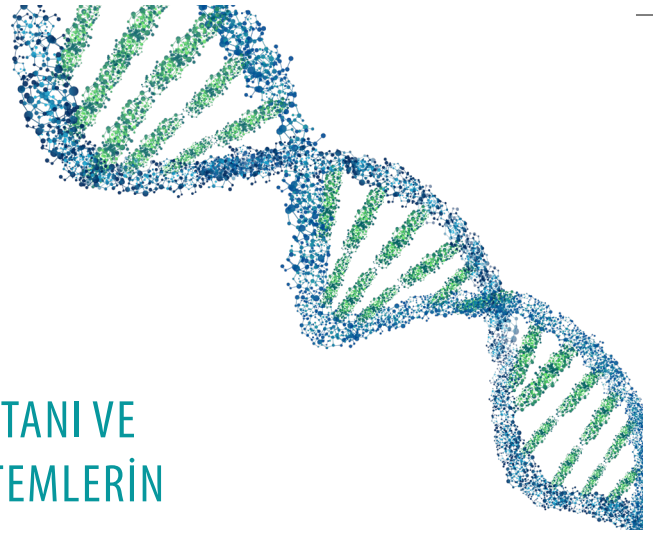


BÖLÜM 37

ASEPTİK MENENJİT ETKENİ VİRÜSLERİN TANI VE EPİDEMİYOLOJİSİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN KULLANIMI



Selma GÖKAHMETOĞLU¹

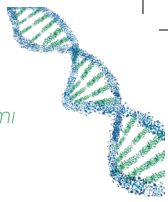
Santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonunda etken olan virüsler arasında herpes simplex virüs (HSV), enterovirüs (EV), human herpes virüs 6 (HHV-6), 'human immunodeficiency' virüs (HIV), dengue virüs, influenza virüs, parainfluenza, Hendra, Nipah, Epstein-Barr virüs (EBV), JC polyomavirus, parvovirüs B-19, kuduz, kızamık, kabakulak, varicella zoster virüs (VZV), Batı Nil ateşi virüsü (BNV), cytomegalovirüs (CMV), adenovirüs (ADV), rotavirüs, Zika virüs, lenfositik koriyomenenjit virüsü (LCMV), arbovirüsler, human T lenfosit virüsü (HTLV), Marburg ve Ebola virüsler bulunmaktadır. Ülkemizde viral etkenlere bağlı SSS enfeksiyonlarının moleküler yöntemlerle yedi yıllık değerlendirmesinin yapıldığı çalışmada; en sık saptanan etkenler içinde EV ve HSV tip 1 bulunurken, ADV, VZV, EBV ve CMV daha nadir etkenler olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada EV RNA pozitif saptanan hastaların %95'nin ≤ 18 yaş grubunda olduğu ve EV enfeksiyonlarının %80.9'nun yaz-sonbahar aylarında saptandığı bulunmuştur ¹.

Santral sinir sistemi viral enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında beyin omurilik sıvısının

(BOS) direkt incelenmesi, hücre kültüründe virüs izolasyonu, seroloji ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Yakın zamana kadar mikrobiyoloji laboratuvarlarında SSS enfeksiyonlarında viral tanı klinikte belirgin bir işleve sahip değildi. Hücre kültürü, elektron mikroskobu veya seroloji gibi klasik viral tanı yöntemlerinin klinik yönetim üzerinde yalnızca minimum etkisi bulunmaktaydı. Moleküler testler antiviral ilaçların geliştirilmesiyle, ilaçları belirlemek ve bu ilaçlara verilen yanıtların yeterliliğini izlemek için de kullanılmaktadır ².

Tanıda moleküler yöntemler giderek daha fazla kullanılmasına rağmen, viral kültür yöntemleri önemli olmaya devam etmektedir. Virüs kültürü, hayvan modellerinde çalışmak için virüs stokları geliştirmenin yanı sıra, antikorların nötralizasyon kapasitesi, aşı yanıtları ve ilaçları test etmek için de çok önemlidir. Bazı virüsler devamlı hücre hatlarında üreyebilirken, diğerleri ise yalnızca primer veya organotipik kültürlerde üreyebilmektedir. Halen bazı virüslerin üretilmesinde, doğal immüneyi baskılamak için antikorların veya RNA interferans kullanılması veya emziren fareler gibi canlı

¹ Prof. Dr., Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD., selmagk@gmail.com



SSS Enfeksiyonlarında Moleküler Testlerde Yanlış Negatif Sonuç Alınma Nedenleri

- 1-Spesifik mikroorganizma için bir laboratuvar testinin yetersiz analitik hassasiyeti [örneğin organizmanın konsantrasyonu (nükleik asit) fonksiyonel saptama sınırının altındadır],
- 2-Amplifikasyonun "inhibisyonu" (çoğunlukla BOS'un yüksek sayıda eritrosit içermesi),
- 3- İnhibisyon olmamasına rağmen testte mikroorganizmanın amplifiye edilememesi veya tespit edilememesi (nadir, genellikle tanınmayan türlerin genetik varyasyonu veya RNA virüslerinde olduğu gibi yüksek mutasyon oranı nedeniyle),
- 4-Yetersiz klinik duyarlılık [örn., hastalığın patofizyolojisi (örn. Batı Nil virüsü), uzun süreli tedavi ve/veya bağışıklık klerensi nedeniyle gönderilen örnekte mikroorganizma konsantrasyonu düşüktür],
- 5-Örnekleme hatası (düşük nükleik asit konsantrasyonunda oluşur ve moleküler testlerde kullanılan doğal olarak küçük test hacimleriyle ilgilidir),
- 6-Neden olan organizma için test yapılmaması (örneğin, çoğu moleküler test yalnızca tek bir hedef patojeni saptadığından, uygun patojene özgü test yapılmamıştır) ³.

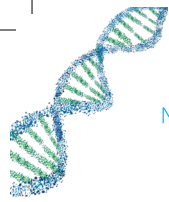
SSS enfeksiyonlarında Moleküler Testlerde Yanlış Pozitif Sonuç Alınma Nedenleri

- 1-Numune toplama sırasında (örneğin steril olmayan teknik, BOS'un kanla kontaminasyonu) veya toplama sonrası (örneğin laboratuvarıda bulaşan bir organizmanın amplifikasyonu),
- 2-Etken olmayan mikroorganizmanın amplifikasyonu (örneğin, akut inflamasyon sırasında KK-B'ni geçen dolaşımdaki lökositlerde bulunan mikroorganizma),
- 3-Latent enfeksiyonda nükleik asit amplifikasyonu,
- 4-Test primeri veya prob dizilerinin özgüllüğünün olmaması ³.

Pozitif sonuçların diğer klinik bulgular ve enfeksiyon olasılığı bağlamında yorumlanması da önemlidir.

Kaynaklar

1. Varıcı Balcı FK, Sayiner AA. Viral etkenlere bağlı santral sinir sistemi enfeksiyonlarının yedi yıllık değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2019;53(4): 434-441.
2. Lipkin WL, Hornig M. Diagnostic and discovery in central nervous system infections. Brain Pathology 2015;25: 600-604.
3. Pety CA, Polage CR. Molecular diagnosis of central nervous system infections. In J. Mitty (Ed), UpToDate, 2022. Erişim tarihi: 16.05.2022 <https://www.uptodate.com/contents/molecular-diagnosis-of-central-nervous-system-infections>.
4. Conca N, Santolaya ME, Farfan MJ, Cofre F, Vergara A, Salazar L, et al. Etiologic diagnosis in meningitis and encephalitis molecular biology techniques. Rev Chil Pediatr 2016;87(1): 24-30.
5. Ohkusu K. Molecular approaches for the diagnosis of central nervous system infections. Brain Nerve 2015;67(7): 799-811.
6. Jin D, Heo TH, Byeon JH, Kim GH, Kim MK, Eun SH, et al. Analysis of clinical information and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for early diagnosis of enteroviral meningitis. Korean J Pediatr 2015;58(11): 446-50.
7. Nolte FS, Rogers BB, Tang YW, Oberste MS, Robinson CC, Eun SH, et al. Evaluation of a rapid and completely automated real-time reverse transcriptase PCR assay for diagnosis of enteroviral meningitis. J Clin Microbiol 2011;49(2): 528-33.
8. Shaker OG, Abdelhamid N. Detection of enteroviruses in pediatric patients with aseptic meningitis. Clin Neurol Neurosurg 2015;129: 67-71.
9. Meyer T, Franke G, Polywka SK, Lütgehetmann M, Gbadamosi J, Magnus T, et al. Improved detection of bacterial central nervous system infections by use of a broad-range PCR assay. J Clin Microbiol 2014;52(5): 1751-3.
10. Mishra AK, Dufour H, Roche PH, Lonjon M, Raoult D, Fournier PE. Molecular revolution in the diagnosis of microbial brain abscesses. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014;33(12): 2083-93.
11. Moayedi AR, Nejatizadeh A, Mohammadian M, Rahmati MB, Namardizadeh V. Accuracy of universal polymerase chain reaction (PCR) for detection of bacterial meningitis among suspected patients. Electron Physician 2015;7(8): 1609-12.
12. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. J Microbiol 2015;53(1): 1-5.
13. Palacios G, Quan PL, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, Liu Y et al. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. Emerg Infect Dis 2007;13: 73-81
14. Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, Avila PC, Boushey HA, Ganem D, Derisi JL. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99: 15687-92.
15. Rowley AH, Whitley RJ, Lakeman FD, Wolinsky SM. Rapid detection of herpes-simplex-virus DNA in cerebrospinal



- fluid of patients with herpes simplex encephalitis. *Lancet* 1990;335(8687): 440-1.
16. Tang YW. Laboratory diagnosis of CNS infections by molecular amplification techniques. *Expert Opin Med Diagn* 2007;1(4): 489-509.
 17. Gitman MR, Ferguson D, Landry ML. Comparison of Simplex HSV 1 & 2 PCR with culture, immunofluorescence, and laboratory-developed TaqMan PCR for detection of herpes simplex virus in swab specimens. *J Clin Microbiol* 2013;51(11): 3765-9.
 18. Giulieri SG, Chapuis-Taillard C, Manuel O, Hugli O, Pignet C, Wasserfallen TB, et al. Rapid detection of enterovirus in cerebrospinal fluid by a fully-automated PCR assay is associated with improved management of aseptic meningitis in adult patients. *J Clin Virol* 2015;62: 58-62.
 19. He T, Kaplan S, Kamboj M, Tang YW. Laboratory diagnosis of central nervous system infection. *Curr Infect Dis Rep* 2016;18(11): 35.
 20. Briese T, Palacios G, Kokoris M, Jabado O, Liu Z, Renwick N, et al. Diagnostic system for rapid and sensitive differential detection of pathogens. *Emerg Infect Dis* 2005;11: 310-313.
 21. Piccirilli G, Chierighin A, Gabrielli L, Giannella M, Squarzone D, Turello G, et al. Infectious meningitis/encephalitis: evaluation of a rapid and fully automated multiplex PCR in the microbiological diagnostic workup. *New Microbiologica* 2018;41: 118-125.
 22. Rajasingham R, Rhein J, Klammer K, Musibire A, Nabeta H, Akampurira A, et al. Epidemiology of meningitis in an HIV-infected Ugandan cohort. *Am J Trop Med Hyg* 2015;92(2): 274-9.
 23. Kelly C, Sohal A, Michael BD, Riordan A, Solomon T, Kneer R. Suboptimal management of central nervous system infections in children: a multi-centre retrospective study. *BMC Pediatr* 2012;12: 145.
 24. Hall CB, Caserta MT, Schnabel K, Shelley LM, Marino AS, Carnahan JA, et al. Chromosomal integration of human herpesvirus 6 is the major mode of congenital human herpes-virus 6 infection. *Pediatrics* 2008;122: 513-520.
 25. Gomez CA, Pinsky BA, Liu A, Banaei N. Delayed diagnosis of tuberculous meningitis misdiagnosed as herpes simplex virus-1 (HSV-1) encephalitis with the FilmArray syndromic PCR panel. *Open Forum Infect Dis* 2016;4(1): ofw245.
 26. Tansarli GS, Chapin KC. Diagnostic test accuracy of the Biofire FilmArray meningitis/encephalitis panel: A systematic review and meta analysis. *Clin Microbiol Infect* 2020;26: 281.
 27. Ramanan P, Bryson AL, Binnicker MJ, Pritt BS, Patel R. Syndromic panel-based testing in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 2018;31: e0002417.
 28. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol* 2017;35: 833-844.
 29. Morfopoulou S, Plagnol V. Bayesian mixture analysis for metagenomic community profiling. *Bioinformatics* 2015;31: 2930-2938.
 30. Brown JR, Bharucha T, Breuer J. Encephalitis diagnosis using metagenomics: application of next generation sequencing for undiagnosed cases. *J Infect* 2018; 76: 225-240.
 31. Houlihan CF, Bharucha T, Breuer J. Advances in molecular diagnostic testing for central nervous system infections. *Curr Opin Infect Dis* 2019;32(3): 244-250.
 32. Zanello M-C, Lenggenhager L, Schrenzel J, Cordey S, Kaiser L. High-throughput sequencing for the aetiological identification of viral encephalitis, meningoencephalitis, and meningitis. A narrative review and clinical appraisal. *Clin Microbiol Infect* 2019;25(4): 422-430.
 33. Edridge AWD, Deijs M, Namazzi R, Cristella C, Jebbink MK, Maurer I, et al. Novel orthobunyavirus identified in the cerebrospinal fluid of a Ugandan child with severe encephalopathy. *Clin Infect Dis* 2019;68: 139-142.
 34. Mai NTH, Phu NH, Nhu LNT, Hong NTT, Hanh NHH, Nguyet LA, et al. Central nervous system infection diagnosis by next-generation sequencing: a glimpse into the future? *Open Forum Infect Dis* 2017;4: ofx046.
 35. Bukowska-Os'ko I, Perlejewski K, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Kosinska J, et al. Sensitivity of next-generation sequencing metagenomic analysis for detection of RNA and DNA viruses in cerebrospinal fluid: the confounding effect of background contamination, pp:53-62. In: Pokorski M, (ed) *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016. Springer, Cham, Switzerland.
 36. Wilson MR, O'Donovan BD, Gelfand JM, Sample HA, Chow FC, Kosinska J, et al. Chronic meningitis investigated via metagenomic next-generation sequencing. *JAMA Neurol* 2018;75: 947.
 37. Silverman RH, Das Gupta J, Lombardi VC, Ruscetti FW, Pfost MA, Hagen KS, et al. Partial retraction. Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. *Science* 2011;334: 176.
 38. Marano G, Franchini M, Farina B, Piccinini V, Pupella S, Vaglio S, et al. The human pegivirus: a new name for an ancient virus. Can transfusion medicine come up with something new? *Acta Virol* 2017;61: 401-412.
 39. Fridholm H, Østergaard Sørensen L, Rosenstjerne MW, Nielsen H, Sellebjerg F, Andersen AB, et al. Human pegivirus detected in a patient with severe encephalitis using a metagenomic panvirus array. *J Clin Virol* 2016;77:5-8.
 40. Bukowska-Os'ko I, Perlejewski K, Pawełczyk A, Rydzanicz M, Pollak A, Papiel M, et al. Human pegivirus in patients with encephalitis of unclear etiology, Poland. *Emerg Infect Dis* 2018;24: 1785-1794.
 41. Hardie D, Smuts H. Human pegivirus-1 in the CSF of patients with HIV-associated neurocognitive disorder (HAND) may be derived from blood in highly viraemic patients. *J Clin Virol* 2017;91: 58-61.
 42. Keene JD. The global dynamics of RNA stability orchestrates responses to cellular activation. *BMC Biol BioMed* 2010;8: 95.
 43. Gliddon HD, Herberg JA, Levin M, Kaforou M. Genome-wide host RNA signatures of infectious diseases: discovery and clinical translation. *Immunology* 2018;153: 171-178.
 44. Cercenado E. Utility of rapid microbiological techniques for the diagnosis of severe infections. *Rev Esp Quimioter* 2017; 30(Suppl 1): 52-55.
 45. Le´ve`que N, Legoff J, Mengelle C, Mercier-Delarue S, N'guyen Y, Renois F, et al. Virological diagnosis of central nervous system infections by use of PCR coupled with mass spectrometry analysis of cerebrospinal fluid samples. *J Clin Microbiol* 2014;52: 212-217.
 46. Bishop B, Geffen Y, Plaut A, Kassis O, Bitterman R, Paul M, et al. The use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid bacterial identification in patients with smear-positive bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect* 2018;24: 171-174.
 47. 47-Njunge JM, Oyaro IN, Kibinge NK, Rono MK, Kariku SM, Newton CR, et al. Cerebrospinal fluid markers to distinguish bacterial meningitis from cerebral malaria in children. *Wellcome Open Res* 2017;2: 47.