

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KONYA BÖLGESİNDEKİ SOLUNUM YOLU PATOJENİ OLAN
İNSAN PARECHOVİRUSLARININ (HPeV) ARAŞTIRILMASI**

SEMİH TOKAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. MEHMET ÖZDEMİR

KONYA 2019

İç Kapak Sayfası

T. C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KONYA BÖLGESİNDEKİ SOLUNUM YOLU PATOJENİ OLAN
İNSAN PARECHOVİRUSLARININ (HPEV) ARAŞTIRILMASI**

SEMİH TOKAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. MEHMET ÖZDEMİR

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 181318004 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2019

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **Semih Tokak**'ın "**Konya Bölgesindeki Solunum Yolu Patojeni Olan İnsan Parechoviruslarının (HPeV) Araştırılması**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya/ 26.04.2019

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Mahmut BAYKAN

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Muhammed Güzel KURTOĞLU

Bolu İzzet Baysal

Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 13/05/2019 tarih ve 09/12 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmzası



APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “**Investigation Of Respiratory Tract Pathogen Human Parechoviruses (HpEV) In Konya Region**” by “**SEMİH TOKAK**” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of “**Medical Microbiology**”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan

Konya, Turkey / 26.04.2019

Principal Advisor

Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR

Necmettin Erbakan University

Meram Faculty of Medicine

Department of Medical Microbiology

Examination Committee Member

Prof. Dr. Mahmut BAYKAN

Necmettin Erbakan University

Meram Faculty of Medicine

Department of Medical Microbiology

Examination Committee Member

Prof. Dr. Muhammed Güzel KURTOĞLU

Bolu İzzet Baysal

Training and Research Hospital

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

Date and Signature



BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 26.04.2019

Öğrencinin Adı Soyadı: SEMİH TOKAK

İmzası: 

[illegible]

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum, hiçbir konuda yardımını esirgemeyen çok değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e, birçok konuda desteklerini aldığım, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mahmut BAYKAN'a, Anabilim Dalı Öğretim Üyelerimiz, Sayın Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Metin DOĞAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Fatma ESENKAYA TAŞBENT'e, tezimi 181318004 no'lu proje ile destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü yöneticilerine, tüm mikrobiyoloji laboratuvarı teknisyen ve personeline son olarak hayatımın her anında yanımda olarak beni destekleyen, hayatımın en önemlileri ve en değerlileri aileme ve eşime sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak Sayfası</i>	i
<i>Tez Onay Sayfası</i>	ii
<i>Approval</i>	iii
<i>Beyanat</i>	iv
<i>Turnitin Orjinallik Raporu</i>	v
<i>Teşekkür</i>	vi
<i>İçindekiler</i>	vii
<i>Şekiller listesi</i>	ix
<i>Tablolar listesi</i>	x
<i>Özet</i>	xi
<i>Abstract</i>	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Picornaviridae Familyasının Taksonomisi</i>	2
2.2. <i>Parechovirus Genusu</i>	3
2.3. <i>Virus yapısı ve genomu</i>	6
2.4. <i>HPeV Reseptörleri</i>	7
2.5. <i>Hücre Tropizmi ve Reseptör Etkileşimleri</i>	8
2.6. <i>Replikasyon Stratejisi</i>	8
2.7. <i>HPeV'lerin Epidemiyolojik Özellikleri</i>	10
2.8. <i>HPeV'nin Mevsimsel Dağılımı</i>	13
2.9. <i>HPeV Enfeksiyonlarının Klinik Özellikleri</i>	14
2.10. <i>Yeni doğan Enfeksiyonları</i>	15
2.11. <i>HPeV Enfeksiyonlarının Tanısı</i>	17
2.11.1. <i>Hücre Kültürü</i>	17
2.11.2. <i>Serolojik Testler</i>	18

2.11.3 Moleküler Teknikler	18
2.12. Tedavi ve Korunma	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Solunum Yolu Örneklerinin Alınması ve Saklanması.....	20
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	20
3.2.1. Kullanılan Aletler	20
3.2.2. Kullanılan Kit ve Kimyasal Malzemeler	21
3.3. Solunum Yolu Örneklerinden RNA İzolasyonu	21
3.3.1. Nazofaringeal Sürüntü Örneklerinden Viral Nükleik Asit İzolasyonu Protokolü 21	
3.4. Multipleks RT-PZR İşlemi	23
3.4.1. Sonuçların Değerlendirilmesi	24
3.5. Viral RNA'nın konvansiyonel RT-PZR ile tespit edilmesi.....	25
3.5.1. RT-PZR ürünlerinin görüntülenmesi.....	27
3.6. Sekans Analizi	28
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	35
7. KAYNAKLAR	36
8. EKLER.....	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Picornaviridae virus familyasının sınıflandırılması.	3
Şekil 2.2. Parechovirus genomunun organizasyonu.	7
Şekil 2.3. Virusun konak hücre içine girişi.	10
Şekil 3.1. Qiagen EZ1 Advanced (Hilden, Almanya) cihazının bölümleri.	23
Şekil 3.2: Karışımların kuyucuklardaki yerleşimi	23
Şekil 3.3. Sonuçların değerlendirilmesi	24
Şekil 3.4. Solunum yolu pozitif örnek	25
Şekil 3.5. Solunum yolu pozitif örnek	25
Şekil 3.6. Solunum yolu negatif örnek.....	25
Şekil 3.7. PCR sonucunda elde edilen bantların elektroforez görüntüsü	27
Şekil 4.1: HPeV saptanan olguların aylara göre dağılımı	30
Şekil 4.2: HPeV saptanan olguların mevsimlere göre dağılımı	30
Şekil 4.3. HPeV genotiplerinin filogenetik ağaçtaki yerleşimi.....	32

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Parechovirus genotiplerinin keşfedildiği yıla, yere, alınan örneğe ve kaynağa göre listesi	5
Tablo 2.2. HPeV ile enfekte insanlar üzerine yapılan son çalışmaların yaşa, yıla, çalışılan popülasyona, virus tipine ve aylara göre dağılımı	12
Tablo 3.1. Solunum yolu örnekleri için PZR döngüsü.....	24
Tablo 3.2. Konvansiyonel RT-PZR protokolü.....	26
Tablo 3.3. Konvansiyonel RT-PZR aşamaları	26
Tablo 3.4. Tris-Borat-EDTA (TBE) Solüsyon Hazırlama Formülasyonu (5x/lt).....	28
Tablo 4.1: Çalışmaya dahil edilen HPeV pozitif hastaların kliniklere göre dağılımı	29
Tablo 4.2: HPeV pozitif hastaların epidemiyolojik özellikleri	29

ÖZET

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA BÖLGESİNDEKİ SOLUNUM YOLU PATOJENİ OLAN İNSAN PARECHOVİRUSLARININ (HPeV) ARAŞTIRILMASI

Semih TOKAK

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2019

İnsan parechovirusu (HPeV) Picornaviridae familyasında Parechovirus cinsini oluşturan, zarfsız, tek iplikli RNA virusudur. Bu viruslara olan ilgi son 20 yılda, insan ve hayvan hastalıkları ile ilişkileri nedeniyle önemli oranda artmıştır. HPeV'ler yaygın patojenler olup dünya genelinde özellikle küçük çocukları enfekte etmektedir. HPeV'lerin bulaşma yolu fekal-oral yolla meydana geldiği görülmekte olup çoğu HPeV enfeksiyonu solunum yolu enfeksiyonu ve gastroenterit ile ilişkili olarak hafif seyirlidir. HPeV'ler, dünya çapında yayılan yaygın patojenler olan 19 genotip (HPeV1-19) içermektedir. Bu çalışma ile Parechovirusların epidemiyolojik özelliklerini daha iyi anlaşılması ve bölgemizdeki genotip dağılımını belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışma için Konya'da solunum yolu enfeksiyon şüphesi olan hastalardan Eylül 2017 ile Mart 2019 arasında solunum yolu örnekleri toplandı. Çalışmaya toplam 2200 solunum yolu örneği dahil edildi. Solunum yolu örneklerinde multipleks PZR ile HPeV RNA araştırıldı ve pozitif bulunan HPeV'lerin spesifik genotipleri RT-PZR ile VP1 bölgesinin amplifikasyonuna ardından sekans analizi ile tanımlandı.

Multipleks PZR ile analiz edilen 2200 solunum yolu numunesinin 11'inde (%0.5) HPeV tespit edildi. HPeV pozitif örnekler daha sonra yapılan RT PZR ve sekans analizinin ardından HPeV1 (n: 3), HPeV4 (n: 1) olarak genotiplendirildi. HPeV öncelikle 3 yaşın altındaki çocuklarda tespit edildi. HPeV'lerin, Ocak-Kasım aylarında belirgin bir mevsimsel artışa sahip olmak üzere yıl boyunca dağılım gösterdiği belirlendi. Elde edilen bulgular Konya'da solunum yolu örneklerinde HPeV1 ve HPeV4 genotiplerinin dolaşımda olduğunu göstermiştir.

Bu çalışma ülkemizdeki solunum yolu enfeksiyonlarında HPeV'nin neden olduğu ilk çalışmadır. HPeV'ler özellikle yenidoğanlarda, sepsis, menenjit veya ensefalitli küçük çocuklarda etken olarak göz önünde bulundurulmalı ve HPeV tespiti için rutin test panelleri hastane laboratuvarlarında bulunmalıdır. Moleküler epidemiyolojik yöntemler kullanılarak yapılan ileri çalışmalar etiyolojide yer alan tüm HPeV'lerin genotiplerinin belirlenmesi ve bu enfeksiyonların daha iyi izlenmesi için oldukça yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Genotiplendirme; HPeV; RT-PZR; Solunum yolu enfeksiyonları

ABSTRACT

T.C.

NECMETTIN ERBAKAN UNIVERSITY
HEALTH SCIENCE INSTITUTE

INVESTIGATION OF RESPIRATORY TRACT PATHOGEN HUMAN PARECHOVIRUSES (HPEV) IN KONYA REGION

Semih TOKAK

DEPARTMENT OF MEDICAL MICROBIOLOGY
M.Sc THESIS / KONYA-2019

Human parechovirus (HPeV) are non-enveloped, single-stranded RNA viruses that form the genus Parechovirus in the family Picornaviridae. The interest in these viruses has notably increased over the past 20 years because of their strengthened associations human and animal diseases. HPeVs are widespread pathogens, infecting mainly young children worldwide. Transmission of HPeVs seems to occur via the fecal-oral route and most HPeV infections are mild, associated with respiratory tract infection and gastro-enteritis. HPeVs include 19 genotypes (HPeV1 to 19) that are globally distributed common pathogens. The aim of this study is to better understand the epidemiological features of HPeV and to examine the clinical features more closely.

Respiratory tract samples were collected from patients with suspected HPeV between September 2017 and March 2019 in Konya. Total 2200 of respiratory tract samples were included in the study. HPeV RNA were investigated in respiratory tract samples by reverse transcription-PCR and specific genotypes of enteroviruses were identified HPeV by direct DNA sequencing of the VP1 region.

HPeV was detected in 11 (0.5%) of 2200 airway samples analyzed by multiplex PCR. HPeV positive samples were then genotyped by RT PCR and sequence analysis followed by HPeV1 (n: 3), HPeV4 (n: 1). It was determined that HPeVs were distributed throughout the year in January-November with a significant seasonal increase. The findings showed that HPeV1 and HPeV4 genotypes were circulating in respiratory tract samples in Konya.

This is the first study of HPeV in respiratory tract infections in our country. HPeVs should be considered as causative agents especially in young infants with sepsis, meningitis, or encephalitis and routine testing panels for HPeV detection should be available in hospital laboratories. Further studies using molecular epidemiological methods will be very useful for identifying genotypes of all HPeVs involved in the etiology and for better monitoring of these infections.

Keywords: Genotyping; HPeV; Respiratory tract infection; RT-PCR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Human Parechovirus (HPeV) Picornaviridae familyasında Parechovirus genusunda zarfsız tek iplikli RNA virusudur. HPeV'ler ilk tanımlandığında hücre kültür karakteristiklerinin temel alınmasıyla Enterovirus genusu içinde echovirus 22 ve echovirus 23 olarak sınıflandırılmıştır. Filogenetik analizler bu virusların genetik olarak Picornavirus genuslarından farklı olduğunu göstermiş (Stanway ve ark. 2000; Joki-Korpela ve Hyypiä 2001) ve bu viruslar Parechovirus ismiyle tekrar sınıflandırılmıştır (Stanway ve ark. 2005).

HPeV'ler yeni doğanlarda viral sepsis benzeri hastalıkların ve menenjitin en önemli ikinci nedenidir (Benschop ve ark. 2006; Wolthers ve ark. 2008). Bu hastalıkların çoğuna HPeV3 neden olmakta ve bu genotip aynı zamanda en patojenik tip olarak karşımıza çıkmaktadır (Harvala ve ark. 2009). Bu tip aynı zamanda paraliz, yeni doğan sepsis benzeri hastalık ve ani ölümle ilişkilidir (Boivin ve ark. 2005; Harvala ve ark. 2009; Yuzurihara ve ark. 2013). Bu viruslara olan ilgi geçmişte bilim camiasında çok az olsa da günümüzde insan ve hayvan hastalıklarıyla ilişkilendirildikleri için son 15 yılda önemli derecede artış göstermiştir.

Bu çalışma ile solunum yolu semptomlu hastalarda Parechovirusların prevalansı ve yaş gruplarına göre HPeV'lerin genotiplendirilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Parechovirus genusu, iki tür içermektedir: Bunlar; HPeV ve Ljungan virus (LV)'tur. LV ilk defa İsviçre'de tarla farelerinden izole edilmiştir. LV'nin fiziksel ve moleküler özellikleri yeni bir parechovirus olduğunu ancak HPeV'dan farklı olduğunu göstermiştir. LV ayrıca kuzey Amerika'da kemirici türlerinden de izole edilmiştir (Nix ve ark. 2008; Pham ve ark. 2010). Bu virusun İsviçre'deki oryantiring yapan kişilerde ölümcül miyokardit olgularının ortaya çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir. Ancak bugüne kadar insan enfeksiyonuyla ilgili herhangi bir delil elde edilememiştir. Bu virus familyasına ait üyeler; küçük, zarfsız, tek bir polipeptidi kodlayan 7 ile 88 kilobazlık pozitif iplikli RNA genomuna sahip RNA viruslarıdır. Bu familya aynı zamanda Picornaviridae familyasının en iyi bilinen ve iyi bir şekilde karakterize edilen genusu olan Enterovirus gibi sayısız önemli insan ve hayvan patojenlerini de içermektedir. Bu genus polimiyelit etkeni poliovirus, herpanjina; el, ayak ve ağız hastalıkları, ciddi neonatal hastalık etkeni Cocksackie ve Enterovirus türleri ve soğuk algınlığının en büyük etkeni olan Rhinovirusları içermektedir. Enterovirusların aksine Parechoviruslar keşfedildiğinden bu yana çocuklarda hafif seyirli ya da asemptomatik hastalıklarla ilişkilendirilmekte dolayısıyla uzun zamandır klinik olarak ilişkisiz olduğu düşünülmektedir (Ito ve ark. 2004). Ancak HPeV3 küçük çocuklarda sepsis benzeri hastalıklarla ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilmektedir (Harvala ve ark. 2010). 2004'te yapılan bir çalışmada HPeV'lerin öneminin sadece artmadığı aynı zamanda klinik uyumluluğunun da aynı oranda arttığı bulunmuştur.

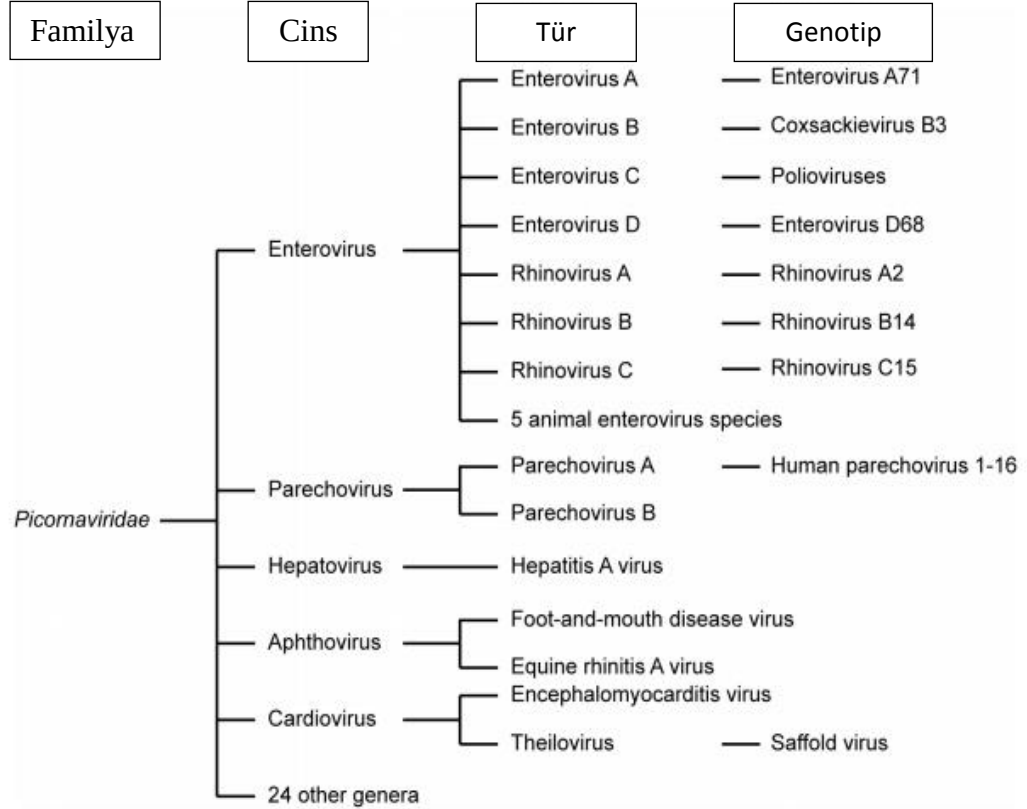
2.1. *Picornaviridae* Familyasının Taksonomisi

Picornaviridae ailesi 26 cins ve 46 türden meydana gelmektedir. Bu virus familyasındaki üyelerin sayısı moleküler metodlardaki gelişmeler sayesinde devamlı olarak artmaktadır. *Picornaviridae* familyasının sınıflandırılması en son Mart 2014'de gerçekleşmiştir (Adams ve ark. 2013). *Picornaviridae* kriterlerine uyan virusların tanımlanması sürdükçe yeni güncellemelerin olması beklenmektedir.

Picornaviruslar genotipik olarak tür düzeyinde sınıflandırılır. Sekans metodlarındaki gelişmelerden önce, picornavirusların tiplendirilmesi spesifik antiserum ile virus izolatlarının nötralizasyonu yöntemine dayanmaktaydı, dolayısıyla viral tipler serotip olarak adlandırılmaktaydı. Serotiplendirmenin yerini

bugün genotipik tiplendirme ya da genotiplendirme almıştır (Viral proteinlerin sekanslanmasıyla tipler tanımlanır). Genotiplendirme metoduyla identifiye edilen tür sayısında önemli derece artış meydana gelmiş şu an 450'den fazla tür bu sayede tiplendirilmiştir (Şekil 2.1.).

Şekil 2.1. *Picornaviridae* virus familyasının sınıflandırılması. Klinik olarak önemli cinsler tanımlanmıştır. Tür ve bazı genotip/serotip örnekleri verilmiştir (Lonneke van der Linden ve ark. 2015).



2.2. Parechovirus Genusu

İlk iki Parechovirus, Enterovirus olarak sınıflandırılan ve Echovirus 22 ve 23 isimli virüsler olarak tanımlanmıştır (Wigand ve Sabin 1961). 1999 yılında Parechoviruslar moleküler; biyolojik ve fonksiyonel farklılıklardan temel alınarak Enteroviruslardan ayrılmıştır (Hyypia ve ark. 1992; King ve ark. 2000)

Echovirus 22 ve 23 İnsan Parechovirus 1 ve 2 olarak yeniden adlandırılmış, moleküler virus keşiflerindeki ve reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyon teknolojisindeki gelişimler yeni Parechovirusların tanımlanmasına imkan sağlamıştır.

İnsan Parechoviruslarının (HPEV) ilk konakları insanlar olmasına rağmen, bazı Parechovirus tipleri insanlarla aynı ortamda yaşayan primatlarda da

gözenmiştir. Bu primat türleri, vahşi Afrika maymunu (*Mandrillus sphinx*) ve güney domuz kuyruklu şebeği (*Macaca nemestrina*) (Oberste ve ark. 2013a), ayrıca insan popülasyonlarıyla yakın temasta olan ortamlarda yaşayan türleri içermektedir (Oberste ve ark. 2013b). HPeV 12 ve HPeV 15 insanların yanısıra Hint şebeği (*Macaca mulatta*)nde olduğu belirlenmiştir. Bu bulguların yanısıra HPeV 1, 4, 5, 6 ve 14 genotipleride şebeklerde rastlanmıştır (Shan ve ark. 2010; Oberste ve ark. 2013b). HPeV17 ise 2014 yılında Fildişi Sahilindeki 9 aylık bir kız çocuğundan, HPeV18 ise Ganalı çocuk dışkılarından izole edilmiştir (Böttcher ve ark. 2017; Graul ve ark. 2017) (Tablo 2.1).

Yapılan tahminlere göre, mevcut tüm HPeV'ler 400 yıllık bir geçmişe uzanan ortak bir ataya sahiptir (Faria ve ark. 2009). Bu tek bir atadan farklı soyların ortaya çıkışı, RNA viruslarında olduğu gibi HPeV'lerin yüksek mutasyon oranı göstermeleri onlara hızlı bir evrim sağlamaktadır (Drake ve Holland 1999; Faria ve ark. 2009). Genotipler arasında meydana gelen rekombinasyon, onların genomik kompozisyonunu büyük oranda etkilemekte ve genotip evrimini teşvik etmektedir (Benschop ve ark. 2008c; Sun ve ark. 2012). Rekombinasyonlar HPeV genomunda tek nokta mutasyonundan daha büyük değişikliğe neden olmaktadır (Baumgarte ve ark. 2008).

Tablo 2.1. Parechovirus genotiplerinin keşfedildiği yıla, yere, alınan örneğe ve kaynağa göre listesi

Genotip	Örnekleme yılı	Yer	Alınan Örnek	Kaynak
HPeV1	1956	ABD	Diyareli çocuk dışkısı	Wigand ve Sabin, 1961
HPeV2	1956	ABD	Diyareli çocuk dışkısı	Wigand ve Sabin, 1961
HPeV3	1999	Japonya	1 yaşındaki geçici felçli, ateşli ve diyareli çocuk dışkısı	Ito ve ark. 2004
HPeV4	2002	Hollanda	8 aylık ateşli bebek dışkısı	Benschop ve ark. 2006a
HPeV5	1986	ABD	Yüksek ateşli 2 yaşındaki çocuk dışkısı	Oberste ve ark. 1998
HPeV6	2000	Japonya	Reye sendromlu 1 yaşındaki çocuk BOS	Watanabe ve ark. 2007
HPeV7	2007	Pakistan	Sağlıklı 2 yaşındaki çocuk dışkısı	Li ve ark. 2009
HPeV8	2006	Brezilya	Enteritli çocuk dışkısı	Drexler ve ark. 2009
HPeV9	2004	Bangladeş	Dışkı	Nix ve ark. 2013 Oberste ve ark. 2013b
HPeV10	2005	Sri Lanka	Gastroenteritli çocuk dışkısı	Kim Pham ve ark. 2010
HPeV11	2005	Sri Lanka	Gastroenteritli çocuk dışkısı	Pham ve ark. 2011
HPeV12	2004	Bangladeş	Maymun dışkısı	Nix ve ark. 2013 Oberste ve

				ark. 2013b
HPeV13	2005	Bangladeş	İnsan dışkısı	Oberste ve ark. 2013b
HPeV14	2004	Hollanda	İnsan dışkısı	Benschop ve ark. 2008b
HPeV15	2008	Bangladeş	Maymun dışkısı	Oberste ve ark. 2013b
HPeV16	2008	Bangladeş	İnsan dışkısı	Oberste ve ark. 2013b
HPeV17	2017	Fildişi Sahili	İnsan Dışkısı	Böttcher ve ark. 2017
HPeV18	2017	Gana	İnsan Dışkısı	Garul ve ark. 2017
HPeV19	2019	Malavi	İnsan Dışkısı	Brouwer ve ark. 2019

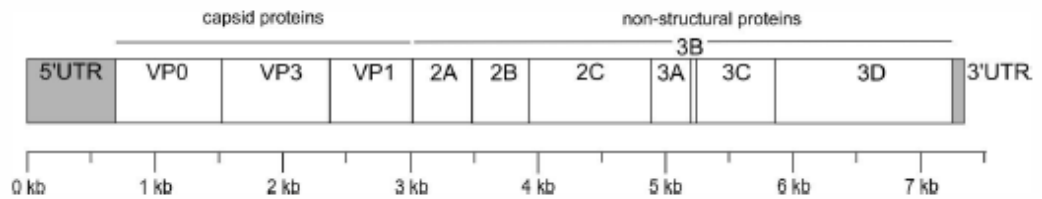
2.3. Virus yapısı ve genomu

Diğer Picornaviruslarla benzer olarak Parechoviruslar zarfsız, tek iplikli RNA viruslarıdır. Parechovirus virionları yaklaşık 22-30 nm olup ikozahedral simetriye sahiptir. Genomları 73 kb'lık protein kılıfla kaplı RNA molekülünden ibarettir. Bu molekül translasyona uğramayan 5' ve 3' bölgelerinden meydana gelmekte bunu tek bir protein kodlayan tek bir okuma çerçevesi takip etmektedir. 5' ucundaki translasyon olmayan bölge tip II internal ribozom giriş bölgesini (IRES) içeren ikincil bir yapıyı meydana getirmektedir (Nateri ve ark. 2000; 2002). Bu genom IRES aracılı translasyon için mRNA olarak rol oynamakta ve viral proteinlerin tümünü içeren bir poliproteini üretmektedir. Tasarlanan 3 yapısal protein, viral protein 0 (VP0), 1 (VP1) ve 3 (VP3) bu poliprotein 5' ucunda yer almaktadır. 3 yapısal proteinin kombinasyonu da viral kapsidin çekirdek yapısını oluşturmaktadır. İkozahedral kapsid bu çekirdek birimin 60 kopyasının bir araya getirilmesinde rol oynamaktadır.

VP0, VP1 ve VP3'ü yapısal olmayan 2A-2C ve 3A-3D proteinleri izlemektedir. Bu proteinlerden 2C proteini NTPaz aktivitesine sahipken replikasyon oluşumuna da katılmaktadır (Krogerus ve ark. 2003; Samuilova ve ark. 2006). 3B

proteini RNA replikasyonunda primer rol üstlenirken, 3C proteini poliprotein kesiminde proteaz olarak görev yapmaktadır (Schultheiss ve ark. 1995). 3D protein RNA bağımlı RNA polimerazdır ve genom replikasyonunu yürütmektedir. 2A, 2B ve 3A proteinlerinin fonksiyonları henüz detaylı bir şekilde bilinmemesine rağmen 2A proteininin viral replikasyonda işleve sahip olduğu ve 2B proteinin membran geçirgenliğinde işleve sahip olduğu düşünülmektedir (Stanway ve ark. 2000; Samuilova ve ark. 2004). Türler arası genom rekombinasyonu enteroviruslar arasında oldukça iyi bilinen bir fenomendir (Wigand ve Sabin 1961; Harvala ve ark. 2010). HPeV1-6 genomunun tam analizi ile farklı tipler arasında genomların oldukça yüksek mozaik olduğu VP1 üzerinde tip spesifik kümelenmenin olduğu gözlemlenmiştir, bu tip spesifik ayırım, yapısal olmayan 3D pol proteininde mevcut değildir. HPeV3'de bu durum farklılık göstermekte olup, kümelenme farklı HPeV3 suşlarının hem VP1 hem de 3D pol protein bölgesinde gözlemlenmiştir (Şekil 2.2). HPeV1, 4, 5 ve 6 suşları arasındaki rekombinasyon sıklıkla NS bölgesinde gözlemlenmekte ancak HPeV3 sekansında tip spesifik segregasyon kaybı gösterilmiş olup bu durum farklı bir hücre tropizmi ile açıklanmıştır (Ehrnst ve Eriksson 1993; Ghazi ve ark. 1998).

Şekil 2.2. Parechovirus genomunun organizasyonu. Her bir genomun fonksiyonu şuanki mevcut bilgilere göre düzenlenmiştir. Sonda yer alan gri kutucuklar transle edilemeyen iki bölgeyi göstermektedir (UTR).



2.4. HPeV Reseptörleri

HPeV1, $\alpha\beta$ 1 ve $\alpha\beta$ 3 integrinlerini reseptör olarak kullanmaktadır ancak her iki integrinin de ifade edildiği hücrelerde HPeV1, muhtemelen $\alpha\beta$ 3 integrinine bağlanmaktadır (Triantafyllou ve ark. 2000). İntegrinler, lökositlerin de dahil olduğu adezyon moleküllerinin önemli bir grubunu oluşturmakta ve arginin-glisin-aspartik asid (RGD) motifine bağlandığı bildirilmektedir. İntegrin β 1, ekstraselüler matriksdeki hücre bağlanmasında rol alırken, β 3 integrinler ise inflamasyon yerinde

trombosit ve nötrofillerin etkileşimlerinde ya da vasküler hasar bölgelerinde yer almaktadır (Roitt ve ark. 2001) Toll-Like-Reseptör 7 (TLR) ve TLR8'in, HPeV1 için konak immün algacı olarak görev yaptığı gösterilmiştir. Tek iplikli RNA genomu, TLR ile endozomal bölümlerde tespit edilmiştir. Bu, konak immün yanıtını başlatacak proinflamatuvar moleküllerin sentezini sağlayan sinyalleri etkinleştirmektedir (Triantafilou ve ark. 2000). Ayrıca HPeV2, HPeV4 ve HPeV5 de VP1'in C terminal ucunda RGD motifine sahiptir. RGD motifi, HPeV1 enfeksiyonları için gerekli olmasına rağmen HPeV3 için gerekli değildir (Ghazi ve ark. 1998; Ito ve ark. 2004). Bu nedenle RGD bağımsız bir yol ve hücre girişinin muhtemel olduğu düşünülmektedir (Ito ve ark. 2004).

2.5. Hücre Tropizmi ve Reseptör Etkileşimleri

BOS'ta HPeV3'ün, belirgin olarak sık saptanması, HPeV tipleri arasında hücre tropizmleri açısından farklılık olduğunu düşündürmektedir. HPeV3'ün sınırlı sayıda hücre kültüründe üremesi ve zayıf sitopatik etkiye neden olması da bunu kanıtlamaktadır. HPeV3, farklı bir tipte enfekte hücreyle nadiren etkileşime geçmektedir. Hücre tropizmlerindeki farklılık, değişik reseptör kullanımlarıyla açıklanabilmektedir. HPeV1,2 ve 4-6; VP1'in C terminal ucunda, el ayak-ağız hastalığı virusu, koksaki A9, ekovirus 9 gibi diğer virusların hücre yüzey integrinlerine bağlanmak için kullandıkları RGD motifini içermektedir. RGD motifi HPeV1 enfeksiyonları için gerekli olmasına rağmen HPeV3, bu motife sahip değildir. Dolayısıyla HPeV3'ün RGD'den bağımsız farklı bir reseptör yoluyla enfeksiyona neden olduğu varsayılmakta ancak bu durum henüz net olarak bilinmemektedir. Tropizmin belirlenmesinde, organ gelişimi sırasında ifade edilen reseptörlerin önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Gelişim sırasında ifade edilen spesifik reseptörlerin farklı olması; HPeV3'ün, büyük çocuk ve yetişkinlerde nadiren görülmesini ya da hiç görülmemesini desteklemekte ve yenidoğanların neden enfeksiyona daha eğilimli olduğunu da kısmen açıklamaktadır (Benschop ve ark. 2012)

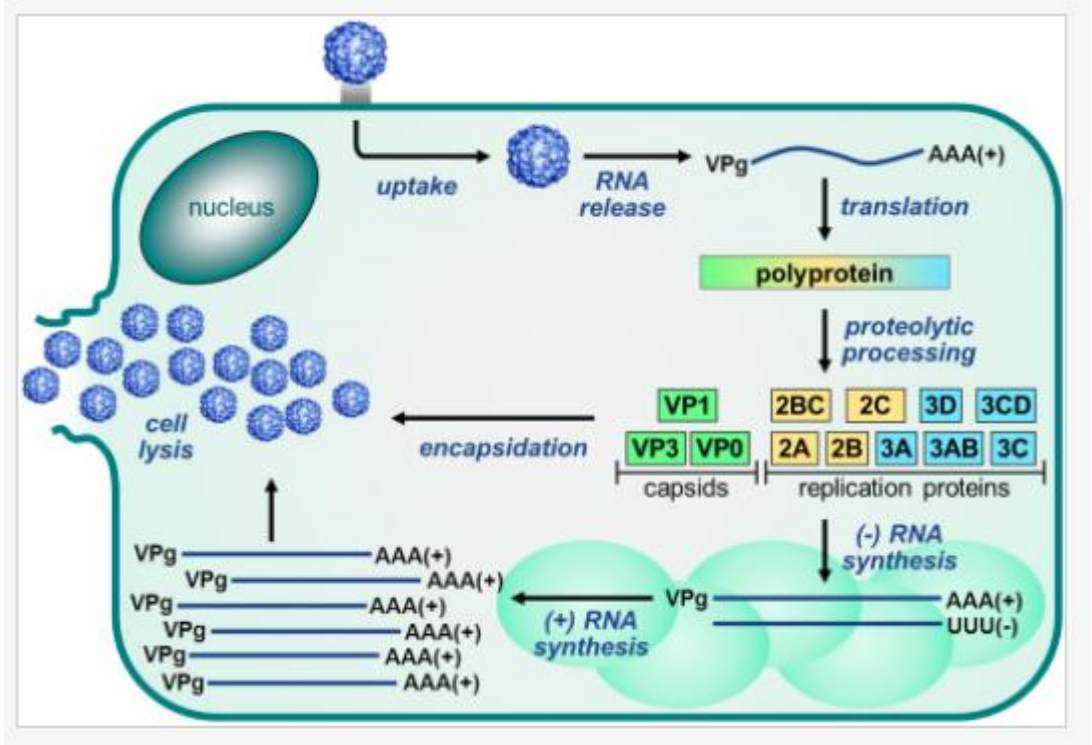
2.6. Replikasyon Stratejisi

Parechovirusların replikasyon stratejisi diğer Picornaviruslarla benzerlik göstermektedir. Şu anki bilgiler ağırlıklı olarak Picornavirus çalışmalarına dayansa da replikasyon döngüsünün belli adımları özellikle HPeV1 ile karakterize

edilmektedir. Konak hücre membranındaki hedef reseptörlerin tanınması Parechovirus yaşam döngüsünü başlatmaktadır. HPeV1 VP1'in C terminalinde RGD motifini kullanarak $\alpha\beta$ integrinlere bağlanmaktadır (Triantafilou ve ark. 2000; Seitsonen ve ark. 2010). Fakat bu motif sadece HPeV genotiplerinin bazısında mevcuttur. HPeV3 ve son zamanlarda keşfedilen HPeV tipleri RGD motifinden yoksundur ve reseptörlerin yolları halen bilinmemektedir (Joki-Korpela ve ark. 2001). HPeV1 çalışmaları, Parechovirusların reseptörlere bağlanmayı takiben konak hücreye klatrin aracılı endolitik yol izini kullanarak giriş yaptığını göstermiştir. İnternalizasyonu takiben, Parechovirus viral genomu sitozol içine salınmakta ve genomu konak hücre ribozomlarına ulaşmakta IRES aracılı translayonu mRNA üstlenmektedir. Viral protein translayon ve 3C proteinin proteolitik olarak parçalanmasıyla üretilmekte ve viral proteinler üretildikten sonra yaşam döngüsü RNA replikasyonuna dönmektedir.

Bu replikasyon prosesi viral peptid 3D ile yönetilmektedir. İlk olarak pozitif 3D RNA ipliklerini komplement negatif iplikli RNA'ya replike edilmekte, bu iplik yeni viral genom için kalıp ödevi görmektedir. HPeV'nin RNA replikasyonu veziküler yapılarda meydana gelmektedir. HPeV1 için replikasyon kompleksi golgi ilişkili veziküllerden oluştuğu bu oluşumun viral peptid3D aracılığıyla meydana geldiği düşünülmektedir. Yeni üretilen viral moleküller, yapısal proteinler ve 5' vpg kaplı pozitif iplikli RNA lar yeni virus partikülünü oluşturmak için bir araya gelmektedir. Yeni oluşan viral partiküller enfektif olmadan önce bir olgunlaşma basamağı geçirmektedir. Olgunlaşma prosesinin arkasında yatan mekanizma halen bilinmemektedir. VP0 proteininin VP2 ve VP4 proteinlerine ayrışması HPeV'lerde olmadığı için bu mekanizma çoğu Picornaviruslarda farklılık göstermektedir (Stanway ve ark. 2000) (Şekil 2.3) Picornavirusların litik yaşam döngüsünde, yeni oluşan virionlar konak hücre lizisinin ardından serbest kalmaktadır (Cann 2012). Picornavirusların çoğu enfeksiyon sürecinde viral proteinlerin üretimini arttırmak için konak hücre proteinlerinin translayonunu bozmaktadır. Parechoviruslarda bu adım mevcut değildir (Coller ve ark. 1990; Stanway ve ark. 2000).

Şekil 2.3. Konak hücrenin tanınmasıyla virus yaşam döngüsü başlar ve endositoz aracılığıyla viral giriş sağlanır. Viral RNA sitozolde serbest kalır, RNA viral protein üretimi için translayona uğratılır, replikasyonda genom ve viral kapsid oluşumuna katılır. Yeni oluşan viral RNA konak hücreden ayrılmadan önce kapsid içinde paketlenir.



2.7. HPeV'lerin Epidemiyolojik Özellikleri

HPeV'ler küresel olarak dağılım göstermekte ve kıtalarda yerleşim gösteren tüm insanlarda görülebilmektedir. Bu virusların klinik özellikleriyle yapılan çoğu çalışma HPeV'lerin insan hastalıklarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu küresel dağılım HPeV tiplerinde farklılık gösterebilmektedir. Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) verilerine göre, 39 yıllık veriler değerlendirildiğinde ABD'de HPeV1'in tanımlanan tüm EV izolatlarına oranı %1,8 (880/49.637)'dir (Khetsuriani ve ark. 2006). HPeV 1-6 tipleri küresel dağılım gösterirken, diğer tiplerin dağılımının oldukça sınırlı olduğu belirlenmiştir. HPeV 7-16 genotipleriyle ilgili çok az bilgi mevcuttur. Güney Amerika ve Asya da HPeV 7, 8, 9 ve 12 genotipi gastrointestinal hastalıklı ya da bilinen klinik durumu olmayan çocuklarda rastlanmıştır (Drexler ve ark. 2009; Li ve ark. 2009; Zhang ve ark. 2011; Zhong ve ark. 2011; Alam ve ark. 2012; Alam ve ark. 2013; Nix ve ark. 2013; Oberste ve ark. 2013b). Genotip 10, 11, 13, 14 ve 15 Asya'daki gastroenteritik ya da asemptomatik çocuklarda ve maymunlardan elde edilen örneklerde rastlanmıştır (Kim ve ark. 2010; Pham ve ark. 2011; Oberste ve ark. 2013b; Alam ve ark. 2013). Hollandalı bir çocuğun dışkısında

bulunan HPeV 14 bu tip için Avrupa'daki tek rapordur (Benschop ve ark. 2008b). Genotip 16 ise Bangladeş'teki bir insan dışkısında tanımlanmıştır (Nix ve ark.2013; Oberste ve ark. 2013b). Birçok HPeV genotipi eş zamanlı olarak insan popülasyonları arasında dağılım göstermektedir. İskoçya ve Hollanda'dan alınan atık örneklerin sürveyans verileri HPeV lerin yüksek oranda mevcut olduğunu göstermiş ve HPeV1, 3 ve 6 genotiplerinin en yaygın görülen tipler olduğu bildirilmiştir (Lodder ve ark. 2013; Harvala ve ark. 2014). Kanada ve Finlandiya'dan elde edilen serolojik veriler çoğu bireyin iki yaşından önce HPeV1 enfeksiyonuna yakalandığını göstermektedir (Abed ve ark. 2007; Tauriainen ve ark. 2007). HPeV1 ve HPeV3 ağırlıklı olarak 3 yaş altındaki çocuklarda görüldüğü için, HPeV'lerin öncelikli hedefinin çocuklar olduğu düşünülmektedir (Grist ve ark. 1978; Khetsuriani ve ark. 2006; Harvala ve Simmonds 2009). HPeV1 ile enfekte çocukların ortalama yaşı (6.6 aylık), HPeV3 (1.3 aylık) ile enfekte çocuklardan önemli derecede yüksek olduğu bulunmuştur. 1983 ve 2005 yılları arasında ABD'de yürütülen çalışmalara göre birçok HPeV1 (%73) ve HPeV2 (%68) enfeksiyonlarının bir yaş altındaki çocuklarda meydana geldiğini göstermektedir (Khetsuriani ve ark. 2006). Bu gözlem HPeV'lerin hedefinin küçük çocuklar olduğunu bir kez daha doğrulamaktadır (Benschop ve ark. 2006b).

Başlıca küçük çocuklarda rapor edilmesine rağmen, birkaç rapor HPeV enfeksiyonlarının yetişkinlerde de gözlendiğini belirtmiştir. Japonya'da HPeV3, 30 yaşından büyük yetişkinlerde kas ağrısı olgularına neden olmuştur (Mizuta ve ark. 2012). Japonya'nın yanısıra yetişkinlerdeki HPeV bulguları Kanada ve Jameika'da rapor edilmiştir (Figueroa ve ark. 1989; Abed ve Boivin 2006; Watanabe ve ark. 2007). Çocuklardaki HPeV'lerin sayısı Enteroviruslardan farklılık göstermekte, tüm yaştaki bireylere etki etme eğilimindedir.

Farklı yaş aralıklarında HPeV ile enfekte kişilerden HPeV'ye karşı oluşan antikorlar serolojik olarak belirlenebilmektedir. HPeV1 için Finlandiyalı yetişkinlerin %95'inde antikor tespit edilmiştir. Bununla birlikte yeni doğan ve bebeklik döneminde yeni doğanların %95'i pasif olarak bağışıklanmış olup potansiyel olarak enfeksiyondan korunmaktadır. Yaş gruplandırması kullanılarak seropozitiflik oranının 2 aylık bebeklerde %22, 2 yaşındaki çocuklarda %88'e yükseldiği PZR temelli çalışmalar ile HPeV1 enfeksiyonunun yüksek insidansa sahip olduğu gösterilmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. HPeV ile enfekte insanlar üzerine yapılan son çalışmaların yaşa, yıla, çalışılan popülasyona, virus tipine ve aylara göre dağılımı

Yazarlar ve Ülke	Yıllar	Çalışılan popülasyon	HPeV prevalansı (örnekler)	Yıllara Göre Prevalans	Virus Tipi (Olgu Sayısı)	Yaş (Pozitif Olgu)	En Yoğun Olduğu Dönem
Kolehmainen ve ark. Finland	1996–2007	Çocuklar	% 6.4 (144/2236) (dışkı örnekleri)	Bildirim yok	HpeV1 (98) HpeV6 (4) HpeV3 (3)	<5 yaş	Eylül-Ekim
Walters ve ark. USA	2005–2009	<18 yaş	% 2.3 (10/421) (BOS)	2005 – 0 2006 – 2 2007 – 0 2008 – 0 2009 – 8	HPeV3 (10)	6–59 gün	Ağustos-Ekim
Harvala ve ark. United Kingdom	2005–2010	Tüm yaşlar	% 8.32 (31/3739) (BOS)	2005 – 0 2006 – 6 (1%) 2007 – 0 2008 – 14 (1.7%) 2009 – 0 2010 – 11 (2.2)	HPeV3 (30) HPeV1B (1)	<3 ay	Şubat-Ekim Mart-Haziran
Selvarangan ve ark. USA	2006–2008	Çocuklar	% 7 (58/780) (BOS)	2006 – 4/218 (2%) 2007 – 52/320 (17%) 2008 – 0	HPeV3 (52) HPeV1 (1)	<2 ay	Haziran-Ekim
Schuffenecker ve ark.	2008–2010	<5 yaş	% 2.9 (33/1128)	2008 – 3/286 (1%) 2009 –	HPeV3 (28) HPeV4	<3 ay	Nisan-Kasım

			(BOS)	6/359 (1.7%) 2010 – 24/483 (5%)	(1)		
France Piralla ve ark. Italy	2008– 2010	Tüm yaşlar	% 0.5 (19/352 5) (nazo- faringe al sürüntü)	2008 – 6 2009 – 7 2010 – 6	HpeV1 (11) HpeV3 (7) HpeV6 (1)	<30 yaş	Nisan- Kasım En yüksek Ekim- Kasım
Felsens tein ve ark. USA	2008– 2012	Çocuklar	% 2.7 (12/440) (BOS)	Bildirim yok	Bildirim yok	<5 yaş	Bildiri m yok
Chieoc hansin ve ark. Thailan d	2009– 2011	Tüm yaşlar	% 6.1 (46/759) (dışkı örnekle ri) 0.4% (12/295 7) (nazo- faringe al sürüntü)	2009 –22 2010 – 27 2011 – 9	HpeV1 (30) HpeV2 (5) HpeV3 (1) HpeV4 (2) HpeV5 (2) HpeV6 (15) HpeV10 (1) HpeV1 4 (2)	<2 yaş	Bildiri m yok

2.8. HPeV'nin Mevsimsel Dağılımı

HPeV enfeksiyonları yıl boyunca meydana gelebilmektedir. Enfeksiyonların oranı coğrafik bölgeler ve genotipler arasında değişiklik göstermektedir. HPeV1 enfeksiyonları tipik olarak yaz aylarının sonuna doğru kış aylarının başında en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. HPeV3 en sık Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında

izole edilmiştir. HPeV3 enfeksiyonu 1998 yılından itibaren sadece çift sayılar olmak üzere enfeksiyonları 2 yılda bir görülmektedir. Ülkemizde ise HPeV ile ilgili epidemiyolojik araştırma henüz rapor edilmemiştir.

2.9. HPeV Enfeksiyonlarının Klinik Özellikleri

Picornaviridae ailesinin diğer üyeleri gibi HPeV ilk olarak ince bağırsakta replike olmakta ve fekal-oral yolla bulaş gerçekleşmektedir. Ancak replikasyon solunum sisteminde de meydana gelmekte olup HPeV'lere solunum sekresyonlarında da rastlanabilmektedir (Harvala ve Simmonds 2009). HPeV genellikle dışkıyla dışarı atıldığı için, bu virusa dışkı örneklerinde de rastlanmaktadır (Noordhoek ve ark. 2008; Pineiro ve ark. 2010; Shoji ve ark. 2013). Gaitadan ortalama yayılma süresi 51 gün olarak gösterilmiştir ancak çocukların yaklaşık %10'unda 3 aydan fazla devam etmektedir (Harvala ve ark. 2010). Gastrointestinal ve respiratuar hastalık ile nedensel ilişkisini saptamak için iyi tanımlanmış kontrol gruplarını içeren ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

HPeV'nin gastrointestinal, solunum ve merkezi sinir sistemi ile ilişkili belirtileriyle ilgili tanısını içeren birkaç rapor mevcuttur. Bunların çoğunda en fazla karşılaşılan semptom diyaredir. DSÖ verilerine göre HPeV1 olgusunun %29'u gastroenteritli hastalar olduğu, HPeV1 enfeksiyonlu 109 İsveçli çocukla yapılan retrospektif çalışmada diyarenin en yaygın klinik bulgu olduğu, bunların %50'sinin etkeni hastaneden aldığı belirlenmiştir. Buna ek olarak, İsveç'te 40 yıllık bir süreyi kapsayan çalışmada nozokomiyal gastroenteritli HPeV2'li hastaların sayısının 4 olduğu belirlenmiştir. Çocuklarda enfeksiyon ile gastroenterit arasındaki ilişki 6 yaşından küçük diyareli 335 çocuğun %16'sının bu etkenle enfekte olduğunun belirlenmesiyle bir kez daha doğrulanmıştır. Bu insidans Amsterdam'da 5 yaşın altındaki hastanede yatan hastalardan alınan 1824 fekal örnektekiyle aynı bulunmuştur.

HPeV kan dolaşımına girebilmekte ve yayılarak organlara etki edebilmektedir. Tipik bir HPeV enfeksiyonu EV enfeksiyonuna benzerlik göstermektedir. HPeV enfeksiyonlarının klinik sayısı ve hastadaki etkisi sıklıkla hafif ya da asemptomatik olarak görülmektedir. Çocuğun yaşı ve HPeV'nin genotipi enfeksiyon seyrinin şiddetini ve sonlanımını etkileyen en önemli faktörlerdir.

HPeV'lere ilk olarak yaz ishalinden müzdarip olan çocuklarda rastlanmıştır. İlk tespit edildiğinden bu yana sayısız çalışma yürütülmüş bu hastalıkla ve gastroenterit etkeni diğer türlerle olan ilişkileri rapor edilmiştir. HPeV'lerin solunum yollarıyla ilişkili olduğunu belirten çalışmalarda büyük bir artış olmuştur. HPeV'lerin gastrointestinal ve solunum yolları hastalıklarının kesin etkeni olduğu halen kabul edilmektedir. HPeV ile ilişkili hastalıkların belirtileri her iki olgu da hafiftir. HPeV1 akut otitis media ile ilişkilidir. HPeV ile indüklenmiş enfeksiyonlarda en sık rastlanan tiptir (Tauriainen ve ark. 2008). HPeV3'ün neden olduğu Merkezi Sinir Sistemi (MSS) enfeksiyonlarında bebeklerin %95'inden fazlasında ateş ve huzursuzluk rapor edilmiştir (Wolthers ve ark. 2008). Çocukların %54-80'ninde; ateş veya hipotermi, dolaşım ve/veya solunum fonksiyon bozukluğunun (taşikardi ya da bradikardi, düşük kan basıncı ve/veya düşük saturasyon) olduğu sepsis benzeri hastalık görülür. HPeV3 enfeksiyonlarında sıklıkla görülen diğer semptomlar, makülopapüler döküntü, gastrointestinal ve solunum sistemi semptomlarıdır.

Nispeten yaygın gözlemlerin yanı sıra HPeV'ler birkaç sporadik olguda Guillan-Barré sendromu, miyokardit, nekrotizan enterokolit, hemolitik üremik sendrom, miyozit Reye's sendromu ve lenf bezi iltihabını da içeren ciddi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Çocuklarda HPeV tip 1, 3 ve 6'ya yumuşak felç olgularında rastlanmıştır (Figuerola ve ark. 1989; Ito ve ark. 2004; Watanabe ve ark. 2007). HPeV tip 4'e ilk olarak 2002 yılında ateşli yenidoğan Hollandalı bir bebekte rastlanmıştır (Benschop ve ark. 2006). O zamandan beri HPeV4 asemptomatik çocuklardan ve gastrointestinal ve solunum semptomlu çocuklarda rastlanmaktadır (Chen ve ark. 2009; Pajkrt ve ark. 2009; Boros ve ark. 2010; Zhang ve ark. 2011; Zhong ve ark. 2011). Birkaç olgudan baz alınan çalışmalarda HPeV4'ün TORCH sendromu ve lenf bezi iltihabı ilişkili olduğunu önermektedir (Schnurr ve ark. 1996; Watanabe ve ark. 2007).

2.10. Yeni doğan Enfeksiyonları

HPeV3 yeni doğanlarda MSS enfeksiyonlarına ve sepsis benzeri hastalıklara neden olabilmektedir (Harvala ve ark. 2010). HPeV enfeksiyonları, hafif seyirli klinik bulgular gösterdiği daha önceden belirlendiği için bu genotipin keşfinde ve HPeV ile olan klinik ilişkisi açısından ilgi sayısında önemli derecede artış olmuştur.

HPeV3 ile ilgili ilk raporlardan sonraki yıllarda özellikle geçtiğimiz son 10 yılda MSS tutulumlu ya da sepsis benzeri hastalıklı kişilerde ciddi HPeV enfeksiyonlarının olduğuna dair rapor sayısında oldukça bir artış olmuştur (Harvala ve ark. 2011). Son zamanlarda HPeV3, MSS ilişkili hastalıklı çocuklarda en yaygın görülen Picornavirus genotipi olmuştur. HPeV3'den önce sadece HPeV1, paraliz ve ensefalit gibi oldukça ciddi klinik tablolardan sorumlu genotiptir.

HPeV3 ile indüklenmiş MSS ilişkili hastalıklar; viral menenjit ve meningoensefalittir (Wolthers ve ark. 2007, 2008; Verboon-Maciolet ve ark. 2008a; Verboon-Maciolet ve ark. 2008b). Bazı çalışmalar HPeV3'ün yenidoğanlarda beyin dokusu zararıyla ilişkili olduğu ve küçük çocuklarda nöral HPeV enfeksiyonunun beyin dokusunda anomaliye neden olduğunu göstermiştir (Verboon-Maciolet ve ark. 2008a; Gupta ve ark. 2010; Belcastro ve ark. 2014). Bu çocukların bazılarında öğrenme bozuklukları ve doğum sonrası epilepsi gelişimini içeren sinir gelişiminde etkiler mevcuttur (Verboon-Maciolet ve ark. 2008a).

Tipik bir yenidoğan HPeV enfeksiyonu yüksek ateş ve duyarlılık ile karakterizedir. Ayrıca hasta da nöbet, kaşıntı ve nefes darlığı gibi semptomlar görülebilmektedir. Sepsis benzeri hastalıklar taşikardi ya da bradikardi, düşük tansiyon ve azalmış oksijen saturasyonu ile ölçülen hipotermi ve solunum bozukluklarını içermektedir (Wolthers ve ark. 2007). HPeV enfeksiyonu ile bağlantılı olarak sepsis benzeri hastalık terimi hasta söz konusu kriterlerin hepsine sahip olmasa da sepsis benzeri bazı semptomlara sahip olduğunda kullanılmaktadır. Enteroviruslar ile karşılaştırıldığında yenidoğan HPeV enfeksiyonları lökosit sayısında düşüklük, yüksek vücut sıcaklığı, uzun ateş periyodu ve uzun yatış süresiyle karakterizedir (Renaud ve ark. 2011; Sharp ve ark. 2012b; Felsenstein ve ark. 2013).

Bu kadar ciddi özelliklerine rağmen, HPeV enfeksiyonları nadiren ölüme neden olmaktadır. 1983-2005 yılları arasında Amerika'da yürütülen çalışmalarda HPeV1'in neden olduğu 10 ölümcül vaka rapor edilmiştir (Khetsuriani ve ark. 2006). Yenidoğan yoğun bakım ünitesindeki 19 bebeğin yakalandığı bir gastroenterit salgınında 7 kanlı diyare ve abdominal radyografide erken nekrotizan enterokolit bulgusuyla karşılaşılmıştır. Bunlara ek olarak HPeV ile enfekte yenidoğanlarda tek ya da kombine olarak ateş, apne, takipne, respiratuar distres, rinore, konjunktivit ve

döküntü görülmüştür (Ljubin-Sternak S ve ark. 2011). Bir başka çalışmada HPeV1, 3 ve 6 genotipinin hastanın ölümüyle bir ilişkisi olmamasına rağmen otopsi numunelerine rastlanmıştır (Sedmak ve ark. 2010). HPeV3 Danimarka, Fransa ve Hollanda da yenidoğan ölüm vakalarının nedeni olduğu bildirilmiştir (Van Zwol ve ark. 2009; Schuffenecker ve ark. 2012; Fischer ve ark. 2014).

2.11. HPeV Enfeksiyonlarının Tanısı

HPeV enfeksiyonlarının tanısı hücre kültürü ve moleküler yöntemlerle gerçekleştirilse de viral kültürde üremeleri oldukça zordur.

2.11.1. Hücre Kültürü

HPeV enfeksiyonlarının tanısında kullanılan klasik metodlardan birisidir. Dışkı örnekleri, boğaz sürüntüleri, BOS ve kandan hücre kültürü ile virus izolasyonu gerçekleştirilmektedir (Levorson ve ark. 2009).

HPeV'ler, genellikle tersiyer maymun böbrek hücreleri ve insan embriyonik akciğer hücre dizileri ve Afrika yeşil maymun böbrek Vero hücrelerinde üreyebilmektedir (Benschop ve ark. 2006). HT29 (insan kalın bağırsak adenokarsinom hücre hattı), A549 (insan akciğer karsinom hücre hattı), RD (Rhabdomyosarkoma hücreleri) hücre dizisi gibi diğer hücreler de HPeV izolatlarının kültürü için kullanılabilir (Levorson ve ark. 2009).

HPeV'nin klinik tanısında hücre kültürü kullanımı birçok faktör nedeniyle sınırlanmaktadır. Gösterildiği gibi, HPeV'nin tanısında kullanılan ticari hücre kültürleri metodları tüm hücre hatlarının çoğalmasını eşit olarak desteklemediği için duyarlılığı oldukça düşüktür (Joki-Korpela ve Hyypia 1998; Benschop ve ark. 2010). HPeV'nin tanısı için gerekli olan primer hücreler ya da hücre hatları klinik laboratuvarlarda kullanılan rutin hücre kültür sistemlerinin bir parçası değildir. Hücre kültüründeki HPeV'nin çoğalabilme yeteneği test edilen örnekteki viral yüke bağlıdır ve örnekteki düşük viral içerik HPeV'nin kültürdeki verimliliğini olumsuz yönde etkilemektedir (Benschop ve ark. 2010). HPeV'nin hücre kültüründeki tanısı birkaç gün aldığından dolayı akut hastalıklarda klinik olarak kullanışsız olmaktadır.

2.11.2. Serolojik Testler

Serolojik testler enfekte kişilerde spesifik antikor yanıtı kullanılarak HPeV'nin belirlenmesinde kullanılabilmektedir. Fakat bu testlerin yapılabilmesi için zamana ihtiyaç vardır. Serolojik testler virusa yönelik serotip spesifik antiserumlar kullanılarak virusların tiplendirilmesinde kullanılmaktadır. EV nötralizasyon panelinin spesifik antikorları HPeV1 ve 2'yi içermektedir. Diğer HPeV tiplerinin (HPeV3-6) spesifik antikorları bulunmadığı veya hepsinin kültürü yapılamadığı için (HPeV7-16) için serotiplendirilmeleri yapılamamaktadır (Benschop ve ark. 2012)

2.11.3. Moleküler Teknikler

HPeV'nin klinik tanısında RT-PZR duyarlılığı ve klinik olarak anlamlı ölçüde tüm HPeV tiplerinin belirleyebildiği için tercih edilen yöntemdir. HPeV'ler enteroviruslarla ilişkilerine rağmen, RT-PZR testleri iki cinsin üyelerinin 5'UTR bölgesindeki sekans heterojenitesi nedeniyle enterovirusları belirlemede kullanılmaktadır. HPeV'lerin RT-PZR kullanılarak belirlenmesi 5'UTR bölgesindeki korunmuş nükleik asid sekanslarının uzatılarak amplifikasyonuna bağlıdır. Başlangıçta tanımlanan testlerle agaroz jel elektroforezi ya da likid hibridizasyonu kullanılarak amplifiye edilen bölge belirlenebilmekteydi. Real time amplifikasyon sistemlerinin ortaya çıkmasıyla amplifikasyon ürünlerinin belirlenmesi ve eş zamanlı amplifikasyon yeteneği ve yüksek duyarlılığa sahip HPeV real-time RT-PZR testlerinin gelişimini sağlamıştır. Tek ya da iki adımlı rRT-PZR HPeV'nin belirlenmesi için tanımlanmıştır. İki adımlı rRT-PZR ilk olarak HPeV RNA genomunu hedef bölgedeki komplementer DNA kopyasına (cDNA) dönüşümünü sağlamaktadır (revers transkripsiyon). Daha sonra cDNA reaksiyonu hedef bölgenin amplifikasyonu için ikinci bir reaksiyon kuvetine aktarılır (PZR). Tek adımlı RT-PZR tek bir reaksiyon kuvetinde cDNA sentezi ve PZR bir arada gerçekleştirilir (Corless ve ark. 2002; Nix ve ark. 2008).

VP1 bölgesi de yüksek değişkenlik gösterdiği için dejenere primerler kullanılarak bütün HPeV tipleri gösterilebilmektedir. Bu yüksek değişkenlik, örneklerin zayıf pozitiflik vermesine sebep olmakta ve tiplendirilmesini zorlaştırmaktadır. 5'UTR bölgesi daha korunmuş bir bölgedir ve bu bölgenin tiplendirilmesi daha duyarlı sonuçlar vermektedir. Ancak bu bölge tiplendirme için uygun değildir, tip tahmini yapılabilmektedir (Harvala ve ark. 2009). Bu nedenler

tipe özgü HPeV identifikasyonu VP1 kodlayan bölgenin filogenetik değerlendirilmesine dayanmakta, HPeV tiplendirilmesi için standart bir kriter olarak düşünülmektedir.

2.12. Tedavi ve Korunma

HPeV'lere karşı etkili bir antiviral tedavi mevcut değildir (Wildenbeest ve ark. 2010). HPeV enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan hiçbir ilaç etkin olamamıştır ve klinik raporlar destek tedavisinden ziyade herhangi bir spesifik tedavi önermektedir. Son zamanlarda kapsamlı bir inceleme sonucunda bazı bileşiklerin picornavirusları inhibe ettiği bulunmuş ancak bu bileşiklerin HPeV'leri inhibe ettiğine dair bir veri elde edilememiştir. HPeV tedavisi için en umut vaat eden aday kapsid ve 3C proteaz inhibitörlerinin olduğu düşünülmekte bu bulguların çalışmalarla doğrulanmasına ihtiyaç vardır. (De Palma ve ark. 2008; Wildenbeest ve ark. 2010).

İntravenöz immunoglobülinler HPeV olgularında destek tedavisinde kullanılmaktadır, ancak çalışmalarla tedavi edici etkilerinin olup olmadığının gösterilmesine ihtiyaç vardır (Li ve ark. 2007)

Bir diğer seçenek ise monoklonal antikor kullanımıdır. İnsan monoklonal antikorları influenza viruslara ve solunum sinsisyal viruslarına karşı etkindir ancak insan enteroviruslarına karşı oluşan antikorlar muhtemelen VP1 kapsid proteinine karşı nötralize edici özelliğe sahiptir ancak influenza virusları olgularında çapraz nötralize edici kapasiteye sahip olmadığı belirlenmiştir (Friesen ve ark. 2010). Bu yaklaşım daha küçük HPeV grupları için VP0'a karşı çapraz reaksiyon gösteren nötralize edici antikorlar için mümkündür (Joki-Korpela ve ark. 2010). HPeV3 çok ciddi hastalıklara neden olmasıyla dikkat çekmekte olup monoklonal antikor nötralizasyonu için ideal bir hedeftir, ancak semptomatik HPeV3 enfeksiyonu çok küçük yaşlarda annenin koruyucu antikorlarına karşı meydana geldiği de tartışılmaktadır. Şu an HPeV'ye karşı kullanılacak bir aşı mevcut olmadığı için HPeV enfeksiyonlarının önlenmesi diğer gastrointestinal patojenlerde de önerilen genel iyi hijyen uygulamalarına dayanmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Solunum Yolu Örneklerinin Alınması ve Saklanması

Solunum yolu örnekleri, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi kliniklerine başvuran solunum yolu enfeksiyon semptomu taşıyan çocuk veya erişkin hastalardan elde edildi. Hastalardan solunum yolu virus incelemesi, nazofaringeal sürüntü örnekleri eküvyon ile her iki burun deliğinden girilip nazofaringeal bölgeye kadar ilerlendikten sonra çubuklar 360⁰ döndürülerek alındı. Hiçbir yere temas ettirilmeden yavaşça geri çekilen eküvyon, içinde 3 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) bulunan, hastanın adı ve soyadı ile etiketlenmiş transport tüpüne konuldu. Alınan tüm örnekler alındıktan hemen sonra, Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiş ve örnekler aynı gün içerisinde çalışılacaksa +4°C’ de, 24-48 saat içerisinde çalışılacaksa -20 °C’de, daha uzun süre sonra çalışılacaksa -80°C’de bekletildi. Çalışmamızda Parechovirus pozitif örnekleri belirleyebilmek için önce multipleks PZR işlemi yapıldı. Pozitif bulunan örnekler sekans yapılması için konvansiyonel RT-PZR işlemi yapıldı.

Çalışmamız Necmettin Erbakan Üniversitesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu’nun 03/11/2017 tarihli ve 2017/1061 sayılı kararı ile “Etik Kurul Onayı”nı almış ve Necmettin Erbakan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 181318004 no’lu proje ile desteklenmiştir.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan Aletler

- ✓ Sınıf II Güvenlik Kabini (Heraeus, HERA safe)
- ✓ Hassas Terazî (Scaltec)
- ✓ Su Banyosu (Memmert)
- ✓ Derin Dondurucu (Uğur, R134a)
- ✓ Vortex (Heidolph, REAX top)
- ✓ Mikrosantrifüj cihazı (Sigma, 1-15)
- ✓ Distile su cihazı (Thermo Scientific, micropure)
- ✓ Isı bloğu
- ✓ Otoklav (Hirayama, HVE-50)
- ✓ +4°C’lik soğutucu (Indesit)

- ✓ -20°C'lik Derin Dondurucu (Indesit)
- ✓ Mikropipet Seti (Thermo Scientific, GJ16637-GJ16827-GJ17112)
- ✓ Light Cycler® 1.5 PZR cihazı (Roche)
- ✓ Elektroforez Cihazı (Consort, EV231)
- ✓ Jel Görüntüleme Cihazı (Slite 200W WIFI Jel, LAT)

3.2.2. Kullanılan Kit ve Kimyasal Malzemeler

- ✓ EZ1 Virus Mini Kit v2. (Qiagen, Inc. Hilden, Almanya)
- ✓ FTD® Respiratory pathogens 21 kits (Luksemburg, Almanya)
- ✓ Saf etil alkol

3.3. Solunum Yolu Örneklerinden RNA İzolasyonu

RNA virus izolatları ve solunum yolu örneklerinden üretici firmanın talimatı doğrultusunda EZ1 Virus Mini Kit v2. (Qiagen, Inc. Hilden, Almanya) kullanılarak ekstrakte edildi (Nix W A. ve ark. 2010).

EZ1 Virus Mini Kit v2. İçeriği;

- ✓ Reaktif tüpleri
- ✓ Tek kullanımlık tüp tutucular
- ✓ Tek kullanımlık filtre-tutucu
- ✓ Örnek tüpleri (2 ml)
- ✓ Yıkama tüpleri (1.5 ml)
- ✓ QIAGEN® Protease (liyofilize edilmiş)
- ✓ Proteaz uzaklaştırma tamponu
- ✓ Taşıyıcı RNA
- ✓ AVE tamponu

3.3.1. Nazofaringeal Sürüntü Örneklerinden Viral Nükleik Asit İzolasyonu Protokolü

Solunum yolu örneklerinden nükleik asit izolasyonu EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Hilden, Almanya) kullanılarak yapıldı. Alınan solunum yolu örnekleri Qiagen EZ1 Advanced (Hilden, Almanya) cihazı kullanıldı.

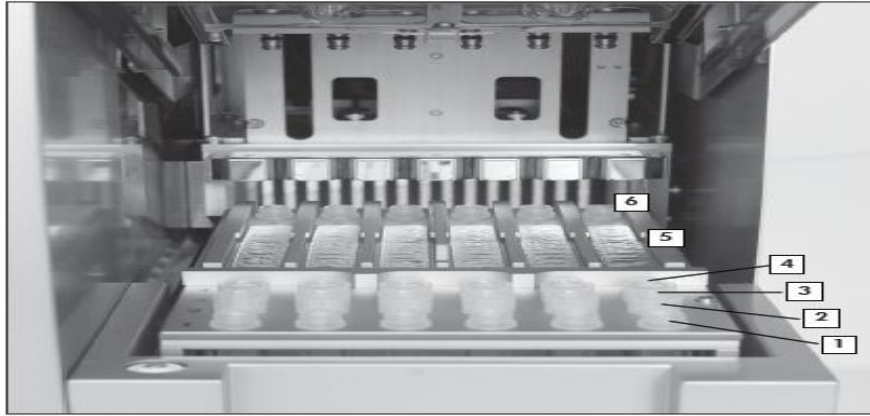
Qiagen EZ1 Advanced (Hilden, Almanya) cihazının çalışma protokolü;

1. Örnekteki virusların proteolizisi yüksek sıcaklıklarda denatüre edici koşullar altında gerçekleştirildi. Lizis işlemi viral kılıf proteinlerinin sindirildiğinden emin olmak ve RNAaz'ları inaktive olduğundan emin olmak için proteinaz K ve lizis tamponu varlığında gerçekleştirildi.
2. Uygun bağlanma koşullarını sağlamak için bağlanma tamponu lizatlara eklendi. Lizatlar viral nükleik asitlerin silika yüzeye optimal adsorpsiyonunu sağlamak için manyetik partiküllerle karıştırıldı. Kullanılan tamponun tuz oranı ve pH'sı, PZR'ı inhibe edebilecek protein ve diğer kontaminantların bağlanmasını engelledi.
3. Viral nükleik asitler manyetik partiküllere bağlanırken, kontaminantlar 1. yıkama tamponu, 2. yıkama tamponu ve etanol kullanılarak etkili bir şekilde uzaklaştırıldı.
4. Yüksek oranda saflaştırılmış nükleik asitler AVE tamponunda yıkandı. Saf haldeki nükleik asitler uygulamalar sırasında kullanıma hazır hale getirildi.

Cihazla otomatik izolasyon yapılmak üzere firma talimatları doğrultusunda aşağıda basamaklar uygulanarak gerçekleştirildi.

1. -20°C'de saklanan solunum yolu örnekleri kantitatif PZR yapılmak üzere oda ısısında çözdürölüp vortekslendi.
2. Qiagen-EZ1 cihazındaki 4.bölüme çözdürülen nazofaringeal sürüntü örneklerinden 400 µl eklendi.
3. Cihazın 3.bölümüne 114 µl AVE solüsyonu, 4 µl 28 taşıyıcı RNA, 2 µl internal kontrol karışımından eklendi.
4. Cihazın 2. bölümüne pipet ucu, 1.bölüme izole edilen DNA örneğini almak için 1,5 ml'lik boş eppendorf tüp yerleştirildi.
5. Cihazın arka bölmesine kit kartı ile sıcak inkübasyonu sağlamak için 2 ml'lik eppendorf tüpü yerleştirildi.
6. 40 dakikalık çalışma süresinin sonunda 120 µl genom elde edildi.

Şekil 3.1. Qiagen EZ1 Advanced (Hilden, Almanya) cihazının bölümleri.



3.4. Multipleks RT-PZR İşlemi

FTDRP multipleks PZR testi 16 insan solunum virusunu kapsayan 5 ayrı primer/prob karışımından meydana gelmektedir. Qiagen EZ1 Advanced (Hilden, Almanya) otomatik izolasyon cihazı ile edilen viral nükleik asit Fast track diagnostics (Luksemburg, Almanya) kiti kullanılarak PZR gerçekleştirilmek üzere 5 ayrı kuyucuğa primerli karışım hazırlandı. Multipleks PZR işlemi üretici firmanın talimatları doğrultusunda aşağıdaki basamaklar uygulanarak gerçekleştirildi.

1. Reaktifler (su, 2X RT-PZR tamponu ve Primer/Probe setleri) kullanılmadan önce çözdürüldü.
2. Karışım reaktifleri her bir hasta için primer mix 1,5 µl, enzim 1 µl, 2X PZR tamponundan 12,5 µl olacak şekilde hazırlandı.
3. Karışım pipetle karıştırıldı ardından kısa bir santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
4. Herbir kuyucuğa toplam karışım miktarı 15 µl olacak şekilde karışım eklendi.
5. Her bir kuyucuğun içerisine izole edilen genomdan 10 µl eklendi.

Şekil 3.2. Karışımların kuyucuklardaki yerleşimi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S2	S3	S4	PC	NC			←	Master mix with enzyme and Flu/Rhino PP		
B	S1	S2	S3	S4	PC	NC			←	Master mix with enzyme COR PP		
C	S1	S2	S3	S4	PC	NC			←	Master mix with enzyme and Para 2/3/4 PP		
D	S1	S2	S3	S4	PC	NC			←	Master mix with enzyme and Bo/Mp/Pf1 PP		
E	S1	S2	S3	S4	PC	NC			←	Master mix with enzyme and RS/EPA PP		
F												
G												
H												

Genom amplifikasyonu Qiagen Rotor-gene Q 29 cihazı kullanılarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. Solunum yolu örnekleri için PZR döngüsü

Sıcaklık	Zaman	Döngü
42 °C	15 dakika	1
94 °C	3 dakika	1
94 °C	8 saniye	40
60 °C	34 saniye	40

3.4.1. Sonuçların Değerlendirilmesi

Multipleks PZR işlemi tamamlandıktan sonra örnekler için siklus eşik değeri (cycle threshold; Ct) uygun floresan kanaldaki eşik çizgisinin üstünde bulunursa sonuç pozitif kabul edildi. Örneklerle ait eşik değeri yoksa ve internal kontrole ait FAM kanalındaki eşik değeri ≤ 32 ise sonuç negatif olarak değerlendirildi.

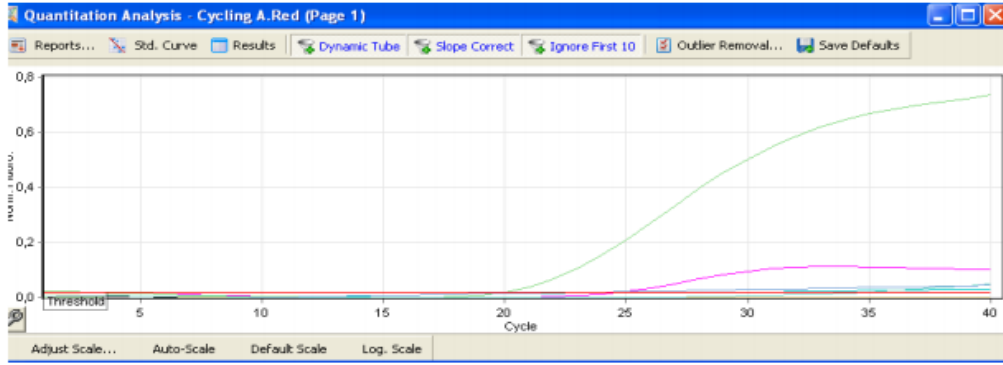
Şekil 3.3. Sonuçların değerlendirilmesi

PP Karışımı	Patojen	Floresan haberci	Boya	Çıkış Dalga Boyu	Belirlenen Dalga Boyu
FLU/Rhino PP	FluA	FAM	green	483	533
	Rhino	VIC	yellow	523	568
	FluA (H1N1) swl	Cy5	red	625	660
	FluB	ROX	orange	585	610
Para 2/3/4 PP	Para 3	FAM	green	483	533
	Para 2	VIC	yellow	523	568
	IC (BMV)	Cy5	red	625	660
	Para 4	ROX	orange	585	610
COR PP	Cor 229	FAM	green	483	533
	Cor 63	VIC	yellow	523	568
	Cor 43	Cy5	red	625	660
	Cor HKU	ROX	orange	585	610
RS/EPA PP	RSVA/B	FAM	green	483	533
	PV	VIC	yellow	523	568
	AV	Cy5	red	625	660
	EV	ROX	orange	585	610
Bo/Mp/Pf1 PP	Para1	FAM	green	483	533
	HMPV A/B	VIC	yellow	523	568
	Mpneu	Cy5	red	625	660
	HBoV	ROX	orange	585	610
RespBac PP	S.aur	FAM	green	483	533
	C.pneu	VIC	yellow	523	568
	S.pneu	Cy5	red	625	660
	HiB	ROX	orange	585	610

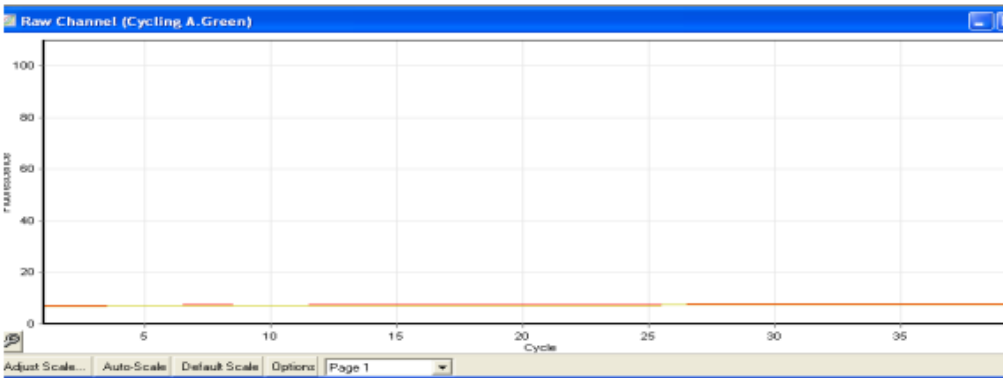
Şekil 3.4. Solunum yolu pozitif örnek



Şekil 3.5. Solunum yolu pozitif örnek



Şekil 3.6. Solunum yolu negatif örnek



3.5. Viral RNA'nın konvansiyonel RT-PZR ile tespit edilmesi

Multipleks PZR ile Parechovirus pozitif tespit edilen solunum yolu örnekleri, eş zamanlı olarak Benschop (2006)'un bildirdiği primerler (VP1 F' CCAAATTCRTGGGGTTC R' AAACCYCTRTCTAAATAWGC) kullanılarak konvansiyonel RT-PZR ile VP1 bölgesi çoğaltıldı. Analizlerde OneStep RT-PZR Kit

kullanılmış olup, elde edilen ampikonlar %1.5'lik agaroz jel elektroforezde 120 voltta 30 dakika yürütülerek UV görüntüleme sisteminde değerlendirildi. Her bir 0.2 ml'lik PZR tüpü için RT-PZR protokolü ve termal döngü programı aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi yapıldı.

Tablo 3.2. Konvansiyonel RT-PZR protokolü

Reaktif	Miktar (µl)
5X RT-PZR Buffer	5
5X Q Solution	5
10 mM dNTP mix	1
Primer PPRVF1b (10 pmol/µl)	1
Primer PPRVF2d (10 pmol/µl)	1
Enzyme Mix	1
Viral RNA (30 ng/µl)	3
Distile su	8
Toplam hacim	25

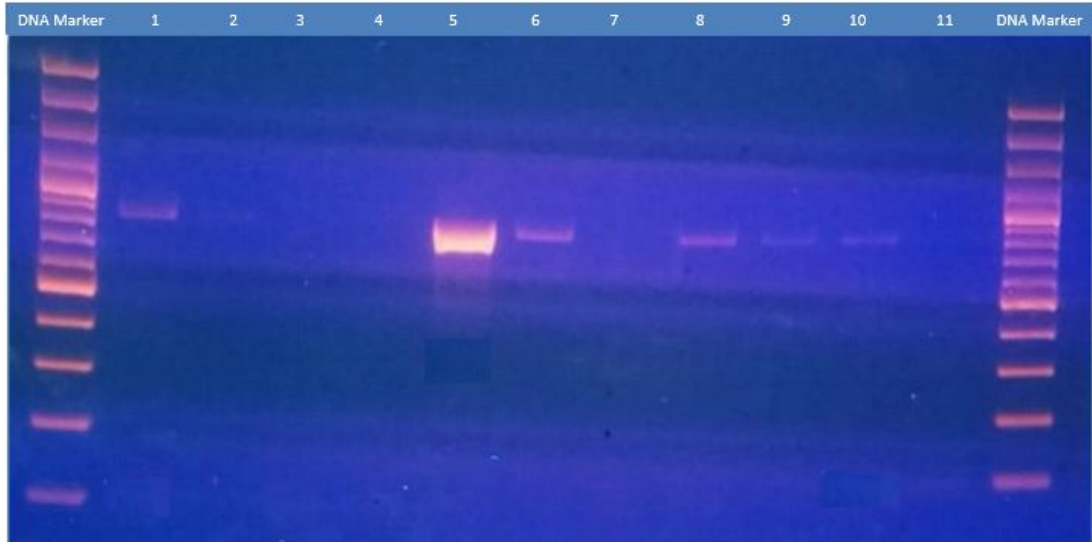
Tablo 3.3. Konvansiyonel RT-PZR aşamaları

Aşamalar	Sıcaklık	Süre/Döngü	
Ters transkripsiyon	50 °C	30 dakika	
PZR başlangıç aktivasyonu	95 °C	15 dakika	
Denatürasyon	94 °C	1 dakika	40 Döngü
Bağlanma	50 °C	1 dakika	
Uzatma	72 °C	2 dakika	
Son uzatma	72 °C	10 dakika	

3.5.1. RT-PZR ürünlerinin görüntülenmesi

Viral RNA üzerinde bulunan hedef bölgenin amplifikasyonu ve primer dimerlerin oluşup oluşmadığından emin olabilmek için RT-PZR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde yürütülerek UV görüntüleme sisteminde değerlendirildi. 600 mg agaroz üzerine 90 ml 1X TBE solüsyonu ilave edilerek agaroz jel hazırlandı. Erlenmayer içerisinde sulandırılarak hazırlanan süspansiyon daha sonra mikrodalga fırında eritilerek homojen hale getirildi. 9 µl GelRed, 60 °C'ye kadar soğutulan karışımın içerisine ilave edilerek iyice karıştırıldıktan sonra tarakları takılı olan jel taşıyıcısına dökülerek donması için 30 dakika bekletildi. Kullanılan 1X TBE solüsyonu ise, stok 5X TBE solüsyonundan steril distile su ile seyreltilerek hazırlandı (Tablo 3.4.) Agaroz jelin donmasının ardından taraklar uzaklaştırıldı ve jel taşıyıcısı ile birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın içerisine 1X TBE buffer, jelin üzerinde 3-4 mm olacak şekilde ilave edildi. 5 µl PZR ürünü 1 µl DNA yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforezde 120 voltta 30 dakika yürütülerek Slite 200W WIFI Jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi ve DNA marker baz alınarak değerlendirildi.

Şekil 3.7. PCR sonucunda elde edilen bantların elektroforez görüntüsü



Tablo 3.4. Tris-Borat-EDTA (TBE) Solüsyon Hazırlama Formülasyonu (5x/lt)

Kimyasal Adı	Miktarı
Trizma-base (Thermo Scientific, ABD-Waltham, kat no:T6066)	54 gr
Borik asit (Thermo Scientific, ABD-Waltham, kat no:B6768)	27.5 gr
EDTA (Thermo Scientific, ABD-Waltham, kat no:E5134)	5.92 gr

3.6. Sekans Analizi

Amplifikasyon işlemi yapılmış PZR ürünlerinin saflaştırılması amacıyla ExoSAP-IT saflaştırma kiti kullanıldı. Bu kit özellikle dizi analizi, genotipleme (SNP analizi), klonlama ve in vitro transkripsiyon gibi uygulamalarda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ürünlerinin hızlı ve etkili saflaştırılmasını sağlayan bir saflaştırma kitidir. DNA dizi analizi reaksiyonu hem forward hem de reverse primer ile iki yönlü olarak yapıldı. Sekans işlemi sonrası oluşan ürünleri otomatik DNA dizi analiz cihazında yürütülmeden önce son bir saflaştırma işlemi daha gerçekleştirildi. Amplifiye edilmiş ürünlerin DNA dizi analizleri ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer DNA Dizi Analiz Cihazı (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Sequencing Analysis 5.3.1 programı yardımıyla incelendi. Son olarak; dizi analizi verileri National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Md. ABD) BLAST sistemi (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmada Eylül 2017 ve Mart 2019 tarihleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi hastanesinin çeşitli polikliniklerine başvuran solunum yolu enfeksiyonu tanısı (bronşit, pnömoni, astımlı bronşit ve diğer solunum yolu hastalıkları) konulan 1110'ü (% 50,5) çocuk, 1090'ı (% 49,5) yetişkin toplam 2200 hastadan alınan nazal ve boğaz sürüntüleri örnekleri, virus varlığı yönünden multipleks PZR ve konvansiyonel RT-PZR ile değerlendirildi.

Toplam 2200 solunum yolu örneğinin 11'inde (%0,9) HPeV PZR pozitif olarak saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen hastaların kliniklere göre dağılımı Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen HPeV pozitif hastaların kliniklere göre dağılımı

Klinik	Sayı
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	3
Çocuk Göğüs Hastalıkları	4
Çocuk Acil	3
Çocuk Yoğun Bakım	1

Yapılan sekans çalışmaları ile 7 HPeV' nin genotipi tanımlanamamıştır. Tanımlanan HPeV'lerin genotipleri; HPeV1 (n:3), HPeV (n:1) olarak saptanmıştır. HPeV pozitif bulunan hastaların epidemiyolojik özellikleri Tablo 4.2.'de verilmiştir.

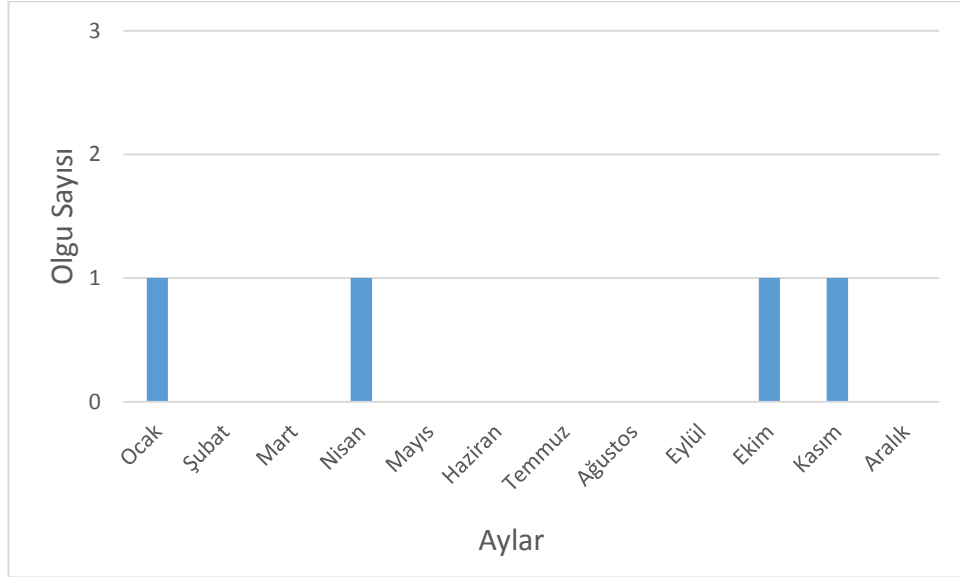
Tablo 4.2. HPeV pozitif hastaların epidemiyolojik özellikleri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Örneğin Alındığı Tarih	Genotip
1	1	Erkek	5.1.2018	Belirlenemedi
2	2	Erkek	19.3.2018	Belirlenemedi
3	1	Erkek	14.3.2018	Belirlenemedi
4	4	Erkek	17.11.2017	Belirlenemedi
5	2	Erkek	14.11.2017	HPeV1

6	4 ay	Kadın	10.10.2018	HPeV1
7	3	Erkek	9.4.2018	Belirlenemedi
8	1	Erkek	6.1.2018	HPeV1
9	1	Kadın	19.3.2018	Belirlenemedi
10	3	Erkek	6.4.2018	HPeV4
11	1	Erkek	12.4.2018	Belirlenemedi

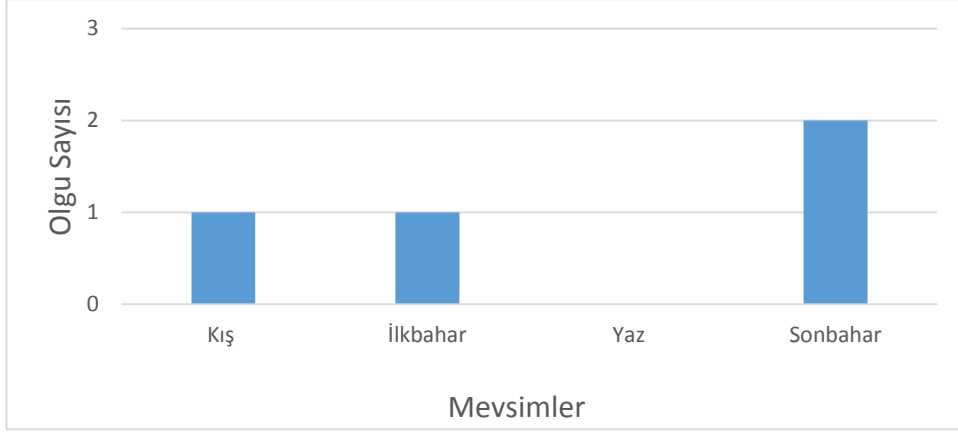
HPeV genotipleri belirlenen olguların aylara göre dağılımı Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

Şekil 4.1. HPeV saptanan olguların aylara göre dağılımı



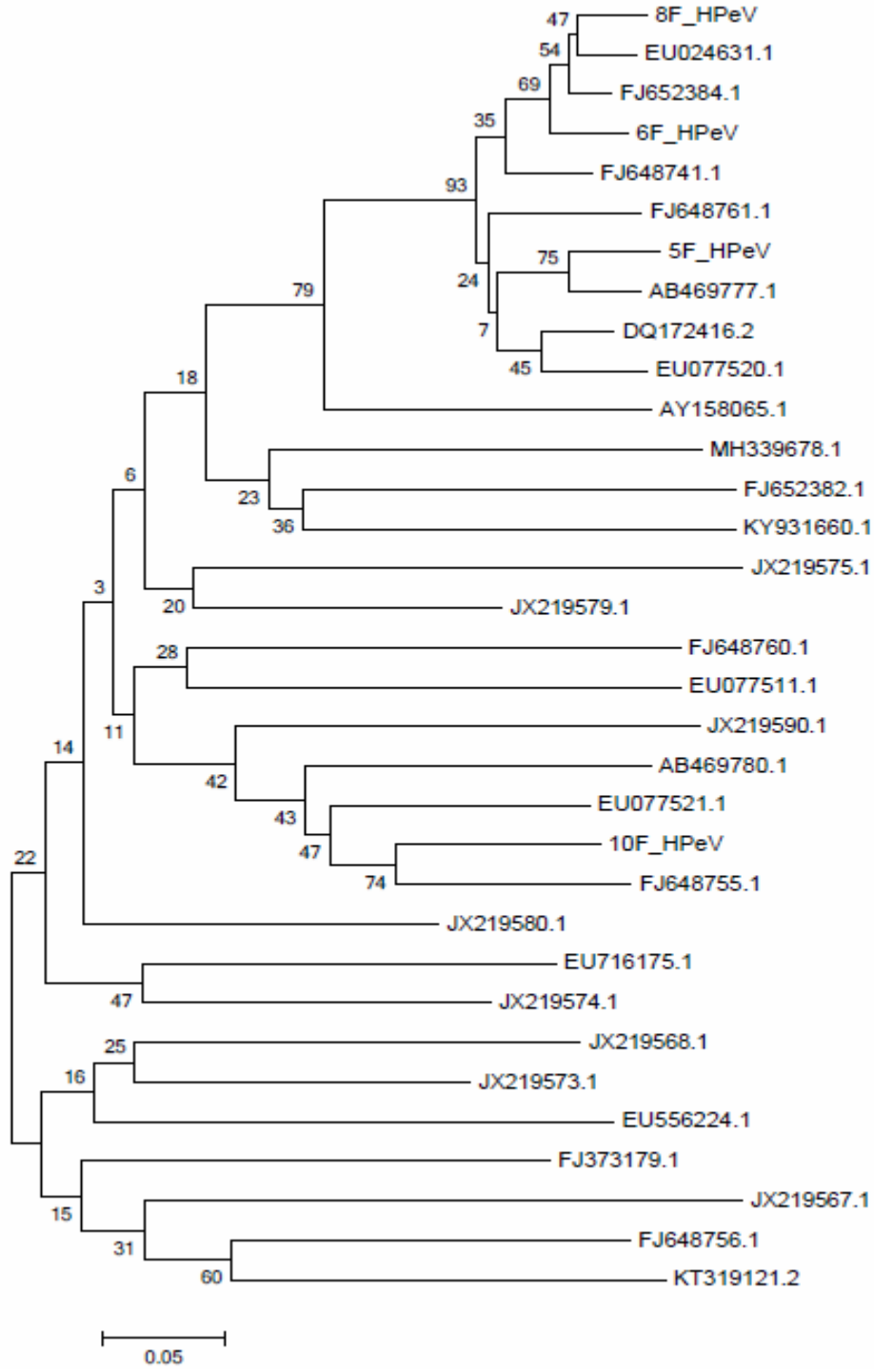
Bu olguların mevsimlere göre dağılımı ise Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Şekil 4.2. HPeV saptanan olguların mevsimlere göre dağılımı



Tanımlan HPeV genotiplerinin filogenetik ağaçtaki yerleşimi Şekil 4.3’de verilmiştir.

Şekil 4.3. HPeV genotiplerinin filogenetik ağaçtaki yerleşimi



5. TARTIŞMA

HPeV'ler, dünya çapında çoğunlukla küçük çocukları enfekte eden yaygın patojenlerdir. HPeV'lerin fekal-oral yoldan bulaştığı görülmekte ve çoğu HPeV enfeksiyonu hafif, solunum yolu enfeksiyonu ve gastro-enterit ile ilişkilidir. HPeV enfeksiyonları, sepsis benzeri hastalık, miyokardit, ensefalit, menenjit ve felç gibi birçok ciddi hastalıkla bağlantılıdır. HPeV1 ve 2 en iyi bilinen genotipler olup, orta şiddette solunum yolu enfeksiyonu ve gastroenterit ile ilişkilendirilmiştir (Benschop ve ark. 2008; Harvala ve ark. 2008).

PZR'nin hücre kültüründen daha duyarlı olduğu, özellikle de hacim ve viral yükte düşük miktarda beyin omurilik sıvısı gibi farklı klinik örneklerin göz önüne alındığı ve bazı HPeV tiplerinin kültüre zor olduğu kanıtlanmıştır (Nix ve ark. 2006; Benschop ve ark. 2008a; Benschop ve ark. 2008 b; Rahimi ve ark. 2009; Ito ve ark. 2010; Mamishi ve ark. 2013). Bu çalışmada, HPeV'ler RT-PZR amplifikasyon yöntemi ve viral genomda 5'UTR bölgesinden spesifik primerler kullanılarak ayırt edildi.

HPeV'lerin genotiplemesinin VP1 dizilimine dayandığı ve serotipleme ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Oberste ve ark. 2003; Nix ve ark. 2006; Rahimi ve ark. 2009; Mamishi ve ark. 2013). Yapmış olduğumuz bu çalışmada, VP1/VP3 bağlantı bölgesi amplifiye edildi ve daha sonra sekans işlemi gerçekleştirilmiştir. HPeV genotipleri, sadece yetersiz örnekleme hacmi veya bu örneklerdeki çok düşük viral yük nedeniyle sadece 4 örnekte başarılı bir şekilde belirlenmiş olup bu çalışma sırasında HPeV1 ve HPeV4 genotipleri tanımlanmıştır.

Hollanda'da HPeV14'ün tek bir bulgusu hariç (Benschop ve ark. 2008b), Avrupa'da yaygın olarak dolaşan genotipler HPeV1 ile 6 arasında olduğu belirlenmiştir. Nadir olarak HPeV2 ve 5'in varlığı da bildirilmiştir. Bu çalışmadaki genotip dağılımımız 1 ve 4 olup, Avrupa'da bildirilen genotiplerle benzerlik göstermektedir.

HPeV1 genotipi, dünyadaki ana HPeV genotipi olarak bilinmektedir. (Legay ve ark. 2002; Harvala ve ark. 2008; van der Sanden ve ark. 2008; Sedmak ve ark. 2010). Daha önceki çalışmaların çoğu, HPeV1'in solunum veya gastrointestinal hastalıklarda daha yaygın olduğunu ve sepsis benzeri hastalıklarda ve aseptik menenjitlerde HPeV3'lerin daha sık tespit edildiğini göstermiştir (Boivin ve ark.

2005; Harvala ve ark. 2008, 2009; van der Sanden ve ark. 2008; Wolthers ve ark. 2008; Zhong ve ark. 2011; Selvarangan ve ark. 2011).

Yapılan başka bir çalışmada ise, HPeV3 ile enfekte olan çocuklar, HPeV1 ile enfekte olan çocuklardan önemli ölçüde daha küçüktü; bu durumun ise, HPeV1'e karşı maternal antikörlerin mevcudiyeti ile ilişkili olabileceğini, ancak HPeV3 için olmadığını göstermektedir (Legay ve ark. 2002; Boivin ve ark. 2005; Wolthers ve ark. 2008; Sedmak ve ark. 2010; Selvarangan ve ark. 2011). Yapmış olduğumuz bu çalışmada, HPeV enfeksiyonu, 3 yaşından daha küçük çocuklarda belirlenmiş olup daha önce yapılan birçok çalışmayla uyumluluk göstermiştir.

HPeV ile ilişkili yenidoğan hastalıklarının çalışmalarında henüz HPeV4 bulunamamasına rağmen, HPeV4 tespit edilmeyen nedensel ajanlardan birini temsil edebilir (Benschop ve ark. 2006b; Harvala ve ark. 2011; Walters ve ark. 2011). Ateşe ek olarak (Benschop ve ark. 2006a), HPeV4 daha önce solunum ve gastrointestinal semptomlarla ilişkilendirilmiştir (Pajkrt ve ark. 2009). Çalışmamızda solunum yolu semptomları olan bir hastada HPeV4 saptanmıştır.

Hollanda ve Birleşik Krallık'ta yapılan çalışmalarda çift sayılı yıllarda HPeV'in daha yüksek prevalansının olduğu bildirilmiş ancak İspanya ve ABD'deki çalışmalarda bu durum görülmemiştir (Romerove ark. 2003; Hayes ve ark. 2005; Papa ve ark. 2009). Yapmış olduğumuz bu çalışmada genotipleri belirlenen 4 olgudan 3'ünün çift sayılı yılda belirlenmiş olup diğer çalışmalarla uyumluluk göstermiştir.

HPeV enfeksiyonları genellikle yıl boyunca görülmesine rağmen önemli bir mevsimsel epidemiyoloji sergilemektedir. Tüm dünyada, en sık sonbahar ve kış aylarında en yüksek seviyede görülmektedir (Siafakas ark. 2004). Çalışmamızda genotiplendirilen 4 örnekten 3'ü sonbahar ve kış mevsiminde alınmış olup yapılan çalışmalarla uyum göstermiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda 2200 solunum yolu örneği taranmış olup bu örneklerin 11'inde (%0,9) HPeV pozitif olarak saptanmıştır. Pozitif olarak belirlenen örnekler sekanslanması sonucunda ise bu örneklerden 3'ü HPeV1, 1'i ise HPeV4 olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç Türkiye'de HPeV epidemiyolojisi hakkındaki ilk veri olması açısından önemlidir.

HPeV'ler, bebeklerde giderek artan oranda görülen bir morbidite nedenidir. Bu artış muhtemelen virüsleri ve hastalık epidemiyolojisindeki değişiklikleri (virülanstaki değişiklikler veya virüsün insidansındaki değişiklikler) tespit etmek için oldukça hassas moleküler tekniklerin kullanılmasından kaynaklanmaktadır. HPeV'ler yenidoğanlarda, özellikle sepsisli, menenjitli ya da ensefalitli küçük çocuklarda özellikle göz önünde bulundurulmalı, HPeV şüpheli ateşli bir bebeğin değerlendirmesinde BOS, kan, solunum ve dışkı örnekleri klinisyen tarafından istenmelidir. Moleküler tanı yöntemleri erken tanı için gereklidir ve yenidoğanlarda ve infantlarda sepsis ve menenjit için standart bir tetkik olarak uygulanmalıdır.

Sonuç olarak bebeklerde HPeV'nin saptanması, gereksiz kapsamlı araştırmaları ve hastanede kalış süresini en aza indirmekte dolayısıyla antimikrobiyallerin klinik, ekonomik ve halk sağlığı kullanımını azaltacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Abed Y, Boivin G. Human parechovirus types 1, 2 and 3 infections in Canada. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(6): 969-75.
- Abed Y, Wolf D, Dagan R, Boivin G. Development of a serological assay based on a synthetic peptide selected from the VP0 capsid protein for detection of human parechoviruses. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(6): 2037-39.
- Adams MJ, King AMQ, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Arch Virol.* 2013; 158(9):2023-2030.
- Alam MM, Khurshid A, Shaikat S, Rana MS, Sharif S, Angez M, Nisar N, Naeem M, Zahoore Zaidi SS. Human parechovirus genotypes -10, -13 and -15 in Pakistani children with acute dehydrating gastroenteritis. *Plos One.* 2013; 8(11):e78377.
- Alam MM, Khurshid A, Shaikat S, Sharif S, Rana MS, Angez M, Naeem M, Zaidi SS. Identification of human parechovirus genotype, HPeV-12, in a paralytic child with diarrhea. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2012; 55(4):339-42.
- Al-Sunaidi M, Williams CH, Hughes PJ, Schnurr DP, Stanway G. Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. *J Virol.* 2007; 81(2):1013-21.
- Baumgarte S, de Souza Luna LK, Grywna K, Panning M, Drexler JF, Karsten C, Huppertz HI, Drosten C. Prevalence, types, and RNA concentrations of human parechoviruses, including a sixth parechovirus type, in stool samples from patients with acute enteritis. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(1):242-48.
- Benschop K, Molenkamp R, van der Ham A, Wolthers K, Beld M. Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *J Clin Virol.* 2008a; 41(2):69-74.
- Benschop K, Thomas X, Serpenti C, Molenkamp R, Wolthers K. High prevalence of human Parechovirus (HPeV) genotypes in the Amsterdam region and identification of specific HPeV variants by direct genotyping of stool samples. *J Clin Microbiol.* 2008b; 46(12):3965-70.
- Benschop KS, Schinkel J, Luken ME, van den Broek PJ, Beersma MF, Menelik N, van Eijk HW, Zaaijer HL, VandenBroucke-Grauls CM, Beld MG, Wolthers KC. Fourth human parechovirus serotype. *Emerg Infect Dis.* 2006a; 12(10):1572-75.
- Benschop KS, Schinkel J, Minnaar RP, Pajkrt D, Spanjerberg L, Kraakman HC, Berkhout B, Zaaijer HL, Beld MG, Wolthers KC. Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2006b; 42(2): 204-10.
- Benschop KS, Williams CH, Wolthers KC, Stanway G, Simmonds P. Widespread recombination within human parechoviruses: analysis of temporal dynamics and constraints. *The Journal of general virology.* 2008c; 89(Pt 4): 1030-35.
- Boivin G, Abed Y, Boucher FD. Human Parechovirus-3 and Neonatal Infections. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(1):103-7.
- Boros A, Uj M, Pankovics P, Reuter G. Detection and characterization of human parechoviruses in archived cell cultures, in Hungary. 2010; *J Clin Virol* 47(4):379-81.
- Böttcher, S. Obermeier, P.E. Diedrich, S. Kaboré, Y. D'Alfonso, R. Pfister, H. Kaiser, R. and Di Cristanziano, V. Genome sequence of novel human parechovirus type 17. *Genome Announc.* 2017; 5(8). pii: e01649-16.
- Brouwer L, Karelehto E, Han AX, Thomas XV, Bruning AHL, Calis JCJ, vanHensbroek MB, Westerhuis BM, Amarthalingam D, Koekkoek SM, Rebers SPH, Phiri KS, Wolthers KC, Pajkrt D. High frequency and diversity of parechovirus A in a cohort of Malawian children. *Arch Virol.* 2019; 164(3):799-806.

- Cann AJ. Principles of Molecular Virology, 5th Edition. Principles of Molecular Virology, 2012, 5th Edition:1-303.
- Centers for Disease Control and Prevention: West Nile virus activity-United States, January 1-December, 2005. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005; 4: 1253-6.
- Chen BC, Cheng MF, Huang TS, Liu YC, Tang CW, Chen CS, Chen YS. Detection and identification of human parechoviruses from clinical specimens. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2009; 65(3): 254-60.
- Coller BAG, Chapman NM, Beck MA, Pallansch MA, Gauntt CJ, Tracy SM. Echovirus-22 Is an Atypical Enterovirus. J Virol. 1990; 64(6): 2692-701.
- De Crom SC, Obihara CC, de Moor RA, Veldkamp EJ, van Furth AM, Rossen JW. Prospective comparison of the detection rates of human enterovirus and parechovirus RT-qPCR and viral culture in different pediatric specimens. J Clin Virol. 2013; 58(2): 449-54.
- De Palma AM, Vliegen I, De Clercq E, Neyts J. Selective inhibitors of picornavirus replication. Med Res Rev. 2008; 28: 823-84.
- Drake JW, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses. P Natl Acad Sci USA. 1999; 96(24): 13910-3.
- Drexler JF, Grywna K, Stocker A, Almeida PS, Medrado-Ribeiro TC, Eschbach-Enteroviruses and Parechoviruses. Viruses. 2015; 10;7(8): 4529-62.
- Faria NR, de Vries M, van Hemert FJ, Benschop K, van der Hoek L. Rooting human parechovirus evolution in time. BMC evolutionary biology. 2009; 9.
- Felsenstein S, Yang S, Eubanks N, Sobrera E, Grimm JP, Aldrovandi G. Human Parechovirus Central Nervous System Infections in Southern California Children. Pediatr Infect Dis J. 2014 Apr;33(4):e87-91.
- Figuerola JP, Ashley D, King D, Hull B. An outbreak of acute flaccid paralysis in Jamaica associated with echovirus type 22. J Med Virol. 1989; 29(4): 315-19.
- Fischer TK, Midgley S, Dalgaard C, Nielsen AY. Human Parechovirus Infection, Denmark. Emerg Infect Dis. 2014; 20(1): 83-7.
- Friesen RHE, Koudstaal W, Koldijk MH, Weverling GJ, Brakenhoff JPJ, Lenting PJ, Stittelaar KJ, Osterhaus ADME, Kompier R, Goudsmit J. New Class of Monoclonal Antibodies against Severe Influenza: Prophylactic and Therapeutic Efficacy in Ferrets. Plos One. 2010; 8;5(2):e9106.
- Ghazi F, Ataei Z, Dabirmanesh B. Molecular detection of human parechovirus type 1 in stool samples from children with diarrhea. Int J Infect Dis. 2012; 16(9):E673-E676.
- Graul S, Böttcher S, Eibach D, Krumkamp R, Käsmaier J, Adu-Sarkodie Y, May J, Tannich E, Panning M. High diversity of human parechovirus including novel types in stool samples from Ghanaian children. J Clin Virol. 2017; 96: 116-119.
- Grist NR, Bell EJ, Assaad F. Enteroviruses in human disease. Progress in medical virology Fortschritte der medizinischen Virusforschung Progres en virologie medicale. 1978; 24:114-57.
- Harvala H, Calvert J, Van Nguyen D, Clasper L, Gadsby N, Molyneaux P, Templeton K, McWilliams Leitch C, Simmonds P. Comparison of diagnostic clinical samples and environmental sampling for enterovirus and parechovirus surveillance in Scotland, 2010 to 2012. Euro Surveill. 2014; 17;19(15).
- Harvala H, McLeish N, Kondracka J, McIntyre CL, Leitch ECM, Templeton K, Simmonds P. Comparison of Human Parechovirus and Enterovirus Detection Frequencies in Cerebrospinal Fluid Samples Collected Over a 5-Year Period in Edinburgh: HPeV Type 3 Identified as the Most Common Picornavirus Type. J Med Virol. 2011; 83(5):889-96.
- Harvala H, Robertson I, Chieochansin T, McWilliam Leitch EC, Templeton K, Simmonds P. Specific association of human parechovirus type 3 with sepsis and fever in young infants, as identified by direct typing of cerebrospinal fluid samples. J Infect Dis. 2009; 199(12):1753-60.

- Harvala H, Robertson I, McWilliam Leitch EC, Benschop K, Wolthers KC, Templeton K, Simmonds P. Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(10): 3446-53.
- Harvala H, Simmonds P. Human parechoviruses: biology, epidemiology and clinical significance. *J Clin Virol.* 2009; 45(1): 1-9.
- Harvala H, Wolthers KC, Simmonds P. Parechoviruses in children: understanding a new infection. *Current opinion in infectious diseases.* 2010; 23(3): 224-30.
- Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 1174-9.
- Hyypia T, Horsnell C, Maaronen M, Khan M, Kalkkinen N, Auvinen P, Kinnunen L, Stanway G. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *P Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(18): 8847-51.
- Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Kabashima Y, Hasegawa A, Nagaya S, Kawaguchi M, Kobayashi S, Fujiura A, Sakae K, Minagawa H. Detection of Human Parechoviruses from Clinical Stool Samples in Aichi, Japan. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(8): 2683-88.
- Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol.* 2004; 85(Pt 2): 391-98.
- Jeziorski E, Schuffenecker I, Bohrer S, Pain JB, Segondy M, Foulongne V. Relevance of human parechovirus detection in cerebrospinal fluid 63 samples from young infants with sepsis-like illness. *J Clin Lab Anal.* 2015; 29(2):112-5.
- Joki-Korpela P, Hyypia T. Diagnosis and epidemiology of echovirus 22 infections. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 1998; 27(1):129-36.
- Joki-Korpela P, Marjomaki V, Krogerus C, Heino J, Hyypia T. Entry of human parechovirus 1. *J Virol.* 2001; 75(4): 1958-67.
- Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *MMWR.* 2006; 55(8):1-20.
- Kim Pham NT, Trinh QD, Takanashi S, Abeysekera C, Abeygunawardene A, Shimizu H, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Novel human parechovirus, Sri Lanka. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(1):130-132.
- King AMQ, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypiä T, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Palmenberg AC, Skern T, Stanway G. Picornaviridae. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet, C.M. Bishop, D.H.L. Calisher, C.H. Carsten, E.B. Estes, M.K. Lemon, S.M. Maniloff, J. Mayo, M.A. McGeoch, D.J. Pringle, C.R. and Wickner, R.B. editor. *Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses.* New-York, San Diego: Academic Press. p 657-673.
- Krogerus C, Egger D, Samuilova O, Hyypia T, Bienz K. Replication complex of human parechovirus 1. *J Virol.* 2003; 77(15): 8512-23.
- Levorson RE, Jantusch BA, Wiedermann BL, Spiegel HML, Campos JM. Human Parechovirus-3 Infection Emerging Pathogen in Neonatal Sepsis. *Pediatric Infectious Disease Journal.* 2009; 28(6): 545-7.
- Li L, Victoria J, Kapoor A, Naeem A, Shaukat S, Sharif S, Alam MM, Angez M, Zaidi SZ, Delwart E. Genomic characterization of novel human parechovirus type. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(2): 288-91.
- Lodder WJ, Wuite M, de Roda Husman AM, Rutjes SA. Environmental surveillance of human parechoviruses in sewage in The Netherlands. *Applied and environmental microbiology.* 2013; 79(20): 6423-8.
- Ljubin-Sternak S, Juretić E, Šantak M, Pleša M, Forčić D, Vilibić-Čavlek T, Aleraj B, Mlinarić-Galinović G. Clinical and molecular characterization of a parechovirus type 1 outbreak in neonates in Croatia. *J Med Virol.* 2011;83(1):137-41.

- Mamishi S, Rahimi P, Sohrabi A, Sabuni F, Edalat R, Mostafavi E, Haghi Ashtiani MT, Azadmanesh K, Poorakbari B, Motamedi Rad M, Abdoli F. Direct serotyping of enteroviruses in cerebrospinal fluid from children with aseptic meningitis. *Jundishapur J Microbiol.* 2013; doi:10.5812/jjm.7852
- Mizuta K, Kuroda M, Kurimura M, Yahata Y, Sekizuka T, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Noda M, Kimura H, Mizutani T, Kato T, Kawanami T, Ahiko T. 2012. Epidemic myalgia in adults associated with human parechovirus type 3 infection, Yamagata, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2008; 18(11): 1787-93.
- Nateri AS, Hughes PJ, Stanway G. Terminal RNA replication elements in human parechovirus 1. *J Virol.* 2002; 76(24): 13116-22.
- Nateri AS, Hughes PJ, Stanway G. In vivo and in vitro identification of structural and sequence elements of the human parechovirus 5' untranslated region required for internal initiation. *J Virol.* 2010; 74(14): 6269-77.
- Nix WA, Khetsuriani N, Penaranda S, Maher K, Venczel L, Cselko Z, Freire MC, Cisterna D, Lema CL, Rosales P, Rodriguez JR, Rodriguez W, Halkyer P, Ronveaux O, Pallansch MA, Oberste MS. Diversity of picornaviruses in rural Bolivia. *J Gen Virol.* 2013; 94(Pt 9): 2017-28.
- Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, Oberste MS. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(8): 2519-24.
- Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2698-704
- Noordhoek GT, Wheel JFL, Poelstra E, Hooghiemstra M, Brandenburg AH. Clinical validation of a new real-time PCR assay for detection of enteroviruses and parechoviruses, and implications for diagnostic procedures (vol 41, pg 75, 2008). *J Clin Virol.* 2008; 43(3): 351.
- Oberste MS, Feeroz MM, Maher K, Nix WA, Engel GA, Begum S, Hasan KM, Oh G, Pallansch MA, Jones-Engel L. Naturally Acquired Picornavirus Infections in Primates at the Dhaka Zoo. *J Virol.* 2013a; 87(1): 572-80.
- Oberste MS, Feeroz MM, Maher K, Nix WA, Engel GA, Hasan KM, Begum S, Oh G, Chowdhury AH, Pallansch MA, Jones-Engel L. Characterizing the picornavirus landscape among synanthropic nonhuman primates in Bangladesh, 2007 to 2008. *J Virol.* 2013b; 87(1): 558-571.
- Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Complete sequence of echovirus 23 and its relationship to echovirus 22 and other human enteroviruses. *Virus Res.* 1998; 56(2): 217-23.
- Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Specific detection of echoviruses 22 and 23 in cell culture supernatants by RT-PCR. *J Med Virol.* 1999, 58(2): 178-81.
- Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA (2003) Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol.* 26:375-377.
- Pajkrt D, Benschop KS, Westerhuis B, Molenkamp R, Spanjerberg L, Wolthers KC. Clinical characteristics of human parechoviruses 4-6 infections in young children. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28(11): 1008-10.
- Papa A, Skoura L, Dumaïdi K, Spiliopoulou A, Antoniadis A, Frantzidou F. Molecular epidemiology of Echovirus 6 in Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28: 683-7.
- Pham NT, Takanashi S, Tran DN, Trinh QD, Abeysekera C, Abeygunawardene A, Khamrin P, Okitsu S, Shimizu H, Mizuguchi M, Ushijima H. Human parechovirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in Sri Lanka. *J Clin Microbiol.* 2010; 49(1): 364-6.
- Pham NTK, Trinh QD, Chan-It W, Khamrin P, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. A novel RT-multiplex PCR for detection of Aichi virus, human parechovirus, enteroviruses, and human bocavirus among infants and children with acute gastroenteritis. *J Virol Methods.* 2010; 169(1): 193-7.
- Pineiro L, Vicente D, Montes M, Hernandez-Dorronsoro U, Cilla G. Human Parechoviruses in Infants With Systemic Infection. *J Med Virol.* 2010; 82(10): 1790-96.

- Piralla A, Mariani B, Stronati M, Marone P, Baldanti F. Human enterovirus and parechovirus infections in newborns with sepsis-like illness and neurological disorders. *Early Hum Dev.* 2014; 90 Suppl 1: S75-7.
- Rahimi P, Tabatabaie H, Gouya MM, Mahmudi M, Musavi T, Samimi Rad K, MokhtariAzad T, Nategh R (2009) Direct identification of non-polio enteroviruses in residual paralysis cases by analysis of VP1 sequences. *J Clin Virol.* 45(2):139-141.
- Renaud C, Kuypers J, Ficken E, Cent A, Corey L, Englund JA. Introduction of a novel parechovirus RT-PCR clinical test in a regional medical center. *J Clin Virol.* 2011; 51(1): 50-3.
- Roitt I, Brostoff J, Male D, Mechanisms of cell migration. In: *Immunology* 6th ed. 2001:3.
- Romero JR, Newland JG. Viral meningitis and encephalitis: Traditional and emerging viral agents. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2003; 14: 72-82.
- Samuilova O, Krogerus C, Fabrichniy I, Hyypia T. ATP hydrolysis and AMP kinase activities of nonstructural protein 2C of human parechovirus 1. *J Virol.* 2006; 80(2): 1053-8.
- Schnurr D, Dondero M, Holland D, Connor J. Characterization of echovirus 22 variants. *Arch Virol.* 1996; 141(9): 1749-58.
- Schuffenecker I, Javouhey E, Gillet Y, Kugener B, Billaud G, Floret D, Lina B, Morfin F. Human parechovirus infections, Lyon, France, 2008-10: Evidence for severe cases. *J Clin Virol.* 2012; 54(4): 337-41.
- Schultheiss T, Emerson SU, Purcell RH, GaussMuller V. Polyprotein processing in echovirus 22: A first assessment. *Biochem Biophys Res Co.* 1995; 217(3):1120-27.
- Sedmak G, Nix WA, Jentzen J, Haupt TE, Davis JP, Bhattacharyya S, Pallansch MA, Oberste MS. Infant Deaths Associated with Human Parechovirus Infection in Wisconsin. *Clin Infect Dis.* 2010; 50(3): 357-61.
- Seitsonen J, Susi P, Heikkila O, Sinkovits RS, Laurinmaki P, Hyypia T, Butcher SJ. Interaction of alpha(V) beta (3) and alpha (V) beta (6) Integrins with Human Parechovirus 1. *J Virol.* 2010; 84(17): 8509-8519.
- Selvarangan R, Nzabi M, Selvaraju SB, Ketter P, Carpenter C, Harrison CJ. Human Parechovirus 3 Causing Sepsis-like Illness in Children From Midwestern United States. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30(3): 238-42.
- Shan TL, Wang CM, Cui L, Delwart E, Yuan CL, Zhao W, Guo W, Dai XQ, Yu Y, Hua XG. Human Parechovirus Infections in Monkeys with Diarrhea, China. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(7): 1168-9.
- Sharp J, Bell J, Harrison CJ, Nix WA, Oberste MS, Selvarangan R. Human parechovirus in respiratory specimens from children in Kansas City, Missouri. *J Clin Microbiol.* 2012a; 50(12): 4111-3.
- Sharp J, Harrison CJ, Puckett K, Selvaraju SB, Penaranda S, Nix WA, Oberste MS, Selvarangan R. Characteristics of Young Infants in Whom Human Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res.* 2012b; 22 (22): 4673-80.
- Shoji K, Komuro H, Miyata I, Miyairi I, Saitoh A. Dermatologic Manifestations of Human Parechovirus Type 3 Infection in Neonates and Infants. *Pediatric Infectious Disease Journal.* 2013; 32(3): 233-6.
- Siafakas N, Markoulatos P, Levidiotou-Stefanou S. Molecular identification of enteroviruses responsible for an outbreak of aseptic meningitis; implications in clinical practice and epidemiology. *Mol Cell Probes.* 2004; 18: 389-98.
- Stanway G, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypia T, King AMQ, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD & other authors. Family Picornaviridae. In *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. London: Elsevier. 2005; pp. 757-78.
- Stanway G, Joki-Korpela P, Hyypia T. Human parechoviruses--biology and clinical significance. *Reviews in medical virology.* 2000; 10(1): 57-69.

- Sun GM, Wang Y, Tao G, Shen Q, Cao WP, Chang XL, Zhang W, Shao C, Yi ML, Shao SH, Yang Y. Complete Genome Sequence of a Novel Type of Human Parechovirus Strain Reveals Natural Recombination Events. *J Virol*. 2012; 86(16): 8892-3.
- Tauriainen S, Oikarinen S, Taimen K, Laranne J, Sipila M, Lonnrot M, Ilonen J, Simell O, Knip M, Hyoty H. 2008. Temporal relationship between human parechovirus 1 infection and otitis media in young children. *J Infect Dis*. 1998; 198(1): 35-40.
- Triantafilou K, Triantafilou M, Takada Y, Fernandez N. Human parechovirus 1 utilizes integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 1 as receptors. *J Virol*. 2000; 74(13): 5856-62.
- Van der Linden L, Wolthers KC, van Kuppeveld FJ. Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses*. 2015 Aug 10;7(8):4529-62.
- Van der Sanden S, E. de B, Vennema H, Swanink C, Koopmans M, van der Avoort H. 2008. Prevalence of human parechovirus in the Netherlands in 2000 to 2007. *J Clin Microbiol*. 46: 2884-2889.
- Van Zwol AL, Lequin M, Aarts-Tesselaar C, van der Eijk AA, Driessen GA, de Hoog M, Govaert P. Fatal neonatal parechovirus encephalitis. *BMJ case reports* 2009; 2009.
- Verboon-Macielek MA, Groenendaal F, Hahn CD, Hellmann J, van Loon AM, Boivin G, de Vries LS. Human parechovirus causes encephalitis with white matter injury in neonates. *Ann Neurol*. 2008a; 64(3): 266-73.
- Verboon-Macielek MA, Krediet TG, Gerards LJ, de Vries LS, Groenendaal F, van Loon AM. Severe neonatal parechovirus infection and similarity with enterovirus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2008b; 27(3): 241-5.
- Vergnano S, Kadambari S, Whalley K, Menson EN, Martinez-Alier N, Cooper M, Sanchez E, Heath PT, Lyall H. Characteristics and outcomes of human parechovirus infection in infants (2008-2012). *Eur J Pediatr*. 2015; 174(7): 919-24.
- Walters B, Penaranda S, Nix WA, Oberste MS, Todd KM, Katz BZ, Zheng X. Detection of human parechovirus (HPeV)-3 in spinal fluid specimens from pediatric patients in the Chicago area. *J Clin Virol*. 2011; 52(3): 187-91.
- Watanabe K, Oie M, Higuchi M, Nishikawa M, Fujii M. Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13(6): 889-95.
- Wigand R, Sabin AB. Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1961; 11: 224-47.
- Wildenbeest JG, Harvala H, Pajkrt D, Wolthers KC. The need for treatment against human parechoviruses: how, why and when? Expert review of anti-infective therapy. 2010; 8(12): 1417-29.
- Wolthers K, Benschop K, Schinkell J, Motenkamp R, Spijkerman I, Kraakman H, Pajkrt D. Human parechoviruses (HPeV) as an important cause for sepsis/meningitis in infants. *Acta Clin Belg*. 2007; 62(6): 452.
- Wolthers KC, Benschop KS, Schinkel J, Molenkamp R, Bergevoet RM, Spijkerman IJ, Kraakman HC, Pajkrt D. Human parechoviruses as an important viral cause of sepsislike illness and meningitis in young children. *Clin Infect Dis*. 2008; 47(3): 358-63.
- Yuzurihara SS, Ao K, Hara T, Tanaka F, Mori M, Kikuchi N, Kai S, Yokota S. Human parechovirus-3 infection in nine neonates and infants presenting symptoms of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Infect Chemother*. 2013 Feb;19(1):144-8.
- Zhang DL, Jin Y, Li DD, Cheng WX, Xu ZQ, Yu JM, Jin M, Yang SH, Zhang Q, Cui SX, Liu N, Duan ZJ. Prevalence of human parechovirus in Chinese children hospitalized for acute gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(10): 1563-9.
- Zhong HQ, Lin Y, Sun JE, Su LY, Cao LF, Yang Y, Xu J. Prevalence and Genotypes of Human Parechovirus in Stool Samples From Hospitalized Children in Shanghai, China, 2008 and 2009. *J Med Virol*. 2011; 83(8): 1428-34.

8. EKLER

Etik Kurul Kararı

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı:56

Toplantı Tarihi: 03.11.2017

Karar Sayısı:2017/1061:Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR' in "Konya Bölgesindeki Solunum Yolu Patojeni Olan İnsan Parechovirüslerinin (HPeV) Araştırılması" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 31.10.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Semih TOKAK' ın yüksek lisans tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR' in sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR

Yardımcı araştırmacı: Semih TOKAK

ASLI GİBİDİR

03.11.2017



Prof. Dr. Ayşe S. SAHİN

İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkan Yardımcısı