilir.
6. Palivizumab Ekim ve Mart ayları arasında kabul edilen RSV sezonu boyunca 1 ay aralarla bir hasta için en fazla 5 doz uygulanmalıdır.

Amerikan Transplantasyon Derneği (AST; American Society of Transplantation) üst solunum yolu hastalığı ile risk faktörü varlığında ve ASYE olan transplant

alıcılarında aerolize ribavirin ile beraber RSV-IGIV veya palivizumab kombinasyonunun kullanılmasının dikkate alınması gerektiğini belirtmektedir²⁶³.

Motavizumab (MEDI-524, MedImmune, Gaithersburgh, MD), palivizumabın RSV F proteinine affinitesinin 70 kat artırılması ve nötralizan aktivitesinin de 20 kat artırılması ile geliştirilen ikinci jenerasyon IgG1 monoklonal antikorudur. Kutanöz reaksiyonlara sebep olduğu saptanmış olup FDA tarafından henüz onaylanmamıştır. Yüksek affinitesi ile üst hava yollarında ve akciğerde nötralize edici titrelere ulaşabilme sebebi ile hem korunma hem de tedavide bir seçenek olabileceği üzerinde araştırmalar devam etmektedir^{264,265}. Çift-kör, randomize bir faz 3 çalışmasında, prematür veya buna bağlı akciğer hastalığı olan 24 aydan küçük 6635 infantın bir grubuna motavizumab ve kontrol grubuna palivizumab profilaksisi uygulandığında ikisinin de RSV hospitalizasyonlarını azalttığı, ancak bu oranın motavizumab verilenlerde palivizumab alıcılarına göre % 50 daha az olduğu gösterilmiştir. Ek olarak iki grupta da yan etkilerin benzer olduğu, ancak motavizumab verilenlerde kutanöz yan etkilerin daha fazla görüldüğü saptanmıştır. Motavizumab yüksek risk grubundaki çocuklarda ciddi RSV hastalığı profilaksisi için alternatif bir seçenek olabilir²⁶⁶.

Deneyisel aşamada olan RSV monoklonal antikorların çoğu F glikoproteinini hedeflemektedir. Son zamanlarda G glikoproteininin hedeflenmesinin çift anti-RSV etkinliğe sebep olacağı üzerinde durulmaktadır. G protein, CXCR3R1 kemokin reseptöre bağlanarak inflamatuvar mediatör kaskadını başlatıp akciğer inflamasyonunu artırmaktadır. Eğer monoklonal antikor ile RSV G proteini üzerinde bulunan CXCR3 motifi hedeflenirse anti-RSV etkinlik yanında akciğer inflamasyonu da azaltılabilir²⁶⁷.

Hastane enfeksiyonunun kontrol altında tutulabilmesi için RSV hastalığından şüphelenilen çocuklar tek kişilik odalarda izole edilmelidir. Enfeksiyonun doğrulanması için gerekli tanısal işlemler yapılmalıdır. Yeterli sayıda tek kişilik oda mevcut değilse, laboratuvar tanısı ile konfirme edilmiş RSV hastalığı olan ve izolasyon gerektirecek başka hastalığı olmayan çocuklar bir arada bir koğuşta izole edilebilirler. Semptomatik bir vaka ile temas öyküsü olan çocuklar da tedbir olarak izole edilmelidir. Bu uygulama inkübasyon periyodu sonuna veya semptomların bitmesinden 10 gün sonrasına kadar devam etmelidir. Hastalar ve çevresi ile temas halinde olanlar önlük ve eldiven kullanılmalıdır. Eldiven giyilmiş olsun veya olmasın hastalarla, solunum sekresyonlarıyla veya çevreleriyle temas sonrası el hijyeni sağlanmalıdır. Hastaların ziyaretçileri başka

hastaları ziyaret etmemeleri veya hastane içinde diğer ziyaretçilerden uzak durmaları konusunda bilgilendirilmelidir. Hasta yakınları ziyaret öncesi ve sonrasında el hijyen kurallarına uymalıdır. Solunum yolu enfeksiyonu belirtileri olan hasta yakınları yüksek risk alanlarından, yenidoğan ünitelerinden uzak tutulmaya çalışılmalıdır²⁶⁸.

Bir yenidoğan ünitesinde kesin veya olası RSV salgını durumunda yenidoğanlar ve prematür infantlar özellikle ciddi RSV enfeksiyonuna duyarlı oldukları için birim yeni başvurulara kapatılmalıdır. Ziyaretler ebeveynler ile sınırlandırılmalı, semptomatik çocukların ebeveynlerinin diğer hasta ve hasta yakınları ile teması önlenmeli, RSV ile enfekte olmayan ancak hastanede yatan bir başka çocukları olan ebeveynlerin önce o çocuklarını ziyaret etmeleri gerektiği anlatılmalıdır. Hasta yakınları izolasyonun sebepleri ve öngörülen izolasyon süresi ile ilgili bilgilendirilmelidir. Tecrit odasının içinde her boyutta eldivenler, tek kullanımlık önlükler, alkollü el jeli, enfekte yatak çarşafı ve klinik atıklar için çöp poşetli kovalar, delici ve kesici klinik malzemeler için ayrı kovalar ve termometre bulundurulmalıdır. Tecrit odasının dış tarafında ise tek kullanımlık önlükler, alkollü el jeli, notlar, klasörler, çizelgeler ve bebek monitörü bulundurulmalıdır. Odaya alınan her ekipman çıkarılırken dekontamine edilmelidir. RSV şüpheli vakalar nazofaringeal aspirat veya sürüntü alınarak taranmalıdır. Haftalık intervaller ile alınan üç örnek sonrasında negatiflik dikkate alınmalıdır. Örnek negatif bulunduğu eğer klinik olarak da düzelmişse ve herhangi bir şüpheli belirti yoksa izolasyon önlemleri durdurulabilir. Kaynak izolasyon odalarının temizlenmesi diğer alanların temizlenmesinden sonra yapılmalıdır²⁶⁸.

2.11.1. Aşı geliştirme çalışmaları

RSV'ye karşı etkin ve güvenli bir profilaktik aşı henüz geliştirilememiştir. RSV hastalığından en sık ve en ağır etkilenen 6 aydan küçük bebekler immunolojik immaturite ve maternal antikorların baskılayıcı etkisi sebebi ile aşılama uygun cevap vermeyebilmektedir²⁶⁹. İlk kez 1960'lı yıllarda yapılan aşı çalışmaları sadece vahşi-tip RSV'ye karşı korumada sınıfta kalmamış aynı zamanda aşı yapılan infantların % 80'inin hospitalizasyonuna ve iki infantın ölümüne sebep olmuştu. Peribronşiyal alana aşırı eozinofil infiltrasyonu ve etkilenen dokuda virus ile beraber koruyucu olmayan antikorların depositleri bulunmuştu²⁷⁰.

İntranazal yol ile uygulanan canlı attenuue aşılar lokal mukozal ve sistemik immunitiyi indükler. Aynı zamanda intranazal uygulandıkları için maternal serum antikorlarının supresif etkisinden kısmen de olsa kurtulabilirler²⁷¹. İnaktive aşılar göre daha fazla immunojeniktirler ve daha geniş koruma sağlarlar. Canlı attenuue aşılar indüklenmiş hastalık ile ilişkili değildir²⁷². Yaşam boyu doğal reenfeksiyonlar ile seyredebilen RSV hastalığına karşı tek doz aşı ile tam koruma sağlanması pek mümkün değildir²⁷³. Bu sebep ile başarılı bir aşıda amaç risk grubunu RSV ile ilişkili ağır alt solunum yolu enfeksiyonlarından korumak olmalıdır.

Aşı geliştirmede attenuasyon ve immunojenite arasındaki denge kritik öneme sahiptir. Canlı aşı adayları düşük ısıda seri pasajlar (soğuk pasaj) ile ve ısıya duyarlı mutantları üretmek için kimyasal mutageniz ile geliştirilmektedir. Elde edilen bu viruslar üst solunum yollarının düşük ısısında replike olabilirken, alt solunum yollarının yüksek ısısında çoğalamazlar²⁷². Bu attenuasyon metodları ile geliştirilen ilk aday aşıların ya çok reaktif ya da aşırı zayıflatılmış ve sıklıkla stabil olmayan mutasyonlara sebep olduğu bulunmuştur^{274,275}. Güvenli ve etkin olan attenuue RSV suşunu elde etmek için en son strateji, hücre kültüründe tamamen klonlanmış cDNA'dan infekte edici virus üretmektir^{272,276}. Bu metod hedeflenen mutasyonlar ile yeterli immunojeniteyi sağlarken daha kesin attenuasyon derecesine ulaşmayı amaç edinmektedir. Örneğin 24 aydan küçük infantlar için faz II klinik çalışmaları devam eden MEDI-559 (MedImmune/National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, MD) SH gen delesyonu içeren ısıya duyarlı bir rekombinant RSV aşısıdır²⁷⁴. SH proteininin konakta T helper 1 cevabını azaltarak antiviral immun cevabı inhibe ettiği bilinmektedir. SH proteini olmayan bir virus daha çok immunojenite gösterecektir. Yine aynı prensipten hareket ile geliştirilen, SH geni yerine konakta interferon cevabını azaltarak immun cevabı inhibe eden NS proteinini kodlayan NS gen delesyonu içeren iki aday aşı daha bulunmaktadır^{277,278}.

Genetik instabilitenin üstesinden gelmek için kullanılan alternatif yöntemlerden biri de vektör aşılarıdır. Vektör aşıların prensibi daha fazla üreme ve stabilite gösteren viruslar (parainfluenza virus, newcastle disease ve sendai virusları) kullanılarak RSV proteinlerinin elde edilmesidir²⁷². Örneğin MEDI-534 aday vektör aşısı parainfluenza tip 3 genomu kullanılarak elde edilmiş RSV F proteinini içermektedir^{279,280}.

RSV'nin saflaştırılmış F, G ve M proteinlerini içeren subunit aşı geliştirme çalışmaları da yapılmaktadır. Bu proteinler antikorların koruyucu ve nötralize edici aktivitelerini indükleme potansiyeline sahiptir. Üç adet RSV F subunit ařısı²⁸¹, F, G ve M proteinlerini içeren kombine subunit ařısı²⁸² ve streptokokal protein G ile konjuge bir G peptid²⁸³ klinik çalışmaları halen devam eden aday subunit aşılardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ana bilim dalının yoğun bakım, onkoloji, hematoloji servislerinde Ekim 2011 - Ekim 2012 tarihleri arasında ateş, öksürük, burun akıntısı, solunum sıkıntısı, morarma, kusma ve beslenme yetersizliği gibi şikayetler ile başvurup, alt solunum yolu enfeksiyonu tanısı alan 0-15 yaş grubundaki 323 hastadan alınan nazofaringeal sürüntü örneklerinde RSV insidansını belirlemek ve tanı yöntemlerini karşılaştırmak amacı ile direkt immunfloresan test (DFA) ile RSV antijeni ve nested reverse transcription-PCR yöntemi ile RSV RNA varlığı araştırıldı.

3.1. Nazofaringeal sürüntü örneklerinin toplanması

Öncelikle hasta ve hasta yakınına işlem anlatıldı. Örnek alınırken her hastada ayrı eldiven ve maske kullanıldı. İşlem sırasında hasta kendini arkaya doğru çektiğinden hasta bir yere yaslanarak oturtuldu. Daha küçük yaş grubunda hastalar hasta yakınının kucağına oturtularak kollarını sabitlemesi ve başını hafif (70°C) geriye itmesi sağlandı. Burunda fazla mukus varlığı hücrelerin toplanmasını engelleyeceği için fazla burun akıntısı olan hastaların kağıt mendille burnunu temizlemesi istendi.

Hastaya işlem sırasında ağızdan nefes alması ve gözlerini kapaması söylenerek hastanın alnından tutup steril nazofaringeal naylon flocced swab (Copan Diagnostics, Brescia, Italy) yüze dik şekilde burun deliğine yavaşça kondu, burun ve kulak memesi arasındaki mesafe kadar nazal boşluğun tabanına (damağa) paralel şekilde arkaya doğru (yukarı doğru değil) ilerletildi. Direnç hissedilince posterior nazofarinkse ulaşıldığı anlaşıp hücrelerin alınması için swab 10-15 sn kadar nazikçe birkaç kez döndürüldü ve yavaşça geri çekildi. İçinde 3ml PBS (Phosphate Buffered Saline) bulunan transport tüpüne konarak üzerine hastanın adı, soyadı ve yaşı yazıldı. Aynı gün içinde örneklerde RSV antijeni tespiti için direk immunfloresan testi uygulandı. İşleme kadar örnek tüpleri dik pozisyonda +4°C'de buzdolabında bekletildi. PCR için ayrılan örnekler işleme kadar -80°C'de saklandı (Şekil 4).



Şekil 4. Nazofaringeal sürüntü örneğinin alınma şekli²⁸⁴

3.2. Direkt immunfloresan test (DFA) ile antijen tespiti

Alt solunum yolu enfeksiyonu olan pediatrik hastalardan toplanan nazofaringeal sürüntü örneklerinde RSV ile infekte hücrelerin varlığı, aynı gün içinde direkt immunfloresan test kiti (Argene SA, France) ile araştırıldı.

3.2.1. Örneklerin işlenmesi ve lamaların hazırlanması:

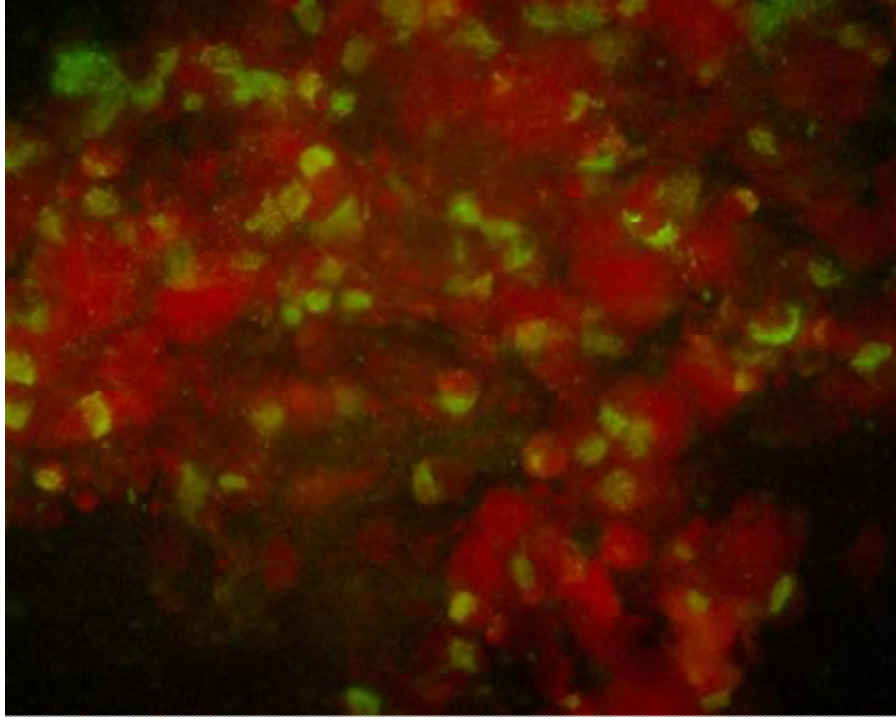
- 1- Nazofaringeal örneklerin oda ısısında 3 saat, +2°C veya +8°C'de 48 saatten uzun bekletilmemesine dikkat ederek mukuslu örnekler ek yıkamaya tabi tutulmak üzere belirlendi.
- 2- Tüp içerisindeki nazal swab üzerinde kalan hücrelerin besiyerinde kalması için swab tüp duvarına yavaşça bastırılarak çıkarıldı.
- 3- Yaklaşık olarak 0,5ml örneğe 5ml PBS eklendi.
- 4- Tüpler homojen süt kıvamında süspansiyon elde edene kadar kibar bir şekilde sallandı. Örneğin 0,5ml'si RT-PCR çalışmaları için -80°C'ye kaldırılıp saklandı.
- 5- Tüpler 180g'de (2000rpm) 10 dakika santrifüj edildi.
- 6- Supernatan kısmı pipet ile atılıp tüpte kalan pellet üzerine ise 10ml PBS eklendi ve 180g'de (2000rpm) 10 dakika santrifüj edildi. Mukuslu örnekler için bu aşama ikinci kez tekrarlandı.
- 7- Supernatan kısmı pipet ile atılıp tüpte kalan pellet üzerine tekrar 10ml PBS eklendi ve pipetajla homojenite sağlandı.

- 8- İmmunfloresan lamalarının her bir kuyucuğuna bir hasta örneği gelecek şekilde 30µl örneklerden eklendi.
- 9- Lamalar ısısı 35°C veya 37°C'e ayarlanmış olan etüvde tamamen kuruyuncaya kadar inkübe edildi.
- 10- Lamalar soğuk aseton bulunan şale içerisinde en az 10dakika fiksasyon için inkübe edildi.
- 11- Lamalar oda ısısında kurumaya bırakıldı ve bu süre sonunda ikinci aşamaya geçildi. Fikse edilen preparatlar birkaç ay -18°C veya -22°C'de saklanabilmektedir.

3.2.2. Direkt immunfloresans

- 1 Çalışması planlanan preparatlar dondurucuda ise çıkarılıp 15 dakika bekletilerek oda ısısına getirildi.
- 2 Monoklonal antikor kullanım öncesi 1/40 oranında PBS ile sulandırıldı.
- 3 Preparatta hasta örneği kuyucuklarının her birine sulandırılmış monoklonal antikordan 30µl eklendi ve antikor buzdolabına kaldırıldı.
- 4 Sonra preparatlar 35°C veya 37°C ısıdaki nemli etüve kaldırılarak 15 dakika inkübe edildi.
- 5 Bu sürenin sonunda preparatlar 5 dakika PBS ile yıkandı.
- 6 PBS kristallerini uzaklaştırmak için preparatlar distile su içeren şaleye daldırılıp çıkarıldı.
- 7 Preparatlar tamamen kurutuldu.
- 8 Örnek kuyuları üzerine bir veya iki damla mounting media damlatıldı ve lameller ile arada hava boşluğu kalmayacak şekilde kapatıldı.
- 10 Preparatlar 25X veya 40X büyütme ile antijen varlığı (stoplazmik inklüzyonlar) açısından floresan mikroskobunda incelendi (Şekil 5).

DFA testinde örneklerden preparatların hazırlanarak fikse edilmesi işlemi 1 saat, direkt floresans mikroskobi için hazırlık ve mikroskobik inceleme 1,5 saat sürmektedir. DFA test ile 2,5 saatte sonuç alınabilmektedir.



Şekil 5. DFA testi ile RSV antijenini pozitif saptadığımız bir hastanın floresan mikroskopundaki görüntüsü

3.3. RNA ekstraksiyonu

Zarflı bir RNA virusu olan RSV çevre şartlarına ve ısı değişimlerine karşı çok dayanıksız olduğu için alınan nazofaringeal örneklerin RNA ekstraksiyonu en kısa zamanda High Pure Viral RNA eFkstraksiyon (Roche Diagnostics, Germany) kiti kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre aşağıdaki gibi yapıldı.

3.3.1. Çözeltilerin hazırlanması

Liyofilize halde bulunan 2mg poly (A) taşıyıcı RNA 0.5ml elution buffer içinde çözülerek iyice karıştırıldı. Bu karışımdan 50µl ependorf tüplere dağıtılarak -20°C'de saklandı. Çalışma sırasında bu 50µl'lik karışıma, 2.5ml binding buffer [6M guanidine-HCl, 10mM Tris-HCl, % 20 Triton X-100(w/v), pH 4,4 (25°C)] eklendi. Binding buffer ve poly(A) karışımı her çalışma sırasında taze olarak hazırlandı.

İnhibitor removal buffer'ın [5M guanidine-HCl, 20mM Tris-HCl pH 6,6 (25°C) etanol eklendikten sonraki konsantrasyonu] içine 20ml saf etanol eklendi.

Yıkama tamponu üzerine 40ml saf etanol ile eklendi [2X10ml, 20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5 (25 °C)].

3.3.2. RNA ekstraksiyon aşamaları

1. Nazofarengeal sürüntü örnekleri -80°C'den çıkarılarak oda ısısına getirilir.
2. Örnekler en az 1 dakika vortekslenir.
3. Numaralandırılmış steril 1,5 ml eppendorf tüplerine 200 µl her bir örnekten aktarılır.
4. Steril bir tüpte 5 ml Binding Buffer ve 50 µl Poly A solüsyonu hazırlanır. Bu karışımdan 400 µl her bir örneğe eklenir ve vortekslenir.
5. Oda ısısında 10 dakika inkübe edilir.
6. Kit içerisindeki toplama kapları ve filtreli tüpler iç içe geçirilerek numaralandırılır.
7. Örnekler, bu filtreli toplama kaplarına yavaşça aktarılır.
8. Örnekler 8000 X g'de 15sn santrifüj edilir.
9. Santrifüj sonrası altta sıvı biriken toplama kapları atılır ve üstteki filtre tüpleri yeni toplama kapları içine yerleştirilir.
10. Üzerine 500 µl İnhibitör Removal Buffer (Guanidium HCl) eklenip 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edilir.
11. Santrifüj sonrası altta sıvı biriken toplama kapları atılır ve üstteki filtre tüpleri yeni toplama kapları içine yerleştirilir.
12. Üzerine 450 µl Wash Buffer eklenip 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edilir.
13. Santrifüj sonrası altta sıvı biriken toplama kapları atılır ve üstteki filtre tüpleri yeni toplama kapları içine yerleştirilir.
14. Onikinci ve onüçüncü basamaklar toplam iki kez yapılır.
15. Örnekler 13000 X g'de 10 sn santrifüj edilir.
16. Santrifüj sonrası altta sıvı biriken toplama kapları atılır ve üstteki filtre tüpleri yeni toplama kapları içine yerleştirilir.
17. Üzerine 50 µl Elution Buffer eklenip 8000 X g'de 1 dakika santrifüj edilir.
18. Eppendorf içindeki filtre tüpleri atılıp içinde RNA ekstraktları bulunan eppendorf tüpleri amplifikasyona kadar -80°C'de saklanır.

3.4. Nested RT-PCR

Hazırlanan RNA ekstraktları DNA kadar dayanıklı olmadığı için mümkün olan en kısa sürede cDNA sentezlerinin yapılması gerekmektedir.

Nested PCR aşamasında öncelikle RSV'nin F geninde bulunan 6090-6628 nukleotidleri arasındaki 539bp uzunluğundaki bir bölgenin amplifikasyonu yapıp, sonra bu bölgenin içindeki 6222-6463 nukleotidleri arasında bulunan 243bp uzunluğundaki bölgenin tekrar amplifikasyonu ile nested RT-PCR gerçekleştirildi²⁸⁵⁻²⁸⁶.

Nested RT-PCR metodunda ise ekstraksiyon işlemi 130 dakika, cDNA sentezi aşaması 90 dakika, ilk amplifikasyon işlemi 190 dakika, elektroforezde görüntüleme 60 dakika, ikinci amplifikasyon işlemi 190 dakika ve elektroforezde tekrar görüntüleme 60 dakika sürmektedir. Nested RT-PCR metodunda aralıksız çalışılırsa toplam 12 saatte sonuç alınabilmektedir.

3.4.1. cDNA sentezi

cDNA sentezi için 5µl RNA ekstraktı, F1-F2 primerleri (25pmol), RT Buffer, 20IU RNasin, her bir dNTP'den 10mM ve M-MuLV RT (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Canada) içeren reaksiyon karışımı 42°C'de 60 dakika, 70°C'de 10dakika inkübe edilerek cDNA'lar elde edildi. cDNA'lar amplifikasyon işlemine kadar -80°C'de saklandı.

3.4.2 Nested PCR aşaması

İlk amplifikasyon 10x Taq Buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM KCl], 1,5 mM MgCl₂, herbir dNTP'den 200 mM, 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 Cihazına (Bio-Rad Life Science Research, France) yerleştirilerek aşağıdaki ısı döngüsü programında çalıştırıldı;

94°C’de 3dakika (ön denatürasyon)
94°C’de 1dakika (denatürasyon)
55°C’de 1dakika (bağlanma)
72°C’de 1dakika (uzama)
72°C’de 10dakika (final uzama)

} 40 siklus

Amplikonlar etidyum bromürlü % 2 agaroz jel elektroforez ile yürütüldü ve jel görüntüleme sisteminde 539bp bantlar incelendi.

İlk aşama amplifikasyonda negatif çıkan amplikonlar ikinci aşama PCR işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon 10X Taq Buffer [100mM Tris-HCl (pH 8,8), 500mM KCl], 1,5mM MgCl₂, herbir dNTP’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 Cihazına (Bio-Rad Life Science Research, France) yerleştirilerek aşağıdaki ısı döngüsü programında çalıştırıldı;

94°C’de 3dakika (ön denatürasyon)
94°C’de 1dakika (denatürasyon)
45°C’de 1dakika (bağlanma)
72°C’de 1dakika (uzama)
72°C’de 10dakika (final uzama)

} 40 siklus

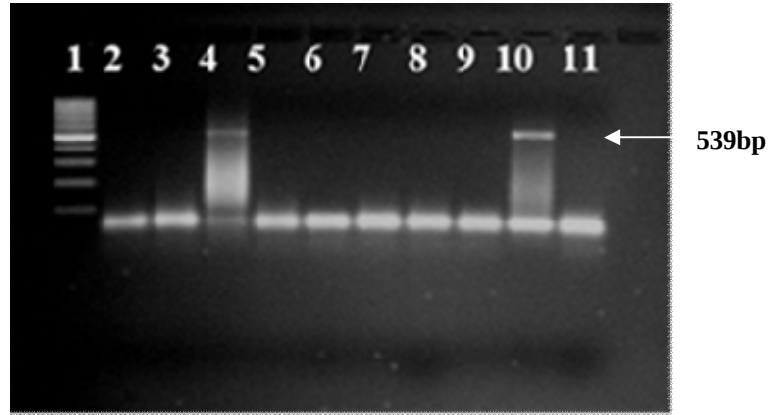
Amplikonlar etidyum bromürlü % 2 agaroz jel elektroforez yöntemi yürütüldü ve jel görüntüleme sisteminde 243bp bantlar incelendi.

3.5. Amplifiye edilen PCR ürünlerinin görüntülenmesi

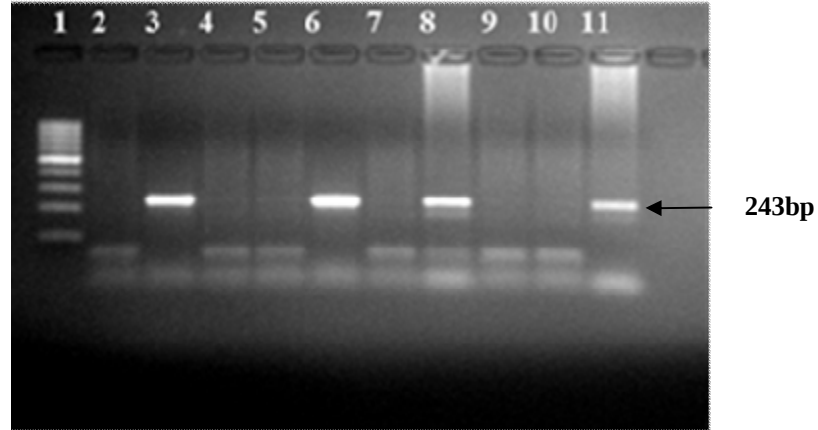
Amplifikasyon ürünleri etidyum bromürlü % 2 agaroz jel elektroforezi ile araştırıldı. Hem tank tamponunun, hem de agaroz jelinin hazırlanmasında 1.6M Tris-Base (Sigma), 0,8M Na acetatx3H₂O ve 40mM EDTAx2H₂O (Sigma) ile hazırlanan 40X Tris Borik EDTA (TBE) stok tamponu kullanıldı. 40X TBE stok solüsyonu kullanım öncesi 1X TBE olacak şekilde distile su ile sulandırıldı (pH 7,2).

3.5.1. Agaroz jel elektroforezi

1. Steril bir balon içine 100ml 1X TBE tamponu ve 2g agaroz (Sigma) eklenerek mikrodalga fırında eritildi.
2. Agaroz (% 2) oda ısısında soğutularak içine 0,5µg/ml etidyum bromür (EtBr) pipetaj ile eklendi.
3. Jel, önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş elektroforez tankının (OWL Separation Systems Model B2 Mini Gel Electrophoresis System) üzerine hava kabarcığı olmayacak şekilde yavaşça döküldü ve oda sıcaklığında katılaşması için yaklaşık olarak 30 dakika bekletildi.
4. Jel katılaştıktan sonra taraklar yavaşça çıkarıldı.
5. Jelin ilk kuyucuğunda 6µl 100bp DNA ladder (Fermentas) olmak üzere, 10µl amplikon ile 2µl yükleme tamponu (1X TBE içinde % 20 sukroz, % 0,25 bromfenol mavisi) karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi.
6. Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300) 80V ve 160A akıma ayarlanarak çalıştırıldı.
7. Yaklaşık olarak 45 dakika sonra elektroforez durduruldu.
8. Jel tanktan çıkarıldı ve jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Imaging Systems Visible & Ultraviolet Transilluminator, MiniBIS Bio-Imaging System) ile görüntülenerek 539bp veya 243bp'de band veren RSV pozitif örneklerin varlığı analiz edildi (Şekil 6 ve 7).



Şekil 6. Nested RT-PCR'ın ilk aşaması sonrası amplifikasyon ürünlerinin % 2 agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi (1;100bp DNA ladder. 2-11;Hastaların amplikonları. 4 ve 10 numaralı hastaların amplikonlarında 539bp band varlığı ile RSV pozitifliği mevcuttur.)



Şekil 7. Nested RT-PCR'ın ikinci aşaması sonrası amplifikasyon ürünlerinin % 2 agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi (1; 100bp DNA ladder. 2-10; Hastaların amplikonları. 11; Pozitif kontrol. 3, 6, ve 8 numaralı hastalarda ve 11 numaralı pozitif kontrol örneğinde 243bp band varlığı ile RSV pozitifliği görülmektedir.)

3.6. İstatistiksel yöntemler

Çalışmamızın istatistiksel analizlerinde SPSS 11.5 ve Epi-Info Ver.6.0 kullanılarak ki-kare testi (uygun olan yerlerde Yates düzeltmesi veya Fisher'in kesin testi) uygulanmıştır.

3.7. Etik komite onayı

Çalışmamızın yürütülebilmesi için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen her hasta ve ebeveyni yapılacak işlemler ile ilgili bilgilendirilerek rızaları alınmıştır.

4. BULGULAR

Bölgemizde ASYE olan çocuklarda RSV enfeksiyonlarının insidansının araştırılması amacı ile Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nın yoğun bakım, onkoloji ve hematoloji servislerinde Ocak 2011 ve Ocak 2012 tarihleri arasında klinik olarak alt solunum yolu enfeksiyonu tanısı alan 0-15 yaş arası 323 hastadan nazofaringeal sürüntü örnekleri toplanarak, bu örneklerde direkt immunfloresan test (DFA) ile RSV antijeni ve nested RT-PCR yöntemi ile RSV RNA varlığı araştırıldı.

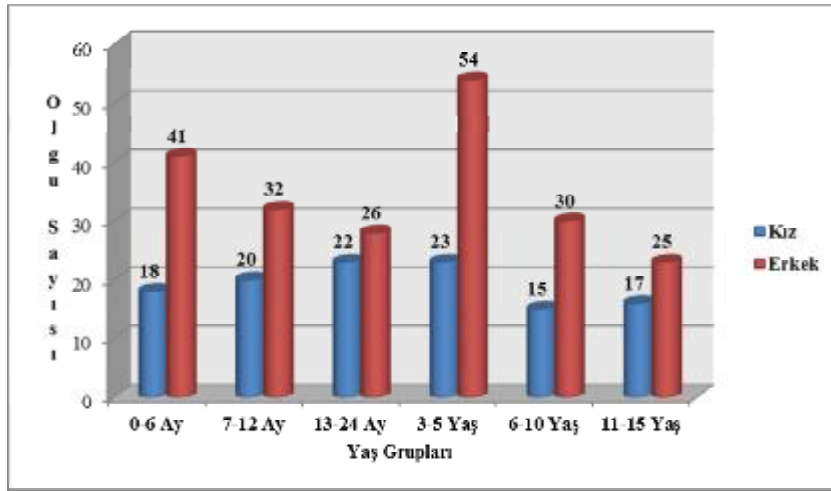
Çalışmaya dahil edilen 0-15 yaş aralığındaki toplam 323 hastanın 208'i (% 64,4) erkek, 115'i (% 35,6) kızdı. Erkeklerin kızlara oranı 1,81 idi. ASYE olan çocukların yaşları üç gruba ayrıldığında, 0-2 yaş grubunda olanlar tüm hastaların % 49,3 olup bunların % 62,3'ü erkek ve % 37,7'si kızdı. Yaşları 3-5 arasında olanlar bütün hastaların % 23,8'ini oluşturdu ve % 70,1'i erkek, % 29,9'u kızdı. Yaşları 6-15 arasında olanlar ise % 26,9'luk bir orandaydı ve bunların % 63,3'ü erkek, % 36,7'si kızdı (Tablo 3). ASYE olan çocukların cinsiyetlerinin yaş grubuna göre dağılımı istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bir fark saptanmadı (χ^2 eğim = 0,106 $p > 0,05$).

Tablo 3. ASYE olan çocukların cinsiyetlerinin yaş gruplarına göre dağılımı (* Satır yüzdesi, ** Sütun yüzdesi) (χ^2 eğim = 0,106 $p > 0,05$)

ASYE olan çocuklar	Erkek		Kız		Toplam	
	Sayı	%*	Sayı	%*	Sayı	%**
0-2 yaş	99	62,3	60	37,7	159	49,3
3-5 yaş	54	70,1	23	29,9	77	23,8
6-15 yaş	55	63,3	32	36,7	87	26,9
Toplam	208	64,4	115	35,6	323	100,0

ASYE olan hastaların yaş grupları 6 gruba ayrıldığında ise, çocukların % 18,3'ü (59/323) 0-6 ay arasında olup bunların % 69,5'i (41/59) erkek ve % 30,5'i (18/59) kızdı. Çocukların % 16,1'i 7-12 ay arasında olup % 61,5'i erkek ve % 38,5'i kızdı. Hastaların

% 14,9'u 13-24 ay arasında olup % 54,2'si erkek ve % 45,8'i kızdı. Çocukların % 23,8'i 3-5 yaş grubunda olup bunların % 70,1'i erkek ve % 29,9'u kız idi. Çocukların % 13,9'u 6-10 yaş arasında olup bunların da % 66,7'si erkek ve % 33,3'ü kız idi. Yaşları 11-15 yaş arasında olanların sayısı ise çocukların % 13'ünü oluşturuyordu ve bunların % 59,5'i erkek ve % 40,5'i kızdı (Şekil 8).



Şekil 8. ASYE olan çocukların cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı

ASYE olan çocuklarda RSV RNA pozitifliği bulunan 95 hastanın % 67,4'ü (64/95) erkek, % 32,6'si (31/95) kızdı. RSV enfeksiyonu oranı erkeklerde % 30,8 iken kızlarda % 27 olup, 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) (Tablo 4).

Tablo 4. ASYE olan çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin cinsiyete göre dağılımı (* Satır yüzdesi, ** Sütun yüzdesi) (Yates=0,351 sd=1 p>0,05)

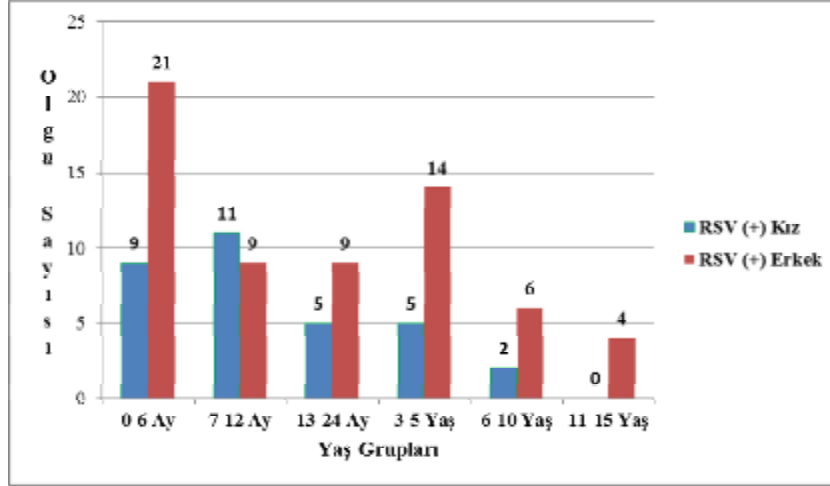
ASYE olan çocuklar	RSV pozitif		RSV negatif		Toplam	
	Sayı	%*	Sayı	%*	Sayı	%**
Erkek	64	30,8	144	69,2	208	64,4
Kız	31	27,0	84	73,0	115	35,6
Toplam	95	29,4	228	70,6	323	100,0

ASYE olan 323 çocuğun % 29,4'ünde (95/323) RSV RNA pozitifliği tespit edilmiş olup RSV enfeksiyonu olan 95 çocuğun % 40,3'ü (64/159) iki yaş altı, % 18,9'u (31/164) üç yaş ve üzeriydi. Çalışma grubundaki ASYE olan çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı incelendiğinde 2 yaş altındaki çocuklarda RSV pozitifliğinin en yüksek olduğu (% 40,3), bu pozitifliğin 3-5 yaş grubunda % 24,7 ve 6-15 yaş grubunda % 13,8 olmak üzere yaş arttıkça anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($\chi^2= 20,053$ sd=2 p<0,001) (Tablo 5). İleri analizde RSV pozitifliği riskinin (Odds Ratio, olasılıklar oranı) 2 yaş altındakilere göre 3-5 yaş grubunda % 50'ye, 6-15 yaş grubunda ise % 26'ya düştüğü görüldü (χ^2 eğim=17,849, p<0,001). Bu azalmanın her iki cins için de geçerli olduğu saptandı. İleri analizde erkeklerde 2 yaş altındakilere göre RSV pozitifliği riskinin 3-5 yaş grubunda % 52'ye, 6-15 yaş grubunda ise % 34'e düştüğü saptandı (χ^2 eğim=8,156, p<0,05). Kızlarda ise 2 yaş altındakilere göre bu riskin 3-5 yaş grubunda % 41, 6-15 yaş grubunda ise % 9 olduğu bulundu (χ^2 eğim=13,138, p<0,001). Bir başka deyişle yaş arttıkça RSV pozitifliği riskinin kızlarda çok daha fazla azaldığı saptandı.

Tablo 5. ASYE olan çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin yaş grubuna göre dağılımı (* Satır yüzdesi, ** Sütun yüzdesi) ($\chi^2= 20,053$ sd=2 p<0,001)

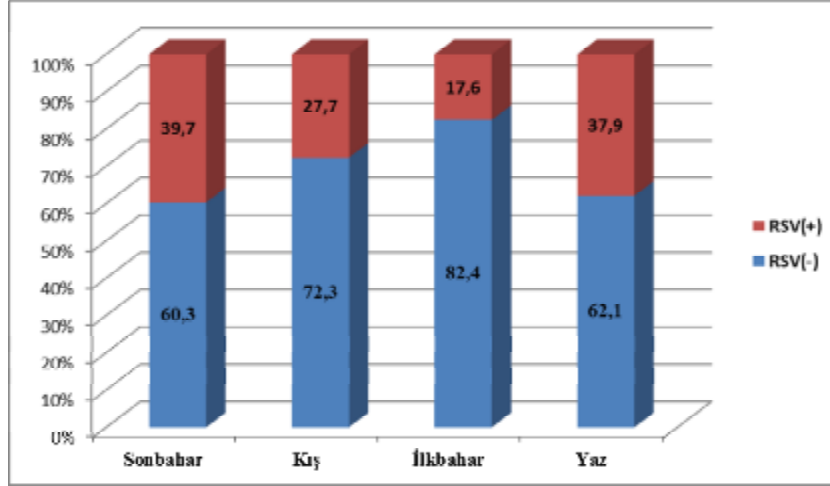
ASYE olan çocuklar	RSV (+)		RSV (-)		Toplam	
	Sayı	%*	Sayı	%*	Sayı	%**
0-2 yaş	64	40,3	95	59,7	159	49,2
3-5 yaş	19	24,7	58	75,3	77	23,8
6-15 yaş	12	13,8	75	86,2	87	27,0
Toplam	95	29,4	228	70,6	323	100,0

RSV pozitif hastaların yaş dağılımı daha ayrıntılı incelendiğinde % 31'inin 0-6 ay, % 21'inin 7-12 ay, % 15'inin 13-24 ay, % 20'sinin 3-5 yaş, % 9'unun 6-10 yaş ve % 4'ünün de 11-15 yaş arasında olduğu görüldü. RSV pozitif 95 hastanın 64'ü (% 67,4) 24 aydan küçük, 31'i (% 32,6) iki yaşından büyük olan çocuklardı. (Şekil 9).



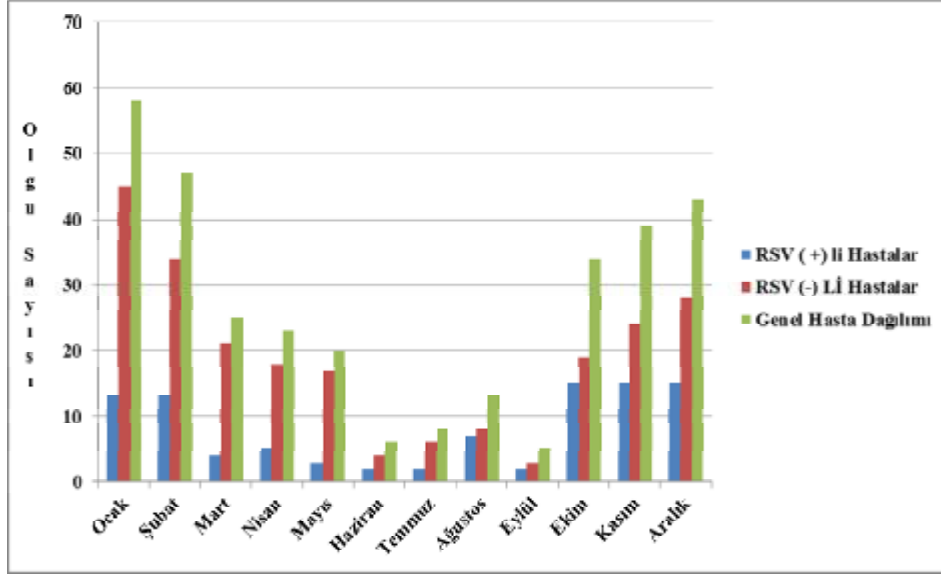
Şekil 9. RSV RNA pozitif bulunan 95 hastanın yaş gruplarına göre dağılımı

Hastaların ASYE sebebi ile hastaneye başvurduğu mevsimler sıklık sırasıyla kış, sonbahar, ilkbahar ve yaz olmak üzere tüm yılı içermekteydi. Sonbaharda toplam 78 vakanın 31’inde, kış mevsiminde toplam 148 vakanın 41’inde, ilkbaharda toplam 68 vakanın 12’sinde ve yaz döneminde toplam 29 vakanın 11’inde RSV RNA pozitifliği tespit edildi. Böylece çalışma grubundaki ASYE’li çocuklarda 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 ($\chi^2= 9,766$; $sd=3$; $P<0,05$). Yazın % 37,9’luk oranla nerdeyse sonbahar kadar yüksek görülmesi yazın ASYE olan hasta sayısının az olmasından (29 vaka ile) kaynaklanabilir. Yine de yüksek bir oran görülmesi ASYE olan hastalarda RSV’nin önemli bir ajan olduğunu göstermektedir (Şekil 10). 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 ($\chi^2= 8,800$; $sd=2$; $p<0,05$).



Şekil 10. ASYE’li çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin mevsimlere göre dağılımı ($\chi^2= 9,766$; $sd=3$; $P<0,05$)

ASYE olan toplam 323 çocukta RSV enfeksiyonu olan 95 vakanın aylara göre dağılımına bakıldığında 58 hastanın 13’ü (% 13,6) Ocak ayında, 47 hastanın 13’ü (% 13,6) Şubat ayında, 25 hastanın 4’ü (% 4,2) Mart ayında, 23 hastanın 5’i (% 5,3) Nisan ayında, 20 hastanın 3’ü (% 3,2) Mayıs ayında, 6 hastanın 2’si (% 2,1) Haziran ayında, 8 hastanın 2’si (% 2,1) Temmuz ayında, 15 hastanın 7’si (% 7,4) Ağustos ayında, 5 hastanın 1’i (% 1,1) Eylül ayında, 34 hastanın 15’i (% 15,8) Ekim ayında, 39 hastanın 15’i (% 15,8) Kasım ayında ve 43 hastanın 15’i (% 15,8) Aralık ayında RSV tespit edildi. RSV’ye bağlı ASYE olan 95 vakanın 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 görüldü (Şekil 11). 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 tutulamamıştır³²¹.



Şekil 11. ASYE’li çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin aylara göre dağılımı

RSV RNA pozitif olduğu belirlenen 95 ASYE’li çocuğun başvuru anındaki şikayetleri sorgulandığında 58’inde (% 61; 58/95) 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. RSV RNA pozitif olan toplam 32 kız çocuğun şikayetleri sıklık sırasına göre 29’unda öksürük, 20’sinde ateş, 20’sinde solunum sıkıntısı, 18’inde burun akıntısı, 10’unda beslenme yetersizliği, 7’sinde kusma, 4’ünde ishal, 1’inde morarma ve 1’inde bilinç bulanıklığı idi. RSV RNA pozitif olan toplam 63 erkek çocuğun ise şikayetleri sıklık sırasına göre 50’sinde öksürük, 46’sında burun akıntısı, 38’inde ateş, 37’sinde solunum sıkıntısı, 20’sinde beslenme yetersizliği, 11’inde kusma, 2’sinde morarma ve 1’inde de ishal idi. Bilinç bulanıklığı olan erkek hasta yoktu (Tablo 6). Hastalık belirtileri yönünden RSV pozitif ve RSV negatif hastalar arasında morarma ve kusma dışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($\chi^2= 8,290$; $sd=5$; $p>0,05$). Morarma ve kusma belirtileri arasında anlamlı fark olması ise RSV varlığından ziyade altta yatan kardiyak ve metabolik hastalıklara bağlı olabileceği düşünüldü ($\chi^2= 48,815$; $sd=7$; $p<0,001$).

Tablo 6. ASYE’li çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin klinik belirtilere göre dağılımı (*Diğer: İshal, bilinç bulanıklığı. * Satır yüzdesi, ** Sütun yüzdesi) ($\chi^2= 8,290$; sd=5; p>0,05)

ASYE olan çocuklar	RSV pozitif		RSV negatif		Toplam	
	n	%*	n	%*	n	%**
Ateş	58	31,4	127	72,6	185	57,3
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	81,8	4	18,2	22	6,8
Beslenme yetersizliği	30	34,5	57	65,5	87	26,9
Diğer	6	16,2	31	83,8	37	11,5

ASYE olan toplam 323 hastanın % 60,4’ünün (195/323) AML, ALL, Talassemi majör gibi hematolojik, nöroblastom, medullablastom, yolk sac tümör gibi onkolojik, kistik fibrozis, histiositozis gibi kronik akciğer hastalığı, VSD, ASD, PDA gibi kardiyak hastalık, nötrofil fonksiyon bozukluğu, prematürite gibi immünolojik hastalık, ensefalit, menenjit gibi nörolojik hastalık veya tirozinemi, glikojen depo hastalığı gibi metabolik hastalık şeklinde ek bir hastalığı vardı. RSV pozitif hastaların ise % 63,2’sinde (60/95) ek bir hastalık mevcuttu. (Tablo 7). Herhangi bir hastalığın varlığı RSV pozitifliğini etkilememekteydi (Yates $\chi^2= 0,287$; sd=1; p>0,05) Hastalık gruplarına göre değerlendirildiğinde ise (“hastalık yok”a karşılık akciğer hastalığı, hematolojik hastalık, immünolojik hastalık, kalp hastalığı, metabolik hastalık, nörolojik hastalık, onkolojik hastalık varlığı) yine bir fark bulunamadı ($\chi^2= 4,478$; sd=7; p>0,05).

Tablo 7. ASYE’li çocuklarda RSV RNA pozitifliğinin ek hastalık varlığına göre dağılımı (* Satır yüzdesi, ** Sütun yüzdesi) (Yates $\chi^2= 0,287$; sd=1; p>0,05)

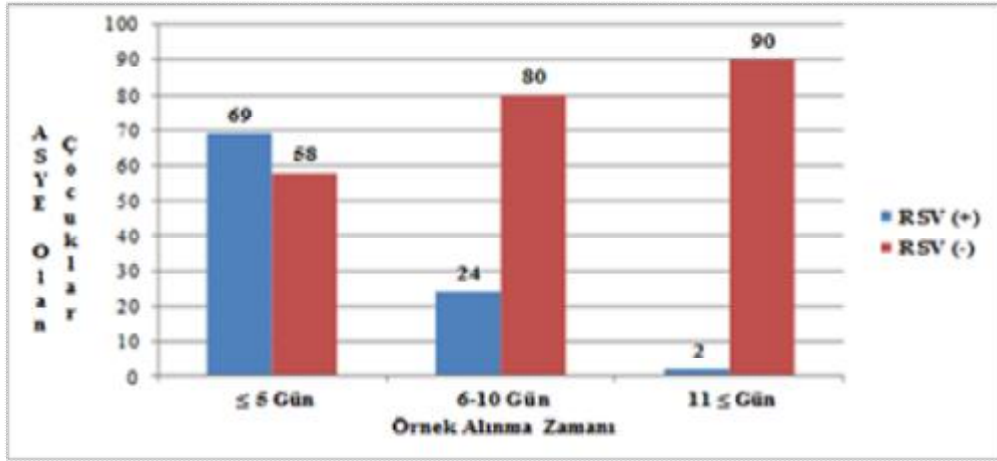
ASYE olan çocuklar	RSV pozitif		RSV negatif		Toplam	
	n	%*	n	%*	n	%**
Ek hastalık yok	35	27,3	93	72,7	128	39,6
Kronik akciğer hastalığı	8	36,4	14	63,6	22	6,8
Hematolojik hastalık	15	27,8	39	72,2	54	16,7
İmmünolojik hastalık	5	38,5	8	61,5	13	4,0
Kardiyak hastalık	12	38,7	19	61,3	31	9,6
Metabolik hastalık	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
Toplam	95	70,6	228	29,4	323	100,0

Flocked eküvyon (Copan Diagnostics, Italy) ile alınan 323 nazofaringeal sürüntü örneğinde RSV antijeni DFA testi ve RSV RNA varlığı nested RT-PCR yöntemi ile araştırıldığında, DFA yöntemi ile 323 örneğin, 88'inde (% 27,6) RSV antijen pozitifliği bulundu. RT-PCR metodu ile 323 örneğin 95'inde (% 29,4) RSV RNA tespit edildi. Örneklerin 80'i (% 25) her iki yöntem ile pozitif, 220'si (% 68) ise her iki yöntemle negatifti. 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 (Tablo 8).

Tablo 8. RSV tanısında kullanılan DFA ve RT-PCR testlerinin sonuçları

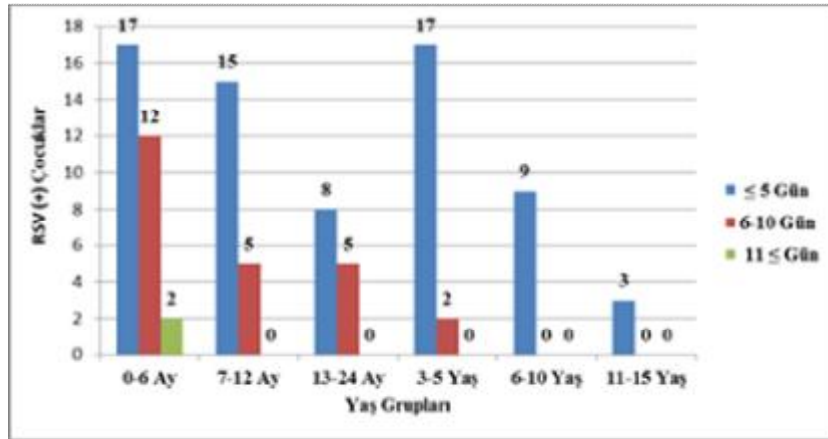
	RT-PCR		
DFA	Pozitif	Negatif	Toplam
Pozitif	80 (% 25)	8 (% 2.6)	88 (% 27.6)
Negatif	15 (% 4.4)	220 (% 68)	235 (% 72.4)
Toplam	95 (% 29.4)	228 (% 70,6)	323 (% 100)

Çalışmaya alınan ASYE'li 323 hastanın klinik belirtilerinin örnek alımından ne kadar önce başladığı değerlendirildiğinde, örneklerin % 39'u (127/323) beş günden az, % 32'si (104/323) 6-10 günler arasında ve % 29'u (92/323) on bir günden uzun süreli idi. İlk beş günde alınan örneklerin % 54,3'ü (69/127) pozitifken 6-10 günde % 23,1'i (24/104), onbir günden sonra alınan örneklerin ise % 2,2'si (2/92) RSV RNA pozitifliği (Şekil 12). İlk beş günde örnek alınan hastalardaki RSV pozitifliği (% 54,3) ileri dönemlerde örnek alınan hastalardakine 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 görüldü (χ^2 eğim=71,746, $p<0,001$).



Şekil 12. ASYE’li çocuklarda RSV test sonucunun örnek alınma zamanına göre dağılımı (χ^2 testi=71,746, $p<0,001$).

RSV RNA pozitif bulunan 95 hasta örneğinin klinik belirtilerin başlamasından ne kadar sonra alındığı incelendiğinde hastaların % 72’sinde (69/95) ilk beş günde, % 25,3’ünde (24/95) 6-10 günler arasında ve % 2,1’inde (2/95) on bir günden sonra idi. Örneklerin 6-10 günleri arasında alındığı RSV RNA pozitif hastaların % 50’si (12/24) 0-6 ay yaş grubunda, % 92’si (22/24) 0-24 ay yaş grubunda idi (Şekil 13).



Şekil 13. RSV pozitif çocuklarda yaş grubuna göre örnek alınma zamanının dağılımı

ASYE olan 323 çocuğun klinik tanıları değerlendirildiğinde % 16,1’i (52/323) bronşit, % 31,9’u (103/323) bronşiyolit, % 43,3’ü (140/323) pnömoni ve % 8,7’si (28/323)

astımdı. RSV pozitif bulunan 95 hastanın klinik tanıları değerlendirildiğinde % 4,2'si bronşit (4/95), % 62,1'i (59/95) bronşiyolit, % 31,6'sı (30/95) pnömoni, ve % 2,1'i (2/95) astım idi. RSV negatif bulunan 228 hastanın ise 48'i bronşit (% 21,1), 44'ü (% 19,3) bronşiyolit, 110'u (% 48,2) pnömoni, ve 26'sı astım (% 11,4) idi (Tablo 9). RSV pozitif hastalarda en çok görülen hastalık % 57,3 oran (59/103) ile bronşiyolit olup % 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).

Tablo 9. ASYE olan çocuklarda RSV pozitifliğinin klinik tanılarına göre dağılımı ($\chi^2=61,336$ df=3 p<0,001).

ASYE olan çocuklar	RSV pozitif		RSV negatif		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Bronşiyolit	59	57,3	44	42,7	103	31,9
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
Toplam	95	29,4	228	70,6	323	100

5. TARTIŞMA

RSV infantlarda ve küçük çocuklarda bronşiolit ve pnömoni gibi alt solunum yolu enfeksiyonlarının major sebebidir. RSV'nin RSV A ve B olmak üzere iki subtipi vardır. RSV subtip A enfeksiyonlarının RSV subtip B'ninkilerden daha ciddi olduğu kaydedilmiştir¹⁶⁴. Çocukların çoğu 2 yaşına kadar RSV ile enfekte olur ve ömür boyu tekrarlayan enfeksiyonlar görülebilmektedir. Hastalık sıklıkla rinitle başlayıp bronşiolit veya öksürük, hırıltı ve solunum sıkıntısı ile seyreden pnömoniye ilerler. Hastalığın süresi genellikle 10-14 gündür ve hospitalize olan yenidoğanlarda fatalite oranı % 0,5-1 olduğu bildirilmektedir⁷³. Bazı yıllarda, RSV vakalarının sayısı diğer bütün respiratuvar virus enfeksiyonlarının toplamına yaklaşabilmektedir¹⁶⁴.

Enfeksiyonların çoğu geç sonbahar ve erken ilkbahar mevsimleri arasında ortaya çıkar ve kışın pik prevalans gösterir. Hastane ortamında genellikle 3-8 gün ve bazen 3-4 hafta kadar uzun süreli olabilen RSV'nin nozokomiyal yayılımı major problem olabilmektedir¹²⁷. RSV'nin hızlı tanısı hem hasta yönetimi hem de nozokomiyal enfeksiyon yayılımının önlenmesi için son derece önem taşır.

RSV'nin rutin tanısında konvansiyonel hücre kültürünün kullanımı sınırlıdır. RSV labil bir RNA virusu olduğu için diğer respiratuvar viruslara göre kültürde üretilmesi daha zordur. HEp-2, HeLa, ve A549 hücreleri primer izolasyon için en sensitif hücre dizileridir. Konvansiyonel tüp kültürünün sensitivitesi hızlı antijen tespiti için kullanılan IFA ile kıyaslandığında % 57-90 arasında değişmektedir. Shell vial hücre kültürü metodunun tüp kültürü ile kıyaslandığında sensitivitesinin daha yüksek olduğu ve izolasyon süresini kısalttığı gösterilmiştir. Shell vial hücre kültürü metodu DFA, ELISA veya konvansiyonel hücre kültürü ile kıyaslandığında sensitivitesi % 67-92 arasında değiştiği gösterilmiştir¹⁶⁴. Laboratuvarların çoğu DFA ve shell vial hücre kültürü ile direk antijen tespitinin kombinasyonunu kullanmaktadır. Mükemmel monoklonal antikörlerin varlığı DFA'nın sensitivitesini % 80-97 arasında artırmıştır. Hızlı ELISA testleri RSV tespiti için yıllardır kullanılmaktadır ve sonuçları 15-30 dakikada verme avantajı sağlarlar, fakat bu testlerin sensitivitesi düşüktür^{148,149}.

RSV tanısı için hızlı testler özellikle RSV prevalansının yüksek olduğu sezonlarda kullanıldıklarında sensitiviteyi DFA ve/veya RT-PCR ile kıyaslandığında % 80-85'dir. Ancak bu testlerin sensitivitesi prevalansın daha düşük olduğu yaz aylarında kullanıldığında çok daha düşük olacaktır. Diğer dikkat edilecek nokta da bu testlerin sensitivitesi çocuklara göre erişkinlerde daha düşüktür, çünkü erişkinlerde genellikle çocuklara göre virus titresi daha düşüktür¹⁶⁴.

RSV antikorlarının taranması ise çoğunlukla araştırma amaçlı seroepidemiolojik bilgi edinmek için yapılır. Serolojik testlerle infantlarda anti-RSV antikorlarının tespiti akut RSV enfeksiyonu tanısı için uygun değildir. Ciddi RSV enfeksiyonunda bile infantlarda genellikle immunolojik cevap tespit edilmez. Maternal antikorların varlığından dolayı infantın kendi antikor cevabı nadiren tespit edilir. Büyük çocuklar ve tekrarlayan enfeksiyonların görüldüğü hasta gruplarında bile tespit edilir antikor cevabı genellikle görülmez.

Konvansiyonel testlere alternatif olarak yüksek sensitivite ve spesifite gösteren nükleik asit amplifikasyon testlerinin kullanımı giderek artmaktadır. RSV tanısı için birçok RT-PCR testleri bulunmaktadır. RT-PCR testi ile RSV tanısı için hedefler füzyon, nükleokapsid ve large polimeraz subunit genleridir^{148,149}. Virusun enfektivitesini belirleyen ve nötralizan antikorların da hedefi olan F ve G yüzey glikoproteinlerinden F protein, RSV'nin iki antijenik grubunda da yüksek derecede korunmuş olan F gen bölgesinde kodlanır. Bu sebeple çalışmamızda F gen bölgesinin amplifikasyonunu hedefledik.

RSV enfeksiyonları en çok 2 yaş altında görülür. Serolojik çalışmalar bebeklerin yarısının ilk bir yaşta, tamamının ise iki yaşına kadar % 95 seropozitifliğe ulaştığını göstermiştir. Farklı ülkelerde yapılan çalışmalar ASYE'lerde viral solunum yolu viruslarının, özellikle RSV'nin klinik önemini göstermiştir. Bu çalışmalardan Fransa'da Freymuth ve arkadaşları 2005 ve 2006 yılları arasında ASYE olan 263 çocuktan topladıkları nazal aspirat örneklerinde respiratuvar virusların tanısında multipleks PCR ile DFA ve hücre kültürünü karşılaştırmak amacı ile yaptıkları çalışmada virus varlığını DFA testi ile % 57,6, DFA ile hücre kültürü yöntemlerinin her ikisi ile % 72,7 ve PCR metodu ile % 92 olarak bulmuşlardır. Bunlar içinde % 43,6 oranı ile en sık görülen viral etkenin RSV olduğunu bildirmişlerdir²⁸⁸.

Diğer bir çalışmada Choi ve arkadaşları Kore’de ASYE’li çocuklarda respiratuvar virusların prevalansını belirlemek amacı ile 2000-2005 yılları arasında beş sezon boyunca 5 yaşından küçük 515 hastadan topladıkları nazofaringeal aspirat örneklerini multipleks RT-PCR metodu ile analizleri sonucunda 312 (% 60,6) hastada virus tespit etmişler ve viral etkenler arasında en sık patojenin % 23,7 oranı ile RSV olduğunu saptamışlardır²⁸⁹.

Mentel ve arkadaşları Ocak 2000 ve Mayıs 2001 tarihleri arasında Kuzeydoğu Almanya’da alt solunum yolu enfeksiyonu olan 2 yaş altı 330 hospitalize çocukta RSV insidansını tespit etmek amacıyla topladıkları nazofaringeal aspirat örneklerini RT-PCR testi ile araştırdıklarında % 26,4 oranını rapor etmişlerdir²⁹⁰.

Kanada’da Papenburg ve arkadaşları 2006-2010 yılları arasındaki dört kış sezonunda akut solunum yolu enfeksiyonu olan 3 yaşın altındaki 1044 çocukta topladıkları nazofaringeal aspirat örneklerini multipleks PCR/DNA hibridizasyon test metodu ile araştırdıkları çalışmada hastanede yatan 734 çocuğun % 63,6’sında ve 305 poliklinik hastasının % 48,2’sinde RSV pozitifliği saptamışlardır²⁹¹.

Zhang ve arkadaşları Çin’de beş yaş altı çocuklarda RSV’ye bağlı ASYE insidansını araştırmak için Nisan 2006 ve Mart 2009 yılları arasında dört sezon boyunca yürüttükleri bir başka çalışmada, alt solunum yolu enfeksiyonu şikayetleri ile başvuran 1387 çocuk hastadan topladıkları nazofaringeal aspirat örneklerinin RT-PCR metodu ile analizinde 439 (% 31,7) hastada RSV pozitifliği saptamışlardır²⁹².

Zhang ve arkadaşlarının alt solunum yolu enfeksiyonlarında respiratuvar virusların prevalansını ve etyolojisini belirlemek amacı ile Çin’de Ocak 2008 ve Aralık 2008 tarihinde akut ASYE tanısı ile hastaneye yatırılan 16 yaşından küçük olan 412 hastadan topladıkları nazofaringeal aspirat örneklerinde DFA testi ile yaptıkları analiz sonucunda 260 (% 63,1) hastada virus izole etmişler ve hastaların % 25’inde RSV saptamışlardır²⁹³. Kanada’da Gregson ve arkadaşlarının ASYE’li 17 yaşından küçük 236 çocukta topladıkları nazofaringeal örneklerde DFA testi ile yaptıkları çalışmada RSV antijen pozitifliği % 49 olarak saptanmıştır²⁹⁴.

RSV enfeksiyonlarının tanısında hızlı tanı testini kullanan çalışmalardan Rusya’da Tatochenko ve arkadaşlarının RSV enfeksiyonunun prevalansını ve mevsimselliğini saptamak amacı ile Eylül 2008 ve Nisan 2009 tarihlerinde üç bölgede yapılan yedisi Moskova’da (Merkez), biri Saint Petersburg’da (Kuzeybatı), biri

Tomsk'da (Doğu) olmak üzere dokuz merkez ile yürüttükleri ASYE olan 2 yaş altındaki toplam 519 hastanın nazofarigeal lavaj örneklerini hızlı immunokromatografik test tekniği ile araştırdıkları çalışmada % 38 oranında RSV pozitifliği saptanmıştır¹⁴⁵. ABD'nin sekiz bölgesinde Ginocchio ve arkadaşlarının Aralık 2008 ve Ocak 2009 tarihlerinde 0-89 yaş arasındaki, % 72,4'ünün 5 yaşın altında, % 12,8'nin 6-21 yaş, % 8,7'sinin 22-59 yaş ve % 6,1'inin 60 yaşın üzerinde olduğu toplam 1501 hastanın nazal aspirat, nazofaringeal aspirat ve nazofaringeal sürüntü gibi çeşitli örneklerinde 3M RSV hızlı tanı testinin ASYE olan hastalardaki performansını R-Miks kültür, DFA testleri ile karşılaştırarak belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada RSV pozitifliği 22 yaşından küçük hastalarda % 38, çalışmadaki tüm popülasyondaki RSV prevalansı ise % 34 olarak tespit edilmiştir²⁹⁵.

Sonuç olarak tüm dünyada ASYE olan çocuklarda RSV insidansı ülkeden ülkeye ve hatta bölgeden bölgeye değişmektedir. Söz konusu çocuklarda RSV sıklığı Avrupa'nın ülkelerinde, örneğin İsviçre'de % 55 iken İtalya'da % 21, Almanya'da % 15-23 ve Fransa'da % 33-43 tespit edilmiştir.^{288,290,296-299} Kuzey Amerika'da RSV insidansının % 12,3-38 olduğunu gösteren çalışmalar vardır^{295,300-301}. Latin Amerika'da ise bu oran % 24-60 arasında bildirilmiştir³⁰²⁻³⁰⁶. Avustralya'da Whiley ve arkadaşları ASYE olan çocuklarda RSV insidansını % 41 olarak kaydetmiştir³⁰⁷. Afrika'da farklı çalışmalarda RSV insidansı % 12,8-36 arasında rapor edilmiştir³⁰⁸⁻³⁰⁹.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda RSV enfeksiyon insidansı % 5,2-55,6 arasında bildirilmiştir^{9,310-320}. Oranlar bölgeden bölgeye, yıla ve mevsime göre değişmektedir.

Ankara'da Güney ve arkadaşları Ocak 2002 ve Mart 2002 tarihleri arasında solunum yolu enfeksiyonu olan 2 yaşın altındaki 35 hastada RT-PCR testi ile RSV sıklığını % 51,5 olarak tespit etmişlerdir³¹⁰. Yine Ankara'da Yolbakan ve arkadaşlarının 2010 ve 2012 yılları arasında solunum yolu enfeksiyonu olan 556 infanttın toplanan çeşitli solunum sekresyonlarında multipleks RT-PCR metodunu kullanarak viral patojenleri araştırmak için yaptıkları çalışmada örneklerin % 89,3'ünde en az bir virus ve bunların da % 23,5'inde RSV pozitifliği tespit etmişlerdir³¹¹.

Elazığ'da Bulut ve arkadaşları 2003 ve 2004 kış mevsimlerinde 6-16 ay yaş grubundaki ASYE'li 90 infanttın topladıkları nazal yıkama ve serum örneklerinde respiratuvar viruslar için ELISA testi ile serum örneklerinin % 51,1'inde en az bir

virusa spesifik IgM pozitifliği ve RT-PCR metodu ile nazal örneklerin % 78,8'inde en az bir virus genomunun varlığını tespit etmişlerdir. Bu hastalar arasında RSV sıklığını RT-PCR testi ile % 28,8 olarak bildirmişlerdir³¹².

Kayseri'de Gökalp ve arkadaşları Kasım 2005 ve Mayıs 2006 tarihleri arasında hastanede yatarak tedavi gören ASYE'li yaşları 0 ve 24 ay arasında olan 80 hastanın nazotrakeal aspirat örneklerinde RSV tanısında DFA, hücre kültürü ve RT-PCR yöntemlerini karşılaştırmak amacı ile yaptıkları çalışmada DFA testi ile % 32,5, hücre kültürü ile % 21,3 ve RT-PCR testi ile % 27 RSV pozitifliği tespit etmişlerdir³¹³.

Konya'da Akkaya ve arkadaşları Ekim 2010 ve Nisan 2011 tarihleri arasında pnömoni tanısı alan 9 yaş altındaki 150 çocukta viral etkenleri belirlemek amacı ile Seeplex RV12 (Seegene Inc, Rockville, MD.) multipleks PCR testi ile örneklerin % 35,6'sında en az bir viral etken ve bunların % 45'inde RSV pozitifliği saptamışlardır³¹⁴.

İstanbul'da Ünüvar ve arkadaşlarının Ekim 2005 ve Nisan 2006 tarihlerinde yaşları 1 ay ve 15 yaş arasında değişen hospitalizasyon gerektirmeyen üst solunum yolu enfeksiyonu olan 201 hastadan topladıkları nazofaringeal sürüntü örneklerinde respiratuvar virusların tanısı için DFA testini kullandıkları çalışmada vakaların % 29,8'inde en az bir viral etken saptanmış ve RSV insidansı % 4 olarak tespit edilmiştir³¹⁵.

RSV enfeksiyonlarının tanısında örneklerin immunokromatografik test ile incelendiği çalışmalardan İstanbul'da Beşer ve arkadaşları solunum yolu enfeksiyonu olan 2 yaş altı 298 çocukta RSV antijen pozitifliğini % 54 olarak saptamıştır³¹⁶. Kanra ve arkadaşları İstanbul'da 2000 ve 2002 yılları arasında 17 merkez ile yürüttükleri altta yatan bronkopulmoner displazi, konjenital kalp hastalığı, kistik fibrozis veya immun yetmezlik sebebi ile yüksek riskli kabul edilen ve hastanede yatan ASYE'li 24 aydan küçük 332 çocuktan aldıkları nazofaringeal aspirat, yıkantı veya sürüntü örneklerinde RSV prevalansını belirlemek amacı ile ELISA yöntemini kullandıkları çalışmada hastaların % 29,5'inin (98) RSV pozitif olduğunu tespit etmişlerdir³¹⁷. Yine İstanbul'da Hatipoğlu ve arkadaşları 1 Ocak 2006 ile 30 Nisan 2006 tarihleri arasında ASYE sebebi ile hospitalize edilen 0-24 ay arasındaki 80 çocukta RSV antijenini tespit etmek için strip test yöntemini kullandıkları çalışmada RSV sıklığını % 35 bulmuşlardır³¹⁸.

Mersin’de Çelik ve arkadaşları Temmuz 2008 ve Haziran 2010 döneminde ASYE olan 2 yaşın altındaki 208 vakada RSV insidansını araştırmak amacı ile strip test kullandıkları çalışmada RSV pozitifliğini % 5,2 bulmuşlardır³¹⁹.

Samsun’da 2009 ve 2010 yılları arasında Kılınç ve arkadaşlarının 2 yaşın altındaki hemodinamik olarak stabil olmayan konjenital kalp hastalığı olan 241 ve risk faktörü olmayan 178 hastayı içeren toplam 419 ASYE’li hastada RSV sıklığını ve etkilerini araştırdıkları çalışmada konjenital kalp hastalığı olanların % 19,5’inde ve risk faktörü olmayanların % 20’sinde hızlı antijen testi ile RSV pozitifliği gösterilmiştir³²⁰.

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı’nın çeşitli servislerinde yatan ve ASYE olan 0-15 yaş arasındaki toplam 323 hastada RSV enfeksiyonu sıklığını tespit için planlanan bu çalışmada RSV pozitifliği RT-PCR testi ile % 29,4 bulundu. RSV enfeksiyonunun en çok görüldüğü 2 yaş altı çocuklarda ise RSV enfeksiyonu insidansı % 40,3 (64/159) olup bu oran 3-5 yaş grubundaki % 24,7 ve 6-15 yaş grubundaki % 13,8 oranlarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($\chi^2= 20,053$ sd=2 p<0,001). ASYE tanısında RT-PCR testini kullanan ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında RSV enfeksiyon insidansını Güney ve arkadaşları Ankara’da ASYE olan 2 yaş altı çocuklarda % 51,4 olarak tespit etmiş olup bizim aynı yaş grubundaki % 40,3 oranından daha yüksek bulmuş olmaları çalışılan hasta sayısının az (35 çocuk) olmasına bağlı olabilir³¹⁰.

Diğer çalışmalarda Ankara’da Yolbakan ve arkadaşları 24 ayın altındaki çocuklarda RT-PCR testi ile RSV enfeksiyon insidansını % 23,5, Elazığ’da Bulut ve arkadaşları % 28,8 ve Kayseri’de Gökalp ve arkadaşları % 27 oranlarında tespit etmiş olup bu bulgular bizim 24 ay altındaki çocuklarda bulduğumuz % 40,3 RSV pozitifliğinden biraz düşüktür³¹¹⁻³¹³. Yine Gökalp ve arkadaşları Kayseri’deki aynı çalışmada DFA testi kullandıklarında ise RSV enfeksiyon insidansını % 32,5 oranında tespit etmişlerdir³¹³.

Ülkemizde viral solunum yolu enfeksiyonu etkenlerinin araştırılması ile ilgili olarak Ünüvar ve arkadaşlarının çalışmasında İstanbul’da üst solunum yolu enfeksiyonu olan 0-15 yaş arasındaki 201 çocukta DFA testi ile viral etken % 29,8’inde (60) bulunurken, RSV enfeksiyonu sadece % 4’ünde (8) tespit edilmiştir³¹⁵. Aynı yaş grubunda bizim bulgumuz DFA testi ile % 27,6 olup bu orandan oldukça yüksektir. Bu durum çalışmamızdaki hasta popülasyonunun ASYE olan ve hastanede yatan, ayrıca

RSV enfeksiyonlarının daha fazla görüldüğü 24 ay altındaki çocukların oranının % 49,2 gibi oldukça yüksek olmasından kaynaklanabilir. İstanbul'da Ünüvar ve arkadaşlarının çalışmasında RSV pozitif 8 hastanın 5'i 0-5 ay ve 1'i 6-24 ay arasında olup % 63'ü (6) 24 ayın altındadır³¹⁵. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde RSV enfeksiyonu olan çocukların % 67,4'ü (64/95) 24 ayın altında olup 30'u 0-6 ay ve 34'ü 7-24 ay arasındadır.

Ülkemizde RSV tanısında hızlı antijen testinin kullanıldığı çalışmalarda ise İstanbul'da Beşer ve arkadaşlarının immunokromatografik test ile ASYE olan 2 yaşından küçük çocuklarda buldukları % 54 oranındaki RSV enfeksiyon insidansı bizim aynı yaş grubundaki % 40,3 oranından daha yüksek olup, çalışma grubunun % 53'nün 0-6 ay arası yaş grubunda olması ile ilişkili olabilir³¹⁶. Bir başka çalışmada ise İstanbul'da Hatipoğlu ve arkadaşlarının bildirdiği RSV enfeksiyon insidansı olan % 35'lik oran bizim bulgumuzdan biraz düşüktür³¹⁸. Buna karşılık İstanbul'dan Kanra ve arkadaşlarının % 29,5, Samsun'dan Kılınç ve arkadaşlarının % 20 ve Mersin'den Çelik ve arkadaşlarının % 5,2'lik bulguları ise daha düşük oranlardadır^{317,319-320}.

ASYE olan ve çoğunlukla 2 yaş altı çocuklarda RT-PCR testi ile diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda Fransa'da Freymuth ve arkadaşları RSV insidansını % 35,2, Kore'de Choi ve arkadaşları % 39,1 tespit etmiş olup, bu oran bizim aynı yaş grubundaki % 40,3 oranına benzerdir²⁸⁸⁻²⁸⁹. Almanya'da Mentel ve arkadaşları ise RSV pozitifliğini % 26,4 oran ile daha düşük bildirmişlerdir²⁹⁰. Kanada'da Papenburg ve arkadaşlarının çalışmasında ise ASYE sebebi ile hospitalize edilen 3 yaş altındaki çocuklarda RSV enfeksiyon insidansı % 63,6 olup bu oran bizim bulgumuzdan oldukça yüksektir²⁹¹.

Diğer bir çalışmada Zhang ve arkadaşları Çin'de 5 yaş altı 1387 çocukta RSV enfeksiyonunu RT-PCR testi ile % 31,7 oranında bildirmiş olup bu oran bizim 5 yaş altı grupta bulduğumuz % 35,2 (83/236) ile uyumludur²⁹².

RSV tanısında RT-PCR testi yerine DFA testini kullanan Zhang ve arkadaşlarının Çin'deki bir başka çalışmasında ise 16 yaş altındaki ASYE olan çocuklarda RSV enfeksiyonu insidansı % 25 olup bizim benzer yaş grubunda bulduğumuz % 27,6'lık oran ile koreledir²⁹³. Kanada'da Gregson ve arkadaşları ise 17 yaş altı ASYE'li çocuklarda DFA testi ile % 49'luk daha yüksek bir oran bildirmiştir²⁹⁴.

RSV tanısında hızlı tanı testi olan immunokromatografik testin kullanıldığı Tatochenko ve arkadaşlarının Rusya’da yaptığı çalışmada ise 2 yaş altı ASYE’li çocuklarda RSV enfeksiyon insidansı % 38 olup bizim aynı yaş grubundaki % 40,3’lük orana benzerdir¹⁴⁵. Yine hızlı tanı testi olan 3M RSV testinin kullanıldığı ABD’de Ginocchio ve arkadaşlarının çalışmasında ise çoğunu 5 yaş altındakilerin oluşturduğu 22 yaşından küçük hastalarda RSV prevalansı % 38 olarak bulunmuştur²⁹⁵.

ASYE’ler bütün dünyada özellikle gelişmekte olan ülkelerde infant (0-1 yaş grubu) ve erken çocukluk döneminde (1-5 yaş) hospitalizasyonun en sık sebebidir ve erkek hastalarda hospitalizasyon oranı kızlardan fazladır^{2,3,6}. Çalışmamızda ASYE olan toplam 323 hastanın % 64,4’ü erkek ve % 35,6’sı kızdı (Tablo 3). Çocukların % 49,2’si (159/323) 24 aydan küçüktü ve bunların % 62,3’ü (99/159) erkek çocuktur. Sonuç olarak çalışmamızda ASYE sebebi ile hospitalize edilen 0-15 yaş arası çocukların yarısı 2 yaşın altındaydı, ancak yaş gruplarına göre dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($\chi^2= 4,56$; $sd=5$; $P=0,471$). Ayrıca toplam 323 hastanın % 73,1’i (236/323) 5 yaşından küçüktü ve bunların da % 64,8’i (153/236) erkek çocuktur (Tablo 4). Çalışmamıza benzer şekilde, Çelik ve arkadaşları da Mersin’de ASYE olan 2 yaşın altı 208 çocukta yaptıkları çalışmada ASYE hastalarının % 64’ünün erkek olduğunu bildirmişlerdir³¹⁹.

Çalışma grubunda RSV RNA pozitif olan 95 çocuğun ise % 67,4’ü (64/95) erkek, % 32,6’sı (31/95) kız olup % 67,4’ü 24 aydan küçüktü. RSV pozitif 95 çocuğun % 87,4’ü (83/95) 5 yaşından küçüktü (Şekil 9). 2 yaş altındaki rsv enfeksiyon oranının % 40,3 ile 3-5 ve 6-15 yaş grubundakilere göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu görüldü ($\chi^2= 20,053$ $sd=2$ $p<0,001$). Ayrıca ileri analizde her iki cinsde RSV pozitifliği riskinin 2 yaş altındakilere göre 3-5 yaş grubunda % 50’ye, 6-15 yaş grubunda ise % 26’ya düştüğü görüldü (χ^2 eğim=17,849, $p<0,001$). Lamarao ve arkadaşları da Brezilya’da ASYE sebebi ile hastanede yatan üç yaş altı 1050 hastada DFA testi ile tespit ettikleri RSV antijeni pozitif olan hastaların % 62,5’inin bir yaşın altındaki infantlar olduğunu bildirmişlerdir³⁰⁵. Çalışmamızda da benzer şekilde RSV enfeksiyonu olan çocukların % 52,6’sı (50/95) bir yaşın altında idi. Zhang ve arkadaşları da Çin’de RSV RNA pozitif bulunan 439 çocuğun % 56’sının 0-6 ay arasında olduğunu ve RSV pozitif çocukların % 70,4’ünün erkek olduğunu tespit etmişlerdir²⁹³. Çalışmamızda ise RSV pozitif hastaların % 31,6’sı (30/95) 0-6 ay yaş grubunda idi ve bunların % 70’i (21/30) erkek hastalardı.

Yine Choi ve arkadaşları Kore’de RSV pozitif çocukların % 77’sinin 3 yaşından küçük olduğunu bildirmiştir²⁸⁹.

RSV ilişkili ASYE’lerin mevsimsel bir özelliği vardır. Çalışmamızdaki hastaların ASYE sebebi ile hastaneye başvurduğu en yoğun dönem sonbahar mevsimi ile kış mevsimleriydi (226/323). RSV RNA pozitif bulunan 95 hastanın % 32,6’sı (31/95) sonbaharda, % 45,3’ü (41/95) kış mevsiminde, % 12,6’sı (12/95) ilkbaharda ve % 11,5’u (11/95) yaz mevsiminde tespit edilmiştir (Şekil 10). Vaka sayısının düşük olduğu (29 ASYE olan hasta) yaz mevsimi hariç tutularak ileri istatistiksel analiz yapıldığında RSV pozitifliği % 39,7 (31/78) ile en yüksek oranda sonbaharda ve sırasıyla kış, ilkbaharda saptanmıştır ($\chi^2= 8,800$; $sd=2$; $p<0,05$). Çalışmamızda RSV’ye bağlı ASYE’lerin yıl boyunca görülebildiği, ancak 95 vakanın pik yaptığı ayların 15’er vaka ile (% 15,8; % 15,8; % 15,8) Ekim, Kasım ve Aralık, 13’er vaka ile (% 13,6; % 13,6) Ocak ve Şubat ayları olduğu görüldü (Şekil 11). Benzer şekilde Çelik ve arkadaşları Mersin’de Temmuz 2008 ve Haziran 2010 tarihleri arasında ASYE’li 2 yaşın altındaki 208 çocukta RSV antijenini en sık Ocak ayında (% 54,5) olmak üzere Şubat ve Mart aylarında da yoğun olduğunu kaydetmişlerdir³¹⁹. Zhang ve arkadaşları da Çin’de salgın aktivitesinin Kasım, Aralık ve Ocak aylarında yüksek olduğunu ve Aralık ayında pik yaptığını saptamıştır²⁹². Oysa Tatochenko ve arkadaşları Rusya’da dokuz merkez ile yürüttükleri çalışmada RSV sezonunun tüm bölgelerde Ekim ayının sonlarında başladığını, pik aktivitesinin % 62 ile Nisan ayının erken döneminde ortaya çıktığını belirlemişlerdir¹⁴⁵. Bu farklı sonuçlar RSV salgın aktivitelerinin coğrafi bölgeye göre değişiklik gösterdiği literatür bilgisi ile uyumludur.

RSV enfeksiyonunda hastalık belirtileri virusun bulaşmasından sonraki 4-6 günlerde (2-8 gün) başlar ve hastaların % 98’inde öksürük, % 75’inde ateş, burun akıntısı, % 65-78’inde hışıltılı solunum, % 73-95’inde solunum güçlüğü ve bazen hipoksi görülür¹²⁵. Çalışmamızda RSV RNA pozitif bulunan çocuklarda (95) en sık görülen semptomlar sırasıyla öksürük (% 83), burun akıntısı (% 67), ateş (% 61) ve solunum sıkıntısı (% 60) idi (Şekil 13). Zhang ve arkadaşları ise Çin’de yaptıkları çalışmada klinik semptomları bilinen 439 RSV pozitif hastada % 99,1’inde öksürük, % 85’inde siyanoz ve % 41,5’inde ateş tespit etmişlerdir²⁹². Bizim çalışmamızda ise siyanoz RSV RNA pozitif hastaların % 3’ünde saptandı.

Viral solunum yolu enfeksiyonlarında virus 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 % 39'unda (127/323) ilk beş günden, % 32'sinde (104/323) 6-10 günler arasında ve % 29'unda (92/323) on bir günden sonraydı. İlk beş günde alınan örneklerin % 54,3'ü (69/127) RSV RNA pozitifken 6-10 günde % 23,1'i (24/104), on bir günden sonra alınan örneklerin ise % 2,2'si (2/92) pozitif (Şekil 12). İlk beş günde örnek alınan hastalardaki RSV pozitifliği (% 54,3) ileri dönemlerde örnek alınan hastalardakine 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 görüldü ($\chi^2_{\text{eğim}}=71,746$, p<0,001). Örnek alım zamanı RSV RNA pozitif hastaların % 73'ünde (69/95) semptomların başlangıcından sonraki ilk 5 gün, % 25'inde (24/95) 6-10 günler arasındaydı. 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 virus saçılımı olmasını desteklemektedir (Şekil 13).

RSV küçük çocuklarda pnömoni olgularının % 5-40'ından, bronşiolit olgularının % 50-90'ından sorumludur¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Çalışmamızda RSV pozitif hastalarda en çok görülen hastalık % 57,3 oran (59/103) ile bronşiyolit olup % 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) (Tablo 8). Zhang ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada benzer şekilde RSV pozitif hastalarda sırasıyla bronşiyolit (% 38,5), pnömoni (% 36,2), bronşit (% 25,1), astım (% 7,5) olarak tespit etmişlerdir²⁹².

Toplam 323 nazofaringeal sürüntü örneğinde RSV antijen tespiti için DFA testini ve RSV RNA tespiti için nested RT-PCR yöntemini kullandığımız bu çalışmada, RSV insidansını DFA yöntemi ile % 27,6 ve nested RT-PCR ile % 29,4 tespit ettik. Örneklerin 80'i (% 25) her iki yöntem ile pozitif, 220'si (% 68) ise her iki yöntem ile negatifti. 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 (Tablo 7). Moreira ve arkadaşları 1 ay ve 11 yaş arasındaki 230 ASYE'li hastadan topladıkları nazal yıkantı sıvısında DFA ve RT-PCR yöntemleri ile RSV insidansını araştırdıkları çalışmada DFA testinin sensitivite, spesifite, PPV ve NPV'lerini sırasıyla % 83,3, % 100, % 100 ve % 97,3 olarak bizim bulgularımıza benzer yüksek oranlarda bulmuşlardır³⁰⁶. Gökalp ve arkadaşları Kayseri'de yaşları 0 ve 24 ay arasındaki 80 ASYE hastasında RSV enfeksiyon insidansını RT-PCR testi ile % 27, DFA testi ile % 32,5 oranda tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada hücre kültürü altın standart kabul edildiğinde DFA testinin sensitivitesini % 100, spesifitesini % 85,5, PPV'sini % 65,4 ve NPV'sini % 100 olarak bulmuşlardır. Bu oranları RT-PCR için sırasıyla % 100, % 94,7, % 85 ve % 100 olarak tespit etmişlerdir ki DFA testinin sensitivite ve spesifitesi RT-PCR testine yakındır³¹³.

RSV tanısında kullanılan metodların sensitivite ve spesifitesinin yüksek olması kadar işlem için gereken sürenin kısa olması da önemlidir. DFA testinde örneklerden preparatların hazırlanarak fikse edilmesi işlemi 1 saat ve direkt floresans mikroskopi için hazırlık ve mikroskobik inceleme 1,5 saat olmak üzere DFA testi ile yaklaşık olarak 2,5 saatte sonuç alınabilmektedir. Nested RT-PCR metodunda ise ekstraksiyon işlemi 130 dakika, cDNA sentezi aşaması 90 dakika, ilk amplifikasyon işlemi 190 dakika, elektroforezde görüntüleme 60 dakika, ikinci amplifikasyon işlemi 190 dakika ve elektroforezde tekrar görüntüleme 60 dakika sürmektedir. Böylece nested RT-PCR metodunda aralıksız çalışılırsa toplam 12 saatte sonuç alınabilirken DFA testi ile bu süre daha kısa olup 2,5 saattir. Bu sebeple ASYE olan infant ve çocuklarda RSV'nin hızlı tanısı için öncelikle yüksek sensitiviteye sahip DFA testi ile örneklerin analiz edilmesi ve ardından RSV-negatif hasta örneklerinin RT-PCR ile test edilmesi uygun olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bölgemizde 2011 Ekim ve 2012 Ekim tarihleri arasında ASYE sebebi ile hospitalize edilen 0-15 yaş arasındaki toplam 323 hastada RSV sıklığını DFA ve RT-PCR yöntemleri ile araştırdığımız çalışmanın sonuçları;

1. Toplam 323 hastanın % 64,4'ü erkek ve % 35,6'sı kızdı. Hastaların % 73,1'i 5 yaşından küçüktü ve bunların % 64,8'i erkek çocuktü.
2. Nested RT-PCR testi ile 323 çocuğun % 29,4'ünde (95) RSV RNA pozitif bulundu.
3. RSV enfeksiyonu olan 95 çocuğun % 66,3'ü erkek, % 33,7'si kız olup % 67,4'ü 24 aydan küçük, % 87,4'ü ise 5 yaşın altındaydı.
4. RSV enfeksiyon oranının 24 ayın altında % 40,3 ile 3-5 ve 6-15 yaş grubundakilere göre anlamlı ölçüde yüksek oluşu görüldü. Ayrıca ileri analizde RSV pozitifliği riskinin her iki cinsde 2 yaş altındakilere göre 3-5 yaş grubunda % 50'ye, 6-15 yaş grubunda ise % 26'ya düştüğü görüldü (χ^2 eğim=17,849, $p<0,001$).
5. Hastaların ASYE sebebi ile hastaneye başvurduğu en yoğun dönem sonbahar mevsimi ile kış mevsimleriydi (226/323). Mevsimlere göre RSV enfeksiyon sıklığı en yüksek % 39,7 oranla sonbaharda tespit edilmiş olup, bunu yaz döneminde % 37,9, kış döneminde % 27,7 ve ilkbaharda % 17,6 oranları izlemiştir. RSV'nin toplumdaki gerçek dağılımını gösterebilmek için toplum tabanlı çalışmalara ihtiyaç vardır.
6. RSV'ye bağlı ASYE'nin yıl boyunca görülebildiği, ancak 95 vakanın pik yaptığı ayların 15'er vaka ile (% 15,8; % 15,8; % 15,8) Ekim, Kasım ve Aralık, 13'er vaka ile (% 13,6; % 13,6) Ocak ve Şubat ayları olduğu bulundu.
7. RSV enfeksiyonu olan hastaların klinik tanıları sırası ile % 57,3'ü bronşiyolit, % 21,4'ü pnömoni, % 7,7'si bronşit ve % 7,1'i astım olup, bronşiyolit görülme sıklığı istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ($\chi^2=61,336$ df=3 $p<0,001$).

8. RSV RNA pozitif bulunan çocuklarda (95) en yaygın görülen semptomlar sırasıyla öksürük (% 83), burun akıntısı (% 67), ateş (% 61) ve solunum sıkıntısı (% 60) idi. RSV pozitif ve RSV negatif hastalar arasında morarma ve kusma dışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($\chi^2= 8,290$; $sd=5$; $p>0,05$).
9. RSV insidansı DFA yöntemi ile % 27,6, nested RT-PCR ile % 29,4 tespit edildi. Örneklerin 80'i (% 25) her iki yöntem ile pozitif, 220'si (% 68) ise her iki yöntem ile negatifti. 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.
10. DFA testinde 2,5 saatte sonuç alınabilirken nested RT-PCR metodunda bu süre 12 saat idi.

İnfant ve çocuklarda RSV ile ilişkili alt solunum yolu enfeksiyonları bütün dünyada yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkilidir. Epidemiyolojik çalışmaların sürekliliği RSV insidansının, salgınlarının olduğu ayların ve risk grubundaki etkilerinin belirlenmesini mümkün kılacaktır.

Sonuç olarak çalışmamızda RSV enfeksiyonlarının insidansının % 29,4 oran ile oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. RSV enfeksiyonlarının hızlı tanısı antiviral tedaviye erken başlanması, rasyonel antibiyotik kullanımı, hastanede yatış sürelerinin azaltılması, hasta yönetimi için maliyetin azaltılması, korunma ve kontrol önlemlerinin erken alınabilmesi ve 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 önerilir.

Çalışmamızdaki alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda RSV enfeksiyonunun insidansı ve mevsimsel dağılımı ile ilgili veriler gelecekte yapılacak RSV tarama çalışmalarına katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. **WHO.** The World Health Report 2005: Redesigning child care: Survival, growth and development. Geneva: World Health Organization **2005**;127-143.
2. **World Health Organization.** Acute Respiratory Infections in Children (update september 2009). Available at: www.who.int/fch/depts/cah/resp_infections/en
3. **TC Hükümeti-UNICEF 2001-2005 İşbirliği Programı.** Türkiye'de çocuk ve kadınların durumu raporu **2000**;103-185.
4. **Türk Toraks Derneği.** Çocukluk Çağında TKP Tanı ve Tedavi Rehberi **2009**.
5. **Black CP.** Systematic Review of the Biology and Medical Management of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Respir Care* **2003**; 48:209-231.
6. **Nair H, Nokes DJ, 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):1545-1555.
7. **Devincenzo JP.** Naturel infection of infants with respiratory syncytial virus subgroups A and B: a study of frequency disease severity, and viral load. *Pediatr Res* **2004**; 56:914-917.
8. **Mcintosh K.** Respiratory Syncytial Virus. In: Nelson Textbook of Pediatrics. Eds, Behrman RE, Kliegman RN. 18th edition. Publishers, Philadelphia, WB Saunders **2007**;1388-1390.
9. **Hatipoğlu N, Somer A, et al.** Viral etiology in hospitalized children with acute lower respiratory tract infection. *Turk J Pediatr* **2011**; 53(5):508-516.
10. **Hacımustafaoğlu M, Çelebi S, et al.** Evaluation of RSV frequency in acute bronchiolitis by different methods. *Çocuk Enf Derg* **2008**; 4:156-161.
11. **Anak S, Atay D, et al.** Respiratory syncytial virus infection outbreak among pediatric patients with oncologic diseases and/or BMT. *Pediatr Pulmonol* **2010**; 45(3):307-311.
12. **Ohuma EO, Okiro EA, 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(9):794-802.
13. **Adams J.** Primary virus pneumonitis with cytoplasmic inclusion bodies: a study of an epidemic involving thirty-two infants with nine deaths. *JAMA* **1941**; 116:925-933.
14. **Hemming VG.** Respiratory syncytial virus: a brief history. In: Weisman LE, Groothuis JR, editors. Contemporary diagnosis and management of respiratory syncytial virus. Newtown PA: *Handbooks in Health Care Co* **2000**;7-23.
15. **Morris J, Blount R, Savage R.** Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* **1956**; 92:544-549.

16. **Chanock R, Roizman B, Myers R.** Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA): I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* **1957**; 66:281-290.
17. **Chanock RM.** Association of a new type cytopathogenic myxovirus with infantile croup. *J Exp Med* **1956**; 104:555-576.
18. **Chanock R, Finberg L.** Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA): II. Epidemiologic aspects of detection in infants and young children. *Am J Hyg* **1957**; 66:291-300.
19. **Chanock RM, Kim HW, et al.** Respiratory syncytial virus I. Virus recovery and Other observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia and minor respiratory disease in children. *JAMA* **1961**; 176:647-653.
20. **Hilleman VG.** Respiratory syncytial virus. *Am Rev Respir Dis* **1963**; 88:181-197.
21. **Jeffcoate TN.** Vaccine against respiratory syncytial virus. *Lancet* **1969**; 2(7615):311.
22. **Kapikian AZ, Mitchell RH, et al.** An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol* **1969**; 80(4):405-421.
23. **Kim HW, Canchola JG, et al.** Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* **1969**; 89:422-434.
24. **Fulginiti VA, Eller JJ, et al.** Respiratory virus immunizations. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines: an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *Am J Epidemiol* **1969**; 435-448.
25. **Chin J, Magoffin RL, et al.** Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. *Am J Epidemiol* **1969**; 80(4):449-463.
26. **Glezen P, Denny FW.** Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. *N Engl J Med* **1973**; 288:498-505.
27. **Chidzey SM, Broadley KJ.** Respiratory syncytial virus infections: characteristic and treatment. *J Pharm Pharmacol* **2005**; 57(11):1371-1381.
28. **Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, Virology.** 10th Ed, London: Hudder Arnold publishers, **2005**; 783-806.
29. **Hall CB, McBride JT, et al.** Aerosolized ribavirin treatment of infants with respiratory syncytial virus infection: a randomized double-blind study. *N Engl J Med* **1983**; 308(24):1443-1447.
30. **Rodriguez WJ, Kim HW, et al.** Aerosolized ribavirin treatment of patients with respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J* **1987**; 6(2):159-163.
31. **Smith DW, Frankel LR, et al.** A controlled trial of aerosolized ribavirin in infants receiving mechanical ventilation for severe respiratory syncytial virus. *N Engl J Med* **1991**; 325(1):24-29.
32. **American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases.** Reassessments of the indications for ribavirin therapy in respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics* **1996**; 97(1):137-140.

33. **Fixler DE.** Respiratory syncytial virus infection in children with congenital heart disease: a review. *Pediatr Cardiol* **1996**; 17:163-168.
34. **Couch RB, Englund JA, Whimbey E.** Respiratory viral infections in immunocompetent and immunocompromised persons. *Am J Med* **1997**; 102:2-9.
35. **Hall CB.** Respiratory syncytial virus: a continuing culprit and conundrum. *J Pediatr* **1999**; 135:847-852.
36. **The PREVENT Study Group.** Reduction of respiratory syncytial virus hospitalization among premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia using respiratory syncytial virus immune globulin prophylaxis. *Pediatrics* **1997**; 99(1): 93-99.
37. **The Impact RSV Study Group.** Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics* **1998**; 102(3):531-537.
38. **Committee on Infectious Diseases.** From the American Academy of Pediatrics: Policy statements-modified recommendations for use of palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics* **2009**; 124(6):1694-1701.
Erişim: <http://aapredbook.aappublications.org/cgi/content/full/2009/1/3.110>.
39. **Waris M.** Pattern of respiratory syncytial virus epidemics in Finland: two year cycles with prevalence of group A and B. *J Infect Dis*, **1991**; 163:464-469.
40. **Shay DK, Holman RC, et al.** Bronchiolitis-associated mortality and estimated of respiratory syncytial virus associated deaths among children, 1975-1997. *J Infect Dis* **2001**; 183:16-22.
41. **Langley JM, LeBlanc JC, et al.** Increasing incidence of hospitalization for bronchiolitis among Canadian children, 1980-2000. *J Infect Dis* **2003**;188:1764-1767.
42. **Simoes EAF.** Respiratory syncytial virus infection. *Lancet* **1999**; 354:847-852.
43. **Prober CG, Sullender WM.** Advances in prevention of respiratory syncytial virus. *J Pediatr* **1999**; 135:546-558.
44. **Hadi H, Stolfus RJ, et al.** Respiratory infections reduce the growth response to vitamin A supplementation in a randomized controlled trial. *Intern J Epidemiol* **1999**; 28:874-881.
45. **Hoebee B, Rietveld E, et al.** Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with Interleukin-4 and Interleukin-4 receptor alpha polymorphisms. *J Infect Dis* **2003**; 187:2-11.
46. **Collins PL, Crowe J E Jr.** Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In: Fields Virology Volume 2. Eds: Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins **2007**; 5:1601-1646.
47. **Hacking D, Hull J.** Respiratory syncytial virus; viral biology and the host response. *J Infect Dis* **2002**; 45:18-24.
48. **Bishop DHL, Pringle CR.** Order Mononegavirales. In: Virus Taxonomy-Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Eds: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL. Archives of Virology Supplement, *Springer Publishers, Vienna, Austria* **1995**; 10:265-267.
49. **Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Eds: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Publisher San Diego Elsevier **2011**.

50. **Richman AV, Pedreira FA, et al.** Attempts to demonstrate hemagglutination and hemadsorption by respiratory syncytial virus. *Appl Microbiol* **1971**; 21:1099-1100.
51. **Zimmer G, Budz L, Herrler G.** Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. *J Biol Chem* **2001**; 276: 31642-31650.
52. **Bhella D, Ralph A.** Significant differences in nucleocapsid morphology within the *Paramyxoviridae*. *J Gen Virol* **2002**; 83:1831-1839.
53. **Domachowske JB, Rosenberg HF.** Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clin Microbiol Rev* **1999**; 12:298-309.
54. **Johnson PR, Spriggs MK, et al.** The G glycoprotein of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **1987**; 84:5625-5629.
55. **Sullender WM.** Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev* **2000**; 13:1-15.
56. **Peret TC, Hall CB, et al.** Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol* **1998**; 79(9):2221-2229.
57. **Venter M, Madhi SA, et al.** Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol* **2001**; 82:2117-2124.
58. **Trento A, Viegas M, et al.** Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. *J Virol* **2006**; 80:975-984.
59. **Trento A, Galiano M, et al.** Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J Gen Virol* **2003**; 84:3115-3120.
60. **Sato M, Saito R, et al.** Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J Clin Microbiol* **2005**; 43:36-40.
61. **Dapat IC, Shobugawa Y, et al.** New genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata, Japan. *J Clin Microbiol* **2010**; 48:3423-3427.
62. **Shobugawa Y, Saito R, et al.** Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. *J Clin Microbiol* **2009**; 47:2475-2482.
63. **Ogra PL.** RSV: The virus, the disease and the immun response. *Ped Res Rev* **2004**; 5(A):119-126.
64. **Peret TC, Hall CB.** Circulation patterns of group A and B strains of human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis* **2000**; 181:1891-1896.
65. **Maggon K, Barik S.** New drugs and treatment for Respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* **2004**; 14:149-168.
66. **Bont L, Kimpen JL.** Immunological mechanisms of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Intensive Care Med* **2002**; 28:616-621.
67. **Savon C, Goyenechea A, et al.** Respiratory syncytial virus group A and B genotypes and disease severity among Cuban children. *Arch Med Res* **2006**; 37:543-547.

68. **Walsh EE, McConnochie KM, Long CE, Hall CB.** Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J Infect Dis* **1997**; 175:814-820.
69. **Gilca R, De Serres G, et al.** Distribution and clinical impact of human respiratory syncytial virus genotypes in hospitalized children over 2 winter seasons. *J Infect Dis* **2006**; 193(1):54-58.
70. **Domingo E, Holland JJ.** Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: *The Evolutionary Biology of Viruses*. Eds: Morse SS, *Raven Press New York*, **1994**;161-184.
71. **McLellan JS, Yang Y, et al.** Structure of respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in the postfusion conformation reveals preservation of neutralizing epitopes. *J Virol* **2011**; 85(15):7788-7796.
72. **Collins PL, Huang YT, Wertz GW.** Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **1984**; 81:7683-7687.
73. **Hall CB.** Respiratory syncytial virus. In: *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. Eds: Feigin RD, Cherry JD, Demler GS, Kaplan SL. Saunders Company Publishers, Philadelphia **2004**; 2315-2341.
74. **Wertz GW, Krieger M, Ball LA.** Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O glycosylation. *J Virol* **1989**; 63:4767-4776.
75. **Sullender WM, Mufson MA.** Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J Virol* **1991**; 65:5425-5434.
76. **Collins PL, Mottet G.** Oligomerization and post-translational processing of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus: altered O-glycosylation in the presence of brefeldin A. *J Gen Virol* **1992**; 73:849-863.
77. **Wertz GW, Collins PL.** Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **1985**; 82: 4075-4079.
78. **Lichtenstein DL, Robertson SR.** Definition and functional analysis of the signal/anchor domain of the human respiratory syncytial virus glycoprotein G. *J Gen Virol* **1996**; 7:109-118.
79. **Teng MN, Collins PL.** The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection in vitro or in vivo. *J Virol* **2002**; 76:6164-6171.
80. **Tripp RA, Jones LP.** CXC3 chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol* **2001**; 2:732-738.
81. **Roberts SR, Lichtenstein D.** The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol* **1994**; 68:4538-4546.
82. **Hendricks DA, McIntosh K, Patterson JL.** Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol* **1988**; 62:2228-2233.
83. **Buraphacheep W, Britt WJ, Sullender WM.** Detection of antibodies to respiratory syncytial virus attachment and nucleocapsid proteins with recombinant baculovirus expressed antigens. *J Clin Microbiol* **1997**; 35:354-357.
84. **Türkoğlu S.** Respiratory syncytial virus. In: *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Eds: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Publishers Nobel Tıp Kitabevleri, **2002**; 2: 1289-1292.

85. **Johnson PR, Olmsted RA.** Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *J Virol* **1987**; 61: 3163-3166.
86. **Olmsted RA, Collins PL.** The A1 protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. *J Virol* **1989**; 63: 2019-2029.
87. **Collins PL, Mottet G.** Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **1993**; 74: 1445-1450.
88. **Anderson K, King AM.** Polylactosaminoglycan modification of the respiratory syncytial virus small hydrophobic (SH) protein: a conserved feature among human and bovine respiratory syncytial viruses. *Virology* **1992**; 191: 417-30.
89. **Mc Namara PS, Smyth RL.** The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood. *Br Med Bull* **2002**; 61: 13-28.
90. **Domachowske JB, Bonville CA.** Respiratory syncytial virus infection induces expression of the anti-apoptosis gene IEX-IL in human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis* **2000**; 181:824-830.
91. **Horikami SM, Curran J.** Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for detective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol* **1992**; 66: 4901-4908.
92. **Villanueva N, Hardy R.** The bulk of phosphorylation of human respiratory syncytial virus phosphoprotein is not essential but modulates viral RNA transcription and replication. *J Gen Virol* **2000**; 81: 129-133.
93. **Stec DS, Hill MG, Collins PL.** Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virol* **1991**; 183: 273-287.
94. **Huang YT, Collins PL, Wertz GW.** Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. *Virus Res* **1985**; 2: 157-173.
95. **Satake M, Venkatesan S.** Nucleotide sequence of gene encoding respiratory syncytial virus matrix protein. *J Virol* **1984**; 50: 92-99.
96. **Hardy RW, Harmon SB, Wertz GW.** Diverse gene junction of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J Virol* **1999**; 73: 170-176.
97. **Hardy RW, Wertz GW.** The Cys₃-His₁ motif of the respiratory syncytial virus M2-1 protein is essential for protein junction. *J Virol* **2000**; 74: 5880-5885.
98. **Evans JE, Cane PA, Pringle CR.** Expression and characterization of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. *Virus Res* **1996**; 43: 155-161.
99. **Schlender J, Bossert B.** Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J Virol* **2000**; 74: 8234-8242.
100. **Spann KM, Tran KC, et al.** Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. *J Virol* **2004**; 78: 4363-4369.

101. **Jin H, Zhou H.** Recombinant respiratory syncytial viruses with deletion in the NS1, NS2, SH and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. *Virology* **2000**; 273: 210-218.
102. **Hambling M.** Survival of the respiratory syncytial virus during storage under various conditions. *Br J Exp Pathol* **1964**; 45: 647-655.
103. **Hall CB, McCarthy CA.** Respiratory syncytial virus. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Eds: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Publishers, Elsevier Inc, **2005**; 6: 2008-2026.
104. **Krusat T, Streckert HJ.** Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. *Arch Virol* **1997**; 142: 1247-1254.
105. **Feldman SA, Hendry RM, Beeler JA.** Identification of a linear heparin binding domain for respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J Virol* **1999**; 73: 6610-6617.
106. **Karron RA, Buonagurio DA.** Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**; 94: 13961-13966.
107. **Techaarpornkul S, Collins PL, Peeples ME.** Respiratory syncytial with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology* **2002**; 294: 296-304.
108. **Bachi T.** Direct observation of the budding and fusion of an enveloped virus by video microscopy of viable cells. *J Cell Biol* **1988**; 107: 1689-1695.
109. **Piedra PA, Englund JA, Glezen WP.** Respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. Clinical Virology. Eds: Richmand DD, Whitley RJ, Hayden FG. Publishers, Washington DC ASM press, **2002**; 2: 763-791.
110. **Anlar Y.** Respiratuvar sinsityal virus (RSV) enfeksiyonlarında klinik ve laboratuar. *J Pediatr Inf* **2011**; 5(1): 134-135.
111. **Abacioğlu H.** Virus-Hücre Etkileşimleri. *Moleküler, klinik ve tanısal viroloji*. Ed: Ustaçelebi S, Abacioğlu H, Badur S. Güneş Kitabevi, Ankara, **2004**; 13-50.
112. **Arslanagic E, Matsumoto M.** Maturation of respiratory syncytial virus within Hep-2 cell cytoplasm. *Acta Virol* **1996**; 40: 209-214.
113. **Fearns R, Collins PL.** Model for polymerase Access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus. *J Virol* **1999**; 73: 388-397.
114. **Krempf C, Murphy BR, Collins PL.** Recombinant respiratory syncytial virus with the G and F genes shifted to the promoter-proximal positions. *J Virol* **2002**; 76: 11931-119342.
115. **Alberts B, Bray D, et al.** Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell. Garland Publishing New York, **1998**; 297-300.
116. **Hall CB, Douglas RG.** Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr* **1981**; 99(1): 100-103.
117. **Lugo RA, Nahata MC.** Pathogenesis and treatment of bronchiolitis. *Clin Pharm* **1993**; 12: 95-116.
118. **Harcourt J, Alvarez R, et al.** Respiratory syncytial virus G protein and G protein CX3C motif adversely affect CX3CR1+ T cell responses. *J Immunol* **2006**; 176(3):1600-1608.

119. **Amanatidou V, Sourvinos G, et al.** T280M variation of the CX3C receptor gene is associated with increased risk for severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* **2006**; 5(25): 410-414.
120. **Van Schaik SM, Welliver RC, Kimpfen JLL.** Novel pathways in the pathogenesis of respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Pulmonol* **2000**; 30(2): 131-138.
121. **Panitch HB.** Bronchiolitis in infants. *Curr Opin Pediatr* **2001**; 13: 256-260.
122. **Visscher DW, Myers JL.** Bronchiolitis. *Proc Am Thorac Soc* **2006**; 3(1): 41-47.
123. **Groothuis JR, Hoopes JM, Hemming VG.** Prevention of serious respiratory syncytial virus related- illness. I. Disease pathogenesis and early attempts at prevention. *Adv Ther* **2011**; 28(2): 91-109.
124. **Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, et al.** The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* **2009**; 360(6): 588-598.
125. **Dawson-Caswell M, Muncie HL.** Respiratory syncytial virus infection in children. *Am Fam Phys* **2011**; 83(2): 141-146.
126. **Van Drunen Littel-van den Hurk S, Watkiss ER.** Pathogenesis of respiratory syncytial virus. *Curr Opin Virol* **2012**; 2(3):300-305.
127. **Shepherd VL.** Distinct roles for lung collectins in pulmonary host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2002**; 26:257-260.
128. **Ghildyal R, Hartley C, et al.** Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion activity. *J Infect Dis* **1999**; 180:2009-2013.
129. **McCormack FX, Whitsett JA.** The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest* **2002**; 109:707-712.
130. **Saito T, Deskin RW, et al.** Respiratory syncytial virus induces selective production of the chemokine RANTES by upper airway epithelial cells. *J Infect Dis* **1997**; 175:497-504.
131. **Noah TL, Ivins SS, et al.** Chemokines and inflammation in the nasal passages of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Immunol* **2002**; 104:86-95.
132. **Roel MFE, Bloxham DM, et al.** Changes in helper lymphocyte chemokine receptor expression and elevation of IP-10 during acute respiratory syncytial virus infection in infants. *Pediatr Allerg Immunol* **2011**; 22:229-234.
133. **Vieira RA, Diniz EMA, Ceccon MEJR.** Correlation between inflammatory mediators in the nasopharyngeal secretion and in the serum of children with lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus and disease severity. *J Bras Pneumol* **2010**; 36(1):59-66.
134. **Villenave R, O'donoghue D, et al.** Differential cytopathogenesis of respiratory syncytial virus prototypic and clinical isolates in primary pediatric bronchial epithelial cells. *Virology* **2011**; 1-9.
135. **Tsutsumi H, Matsuda K, et al.** Respiratory syncytial virus-induced cytokine production by neonatal macrophages. *Clin Exp Immunol*, **1996**;106:442-446.
136. **Underhill DM, Ozinsky A.** Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* **2002**; 14: 103-110.

137. Sabroe I, Lloyd CM, et al. Chemokines, innate and adaptive immunity, and respiratory disease. *Eur Respir* **2002**; 19: 350-355.
138. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2001**; 2: 675-680.
139. Kurt-Jones EA, Popova L, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* **2000**; 1: 398-401.
140. Crowe JE. Influence of maternal antibodies on neonatal immunization against respiratory viruses. *Clin Infect Dis* **2001**; 33: 1720-1727.
141. McIntosh K, Masters HB, et al. The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. *J Infect Dis* **1978**; 138:24-32.
142. Wagner DK, Muelenaer P, et al. Serum immunoglobulin G antibody subclass response to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins after first, second, and third infections. *J Clin Microbiol* **1989**; 27: 589-592.
143. Wright PF, Gruber WC, et al. Illness severity, viral shedding, and antibody responses in infants hospitalized with bronchiolitis by respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* **2002**; 185:1011-1018.
144. Tatochenko V, Uchaikin V, et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children ≤ 2 years of age hospitalized with lower respiratory tract infections in the Russian Federation: a prospective, multicenter study. *Clin Epidemiol* **2010**; 2: 221-227.
145. Hall CB. The burgeoning of respiratory syncytial virus among children. *Infect Disord Drug Targets* **2012**; 12(2):92-97.
146. Ralston S, Hill V. Incidence of apnea in infants hospitalized with respiratory syncytial virus bronchiolitis: a systematic review. *J Pediatr* **2009**; 155(5): 728-733.
147. Zorc JJ, Hall CB. Bronchiolitis: recent evidence on diagnosis and management. *Pediatrics* **2010**; 125(2): 342-349.
148. Everard M. Diagnosis, admission, discharge. *Pediatr Respir Rev* **2009**; 10(1):18-20.
149. Paes B, Cole M, Latchman A, Pinelli J. Predictive value of the respiratory syncytial virus risk-scoring tool in the term infant in Canada. *Curr Med Res Opin* **2009**; 25(9):2191-2196.
150. Walsh P, Rothenberg SJ, et al. A validated clinical model to predict the need for admission and length of stay in children with acute bronchiolitis. *Eur J Emerg Med* **2004**; 11(5): 265-272.
151. Mansbach JM, Clark S, Christopher NC, et al. Prospective multicenter study of bronchiolitis: predicting safe discharges from the emergency department. *Pediatric* **2008**; 121(4): 680-688.
152. Thorburn K, Harigopal S, et al. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax* **2006**; 61: 611-615.
153. Resch B, Gusenleitner W, Mueller MD. Risk of concurrent bacterial infection in preterm infants hospitalized due to respiratory syncytial virus infection. *Acta Pediatr* **2007**; 96: 495-498.
154. Duttweiler L, Nadal D, Frey B. Pulmonary and systemic bacterial co-infections in severe RSV bronchiolitis. *Arch Dis Child* **2004**; 89: 1155-1157.

155. **Randolph AG, Reder L, Englund JA.** Risk of bacterial infection in previously healthy respiratory syncytial virus-infected young children admitted to the intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J* **2004**; 23: 990-994.
156. **Kneyber MC, Blusse van Oud-Alblas H, et al.** Concurrent bacterial infection and prolonged mechanical ventilation in infants with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *Intensive Care Med* **2005**; 31:680-685.
157. **Virkki R, Juven T, Rikalainen H, et al.** Differentiation of bacterial and viral pneumonia in children. *Thorax* **2002**; 57: 438-441.
158. **Haruka Hishiki, Naruhiko Ishiwada, et al.** Incidence of bacterial coinfection with respiratory syncytial virus bronchopulmonary infection in pediatric inpatients. *J Infect Chemother* **2011**; 17:87-90.
159. **Luginbuhl LM, Newman TB, Pantell RH, et al.** Office-based treatment and outcomes for febrile infants with clinically diagnosed bronchiolitis. *Pediatrics* **2008**; 122(5): 947-954.
160. **Wagner T.** Bronchiolitis. *Pediatr Rev* **2009**; 30(10): 386-395.
161. **Levine DA, Platt SL, Dayan PS, et al.;** Multicenter RSV-SBI Study Group of the Pediatric Emergency Medicine Collaborative Research Committee of the American Academy of Pediatrics. Risk of serious bacterial infection in young febrile infants with respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics* **2004**; 113(6): 1728-1734.
162. **Aslan IR, Baca EA, Charlton RW, Rosenthal SM.** Respiratory syncytial virus infection as a precipitant of thyroid storm in a previously undiagnosed case of Graves' disease in a prepubertal girl. *Int J Pediatr Endocr* **2011**; ID138903.
163. **Mahony JB.** Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* **2008**; 21(4): 716-747.
164. **van Woensel JB, Kimpen JL, et al.** Long-term effects of prednisolone in the acute phase of bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *Pediatr Pulmonol* **2000**; 30(2): 92-96.
165. **Gern JE.** Viral respiratory infection and the link to asthma. *Pediatr Infect Dis J* **2008**; 27(10): 97-103.
166. **American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis.** Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics* **2006**; 118(4):1774-1793.
167. **Hall CB.** Contemporary diagnosis and management of respiratory syncytial virus. In: Pathology and pathogenicity. Weisman LE, Groothuis JR, editors. Newtown PA: Handbooks in Health Care Co **2000**; 72-93.
168. **Garzon LS, Wiles L.** Management of respiratory syncytial virus with lower respiratory tract infection in infants and children. *AACN Clin Issues* **2002**; 13(3):421-430.
169. **Wright AL, Taussig LM, et al.** The Tucson Children's Respiratory Study. II. Lower respiratory tract illness in the first year of life. *Am J Epidemiol* **1989**; 129(6): 1232-1246.
170. **Leung AKC, Klinier JD, Davies HD.** Respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Nat Med Assoc* **2005**; 97(12): 1708-1713.
171. **Heikkinen T, Marttila J, et al.** Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 4337-4339.

172. **Leland DS, Ginocchio CC.** Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev* **2007**; 20(1): 49-78.
173. **Popow-Kraupp T, Aberle JH.** Diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *Open Microbiol J* **2011**; 5(S2-M2): 128-134.
174. **Ray CG, Minnich LL.** Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses. *J Clin Microbiol* **1987**; 25: 355-357.
175. **Hijazi Z, Pacsa A et al.** Laboratory diagnosis of acute lower respiratory tract viral infections in children. *J Trop Pediatr* **1996**; 42: 276-280.
176. **Ohm-Smith MJ, Nassos PS, Haller BL.** Evaluation of the Binax NOW, BD Directigen, and BD Directigen EZ assays for detection of respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 2996-2999.
177. **Landry ML, Ferguson D.** SimulFluor respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimens by immunofluorescence staining. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 708-711.
178. **Fong CK, Lee MK, Grith BP.** Evaluation of R-Mix FreshCells in shell vials for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 4660-4662.
179. **Dunn JJ, Woolstenhulme RD, et al.** Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-Mix Fresh Cells. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 79-82.
180. **Ahluwalia G, Embree J, et al.** Comparison of nasopharyngeal aspirate and nasopharyngeal swab specimens for respiratory syncytial virus diagnosis by cell culture, indirect immunofluorescence assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **1987**; 25: 763-767.
181. **Brandenburg AH, Groen J, et al.** Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. *J Med Virol* **1997**; 52:97-104.
182. **Murphy BR, Alling DW, et al.** Effect of age and preexisting antibody on serum antibody response of infants and children to the F and G glycoproteins during respiratory syncytial virus infection. *J Clin Microbiol* **1986**; 24:894-898.
183. **Falsey AR, Formica MA, Walsh EE.** Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. *J Clin Microbiol* **2002**; 40:817-20.
184. **Kehl SC, Kumar S.** Utilization of nucleic acid amplification assays for the detection of respiratory viruses. *Clin Lab Med* **2009**; 29: 661-71.
185. **Myint S.** Recent advances in the rapid diagnosis of respiratory tract infection. *Br Med Bull* **2002**; 61:97-114.
186. **Jokela P, Piiparinen H, et al.** Detection of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by duplex real-time RT-PCR assay in comparison with direct fluorescent assay. *Clin Microbiol Infect* **2010**; 16(10):1568-1573.
187. **Kuypers J, Wright N, et al.** Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for respiratory syncytial virus infections in children. *J Clin Microbiol* **2006**; 44(7): 2382-2388.

188. Law BJ, Carbonell-Estrany X, Simoes EA. An update on respiratory syncytial virus epidemiology: a developed country perspective. *Respir Med* **2002**; 96B:1-7.
189. Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. Risk factors for respiratory syncytial virus associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol* **1991**; 133(11):1135-1151.
190. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA* **1999**; 282: 1440-1446.
191. Leowski J. Mortality from acute respiratory infections in children under 5 years of age: global estimates. *World Health Stat Q* **1986**; 39: 138-144.
192. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* **2003**; 289(2): 179-186.
193. Park HW, Lee BS, et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in infants born at less than thirty-five weeks of gestational age. *Pediatr Infect Dis J* **2012**; 31(8):e99-e104.
194. Resch B, Kurath S, et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in preterm infants. *Open Microbiol J* **2011**; 5:135-143.
195. Wahab AA, Dawod ST, Raman HM. Clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection in hospitalized healthy infants and young children in Qatar. *J Trop Pediatr* **2001**; 47: 363-366.
196. Calegari T, Queiroz DA, Yokosawa J, et al. Clinical epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. *Braz J Infect Dis* **2005**; 9: 156-161.
197. Parrot RH, Kim HW. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C.II. Infection and disease with respect age, immunologic status, race and sex. *Am J Epidemiol* **1973**; 98:289-300.
198. Glezen WP, Taber LH. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child* **1986**; 140: 543-546.
199. Heilman CA. Respiratory syncytial and parainfluenza viruses. *J Infect Dis* **1990**; 161:402-406.
200. Medici MC, Arcangeletti MC, et al. Incidence of respiratory syncytial virus infection in infants and young children referred to the emergency departments for lower respiratory tract diseases in Italy. *Acta Biomed* **2004**; 75: 26-33.
201. Mlinaric-Galinovic G, Varda-Brkic D. Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2000**; 37: 237-246.
202. Collins CL, Pollard AJ. Respiratory Syncytial Virus Infections in children and adults. *Journal of Infection* **2002**;10-17.
203. Goldmann DA. Epidemiology and prevention of pediatric viral respiratory infections in health-care institutions. *Emerg Infect Dis* **2001**; 7: 249-253.
204. Checchia P. Identification and management of severe respiratory syncytial virus. *Am J Health Syst Pharm.* **2008**; 65(8): 7-12.
205. Thorburn K. Pre-existing disease is associated with a significantly higher risk of death in severe respiratory syncytial virus infection. *Arch Dis Child* **2009**; 94: 99-103.

206. **Martin ET, Kuypers J, et al.** Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children. *Influenza Other Respi Viruses* **2012**; 6(1):71-77.
207. **Hall CB.** Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the 'Cold War' has not ended. *Clin Infect Dis* **2000**; 31: 590-596.
208. **Lima HN, Botosso VF, et al.** Molecular epidemiology of the SH (small hydrophobic) gene of human respiratory syncytial virus (HRSV), over 2 consecutive years. *Virus Res* **2012**; 163(1):82-86.
209. **Madhi SA, Ismail K, O'Reilly C, Cutland C.** Importance of nosocomial respiratory syncytial virus infections in an African setting. *Trop Med Int Health* **2004**; 9: 491-498.
210. **Handforth J, Friedland JS, Sharland M.** Basic epidemiology and immunopathology of RSV in children. *Pediatr Respir Rev* **2000**; 1: 210-214.
211. **Donaldson GC.** Climate change and the end of the respiratory syncytial virus season. *Clin Infect Dis* **2006**; 42: 677-679.
212. **Di Carlo P, Romano A, Salsa L, et al.** Epidemiological assessment of Respiratory Syncytial Virus infection in hospitalized infants, during season 2005-2006 in Palermo, Italy. *Ital J Pediatr* **2009**; 35: 11.
213. **Nair H, Verma VR, et al.** An evaluation of the emerging interventions against Respiratory Syncytial Virus (RSV)-associated acute lower respiratory infections in children. *BMC Public Health* **2011**; 11(3):30.
214. **Mullins JA, LaMonte AC, Bresee JS, et al.** Substantial variability in community RSV season timing. *Pediatr Infect Dis J* **2003**; 22: 857-862.
215. **American Academy of Pediatrics.** Respiratory syncytial virus. In: 2009 report of the Committee on Infectious Disease. Eds: Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS. Publishers, Elk Grove Village. *Am Acad Pediatr* **2009**; 28: 560-569.
216. **CDC.** Respiratory syncytial virus activity- United States, July 2008-December 2009. *MMWR* **2010**; 59: 230-233.
217. **CDC.** Respiratory syncytial virus activity- United States, July 2007-June 2011. *MMWR* **2011**; 60: 1203-1206.
218. **Bradley JP, Bacharier J, Bonfiglio J, Schechtman KB et al.** Severity of respiratory syncytial virus bronchiolitis is affected by cigarette smoke exposure and atopy. *Pediatrics* **2005**; 115: e7-e14.
219. **Choudhuri JA, Ogden LG, et al.** Effect of altitude on hospitalizations for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics* **2006**; 117: 349-356.
220. **Pankovics P, Szabo H, Szekely G, et al.** Detection and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus type A and B strains in childhood respiratory infections in Hungary. *CEMED* **2009**; 3(1): 87-97.
221. **Welliver RC.** Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr* **2003**; 143(5): 112-117.
222. **Bueno IA, Riccetto AG, et al.** Respiratory syncytial virus, infants and intensive therapy. *Braz J Infect Dis* **2012**; 16(1):86-89.

223. **Steiner RW.** Treating acute bronchiolitis associated with RSV. *Am Fam Physician* **2004**; 69(2): 325-330.
224. **Perrotta C, Ortiz Z, Roque M.** Chest physiotherapy for acute bronchiolitis in Pediatric patients between 0 and 24 months old. *Cochrane Database Syst Rev* **2007**; (1):CD004873.
225. **Fitzgerald DA, Kilham HA.** Bronchiolitis: assessment and evidencebased management. *Med J Aust* **2004**; 180(8): 399-404.
226. **Krilov LR.** Respiratory syncytial virus disease: update on treatment and prevention. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2011**; 9(1): 27-32.
227. **Patel H, Gouin S, Platt RW.** Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral albuterol in infants with mild-to-moderate acute viral bronchiolitis. *J Pediatr* **2003**; 142: 509-514.
228. **Gadomski AM, Bhasale AL.** Bronchodilators for bronchiolitis. *Cochrane Database Syst Rev* **2009**; 3: CD001266.
229. **Wainwright C, Altamirano L, Cheney M et al.** A multicenter, randomized, double-blind, controlled trial of nebulized epinephrine in infants with acute bronchiolitis. *N Engl J Med* **2003**; 349: 27-35.
230. **Hartling L, Wiebe N, Russell K, Patel H, Klassen TP.** Epinephrine for bronchiolitis. *Cochrane Database Syst Rev* **2004**; (1): CD003123.
231. **Grewal S, Ali S, McConnell DW, et al.** A randomized trial of nebulized 3 % hypertonic saline with epinephrine in the treatment of acute bronchiolitis in the emergency department. *Arch Pediatr Adolesc Med* **2009**; 163(11): 1007-1012.
232. **Patel H, Platt R, Lozano JM, Wang EE.** Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children. *Cochrane Database Syst Rev* **2004**; (3): CD004878.
233. **Corneli HM, Zorc JJ, Majahan P et al.** A multicenter, randomized, controlled trial of dexamethasone for bronchiolitis. *N Engl J Med* **2007**; 357: 331-339.
234. **Amirav I, Luder AS, Kruger N et al.** A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of montelukast for acute bronchiolitis. *Pediatrics* **2008**; 122: 1249-1255.
235. **Spurling GK, Fonseka K, Doust J, Del Mar C.** Antibiotics for bronchiolitis in children. *Cochrane Database Syst Rev* **2007**; (1): CD005189.
236. **Duffet M, Choong K, Randolph A, et al.** Surfactant therapy for acute respiratory failure in children: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care* **2007**; 11(3): 1-10.
237. **Salman N.** RSV enfeksiyonları; tedavi ve korunma. *J Pediatr Inf* **2011**; 5(1): 136-137.
238. **Ventre K, Randolph A.** Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the LRTI in infants and young children. *Cochrane Database Syst Rev* **2004**; 4: CD000181.
239. <http://www.fda.gov/oc/foia/2012/ADMA-BIOLOGICS-INC-8-K.A/>
240. **Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T.** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **2001**; 411(6836): 494-498.
241. **De Fougères A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J.** Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2007**; 6(6): 443-453.

242. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* **2005**; 11(1): 50-55.
243. Zhang W, Yang H, Kong X, et al. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med* **2005**; 11(1): 56-62.
244. Alvarez R, Elbashir S, Borland T, et al. RNAi-mediated silencing of the respiratory syncytial virus nucleocapsid defines a potent anti-viral strategy. *Antimicrob Agents Chem* **2009**; 53(9): 3952-3962.
245. Bonfanti JF, Roymans D. Prospects for the development of fusion inhibitors to treat human respiratory syncytial virus infection. *Curr Opin Drug Discov Devel* **2009**; 12(4): 479-487.
246. Douglas JL. In search of a small-molecule inhibitor for respiratory syncytial virus. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2004**; 2(4): 625-639.
247. Sudo K, Miyazaki Y, Kojima N, et al. YM-53403, a unique anti-respiratory syncytial virus agent with a novel mechanism of action. *Antiviral Res* **2005**; 65(2): 125-131.
248. Chapman J, Abbott E, Alber DG, et al. RSV604, a novel inhibitor of respiratory syncytial virus replication. *Antimicrob Agents Chem* **2007**; 51(9): 3346-3353.
249. Morikawa K, Nonaka M, Torii I, Morikawa S. Modulatory effect of fosfomycin on acute inflammation in the rat air pouch model. *Int J Antimicrob Agents* **2003**; 21(4): 334-339.
250. Casola A, Garofalo RP, Haeberle H, et al. Multiple cis regulatory elements control RANTES promoter activity in alveolar epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *J Virol* **2001**; 75(14): 6428-6439.
251. Okabayashi T, Yokota S, Yoto Y, Tsutsumi H, Fujii N. Fosfomycin suppresses chemokine induction in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Clin Vaccine Immunol*, **2009**; 16(6): 859-865.
252. Davis IC, Lazarowski ER, Chen FP, et al. Post-infection A77-1726 blocks pathophysiologic sequelae of respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Mol Biol* **2007**; 37(4): 379-386.
253. Quinlan KP, Hayani KC. Vitamin A and respiratory syncytial virus infection. Serum levels and supplementation trial. *Arch Pediatr Adolesc Med* **1996**; 150:882.
254. Bresee JS, Fischer M, Dowell SF, et al. Vitamin A therapy for children with respiratory syncytial virus infection: a multicenter trial in the United States. *Pediatr Infect Dis J* **1997**; 16: 84-85.
255. Jefferson T, Del Mar C, Dooley L, et al. Physical interventions to interrupt or reduce the spread of respiratory viruses. *Cochrane Database Syst Rev* **2010**; (1): CD006207.
256. Nokes JD, Cane PA. New strategies for control of respiratory syncytial virus infection. *Curr Opin Infect Dis* **2008**; 21(6): 639-643.
257. Siber GR, Leombruno D, Leszczynski J, et al. Comparison of antibody concentrations and protective activity of respiratory syncytial virus immune globulin and conventional immune globulin. *J Infect Dis* **1994**; 169(6): 1368-1373.
258. Buchacher A, Iberer G. Purification of intravenous immunoglobulin G from human plasma- aspects of yield and virus safety. *Biotechnol J* **2006**; 1(2): 148-163.

259. **Morris SK, Dzolganovski B, Beyene J, Sung L.** A meta-analysis of the effect of antibody therapy for the prevention of severe respiratory syncytial virus infection. *BMC Infect Dis* **2009**; 9:106.
260. **Feltes TF, Cabalka AK, Meissner HC et al.** Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodynamically significant congenital heart disease. *J Pediatr* **2003**; 143: 532-540.
261. **Meissner HC, Rennels MB, Pickering LK, Hall CB.** Risk of severe respiratory syncytial virus disease, identification of high risk infants and recommendations for prophylaxis with palivizumab. *The Pediatr Infect Dis J* **2004**; 23(3): 284-285.
262. **Munksgaard B.** Community-acquired respiratory viruses. *Am J Transplant* **2004**; 4(10): 105-109.
263. **Wu H, Pfarr DS, Johnson S, et al.** Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. *J Mol Biol* **2007**; 368(3): 652-665.
264. **Lagos R, DeViencenzo JP, et al.** Safety and antiviral activity of motavizumab, a respiratory syncytial virus (RSV)-specific humanized monoclonal antibody when administered to RSV infected children. *Pediatr Infect Dis J* **2009**; 28: 835-837.
265. **Carbonell-Estrany X, Simoes EAF, et al.** Motavizumab for prophylaxis of respiratory syncytial virus in high-risk children: a noninferiority trial. *Am Acad Pediatr* **2010**; 125(1): e35-e51.
266. **Haynes LM, Caidi H, Radu GU, et al.** Therapeutic monoclonal antibody treatment targeting respiratory syncytial virus (RSV) G protein mediates viral clearance and reduces the pathogenesis of RSV infection in BALB/c mice. *J Infect Dis* **2009**; 200(3): 439-447.
267. **Potter J.** Guidelines for the management of respiratory syncytial virus (RSV) approved by Infection Control Committee. August 2012.
Erişim:
<http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/RespiratorySyncytialVirus/>
268. **Karron RA, Steinhoff MC, Subbarao EK, et al.** Safety and immunogenicity of a cold-adapted influenza A (H1N1) reassortant virus vaccine administered to infants less than six months of age. *Pediatr Infect Dis J* **1995**; 14(1): 10-16.
269. **van Drunen Littel-van den Hurk S, Mapletoft JW, et al.** Immunopathology of RSV infection: prospects for developing vaccines without this complication. *Rev Med Virol* **2007**; 17(1):5-34.
270. **Crowe JE Jr, Bui PT, Siber GR, Elkins WR, Chanock RM, Murphy BR.** Cold-passaged, temperature-sensitive mutants of human respiratory syncytial virus (RSV) are highly attenuated, immunogenic, and protective in seronegative chimpanzees, even when RSV antibodies are infused shortly before immunization. *Vaccine* **1995**; 13(9): 847-855.
271. **Collins PL, Murphy BR.** New generation live vaccines against human respiratory syncytial virus designed by reverse genetics. *Proc Am Thorac Soc* **2005**; 2(2): 166-173.
272. **Schickli JH, Dubovsky F, Tang RS.** Challenges in developing a pediatric RSV vaccine. *Hum Vaccin* **2009**; 5(9): 582-591.

273. **Karron RA, Wright PF, Crowe JE Jr, et al.** Evaluation of two live, cold-passaged, temperature-sensitive respiratory syncytial virus vaccines in chimpanzees and in human adults, infants, and children. *J Infect Dis* **1997**; 176(6): 1428-1436.
274. **Wright PF, Karron RA, et al.** Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. *J Infect Dis* **2000**; 182(5): 1331-1342.
275. **Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR.** Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Nat Acad Sci USA*, **1995**; 92(25): 11563-11567.
276. **Jin H, Cheng X, Traina-Dorge VL, et al.** Evaluation of recombinant respiratory syncytial virus gene deletion mutants in African green monkeys for their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine* **2003**; 21(2526): 3647-3652.
277. **Ramaswamy M, Shi L, Varga SM, et al.** Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction. *Virol* **2006**; 344(2): 328-339.
278. **Martinez-Sobrido L, Gitiban N, et al.** Protection against respiratory syncytial virus by a recombinant Newcastle disease virus vector. *J Virol* **2006**; 80(3): 1130-1139.
279. **Tang RS, Spaete RR, et al.** Development of a PIV-vectored RSV vaccine: preclinical evaluation of safety, toxicity, and enhanced disease and initial clinical testing in healthy adults. *Vaccine* **2008**; 26(50): 6373-6382.
280. **Simoes EA, Tan DH, Ohlsson A, Sales V, Wang EE.** Respiratory syncytial virus vaccine: a systematic overview with emphasis on respiratory syncytial virus subunit vaccines. *Vaccine* **2001**; 20(56): 954-960.
281. **Falsey AR, Walsh EE, et al.** Comparison of the safety and immunogenicity of 2 respiratory syncytial virus (rsv) vaccines-nonadjuvanted vaccine or vaccine adjuvanted with alum given concomitantly with influenza vaccine to high-risk elderly individuals. *J Infect Dis* **2008**; 198(9): 1317-1326.
282. **Power UF, Nguyen TN, et al.** Safety and immunogenicity of a novel recombinant subunit respiratory syncytial virus vaccine (BBG2Na) in healthy young adults. *J Infect Dis* **2001**; 184(11): 1456-1460.
283. <http://arcdia.com/eng/maripoc/samplin/>
284. **Paton AW, Paton JC, et al.** Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol* **1992**; 30(4): 901-904.
285. **Rohwedder A, et al.** Detection of respiratory syncytial virus RNA in blood of neonates by polymerase chain reaction. *J Med Virol* **1998**; 54:320-327.
286. **Englund JA, Piedra PA, Whimbey E.** Prevention and treatment of respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses in immunocompromised patients. *Am J Med* **1997**; 102(3A):61-70.
287. **Zambon M.** Active and passive immunisation against respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* **1999**; 9:227-236.
288. **Freymuth F, Vabret A, et al.** Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnosis of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol* **2006**; 78:1498-1504.

289. Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. *Clin Infect Dis* **2006**; 43:585-592.
290. Mentel R, et al. Molecular and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections in hospitalized children. *Med Microbiol Immunol* **2005**; 194:67-71.
291. Papenburg J, Carbonneau J, Hamelin ME, et al. Molecular evolution of respiratory syncytial virus fusion gene, Canada, 2006-2010. *Emerg Infect Dis* **2012**; 18(1):120-124.
292. Zhang Z, Du L, Chen X, et al. Genetic variability of respiratory syncytial viruses (RSV) prevalent in southwestern China from 2006 to 2009: Emergence of subgroup B and A RSV as dominant strains. *J Clin Microbiol* **2010**; 48(4):1201-1207.
293. Zhang C, Li Z, Zhang G, et al. Respiratory viruses in hospitalized children with acute lower respiratory tract infections in Harbin, China. *J Infect Dis* **2009**; 62:458-460.
294. Gregson D, Lloyd T, et al. Comparison of the RSV Respi-Strip with direct fluorescent-antigen detection for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in pediatric patients. *J Clin Microbiol* **2005**; 43(11): 5782-5783.
295. Ginocchio CC, Swierkosz E, McAdam AJ, et al. Multicenter study of clinical performance of the 3M rapid detection RSV test. *J Clin Microbiol* **2010**; 48(7):2337-2343.
296. Abels S, Nadal D, Stroehle A, Bossart W. Reliable detection of respiratory syncytial virus infection in children for adequate hospital infection control management. *J Clin Microbiol* **2001**; 39(9):3135-3139.
297. Medici MC, Arcangeletti MC, et al. Four year incidence of respiratory syncytial virus infection in infants and young children referred to emergency departments for lower respiratory tract diseases in Italy: the 'Osservatorio VRS' Study (2000-2004). *New Microbiol* **2006**; 29:35-43.
298. Reiche J, Schweiger B. Genetic variability of group A human respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998-2007. *J Clin Microbiol* **2009**; 47(6):1800-1810.
299. Bellau-Pujol S, Vabret A, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory viruses. *J Virol Meths* **2005**; 126:53-63.
300. Boyce TG, Mellen BG, et al. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in Medicaid. *J Pediatr* **2000**; 137:865-870.
301. Singleton RJ, Bruden D, Bulkow L. Respiratory syncytial virus season and hospitalizations in Alaskan Yukon-Kuskokwim delta. *Pediatr Infect Dis J* **2007**;26:1-6.
302. Erdman DD, Weinberg GA, et al. GeneScan reverse transcription-PCR assay for the detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. *J Clin Microbiol* **2003**; 41(9):4298-4303.
303. Bruce N, Weber M, Arana B. Pneumonia case-finding in the RESPIRE Guatemala indoor air pollution trial: standardizing methods for resource-poor settings. *Bull World Health Organ* **2007**; 85:535-544.
304. Vaz-de-Lima LRA, Souza MCO, et al. Performance of indirect immunofluorescence assay, immunochromatography assay and reverse transcription-polymerase chain reaction for detecting human respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirate samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* **2008**; 103(5):463-467.

305. **Lamarao LM et al.** Prevalence and clinical features of respiratory syncytial virus in children hospitalized for community acquired pneumonia in northern Brasil. *BMC Infect Dis* **2012**; 12:119-126.
306. **Moreira LP et al.** A survey strategy for human respiratory syncytial virus detection among haematopoietic stem cell transplant patients: epidemiological and methodological analysis. *Mem Inst Osw Cruz, Rio de Janeiro* **2012**; 107(8):1-4.
307. **Whiley DM, Syrmis MW, et al.** Detection of human respiratory syncytial virus in respiratory samples by LightCycler reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* **2002**; 40(12):4418-4422.
308. **Robertson SE, Roca A, et al.** Respiratory syncytial virus infection: denominator-based studies in Indonesia, Mozambique, Nigeria and South Africa. *Bull World Health Organ* **2004**; 82:891-970.
309. **Niekerk SV, Venter M.** Replacement of previously circulating respiratory syncytial virus (RSV) subtype B strains with the BA genotype in South Africa. *J Virol* **2011**; 85(17):8789-8797.
310. **Güney C, Kubar A, et al.** An outbreak respiratory infection due to respiratory syncytial virus subgroup B in Ankara, Turkey. *Jpn J Infect Dis* **2004**; 57:178-180.
311. **Yolbakan S, Altaş AB ve ark.** Solunum yolu infeksiyonu nedeniyle hastanede yatan infantlarda viral koenfeksiyon görülme sıklığı. 7.Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi, Program ve Bildiri Özeti Kitabı **2012**; p:097.
312. **Bulut Y, Sen Y, et al.** Use of nasal samples and genom amplification methods for detection of respiratory viruses in infants with acute lower respiratory tract infection. *Turk J Med Sci* **2007**; 37(1):21-25.
313. **Gökcalp C, Gökahmetoğlu S ve ark.** Investigation of respiratory syncytial virus by three different methods in children with lower respiratory tract infections. *Mikrobiol Bul* **2009**; 43:433-438.
314. **Akkaya O, Feyzioğlu B ve ark.** Viral pnömoni tanısı alan hastalarda etkenlerin multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırılması. 7.Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi, Program ve Bildiri Özeti Kitabı **2012**; p:096.
315. **Ünüvar E, Yıldız I, et al.** Viral etiology and symptoms of acute upper respiratory tract infections in children. *Turk J Med Sci* **2009**; 39(1):29-35.
316. **Beşer ÖF, Davutoğlu G ve ark.** Solunum yolu infeksiyonu olan iki yaş altı çocuklarda respiratory syncytial virus infeksiyonlarının sıklığı ve klinik özellikleri. *JOPP Derg* **2010**; 2(2):84-88.
317. **Kanra G, Tezcan S, Yılmaz G, Turkish National Respiratory Syncytial Virus (RSV) Team.** Respiratory syncytial virus epidemiology in Turkey. *Turk J Pediatr* **2005**; 47:303-308.
318. **Hatipoğlu S, Arıca S ve ark.** Alt solunum yolu infeksiyonu tanısıyla hastanemize yatırılan olgularda RSV infeksiyonu sıklığı ve klinik özellikleri. *Düzce Tıp Fak Derg* **2009**; 11(1):38-44.
319. **Çelik Y, Atıcı A ve ark.** Alt solunum yolu infeksiyonu tanısı alan çocuklarda RSV sıklığının ve klinik özelliklerinin araştırılması. *Çocuk Dergisi* **2011**; 11(2):54-58.
320. **Kılınç AA, Aydın C ve ark.** RSV'nin konjenital kalp hastalıkları üzerindeki etkileri. *J Pediatr Inf* **2011**; 1:267-293.
321. **Aksakoğlu Y.** *Sağlıkta Araştırma ve Çözümleme*. 1. Baskı, İzmir: DEÜ Rektörlük Basımevi, **2006**; 243.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: Hatice Hale GÜMÜŞ
Doğum Tarihi ve Yeri	: 8 Şubat 1978, Kozan, Adana
Medeni Durumu	: Bekar
Adres	: Sümer Mah. 69077 Sok. 5/03 Seyhan, Adana
Telefon	: 0 505 457 12 72
Faks	: (-)
E-posta	: hhaleag01@hotmail.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi	: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi (2004)
Varsa Mezuniyet Derecesi	: (-)
Görev Yerleri	: Kahramanmaraş Pazarcık Devlet Hastanesi (2004-2007) Adana İmamoğlu Toplum Sağlığı Merkezi (2008) Ç.Ü.T.F. Tıbbi Mikrobiyoloji (2009-2013)
Dernek Üyelikleri	: Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği
Alınan Burslar	: Yok
Yabancı Dil(ler)	: İngilizce
Diğer Hususlar	: Anadolu Üniversitesi AÖF Sağlık Kurumları İşletmeciliği (2009-2011)