

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ (VETERİNER) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SANTRAL SİNİR SİSTEMİ İNFEKSİYONU ETKENİ OLAN
ENTEROVİRÜSLERİN SAPTANMASINDA HÜCRE
KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ VE RT-PCR YÖNTEMLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

GÜNEŞ ÖZÇOLPAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

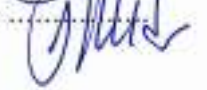
DANIŞMAN
Prof. Dr. Tolga TAN

AYDIN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Viroloji (Veteriner) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Güneş ÖZÇOLPAN tarafından hazırlanan “Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonu Etkeni Olan Enterovirüslerin Saptanmasında Hücre Kültürü Yöntemi ve RT-PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:22/11/2019

Üye (T.D.): Prof. Dr. M. Tolga TAN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye : Prof. Dr. Candan ÇİÇEK	Ege Üniversitesi	
Üye : Prof. Dr. Sevin KIRDAR	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih ve sayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit KUM
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım sayın Prof. Dr. Tolga TAN'a; tezin gerçekleşmesi için tüm imkanlarıyla katkı sağlayan sayın Prof. Dr. Candan ÇİÇEK'e; desteklerini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Sevin KIRDAR'a, Doç. Dr. Nural EROL'a, Dr. Öğretim Üyesi Taylan KOÇ'a; bu tezi yapabilmem için yolumu açan sayın Prof. Dr. Neriman AYDIN'a ve özverili teknik destekleri için sayın Sinan ERCAN'a çok teşekkür ediyorum.



İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Santral Sinir Sisteminin Viral Enfeksiyonları	2
2.2. Enterovirüsler	3
2.2.1. Tarihçe	3
2.2.2. Sınıflandırma	4
2.2.3. Genel Özellikleri	5
2.2.3.1. Yapısı	5
2.2.3.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	6
2.2.3.3. Genomik Yapısı	7
2.2.3.4. Replikasyon	9
2.2.3.5. Patogenez	10
2.2.3.6. Reseptörler	11
2.2.3.7. İmmun Cevap	13
2.2.4. Epidemiyoloji	14
2.2.4.1. Bulaşma Yolları	14
2.2.4.2. Enterovirüs Enfeksiyonları Epidemiyolojisi	14
2.2.5. Enterovirüs Enfeksiyonları	16
2.2.5.1. Asemptomatik Enfeksiyon	16
2.2.5.2. Menenjit ve Ensefalit	16
2.2.5.3. Poliomyelit	18
2.2.6. Mikrobiyolojik Laboratuvar Tanısı	19
2.2.6.1. Hücre Kültürü	20

2.2.6.2. Serolojik Tanı	22
2.2.6.3.Nükleik Asit Testleri	23
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1 Gereçler	25
3.1.1 Çalışma Yeri.....	25
3.1.2 Çalışma Grubu ve Örnekleri.....	25
3.1.3 BOS Örneklerinin Saklanması	25
3.2. Yöntemler	25
3.2.1 Nükleik Asit Testi.....	26
3.2.1.1 Nükleik Asit Testi Miks İçeriği ve Isı Döngüsü.....	26
3.2.2 Hücre Kültürü.....	27
3.2.2.1 Hücre Çözdürme.....	27
3.2.2.2 Hücre Dizilerinin Shell Viallere Pasajlanması	28
3.2.2.3 Örneklerin Shell Viallere İnokülasyonu	29
3.2.2.4 Shell Vial Hücre Kültüründen Subpasajlama İşlemleri	29
3.2.4.5 Üreme Olan BOS örneğinin shell vial kültür süpernatantından Dilüsyon Örneklerinin Hazırlanması.....	30
3.2.4.6 Hücrelerin Boyanması.....	30
3.2.2.7 Shell Vial Hücre Kültürü Yönteminde Kullanılan Sıvı Besiyerleri ve Solüsyonlar...31	31
3.2.2.7.1 Vero, RD ve HEp-2 Hücrelerinin Büyüme Besiyeri	31
3.2.2.7.2 Enterovirus İzolasyon Besiyeri.....	31
3.2.2.7.3 Antibiyotikli Yıkama Sıvısı.....	31
4.BULGULAR	32
5. TARTIŞMA.....	40
6.SONUÇ.....	43
7.KAYNAKLAR.....	44

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BOS :	Beyin omurilik sıvısı
CPE :	“Cytopathic effect”; sitopatik etki
DNA :	Deoksiribonükleik asit
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EV :	Enterovirüs
HEp-2 :	İnsan larinks epitelyal karsinoma hücre dizisi
HEV :	“Human enterovirus”; insan enterovirüs
HPeV :	“Human parechovirus”; insan parechovirus
IPV :	“Inactive polio vaccine”; inaktif polio aşısı
IRES :	“Internal ribosome entry site”; iç ribozom giriş bölgesi
NTR :	“Nontranslated region”; kodlanmayan bölge
NPEV :	“Non polio enteroviruses”; polio dışı enterovirüsler
OPV :	“Oral polio vaccine”; oral polio aşısı
ORF :	“Open reading frame”; açık okuma çerçevesi
PZR :	“Polymerase Chain Reaction”; polimeraz zincir reaksiyonu
RD :	İnsan rabdomyosarkom hücre kültürü
RNA :	Ribonükleik asit
Vero :	Afrika yeşil maymun böbrek hücre dizisi
WHO :	“World Health Organization”; Dünya Sağlık Örgütü
NAT	Nükleik asit testi
I Gsf	İmmünooglobulin süper aile
nt	Nükleotid
VP	Viral protein
RT-PCR	Real-time PCR
SF	Serum fizyolojik

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Picornavirus Şematik Yapısı.....	5
Şekil 2: Picornavirus Yapısal Proteinleri	6
Şekil 3: Picornavirus Genomu Şeması Enterovirus	9
Şekil 4: Enterovirüslerde Replikasyon.....	11
Şekil 5: Hücre Yüzeyindeki Bazı Enterovirüs Reseptör Yapıları.....	13



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: NAT Isı Döngüsü.....	26
Resim 2: Tripsin ile Muamele Sonrası, Flasktan Kalkmış Hücrelerin, Inverted Mikroskopta 40X Objektifle görünümü.....	29
Resim 3: Dilüe Edilmiş EV İçeren Örneklerin Amplifikasyon Eğrileri	34
Resim 4: Dilüe Edilmiş EV İçeren Örneklerin İnternal Kontrol Amplifikasyon Eğrileri	34
Resim 5: A.HEp-2 hücrelerinin 40 x büyütmede floresan mikroskopta görüntüleri B.RD hücrelerinin 40 x büyütmede floresan mikroskopta görüntüleri C.Vero hücrelerinin 40 x büyütmede floresan mikroskopta görüntüleri.....	36
Resim 6: A. Hep2 hücre hattında 40X objektifle floresan mikroskopta EV üremesi görünümü B. RD hücre hattında 40X objektifle floresan mikroskopta EV üremesi görünümü	38

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Enterovirüslerin konak hücre yüzeyindeki reseptörleri.....	13
Tablo 2. EV Tanısında Alınması Önerilen Örnekler	18
Tablo 3. Real-Time PZR Yöntemiyle EV RNA pozitif BOS Örneklerinin Hücre Kültürü Sonuçları.....	32
Tablo 4: Hücre Kültüründe EV Üreyen BOS Örneğinin Süpernatantından Yapılan 2 Katlı Dilüsyon Örneklerinin PZR ve Hücre Kültürü Sonuçları	34
Tablo 5: BOS örneklerinde PZR ve Hücre Kültürü Sonuçları	41



ÖZET

SANTRAL SİNİR SİSTEMİ İNFEKSİYONU ETKENİ OLAN ENTEROVİRÜSLERİN SAPTANMASINDA HÜCRE KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ VE RT-PCR YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

**Özçolpan G. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Viroloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019.**

Santral sinir sistemi (SSS) infeksiyonları; menenjit, ensefalit ve ensefalomiyelitten beyin apselerine kadar geniş bir klinik dağılım gösterir. Hızlı ilerleme potansiyeli, kalıcı nörolojik hasar olasılığı ve ölüme yol açabilmesi nedeniyle çoğu infeksiyonda acil tanı ve tedavi yaklaşımı gerekmektedir.

Aseptik menenjit, inflamatuvar bir beyin zarı hastalığı olup, birçok etkenle gelişebilmektedir. Aseptik menenjitin en sık saptanan etkeni viruslardır ve %80-95'inden enterovirüsler (EV) sorumludur. Viral ensefalitlerin yaklaşık %10-20'si de enterovirüs kaynaklıdır.

Enterovirüs infeksiyonlarını saptamada hücre kültürü, serolojik testler ve nükleik asit amplifikasyon testleri (NAT) kullanılmaktadır. Enterovirüs infeksiyonu tanısında hücre kültürü standart yöntemdir ancak NAT tanıda daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi (ADÜTF) Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında santral sinir sistemi infeksiyonu etkeni virusların saptanmasında multipleks Real-Time PCR yöntemi kullanılmaktadır. İlgili örneklerin laboratuvarımızda rutinde Real-Time PCR yöntemi yanısıra hücre kültürü yöntemi ile de çalışılmasının enterovirüs yakalama oranını arttırabileceği ve olası yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların yorumlanmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmaya, ADÜTF hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına viral SSS enfeksiyonu şüphesi olan hastalardan, Real-Time PCR testi istemiyle, 01.11.2018 ile 01.11.2019 tarihleri arasında, klinik açısından viral SSS enfeksiyonu şüphesi olan hastalardan, nükleik asit testi ile viral menenjit paneli çalışılması için gönderilen, 20 adet BOS örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca Enterovirüs üremesi olan hücre kültür hattı süpernatantından 20 adet, 2 katlı, seri dilüsyon hazırlanmıştır. Farklı miktarlarda enterovirüs içeren dilüsyonların herbiri iki alikota ayrılmıştır ve hem hücre kültürü yöntemiyle hem de Real-Time PCR yöntemiyle, eş zamanlı çalışılmıştır. Hücre kültürü çalışması, "shell vial" yöntemi ile Vero (African green monkey kidney-fibroblastbenzeri

hücre; Refik Saydam Hıfzıssıhha, Ankara), HEp-2 (Human laringeal carsinoma-epitelyal hücre; Japonya Hücre Bankası) ve RD (Human rabdomyosarkoma-kas hücresi;DSMZ, Almanya) hücre hatları kullanılarak yapılmıştır.

Bu çalışmada menenjit şüpheli hastalara ait 20 adet BOS örneği arasından, altı örnekte (%30) real-time PZR ile EV RNA saptanmıştır ve bir örnekte (%5) hücre kültürü ile enterovirüs üremesi saptanmıştır. Hücre kültürü yönteminde doğru sonuç için örnekte bulunan virüsün canlı olması gerekmektedir. Bu çalışmada yöntemler arası saptama oranı farklılığının hücre kültürü çalışmasının saklanmış örneklerde yapılması ve saklama sırasında da virüsün canlılığını kaybetmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Örnek miktarının az olması nedeniyle test tekrarına gidilememiştir.

Hücre kültüründe EV üreyen BOS örneğinin süpernatantından MEM sıvısında hazırlanan 2 katlı dilüsyon örneklerinde (20 adet dilüsyon 1/2 - 1/4 - 1/8...) ise 20 dilüsyon örneğinin 17(%85)'sinde, hücre kültüründe EV üremesi saptanmıştır ve 15(%75)'inde ise real-time PZR testi ile EV RNA saptanmıştır. Bu çalışmada hücre kültüründe üreme olan vialin süpernatantından dilüsyonla hazırlanan, EV içeren örnekler işlemlendiğinde hücre kültüründe NAT'a göre daha yüksek oranda (%85/%75) EV pozitifliği sapanmıştır. Dilüsyonlu örneklerin, bekletilmeden ekilmesi nedeniyle virüs canlılığını yitirmeden viallere inoküle edilebilmiştir. Bu durum hücre kültürü yönteminde örneğin transferi ve saklama koşullarının etken izolasyon oranını büyük oranda etkilediğini göstermiştir.

Rutin tanıda kullanılan NAT'ların validasyon kriterleri ve saptayabildikleri EV tipleri yönünden özenle seçilmesinin önemi vurgulanmalıdır. Hücre kültürü yöntemi zaman alıcı ve fazla miktarda örnek inokülasyonu gerektirmesi gibi nedenlerle rutin uygulama açısından pratik değildir ancak rutin tanı laboratuvarlarında NAT negatif çıkan BOS örneklerinde, shell vial yöntemiyle hücre kültürü yapılarak tanının desteklenmesinin, tanı duyarlılığını arttırmada önemli olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Enterovirüs, Hücre kültürü, Real-Time PCR

ABSTRACT

COMPARISON OF CELL CULTURAL METHOD AND RT-PCR METHODS IN DETERMINATION OF ENTEROVIRUSES THAT CAUSE ACTIVE INFECTION

**Özçolpan G. Aydın Adnan Menderes University Institute of Medical Sciences
Department of Virology Master Thesis, Aydın, 2019.**

Central nervous system (CNS) infections includes many clinical forms ; meningitis, encephalitis and encephalomyelitis to brain abscesses. Most of the enteroviral infections require immediate diagnosis and treatment because of the potential for rapid progression, the possibility of permanent neurological damage and death.

Aseptic meningitis is an inflammatory brain disease and can be caused by many factors. Viruses are the most common causative agent of aseptic meningitis and enteroviruses (EV) are responsible for 80-95%. Approximately 10-20% of viral encephalitis is caused by enterovirus.

Cell culture, serological tests and nucleic acid amplification tests (NAT) are used to detect enterovirus infections. Cell culture is the standard method for the diagnosis of enterovirus infection, but NAT is more widely used in the diagnosis.

Adnan Menderes University Medical Faculty (ADÜTF) Hospital Department of Medical Microbiology Laboratory uses Real-Time PCR method for detection of central nervous system infections. It is considered that studying the related samples with routine cell culture method as well as Real-Time PCR method in our laboratory may increase the rate of enterovirus capture and contribute to the interpretation of possible false positive and false negative results

20 CSF samples; from the patients suspected of viral CNS infection sent to investigate the viral meningitis panel by the Real-Time PCR test in ADUTF Hospital Medical Microbiology Laboratories between 01.11.2018 and 01.11.2019; were included in the study.

In addition, supernatant obtained from enterovirus positive cell cultures, 2 folds serially diluted with sterile SF. 20 dilution samples, each dilution containing different amounts of enterovirus, were prepared. Each dilution specimen was divided into two aliquots and studied by both cell culture method and real-time PCR method at the same time. All samples were cultured using "shell vial" method using Vero, HEp-2 and RD cell lines.

In this study, a higher rate of enterovirus positivity was detected in CSF specimens (20 CSF specimen) with NAT compared with cell culture (%30/%5 respectively). This difference

between the methods was thought to be due to the loss of viability of the virus during storage. Due to the small sample amount, the test could not be repeated. Cell culture enterovirus positivity rate is higher than NAT (%85/75 respectively) in the dilution samples prepared from the enterovirus positive cell culture. These dilution samples were not stored and were tested quickly. This showed that transfer and storage of factors greatly affect the isolation rate of the cell culture method.

It should be emphasized that NATs used in routine diagnosis should be carefully selected in terms of validation criteria and EV types they can detect. Cell culture method; is time consuming and it requires excess sample inoculation; is not practical for routine applications because. In routine laboratory diagnosis especially for NAT-negative CSF samples, supporting the diagnosis performed in cell culture with the shell vial method together with NAT is thought to be important in increasing diagnostic sensitivity.

Key words: Enterovirus, Cell culture, Real-Time PCR

1. GİRİŞ

Santral sinir sistemi (SSS) Enfeksiyonları; menenjit, ensefalit ve ensefalomiyelit ve beyin apselerini de içeren klinik gidişler göstermektedir. SSS enfeksiyonları, hızlı ilerleme göstererek kalıcı nörolojik hasar ve ölümlere yol açabildiğinden tanı ve tedavileri en kısa zamanda yapılmalıdır (Topçu , 2008; Smalling, 2002).

Aseptik menenjit, beyin zarının yangısal bir hastalığıdır. Aseptik menenjitlerde en sık saptanan etken %80-95 oranında enterovirüslerdir (EV). Akut ensefalit beyin parankimi inflamasyonudur ve etken %10-20 oranında enterovirüslerdir (Arısoy, 2008; Romero ve Rotbart, 2003; Romero ve Newland, 2006). Enterovirüslerin etken olduğu SSS enfeksiyonlarının ayırıcı tanısında, diğer viral ve bakteriyel etkenler de araştırılmalıdır.

SSS enfeksiyonlarının ayırıcı tanısında enteroviral enfeksiyonları dışlamak için hızlı ve özgül tanı yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir. (Smalling, Sefers, 2002; Chadwick, 2006; Guney, 2003).

Hücre kültürü, enterovirüs enfeksiyonu tanısında standart yöntemdir. Hücre kültürü ile tanı koyulabilmesi için örnekte yüksek miktarda canlı virüs olması gereklidir. Hücre kültürü yöntemiyle bazı enterovirüs serotipleri saptanamamaktadır.

Enterovirüslerin farklı serotipleri arasında ortak antijenik yapı bulunmadığından immünglobulin düzeyleri değişkenlik gösterebilmektedir, bu nedenle SSS enfeksiyonu tanısında antikor testleri yetersiz kalmaktadır.

Klinik örneklerden enterovirüs RNA araştırılması ile (polimeraz zincir reaksiyonu) enteroviral menenjit tanısı hızlı bir şekilde koyulabilmektedir. Enteroviral menenjitlerin hızlı tanısı, gereksiz antibiyotik veya antiviral kullanımını ve invaziv tanı testlerin yapılmasını önlemede, hastanede yatış süresini kısaltmada, kalıcı sekel ve ölüm oranlarını azaltmada yararlıdır (Smalling ve Sefers, 2002; Romero ve Rotbart, 2003; Sawyer, 2002).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Santral Sinir Sisteminin Viral Enfeksiyonları

SSS'de bakteri, virüs, mantar ve parazit gibi etkenler enfeksiyona yol açabilirler. Enfeksiyonun yeri ve etkenin virulansı SSS enfeksiyonlarının klinik gidişini etkilemektedir: akut veya kronik enfeksiyonlar. SSS enfeksiyonlarında ölüm ve kalıcı sekel oranları yüksektir ve acil müdahale gerekir (Tunkell, 2005).

SSS enfeksiyonlarının özgül belirtileri; enfeksiyonun yayılım patogeneğine, etiyolojik mikroorganizmanın virülansına ve SSS'de etkilenen bölgeye göre değişir. SSS enfeksiyonu olan hastalarda çoğunlukla bilinç değişikliği, baş ağrısı, ateş gibi özgül olmayan semptom ve bulgular bulunur (Tunkell, 2005).

Akut menenjit genellikle ateş, ense sertliği, baş ağrısı ve bilinç değişikliği ile karakterizedir. Virüsler ve bakteriler, akut menenjitin etiyolojisindeki en yaygın etkenlerdir (Tunkell, 2005).

BOS'ta lenfosit hakimiyeti saptanan, kültürde üreme saptanmayan, Gram boyamada etken gösterilemeyen klinik durumlar aseptik menenjit olarak tanımlanır (Tunkell ve Scheld, 2005; Rotbart, 2000). Aseptik menenjitin %80-95 oranında en sık saptanan etkeni enterovirüslerdir. İmmün suprese bireylerde ve çocuklarda enteroviral menenjit daha sık saptanır. Artan yaşla birlikte enteroviral menenjit görülme oranı azalmaktadır. Erişkinlerde de en yaygın aseptik menenjit etkeni enterovirüslerdir. Sıcak iklimlerde yaz/sonbahar dönemlerinde daha çok görülmektedir, bununla beraber tropikal ve yarı tropikal bölgelerde yıl boyunca yüksek insidanslarda görülmektedir.

Akut ensefalit tablosunda, bilinç değişikliği, ateş ve baş ağrısı gibi akut menenjit benzeri semptom ve bulgular görülebilmektedir. Ayrıca dikkat azalması, koma, hareket ve konuşma bozuklukları ve fokal veya hemiparezi gibi diffüz nörolojik bozukluklar da görülebilmektedir (Tunkell, 2005). Ensefalit olgularının çoğunun etiyolojisi saptanamamaktadır ancak enterovirüsler viral ensefalitlerin en yaygın nedenidir. Yaz sonu, sonbahar aylarında sıklıkla görülür. Viral ensefalitlerde klinik özellikler birbirine benzer. Etkenin saptanmasında enfeksiyonun yıl içinde görüldüğü dönem ipucu olabilir (Griffin, 2005). İmmünkompetan bir kişide aynı enteroviral serotipin, tekrar enfeksiyona neden

olmadığı bildirilmektedir (Tunkell ve Scheld, 2005; Rotbart, 2000). Viral ensefalit ve viral menenjitlerde; BOS biyokimyasal ve sitolojik bulguları benzemektedir.

Myelit, spinal kordun enfeksiyonudur, ensefalitle birlikte görülebilir ve bu birlikteliğe ensefalomyelit denilmektedir. Enterovirüslerin etken olduğu poliomyelit; ön boynuz hücrelerini tutan asimetrik flask paralizidir. Diğer SSS Enfeksiyonlarında (subdural ampiyem, beyin absesi, epidural abse, süpüratif intrakraniyal tromboflebit, nörit gibi), sıklıkla etken bakteri veya funguslardır (Griffin, 2005).

Viral Enfeksiyonda BOS lökosit sayısı genellikle 100-1000/mm³ arasındadır. Enfeksiyonun erken dönemlerinde nötrofil hakimiyeti varken ilerleyen dönemlerde lenfosit hakimiyeti vardır. Viral menenjitlerde genellikle BOS proteininde ılımlı artış ve glukoz konsantrasyonunda ılımlı azalma saptanır. BOS glukozu ölçümü ve serum glukozu ölçümü eş zamanlı yapılarak, karşılaştırılmalıdır. BOS/serum glukoz oranının 0.5'den daha düşük olması anormal olarak değerlendirilmelidir. Özgül mikrobiyolojik tanı testleri arasında; viral nükleik asitlerin saptanması, hücre kültürü, antikor ve antijen tayini bulunmaktadır. Bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans gibi çeşitli görüntüleme yöntemlerinden de faydalanılmaktadır (Tunkell, 2005; Tunkell ve Scheld, 2005; Sayiner, 2005).

2.2. Enterovirüsler

2.2.1. Tarihçe

Enterovirüs ailesi üyelerinden poliovirüslerin etken olduğu poliomyelitin eski çağlardan beri görüldüğü düşünülmektedir. Poliomyelit, 1800'lü yıllarda, ateş ve paralizi bulguları saptanan bir olguda, ilk kez klinik olarak tanımlanmıştır. Heine (1840) ve Medin'in (1891) yaptığı çalışmalar nedeniyle, paralitik poliomyelit, *Heine-Medin hastalığı* olarak isimlendirilmiştir. Wickman, 1900'lü yılların başında, poliomyelitin bulaş yollarını ve enfeksiyonun patogenezi tanımlamıştır. Bodian, nötralizasyon testleri ile 1949'da Poliovirusun üç serotipe sahip olduğunu göstermiştir. Poliovirusun nöral doku dışında, insan embriyonik doku kültürlerinde üretilebileceği Enders ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. 1955'de, Bodian, virüsün oral yol ile vücuda girdiğini ve vireminin ardından SSS enfeksiyonunun geliştiğini belirtmiştir. Tüm bu araştırmalar aşı çalışmaları için dayanak oluşturmıştır. Salk, 1955 yılında inaktif polio asısını; Sabin ise 1961-1962 yılları arasında

canlı attenüe aşısını üretmek ABD’de lisans almıştır (Pallansch ve Roos, 2007; Zeichhardt ve Grunert, 2000; Jubelt, 2014).

1948 yılında, New York’taki poliomyelit epidemisinde paralizili çocukların dışkılarından ilk kez Cocksackievirus A izole edilmiştir. Cocksackievirus B ise, ilk kez 1949’da aseptik menenjitli bir olguda izole edilmiştir. 1951 yılında ilk defa asemptomatik bireylerin dışkılarından echoviruslar izole edilmiştir. İlk zamanlarda echovirüslerin insanda hastalık yapmadıkları düşünüldüğünden “orphan” (öksüz) virüs olarak tanımlanmıştır. İlerleyen zamanlarda echovirüslerin insanda hastalık etkeni olduğu gösterilmiştir ve enterik sitopatik etki gösterdiklerinden bu virüslere “echo” (Enteric Cytopathic Human Orphan) adı verilmiştir (Pallansch ve Roos, 2007; Karahasan, 2008).

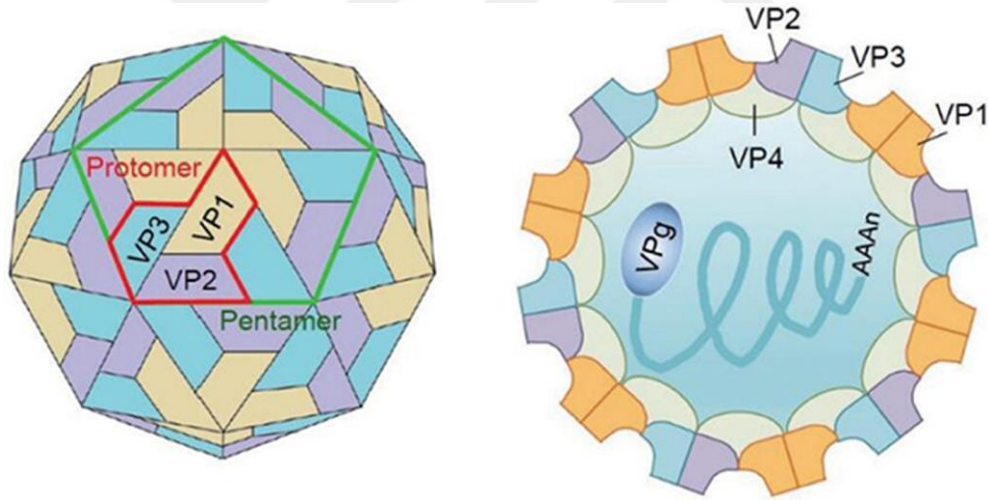
2.2.2. Sınıflandırma

Enterovirüsler *Picornaviridae* ailesi içinde yer alırlar ve 180 civarında serotipleri bulunmaktadır. *Picornaviridae* ailesi toplam 47 cinsten oluşmaktadır. Enterovirüs cinsi içinde 15 tür bulunur (Virüs Taksonomi komitesi, 2018). Önceden enterovirüs cinsinin üyesi olan enterovirüs 72’nin adı, hepatovirus A olarak değiştirilip yeni bir cins olan hepatovirus içine alınmıştır.

Enterovirüslerin geleneksel taksonomik gruplaması, hayvanlarda oluşturdukları hastalıklar ve hücre kültürlerinde her serotipin oluşturduğu replikasyon paterni temel alınarak yapılır. Polioviruslar, insan ve maymun kaynaklı hücrelerde çok iyi üremektedir. Cocksackievirus A, süt emen farelerde üreyebilirken insan dokularından veya maymundan elde edilmiş hücre kültürlerinde kolayca üremez. Cocksackievirus B, hem süt emen farelerde hemde insan ve maymun kaynaklı hücre kültüründe kolayca ürer. Echovirus, insan kaynaklı hücrelerde değişken, maymun kaynaklı hücre kültürlerinde ise çok iyi üremektedir. Yeni hücre dizilerinin ve yeni kökenlerin tanımlanması enterovirüslerin üreme özelliklerinin çakışmasına neden olduğundan yeni serotipler numaralandırılmıştır (EV68 - EV71) (Romero ve Rotbart, 2003). Modern moleküler virolojinin gelişimiyle enterovirüslerin sınıflaması yeniden değerlendirilmiştir. Major kapsit proteini olan VP1’i kodlayan genin dizi analizi ile yapılan filogenetik analizler enterovirüs sınıflamasında yararlı olmuştur. Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi’nin 2018 yılı raporunda enterovirüsler; Enterovirüs A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L ve Rhinovirüs A, B, C olmak üzere 15 tür içinde sınıflandırılmıştır.

Kapsidin bir kısmı çok değişken bölgelere sahiptir; bu durum enterovirüslerin yüksek antijenik çeşitliliğini açıklar. Çoğu enterovirüs, her beş katlı simetri eksenini çevreleyen derin, dairesel bir yüzey çöküntüsü veya kanyona sahiptir. Bu çukur bölgeler genellikle reseptör bağlanma bölgesi olarak görev yapar (Rossmann, 2002).

Picornaviridae ailesinin insanda hastalık yapan üyelerinin birçoğunun, yapısı çözümlenmiş ve enterovirüsler ile rhinovirusların korunmuş yapısal motifleri paylaştığı gösterilmiştir. Kapsit yüzeyinde her pentamerik birimin beşli ekseninde korunmuş çıkıntıyı dar ve derin bir yarık veya kanyon çevreler. Virüsün bu bölgeleri, duyarlı konak hücrenin enterovirüs için özgül olan reseptörlerine bağlanır. Kapsitte hemen her bir protomerin kanyon parçası altında, VP1'in 'beta-barrel' yapısı ile hidrofobik cep yapı biçimlenir. Hidrofobik cepte bulunan lipitler, reseptör bağımlı yapısal değişikliklerde ve kapsitten RNA'nın çıkmasında kritik rol oynar. Bazı antipicornaviral maddelerin hidrofobik cepteki lipiti çıkarıp, buraya sıkıca bağlanarak ve infektiviteyi engellediğı bildirilmiştir (Romero ve Rotbart, 2003; Zeichhardt ve Racaniello, 2007).



Şekil 2. Picornavirus Yapısal Proteinleri (Yuan, 2018)

2.2.3.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Tüm enterovirüsler çeşitli proteolitik enzimlere ve düşük pH'ya (pH:3) dirençli olmaları nedeniyle mide ve duodenumdan geçebilir. Buna karşın rinovirüs türlerinin pH'ı 5-6'nın altında dayanıksızdır. Bazen enterovirüslerde küçük bir oranda (popülasyonun

yaklaşık% 1'i) ağır partiküller (yoğunluk: 1.43 g cm⁻³) gözlenebilir. Boş kapsidler, virüs preparatlarında sıklıkla gözlenir ([International Committee on Taxonomy of Viruses \(ICTV\)](#)).

Enterovirüsler zarfsız olmaları nedeniyle lipid çözücü deterjanlara, eter, deoksikolat, kloroforma dirençlidir. Ayrıca %70 alkol, %5 lizol ve %1kuarterner amonyum bileşikleri ile inaktivasyona dirençlidir (Zeichhardt ve Grunert, 2000). Enterovirüsler formaldehit (%0.3), klor (0.3-0.5 ppm), diğer halojenler (brom veya iyot 0.5 ppm 10 dakika), kuruluk, sıcaklık (magnezyum klorid yokluğunda 1 saat 50°C'de), pastörizasyon ve ultraviyole ışını ile inaktive olurlar. Titrede azalma olmakla birlikte 4°C'de genellikle haftalarca, -20°C'de aylarca, -70°C'de saklandığında yıllarca stabil kalabilirler (Romero ve Rotbart, 2003; Pallansch ve Roos, 2007; Zeichhardt ve Grunert, 2000).

Picornavirüslerin konakçı aralığı ve doku tropizmi oldukça çeşitlidir ancak gen ekspresyonunun stratejisi ve virus yapıları benzerdir. Picornavirüsler , 22–30 nm çapında, küresel yapıda, zarfsız virüslerdir. Virion bir protein kılıf/ kapsid ile çevrili RNA içerir. X-ray kristalografik çözünürlüğüne bakıldığında viryonların ikosahedral simetriye sahip olduğu anlaşılmıştır. Protein kapsid 60 alt üiteden (protomer) oluşur. EV genomu, tek zincirli yaklaşık 7400 nükleotitten (nt) oluşan bir RNA molekülüdür. Genomun gerçek boyutu farklı poliovirüs ve coxsackievirüsler incelendiğinde 7389 ile 7441 nt arasında değişmektedir. Genomik RNA'nın moleküler ağırlığı 2.58 10⁶ Da'dur. Tüm picornavirusların genomunda 5' ucuna kovalent olarak bağlanmış küçük bir bazik protein (VPg) bulunur. Genomun 3'ucunda ise değişken uzunlukta poliadenilatlanmış kuyruk (poli A kuyruğu) bulunur. Virion ağırlığının % 30'unu RNA, ve % 70'ini protein kılıf oluşturur. RNA hibridizasyon çalışmaları ve dizi analizi çalışmalarına göre enterovirus turlaeri arasında ortalama % 50 özdeşlik saptanmıştır (Jubelt, 2014).

Kapsid, dört viral proteinden (VP) oluşur, VP'ler SDS poliakrilamid jelde hareketlilikleri esas alındığında, molekül ağırlıkların azalan sıralamasına göre VP1 (1D), VP2 (1B), VP3 (1C) ve VP4 (1A) olarak adlandırılır.. Parantez içindeki VP sıralaması genomdaki konumları esas alınarak hazırlanmış standart bir isimlendirmedir (Rueckert ve Wimmer, 1984). Picornavirüsler tipik olarak VPO (1AB) adında beşinci bir protein içerirler. VPO kesilerek VP2 (1B) ve VP4 (1A)'yı oluşturur. Dört ana viryon proteini, protomerler olarak adlandırılan 60 kapsid alt biriminden oluşur (Rueckert, 1976). Her protomerin bölümleri VP1, 2 ve 3, viryon yüzeyindedirler. VP4 ise (1A), RNA ile yakın ilişki içinde olup viriyon yüzeyinin altına gömülüdür.

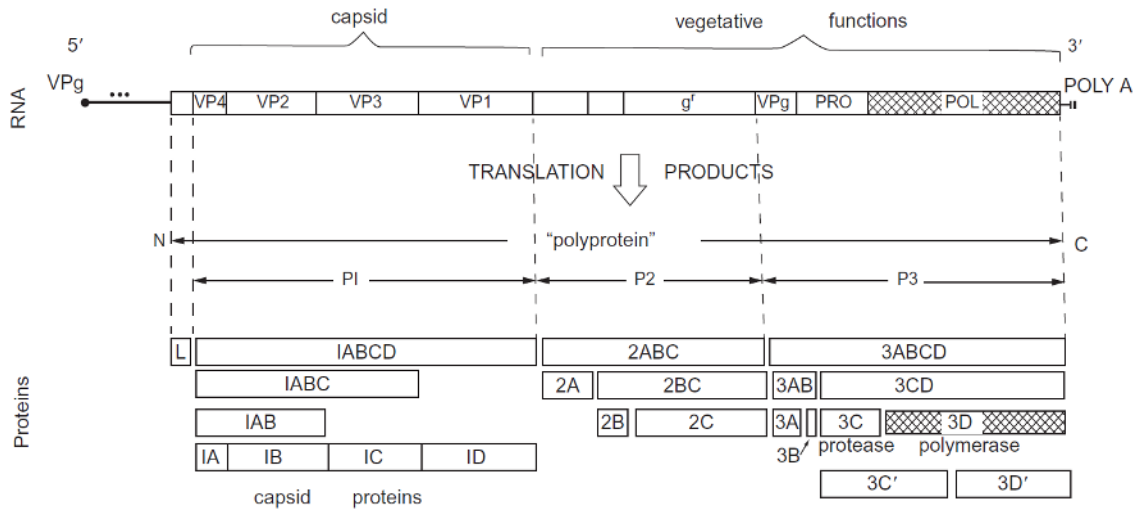
2.2.3.3. Genomik Yapısı

Enterovirüs genomu 7,100-7,450 nt'den (5'-NTR“ nontranslated region”;; 610-822 nt; ORF: 6,417-6,645 nt; 3'-NTR: 37-99 nt) oluşur. Genom, tip I IRES içerir ve poli (C) kanal içermez. 2C (EV-A virüsleri, EV-B, EV-C ve EV-D virüsleri), 2A (RV-A virüsleri), 1D (RV-B virüsleri), 1B (EV-C virüsleri) virüsleri; CRE (cis-acting replication element) içerir. Enterovirüsler ve rinovirüsler arasındaki nt dizilerinde ortalama % 50 oranında benzerlik vardır. İnsan rinovirüslerinin 5'-NTR'si, IRES ve çeviri başlangıç bölgesi arasında yaklaşık 100 nt'lik bir eksiklik nedeniyle enterovirüslerden yaklaşık 650 nt daha kısadır (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)).

Enterovirüs RNA genomu viral protein translasyonu ve RNA replikasyonun her ikisi için kalıp görevini yerine getirir. Yaklaşık 740 nükleotit uzunluğunda kodlama yapmayan ve korunmuş bölgenin (5' NTR) hemen devamında tek bir protein kodlayan bölge olan açık okuma çerçevesi (“Openreading frame”; ORF) yer alır. ORF, 5' ucunda yaklaşık 740. nükleotitten başlayıp yaklaşık 7370. nükleotitte bitmektedir. ORF, P1, P2 ve P3 olmak üzere üç bölgeye ayrılır. P1 bölgesi, dört yapısal viral kapsit proteinini kodlar (VP1- VP4). Bu bölgeler 5' ucundan 3' ucuna sırasıyla VP4 (1A), VP2 (1B), VP3 (1C), VP1 (1D) olarak yerleşmiştir. P2 ve P3 bölgeleri ise yapısal olmayan viral yaşam döngüsü için gerekli olan yedi proteini kodlar. Bu bölgeler 5' ucundan 3' ucuna sırasıyla 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C ve 3D olarak yerleşmiştir. ORF translasyonu ile oluşan tek bir poliprotein virüsün sentezlediği proteazlar tarafından 11 proteine parçalanır. ORF devamında, yaklaşık 70-100 bazlık kodlama yapmayan bölge (3' NTR) ve terminal poliadenilat kuyruğu bulunur. Poliadenilat kuyruğu olmayan viral RNA enfeksiyöz değildir (Romero ve Rotbart, 2003; Racaniello, 2007).

Enterovirüs yaşam döngüsü için 5' NTR ve 3' NTR bölgeleri önemli rol oynarlar. 5' NTR'nin 5' uç bölgesi viral RNA replikasyonu için zorunludur. Bu bölge genom replikasyonunu ve translasyonunu kontrol eder. Viral RNA, replikasyon için gereken tüm viral proteinleri hücre içine girdiğinde sentezleyebildiği için enfeksiyözüdür. 5' ucuna kovalant olarak bağlanmış olan VPg (viral protein ilişkili genom) bölgesi, viral RNA sentezini başlatır. 5' NTR'deki iç ribozom giriş bölgesi (“internal ribosome entry site”; IRES), enterovirüs genomunun translasyonunu düzenler. IRES, 5' NTR'de 743. pozisyonda AUG translasyon kodonun başında yonca yaprağına benzer ikincil yapıdır. Enterovirüslerin 5' NTR bölgesi, özgül hücre tipi, konak dağılımı ve fenotipik virulans belirleyicisidir. Bu

çok önemli fonksiyonların kontrol edildiği 5' NTR bölgesinin nükleotit dizileri enterovirüsler arasında tam veya tama yakın korunmuştur. Bu nedenle 5' NTR bölgesi, enterovirüs saptanmasında kullanılan RT-PZR yöntemlerinde primer ve problemlerin tasarlanmasında kullanılır. Aynı zamanda 3' NTR bölgesinin de viral replikasyonda rol oynadığı gösterilmiştir. Bu bölgede yalancı düğüm (pseudoknot) denilen ikincil bir yapı bulundurulur ve RNA sentezinin kontrolünde yer alır. Picornaviruslar arasında korunmuş olan bu bölge (pseudoknot), 3D gen bölgesi ile birlikte kopyalamanın özgüllüğünde önemli rol oynamaktadır. "pseudoknot" yapısındaki mutasyonlar RNA sentezinin bozulmasına neden olur (Romero ve Rotbart, 2003; Zeichhardt ve Grunert, 2000; Racaniello, 2007).



Şekil 3. Picornavirus Genomu Şeması Enterovirus (Jubelt, 2014)

2.2.3.4. Replikasyon

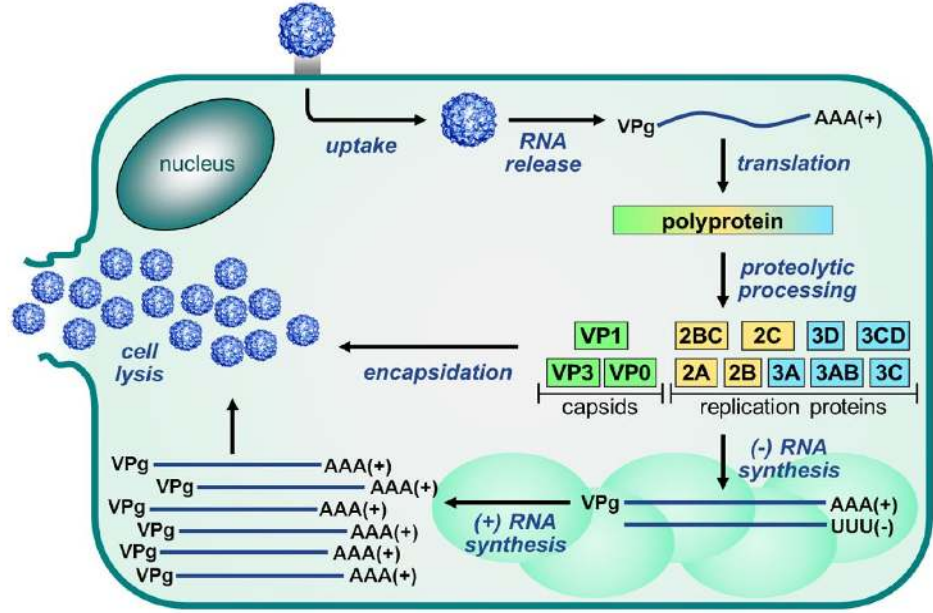
Picornavirus replikasyonu, reseptöre bağlanma, konakçı hücre içine giriş, translasyon, transkripsiyon/genom replikasyonu, virüsün oluşması ve hücreden çıkış basamaklarından oluşur. Picornavirusların replikasyonu hücre sitoplazmasında gerçekleşir.

Virüs hücre reseptörlerine bağlanmasının ardından hücre içine girer. Picornavirusların hücre içine girişi ile ilgili üç farklı teorik model vardır. 1) Virüsün hücre reseptörüne bağlanması sonucunda reseptör aracılı yapısal değişimler meydana gelir ve virüs partikülü değişime uğrar; normalde kapsitin iç tarafında yer alan VP1'in N ucu, kapsitin içinden dış yüzeye doğru hareket eder, VP4'ler kapsitten ayrılır. Viral RNA plazma membranından

hücre içine salınır. 2) Virüs partikülü reseptör aracılı endositozis ile endozom içinde hücreye alınır. pH bağımlı asidifikasyon yolu ile kapsitten viral RNA çıkıp endozom porlarından hücre içine salınır. 3) Poliovirus reseptörü (PVR) hidrofobik cebin üst kısmından kapsit kanyonuna bağlanır. Viral RNA hidrofobik cepten çıkar. Daha sonra VP1 proteininin N ucu (amino ucu), tarafından hücre zarında por açılarak viral RNA'nın hücre içine geçisi gerçekleşir (Racaniello, 2007).

Viral RNA'nın sitoplazma içine girmesiyle genom replikasyonu için gerekli olan viral proteinler ve viriyonun yapısal proteinlerinin sentezi ve pozitif sarmal RNA oluşmaya başlar. Viral genom sitoplazmaya girdiğinde VPg, bir hücre enzimi ile 5' ucundan çıkarılır ve IRES ile 40S ribozomal altbirime bağlanmasıyla protein sentezi başlar. Oluşan poliprotein viral proteinazlar tarafından P1, P2 ve P3 proteinlerine kesilir. Kapsit proteinlerinin öncülü olan P1 proteini parçalanıp; VP0 (VP4 ve VP2 öncülü), VP3 ve VP1 oluşur. P2 ve P3 proteinleri de farklı işlevdeki protein parçacıklarına parçalanır (Racaniello, 2007; Carter ve Saunders, 2007; Stanway, 2000) .

Genom replikasyonu sırasında öncelikle, endoplazmik retikulumdan oluşmuş küçük membran veziküllerinde viral RNA polimeraz ile pozitif sarmallı RNA'dan negatif sarmallı RNA oluşur. Bu negatif sarmallı RNA'lardan yeni pozitif sarmallı RNA'lar oluşur. VPg proteini negatif ve pozitif sarmallı RNA sentezi için primer görevi üstlenir. Pozitif sarmallı RNA'ların bir kısmı translasyona girip viral proteinleri sentezler. Kapsit proteinleri, yeterince çoğaldığı andan itibaren, pozitif sarmal RNA'lar kapsitlenmeye (kapsitle paketlenmeye) başlar. Yeni sentezlenen virüs partikülleri yaklaşık 105 virion olduğunda hücrenin lizisi ile serbest kalır (Racaniello, 2007; Carter ve Saunders, 2007) .



Şekil 4. Enterovirüslerde Replikasyon (Linden, 2015)

2.2.3.5. Patogenez

Enterovirüslerin ortalama inkübasyon süresi 7-14 gündür. Poliovirusun patogenezini enterovirüsler için bir örnek teşkil edebilir. Poliovirüsler motor nöronlara tropizm gösterirler ayrıca CD155 reseptörü olan hücreleri de enfekte edebilirler. Poliovirus bağırsak epitel hücrelerini, medulla spinalisin ön boynuz hücrelerini, arka kök ganglionlarını, motor nöronları, iskelet kas hücrelerini enfekte edebilen, bir virüstür. NPEV'ler için bağırsaklar dışında SSS'de, meninkslerde, çizgili kaslarda, gözde, kalpte, pankreasta, solunum yollarında ve deride reseptörler bulunur. Bu nedenle farklı hedef organları etkileyip hastalıklar oluşturabilirler. Enterovirüslerin çoğu sitoliz yapar, hızla replike olur ve hedef hücrede hasar oluşturlar (Pallansch ve Roos, 2007; Zeichhardt ve Grunert, 2000; Karahasan, 2008).

Enterovirüsler mide asiditesine dirençlidirler. Virüs replikasyonu için ince bağırsaklar için uygun bir ortamdır. Enterovirüsler, derin servikal ve mezenterik dokularda çoğalırlar. Solunum sekresyonları ve dışkı ile vücuttan atılırlar. Enterovirüsler uzun süre dışkı ile vücuttan dışarı atılabilir. Bu süre bireyin bağışıklık durumundan etkilenebilir ve altı haftadan daha uzun olabilir. Virüs, ilk olarak çoğaldığı Peyer plakları ve tonsiller gibi mukozal lenfoid

dokularda genellikle 1-3 gün içinde saptanabilir. Sonrasında minör viremiyle dalak, karaciğer, kemik iliği, lenf nodları gibi retiküloendotelial sistemin (RES) invazyonuna yol açar. Viremik faz tüm enfeksiyonların %25'inde gerçekleşir fakat virüs yükü çok düşük ve geçicidir. Santral sinir sistemi bu evrede enfekte olabilir fakat santral sinir sistemi enfeksiyonunun major viremiyle yani virüsün RES dokularında çoğalması sonrası ortaya çıkması daha olasıdır. Birçok bireyde enfeksiyon major viremiden önce genellikle asemptomatik olarak sonlanır. Poliovirusun SSS'ne girişi hakkında uzun süredir devam eden tartışmalar bulunmaktadır. Paralitik poliomyelit viremiyi takiben ortaya çıktığı ve nötralizan antikorların poliomyelit gelişimini önlediği bilgisii SSS yayılımında vireminin önemini göstermektedir. CD155 transgenik farelerden (insan CD155 reseptör geni taşıyan fareler) elde edilen veriler, poliovirusun, kan beyin bariyerinden geçebildiğini göstermektedir. Virüsün SSS'ne girişi için viremi kritik gözükmesine rağmen epidemiyolojik bulgular ve deneysel çalışmalarla poliovirusun, periferik veya kranial sinirlerden muhtemelen retrograd aksonal yol ile SSS'ne yayılabildiği de düşünülür. SSS'de virüs replikasyonu ile motor nöron hasarı ve bunu takip eden paralizi gelişir (Pallansch ve Roos, 2007; Karahasan, 2008).

2.2.3.6. Reseptörler

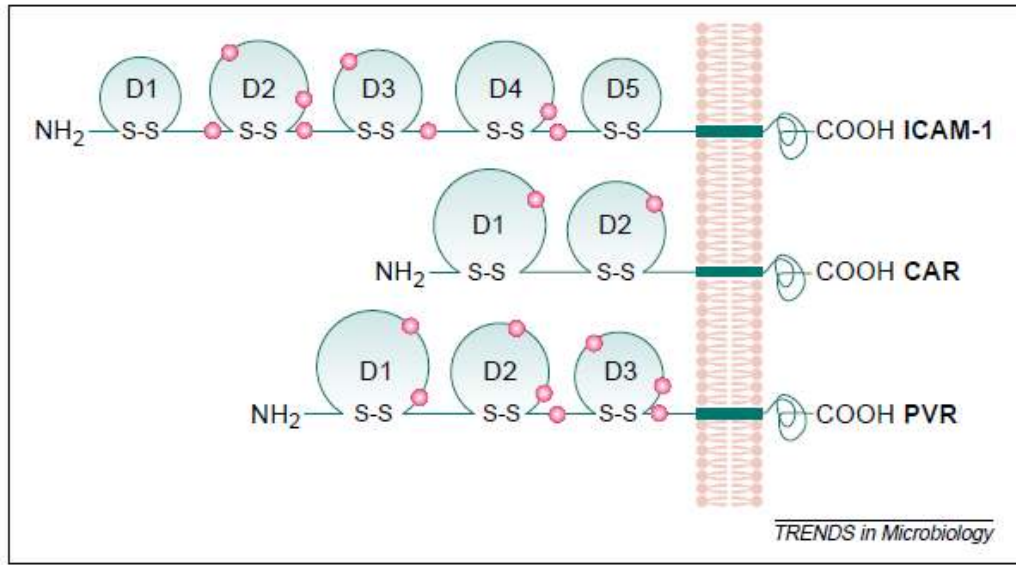
Çoğu hayvan ve bakteri virüsleri, enfeksiyonu başlatmak için spesifik hücre yüzeyi molekülleri kullanır. Hücre tipleri belirli reseptör molekülleri taşır. Bu nedenle virusün hücre tropizmini sınırlanır ayrıca hücre yüzey reseptörlerinin farklı türler arasında değişmesi, virüsün konak aralığını sınırlar. Virüsler, proteinler, karbonhidratlar ve glikolipidler içeren reseptörler olmak üzere çok çeşitli molekülleri kullanacak şekilde gelişmiştir (Evans, 1998).

Rinovirüs ve enterovirüslerin kapsidini oluşturan pentamerik yapının etrafını çevreleyen büyük (~ 12 Å derin ve ~ 15 Å genişliğinde) girinti veya “kanyon” yapıları bulunur. Kanyonda bulunan reseptör yapışma bölgesinin daha fazla korunmuş amino asit kalıntısı içerdiği, nötralize edici antikorların daha büyük kesitleri olması nedeniyle kanyonun içine nüfuz edememesiyle konakçı bağışıklık yanıtından korunmada önemli olduğu ileri sürülmüştür (Rossman ve Arnold, 1985)

EV'lerin reseptörleri, immünglobulin süper ailesi veya integrinler gibi reseptör ailelerinin üyesidir. İnsan hücrelerinde, farklı enterovirüsler için yedi farklı reseptör

tanımlanmıştır. Bu reseptörler; poliovirus reseptör (PVR; CD155), üç ayrı integrin ($\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$ ve $\alpha\beta 6$), ayrılmayı kolaylaştırıcı faktör (“decay accelerating factor”; DAF; CD55), coxsackievirus adenovirus reseptör (CAR) ve interselüler adezyon molekülü’dir (“intercellular adhesion molecule1”; ICAM-1). Bazı enterovirüsler birden fazla reseptör kullanabilirler ve henüz tanımlanmamış reseptörler de olabilir (Zeichhardt ve Grunert, 2000; Palacios ve Oberste , 2005).

Rhinovirüslerin çoğu ücreler arası adezyon molekül-1 (ICAM-1 veya CD54) reseptörlerine, coxsackievirus A21 (CAV21) ICAM-1 reseptörüne; coxsackievirus B3 (CVB3) coxsackievirus-adenovirüs reseptörüne (CAR) ve poliovirüs (PV) topoliovirüs (PVR veya CD155) reseptörüne bağlanırlar. Bu reseptörlerin tümü, bir dizi immünooglobulin süper aile biriminden (IgSF) oluşan, benzer bir yapıya sahiptirler. Bu reseptörler kanyon içine uzanarak bağlanan amino-terminal ucu ile hücre plasma membranına bağlanan stoplazmik ucu içerirler (Rossmann ve Yongning, 2002).



Şekil 5. Hücre Yüzeyindeki Bazı Enterovirüs Reseptör Yapıları (Rossmann ve Yongning, 2002)

Tablo 1: Enterovirüslerin konak hücre yüzeyindeki reseptörleri (Rossmann ve Yongning, 2002)

Major-grup HRV (90 serotip)	ICAM-1
Minor-grup HRV (10 serotip)	LDL-R
PV (3 serotip)	PVR
CVB (6 serotip)	CAR, DAF
CAV21	ICAM-1
CAV9 $\alpha\upsilon\beta 3$	integrin
ECHO (10+ serotip)	DAF
ECHO (serotip 1 and 8)	VLA-2 ($\alpha 2\beta 1$ integrin)
HAV	HAVcr-1
FMDV (7 serotypes)	$\alpha\upsilon\beta 3$ and $\alpha\upsilon\beta 6$ integrin, heparan sülfat
Theiler	Sialik asid

2.2.3.7. İmmün Cevap

Enterovirüs enfeksiyonlarında sıvısal ve salgısal antikorlar önemli rol oynamaktadır. EV enfeksiyonları konakçıdan, esas olarak sıvısal immünite yolu ile temizlenir. Hücresel immünite ise iyi tanımlanamamıştır. Konjenital veya edinilmiş immün yetmezlik nedeni ile antikor eksikliği olan kişiler EV Enfeksiyonlarına karşı duyarlıdırlar. Benzer şekilde sağlıklı yenidoğanlar da antikor eksikliğinden dolayı, EV enfeksiyonlarına karşı duyarlıdır (Zeichhardt ve Grunert, 2000; Rotbart, 2002).

Tip özgül IgG, IgM, IgA antikorları ile sıvısal immünite hedef organlara virüsün kan yoluyla yayılımını önler. İlk olarak IgM ortaya çıkar (7-10. günler). Virüse özgül IgG ve IgA, IgM'den birkaç gün sonra görülür. IgM'ler yaklaşık 60 gün içinde kaybolur. IgG'ler ise yaşam boyu tipe özgül bağışıklık sağlar. Yaşamın ilk dönemlerinde, enterovirüs immün anneden doğan bebeği, transplasental yolla geçen virüs özgül IgG antikorları korur (Zeichhardt ve Grunert, 2000; Karahasan, 2008).

2.2.4. Epidemiyoloji

2.2.4.1. Bulaşma Yolları

İnsan enterovirüsleri çevresel kaynaklardan izole edilebilmektedirler ancak insanlar bilinen tek rezervuarıdır (Pallansch, Roos, 2007; Zeichhardt, Grunert, 2000). Fekal oral ve solunum yolu ile bulaş enterovirüsler için en önemli bulaş yollarıdır. Gelişmiş bölgelerde solunum yolu ile bulaş daha etkin iken sağlık koşulları kötü olan bölgelerde fekal-oral yol ile bulaş öne çıkmaktadır. Solunum ve oküler sekresyonlar (enterovirüs 70 ve coxsackievirus 24), damlacık, veziküler sıvı ve objelerle temas, kontamine su, yüzme havuzu, kontamine gıda ayrıca transplental, perinatal yol ile bulaş olabilmektedir. Aile içi geçiş; aile fertlerinin ve kardeşlerin sayısı, aile fertlerinin immün durumu, sosyo- ekonomik durum, virüs salınımının süresi ve diğer faktörlere bağlı olarak değişebilir (Pallansch, Roos, 2007; Zeichhardt, Grunert, 2000; Romero, 2008). Kontamine ellerle, ağız, burun ve göze otoinoküle olabilir (enterovirüs 70 ve coxsackievirus 24). Kan transfüzyonu, böcek ve sivrisinek ısırıkları ile virus geçişi olmaz. Laboratuvar kazaları ile direkt kana inoküle olabilir. Ayrıca yenidoğan odalarında çeşitli coxsackievirus A, B ve echoviruslarla nozokomiyal enfeksiyonlar gösterilmiştir. Bu bulaşların hastane görevlilerinin aracılığı ile olabildiği gösterilmiştir (Pallansch ve Roos, 2007; Zeichhardt ve Grunert, 2000). CNS enfeksiyonu, Poliovirüsün ve diğer EV'lerin neden olduğu enterik enfeksiyonların bir komplikasyonudur. Fekal-el-oral veya daha az yaygın olarak, orofarengeal –oral yoldan bulaş meydana gelir, orofarinks ve bağırsak hücrelerde çoğalır. Ayrıca bazı coxsackievirus ve echovirusler solunum yoluyla (aerosoller) bulaşabilir. Solunum yolu yoluyla bulaşta genellikle üst solunum yolu enfeksiyonu gelişir , ancak bronşit ve / veya pnömoni gelişebilir. EV-70 genellikle kirlenmiş ellerle göze dokunulmasıyla konjonktivite neden olur. Kuluçka süresi tablolara göre değişir, konjonktivit için en kısa 12–24 saat, üst solunum yolu enfeksiyonları ve gastroenterit 2-3 gün, sistemik minör enfeksiyonlarda için kuluçka dönemi genellikle 1 ila 3 gündür ve nadiren 4 ila 5 günden fazladır. CNS'nin katılımı çocuk felci veya diğer EV enfeksiyonlarında genellikle 7 ila 21 gün içinde görülür (5 - 35 gün maksimum) (Jubelt, 2014).

2.2.4.2. Enterovirüs Enfeksiyonları Epidemiyolojisi

Enterovirüsler tüm Dünya’da yaygın olarak bulunan önemli insan virüsleri arasındadır. Enterovirüslerin çoğu 1948 ile 1963 yılları arasında yapılan çalışmalarla belirlenmişlerdir. 1960’ların başında poliovirus aşılarının onay almasıyla Dünya’nın pek çok yerinde poliovirus enfeksiyonları eradike edilmiştir. Poliovirus enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasıyla NPEV enfeksiyonlarına odaklanılmıştır. Enterovirüslerin ABD’de yılda 50 milyon ve dünya çapında ise yıllık yaklaşık bir milyar veya daha fazla sayıda insanı infekte ettiği tahmin edilmektedir (Romero ve Rotbart, 2003; Zeichhardt ve Grunert, 2000; Palacios, Oberste , 2005).

Enterovirüs enfeksiyonlarının özellikle yaz ve sonbahar aylarında mevsimsel artışı görülmekle birlikte serotipler arasında mevsimsel farklılıklar bulunabilir. Tropik ve yarı tropik bölgelerde ise tüm yıl boyunca görülebilir (Romero ve Rotbart, 2003; Zeichhardt ve Grunert, 2000; Romero, 2008; Koskiniemi , 1991).

Düşük sosyo ekonomik düzeye sahip kişiler yüksek sosyo ekonomik düzeye sahip olan kişilere göre enterovirüs enfeksiyonlarına daha sık ve daha yüksek insidansta maruz kalırlar. Ayrıca erkeklerde kadınlardan daha sık (1.5-2.5:1) görüldüğü bildirilmiştir (Zeichhardt ve Grunert, 2000).

Enterovirüs enfeksiyonları genellikle küçük çocuklarda görülür. İlk hastalık yaşı, kötü sağlık koşulları ve düşük sosyo ekonomik düzeye bağlı olarak düşer. Hastalığın şiddeti ise yaşla birlikte artar. Yetişkinlerde poliomyelite gidis çocuklardan daha muhtemeldir (Zeichhardt ve Grunert, 2000).

Enterovirüsler endemik veya epidemik salgınlar şeklinde görülebilir. Tek bir serotipin neden olduğu salgınlar sıklıkla bildirilmiştir ve önemli bir halk sağlığı sorunudur. (Guney, 2003; Zeichhardt ve Grunert, 2000).

Toplumda baskın olarak saptanan enterovirüs serotipleri yıldan yıla farklılık göstermektedir. ABD’de 1997-2001 yılları arasında en sık rastlanan NPEV serotipleri sırasıyla echovirus 30, 18, 13, 11, 6, coxsackievirus B5, echovirus 9, coxsackievirus B2, A9, B3, B4, B1’dir (Romero, 2008).

Poliovirus aşısının başarılı şekilde uygulanması ile vahşi (yaban) tip poliovirusların yaptığı poliomyelit hastalığı eradike edilmek üzeredir. Tüm Dünya’da yürütülmekte olan polio eradikasyon programının (PEP) sonuçlarından biri olarak 2002 yılı itibari ile yaban Poliovirus tip 2 tüm Dünya’dan yok edilmiş durumdadır (Özkaya, 2007).

Ülkemizde enteroviral Enfeksiyonlar sıklıkla yaz ve sonbahar aylarında görülür. Ülkemizde PEP uygulaması 1989 yılında baslatılmıştır. En son 1998 yılında çoğunluğunda yaban tip 1 poliovirusun izole edildiği 24 poliomyelit olgusu görülmüştür. Yaban tip 1 poliovirus enfeksiyonunun en son olgusu Kasım 1998 yılında Ağrı’da saptanmıştır. Türkiye, Avrupa bölgesindeki 51 ülke ile birlikte Haziran 2002 tarihinde polio olgusu bulunmayan bölge olarak WHO tarafından belgelendirilmiştir (Özkaya, 2007).

NPEV enfeksiyonlarından ise 1999 yılında Ankara ve Antalya’da 86 hastanın BOSve/veya dışkı örneklerinden viral kültür ile echovirus 30’un neden olduğu aseptik menenjit salgını bildirilmiştir (Özkaya, 2003).

2.2.5. Enterovirüs Enfeksiyonları

Enterovirüsler farklı organları etkileyerek farklı hastalıklara neden olur ve bu enfeksiyonların çoğu asemptomatik olarak geçirilir. Bu hastalıklar arasında üst solunum yolu hastalıkları (soğuk algınlığı), atesli döküntü (el ayak ağız hastalığı ve herpanjina), aseptik menenjit, plörodini, ensefalit, akut flask paralizi (paralitik polimiyelit) ve neonatal sepsis bulunur.

Aseptik menenjit, enterovirüslerin neden olduğu medikal bakım gerektiren en yaygın klinik durumdur. Bir serotip tek bir hastalıkla ilişkili olmadığı gibi bir hastalığa birden çok enterovirüs serotipi neden olabilmektedir. Bu nedenle genellikle enterovirüsün hangi serotipinin etken olduğunu belirlemek gereksizdir. Bu akut hastalıklara ek olarak enterovirüsler ağır kronik hastalıklarla da ilişkilidir ki bunlar arasında myokardit, dilate kardiyomyopati, tip 1 diabetes mellitus ve nöromusküler hastalıklar bulunmaktadır (Romero ve Rotbart, 2003; Pallansch ve Roos, 2007; Palacios ve Oberste, 2005).

2.2.5.1. Asemptomatik Enfeksiyon

Enterovirüs enfeksiyonları yaygın enfeksiyonlardır ve en sık ılımlı veya subklinik formda görülürler. Poliovirus enfeksiyonlarının %90-95’i asemptomatik geçirilirken sadece %0.1-1’i paralitik poliomyelit ile sonuçlanmaktadır. Echovirus ve coxsackieviruslar ile de asemptomatik enfeksiyonlar görülebilmektedir. Bağırsak epitel hücrelerinin hızlı yenilenmesinden dolayı enfeksiyon sırasında hücrelerin lizisi, klinik tablo oluşturmaz.

Klinik semptomlar intestinal sistem epitelinin büyük oranda etkilenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (Zeichhardt ve Grunert, 2000).

2.2.5.2. Menenjit ve Ensefalit

Gelişmiş olan ülkelerde enterovirüs hem çocuklarda hem de yetişkinlerde aseptik menenjitin en bilinen nedenidir. Aseptik menenjitli olguların %80 ile %95'inde enterovirüsler tanımlanmıştır. Sıcak bölgelerde yaz ve sonbahar aylarında görülen aseptik menenjitte etken olarak enterovirüslerden şüphelenilmelidir. Echovirus 4, 6, 7, 13, 18, 30, coxsackievirus B2, B3, B5, B6 ve enterovirüs 71 gibi viral menenjit etkeni enterovirüs serotiplerinin dünyanın farklı bölgelerindeki sporadik olgular ve salgınlarda devamlı dolaştığı gözlenmektedir (Pallansch ve Roos, 2007; Santos, 2006).

Baslangıçta ateşin de içinde bulunduğu genel semptomların ardından baş ağrısı Kernig ve Brudzinski gibi meninks irritasyon bulguları ortaya çıkar. Ayrıca üst solunum yolu enfeksiyonu ve döküntü gibi belirtiler de görülebilir, bunlar tanının konmasında ve özellikle enterovirüs serotiplerinin tanınmasında yardımcıdır. Döküntüler, SSS hastalığı nedenleri olan coxsackievirus A5, A9, A16, echovirus 4, 6, 9 ve 16 enfeksiyonlarında görülebilir. Echovirus 9 ile ilişkili menenjitte meningokokseminde görülene benzeyen peteşi görülebilir (Pallansch ve Roos, 2007).

Menenjit genellikle kendi kendini sınırlayan niteliktedir ve iyi seyirlidir. Ancak coxsackievirus B1, echovirus 9, 17 ve 21 ile olan enfeksiyonlarda ölümler bildirilmiştir. Enteroviral menenjitin kliniği yaş ile değişmektedir. Yenidoğanlarda sekel ve ölüm daha fazladır. Hastalık özellikle doğumdan hemen sonra ortaya çıkmış ise daha şiddetli olma eğilimindedir. Tipik BOS görünümü; mononükleer pleositoz, genellikle 100-300/mm³ beyaz hücre, normal veya hafif artmış protein içerik ve normal glukoz konsantrasyonu şeklindedir. Hastalığın erken döneminde BOS lökosit sayısı 1000/mm³ üstünde olabilir ve nötrofil hakimiyeti görülebilir. Hastalık süresi genellikle yedi günden daha azdır fakat adölesanlarda ve yetişkinlerde birkaç haftaya uzayabilir (Sawyer, 2002; Pallansch, Roos, 2007). İmmün yetmezliğin olması enterovirüs kaynaklı aseptik menenjit veya meningoensefalit, bazen de persistan SSS enfeksiyonuna neden olur. İmmün yetmezliği olan bazı olgularda aniden başlasa da birçoğunda yavaş ilerleme gösterir ve ilerleyen yıllarda ölüm ile sonuçlanır (Pallansch ve Roos, 2007).

Genellikle ensefalit olgularının çoğunda spesifik bir virüs tanımlanamamakla birlikte ABD’de etkeni tanımlanmış ensefalitlerde enterovirüsler, arbovirus ve herpes simpleksvirüsden sonra ikinci sırada gelmektedir. Tanımlanmış viral ensefalitlerin %10–20’sinden enterovirüsler sorumludur ve çoğunda coxsackievirus A izole edilmiştir. Akut serebellar ataksisi olan çocuklarda poliovirus, echovirus 6, 9, coxsackievirus A2 ve A9 saptanmıştır. Enterovirüs ensefalitleri ateş, dezoryantasyon, fokal nöbet ve nadiren koma içeren mental durum değişikliği semptomlarını içerir. Diğer nadir klinik görünüm; akut hemipleji, opsoklonus-myoكلonus, hareket bozuklukları ve Guillain-Barre sendromudur. Enterovirüs 71 enfeksiyonu ile şiddetli rhombensefalit bildirilmiştir. Çocuklarda özellikle bir yaş altı olanlarda ensefalit sıklığı artmaktadır (Romero ve Newland , 2006; Pallansch ve Roos, 2007; Koskiniemi , 1991).

2.2.5.3. Poliomyelit:

Poliovirüs tip 1 en fazla, tip 2 daha az, tip 3 ise seyrek olarak paralizisi yapar. Enfeksiyonlarının %90-95’i asemptomatik iken %4-8 hastada minör hastalık (abortif poliomyelit), %0.1-1 hastada parolitik poliomyelit (major hastalık), %1-2 hastada non parolitik poliomyelit (aseptik menenjit) şeklinde görülür. Çeşitli coxsackievirus ve echovirus serotiplerine bağlı olarak sporadik flask motor paraliziler bildirilmiştir. Enterovirüs 71’de polio benzeri epidemik parolitik hastalık oluşturabilmektedir (Sayiner, 2005; Zeichhardt ve Grunert, 2000).

2.2.6. EV’lerin Mikrobiyolojik Laboratuvar Tanısı

Enterovirüs enfeksiyonun tanısı için hasta örneklerinden virüsün saptanması gerekir. Enterovirüs enfeksiyonlarında değişken klinik tablolar görülebilir. EV enfeksiyonunun laboratuvar tanısı ile doğrulanması gereksiz antibiyotik kullanımının azaltılması, hastaneye yatış süresini kısaltılması, komplikasyon riskinin en aza indirilmesi, maliyetli tanı araştırmalarının sınırlandırılması ve yeni antiviral ilaç üretimi ve aşı çalışmalarına yapılabilmesi konularında fayda sağlar. EV laboratuvar tanısı ayrıca daha ciddi hastalıklarla ilişkili EV tiplerinin tanımlanması ve ilişkili hastalıkların izlenmesi; salgınla ilişkili spesifik EV tipinin tanımlanması; poliovirüsün dolaşımda olmadığını teyit edilmesi; EV-A71 ve EV-

D68 gibi ciddi hastalıkla ilişkili olduğu bilinen EV tiplerinin veya suşlarının moleküler epidemiyoloji ve coğrafi dağılımının izlenmesi ve yeni eni EV tiplerinin veya EV tiplerinin yeni rekombinantlarının saptanması ve izlenmesi açısından da önemlidir (Havala H, 2018). Enterovirüs enfeksiyonlarını saptamada viral kültür, serolojik testler ve nükleik asit amplifikasyon testleri (NAT) kullanılmaktadır (Sawyer, 2002).

Tablo 2: EV Tanısında Alınması Önerilen Örnekler EV (Havala, 2018)

Akut flasid paralizi, myelit	Solunum yolu örneği, BOS, dışkı ve kan
Döküntüler	Vezikül sıvısı, solunum yolu örneği ve/veya dışkı
Solunum yolu hastalığı	Solunum yolu örneği, dışkı örneği
Miyokardit	Dışkı ve solunum yolu örneği, kan ev/veya kardiak biopsi
Konjunktivit	Göz sürüntüsü

(Koyu karakterli yazılar başlıca örneği belirtir)

2.2.6.1. Hücre Kültürü

EV hücre kültürü artık rutin tanısı için kullanılmasa da referans laboratuvarlarında EV kültürünün yapılması önerilmektedir. EV suşlarını toplanması, tanı testi geliştirilmesi , PZR negatif sonuçların doğrulanması için, yeni bir suşla enfeksiyon şüphesinde, bir örnekte birden fazla viral suş varlığında, nötralizan antikorların ölçülmesi amacıyla, antivirallerin etkilerinin belirlenmesi ve kalite kontrol testlerinde kullanım amaçlı hücre kültürü kullanılabilir. EV hücre kültürü için örnek toplama, hazırlık ve virüs izolasyonundaki metodoloji konularında kılavuzlardan faydalanılabilir (Havala, 2018).

Memeli hücre hattı kullanılan hücre kültürlerinde birçok EV izole edilebilir. Genellikle, en az üç farklı hücre hattı, maymun böbrek hücreleri ve insan fibroblastlarını içeren hücre hatları kullanılır. Ancak EV-A71 de dahil olmak üzere grup A EV'ler hücre

kültürlerinde zayıf şekilde üreyebilirler ve EV-D68 normalden daha düşük inkübasyon sıcaklıkları gerektirir (Havala, 2018).

Virüs izolasyonu için örnekler duyarlı ve uygun hücre dizilerine inoküle edilmelidir. İzolasyonda tüm insan enterovirüs türlerini saptayabilmek için farklı insan ve maymun hücre dizileri aynı anda kullanılmaktadır. Poliovirus, coxsackievirus B ve echovirus için maymun böbrek hücre dizileri (Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücresi olan Vero hücresi dahil), coxsackievirus A için WI-38 (insan embriyonu akciğer hücre dizisi) ve HELF (human embryonic lung fibroblast) gibi insan diploid fibroblast hücreleri kullanılabilir. İnsan rabdomyosarkom hücrelerinden elde edilen RD hücreleri, coxsackievirus A'ların saptanması için uygunken pek çok coxsackievirus B için başarısızdır ve sıklıkla kör pasajlama gerekmektedir. İstisna olarak coxsackievirus A1, A19, A22 hücre kültüründe üremedikleri için ancak süt emen farelerde izole edilebilmektedirler (Romero ve Rotbart, 2003; Zeichhardt ve Grunert, 2000).

Geleneksel yöntemlerle BOS'dan enterovirüs saptanması 3.7-8.2 gün arasındadır. Duyarlı hücre dizilerinin enterovirüs ile enfeksiyonu sonucunda, hücrelerin büzülüp, yuvarlaklaşıp çekirdeklerinin piknotik hale dönüşmesi ile karakteristik gözyaşı şeklinde sitopatik etki (CPE) ortaya çıkar ve enfeksiyonun ilerlemesi ile hücreler yapıştıkları yüzeyden ayrılarak serbestleşir. Hastalık nedeni olan enterovirüs serotipleri hücre kültüründe üreyip CPE saptandıktan sonra, tip özgül antiserumla nötralizasyon yapılarak serotip belirlenebilmektedir. Bu yüzden hücre kültürü önemli bir epidemiyolojik araçtır. Geleneksel tüp kültürünün sınırlılıkları, menenjit tanısında oldukça düşük duyarlılığa sahip olması (%75'in altında), bazı serotiplerin hücre kültüründe üretilmemesi ve sonuçların genellikle hastaların etkili tedavisinde yeterli sürede elde edilememesi olarak sayılabilir (Romero ve Rotbart, 2003; Sawyer, 2002; Pallansch ve Roos, 2007; Romero, 2008; Rotbart, Hayden, 2000).

Hızlı 'shell vial' hücre kültür yöntemi ile işaretli antikorların kullanılarak saptama süresi 2-3 güne kadar kısalmıştır. Hücreler düz tabanlı tüplerin dibindeki 12 mm çaplı yuvarlak lamellerde üretilip örnek ekildikten sonra yavaş hızla santrifüj edilerek inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında floresein izotiyosiyanat (FITC) işaretli özgül antikorlarla enterovirüsler gösterilir.

BOS, dışkı, rektal sürüntü, boğaz sürüntüsü, boğaz çalkantı suyu, kan, idrar ve doku örnekleri EV izolasyonu için kullanılabilir. Klinik örneklerden virüsün başarılı izolasyonu enterovirüs enfeksiyon patogenezinin bağlı olarak değişir. Boğaz sürüntüsünden, enfeksiyonun başlangıcından sonraki ilk 15 günde; dışkı ve rektal sürüntüden, enfeksiyondan

sonraki dört haftaya kadar ve BOS örneklerinden, SSS semptomları başladıktan sonraki 2-3 haftaya kadar izole edilebilir. Dışkıda virüs konsantrasyonu daha fazladır bu nedenle dışkıdan izolasyon şansı diğer örneklerle göre daha yüksektir. Enterovirüsler akut enfeksiyondan haftalar sonra da dışkıda bulunabildiğinden ve hastalığın kliniği düzeldikten sonra da saptanabildiğinden dışkıdan virüs izolasyonu bu durum göz önünde bulundurularak değerlendirilmelidir. Ayrıca oral polio aşı virüsü uygulandıktan haftalar sonra da virüs dışkıda bulunabilir ve viral kültürlerde saptanabilir. EV 70'in neden olduğu akut hemorajik konjunktivit tanısı için konjunktival sürüntüden; coxsackievirus A4, A5, A9, A10, A16, B2, B5 ve enterovirüs 71'in neden olduğu veziküler lezyonların tanısı için vezikül sıvısından virüs izole edilebilir. Kandan virüs izolasyonu, viremi (enfeksiyondan sonraki 6-9 gün) sırasında başarılıdır ancak bu sürenin kısa olması nedeni ile kan örneğinde çalışmak tercih edilmez (Sawyer, 2002; Pallansch ve Roos, 2007; Zeichhardt ve Grunert, 2000).

2.2.6.2. Serolojik Tanı

Enterovirüs enfeksiyonları sırasında oluşan nötralizan antikorlar tipe özgüdür ve enfeksiyondan yıllar sonra veya ömür boyu saptanabilir. Şüphelenilen virüs ile akut ve iyileşme fazındaki sulandırımı yapılmış hastaya ait serum örnekleri karşılaştırılarak enterovirüslerin serolojik tanısına gidilebilir. Nötralizan antikor titresinin dört kat veya üstünde artmış olması enfeksiyon tanısını koydurur. Sağlıklı kişilerde enterovirüs antikorlarının yüksek titrelerde bulunmasından dolayı tek örnek sonucuya tanı koyulamaz (Romero ve Rotbart, 2003; Pallansch ve Roos, 2007; Ladwig, 2000).

Poliovirus enfeksiyonları örnek verilirse; primer enfeksiyondan 7-10 gün sonra IgM antikorları, 14 gün sonra IgG antikorları saptanabilir. Ancak oluşan antikorlar serotipe özgüdür, hayat boyu serotipe özgü bağışıklık oluşur (Karahasan, 2008).

ELISA “enzyme linked immunosorbent assay” temelli monotipik antikor testleri, özellikle bir serotipten klinik olarak şüphelenilmedikçe tanı testi olarak uygun değildir. Heterotipik antikor testleri pek çok enterovirüs serotipini, tipe özgül olmadan, saptayabilir. Heterotipik ELISA testleri enterovirüs serotiplerinin benzer epitoplarını saptamaya yönelik üretilmiştir. Bu testlerin serotip özgüllüğünü geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalar testin duyarlılığını azaltabilir. ELISA kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Kompleman fiksasyon testine göre daha duyarlıdır ve nötralizasyon testinden çok daha az emek yoğunudur.

Nötralizasyon testi veya ELISA IgM testi ile saptanan pozitif sonuç yakın dönemde geçirilmiş enfeksiyonun göstergesidir (Pallansch ve Roos, 2007; Ladwig, 2000; Craig, 2003).

Enterovirüs serolojik olarak tanımlanması, enterovirüs serotip sayısının fazla olması nedeniyle daha çok epidemiyolojik çalışmalar ve araştırma uygulamaları için uygundur. Enteroviral enfeksiyonların tanısında serolojik testler kullanılmamaktadır (Smalling, Sefers , 2002; Romero ve Rotbart, 2003; Sawyer, 2002; Pallansch ve Roos, 2007).

2.2.6.3. Nükleik Asit Testleri

PZR yöntemi ile enterovirüslerin hızlı, duyarlı ve özgül olarak saptanması mümkündür. Ticari kitlerin yanısıra laboratuvar tasarımı olan (in house) PZR yöntemleri de kullanılmaktadır. Enteroviral enfeksiyonların tanısında PZR yöntemiyle tüm serotipleri saptayabilmek ya da sınırlı sayıda serotipleri ‘türe özgül’ olarak saptayabilmek ya da ‘serotip özgül’ olarak tek serotipi saptayabilmek mümkündür. Türe özgül enterovirüs PZR uygulamaları klinik örneklerdeki polio ve NPEV ayırımı yapmak için kullanılmaktadır. Serotip veya suş özgül PZR ise genellikle moleküler epidemiyolojik çalışmalar, filogenetik analiz ve moleküler virülans belirleme çalışmalarında uygulanmaktadır (Romero ve Rotbart, 2003).

PZR yöntemiyle enterovirüs RNA’sı; BOS, serum, idrar, gibi vücut sıvıları; dokular; dışkı; rektal ve faringeal sürüntü örneklerinde saptanabilir (Romero ve Rotbart, 2003). 5’ NTR ve VP2 gibi korunmuş bölgeler kullanılarak hemen tüm enterovirüs tipleri için ortak amplifikasyon sağlayan primer ve probler geliştirilmiştir.

En sık kullanılan hedef 5’NTR bölgesi olup bu bölgeye özgü primer ve problerle tüm enterovirüs tipleri saptanabilmektedir. 5’ NTR’deki çok iyi korunmuş nükleotit bölgelerini hedefleyen primer ve problerle klinik örneklerde enterovirüs varlığı saptanabilmekte ve tanı testi olarak bu bölge önerilmektedir (Havala, 2018). Bu primerler rhinovirusların genomlarını saptayamayabilir. Bu durum solunum yolu örneklerinde önemlidir. Rhinoviruslar SSS’de veya sistemik hastalık yapmadıklarından bu örneklerde dikkate alınmamaktadır (Romero ve Rotbart, 2003; Romero, 2008;Chapman, 1990;Rotbart, 1990). VP1 bölgesi çoğaltılarak türe spesifik tanı koyulabilmektedir (Havala, 2018).

PZR yöntemi, hücre kültürü ile karşılaştırıldığında duyarlılık %86-100, özgüllük %92-100 arasındadır. BOS örneklerinden enterovirüs genomunu saptamada PZR yöntemi çok duyarlıdır. PZR’nin, düşük miktar enterovirüs genom molekülünü saptayabilecek kadar

duyarlı olması ve nükleik asitlerin genellikle viral partiküllerden daha stabil olması nedeniyle (örneklerin taşınması sırasında virüslerin canlılığı kaybolabileceği için) kültür negatif, PZR pozitif, sonuçlar elde edilebilir. Buna ek olarak replikasyon süresince birçok virüs, defektif virüs partikülleri üretir. Bunlar hücreleri infekte edemez fakat nükleik asit içerirler. Bu partiküller de PZR yöntemi ile saptanabilirler. Ayrıca PZR ile hücre kültüründen daha kısa sürede sonuç alınmakta ve kültürde üreyemeyen serotipler de gösterilebilmektedir (Romero ve Rotbart, 2003; Sawyer, 2002). PZR testlerinin duyarlılıkları yüksek olduğundan, laboratuvar içi kontaminasyonlardan kaynaklı yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir. Enterovirüs PZR test sonuçları, klinik ile uyumlu olmadığı durumlarda test tekrarlanmalıdır. Bu nedenle kalite kontrolü PZR temelli testlerde önemlidir (Sawyer, 2002).

Geleneksel PZR dışında kullanılan diğer moleküler tanı yöntemleri gerçek zamanlı PZR (Real time-RT-PZR) ve nükleik asit dizilimi temelli amplifikasyondur (NASBA).

RT-PZR'ın en belirgin avantajı iş yükünün az olması ve hızlı sonuç alınabilmesidir. Bu avantajı kısmen hedef amplifikasyonunun ve amplikon tayininin eş zamanlı olarak gerçekleşmesine bağlıdır. Ayrıca kullanılan malzemeler nedeniyle ısı iletimi hızlıdır bu da döngü sürelerini oldukça kısaltmıştır (Romero, 2008).

NASBA ile reaksiyon başına 10-100 RNA kopyası saptanabilmektedir ve RT-PZR gibi enterovirüs saptanmasında hücre kültüründen daha duyarlıdır. Bu yönteminde avantajı iş yükünün az olması, hızlı sonuç alınabilmesi ve ticari kitler içinde internal kontrollerin bulunmasıdır. BOS dışındaki dışkı, boğaz sürüntüsü, nazofarengeal sürüntü, rektal sürüntü gibi örneklerde inhibitörler nedeni ile geçersiz sonuçların sık ortaya çıkması önemli bir dezavantajdır (Romero, 2008).

Polioviruslar ile NPEV'leri ve aşı susları ile yaban tip poliovirusları ayırmada çeşitli moleküler yöntemler tanımlanmıştır. Bu amaçla PZR-restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizm (PZR-RFLP) analizi ve prob hibridizasyon testleri, multipleks PZR testi kullanılabilmektedir. Poliovirus serotipleri ve NPEV'ler, VP1 dizilerini hedefleyen dejenere primerler kullanılarak yapılan PZR testleriyle ayırt edilebilir (Romero ve Rotbart, 2003; Romero, 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1 Çalışma Yeri

Çalışmalar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, hücre kültürü laboratuvarları ve ADÜTF Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışma için ADÜTF Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı. Çalışmanın yapılabilmesi için ilgili laboratuvarlardan resmi izinler alındı.

3.1.2 Çalışma Grubu ve Örnekleri

- 1) Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi (ADÜTF) Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'na, tanı testleri için 01.11.2018 ile 01.11.2019 tarihleri arasında, viral SSS enfeksiyonu şüphesi olan hastalardan nükleik asit testi ile viral menenjit paneli çalışılması amacıyla gönderilen, 20 adet BOS örneği çalışmaya dahil edildi. Rutinde nükleik asit testi yapılmış olan BOS örnekleri hücre kültürü işlemine alınana kadar -80 °C'da saklandı.
- 2) Enterovirüs üremesi olan hücre kültür hattı süpernatantından 20 adet, 2 katlı, seri dilüsyon hazırlandı. Farklı miktarlarda enterovirüs içeren dilüsyonların herbiri iki alikota ayrıldı ve hem hücre kültürü yöntemiyle hem de Real-Time PCR yöntemiyle, eş zamanlı çalışıldı.

3.1.3 BOS Örneklerinin Saklanması

Çalışmaya alınan BOS örnekleri çalışma anına kadar burgulu kapaklı RNaz ve DNaz içermeyen steril tüplerde -80°C'de saklandı.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Nükleik Asit Testi

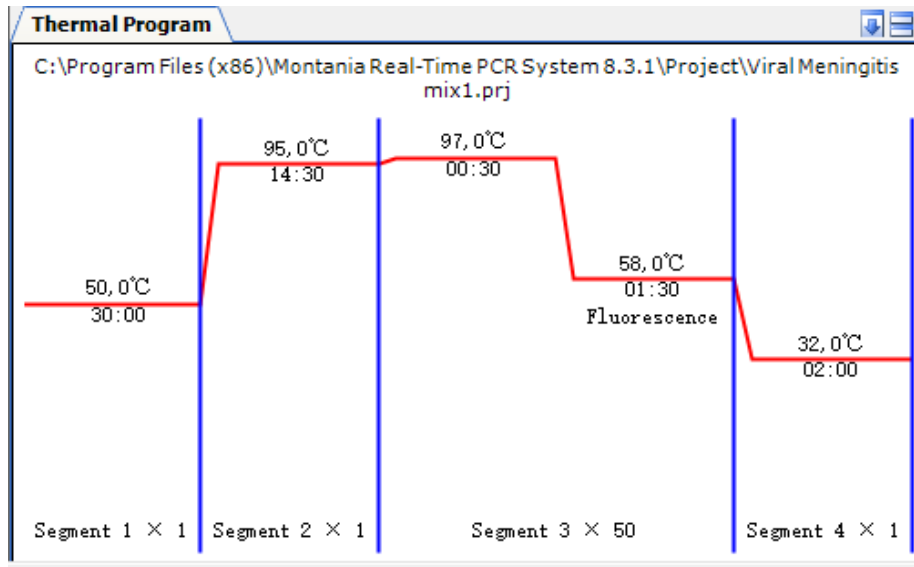
Çalışmaya alınan BOS ve EV üremiş hücre kültürü supernatantının dilüsyon örneklerinden Enterovirus RNA'sını saptamak amacıyla,

- 1) BOS örnekleri ticari ekstraksiyon kiti (Magesia® Viral DNA/RNA Extraction Kit EP, Türkiye) ile kitin önerileri doğrultusunda ekstrakte edildi.
- 2) Elde edilen ekstraktlar ticari Real-Time PCR kiti (Bosphore® Viral Menenjit Panel Kiti v1, Türkiye) ile kitin önerileri doğrultusunda amplifiye edildi.

Bosphore® Viral Menenjit Panel Kiti v1; HSV-1, HSV-2, Enterovirus (Coxsackie A ve B, Ekovirüs, Poliovirüs, Enterovirüs 68-71), Parechovirüs, VZV genomunu saptayabilmektedir.

3.2.1.1 Nükleik Asit Testi Miks İçeriği ve Isı Döngüsü

PCR master miks	15 µl
Internal kontrol	0.2 µl
DNA	10 µl
TOPLAM	25 µl



Resim 1. NAT Isı Döngüsü

3.2.2 Hücre Kültürü

1) Shell vial yöntemi ile,

Vero (African green monkey kidney-fibroblastbenzeri hücre) (Refik Saydam Hıfzıssıhha, Ankara)

HEp-2 (Human laringeal carsinoma-epitelyal hücre)(Japonya Hücre Bankası) ve

RD hücre dizileri (Human rabdomyosarkoma-kas hücresi) (DSMZ, Almanya) kullanılarak hücre kültürü laboratuvarında sınıf II kabinlerde gerçekleştirildi.

2) İnkübasyon periyodu sonunda hücreler poliklonal antikorlar ile (Enterovirus

Screening Set, Light Diagnostic, Chemicon International, Temecula, ABD) boyanıp floresan mikroskopta elma yeşili rengi floresan ışımaya görülen hücreler araştırıldı.

Pan-Enterovirus Blend poliklonal antikor, hücre kültüründe üretilmiş patojenin tanımlanmasında kullanılan ve indirekt immünfloresan antikor test yöntemi ile çalışan bir tarama kitidir. Enterovirusların viral kapsit antijenine karşı oluşturulmuş FITC işaretli anti- mouse antikorlarla iki aşamada yapılır. Bu boyama kiti ile echovirus 4, 6, 9, 11, 30, 34, coxsackievirus B1-B6, poliovirus 1-3ve enterovirus70-71saptanabilir.

3.2.2.1 Hücre Çözdürme

1) İçinde hücre dizisi bulunan kriyotüp -196°C'deki sıvı azot tankından çıkarıldı ve 37°C'deki su banyosunda çözdürüldü.

2) Hücreler yavaşça pipetlenerek homojen hale getirildi.

3) 5 ml büyüme besiyeri içeren tüplere alınarak 200 g'de, 24 °C'da, 5 dakika santrifüj edildi.

4) Süpernatant atıldı. Altta kalan hücre çökeltisi üstüne 2 ml büyüme besiyeri koyularak pastör pipeti ile yavaşça homojenize edildi.

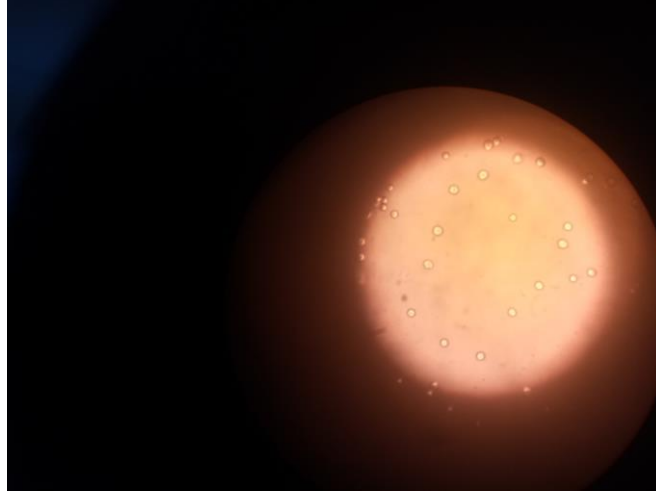
5) Flaska 3 ml büyüme besiyeri koyulup hücre süspansiyonu yavaşça ilave edildi.

6) Flask 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi.

3.2.2.2 Hücre Dizilerinin Shell Viallere Pasajlanması

Her örnek için bir HEp-2, bir Vero ve bir de RD hücre dizisini içeren toplam üç shell vial hazırlandı.

- 1) Flasklarda (25 cm²'lik) tam tabaka halinde bulunan RD, HEp-2 ve Vero hücrelerinin üzerindeki besiyeri alındı.
- 2) Flask üzerine 5 ml antibiyotikli yıkama sıvısı eklenerek hücreler yıkandı. Sıvı şişe içinden alınıp atıldı.
- 3) Trypsin (Trypsin-Versene Mixture, Lonza, USA) solüsyonu flask içine 1.5 ml olacak şekilde eklendi.
- 4) Flasklar 37°C'de 10 dakika bekletildi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı.
- 5) İnverted mikroskopta hücreler kontrol edilerek ayrılma gözlenince içine 5 ml büyüme besiyeri koyulup tripsinin etkisi nötralize edildi.
- 6) Süspansiyon halindeki hücreler steril tüplere aktarıldı.
- 7) Tüpler 200 g'de, 24°C'de, 6 dakika santrifüj edildi.
- 8) Santrifüj sonunda tüplerin içindeki sıvı dibindeki hücre çökeltinin dökülmemesine dikkat edilerek atıldı.
- 9) 100.000 hücre/ml olacak şekilde viral büyüme besiyeri ilave edildi. Hücrelerin pasteur pipetiyle nazıkçe homojenizasyonu sağlandı.
- 10) shel viallere 1,5 ml büyüme besiyeri koyulduktan sonra üzerine 0.5 ml hücre süspansiyonu eklendi.
- 11) Vialler 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 48 saat inkübe edildi.



Resim 2. Tripsin ile Muamele Sonrası, Flasktan Kalkmış Hücrelerin, Inverted Mikroskopta 40X Objektifle görünümü

3.2.2.3 Örneklerin Shell Viallere İnokülasyonu

- 1) İnküasyon sonunda shell viallerin inverted mikroskopta tek tabaka olup olmadığı kontrol edildikten sonra içindeki sıvı besiyerleri atıldı.
- 2) Bir ml antibiyotikli yıkama sıvısı ile iki kez yıkandı.
- 3) 200 µl BOS örneği her üç vialle inoküle edildi.
- 4) Vialler 700 g'de 30 dakika 24°C'de santrifüj edildi.
- 5) Bir saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi.
- 6) 2 ml enterovirus izolasyon sıvı besiyeri ilave edildi.
- 7) Vialler 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 48 saat inkübe edildi.

3.2.2.4 Shell Vial Hücre Kültüründen Subpasajlama İşlemleri

- 1) 48 saat sonunda shell viallerin süpernatantından,
 - a. 500'er µl alınarak yeni hazırlanmış shell viallere (Vero, RD, Hep2 hücrelerine) inoküle edildi (subpasaj) ve
 - b. Vialler 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 48 saat inkübe edildi. Böylece BOS örneklerinde shell vial yönteminin duyarlılığı arttırılmaya çalışıldı.

3.2.4.5 Üreme Olan BOS örneğinin shell vial kültür süpernatantından Dilüsyon Örneklerinin Hazırlanması

- 1) Üreme saptanan BOS örneği shell vialinin süpernatantından steril SF kullanılarak 1/2, 1/4, 1/8....1/1048576 dilüsyonlar yapıldı (Toplam 20 dilüsyon örneği).
- 2) Her dilüsyondan iki alikot hazırlandı.
- 3) Bir kısmı ile hücre ile kaplanmış shell vial hücre hatlarına (Vero, RD, Hep2) ekim yapıldı.
- 4) Diğer kısmı ile real-time PZR testi aynı gün çalışıldı.

3.2.2.6 Hücrelerin Boyanması

İnkübasyon süresi sonunda lameller (3 lamel) enteroviruslara karşı hazırlanmış Pan- Enterovirus Blend poliklonal antikorlarla (Enterovirus Screening Set, Light Diagnostic, Chemicon International, Temecula, ABD) üretici firmanın önerileri doğrultusunda boyandı. Floresan mikroskopunda bir ve daha fazla elma yeşili rengi floresan ışığa görülen hücrelerin bulunduğu örnekler pozitif olarak kabul edildi.

- 1) Shell viallerden kültür sıvısı çekildi ve her lamel iki kez 1 ml fosfat tampon çözeltisi (PBS) (Biochrom AG, Almanya) ile yıkandı ve beş dakika PBS içinde bırakıldı.
- 2) PBS viallerden çekildi, her bir vial 1 ml aseton kondu ve -20°C’de 10 dakika bekletildi.
- 3) Aseton viallerden atıldı ve PBS ile yıkama tekrarlandı.
- 4) Bir lam üzerine 25 µl poliklonal antikor damlatıldı ve lamellerin hücreli yüzeyi damla üzerine kapatıldı.
- 5) 30 dakika ,37°C’de kapalı ve nemli ortamda inkübe edildi.
- 6) Lameller, iki kez PBS ile yıkandı.
- 7) Bir lam üzerine 25 µl FITC ile işaretli ‘anti-mouse’ Ig damlatıldı ve lamellerin hücreli yüzeyi damla üzerine kapatıldı.
- 8) 30 dakika 37°C’de kapalı ve nemli ortamda inkübe edildi.
- 9) Lameller, iki kez PBS ile yıkandı.
- 10) Kuruduktan sonra lam üzerine bir damla mounting medium damlatıldı lamelin hücreli yüzeyi mediuma değecek şekilde kapatıldı.

3.2.2.7 Shell Vial Hücre Kültürü Yönteminde Kullanılan Sıvı Besiyerleri ve Solüsyonlar

3.2.2.7.1 Vero, RD ve HEp-2 Hücrelerinin Büyüme Besiyeri

100 ml Eagle's MEM (1X) (MEM-Earle) (Biochrom AG, Almanya)
10 ml FCS (Biochrom AG, Almanya)
2 ml L-glutamin (200 mM) (Biochrom AG, Almanya)
1 ml HEPES (1 M) (Biochrom AG, Almanya)
1 ml penisilin-streptomisin solüsyonu (10.000 µg/ml) (Biochrom AG, Almanya)
0.1 ml gentamisin solüsyonu (10 mg/ml) (Biochrom AG, Almanya)
0.4 ml amfoterisin-B solüsyonu (250 µg) (Biochrom AG, Almanya)

3.2.2.7.2 Enterovirus İzolasyon Besiyeri

100 ml Eagle's MEM (1X) (MEM-Earle) 2 ml FCS
1 ml L-glutamin (200 mM) (Biochrom AG, Almanya)
1 ml HEPES (1 M) (Biochrom AG, Almanya)
0.2 ml penisilin-streptomisin solüsyonu (10.000 µg/ml) (Biochrom AG, Almanya)
0.1 ml gentamisin solüsyonu (10 mg/ml) (Biochrom AG, Almanya)
1.6 ml amfoterisin-B solüsyonu (250 µg) (Biochrom AG, Almanya)

3.2.2.7.3 Antibiyotikli Yıkama Sıvısı

100 ml Hanks' Salt Solution (Biochrom AG, Almanya)
1 ml HEPES
1 ml penisilin-streptomisin solüsyonu (10.000 µg/ml) (Biochrom AG, Almanya)
0.1 ml gentamisin solüsyonu (10 mg/ml) (Biochrom AG, Almanya)
0,4ml amfoterisin-B solüsyonu (250 µg) (Biochrom AG, Almanya)

4. BULGULAR

BOS örneklerinden ve dilüe edilmiş EV üreyen kültür süpernatantından, santral sinir sistemi infeksiyonu etkeni olan enterovirusların araştırıldığı bu çalışmada;

- 1) 20 BOS örneği arasından,
 - a. Bir örnekte (%5) hücre kültürü ile EV üremesi saptandı. Örnekteki suş sadece Hep2 ve RD hücrelerinde üredi, Vero hücrelerinde üremedi.
 - b. Altı örnekte (%30) real-time PZR ile EV RNA pozitifliği saptandı.

Tablo 3. Real-Time PZR Yöntemiyle EV RNA pozitif BOS Örneklerinin Hücre Kültürü Sonuçları

HASTA	CİNS	YAŞ	ÖRNEK ALINMA ZAMANI	PZR CT	HÜCRE KÜLTÜRÜ ÜREME
A.Ö.	E	4	06.09.19	33.58	YOK
M.A.	E	YENİDOĞAN	12.07.19	34.34	YOK
M.A.Ç.	E	7	05.08.19	28.12	YOK
M.O.	E	YENİDOĞAN	04.07.19	27.21	YOK
Z.T.	K	7	09.10.19	31	YOK
B.Ç.	K	6	04.10.19	25.5	VAR

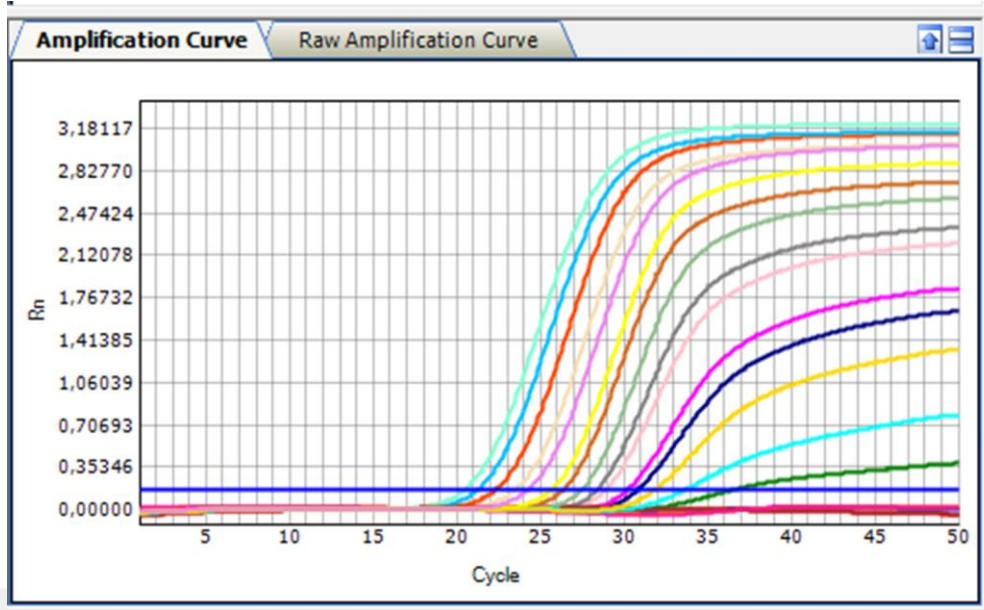
2) Hücre kültüründe EV üreyen BOS örneğinin süpernatantından yapılan 2 katlı dilüsyonlarda ise,

a. 1/131072 dilüsyon da dahil olmak üzere hücre kültüründe EV üremesi saptandı.

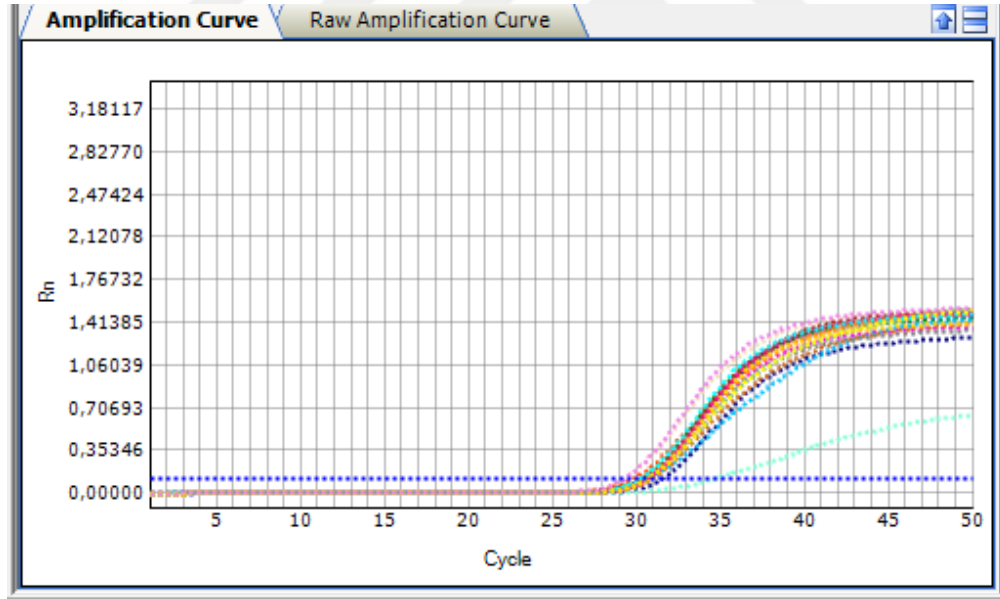
b. 1/262144 dilüsyonda EV RNA pozitif saptandı.

Tablo 4. Hücre Kültüründe EV Üreyen BOS Örneğinin Süpernatantından Yapılan 2 Katlı Dilüsyon Örneklerinin PZR ve Hücre Kültürü Sonuçları

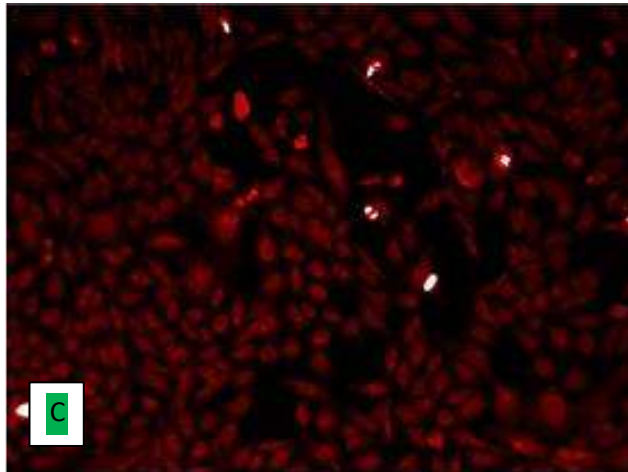
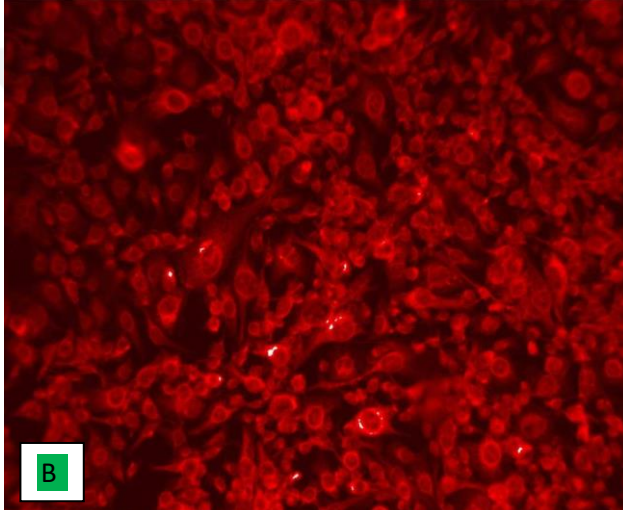
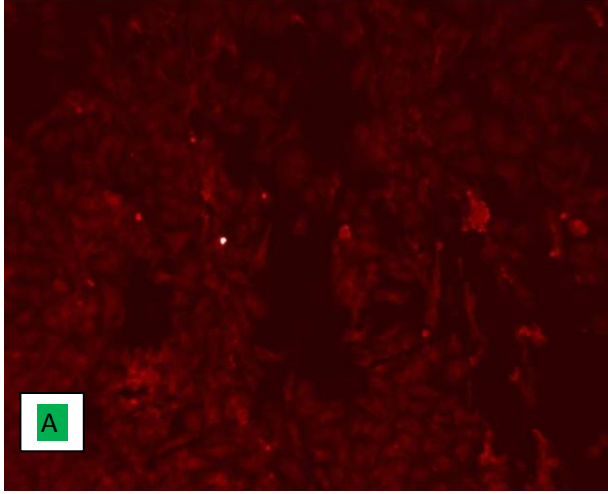
EV POZİTİF ÖRNEK	REAL TIME PZR CT	REAL-TIME	HÜCRE KÜLTÜRÜ
1/2	20.05	POZİTİF	VAR
1/4	20.85	POZİTİF	VAR
1/8	21.90	POZİTİF	VAR
1/16	23.08	POZİTİF	VAR
1/32	23.85	POZİTİF	VAR
1/64	25.29	POZİTİF	VAR
1/128	26.01	POZİTİF	VAR
1/256	27.12	POZİTİF	VAR
1/512	28.06	POZİTİF	VAR
1/1024	28.59	POZİTİF	VAR
1/2048	29.85	POZİTİF	VAR
1/4096	30.44	POZİTİF	VAR
1/8192	31.41	POZİTİF	VAR
1/16384	33.02	POZİTİF	VAR
1/32768	-	NEGATİF	VAR
1/65536	-	NEGATİF	VAR
1/131072	-	NEGATİF	VAR
1/262144	35.36	POZİTİF	YOK
1/524288	-	NEGATİF	YOK
1/1048576	-	NEGATİF	YOK



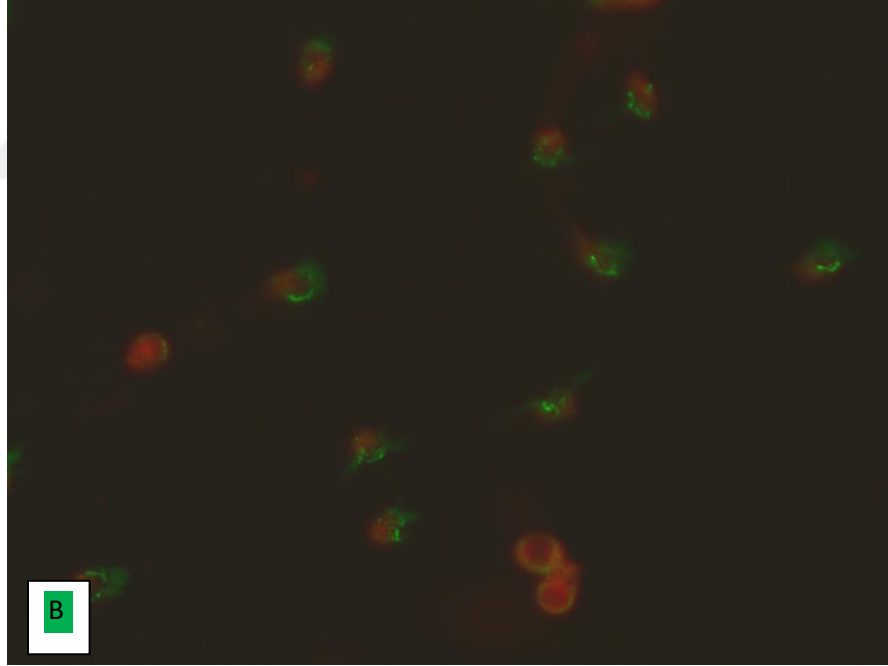
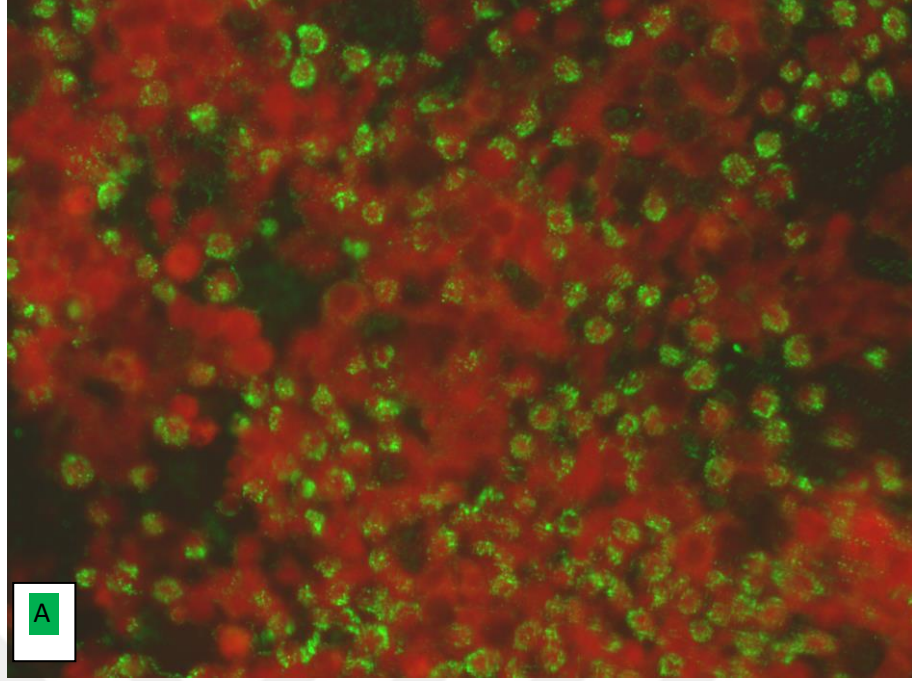
Resim 3. Dilüe Edilmiş EV İçeren Örneklerin Amplifikasyon Eğrileri



Resim 4. Dilüe Edilmiş EV İçeren Örneklerin İnternal Kontrol Amplifikasyon Eğrileri



Resim 5. A. HEp-2 hücrelerinin 40 x büyütmede floresan mikroskopta görünüşleri, B. RD hücrelerinin 40 x büyütmede floresan mikroskopta görünüşleri, C. Vero hücrelerinin 40 x büyütmede floresan mikroskopta görünüşleri



Resim 6. A. Hep2 hücre hattında 40X objektifle floresan mikroskopta EV üretmesi görünüm,
B. RD hücre hattında 40X objektifle floresan mikroskopta EV üretmesi görünümü

5. TARTIŞMA

Santral sinir sistemi infeksiyonlarının kliniği akut seyirlidir ve hızlı ilerler. Yüksek oranda ölüm ve ciddi kalıcı sekel sebebidirler. Bu nedenle, tanıları doğru ve hızlı bir şekilde konulmalıdır. Menenjit ve ensefalit, santral sinir sisteminin en sık görülen infeksiyonlarıdır. Virüsler aseptik menenjitin önemli etkenlerindendir. Etiyolojinin belirlendiği aseptik menenjit olgularının %80-95'inden polio dışı enterovirüsler sorumludur. Sıklıkla menenjit yapan polio dışı enterovirüsler coxsackievirus B2, B5, echovirus 4, 6, 9, 11, 16, 30, enterovirus 70, 71'dir (Tunkell, 2005; Rotbart, 2000).

Bu çalışmada enterovirus varlığı, çalışmaya alınan hastaların BOS örneklerinde araştırılmıştır. Enterovirus saptama olasılığını arttırmak için BOS'a ek olarak boğaz ve rektal sürüntü örneklerinin de hücre kültürü yapılması önerilmektedir. Klinik örneklerden virüsün başarılı izolasyonu enterovirus infeksiyon patogenezinin bağlı olarak değişmektedir. Boğaz sürüntüsü veya dışkı kültürü ile pozitiflik enterovirus varlığını göstermesi nedeni ile önemlidir ve SSS infeksiyonu etkeni olabileceği şüphesini destekler ancak kesin tanı için SSS infeksiyonunun etkenini BOS'da saptamak gereklidir. Bu yüzden bu çalışmada BOS örneği kullanılmıştır (Havala, 2018).

Enteroviral menenjitin özgül virolojik tanısı, BOS'daki virüsün doku kültüründe izole edilmesine bağlıdır. Ancak hücre kültürünün enterovirus serotipleri için duyarlılığı %65-75 arasında değişmektedir. BOS örneklerinde enterovirus izolasyonun zor olmasının nedenleri; enterovirus titresinin düşük olması ve belli serotiplerin hücre kültüründe üreyememesi ile ilişkilendirilmiştir. Geleneksel hücre kültür yöntemleri ile enterovirus izolasyonu 3.7-8.2 gün arasında sonuçlanmaktadır. Bu süre, akut SSS infeksiyonunun hızlı tanısı ve uygun tedavisi için oldukça uzun bir süredir (Romero, 2003; Tunkell, 2005).

Bu çalışma, shell vial hücre kültür tekniği ile tasarlanmıştır. İki insan (RD, HEp-2) ve bir maymun (Vero) hücre dizisinden oluşan üç ayrı hücre dizisi kullanılmıştır. Bu hücre dizileri, günümüzde tüm enterovirusların üreyebildiği tek bir hücre dizisi henüz mevcut olmadığı için farklı hücre tiplerine ekimler yapılarak çok sayıda serotipe sahip enterovirusların üreme şansını arttırmak amacıyla seçilmiştir (Chonmaitree, 1988). Shell vial yönteminin geleneksel yöntemle göre basit laboratuvar işlemlerine sahip olması, saptama basamağında floresan mikroskopla değerlendirme kolaylığının olması ve 48 - 72

saat içerisinde sonuç alınması gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak BOS örneğinin toplamda 600 µl kullanılıyor olması miktarı yetersiz örneklerle çalışılmasını imkansız kılmaktadır. İnokülasyon miktarının fazla oluşu test tekrarlarını ve farklı yöntemlerle çalışma imkanını da kısıtlamaktadır.

Dondurulup çözödürölen örneklere viral yükün düşme olasılığı olduğu için bu çalışmada PZR testi çalışıldıktan sonra dondurulmuş BOS örnekleri tek kerede çözölüp hücre kültürü yöntemiyle çalışılmıştır. Ancak dondurulmuş BOS örneklerinde canlı virüs miktarında azalmaya bağılı olarak hücre kültüründe üreme oranlarının PZR pozitiflik oranlarına göre daha düşük olduğu görölmüşür.

Bu çalışmada hücre kültüründe EV üreyen kültür süpernatantının dilüsyon örnekleri, dondurulup çözödürölen örneklere viral yükün düşme olasılığının ortadan kaldırılması için dilüsyon yapıldığı gün her iki yöntemle de çalışılmıştır. Dilüsyon çalışmasında, EV içeren örneklere hücre kültüründe üreme oranlarının daha yüksek (%85) olduğu görölmüşür. Bu durumun örneklerin bekletilmeden işlemlenmesi nedeniyle örneklere EV'lerin canlılığını kaybetmemesine bağılı olabileceğı düşünölmüşür.

Tablo 5: BOS örneklere PZR ve Hücre Kültürü Sonuçları

EV içeren örnek sayısı	Hücre kültüründe üreme olan örnek sayısı / %	Hücre kültüründe üreme olan son dilüsyon	PZR ile EV RNA pozitif saptanan örnek sayısı / %	NAT pozitiflik saptanan son dilüsyon
20	17/%85	1/131072	15/%75	1/262144

NAT'lerinin daha duyarlı ve viral kültürden daha kısa sürede tanı koyabiliyor olması hastaneye gereksiz yatışların azaltılmasını, daha az beyin BT, MR vb. tetkik istenmesini, hastaların daha kısa süre antibiyotik almasını sağlayarak ciddi oranda maddi kazanç sağladığı gösterilmiştir. NAT, erken tanı ve erken tedavide özellikle enterovirus etkenli SSS enfeksiyonlu olgular için önemli bir potansiyele sahiptir. Moleküler tekniklerin gelişmesi ile bu teknikler, EV enfeksiyonlarının tanısında da geniş kullanım alanı bulmuştur. NAT'lerinin enteroviral menenjit tanısında virüs izolasyonundan daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. NAT ile 5 ile 24 saat gibi kısa bir sürede sonuç alınması

testin önemli bir üstünlüğüdür. Testin bu avantajı ile hastaların tedavisinde zaman geçirmeden değişikliğe gidilebilir. Kısıtlı miktarda alınabilen klinik örneği az miktarda kullanıyor olması da moleküler yöntemlerin bir diğer avantajıdır (Sawyer, 2002; Leland, 2007).

Aseptik menenjit etkeni olarak enterovirusların %80-95 oranında saptandığı çalışmaların yanısıra BOS örneklerinde farklı NAT yöntemleri ile yapılmış çalışmalarda enterovirus saptanma oranının %3-%28 arasında değişmekte olduğu görülmüştür. Güney ve arkadaşlarının 68 aseptik menenjitli yenidoğan hastanın BOS örneklerinde yaptıkları çalışmalarında 36 (%53) örnek geleneksel hücre kültürü ile 43 (%63) örnek 'in house' PZR ile enterovirus pozitif olarak saptanmıştır. Özkaya ve arkadaşları 2001-2004 yılları arasında 246 aseptik menenjit ön tanılı hastanın 180 dışkı, 54 BOS, 15 boğaz sürüntüsü örneğini geleneksel hücre kültürü ile çalışmışlardır. Seksenbeş örnekte enterovirus saptanmıştır, bunların 78'i (%43.3) dışkı, 9'u (%16.6) BOS, 8'i (%53.3) boğaz sürüntüsü örneğinden saptanmıştır. Çolak ve arkadaşları real-time PCR yöntemiyle yaptıkları çalışmada 447 BOS örneğinde %1.8 (8/447) oranında EV RNA pozitif olarak saptamışlardır (Romero, 2003; Guney, 2003; Tunkell, 2005; Beld, 2004; Çolak, 2016).

Moleküler tekniklerin gelişmesi ile bu teknikler, EV infeksiyonlarının tanısında da geniş kullanım alanı bulmuştur. Menenjitli hastalardaki BOS EV titreleri düşük olduğundan, moleküler tekniklerin duyarlılıkları %33'ü aşmamaktadır ancak, EV PZR birçok klinik çalışmada kullanılmış, NAT'ın enteroviral menenjit tanısında virüs izolasyonundan daha duyarlı ve EV menenjiti tanısında %94-%100 özgül olduğu gösterilmiştir (Gomara, 2006; Arısoy, 2004). NAT ile 3-5 saat içinde kısa sürede sonuç alınması testin önemli bir üstünlüğüdür. Testin bu avantajı ile hastaların tedavisinde zaman geçirmeden değişikliğe gidilebilir. Kısıtlı miktarda alınabilen klinik örneği az miktarda kullanıyor olması da moleküler yöntemlerin bir diğer avantajıdır. Bu çalışmada ticari NAT testinin analitik duyarlılığı 39 kopya/reaksiyon olarak belirtilmiştir. Dilüsyon örneklerininin %75'inde pozitiflik saptanmıştır. Özellikle az sayıda virüs içeren BOS örneklerinde EV tanısı için daha duyarlı yöntem veya kitlerle çalışmak gerektiği anlaşılmaktadır. Ticari testlerin rutinde kullanıma alınmadan verifiye edilmesinin önemi ve analitik duyarlılığı yüksek testlerle rutin tanılama yapılmasının gerektiği düşünülmüştür

6. SONUÇ

Bu çalışmada NAT testi sonrası saklanmış BOS örnekleri shell vial hücre kültürüne yöntemiyle çalışıldığında, 1 örnekte üreme saptanmıştır. Real-time PZR yöntemiyle çalışıldığında 6 örnekte EV RNA pozitif saptanmıştır. Yöntemler arasında saptanan bu uyumsuzluğun hücre kültürü için BOS örneklerinin saklanması sırasında virüsün canlılığını yitirmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Örnek miktarlarının az olması nedeniyle test tekrarına gidilememiştir.

Bu çalışmada hücre kültüründe üreme olan vialin süpernatantından dilüsyonla hazırlanan, EV içeren örnekler hücre kültürü yöntemiyle işlemlendiğinde real-time PZR yöntemine göre daha yüksek oranda (%85/%75) EV pozitifliği saptanmıştır. Dilüsyonlu örneklerin, bekletilmeden işlemlenmesi nedeniyle virüs canlılığını yitirmeden viallere inoküle edilebilmiştir. Bu durum hücre kültürü yönteminde örneğin transferi ve saklama koşullarının etken izolasyon oranını büyük oranda etkilediğini göstermiştir.

Ticari real-time PZR kitinin analitik duyarlılığı 39 kopya/reaksiyon olarak belirtilmiş. Analitik duyarlılığı yetersiz NAT kitleriyle çalışmak özellikle BOS örneklerinde yanlış negatif sonuçlara neden olabileceğinden rutin tanıda kullanılan NAT'ların validasyon kriterleri ve saptayabildikleri EV tipleri yönünden özenle seçilmesi çok önemlidir. Hücre kültürü yöntemi zaman alıcı ve fazla miktarda örnek inokülasyonu gerektirmesi gibi nedenlerle rutin uygulama açısından pratik değildir. Ancak rutin tanı laboratuvarlarında NAT negatif çıkan BOS örneklerinde, shell vial yöntemiyle hücre kültürü yapılarak tanının desteklenmesinin bir seçenek olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Arısoy ES.** Aseptik ve viral menenjitler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, (eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı, Cilt 1. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2008; 1422-1430.
- Arısoy ES.** Viral Menenjit. T Klin J Ped Sp Iss 237-243, 2004.
- Baggen J.** The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. Nat Rev Microbiol. 2018 Jun; 16(6):368-381.
- Beld M.** Highly sensitive assay for detection of enterovirus in clinical specimens by reverse transcription-PCR with an armored RNA internal control, J. Clin. Microbiol. 2004, 42 (7): 3059–3064.
- Buck GE, Wiesemann M, Stewart L.** Comparison of mixed cell culture containing genetically engineered BGMK and CaCo-2 cells (Super E-Mix) with RT-PCR and conventional cell culture for the diagnosis of enterovirüs meningitis. J Clin Virol 2002; 25: 13-18.
- Carter JB, Saunders VA.** Picornaviruses (and other plus-strand RNA viruses). In: Carter JB, Saunders VA. Virology Principles and Applications. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 2007; 157-172.55
- Chadwick DR.** Viral meningitis. Brit Med Bull 2006; 10: 1-14.
- Chapman N.** Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. J Clin Microbiol 1990; 28: 843-850.
- Chonmaitree T.** Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. J. Clin. Microbiol. 26 (12) (1988) 2576–2580.
- Craig ME.** Diagnosis of enterovirüs infection by genus-specific PZR and enzyme-linked immunosorbent assays. J Clin Microbiol 2003; 41: 841–844.
- Çolak D.** Beyin Omurilik Sıvısı Örneklerinden Saptanan Viral Etkenler. Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(4):152-158, 2016
- Evans DJ, Almond J.W.** Cell receptors for picornaviruses as determinants of cell tropism and pathogenesis Trends Microbiol, 6 (1998), pp. 198-202
- Gomara MI.** Molecular Detection and Characterization of Human Enteroviruses Directly From Clinical Samples Using RT-PCR and DNA Sequencing. Journal of Medical Virology 2006, 78:243– 253.

- Griffin DE.** Encephalitis, myelitis and neuritis. In: Mandell LG, Bennet JE, Dolin R, (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, 2005; 1143-1150.
- Guney C.** Laboratory diagnosis of enteroviral infections of the central nervous system by using a nested RT-polymerase chain reaction (PCR) assay. *Diagn Microb Infect Dis* 2003; 47: 557-562.
- Havala H.** Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *Journal of Clinical Virology* 101 (2018) 11–17.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).** <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Jubelt B.** Enterovirus/Picornavirus infections. *Handbook of Clinical Neurology* 2014; Vol.123:379-416.
- Karahasan AY.** Picornavirus ailesi. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, (eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. Baskı, Cilt 2. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2008; 1825-1832.
- Koskiniemi M.** Epidemiology of encephalitis in children: a 20-year survey. *Ann Neurol* 1991; 29: 492-497. <http://www.who.int/csr/don/archive/disease/enterovirus/en/>
- Ladwig ET.** Evaluation of enterovirus serological tests IgM-EIA and complement fixation in patients with meningitis, confirmed by detection of enteroviral RNA by RT-PCR in cerebrospinal fluid. *J Med Virol* 2000; 61: 221–227.
- Leland DS, Ginocchio CC.** Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(1): 49-78.
- Linden L.** Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses*. 2015, 7, 4529-4562.
- Nix WA.** Detection of all known parechoviruses by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (8): 2519-2524.
- Ozkaya E.** An outbreak of aseptic meningitis due to echovirus type 30 in two cities of Turkey. *Eur J Epidemiol* 2003; 18: 823-826.
- Özkaya E.** Enterovirus enfeksiyonlarında tanısal yaklaşım. 3. Ulusal Viroloji Kongresi 9-13 Aralık 2007-Bursa, 26-30.
- Palacios G, Oberste MS.** Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J Neurovirol* 2005; 11: 424-433.

- Pallansch M, Roos R.** Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, (eds). *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007; 840-893.
- Racaniello VR.** Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, (eds). *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007; 796-838.
- Romero JR, Newland JG.** Diagnosis of viral encephalitides: nonzoonotic-associated viruses. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25(8): 739-740.
- Romero JR, Rotbart HA.** Enteroviruses. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover MC, (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: ASM Press, 2003; 1427-38.
- Romero JR.** Çeviren: Ozkaya E. Enteroviruses and Parechoviruses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington DC: ASM Press, 2008; 1392-1404.
- Rossman MG, Arnold E.** Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*. 1985, 317;12.
- Rotbart HA, Hayden FG.** Picornavirus Infections. *Arch Fam Med*. 2000; 9: 913-920.
- Rotbart HA.** Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 438-442.
- Rotbart HA.** Treatment of picornavirus infections. *Antiviral Research* 2002; 53: 83–98.
- Rossmann MG.** Picornavirus–receptor interactions. *Trends in Microbiology* 2002; vol. 10:324-331.
- Rotbart HA.** Viral meningitis. *Semin Neurol*. 2000; 20(3): 277-92.
- Rueckert RR.** , Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *Journal of virology* 1984; 0(3):957-9.
- Santos GPL.** Enterovirus meningitis in Brazil, 1998–2003. *J Med Virol* 2006; 78: 98-104.
- Sawyer MH.** Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Curr Opin Pediatr* 2002;13(1): 40-47.
- Sayiner A.** Viral santral sinir sistemi Enfeksiyonlarında tanı. *ANKEM Derg* 2005; 19(2): 129-144.
- Smalling TW, Sefers SE.** Molecular approaches to detecting herpes simplex virus and enteroviruses in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 2002;40(7): 2317-2322.
- Stanway G.** Human parechoviruses-biology and clinical significance. *Rev Med Virol* 2000; 10: 57-69.

Topçu AW. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Söyletir G, Doğanay M, (Eds), Nobel Tıp Kitapevleri, 2008; 1375-1388.

Tunkell AR, Scheld WM. Acute meningitis. In: Mandell LG, Bennet JE, Dolin R, (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, 2005;1083-1120.

Tunkell AR. Approach to the patient with central nervous system infection. In: Mandell LG, Bennet JE, Dolin R, (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, 2005; 1079-1083.

Yuan J. Enterovirus A71 Proteins: Structure and Function. Front Microbiol. 2018 Feb 21;9:286.

Zeichhardt H, Grunert HP. Enteroviruses. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA. Clinical Virology Manual. 3th ed. Washington DC: ASM Press, 2000; 252-269.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ÖZÇOLPAN Güneş
Uyruk : T.C.
Doğumyerivetarihi : Gaziantep / 29.10.1979
E-mail : gunes.soz@gmail.com
YabancıDil : İngilizce

EĞİTİM

Uzman Doktor

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Tıpta Uzmanlık	Dokuz Eylül Üni. Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji AD	Mayıs 2009
Lisans	Ege Üni. Tıp Fak.	Haziran 2003

BURSLAR ve ÖDÜLLER

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2015-....	ADÜ Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji AD	Dr. Öğr. Üyesi
2012-2015	Balıkesir Halk Sağlığı Laboratuvar	Uzman Doktor
2010-2012	MANİSA DEVLET HASTANESİ	Uzman Doktor
2004-2009	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI	Araştırma Görevlisi

AKADEMİK YAYINLAR

1.MAKALELER

1. KIRDAR SEVİN, ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, CEYLAN EMEL, EVCİ KİRAZ EMİNE DİDEM, AYDIN NERİMAN (2018). Circulating Respiratory Viruses İn Aydın Province. Journal of Environmental Protection and Ecology (JEPE), 19(3), 1389-1396. (Yayın No: 4732076)
2. GÜNDÜZ TURAN,senem akgul,ÖZÇOLPAN GÜNEŞ,LİMONCU MEHMET EMİN (2012). Investigation of inducible clindamycin resistance among clinical isolates of staphylococci. African journal of microbiology research (Yayın No: 4471145)
- 3.TOSUN SELMA,LİMONCU MEHMET EMİN,GÜNDÜZ TURAN,ÖZÇOLPAN GÜNEŞ,AKGUL SENEM (2013). Prevalence of Brucellosis in Manisa A Retrospective Study Including 2008 2012. Anatol J Clin Investıg (Kontrol No: 3191958)

2. PROJELER

- 1.MikroRNA'ların HBV İnfeksiyon Patogenezi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, ARAŞTIRMA PROJESİ, Yürütücü:ÖZÇOLPAN GÜNEŞ,Araştırmacı:KIRDAR SEVİN,Araştırmacı: KANDEMİR ALTAY,Araştırmacı:AYDIN NERİMAN, , 01/01/2016 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
- 2.Peptik Ülserli Hastalarda Helicobacter pylori tespitinde Hangi Testi Kullanalım?, ARAŞTIRMA PROJESİ, Araştırmacı:TUNA HURŞİDE,Araştırmacı:COŞKUN ADİL,Araştırmacı:CENGİZ ARZU,Araştırmacı:ÖZÇOLPAN GÜNEŞ,Araştırmacı:TÜRE MEVLÜT,Araştırmacı:YÜKSELEN ABDULVAHİT, 01/01/2016 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
- 3.Doğal bir ürün olan trans Cinnamic Asit'in insan patojeni bazı mantarlara karşı in vitro etkinliğinin araştırılması, ARAŞTIRMA PROJESİ, Yürütücü:HAZIR SELÇUK,Araştırmacı: AYDIN NERİMAN, Araştırmacı: KORKMAZGİL BERNA, Araştırmacı: ÖZÇOLPAN GÜNEŞ,Araştırmacı:ULUĞ DERYA,Araştırmacı:ÇİMEN HARUN, , 01/01/2016 (Devam Ediyor) (ULUSAL)

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. AYDIN NERİMAN, ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, PAT YAĞIZ, KIRDAR SEVİN (2018). Hepatit B Virüs Enfeksiyonunda Atipik Serolojik Profillerile Hbv Dna Düzeyleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4553674)
- 2.KIRDAR SEVİN, YAZICI ONUR, CEYLAN EMEL, ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, AYDIN NERİMAN (2018). ERİŞKİNLERDE SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARININ

- EPİDEMİYOLOJİK VE KLİNİK ÖZELLİKLERİ. Uluslararası tarım, çevre ve sağlık kongresi, 716-722. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4606692)
- 3.KIRDAR SEVİN, YAZICI ONUR, CEYLAN EMEL, ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, AYDIN NERİMAN (2018). Erişkinlerde Solunum Yolu Enfeksiyonlarının Epidemiyolojik ve Klinik Özellikleri. Uluslar arası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4553667)
- 4.ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, KIRDAR SEVİN, AYDIN NERİMAN (2018). Rhinovirus among children patients in Aydın province, Turkey. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious DiseasesMadrid, İspanya (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4471162)
5. KIRDAR SEVİN, ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, CEYLAN EMEL, EVCİ KİRAZ EMİNE DİDEM,AYDIN NERİMAN (2018). Circulating Respiratory Viruses in Aydın Province. 2nd International Urban, Environment and Health Congress (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4516873)
- 6.ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, SAYINER AYÇA ARZU (2009). Developing aReal-Time PCR Assay to Determine the Hepatitis B Virus DNA in Plasma. 12.Annual ESCV Meeting (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4471408)
- 7.KIRDAR SEVİN, ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, CEYLAN EMEL, AYDIN NERİMAN (2018).) Aydın İlinde Solunum yolu enfeksiyonu ön tanısıyla yatan hastalarda parainfluenza virusları ve özellikleri. The International Health Science and Life Congress (IHSLC 2018) Burdur, Türkiye (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4471172)

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. USLU MELTEM, KARATAŞ CANSU, GÜVEN MÜNEVVER, ŞENDUR NESLİHAN, BOZKURT ŞAVK EKİN, TATAROĞLU CANTEN, ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, KAYA ÜMMÜHAN (2018). Lepra: Aydın'da Yeni Tanı Alan İki Olgu. 27. Ulusal Dermatoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4471909)
2. ÖZÇOLPAN GÜNEŞ,KIRDAR SEVİN,AYDIN NERİMAN (2017). Hematolojik Maliniteli Hastalarda Hepatit C Virüsü (HCV) Seroprevalansı. 37. TMC kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4471186)
3. Babacan Ümit,ÖZÇOLPAN GÜNEŞ,AYDIN NERİMAN (2017). Padina pavinica'nın antifungal etkinliğinin araştırılması. Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3909427)
4. ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, PAT YAĞIZ, TELLİ MURAT (2017). Adnan Menderes Üniversitesi'nde İzole Edilen Mycobacterium Tuberculosis Kompleks izolatlarında Antitüberküloz İlaçlara Direnç Oranları. 4. ULUSALKLİNİK MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3910233)

5. KIRDAR SEVİN, ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, CEYLAN EMEL, AYDIN NERİMAN (2017). Solunum Yolu Enfeksiyonu Ön Tanısı İle Yatan Hastalarda Respiratuvar Sinsityal Virus Epidemiyolojisi. 4. ULUSAL KLİNİK MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4022398)
6. KIRDAR SEVİN, ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, CEYLAN EMEL, AYDIN NERİMAN (2017). Solunum yolu enfeksiyonu ön tanısıyla yatan hastalarda respiratuvar sinsityal virüs (RSV) epidemiyolojisi. 4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4471194)
7. ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, senem akgul, PEKİNTÜRK NİLÜFER, TOSUN SELMA (2011). Giderek artan bir sorun ESBP pozitif E. coli. 15. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4471350)
8. SENEM AKGUL, ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, PEKİNTÜRK NİLÜFER, TOSUN SELMA (2011). Pseudomonas aeruginosa suşlarına karşı antibiyotik direncinin yıllara göre değerlendirilmesi. 15. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4471339)
9. PEKİNTÜRK NİLÜFER, senem akgul, ÖZÇOLPAN GÜNEŞ (2011). Acinetobacter suşlarına karşı gelişen antibiyotik direncinin yıllara göre değişiminin değerlendirilmesi. 15. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4471383)
10. APPAK ÖZGÜR, ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, SAYINER AYÇA ARZU, ŞİŞMAN ALİ RIZA (2008). Beyin Omurilik Sıvısı Biyokimyasal Özellikleri ile HSV-DNA PCR İstemlerinin Uygunluğunun Karşılaştırılması. 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4471434)
11. SAYINER AYÇA ARZU, ÖZÇOLPAN GÜNEŞ, ÖZKUL AYKUT (2007). İnternal Kontrol İçeren Kalitatif HSV1/2 Real-Time PCR Testi Geliştirilmesi. 3. Ulusal Viroloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4471452)