ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORTA IRAK'TA A GRUBU ROTAVİRÜS SUŞLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Hussesin Ali Nsaif ALHAMZAH

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI (MOLEKÜLER BİYOLOJİ)

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Orta Irak'ta A Grubu Rotavirüs Suşlarının Moleküler Karakterizasyonu**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü
Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (20/9/2021).

Hussein Ali Nsaif ALHAMZAH

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ORTA IRAK'TA A GRUBU ROTAVİRÜS SUŞLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Hussein Ali Nsaif ALHAMZA

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mohammed Abdulwahab Ati AL-ASKERI

Rotavirüs bebeklerde ve küçük çocuklarda, dünya çapında en yaygın ishal nedenidir. Gelişmekte olan ülkelerde her yıl yüksek sıklık ile beş yaşın altındaki çocuklar arasında yaklaşık olarak 453.000 ölüme ve 2,4 milyon hastaneye yatışa neden olmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar sonucu, gelişmekte olan ülkelerdeki bebeklerde ve küçük çocuklarda Rotavirüs genotiplerinin paterni ve dağılımı belirlenebilir ve böylelikle gelecekteki Rotavirüs aşısı geliştirme stratejileri geliştirilebilir. Bu çalışmanın amacı, beş yaş altı ve şiddetli gastroenterit gösteren çocuklarda Rotavirüs suşlarının ne kadar yaygın olduğunu tespit etmekti. Eylül 2020'den Ocak 2021'e kadar beş yaşın altındaki çocuklardan elde edilen toplam 100 dışkı örneği üzerinde çalışıldı. Çocukların yaşları bir ile altmış ay arasında değişmekteydi. Örnekleri değerlendirmek için Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanıldı.
ELISA ve PCR bulgularımız örneklerin %41 oranında pozitif olduğunu gösterdi. Genotiplemeyi analiz etmek için Yarı-Yuvalanmış Multipleks PCR kullanıldı. Genotip kombinasyonu en yüksek oranda G1P8 %34,14 ve bunu takiben G2P8 %14,63, G1P6 %12,19, G4P8 %7,31, G4P6 %2,43 olarak tespit edildi. Rotavirüs genotipleri, Rotavirüs yüzdesi yüksek olduğu için küçük çocuklarda ve bebeklerde viral gastroenterit için ana risk faktörüdür. Bu çalışmanın bulguları, Irak'da ki mevcut Rotavirüs havuzunun çeşitliliğine katkıda bulunan Rotavirüs tür çeşitliliğinin önemli yönlerine işaret etmiştir ve bu, Rotavirüs dinamiklerine dayanan belirgin ekstra Rotavirüs tür çeşitliliğini hesaba katan bir aşı geliştirmek için gelecekteki deneylere yardımcı olacaktır. Gelecekte, daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulacaktır.

2021, 75 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Irak, Rotavirüs, Moleküler tipleme, PCR

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF GROUP A ROTAVIRUS STRAINS IN CENTRAL IRAQ

Hussein Ali Nsaif ALHAMZA

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. Müge FIRAT
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Mohammed Abdulwahab Ati AL-ASKERI

Around the globe, rotavirus is the most prevalent cause of diarrhea in infants and young children. causes 453,000 deaths and 2.4 million hospitalizations among children under the age of five years every year, with the highest frequency in developing countries. In epidemiological studies, the pattern and distribution of rotavirus genotypes in infants and young children in developing countries play a role, as well as giving a plan for future Rotavirus vaccine development. The goal of this study was to find out how prevalent Rotavirus strains are in children under the age of five, as well as what influence they have on severe gastroenteritis. A total of 100 stool specimens were studied, all of which were obtained from children under the age of five from September 2020 to January 2021. The children's ages ranged from one to sixty months. The Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (ELISA) and Polymerase Chain Reaction (PCR) were used to evaluate the samples. Our ELISA and PCR findings showed that 41% of the samples were positive. HemiNested Multiplex PCR was used to analyzed the genotyping. Genotype combination G1P8 was 34.14% followed by G2P8 14.63%, G1P6 12.19%, G4P8 7.31%, G4P6 2.43%. Rotavirus genotypes is a main risk factor of viral gastroenteritis in young children and infant as the percentage of rotavirus was high. The findings of this study point to important aspects of Rotavirus strain diversity in Iraq that contribute to the diversity of the current virus pool, which will aid future experiments to develop a vaccine that takes into account this apparent additional rotavirus strain diversity based on dynamics of rotavirus strains. In the future, further studies will be required.

2021, 75 pages

Keywords: Iraq, Rotavirus, Molecular typing, PCR

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Öncelikle bu çalışmayı tamamlamamı sağlayan Yüce Allah'a şükrederim. Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT'a ve Eş Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mohammed Abdulwahab Ati AL-ASKERI'e destekleri ve nazik danışmanlığı, birlikte yapmış olduğumuz bitmeyen ve teşvik edici tartışmalar, yenilikçi fikirler ve araştırma çalışmalarım sırasındaki muazzam motivasyonları için teşekkür ederim. Teşvikleri ve tavsiyeleri için kendilerine minnettarım.

Özel teşekkür

Irak'ın Al-Qadisiyah şehrinde bulunan Al-Qadisiyah Üniversitesi Biyoteknoloji Fakültesi Kadın ve Çocuk Hastanesi ve Moleküler Laboratuvarı laboratuvar personeline teşekkür ederim.

Bu çalışmayı başarıya ulaştıran ve güzel sonuçlar veren çocuk hastalara çok teşekkür ederim.

Dünya harikası annem ve babama

Bugün olmamın nedeni, desteğiniz ve sürekli ilginiz için teşekkür ederim. Destekleri için eşime, kardeşlerime, tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hussein Ali Nsaif ALHAMZAH Çankırı, Eylül 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i** **ABSTRACT** ..... **ii** **4**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **v**
ŞEKİLLER DİZİNİ **9**
ÇİZELGELER DİZİNİ **10**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Genel Bilgiler **1**
1.2 Çalışmanın Amacı **3**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **3**
2.1 Rotavirüs Virolojisi **3**
2.2 Rotavirüsün Keşfi **4**
2.3 Rotavirüsün Yapısı **5**
2.3.1 Genom **5**
2.3.2 Protein **7**
2.4 Rotavirüsün Sınıflandırılması **10**
2.5 Rotavirüsün Epidemiyolojisi **12**
2.6 Patogenez **14**
2.7 Rotavirüs Replikasyonu **15**
2.8 Bulaşma **17**
2.9 Belirtiler **18**
2.10 Rotavirüsün Teşhisi **19**
2.10.1 Elektron mikroskobu **20**
2.10.2 Antijen tespiti **22**
2.10.3 Moleküler teknikler **22**
2.11 Bağışıklık Yanıtı **24**
2.12 Aşı **25**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **27**
3.1 Materyal **27**
3.1.1 Araç ve gereçler **27**
3.1.2 Kimyasallar **28**
3.1.3 Primerler **29**
3.1.3 Kitler **31**
3.2 Yöntem **32**
3.2.1 Etik hususlar **33**
3.2.2 Numunelerin toplanması **34**
3.2.3 Makroskopik dışkı inceleme testi **34**
3.2.4 Mikroskobik dışkı inceleme testi **34**

3.2.5 Rotavirüs tespiti için immünolojik testler 34
3.2.6 RT-PCR ile rotavirüsün moleküler tespiti 36
4. BULGULAR 42
4.1 Örnek Toplama 42
4.2 İshal İçin Pozitif ve Negatif Rotavirüs ELISA'nın Cinsiyete Göre Dağılımı 42
4.3 İshal İçin Pozitif ve Negatif Rotavirus ELISA'nın Yaş Gruplarına Göre Dağılımı 43
4.4 Hastaların Beslenme Şekline Göre Dağılımı 45
4.5 Rotavirüs Enfeksiyonu ile Klinik Özelliklerin İlişkisi 46
4.6 Rotavirüs Genotipleri 47
4.6.1 VP7 (G) genotiplerinin dağılımı 47
4.6.2 VP4 (P) genotiplerinin dağılımı 49
4.6.3 VP7/VP4 (G/P) genotiplerinin dağılımı 51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 52
5.1 Sonuçlar 57
KAYNAKLAR 58

ÖZGEÇMİŞ 75

SİMGELER DİZİNİ

AGE	Akut Gastroenterit
Bb	Çift Bazlı
°C	Derece Santigrat
cDNA	Tamamlayıcı DNA
Cl	Klorür
CMI	Hücreye Bağımlı Bağışıklık
CMV	Sitomegalovirüs
dak	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DLP	Çift Katmanlı Partikül
dNTP	Deoksinükleosid Trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dsRNA	Çift Sarmallı RNA
ELISA	Enzim Bağlı Immünosorbent Deneyi
EM	Elektron Mikroskobu
EtBr	Etidyum Bromür

g	Gram
GD1a	Gangliosid Da1
GM1	Gangliosid M1
GRSN	Yılında Küresel Rotavirüs Gözetim Ağı'Nı
HBGAs	Histo Kan Grubu Antijenleri
HRP	Konjuge Yabanturbu Peroksidaz
ICTV	Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi
ICT	İmmünokromatografik Testler
IFN-γ	İnterferon-Gama
IRF-3	İnterferon Düzenleyici Faktör 3
Ig	İmmünoglobulin
KCl	Potasyum Klorür
KDa	Kilodalton
LAT	Lateks Aglütinasyon Testi
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
mL	Mililitre
mRNA	Haberci RNA
µM	micromolar
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogramlar
NAT	Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri
nm	Nanometre
NSP	Yapısal Olmayan Proteinler
OD	Optik Yoğunluk
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu
PRRs	Model Tanıma Reseptörleri
RdRps	RNA'ya Bağımlı RNA Polimerazları
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
RT-PCR	Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RV	Rotavirüs
RVA	Rotavirüs A

RCWG	Rotavirüs Sınıflandırma Çalışma Grubu
s	Saniye
SG	Alt Grup
SLP	Tek Katmanlı Partikül
Sn	Saniye
T	Değişken Sayıda Nirengi
TA	Tavlama Sıcaklığı
TAE	Tris-Asetat-Edta
TC	Döngüsel Denatürasyon
TE	Döngüsel Uzatma
TFE	Son Uzatma
TID	İlk Denatürasyon
TLP	Üç Katmanlı Partikül
UV	Ultraviolet
VB	Döndürme Sütunu
VP	Yapısal Proteinler
+RNA	Pozitif İplikli RNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Segmentli lineer dsRNA genomu. 12 proteini kodlayan 11 segment içerir 7
Şekil 2.2 Rotavirüs mimarisine genel bakış (Jenni *et al.* 2019) 8
Şekil 2.3 Rotavirüs genom yapısı ve organizasyonu (Desselberger 2014) 9
Şekil 2.4 Rotavirüs replikasyon döngüsü (Crawford *et al.* 2018) 16
Şekil 2.5 Rotavirüs aşılarının küresel tanıtımı (Steele *et al.* 2019) 26
Şekil 3.1 algoritma çalışma yöntemini gösterir 31
Şekil 4.1 Rotavirüsün farklı cinsiyet gruplarına göre dağılımı …….. 43
Şekil 4.2 Rotavirüs enfeksiyonunun farklı yaş gruplarına göre dağılımı 44
Şekil 4.3 Beslenme şekline göre Rotavirüs enfeksiyonu dağılım 46
Şekil 4.4 Rotavirüs pozitif ve Rotavirüs negatif hastaların klinik özellikler 47
Şekil 4.5 G-genotiplerinin (%) frekans dağılımı 49
Şekil 4.6 Çalışmada tanımlanan G-tiplerinin temsili jel görüntüsü, M şeridi 100bp DNA merdivenini temsil etmektedir, N Şeridi negatif kontrol olup. Şerit 1, VP7 ilk ur ürünüdür ..... 49 Şekil 4.7 P-genotiplerinin (%) frekans dağılımı 50
Şekil 4.8 Çalışmada tanımlanan P-tiplerinin temsili jel görüntüsü, M şeridi 100bp DNA merdivenini temsil etmektedir, N Şeridi negatif kontrol olup. Şerit 1, VP4 ilk tur ürünüdür 51
Şekil 4.9 G/P kombinasyonlarının (%) frekans dağılımı 52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Gen segmenti ve protein (Arias *et al.* 2015) .....
6 Çizelge 2.2 Rotavirüs sınıflandırılması .....
11
Çizelge 3.1 Bu çalışmanın prosedürlerinde kullanılan ekipman ve aletler …… 27
Çizelge 3.2 Bu çalışmanın prosedürlerinde kullanılan kimyasallar 28
Çizelge 3.3 VP7 genotipe özgü primerler 29
Çizelge 3.4 VP4 genotipine özgü primerler 29
Çizelge 3.5 Bu çalışmada kullanılan kitler 30
Çizelge 3.6 cDNA bileşeni 36
Çizelge 3.7 cDNA sentezi için termodöngü koşulları 37
Çizelge 3.8 İlk tur PCR için reaksiyon karışımı 38
Çizelge 3.9 İlk tur PCR için ısıl döngü koşulları 38
Çizelge 3.10 G-genotipleri için ikinci tur PCR için reaksiyon karışımı 39
Çizelge 3.11 G-genotipleme için ikinci tur PCR için ısıl döngü koşulları..... 39
Çizelge 3.12 P-genotipleri için ikinci tur PCR için reaksiyon karışımı 40
Çizelge 3.13 P-genotipleme için ikinci tur PCR için ısıl döngü koşulları 40
Çizelge 4.1 Rotavirüs enfeksiyonunun cinsiyet gruplarına göre dağılımı 42
Çizelge 4.2 Rotavirüs enfeksiyonunun yaş gruplarına göre dağılımı 44
Çizelge 4.3 Beslenme şekline göre Rotavirüs dağılımı 45
Çizelge 4.4 Hastalarda rotavirüs pozitif ve rotavirüs negatif klinik özellikleri 47
Çizelge 4.5 RT-PCR tiplemesi ile belirlenen RVA G tiplerinin sıklığı 48
Çizelge 4.6 RT-PCR tiplemesi ile belirlenen RVA P tiplerinin sıklığı..... 50
Çizelge 4.7 Çalışmada tespit edilen rotavirüs suşlarının genotip karakterizasyonu 52

1. GİRİŞ

1.1 Genel Bilgiler

İshalli hastalıklar, az gelişmiş ülkelerde beş yaşın altındaki çocuklarda yüksek oranda morbidite ve mortalite ile ilişkilendirilmiş olup beş yaşın altındaki çocuklarda ölümlerin %15 - 30'unu oluşturmaktadır (Ojobor *et al.* 2020). İshal hala dünya çapında çocuklarda önemli bir hastalık ve ölüm kaynağıdır (Ulrich and Ziebert 2017). İshal, özellikle gelişmekte olan ülkelerde beş yaşın altındaki çocuklarda önde gelen ölüm nedenidir. Ancak rotavirüsler, beş yaş altı çocuklarda aşı ile önlenebilir hastalık ölümlerinin pnömokok pnömonisinden sonra ikinci en büyük nedenidir (Güzel *et al.* 2020). Akut gastroenterit, başta çocuklar olmak üzere dünya genelinde her yaştan insanı etkileyen en sık görülen bulaşıcı hastalıklardan birisidir (Salami *et al.* 2019). A Grubu Rotavirüsler, dünya çapında yenidoğanlarda ve küçük çocuklarda en sık görülen ishal nedenidir (Dhital *et al.* 2017). İnsan rotavirüsü (RV), gelişmekte olan ülkelerde en yüksek sıklıkta olmak üzere, her yıl beş yaşın altındaki çocuklar arasında 453.000 ölüm ve 2,4 milyon hastaneye yatış ile dünya çapında çocuklarda şiddetli ishalin en yaygın nedenidir (Shaheen 2017). Rotavirüs hastalığının yaygın etkisi nedeniyle rotavirüs aşılarının geliştirilmesi hızlanmıştır. Bu nedenle, bir aşının popülasyona uygulanmadan önce hazırlanması için öncelikle bölgelerdeki rotavirüs prevalansının ve türlerinin belirlenmesi gerekmektedir (Abood 2013).

Birçok infantil gastroenterit vakasında etiyolojik ajan 1970'lerden önce bilinmemekteyken, 1973'te şiddetli diyareli bebeklerden alınan duodenal biyopsi örneklerinde ve akut diyareli çocukların dışkı örneklerinde viral partiküllerin bulunduğu keşfedilmiştir (Crawford *et al.* 2018). Tekerleğe benzer bu virüslerin adlandırılmasında kullanılan Rotavirüs kelimesi, "tekerlek" anlamına gelen Latince “Rota” kelimesinden türetilmiştir. Bu virüsler çift kabuklu olup diğer virüsler gibi herhangi bir kılıfla örtülmemiştir (Pant *et al.* 2017).

Rotavirüsler, reoviridae ailesinin bir üyesidir, ikosahedral, zarfsız ve altı yapısal proteini (VP1-VP4, VP6 ve VP7) ve altı yapısal olmayan proteini (NSP1-NSP6) kodlayan 11 segmentli çift sarmallı RNA'dan oluşan bir çekirdeğe sahip üç eşmerkezli protein katmanından oluşur (Lorestani *et al.* 2019). VP4 ve VP7 proteinleri, virüsün dış kaplamasını oluşturur. Ara katman, genotiplemeye yardımcı olan korunmuş bir alan olan VP6'dan oluşur. VP2, VP1 ve VP3 virüsün iç katmanını oluşturur; ayrıca virüs, bağışıklığı modüle eden NSP1, viral gen ekspresyonunu düzenleyen NSP3 ve enfekte hücrelerde ishali indükleyen NSP4 gibi çeşitli rolleri yerine getiren yapısal olmayan proteinler içerir (Jasim 2019).

G (glikoprotein) ve P (proteaz duyarlı) genotipleri, sırasıyla VP7 ve VP4 proteinleri tarafından belirlenir ve bağımsız olarak nötralize edici antikorları ortaya çıkarır. VP7 ve VP4 proteinlerinin kodlama alanlarının moleküler karakterizasyonu, yerel ve küresel A Grubu Rotavirüslerin (RVA) moleküler epidemiyolojisini araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır ve virüsün ikili genotip sınıflandırmasının temelidir (Owor *et al.* 2019). A Grubu Rotavirüsler, VP7 ve VP4 genlerinin dizi çeşitliliğine dayalı olarak çoklu G ve P genotiplerine bölünebilir. Şimdiye kadar 27 G genotipi ve 37 P genotipi keşfedilmiştir (Tian *et al.* 2018). Rotarix ve RotaTeq, 2006 yılında onaylanan ve DSÖ tarafından tüm dünyada yeni doğanlar için ticari olarak temin edilebilen ve önerilen iki canlı oral aşıdır. Bu aşıların konak bağışıklığını indüklemek için farklı mekanizmaları vardır. Her iki aşının da Amerika ve Avrupa'da etkili iken, Asya ve Afrika'nın en fakir ülkelerinde maliyetinden dolayı daha az etkili olduğu gösterilmiştir (Sadiq *et al.* 2019).

Dehidrasyon, rotavirüs enfeksiyonu vakalarında diğer bakteriyel patojen enfeksiyon vakalarına göre daha fazladır ve RV enfeksiyonu ile ilişkili ölümlerin önde gelen nedenidir (Dawood and Altameemi 2018). Rotavirüsün kuluçka süresi yaklaşık iki gün sürer (Sadeq and Ali 2019). Enfeksiyonda; ateş, sık karın ağrısı ve 2 - 3 gün süren kusmanın ardından 3-8 gün süren soluk sulu veya gevşek, kansız ishal takip eder (Wandera 2017). Rotavirüs gastroenteritinin klinik semptomları diğer enfeksiyonların neden olduğu gastroenteritlerin semptomlarına benzer olduğundan, rotavirüs enfeksiyonunu sadece klinik özellikler üzerinden teşhis etmek mümkün değildir.

Çocuğun dışkısındaki virüsü tespit etmek için bir enzim immün testi kullanılarak, Rotavirüs enfeksiyonunun spesifik teşhisine ulaşılabilir. Araştırma laboratuvarlarında, antibiyotiklerin aşırı kullanımını önlemek için elektron mikroskobu ve PCR gibi diğer prosedürler kullanılmaktadır (Hussein *et al.* 2015). Nokta mutasyonları, genetik yeniden sınıflandırma ve hayvan viral suşlarının insanlara transferi, Rotavirüsün muazzam çeşitliliğine katkıda bulunan faktörlerdir (Dhital *et al.* 2017). Sonuç olarak, belli bir bölgede sirküle olan çeşitli G ve P suşlarının prevalansını ve potansiyel değişikliklerini izlemek için rotavirüs sürveyansı gereklidir.

1.2 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, Orta Irak'ta akut diyare olan beş yaş altı çocuklarda RV genotiplerinin varlığını araştırmak, A grubu rotavirüs varlığını belirlemek ve ayrıca yakın zamanda tespit edilen bu rotavirüslerin epidemiyolojik özelliklerini ve dolaşımdaki genotiplerini tanımlamaktır. Bu çalışmadan elde edilecek epidemiyolojik veriler, gelecekte rotavirüs aşı suşlarının seçimindeki önerileri yönlendirmek için çok önemli olacaktır.

Bu çalışmanın sonuçları, Irak'taki rotavirüs suşu çeşitliliğinin önemli yönlerini vurgulayabilir ve bu durum, uygun bir aşı geliştirmek için gelecekteki deneylerde yardımcı olacak mevcut virüs havuzunun çeşitliliğine katkıda bulunabilir. Rotavirüs suşlarının dinamiklerine dayalı olarak, rotavirüs suşlarının çeşitliliği bu belirgin ilavesini hesaba katmalıdır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Rotavirüs Virolojisi

Bakteriler, virüsler ve protozoer parazitler bulaşıcı ishale neden olan patojenler arasındadır. Viral gastroenterit çocuklarda daha sık görülmesine ragmen, erişkinlerde

ishal vakalarının çoğuna bakteriyel hastalıklar neden olur. Rotavirüs, küresel olarak tüm ishal ölümlerinin %40'ından fazlasını oluşturan ciddi ve ölümcül ishalin hala en yaygın nedenidir (Gikonyo *et al.* 2019). Minimum 10 virion enfeksiyöz dozu ile Rotavirüs fekaloral yolla veya enfekte su veya gıda alımı yoluyla bulaşır (Leite *et al.* 2017).

2.2 Rotavirüsün Keşfi

1950'lerde ve 1960'larda, elektron mikroskobu kullanılarak maymunların rektal sürüntülerinde ve farelerin bağırsak biyopsilerinde Rotavirüs (RV) tespit edilmiştir (Adams and Kraft 1963). RV, insanlarda ilk kez 1973 yılında Bishop ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (Bishop *et al.* 1973).

Mayıs 1973'te, akut gastroenteritli (AGE) çocuklardan alınan duodenal mukozanın ultra ince kesitlerini incelemek için elektron mikroskobu (EM) kullanan Bishop ve arkadaşları, daha önce hayvanlarda bildirilen RV'lere benzeyen üst villöz yüzeyin epitel hücre astarlarında bol miktarda viral partikül keşfettiklerini belirtmişlerdir (Lestari *et al.* 2020). Virüs, daha önce yeni doğan farelerde ve buzağılarda ishale neden olan virüslere yakın benzerlik gösteren, reovirüs benzeri/ orbivirüs benzeri olarak tanımlanmıştır (Bishop 2009). İshalli dışkıda virüs, 70nm partiküller olarak (negatif olarak boyanmış dışkı numunelerinin elektron mikroskobu ile) kolayca tanımlanan mililitre başına 10^{10} partikül saçmaktadır (Bishop *et al.* 1974). Kapikian ve arkadaşları (Kapikian *et al.* 1972), akut bakteriyel olmayan gastroenteritli yetişkinlerden dışkı filtratları tüketen yetişkin gönüllülerden alınan dışkı ekstraktlarında 27 nm'lik küçük bir partikül rapor etmiştir. Bu virüs daha sonra bir kalisivirüs (Norwalk virüsü) olarak tanımlanmış ve küçük bebeklerde görülen virüsten açıkça farklılık göstermiştir. Bebeklerden alınan 70nm virüsüne başlangıçta reovirüs benzeri, ikili virüs benzeri, orbivirüs benzeri, infantil gastroenterit virüsü veya yeni bir virüs dahil olmak üzere birçok isim verilmiştir. Direkt ince tabaka elektron mikroskobu ve immünolojik elektron mikroskobu kullanılarak, daha sonra hastanede yatan çocukların dışkılarında önemli seviyelerde Rotavirüs keşfedilmiştir. Bu 70nm tekerlek benzeri parçacığa, elektron mikroskobu altında bakıldığında tekerlek

benzeri görünümü sergilemesi nedeniyle Latince “rota” (tekerlek) kelimesinden sonra rotavirüs adı verilmiştir (Sadiq *et al.* 2018).

2.3 Rotavirüsün Yapısı

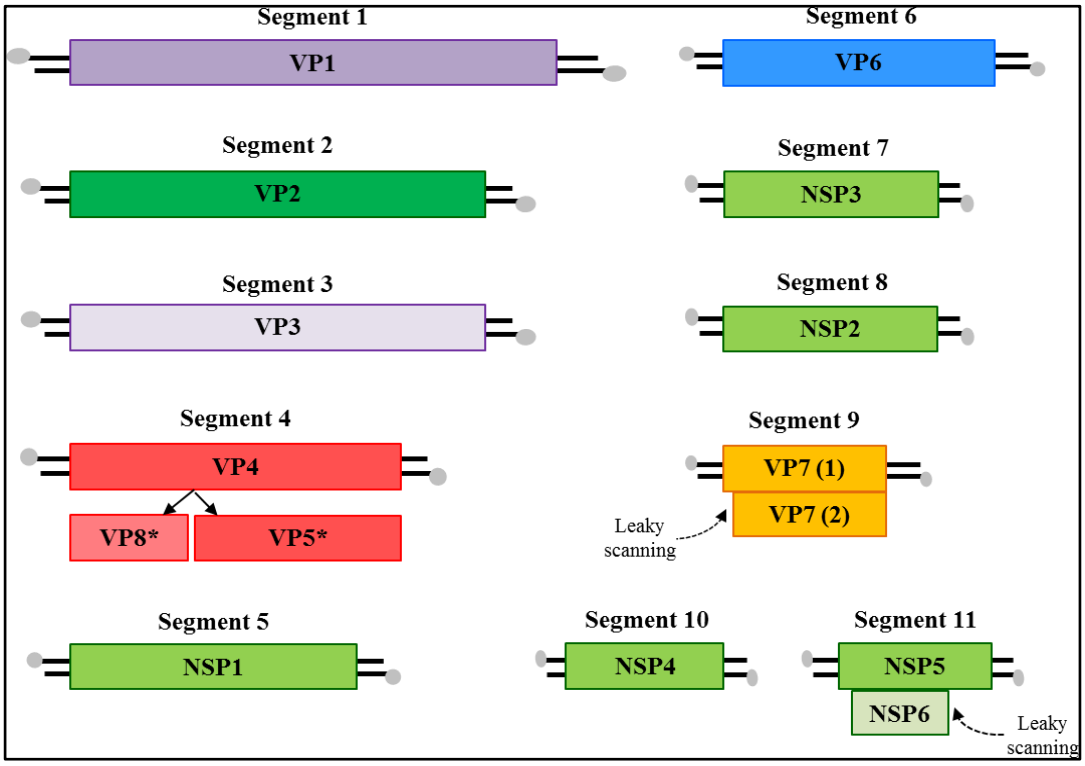
2.3.1 Genom

Rotavirüs genomu, 11 çift sarmallı RNA (dsRNA) genomu içeren zarfsız bir viral kapsiddir (Jasim 2019). RVA genomu yaklaşık 18,5 kilobayt büyüklüğündedir ve Çizelge 2.1'de gösterildiği gibi altı yapısal proteini (VP1-VP4, VP6 ve VP7) ve altı yapısal olmayan proteini (NSP1-NSP6) kodlayan 11 segmentten oluşur. Bisistronik olan ve belirli RV suşlarında iki proteini (NSP5 ve NSP6) kodlayan gen segmenti 11 dışında, gen segmentleri monosistroniktir ve uzunlukları 667 ila 3302 bp arasında değişir (Sadiq *et al.* 2018). RVA kapsidi, dış katmanı VP7 (kapsid) ve VP4 (spike/ diken) proteinleri olan üç protein katmanından oluşur (Ianiro *et al.* 2019). Tripsin, VP4'ü, virüsün hücreye girmesi için gerekli olan VP8 ve VP5 olmak üzere iki alt birime ayırır (Şekil 2.1) (Arias *et al.* 2015). Proteaza duyarlı proteinler VP4 ve glikoprotein VP7, antijenleri nötralize eder ve sırasıyla P serotipi/genotipi ve G serotipi/genotipini belirler (Zeng *et al.* 2019). İki protein (VP7 ve VP4) dış kapsid katmanını, (VP6) ara katmanı ve (VP2); VP1 (RNA bağımlı RNA polimeraz) ve VP3 (viral kapaklama enzimi) olmak üzere iki protein içeren iç katmanı oluşturur (Sadiq *et al.* 2018). Rotavirüs genomik RNA'sı poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) kullanılarak klinik örneklerden ekstrakte edilebilir ve saflaştırılabilir. Uzun RNA desenli virüslerin genom segmentleri olan 10 ve 11, iki birincil RNA göç modeline göre kısa RNA desenli virüslerinkinden daha hızlı seyahat eder. Her rotavirüs suşu, genetik epidemiyoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılan, elektroferotip olarak bilinen farklı bir göç paternine sahiptir (Hart and Cunliffe 2020).

Çizelge 2.1 Gen segmenti ve protein (Arias *et al.* 2015)

Gen Segmenti	Protein	Boyut bp	Ağırlık KDa	Yer	Fonksiyon

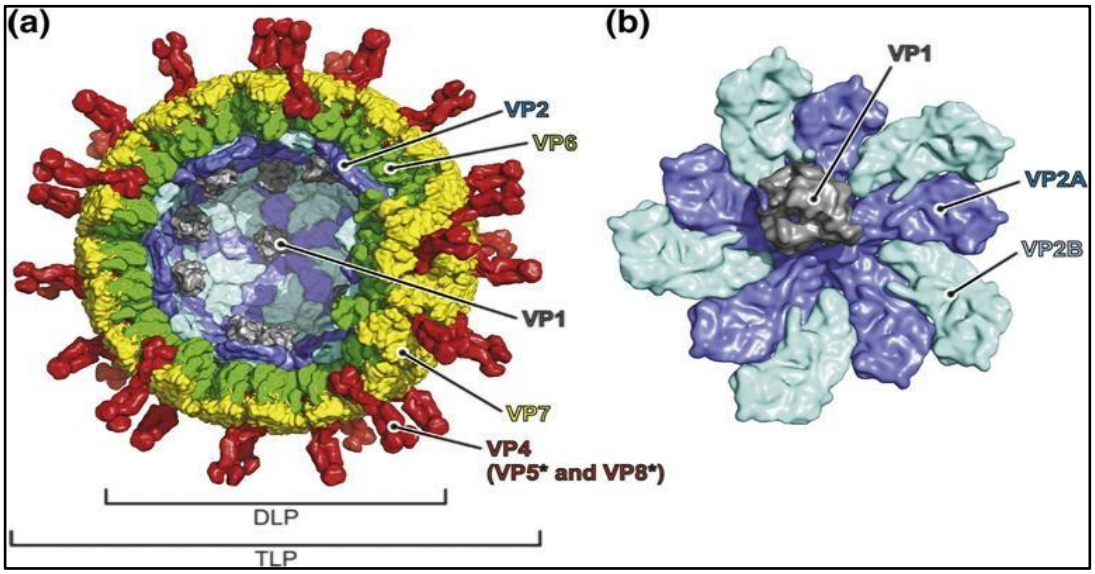
1	VP1	3302	125	Çekirdek	mRNA transkripsiyonu için VP3 ile kompleks oluşturulması
2	VP2	2690	102	Çekirdek	VP1 replikaz işlevi için gerekli olan RNA bağlanması
3	VP3	2591	88	Çekirdek	VP1 mRNA transkripsiyonu ile polimeraz kompleksi oluşturulması
4	VP4 (VP5+ VP8)	2362	87	Dış kapsid	Hücre eki, hemaglutinin, nötralize edici antijen
5	NSP1	1611	59	Yapısal olmayan protein	İnterferon antagonisti
6	VP6	1356	45	İç kapsid	Transkripsiyon için gerekli, alt grup antijeni (IgA için ana hedef)
7	NSP3	1104	37	Yapısal olmayan protien	Konakçı çevirisini engellenmesi
8	NSP2	1059	35	Yapısal olmayan	NSP5 ile viroplazma oluşturulması
9	VP7	1062	37	Dış kapsid	Nötralize edici antijen
10	NSP4	751	20	Yapısal olmayan protein	Dış kapsid düzeneğine yardımcı olunması, enterotoksin
11	NSP5+ NSP6	677	22	Yapısal olmayan protein	NSP2 ile viroplazma oluşturulması



Şekil 2.1 Segmentli lineer dsRNA genomu 12 proteini kodlayan 11 segment içerir

2.3.2 Protein

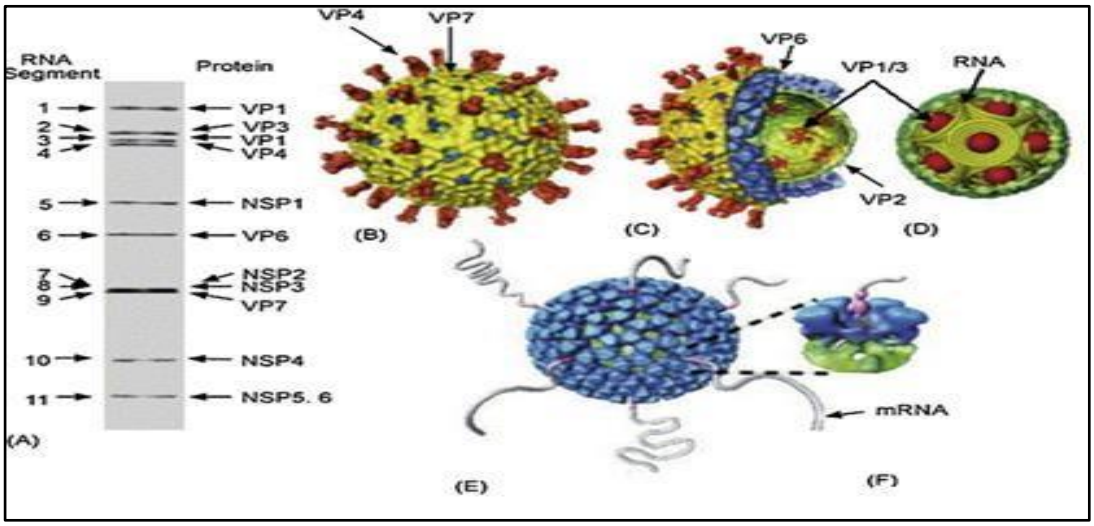
Rotavirüs virionu 85nm çapında üç katmanlı bir partiküldür (TLP). Bir VP2 çekirdek kabuğundan, bir orta VP6 katmanından ve (VP4) diken ek proteinleri ile gömülü bir dış (VP7) katmandan oluşur (Şekil 2.2). VP1 polimerazın, VP3 RNA kapatma enzimi ile bir kompleks oluşturduğu ve VP1-VP3 heterodimerlerinin 12 ikosahedral beş katlı eksenin her birinin altında VP2'ye bağlı olduğu düşünülmektedir (Long and McDonald 2017).



Şekil 2.2 Rotavirüs mimarisine genel bakış (Jenni *et al.* 2019)

Tamamen bulaşıcı bir virion oluşturmak için VP8 ve VP5'teki tripsin benzeri proteazlar tarafından proteolitik olarak bağırsak lümeninden veya hücrelerin içinden işlenmesi gereken 3 kopya VP4'ten oluşan viral diken vardır (Jiménez-Zaragoza *et al.* 2018). Diğer dsRNA virüsleri gibi rotavirüsler, parçalanmış genomlarını kopyalamak için RNA' ya bağımlı RNA polimerazları (RdRps) içine alır. Üç eş merkezli, ikosahedral simetri protein kabuğu, paketlenmiş RNA'yı "üç katmanlı partikül" (TLP) olarak bilinen bulaşıcı virionda sarar (Jenni *et al.* 2019). Üç kapsid katmanı, iç kapsid proteini VP2'nin 60 dimerinden ve 260 trimerden oluşan orta katman proteini VP6'dan ve 780 monomerden oluşan glikosile edilmiş VP7 proteininden oluşur. Proteaza duyarlı VP4 proteininin 60 trimeri, virion yüzeyinden çıkıntı yaparak sivri proteinler oluşturur (João *et al.* 2018). Tüm reovirideae virüslerinin kapsid organizasyonu, çoklu protein katmanları ile benzer görünmektedir. Değişken sayıda nirengi (T) ile bu katmanlar çeşitli ikosahedral simetrileri takip eder (Libersou *et al.* 2008). TLP'nin en dış tabakası (T=13), proteaza duyarlı VP4'ün 60 trimeriyle gömülü olan VP7 glikoproteini tarafından oluşturulur (Boudreaux *et al.* 2015). Gen segmenti 4 tarafından kodlanan serotip P (proteaz duyarlı proteinler VP4) ve suşa bağlı olarak gen segmentleri 7, 8 veya 9 tarafından kodlanan G (glikoprotein VP7), iki dış kapsid proteini (VP4) ve (VP7) tarafından tanımlanır. Her iki protein de A Grubu rotavirüslerini P ve G serotipleri ve genotiplerine sınıflandırmak ve

ayrıca nötralize edici antikor yanıtlarını indüklemek için kullanılır (Sudhir and Delma 2018). En içteki T=1 çekirdek kabuğu tamamen VP2'den, T=13 ara virion katmanı ise tamamen VP6'dan yapılmıştır (Boudreaux *et al.* 2013). İç katman, RNA'ya bağımlı RNApolimeraz VP1 (125 kDa) ve RNA-kaplama enzimi VP3 (88 kDa) ile pentamerik bölgelerde birleştirilen 11 dsRNA genomik segmentini çevreleyen VP2 proteininin (102 kDa) 60 asimetrik dimerinden oluşan bir T = 1 kapsiddir (Estrozi *et al.* 2013, Periz *et al.* 2013). Viral DNA'yı çoğaltmak ve paketlemek için kullanılan bir ara yapı olan bu SLP, 260 VP6 armut biçimli trimerden (45 kDa) oluşan kalın bir T = 13 tabakası ile yuvarlanır (Jiménez-Zaragoza *et al.* 2018). VP2 kopyaları (120), simetrik olarak uyumsuz çekirdek kabuğu T = 1'i oluşturur. VP2 (1–100) N-terminal kalıntıları, viral polimeraz VP1 ve kapaklama enzimi VP3'ü birbirine bağlayan beş katlı köşe boyunca partikülün iç kısmına doğru çıkıntı yaptığı varsayılan esnek bir alan oluşturur (Hauser *et al.* 2019).



Şekil 2.3 Rotavirüs genom yapısı ve organizasyonu (Desselberger 2014)

Yapısal olmayan protein NSP1, Interferon düzenleyici faktör 3 ile doğrudan etkileşime giren bir RNA bağlayıcı proteindir (IRF-3). Viroplazmanın gelişiminde ve genom replikasyonu ve paketlemesinde yapısal olmayan proteinler NSP5 ve NSP2 yer alır, NSP5'in işlevi, replikasyon ve paketleme sırasında RNA'nın NSP2 tarafından bağlanmasını düzenlemektir. Yapısal olmayan protein NSP3'ün, rotaviral mRNA'ların özel olarak tanınmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Pesavento *et al.* 2006). NSP3,

viral mRNA'nın 3'ucuna bağlanır, viral protein sentezini arttırır ve konak hücre protein üretimini durdurur (Şekil 2.3). Enfeksiyon sırasında NSP4, ishale neden olan viral bir enterotoksindir. RNA bağlayıcı protein NSP6, faz dışı bir açık okuma çerçevesinden gen 11 tarafından kodlanır (Wandera 2017).

2.4 Rotavirüsün Sınıflandırılması

Rotavirüs, reovirideae ailesine ait zarfsız bir RNA virüsüdür. Reovirideae ailesinin diğer üyeleri arasında orthoreovirus, orbivirus, coltivirus, cypovirus, phytoreovirus, aquareovirus, oryzavirus, seadornavirus, ıdoreovirus ve mycoreovirus bulunmaktadır (Motayo *et al*. 2018). Uluslararası virüs taksonomisi komitesi (ICTV)'ne göre rotavirüsler, reoviridae ailesinin reovirideae cinsine aittir ve sedoreovirinae'nin alt familyalarında sınıflandırılır (Guerra *et al.* 2016). VP6 proteinine göre yedi kategoriye ayrılırlar (A-G) (Lekana-Douki *et al*. 2015). Bu protein, A Grubu rotavirüslerin alt gruplara (SG) sınıflandırılmasını sağlayan antijenik epitoplar içerir. İki monoklonal antikora karşı reaktiviteye dayalı olarak, SGI, SGII+ SGI ve II ve SG non-I ve non-II tanımlanmıştır (Motayo *et al.* 2018). İnsanlar ve diğer hayvanlar rotavirüsler tarafından enfekte olabilir. A-C Gruplarının rotavirüsleri hem insanlarda hem de hayvanlarda bulunabilir, ancak D-G Gruplarının rotavirüsleri sadece hayvanlarda bulunur (Mansoor and Mahmood 2018). Dış kapsid, ikili sistemde Rotavirüs sınıflandırması için gerekli olan VP7 (G tipi) ve VP4 (P tipi) proteinlerini içerir (Giri *et al*. 2019). VP7 ve VP4 genlerinin dizilimine dayanarak, G-genotiplerine (VP7, glikoprotein) ve P-genotiplerine (VP4, proteaz duyarlı) ayrılırlar (de Waure *et al.* 2020). İkili G/P tipi sınıflandırma sistemi, on bir viral genin ikisi (VP7 ve VP4) dışında hepsini yok sayma sınırlamasına sahiptir. Sonuç olarak, ikili sistem, ortak dolaşımdaki RV'lerin genetik çeşitliliğini, evrimsel dinamiklerini ve etkileşimlerini yeterince değerlendirmek için gerekli verileri sunamaz. İki gelişme, bu sınırlamanın kısmen üstesinden gelmiştir: (i) RV suşlarının rutin tam genom dizilişine izin veren yüksek verimli dizileme teknolojilerinin ilerlemesi ve (ii) belirli bir genotipe atanacak her virüs genomu segmentinin rutin olarak tam genom dizilimine izin veren eksiksiz dizi tabanlı bir sınıflandırma sisteminin geliştirilmesi (Patton 2012). Bu sınıflandırma sisteminde, VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-

NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 Rotavirüs suşlarının genlerini tanımlamak için Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx kısaltmaları kullanılır (Matthijnssens *et al.* 2011). Bu sınıflandırma, spesifik nükleotit kesme birim yüzdelerine ve 11 gen segmentinin tümünün filogenetik analizine dayanmaktadır (Motayo *et al.* 2018). Suşların çoğu ya Wa-benzeri (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1), DS-1 (G2-P[4]-I2- R2-C2-M2-A2-N2-T2E2-H2) veya AU-1 ile ilgili (G3-P[3]-I3-R3-C3-M3-A3/A12-N3-T3-E3-H3/H6) genotipleri göstermektedir (Lestari *et al.* 2020). Hem hayvan hem de halk sağlığı için standart isimlendirme ihtiyacı, hayvan ve insan RV suşlarının ilişkisi konusundaki farkındalığımızı güçlendiren tam genom araştırmalarıyla vurgulanmıştır. Dünyanın her yerinden araştırmacılardan oluşan Rotavirüs Sınıflandırma Çalışma Grubu (RCWG), bu yaklaşımı sürdürmek, analiz etmek ve geliştirmek için kurulmuştur (Matthijnssens *et al.* 2011).

Dünya çapında altı G tipi (G1, G2, G3, G4, G9 ve G12) ve üç P tipi (P4, P6 ve P8) hakim olmasına rağmen, 32 G genotipi ve 47 P genotipi tespit edilmiştir. G1P8, G2P4, G3P8, G4P8, G9P8 ve G12P8, dünya çapında dolaşan A Grubu Rotavirüslerin %90'ından fazlasını oluşturan A Tipi Rotavirüsün altı suşudur (Crawford *et al*. 2018).

Çizelge 2.2 Rotavirüs sınıflandırılması

Alem	Riboviria
Hrallık	Orthornavirae
Filum	Duplornavirae
Sınıf	Resentoviricetes
Şube	Reovirales
Aile	Reoviridae
Alt aile	Sedoreovirinae

cins	Rotavirus
Türler	A, B, C, D, E, F, G

2.5 Rotavirüsün Epidemiyolojisi

İnsan rotavirüsü (RV), gelişmekte olan ülkelerde en yüksek sıklıkta olmak üzere, her yıl beş yaşın altındaki çocuklar arasında 453.000 ölüm ve 2,4 milyon hastaneye yatış ile dünya çapında çocuklarda şiddetli ishalin en yaygın nedenidir (Shaheen 2017). Güney ve Güneydoğu Asya ile Sahra Altı Afrika ve Hindistan'da her yıl yaklaşık 100.000 kişi ve Afrika ülkelerinde 200.000'den fazla kişinin ölmesi sonucu yüksek ölüm oranlarına sahiptir (Arun *et al.* 2019). A Grubu Rotavirüs, 4 ila 36 aylık çocuklarda en yüksek insidans ile dünya çapında 3 yaşından küçük çocuklarda ishalin en yaygın nedenidir. Bu çocuklar, öncelikle dehidrasyon nedeniyle hastaneye yatışlara daha duyarlıdır ve hastalığın ekonomik etkisi önemlidir (Luchs and Timenetsky 2016). Rotavirüsler dünyada oldukça yaygındır ve hemen hemen her çocuğu 3-5 yaşına kadar enfekte eder (Crawford *et al.* 2017). Bulaşıcı ishal, az gelişmiş ülkelerde gelişmiş ülkelere göre daha yaygındır. Bulaşıcı ishale; kötü hijyen, kirli su, enfekte gıda ve uygunsuz dışkı atılması neden olur (Lekana-Douki *et al.* 2015). Rotavirüs enfeksiyonları en çok ılıman bölgelerde kış ve ilkbaharın başlarında görülürken, diğer dönemlerde daha az vaka meydana gelir. Rotavirüs enfeksiyonları tropik bölgelerde yılın herhangi bir zamanında ortaya çıkabilirken, daha soğuk ve kurak aylarda daha fazla vaka görülür (Hart and Cunliffe 2020).

En yaygın G tipleri G1, G2, G3, G4, G9 ve G12 iken, P4, P6 ve P8 dünya çapında en yaygın P genotipleridir (Dey *et al*. 2020). RV'lerin geniş genetik ve antijenik çeşitliliğine rağmen, son otuz yılda insanlarda sadece birkaç RV tipi hakim olmuştur: G1P1A8, G2P1B4, G3P1A8, G4P1A8 ve daha yakın zamanlarda G9P1A8 ve G12P1A8 kuzey

amerika, avrupa ve avustralya'daki tüm RV enfeksiyonlarının %80 - 90'ını oluşturarak, yoğun bir şekilde birlikte dolaşıma girmiştir. G5, G6 ve G8 gibi diğer genotipler Afrika, Asya ve Güney Amerika ülkelerinde daha yaygındır (Desselberger 2014). G1P8, G2P4, G3P8, G4P8, G9P8 ve G12P8, dünya genelinde yaygın olarak bulunan RVA genotipleridir (Athiyyah *et al.* 2019).

Rotavirüs epidemiyolojisini araştırmak için dünya çapında birçok çalışma yapılmıştır. Bunlardan bazılarında; Latin Amerika'da %30, Avrupa'da %40, afrika ve orta doğu'da %34 – 40% rotavirüs ile ilişkili hastalık oranları tespit edilmiş ve bildirilmiştir (Nick *et al.* 2019). Dünya sağlık örgütü (DSÖ) tarafından İran, Irak, Suriye, Mısır, Umman, Ürdün, Yemen, Libya, Fas ve Tunus için Rotavirüs ile ilişkili gastroenterit oranının yüzde 14 ila 45 arasında olduğu belirtilmiştir (Nick *et al.* 2019). Avustralya, bangladeş, kanada, gine bissau, hindistan ve meksika'da, aşı öncesi dönemde rotavirüs enfeksiyonlarının doğal seyri üzerine yapılan araştırmalar, çocukların yüzde 64 - 80'inin bebeklik ve erken çocukluk döneminde en az bir kez Rotavirüs enfeksiyonu geçirdiğini göstermiştir (Burnett *et al*. 2018).

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ishal insidansı benzer olmasına rağmen, Rotavirüs ishali her birinde farklı özelliklere sahiptir. Gelişmekte olan ülkelerde hastalığın şiddeti ve mortalitesi çok yüksektir, enfeksiyonun aynı anda birçok suşu vardır ve hastalık çocukları küçük yaşta etkiler (Dhital *et al.* 2017). Birçok afrika ve asya ülkesinde, rotavirüs ishali sonucu hastaneye yatırılan çocukların ortalama yaşı 6 - 9 aydır ve %80'e kadarı bir yaşın altındadır. Gelişmiş ülkelerde ise ortalama enfeksiyon yaşı 13-16 aydır ve en yüksek vakalar yaşamın ikinci yılında meydana gelmektedir (Hart and Cunliffe 2020). Rotavirüs aşısının uygulanmaya başlamasından önce, çocukların yüzde 65'inden fazlası beş yaşından önce en az bir kez Rotavirüs ishal hastalığı geçirmiştir ve dünya çapında tüm nedenlere bağlı ishallerin %40'ından fazlası Rotavirüs kaynaklı olmuştur (Burnett *et al.* 2018). RV'ler aşırı derecede bulaşıcıdır; düşük oranda (virüs partikülü/ bulaşıcı birim sayısı) az sayıda Rotavirüs partikülü, duyarlı bir bireyi enfekte etmek için yeterlidir, enfeksiyonun akut aşaması sırasında veya enfekte olmuş bağışıklığı baskılanmış konaklar tarafından uzun süreler boyunca dışkıdaki viral partiküller büyük

oranda (10^{11} partikül/mL'ye kadar) saçılır ve RV partikülleri çevresel faktörlere, sıcaklık, pH, vb.'ne son derece dirençlidir (Desselberger 2014).

RV enfeksiyonunun neden olduğu ishal ortalamadan daha şiddetlidir; Rotavirüs tarafından üretilen ishal ataklarının oranı, ayakta tedavi %15 – 20% veya hastane bakımı (%30-50) gerektirenlere kıyasla sadece evde bakıma %5 – 10% ihtiyaç duyan toplum hastalarında en düşüktür. Rotavirüs aşılarının kullanılmaya başlanmasından önce, dünya çapında çok sayıda ülkede yapılan sürveyans çalışmalarında, beş yaşın altındaki çocuklarda ishal nedeniyle hastaneye yatışların %40'ının Rotavirüs enfeksiyonunu kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Aşının kullanıma sunulmasının ardından Rotavirüs epidemiyolojisindeki değişiklikleri takip etmek için sürekli izleme gerekmektedir. Genotiplemeye ek olarak, aşının uygulanmasından önce ve sonra o bölgede sirküle olan Rotavirüs suşlarının tam genomik analizi, aşıların Rotavirüs genom evrimini değiştirip değiştirmediğini belirlemeye yardımcı olabilmektedir (Crawford *et al*. 2018).

2.6 Patogenez

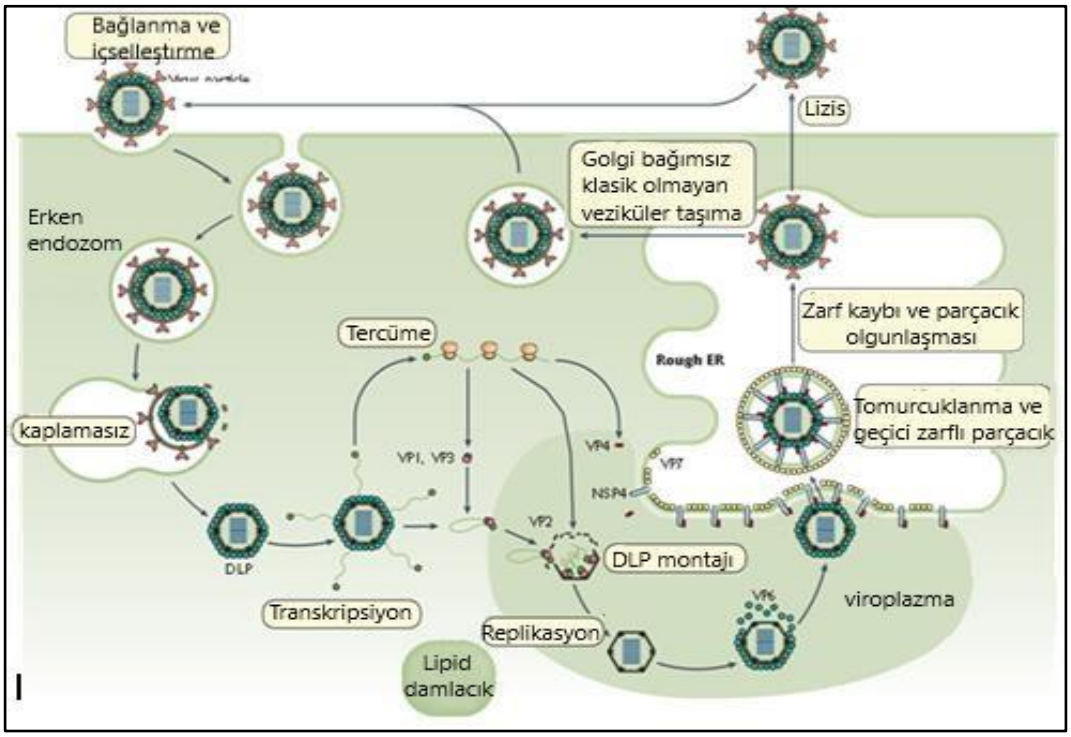
Rotavirüs, hem sanayileşmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde 3-5 yaş arasındaki hemen hemen tüm çocukları enfekte eder, yenidoğan enfeksiyonları meydana gelir, ancak bunlar muhtemelen annenin antikor korumasına bağlı olarak genellikle asemptomatik veya hafiftir. Gelişmiş ülkelerdeki vaka kontrol çalışmalarında; emzirme eksikliği, erken doğum ve düşük doğum ağırlığının, Rotavirüs gastroenteritinde hastaneye yatış riskinin artmasıyla bağlantılı olduğu bulunmuştur (Prez *et al.* 2015). Rotavirüs, gastroenteritli çocukların dışkısından yüksek konsantrasyonlarda (~10^{12} virus/g) atılır (Surendran 2008) ve duyarlı bireylerde enfeksiyonu indüklemek için sadece on enfeksiyöz partikül yeterlidir (Sadiq *et al.* 2018). Etken 2-3 günlük bir kuluçka süresine sahiptir (Kirkwood *et al.* 2019). RV'ler, memeli türlerinin ince bağırsaklarının villusunun üst ucundaki olgun enterositleri enfekte eder, burada vakuolizasyon ve ardından kript hiperplazisi gözlemlenebilir. Serum ve diğer konakçı vücut lokasyonlarında RV dsRNA, RV antijeni ve bazen enfeksiyöz RV'nin tanımlanmasıyla gösterildiği gibi, RV'nin ekstraintestinal

yayılımı yaygın olsa da, RV'nin ekstraintestinal yayılımı nadirdir (Desselberger 2014). Salgın süreçleri, enterik sinir sisteminin aracılık ettiği süreçleri ve sonuncusuna hücresel Cl kanallarının aktivasyonunun aracılık ettiği NSP4'ün etkisini içerir, bu da Cl'nin artmasına ve bunun sonucunda su salgısının artmasına neden olur. Rotavirüs enfeksiyonunun başlangıçta bağırsakla sınırlı olduğu varsayılmıştır, ancak immünokompetan yenidoğanlarda ve deneysel olarak enfekte olmuş hayvanlarda Rotavirüs, enfeksiyonun akut fazı sırasında en azından kısa bir süre için viremiye neden olur (Cunliffe *et al.* 2014). Rotavirüs hastalığı hafif, sulu ishalden kusma ve ateşle birlikte şiddetli ishale kadar dehidrasyon, şok, elektrolit dengesizliği ve hatta ölüme yol açabilen şiddetli ishal şeklinde kendini gösterebilir (Muendo *et al.* 2018). Rotavirüs A hastalığının belirtileri 1-3 gün süren kusmayı, ardından 4-8 gün süren bol ishali içerir. Rotavirüs A, bağırsak villuslarının uçlarını kaplayan olgun enterositlerin sitoplazmasında çoğalır, besinlerin emilmesini önler ve tedavi edilmezse ölümcül olabilen şiddetli ishale neden olur. Başlangıçtan iki gün önce ve on gün sonra, Rotavirüs A dışkıda yüksek konsantrasyonda tutulur ve fekal-oral yolla yayılır (Shrestha *et al.* 2019).

2.7 Rotavirüs Replikasyonu

Rotavirüs sadece ince bağırsağın olgun farklılaşmış villöz enterositlerini enfekte eder (Hart and Cunliffe 2020), bu tip hücrelerin etkili enfeksiyon ve replikasyon için gerekli bileşenleri eksprese ettiğini düşündürür (Hagbom *et al.* 2011, Saxena *et al.* 2016). Dış kapsid proteini VP4 (kendi VP8 alanı aracılığıyla) ve sialoglikanlar (gangliozidler GM1 ve GD1a gibi) ve histo kan grubu antijenleri (HBGA'lar) gibi konak hücre yüzeyindeki bağlayıcı ortaklar, rotavirüsün konak hücrelere bağlanmasından sorumludur (Arias *et al.* 2015). Yeni oluşturulmuş rotavirüs virionları tamamen bulaşıcı değildir; membran penetrasyonu için, VP4 spike proteini, konakçı gastrointestinal sistemdeki tripsin benzeri proteazlar tarafından VP8 (28 kDa) ve VP5 (60 kDa) olmak üzere iki parçaya proteolitik olarak bölünmelidir (prime edilmelidir) (Frankenberg 2012). Enfeksiyöz üç katmanlı partikülün dış tabakası, bağlanma ve penetrasyondan (TLP) sorumludur. Çift katmanlı partikülün (DLP) sitozole salınmasıdır. Şekil 2.4, iki dış katman proteini olan VP4 ve VP7'nin kaybıyla başarılı penetrasyonun sonucudur (Salgado *et al.* 2017). Rotavirüsün

replikasyon döngüsü sırasında, reseptör aracılı endositoz ve enfeksiyöz partikülün kısmi sindirimi, viral progen replikasyonunu başlatan transkripsiyonel olarak aktif çift katmanlı partiküllerin (DLP'ler) sitozole salınmasıyla sonuçlanır (Glück *et al.* 2017). DLP'ler, kapsid üzerindeki deliklerden sitoplazmaya girer. DLP'ler sitoplazmada transkripsiyonel olarak aktif moleküller haline gelir (Salgado *et al.* 2017). Polimeraz kompleksi (VP1 ve VP3), 11 çift sarmallı RNA (dsRNA) genomik segmentinin her birinden başlıklı pozitif anlamlı RNA'yı [(+)RNA'ları] kopyalamak için sitoplazmaya salınan DLP'lerde aktive edilir (Suzuki 2019). Beş katlı köşelerdeki sınıf I kanalların çapı, transkripsiyonel olarak aktif DLP'lerde artar ve ss (+) RNA transkriptlerinin sitoplazmaya salınmasına izin verir (Trask *et al.* 2012). Yeni oluşturulan (+) RNA iplikleri, birçok transkripsiyon turundan sonra DLP'lerden sitozole ekstrüde edilir (Libersou *et al.* 2008). Bir şablonun sitozole aktarılması için iki model sunulmuştur, her kanal tek tip RV segmentinin taşınmasında uzmanlaşmıştır ve kanal uzmanlaşma konseptine dayalı belirli bir transkripsiyonel komplekse bağlanmıştır. Kanal genelleme modelinde viral kapsid üzerindeki gözeneklerden gen bölümlerinin çoklu transkriptleri gerçekleştirilebilir ve her seferinde bir bölüm kapsidden dışarı çıkabilir (Sadiq *et al.* 2018). (+) sarmallı RNA'lar, sırasıyla dsRNA bölümlerinin ve virüs kodlu proteinlerin translasyonu ve replikasyonu için bir şablon olarak kullanılabilir (Jr *et al.* 2017). Yapısal olmayan protein NSP2, son DLP birleştirmesinden önce elimine edilmelidir, DLP'ler viroplazmadan çıkar ve komşu endoplazmik retikulumda tomurcuklanır, burada VP4 ve VP7 ilavesiyle TLP'lere dönüştürülür (Long and Mcdonald 2017). İzole Rotavirüs düzeneği ara ürünlerinin yapılarını, bileşimlerini ve aktivitelerini daha iyi bir çözünürlükte anlamak ve bu potansiyel erken morfogenez modelini test etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



Şekil 2.4 Rotavirüs replikasyon döngüsü (Crawford *et al.* 2018)

2.8 Bulaşma

Rotavirüs, kişinin ellerini enfekte kişilerin dışkısıyla kontamine ederek bulaşır ve daha sonra ağız veya solunum sistemine gider (Fattah *et al.* 2020). Nozokomiyal rotavirüs enfeksiyonu, RV enfeksiyonunda artışa ve uzun süreli hastanede yatıştan kaynaklanan önemli mali kayıplara neden olan bir rezervuar işlevi görür (Frühwirth *et al.* 2001). Gelişmiş ülkelerde, RV enfeksiyonlarının yaklaşık %11 ila %32'si hastanelerde bulaşır, bu da hastane enfeksiyonlarının hastalık yükünün önemli bir kısmından sorumlu olduğunu gösterir (Sadiq *et al.* 2018). Rotavirüsler, elde edilen raporlara gore gram başına 10^{11}'den fazla partiküle dışkıda çok sayıda salgılanır (Kirkwood *et al.* 2019). Hayvan modellerinde ve insanlarda rotavirüs patogenezinin mekanizmaları araştırılmıştır. Rotavirüsün 100-1000 viral partikülden oluşan bulaşıcı bir doza sahip olduğu düşünülmektedir. Rotavirüs çoğunlukla fekal-oral yolla bulaşır, ancak kontamine eller, yüzeyler ve ortamdaki nesneler ve nadir durumlarda yiyecek ve içecekler yoluyla da

yayılabilir (Prez *et al.* 2015). Rotavirüsün, bakıcıların ellerini enfekte fomitler veya yüzeylerle kontamine ederek bir çocuktan diğerine bulaştığı da düşünülmektedir (Dennehy 2000). Rotavirüs dışkıda stabildir ve oda sıcaklığında; doğum üniteleri, hastane koğuşları ve küçük çocuklar için kreşler de dahil olmak üzere çeşitli ortamlarda kolayca yayılarak günlerce hayatta kalabilir (Kirkwood *et al.* 2019). Ayrıca Rotavirüs kuru yüzeylerde on günden fazla ve insan ellerinde dört saate kadar hayatta kalabilir (Chen *et al.* 2012). Aerosol iletimi de olası bir faktör olarak belirtilmiştir. Kısa kuluçka süresi (13 gün) ve rotavirüs gastroenteritinin sıklıkla patlayıcı salgınlarda ortaya çıkması, rotavirüs gastroenteritinin hava yoluyla yayılmasının çoğunlukla ikinci derece kanıtıdır. Sınırlı sayıda kişide solunum salgılarında rotavirüs tespit edilmiştir ve zatürre vakaları bildirilmiştir. Ayrıca, bazı araştırmalara göre, rotavirüsü olan bireylerin %50'sine kadarında solunum yolu semptomları ve orta kulak iltihabı gelişir. Rotavirüs enfeksiyonu olan hastanede yatan çocukların odalarından toplanan hava örneklerinden alınan RNA'dan elde edilen erken verilere göre, hava yoluyla bulaşma hastane ve kreş ortamlarında önemli bir bulaşma modu olabilir (Chen *et al.* 2012).

2.9 Belirtiler

Rotavirüs hastalığının klinik spektrumu; sınırlı süreli hafif, sulu ishalden dehidratasyon, şok, elektrolit dengesizliği ve ölüme yol açabilen kusma ve ateşle birlikte şiddetli ishale kadar uzanır (Vidya *et al.* 2015). Kuluçka süresi yaklaşık 2 gündür ve belirtiler arasında ateş, kusma nöbetleri ve mide ağrısının izleyebileceği veya izleyemeyeceği sulu akut ishal bulunur. Hastalık kendi kendini sınırlar ve gastrointestinal belirtiler normalde üç ila yedi gün içinde kaybolur (Betancourt 2019). Vakaların üçte birinden fazlasının ateşi 39 °C ve üzerindedir (Vidya *et al.* 2015). Rotavirüs enfeksiyonu, 3 ila 36 aylık çocuklarda en yaygın ve şiddetli olarak seyreder. Daha büyük çocuklarda ve yetişkinlerde kazanılmış bağışıklık genellikle gelecekteki nöbetleri hafif veya asemptomatik hale getirse de, yaşam boyunca birden fazla enfeksiyon meydana gelebilir (Chen *et al.* 2012). Rotavirüsler genellikle üst ince bağırsakta olgun enterositleri enfekte etseler de, gastrointestinal

sistemin dışına yayılabileceğine ve ateşli nöbetler gibi nadir görülen ekstra bağırsak semptomlarına ve ensefalit gibi merkezi sinir sistemi hastalıklarına neden olabileceğine dair artan kanıtlar vardır (Justino *et al.* 2019). Rotavirüs ağırlıklı olarak enterositleri enfekte eder ve emici enterositleri yok ederek (malabsorbsiyonla sonuçlanır), rotavirüs yapısal olmayan protein 4 aracılığıyla bağırsak salgısını uyararak ve enterik sinir sistemini aktive ederek ishale neden olur. Ayrıca, rotavirüs enfeksiyonları antijenemiye (daha şiddetli akut gastroenterit semptomları ile bağlantılıdır) ve viremiye neden olabilir ve rotavirüs sistemik yerlerde çoğalabilir (Crawford *et al.* 2017).

2.10 Rotavirüsün Teşhisi

Dışkıda rotavirüs tespiti çeşitli yöntemler kullanılarak yapılabilir. Bu testler arasında virüs çoğaltma, elektron mikroskobu (EM), enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA), lateks aglütinasyon testi (LAT), poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ve ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yer almakta olup kendilerine göre avantajları ve dezavantajları vardır (Lorestani *et al*. 2019). Elektron mikroskobu, diğer olası viral enteropatojenleri tanımlayabilen kapsamlı bir yöntem olduğundan, halen değerli bir tanı aracıdır (Hart and Cunliffe 2020). Rotavirüs mevsiminde bile rotavirüs hastalıklarının klinik ve epidemiyolojik belirtileri (şiddetli ishal, kusma, dehidratasyon, küçük çocuklarda ateş ve tropikal olmayan yerlerde mevsimsellik) tanıya izin verecek kadar belirgin değildir. Bu nedenle, doğru bir teşhis, virüsün veya viral antijenin, virüse özgü bir serolojik reaksiyonun ve hatta virüs gen fragmanlarının tanımlanmasını gerektirir. Rotavirüs hastalığının geleneksel epidemiyolojik belirtileri, hastalığın teşhisinde yardımcı olabilir, ancak rotavirüs enfeksiyonu doğrulaması için laboratuvar teyiti gereklidir. Elektron mikroskobu, PAGE, antijen saptama testleri, RT-PCR ve viral izolasyon gibi çeşitli yöntemler, gastroenteritli çocuklardan alınan dışkı örneklerinde rotavirüsü tanımlamak için kullanılabilir. Başlangıçta RV, hem immünolojik serum aglütinasyonu olan hem de olmayan elektron mikroskobu ile teşhis edilmiştir (Prez *et al.* 2015). Enfeksiyonun akut fazı sırasında, büyük miktarlarda RV partikülü (10^{11}/g dışkıya kadar) dışarı atılır ve şiddetli ishali olan çocukların daha yüksek miktarda virüs atıyor gibi görünmektedir (Kang *et al.* 2004, Kirkwood *et al.* 2019). Çift sarmallı RNA genomunun

11 segmentinin elektroforetik göç modeli, dolaşımdaki suşların ilişkisinin analizine izin verir. Doğrudan dışkı örneklerinden ekstrakte edilen Rotavirüs RNA, poliakrilamid jel elektroforezi ile tespit edilir. Rotavirüs testinin bulguları tedaviyi etkilemediği için gastroenteritli çocuklarda düzenli olarak yapılmaz. Ticari olarak erişilebilen enzim bağlantılı immünosorbent testleri (ELISA'lar) ve immünokromatografik testler gibi antijen saptama prosedürleri, test sırasında sıklıkla kullanılır. Bu testlerin çoğunun duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça iyidir (%90 - 95) Araştırma laboratuvarlarında, viral genomları tanımlamak için sıklıkla RT-PCR kullanılır. Rotavirüs suşlarını G ve P türleri olarak sınıflandırmak için kullanılan VP7 ve VP4 genotipleri hakkında bilgi içerir (Prez *et al.* 2015). Dışkı örneklerinde viral antijenlerin, özellikle VP6 glikoproteinin tanımlanması, serogrup A rotavirüs enfeksiyonlarını teşhis etmek için kullanılır. Şu anda diğer serogruplardan rotavirüs tespit etmek için ticari olarak mevcut teknikler bulunmamaktadır. ELISA, membran EIA, ICT ve lateks aglütinasyon dahil olmak üzere çok sayıda format mevcuttur (Dusetty *et al.* 2013, Gautam *et al.* 2013, Khamrin *et al.* 2011). Az veya seyrek numunesi olan hastaneler için membran EIA, ICT yaklaşımları ve lateks aglütinasyon uygun prosedürlerdir. Bununla birlikte, geleneksel ELISA'lardan daha az hassastırlar. RT-PCR, giderek daha hassas ve seçici moleküler prosedürlerde kullanılmaktadır. Pazarlanan sistemler, RT-PCR ile Grup A Rotavirüsünü teşhis etmek için NSP3 yapısal olmayan proteini kodlayan genin belirli primerlerini kullanır. Bu yaklaşım aynı zamanda rotavirüsün farklı serogruplarını da tanımlayabilir (Balsalobre-Arenas and Alarcón-Cavero 2017).

2.10.1 Elektron mikroskobu

RVA'yı teşhis etmek için yapılabilecek çeşitli testler vardır. Elektron mikroskobu (EM) eskiden tanı laboratuvarlarında virüsü tespit etmek için standart yöntem olmuştur. Ancak, mikroskobun yüksek maliyeti ve bakımının yanı sıra gerekli teknik beceriler nedeniyle bu yaklaşım gözden düşmüştür. Ayrıca, EM duyarsız olup tespit için 106 viral partikül/ml'ye ihtiyaç duymaktadır (Soltan *et al.* 2016). Halk sağlığı laboratuvarlarında, enterik virüsler için dışkı örneklerini taramak için doğrudan EM kullanılabilir. Tepki süresi hızlıdır (aynı gün numune gönderimi ve sonuçlar alınabilir) ve EM'nin çok çeşitli

enterik viral enfeksiyonlar için bir tanı ortaya koymak için de faydalıdır (Sidoti *et al.* 2015). Virüsler, doğrudan EM kullanılarak çeşitli klinik örneklerde bulunmuştur. Yaklaşımın seçici olmayan doğası ve virüs aileleri arasındaki morfolojik farklılıklar bunu akla yatkın hale getirmiştir. Virüsler boyutlarına ve şekillerine göre üç morfolojik gruba ayrılır: (1) sarmal simetri, (2) kübik veya ikosahedral simetri ve (3) diğer veya karmaşık simetri. ELISA, PCR ve NAT ile karşılaştırıldığında EM'nin iki avantajı vardır. Hızlı ve kolay bir negatif boyamadan sonra, EM, test edilen numunede mevcut olan çeşitli enfeksiyöz ajanların hızlı morfolojik tanımlaması ve ayırıcı tanısı için kullanıma hazırdır (Arientova 2010). Rotavirüs partiküllerinin morfolojik görünümü belirgindir ve virüsün mikroskobik olarak tanımlanmasına izin verir. Diğer enteropatojenlerden farklı morfolojik görünümü nedeniyle, dışkı örneklerinin elektron mikroskobu (EM) ile doğrudan görüntülenmesi yüksek özgüllük avantajına sahiptir (Greenberg and Estes 2009). Negatif olarak boyanmış dışkı numunelerinde EM, 70 nm partiküller göstermiştir. Reovirüs benzeri, orbivirüs benzeri, duovirüs, infantil gastroenterit virüsü veya "yeni" bir virüs ilk başta viral partiküle verilen isimler olmuştur. EM'de görülen tekerlek benzeri yapıya, sonunda Rotavirüs (rota, Latincede tekerlek anlamına gelir) adının verilmesine yol açmıştır (Lestari *et al.* 2020). EM, rotaviral hastalıkların tanısında önemli olmaya devam etmektedir ve sıklıkla diğer tekniklerden elde edilen sonuçlardaki farklılıkları gidermek için ve rotavirüsler için yalnızca birkaç numunenin incelenmesi gerektiğinde kullanılır. Bu yöntem, çok sayıda dışkı örneğinde rotavirüsün rutin tespiti için fazla emek gerektirmektedir. Ek olarak, EM pahalı bir ekipman ve yüksek eğitimli personel gerektirir ve farklı gruplara ait rotavirüsler arasında ayrım yapamaz çünkü farklı gruplardaki rotavirüsler elektron mikroskobu altında görünüm açısından benzersiz değildir (Lesta 2018). Elektron mikroskobu bulgularının temel faydası, antijen veya nükleik asit tipi varlığından ziyade morfolojiye dayalı olmalarıdır. Antijen veya nükleik asit tespiti, canlı bulaşıcı virüs partiküllerinin varlığını mutlaka göstermeyebilir, ancak EM ile gözlenen tam viryonların bulaşıcı virüsü düşündürmesi muhtemeldir. Hem EM hazırlama hem de değerlendirme otomatik olarak yapılamaz; deneyimli ve özverili personele ihtiyaç duyar. Tanısal EM'nin diğer bir sınırlaması, diğer tanı prosedürlerine kıyasla sınırlı duyarlılığıdır (mL başına 105-106 partikül). Öte yandan, klinik numuneler genellikle bu sınırı birçok büyüklük sırası ile aşan viral konsantrasyonlar içerir. Sonuç olarak, olumsuz kanıtlar kesin bir tanı değildir (Arientova 2010).

2.10.2 Antijen tespiti

2.10.2.1 Enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA)

Serogrup A Rotavirüs tanımlaması için, özellikle VP6 glikoprotein olmak üzere dışkı örneklerinde viral antijenlerin tanımlanması yoluyla Rotavirüs enfeksiyonlarını teşhis etmek için kullanılır (Balsalobre-Arenas and Alarcón-Cavero 2017). ELISA, lökosit B hücreleri ve antijenler tarafından üretilen antikorlar arasındaki kimyasal etkileşimi gösteren antijen-antikor etkileşimleri kavramına bağlıdır. Bu özel bağışıklık tepkisi, vücudu enfeksiyonlar ve toksinler gibi davetsiz misafirlerden korumada önemlidir (Sakamoto *et al.* 2018). Test antijeni için genellikle bir mikroplakanın kuyularına bağlanan spesifik antikorlar kullanırlar. Klinik numunedeki antijen, katı faza bağlı antikor ile karıştırılır ve antijenin varlığı, bir enzime konjuge edilmiş ikinci bir antikor kullanılarak belirlenir. Peroksidaz ve alkalin fosfataz en sık kullanılan enzimlerdir. Enzim substrat ile reaksiyona girdiğinde, çıplak gözle görülebilen veya 450 nm'ye ayarlanmış bir spektrofotometre kullanılarak ölçülebilen kolorimetrik bir sinyal üretir. Bu prosedürlerin duyarlılığı ve özgüllüğü genel olarak mükemmeldir. Aynı anda birçok numune partisinin işlenmesini ve ayrıca belirli durumlarda keşfedilen antijenin miktarının belirlenmesini sağlarlar. Birçok reaktifin, yıkama aşamalarının ve inkübasyon sürelerinin kullanılmasını gerektiren zaman alıcı prosedürlerdir. Bununla birlikte, kolayca otomatikleştirilirler (Balsalobre-Arenas and Alarcón-Cavero 2017).

2.10.3 Moleküler teknikler

Viral testler için moleküler tanı yöntemleri son yıllarda hızla ilerlemiş ve laboratuvarların çoğu tarafından virüsler gibi insan enfeksiyonlarına sebep olan etkenleri teşhis etmek için yeni bir yöntem olarak benimsenmiştir (Cobo 2012). Nükleik aside dayalı moleküler tespit teknikleri, daha hızlı, daha hassas ve çok spesifik bir teşhis yoluyla virolojik teşhiste devrim yaratmıştır (Shen *et al.* 2020). Bu yöntemler belirli nükleer asit dizilerini tespit

ettiğinden, tespit için insanları etkileyen hemen hemen her virüs için nükleer asit üzerinde teşhis testleri yapılabilir (Cobo and Talavera 2006). Viral genomik materyalin amplifikasyonunu içeren moleküler teknikler son derece hassas ve spesifiktir, hızlı teşhise olanak tanır ve aynı anda birçok virüsü tespit edebilir.

Nükleik asit amplifikasyon teknikleri, izolasyonu zor olan virüsleri, yavaş büyüyen kültür virüslerini ve antijenik varyantlar sergileyen virüsleri tespit etmek için oldukça faydalıdır (Reta *et al.* 2020). Pediatrik hastalarda gastroenterite neden olan viral ajanların tanımlanması ve akut gastroenterite neden olan ajanın gerçek varlığının bir göstergesini sunmak için dışkı örneklerinin taranması için çeşitli hassas ve hızlı moleküler teknikler uygulanmıştır (Lorestani *et al.* 2019). PCR, tanıtılmasından bu yana insan viral enfeksiyonlarını teşhis etmek için kullanılmıştır ve genel klinik duyarlılığı %77,8 ila %100 arasında ve klinik özgüllüğü %89 ila %100 arasında değişmektedir (Reta *et al.* 2020). Spesifik bir nükleik asit dizisi, PCR kullanılarak milyonlarca kopya halinde sentezlenebilir. Bu kimyasal reaksiyon, bir DNA zincirini kopyalayabilen bir DNA polimerazın etkisi nedeniyle gerçekleşir. Hedef DNA, iki oligonükleotit primeri, bir DNA polimeraz, deoksiribonükleotit trifosfatların (dNTP'ler), $MgCl_2$, KCl ve Tris-HCl tamponunun bir kombinasyonu, bir PCR karışımında kullanılır. Programlanabilir bir termal döngüleyicideki reaksiyon karışımı, çoklu döngüler için ısıtılır ve soğutulur ve hedef dizi 2n kat büyütülebilir. PCR prosedürünü takiben, amplifiye edilmiş sonuç çeşitli yöntemler (örn. jel analizi, kolorimetrik saptama) kullanılarak saptanmalıdır (Cobo 2012). Virüs genotipleme ve RNA göç modellerini değerlendirmek için ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu ve poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) gibi moleküler teknikler kullanılabilir (Dubal *et al.* 2015).

2.10.3.1 Ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR tekniği, RNA hedeflerini amplifiye etmek için tasarlanmıştır (Cobo and Talavera 2006). Bu yöntemde, viral RNA hedeflerini daha sonra standart PCR

kullanılarak amplifiye edilen tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüştürmek için ters transkriptaz kullanılır (Cobo and Talavera 2006, Dhital *et al.* 2017). Geliştirilmesinden bu yana, RNA virüsleri tarafından insan enfeksiyonunu teşhis etmek için ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılmıştır. Viral enfeksiyonun saptanmasında, geleneksel RT-PCR, %73 ila %100 arasında değişen genel duyarlılık ve %99 ila %100 arasında değişen özgüllük ortaya çıkarmıştır (Reta *et al.* 2020).

RT-PCR testleri, daha yüksek RVA algılama hassasiyeti elde etmek için bir veya iki aşamalı ters transkript ve ardından bir amplifikasyon tekniği kullanır ve tümü, RT-PCR karışımına eklenmeden önce dsRNA denatürasyonu gerektirir (Mijatovic-Rustempasic *et al.* 2013). Reaktin PCR'lerinin çoğu, Grup A rotavirüslerini tanımlamak için geliştirilmiştir, ancak Grup B ve C tespiti için PCR'ler de mevcuttur. RV'ü saptamak için, Rotavirüsleri saptamaya yönelik primerler, VP6 genine yönlendirilirken, genotipleme için primerler, VP7 ve VP4 kodlayan genlere yöneliktir. RT-PCR, rotavirüsleri karakterize etmek için de kullanılabilir (Jain 2017). Yarı yuvalanmış RT-PCR, viral RNA'nın ters kopyalandığı ve G veya P serotip genleri için konsensüs primerlerinin varlığında amplifiye edildiği genotipleme için kullanılır (Lorestani *et al.* 2019). Primerler birçok farklı stereotip için tasarlanmıştır ve rotavirüs suşlarının çoğunu çoğaltabilir. Birinci tur PCR'den başvuran, genotipe bağlı olarak çeşitli boyutlarda ürünler üretmek için bir konsensüs primeri ve genotipe özgü primerlerin bir kombinasyonunu kullanan ikinci tur PCR'de şablon olarak kullanılır (Jain 2017). Genotipler, amplifiye edilen ürünün boyutuna dayalı olarak agaroz jel elektroforezi kullanılarak tanımlanabilir (Jasim 2019).

2.11 Bağışıklık Yanıtı

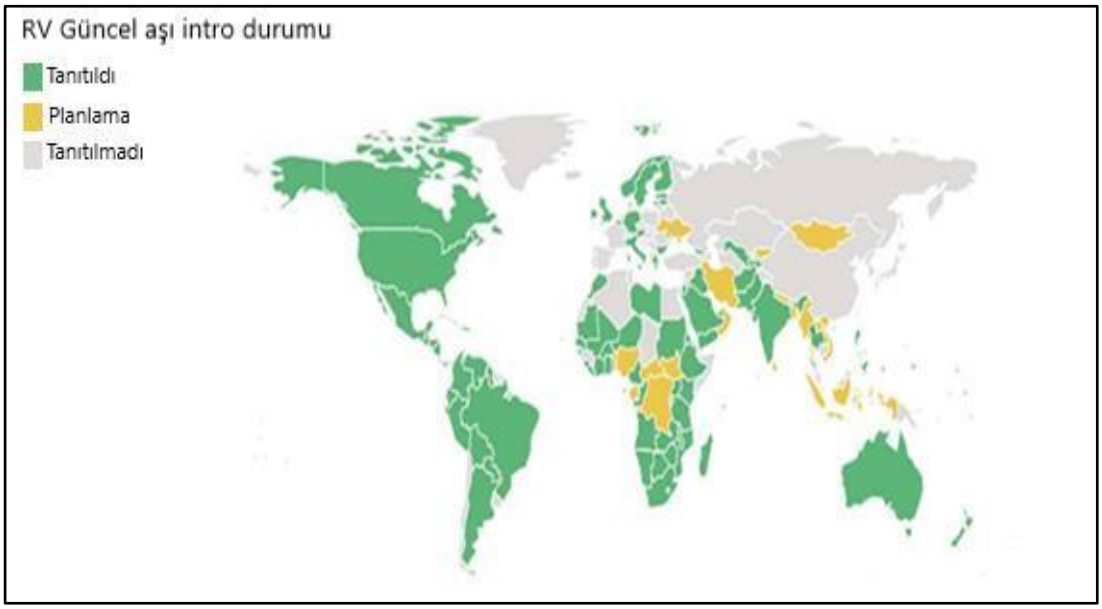
Rotavirüsler ilk olarak enterositlerde veya bağışıklık sistemi hücrelerinde (makrofajlar, dendritik hücreler veya adaptif B hücreleri ve T hücreleri dahil) patern tanıma reseptörleri (PRR'ler) tarafından tanımlanır (Crawford *et al.* 2018). Maternal antikorlar yenidoğana iki farklı yolla iletilir: (1) immünoglobulin G'nin (IgG) yenidoğanın dolaşımına plasental transferi ve (2) esas olarak IgA'nın yenidoğanın gastrointestinal sistemine anne sütü ile geçişi (Otero *et al.* 2020). IgA'nın koruyucu işlevi, Rotavirüs hümoral ve hücre aracılı

bağışıklıkta (CMI) antikorları ve T hücrelerini nötralize etme işlevi geniş çapta araştırılmıştır ve bu rolleri destekleyen kanıtlar kapsamlıdır. Bununla birlikte, bu immünolojik bileşenlerin koruyucu etkisi hala bir ihtilaf ve tartışma kaynağıdır (Malm *et al.* 2019). Artan kanıtlara göre, doğuştan gelen bağışıklık tepkileri, konakta Rotavirüs proliferasyonu ve hastalığına karşı ilk savunma hattı olarak önemli görünmektedir. Ek olarak, doğuştan gelen tepkiler, önceki konak-virüs modellerinde gösterildiği gibi, adaptif tepkilerin yoğunluğu ve uzun ömürlülüğünde rol oynayabilir (Holloway and Coulson 2013). Hayvan modelleri ve insan araştırmaları, RV'ye özgü T lenfositlerin, örneğin interferon-gama (IFN-γ) salınımının aracılık edebileceği viral klirenste bir rolü olduğunu göstermektedir. RV ile enfeksiyon hem CD4+ hem de CD8+ T hücre yanıtlarına neden olur, ancak bu seviye CMV gibi diğer virüslerden çok daha düşüktür (Malm *et al.* 2019). Doğal (spesifik olmayan) ve adaptif (spesifik) bağışıklık, rotavirüs enfeksiyonu veya aşılama ile indüklenir. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, RV enfeksiyonundan sonra hızla aktive olur ve bu da konak hücrede RV replikasyonunu baskılayan güçlü bir antiviral durumla sonuçlanır (Sadiq *et al.* 2018). Viral enfeksiyona yanıt olarak makrofajlar, tip I ve tip III interferonlar (IFN'ler) ve diğer sitokinleri üreten doğuştan gelen bağışıklık sistemine aracılık eder (Di Fiore *et al.* 2015). Doğuştan gelen bağışıklık, sonradan gelen adaptif bağışıklığın düzgün çalışması için gereklidir. Hümoral ve hücre aracılı bağışıklık tepkileri, antijen özgüllüğü ve hafıza ile tanımlanan adaptif bağışıklık tarafından uyarılır (Sadiq *et al.* 2018).

2.12 Aşı

2009'dan beri Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), rotavirüs aşısının tüm ulusal aşı rejimlerine dahil edilmesini tavsiye etmektedir (Napolitano *et al.* 2019). Bu aşıların, ülke ölüm katmanlarına bağlı olarak RV1 için %57 ila %85 ve RV5 için %45 ila %90 arasında değişen aşı etkinliği ile dünya çapında rotavirüs gastroenteritini ve hastaneye yatışları önlemede etkili olduğu gösterilmiştir ve çocukluk ölümlerinin daha düşük olduğu

ülkelerde daha yüksek aşı etkinliği görülmüştür (Jonesteller *et al.* 2017). Monovalan Rotarix (RV1; GlaxoSmithKline, Rixensart, Belçika) ve beşLİ RotaTeq (RV5; Merck, West Point, PA, ABD) Rotavirüs aşıları artık dünya çapında kullanılmaktadır (Aliabadi *et al.* 2019). RotaTeq, 2 aylık, 4 aylık ve 6 aylıkken 3 doz oral doz şeklinde verilir (RoczoFarkas *et al.* 2018). RV5 aşısı, insan VP4 veya VP7'yi eksprese eden rotavirüs suşu G1, G2, G3, G4 ve P1A[8] kaynaklı beş sığır-insan reassortant rotavirüsünden oluşan canlı zayıflatılmış bir pentavalan aşıdır (Crawford *et al.* 2018). Rotarix, iki ve dört aylıkken iki doz oral rejimde verilen tek bir zayıflatılmış insan G1P[8] rotavirüs suşudur (RoczoFarkas *et al.* 2018). 2 Aralık 2016 itibariyle, 82 ülke rotavirüs aşılarını ulusal aşı programlarına dahil etmiş ve 6 ülke daha yerel düzeyde rotavirüs aşılarını uygulamaya koymuştur. Rotavirüs aşıları, diğer birçok ülkede serbest piyasada da mevcuttur (Jonesteller *et al*. 2017). Rotavirüs gastroenterit yükünü güvenilir bir şekilde ölçmek ve aşıların etkisini değerlendirmek için yüksek kaliteli sürveyans verileri gereklidir. DSÖ, altı DSÖ bölgesinin (Afrika Bölgesi, Amerika Bölgesi, Güneydoğu Asya Bölgesi, Avrupa Bölgesi, Doğu Akdeniz Bölgesi ve Batı Pasifik Bölgesi) her birinden (Afrika Bölgesi, Amerika Bölgesi, Güneydoğu Asya) mevcut sentinel hastane Rotavirüs sürveyans platformlarını bir araya getirerek bu ihtiyacı karşılamak için Aşı İttifakı Gavi'nin finansmanıyla 2008 yılında Küresel Rotavirüs Gözetim Ağı'nı (GRSN) kurmuştur (Aliabadi *et al.* 2019). Rotavirüs aşılama programlarının küresel olarak eklenmesi ve etkinliklerinin kanıtı, tarihin en hızlılarından biri olmuştur. Şu anda 95 ülke, aşı satın almak için Gavi Alliance fonunu kullanan 45 Gavi'ye uygun ülke de dahil olmak üzere, ulusal çocuk aşılama programlarına rotavirüs aşısını dahil etmiştir (Şekil 2.5) (Steele *et al*. 2019).



Şekil 2.5 Rotavirüs aşılarının küresel tanıtımı (Steele *et al.* 2019)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Araç ve gereçler

Bu çalışmanın prosedürlerinde kullanılan ekipman ve aletler, menşei ülkeleri ile birlikte Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Bu çalışmanın prosedürlerinde kullanılan ekipman ve aletler

NO.	Araç ve Gereçler	Şirket/ Ülke

1	Otoklav	Astell / İngiltere
2	Derin dondurucu	Climas/ İspanya
3	Biyogüvenlik kabini	Labconco/ USA LabNet
4	Yüksek Hızlı Soğuk santrifüj	LabNet /ABD Climas/
5	Mikropipetler0,5-10,10-100,100-1000µL	CYAN/ Belçika
6	Nano damla spektrofotometresi	THERMO/ ABD
7	Eppendorf mikrosantrifüj	Bioneer/ Kore Gallen
9	Hassas elektron Terazisi	Intris (Almanya)
10	Ultraviyole ışık transillüminatör	Kore
11	Silindir tüp karıştırıcı	Waplab/ Endonezya
12	Vorteks	Tayvan
13	Termal manyetik karıştırıcı	Thermo Scientific/ Singapur
14	Mikroskop	Olympus/Japonya
15	Çalkalayıcı	Labove/ Almanya
17	PCR	Labnet/ ABD
18	Benmari	Plymouth/ ABD
19	Soğuk raf tüpleri	BIO BASIC INC. ABD
20	Tahta çubuklar	Meheco /Çin
21	Düz tüpler 10 mL-5 mL	Plane / Ürdün
22	Buzdolabı	Concord /Lübnan
23	Tek kullanımlık uçlar (beyaz, sarı, mavi)	Bioneer/Kore
24	Filtreli tek kullanımlık uçlar	Bioneer/Kore
25	Exispin girdap santrifüjü	Bioneer/Kore
26	Tozsuz Tek Kullanımlık Eldivenler	Çin
27	Eppendroff tüpleri (1,5) mL	Bioneer/Kore
28	Cam şişe 100 – 1000 mL	Oxford/ ABD
29	Steril maske	Çin
30	Jel elektroforezi	Kore

3.1.2 Kimyasallar

Bu çalışmanın prosedüründe kullanılan kimyasallar ve kaynakları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Bu çalışmanın prosedürlerinde kullanılan kimyasallar

No.	Malzemeler	Şirket/ Menşei
1	Mutlak etanol	BDH/ İngiltere
2	Mutlak aseton	BDH/ İngiltere
3	Sodyum klorür çözeltisi	Pioneer/ Irak
4	Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS)	Fischer/ İngiltere
5	Nükleaz içermeyen su	Promega/ ABD
6	ÇAY tamponu	Neb/ İngiltere
7	Etidyum bromür	Intron/ Kore
8	Agaroz jel	Ronadisa/ İspanya

3.1.3 Primerler

Rotavirüs suşlarının doğrudan tespiti için kullanılan primerler (Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4) (DSÖ 2009), referanslarından alınmıştır ve Makrojen/ Kore tarafından sağlanmıştır.

Çizelge 3.3 VP7 genotipe özgü primerler

Primer	Dizin (5’ - 3’)	G tipi	nt konumu
İlk amplifikasyon konsensüs primerleri			
9con1	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	VP7-F	904 bp
9con2	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	VP7-R	
İkinci amplifikasyon genotipleme primerleri			
9T-1	TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG	G1	158 bp
9T-2	GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT	G2	244 bp
9T-3	GTC CAG TTG CAG TGT AGC	G3	466 bp
9T-4	GGG TCG ATG GAA AAT TCT	G4	403 bp
9T-9	TAT AAA GTC CAT TGC AC	G9	110 bp

Çizelge 3.4 VP4 genotipine özgü primerler

Primer	Dizin (5’ - 3’)	P tipi	nt konumu
İlk amplifikasyon konsensüsü			
con3	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	VP4-F	876 bp
con2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	VP4-R	
İkinci amplifikasyon			
1T-1	TCT ACT TGG ATA ACG TGC	P8	345 bp
2T-1	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	P4	483 bp
3T-1	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	P6	267 bp
4T-1	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	P9	391 bp

5T-1	ATC ATA GTT AGT AGT CGG	P10	583 bp
ND2	AGC GAA CTC ACC AAT CTG	P11	122 bp

3.1.3 Kitler

Bu çalışmada kullanılan kitler Çizelge 3.5'de listelenmiştir.

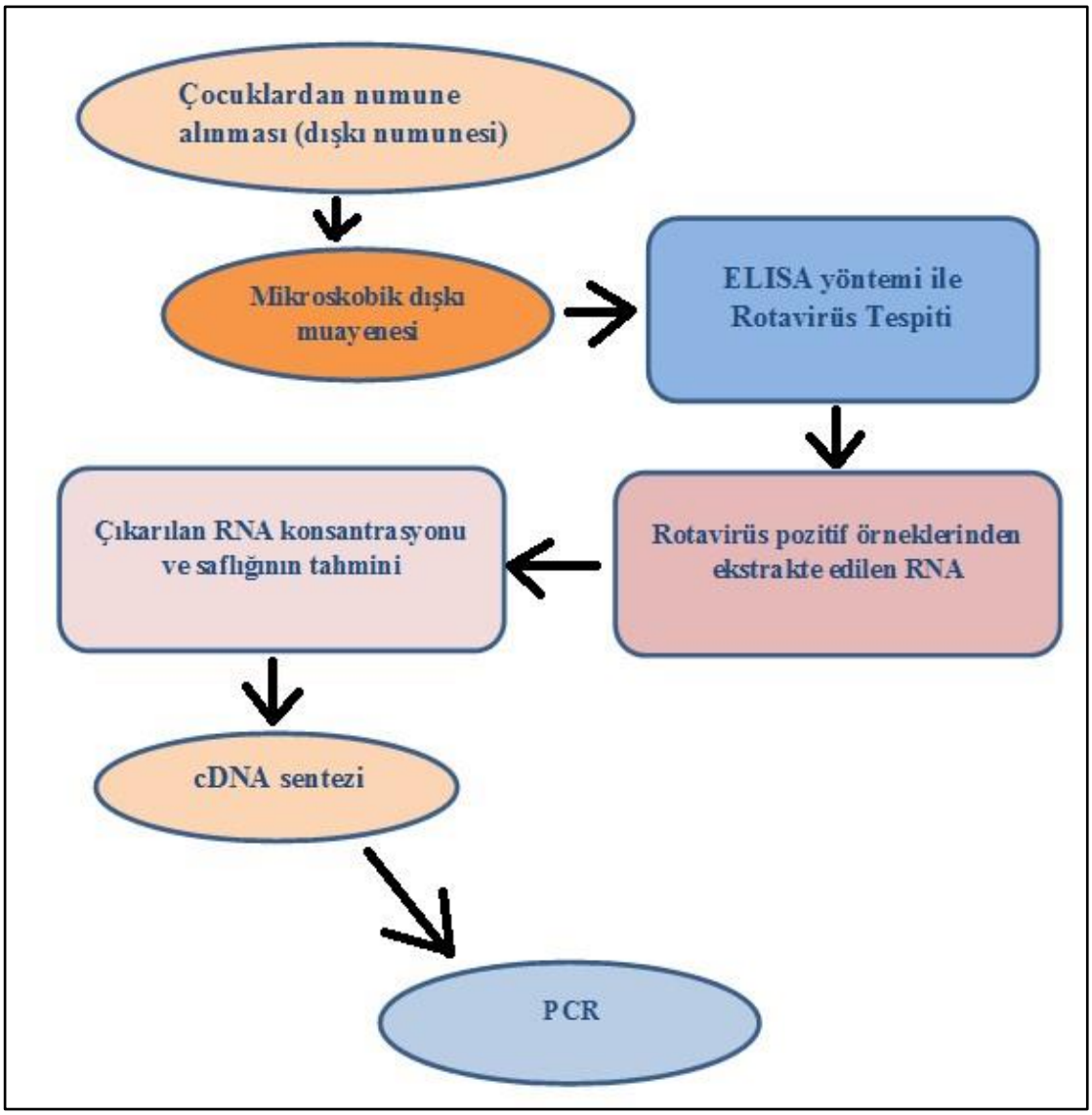
Çizelge 3.5 Bu çalışmada kullanılan kitler

No.	Kit	Ülke
1.	**Viral nükleik asit ekstraksiyon kiti**	**Geneaid -Tayvan**
a.	Lizis tamponu	
b.	Ad tamponu	
c.	W1 tamponu	
d.	Yıkama tamponu	
e.	Rnaz içermeyen su	
f.	VB kolonu (100 kolon)	
g.	Toplama tüpü 2.0 mL	
2.	**GoTaq® Yeşil Master Mix**	**Promega -ABD**
	TaqDNA polimeraz, polimeraz, dNTP'ler, $MgCl_2$, reaksiyon tamponları	
3.	**wizScript RT FDmix (Heksamer)**	**Wibiosolution-Kore**
4.	**ELISA kiti**	**CUSABIO -Çin**

a.	Tahlil laması	
b.	Negatif kontrol	
c.	Pozitif kontrol	
d.	HRP-konjugat	
e.	Yıkama Tamponu	
f.	Substrat A	
g.	Substrat B	
h.	Durdurma çözeltisi	
j.	Kullanım klavuzu	

3.2 Yöntem

Çalışma yöntemi aşağıdaki algoritmaya göre takip edilmiştir (Bkz Şekil 3.1)



Şekil 3.1 Algoritma çalışma yöntemini gösterir

3.2.1 Etik hususlar

Irak Sağlık Bakanlığı'ndan bu çalışma için onay alındı. Numune alınan çocuk hastaların isimleri kullanılmadı. Bunun yerine, gizliliği korumak için numuneleri tanımlayıcı kodlar kullanıldı. Numuneler toplanmadan önce, katılımcıların ebeveynlerinin ve velilerinin rızası alındı. İlgili hastanın iyi niyetiyle gizliliğin paylaşılmasına izin veren bir klinik

belirti olmadıkça, hastalardan toplanan bilgiler kesinlikle yalnızca akademik kullanımla sınırlandırılmıştır.

3.2.2 Numunelerin toplanması

Mevcut çalışma, Kadın ve Çocuk Hastanesinde Eylül 2020'den Ocak 2021'e kadar 5 aylık bir süre boyunca yapılmıştır. Araştırmaya, akut ishalden muzdarip beş yaşından küçük 100 çocuk dahil edildi. Tüm dışkı numuneleri bakteri, parazit, amip gibi diğer patojenlerin varlığı açısından kontrol edildi. Her hastadan kusma, ateş, yaş, cinsiyet, emzirip emzirmeme, mama kullanıp kullanmama gibi demografik veriler ve klinik bilgiler, akut gastroenteritli her çocuktan 5mL dışkı toplandı. Numune daha sonra iki kısma ayrıldı, ilk kısım (2mL) dışkının doğrudan genel muayenesi amacıyla hemen test için kullanıldı, ikinci kısma (3mL) 5 mL fosfat tamponlu salin solüsyonu eklendi ve pH 7,2'de, ELISA ve PCR testleri ile Rotavirüs tespitinde kullanılana kadar -20°C'de saklandı.

3.2.3 Makroskopik dışkı inceleme testi

Dışkı örneği, renk, kıvam, mukus varlığı veya yokluğu, brüt kan, tenyalar ve diğer anormallikleri kontrol etmek için görsel olarak incelendi.

3.2.4 Mikroskobik dışkı inceleme testi

Mikroskobik olarak dışkının incelemesi, bir ışık mikroskobu kullanılarak *Campylobacter, Salmonella, Shigella, Escherichia* ve *Yersinia* gibi bakteriler ile *Entamoeba hystolytica, Giardia* ve *Kristosporidyum* gibi parazit kistlerinin teşhisi için yapılmıştır.

3.2.5 Rotavirüs tespiti için immünolojik testler

Rotavirüs tespiti için enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA), kalitatif enzimler için bir immünoassay tekniği olarak kullanılmaktadır. Bu kitteki mikrotitre plakası, Rotavirüse özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır. Numuneler, antikor konjuge Yabanturbu peroksidaz (HRP) ile çukurcuklara pipetlenir. Örneklerdeki herhangi bir Rotavirüs antijeni, önceden kaplanmış özel antikora bağlanır. Herhangi bir bağlanmamış reaktifi çıkarmak için yıkamadan sonra çukurcuklara bir substrat solüsyonu eklenir ve ilk aşamada bağlanan insan Rotavirüs antijeni miktarıyla orantılı olarak renk gelişir. Daha sonra renk gelişimi durdurulur ve renk yoğunluğu ölçülür. Test aşağıdaki basamaklara göre yapılır:

1. Tüm reaktifler ve numuneler belirtildiği şekilde hazırlanır.
2. Negatif ve Pozitif Kontrol çukurcuklarının yanı sıra bir boş çukurcuk (çözeltisiz) hazırlanır.
3. Boş çukurcuk dışında her çukurcuğa 50µL Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol veya Numune eklenir. Daha sonra boş çukurcuk hariç her çukurcuğa 50µL HRP-konjugat ilave edilir. Kit ile sağlanan yapışkan şerit kullanılarak alan kaplanır. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
4. Aspirasyon yapılır ve her bir çukurcuk yıkanır. Her çukurcuğa 50µL Yıkama Tamponu eklenir.
5. Bir fışkırtma şişesi, çok kanallı pipet, düzenek dağıtıcısı veya otomatik yıkayıcı kullanılarak her çukurcuk distile su ile doldurulur ve 30 saniye bekletilir. Son yıkamadan sonra aspire ederek veya boşaltarak kalan sıvı kuyucuklardan uzaklaştırılır. Plakayı temizlemek için ters çevrilir ve temiz kağıt havlularla kurulanması. Toplam on yıkama için teknik on kez tekrar edilir.
6. Her çukurcuğa 50 µL Substrat A ve 50 µL Substrat B eklenilir. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir.
7. Her çukurcuğa 50µL Durdurma Solüsyonu eklenir ve iyice karışmasını sağlamak için plaka hafifçe sallanır.
8. Boş çukurcuk sıfır olarak alınarak, 450 nm'ye ayarlanmış bir mikroplaka okuyucu kullanılır ve her bir çukurcuğun optik yoğunluğu 10 dakika içinde belirlenir.

Sonuçların değerlendirilmesi şu şekilde yapılır:

Numune çukurcuğu kontrol ile karşılaştırarak insan Rotavirüs antijeninin değerinin hesaplanması için, Kesme Değeri = OD negatif ＋ 0,10 ortalama değeri (OD -ve < 0,05 ise, 0,05) olarak hesaplanır.

1. (–) kontrol OD değeri 0,1'den küçük ve (+) kontrol OD değeri 0,8'den büyük olmalıdır.
2. Sonuçların belirlenmesi:

OD numune ≥Kesme Değeri: (+) kontrol, - OD numune iken ＜Kesme Değeri: (-) kontrol.

3.2.6 RT-PCR ile rotavirüsün moleküler tespiti

Yuvalanmış (Nested) RT-PCR'de, dışkıdan izole edilen viral RNA, G (gen 9) veya P (gen 4) serotiplerini belirleyen rotavirüs genleri için konsensüs primerlerinin varlığında PCR ile ters kopyalanmış ve amplifiye edilmiştir. Primerler, çeşitli Rotavirüs serotiplerinin suşlarına homolog olacak şekilde seçilmiştir. İlk amplifikasyon döngüsünden elde edilen DNA, orijinal konsensüs primerlerinden biri ve konsensüs primerine zıt polariteye sahip genotipe özgü primerlerin bir kombinasyonu kullanılarak ikinci tur bir PCR'de şablon olarak kullanılmış ve her biri farklı boyutta bir ürün verecek şekilde tasarlanmıştır.
Agaroz jel elektroforezinden sonra sonucun büyüklüğüne göre genotipler belirlenmiştir.

3.2.6.1 Numunenin hazırlanması

Bu çalışmada dışkı süspansiyonunun %20'si aşağıdaki adımlarla hazırlandı:

1. 4 mL salin solüsyonu ve 1 gr (1mL) dışkı miktarı 5mL tüpe aktarıldı.
2. Karışım, homojen bir süspansiyon elde etmek için vortekslendi ve 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi.
3. Süpernatant, bir sonraki adımda viral RNA'nın ekstraksiyonu için kullanıldı. (Lorestani *et al*. 2019).

3.2.6.2 Viral nükleik asit ekstraksiyonu

Bu çalışmada Rotavirüs RNA'sı, akut gastroenterit ile enfekte olmuş çocuklardan toplanan dışkı örneklerinden ticari bir Viral Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (Geneaid) kullanılarak aşağıdaki protokole göre ekstrakte edildi:

1. 200µL numune 1,5mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2. Numuneye 400 µL VB Lysis eklenerek vorteks ile karıştırıldı.
3. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
4. Örnek lizatına 450 µL AD tamponu eklendi ve karıştırmak için tüp kuvvetlice çalkalandı.
5. 2 mL'lik toplama tüpüne bir VB kolonu yerleştirildi.
6. 600 µL lizat karışımı VB Sütununa aktarıldı.
7. 1 dakika boyunca 14.000-16.000 rpm'de santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve ardından VB Kolonu 2 mL toplama tüpüne geri yerleştirildi.
8. Kalan karışım VB kolonuna aktarıldı, 14.000-16.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Süpernatantı içeren 2 mL toplama tüpü atıldı.
10. VB kolonu yeni bir 2 mL toplama tüpüne aktarıldı.
11. VB Kolonuna 400 µL W1 Tamponu eklendi ve ardından 30 saniye boyunca 14.000-16.000 rpm'de santrifüj edildi.
12. Süpernatant uzaklaştırıldı ve ardından VB kolonu 2mL toplama tüpüne geri yerleştirildi.
13. VB Kolonuna 600µL yıkama tamponu eklendi ve 30 saniye boyunca 14.000-16.000 rpm'de santrifüj edildi.
14. Süpernatant atıldı ve kolon matrisini kurutmak için VB Kolonu 2 mL toplama tüpüne geri konularak 14.000-16.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
15. Kurutulmuş VB kolonu temiz bir 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
16. VB kolon matrisinin merkezine 50 µL RNA'dan ari su eklendi.
17. RNasız suyun matris tarafından emildiğinden emin olmak için en az 3 dakika bekletildi.

18. Saflaştırılmış nükleik asidi ayrıştırmak için 14.000-16.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

Dışkı örneklerinden ekstrakte edilen RNA'lar, 260/280 nm absorbansta RNA konsantrasyonu ve saflığını değerlendirmek için kullanılan bir Nanodrop spektrofotometresi ile ölçüldü.

3.2.6.3 cDNA sentezi

Bu çalışmada RNA'dan cDNA sentezi için WizScript™ RT FDmix (Hexamer) kullanılmıştır. Bu standart protokol, RT FDmix (Heksamer) tüpüne yalnızca şablon RNA ve suyun eklenmesini gerektirir. Bu amaçla:

1. RT FDmix (Hexamer) tüpü PCR tüp rafına yerleştirildi.
2. Reaksiyon bileşeni RT FDmix (Hexamer) tüpüne Çizelge 3.6'da gösterilen bileşenler eklendi.
3. Tüpler, Çizelge 3.7'de gösterilen programlanmış bir ısısal döngü cihazına (termal döngüleyiciye) yerleştirildi.
4. Sentezlenen cDNA, PCR için şablon olarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Çizelge 3.6 cDNA bileşeni

Bileşen	**Hacim**
RT FDmix (hekzamer)	1 µL
Şablon RNA	10 µL
RNaz içermeyen su	9 µL

Total	20 μL

Çizelge 3.

7 cDNA sentezi için termodöngü koşulları

Sıcaklık (ºC)	**Süre (dk)**	**Sıcaklık (º C)**	**Süre (dk)**	**Sıcaklık (º C)**	**Süre (dk)**	**Döngü sayısı**
25	10	42	30	85	5	1

3.2.6.4 Rotavirüs genotiplemesi

Bu çalışmada Rotavirüs genotiplemesi için Yarı-Yuvalanmış (Semi-Nested) Multipleks RT-PCR prosedürleri uygulandı. PCR'nin ilk turunda, G tipi için 9con1 ve 9con2 konsensus primerleri kullanıldı. Bunu takiben 9con1 primeri, PCR'de G1-G4 ve G9'a özgü ileri primerler ile birleştirildi. RT-PCR'de Con2-Con3 konsensus primerleri kullanılarak P tiplemesi yapıldı, ardından P4, P6, P8, P9, P10 ve P11 için tipe özgü primerlerle birlikte Con3 primeri kullanılarak PCR yapıldı. Birinci tur PCR'den gelen amplikon, genotipe bağlı olarak çeşitli boyutlarda bir ürün üretmek için bir konsensus primeri ve genotipe özgü primerlerin bir kombinasyonunu kullanılarak ikinci tur PCR'de şablon olarak kullanıldı.

G genotiplemesinin ilk turunda, VP7 geninin bir bölgesi 9con1 ve 9con2 primerleri kullanılarak amplifiye edilirken, P genotiplemesinin ilk turunda VP4 geninin bir bölgesi con2 ve con3 primerleri kullanılarak amplifiye edildi (Çizelge 3.8) ve PCR ısısal döngü koşullarının ilk turu Çizelge 3.9'da gösterildi.

8 İlk tur PCR için reaksiyon karışımı

Çizelge 3.

Bileşen	**Reaksiyon**
cDNA Şablonu	5 µL
10 µM İleri Primer	2 µL
10 µM Geri Primer	2 µL
GoTaq® Green Mater Mix, 2X	12,5 µL
Nükleaz içermeyen su	3,5 µL
Toplam	25 µL

Çizelge 3.9 İlk tur PCR için ısıl döngü koşulları

TID		**TC**		**TA**		**TE**		**TFE**	
Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Sıcaklık (° C)	Süre (s)	Sıcaklık (° C)	Süre (s)	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Sıcaklık (°C)	Süre (s)
94	5	94	30	42	30	72	60	72	7
1 siklus		35 siklus						1 siklus	

TID = İlk Denatürasyon, TC = Döngüsel Denatürasyon, TA = Bağlanma Sıcaklığı, TE = Döngüsel Uzama, TFE = Son Uzama

Birinci turun bitiminde ürün, 9con1 primeri ve G1, G2, G3, G4 ve G9 genotiplerine özgü bir primerler karışımı kullanılarak ikinci tur PCR'ye tabi tutulmuştur. Çizelge 3.10'da PCR reaksiyon karışımına dahil edilen bileşenler ve Çizelge 3.11'de ikinci tur PCR için ısıl döngü koşulları verilmiştir.

10 G-genotipleri için ikinci tur PCR için reaksiyon karışımı

Bileşen	**Reaksiyon**

Çizelge 3.

İlk tur PCR ürünü	2,5 µL
Ortak ileri primer (10 pmol/µL)	1 µL
10 µM Ters Primer (P-tip özel primerler)	5 µL
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12,5 µL
Nükleaz içermeyen su	4 µL
Toplam	25 µL

Çizelge 3.11 G-genotipleme için ikinci tur PCR için ısıl döngü koşulları

TI)		**TC**		**TA**		**TE**		**TFE**	
Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Sıcaklık (°C)	Süre (s)
94	5	94	30	42	30	72	60	72	7
1 sikl s		35 siklus						1 siklus	

Rotavirüsün P-genotiplemesi için VP4'e özgü PCR'nin ilk tur ürünü, ileri primer olarak con3 ve ters primerler olarak P4, P6, P8, P9, P10 ve P11 spesifik primerler kombinasyonu kullanılarak ikinci tur bir PCR'ye tabi tutuldu. Çizelge 3.12'de reaksiyon karışımındaki bileşenler listesi ve Çizelge 3.13'de P-genotiplerinin ikinci tur PCR'ı için ısıl döngü koşulları gösterilmiştir.

12 P-genotipleri için ikinci tur PCR için reaksiyon karışımı

Bileşen	Reaksiyon

Çizelge 3.

İlk tur PCR ürünü	2,5 µL
Ortak ileri primer (10 pmol/µL)	1 µL
Ortak ileri primer (10 pmol/µL)	6 µL
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12,5 µL
Nükleaz içermeyen su	3 µL
Toplam	25 µL

Çizelge 3.13 P-genotipleme için ikinci tur PCR için ısıl döngü koşulları

TID		**TC**		**TA**		**TE**		**TFE**	
Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Sıcaklık (°C)	Süre (s)
94	5	94	30	42	30	72	60	72	7
1 siklus		35 siklus						1 siklus	

3.2.6.5 Agaroz jel elektroforezi

PCR'ın amplifiye ürünlerinin tümü, bir agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutuldu. %2'lik agaroz jel hazırlamak için 100 ml 1X TAE tamponu içine 2 g agaroz tozu eklendi. Agaroz, tamponla karıştırıldı ve mikrodalgada 1 dakika ısıtıldı. Çözelti, ılık olana kadar soğumaya bırakıldı ve 0,5 g/mL'lik bir konsantrasyonda etidyum bromür (EtBr) ilave edildi. EtBr solüsyona nazikçe karıştırıldı ve tarakla donatılmış bir jel tepsisine konuldu. Yaklaşık 15-20 dakika jelin soğuması ve tepside şekil alması sağlandı. Tarak dikkatlice çıkartıldı ve jel, 1X TAE tamponu ile doldurulmuş bir elektroforez tankına yerleştirildi. İlk göze DNA markörü ve diğer gözlere PCR ürünleri yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi. 100V'de 60 dakika boyunca elektroforez yapıldı. Jel daha sonra bantların izlenmesi için bir UV transillüminatör altına yerleştirildi.

4. BULGULAR

4.1 Örnek Toplama

Rotavirüs belirti/bulguları gösteren ve ebeveynleri veya vasileri çalışmaya katılmayı kabul eden beş yaşından küçük çocuklar, Eylül 2020 ile Ocak 2021 tarihleri arasında Irak devaniye kadın ve çocuk hastanesine alındı. Akut gastroenterit belirti ve bulguları göstererek hastaneye yatırılan çocuklardan ishalli dışkı örnekleri alındı. Çocuklardan toplam 100 dışkı örneği toplandı ve bir ELISA kiti (Cusabio CSB-E05033h) kullanılarak RVA antijenlerinin varlığı için test edildi. İncelenen 100 numuneden 41'i RVA yönünden pozitif ve kalan 59 numune RVA yönünden negatif tespit edildi.

4.2 İshal İçin Pozitif ve Negatif Rotavirüs ELISA'nın Cinsiyete Göre Dağılımı

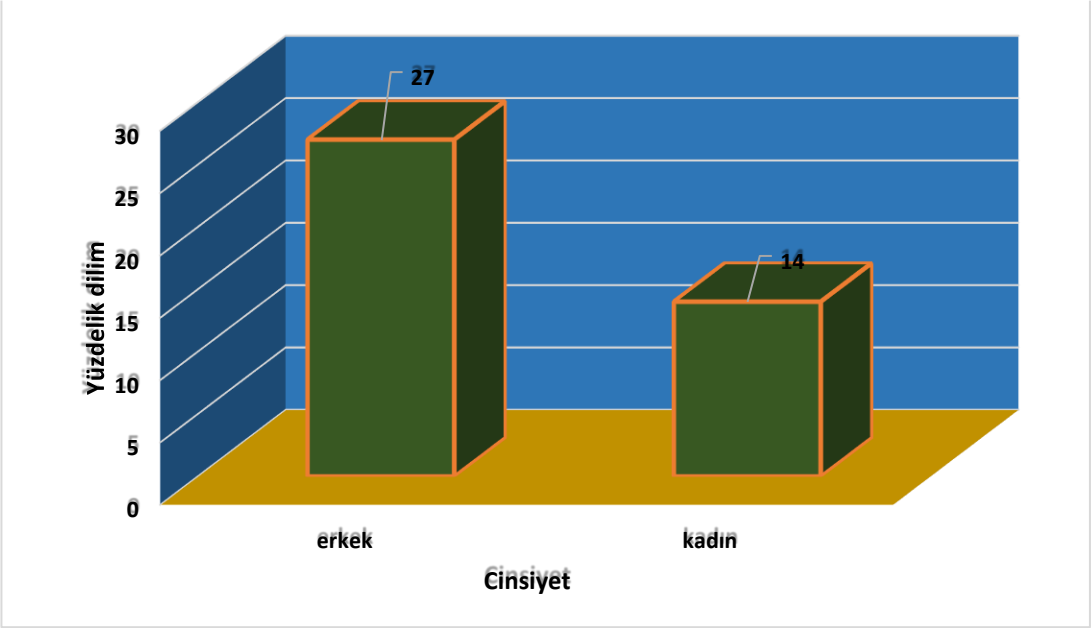
ELISA testi ile analiz edilen 100 dışkı örneğinden 41'i Rotavirüs yönünden pozitif bulundu. Çizelge 4.1'de, Rotavirüs ile gastroenterit tanısı konan bebek ve beş yaş altı çocukların dağılımı ve aralarındaki fark gösterilmiştir.

Enfekte olan toplam erkek oranı, test edilen toplam erkek numune vakalarının %50,94'ünü gösterirken, enfekte olan kadınlar test edilen toplam kadın numune vakalarının %29,78'ini oluşturmuştur. Bu farklılık, bu çalışmadaki numune alınan erkeklerin kadınlara göre belirli bir düzeyde daha fazla sağlık ve hastaneye yatış ihtiyacına sahip olmalarına bağlanabilir. Ancak erkeklerin Rotavirüs enfeksiyonuna kadınlardan daha duyarlı olduğunu göstermez.

Çizelge 4.1 Rotavirüs enfeksiyonunun cinsiyet gruplarına göre dağılımı

Değişken	Kategoriler	Toplam Sayı	Pozitif Sayısı	%	X^2	P değeri
Cinsiyet	Erkek	53	27	50,94	4,06	0,032 (S)
	Kadın	47	14	29,78		
	Toplam	100	41	41		

S: Anlamlı fark (P<0,05); HS: Çok anlamlı fark (P<0,01)



Şekil 4.1 Rotavirüsün farklı cinsiyet gruplarına göre dağılımı

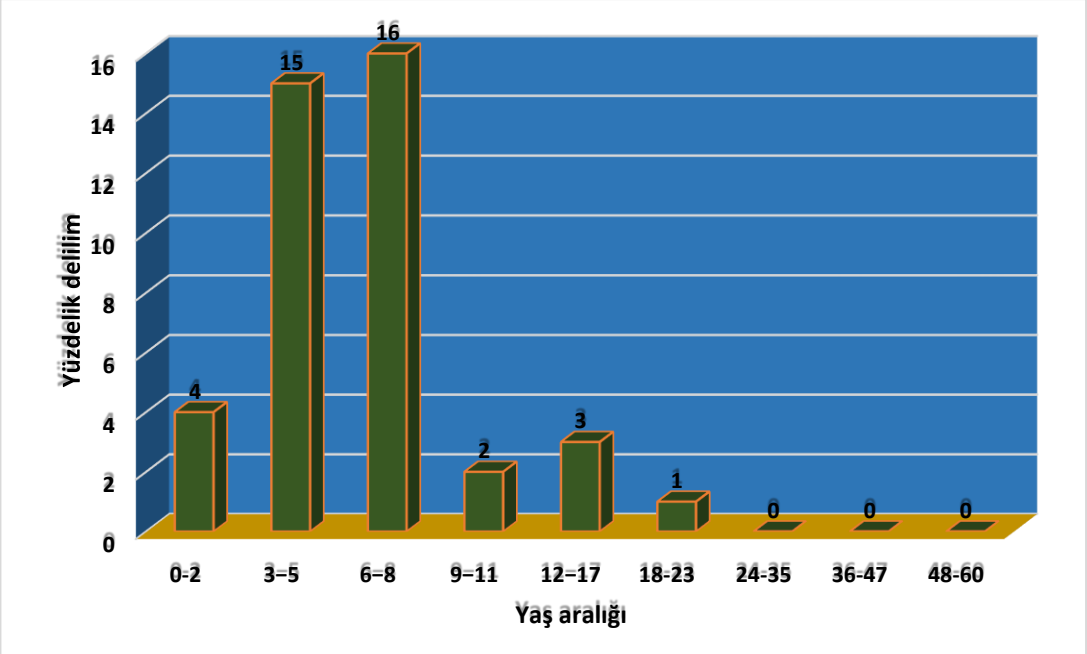
4.3 İshal İçin Pozitif ve Negatif Rotavirus ELISA'nın Yaş Gruplarına Göre Dağılımı

Mevcut çalışmamızın sonuçları, Rotavirüs ile en çok enfekte olan vakaların, Rotavirüsten en çok etkilenen yaş grupları olan 1-12 ay (Çizelge 4.2) arasındaki çocuklarda ortaya çıktığını göstermiştir. Çocuklarda Rotavirüs antijeni sırasıyla 1-2 aylık yaş grubunda %25, 3-5 aylık grupta %65,21, 6-8 aylık grupta %72,72, 9-11 aylık grupta %14,28, 12-17 aylık grupta %27,27, 18-23 aylık grupta %12,5 olarak bulunmuştur. Rotavirüs enfeksiyonu biraz daha büyük çocuklarda asemptomatik seyredebilmektedir, çünkü bu bireyler muhtemelen daha önce bu ajanla enfekte oldukları için klinik hastalığa karşı bir miktar korumaya sahiptirler. Genç gruplardaki potansiyel koruma ise anne sütünden veya plasenta yoluyla kazanılmış bağışıklıktan ileri gelebilir.

Çizelge 4.2 Rotavirüs enfeksiyonunun yaş gruplarına göre dağılımı

Değişken	Kategoriler	Toplam Sayı	Pozitif Sayısı	%	X^2	P değeri
Yaş	0-2	16	4	25	28,26	0(HS)
	3-5	23	15	65,21		
	6-8	22	16	72,72		
	9-11	14	2	14,28		
	12-17	11	3	27,27		
	18-23	8	1	12,5		
	24-35	2	0	0		
	36-47	1	0	0		
	48-60	3	0	0		
	Toplam	100	41	41		

HS: Çok anlamlı fark (P<0,01)



Şekil 4.2 Rotavirüs enfeksiyonunun farklı yaş gruplarına göre dağılımı

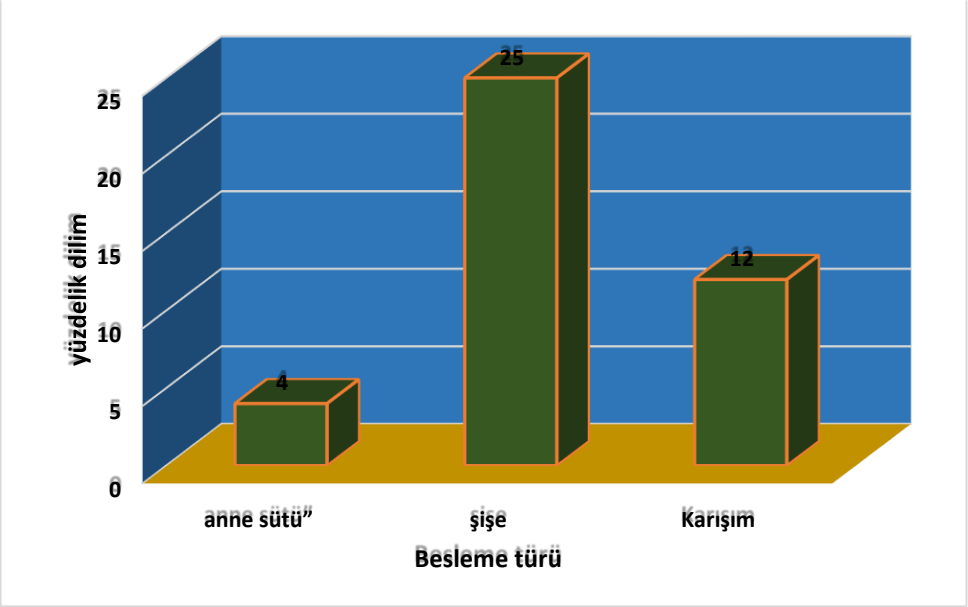
4.4 Hastaların Beslenme Şekline Göre Dağılımı

Çalışmada ayrıca Çizelge 4.3'de gösterildiği gibi emzirme, karma biberonla beslenen Rotavirüs enfeksiyonu olan hastalarda enfeksiyon oranları kaydedilmiş ve Rotavirüs enfeksiyonu ile enfekte çocukların yüzdesi tespit edilmiştir. Biberonla beslenen çocuklarda enfeksiyon oranı %55,55 iken, karma beslenme ile beslenen çocuklarda enfeksiyon yüzdesine göre oranı %40 olmuş ve en düşük enfeksiyon yüzdesi %16 ile emzirme yoluyla beslenen bireylerde bulunmuştur.

Çizelge 4.3 Beslenme şekline göre Rotavirüs dağılımı

Değişken	Kategoriler	Toplam Sayı	Pozitif Sayısı	%	X^2	P değeri
Beslenme şekli	Emzirme	25	4	16	10,41	0,005(HS)
	Biberon	45	25	55,55		
	Karışık	30	12	40		
	Toplam	100	41	41		

HS: Çok anlamlı fark (P<0,01)



Şekil 4.3 Beslenme şekline göre Rotavirüs enfeksiyonu dağılım

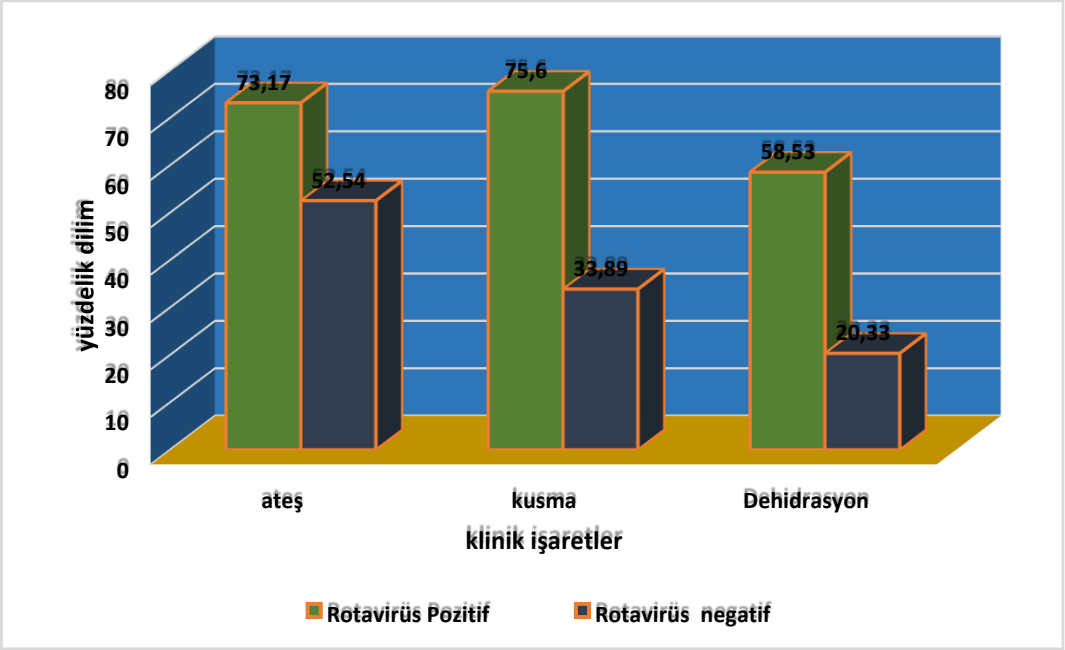
4.5 Rotavirüs Enfeksiyonu ile Klinik Özelliklerin İlişkisi

Rotavirüs pozitif ve rotavirüs negatif hastaların klinik bulguları rotavirüs enfeksiyonu ile kusma, ateş ve dehidratasyon semptomları arasında bir bağlantı olup olmadığını anlamak için karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.4). Bu çalışma kapsamında, beş yaşın altındaki çocuklarda, rotavirüs pozitif olan hastaların %75,6'sı buna mukabil rotavirüsü pozitif olmayan hastaların %33,89'unun kusma şikayeti yaşadığı belirlenmiştir. Ayrıca Rotavirüs pozitif hastaların %73,17'sinde ateş görülürken, rotavirüs pozitif olmayan hastaların %52,54'ünde ateş görüldüğü ve benzer şekilde Rotavirüs pozitif vakalarda, Rotavirüs negatif vakalardan daha yüksek dehidratasyon oranı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4 Hastalarda rotavirüs pozitif ve rotavirüs negatif klinik özellikleri

Klinik İşaretler	**Rotavirus positif Toplam sayı=41**		**Rotavirus negative Toplam sayı=59**		**X^2**	**P değeri**
	No.	%	No.	%		
Ateş	30	73,17	31	52,54	4,32	0.038(S)
Kusma	31	75,6	20	33,89	16,84	0(HS)
Dehidratasyon	24	58,53	12	20,33	15,31	0(HS)

S: Anlamlı fark (P<0,05); HS: Çok anlamlı fark (P<0,01)



Şekil 4.4 Rotavirüs pozitif ve Rotavirüs negatif hastaların klinik özellikler

4.6 Rotavirüs Genotipleri

Rotavirüs, hasta örneklerinden ELISA testi ile tespit edilmiş, 41 Rotavirüs numunesi pozitif çıkmış ve tüm pozitif numuneler Yarı Yuvalanmış (Semi-Nested) RT-PCR ile G ve P genotiplendirmesine tabi tutulmuştur. Tek veya karma enfeksiyonda toplam dört farklı G genotipi ve iki P genotipi tanımlanmıştır. Beş G-tipi numunesi (%12,19) ve dört P-tipi numunesi (%9,75) tiplendirilememiştir.

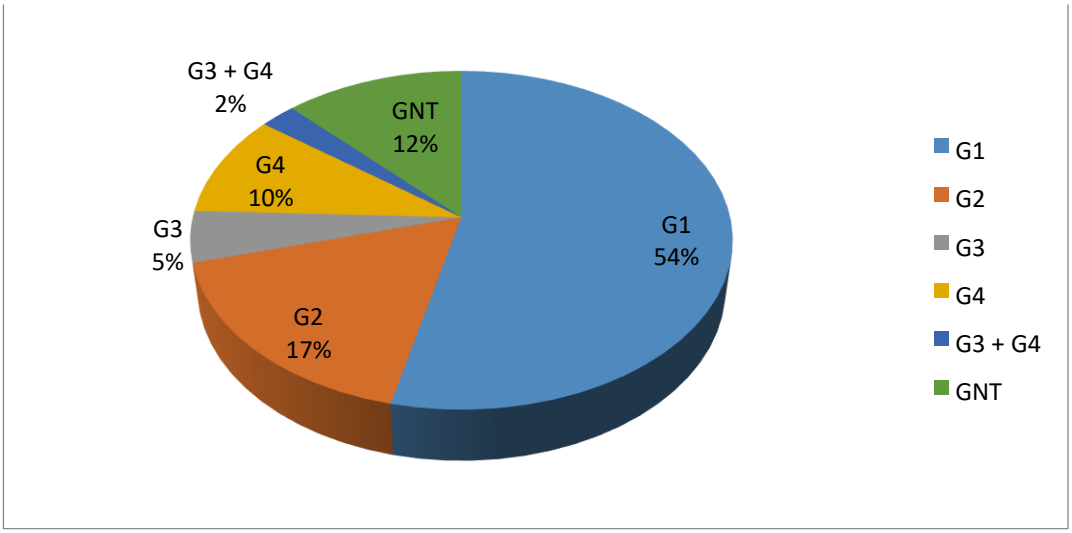
4.6.1 VP7 (G) genotiplerinin dağılımı

Bu çalışmada Rotavirus G-tipleri arasında G1, %53,65 (22/41) pozitifliği ile baskın VP7 genotipi olmuştur (Şekil 4.5). Yedi örnekte G2 gözlenmiş olup (7/41; %17,07) en çok saptanan ikinci genotip olmuştur, bunu dört örnekte (4/41; %9,75) gözlenen G4 ve iki örnekte gözlenen G3 (2/ 41; %4,87) takip etmiştir (Çizelge 4.5). Bir örnekte G3/G4'ün karışık enfeksiyonları gözlenmiştir (1/41; %2,43). G tiplerinin beş numunesi (%12,19) tiplendirilememiştir. Çalışmada tanımlanan G genotiplerinin temsili jel görüntüleri Şekil

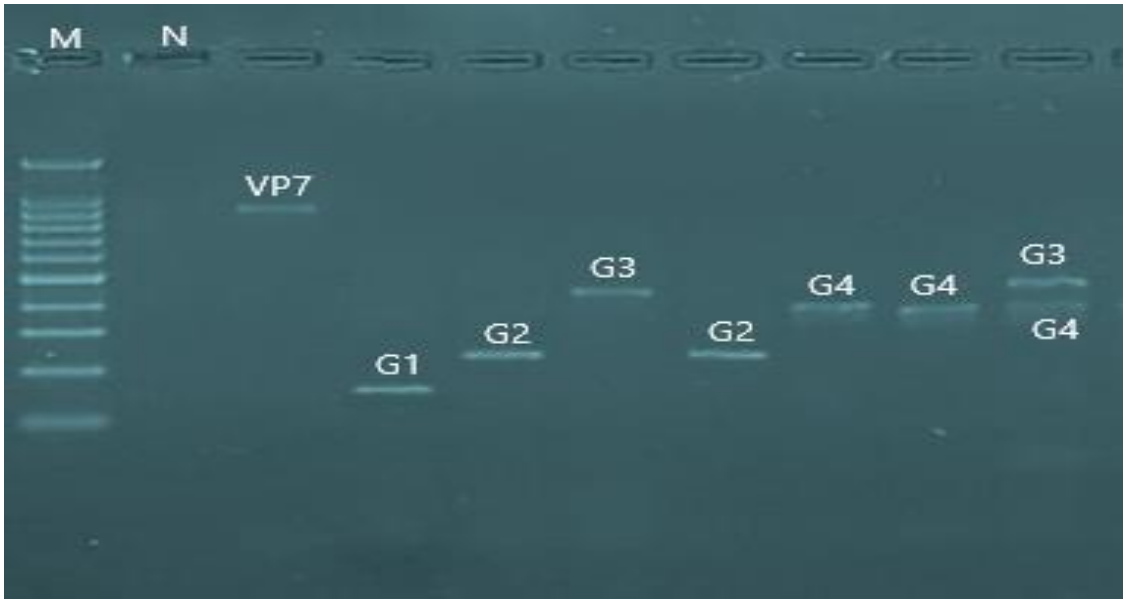
4.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.5 RT-PCR tiplemesi ile belirlenen RVA G tiplerinin sıklığı

Genotip	Sayı	%
G1	22	53,65
G2	7	17,07
G3	2	4,87
G4	4	9,75
G3 + G4	1	2,43
GNT	5	12,19
Toplam	41	100



Şekil 4.5 G-genotiplerinin (%) frekans dağılımı



Şekil 4.6 Çalışmada tanımlanan G-tiplerinin temsili jel görüntüsü, M şeridi 100bp DNA merdivenini temsil etmektedir, N Şeridi negatif kontrol olup. Şerit 1, VP7 ilk ur ürünüdür

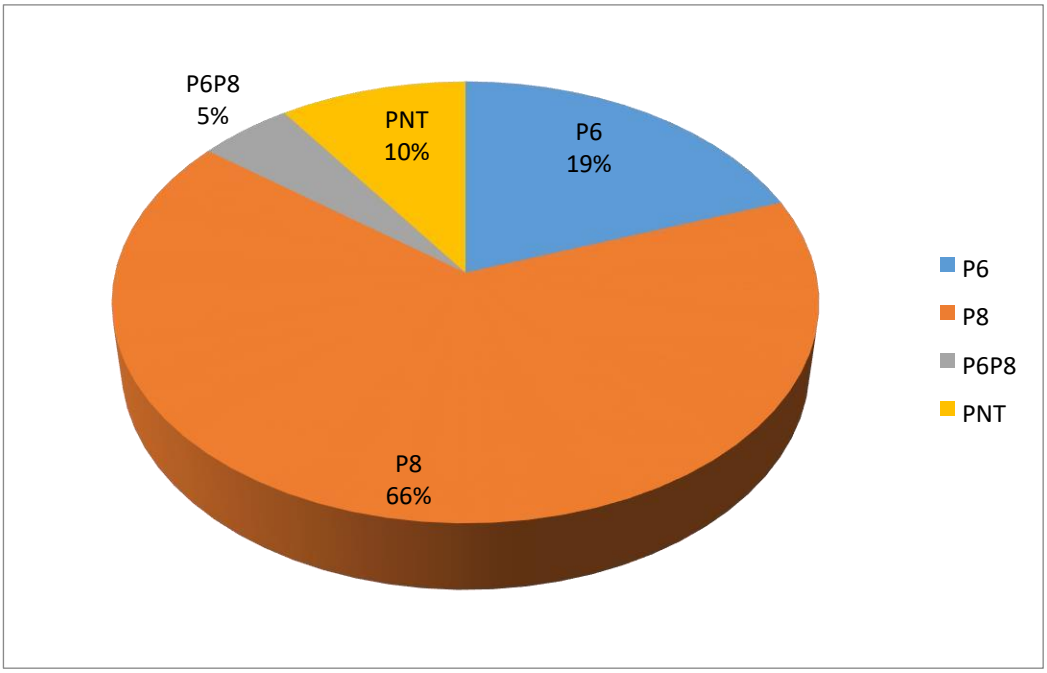
4.6.2 VP4 (P) genotiplerinin dağılımı

Tanımlanan P-tipleri arasında yirmi yedi numunede (27/41; %65,85) tespit edilen P8 en sık tespit edilen tip olmuş, bunu sekiz numunede (8/41; %19,51) gözlenen P6 izlemiştir.

Araştırmada tanımlanan P genotiplerinin temsili jel görüntüleri Şekil 4.8'de gösterilmektedir. Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi örneklerin %4,87'sinde (2/41) P6 ve P8'in karışık enfeksiyon görülmüştür. Dört numune (4/41; %9,75) tiplendirilemez bulunmuştur (Şekil 4.7).

Çizelge 4.6 RT-PCR tiplemesi ile belirlenen RVA P tiplerinin sıklığı

Genotip	Sayı	%
P6	8	19,51
P8	27	65,85
P6P8	2	4,87
PNT	4	9,75
Toplam	41	100



Şekil 4.7 P-genotiplerinin (%) frekans dağılımı



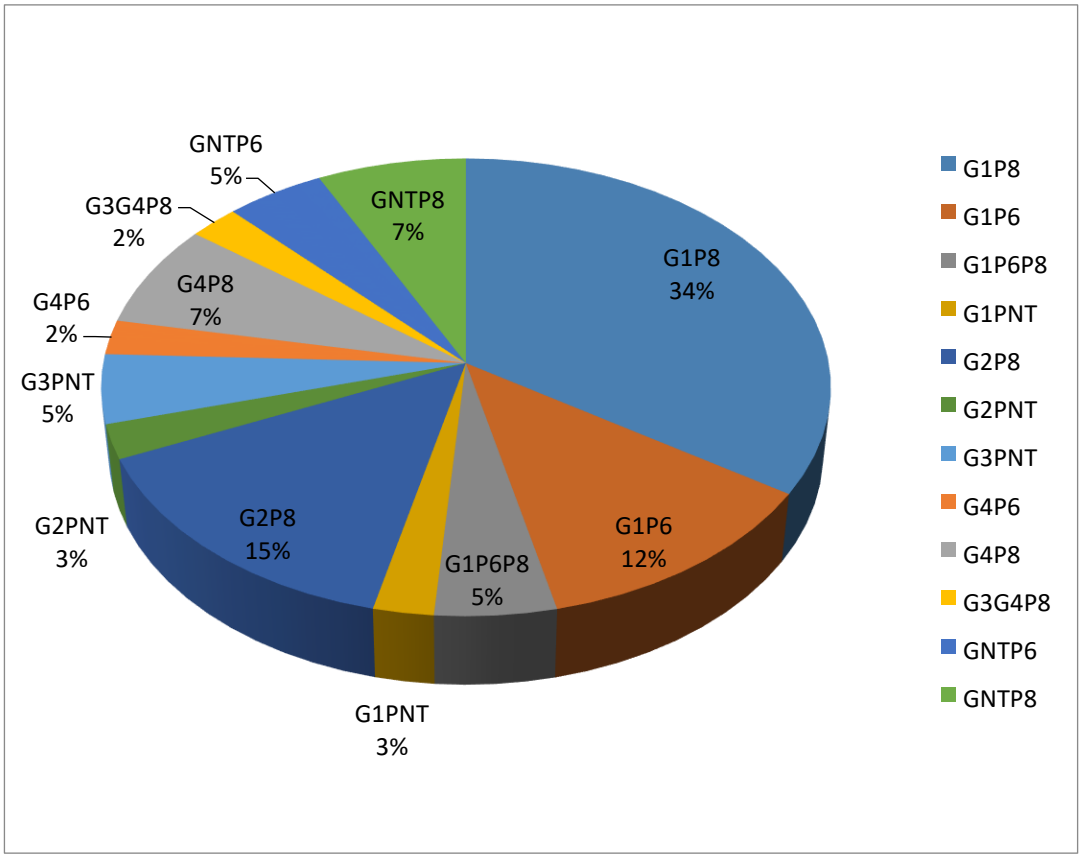
Şekil 4.8 Çalışmada tanımlanan P-tiplerinin temsili jel görüntüsü, M şeridi 100bp DNA merdivenini temsil etmektedir, N Şeridi negatif kontrol olup. Şerit 1, VP4 ilk tur ürünüdür

4.6.3 VP7/VP4 (G/P) genotiplerinin dağılımı

Bu çalışmadan elde edilen RVA VP7/VP4 suşlarını belirlemek için 41 örneğe G/P genotip kombinasyonları atanmıştır. G/P genotip terminolojisi, tek enfeksiyonlarda (%70,73) ile 29/41 örnekte tanımlamıştır: G1P8 (14/41;34,14), G2P8 (6/41;%14,63), G1P6 (5/41;%12,19), G4P8 (3/41;%7,31), G4P6 (1/41;%2,43) ve 3/41(%7,31) karma enfeksiyonlarda G1P6,8 (2/41; %4,87), G3G4P8 (1/41; %2,43) tespit edilmiştir. G3PNT iki örnekte (2/41; %4,87), G1PNT bir örnekte 1/41(%2,43), G2PNT bir örnekte (%2,43), GNTP6 iki örnekte (%4,87) ve GNTP8 üç örnekte (%7,31) tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Tanımlanan tüm suşların genotip dağılımında G1P8, G2P8, G1P6 en yaygın suşlar olup 2020 ve 2021'de beş yaş altı çocuklarda tespit edilen RVA vakalarının sebebiyet vermiştir (Şekil 4.9).

Çizelge 4.7 Çalışmada tespit edilen rotavirüs suşlarının genotip karakterizasyonu

Genotip	**P6**		**P8**		**P6P8**		**PNT**		**Total**	
	No.	**%**	**No.**	**%**	**No.**	**%**	**No.**	**%**	**No.**	**%**
G1	5	12,19	14	34,14	2	4,87	1	2,43	22	46,8
G2	0	0	6	14,63	0	0	1	2,43	7	17,07
G3	0	0	0	0	0	0	2	4,86	2	4,87
G4	1	2,43	3	7,31	0	0	0	0	4	9,75
G3 + G4	0	0	1	2,43	0	0	0	0	1	2,43
GNT	2	4,86	3	7,31	0	0	0	0	5	12,19
Toplam	8	19,51	27	65,85	2	4,87	4	9,75	41	100



Şekil 4.9 G/P kombinasyonlarının (%) frekans dağılımı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Rotavirüs tüm dünyada yaygın olup gelişmekte olan ülkelerde yüksek morbidite ve ölüm oranlarına sebep olmaktadır (Hussein *et al.* 2015). Dünya çapında, İnsan Rotavirüsü (HRV), her yıl beş yaşın altındaki çocuklar arasında yaklaşık 453.000 ölüm ve 2,4 milyon hastaneye yatış ile çocuklarda şiddetli ishalin en yaygın nedeni olup, gelişmekte olan ülkelerde en yüksek sıklıktadır (Shaheen 2017).

Bu çalışmada test edilen 100 numunenin %41'i ELISA testinde pozitif bulunmuştur. Bu sonuç, virüsü %45 oranında tespit eden Irak' ta yapılan başka bir çalışmanın sonucundan daha düşüktür (Fenjan *et al.* 2020). Bununla birlikte, mevcut çalışmada tespit edilen oran, Irak'ın üç şehrini kapsayan başka bir araştırmada bildirilen dışkı numunelerinde tespit edilen %40 Rotavirüs tespit oranına yaklaşmıştır (Ahmed *et al.* 2013). Bu bulgular, Orta Irak' taki Rotavirüs prevalansının önceki sonuçlarından (%51,98) daha düşüktür (AlKelaby 2008). Ayrıca bu çalışmada bulunan sonuç, Kuveyt'de daha önceden tespit edilmiş %43,6 oranından daha düşüktür (Marmash *et al.* 2007). Yine, bu çalışmanın virüsü tespit etme sonucu Umman'daki sonuçlardan (%50) daha düşüktür (Al Awaidy *et al.* 2009). Suriye'de de örneklerin %61'inde virüs tespit edilmiştir (Teleb 2008).

Komşu ülke Ürdün'de ise virüsün prevalansı %39,9 olmuştur (Nafi 2010). Türkiye'de virüsün prevalansı yapılmış olan bir çalışmada %33,1 bulunmuştur (Aydin and Aktaş 2017). Bu nedenle, pek çok sebepten dolayı gelişmekte olan ülkeler arasında yer alan Irak için bu sonuçlar şaşırtıcı değildir. Bu sebeplerden bazıları; siyasi, finansal ve güvenlik istikrarsızlığı nedeniyle ihmal edilen ve bozulan Irak sağlık hizmetlerinin yanı sıra düşük yaşam standartları, düşük toplum hijyen standartları ve yetersiz gıda ve su sanitasyonudur (Nasser *et al.* 2021). Toplumda rotavirüs enfeksiyon oranının artmasına sebebiyet vermiş olabilecek bir diğer faktör, rotavirüsün zoonotik geçişi gösterildiği için, üretken evcil hayvanların ev içinde yetiştirilmesidir (Doan *et al.* 2013, Luchs *et al.* 2012). Ayrıca, özellikle düşük gelirli ülkelerde, yüksek derecede genetik benzerlik ve doğrudan hayvandan insana geçen RVA suşlarının insan türleri ortaya çıkabilir (Nasser *et al.* 2021).

Irak için durum, kötü genel sağlık koşullarından muzdarip olan ülke içinde yerinden edilmiş çok sayıda mültecinin varlığıyla daha da kötüleşmektedir.

Mevcut çalışmamızın sonuçları, Rotavirüs yönünden en çok pozitiflik tespit edilen vakaların bir yaşından küçük yaş gruplarında meydana geldiğini, bir yaşından büyük çocuklarda ise daha düşük enfeksiyon oranının olduğunu göstermiştir. 0 - 12 aylık bebeklerin hastalığa karşı daha savunmasız olmasının, bu bebeklerin kontamine maddelere daha fazla maruz kalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu yaş aralığındaki çocuklar her şeyi ağızlarına götürmeleri sebebi ve virüsün oyuncaklar da dahil olmak üzere yüzeylerde uzun süre yaşayabileceği düşünüldüğünde, potansiyel olarak oldukça basit bir şekilde enfekte olabilmektedirler. Rotavirüs enfeksiyonlarının oranı 24 aydan daha büyük çocuklarda düştüğü için, iki yaşına gelen çocukların çoğunun bir kez enfekte olması ve semptomatik olarak yeniden enfeksiyona karşı bağışıklık sergilemesi mümkündür. Rotavirüs ile ilişkili hastalıkların, tüm ishalli hastaneye yatışların yüzde 20 ila 70'ine ve beş yaşın altındaki çocuklarda ishalden kaynaklanan ölümlerin yüzde 20'sine sebebiyet verdiği düşünülmektedir. Çoğu araştırmanın sonuçlarına göre Rotavirüs, küçük çocuklarda ve bebeklerde gastroenteritin en yaygın nedenidir. Rotavirüs çoğunlukla beş yaşın altındaki çocukları etkiler ve küçük çocuklarda Rotavirüs enfeksiyonlarının yüzdesi daha büyük yaş gruplarına göre daha fazladır (Fenjan *et al.* 2020). Daha büyük çocuklarda Rotavirüs enfeksiyonu, bu ajanla önceki enfeksiyon nedeniyle klinik hastalığa karşı bir dereceye kadar koruma sebebiyle asemptomatik olabilir (Khafaji and Al-jiboury 2013). Üç aylıktan küçük çocuklarda Rotavirüs enfeksiyonu daha az sıklıkta görülür, bunun nedeni plasenta veya anne sütü yoluyla geçen maternal antikorların yaşamın ilk aylarında RV enfeksiyonuna karşı pasif koruyucu etki sağlaması olabilir (Habash and Issa Habeeb 2018). Bu çalışmanın sonuçları, Rotavirüs enfeksiyonlarının çoğunun bir yaşından küçük yaş gruplarında olduğunu gösteren bir araştırmanın (Al-Tabtabai *et al.* 2020) bulguları ile uyumludur. Çalışmamızda erkeklerde Rotavirüs enfeksiyonu insidansı kadınlardan çok daha fazla olmuş ve Irak'ın orta bölgelerinde yapılan daha önceki çalışmalarda karşılaştırılabilir bulgular rapor edilmiştir (Al-Saidy 2019). Bu bulgu, daha önce İran'da (Nasab *et al.* 2016) ve Ürdün'de (Alrwashdeh *et al. 2020)*. Rotavirüs enfeksiyonunun erkeklerde kadınlardan daha yüksek oranda tespit edildiğini gösteren diğer çalışmalarla

örtüşmektedir. Ayrıca beslenme örüntüsü ile Rotavirüs insidansı arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada en yüksek Rotavirüs enfeksiyonu %55,55 ile biberonla beslenen çocuklarda tespit edilmiştir, bunu sırasıyla %40 ile karma beslenme ve %16 ile emzirme ile birlikte anne sütü alan çocuklar göstermiştir. Bu sonuçların varyasyonu istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,01$). Benzer başka bir yerel çalışmada, biberonla beslenen çocuklarda Rotavirüs pozitiflik oranı yine en yüksek düzeyde tespit edilmiştir (Fenjan *et al.* 2020). Bu çalışmanın sonuçlarında da, biberonla beslenen çocuklarda, karma beslenen ve anne sütü alan bebeklere kıyasla rotavirüs ile enfekte olma oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni, kontamine biberonlarda Rotavirüsün daha kolay bulaşabilmesi olabilir. Emzirme ayrıca

Rotavirüs gastroenterit enfeksiyonu riskinin azalmasıyla da ilişkilendirilmiştir. Anne sütünde yüksek antirotavirüs-IgA titreleri olduğu için anne sütüyle beslenen bebekler, düşük antirotavirüs-IgA titrelerine sahip olanlara göre rotavirüs enfeksiyonuna daha az duyarlıdır. Anne sütündeki antimikrobiyal peptitlere ek olarak, anne sütü, doğuştan gelen bağışıklığın geliştirilmesine yardımcı olan laktaderin, laktoferrin, salgı IgA, lenfositler, oligosakkaritler ve insan sütü glikanları gibi biyoaktif bileşenleri içermektedir. (Habash and Issa Habeeb 2018). Emzirilen yenidoğanların Rotavirüs ile enfekte olma durumunda daha az şiddetli bulgular gösterdiği ve emzirme ile Rotavirüs insidansını en aza indirebileceği tespit edilmiştir. Bebeklerde ve küçük çocuklarda, rotavirüs enfeksiyonunun klinik belirtileri; kısa süreli hafif sulu ishalden, ateş, kusma, karın ağrısı ve dehidratasyonla seyreden şiddetli gastroenterit ishale kadar değişiklik gösterebilir. Tüm çocuklar hayatlarının ilk beş yılında en az bir kez Rotavirüs ile enfekte olsalar da,

Rotavirüs enfeksiyonunun neden olduğu şiddetli ishale karşı en savunmasız olanlar 6 ila 24 aylık çocuklardır (Kargar *et al.* 2012). Rotavirüs enfeksiyonu asemptomatik olabilir, bu da muhtemelen daha önce bu virüsle enfekte olmaları nedeniyle bireylerin klinik hastalığa karşı bir miktar korumaya sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Transplasental bağışıklık ve anne sütü daha genç gruplara koruma sağlayabilir. Rotavirüs genotiplerinin çeşitli coğrafi bölgelerde ve yılın çeşitli zamanlarında tanımlanması, aşılama rejimlerine rehberlik etmek açısından kritik bir noktadır (City *et al.* 2020).

Rotavirüsün dışkıdan toplanması, ishal sırasında bağırsak iltihabı sonucunda yüksek konsantrasyonlarda Rotavirüs partikülü saçılımı olması nedeniyle rotavirüsün genotipik

tespiti için uygun bir yöntem olmuştur (Nakawesi *et al.* 2010). Prevalans oranlarındaki varyasyon, tespit oranlarını etkileyen farklı koşullarla ilişkili olabilir. Örneğin, incelenen örneklerin miktarında, örnek toplama mevsiminde ve farklı çalışmalarda örnekleme yöntemlerinde farklılıklar söz konudur (Shaheen 2017). Tespit yöntemi olarak ELISA kullanılması iyi bir yöntemdir, ayrıca düşük maliyetlidir ve uygulanması basittir. Bununla birlikte, hastalığın tedavisini kolaylaştırmak için virüsün tespiti için hızlı ve spesifik tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Jasim 2019). Rotavirüsün farklı genetik tiplerini tespit etmek için birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, virüsü tespit etmek için ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu tekniği kullanılmıştır, çünkü bu test ile en yaygın genotipler tespit edilebilmektedir. Küresel olarak G1-G4, G9 ve G12, P4, P6 ve P8 ile birlikte insanlarda en çok saptanan Rotavirüs genotipleridir (Maringa *et al.* 2020). Rotavirüs G1 genotipi dünyanın çeşitli bölgelerinde saptanan en yaygın genotiptir ve %36 ile %74 arasında değişen sıklıkta bildirilmektedir (Soares and Linhares 2010). Bu çalışmada, karakterize edilen VP7 ve VP4 gen segmentlerinden akut diyare şikayeti olan hastalarda RT-PCR ile rotavirüs enfeksiyonu saptanmıştır (Ahmed *et al.* 2013, Jasim 2019). Çalışmamızda G1 genotipinin sıklığı küresel eğilimlere karşılık gelmektedir. G1 rotavirüs (%53,65) ile en önde gelen G-tipi olup, bunu sırasıyla G2 (%17,07), G4 (%9,75), G3 (%4,87) ile takip etmektedir. Bu sonuç İran (Lorestani *et al.* 2019), Türkiye (Aydin and Aktaş 2017) ve Mısır (Shaheen 2017) gibi komşu ülkelerde yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. VP4'ün insanlarda en sık görülen biçimleri ise P4, P6 ve P8'dir. P-tipleme testleri sonrasında P8 varlığı yaygın olarak (%65,85) tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarının, İran'da P8'in (%97,80) ile daha yaygın olduğunu bulan başka bir çalışmada gözlemlenenlerle eşleştiği gözlenmiştir (Lorestani *et al.* 2019). Bu oran Suudi Arabistan'da (%69,2) (Al-Ayed *et al.* 2017), Türkiye'de (%72,5) (Aydin and Aktaş 2017), Tunus'ta (%81,9) (Bennour *et al*. 2019) olmuştur. P tipi 8, diğer P tiplerinin en yaygın türüdür. Bunu takiben, P 6, P 8'den sonra ikinci sırada yer almış olup bu çalışmada yaygın olarak (%19,51) ortaya çıkmıştır. P6 genotipi, sanayileşmiş ülkelerde nadir görülen bir genotiptir ancak dünyanın Asya bölgelerinde yaygındır (Arun *et al.* 2019). Bu çalışmada hiçbir vakada P4 bulunamamıştır. P-tiplerinin bu değişken çeşitliliği, bölgede önleyici müdahalelerin geliştirilmesi ve yürütülmesi için çok önemlidir. Daha düşük G-tipleme ve P-tipleme etkinliği, kısmen bazı izolatlarda RNA

bozulmasına bağlanabilir. Dünya çapında yürütülen hemen hemen tüm epidemiyolojik araştırmalarda tiplendirilemeyen RV bulunmuştur. Tiplendirilemeyen genotiplerin nedeni bilinmemektedir, ancak Rotavirüs genlerinin primer bağlanma bölgelerindeki bir nokta mutasyonu veya yeni ortaya çıkan Rotavirüs genotipleri ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Azaran *et al.* 2018).

Genel olarak, G1P8, G2P4, G3P8 ve G4P8 küresel olarak en yaygın dört baskın genotiptir (Azaran *et al.* 2018). G1P8 suşları, dünya çapında keşfedilen rotavirüs suşlarının yaklaşık %65'ini oluşturmaktadır (Soares and Linhares 2010). Bu çalışmada, PCR tekniği ile çocukların %41'inin Rotavirüs yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada G/P kombinasyonunun sonuçları, G1P8 genotipinin prevalansı (%34,14) ile baskın olduğunu, bunu G2P8 (%14,63), G1P6 (%12,19), G4P8 (%7,31), G4P6 (%2,43), tiplendirlemeyen G (%12,19) ve tiplendirelemeyen P'nin (%9,75) izlediğini ortaya koymuştur. Irak'da Rotavirüsün genotiplendirilmesi konusunda sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Mevcut sonuçlar, RV'nin PCR ile saptanma oranının %40,9 olduğunu bulan bir çalışma ile kısmen uyumludur. En yaygın genotip G18 bulunmuştur (Nasser *et al.* 2021). Ayrıca, mevcut sonuçlar, Irak'da yapılan ve sonuçları G1P8 (%46,15) ve ardından G3P8 (%15,38), G2P6 (%7,69), G4P8 (%7,69), G9P8 (%7,69) bulunan başka bir çalışma ile kısmen uyumludur (Kareem and Hassan 2018). Buna karşılık, mevcut çalışmada incelenen hastalarda G1P8, G2P8, G4P8, G1P6 baskın genotip olarak bulunmuştur.
Mevcut çalışmanın sonuçları, en yaygın olanın G2P6 olduğunu ve bunu G1P8'nin izlediğini gösteren araştırmacı tarafından yürütülen çalışmanın sonuçlarından farklılık göstermektedir (Ahmed *et al.* 2013). Bu çalışma, İran (Lorestani *et al.* 2019) ve Ürdün (Alrwashdeh *et al.* 2020) gibi komşu ülkelerde yapılan diğer araştırmalara benzerlik göstermektedir.

Mevcut çalışma, 2006 - 2016 yılları arasında 20 Afrika ülkesinde beş yaş altı çocuklar arasında yapılan 27 çalışmayı içeren ve en yaygın (%22,64) olan G1P8'nin en sık izlenen ve sırasıyla G2P4 (%8,29), G9P8 (%6,95) ve G2P6 (%5,00) olan çalışma ile kısmen uyumludur ve Kuzey Afrika'da yaygın olan dolaşımdaki RV suşlarının (%65,70) P8 genotipine sahiptir (Ouermi *et al.* 2017). Mevcut sonuçlar G1P8'in en yaygın genotip

kombinasyonu olduğu (%42,2) ve bunu sırasıyla G9P8 (%21,1) ve G12P6 (%11,0)'nın izlediği Türkiye'dekilerle kısmen tutarlıdır (Aydin and Aktaş 2017). Ayrıca başka bir çalışmada daha yaygın tespit edilen genotip G1P8 (%24,6) olmuştur ve, bunu G3P8 (%19,6), G9P8 (%12,2), G2P4 (%9,5), G2P8 (%6,5) ve G4P8 (%4,8) takip etmiştir (Durmaz *et al.* 2018). İran'da ise en yaygın G/P kombinasyonu G1P8 (%57,82) olmuştur ve, bunu sırasıyla G2P8 (%16,98), G2P4 (%1,72), G3P8 (%4,69), G8P8 (%3,13), G4P8 (%3,13) ve G9P8 (%6,26) izlemiştir (Lorestani *et al.* 2019). Mevcut çalışma; İran, Türkiye, Suriye ve diğer komşu ülkelerde meydana gelen RV genotipik değişikliklerinın sıkı şekilde izlenmesi gerektiğini önermektedir. Başka bir çalışma ise, belirli hayvan Rotavirüs suşlarının, belirli insan suşlarına antijenik olarak benzerlikler sergilediğini ortaya koymuştur; bu durum, bir hayvanın insanlarda Rotavirüs enfeksiyonu kaynağı olabileceğini gösterebilir (Geletu *et al.* 2021). Ayrıca başka bir çalışma, yaygın Rotavirüs G1P8 genotipinin çocukların yanı sıra buzağılar arasında da tespit edildiğiNİ bildirilmiştir (Ammar *et al.* 2021). Klinik veya semptomsuz Rotavirüs enfeksiyonunda dışkı ile Rotavirüs dökülmesinin, maruziyetten sonra 10 güne kadar devam ettiği gösterilmiştir (Bartholomeusz and Locarnini 2006). Hayvan ve insan dışkıları tarımda hala gübre olarak kullanılmaktadır ve elbette bunların en tehlikelisi, RV enfeksiyonu kaynağı olarak pişirilmeden taze tüketilen sebzelerdir (Nasser *et al.* 2021). Farklı insan Rotavirüs suşlarının coğrafi dağılımı hakkında epidemiyolojik çalışmaların azlığı, gelecekteki Rotavirüs aşıları için en önemli sorunlardan biridir. Ayrıca, gelecekte Rotavirüs salgını kontrol stratejilerine yardımcı olacak, DSÖ tarafından da tavsiye edildiği üzere, dolaşımdaki yeni Rotavirüs suşlarına karşı korunmak için polivalan bir Rotavirüs aşısı geliştirmenin gerekliliği önemli bir noktadır. Mevcut çalışma, Irak açısından İran, Türkiye, Suriye ve diğer komşu ülkelerde meydana gelen RV genotipik değişikliklerine yoğunlaşması gerektiğini göstermektedir.

5.1 Sonuçlar

1. PCR tekniği Rotavirus genotiplerinin tespiti için iyi bir yöntemdir.

2. Moleküler yöntemler, şu anda dolaşan Rotavirüs suşlarının prevalansı hakkında faydalı bilgiler sağlayabilir ve böylece viral prevalansın izlenmesine izin verebilir.
3. Mevcut araştırma, özellikle iki yaşın altındaki çocuklarda Rotavirüs gastroenteritinin mevcut yükünü ve Irak ile komşu ülkelerde dolaşan Rotavirüs suşlarının çeşitliliğini doğrulamaktadır.
4. Küçük çocuklarda akut gastroenterite neden olan ve geç vakalarda dehidratasyon ve ölüme yol açabilen çok sayıda Rotavirüs enfeksiyonu vardır.

KAYNAKLAR

Abood, W. S. 2013. The molecular epidemiology of rotavirus strains causing gastroenteritis in infant in the region of Mid Iraq. 1.

Adams, W. R., & Kraft, L. M. 1963. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. Science, 141, 359–360.

Ahmed, S., Klena, J., Albana, A., Alhamdani, F., Oskoff, J., Soliman, M., Heylen, E., Teleb, N., Husain, T., & Matthijnssens, J. 2013. Infection , Genetics and Evolution Characterization of human rotaviruses circulating in Iraq in 2008 : Atypical G8 and high prevalence of P [6] strains. Infection, Genetics and Evolution, 16, 212–217.

Al-Kelaby, K. K. A. 2008. Study on rotavirus serovars G1 and G2 isolated from acute diarrhea of children. Ph.d thesis, Babylon University.

Al-Saidy, A. A. S. 2019. Role of rotavirus as the cause of acute pediatric diarrhea in AlDiwaniyah ,. 18, 1–4.

Al-Tabtabai, A. M. H., Al-Rubaey, N. K. F., & Al-Zamily, K. Y. 2020. Detection of rotavirus, norovirus and astrovirus among children with acute gastroenteritis in Babylon governorate, Iraq. Biochemical and Cellular Archives, 20, 3295–3299.

Al-Ayed, M. S. Z., Asaad, A. M., Qureshi, M. A., & Hawan, A. A. 2017. Epidemiology of group A rotavirus infection after the introduction of monovalent vaccine in

the National Immunization Program of Saudi Arabia. Journal of Medical Virology, 89, 429–434.

Al Awaidy, S. A., Bawikar, S., Al Busaidy, S., Baqiani, S., Al Abedani, I., Varghese, R., Abdoan, H. S., Al Abdoon, H., Bhatnagar, S., Al Hasini, K. S., Mohan, P., Shah, S., Elamir, E., Klena, J., Ahmed, S. F., Teleb, N., Parashar, U., & Patel, M. M. 2009. Considerations for introduction of a Rotavirus vaccine in Oman: Rotavirus disease and economic burden. Journal of Infectious Diseases, 200, 0–5.

Aliabadi, N., Antoni, S., Mwenda, J. M., Weldegebriel, G., Biey, J. N. M., Cheikh, D., Fahmy, K., Teleb, N., Heffelfinger, J. D., Fox, K., Paladin, F. J., Nakamura, T., Agócs, M., Murray, J., Cherian, T., & Yen, C. 2019. Articles Global impact of rotavirus vaccine introduction on rotavirus hospitalisations among children under 5 years of age , 2008 – 16 : findings from the Global Rotavirus Surveillance Network. 7, 893–903.

Alrwashdeh, M., Almaayteh, M., Kaabneh, A., Haddadin, W., Ababneh, M., & ALHmoud, N. 2020. Prevalence of rotavirus infection in pediatric patients after introduction of the Rotateq vaccine in Jordan. Eurasian Journal of Biosciences, 14, 4853–4860.

Ammar Talib Nasser, Abdulrazak Shafiq Hasan, Amer Khazaal Saleh, & Mohammad Kassem Saleh. 2021. Immunological and molecular detection of rotavirus genotype in children with gastroenteritis in Diyala-Iraq. GSC Advanced Research and Reviews, 06, 194–208.

Arias, C. F., Silva-ayala, D., & López, S. 2015. Rotavirus Entry : a Deep Journey into the Cell with Several Exits. 89, 890–893.

Arientova, S. 2010. The Role of Electron Microscopy in the Rapid Diagnosis of Viral Infections – review. March.

Arun, P., Krishnasami, K., Gunasekeran, P., Fathima, G., & Padmanabhan, V. 2019. Detection and molecular characterization of uncommon rotavirus group a genotype g12 among hospitalized children in chennai. Turkish Journal of Pediatrics, 61, 209–216.

Athiyyah, A. F., Utsumi, T., Wahyuni, R. M., & Dinana, Z. 2019. Molecular Epidemiology and Clinical Features of Rotavirus Infection Among Pediatric Patients in East Java , Indonesia During 2015 – 2018 : Dynamic Changes in Rotavirus Genotypes From Equine-Like G3 to Typical Human G1 / G3. 10, 1–10.

Aydin, H., & Aktaş, O. 2017. Rotavirus genotypes in children with gastroenteritis in Erzurum: first detection of G12P [6] and G12P [8] genotypes in Turkey. Przeglad Gastroenterologiczny, 12, 122.

Azaran, A., Makvandi, M., Teimoori, A., Ebrahimi, S., Heydari, F., & Nikfar, R. 2018. Distribution of rotavirus genotypes circulating in Ahvaz, Iran in 2016. Iranian Biomedical Journal, 22, 107–116.

Balsalobre-Arenas, L., & Alarcón-Cavero, T. 2017. Rapid diagnosis of gastrointestinal tract infections due to parasites, viruses, and bacteria. Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica, 35, 367–376.

Bartholomeusz, A., & Locarnini, S. 2006. Associated With Antiviral Therapy. Antiviral Therapy, 55, 52–55.

Bennour, H., Fodha, I., Bouazizi, A., Hamida-Rebaï, M. Ben, Jerbi, A., Fredj, M. B. H., Lakhal, S., Dhiflaoui, A., Abdelberi, S., Abbassi, F., Boujaafar, N., Fathallah, A., Abroug, S., Khlifa, M., & Trabelsi, A. 2019. Molecular characterization of group a rotavirus among children aged under 5 years in Tunisia, 2015-2017. Journal of Medical Microbiology, 68, 1240–1243.

Betancourt, W. 2019. Part Three. Specific Excreted Pathogens: Environmental and Epidemiology Aspects Cryptosporidium Spp. Global Water Pathogens Project, 3, 1–50.

Bishop, Ruth. 2009. Discovery of rotavirus: Implications for child health. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 24 Suppl 3, S81–S85.

Bishop, RuthF, Davidson, G. P., Holmes, I. H., & Ruck, B. J. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. The Lancet, 302, 1281–1283.

Bishop, RuthF, Davidson, G. P., Holmes, I. H., & Ruck, B. J. 1974. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. The Lancet, 303, 149–151.

Boudreaux, C. E., Kelly, D. F., & Mcdonald, S. M. 2015. Electron microscopic analysis of rotavirus assembly-replication intermediates. Virology, 477, 32–41.

Boudreaux, C. E., Vile, D. C., Gilmore, B. L., Tanner, J. R., Kelly, D. F., & Mcdonald, S. M. 2013. Rotavirus core shell subdomains involved in polymerase encapsidation into virus-like particles. 1818–1826.

Burnett, E., Parashar, U., & Tate, J. 2018. Rotavirus Vaccines: Effectiveness, Safety, and Future Directions. Pediatric Drugs, 20, 223–233.

Chen, S. C., Tan, L. B., Huang, L. M., & Chen, K. T. 2012. Rotavirus infection and the current status of rotavirus vaccines. Journal of the Formosan Medical Association, 111, 183–193.

City, A. A., Al-nasrawy, L. M., & Al-yasseen, A. K. N. 2020. Molecular characterization of Rotavirus infection among children with acute gastroenteritis in Al-Najaf ALAshraf City , Iraq. November 2019.

Cobo, F. 2012. Application of Molecular Diagnostic Techniques for Viral Testing. 104–114.

Cobo, F., & Talavera, P. 2006. Diagnostic approaches for viruses and prions in stem cell banks. 347, 1–10.

Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M. A., Greenberg, H. B., O'Ryan, M., & Kang, G. 2017. Rotavirus infection. Nature Reviews Disease Primers, 3, 1–16.

Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M.,

Franco, M. A., Greenberg, H. B., O'ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., Estes, M. K., Troeger, C., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, S., Blacker, B. F., Ahmed, T., Armah, G., Bernstein, D. I. 2018. Rotavirus infection HHS Public Access. JAMA Pediatrics, 172, 50–53.

Cunliffe, N. A., Glass, R. I., & Nakagomi, O. 2014. Rotavirus and Other Viral Diarrhoea. Manson's Tropical Infectious Diseases, 207.

Dawood, Q., & Altameemi, Y. 2018. Role of Breast Feeding Against Infection With Rotavirus Among Original Research Article Role of Breast Feeding Against Infection With Rotavirus Among Children. International Journal of Development Research, 08(11).

de Waure, C., Sarnari, L., Chiavarini, M., Ianiro, G., Monini, M., Alunno, A., & Camilloni, B. 2020. 10-year rotavirus infection surveillance: Epidemiological trends in the pediatric population of Perugia province. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17, 1–9.

Dennehy, P. H. 2000. Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. Pediatric Infectious Disease Journal, 19, 103–105.

Desselberger, U. 2014. Rotaviruses. Virus Research, 190, 75–96.

Dey, S. K., Sharif, N., Sarkar, O. S., Sarkar, M. K., Talukder, A. A., Phan, T., & Ushijima, H. 2020. Molecular epidemiology and surveillance of circulating rotavirus among children with gastroenteritis in Bangladesh during 2014–2019. PLoS ONE, 15, 1–20.

Dhital, S., Sherchand, J. B., Pokhrel, B. M., Parajuli, K., & Shah, N. 2017. Molecular epidemiology of Rotavirus causing diarrhea among children less than five years of age visiting national level children hospitals , Nepal. 1–7.

Di Fiore, I. J. M., Holloway, G., & Coulson, B. S. 2015. Innate immune responses to rotavirus infection in macrophages depend on MAVS but involve neither the NLRP3 inflammasome nor JNK and p38 signaling pathways. Virus Research, 208, 89–97.

Doan, Y. H., Nakagomi, T., Aboudy, Y., Silberstein, I., Behar-Novat, E., Nakagomi, O., & Shulman, L. M. 2013. Identification by full-genome analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to and causing diarrhea in a human child. Journal of Clinical Microbiology, 51, 182–189.

Dubal, Z. B., Mawlong, M., Susngi, B., Sanjukta, R., Puro, K., Ghatak, S., Sen, A., Barbuddhe, S. B., Ahuja, A., Bhattacharjee, U., Mawlong, M., Susngi, B., Sanjukta, R., Puro, K., Ghatak, S., & Sen, A. 2015. Comparison of agarose gel electrophoresis and RNA-PAGE for rapid detection of rotavirus from faecal samples. Journal of Applied Animal Research, 43, 77–82.

Durmaz, R., Bakkaloglu, Z., Unaldi, O., Karagoz, A., Korukluoglu, G., Kalaycioglu, A. T., Acar, S., & Kilic, S. 2018. Prevalence and diversity of rotavirus A genotypes cirulating in Turkey during a 2-year sentinel surveillance period, 2014-2016. Journal of Medical Virology, 90, 229–238.

Dusetty, P., Velázquez, F. R., Gutiérrez-Escolano, A. L., & Ludert, J. E. 2013. Evaluation of the second generation of a commercial latex agglutination test for the detection of rotavirus antigens in fecal samples. Journal of Clinical Virology, 57, 88–90.

Estrozi, L. F., Settembre, E. C., Goret, G., McClain, B., Zhang, X., Chen, J. Z., Grigorieff, N., & Harrison, S. C. 2013. Location of the dsRNA-dependent polymerase, VP1, in rotavirus particles. Journal of Molecular Biology, 425, 124–132.

Fattah, S. A. A., Hamad, M. A., & Al-ani, M. Q. 2020. Prevalence and Molecular Detection of Rotavirus in Children in Ramadi City-Iraq. 20, 2096–2102.

Fenjan, M. N., Jarullah, B. A., Abdulrahman, S. J., & Roomi, A. B. 2020. Molecular identification and phylogenetic analysis of rotavirus in children suffered from diarrhea under five years old in Thi-Qar Province, of Iraq. International Journal of Pharmaceutical Research, 12, 2484–2491.

Frankenberg, E. 2012. Structural Insights into the Coupling of Virion Assembly and Rotavirus Replication. Bone, 23, 1–7.

Frühwirth, M., Berger, K., Ehlken, B., Moll-Schüler, I., Brösl, S., & Mutz, I. 2001. Economic impact of community- and nosocomially acquired rotavirus gastroenteritis in Austria. Pediatric Infectious Disease Journal, 20, 184–188.

Gautam, R., Lyde, F., Esona, M. D., Quaye, O., & Bowen, M. D. 2013. Comparison of Premier™ Rotaclone®, ProSpecT™, and RIDASCREEN® rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens. Journal of Clinical Virology, 58, 292–294.

Geletu, U. S., Usmael, M. A., & Bari, F. D. 2021. Rotavirus in Calves and Its Zoonotic Importance. 2021.

Gikonyo, J., Mbatia, B., Okanya, P., Obiero, G., Sang, C., & Nyangao, J. 2019. Rotavirus prevalence and seasonal distribution post vaccine introduction in Nairobi county Kenya. Pan African Medical Journal, 33, 1–9.

Giri, S., Nair, N. P., Mathew, A., Manohar, B., Simon, A., Singh, T., Suresh Kumar, S., Mathew, M. A., Babji, S., Arora, R., Girish Kumar, C. P., Venkatasubramanian, S., Mehendale, S., Gupte, M. D., & Kang, G. 2019. Rotavirus gastroenteritis in Indian children < 5 years hospitalized for diarrhoea, 2012 to 2016. BMC Public Health, 19, 1–10.

Glück, S., Buttafuoco, A., Meier, A. F., Arnoldi, F., Vogt, B., Schraner, E. M., Ackermann, M., & Eichwald, C. 2017. Rotavirus replication is correlated with S/G2 interphase arrest of the host cell cycle. PLoS ONE, 12, 1–24.

Greenberg, H. B., & Estes, M. K. 2009. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. Gastroenterology, 136, 1939–1951.

Guerra, S. F., Soares, L. S., Lobo, P. S., Penha Júnior, E. T., Sousa Júnior, E. C., Bezerra, D. A., Vaz, L. R., Linhares, A. C., & Mascarenhas, J. D. 2016. Detection of a novel equine-like G3 rotavirus associated with acute gastroenteritis in Brazil. Journal of General Virology, 97, 3131–3138.

Güzel, M., Akpınar, O., & Kılıç, M. B. 2020. Prevalence of Rotavirus-Associated Acute

Gastroenteritis Cases in Early Childhood in Turkey: Meta-Analysis. Children, 7, 159.

Habash, S. H., & Issa Habeeb, S. 2018. Rotavirus Diarrhea in Children Under Five in Basrah: Hospital Based Study. Pediatric Infectious Diseases: Open Access, 03, 3–7.

Hagbom, M., Istrate, C., Engblom, D., Karlsson, T., & Rodriguez-diaz, J. 2011. Rotavirus Stimulates Release of Serotonin (5-HT) from Human Enterochromaffin Cells and Activates Brain Structures Involved in Nausea and Vomiting, 7, 1–10.

Hart, C. A., & Cunliffe, N. A. 2020. Diarrhoea Caused by Viruses. January, 815–824.

Hauser, M., Dearnaley, W. J., Varano, A. C., Casasanta, M., Mcdonald, S. M., & Kelly, D. F. 2019. Cryo-EM Reveals Architectural Diversity in Active Rotavirus Particles. Computational and Structural Biotechnology Journal, 17, 1178–1183.

Holloway, G., & Coulson, B. S. 2013. Innate cellular responses to rotavirus infection. Journal of General Virology, 94, 1151–1160.

Hussein, R. A., Al-abbas, A. A., Abdullah, A. M., & Al-bashier, N. T. 2015. Prevalence of Rotavirus Infection among Diarrheal Children in Baghdad City. International Journal of Science and Research (IJSR), 4, 978–982.

Ianiro, G., Micolano, R., Bartolo, I. Di, Scavia, G., Monini, M., & Group, R. S. 2019. Group A rotavirus surveillance before vaccine introduction in Italy , September 2014 to August 2017. Eurosurveillance, 24, 1–10.

Jain, S. 2017. Molecular Characterization Of Group A Rotaviruses Prevalent In Himachal Pradesh (Issue 116555).

Jasim, H. S. 2019. Detection of rotavirus genotypes with conventional pcr in group of Iraqi children with acute viral gastroenteritis. Indian Journal of Public Health Research and Development, 10, 676–681.

Jenni, S., Salgado, E. N., Herrmann, T., Li, Z., Grant, T., Grigorieff, N., Trapani, S., Estrozi, L. F., & Harrison, S. C. 2019. In situ Structure of Rotavirus VP1

RNADependent RNA Polymerase. Journal of Molecular Biology, 431, 3124–3138.

Jiménez-Zaragoza, M., Yubero, M. P., Martín-Forero, E., Castón, J. R., Reguera, D., Luque, D., de Pablo, P. J., & Rodríguez, J. M. 2018. Biophysical properties of single rotavirus particles account for the functions of protein shells in a multilayered virus. ELife, 7, 1–23.

João, E. D., Strydom, A., O'Neill, H. G., Cuamba, A., Cassocera, M., Acácio, S., Mandomando, I., Motanyane, L., Page, N., & de Deus, N. 2018. Rotavirus A strains obtained from children with acute gastroenteritis in Mozambique, 20122013: G and P genotypes and phylogenetic analysis of VP7 and partial VP4 genes. Archives of Virology, 163, 153–165.

Jonesteller, C. L., Burnett, E., Yen, C., Tate, J. E., & Parashar, U. D. 2017. Effectiveness of rotavirus vaccination: A systematic review of the first decade of global postlicensure data, 2006-2016. Clinical Infectious Diseases, 65, 840–850.

Jr, T. F., Sung, P., Celma, C. C., & Roy, P. 2017. Rotavirus Genomic RNA Complex Forms via Specific RNA – RNA Interactions : Disruption of RNA Complex Inhibits Virus Infectivity, 6, 1–15.

Justino, M. C., Campos, E. A., Mascarenhas, J. D., Soares, L. S., Guerra, S. D., Furlaneto, I. P., Jaime, M., Jr, C. P., Maciel, T. S., Farias, F. P., Bezerra, O. M., Vinente, C. B., Barros, R. J., & Linhares, A. C. 2019. Rotavirus antigenemia as a common event among children hospitalised for severe , acute gastroenteritis in Belém , northern Brazil, 1–11.

Kang, G., Iturriza-Gomara, M., Wheeler, J. G., Crystal, P., Monica, B., Ramani, S., Primrose, B., Moses, P. D., Gallimore, C. I., Brown, D. W., & Gray, J. 2004. Quantitation of Group A Rotavirus by Real-Time Reverse-TranscriptionPolymerase Chain Reaction: Correlation with Clinical Severity in Children in South India. Journal of Medical Virology, 73, 118–122.

Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., & Chanock, R. M. 1972. Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. Journal of Virology, 10, 1075–1081.

Kareem, J. A., & Hassan, M. J. 2018. Sequencing and Molecular Phylogenetic Analyses of VP4 Gene from Rotavirus in Iraqi Children. International Journal of Microbiology Research, ISSN, 975–5276.

Kargar, M., Jafarpour, T., & Najafi, A. 2012. Burden and typing of rotavirus group A in children with acute gastroenteritis in Shiraz, Southern Iran. Iranian Red Crescent Medical Journal, 14, 531–540.

Khafaji, Y. A., & Al-jiboury, H. J. 2013. Detection of Rotavirus in diarrhea stool samples of children with acute gastroenteritis in Babylon, 4, 84–88.

Khamrin, P., Tran, D. N., Chan-it, W., Thongprachum, A., Okitsu, S., Maneekarn, N., & Ushijima, H. 2011. Comparison of the rapid methods for screening of group a rotavirus in stool samples. Journal of Tropical Pediatrics, 57, 375–377.

Khoury, H., Ogilvie, I., El Khoury, A. C., Duan, Y., & Goetghebeur, M. M. 2011. Burden of rotavirus gastroenteritis in the Middle Eastern and North African pediatric population. BMC Infectious Diseases, 11.

Kirkwood, C. D., Ma, L. F., Carey, M. E., & Steele, A. D. 2019. The rotavirus vaccine development pipeline. Vaccine, 37, 7328–7335.

Leite, M., Carmona, R. de, C. C., Carraro, E., Watanabe, A. S., & Granato, C. F. 2017. Rotavirus genotypes as etiological agents of diarrhoea in general populations of two geographic regions of Brazil. Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 59, 2–9.

Letsa, V. 2018. Molecular Characterization of Group Rotaviruses Detected From Ashaiman in the Greater Accra Region of Ghana (2014-2016). University Of Ghana.

Lekana-Douki, S. E., Kombila-Koumavor, C., Nkoghe, D., Drosten, C., Drexler, J. F., & Leroy, E. M. 2015. Molecular epidemiology of enteric viruses and genotyping of rotavirus A, adenovirus and astrovirus among children under 5 years old in Gabon. International Journal of Infectious Diseases, 34, 90–95.

Lestari, F. B., Vongpunsawad, S., Wanlapakorn, N., & Poovorawan, Y. 2020. Rotavirus infection in children in Southeast Asia 2008-2018: Disease burden, genotype distribution, seasonality, and vaccination. Journal of Biomedical Science, 27, 1–19.

Libersou, S., Siebert, X., Ouldali, M., Estrozi, L. F., Navaza, J., Charpilienne, A., Garnier, P., Poncet, D., & Lepault, J. 2008. Geometric Mismatches within the Concentric Layers of Rotavirus Particles : a Potential Regulatory Switch of Viral Particle Transcription Activity, 82, 2844–2852.

Long, C. P., & McDonald, S. M. 2017. Rotavirus genome replication: Some assembly required. PLoS Pathogens, 13, e1006242.

Lorestani, N., Moradi, A., Teimoori, A., Masodi, M., Khanizadeh, S., Hassanpour, M., Javid, N., Ardebili, A., Tabarraei, A., & Nikoo, H. R. 2019. Molecular and serologic characterization of rotavirus from children with acute gastroenteritis in northern Iran, Gorgan. BMC Gastroenterology, 19, 1–9.

Luchs, A., Cilli, A., Morillo, S. G., Carmona, R. de, C. C., & Timenetsky, M. do C. S. 2012. Rare G3P [3] rotavirus strain detected in Brazil: Possible human–canine interspecies transmission. Journal of Clinical Virology, 54, 89–92.

Luchs, A., & Timenetsky, M. do, C. S. 2016. Group A rotavirus gastroenteritis: postvaccine era, genotypes and zoonotic transmission. Einstein (Sao Paulo, Brazil), 14, 278–287.

Malm, M., Hyöty, H., Knip, M., Vesikari, T., & Blazevic, V. 2019. Development of T cell immunity to norovirus and rotavirus in children under five years of age. January, 1–9.

Mansoor, A. N., & Mahmood, S. U. 2018. Pakistan's Stance Against Rotavirus-Need for Awareness. Journal of Gastrointestinal & Digestive System, 08, 8–10.

Maringa, W. M., Mwangi, P. N., Simwaka, J., Mpabalwani, E. M., Mwenda, J. M., Peenze, I., Esona, M. D., Mphahlele, M. J., Seheri, M. L., & Nyaga, M. M. 2020. Molecular Characterisation of a Rare Reassortant Porcine-Like G5P [6] Rotavirus Strain Detected in an Unvaccinated Child in Kasama, Zambia. Pathogens, 9, 663.

Marmash, R. W., Dalwai, A. K., Szucs, G., Molla, A. M., Pacsa, A. S., Al-Nakib, W., & Albert, M. J. 2007. Genotypic characterization of rotaviruses and prevalence of serotype-specific serum antibodies in children in Kuwait. Epidemiology and Infection, 135, 1331–1337.

Matthijnssens, Jella, C., Max, M., Sarah, M. A., Houssam. B., Kriszti, B., Rodney, B., Javier, E., Mathew, D. E., Mary, K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., van Ranst, M. 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). Archives of Virology, 156, 1397–1413.

Mijatovic-Rustempasic, S., Tam, K. I., Kerin, T. K., Lewis, J. M., Gautam, R., Quaye, O., Gentsch, J. R., & Bowen, M. D. 2013. Sensitive and specific quantitative detection of rotavirus a by one-step real-time reverse transcription-PCR assay without antecedent double-stranded-RNA denaturation. Journal of Clinical Microbiology, 51, 3047–3054.

Motayo, B. O., Faneye, A. O., & Adeniji, J. A. 2018. Epidemiology of Rotavirus A in Nigeria : Molecular Diversity and Current Insights. 2018.

Muendo, C., Laving, A., Kumar, R., Osano, B., Egondi, T., & Njuguna, P. 2018. Prevalence of rotavirus infection among children with acute diarrhoea after rotavirus vaccine introduction in Kenya , a hospital cross-sectional study, 1–9.

Nafi, O. 2010. Rotavirus gastroenteritis among children aged under 5 years in al karak, Jordan. Eastern Mediterranean Health Journal, 16, 1064–1069.

Nakawesi, J. S., Wobudeya, E., Ndeezi, G., Mworozi, E. A., & Tumwine, J. K. 2010. Prevalence and factors associated with rotavirus infection among children admitted with acute diarrhea in Uganda. BMC Pediatrics, 10.

Napolitano, F., Ali Adou, A., Vastola, A., & Angelillo, I. F. 2019. Rotavirus infection and vaccination: Knowledge, beliefs, and behaviors among parents in Italy. International journal of environmental research and public health, 16, 1807.

Nasab, S. D. M., Sabahi, F., Makvandi, M., Samiee, S. M., Nadji, S. A., & Ravanshad, M. 2016. Epidemiology of rotavirus-norovirus co-infection and determination of norovirus genogrouping among children with acute gastroenteritis in Tehran, Iran. Iranian Biomedical Journal, 20, 280.

Nasser, A. T., Hasan, A. S., Saleh, A. K., & Saleh, M. K. 2021. Immunological and molecular detection of rotavirus genotype in children with gastroenteritis in Diyala-Iraq. GSC Advanced Research and Reviews, 6, 194–208.

Nick, S. T., Mohebbi, S. R., Ghaemi, A., & Hosseini, S. M. 2019. Human rotavirus in Iran; molecular epidemiology, genetic diversity and recent updates on vaccine advances. Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench, 12, 9–109.

Ojobor, C. D., Olovo, C. V., Onah, L. O., & Ike, A. C. 2020. Prevalence and associated factors to rotavirus infection in children less than 5 years in Enugu State, Nigeria. VirusDisease, 31, 316–322.

Otero, C. E., Langel, S. N., Blasi, M., & Permar, S. R. 2020. Maternal antibody interference contributes to reduced rotavirus vaccine efficacy in developing countries. PLoS Pathogens, 16, 1–10.

Ouermi, D., Soubeiga, D., Nadembèga, W. M. C., Sawadogo, P. M., Zohoncon, T. M., Obiri-Yeboah, D., Djigma, F. W., Nordgren, J., & Simpore, J. 2017. Molecular epidemiology of rotavirus in children under five in Africa (2006-2016): A systematic review. Pakistan Journal of Biological Sciences, 20, 59–69.

Owor, B. E., Mwanga, M. J., Njeru, R., Mugo, R., Nokes, D. J., Agoti, C. N., Ngama, M., & Otieno, G. P. 2019. Molecular characterization of rotavirus group A strains circulating prior to vaccine introduction in rural coastal Kenya , 2002-2013 version 2 ; peer review : 2 approved , 1 approved with reservations. May.

Pant, M., H, K., KP, S., & HC, J. 2017. Detection of Rota Virus with the Help of Nanomaterial Based Field Effect Transistor (BIO-FET). Biosensors Journal, 06(02).

Prez, V. E., Gil, P. I., Temprana, C. F., Cuadrado, P. R., Martínez, L. C., Giordano, M. O., & Barril, P. A. 2015. Quantification of human infection risk caused by rotavirus in surface waters from Córdoba, Argentina. Science of the Total Environment, 538, 220-229.

Patton, J. T. 2012. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. Discovery Medicine, 13, 85.

Periz, J., Celma, C., Jing, B., Pinkney, J. N. M., Roy, P., & Kapanidis, A. N. 2013. Rotavirus mRNAS are released by transcript-specific channels in the doublelayered viral capsid. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110, 12042–12047.

Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K., & Venkataram Prasad, B. V. 2006. Rotavirus proteins: Structure and assembly. Current Topics in Microbiology and Immunology, 309, 189–219.

Reta, D. H., Tessema, T. S., Ashenef, A. S., Desta, A. F., Labisso, W. L., Gizaw, S. T., Abay, S. M., Melka, D. S., & Reta, F. A. 2020. Molecular and Immunological Diagnostic Techniques of Medical Viruses. 2020.

Roczo-Farkas, S., Kirkwood, C. D., Cowley, D., Barnes, G. L., Bishop, R. F., Bogdanovic-sakran, N., Boniface, K., Donato, C. M., & Bines, J. E. 2018. The impact of rotavirus vaccines on genotype diversity: a comprehensive analysis of 2 decades of Australian surveillance data. The Journal of infectious diseases, 218, 546-554.

Sadeq, T. N., & Ali, A. D. 2019. Effects of Rota Vaccine on Severity and Duration of Rotavirus Infection among Children Less Than 5 Years Old at Al Kadhimiya Pediatrics Hospital, 375, 223–230

Sadiq, A., Bostan, N., Bokhari, H., Matthijnssens, J., Yinda, K. C., Raza, S., & Nawaz, T. 2019. Molecular characterization of human group A rotavirus genotypes circulating in Rawalpindi, Islamabad, Pakistan during 2015-2016. PLoS ONE, 14, 1–28.

Sadiq, A., Bostan, N., Yinda, K. C., Naseem, S., & Sattar, S. 2018. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. Reviews in Medical Virology, 28(6).

Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., & Morimoto, S. 2018. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. Journal of Natural Medicines, 72, 32–42.

Salami, A., Fakih, H., Chakkour, M., Salloum, L., Bahmad, H. F., & Ghssein, G. 2019. Prevalence , risk factors and seasonal variations of different Enteropathogens in Lebanese hospitalized children with acute gastroenteritis. 1–10.

Salgado, E. N., Upadhyayula, S., & Harrison, S. C. 2017. Single-Particle Detection of Transcription following Rotavirus Entry. Journal of Virology, 2, 227–249.

Saxena, K., Blutt, S. E., Ettayebi, K., Zeng, X., Broughman, J. R., Crawford, S. E., Karandikar, U. C., Sastri, N. P., Conner, M. E., Opekun, A. R., Graham, D. Y., Qureshi, W., Sherman, V., Foulke-abel, J., In, J., Kovbasnjuk, O., Zachos, N. C.,

Donowitz, M., & Estes, K. 2016. Human Intestinal Enteroids : a New Model To Study Human Rotavirus Infection , Host Restriction , and Pathophysiology. 90, 43–56.

Shaheen, M. 2017. Molecular Characterization of Rotavirus Strains Causing Gastroenteritis in Children under 5 Years in Cairo, Egypt. MOJ Public Health, 6, 428–432.

Shen, M., Zhou, Y., Ye, J., Al-maskri, A. A., Kang, Y., & Zeng, S. 2020. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. Journal of Pharmaceutical Analysis, 10, 97–101.

Shrestha, S., Thakali, O., Raya, S., Shrestha, L., & Parajuli, K. 2019. Acute gastroenteritis associated with Rotavirus A among children less than 5 years of age in Nepal. BMC Infectious Diseases, 1–8.

Sidoti, F., Ritt À, M., Costa, C., & Cavallo, R. 2015. Diagnosis of viral gastroenteritis: Limits and potential of currently available procedures. Journal of Infection in Developing Countries, 9, 551–561.

Soares, S., & Linhares, C. 2010. Molecular characterization of G1 human rotaviruses detected in children from Belém , Pará , Brazil. 125–130.

Soltan, M. A., Tsai, Y. L., Lee, P. Y., Tsai, C. F., Chang, H. F., Wang, H. T., & Wilkes, R. P. 2016. Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. Journal of Virological Methods, 235, 99–104.

Steele, A. D., Victor, J. C., Carey, M. E., Tate, J. E., Atherly, D. E., Pecenka, C., Diaz, Z., Parashar, U. D., Kirkwood, C. D., Victor, J. C., Carey, M. E., Tate, J. E., Atherly, D. E., & Pecenka, C. 2019. Experiences with rotavirus vaccines : can we improve rotavirus vaccine impact in developing countries ? Human Vaccines & Immunotherapeutics, 15, 1215–1227.

Sudhir, P., & Delma, D. 2018. Comparison of body image perception and the actual BMI and correlation with self-esteem and mental health: A cross-sectional study among adolescents Sudhir. International Journal of Health & Allied Sciences, 7, 145–150.

Surendran, S. 2008. Review article : Rotavirus Infection : Molecular Changes And Pathophysiology. 154–162.

Suzuki, H. 2019. Rotavirus Replication : Gaps of Knowledge on Virus Entry and Morphogenesis. 285–296.

Teleb, N. 2008. Rotavirus Surveillance Network in the Eastern Mediterranean regional. 8th International Rotavirus Symposium, 3–4.

Tian, Y., Chughtai, A. A., Gao, Z., Yan, H., Chen, Y., Liu, B., Huo, D., Jia, L., Wang, Q., & MacIntyre, C. R. 2018. Prevalence and genotypes of group A rotavirus among outpatient children under five years old with diarrhea in Beijing, China, 2011-2016. BMC Infectious Diseases, 18, 1–11.

Trask, S. D., McDonald, S. M., & Patton, J. T. 2012. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. Nature Reviews Microbiology, 10, 165–177.

Ulrich, S., & Ziebert, C. 2017. Nanocrystalline Metastable Hard Coatings Provided for non-commercial research and education use . Not for reproduction , distribution or commercial use . Egypt. Acad. J. Biolog. Sci., 10, 4–10.

Vidya, P., Ponnambalam, A., & Arunagiri, K. 2015. Journal of Pediatric Sciences Rota virus infections : prevalence , diagnosis and prevention. August 2017.

Wandera, A. E. 2017. Rotavirus Disease Epidemiology and Molecular Characteristics. Doctoral dissertation, Nagasaki University.

WHO. 2009. Manual of rotavirus detection and characterization methods. World Health Organization.

Zeng, Y., Li, T., Zhao, B., Lai, F., Tang, X., Qiao, Y., Chen, W., Yu, F., Zhang, S., Wang, Y., Ge, S., Xu, H., & Xia, N. 2019. Molecular epidemiology of group A rotavirus in outpatient diarrhea infants and children in Chongqing, China, 2011-2015. Journal of Medical Virology, 91, 1788–1796.