



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**ASEPTİK MENENJİT ŞÜPHELİ HASTALARA AİT BOS
ÖRNEKLERİNDE HUMAN PARECHOVİRUS VE
ENTEROVİRUSLARIN ARAŞTIRILMASI**

**Canan ÇORABATIR DİRİM
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER**

MERSİN - 2015



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**ASEPTİK MENENJİTLİ HASTALARA AİT BOS
ÖRNEKLERİNDE HUMAN PARECHOVİRUS VE
ENTEROVİRUSLARIN ARAŞTIRILMASI**

**Canan ÇORABATIR DİRİM
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER**

Bu tez “BAP-TF TMAD (CÇ) 2013-2 TU” kodlu proje olarak Mersin
Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir.

MERSİN - 2015

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitim s¼rem boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaŐan hocalarım; baŐta Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı BaŐkanı Prof. Dr. G¼n¼l ASLAN olmak üzere Prof. Dr. Nuran DELİALİOğLU, Prof. Dr. Candan ÖZT¼RK, Prof. Dr. Feza OTAğ, Prof. Dr. G¼rol EMEKDAŐ ve tez danıŐmanım değerli Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER'e; destek ve sevgilerini her zaman hissetiğim canım ailem ve eŐim Sercan DİRİM'e teŐekk¼r ederim.

Dr. Canan ÇORABATIR DİRİM

İÇİNDEKİLER

ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	8
Menenjit Tanımı	8
Aseptik Menenjit Tanımı	8
Aseptik Menenjit Etyoloji ve Epidemiyolojisi	8
Viral Aseptik Menenjit Fizyopatolojisi ve Patogenezi	10
<i>Picornaviridae</i> Ailesi İçerisindeki Aseptik Menenjit Etkenleri	11
Enteroviruslar	11
Human Parechoviruslar	14
HPeV Reseptörleri	16
Hücre Tropizmi ve Reseptör Etkileşimleri	17
HPeV Replikasyon Siklusu	17
HPeV Enfeksiyonları	19
HPeV Epidemiyolojisi	22
MSS Enfeksiyonları ile İlişkili HPeV Epidemiyolojisi	23
Viral Aseptik Menenjitin Laboratuvar Bulguları	25
EV Enfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı	25
HPeV Enfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı	26
Viral Aseptik Menenjitte Tedavi	29
Viral Aseptik Menenjitte Prognoz	30
Viral Aseptik Menenjitten Korunma	31
GEREÇ ve YÖNTEM	32
BULGULAR	41
TARTIŞMA	45
SONUÇ ve ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	54
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	1
ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ	2
TABLolar DİZİNİ	3

ÖZET

Aseptik menenjitte, klinik ve laboratuvar bulguları meningeal inflamasyonu göstermesine rağmen rutin inceleme ve kültürlerle etken saptanamamaktadır ve en sık görülen etken enterovirus (EV)lardır. Son yıllarda aseptik menenjit etkenleri arasında, yaygın olarak tüm dünyada çocuklarda tanımlanmaya başlanan *Picornaviridae* ailesinden bir virus olan human parechovirus (HPeV) da bulunmaktadır. Mersin ilinde, şu ana kadar HPeV ve EV enfeksiyonunun varlığı yönünden herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda, aseptik menenjit şüphesiyle laboratuvarımıza gönderilen beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinde HPeV ve EV varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Gram boyama ile incelenmesi sonucunda mikroorganizma görülmeyen ve bakteriyolojik kültüründe üreme olmayan, lökosit sayısı ortalama $90/\text{mm}^3$ olan toplam 50 BOS örneği çalışmaya dahil edildi. HPeV ve EV varlığı "real time" revers transkriptaz (RT)-PCR yöntemi ile araştırıldı. Örneklerin hiçbirinde RT-PCR sonrası HPeV pozitifliğine rastlanmazken örneklerin dört tanesinde (%8, 4/50) EV saptandı. EV saptanan hastaların yaş aralığı 6-16 olduğu, örneklerden birinin Eylül 2013'te üçünün ise 2014 Ağustos-Eylül aylarında alındığı belirlendi. Sonuç olarak, EV enfeksiyonunun ilimizde çocuklarda oldukça yaygın bulunduğu saptandı. Enteroviral meningoensefalitlerin erken tanısı, ampirik antimikrobiyal tedavi periyodunu azaltarak hasta yönetimini değiştirecek ve hastanede uzun yatış süresinin azaltılmasına olanak sağlayacaktır. Daha ileri çalışmalarda etyolojide rol alan EV alt tiplerinin belirlenebilmesine ve daha iyi izlenmesine yönelik moleküler epidemiyolojik yöntemlerin kullanılması faydalı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Aseptik menenjit, Enterovirus, Human Parechovirus, Merkezi sinir sistemi enfeksiyonu, RT-PCR

INVESTIGATION OF HUMAN PARECHOVIRUS AND ENTEROVIRUSES IN CSF EXAMPLE OF THE PATIENT WITH ASEPTIC MENINGITIS

ABSTRACT

Despite the clinical and laboratory symptoms show the meningeal inflammation at aseptic meningitis, causative agent can not be detected by routine examination and culture and the most common agent is enteroviruses. In recent years, human parechovirus, that has began to identify commonly in children all over the world, is also cause of aseptic meningitis. In Mersin, there is not any work up to now respect to the presence of HPeV and EV infections. In our study, we aimed to investigate the presence of HPeV and EV in cerebrospinal fluid (CSF) samples sent to our laboratory with suspected aseptic meningitis, Total 50 of CSF samples were included in the study which's examination with Gram stain and reproduction in bacteriological cultures were negatif and the average number of leukocytes $90/\text{mm}^3$. HPeV and EV presence was investigated by "real time" reverse transcriptase (RT) -PCR method. In any of the samples, HPeV was not observed, but four (8%, 4/50) of the examples were detected as EV positive by RT-PCR. EV is determined by the 6-16 age range of patients, whereas one of samples was determined to be in September 2013 and three of were in August-September. Consequently, EV infection is highly prevalent among young children in our region. Early diagnosis of enteroviral meningoencephalitis could alter management, potentially reducing the period of treatment with empirical antimicrobials and permitting earlier discharge. Further studies, using molecular epidemiological methods would be beneficial to subtype all EVs involved in the etiology and warranted to better monitor these infections.

Keywords: Aseptic meningitis, Enterovirus, Human Parechovirus, Central nervous system infections, RT-PCR

GİRİŞ VE AMAÇ

Aseptik menenjit, klinik ve laboratuvar bulguları meningeal inflamasyonu göstermesine rağmen rutin inceleme ve kültürlerle etkenin saptanamadığı durum olarak bildirilmektedir¹. Viruslar, aseptik menenjitin en sık rastlanılan nedenidir. Etken olarak en sık enterovirus (EV)lar bildirilmekle birlikte, herpes grubu viruslar, respiratuvar viruslar, arboviruslar, kabakulak virusu, HIV ve yeni tanımlanan bir virus olan İnsan Parechovirus (HPeV)'un da etyolojide rol alabileceği belirtilmektedir^{2,3}.

Sağlıklı, asemptomatik bebeklerin gaita örneklerinde HPeV saptanması ve toplumdaki bebek ve çocuklarda yüksek seroprevalans oranları enfeksiyonun çoğunun subklinik geçirdiğini desteklemektedir. HPeV enfeksiyonlarında klinik, hafif solunum ve gastrointestinal sistem hastalığından menenjit ve sepsis gibi daha ciddi hastalıklara kadar oldukça geniş bir spektrumda görülmektedir. Önceki yıllarda, sadece HPeV tip 1 ve 2 tanımlanmışken bu virusun klinik öneminin az olduğu düşünülmüştür. Ancak HPeV tip 3'ün keşfiyle bu bakış değişmiştir. HPeV1 ve HPeV3 ile enfekte çocukların klinik verileri kıyaslandığında, tip 3'ün artan klinik önemi gösterilmiştir. HPeV1 enfeksiyonları hafif semptomlara neden olurken HPeV3 ağırlıklı olarak neonatal sepsis ve MSS hastalıklarıyla ilişkili bulunmuştur⁴.

Mersin ilinde, şu ana kadar aseptik menenjit olgularında HPeV ve EV enfeksiyonlarının varlığı yönünden herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada, aseptik menenjit şüphesiyle hastalardan alınan BOS örneklerinde HPeV ve EV varlığının RT-PCR yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Menenjit Tanımı

Menenjit, beyin ve spinal kordu saran meninkslerin inflamasyonu ile karakterize bir durumdur. Malignite metastazı, bazı belli ilaçlar ya da sarkoidoz gibi nedenlerle meydana gelebilmekle birlikte menenjitte genellikle enfeksiyöz etkenler neden olmaktadır. En sık viruslar olmak üzere bakteri, mantar ve parazitler etken olarak karşımıza çıkmaktadır⁵.

Aseptik Menenjit Tanımı

Aseptik menenjit, klinik ve laboratuvar bulguları meningeal inflamasyonu göstermesine rağmen rutin inceleme ve kültürlerle etkenin saptanamadığı durum olarak bildirilmektedir¹. Beyin parankim tutulumu (ensefalit) ya da spinal kord tutulumu (myelit) görülmez. Meningoensefalit, ensefalomyelit gibi sendromlar ve bakteriyel menenjite göre daha benign bir kliniğe sahiptir⁶. Beyin omurilik sıvısında (BOS) lenfosit hakimiyeti vardır. BOS proteini hafif yüksek, BOS glukozu normal ya da hafif azalmıştır⁷.

Aseptik Menenjit Etyoloji ve Epidemiyolojisi

Viruslar aseptik menenjitin en sık nedenidir. Rutin yöntemlerle belirlenemeyen tüberküloz, mikoplazma, leptospira ve Lyme hastalığı aseptik menenjit tablosu oluşturabilir⁸. Altta yatan konnektif doku hastalıkları veya malign hastalıklar ve ilaç reaksiyonları da aseptik menenjite yol açar⁷. İlginç olarak üriner sistem enfeksiyonuna bağlı sepsisi olan yenidoğanlarda sepsis nedeni araştırılırken yapılan lumbar ponksiyon sonucu hastaların %11,9'unda pleositoz ve aseptik menenjit saptandığı belirtilmiştir⁹. Enfeksiyöz olmayan nedenlere bağlı aseptik menenjit nedenlerinden ilaç nedenli aseptik menenjit çocuklardan ziyade erişkinlerde daha sık görülmektedir. Amoksisilin, trimethoprim–sulfamethoxazole ve ibuprofen gibi çocuklarda da sık kullanılan ilaçların bu potansiyel komplikasyonu her zaman akılda bulundurulmalıdır^{10, 11, 12}. Aseptik menenjitli hastalarda ayrıntılı bir araştırma yapıldığında %70'e varan oranda viral etkenler saptanmaktadır⁷. Aseptik menenjit, meningoensefalit ve

ensefalomyelitte benzer klinik tablolar oluşmaktadır ve her hastada her etken mutlaka düşünülmelidir⁶. Tablo 1'de aseptik menenjit etyolojisinde rol alan etkenler ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

Tablo 1. Aseptik menenjitin etyolojisi.

ENFEKSİYÖZ NEDENLER	ENFEKSİYON DIŞI NEDENLER
1.VİRUSLAR	1.AŞI VE ENFEKSİYON SONRASI
Enteroviruslar	Rubella
Poliovirus	Rubeola
Koksakivirus	Varisella
Ekovirus	Kuduz aşısı
Herpes grubu viruslar	Boğmaca aşısı
Herpes simpleks virus tip1-2	İnfluenza aşısı
Varisella zoster virus	2.İLAÇLAR
Sitomegalovirus	Non steroid anti inflamatuvar ilaçlar
Ebstein-Barr virus	Trimetoprim-sulfametoksazol, amoksisilin
Human herpesvirus 6	Azathioprin
Respiratuar viruslar	IV immunglobülin
Adenovirus	İzoniazid
İnfluenza tip A-B	İntratekal metotreksat
Arboviruslar	Allopurinol
Kabakulak virusü	Karbamazepin
HIV	Sülfasalazin
2.BAKTERİLER	3.SİSTEMİK HASTALIKLAR
Yetersiz tedavi edilmiş bakteriyel enf.	Kollajen vasküler hastalıklar
Endokardit	• Sistemik lupus eritematozis
Mycoplasma pneumoniae	• Wegener granülomatozis
M. tuberculosis	• MSS vaskülit
Brucella	• Romatoid artrit
T. pallidum	• Kawazaki hastalığı
3.MANTARLAR	Sarkoidoz
C. neoformans	Behçet hastalığı
H. capsulatum	Transplantasyon sonrası lenfoproliferatif hastalık
Coccidioides immitis	4.NEoplastik Hastalıklar
Blastomyces dermatitides	Lösemi
Candida	Beyin tümörüne sekonder karsinomatöz menenjit
4.PARAZİTLER	5.KOMŞU YAPILARDA ENFLAMASYON
Toksoplazma gondii	Beyin absesi
Trichinosis	Epidural abse
Naegleria	6.DİĞERLERİ
Bartonella henselae	Migren
5.RİKETSİA	Üriner sistem enfeksiyonu
Kayalık dağlar benekli ateşi	Araknoidit
Tifüs	

Aseptik menenjitin en sık viral nedeni EV'lardır ve %80-95 oranında görülmektedir^{13, 14}. EV'ların 50'den fazla serotipi menenjit ile bağlantılı bulunmuştur. Ilıman iklimlerde en yüksek insidans yaz sonu ve sonbahar aylarında görülür. Tropikal ve subtropikal iklimlerde ise tüm yıl yüksek insidansa sahiptir¹⁵. Kabakulak, bir diğer önemli menenjit nedenidir. Herpes virus tip 1 (herpes labialis) ve tip 2 (genital herpes) çocuklar, özellikle bebeklerde menenjite neden olabilir. Varisella zoster virusu (VZV) da özellikle bağışıklığı baskılanmış olanlarda menenjite neden olabilir. HIV de aseptik menenjite yol açabilir². *Picornaviridae* ailesinin bir üyesi olan İnsan Parechovirus (HPeV)'lar, özellikle tip 3 son yıllarda yenidoğanlarda en sık karşılaşılan aseptik menenjit etkenleri arasındadır³.

Hastalık her yaşta ortaya çıkar ancak en sık küçük çocuklarda görülür. Hiçbir ırksal farklılık bilinmemektedir. Erkeklerde 3 kat daha sık görülmektedir². Finlandiya 'da yapılan geniş kapsamlı bir kohort çalışmada yıllık insidansın bir yaş altı çocuklarda 100.000'de 219, 14 yaş altı çocuklardaki insidansın da 100.000'de 27,8 bulunmuştur¹⁶. Daha dar kapsamlı bir retrospektif çalışmada 16 yaş ve üzerinde, aseptik menenjit insidansı 100.000'de 7,6 olarak bulunduğu belirtilmiştir¹⁷.

Viral Aseptik Menenjit Fizyopatolojisi ve Patogenezi

Viruslar merkezi sinir sistemine çok çeşitli mekanizmalarla girebilirler. EV'lar gibi birçok virus, merkezi sinir sistemi dışında replike olup, hematogen yol ile yayılır. Bazı viruslar; enfekte lökositlerin içinde taşınarak (kabakulak, kızamık ve herpesvirus gibi) ya da direkt kan-beyin bariyerini geçerek vasküler endotel hücrelerini enfekte etmektedir. Poliovirus ve HSV, sırasıyla periferik ve kranial sinirler yoluyla yayılmaktadır. Viruslar, nöral dokulardan nöron ve glial hücrelere doğrudan ya da enfekte lökositler yoluyla yayılabilir. Merkezi sinir sisteminde BOS ile subaraknoid boşlukta yayılan viruslar, menenjitle sonuçlanan enflamatuvar yanıtı neden olur¹⁸.

Enfeksiyon geliştiği zaman, özellikle virusu hedef alan lenfositlerin çoğunlukta olduğu enflamatuvar hücreler MSS'de birikir. Plazma hücrelerinden lokal immunglobulinlerin üretimine interleokin (IL)-1 β , IL-6, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımı eşlik eder. Enflamatuvar yanıt, kan-beyin bariyerinde geçirgenlik artışına neden olur, böylece dolaşımdaki

immunglobulinlerin girişi kolaylaşır. Viruslar, immun tolerans yoluyla ya da immun yanıtta kaçarak kurtulabilir. T lenfosit cevabı, sitomegalovirus (CMV) ve VZV gibi bazı virüslara karşı immun yanıtta önemli bir rol oynar. Hücrel immünitesi bozulmuş hastalarda bu virüslara bağlı kronik menenjit sıklığı ve morbiditesinde artış gösterilmiştir¹⁸.

***Picornaviridae* Ailesi İçerisindeki Aseptik Menenjit Etkenleri**

Picornaviridae ailesi günümüzde, tanımlanmış 12 genus içermektedir: Enterovirus, Parechovirus, Hepatovirus, Kobuvirus, Aphthovirus, Erbovirus, Teschovirus, Cardiovirus, Tremovirus, Sapelovirus, Avihepatovirus ve Senecavirus^{3, 19}.

Enteroviruslar

EV'lar, *Picornaviridae* ailesinin üyesidir ve diğer picornaviruslardan (rhinovirus gibi) düşük pH'da stabil kalmalarıyla ayrılırlar. Tüm EV'lar, yaklaşık olarak 27 nm büyüklüğünde, zarfsız ikosahedral yapıdadır. Kapsid yapısı, her biri dört proteinden oluşan (V1-V4) 60 subüniteden meydana gelir. Yaklaşık 7,5 kb büyüklüğünde lineer, tek iplikli RNA genomu kapsid tarafından sarılmıştır. Tek bir poliprotein olan translasyon ürünü, viral proteazlar tarafından yapısal proteinler (V1-V4), RNA polimeraz, proteazlar ve diğer yapısal olmayan proteinlere bölünür²⁰. Eter ve alkole dirençli olmakla birlikte pH 3'ten 10'a kadar geniş bir aralıkta enfeksiyon oluşturabilir. 50°C'nin üzerinde inaktive olur iken molar magnezyum klorid, daha yüksek sıcaklıklarda labiliteyi azaltır. EV'lar konak dağılımına ve patojenik potansiyeline göre 5 altgruba ayrılır: polioviruslar, grup A koksakiviruslar, grup B koksakiviruslar, ekoviruslar ve daha yeni EV'lar. Her bir alt genus, spesifik antiserumlarla nötrale edilerek ayırt edilen özgün serotipler içerir. Geleneksel yöntemlerle başlangıçta 72 serotip tanımlanmıştır: Poliovirus serotip 1-3, grup A koksakivirus serotip 1-22, 24, grup B koksakivirus serotip 1-6, ekovirus serotip1-9, 11-21, 24-27, 29-33 ve EV serotip 68-71 (Tablo 2). Bunlardan 65 serotipin insanlarda hastalık yaptığı bilinmektedir. Moleküler yöntemlerle yeni birçok EV serotipi tanımlanmış olup bu sayı 100'ü aşmıştır. Yeni bir sınıflamada VP1 kapsid proteininin kodlandığı bölge içinde yer alan RNA homolojisine göre polio dışı EV'lar A'dan D'ye kadar dörde ayrılmıştır (Tablo 3)²¹.

Tablo 2. EV'ların geleneksel sınıflandırılması.

	Serotip numarası
Poliovirus	1-3
Grup A koksakivirüsler	1-24
Grup B koksakivirüsler	1-6
Ekovirüsler	1-34
Yeni EV'lar	68-72

Tablo 3. EV'ların RNA homolojisine göre sınıflandırılması.

EV sınıfı	Serotipler
A	KAV2-KAV8, KAV10, KAV12, KAV14, KAV16, EV71, EV76, EV89, EV91
B	KAV9, KBV1-KBV6, E1-E7, E9, E11- E21, E24- E27, E29-E33, EV69, EV73-EV75, EV77-EV88, EV100, EV101
C	KAV1, KAV11, KAV13, KAV15, KAV17, KAV18-KAV22, KAV24, PV1-PV3
D	EV68, EV70

KAV: Grup A koksakivirüs, KBV: Grup B koksakivirüs, EV: Enterovirus, E: Ekovirus, PV:Poliovirus

EV enfeksiyonları ılıman iklimlerde yıl boyunca görülmele birlikte yaz ve sonbaharda daha sıklıkla oluşmaktadır²². Etyolojinin belirlendiği aseptik menenjit olgularının %80-95'inden polio dışı EV'lar sorumlu tutulmaktadır^{6, 23}. Bunlar arasında en sık rastlanılan tiplerin de KBV2, B5; ekovirus tip 4, 6, 9, 11, 16, 30 ve EV tip 70, 71 olduğu ifade edilmektedir²³. İmmün yetmezlik (özellikle konjenital veya kazanılmış humoral immünite) ve yaş enteroviral menenjit için risk faktörüdür. Yeni doğan ve küçük çocuklar toplumdaki en duyarlı grup olmaları nedeniyle enteroviral menenjitten çoğunlukla etkilenmektedir. Güney Galler'in kuzeyinde yenidoğan ve küçük çocuklarda enteroviral meningoensefalit epidemiyolojisinin araştırıldığı retrospektif bir çalışmada olguların %42'sini yenidoğan ve 3 aylıktan küçük çocukların oluşturduğu saptanmıştır²⁴. EV'lar erişkinlerde de en yaygın aseptik menenjit nedenidir. Artan yaşla birlikte görülme oranı azalmaktadır^{6, 23}.

EV'lar fekal oral yol ile bulaşır ve gaita ile direkt temas genellikle bez değiştirme ile meydana gelmektedir. İndirekt geçiş ise kötü sanitasyon koşulları nedeniyle kontamine su, yiyecek ve fomitlerle meydana gelmektedir²⁵.

ABD'de 2002-2011 yılları arasında yapılan geniş çaplı bir çalışmada viral menenjitli hastalarda EV'ların oranı %75,1 bulunmuştur²⁶. Güney Kore'de

yapılan 13 yıllık bir çalışmada (1999-2011) 14657 örnek çalışılmış olup bu örneklerin %32,5'u EV olarak saptanmıştır. Salgınların mevsimsel olduğu tespit edilmiş ve EV 71, ekovirus 30, koksakivirus B5, EV 6 ve koksakivirus B2 en sık karşılaşılan serotipler olarak raporlanmıştır. Aseptik menenjitli hastalarda en sık ekovirus 30, EV 6 ve koksakivirus B5 ile karşılaşıırken el-ayak-ağız hastalığında en sık koksaki A16, nörolojik komplikasyonların eşlik ettiği el-ayak-ağız hastalığında ise en sık EV 71 tespit edildiği bildirilmiştir²⁷. Kuzey Tayvan'da 2011'de görülen koksakivirus A9 salgınında aseptik menenjit vakaları saptanmıştır²⁸. 2014'de Los Angeles'ta²⁹, Çin'de 2009'da koksakivirus B5³⁰, 2012'de Guangdong'da (Çin)³¹, İtalya'da³² ekovirus 30'a bağlı aseptik menenjit salgınları bildirilmiştir. İspanya'da en sık izole edilen suş ekovirus 4, ikinci sıklıkta ekovirus 30 ve sırasıyla ekovirus 9 ve 6 olarak raporlanmıştır³³. Yunanistan'dan 2011'de yenidoğanlarda ekovirus 6 salgını³⁴ saptanmış olup bunun gibi dünya üzerinde çok çeşitli ülke ve bölgelerden EV'lara bağlı aseptik menenjit salgınları bildirilmektedir.

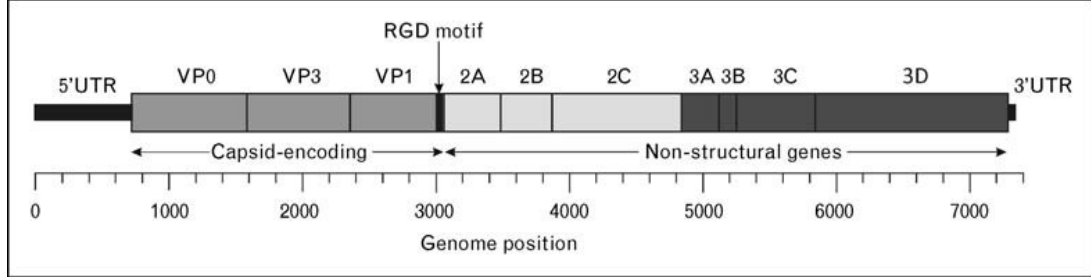
Ülkemizde de dünya genelinde olduğu gibi EV'lara bağlı aseptik menenjit vaka ve salgınları diğer viruslara kıyasla en sık görülen etkidir. Özkaya ve ark.³⁵ 1999 Haziran - Eylül aylarında Ankara ve Antalya'da bir aseptik menenjit salgını bildirmişlerdir. 86 hastanın BOS ve/veya gaita kültürü yapılmış ve 30 hastada (%44) ekovirus 30 saptanmıştır. Güney ve ark.³⁶ 'nın 1999-2002'de yaptıkları çalışmada 68 aseptik menenjit şüpheli hastanın BOS'u; HeLa, Hep-2 ve RD hücre kültürü ve RT-PCR yöntemi ile EV açısından araştırılmıştır. Kültürde üreyenlerden 30 tanesi ekovirus 30 ve 5 tanesi koksakivirus B olarak tanımlanırken RT-PCR ile 43 örnekte pozitiflik saptanmıştır. Şensoy ve ark.³⁷ tarafından yapılan çalışmada Mayıs 1999 - Aralık 2004 tarihleri arasında kliniklerinde takip ettikleri 612 aseptik menenjitli hastanın %17'sinde EV saptanmıştır. En sık izole edilen tip ekovirus 30 (%36,5) iken sırasıyla koksakivirus B (%16,3), ekovirus 6 (%10,6), ekovirus 11 (%5,8) ve ekovirus 13 (%3,8) tespit edilmiştir. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'den 2002 yılında 23 vakanın olduğu bir aseptik menenjit salgını bildirilmiştir³⁸. Bu hastaların 19'unun BOS ve/veya gaita örneklerinden ekovirus 30 izole edilirken 4 hastanın kültüründe üreme olmamıştır. Önen ve ark.³⁹ 2005 yazında ülkemizin güneyinde 688 hastanın dahil olduğu bir aseptik menenjit salgını bildirmişlerdir. Klinik olarak şüphelenilen hastaların, nonviral nedenlerin ekarte edildiği, lökosit

sayısı artmış ve bakteriyel kültürlerinde üreme olmayan BOS örnekleri toplanmıştır. Hatay ilindeki uzman ve pratisyen hekimler tarafından bu örnekler, referans hastane olan Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne gönderilmiş ve burada uygun koşullarda biriktirilerek Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Viroloji Bölümü'ne transfer edilmiştir. Konvansiyonel hücre kültürü ve mikronötralizasyon yöntemleriyle çalışılabilen BOS örneklerinin %9'unda ekovirus tip 4 saptanmıştır.

Human Parechoviruslar

Picornaviridae ailesi içindeki Parechovirus genusu, 2 tür içermektedir: bunlar; HPeV ve Ljungan virus (LV)'tur. LV ilk defa İsviçre'de tarla farelerinden izole edilmiştir. LV'nin fiziksel ve moleküler özellikleri yeni bir parechovirus olduğunu ancak HPeV'dan farklı olduğunu göstermiştir. LV ayrıca kuzey Amerika'da rodent türlerinden de izole edilmiştir^{40, 41}. HPeV'lar küçük (28 nm çapında), diğer picornaviruslar gibi küresel şekilli, zarfsız RNA viruslarıdır^{42, 43}. Lipit bir zarfa sahip olmadıklarından organik çözücülere dirençli olup 3 ve daha düşük pH değerlerinde enfektivitelerini korumaktadır⁴⁴. Genomu, yaklaşık 7.35 kb uzunluğunda, tek iplikçikli, pozitif polariteli RNA'dır^{43, 45, 46}. Genom, tekrarlayan VP0, VP1, VP3'ten oluşan ikosahedral kapsid ile çevrelenmiştir⁴¹. Bu yüzden HPeV'lar, genom yapısı ve replikasyon özellikleri açısından diğer picornavirus cinslerine göre farklılık göstermektedir. Yaklaşık 7300 baz uzunluğundaki genomun hemen hemen tümü doğrudan protein kodlama işlevine sahiptir. Virusun hücre içine girişinde salınan RNA, doğrudan uzun bir poliproteine çevrilir ve bu daha sonra viral proteazlar (3C) tarafından replikasyon döngüsünü başlatan bir dizi yapısal olmayan proteine bölünür (44). Picornavirusların kapsid yapısı, HPeV'lar haricinde, viral protein (VP) 1, VP2, VP3, VP4 olmak üzere dört yapısal proteinden oluşmaktadır⁴⁴. HPeV genomu diğer picornaviruslara benzemektedir ancak VP0 kapsid proteini maturasyon sırasında VP2 ve VP4'e parçalanmamıştır⁴⁷. Poliprotein translasyon sonrası, viral proteazlar tarafından üç yapısal protein (VP0, VP1 ve VP3) ve 7 yapısal olmayan proteine (2A-2C ve 3A-3D) ayrılır (Şekil 1)³. Diğer pikornavirusların tersine, VP0; VP2 ve VP4'e ayrılmaz. Ayrıca VP0, diğer genusların hiçbirinde antijenik değil iken HPeV'un önemli antijenik alanı VP0 proteininin N-terminal bölgesinde bulunmaktadır. HPeV1 için nötralizan antikor üretimine sebep olan

başka antijenite alanı, VP1 kapsid proteininin C-terminal ucunda bulunmaktadır. Burada reseptör bağlayan motif arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) bulunmaktadır¹⁹. Replikasyon RNA bağımlı RNA polimeraza bağımlıdır. 5' ucuna VPg proteini bağlanınca pozitif RNA zinciri negatif RNA zincirini oluşturmak üzere kopyalanır. Bu da, translasyon ve viral partiküllerin üretimi için gerekli pozitif RNA zincirine tekrar geri replike edilebilmektedir.



Şekil 1. Human parechovirus genom organizasyonu.

Günümüzde tanımlanan 16 tipi bulunmaktadır. HPeV tip 1 ve 2, yaklaşık 50 yıl önce sırasıyla echovirus tip 22 ve 23 olarak tanımlanmış⁴³ olup 1990'larda bu virusların genomunun dizi analizinin yapılmasıyla diğer EV'lardan genetik ve biyolojik olarak önemli farklılıklarının olduğu tespit edilmiştir. Böylece *Picornaviridae* ailesi içerisinde yeni bir genus tanımlanmış ve echovirus tip 22 ve 23'ün ismi değiştirilerek HPeV tip 1 ve 2 olarak yeniden adlandırılmıştır⁴³. HPeV3, Japonya'da 1999 yılında transient paralizi, ateş ve diarezi olan bir yaşındaki bir çocuktan izole edilmiş⁴⁸ ve neredeyse eş zamanlı olarak Kanada'da sepsis şüphesi olan bir yenidoğanın nazofaringeal aspiratında tespit edilmiştir⁴⁹. Diğer bir HPeV tipi, HPeV4; 2002 yılında Hollanda'da ateşli hastalığı olan bir yenidoğanın gaita örneğinde saptanmış⁴⁷ ancak 1970'lerden beri dolaşımda olduğu gösterilmiştir^{50, 51}. HPeV5 ilk kez 1986 yılında ABD'de yüksek ateşi olan 2 yaşındaki bir çocuktan izole edilmiş⁴⁵ fakat bu virus hatalı nötralizasyon verilerine dayanarak HPeV2 olarak tanımlanmış ve yakın bir zamanda genetik analizi yapılarak beşinci tip olarak sınıflandırılmıştır⁵¹. HPeV6, Japonya'da Reye Sendromu olan bir yaşındaki bir çocuğun BOS örneğinden izole edilmiştir⁵². HPeV7, çok yakın bir zamanda, akut flask paralizi olan bir hastayla temas öyküsü olan sağlıklı Pakistanlı bir çocuğun gaita örneğinden izole edilmiştir⁵³. Akut diarezi olan Brezilyalı çocuklardan toplanan fekal

örneklerin taranmasıyla dayeni bir tip, HPeV8 tanımlanmıştır⁵⁴. İnsanlarda hastalık oluşturduğu gösterilen diğer tipler, (HPeV 9-16) Hollanda, Sri Lanka ve Tayland'da çok yakın zamanda tanımlanmıştır^{41, 55, 56}.

Tablo 4. HPeV tipleri.

Tip	Suş orjini	Kaynak
HPeV1*	Harris (Ohio/56)	Hyypiä et al., 1992
HPeV1B	BNI-788 St Bonn, Germany	Baumgarte et al., 2008
HPeV2**	Williamson (Ohio/56)	Stanway et al., 1994
		Ghazi et al., 1998
HPeV3	A308/99 Aichi, Japan	Ito et al., 2004
	Can82853-01	Abed and Boivin, 2005
HPeV4	K251176-02 Amsterdam, the Netherlands	Benschop et al., 2006
	T75-4077	Al-Sunaidi et al., 2006
HPeV5***	CT86-6760 Connecticut, USA	Oberste et al., 1998
	T92-15	Al-Sunaidi et al., 2006
HPeV6	NII561-2000 Niigata, Japan	Watanabe et al., 2007
HPeV 7	PAK5045 Badin, Pakistan	Li et al., 2009
HPeV 8	BR/217/2006 Salvador, Brazil	Drexler et al., 2009
HPeV 9	BAN2004-10902 Bangkok, Thailand	Oberste et al., unpub.
HPeV 10	BAN2004-10903 Bangkok, Thailand	Oberste et al., unpub.
HPeV 11	BAN2004-10905 Bangkok, Thailand	Oberste et al., unpub.
HPeV 12	BAN2004-10904 Bangkok, Thailand	Oberste et al., unpub.
HPeV 13	BAN2004-10901 Bangkok, Thailand	Oberste et al., unpub.
HPeV 14	451564 Amsterdam, the Netherlands	Benschop et al., 2008c
HPeV 15	BAN-11614 Bangkok, Thailand	Oberste et al., unpub.
HPeV 16	BAN-11615 Bangkok, Thailand	Oberste et al., unpub.
*	-HPeV1, daha önceleri Echovirus 22 olarak bilinmekte	
**	-HPeV2, daha önceleri Echovirus 23 olarak bilinmekte	
***	-HPeV5 Connecticut, daha önceleri HPeV2b olarak bilinmekte	

HPeV Reseptörleri

HPeV1, alfavbeta3 ve alfavbeta1 integrinlerini reseptör olarak kullanmaktadır ancak her iki integrinin de eksprese edildiği hücrelerde HPEV-1, olasılıkla alfavbeta3 integrinine bağlanmaktadır⁵⁷. İntegrinler, lökositlerin de dahil olduğu adezyon moleküllerinin önemli bir grubunu oluşturmakta ve arglisin-asp asid (RGD) motifine bağlandığı gösterilmiştir. İntegrin β 1, ekstraselüler matrisdeki hücre bağlanmasında rol alırken, β 3 integrinler ise inflamasyon yerinde trombosit ve nötrofillerin etkileşimlerinde ya da vasküler

hasar bölgelerinde yer alır⁵⁸. Toll-Like-Reseptör 8 (TLR) ve TLR7'nin, HPeV1 için konak immün algacı olarak görev yaptığı gösterilmiştir. Viral ssRNA genomu, TLR ile endozomal bölümlerde tespit edilmiştir. Bu, konak immün yanıtını başlatacak proinflamatuvar moleküllerin sentezini sağlayan sinyalleri etkinleştirmektedir⁵⁹. Ayrıca HPeV2, HPeV4 ve HPeV5 de VP1'in C terminal ucunda RGD motifine sahiptir. RGD motifi, HPeV1 enfeksiyonları için gerekli olmasına rağmen^{46, 48} HPeV3 için gerekli değildir. Bu nedenle RGD bağımsız bir yol ve hücre girişinin muhtemel olduğu düşünülmektedir⁴⁸.

Hücre Tropizmi ve Reseptör Etkileşimleri

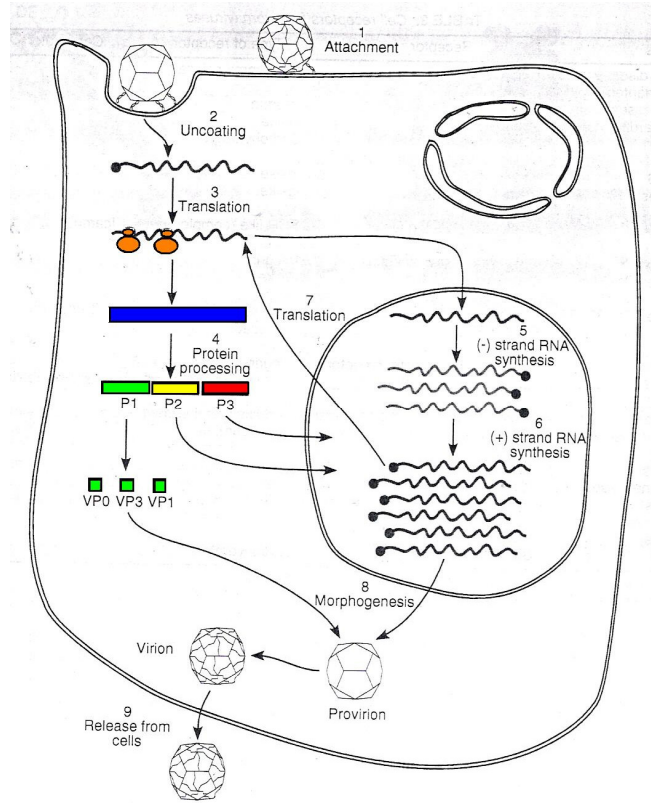
BOS'ta HPeV3'ün, belirgin olarak sık saptanması, HPeV tipleri arasında hücre tropizmleri açısından farklılık olduğunu düşündürmektedir. HPeV3'ün sınırlı sayıda hücre kültüründe üremesi ve zayıf sitopatik etkiye neden olması da bunu kanıtlamaktadır. HPeV3, farklı bir tipte enfekte hücreyle nadiren etkileşime geçmektedir. Hücre tropizmlerindeki farklılık, değişik reseptör kullanımlarıyla açıklanabilir. HPeV1,2 ve 4-6; VP1'in C terminal ucunda, el-ayak-ağız hastalığı virusu, koksaki A9, ekovirus 9 gibi diğer virusların hücre yüzey integrinlerine bağlanmak için kullandıkları RGD motifini içermektedir. RGD motifi HPeV1 enfeksiyonları için gerekli olmasına rağmen HPeV3, bunu içermemektedir. Dolayısıyla HPeV3'ün RGD'den bağımsız farklı bir reseptör yoluyla enfeksiyona neden olduğu varsayılmakta ancak henüz net bilinmemektedir. Tropizmin belirlenmesinde, organ gelişimi sırasında eksprese edilen reseptörlerin önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Gelişim sırasında eksprese edilen spesifik reseptörlerin farklı olması; HPeV3'ün, büyük çocuk ve yetişkinlerde nadiren görülmesini ya da hiç görülmemesini desteklemekte ve yenidoğanların neden enfeksiyona daha eğilimli olduğunu kısmen açıklamaktadır¹⁹.

HPeV Replikasyon Siklusu

HPeV replikasyonu hücre sitoplazması içinde gerçekleşir. Virus reseptör-aracılı endositoz yolu ile hücre içine girer⁶⁰.

Replikasyon aşamaları (Şekil 2);

1. Virus hücresel reseptörlere bağlanır.
2. Genom kapsidden ayrılır.
3. Translayon gerçekleşir.
4. Bireysel viral proteinler oluşur.
5. Viral RNA polimeraz tarafından (+) zincir RNA kopyalanır, bu da tam uzunluktaki (-) zincir RNA'ları oluşturur.
6. (-) zincir RNA başka (+) zincir RNA'ları oluşturur.
7. İnfeksiyonun erken safhasında, yeni sentezlenen (+) zincir RNA'lar başka viral proteinleri transle eder.
8. İnfeksiyonun geç safhalarında (+) zincirler morfojenetik yola girerler
9. Yeni sentezlenen virus partikülleri hücre lizisi ile dışarı salınırlar.



Şekil 2. HPeV replikasyon siklusu.

HPeV Enfeksiyonları

EV'ların genellikle tüm yaş gruplarını etkilemesine rağmen, HPeV enfeksiyonlarının %90'ından fazlası 5 yaştan daha küçük çocukları etkilediği belirtilmektedir¹⁹. Japonya ve İrlanda'da yapılan seroepidemiolojik çalışmalar çocukları erken çocukluk döneminde enfekte olduğu ve okul çağına ulaşınca kadar yüksek seroprevalans oranına ulaştığı belirtilmektedir⁴⁰.

Bulaşın fekal-oral ve respiratuar yolla olduğu tahmin edilmektedir⁶¹. Yenidoğanlarda yaşamın ilk 2 gün içinde meydana gelen HPeV enfeksiyonları intrauterin bulaş olasılığını da destekleyebilir⁶². Enfeksiyondan sonra, virus gastrointestinal sistem ve üst solunum yollarından yayılır. Yayılma süresi henüz net olarak aydınlatılamamışsa da gaitada iki haftadan az süreden beş aya kadar ve solunum yollarında 1-3 hafta kadar saptanabilmektedir⁶³. Gaitadan ortalama yayılma süresi 51 gün olarak gösterilmiştir⁴ ancak çocukların yaklaşık %10'unda 3 aydan fazla devam etmektedir.

Sağlıklı, asemptomatik bebeklerin gaita örneklerinde HPeV saptanması ve toplumdaki bebek ve çocuklarda yüksek seroprevalans oranları enfeksiyonun çoğunun subklinik geçirildiğini desteklemektedir⁴.

HPeV enfeksiyonlarında klinik, genellikle EV kliniğine benzerdir. Hafif solunum ve gastrointestinal sistem hastalığından menenjit ve sepsis gibi daha ciddi hastalıklara kadar geniş bir spektrumda görülür. Önceki yıllarda, sadece HPeV tip 1 ve 2 tanımlanmışken bu virusun klinik öneminin az olduğu düşünülmüştür. Ancak HPeV3'ün keşfiyle bu bakış değişmiştir. HPeV1 ve HPeV3 ile enfekte çocukların klinik verileri kıyaslandığında, tip 3'ün artan klinik önemi gösterilmiştir. HPeV1 enfeksiyonları hafif semptomlara neden olurken HPeV3 ağırlıklı olarak neonatal sepsis ve MSS hastalıklarıyla ilişkili bulunmuştur.

İskoçya'da yapılan bir çalışmada 2006-2008 yılları arasında 1480 BOS örneği incelenmiş ve 14 tanesinde HPeV saptanmıştır. Bunların tümü tip 3'tür ve hastaların hepsi 3 aydan küçük bebeklerdir⁶⁴. ABD'de yapılan retrospektif bir çalışmada, çocuklardan alınan ve EV negatif olduğu gösterilen 780 BOS örneğinin %7,4'ünde (n:58) HPeV saptanmıştır⁶⁵. Genotipleme ile bunların 52 tanesinin HPeV3 ve bir tanesinin HPeV1 olduğu gösterilmiştir. Hastaların %81'i 2 aylık ya da daha küçük, %26'sı 1 aylık ya da daha küçük bulunmuştur. HPeV nedenli MSS enfeksiyonu olan çocuklarda en yaygın tip, HPeV3'tür ve olguların

çoğunu 3 aydan küçük bebekler oluşturmaktadır. Bütün bildirilerde erkek olgular, kızlardan daha fazladır (%55-71).

HPEV3'ün neden olduğu MSS enfeksiyonlarında bebeklerin %95'inden fazlasında ateş ve huzursuzluk rapor edilmiştir⁶⁶. Çocukların %54-80'ninde; ateş veya hipotermi, dolaşım ve/veya solunum fonksiyon bozukluğunun (taşikardi ya da bradikardi, düşük kan basıncı ve/veya düşük saturasyon) olduğu sepsis benzeri hastalık görülür. HPEV3 enfeksiyonlarında sıklıkla görülen diğer semptomlar, makülopapüler döküntü, gastrointestinal ve solunum sistemi semptomlarıdır. Dikkat çekici bir şekilde olguların hiçbirinde kafa içi basınç artışı bulgusu (şişkin fontanel) ya da meninks irritasyon bulgusu (ense sertliği, Kernig ve Brudzinski bulgusu) gözlemlenmemiştir.

BOS'un sitokimyasal değerlendirmesinde hastaların çoğunda herhangi bir değişiklik yoktur ya da çok azdır^{65, 66, 67}. 67 bebeğin sadece %12'sinde lökosit sayısı ve %7,5'inde BOS'ta protein miktarı yaşa göre normal değerlerin üzerinde bulunmuştur⁶⁷.

HPEV, akut flask paralizi etyolojisinde rol almaktadır^{48, 52}. HPEV3 ilk olarak ateş, diare ve transient paralizisi olan bir yaşındaki bir kız çocuğunda tanımlanmıştır⁴⁸. Akut flask paralizi ile ilişkili diğer tipler HPEV1 ve 6'dır^{52, 68}. Jamaika'da 26 ve 27 yaşında iki erişkin ve 21 aylık, 4, 7 ve 13 yaşında dört çocuğun etkilendiği HPEV1 ile ilişkili akut flask paralizi salgını bildirilmiştir⁶⁸.

HPEV ile ilişkili ensefalit özellikle yenidoğan ve küçük bebeklerde görülmektedir. HPEV3 daha baskın olmak üzere HPEV 1 ve 3 neden olmaktadır. Çoğu vaka term yenidoğanlarda meydana gelmekte ve semptomlar hayatın ilk iki haftasında başlamaktadır. Prematür olgularda hastalığın başlangıcı 50-90. gün gibi daha geç görülmektedir. Nöbet geçirme, en sık karşılaşılan klinik bulgudur (%82). Ateş ve huzursuzluk bebeklerin %73'ünde, olguların yaklaşık üçte ikisinde raş ve %55'inde apne görülmüştür. Bebeklerin hepsinde kranial USG ve MR görüntüleme anormallikler saptanmıştır. Bazı hastalar epilepsi, serebral palsi, görme bozukluğu, öğrenme güçlüğü ve hipotoni gibi sekellerle iyileşmiştir⁶⁹.

HPEV, nedeni bilinmeyen ateşli hastalığı olan yenidoğanların gaita örneklerinde sıklıkla saptanmıştır⁷⁰.

Hepatit, trombositopeni ve kanamayla giden kanamalı hepatit sendromu yine yenidoğanlarda rapor edilmiştir⁶⁹.

Yenidoğanlarda HPeV1 enfeksiyonu nekrotizan enterokolit ile ilişkili bulunmuştur⁷¹. Yenidoğan yoğun bakım ünitesindeki 19 bebeğin yakalandığı bir gastroenterit salgınında 7 kanlı diare ve abdominal radyografide erken nekrotizan enterokolit bulgusuyla karşılaşılmıştır. Bunlara ek olarak HPeV ile enfekte yenidoğanlarda tek ya da kombine olarak ateş, apne, takipne, respiratuar distres, rinore, konjonktivit ve döküntü görülmüştür⁷².

Diare, HPeV ile ilişkili hemen hemen her sendromda hastalığın bir parçası olarak ortaya çıkmaktadır. 499 tane toplum kökenli enteriti olan ayaktan hastanın ve 39 tane enterit olmayan kontrolün dahil edildiği kohort bir çalışmada⁶¹ ilk grupta 8, kontrol grubunda ise bir tane HPeV bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ancak olguların neredeyse hepsinin iki yaşından küçük çocuklar olması dikkat çekicidir. Akut gastroenteriti olan, RT-PCR ile rotavirus, adenovirus, saporovirus, norovirus ve astrovirusun tespit edilemediği Tayland'lı çocuklardan alınan 82 tane fekal örneğin 12 tanesinde (%14,6) HPeV genomu saptanmıştır⁴¹. Çocukların yaşı, 6-24 ay arasında değişmektedir. 9 tanesinde tiplendirme yapılmış ve bunlar tip 1 (n:5), 2 (n:1), 3 (n:2), 4 (n:1) olarak bulunmuştur. Benzer şekilde Sri Lanka'da akut gastroenterit nedeniyle hastaneye yatan çocuklardan 362 gaita örneği toplanmış ve rota-, adeno-, saporo-, noro-, astrovirus, RT-PCR ile HPeV araştırılmıştır. HPeV, %8,3 (n:30) oranında bulunmuştur. 27 örnek tiplendirilmiş ve sonuç; HPeV tip 1 (n:11), 3 (n:1), 4 (n:5), 5 (n:3), 10 (n:5), 11 (n:2) şeklinde bulunmuştur. Diğer enterik patojenlerle koenfeksiyon oranı %67 iken sadece HPeV ile enfekte 10 çocuk bulunmuş olup, yaşlarının 2-26 ay arasında değiştiği bildirilmiştir⁷³.

HPeV'ün kültür, seroloji ya da NAAT gibi herhangi bir yöntemle tanımlandığı birçok hastada solunum semptomları, tek başına ya da diğer bulgularla beraber tespit edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Viroloji Birimi, HPeV1 olgularının yaklaşık olarak dörtte birinin solunum sistemi hastalığı bulgusu ile görüldüğünü bildirmiştir⁷⁴. Japonya'da bir üniversitede 15 yıllık bir dönemde HPeV'la ilişkili olgular değerlendirildiğinde 41 hastanın %14,6'sının solunum yolu enfeksiyonunun olduğu görülmüş ve saptanan tiplerin ise 1, 3 ve 6 olduğu belirtilmiştir⁵².

DSÖ'nün 581 olgunun dahil olduğu bir çalışmada; HPeV1 ile enfekte hastaların %29'unda gastrointestinal semptomlar, %26'sında solunum

semptomları, %12'sinde MSS semptomları, %6'sında kardiyak, deri/mukoza veya müsküler semptomlar ve kalan %27'sinde diğer semptomların olduğu gsterilmiřtir⁷⁴. HPeV4 ve 6'nın gastroenterit ile ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda gsterilmiş^{76, 75} ancak enterik hastalıklardaki rolünün net olarak kurulması gerekmektedir. Çünkü bazı durumlarda asemptomatik taşıyıcılık olmasına rağmen rastlantısal olarak farklı bir etkenle hastalık meydana gelebilmektedir. HPeV4, küçük çaplı çalışmalarda ve bazı olgu sunumlarında lenfadenit⁵² ve TORCH sendromu⁵⁰ ile ilişkili bulunmuştur. Hepatik disfonksiyon ve yağlı infiltrasyon ile birlikte akut, noninflamatuar ensefalopati ile karakterize Reye sendromu, HPeV5⁵¹ ve HPeV6⁵² ile ilişkilendirilmiştir.

HPeV Epidemiyolojisi

HPeV, dünya çapında bildirilen bir virustur^{4, 41, 51, 54, 64, 68, 70, 71, 72, 77, 78, 79, 80}. 2004 yılına kadar HPeV'n sadece 2 tipi bilinmekteyken 2004'ten itibaren 14 yeni tip daha tanımlanmıştır. HPeV epidemiyolojisi hakkında bilinen şeylerin çoğu bu ajanların hücre kültürüyle tespiti yani HPeV için düşük duyarlılığa sahip bir metodolojiye dayanmaktaydı. Bu nedenle HPeV epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi, yeni tiplerin tanımlanması ve tanımlama için NAAT gibi moleküler yöntemlerin geliştirilmesine bağlıdır. HPeV ile ilgili hastalıklarda, bilinen 16 tipin her birinin etkisi henüz belirsizdir. Benzer şekilde tiplerin her birinin dünya çapındaki dağılımı da tanımlanmamıřtır¹⁹.

Hastalıkları Kontrol ve nleme Merkezi (CDC) verilerine göre, 39 yıllık veriler değerlendirildiğinde ABD'de HPeV1'in tanımlanan tüm EV izolatlarına oranı %1,8 (880/49.637)'dir^{79, 81}. Buna karşılık HPeV2 sadece %0,1 oranında izole edilmiştir. İsveç'te 33 yıllık bir dönemde yapılan çalışmada 1000 EV arasında sadece 5 tane HPeV2 saptanmıřtır⁷⁸. Japonya Niigata'dan bildirilen 15 yıllık bir raporda; gaita, boğaz svabı ve BOS örneklerinden yapılan hücre kültürü ile 41 HPeV izolatı tanımlanırken buna karşılık aynı dönemde 1437 EV izolatı tanımlanmıştır. HPeV, tüm EV'ların yaklaşık olarak %2,8'ini oluřturmaktadır⁵². Tiplendirmenin yapılmasıyla HPeV 1, 3, 4 ve 6'nın tüm izolatların sırasıyla yaklaşık olarak %34, %39, %2 ve % 24'n oluşturduğu gösterilmiştir. Japonya'dan yapılan başka bir bildiriye, dokuz yıllık bir dönemde viral enfeksiyon şüphesi olan çocuklardan toplanan 4976 gaita örneğinin 110 tanesinde (%2,2) HPeV tespit edilmiştir. Bunların %57 (n:63)'si HPeV1 iken

%40 (n:44)'ı HPeV3'tür. Kalan üç izolatin ikisi HPeV4 ve biri HPeV6'dır⁴⁸. Kanada'dan bildirilen bir raporda 20 yıllık bir dönemde tanımlanan 28 HPeV izolatinin sırasıyla %71,4 (n:20), %10,7 (n:3) ve %17,9 (n:5)'u tip 1, 2 ve 3'tür⁷⁷.

Mevcut veriler, HPeV'ün geleneksel yöntemlerle klinik laboratuvarlar tarafından izole edilen tüm EV'ların yaklaşık %2'sini oluşturduğunu göstermektedir. HPeV1 ve ardından HPeV3, cinsinin en sık tanımlanan üyeleridir. Şimdilik HPeV ilişkili hastalıklarda diğer üyelerin küçük bir katkısı var gibi görünmektedir. Ancak NAAT'ların daha sık kullanılmasıyla bu sonuç değişebilir⁸².

HPeV enfeksiyonları özellikle hayatın erken dönemlerinde geçirilmektedir ve ilk karşılaşılan tip coğrafik farklılıklara göre etkilenebilmektedir. Finlandiya'da yapılan çalışmalarda 2 yaşa kadar çocukların %72-89'unun HPeV1 antikörlerine sahip olduğu saptanmıştır⁸³. Japonya'da yapılan iki çalışmada HPeV1 ve HPeV3 seroprevalans oranlarının çocuklarda yaşa göre değişken olduğu bildirilmektedir⁴⁸. Japonya ve Finlandiya'da yapılan diğer iki seroepidemiolojik çalışmada, çocukların hayatın erken dönemlerinde HPeV ile enfekte oldukları ve okul yaşına ulaşıncaya kadar yüksek bir seroprevalansa ulaştığı saptanmıştır^{84, 85}. Kanada'da 28 çocuğun dahil olduğu bir çalışmada HPeV3 enfeksiyonunun ortalama 0,7 aylıkken, buna karşılık HPeV1 ve 2'nin sırasıyla 14,6 ve 6,3 aylıkken geçirildiği saptanmıştır⁷⁷.

HPeV enfeksiyonları yıl boyunca oluşabilmesine rağmen önemli bir mevsimsel epidemiyoloji sergilemektedir. Tüm dünyada, en sık sonbahar ve kış aylarında pik görülmektedir⁷⁷. Çeşitli bildirimlerde HPeV3'ün sirkülasyon paterni, iki yılda bir olarak belirtilmiştir^{62, 64, 66}.

MSS Enfeksiyonları ile İlişkili HPeV Epidemiyolojisi

HPeV'ların fekal-oral yolla bulaştığı bildirildiği için epidemiyolojik çalışmaların çoğu gaita örnekleriyle yapılmış ve farklı tiplerin prevalansı için doğru tahminler yapılmasını sağlamıştır. Son 30 yıllık dönemde yapılan epidemiyolojik çalışmalar, HPeV1'in, özellikle küçük çocukları etkileyen en yaygın tip olduğunu göstermiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda yeni tiplerin de belirlenmesiyle tip3'ün ikinci en sık görülen tip olduğu bulunmuştur. Amsterdam'da toplanan HPeV pozitif gaita örneklerinin %22-26'sı HPeV3 iken büyük çoğunluğu (%65-71) HPeV1 oluşturmaktadır. Diğer Avrupa ülkeleri ve

Asya'da gaita ile yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar bulunmuştur. HPeV3, en yaygın tip olan HPeV1 ardından ikinci sıklıkta saptanmıştır. HPeV6, sekonder solunum patojeni iken; HPeV4 sıklıkla gaita örneklerinde bulunmaktadır. HPeV2 ve 5 enfeksiyonları sporadik olarak bildirilmektedir. Yeni tanımlanan HPeV 7-16 tiplerinin sirkülasyon paterni henüz tespit edilmemiştir. Sadece MSS enfeksiyonları dikkate alındığında HPeV tipleri önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. HPeV3, çocuklarda özellikle de yenidoğanlarda en sık karşılaşılan tiptir. Bu enfeksiyonların, menenjit ve ensefalit gibi MSS enfeksiyonlarının yaklaşık %3-17'sini oluşturduğu ve HSV enfeksiyonlarının oranının üzerine çıktığı belirtilmektedir. Ancak EV'lar, her yaz %14-19 oranıyla en sık karşılaşılan tip olarak tespit edilmeye devam etmektedir. Bu sebeple HPeV, viral menenjit ve ensefalit olgularında en yaygın görülen ikinci patojen olduğu belirtilmektedir. HPeV1 enfeksiyonları BOS'da nadiren belirlenmişlerdir ve diğer HPeV tipleri ise BOS'da hiç belirlenmemiştir. MSS enfeksiyonları ilgi çekici olarak her 2-3 yılda bir aralıklı olarak sirküle olmakta ve her zaman yaz aylarında görülmektedir. Ancak dolaşım paternleri coğrafi olarak farklılık göstermektedir. Kuzey Avrupa'da hem BOS hem de gaitada saptanan HPeV3, iki yılda bir yaz döneminde görülürken ABD'de iki yıllık periyotlarda yılın herhangi bir döneminde görülebilmektedir. Pineiro ve arkadaşları İspanya'da 2006 ve 2009'da HPeV3 piki tespit etmiş ve üç yıl gibi daha uzun bir döngü süresinin olabileceğini düşünmektedirler. Döngü paterninin belirlenebilmesi için daha fazla veriye ihtiyaç vardır. HPeV3'ün ilk tanımlandığı Asya'da epidemiler, yıl boyunca dağılmıştır. Bu aralıklı döngü, ekovirus 9 ve 30 gibi EV'lar için de tanımlanmış ve bu antijenik çeşitliliğin ve yeni rekombinantların ortaya çıkmasıyla ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak HPeV3'ün sirkülasyonu henüz belirsizdir. HPeV3'ün aksine HPeV1, 4, 6; Asya ve Avrupa'da her yıl sonbahar ve kış aylarında görülmektedir. Sonuç olarak, HPeV3 sadece klinik olarak değil epidemiyolojik olarak da diğer tiplerden farklı davranmaktadır¹⁹.

Viral Aseptik Menenjitin Laboratuvar Bulguları

Viral menenjitlerin tanısı tipik olarak BOS analizi ve etiyolojik ajanın gösterilmesini içermektedir. HPeV ile enfekte çocukların BOS analizinde, lökosit miktarının biraz yükseldiği ancak çoğunda (özellikle yenidoğanlarda) pleositozun gözlenmediği bildirilmiştir. Lökosit hücre miktarının normal değeri yaşla birlikte değişmektedir ve genelde yüksek değerler küçük çocuklarda normal olarak kabul edilmektedir. Son çalışmalarda lökosit miktarının normal değerleri; 0-28 günlük yenidoğanlarda $<19/\mu\text{l}$ ve 29-56 günlük yenidoğanlarda $<9/\mu\text{l}$ olarak belirtilmiştir. Ayrıca, HPeV ile enfekte çocuklarda BOS glikoz seviyeleri genelde normaldir, BOS protein seviyeleri ise normal veya yükselmiş olabilmektedir. Bu sebeple normal BOS bulgularında HPeV menenjit veya ensefaliti göz ardı edilmemelidir¹⁹.

HPeV ile enfekte çocukların kan laboratuvar değerlendirmesinde, kanda normal lökosit miktarı gösterilmesine karşın, lökopeni çocukların %33'ünde bildirilmiştir. C-reaktif protein düşük veya çok az yükselmiştir. Bazı durumlarda karaciğer enzim seviyeleri yükselbilmekte, bazen hepatit ve karaciğer nekrozuna neden olabilmektedir¹⁹.

EV Enfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı

EV'a bağlı menenjitli hastalarda pleositoz hemen her zaman olmasına rağmen menenjitte uyumlu klinik bulguları olan ve BOS'ta EV izole edilen ancak hücre saptanmayan olgular vardır. BOS'taki hücre sayısı genellikle 100-1000/mm³dür. BOS'ta lökosit sayısı arttıkça EV izolasyon olasılığı artar. Enfeksiyonun erken döneminde, BOS'ta sıklıkla nötrofiller baskındır²³. BOS glukozundaki düşme ve proteinindeki yükselme genellikle hafiftir⁸⁶. EV'lar farklı serotipler arasında ortak antijen içermediğinden IgM düzeyleri değişkenlik göstermekte ve bu nedenle antikor testleri MSS enfeksiyonu tanısında yaygın olarak uygulanamamaktadır⁸⁷.

Hücre Kültürü

EV enfeksiyonlarının tanısında hücre kültürü standart yöntem olmakla birlikte örnekte yüksek miktarda canlı virus olması gereklidir ve bazı serotipler hücre kültüründe saptanamayabilir. Bu şekilde virus izolasyonu oranı %65-75 civarındadır. Ayrıca hastanın orofarenks ve dışkılarından enterovirus izolasyonu

da etiyolojik tanı için değerlidir⁸⁶.Virus izolasyonu için 3 ya da 4 farklı hücre hattına ihtiyaç duyulur. Görünür sitopatik etkinin gelişimi 2-6 gün sürer⁸⁸. Sitopatik etkinin doğrulanmasında VP1 epitopuna özgü bir monoklonal antikor kullanılabilir⁸⁹. EV hücre kültürleri genellikle yoğun çaba ister, pahalıdır ve PCR'den daha düşük duyarlılığa sahiptir.

PCR Yöntemi

Bir başlangıç reverz transkriptaz adım ve genomun iyi korunmuş 5' kodlanmamış bölgesinden ("5' nontranslated region", 5' NTR) elde edilen primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi, EV saptanmasında hücre kültüründen daha üstündür. PCR yöntemi, akut enteroviral menenjitli olguların %66-86' sında EV RNA'sını saptayabilirken hücre kültürüyle izolasyon ise %30' dur⁹⁰. RT-PCR yönteminin, EV menenjit tanısı için duyarlılığı %86-100, özgüllüğü ise %92-100 olarak saptanmıştır. PCR yöntemiyle; enteroviral RNA boğaz kültürü, serum, idrar ve gaita örneğinden saptanabilir. Ancak idrar örneklerinde duyarlılığı diğer örneklerden daha düşüktür. RT-PCR yöntemi ile EV saptanma zamanı (saatler-1 gün) kültürle karşılaştırıldığında önemli ölçüde kısadır. Bu nedenle PCR yönteminin kullanılması hastanede yatış süresini kısaltabilir, olası bakteriyel menenjit için antimikrobiyal kullanımını ve yardımcı tanısal testlere ihtiyacı da azaltır²³.

HPeV Enfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı

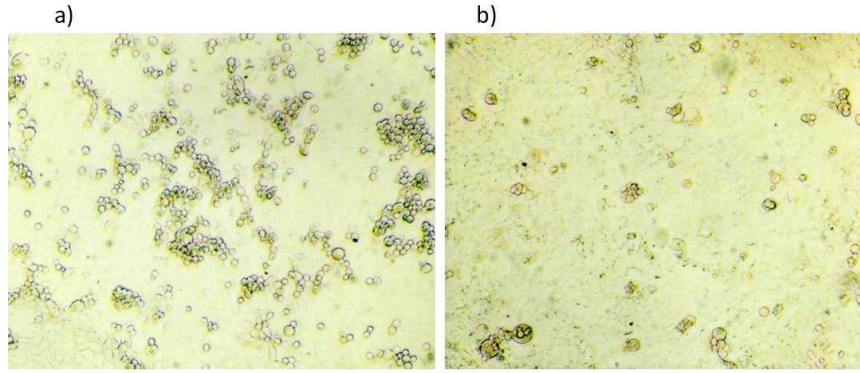
HPeV'ün hücre kültürü ve moleküler tekniklerin kullanımı ile tanısı konulabilmektedir.

Hücre Kültürü

HPeV'ların, EV'lar gibi rutin tanısal prosedürler ile belirlenebilmektedirler. Enfeksiyonun tanısındaki klasik metot, dışkı örnekleri, boğaz svapları, BOS ve kandan hücre kültürü ile virus izolasyonudur⁹¹.

HPeV, genellikle tersiyer maymun böbrek hücreleri ve insan embriyonik akciğer hücre dizileri ve Afrika yeşil maymun böbrek Vero hücrelerinde üreyebilmektedir⁴⁷. HT29 (human colon adenocarcinoma cells), A549 (human lung carcinoma cell line), RD (Rhabdomyosarcoma cells) hücre dizisi gibi diğer hücreler de HPeV izolatlarının kültürü için kullanılabilir⁹¹. Ancak hücre

kültürünün bazı sınırlamaları vardır. Hücre kültüründe, CPE özelliği ile HPeV belirlenmesi güçtür çünkü HPeV ve EV hücre kültüründe aynı karakterde CPE oluştururlar. Hücreler ayrılır ve koyu renk görünürler, dökülürler (Şekil 3)⁴⁷. Ayrıca EV'larda olduğu gibi farklı HPeV tipleri farklı hücre dizilerinde üreyebilmektedirler. Bu sebeple klinik materyalden etkili bir izolasyon için, her izolasyonda 3 ayrı hücre dizisinin kullanılması gerekebilmektedir. HT29, HPeV1, 2 ve 4-6'nın üremesini desteklediği bulunmuştur. Ancak HPeV3'ün izolasyonu birkaç sepsifik hücre dizisinde (örn. Vero ve LLCMK₂ monkey kidney cells) olmaktadır⁹¹.



Şekil 3. a) LLCMK₂ hücre dizisi, b) HPeV ile enfekte LLCMK₂ hücre dizisi

Serotiplendirme

Genelde HPeV'ların oluşturduğu CPE, EV'ların oluşturduğu CPE'den belirgin bir farklılığı olmadığı için, çoğu zaman HPeV'lar yanlışlıkla EV'lar ile karıştırılmaktadır. Bu durum serotip spesifik nötralizasyon testleri ile aşılabilir. Serotiplendirme virusa yönelik serotip spesifik antiserumlar kullanılarak virusların tiplendirildiği bir metottur. EV nötralizasyon panelinin spesifik antikoları HPeV1 ve 2'yi içermektedir. Diğer HPeV tiplerinin (HPeV3-6) spesifik antikoları bulunmadığı veya hepsinin kültürü yapılamadığı için (HPeV7-14) için serotiplendirilmeleri yapılamamaktadır¹⁹.

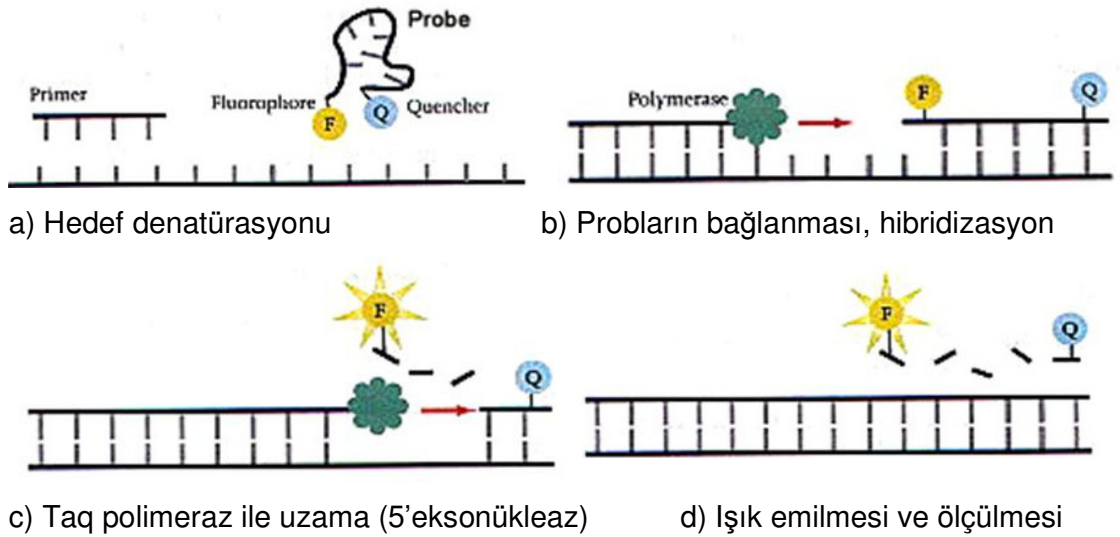
Moleküler Teknikler

Hücre kültürleri zaman alıcı ve çok duyarlı olmadıkları için, HPeV identifikasyonu için real time (rt)-RT-PCR gibi moleküler tekniklerin kullanımı tercih edilmektedir.

MSS'den virus izolasyonu için hücre kültürünün duyarlılığı oldukça düşüktür çünkü menenjit veya ensefalitli hastaların viral yükü BOS ml'sinde 10-1000 TCID₅₀ arasında değişmektedir. Bu sebeple bu materyallerde virusun belirlenmesi için RT-PCR gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Hücre kültür yöntemleri ile EV ve HPeV'ların her ikisinin tanısı konulabilirken, EV spesifik PCR HPeV'ları belirleyememektedir çünkü hedeflenen 5'UTR bölgesi HPeV ve EV'lar arasında oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu sebeple HPeV'ların 5'UTR bölgesini hedefleyen RT-PCR protokolleri uygulanmalıdır^{91, 92}.

Real-time PCR sistemi floresan ile işaretli probalar ile amplifiye ürünlerin belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Probların 5' ucu floresan donör boya ve 3' ucu "quencher" boya ile işaretlidir. Hedef komplementer dizi olmadığında donör floresansı bastırılır. PCR sırasında işaretli oligonükleotidler hedef dizi ile hibridize olur ve 5' boya *Taq* DNA polimerazın 5'-3' endonükleaz aktivitesi ile uzaklaştırılır. Donör floresan artık bastırılmaz ve ölçülebilir hale gelir (Şekil 4).

HPeV genomunun 5' UTR bölgesine göre primer ve probalar tasarlanmaktadır. Bu bölge farklı HPeV tipleri arasında oldukça korunmuştur ve tek bir primer çifti-prob kombinasyonu ile bütün HPeV tipleri belirlenebilmektedir.



Şekil 4. rt-RT-PCR

rt RT-PCR metotları, daha hızlı, daha az zahmetli ve konvansiyonel PCR'dan daha düşük kontaminasyon riski ile HPeV belirlenmesi için geliştirilmiş ve onaylanmıştır. Değişken VP1 kapsit bölgesini hedefleyen genotiplendirme metotları ile MSS ile ilişkili hastalığı olan yenidoğanların BOS gibi klinik materyalden direkt belirlenebilmektedir^{19, 64}. VP1 bölgesi de yüksek değişkenlik gösterdiği için dejenere primerler kullanılarak bütün HPeV tipleri gösterilebilmektedir. Bu yüksek değişkenlik, örneklerin zayıf pozitiflik vermesine sebep olmakta ve tiplendirilmesini zorlaştırmaktadır. 5'UTR bölgesi daha korunmuş bir bölgedir ve bu bölgenin tiplendirilmesi daha duyarlı sonuçlar vermektedir. Ancak bu bölge tiplendirme için uygun değildir, tip tahmini yapılabilmektedir⁶⁴.

Sonuç olarak; HPeV3 en patojenik HPeV tipidir ve MSS hastalığında en yaygın belirlenen tiptir. Hücre kültüründe üretilmesi zordur ve mevcut antikor havuzları ile rutin olarak serotiplendirmesi yapılamamaktadır. HPeV tiplerinin prevalans verileri sadece hücre kültürü ile virus izolasyonuna bağlı olması, kültürde kullanılan hücre panelleri tarafından etkilenmesine sebep olmaktadır çünkü HPeV tipleri arasında üreme özellikleri yönünden farklılıklar bulunmaktadır. Bu sebeple klinik veya epidemiyolojik amaçlı HPeV belirlenmesi için rt RT-PCR metotları kullanılmalı ve genotiplendirme için VP1 veya VP1/VP3 gen bölgeleri hedeflenmelidir¹⁹.

Viral Aseptik Menenjitte Tedavi

Enteroviral menenjit / meningoensefalit tedavisinde etkili, lisans almış bir ilaç henüz yoktur. Temel olarak destekleyici tedavi uygulanmaktadır⁹³. Klinik kullanım ve araştırmalarda yer alan başlıca tedavi seçenekleri; immünglobulin ve bir anti-pikornaviral ilaç olan plekonarildir. Plekonaril; hücreye tutunma ve viral RNA'nın soyunmasını inhibe ederek replikasyonla yeni virionların oluşumunu engellemektedir. Oral biyoyararlanımı iyi bir ilaçtır⁹⁴. Yetişkin ve çocuklarda plekonaril ile EV menenjit tedavisinin semptomların şiddetini ve süresini kısalttığını rapor eden çalışmalar bulunmaktadır⁹⁵. EV'lara karşı immün yanıtta antikorların önemli rolü olduğu için ciddi hastalıklarda intravenöz immünglobulinler kullanılmaktadır⁹⁴. Ağır EV sepsis veya menenjitli yenidoğanlarda intravenöz immünglobulin, maternal serum veya plazma uygulamalarıyla da seyrek olarak başarı sağlandığı bildirilmiştir⁷. Yaşamın ilk iki

haftasında, EV enfeksiyonu olan yenidoğanlarda, intravenöz immünglobulin kullanımının yararını araştıran tek kontrollü çalışmada, intravenöz immünglobulin verilen bebeklerde viral titre azalımı görülmüş ancak klinik yarar gösterilememiştir⁹⁶.

HPeV'e karşı geliştirilmiş bir antiviral tedavi henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle mevcut seçenekler, destek tedavisi ve intravenöz immünglobulin kullanımınıdır⁹⁷. HPeV3 ile enfekte neonatal sepsis ve hepatiti olan bir olgunun intravenöz immünglobulin aldıktan sonra iyileştiği bildirilmiştir (98). İnvitro yapılan çalışmalarda HPeV1 ve HPeV3'ün plekonarile dirençli olduğu saptanmıştır⁹⁷. Plekonaril, viral kapsidin hidrofobik bölgesine integrasyonla viral replikasyonu inhibe etmektedir. Böylece soyunma ve virusun konak hücreye bağlanması engellenmektedir. HPeV ile ilişkili enteropatisi olan bir olguda plekonarilin kullanıldığı bildirilmiş ancak bu hastada hem plekonaril hem de ribavirinin virus replikasyonunda herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir⁹⁹. Şimdilik, intravenöz immünglobulin tek seçenek olarak görülmektedir ve yeni tedavi seçenekleri için daha fazla araştırmaya gerek vardır.

Viral Aseptik Menenjitte Prognoz

Viral aseptik menenjitli çocukların çoğu tamamiyle iyileşmektedir. Bazı hastalarda akut hastalık sonrası, haftalar süren yorgunluk, huzursuzluk, azalmış konsantrasyon, kas güçsüzlüğü, spazmı ve koordinasyon bozukluğu görülebilmektedir. Enteroviral aseptik menenjit tipik olarak benign klinik seyir gösterir, ensefalit ya da miyeliti gösteren nörolojik anormallikler yoktur. EV menenjitinin dünya çapında yaygın olarak görülmesi ve raporlanmaması nedeniyle morbidite ve mortalitesi kesin olarak bilinmemektedir. Yenidoğan ya da immun yetersizliği olan bireylerde sekel ve mortalite oranı yüksek olabilmektedir. Çocuklarda semptomların süresi genellikle 1 haftadan daha azdır. Çok sayıda yaygın lomber ponksiyondan sonra klinik iyileşmeyi bildirmektedir. Adolesanlar ve erişkinler uzamış konvalesan faza sahip olabilir ve semptomlar birkaç hafta devam edebilmektedir.

HPeV enfeksiyonları, özellikle yenidoğan dönemi ve küçük çocuklarda sepsis, sepsis benzeri hastalık, menenjit gibi ağır seyirli hastalıklara neden olabilmektedir. Verboon-Maciolek ve arkadaşları, yenidoğanlarda EV ve HPeV

enfeksiyonlarını karşılaştırdıklarında mortalite ve sekel oranında anlamlı bir fark bulamamışlardır¹⁰⁰.

Viral Aseptik Menenjitin Korunma

Viral menenjitin önde gelen etkeni olan EV ve HPeV için aşı ya da özgül bir koruyucu önlem yoktur. HPeV, primer olarak el hijyeninin eksikliğine bağlı yayılmaktadır. El yıkama ile yayılma önlenmektedir çünkü majör bulaş yolu fekal- oral yoldur. HPeV nedeniyle hastanede yatan hastalar için ise standart enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması yeterlidir¹⁰¹.

GEREÇ VE YÖNTEM

BOS örneklerinin alınması ve saklanması

BOS örnekleri, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi kliniklerine başvuran aseptik menenjit tanısı konan çocuk veya erişkin hastalardan elde edilmiştir. Örnekler, sızdırmaz kapaklı steril tüplere alınmıştır. Tüm örnekler alındıktan hemen sonra, gecikmeden Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderilmiştir ve -80°C'de saklanmıştır.

Çalışma Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'nın 20/06/2013 tarihli ve 2013/206 sayılı kararı ile "Etik Kurul Onayı"nı almıştır.

Klinik verilerin toplanmasında, hastaların BOS biyokimyası (glukoz, protein), hücre sayısı, ateş, meningeal irritasyon bulguları (ense sertliği, Kernig, Brudzinski), fokal nörolojik bulgu, deri lezyonları, gastrointestinal ve solunum sistem bulguları ile altta yatan hastalıkları değerlendirilmiştir.

Kullanılan Araç ve Gereçler

Kullanılan Cihazlar

- Isı bloğu
- Güvenlik Kabini (Heraeus, HERA safe)
- Derin Dondurucu (Uğur, R134a)
- Hassas Terazisi (Scaltec)
- Vortex (Heidolph, REAX top)
- Mikrosantrifüj (Sigma, 1-15)
- Otoklav (Hirayama, HVE-50)
- +4°C'lik soğutucu (Indesit)
- -20°C'lik Derin Dondurucu (Indesit)
- Su Banyosu (Memmert)
- Distile su cihazı (Thermo Scientific, micropure)
- Mikropipet Seti (Thermo Scientific, GJ16637-GJ16827-GJ17112)

Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

- Etanol (%96'lık)
- QIAamp®MinElute®Virus Spin Kit(QIAGEN, Hamburg, Almanya)
- Parechovirus R-gene™ assay (Kat no: 71-020, bioMerieux/Argene, Fransa)
- Enterovirus R-gene gene™ assay (Kat no: 69-005B, bioMerieux/Argene, Fransa)

BOS örneklerinden viral RNA izolasyonu

RNA ekstraksiyonu için "QIAamp®MinElute®Virus Spin"(QIAGEN, Hamburg, Almanya) kiti kullanıldı. Ekstraksiyon aşamaları ve kullanılan çözeltilerin hazırlanması üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapıldı.

Kit içeriği

QIAamp MinElute Kolonları

Toplama tüpleri

AL Tampon

AW1 Tampon (konsantre)

AW2 Tampon (konsantre)

AVE Tampon

Proteaz Resüspanسیون Tampon

Taşıyıcı RNA

QIAGEN® Proteaz

Çözeltilerin Hazırlanması

QIAGEN® proteaz: Liyofilize halde bulunan QIAGEN Proteaz, 1.4 ml Tampon AWE ile çözülerek proteaz çalışma solüsyonu hazırlandı. Çalışma sırasında QIAGEN Proteaz direkt olarak AL tampona eklenmemektedir. Solüsyon çözdürüldükten sonra 1-8°C'de saklanmaktadır.

Taşıyıcı RNA: 310 µl AVE tampon 310 µg liyofilize taşıyıcı RNA içeren tüp üzerine eklenir ve 1 µg/ml konsantrasyonunda taşıyıcı RNA elde edilir. İyice çözüldükten sonra 50 µl'lik porsiyonlara ayrılarak -20°C'de saklandı.

AL tampon-taşıyıcı RNA karışımının hazırlanması: Her bir örnek için 0.22 ml AL tamponu, 6.2 µl AVE tamponu içinde çözdürülmüş taşıyıcı RNA ile karıştırılarak kullanıldı. Miktarlar örnek sayısı kadar artırıldı.

AW1 tampon: 19 ml konsantre AW1 tampon şişesine 25 ml %96'lik etil alkol eklendi. Oda ısısında (15–25°C) saklandı.

AW2 tampon: 13 ml konsantre AW2 tampon şişesine 30 ml %96'lik etil alkol eklendi. Oda ısısında (15–25°C) saklandı.

İnternal kontrollerin eklenmesi: QIAamp MinElute Virus Spin kit protokolü, ticari amplifikasyon sistemleri ile kullanıldığında, saflaştırma prosedürüne internal kontrollerin eklenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, kullandığımız amplifikasyon kiti ile temin edilen RNA internal kontrolü (IC1) lizis tampona taşıyıcı RNA ile birlikte tüm ekstrakte edilen örnekler eklendi. Negatif kontrol olarak su (Wo) ve IC1 birlikte eklendi.

BOS'dan Viral Nükleik Asit izolasyonu Protokolü

Çalışmada önemli noktalar

Bütün santrifüj basamakları oda ısısında (15–25°C) gerçekleştirildi.

Bütün BOS örnekleri buz üzerinde tutularak çözdürüldü.

Isı bloğu önceden 56°C'ye ayarlandı.

Protokol

1. 25 µl QIAGEN proteaz çalışma solüsyonu, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine pipet edildi.

2. Üzerine 200 µl BOS örneği eklendi.

3. Üzerine 200 µl AL tampon (28 µg/ml taşıyıcı RNA içeren) eklendi ve kapağı kapatılarak 15 saniye vortekslenerek karıştırıldı. Lizisin meydana geldiği, homojen solüsyon meydana geldiğinde anlaşıldı.

NOT: QIAGEN proteaz direkt olarak AL tampona eklenmedi.

4. 56°C'ye ayarlanan ısı bloğunda 15 dakika inkübe edildi.

5. İnkübasyon sonunda, tüp kapağındaki sıvı damlalarının ortadan kaldırılması için tüpler kısa santrifüj yapıldı.

6. Örneklerin üzerine 250 µl soğuk %96'lik etil alkol eklendi ve kapağı kapatılarak 15 saniye vortekslenerek karıştırıldı. Etil alkollü lizat oda ısısında (15–25°C) 5 dakika inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonunda, tüp kapağındaki sıvı damlalarının ortadan kaldırılması için tüpler kısa santrifüj yapıldı.
8. Lizatın hepsi QIAamp MinElute kolonlarına dikkatlice aktarıldı. Kapakları kapatılarak 6000xg (veya 8000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp MinElute kolonları temiz 2 ml'lik toplama tüplerine aktarıldı ve filtratı içeren toplama tüpleri atıldı.
9. QIAamp MinElute kolonlarının kapakları dikkatlice açılarak 500 µl AW1 tampon eklendi ve 6000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp MinElute kolonları temiz 2 ml'lik toplama tüplerine aktarıldı ve filtratı içeren toplama tüpleri atıldı.
10. QIAamp MinElute kolonlarının kapakları dikkatlice açılarak 500 µl AW2 tampon eklendi ve 6000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp MinElute kolonları temiz 2 ml'lik toplama tüplerine aktarıldı ve filtratı içeren toplama tüpleri atıldı.
11. QIAamp MinElute kolonlarının kapakları dikkatlice açılarak 500 µl %96'lik etil alkol eklendi ve 6000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp MinElute kolonları temiz 2 ml'lik toplama tüplerine aktarıldı ve filtratı içeren toplama tüpleri atıldı.
12. QIAamp MinElute kolonları maksimum hızda (20,000 x g veya 14,000 rpm) 3 dakika membran tamamen kuruyuncaya kadar santrifüj edildi.
13. QIAamp MinElute kolonları temiz 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve ve filtratı içeren toplama tüpleri atıldı. QIAamp MinElute kolonlarının kapakları dikkatlice açılarak, membranın tam üzerine 40 µl AVE tampon eklendi. Kapakları kapatılarak oda ısısında 1 dakika bekletildi ve sonrasında maksimum hızda (20,000 x g veya 14,000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.
14. Elde edilen nükleik asit PCR amplifikasyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere, -20°C'de saklandı.

HPeV'ların belirlenmesi

Real time Parechovirus R-gene™ assay (bioMerieux/Argene,France)

Parechovirus R-gene™ real time testi solunum ve BOS örneklerinden 14 Parechovirus tipini, 5' nükleaz teknolojisi prensibine dayanan real time PCR tekniği ile belirlemektedir. Bu teknikte parechovirus genomunun 5'UTR bölgesinde lokalize 265 bp'lik bir böge amplifiye edilmektedir.

Testin prensibinde, real-time dubleks PCR tekniği uygulanmaktadır. BOS'dan RNA izolasyonundan sonra, kit içerisindeki amplifikasyon premiksi insan parechovirus (530 nm'de okuyarak) ve internal kontrol (IC1) (560 nm'de okuyarak)'ün amplifikasyonu ve tespiti için optimize edilmiştir.

Kit içeriği

R20	Amplifikasyon premiks Parechovirus ve IC1 <i>dNTP'ler, MgCl₂, amplifikasyon tamponu, Parechovirus ve IC1 için prob, Taq Polymerase, ROX™ pasif referans boyası içermektedir.</i>	2x450 µl
W0	Ekstraksiyon için su (moleküler grade)	1x1.8 ml
PC20	Pozitif kontrol	1x300 µl
IC1	İnternal control 1	1x0.7 ml
RT	Reverse Transkriptaz (Konsantre)	1x15 µl

Kontroller

- Negatif ekstraksiyon ve amplifikasyon kontrolü (IC1W0, 530 nm): Bu kontrol suya (W0) eklenen internal kontrolü içermektedir. Bu karışım ekstrakte edildikten sonra her bir hasta örneği gibi amplifikasyona tabi tutulur. Bu kontrol ekstraksiyon ve amplifikasyon kontaminasyonunu izlemek için kullanılır. Sinyaller 530 nm'de okunur.
- İnternal kontrol 1 (ICW0, 560 nm): İnternal kontrol; IC1, örneklerin ekstraksiyon+inhibisyon kontrolü olarak lizis basamağında tüm ekstrakte edilen örneklerle eklenir (IC1+örnek). Sinyaller 560 nm'de okunur. Ayrıca referans ekstraksiyonu+inhibisyonunun kontrolü için ekstrakte edilen suya da konur (IC1W0).

- Değerlendirme, 560 nm’de IC1+örnek ve IC1W0 kontrollerinin CT değerinin karşılaştırılması ile yapılır ve ekstraksiyonun etkinliği ve herhangi bir inhibitör varlığı yönünden değerlendirilir.
- Pozitif kontrol (PC20): PC20 pozitif kontrolü, R20 karışımında bulunan parechovirus primer ve problemleri tarafından tanınan spesifik plasmid içerir. Sinyaller 530 nm’de okunur.

Amplifikasyon

Amplifikasyonlar “Applied Biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR System” (Life Technologies, Kaliforniya, ABD) cihazında yapıldı.

Reverse transkriptaz (RT) enzimi kullanılmadan önce 1:10 oranında dilüe edildi. Amplifikasyon son hacmi 25 µl olup, 15 µl amplifikasyon premiks, 0.15 µl dilüe RT enzimi ve 10 µl ekstrakte edilen RNA’dan oluşmaktadır. Her çalışmaya pozitif kontrol ve negatif kontrol eklenmiştir.

Mikopleylerde hazırlanan karışım 15 sn vortex ve santrifüjden sonra real-time PCR cihazının gözüne yerleştirilmiştir.

Amplifikasyon koşulları aşağıda verilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. HPeV RT-PCR amplifikasyon koşulları.

Basamak		Süre	Sıcaklık	Siklus	Floresan yakalama
Revers transkripsiyon		5 dk.	50°C	1	-
Taq polimeraz aktivasyonu		15 dk.	95°C	1	-
Amplifikasyon	Denatürasyon	10 sn.	95°C	45	-
	Bağlanma	40 sn.	60°C		530 + 560 nm
	Uzama	25 sn.	72°C		-

Sonuçların değerlendirilmesi

Pozitif örneklerde, 530 nm’de CT bulunmaktadır.

Negatif örneklerde, 530 nm’de CT bulunmamaktadır. İnhibisyonlu veya kötü ekstrakte edilen örneklerde de CT bulunmamaktadır.

1. Basamak 530 nm'de okuma Parechovirus	2. Basamak 560 nm'de okuma IC1+örnek, IC1W0	Değerlendirme
CT hesaplandığında	Değerlendirilmesine gerek yok	Parechovirus pozitif örnek
CT hesaplanmadığında	$CT [IC1+örnek] \leq CT [IC1W0] + 3$ siklus	Parechovirus negatif örnek
	$CT [IC1+örnek] > CT [IC1W0] + 3$ siklus	Sonuç geçersizdir (İnhibisyonlu veya kötü ekstrakte edilmiş örnek olup, tekrar test edilmesi gerekmektedir)

EV'ların belirlenmesi

Real time Enterovirus R-gene™ assay (bioMerieux/Argene, France)

Enterovirus R-gene™ kiti, enteroviral genomun oldukça korunmuş 5' kodlanmayan bölgesini hedefleyen real-time PCR amplifikasyonu ile EV'ları tespit edebilmektedir. Kit serotipleri enterovirusların, Enterovirus A: Coxsackievirus A4, A6 to A8, A10, A14, A16, A16V, Enterovirus 71, 76; Enterovirus B: Coxsackievirus A9, B1 to B6, Echovirus 1 to 7, 9, 11 to 21, 24 to 27, 29 to 33, Enterovirus 69, 74, 75, 77, 78, 93; Enterovirus C: Coxsackievirus A11, A13, A17, A20, A21, A24, A24V, Poliovirus 1, 2, 3; Enterovirus D: Enterovirus 68, 70, 94 serotiplerini belirleyebilmektedir.

Test prensibinde ekstrakte edilen örnek transkripsiyon sonrası viral genomun 5' kodlanmayan bölgesindeki 146 bp uzunluğundaki bölgeyi hedefleyen spesifik primerler ile aynı anda amplifiye edilmekte ve tespit edilmektedir. Bu primerler birçok EV serotipini belirleyebilmektedir. Ayrıca testte testin doğru gerçekleştiğini gösteren pozitif kontrol (PC) ve ekstraksiyon ve inhibisyon varlığını test eden internal kontrol (IC) kullanılmaktadır

Kit içeriği

R9	Amplifikasyon premiks Enterovirus ve IC1	3x450 µl
W0	Ekstraksiyon için su (moleküler grade)	2x1.8 ml
PC9	Pozitif Enterovirus kontrol	1x300 µl
IC1	İnternal control 1	1x1 ml
RT	Superscript® III Reverse Transkriptaz (Konsantre)	1x20 µl

Kontroller

- Ekstraksiyon ve inhibisyon kontrolü (IC1, 560 nm): Bu kontrol hasta örneğine eklenen internal kontrolü (IC1) içermektedir. Bu karışım ekstrakte edildikten sonra amplifikasyona tabi tutulur ve ekstraksiyonun etkinliğini ve olası inhibitör varlığını test etmek için kullanılır. Sinyaller 560 nm’de okunur.
- Referans ekstraksiyon ve inhibisyon kontrolü (IC1W0, 560 nm): Bu kontrol negatif ekstraksiyon kontrolüne (W0) eklenen internal kontroldür (IC1) ve negatif referans olarak hasta örnekleri ile aynı anda ekstakte ve amplifiye edilmektedir. İnternal kontrol; Sinyaller 560 nm’de okunur.
- Değerlendirme, 560 nm’de IC1+örnek ve IC1W0 kontrollerinin CT (Crossing Threshold) değerinin karşılaştırılması ile yapılır ve ekstraksiyonun etkinliği ve herhangi bir inhibitör varlığı yönünden değerlendirilir.
- Pozitif kontrol (PC9): PC9 pozitif kontrolü, R9 karışımında bulunan EV primer ve problemleri tarafından tanınan spesifik plasmid içerir. Sinyaller 530 nm’de okunur.
- 530 nm=FAM okuma kanalı
- 560 nm=VIC okuma kanalı

Amplifikasyon

Amplifikasyonlar “Applied Biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR System” (Life Technologies, Kaliforniya, ABD) cihazında yapıldı.

Reverse transkriptaz (RT) enzimi kullanılmadan önce 1:10 oranında dilüe edildi. Amplifikasyon son hacmi 25 µl olup, 15 µl amplifikasyon premiks, 0.15 µl dilüe RT enzimi ve 10 µl ekstrakte edilen RNA’dan oluşmaktadır. Her çalışmaya pozitif kontrol ve negatif kontrol eklenmiştir.

Mikopleylerde hazırlanan karışım 15 sn vortex ve santrifüjden sonra real-time PCR cihazının gözüne yerleştirilmiştir. Amplifikasyon koşulları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. EV RT-PCR amplifikasyon koşulları.

Basamak		Süre	Sıcaklık	Siklus	Floresan yakalama
Revers transkripsiyon		5 dk.	50°C		-
Taq polimeraz aktivasyonu		15 dk.	95°C		-
Amplifikasyon	Denatürasyon	10 sn.	95°C	45	-
	Bağlanma	40 sn.	60°C		530 (FAM) + 560 (VIC) nm
	Uzama	25 sn.	72°C		-

Sonuçların değerlendirilmesi

Pozitif örneklerde, 530 nm'de CT bulunmaktadır.

Negatif örneklerde, 530 nm'de CT bulunmamaktadır. İnhibisyonlu veya kötü ekstrakte edilen örneklerde de CT bulunmamaktadır.

1. Basamak 530 nm'de okuma Enterovirus	2. Basamak 560 nm'de okuma IC1+örnek, IC1W0	Değerlendirme
CT hesaplandığında	Değerlendirilmesine gerek yok	Enterovirus pozitif örnek
CT hesaplanmadığında	$CT [IC1+örnek] \leq CT [IC1W0] + 3$ siklus	Enterovirus negatif örnek
	$CT [IC1+örnek] > CT [IC1W0] + 3$ siklus	Sonuç geçersizdir (İnhibisyonlu veya kötü ekstrakte edilmiş örnek olup, tekrar test edilmesi gerekmektedir)

BULGULAR

Çalışmamıza çeşitli kliniklerden Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na Ağustos 2011- Şubat 2015 tarihleri arasında gönderilen aseptik menenjit şüpheli hastalardan alınan toplam 50 BOS örneği dahil edilmiş olup, hastaların 29 (%58)'unun erkek ve 21 (%42)'inin kadın hastadan oluştuğu belirlendi.

Aseptik menenjit şüpheli 50 hastanın yaşları yedi ay-76 yaş aralığında ve yaş ortalamaları 27,1 olarak bulundu. Hastaların 23 (%46)'ü çocuk yaş grubunda (7 ay-18 yaş) iken, 27 (%54)'si erişkin yaş grubunda (19-76) idi. Çalışmaya dahil edilen 50 hastanın kliniklere göre dağılımı Tablo 7'de verilmektedir.

Tablo 7. Çalışmaya dahil edilen hastaların kliniklere göre dağılımı.

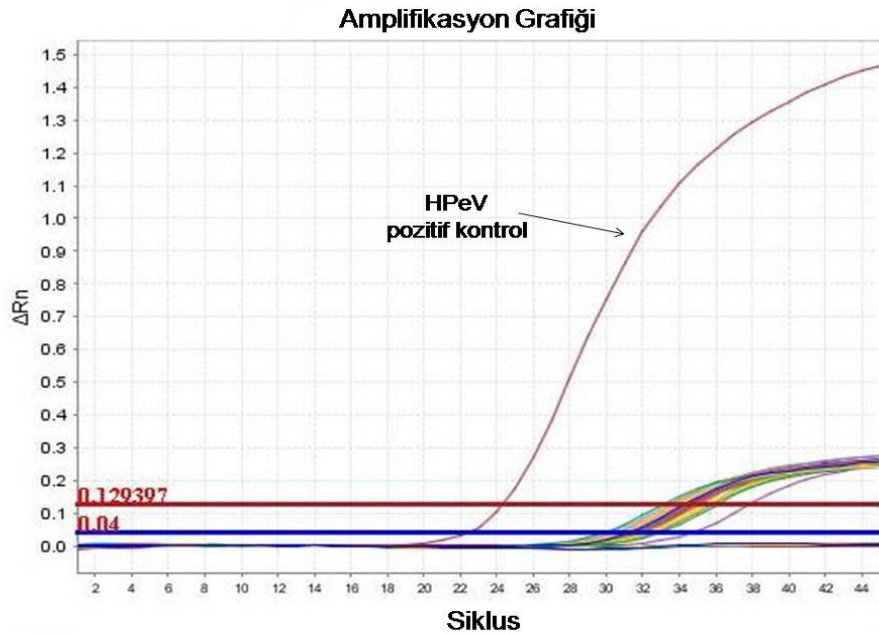
Klinik	Sayı
Çocuk Acil Kliniği	11
Erişkin Acil Kliniği	10
Erişkin Nöroloji Kliniği	10
Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği	6
Erişkin Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği	6
Genel Pediatri Kliniği	3
Çocuk Nöroloji Kliniği	2
Kulak Burun Boğaz Kliniği	1
Çocuk Yoğun Bakım Kliniği	1
Toplam	50

Hastaların klinik bulguları değerlendirildiğinde; 29 (%58) hastada ateş, 28 (%56) hastada fokal nörolojik bulgu, 12 (%24) hastada meningeal irritasyon bulguları (ense sertliği, Kernig, Brudzinski), 3 (%6) hastada gastrointestinal sistem bulguları, 2 (%4) hastada deri lezyonları ve 2 (%4) hastada solunum sistemi bulguları olduğu saptandı. Altta yatan hastalık olarak, 6 hastada (%12) Guillain-Barré sendromu, 4 hastada (%8) akut diseminat ensefalomyelit (ADEM), 4 hastada (%8) transvers miyelit olduğu tespit edildi.

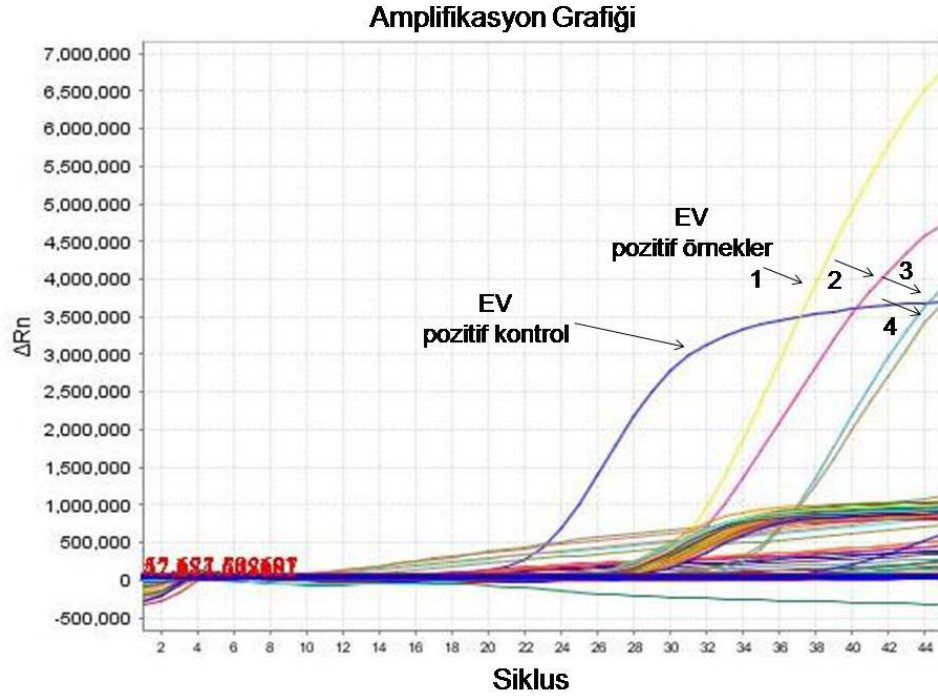
Çalışmaya dahil edilen 50 hastanın BOS örneğinin, Gram boyama ile incelenmesi sonucunda hiçbirinde mikroorganizma görülmedi ve bakteriyolojik kültüründe üreme olmadı.

BOS lökosit sayısı, çalışmaya dahil edilen 50 hasta için ortalama $90/\text{mm}^3$ ($0-960/\text{mm}^3$) olarak bulunurken giemsa boyamada bütün örneklerde lenfosit hakimiyeti mevcuttu. 20 (%40) örnekte lökosit görülmezken, 7 (%14) hastada 10 lökosit, 12 (%24) hastada $10-100/\text{mm}^3$ lökosit, 7 (%14) hastada $100-500/\text{mm}^3$ lökosit ve 4 (%8) hastada $500-1000/\text{mm}^3$ lökosit görüldü. BOS protein değeri ortalaması 560 mg/dl, BOS glukoz değeri ortalaması 63 mg/dl olarak saptandı.

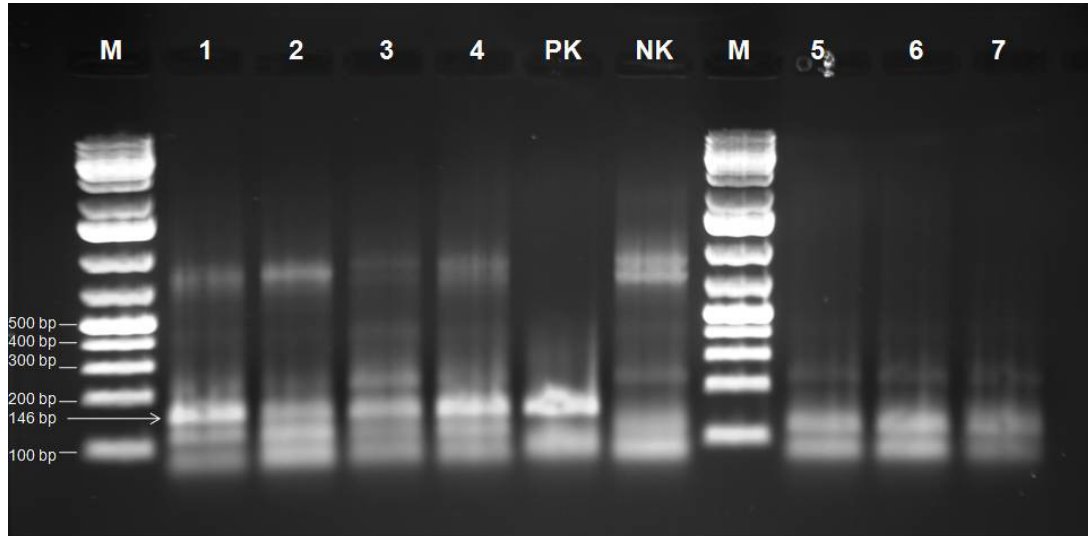
Toplam 50 BOS örneğinin hiçbirinde RT-PCR ile HPeV pozitifliğine rastlanmadı (Şekil 5) ancak örneklerin 4'ünde (%8) EV pozitif olarak saptandı (Şekil 6 ve 7). EV PCR pozitif olan hastaların yaşı 6-16 arasındaydı. Bu hastaların 3'ü erkek 1'i kız idi. Hepsinde ateş, baş ağrısı, kusma (%100) gözlenirken 3'ünde (%75) meninks irritasyon bulguları saptandı. BOS lökosit sayısı, ortalama $182/\text{mm}^3$ ($40-330/\text{mm}^3$) olarak bulunurken giemsa boyamada bütün örneklerde lenfosit hakimiyeti mevcuttu (Tablo 8).



Şekil 5. HPeV RT-PCR grafiği örneği.



Şekil 6. EV RT-PCR grafiği örneği.

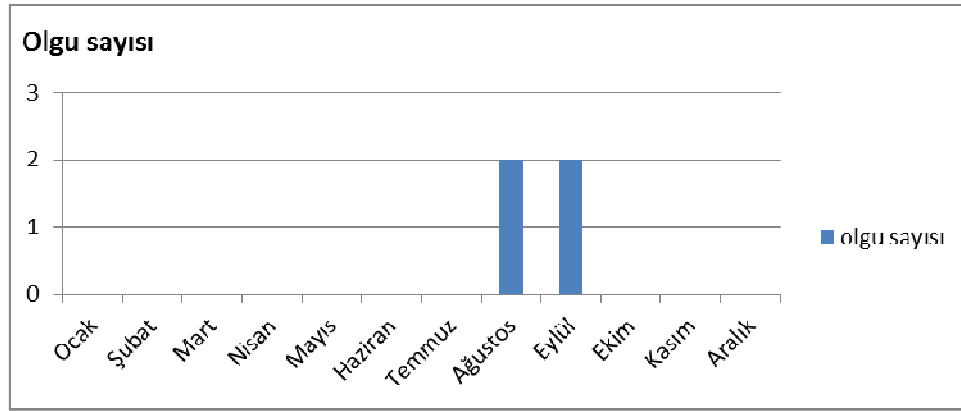


Şekil 7. RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M; Moleküler ağırlık standartı (GeneRuler 100 bç DNA ladder, #SM0241, Fermentas), 1-4 nolu kolonlar; EV pozitif olarak belirlenen klinik örneklerin RT-PCR ürünleri (146 bp hizasında belirlenen bantlar), PK; Pozitif kontrol, NK; Negatif kontrol, 5-7 nolu kolonlar; EV negatif olarak belirlenen klinik örneklerin RT-PCR ürünleri

Tablo 8. EV saptanan hastaların BOS bulguları.

	BOS lökosit sayısı (mm ³ başına)	Lenfosit oranı (%)	BOS proteini (mg/dl)	BOS glukozu / Kan glukozu (mg/dl)
Örnek 1	330	60	184	97 / 136
Örnek 2	40	70	333	66 / 101
Örnek 3	230	75	346	55 / 99
Örnek 4	130	80	320	84 / 98

Örneklerden bir tanesi Eylül 2013'te saptanırken üç tanesi 2014'te Ağustos-Eylül aylarında tespit edilmiştir.



Şekil 8. EV saptanan olguların aylara göre dağılımı

TARTIŞMA

EV, HPeV gibi *Picornaviridae* ailesi üyesi viruslar, ciddi MSS enfeksiyonlarının önemli nedenlerindedir. Aseptik menenjitin en sık viral nedeni EV'lardır ve %80-95 oranında görülmektedir^{13, 14}. Moleküler teknikler, HPeV'ların identifikasyonunda yaygınlıkla kullanılmakta olup, artan epidemiyolojik ve klinik veriler ile HPeV, EV'ları takiben viral menenjit olgularının ikinci nedeni olarak kabul edilmektedirler¹⁹.

HPeV enfeksiyonları, yaygın olarak tüm dünyada çocuklarda tanımlanmaya başlanmıştır. En iyi bilinen genotipler, orta şiddette solunum yolu enfeksiyonu ve gastroenterit ile ilişkilendirilen HPeV1 ve 2' dir^{55, 63}. Yenidoğan ve küçük bebeklerde merkezi sinir sistemi enfeksiyonu ve sepsis benzeri hastalık ile HPeV3 ilişkisi net olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmada, aseptik menejit şüphesiyle hastalardan alınan BOS örneklerinde HPeV ve EV varlığının RT-PCR yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen toplam 50 BOS örneğinin hiçbirinde HPeV pozitifliğine rastlanmazken, örneklerin 4'ünde (%8) EV pozitif olarak saptandı.

EV'lar, dünya çapında dağılım ve sonbahar - yaz aylarında mevsimsellik göstermektedir¹⁰². Mladenova ve ark.¹⁰³ 2012 yılının sonbahar yaz aylarında Bulgaristan'da meydana gelen bir menenjit salgını bildirmişlerdir. 157 aseptik menenjit tanısı alan hastanın 117 tanesinde ekovirus 30 saptanmıştır. Bizim olgularımız da literatür ile uyumlu olarak yaz ve sonbahar aylarında tespit edilmiştir.

Kansas'ta Sharp ve ark.'nın¹⁰⁴ yaptığı bir çalışmada Haziran-Ocak ayları arasında 18 yaşından küçük çocuklardan alınan BOS örneklerinin %17'sinde HPeV saptandığı, bunlarının da %77'sinin tip 3 olduğu bildirilmiştir. Yapmış olduğumuz bu tez çalışmasında, tüm yaş gruplarından yıl boyunca laboratuvarımıza gönderilen BOS örnekleri değerlendirildi. Örneklerin hiçbirinde HPeV saptanmadı. Sharp ve ark.'nın yaptığı bu çalışmada ise HPeV enfeksiyonu olan bebeklerin hepsi 5 aylıktan küçük bulunmuştur ve HPeV sıklığı aynı dönemdeki EV enfeksiyonlarından (%14) daha fazla saptanmıştır.

Hollanda Arnhem'de 2004 yazında bir hastaneye başvuran ve HPeV3 saptanan 14 bebeğin de iki aylıktan küçük olduğu bildirilmiştir¹⁰⁵. Başka bir çalışmada BOS'ta HPeV saptanan bebeklerin median yaşının 41 gün olduğu ve özellikle erkek çocukların etkilendiği bildirilmiştir¹⁰⁶. Bazı çalışmalarda^{65, 107, 108} erkek çocukların daha sık etkilendiği bildirilirken bazılarında ise^{109, 110} anlamlı cinsiyet farkının olmadığı bildirilmiştir.

Şensoy ve ark.'nın³⁷ 1999-2004 yılları arasında yaptıkları çalışmada 612 aseptik menenjitli olgunun 104 (%17) tanesinde EV saptanmıştır ve olguların çoğunun (%34,6) Ağustos ayında olduğu belirtilmiştir. En yaygın semptomlar ateş (%81,7), kusma (%77,9), baş ağrısı (%57,7) olarak bildirilmiş ve olguların %46,2'sinde fizik muayenede ense sertliği görülmüştür. Bizim olgularımızda literatür ile benzer olarak en sık saptanan bulgular ateş, kusma ve baş ağrısıdır.

Hollanda¹¹¹ ve Birleşik Krallık'ta¹¹² yapılan çalışmalarda çift sayılı yıllarda HPeV'in daha yüksek prevalansının olduğu bildirilmiş ancak İspanya⁷³ ve ABD'deki⁶⁵ çalışmalarda bu görülmemiştir. Yine ABD'de yapılan başka bir çalışmada HPeV'in tekli yıllarda pik yapan farklı bir siklusu bildirilmiştir¹⁰⁴. Kaliforniya'dan bildirilen bir çalışmada¹¹³, saptadıkları HPeV'lerin neredeyse tamamının çift sayılı yıllarda olduğu ancak bu sonucun, örneklerin çoğunun çift sayılı yıllarda toplanmasından kaynaklanıyor olabileceğinden bahsedilmiştir. 2008-2012 yılları arasında toplanan BOS'ların incelendiği bu çalışmada, tek sayılı yıllarda sadece bir hastanın saptandığı, onun da 5 yaşında olduğu bildirilmiştir. Bu hasta, ateş ve BOS'ta pleositozu olmayan, serebellar ataksi kliniği ile diğer hastalara benzememektedir ve gruptaki en büyük hastadır. Gruptaki diğer hastalar, genellikle 3 aydan küçük bulunmuştur.

Yenidoğan ve küçük çocuklarda sepsis ve menenjitte neden olan genotip, sıklıkla HPeV3 olup BOS'ta saptanan diğer genotipler sporadik olarak ortaya çıkmaktadır ve daha büyük çocuklardan izole edilmektedir⁶⁴. İskoçya'nın doğusunda yapılan 8 yıllık uzun süreli bir sürveyans çalışmasında, BOS'ta tespit edilen 68 suşun ikisi hariç hepsinin HPeV3 olduğu bildirilmiştir¹¹⁴. Çeşitli çalışmalarda, HPeV3 ile enfekte yenidoğan ve çocukların, diğer genotiplerle enfekte olanlara göre daha küçük olduğu ve daha ciddi semptomlarının olduğu bildirilmiştir^{47, 64}.

Fransa'da Jeziorsky ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada¹⁰⁶ 2012 yılında yenidoğan ve 1 yaşından küçük bebeklerden toplanan 120 BOS örneğinin

%7,5'inde HPeV bulunduğu, bunların çoğunun yaz aylarında saptandığını bildirilmiştir. Ancak bir grup olgu da Kasım ayında görülmüştür. Bu da HPeV sirkülasyon periyodunun düşünöldüğünden daha geniş, yıl boyu sürdüğünü düşünörmüştür. Çalışmamızda beş yıllık bir dönemde topladığımız örneklerin hiçbirinde HPeV saptanmadı.

Piralla ve ark. Ocak 2010- Ekim 2013 tarihleri arasında 60 yenidoğandan 54 BOS ve 10 plazma örneği toplamışlardır. Real time PCR ile çalıştıklarında, örneklerin %11,6'sında EV, %5'inde HPeV saptamışlardır. 2007-2009 yılları arasında İsrail'de, beş yaşından küçük çocuklardan toplanan EV PCR negatif BOS örneklerinin dahil edildiği çok merkezli bir çalışmada, örneklerin %3,5'inde HPeV3 tespit edilmiřtir¹⁰⁹. Yenidoğanlar ve küçük bebekler, büyük çocuklar ve erişkinlere göre enfeksiyöz ajanlara daha savunmasızdır¹¹⁵. Ayrıca yetişkinlerdeki anti-HPeV3 antikor seroprevalansı, anti-HPeV1 seroprevalansı ile karşılaştırıldığında daha düşöktür ve sonuç olarak anneden yenidoğana aktarılan koruyucu anti-HPeV3 antikoru da göreceli olarak azdır⁶⁴.

İran'da Rahimi ve ark.'nın¹¹⁶ yaptığı çalışmada aseptik menenjit ve sepsis benzeri hastalık ön tanısıyla sekiz yaşından küçük çocuklardan toplanan 148 BOS örneği, real time PCR ile çalışılmış ve örneklerin 64 (%43,24) tanesinde HPeV, 31 (%20,94) tanesinde EV, 10 (%6,75) tanesinde koenfeksiyon saptanmıştır. HPeV, hem aseptik menenjit hem de sepsis benzeri hastalığın ikisinde de EV'e göre daha sık gözlenmiştir. Wolthers ve ark.'nın⁶⁶ yaptığı çalışmada, beş yaşından küçük çocuklardan toplanan 716 BOS'un %14,2'sinde EV, %4,6'sında HPeV saptanmıştır. Ülkemizde Kuzdan'ın¹⁰⁰ yaptığı çocuklarda EV ve HPeV sörveyansının değerlendirildiği ilk ve tek çalışmada, Mayıs 2006 - Ocak 2009 tarihleri arasında, yedi coğrafik bölgede, toplam 37 merkezden 657 BOS örneği toplanmış ve çalışılmıştır. Örneklerin hiçbirinde HPeV bulunamazken öлке ve dünya verilerine göre daha az bir oranda olmak üzere 13 (%2) örnekte EV saptanmıştır. Bazı çalışmalarda HPeV sıklığı daha fazla bulunurken bazılarında EV daha sık saptanmıştır. Muhtemel viral etyolojinin düşünöldüğü hastalıklarda, klinik bulguların ve HPeV payının daha iyi anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır¹¹⁶.

Sharp ve ark.'nın¹⁰⁴ yaptığı çalışmada ana semptomlar ateş ve huzursuzluk olup EV enfeksiyonları ile karşılaştırıldığında ateş daha yüksek ve uzun süreli (ortalama 2,7 gün), pleositoz saptanmayan BOS sayısı daha fazla

ve lökosit sayısı daha az bulunmuştur. Skram ve ark.¹⁰⁵ da diğer bazı çalışmalarda olduğu gibi, hastalık ciddi seyirli olsa bile kandaki inflamasyon belirteçlerinin (C-reaktif protein ve lökositoz) ve BOS'ta lökosit ve protein değerlerinin farkedilir bir düzeyde yükselmediğini bildirmiştir. Vergnano ve ark.'nın¹¹⁷ çalışmasında da, BOS PCR'ı pozitif olan bebeklerin %95'inde normal BOS mikroskopisi gözlenmiştir. Jeziorsky ve ark.'nın¹⁰⁶ yaptığı çalışmada tüm hastaların BOS'undaki viral yük düşük bulunmuştur. Bunun da BOS'taki aktif replikasyondan ziyade kan-beyin bariyerinden pasif geçişi yansıttığı düşünülmektedir. Bu da çoğu BOS'ta görülen pleositoz, alfa interferon yokluğu ve normal protein seviyelerini doğrular niteliktedir. Ancak bu belirteçlerin, iki aydan küçük bebeklerde MSS enfeksiyonunda az güvenilir olduğunun belirtilmesi gerekmektedir¹¹⁸.

Jeziorsky ve ark.'nın¹⁰⁶ çalışmasında dokuz hastanın başvuru sırasında en sık klinik prezentasyonunun yükselmiş vücut ısısı ve cilt lezyonları olduğu bildirilmiştir. Sharp ve ark.'nın¹⁰⁴ yaptığı çalışmada tanımlanan vakaların %50-100'ünde özellikle avuç içi ve ayak tabanlarında olmak üzere ekstremitelerinde eritematöz ekzantem görülmüştür. Bu ekzantemler, başlangıçta genellikle görülmezken hastalığın ilerlemesiyle gelişmekte ve ateşi olan yenidoğan ve çok küçük bebeklerde HPeV enfeksiyonu için iyi bir gösterge olabilmektedir¹¹⁹. 2-3 gün içinde de kaybolmaktadır. Skram ve ark.¹⁰⁴ da ateşle birlikte ciltte görülen lekelenme tarzındaki lezyonların en yaygın görülen bulgular arasında olduğunu bildirmişlerdir. Shoji ve ark.¹¹⁹ tüm aile bireylerinde üst solunum yolu enfeksiyonu bulguları ve ateş olan 19 günlük bir erkek bebekte, ateşle birlikte alt ekstremitte distalinde, avuç içi ve ayak tabanlarında makülopapüler döküntü olduğunu bildirmişlerdir. Bizim hastalarımızın sadece birinde cilt lezyonları gözlenmiştir. Ancak bu hastada da virus saptanamamıştır.

Semptomatik MSS enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen HPeV3'ün invitro nöral hücre dizilerinde, MSS semptomu olmayan hastalardaki HPeV1 ve HPeV3'e göre daha yüksek replikasyon kinetiği gösterdiği ve HPeV1'in nötralizasyonu ile karşılaştırıldığında özgül anti-HPeV3 antikolarıyla daha az nötralize olduğu bildirilmiştir¹²⁰.

Bazı çalışmalarda HPeV enfeksiyonlarında, EV enfeksiyonu olan çocuklara göre daha sık nöbet geçirme ve nörolojik semptomlar olduğu bildirilmiştir¹²¹. Verboon-Maciolet ve ark.⁶² erken dönemde HPeV3

meningoensefaliti olan 10 çocuk takip etmiş ve bunların dördünde serebral palsi, epilepsi, serebral görme bozukluğu ve öğrenme bozukluğu gibi MSS bozuklukları olduğunu bildirmişlerdir. Grupta ve ark.¹²² yenidoğan döneminde HPeV enfeksiyonu geçiren bir hastada ciddi bir nörogelişimsel gecikme bildirmiştir. Birçok bebekte HPeV'e bağlı MSS enfeksiyonunda nöbet geçirme ve radyolojik görüntüleme beyaz cevherde değişiklikler gösterilmiştir⁶². Vergnano ve ark'nın¹¹⁷ çalışmasında, MR çekilen 12 bebeğin 10'unda beyaz cevherde değişiklik saptamıştır. Bizim örneklerimizin 27 tanesinde nörolojik bulgu mevcuttu ancak bu örneklerin hiçbirinde HPeV ve EV saptanamadı.

Linden ve ark.¹²³ HPeV enfeksiyonu sonrası gelişen bir Guillain–Barré Sendromu olgusu bildirmişlerdir. Guillain–Barré Sendromu sıklıkla *Campylobacter jejuni*, CMV, EBV enfeksiyonları sonrasında görülse de etyolojisi çok net olmayan bu hastalığın nedenlerinden biri de HPeV gibi görünmektedir. Biz Guillain-Barré Sendromu olan altı hastamızın hiçbirinde HPeV saptayamadık.

Özellikle hayatın ilk ayında geçirilen enfeksiyonun, yoğun bakım gerektiren ciddi hastalıkların habercisi olduğu gösterilmiştir¹¹⁷. Çalışmamıza dahil edilen örneklerden sadece bir tanesi çocuk yoğun bakım ünitesinden gönderilmiştir. Bazı çalışmalarda ise HPeV-3 enfeksiyonu ile ilişkili bebek ölümleri bildirilmiştir^{108, 124, 125}.

EV enfeksiyonları çoğunlukla kendi kendini sınırlayan enfeksiyonlar olmasına rağmen özellikle yenidoğanlarda; meningoensefalit, hepatit ve myokardit ile birlikte fulminan hastalığa neden olabilmektedir¹²⁶. Erkeklerin hastalık riski kadınlardan %50 daha fazladır¹²⁷. Oades ve ark.¹²⁶ 37 haftalık doğan sağlıklı bir erkek bebeğin EV enfeksiyonuna bağlı ex olduğunu bildirmişlerdir. Almanya'da 2011 yılında erkek bir yenidoğanın koksaki B3'e bağlı ciddi sistemik enfeksiyon ve ensefalit sonrası sekelle iyileştiği bildirilmiştir¹²⁸. Bizim olgularımızın 3 tanesi (%75) erkekti ve yaş aralığı 6-16 arasında değişmekteydi. Hepsi sekelsiz sağaltım ile taburcu edilmiştir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, EV'lara bağlı aseptik menenjit olguları oldukça sık görülmektedir. Özkaya ve ark.³⁵ 1999 Haziran - Eylül aylarında Ankara ve Antalya'da bir aseptik menenjit salgını bildirmişlerdir. 86 hastanın BOS ve/veya gaita kültürü yapılmış ve 30 hastada (%44) ekovirus 30 saptandığı belirtilmiştir. Güney ve ark.'nın³⁶ 1999-2002'de yaptıkları çalışmada 68 aseptik

menenjit şüpheli hastanın BOS'u; hücre kültürü ve RT-PCR yöntemi ile EV açısından araştırılmıştır. Kültürde üreyenlerden 30 tanesi ekovirus 30 ve 5 tanesi koksakivirus B olarak tanımlanırken RT-PCR ile 43 örnekte pozitiflik saptandığı belirtilmiştir. Antalya'da 2002 yılında 23 vakanın olduğu bir aseptik menenjit salgını bildirilmiştir ve hastaların 19'unun BOS ve/veya gaita örneklerinden ekovirus 30 izole edildiği belirtilmiştir³⁸. Şensoy ve ark.³⁷ tarafından yapılan çalışmada Mayıs 1999 - Aralık 2004 tarihleri arasında kliniklerinde takip ettikleri 612 aseptik menenjitli hastanın %17'sinde EV saptanmıştır. En sık izole edilen tip ekovirus 30 (%36,5) iken sırasıyla koksakivirus B (%16,3), ekovirus 6 (%10,6), ekovirus 11 (%5,8) ve ekovirus 13 (%3,8) tespit edilmiştir. Önlen ve ark.³⁹ 2005 yazında ülkemizin güneyinde (Hatay ilinde) 688 hastanın dahil olduğu bir aseptik menenjit salgını bildirmişlerdir. Konvansiyonel hücre kültürü ve mikronötralizasyon yöntemleriyle BOS örneklerinin %9'unda ekovirus tip 4 saptandığını bildirmiştir. Yaptığımız bu tez çalışmasında da dört yıllık periyotta toplanan örneklerden seçilen 50 aseptik menenjit olgusunun 4'ünde (%8) EV pozitifliği saptanmıştır.

EV ve HPeV'in tespit edilmesinde hızlı tanı yöntemlerinin oldukça faydası olmakla birlikte negatif bir sonucun hızlı bir şekilde tespitinin de hasta yönetiminin en iyi şekilde yapılması ve uygun tedavinin verilmesinde önemi büyüktür. Klinik tanının, real time PCR gibi duyarlı bir yöntemle, viral RNA'nın örneklerde gösterilerek doğrulanması gerekmektedir. Bu yöntem, hücre kültürüyle karşılaştırıldığında daha duyarlıdır ve daha kısa sürede sonuç alınabilmektedir¹²⁹. Çocuk hastaların çeşitli örneklerinde (BOS, gaita, kan, idrar) PCR ve hücre kültür yöntemiyle EV ve HPeV saptama oranlarının karşılaştırıldığı birçok merkezli prospektif çalışmada, her iki virusun da real time PCR ile daha yüksek özgüllük ve negatif prediktif değere sahip olduğu bildirilmiştir¹³⁰. Shaker ve ark.¹³¹ yaşları 1,5 ay ve 6 yaş arasında değişen ve aseptik menenjit tanısı alan 100 hastanın BOS'unun PCR ile çalışıldığında %56'sında buna karşılık viral kültür yapıldığında %20'sinde EV saptadıklarını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, EV ve HPeV yenidoğanlarda hastaneye yatışı gerektiren ateşli hastalıkların önde gelen nedenlerindedir. Özellikle yenidoğan enfeksiyonlarında, klinik komplikasyonları azaltmak için, EV ve HPeV'e spesifik antiviral tedavilerin uygulanması gerekmektedir. Enfeksiyon şüphesi olan

hastalarda laboratuvar ile işbirliği yapmak, etkenin tespiti ve muhtemel bulaşı önlemek açısından çok önemlidir¹²⁹. Etyolojinin bilinmediği klinik durumlarda EV veya HPeV'ların tanımlanması hastanede kalış süresini kısaltmada, gereksiz antibiyotik kullanımını önlemede ve genel bakım giderlerinin azaltılmasında önemlidir¹⁰⁶. EV ve HPeV'e spesifik PCR'ın klinik viroloji laboratuvarının rutinine konulması önerilmektedir¹¹⁷. Normal BOS bulguları olan hastalarda MSS enfeksiyonu, klinisyenler tarafından dışlanmamalıdır ve EV ve HPeV tanısında moleküler temelli tanı testlerinin önemi vurgulanmalıdır¹¹³.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Aseptik menenjitin en sık viral nedeni EV'lardır ve moleküler tekniklerin yaygın kullanılması ile HPeV'lar, EV'ları takiben viral menenjit olgularının ikinci nedeni olarak kabul edilmektedir.

HPeV, yaygın olarak tüm dünyada çocuklarda tanımlanmaya başlanan *Picornaviridae* ailesinden bir virustur. Orta şiddette solunum yolu enfeksiyonu ve gastroenterit ile ilişkilendirilen HPeV1 ve 2 dışında HPeV3, sıklıkla yenidoğanlarda olmak üzere küçük çocuklarda MSS enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Hayatın ilk aylarında geçirilen HPeV3 enfeksiyonlarında nörolojik komplikasyon gelişme oranı, EV'lara oranla daha sık bulunmuştur. Aseptik menenjitlerde BOS'ta görülen pleositoz ve protein artışı gibi beklenen bulguların aksine MSS'nin HPeV ile enfeksiyonlarında çoğunlukla normal BOS mikroskopisi ve protein değerleri görülmektedir. Normal BOS bulguları olan hastalarda MSS enfeksiyonu, klinisyenler tarafından dışlanmamalı ve etiyolojide HPeV akılda tutulmalıdır.

Yaptığımız bu çalışmada, EV enfeksiyonunun ilimizde aseptik menenjit tanılı olgularda %8 oranı ile oldukça yaygın bulunduğu saptandı. EV saptanan hastaların yaş aralığı 6-16 olduğu, örneklerden birinin Eylül 2013'te üçünün ise 2014 Ağustos-Eylül aylarında alındığı belirlendi. Diğer yandan HPeV pozitifliğine rastlanmadı. Laboratuvarımıza gönderilen BOS örneklerinin hiçbirinin, HPeV'e bağlı menenjitlerin sık görüldüğü yenidoğan dönemindeki bebeklerden alınmamış olması ve materyal sayısının kısıtlı olması sebebiyle pozitif sonucun elde edilemediği düşünülmektedir.

Etiyolojinin bilinmediği klinik durumlarda EV veya HPeV'un tanımlanması hastanede kalış süresini kısaltmada, gereksiz antibiyotik kullanımını önlemede ve genel bakım giderlerinin azaltılmasında önemlidir. Virusun tespitinde kullanılabilecek en uygun yöntem real time PCR'dır. Bu yöntem, hücre kültürüyle karşılaştırıldığında daha duyarlıdır ve daha kısa sürede sonuç alınabilmektedir.

Özellikle yenidoğan enfeksiyonlarında, klinik komplikasyonları azaltmak için erken tanı ve HPeV'e spesifik tedavilerin uygulanması gerekmektedir.

Enfeksiyon Şüphesi olan hastalarda laboratuvar ile iŐbirliĐi yapmak, etkenin tespiti ve muhtemel bulaşı önlemek aÇısından çok önemlidir.

Sonuç olarak, enteroviral meningoensefalitlerin erken tanısı, ampirik antimikrobiyal tedavi periyodunu azaltarak hasta yönetimini değiştirecek ve hastanede uzun yatış süresinin azaltılmasına olanak sağlayacaktır. Daha ileri çalışmalarda etiyolojide rol alan EV alt tiplerinin belirlenebilmesine ve daha iyi izlenmesine yönelik moleküler epidemiyolojik yöntemlerin kullanılması faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Parasuraman TV, Frenia K, Romero J. Enteroviral meningitis. Cost of illness and considerations for the economic evaluation of potential therapies. *Pharmacoeconomics* 2001; 19(1):3-12.
2. Kumar R. Aseptic Meningitis: Diagnosis and Management. *Indian J Pediatr* 2005; 72(1):57-63.
3. Harvala H, Wolthers KC, Simmonds P. Parechoviruses in children: understanding a new infection. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23(3):224-30.
4. Tapia G, Cinek O, Witsø E, et al. Longitudinal observation of parechovirus in stool samples from Norwegian infants. *J Med Virol* 2008; 80(10):1835-42.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *MMWR* 1997; 46(RR10):1-55.
6. Rotbart HA. Viral meningitis. *Semin Neurol* 2000; 20(3):277-92.
7. Tunkel AR, Scheld WM. Acute meningitis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:959-97.
8. Lee BE, Davies HD. Aseptic meningitis. *Curr Opin Infect Dis* 2007;20(3):272-7.
9. Adler-Shohet FC, Cheung MM, Hill M, Lieberman JM. Aseptic meningitis in infants younger than six months of age hospitalized with urinary tract infections. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22(12):1039-42.
10. Wittmann A, Wooten GF. Amoxicillin-induced aseptic meningitis. *Neurology* 2001; 57(9):1734.
11. Bua J, Marchetti F, Barbi E, et al. Tremors and chorea induced by trimethoprim-sulfamethoxazole in a child with *Pneumocystis pneumonia*. *Pediatr Infect Dis J*. 2005; 24(10):934-5.
12. Rodriguez SC, Olguin AM, Miralles CP, Viladrich PF. Characteristics of meningitis caused by Ibuprofen: report of 2 cases with recurrent episodes and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2006; 85(4):214-20.

13. Rotbart HA. Viral meningitis and the aseptic meningitis syndrome. In: Scheld WM, Whitley RJ, Durack DT (eds). *Infections of the Central Nervous System*. 2 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997:23-46.
14. Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18(12):1033-9.
15. Irani DN. Aseptic Meningitis and Viral Myelitis. *Neurol Clin* 2008; 26(3):635-55.
16. Rantakallio P, Leskinen M, von Wendt L. Incidence and prognosis of central nervous system infections in a birth cohort of 12,000 children. *Scand J Infect Dis* 1986; 18(4):287-94.
17. Kupila L, Vuorinen T, Vainionpää R, Hukkanen V, Marttila RJ, Kotilainen P. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology* 2006; 66(1):75-80.
18. Chadwick DR. Viral meningitis. *Br Med Bull*. 2006; 75-76:1-14.
19. Benschop K, Wildenbeest J, Pajkrt D, Wolthers K. Human Parechoviruses, New Players in the Pathogenesis of Viral Meningitis. In: *Meningitis, Wireko-Brobby G (ed.)*, 2012;12:145-162
20. Rueckert RR. Picornaviridae and Their Replication. In: *Virology*, 2nd ed, Fields BN, Knipe DM (eds), Raven Press, New York 1990;507.
21. Melnick JL. Discovery of the enteroviruses and the classification of poliovirus among them. *Biologicals* 1993; 21(4):305-9.
22. Moore M. Centers for Disease Control. Enteroviral disease in the United States, 1970-1979. *J Infect Dis* 1982; 146(1):103-8.
23. Tunkell AR, Scheld WM. Acute meningitis. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, 2005:1083-120.
24. March B, Eastwood K, Wright IM, Tilbrook L, Durrheim DN. Epidemiology of enteroviral meningoencephalitis in neonates and young infants. *J Paediatr Child Health* 2014; 50(3):216-20.
25. Begier EM, Oberste MS, Landry ML, et al. An outbreak of concurrent echovirus 30 and coxsackievirus A1 infections associated with sea swimming among a group of travelers to Mexico. *Clin Infect Dis* 2008; 47(5):616-23.

26. Armed Forces Health Surveillance Center (AFHSC). Viral meningitis, active and reserve components, U.S. Armed Forces, 2002-2011. *MSMR* 2012; 19(8):2-6.
27. Hyeon JY, Hwang S, Kim H, et al. Accuracy of diagnostic methods and surveillance sensitivity for human enterovirus, South Korea, 1999-2011. *Emerg Infect Dis* 2013; 19(8):1268-75.
28. Huang YC, Chu YH, Yen TY, et al. Clinical features and phylogenetic analysis of Coxsackievirus A9 in Northern Taiwan in 2011. *BMC Infect Dis*. 2013; 24;13:33.
29. Croker C, Civen R, Keough K, Ngo V, Marutani A, Schwartz B; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Aseptic meningitis outbreak associated with echovirus 30 among high school football players--Los Angeles County, California, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015; 63(51):1228.
30. Liu N, Jia L, Yin J, et al. An outbreak of aseptic meningitis caused by a distinct lineage of coxsackievirus B5 in China. *Int J Infect Dis* 2014; 23:101-4.
31. Lu J, Zheng H, Guo X, et al. Elucidation of echovirus 30's origin and transmission during the 2012 aseptic meningitis outbreak in Guangdong, China, through continuing environmental surveillance. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81(7):2311-9.
32. Milia MG, Cerutti F, Gregori G, et al. Recent outbreak of aseptic meningitis in Italy due to Echovirus 30 and phylogenetic relationship with other European circulating strains. *J Clin Virol* 2013; 58(3):579-83.
33. Cabrerizo M, Trallero G, Echevarría JE, et al. Molecular characterization of enteroviruses associated with neurological infections in Spain, 2008. *J Med Virol* 2013; 85(11):1975-7.
34. Siafakas N, Goudesidou M, Gaitana K, et al. Successful control of an echovirus 6 meningitis outbreak in a neonatal intensive care unit in central Greece. *Am J Infect Control* 2013; 41(11):1125-8.
35. Ozkaya E, Hizel K, Uysal G, Akman S, Terzioglu S, Kuyucu N. An outbreak of aseptic meningitis due to echovirus type 30 in two cities of Turkey. *Eur J Epidemiol* 2003; 18(8):823-6.

36. Guney C, Ozkaya E, Yapar M, Gumus I, Kubar A, Doganci L. Laboratory diagnosis of enteroviral infections of the central nervous system by using a nested RT-polymerase chain reaction (PCR) assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47(4):557-62.
37. Şensoy G, Sel K, Özkaya E, Çuhaci Çakir B, Vidinlisan S, Doganci L. Enteroviral meningitis in children in Turkey. *Cent Eur J Med* 2009; 4(2):253-8.
38. Akman S, Özkaya E, Colak D, Daloğlu H. A hospital outbreak of aseptic meningitis due to echovirus type 30 in Antalya, Turkey. *Turk J Pediatr* 2002; 44(3):237-9.
39. Onlen Y, Özkaya E, Savas L, Incecik F, Akcali A. An outbreak of aseptic meningitis in Hatay Province, Turkey. *Neurosciences* 2008; 13 (2)188-9.
40. Nix WA, Maher K, Johansson ES, et al. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2008; 46(8):2519-24.
41. Pham NT, Trinh QD, Khamrin P, et al. Diversity of human parechoviruses isolated from stool samples collected from Thai children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2010; 48(1):115-9.
42. Knowles NJ, Hovi T, King AMQ, et al. Overview of taxonomy. In: *The picornaviruses*. Ehrenfeld E, Domingo E, Roos RP (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2010:19–32.
43. Hyypia T, Horsnell C, Maaronen M, et al. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(18):8847-51.
44. Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR. Picornaviridae. In: *Principles and Practice of Clinical Virology*, 4th ed., 1999:23.
45. Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Complete sequence of echovirus 23 and its relationship to echovirus 22 and other human enteroviruses. *Virus Res* 1998; 56(2):217-23.
46. Ghazi F, Hughes PJ, Hyypiä T, Stanway G. Molecular analysis of human parechovirus type 2 (formerly echovirus 23). *J Gen Virol* 1998; 79 (Pt 11):2641-50.
47. Benschop KS, Schinkel J, Minnaar RP, et al. Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin Infect Dis* 2006; 42(2):204-10.

48. Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol* 2004; 85(Pt 2):391-8.
49. Boivin G, Abed Y, Boucher FD. Human parechovirus 3 and neonatal infections. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(1):103-5.
50. Schnurr D, Dondero M, Holland D, Connor J. Characterization of echovirus 22 variants. *Arch Virol* 1996; 141(9):1749-58.
51. Al-Sunaidi M, Williams CH, Hughes PJ, Schnurr DP, Stanway G. Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. *J Virol* 2007; 81(2):1013-21.
52. Watanabe K, Oie M, Higuchi M, Nishikawa M, Fujii M. Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(6):889-95.
53. Li L, Victoria J, Kapoor A, et al. Genomic characterization of novel human parechovirus type. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(2):288-91.
54. Drexler JF, Grywna K, Stocker A, et al. Novel human parechovirus from Brazil. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(2):310-3.
55. Benschop K, Thomas X, Serpenti C, Molenkamp R, Wolthers K. High prevalence of human Parechovirus (HPeV) genotypes in the Amsterdam region and identification of specific HPeV variants by direct genotyping of stool samples. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(12):3965-70.
56. Calvert J, Chieochansin T, Benschop K, et al. The recombination dynamics of human parechoviruses; investigation of type-specific differences in frequency and epidemiological correlates. *J Gen Virol* 2010; 91(Pt 5):1229-38.
57. Triantafilou K, Triantafilou M, Takada Y, Fernandez N. Human parechovirus 1 utilizes integrins alphavbeta3 and alphavbeta1 as receptors. *J Virol* 2000; 74(13):5856-62.
58. Roitt I, Brostoff J, Male D, Mechanisms of cell migration. In: *Immunology* 6th ed., 2001:3.
59. Triantafilou K, Vakakis E, Orthopoulos G, et al. TLR8 and TLR7 are involved in the host's immune response to human parechovirus 1. *Eur J Immunol* 2005; 35(8):2416-23.

60. Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR. Principles and Practice of Clinical Virology, 4th ed., 1999:23
61. Baumgarte S, de Souza Luna LK, Grywna K, et al. Prevalence, types, and RNA concentrations of human parechoviruses, including a sixth parechovirus type, in stool samples from patients with acute enteritis. *J Clin Microbiol* 2008; 46(1):242-8.
62. Verboon-Maciolek MA, Krediet TG, Gerards LJ, de Vries LS, Groenendaal F, van Loon AM. Severe neonatal parechovirus infection and similarity with enterovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27(3):241-5.
63. Harvala H, Robertson I, McWilliam Leitch EC, et al. Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections. *J Clin Microbiol* 2008; 46(10):3446-53.
64. Harvala H, Robertson I, Chieochansin T, McWilliam Leitch EC, Templeton K, Simmonds P. Specific association of human parechovirus type 3 with sepsis and fever in young infants, as identified by direct typing of cerebrospinal fluid samples. *J Infect Dis* 2009; 199(12):1753-60.
65. Selvarangan R, Nzabi M, Selvaraju SB, Ketter P, Carpenter C, Harrison CJ. Human parechovirus 3 causing sepsis-like illness in children from midwestern United States. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30(3):238-42.
66. Wolthers KC, Benschop KS, Schinkel J, et al. Human parechoviruses as an important viral cause of sepsislike illness and meningitis in young children. *Clin Infect Dis* 2008; 47(3):358-63.
67. Piñeiro L, Vicente D, Montes M, Hernández-Dorransoro U, Cilla G. Human parechoviruses in infants with systemic infection. *J Med Virol* 2010; 82(10):1790-6.
68. Figueroa JP, Ashley D, King D, Hull B. An outbreak of acute flaccid paralysis in Jamaica associated with echovirus type 22. *J Med Virol* 1989; 29(4):315-9.
69. Levorson RE, Jantusch BA, Wiedermann BL, Spiegel HM, Campos JM. Human parechovirus-3 infection: emerging pathogen in neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28(6):545-7.
70. Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, et al. Detection of human parechoviruses from clinical stool samples in Aichi, Japan. *J Clin Microbiol* 2010; 48(8):2683-8.

71. Birenbaum E, Handsher R, Kuint J, et al. Echovirus type 22 outbreak associated with gastro-intestinal disease in a neonatal intensive care unit. *Am J Perinatol* 1997; 14(8):469-73.
72. Ljubin-Sternak S, Juretić E, Šantak M, et al. Clinical and molecular characterization of a parechovirus type 1 outbreak in neonates in Croatia. *J Med Virol* 2011; 83(1):137-41.
73. Pham NT, Chan-It W, Khamrin P, et al. Detection of human parechovirus in stool samples collected from children with acute gastroenteritis in Japan during 2007-2008. *J Med Virol* 2011; 83(2):331-6.
74. Grist NR, Bell EJ, Assaad F. Enteroviruses in human disease. *Prog Med Virol* 1978; 24:114-57.
75. Koskiniemi M, Paetau R, Linnavuori K. Severe encephalitis associated with disseminated echovirus 22 infection. *Scand J Infect Dis* 1989; 21(4):463-6.
76. Pajkrt D, Benschop KS, Westerhuis B, Molenkamp R, Spanjerberg L, Wolthers KC. Clinical characteristics of human parechoviruses 4-6 infections in young children. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28(11):1008-10.
77. Abed Y, Boivin G. Human parechovirus types 1, 2 and 3 infections in Canada. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(6):969-75.
78. Ehrnst A, Eriksson M. Echovirus type 23 observed as a nosocomial infection in infants. *Scand J Infect Dis* 1996; 28(2):205-6.
79. Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA; Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ* 2006; 55(8):1-20.
80. Boros A, Uj M, Pankovics P, Reuter G. Detection and characterization of human parechoviruses in archived cell cultures, in Hungary. *J Clin Virol* 2010; 47(4):379-81.
81. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Nonpolio enterovirus and human parechovirus surveillance --- United States, 2006-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010; 59(48):1577-80.
82. Romero JR, Selvarangan R. The human Parechoviruses: an overview. *Adv Pediatr* 2011; 58(1):65-85.
83. Tauriainen S, Martiskainen M, Oikarinen S, et al. Human parechovirus 1 infections in young children--no association with type 1 diabetes. *J Med Virol* 2007; 79(4):457-62.

84. Joki-Korpela P, Hyypiä T. Diagnosis and epidemiology of echovirus 22 infections. *Clin Infect Dis* 1998; 27(1):129-36.
85. Takao S, Shimazu Y, Fukuda S, Noda M, Miyazaki K. Seroepidemiological study of human Parechovirus 1. *Jpn J Infect Dis* 2001; 54(2):85-7.
86. Sayiner A. Viral merkezi sinir sistemi infeksiyonlarında tanı. *ANKEM Derg* 2005; 19(Ek 2):130-6.
87. Kılıç I, Altuğlu I, Çiçek C, Pullukçu H, Bayram N, Sirin H, Erensoy S. Identification of enteroviruses from central nervous system infections by RT-PCR and cell culture methods. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(3):468-77.
88. Dagan R, Menegus MA. A combination of four cell types for rapid detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Med Virol* 1986; 19(3):219-28.
89. Trabelsi A, Grattard F, Nejmeddine M, Aouni M, Bourlet T, Pozzetto B. Evaluation of an enterovirus group-specific anti-VP1 monoclonal antibody, 5D8/1, in comparison with neutralization and PCR for rapid identification of enteroviruses in cell culture. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9):2454-7.
90. Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, et al. Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J Clin Microbiol* 1994; 32(10):2590-2.
91. Benschop K, Minnaar R, Koen G, et al. Detection of human enterovirus and human parechovirus (HPeV) genotypes from clinical stool samples: polymerase chain reaction and direct molecular typing, culture characteristics, and serotyping. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68(2):166-73.
92. Wolthers KC, Benschop KS, Schinkel J, et al. Human parechoviruses as an important viral cause of sepsislike illness and meningitis in young children. *Clin Infect Dis* 2008; 47(3):358-63.
93. Lee BE, Davies HD. Aseptic meningitis. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20(3):272-7.
94. Florea NR, Maglio D, Nicolau DP. Pleconaril, a novel antipicornaviral agent. *Pharmacotherapy* 2003; 23(3):339-48.
95. Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Curr Opin Pediatr* 2002; 13(1):40-47.

96. Abzug MJ, Keyserling HL, Lee ML, Levin MJ, Rotbart HA. Neonatal enterovirus infection: virology, serology, and effects of intravenous immune globulin. *Clin Infect Dis* 1995; 20(5):1201-6.
97. Wildenbeest JG, Harvala H, Pajkrt D, Wolthers KC. The need for treatment against human parechoviruses: how, why and when? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8(12):1417-29.
98. Al Maamari K, Docherty C, Aitken C. 2009. "Twin" viruses. *J. Clin. Virol.* 44:vi, I.
99. van de Ven AA, Douma JW, Rademaker C, et al. Pleconaril-resistant chronic parechovirus-associated enteropathy in agammaglobulinaemia. *Antivir Ther* 2011; 16(4):611-4.
100. Kuzdan C. Türkiye'deki çocuklarda enterovirus ve parechovirüse bağlı viral aseptik menenjit sürveyansı. Yandal Uzmanlık Tezi. İstanbul: 2011: 50-3.
101. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L; Health Care Infection Control Practices Advisory Committee. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *Am J Infect Control* 2007; 35(10 Suppl 2):S65-164.
102. Cherry JD, Bronstein DE. Aseptic meningitis and viral meningitis. Feigin RD, Cherry JD, Demmler-Harrison GJ, Kaplan SL, Feigin & Cherry's (eds) *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 6th ed, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009:494-504.
103. Mladenova Z, Buttinelli G, Dikova A, et al. Aseptic meningitis outbreak caused by echovirus 30 in two regions in Bulgaria, May-August 2012. *Epidemiol Infect* 2014; 142(10):2159-65.
104. Sharp J, Harrison CJ, Puckett K, et al. Characteristics of young infants in whom human parechovirus, enterovirus or neither were detected in cerebrospinal fluid during sepsis evaluations. *Pediatr Infect Dis J* 2013; 32(3):213-6.
105. Skram MK, Skanke LH, Krokstad S, Nordbø SA, Nietsch L, Døllner H. Severe parechovirus infection in Norwegian infants. *Pediatr Infect Dis J* 2014; 33(12):1222-5.
106. Jeziorski E, Schuffenecker I, Bohrer S, Pain JB, Segondy M, Foulongne V. Relevance of human parechovirus detection in cerebrospinal fluid

- samples from young infants with sepsis-like illness. *J Clin Lab Anal* 2015; 29(2):112-5.
107. Walters B, Peñaranda S, Nix WA, et al. Detection of human parechovirus (HPeV)-3 in spinal fluid specimens from pediatric patients in the Chicago area. *J Clin Virol* 2011; 52(3):187-91.
108. Schuffenecker I, Javouhey E, Gillet Y, et al. Human parechovirus infections, Lyon, France, 2008-10: evidence for severe cases. *J Clin Virol* 2012; 54(4):337-41.
109. Ghanem-Zoubi N, Shiner M, Shulman LM, et al. Human parechovirus type 3 central nervous system infections in Israeli infants. *J Clin Virol* 2013; 58(1):205-10.
110. Piñeiro L, Vicente D, Montes M, Hernández-Dorronsoro U, Cilla G. Human parechoviruses in infants with systemic infection. *J Med Virol* 2010; 82(10):1790-6.
111. van der Sanden S, de Bruin E, Vennema H, Swanink C, Koopmans M, van der Avoort H. Prevalence of human parechovirus in the Netherlands in 2000 to 2007. *J Clin Microbiol* 2008; 46(9):2884-9.
112. Harvala H, McLeish N, Kondracka J, et al. Comparison of human parechovirus and enterovirus detection frequencies in cerebrospinal fluid samples collected over a 5-year period in edinburgh: HPeV type 3 identified as the most common picornavirus type. *J Med Virol* 2011; 83(5):889-96.
113. Felsenstein S, Yang S, Eubanks N, Sobrera E, Grimm J, Aldrovandi G. Human Parechovirus Central Nervous System Infections in Southern California Children. *Pediatr Infect Dis J* 2014; 33(4):e87-91.
114. Harvala H, Calvert J, Van Nguyen D, et al. Comparison of diagnostic clinical samples and environmental sampling for enterovirus and parechovirus surveillance in Scotland, 2010 to 2012. *Eur Surveill* 2014; 19(15):1-9.
115. Maródi L. Neonatal innate immunity to infectious agents. *Infect Immun* 2006; 74(4):1999-2006.
116. Rahimi P, Naser H, Siadat S, et al. Genotyping of human parechoviruses in Iranian young children with aseptic meningitis and sepsis-like illness. *Journal of NeuroVirology* 2013; 19(6):595-600.

117. Vergnano S, Kadambari S, Whalley K, et al. Characteristics and outcomes of human parechovirus infection in infants (2008–2012). *Eur J Pediatr* 2015.
118. Seiden JA, Zorc JJ, Hodinha RL, Shah SS. Lack of cerebrospinal fluid pleiocytosis in young infants with enterovirus infections of the central nervous system. *Pediatr Emerg Care* 2010; 26(2):77–81.
119. Shoji K, Komuro H, Kobayashi Y, et al. An Infant with Human Parechovirus Type 3 Infection with a Distinctive Rash on the Extremities. *Pediatr Dermatol* 2014; 31(2):258-9.
120. Bangalore H, Ahmed J, Bible J, Menson EN, Durward A, Tong CY. Abdominal distension: an important feature in human parechovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30(3):260-2.
121. Felsenstein S, Yang S, Eubanks N, Sobrera E, Grimm JP, Aldrovandi G. Human parechovirus central nervous system infections in southern California children. *Pediatr Infect Dis J* 2013; 33(4):e87-91.
122. Gupta S, Fernandez D, Siddiqui A, Tong WC, Pohl K, Jungbluth H. Extensive white matter abnormalities associated with neonatal Parechovirus (HPeV) infection. *Eur J Paediatr Neurol* 2010; 14(6):531-4.
123. Linden S, Vuorinen T, Österback R, Soilu-Hänninen M. Parechovirus infection preceding Guillain-Barré syndrome. *J Neurovirol* 2012; 18(5):434-6.
124. van Zwol AL, Lequin M, Aarts-Tesselaar C, et al. Fatal neonatal parechovirus encephalitis. *BMJ Case Rep* 2009;2009.
125. Sedmak G, Nix WA, Jentzen J, et al. Infant deaths associated with human parechovirus infection in Wisconsin. *Clin Infect Dis* 2010; 50(3):357-61.
126. Oades PJ, Ladhani S. Enteroviral meningoencephalitis in an infant: an increasingly recognised infection. *Arch Dis Child* 2015; 100(2):208.
127. Modlin JF, Hirsch MS, Baron EL. Epidemiology; pathogenesis; treatment; and prevention of enterovirus infections. www.uptodate.com. Erişim tarihi:08.06.2015
128. Ronellenfitsch S, Tabatabai J, Böttcher S, et al. First report of a Chinese strain of coxsackie B3 virus infection in a newborn in Germany in 2011: a case report. *J Med Case Rep*. 2014 8:164.

129. Piralla A, Mariani B, Stronati M, Marone P, Baldanti F. Human enterovirus and parechovirus infections in newborns with sepsis-like illness and neurological disorders. *Early Hum Dev* 2014; 90 Suppl 1:S75-7.
130. de Crom SC, Obihara CC, de Moor RA, Veldkamp EJ, van Furth AM, Rossen JW. Prospective comparison of the detection rates of human enterovirus and parechovirus RT-qPCR and viral culture in different pediatric specimens. *J Clin Virol* 2013; 58(2):449-54.
131. Shaker OG, Abdelhamid N. Detection of enteroviruses in pediatric patients with aseptic meningitis. *Clin Neurol Neurosurg* 2015; 129:67-71.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CMV	Sitomegalovirus
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EV	Enterovirus
E	Ekovirus
HPeV	Human Parechovirus
HSV	Herpes Simpleks Virus
IL	İnterlökin
KAV	Grup A Koksakivirus
KBV	Grup B Koksakivirus
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PV	Poliovirus
RT-PCR	Revers Transkriptaz-PCR
TLR	Toll-Like-Reseptör
VZV	Varisella Zoster Virus

ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

Şekil 1. Human parechovirus genom organizasyonu.	15
Şekil 2. HPeV replikasyon siklusu.	18
Şekil 3. a) LLCMK ₂ hücre dizisi, b) HPeV ile enfekte LLCMK ₂ hücre dizisi	27
Şekil 4. rt-RT-PCR.	28
Şekil 5. HPeV RT-PCR grafiği örneği.	42
Şekil 6. EV RT-PCR grafiği örneği.	43
Şekil 7. RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	43
Şekil 8. EV saptanan olguların aylara göre dağılımı.	44

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Aseptik Meningen Etyolojisi.	9
Tablo 2. EV'lerin geleneksel sınıflandırılması.	12
Tablo 3. EV'lerin RNA homolojisine göre sınıflandırılması.	12
Tablo 4. HPeV tipleri.	16
Tablo 5. HPeV RT-PCR amplifikasyon koşulları.	37
Tablo 6. EV RT-PCR amplifikasyon koşulları.	40
Tablo 7. Çalışmaya dahil edilen hastaların kliniklere göre dağılımı.	41
Tablo 8. EV saptanan hastaların BOS bulguları.	44