

BÖLÜM 36

GASTROENTERİT ETKENİ VİRÜSLERİN TANI VE EPİDEMİYOLOJİSİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN KULLANIMI

Gülendam BOZDAYI¹

Giriş

Gastroenteritler tüm dünyada majör mortalite ve morbidite nedeni olup olguların çoğundan virüsler sorumludur ¹. Elektron mikroskobu kullanılarak 1972 yılında ilk enterik virüs olan Norovirüs'ün (Caliciviridae) tanımlanmasından bu yana, Rotavirüs (Reoviridae), Picobirnavirüs (Picobirnaviridae), Astrovirüs (Astroviridae), enterik Adenovirüs (Adenoviridae), Sapovirüs (Caliciviridae), Torovirüs (Coronaviridae), Parechovirüs, Bocavirüs, Aichivirüs (Picornaviridae) ve daha birçok virüsün gastroenterit enfeksiyonları ile ilişkili olduğu bulunmuştur ²⁻⁸.

Akut viral gastroenteritler, bağışıklığı baskılanmış ve genç bireylerde daha sık görülmekle birlikte ⁹, fizyolojideki değişikliklere ve bağışıklığın zamanla azalmasına bağlı olarak yaşlı bireylerde de görülmektedir ¹⁰.

Viral gastroenteritlerin tanısında kullanılan elektron mikroskobu, seroloji ve virüs izolasyonu gibi geleneksel tanı yöntemleri, klinik laboratuvarların temel dayanağı olmuştur, ancak viro-

mun değişim hızının artışıyla birlikte geleneksel yöntemlerden elde edilen verim azalmıştır. Viral genomun moleküler karakterizasyonu, tanı kabiliyetini ve epidemiyolojik sürveyansı büyük ölçüde geliştirmiştir. Moleküler tanısal yaklaşımlar teknik uzmanlık gerektirse de çok geniş aralıktaki virüsleri tespit edebilmeleri, testlerin sonuca ulaşma ve geri dönüş sürelerinin 2-6 saat arasında olması ve en önemlisi de yüksek özgüllüğe ve duyarlılığa sahip olması sebebi ile virüslerin tanısı için tercih edilen yöntemlerdir ^{7,11}.

Moleküler yöntemler DNA veya RNA'nın çeşitli nükleik asit amplifikasyon teknikleriyle amplifikasyonuna [nucleic acid amplification tests (NAAT)] dayanır. Polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] ve bunun modifikasyonları olan gerçek zamanlı PCR [real-time PCR (Rt-PCR)] ile multipleks PCR, klinik laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmaktadır. NAAT'lar, virüs ile enfekte hastalarda, enfeksiyonun seyri sırasında, düşük düzeyde virüs saçılımında bile doğru ve hızlı tanı sağlayabilmektedir. Ayrıca, NAAT'lar kolayca tek-

¹ Prof. Dr. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD., gbozdayi@hotmail.com

Microarray

Microarray yöntemi toplu analiz, sürveyans ve farkındalık için oldukça uygundur ve ayrıca endemik bölgelerdeki rezervuarları izlemek için kullanılmıştır. Daha önce çok sayıda virüsün eş zamanlı tespiti için uygulanmıştır⁵⁹. İnternal nükleik asit ekstraksiyon kontrolü ve PCR kontrolü içeren FilmArray GI Panel testi, otomatikleştirilmiş nükleik asit ekstraksiyonu, ters transkripsiyon, amplifikasyon ve analizden oluşur. Bu teste sonuçlar her çalışmada örnek başına bir saatte sağlanır⁶⁰. Rutin yöntemlerin örneklerin yalnızca %1'ini tanımlayabildiği bir çalışmada, FilmArray GI Paneli tarafından pozitif örneklerin %30'unda birden fazla organizma tespit edilmiştir⁶⁰. Geliştirilen bir DNA *microarray* teknolojisinde 14 referans gastrointestinal virüs test edilerek doğrulanmış ve klinik örneklerde de kolaylıkla HAdV-F, HAdV-A, HPeV, HBoV ve TTV'den oluşan beş farklı viral tür tanımlanmıştır⁶¹.

Aptamerler

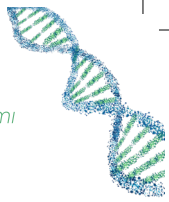
Aptamerler antikorlara alternatif olarak geliştirilen bir oligonükleotit veya peptid dizisidir ve dünya çapında araştırmacıların büyük ilgisini çekmiştir. Antikorların tüm benzersiz özelliklerini taşırlar, termostabil ve ekonomiktirler, bu durum onları sınırlı kaynaklarda kullanılmaya daha uygun hale getirmektedir⁶². Etkili tanı için aptamerler RT-PCR ile birleştirilmektedir. ELISA'ya benzer şekilde Aptamer bağlantılı immün sorbent testi, yüzey plazmon rezonans [surface plasmon resonance (SPR)] tabanlı ve konsol tabanlı aptasensörler olarak kullanılırlar. Aptasensörlerin yüksek hassasiyeti avantajlıdır ve bu nedenle taşınabilir, kolay ve hızlı algılama sundukları için hasta başı tanı da kullanım potansiyeline sahiptir⁶³. Bu yöntem, Norovirüs suşlarının tanısında etkin bir şekilde kullanılmıştır⁶⁴. Klinik örneklerden insan norovirüslerinin tespiti için in situ capture Rt-PCR analizine dayalı bir aptamer yakın zamanda geliştirilmiştir²⁴.

Sonuç olarak; gastroenterit etkeni virüslerin tanı ve epidemiyolojisinde kullanılan moleküler

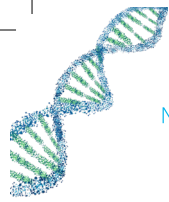
yöntemler temelde nükleik asit amplifikasyonuna dayalı olup, çeşitli modifikasyonlar ve yeni nesil yöntemlerle gelişmeye devam etmektedir. Temel moleküler tanı yöntemleri hızlı, güvenilir ve duyarlı viral tanı sağlamanın yanında, asemptomatik enfeksiyonlar ve taşıyıcılığın izlenilmesinde de büyük öneme sahiptir ve bu yönüyle de epidemiyolojiye katkı sağlamaktadır. Etken virüslerin genom yapısına bağlı olarak kullanılacak moleküler yöntemler de değişiklik göstermektedir. Çoklu etkenlerin sebep olduğu enfeksiyonlarda Multipleks PCR yöntemleri ve modifikasyonları kullanılmaktadır. Diyare olgularında bakteriyel etkenler de eşlik edebileceğinden bakteriyel ve viral etkenleri aynı anda tespit eden real-time ve multipleks PCR'in kominasyonu olan panel sistemler de hızlı ve güvenilir tanıya aracılık etmektedir. Yeni nesil tanı araçlarının da hızlı tanı ve kolay uygulanabilir olması bu yöntemlerin yakın zamanda geniş alanda kullanım bulacağını göstermektedir.

Kaynaklar

1. Shane AL, Mody RK, Crump JA, Tarr PI, Steiner TS, Kotloff K, et al. Infectious Diseases Society of America clinical practice guidelines for the diagnosis and management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis* 2017;65(12): e45-e80.
2. Cheng WX, Jin Y, Duan ZJ, Xu ZQ, Qi HM, Zhang Q, et al. Human bocavirus in children hospitalized for acute gastroenteritis: a case-control study. *Clin Infect Dis* 2008;47(2): 161-167.
3. Dhama K, Pawaiya RVS, Chakraborty S, Tiwari R, Verma AK. Toroviruses affecting animals and humans: A review. *Asian J Anim Vet Adv* 2014;9(8): 190-201.
4. Malik YS, Kumar N, Sharma K, Dhama K, Shabbir MZ, Ganesh B, et al. Epidemiology, phylogeny, and evolution of emerging enteric Picobirnaviruses of animal origin and their relationship to human strains. *BioMed Res Int* 2014;2014: 780752.
5. Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2014;14(8): 725-730.
6. Yip CC, Lo K-L, Que T-L, Lee RA, Chan K-H, Yuen K-Y, et al. Epidemiology of human parechovirus, Aichi virus and salivirus in fecal samples from hospitalized children with gastroenteritis in Hong Kong. *Virol J* 2014;11(1): 1-10.
7. Sidoti F, Rittà M, Costa C, Cavallo R. Diagnosis of viral gastroenteritis: limits and potential of currently available procedures. *J Infect Dev Ctries* 2015;9(06): 551-561.
8. Delmas B, Attoui H, Ghosh S, Malik Y, Mundt E, Vakharia V. ICTV virus taxonomy profile: Picobirnaviridae. *J Gen Virol* 2019;100: 133-4.



9. Krones E, Högenauer C. Diarrhea in the immunocompromised patient. *Gastroenterol Clin North Am* 2012;41(3): 677-701.
10. Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. Pp:1347–1401. In: Knipe DM, Howley PM et al. *Fields Virology*. 2013, 6th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
11. Steyer A, Jevšnik M, Petrovec M, Pokorn M, Grosek Š, Steyer AF, et al. Narrowing of the diagnostic gap of acute gastroenteritis in children 0-6 years of age using a combination of classical and molecular techniques, delivers challenges in syndromic approach diagnostics. *Pediatr Infect Dis J* 2016;35(9): e262.
12. Malik YS, Verma AK, Kumar N, Touil N, Karthik K, Tiwari R, et al. Advances in diagnostic approaches for viral etiologies of diarrhea: from the lab to the field. *Front Microbiol* 2019;10: 1957.
13. Kowada K, Takeuchi K, Hirano E, Toho M, Sada K. Development of a multiplex real-time PCR assay for detection of human enteric viruses other than norovirus using samples collected from gastroenteritis patients in Fukui Prefecture, Japan. *J Med Virol* 2018;90(1): 67-75.
14. Phan TG, Nordgren J, Ouermi D, Simporé J, Nitiema LW, Deng X, et al. New astrovirus in human feces from Burkina Faso. *J Clin Virol* 2014;60(2): 161-164.
15. Guan TP, Teng JL, Yeong KY, You ZQ, Liu H, Wong SS, et al. Metagenomic analysis of Sichuan takin fecal sample viromes reveals novel enterovirus and astrovirus. *Virology* 2018;521: 77-91.
16. Kumar N, Malik YS, Kumar S, Sharma K, Sircar S, Saurabh S, et al. Peptide-recombinant VP6 protein based enzyme immunoassay for the detection of group A rotaviruses in multiple host species. *PLoS One* 2016;11(7): e0159027.
17. Ye X, Xu J, Lu L, Li X, Fang X, Kong J. Equipment-free nucleic acid extraction and amplification on a simple paper disc for point-of-care diagnosis of rotavirus A. *Analytica chimica acta* 2018;1018: 78-85.
18. Wang H, Cong F, Zeng F, Lian Y, Liu X, Luo M, et al. Development of a real time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method (RT-LAMP) for detection of a novel swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV). *J Virol Methods* 2018;260: 45-48.
19. Smits SL, Schapendonk CM, van Beek J, Vennema H, Schürch AC, Schipper D, et al. New viruses in idiopathic human diarrhea cases, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2014;20(7): 1218.
20. Kemenesi G, Dallos B, Görfői T, Estók P, Boldogh S, Kurucz K, et al. Genetic diversity and recombination within bunyaviruses: Detection of a novel strain in Hungarian bats. *Infect Genet Evol* 2015;33: 288-292.
21. Varela MF, Monteiro S, Rivadulla E, Santos R, Romalde JL. Development of a novel digital RT-PCR method for detection of human sapovirus in different matrices. *J Virol Methods* 2018;254: 21-24.
22. Nasheri N, Petronella N, Ronholm J, Bidawid S, Corneau N. Characterization of the genomic diversity of norovirus in linked patients using a metagenomic deep sequencing approach. *Front Microbiol* 2017;8: 73.
23. Baek SH, Kim MW, Park CY, Choi C-S, Kailasa SK, Park JP, et al. Development of a rapid and sensitive electrochemical biosensor for detection of human norovirus via novel specific binding peptides. *Biosens Bioelectron* 2019;123: 223-229.
24. Liu D, Zhang Z, Yin Y, Jia F, Wu Q, Tian P, et al. Development and evaluation of a novel in situ target-capture approach for aptamer selection of human noroviruses. *Talanta* 2019;193: 199-205.
25. Malik Y, Sharma A, Sharma K, Sircar S, Dhama K. RNA polymerase gene based RT-PCR assay with primers update for genus specific detection of picobirnaviruses. *J Anim Plant Sci* 2017;27(2): 582-588.
26. Pabbaraju K, Wong S, Fox JD. Detection of adenoviruses. Pp: 1-15. In: Stephenson CR, Warnes A. *Diagnostic Virology Protocols*. 2010, 2nd ed. Humana Press, Springer, London, UK.
27. Esona MD, Gautam R. Rotavirus. *Clin Lab Med* 2015;35(2): 363-391.
28. O'Neill HJ, McCaughey C, Wyatt DE, Mitchell F, Coyle PV. Gastroenteritis outbreaks associated with Norwalk-like viruses and their investigation by nested RT-PCR. *BMC microbiology* 2001;1(1): 1-8.
29. Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Shinozaki K. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. *Arch Virol* 2006;151(12): 2503-2509.
30. Rigotto C, Victoria M, Moresco V, Kolesnikovas C, Corrêa A, Souza D, et al. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. *J Appl Microbiol* 2010;109(6): 1979-1987.
31. Ryu H, Cashdollar JL, Fout GS, Schrantz KA, Hayes S. Applicability of integrated cell culture quantitative PCR (ICC-qPCR) for the detection of infectious adenovirus type 2 in UV disinfection studies. *J Environ Sci Health, Part A* 2015;50(8): 777-787.
32. Parshionikar S, Laseke I, Fout GS. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(13): 4318-4326.
33. Bonot S, Ogorzaly L, El Moulaj B, Zorzi W, Cauchie H-M. Detection of small amounts of human adenoviruses in stools: comparison of a new immuno real-time PCR assay with classical tools. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(12): 1010-1016.
34. Yamashita T, Sugiyama M, Tsuzuki H, Sakae K, Suzuki Y, Miyazaki Y. Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the Picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J Clin Microbiol* 2000;38(8): 2955-2961.
35. Schwab KJ, Neill FH, Le Guyader F, Estes MK, Atmar RL. Development of a reverse transcription-PCR-DNA enzyme immunoassay for detection of "Norwalk-like" viruses and hepatitis A virus in stool and shellfish. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(2): 742-749.
36. Thongprachum A, Khamrin P, Pham NTK, Takanashi S, Okitsu S, Shimizu H, et al. Multiplex RT-PCR for rapid detection of viruses commonly causing diarrhea in pediatric patients. *J Med Virol* 2017;89(5): 818-824.
37. Gouvea V, Santos N. Rotavirus serotype G5: an emerging cause of epidemic childhood diarrhea. *Vaccine* 1999;17(11-12): 1291-1292.
38. Lee T, Kurtz J. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976–92, with evidence for two new



- serotypes. *Epidemiol Infect* 1994;112(1): 187-193.
39. Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 1995;33(4): 797-801.
 40. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990;28(2): 276-282.
 41. Gentsch JR, Glass R, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30(6): 1365-1373.
 42. Liu Y, Xu Z-q, Zhang Q, Jin M, Yu J-m, Li J-s, et al. Simultaneous detection of seven enteric viruses associated with acute gastroenteritis by a multiplexed Luminex-based assay. *J Clin Microbiol* 2012;50(7): 2384-2389.
 43. Hamza IA, Jurzik L, and Wilhelm M. Development of a Luminex assay for the simultaneous detection of human enteric viruses in sewage and river water. *J Virol Methods* 2014;204: 65-72.
 44. Jiang Y, Fang L, Shi X, Zhang H, Li Y, Lin Y, et al. Simultaneous detection of five enteric viruses associated with gastroenteritis by use of a PCR assay: a single real-time multiplex reaction and its clinical application. *J Clin Microbiol* 2014;52(4): 1266-1268.
 45. Anaya-Molina Y, Hernández SIDLC, Andrés-Dionicio AE, Terán-Vega HL, Méndez-Pérez H, Castro-Escarpulli G, et al. A one-step real-time RT-PCR helps to identify mixed rotavirus infections in Mexico. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;92(4): 288-293.
 46. Wongboot W, Okada K, Chantaroj S, Kamjumphol W, Hamada S. Simultaneous detection and quantification of 19 diarrhea-related pathogens with a quantitative real-time PCR panel assay. *J Microbiol Methods* 2018;151: 76-82.
 47. Hornyák Á, Bálint Á, Farsang A, Balka G, Hakhverdyan M, Rasmussen TB, et al. Detection of subgenomic mRNA of feline coronavirus by real-time polymerase chain reaction based on primer-probe energy transfer (P-sg-QPCR). *J Virol Methods* 2012;181(2): 155-163.
 48. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991;350: 91-92.
 49. Mo Q-H, Wang H-B, Dai H-R, Lin J-C, Tan H, Wang Q, et al. Rapid and simultaneous detection of three major diarrhea-causing viruses by multiplex real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Arch Virol* 2015;160(3): 719-725.
 50. Mo Q-H, Wang H-B, Tan H, Wu B-M, Feng Z-L, Wang Q, et al. Comparative detection of rotavirus RNA by conventional RT-PCR, TaqMan RT-PCR and real-time nucleic acid sequence-based amplification. *J Virol Methods* 2015;213: 1-4.
 51. Karthik K, Rathore R, Thomas P, Arun T, Viswas K, Dhama K, et al. New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. *MethodsX* 2014;1: 137-143.
 52. Nagamine K, Hase T, and Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002;16(3): 223-229.
 53. Yoda T, Suzuki Y, Yamazaki K, Sakon N, Kanki M, Aoyama I, et al. Evaluation and application of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of noroviruses. *J Med Virol* 2007;79(3): 326-334.
 54. Malik YS, Sharma K, Kumar N, Shivachandra SB, Rawat V, Rakholia R, et al. Rapid detection of human rotavirus using NSP4 gene specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Indian J Virol* 2013;24(2): 265-271.
 55. Hanke D, Pohlmann A, Sauter-Louis C, Höper D, Stadler J, Ritzmann M, et al. Porcine epidemic diarrhea in Europe: in-detail analyses of disease dynamics and molecular epidemiology. *Viruses* 2017;9(7): 177.
 56. Rosario K, Duffy S, and Breitbart M. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. *Arch Virol* 2012;157(10): 1851-1871.
 57. Rosario K, Nilsson C, Lim YW, Ruan Y, and Breitbart M. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environ Microbiol* 2009;11(11): 2806-2820.
 58. Piao J, Jiang J, Xu B, Wang X, Guan Y, Wu W, et al. Simultaneous detection and identification of enteric viruses by PCR-mass assay. *PLoS One* 2012;7(8): e42251
 59. Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, Avila PC, Boushey HA, Ganem D, et al. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99(24): 15687-15692.
 60. Buss SN, Leber A, Chapin K, Fey PD, Bankowski MJ, Jones MK, et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2015;53(3): 915-925.
 61. Martínez MA, Soto-del Río MdD, Gutiérrez RM, Chiu CY, Greninger AL, Contreras JF, et al. DNA microarray for detection of gastrointestinal viruses. *J Clin Microbiol* 2015;53(1): 136-145.
 62. Song K-M, Lee S, Ban C. Aptamers and their biological applications. *Sensors* 2012;12(1): 612-631.
 63. van den Kieboom CH, van der Beek SL, Mészáros T, Gyurcsányi RE, Ferwerda G, de Jonge MI. Aptasensors for viral diagnostics. *Trends Analyt Chem* 2015;74: 58-67.
 64. Escudero-Abarca BI, Suh SH, Moore MD, Dwivedi HP, and Jaykus L-A. Selection, characterization and application of nucleic acid aptamers for the capture and detection of human norovirus strains. *PloS one* 2014;9(9): e106805.