

# Üst solunum yolu infeksiyonlu çocuklarda viral etkenlerin multipleks PCR ile araştırılması

## Investigation of viral agents by multiplex PCR in children with symptoms of upper respiratory tract infection

Talat ECEMİŞ<sup>1</sup>, Özge YILMAZ<sup>2</sup>, Tamer ŞANLIDAĞ<sup>1</sup>, Sinem AKÇALI<sup>1</sup>, Hasan YÜKSEL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

<sup>2</sup>Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Manisa

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, akut üst solunum yolu semptomlu çocuklarda test edilmiş “viral solunum paneli” sonuçlarını değerlendirdik.

**Yöntemler:** Toplam 160 semptomlu çocuğun nazofaringeal sürüntü örneklerinin multipleks PCR ile test edilmiş sonuçları incelendi.

**Bulgular:** Hastaların 55 (%34.4)’i pozitif. Beş hastada (%3.1) çift etken, bir hastada (%0.6) ise üç etken bulundu. En sık olarak insan rinovirüs 14 hastada (%25.4) tespit edildi.

**Sonuç:** Etken viruslarının sıklığının ortaya konulduğu çalışmada, çok sayıda virüsü aynı anda ve kısa sürede tespit edebilen multipleks PCR’in güvenilir bir test olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Solunum yolu infeksiyonu, çocuk, multipleks PCR, virüs

### ABSTRACT

**Objective:** We evaluate the results of “respiratory viral panel” tested in children with symptoms of acute upper respiratory tract infections.

**Methods:** Multiplex PCR test results of nasopharyngeal swap samples of 160 symptomatic children were analyzed.

**Results:** Fifty-five patients (34.4%) had PCR test positivity. Two (n=5 patients; 3.1%), and three (n=1; 0.6%) viral species were detected. Rhinovirus was the most frequently detected species (n= 14; 25.4%).

**Conclusion:** It was concluded that multiplex PCR is a reliable test which can simultaneously detect numerous viruses in a short time in accordance with the results of this study.

**Key words:** Respiratory tract infection, children, multiplex PCR, virus

**Alındığı tarih:** 22.02.2012

**Kabul tarihi:** 24.02.2012

**Yazışma adresi:** Yrd. Doç. Dr. Talat Ecemiş, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uncubozköy-Manisa  
**e-mail:** talat.ecemis@gmail.com

### GİRİŞ

Üst solunum yolu infeksiyonu (ÜSYİ), tüm dünyada çocuklar arasında infeksiyonla ilişkili morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biridir. Bu infeksiyonların büyük bölümü başta respiratuar sınıfta viral, metapneumovirus, influenza virus, parainfluenza virus, rhinovirus gibi viruslar tarafından

oluşturulmaktadır ve klinik görünimleri birbirine oldukça benzer olduğundan etiyolojik tanının konulması oldukça güçtür<sup>(1,2)</sup>.

Hızlı virolojik tanı testleri klinisyenin tedavi kararını erken dönemde yönlendirmekte, salgınların uyarısını da verebilmektedir. Hücre kültüründe viral izolasyon uzun zaman alabilmekte veya direkt floresan antikor (DFA) testi gibi antijen tespit yöntemleri

düşük duyarlılıklarıyla tatmin edici sonuçlar vermektedir. Günümüzde geliştirilen moleküler tekniklerle hem hızlı ve hem de duyarlılık ve özgüllük yönünden yüksek performansta sonuçlar elde edilmektedir. Geliştirilen multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (m-PCR) testleri ile çeşitli virüslerin amplifikasyonunu aynı anda olabileceğinden, çok sayıda virüsün daha düşük maliyetlerle ve hızlı bir şekilde tespiti gerçekleştirilmektedir<sup>(3)</sup>.

Biz bu çalışmada, akut üst solunum yolu enfeksiyonu semptomlarıyla hastanemize başvurmuş çocuklarda test edilmiş m-PCR sonuçlarını araştırdık ve değerlendirdik.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Hastanemiz çocuk sağlığı ve hastalıkları polikliniklerine 2010 ve 2011 yıllarında akut üst solunum yolu enfeksiyonu belirtileriyle başvurmuş ve tanısal amaçlı “viral solunum paneli” testi gerçekleştirilmiş 160 hastanın sonuçları retrospektif olarak araştırıldı.

Hasta grubu, ateş, rinit, burun tıkanıklığı, baş ağrısı, öksürük, konjunktivit gibi akut üst solunum yolu enfeksiyonu semptomlarıyla hastaneye başvuran, yaşları 1 ay ile 8 yaş arasında (ortalama 6.5 ay), 56 (%35)’sı kız, 104 (%65)’ü erkek 160 hastadan oluşmaktaydı. Nazofaringeal sürüntü örnekleri alındı ve test gününe kadar -20°C’da bekletildi (en fazla 2 hafta).

Kullanılan viral solunum paneli, solunum yolunda enfeksiyon etkeni olabilen 15 adet virüsü (influenza A virus [IAV], influenza B virus [IBV], human respiratory syncytial virus A [RSVA], human respiratory syncytial virus B [RSVB], human adenovirus [AdV], human metapneumovirus [MPV], human coronavirus 229E/NL63 [229E/NL63], human coronavirus OC43 [OC43], human parainfluenzavirus 1 [PIV1], human parainfluenzavirus 2 [PIV2], human parainfluenzavirus 3 [PIV3], human parainfluenzavirus 4 [PIV4], human rhinovirus [HRV], human enterovirus [HEV], human bocavirus [HBoV]) aynı anda, m-PCR yöntemiyle kalitatif olarak tespit eden bir test siste-

midir (Seeplex® RV15 ACE, Seegene, Güney Kore). Testin uygulanması üretici firmanın prosedürüne göre gerçekleştirilmektedir. Örneklerden viral nükleik asitin ekstraksiyonu, reverse transkripsiyon ile cDNA’nın sentezi, hedef DNA’nın multiplex PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi aşamalarından sonra sonuçlar elde edilmektedir<sup>(4)</sup>. İnfluenza A virus pozitif çıkan örneklerden ise yine aynı üretici firmanın kitiyle (Seeplex® Influenza A/B typing, Seegene, Güney Kore) ve yukarıdaki sözü edilen aşamalar uygulanarak tiplendirilme yapılmaktadır. Bu tiplendirmede insan H1 ve H3 ve domuz H1 tipleri ayırt edilebilmektedir.

## BULGULAR

Test edilen toplam 160 hastanın 55 (%34.4)’i pozitif bulundu. Beş hastada (%3.1) çift etken pozitifliği tespit edildi. Bir hastada (%0.6) ise üç farklı etken (RSVA, RSVB, AdV) mevcuttu. En sık tespit edilen virus, 14 hastada (%25.4) görülen HRV’dü. On bir hastada (%20) tespit edilen IAV ise ikinci sık-

**Tablo 1. Solunum yolu enfeksiyon etkeni virusların hastalarda dağılımı.**

	Virüs	Hasta sayısı (%)
Tek etken viruslar	IAV	11 (20)
	IBV	3 (5.4)
	RSVA	4 (7.2)
	RSVB	3 (5.4)
	AdV	1(1.9)
	MPV	5 (9)
	229E/NL63	1(1.9)
	PIV1	2 (3.6)
	PIV3	4 (7.2)
	HRV	11 (20)
	HBoV	2 (3.6)
Çift etken viruslar	PIV 3 + HBoV	1(1.9)
	HRV + HBoV	1(1.9)
	HRV + PIV 3	1 (1.9)
	HRV + RSVA	1 (1.9)
	RSVA + RSVB	3 (5.4)
Üçlü etken viruslar	RSVA + RSVB + AdV	1 (1.9)
TOPLAM		55 (100)

lıkta etken olarak bulundu. Çift etken olarak RSVA ve RSVB birlikteliği 3 hastada en sık olarak bulundu (Tablo 1). On bir hastada pozitif bulunan IAV'ün tiplendirilmesinde, 9'u H3N2, 2'si ise insan H1N1 olarak sonuçlandırıldı

## TARTIŞMA

ÜSYİ viruslarının hızlı tanısının, gelişen antiviral tedavilerle birlikte önemi artmıştır. Hızlı viral tanı testleri, klinisyenin doğru tedavi kararı almasına olanak sağlayarak gereksiz antibiyotik kullanımını azaltmakta, infeksiyonun yayılmasını sınırlamakta ve hastanede yatış süresini kısaltabilmektedir. Virüsü tespit etmede konvansiyonel olarak altın standart olarak kabul edilen hücre kültürü ve direkt floresan antikor (DFA) testleri kullanılmaktadır. Hücre kültürünün en büyük dezavantajı, sonucun elde edilmesinin 7 güne kadar uzayabilmesidir. DFA hızlı ve ucuz bir test olmasına rağmen, duyarlılığının düşüklüğü (%87) önemli bir sorun oluşturmaktadır (4). Örnek kalitesi ve değerlendirmenin uzmanlık gerektirmesi, sonucu etkileyen en önemli faktörlerdir (5). Ayrıca bu iki testte, yeni tanımlanan viruslar için gerekli olan monoklonal antikorların gerekliliği de kullanımlarını sınırlamaktadır (6).

Virüslerin tespitinde PCR ile yüksek duyarlılıkta sonuçlar hızlıca elde edilebilmektedir. Son yıllarda geliştirilen m-PCR'ın duyarlılığı birçok çalışmada %98, özgüllüğü %96 civarında bildirilmiştir (4,7). Yüksek duyarlılığın yanında çok sayıda virüsü 6 saat içerisinde aynı anda tespit edebilmesi bu test için büyük bir avantaj oluşturmaktadır. Yüksek m-PCR duyarlılığının nedeni, düşük titrelerdeki viral genomları tespit etmesidir. Ayrıca HBoV, MPV, HRV, coronavirus gibi hücre kültürü veya DFA ile tespit edilemeyen virusları da tespit edebilmektedir. Üst solunum yolu infeksiyonlarında etken virusların m-PCR ile tespit edilmesi, infeksiyonun alt solunum yolu enfeksiyonlarından ayırımında önemli olmaktadır.

Gerek PCR için, gerekse hücre kültür ve DFA için örnek alınma yönteminin testin duyarlılığını etkiledi-

ği bildirilmiştir (8). Bu çalışmadaki örnekler nazofaringeal sürüntüyle alınmıştır. Orofaringeal sürüntülerin nispeten daha kolay ve basit olduğu belirtilse de, bir çok çalışmada nazofaringeal sürüntüler de duyarlılığın daha iyi olduğu gösterilmiştir (8). Sürüntü alınırken nazofarinksin epitelinin hafifçe travmatize edilmesi, virus izolasyonunu artırmaya katkısı olabilir.

Toplam 160 ÜSYİ semptomlu hastanın 55 (%34.4)'inde virus etken olarak tespit edildi. Bu oran, benzer çalışmayı yapmış olan Bonfim ve Tsuchiya'nın sonuçlarına yakın olup, sırasıyla %37.6 ve %30 bulmuştur (9,10). Birçok çalışmada da bu oran yaklaşık olarak %30 civarındadır (11). Çalışmamızda %25.4 oranla (14 hasta) en sık tespit edilen virus HRV'dü. HRV'ün 3'ü çift etkenden birini oluşturmaktaydı. Brittain-Long ve ark.'nın 954 örnekte yaptığı m-PCR çalışmasında IAV %25 oranında ilk sırada, HRV %20 ile 2. sırada tespit edilmiş, üçüncü sıklıkta ise bizimkine benzer şekilde %10 oranında MPV bulunmuştur (1). Bir başka çalışmada ise ÜSYE olan çocuklarda etken viruslar olarak sırasıyla HRV (37.7), HRSV (20.7), IAB (17.3) ilk sıralarda yer almaktadır. Hindistan'da m-PCR ile ÜSYE olan çocuklarda, en sık viral etken RSV %47.1 ile ilk sırada tespit edilmiştir (12). İstanbul'da yapılan bir çalışmada, Ünüvar ve ark. 234 ÜSYİ çocukların %29.8'inde virüs tespit etmiş ve sıklık sırasını IAV (%36.6), AdV (%28.3), HRV (13.3) belirlemişlerdir. IAV'lerin tamamı ise H3N2 bulunmuştur (13).

HRV ve IAV (çoğunluğu H3N2 olmak üzere) genel olarak ÜSYİ etiolojisinde ilk sıralarda yer almaktadır (14). HRV'ün bulaşma yolları infeksiyonun kolay yayılmasında önemlidir. HRV infeksiyonunun bulaşmasında en önemli etkenin damlacıklar mı yoksa indirekt kontamine sekresyonlarla mı olduğu konusunda farklı görüşler mevcuttur, ancak nüfusu artan dünyada 100'den fazla serotipi olan HRV'nin ÜSYİ etiolojisinde ön sıralarda gideceği kaçınılmaz görünmektedir (14). İkinci sıklıkta tespit ettiğimiz IAV'ün tiplendirilmesinde ise 9'u H3N2, 2'si ise insan H1N1 sonucu elde edildi. Dünyada ve ülkemizde ÜSYİ'de en sık etken olarak IAV olduğu çok

sayıda çalışmada gösterilmiştir <sup>(15-18)</sup>. Birçok araştırmada IAV'ın en sık rastlanan tipi -çalışmamızda olduğu gibi- H3N2'dir <sup>(18)</sup>. IAV H3N2'nin daha ciddi infeksiyon yapma potansiyeline sahip olduğu belirtilmektedir, bunun farklı viral ortamlardan geçişindeki uğradığı mutasyonların virülans faktörlerinin antijenik yapısını değiştirmesinden kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir <sup>(18)</sup>. Aralık 2011'de varyant bir IAV H3N2 [A(H3N2)v] Amerika Birleşik Devletleri'nde bildirilmiştir. Orta şiddette kendini sınırlayan bir ÜSYİ yaptığı izlenmiş, henüz mevsimsel tipten farkları bilinmemektedir <sup>(19)</sup>.

Hücre kültürü rutin olarak tespit edilmesi çok güç olan MPV, çalışmamızda 55 etkenin 5 (%9)'inde tespit edilebilmiştir. Chung ve ark. MPV oranını ÜSYE'da %12.1 oranında bildirmiştir <sup>(20)</sup>. Diğer tespit edilen virusların dünyadaki dağılımı değişiklik göstermekle birlikte, çalışmamızdaki gibi daha gerilerde yer almaktadır <sup>(11)</sup>.

Başta HRV ve RSV'ler olmak üzere etkenlerin yaklaşık %10'u çift etken olarak hastalarda tespit edildi ve bir hastada ise üç etken mevcuttu. Coiras ve ark.'da aynı yöntemle test ettikleri hastalarda aynı oranı (%9.5) tespit etmiştir <sup>(3)</sup>. Çift etken viral ÜSYİ yaklaşık %5-20 hastada olduğu bildirilmektedir <sup>(21)</sup>. Olasılıkla bu tespitlerin bir kısmı -viral çeşitlilikteki eksiklikten dolayı- diğer konvansiyonel yöntemlerle tespit edilemeyecekti ve bu da aynı anda çok sayıda virüsün tespit edebilen m-PCR'ın önemi bir üstünlüğünü ortaya koymaktadır. Klinik olarak ÜSYİ'larını birbirinden ayırmak mümkün olmadığından, hastalığın şiddetini daha da artırabilen çeşitli patojenlerin çoklu etken olarak tespiti klinik değerlendirmede oldukça önemli olacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışmada ÜSYİ semptomlarıyla başvuran çocukların yaklaşık 1/3'ünün viral patojenlerle enfekte olduğu ve çocuklarda en sık viral etkenin HRV olduğu tespit edildi. Çok sayıda virusu aynı anda ve kısa sürede tespit edebilen, m-PCR'ın ÜSYİ tanı ve tedavisinde önemli ve güvenilir bir test olduğu görüşüne varıldı.

## KAYNAKLAR

1. Brittain-Long R, Nord S, Olofsson S, Westin J, Anderson LM, Lindh M. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2008;41(1):53-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2007.10.029> PMID:18093871
2. Bonfim CM, Nogueira ML, Simas PV, Gardinassi LG, Durigon EL, Rahal P, et al. Frequent respiratory pathogens of respiratory tract infections in children attending daycare centers. *J Pediatr* 2011;87(5):439-44. <http://dx.doi.org/10.2223/JPED.2126> PMID:22125800
3. Coiras MT, Aguilar JC, García ML, Casas I, Pérez-Breña P. Simultaneous Detection of Fourteen Respiratory Viruses in Clinical Specimens by Two Multiplex Reverse Transcription Nested-PCR Assays. *J Med Virol* 2004;72(3):484-95. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.20008> PMID:14748074
4. Roh KH, Kim J, Nam MH, Yoon S, Lee CK, Lee K, et al. Comparison of the Seeplex Reverse Transcription PCR Assay with the R-mix Viral Culture and Immunofluorescence Techniques for Detection of Eight Respiratory Viruses. *Ann Clin Lab Sci* 2008;38(1):41-6. PMID:18316781
5. Syrmis MW, Whiley DM, Thomas M, Mackay IM, Williamson J, Siebert DJ, et al. A Sensitive, Specific, and Cost-Effective Multiplex Reverse Transcriptase-PCR Assay for the Detection of Seven Common Respiratory Viruses in Respiratory Samples. *J Mol Diagn* 2004;6(2):125-31. [http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60500-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60500-4)
6. Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoubian S, Sinha T, Lisle C, et al. Development of a Respiratory Virus Panel Test for Detection of Twenty Human Respiratory Viruses by Use of Multiplex PCR and a Fluid Microbead-Based Assay. *J Clin Microbiol* 2007;45(9):2965-70. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02436-06> PMID:17596360 PMID:2045291
7. Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods* 2005;126(1-2):53-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.020> PMID:15847919
8. Hammit LL, Kazungu S, Welch S, Bett A, Onyango CO, Gunson RN, et al. Added Value of an Oropharyngeal Swab in Detection of Viruses in Children Hospitalized with Lower Respiratory Tract Infection. *J Clin Microbiol* 2011;49(6):2318-20. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02605-10> PMID:21490188 PMID:3122752
9. Tsuchiya LR, Costa LM, Raboni SM, Nogueira MB, Pereira LA, Rotta I, et al. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. *J Infect* 2005;51:401-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2004.12.002> PMID:16321652
10. Olofsson S, Brittain-Long R, Andersson LM, Westin J, Lindh M. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9(8):615-26. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.11.75> PMID:21819328

11. Bharaj P, Sullender WM, Kabra SK, Mani K, Cherian J, Tyagi V, et al. Respiratory viral infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007. *Virology* 2009;6:1-11.  
<http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-6-89>  
PMid:19558656 PMCID:2709894
12. Ünüvar E, Yıldız İ, Kılıç A, Aslan SS, Çakal B, Toprak S, et al. Viral Etiology and Symptoms of Acute Upper Respiratory Tract Infections in Children. *Turk J Med Sci* 2009;39 (1):29-35.
13. Monto AS. Epidemiology of Viral Respiratory Infections. *Am J Med* 2002;(112 Suppl 6A):4S-12S.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343\(01\)01058-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343(01)01058-0)
14. Broor S, Parveen S, Bharaj P, Prasad VS, Srinivasulu KN, Sumanth KM, et al. A Prospective Three-Year Cohort Study of the Epidemiology and Virology of Acute Respiratory Infections of Children in Rural India. *PLoS One* 2007;2(6):e491.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000491>  
PMid:17551572 PMCID:1876256
15. Peng J, Kong W, Guo D, Liu M, Wang Y, Zhu H, Pang B, Miao X, Yu B, Luo T, Hu Q, Zhou D. The epidemiology and etiology of influenza-like illness in Chinese children from 2008 to 2010. *J Med Virol* 2012;84(4):672-8.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jmv.22247>  
PMid:22337308
16. Ünüvar E, Öz ŞS, Yıldız İ, Çıplak M, Badur S, Kılıç A, et al. Çocuklarda Üst Solunum Yolu Enfeksiyonlarında 2006-2008 Dönemi Viral Etiyoloji Araştırması. *Çocuk Derg* 2008;8(3):179-82.
17. Akarsu DÇ, Altoparlak Ü. Erzurum Yöresinde Üst Solunum Yolu Enfeksiyonlu Hastalarda Bazı Viral Etkenlerinin Araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2009;15(6):951-5.
18. Carrat F, Vergu E, Ferguson NM, Lemaître M, Cauchemez S, Leach S, et al. Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies. *Am J Epidemiol* 2008;167(7):775-85.  
<http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwm375>  
PMid:18230677
19. <http://www.cdc.gov/flu/swineflu/prevention-strategies.html>
20. Chung JY, Han TH, Kim BE, Kim CK, Kim SW, Hwang ES. Human metapneumovirus infection in hospitalized children with acute respiratory disease in Korea. *J Korean Med Sci* 2006;21:838-842.  
<http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2006.21.5.838>  
PMid:17043416 PMCID:2721993
21. Brittain-Long R, Westin J, Olofsson S, Lindh M, Andersson LM. Prospective evaluation of a novel multiplex real-time PCR assay for detection of fifteen respiratory pathogens - Duration of symptoms significantly affects detection rate. *J Clin Virol* 2010;47(3):263-7.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.12.010>  
PMid:20080440