T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SANTRAL SİNİR SİSTEMİ ENFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER TEST SONUÇLARININ RETROSPEKTİF OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Osman MERDAN

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SANTRAL SİNİR SİSTEMİ ENFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER TEST SONUÇLARININ RETROSPEKTİF OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Osman MERDAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: İmran SAĞLIK

Bursa-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ii

İNGİLİZCE ÖZET……iv

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarının Patofizyolojisi 3

Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarının Sınıflandırması 7

Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi 9

Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojisi 11

Diğer Tanı Yöntemleri 13

Moleküler Tanı Yöntemleri 15

Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarında Sık Tespit Edilen Patojenlerin Tanısına Yaklaşım 16

GEREÇ VE YÖNTEM 19

BOS Örneklerinin Direkt Mikroskobik İncelenmesi 20

BOS Örneklerinin Bakteriyel Etkenlere Yönelik Kültürü 20

BOS Örneklerinden Nükleik Asit İzolasyonu 20

FTD Viral Menenjit Paneli 22

Bio-Speedy Menenjit/Ensefalit RT-qPCR MX-17S Paneli 22

Verilerin Analizi 24

BULGULAR 26

TARTIŞMA 35

KAYNAKLAR 42

EKLER 47

EK – 1: Araştırma İzinleri 47

TEŞEKKÜR 49

ÖZGEÇMİŞ 50

ÖZET

Teknolojik gelişmelere rağmen, santral sinir sistemi enfeksiyonlarının (SSS) teşhisi hala zordur. Bu çalışmanın amacı, merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarının tanısında moleküler panel sonuçlarının restorspektif olarak değerlendirilmesidir.

Bio-Speedy Menenjit/Ensefalit (ME) (Bioeksen, İstanbul, Türkiye) paneli, 17 patojenin eş zamanlı, hızlı (~1 saat) tespitini amaçlayan bir multipleks PCR testidir.

Bu çalışma, Haziran 2022 ile Mart 2023 arasında SSS enfeksiyonu şüphesi olan 88 hastanın BOS örneklerini içermektedir. Bio-Speedy panelinin sonuçları, gram boyama/bakteri kültürü ve FTD Viral menenjit Kiti (Fast Track Diagnostics Ltd, Lüksemburg) (AB'de IVD kullanımı için CE işaretli) (HSV-1, HSV-2, VZV, EV, Mumps virüsü, HPeV) ile karşılaştırılmıştır.

On altı (%18,2) örnekte en az bir yöntemle bakteri veya virüs saptanmıştır ve bunların 12'si (%13,6) doğru pozitif olarak kabul edilmiştir. BioSpeedy paneli ile toplam dokuz sonuç [VZV (n=3), EV (n=1), *S. pneumoniae* (n=2), *N. Meningitides* (n=1*), H. influenzae* (n=1)] doğru pozitif olarak değerlendirilmiştir. Dört virüs [VZV (n=3), EV (n=1)], hem BioSpeedy hem de FTD panelinde tespit edilmiştir. İki örnekte sadece FTD paneli ile virüs [Kabakulak virüsü, HSV-2] tespit edilebilmiştir. Bir etken (*S. pyogenes*) sadece bakteriyel kültür ile tespit edilebilimiştir. Yalnızca Biospeedy tarafından tespit edilen toplam beş patojen [*S. pneumoniae* (n=2), HHV-6 (n=2), HHV-7 (n=1)] klinik anlamı belirsiz olarak değerlendirilmiştir.

Biospeedy moleküler tanı paneli, yanlış negatif sonuçları önlemek ve doğru bir teşhis sağlamak için geniş bir ölçekte çok çeşitli olası patojenler içerir. Ancak yöntem kaynaklı klinik anlamı belirsiz sonuçlarından ve gereksiz tedavi uygulamalarından kaçınmak için test sonuçlarının klinik ve laboratuvar muayeneye göre yorumlanması veya doğrulanması gerekir.

Anahtar kelimeler: Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, Menenjit, Ensefalit, Moleküler tanı, Multipleks PCR panelleri

SUMMARY

Despite the technological advancements, diagnosis of central nervous system infections is still challenging. Retorspective evaluation of central nervous system infections' molecular test results using commercially available multiplex PCR panels was the aim of this study.

The Bio-Speedy Meningitis/Encephalitis (ME) (Bioeksen, Istanbul, Turkey) panel is a multiplex PCR test aiming for the simultaneous, rapid (~1-h) detection of 17 from cerebrospinal fluid (CSF) specimens for in vitro diagnosing of CNS infections.

This study included CSF specimens of 88 patients with suspected CNS infection between June 2022 and March 2023. The results of the Bio-Speedy panel were compared with gram staining/bacterial culture and the FTD Viral meningitis Kit (Fast Track Diagnostics Ltd, Luxemburg) (CE-marked for IVD use in the EU) (HSV-1, HSV-2, VZV, EV, Mumps virus, HPeV).

A bacteria or a virus were detected by at least one method in 16 (18.2%) samples, and 12 (13.6%) of them were accepted as true positives. A total of nine results with the BioSpeedy panel [VZV (n=3), EV (n=1), *S. pneumoniae* (n=2), *N. meningitidis* (n=1), *H. influenzae* (n=1)] evaluated as true positives. Four viruses [VZV (n=3), EV (n=1)] were detected in both the BioSpeedy and FTD panels. In two samples viruses [Mumps virus, HSV-2] could be detected only by the FTD panel. An agent (*S.pyogenes*) could only be detected in culture. A total of five pathogens [*S. pneumoniae* (n=2), HHV-6 (n=2), HHV-7 (n=1)] detected only by Biospeedy were evaluated as indetermined.

The Biospeedy molecular diagnostic panel includes a wide range of possible pathogens on a broad scale to avoid false negative results and ensure an accurate diagnosis. However, test results should be interpreted or confirmed according to clinical and laboratory to avoid method-related IP results and unnecessary treatment.

Keywords: Central nervous system infections, Meningitis, Encephalitis, Molecular diagnostics , Multiplex PCR panels

GİRİŞ VE AMAÇ

Santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları, SSS hastalıkları arasında sık görülmektedir. Nörolojik hastalıkların neden olduğu mortalite ve morbidite sıralamasında, gerek hastalık tablosu gerekse sonrasında gelişebilen nörolojik defisitler nedeniyle dördüncü sırada yer alırlar (1). Uygun tedavi edilmediklerinde neden oldukları nörolojik hasar ve ölüm riski artar. Tanıda klinik bulguların yanında, radyolojik incelemelerden ve laboratuvar testlerinden de yararlanılır. SSS enfeksiyonlarının etyolojik tanısında mikrobiyoloji laboratuvarları önemli rol oynamaktadır. Uzun yıllardır uygulanan ve kabaca geleneksel yöntemler olarak tanımlanan kültür temelli testler zaman alıcıdır bazen yetersiz kalabilir. Bazı olgularda birden fazla beyin omurilik sıvısı (BOS) örneğinin alınması hatta bazan cerrahi işlem uygulanması gerekebilir. Bu tanı çabalarına rağmen, menenjit veya ensefalit tablosu olan hastaların %40 ile 60'ında özgün tanı sağlanamayabilir (2). Ayrıca SSS enfeksiyonlarına çok sayıda patojenin neden olabilmesi, hem mikrobiyologlar hem de klinisyenler için ayırıcı tanıyı zorlaştırmaktadır. Hastalarda hızlı tanının erken ve özgün tedavi sağlayarak mortalite ve morbidite oranlarını azaltması tanıya yönelik yeni yöntemlerin uygulanmasını teşvik etmiştir.

Santral sinir sistemi enfeksiyonlarının tanısında birçok bakteriyel ve fungal etkenin uygun koşullar altında çoğaltılmasına ve gösterilmesine imkan sağlayan kültür yöntemi klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla uygulanmaktadır. Ancak bu yöntemde patojenlerin üremesi için inkübasyon süresi gerekmesi nedeniyle tanı ve özgün tedavi gecikebilir. BOS örneğinde patojene özgü antijen veya immün yanıtı tespit eden testler duyarlılık ve özgüllüklerinin düşük olması ve elde edilen sonuçların değerlendirilme zorluğu nedeniyle büyük ölçüde önemini kaybetmiştir. Nükleik asit amplifikasyon testleri (NAT), virüslerin ve kültürde güç üreyen bakteriyel patojenlerin neden olduğu SSS enfeksiyonlarının tanısını önemli ölçüde iyileştirmiştir. Özellikle Real Time-Polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi sağladığı

avantajlarla yaygın kullanılmakta ve moleküler NAT teknikleri arasında öne çıkmaktadır (3). Son zamanlarda multipleks veya sendromik yaklaşımla dizayn edilmiş RT-PCR tanı testleri birçok etkeni birlikte saptamaya imkan sağlamaları nedeniyle tercih edilmektedir. Bu testler tek bir BOS örneğinden çok sayıda patojeni hızlı şekilde tanımlama avantajlarıyla erken tedaviye olanak sağlamanın yanında, tanı ve tedavi maliyetinde tasarruf da sağlayabilirler. Değerlendirmenin nispeten kolay ve objektif olması bu testlerin diğer bir avantajıdır. Kullanılan moleküler tanı panelinin tüm olası etkenleri kapsıyor olması yalancı negatif sonuçların azaltılması ve doğru tanı sağlanma açısından önem taşımaktadır. Ancak özellikle bakteriyel etkenler için kültür yöntemiyle moleküler testlerin sonuçlarının doğrulanması, kontaminasyon veya teknik nedenlerden kaynaklanan yalancı pozitifliklerden kaçınmayı sağlayacaktır.

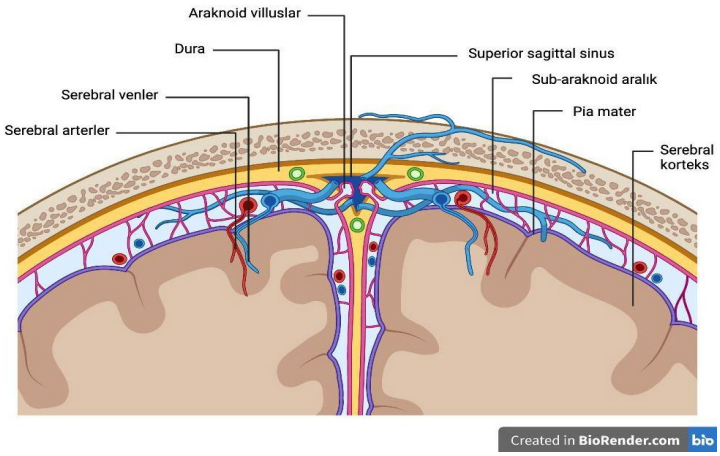
Günümüzde menenjit/ensefalit tanısına yönelik olarak kullanıma sunulan multipleks hedefli paneller bulunmaktadır. Bu paneller temelde sık görülen etkenleri kapsayacak şekilde dizayn edilse de farklılıklar göstermektedir. Bazıları belirli viral ve/veya bakteriyel patojenlerin yanı sıra *Cryptococcus neoformans/gattii* varlığını da tespit edebilir. Bunlar içerisinde FDA onayı almış olan sadece bir kit bulunmaktadır (FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel - BioFire Diagnostics). Ülkemizde de biyoteknoloji sektöründe çözümler üreten ticari firmalar bu alanda araştırma geliştirme faaliyetleri yürütmektedir. Ancak menenjit/ensefalit tanısına yönelik multipleks RT-PCR kitlerini hasta tanısında güvenle kullanabilmek için kit performanslarının hasta örneklerinin kullanıldığı gerçek yaşam verileriyle de belirlenmesi önemlidir.

Bu çalışmada santral sinir sistemi enfeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler test sonuçlarının diğer laboratuvar verileri ışığında retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarının Patofizyolojisi

Santral sinir sistemi enfeksiyonları, fiziksel ve immünolojik özellikler bakımından vücuttaki diğer enfeksiyonlardan farklılıklar gösterir. Beyin ve omurilik, kafatası ve vertebral kolonun iskelet sistemi tarafından iyi bir şekilde korunmaktadır. Beyin omurilik sıvısı ventriküllerin koroid pleksusunda üretilir, serebral hemisferi ve sisterna magnayı çevreleyen subaraknoid boşluğa akar (Şekil 1). Daha sonra araknoid villuslar tarafından geri emilir. BOS, beyin ve omuriliği çevreleyerek nöral dokuya destek sağlayarak yastıklama görevi görür, gerekli metabolitleri taşır ve SSS boyunca dolaşarak atıkları ortadan kaldırır. Kan-beyin bariyeri (KBB), enflamatuar hücrelerin ve mikroorganizmaların santral sinir sistemi dokularına girişini kontrol eden bir bariyer görevi görür. Normal koşullarda doğal bağışıklık üyelerinin BOS'ta olmaması da SSS enfeksiyonlarının ilerlemesini şiddetlendirebilir (4).



Şekil 1: Subaraknoid aralık ve komşuluklarının anatomisi (4). (Biorender kullanılarak oluşturulmuştur.)

Santral sinir sistemi enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan farmakolojik ajanlar, KBB'ye nüfuz etme kabiliyetine sahip olmalıdır. Ayrıca bu fiziksel bariyer nedeniyle bakteriyel eradikasyon için sıklıkla uygulanan tedavilerin yüksek dozda olması gerekebilir (5).

Santral sinir sistemi enfeksiyonları etkilenen bölge veya dokuya göre ayrılmaktadır. Menenjit, beyin zarlarının enfeksiyonudur. Beyin parankimini doğrudan etkilemez ve subaraknoid boşlukta sınırlı kalır. Ancak konağın inflamatuar yanıtı nöral dokuda hasara neden olabilir. Lökositlerin subaraknoid boşluğa göçü, kortikal damarlarının tıkanmasına ve içinden geçen sinir köklerinin zarar görmesine neden olarak kranial veya spinal sinir disfonksiyonuna ve hidrosefaliye yol açabilir. Lökositlerin aktivasyonu, sitokinlerin, oksidan moleküllerin ve proteolitik enzimlerin salınmasıyla sonuçlanan bir inflamatuar kaskadı tetikler. Hücresel düzeyde, bu olaylar dizisi KBB'nin ve serebrovasküler otoregülasyonun bozulmasına neden olabilir (5). Bunun sonucunda, azalmış doku perfüzyonu nedeniyle beyindeki nöronlar hipoksik kalabilir veya kafa içi basıncın artışı transtentoryal herniasyona yol açabilir (5).

Patojenler SSS' ye farklı yollarla ulaşabilir. Örneğin, bakteriyel menenjitin sık etkenleri olan *Streptococcus pneumoniae* ve *Neisseria meningitidis*, önce nazofarengeal epitel hücrelerine tutunarak nazofarenkste kolonize olur. Daha sonra epitel hücrelerinden geçerek veya aralarındaki sıkı bağlantılarda ayrımlar oluşturarak kan dolaşımına girebilirler. Bakteriler kan dolaşımına girdikten sonra, immün sistemin savunmasından kaçabilir ve intraventriküler koroid pleksusu enfekte ederek veya serebral kapiller endotel hücrelerine yapışarak BOS'a ulaşabilirler. BOS'ta etkin bir bağışık yanıt olmaması nedeniyle bakteriler bu ortamda hızla çoğalabilir. Antibiyotik tedavisiyle BOS bakteriden arındırılsa bile, patojene karşı oluşan immün yanıt nörolojik hasara neden olmaya devam edebilir. Bakterilerin parçalanması ve ardından hücre duvarı bileşenlerinin subaraknoid aralığa (SAA) salınması, inflamatuar yanıtın indüklenmesine ve SAA'da pürülan bir eksüda oluşumuna yol açar. Gram-negatif bakterilerin lipopolisakkarit molekülleri ve *S. pneumoniae*'nin teikoik asit ve peptidoglikanları gibi bakteriyel hücre duvarı

bileşenleri mikroglia, astrositler, monositler, mikrovasküler endotelyal hücreler ve BOS lökositlerinden sitokin salınımını indükler. Deneysel menenjit modellerinde, LPS'nin intrasisternal inokülasyonundan birkaç saat sonra tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) ve interlökin 1β (IL-1β) dahil sitokinlerin, BOS'ta bulunduğu gösterilmiştir (5). Bu sitokin salınımının hemen ardından BOS protein konsantrasyonunda ve lökositlerinde bir artış meydana gelir. Ek olarak, bakteriyemi ve enflamatuar sitokinler, uyarıcı amino asitlerin, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (serbest oksijen radikalleri, nitrik oksit ve peroksinitrit) ve özellikle hippokampusün dentat girusu başta olmak üzere beyin hücrelerinin ölümüne neden olabilen diğer aracıların üretimini indükler. Özellikle TNF-α ve IL-1β birlikte etki ederek KBB'nin geçirgenliğini artırır. Bu, vazojenik ödeme ve serum proteinlerinin subaraknoid boşluğa sızmasına neden olarak SAA'da proteinden yoğun eksüdanın ve lökositlerin birikmesine yol açar. Bu birikmeyle, ventriküler sistem boyunca BOS akışı yavaşlar, dural sinüslerdeki araknoid granülasyonların reabsorbsiyon kapasitesi azalır ve sonucunda obstrüktif hidrosefali ve interstisyel ödem görülebilir. Enflamatuar sitokinler, serebral kapillerlerin endotelyal hücrelerinde ve lökositlerde selektin ekspresyonunu uyararak, lökositlerin vasküler endotelyal hücrelere adezyonuna ve ardından BOS'a migrasyonuna yol açar. Lökositlerin kılcal damar endotel hücrelerine tutunması kan damarı geçirgenliğinde artışa neden olur. Böylece plazma proteinlerinin BOS'a sızması kolaylaşır ve enflamatuar eksüda artar.

Klasik bilgilere göre uyarılan ve BOS'a geçen lökositlerin bakteriyel enfeksiyonların önlenmesinde ve kliniğin iyileşmesinde yardımcı olduğuna inanılmaktaydı. Ancak son zamanlarda bu duruma dair yani yaklaşımlar ortaya atılmıştır (6). Uyarılan nötrofillerin degranülasyonuyla serbest kalan toksik metabolitler SSS'nde sitotoksik ödem, hücre hasarı hatta hücre ölümüne katkıda bulunur. Ek olarak, subaraknoid boşluktaki pürülan eksüda beyin tabanındaki büyük arterleri daraltabilir ve inflamasyon arter duvarına sızarak vaskülite neden olabilir (6). Bu da iskemi ve enfarktüse yol açabileceği gibi orta serebral arterin dallarının trombozla tıkanmasına neden olabilir. Ayrıca büyük serebral venöz sinüslerin ve serebral kortikal damarların

trombozu da meydana gelebilir. Dural sinüs veya kortikal ven trombozu gelişirse hidrosefali şiddetlenebilir. Ek olarak interstisyel, vazojenik ve sitotoksik ödemin birlikteliği kafa içi basıncının daha da artmasına, bu da herniasyona ve komaya yol açabilir (7).

Ensefalit beyin parenkiminin enfeksiyonudur. Temelde nörolojik işlev bozukluğuyla karakterize klinik bulgular görülmekle birlikte, meningeal inflamasyonla beraber olursa meningoensefalit olarak adlandırılan tablo ile karşımıza çıkar. Ayrıca ensefalit, omuriliğin inflamasyonu olan miyelit ile birlikte olursa ensefalomiyelit tablosuna yol açabilir. Bu üç sendrom epidemiyolojik, mikrobiyolojik ve tedavi yaklaşımları açısından önemli benzerlikler gösterdikleri için genellikle birlikte gruplandırılır (8). Ensefalite neden olan enfeksiyöz ajanların çoğu, farklı organ ve/veya doku tutulumu yapan etkenlerin hematojen yolla yayılımıyla SSS'ne ulaşır. Patojenin vücuda ilk giriş ve çoğalma yeri organizmaya bağlı olarak farklılık gösterir. Örneğin kızamık virüsü solunum yollarına, enterovirüsler mide-bağırsak sistemine, arbovirüsler cilde yerleşir. Lokalize enfeksiyonu, SSS'ne invazyon ve replikasyon ile sonuçlanan viremi takip eder. Arbovirüsler gibi hematojen enfeksiyonlara neden olan virüs enfeksiyonları, beyinde geniş bir alanın tutulumuyla yaygın nörolojik fonksiyon bozukluğuna sebep olur. Aksine, vücuda diğer giriş yollarını kullanan virüsler genellikle sınırlı bir beyin alanını etkiler. Örneğin kuduz virüsü, enfekte bir hayvanın ısırmasından sonra deri altından giriş yapar ve periferik sinirler boyunca beyin sapına doğru ilerler (9). Serbest yaşayan amip olan Naegleria fowleri konağa burundan girer ve cribriform tabakayı geçip beynin ön loblarını tutar. Herpes simpleks virüs ensefalitinin patogenezinde, virüsün trigeminal gangliyonda reaktivasyonu ve tentoryal sinirler yoluyla frontal ve temporal loblara yayılması rol oynamaktadır (10).

Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarının Sınıflandırması

Santral sinir sistemi enfeksiyonları, enfekte alanın lokalizasyona göre sınıflandırılır. Menenjit, ensefalit ve miyelit; sırasıyla meninksler, beyin ve omurilik enfeksiyonuna verilen isimlerdir. Apse, subdural ampiyem veya subaraknoid ampiyem gibi fokal SSS enfeksiyonları da görülebilir. Enfeksiyon, tek bir anatomik kompartmanla sınırlı olabilir veya meningoensefalit - ensefalomiyelit gibi birden fazla bölgeyi etkileyebilir.

Akut menenjitin başlangıcı, tipik olarak saatler veya günler içinde ortaya çıkan ateş, baş ağrısı ve ense sertliği üçlüsü ile karakterizedir. Ensefalit hafif bir bilinç bulanıklığından komaya kadar geniş skalada değişen mental durum değişiklikleriyle kendini gösterir. Miyelit omuriliğin enfeksiyonudur, ateş, baş ağrısı ve paraparezi veya motor sinirlerin etkilenmesiyle gelişen felç gibi semptomlarla karakterizedir.

Menenjit daha gürültülü bir klinik tabloya neden olmaktadır. Birkaç saat içinde hızla ilerleyen akut fulminan bir hastalık veya birkaç gün içinde kademeli olarak kötüleşen subakut bir enfeksiyon olarak ortaya çıkar. Menenjitin klasik klinik bulguları olan ateş, baş ağrısı ve ense sertliği yetişkin akut bakteriyel menenjit vakalarının %80'inden fazlasında görülür, ancak bu bulguların tamamı her zaman mevcut olmayabilir (11). Hastaların %75'inden fazlası, uykuya meyilden komaya kadar değişebilen bilinç düzeyinde bozukluk yaşar (11). Ayrıca bulantı, kusma ve ışığa karşı hassasiyet (fotofobi) de sık görülen semptomlardır. Meningeal irritasyonun bulgusu olan ense sertliği boynun pasif fleksiyona direnmesi olarak görülür. Kernig ve Brudzinski belirtisi, meningeal iritasyonun diğer tipik bulgularıdır. Kernig'in işareti muayenesi için hasta sırt üstü yatırılır. Diz bükülü, uyluk karın üzerinde fleksiyonda iken dizi pasif olarak uzatmaya çalışmak hastada ağrıya neden oluyorsa meningeal irritasyon vardır. Brudzinski'nin işareti için hasta sırt üstü yatırılır ve pasif boyun fleksiyonunun kalça ve dizlerin spontan fleksiyonuna neden olması meningeal irritasyonu gösterir. Kernig ve Brudzinski işareti klinik tanıda yer alsa da duyarlılığı ve özgüllüğü belirsizdir (11). Yaşlılarda, bağışıklığı baskılanmış bireylerde veya zihinsel durumu ciddi şekilde depresif

olanlarda bulunmayabilir. Yaşlılarda servikal omurga hastalığı prevalansının yüksek olmasından dolayı hastada meningeal irritasyon olmasa da ense sertliği saptanabilir (11). Bakteriyel menenjiti olan hastaların %15 ile %40'ı tipik bulgulara ek olarak nöbet geçirir (11). Fokal nöbetlere arteriyel iskemi, enfarktüs veya kortikal damarların hemoraji veya ödem ile trombozu neden olur. Jeneralize nöbetler veya status epileptikus, serebral anoksi, hiponatremi veya antimikrobiyal ajanların toksik etkilerinden kaynaklanabilir (12). Hastaların %90'ından fazlasında BOS basıncı 180 mmH_2O'nun üzerinde, %20'sinde ise 400 mmH_2O'nun üzerindedir (12). Artmış kafa içi basıncının belirtileri arasında bilinç düzeyinde azalma, papil ödem, ışığa zayıf tepki veren geniş pupiller, altıncı kraniyal sinir felci, deserebrasyon duruşu ve Cushing refleksi (bradikardi, hipertansiyon ve düzensiz solunum) yer alır. Serebral herniasyon, artmış kafa içi basıncının en ciddi komplikasyonudur ve bakteriyel menenjit vakalarının bir kısmında (%1-8) ortaya çıkabilir (12). Artmış kafa içi basıncı komaya da neden olabilir.

Hastaların klinik tablosunda bazı patojenlerin tespitine yardımcı olabilecek spesifik bulgular görülebilir. Örneğin meningokok menenjitinde karakteristik olarak döküntü görülebilir. Başlangıçta bu döküntü viral bir ekzantem gibidir, ancak hızla gövde ve alt ekstremitelerde, mukozalarda, konjonktivada ve hatta bazen avuç içi ve ayak tabanlarında görülebilen peteşiye dönüşür (13).

Ensefalit tablosu menenjite benzer olmakla birlikte, dalgalı seyreden veya azalan bilinç düzeyi, fokal veya yaygın nörolojik belirtilerle karakterize akut ateşli bir hastalık olarak ortaya çıkar. Ensefaliti olan hastalarda ayrıca halüsinasyonlar, ajitasyon, kişilik değişiklikleri, davranış bozuklukları ve nöbetler görülebilir. Viral ensefalitlerde afazi, ataksi, halsizlik, istemsiz hareketler ve kranial sinir defisitleri gibi fokal nörolojik bozukluklar yaygın olarak rapor edilmiştir. Hipotalamik-hipofiz ekseninin tutulumu, vücut sıcaklığında düzensizlik, diyabet insipidus veya antidiüretik hormonun uygunsuz salgılanması sendromu ile sonuçlanabilir. SSS'nin bazı tipik bölgelerinde hasara neden olan nörotropik virüsler olsa da, bir ensefalit vakasının etiyolojisini yalnızca klinik bulgularla belirlemek zordur (8).

Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

Bakteriyel menenjit, tüm dünyada SSS'nin en yaygın süpüratif enfeksiyon türüdür. Toplum kökenli bakteriyel menenjitten sorumlu başlıca organizmalar *S. pneumoniae* (vakaların yaklaşık %50'si), *N. meningitidis* (vakaların yaklaşık %25'i), grup B streptokoklar ve *Listeria monocytogenes'tir*. *Haemophilus influenzae tip b*, vakaların onda birinden azını oluşturur (12). Günümüzde *H. influenzae tip b* (Hib) konjuge aşısı sayesinde çocuklarda Hib kaynaklı menenjit vakaları çok nadir görülmektedir (12). *L. monocytogenes* yenidoğanlar, hamile kadınlar, 60 yaşından büyük kişiler ve bağışıklık sistemi yetersiz kişiler gibi belirli gruplarda menenjit vakalarına neden olmaktadır. Enfeksiyon, Listeria ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesiyle oluşur. Menenjit salgınlarına neden olan organizma *N. meningitidis*'tir (12). Ancak kuadrivalan (A, C, W-135, and Y serogrupları) meningokok konjuge aşıları sonrası *N. meningitidis* kaynaklı menenjit olguları ciddi oranda azalmıştır (13).

Gram-negatif basillerin neden olduğu menenjit, diyabet, siroz veya alkolizm gibi kronik hastalıkları olanlarda veya üriner sistem enfeksiyonu olan kişilerde yaygındır. Nöroşirürjik girişimlerin, kronik orta kulak veya sinüs enfeksiyonlarının bir komplikasyonu olarak gram pozitif kok kaynaklı menenjit vakaları görülebilmektedir (12).

Virüsler, kabaca kültür negatif menenjitin en sık nedenidir. Viral menenjite en sık non-polio enterovirüsler neden olmaktadır (14). Çocuklarda ve genç erişkinlerde yaygın olup tüm vakaların yarısından fazlasını oluşturur (14). Viral menenjitlerin insidansı yaz ve sonbahar aylarında yüksektir (14). Nispeten yaygın olan diğer viral menenjit etkenleri arasında Herpes Simplex Virus-2 (HSV-2), Human Immunodeficiency Virus (HIV) enfeksiyonu, Varicella-Zoster virüsü (VZV) ve Lenfositik Koriomenenjit virüsü bulunur (14). Ayrıca Arbovirüsler de viral menenjitin önemli bir nedenidir, ancak bulaş artropodla olduğu için, vektörün coğrafi dağılımına bağlı olarak enfeksiyonun dağılımı değişmektedir.

Aşı yoluyla önlenebilen bazı hastalıkların insidansının azalması ve Batı Nil virüsü (WNV) gibi yeni patojenlerin artık daha kolay tanınmasıyla ensefalite neden olabilecek etkenlerin spektrumu son yıllarda değişmiştir (15,16). Ensefalit nedenlerindeki bu değişikliklere rağmen, genel insidans sabit kalmıştır (15,16). Amerika Birleşik Devletleri'nde en sık saptanan ensefalit nedenleri HSV-1 (Herpes Simplex Virus-1), WNV ve enterovirüsler olup bunları diğer herpesvirüsler takip eder (16,17) (Tablo 1).

Tablo 1: Akut ensefalite neden olan bazı virüsler (16,17).

Sık Rastlanan Virüsler	Nadir Rastlanan Virüsler	Artropod İlişkili Virüsler
Herpesvirüsler	Rabies lyssavirus	La Crosse virüsü
İmmün kompromize hastalarda CMV	Doğu Equine Ensefalit Virüsü	Batı Nil virüsü
HSV-1	Powassan virüsü	St. Louis ensefalit virüsü
HSV-2	CMV	Zika virüs
HHV-6	Kolarado kene ateşi virüsü	
VZV	Kabakulak virüsü (Paramyxoviridae)	
EBV	Jamestown kanyon virüsü	
Enterovirüsler	Nipah virüsü	
	Toscana virüsü	
	Chandipura virüsü	

Dünyada immün kompetan yetişkinlerde sporadik akut ensefalit vakalarına neden olan en yaygın virüsler HSV, VZV ve EBV'dir. Ensefalite neden olduğu kabul edilen nadir patojenler arasında Nipah virüsü, Toscana virüsü, enterovirüs 71, Balamuthia mandrillaris ve Chandipura virüsü bulunmaktadır. Bu ajanlara belirli coğrafi bölgelerde (La Crosse virüsü gibi) rastlanabilir. Hindistan'daki Chandipura virüsü ve Malezya'daki Nipah virüsü gibi belli coğrafi dağılımlara sahip virüsler açısından, endemik bir bölgeye seyahat edenler veya o bölgede yaşayan kişiler risk altındadır (17).

Bazı viral etkenler uluslararası düzeyde (kuduz virüsü veya Japon ensefalit virüsü gibi) öneme sahip olabilir. *Ehrlichia spp*. ve *Rickettsia rickettsii* de antibiyotiklerle tedavi edilebilen nadir ensefalit nedenleridir. Bu hastalarda klinik şüphe üzerine erken başlanan antibiyotik tedavisi hayat kurtarıcı olabilir (18). Virüslerin yanı sıra *Borrelia burgdorferi* ve *Coxiella burnetii* gibi patojenler de meningoensefalit tablosuna neden olabilir. Zaman zaman BOS örneklerine uygulanan NAT testleriyle varlığı gösterilen ve ensefalit ile nedensellik ilişkisinin henüz açıklanamadığı patojenler arasında influenza virus, HHV-6 (İnsan Herpes Virus 6) ve parvovirus B-19 yer alır (19-21). Bu alanda yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojisi

Santral sinir sisteminin farklı bölümlerini etkileyen, farklı klinik tablolar olan menenjite ve ensefalite neden olan patojenler de farklılık gösterir.

Akut menenjit, bakteriyel ve bakteriyel olmayan (benign lenfositik veya aseptik menenjit olarak da bilinir) olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Bu iki tablo arasındaki ayrım klinik olarak semptomların ortaya çıkış şekli ve özgün laboratuvar bulguları ile sağlanabilir. Bakteriyel bir etken varlığında, periferik kan lökositozu (>10.000/mm3), nötrofillerin baskın olduğu BOS pleositozu (>1.000/mm3), düşük BOS glukozu (<40 mg/dl) ve artmış protein konsantrasyonu (>45 mg/dl) saptanır (Tablo 2) (4). Bakteriyel etkenin tespiti için BOS örneklerinin gram boya ile incelenmesi, tanıyı destekleyen güçlü bir kanıt olarak kabul edilir.

Tablo 2: Bakteriyel menenjitte BOS'ta beklenen değişiklikler (4).

BOS Açılış Basıncı	>180 mmH2O
Beyaz Küre	Nötrofil hakimiyetinde 10/µL - 10000/µL
Eritrosit	Travmatik olmayan BOS örneklemelerinde beklenmez
Glukoz	<40 mg/dL
BOS/Serum glukozu oranı	<0.4
Protein	>45 mg/dL
Gram boyama	>%60 pozitif
Kültür	>%80 pozitif
PCR	Bakteriyel DNA saptanır

Aseptik menenjit, kültür negatif olan akut menenjitleri tarif etmek için kullanılan bir terimdir. Kültür negatif menenjit ayırıcı tanısı, riketsiyal enfeksiyonları, spiroketal enfeksiyonları (*Treponema pallidum* veya *Borrelia burgdorferi* gibi), mantar veya mikobakteriyel enfeksiyonları, parameningeal enfeksiyondan kaynaklanan inflamasyonu veya yeterince tedavi edilmemiş bakteriyel enfeksiyonları içerir (14). Enfeksiyon kaynaklı olmayan bazı semptomlar da enfeksiyöz menenjiti taklit eden BOS pleositozuna neden olabilir. Viral ensefalitin BOS profili viral menenjitle benzemektedir. Genellikle BOS örneğinde lenfositik pleositoz, hafif yüksek protein seviyeleri ve normal glukoz seviyeleri ile karakterizedir. Doğrulanmış viral ensefaliti olan bağışıklığı yeterli hastaların %95'inden fazlasında BOS'ta bir pleositoz (>5 hücre/mL) meydana gelir (15). HIV enfeksiyonu veya immünsüpresif tedavi nedeniyle bağışıklığı baskılanmış olan hastalarda, BOS'ta inflamatuar yanıt görülmeyebilir. Ensefaliti olan hastaların sadece yaklaşık 1/10'unda 500/µL'nin üzerinde beyaz küre sayısı gözlenir (16).

Arbovirüsler veya kabakulak virüsü bazen 1.000/µL'nin üzerinde hücre sayısına neden olabilir, ancak bu hücre sayısı viral olmayan enfeksiyonlar

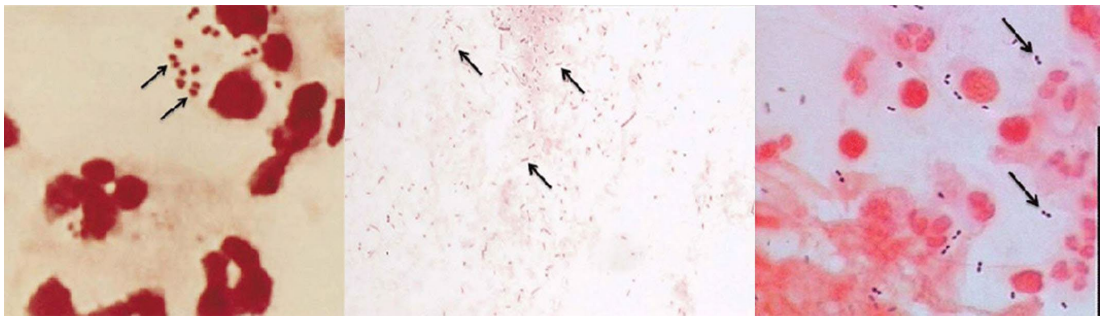
veya diğer enflamatuar süreçlerin varlığını da akla getirmelidir. Epstein-Barr virüsü (EBV) enfeksiyonu olan hastalarda ve daha az sıklıkla sitomegalovirüs (CMV), herpes simpleks virüsü (HSV) ve enterovirüsler gibi virüslerle enfekte olan hastalarda BOS'ta atipik lenfositler gözlenebilir (16). Antiviral tedaviye rağmen BOS nötrofilinin varlığının sebat etmesi durumunda bakteriyel enfeksiyon, leptospiroz, amip enfeksiyonu veya son yıllarda önemi gittikçe artan otoimmün ensefalitler gibi enfeksiyöz olmayan durumlar akla gelmelidir. Ensefaliti olan hastaların %20'sinden fazlasının BOS örneğinde yüksek sayıda eritrosit saptanabilir (16). Bu bulgu, HSV enfeksiyonunda görülen punktat mikrohemorajilerle ilişkili olabilir, ancak herpetik olmayan fokal ensefalitli hastalarda benzer sıklıkta ve benzer sayılarda eritrosit saptanabilir. Bu nedenle eritrosit varlığı her zaman HSV enfeksiyonunu göstermez (16). Viral ensefalitte BOS glikoz konsantrasyonu genellikle normaldir. BOS glikoz konsantrasyonu düşük olduğunda bakteriyel, fungal, tüberküloz, parazitik, leptospiral, sifilitik, sarkoid veya neoplastik menenjit gibi diğer menenjit tabloları akla gelmelidir. Bununla birlikte, nadiren kabakulakta, ilerlemiş HSV ensefaliti vakalarında ve CMV miyeloradiküliti olan hastalarda BOS glukoz konsantrasyonu düşük gözlenebilir.

Diğer Tanı Yöntemleri

Santral sinir sistemi enfeksiyonlarının ayırıcı tanısı, enfeksiyöz olmayan diğer nedenlerden dolayı oldukça zordur. Tanı sürecinde hastalığın görüldüğü coğrafi bölge, mevsim, hastanın yaşı, hastanın mesleği gibi diğer faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Kapsamlı bir öykü ve fizik muayeneye, nörolojk görüntüleme ve gerekli durumlarda EEG eşlik etmelidir. Günümüzde NAT testleri başta olmak üzere moleküler testler SSS enfeksiyonlarının tanısında öne çıkmaktadır. Fakat testlere erişim, ekonomik nedenler ve nadir de olsa yalancı pozitifliklerden ötürü geleneksel mikrobiyolojik yöntemler hala önemini korumaktadır.

Santral sinir sistemi enfeksiyonlarının tanısında hızlı ve kolay erişilebilir yöntemlerden biri mikroskopik incelemelerdir. Direkt mikroskobik

inceleme yöntemiyle BOS'ta hücre sayımı ve biyokimyasal analizlerle glukoz ve protein ölçümü ilk basamakta yer almaktadır. BOS'un Gram boyamasında bakterilerin görülmesi bakteriyel menenjit tanısını destekler (Şekil 2). Ancak Gram boyamanın duyarlılığı bakteriyel patojenler arasında farklılık gösterir. Örneğin; *S.pneumoniae* menenjit vakalarının neredeyse %90'ında gram pozitif kok şeklinde bakteriler saptanırken, *L. monocytogenes* vakaların %50'sinden azında gram boyamada gram pozitif basiller görülür (23). BOS örneği alınmadan önce antimikrobiyal tedavi verilen hastalarda, gram boyamanın duyarlılığı düşmektedir (23). Gram boyanın yanı sıra çini mürekkebi ile inceleme *Cryptococcus* enfeksiyonlarında yardımcıdır (24).



Şekil 2: Bakteriyel menenjit vakalarında BOS Gram boyama örnekleri. Soldan sağa doğru; *Neisseria meningitidis* (gram negatif diplokoklar), *Haemophilus influenzae* (gram negatif kokobasiller), *Streptococcus pneumoniae* (gram pozitif diplokoklar) ve lökositler (25).

Hızlı antijen testlerinin BOS örnekleri için kullanımı bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin düşük olması nedeniyle sınırlıdır (26). Bakteriyel ve viral etkenleri saptamada antijen testleri yerini günümüzde moleküler testlere bırakmıştır. Ancak HIV ile yaşayan hastalarda veya immun düşkün hasta populasyonlarında serum veya BOS örneklerinde Cryptococcus antijen testlerinin duyarlılıkları ve özgüllükleri yüksektir (27).

Kültür yöntemleri bakteriyel, fungal ve mikobakteriyel SSS enfeksiyonlarının kesin tanısını koydurur. Ancak bakteriyel menenjitte

antibiyotik tedavisinden sonra alınan BOS örneklerinde kültür pozitifliği ciddi oranda azalmaktadır (28). Viral etkenlerin tanımlanmasında kültür zaman alıcı, pahalı ve düşük duyarlılıkta bir yöntemdir. Ayrıca hızlı tanının bir zorunluluk olduğu viral menenjit ve ensefalit vakalarında tanıda kullanımı kısıtlıdır.

Serolojik yöntemler nörosifiliz, arbovirüsler veya rickettsia ilişkili SSS hastalıklarının tanısında yardımcıdır. Pek çok virüs için ise SSS'de lokal ve patojen spesifik antikor üretiminin gösterilmesi ek testleri gerektirdiğinden rutinde viral menentjit veya ensefalitlerin tanısında tercih edilmemektedir.

Moleküler Tanı Yöntemleri

Herpes virüs ensefalitlerinin tanısında doksanlı yılların başında NAT'ın kulanılması SSS enfeksiyonlarının tanısını dramatik bir şekilde iyileştirmiştir (29).

BOS örneklerinde mikroorganizma yükü genellikle azdır, bu nedenle maksimum düzeyde duyarlılık ve özgüllük SSS enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında kullanılan yöntemlerde aranan özelliklerdir. Bu da zaman içinde NAT'ı klinik laboratuvarlarda en çok tercih edilen yöntem haline getirmiştir. Günümüzde BOS örneklerinde NAT yöntemiyle viral nükleik asitlerin saptanması serebral viral aktiviteyi göstermede kullanılır (29). SSS enfeksiyonlarının tanısını koymada pek çok NAT temelli kit veya cihaz geliştirilse de bunların çok az bir kısmı FDA (Food and Drug Administration, ABD) onayı alabilmiştir. Örneğin, ensefalitlerin en sık nedenlerinden biri olan HSV varlığını BOS örneklerinde tespit edebilen FDA onayı almış sadece iki ticari kit mevcuttur (30, 31). Viral menenjit etkenlerinden olan Enterovirus için onay alabilmiş bir ticari panel vardır (32).

Önemli bir diğer nokta ise PCR yönteminde nadiren preanalitik süreçlerden kaynaklı yanlış pozitiflikler saptanabilmektedir (33). Bu yüzden BOS RT-PCR sonuçları her zaman hastanın kliniğini göz önüne alınarak değerlendirilmelidir. Yanlış pozitiflikler olmasa dahi reaktivasyonla ilişkili olabilecek EBV ve HHV-6 virüslerinin tespit edilmesi klinik bulgular dikkate

alınarak yorumlanmalıdır ve altta yatan başka hastalıkların varlığına işaret edebilir (34).

Geçtiğimiz on yıl içerisinde mikroakışkan teknolojilerindeki ve prob tasarımındaki yenilikler pek çok etkenin aynı anda az miktardaki analitte taranabilmesine olanak sağlamıştır. SSS enfeksiyonlarının tanısı için örnekten-sonuca sendromik panellerin tanı laboratuvarlarında kullanımı artmaktadır. Böylelikle örnek manipülasyonuna minimum ihtiyaç duyan, hızlı ve doğru sonuçlar elde etmek amaçlanmaktadır (30).

Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarında Sık Tespit Edilen Patojenlerin Tanısına Yaklaşım

Erişkinler ve çocuklarda HSV ensefalitlerinin yaklaşık %90'ından HSV-1 sorumlu iken, HSV-2 immün düşkün kişilerde ve hayatın ilk bir yılında SSS enfeksiyonlarına neden olur (35). Asiklovir tedavisi morbidite ve mortaliteyi azalttığından HSV ensefalitinin erken dönemde tanınması gerekir (35). Herpes virüs ensefalitlerinin tanısında HSV PCR'ın duyarlılığı ve özgüllüğü yaklaşık %96 ve %99'dur (33, 36). Tedavi alan hastalarda da HSV DNA PCR ile bir haftaya kadar saptanabilmektedir (36). Yanlış negatiflikler enfeksiyonun erken dönemlerinde görülebilmektedir. HSV ensefalitini destekleyen görüntüleme veya elektroensefalogram (EEG) bulguları olan hastalarda HSV PCR negatif ise ikinci bir örnekle PCR çalışılması uygundur (37). Özetle enfeksiyonun erken ve geç dönemlerinde negatif PCR sonuçları enfeksiyonu kesin olarak dışlamaz. Ayrıca primer-prob bağlanma bölgelerindeki dizi varyasyonları da HSV PCR testlerinde yanlış negatifliklere neden olabilir (31). HSV ensefalitlerinde kantitatif PCR testleri hastalığın takibi veya asiklovir tedavisinin kişiselleştirilmesi için denenmiştir (38). Ancak hastalık prognozunu öngörmede kantitatif RT-PCR testleri ile ilgili geniş çevrelerce kabul görmüş öneriler bulunmamaktadır.

Moleküler metodlar tipik veziküler döküntüleri olmayan hastalarda VZV kaynaklı serebellit, aseptik menenjit ve ensefalitin tespit edilmesini sağlamıştır. Doğrulanmış veya muhtemel VZV ensefaliti hastalarının yaklaşık

dörtte birinde kütanöz bulgular saptanmaz (39). Aseptik menenjit veya (meningo)ensefalit hastalarının yaklaşık %10'undan VZV sorumludur (40). VZV DNA şikayetler başladıktan sonraki bir hafta içinde BOS örneklerinde saptanabilir, ancak döküntü ile seyretmeyen SSS hastalıklarında virüs ikinci haftada tespit edilir (41). Komplike olmayan vakalarda antiviral tedavinin başlanmasından sonra VZV DNA'nın negatifleşmesi beklenir. Viral DNA pozitifliğinin tedaviye rağmen devam etmesi HIV ile yaşayan hastalarda görüldüğünde mortalite ile ilişkilendirilmiştir (42). Yani VZV viral yükü ile hastalık şiddeti arasında korelasyon gösterilmiştir (43).

Menenjit, ensefalit, miyelit ve akut serebellar ataksi akut EBV enfeksiyonunda veya reaktivasyonunda görülebilir (44). BOS'da EBV DNA varlığının saptanması SSS enfeksiyonu kaynaklı olabileceği gibi başka bir hastalığa bağlı olarak immün yanıtın baskısından/kontrolünden kurtulan virüsün reaktivasyonunda da görülebilir (45). Kantitatif EBV testleri BOS'da reaktivasyon ile primer enfeksiyon ayrımında yardımcı olabilir. Ancak kesin cut-off değerleri oluşturulamamıştır (46). HIV ile enfekte ve nörolojik şikayetleri olan kişilerde primer santral sinir sistemi lenfomaları için BOS EBV PCR'ın pozitif prediktif değeri %30'dan azdır. EBV viral yükü primer santral sinir sistemi lenfomaları ile ensefalit ayrımında kullanılamaz (46).

Immün düşkün hastalarda CMV, ensefalitlerin önemli bir nedeniyken genel popülasyonda nadiren etken olarak değerlendirilmektedir (47).

Benzer şekilde son yıllarda özellikle hematopoetik kök hücre nakil hastalarında HHV-6B başta olmak üzere HHV-6 ilişkili ensefalitler artan sayılarda bildirilmektedir (48). Bu gelişmede multiplex PCR panellerine HHV-6'nın da eklenmesinin etkisi olmuştur. HHV-6 ensefaliti sıklığı kord kanı alıcılarında %10'lara ulaşırken bu oran solid organ alıcılarında çok daha düşüktür (49). Diğer Herpes virüslerin aksine HHV-6'da reaktivasyonda viral titre primer enfeksiyona göre daha yüksek olma eğilimindedir (50). HHV-6 primer enfeksiyonu çocuklarda aseptik menenjit ve ensefalitle seyredebilir (51). Çocukluk çağı febril konvülsiyonlarında ayırıcı tanıda HHV-6 akla gelmelidir. (52). Amerika Birleşik Devlertleri'nde (ABD) küçük çocuklarda primer enfeksiyonda BOS HHV-6A ve HHV-6B pozitiflikleri sırasıyla %17 ve

%86 olarak saptanmıştır (53). HHV-6A' nın oligodendrositler latent kalabildiği bilinmektedir (54). HHV-6 kromozoma entegre olabilir ve vertikal olarak sonraki kuşaklara aktarılabilir. Sonraki kuşakların tüm hücreleri viral DNA'yı taşıyacağından bu kişilerde vertikal aktarılmış kromozoma entegre HHV-6 genetik materyalleri (iciHHV-6) nedeniyle BOS örneklerinde yüksek titrede HHV-6 DNA saptanabilir (55). BOS HHV-6 DNA pozitiflikleri klinik, fizik muayene-görüntüleme ve hasta özellikleri ile beraber değerlendirilmelidir (56).

Enterovirüsler ABD'de etken belirlenen aseptik menenjit vakalarının yaklaşık %85'inden sorumludur (57). Vakalar genellikle haziran-ekim ayları arasında kümelenir (58). Daha nadiren enterovirüsler ensefalite neden olabilir ve ensefalitlerin büyük çoğunluğu çocuk popülasyonda görülür (15). Enterovirüsler yüksek mortalite ve morbiditeye neden olan ensefalit salgınlarına neden olabilirler (59). RT- PCR Enteroviral SSS enfeksiyonlarını tespit etmek için çok duyarlı ve özgül bir yöntemdir (18). Cepheid Xpert EV (Cepheid, ABD) gibi FDA tarafından onaylanmış tek etkeni hedef alan monopleks veya birden fazla etkeni saptamayı hedef alan multipleks panellerle Enterovirüs varlığının araştırıldığı farklı Enterovirus testleri bulunmaktadır. Enterovirüs RT-PCR testlerinde Rhinovirüsler ile çapraz reaksiyonları minimalize edecek hedef diziler seçilmelidir (18).

Bakteriyel menenjit tanısında bir çalışmada RT-PCR %59 duyarlı bulunurken, BOS kültürünün duyarlılığı %45'in altında kalmıştır (60). Kültür negatif RT-PCR pozitif örnekler incelendiğinde bu örneklerin büyük kısmının antibiyotik kullanımı sonrasında alındığı gözlenmiştir. Bakteriyel menenjit tanısında monopleks ve multipleks PCR testleri bakteriyel kültüre üstündür (61).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya, Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Haziran 2022 - Mart 2023 tarihleri arasında SSS enfeksiyonu şüphesiyle BOS örneği gönderilen 88 hasta dahil edilmiştir.

Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na SSS enfeksiyonu tanısı için gönderilen BOS örneklerinde önce direkt mikroskobik incelemeyle hücre sayımı yapılmaktadır. Aynı zamanda BOS örneklerinden Gram boya ile hazırlanan yaymalarda bakteri varlığı değerlendirilmektedir. Bakteriyel etkenlerin saptanmasına yönelik olarak kültür yapılmaktadır. Viral etkenlerin saptanmasına yönelik olarak ise Avrupa'da In-vitro Tanıda Kullanım Onaylı (CE-IVD) FTD Viral Menenjit PCR paneliyle (Fast Track Diagnostics, Luxemburg) (HSV-1, HSV-2, Kabakulak, VZV, Enterovirus (EV) ve İnsan Parechovirus'ları (HPeV)) beş viral etken aranmaktadır.

Bu çalışmada ek olarak BOS örneklerinde daha geniş bir panel olan Bio-Speedy Menenjit/Ensefalit RT-qPCR MX-17S (Bioeksen, İstanbul, Türkiye) paneliyle 16 viral, bakteriyel ve fungal etken (*Cryptococcus gattii/neoformans*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactia*, *Escherichia coli* K1, *Streptococcus pneumoniae*, CMV, Enterovirus, İnsan Parechovirus, VZV, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7, HHV-8) varlığı araştırılmıştır.

Hastaların demografik özellikleri ve klinik bulguları hastane bilgi yönetim sisteminden (HBYS) (MİA-MED otomasyon bilgi sistemi) ve hasta dosyalarından elde edilmiştir. Değerlendirmeye alınan hasta verileri ve diğer laboratuvar incelemeleri:

1) Hastaların cinsiyet, yaşı ve komorbiditeleri
2) Hastaların BOS örnek alımı sırasındaki ön tanısı
3) BOS biyokimyası sonuçları

4) BOS hücre sayımı ve Gram boyama sonuçları
5) Viral menenjit panel sonuçları
6) BOS bakteri kültürü sonuçları
7) Uygulanan tedavi öyküsü (antiviral, immünsüpresif vb.)

BOS Örneklerinin Direkt Mikroskobik İncelenmesi

Lomber ponksiyon (LP) ile alınan BOS örnekleri en az iki veya daha fazla steril kuru tüp içinde Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Mikrobiyoloji 7/24 Laboratuvarı'na gelir. Örnekler laboratuvara ulaştığında UF-5000 flow cytometry (Sysmex, Japonya) sistemi vücut sıvısı modunda kullanılarak hücre sayımı yapılır. Hemen sonrasında aynı örnekten gram boyama işlemi gerçekleştirilir.

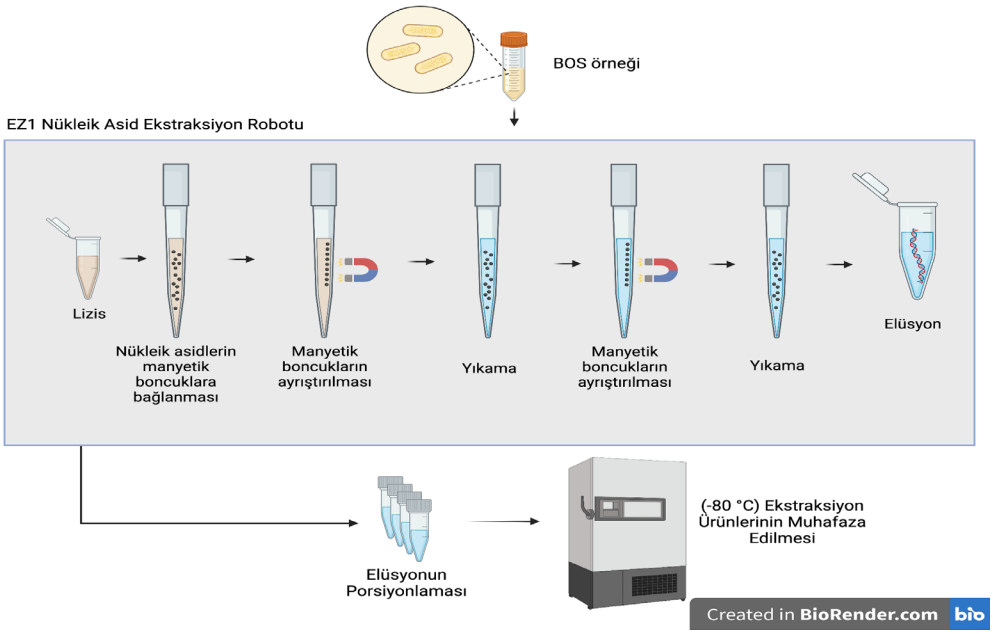
BOS Örneklerinin Bakteriyel Etkenlere Yönelik Kültürü

Lomber ponksiyon ile alınan BOS örneklerinden hasta başında ticari sıvı besiyeri ortamı olan BACTEC FX (BD, ABD) sistemine 3-5 ml ekim yapılır ve beş gün süreyle inkübe edilir. Pozitif sinyal veren kültür şişeleri koyun kanlı agar, çikolatamsı agar ve EMB (Eosin-Methylen Blue) agar plaklarına ekilir ve 48 saat inkübe edilir. Kolonilerden tür tanımlaması MALDI-TOF (Microflex, Bruker, ABD) ile gerçekleştirilir.

BOS Örneklerinden Nükleik Asit İzolasyonu

Menenjit/ensefalit tanısı için LP ile alınan BOS örnekleri steril kuru tüp içinde Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı PCR laboratuvarına gelir. Burada örnekler ekstraksiyon işlemi öncesinde 48 saate kadar +4 °C'de daha uzun süreler için -80 °C'de saklanır. Nükleik asit saflaştırma işlemi EZ1 Advanced biyo-robot (Qiagen, Almanya) otomatize sisteminde EZ1&2 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen,

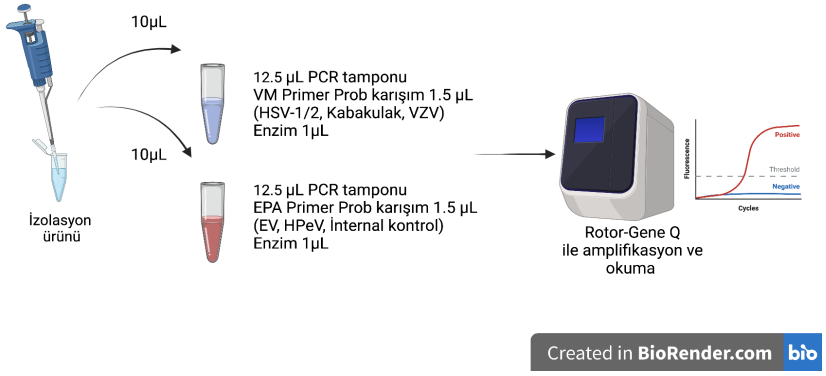
Almanya) ile üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilir. Virus Mini Kit v2.0 simultane viral DNA veya RNA ve bakteriyel DNA izolasyonu yapabilmektedir. Özetle prosedür dört basamaktan oluşur: Proteinaz K ile proteinlerin lizisi, serbest kalan genetik materyalin manyetik partiküllere bağlanması, bağlı nükleik asitlerin yıkanması ve pürifiye edilmiş nükleik asitlerin eldesi (Şekil 3). Lizis aşamasındaki yüksek sıcaklık patojenleri nötralize ederken Proteinaz K varlığı viral kapsid proteinlerini efektif bir şekilde parçalar, örnekte bulunan RNAaz'ları da inaktive eder. Nükleik asid ekstraksiyonu için BOS örneklerinden 200 µL kullanılır. Her bir reaksiyon için 52 µL elüsyon tamponu, 4 µL taşıcıyı RNA (Carrier RNA), 4 µL internal kontrol kullanılır. Taşıyıcı RNA viral ve bakteriyel nükleik asidlerin silika kaplı manyetik boncuklara bağlanmasını sağlar, elde edilen saf DNA ve RNA miktarını arttırır. İzolasyon sonrası 60 µL elüsyon elde edilir.



Şekil 3: Nükleik asid izolasyonunun temel basamaklarının şematizasyonu. (Biorender kullanılarak oluşturulmuştur.)

FTD Viral Menenjit Paneli

Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı PCR laboratuvarına gelen BOS örnekleri ekstraksiyon aşamasından sonra viral menenjit/ ensefalit etkenleri açısından test edilir. Fast Track Viral Menenjit kiti HSV-1, HSV-2, Kabakulak, VZV, Enterovirus (EV) ve İnsan Parechovirus'ları (HPeV) tespit edebilir. Test sırasında iki farklı miks için iki adet ana reaksiyon solüsyonu hazırlanır. Bunlardan birincisi (VM1 PP miks) ilk dört etkeni için primer-prob (PP) karışımı içerirken, ikincisi (EPA miks) kalan iki etken ve internal kontrol için aynı miktarda PP karışımı içerir. Reaksiyon karışımı her iki PP miks için ayrı olmak üzere iki adet hazırlanır; 12.5 µL PCR tamponu, 1 µL enzim ve 1.5 µL PP konur. Her bir PP miks için ayrı pozitif ve negatif kontroller kullanılır. Hazırlanan 15 µL PCR miks solüsyonuna 10 µL örnek yani BOS ekstraktı veya ilgili kontrol eklenir. Amplifikasyon için Real-Time cihazına (Rotor-Gene Q, Qiagen, Almanya) yüklenen örneklere ve kontrollere ait amplifikasyon grafikleri RT-PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra VM1 PP miks için yeşil, sarı, turuncu, kırmızı kanaldan; EPA PP miks için ise yeşil, sarı ve turuncu kanaldan elde edilen amplifikasyon grafikleri değerlendirilir. Sonuçlar kalitatif olarak raporlanır.



Şekil 4: FTD Viral Menenjit Panelinin temel basamakları şematizasyonu. (Biorender kullanılarak oluşturulmuştur.)

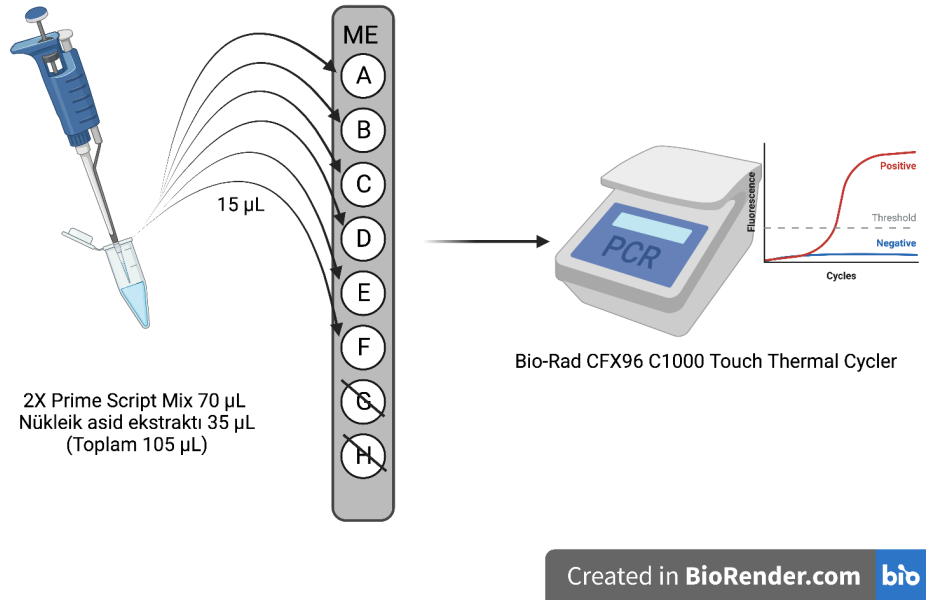
Bio-Speedy Menenjit/Ensefalit RT-qPCR MX-17S Paneli

Bio-Speedy paneli sekiz kuyucuklu şeritlerde (A-H) 17 farklı patojenin genetik materyalini saptayacak şekilde tasarlanmıştır (Tablo 3). Hasta örneklerine negatif kontrol için ME şeritleri, pozitif kontrol için PC-ME şeritleri kullanılmaktadır. ME şeritleri içerisinde önceden hazırlanmış hedefe özgü oligo miks karışımı bulunmaktadır. Her bir hasta örneği için 70 µL 2X Prime Script Mix ve 35 µL hastanın BOS örneğinden elde edilen nükleik asid ekstraktı (pipet kayıpları da hesaba katılarak) eklenenrek 105 µL ana miks hazırlanır. Bu ana miksten 15 µL kadar şeritlerdeki kuyucuklara (A-F) dağıtılır (Şekil 5). Her bir testin kontrolleri için; 70 µL 2X Prime Script Mix ve 35 µL NTC (pipet kayıpları da hesaba katılarak) ile 105 µL ana miks hazırlanır. Bu ana miks negatif kontrol olarak 15'er µL hacimde bir ME şeridine pipetlenir. Pozitif kontrol için de aynı şekilde hazırlanan ana miksden 10'ar µL 2X Prime Script Mix PC-ME şeridindeki kuyucuklara (A-F) pipetlenir.

Tablo 3: Çalışmamızda Bio-Speedy panelinde çalışılan hedeflerin listesi.

Kuyucuk	Bileşen	Hedef
A	CNG Oligo Miks	Dahili kontrol (İnsan RNase P geni) *Cryptococcus gattii/neoformans*
B	LNS Oligo Miks	*Listeria monocytogenes* *Neisseria meningitidis* *Streptococcus pneumoniae*
C	HES Oligo Miks	*Haemophilus influenzae* *Streptococcus agalactiae* *Escherichia coli K1*
D	CPEV Oligo Miks	CMV Enterovirus İnsan Parechovirus VZV
E	HSV Oligo Miks	HSV-1 HSV-2
F	HV Oligo Miks	HHV-6 HHV-7 HHV-8

Hazırlanan hasta ve kontrol PCR mikslerinin amplifikasyon basamamağı Bio-Rad CFX96 C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratuvarları, ABD) cihazında gerçekleştirilir. Döngü sınır değeri (Ct) ≤ 33 olan sigmoidal eğriler pozitif kabul edilir. Sigmoidal olmayan eğriler negatif olarak değerlendirilir. Birden fazla hedef pozitif sonuç verdiğinde, en küçük Ct değeri belirlenir (MinCt). Diğer paramatrenin Ct değeri ile MinCt arasındaki fark 7 den küçük ise diğer parametre pozitif olarak raporlanır. Eğer fark 7'ye eşit veya 7'den büyük ise diğer parametre negatif olarak raporlanır.



Şekil 5: Bio-Speedy paneli için temel çalışma basamakları şeması. (Biorender kullanılarak oluşturulmuştur.)

Verilerin Analizi

Kullanılan her iki PCR panellerinde tespit edilen patojenler hastanın tanı ve ön tanıları, immün durumu, manyetik rezonans (MR), bilgisayarlı tomografi (BT) ve EEG bulguları, BOS'un biyokimyasal özelliği/hücre sayımı ve önceki antibiyoterapileri göz önüne alınarak değerlendirilmiştir. BOS için glukoz ≤ 45 mg/dL, protein ≥ 100 mg/dL ve lökosit ≥ 5 hücre/mm³ SSS enfeksiyonu için anlamlı kabul edilmiştir (4,5). SSS görüntülemelerinde

kanamayı destekleyen bulgular olmayan hastalardan alınan BOS örneklerinde yüksek eritrosit sayıları travmatize lomber ponksiyon ile ilişkilendirilmiştir. Hastaların klinik özellikleri de göz önünde bulundurularak moleküler yöntemlerle tespit edilen pozitiflikler iki grupta değerlendirilmiştir. BOS hücre sayımı ve klinik bulgular veya diğer testlerle desteklenen sonuçlar doğru pozitif (DP) olarak yorumlanmıştır. Hücre sayımı ile uyumsuz ve klinik tabloyu açıklamayan moleküler sonuçlar klinik anlamı belirsiz pozitiflikler olarak (KAB) olarak değerlendirilmiştir. Hasta kliniğinde ateş, akut olarak ortaya çıkan SSS semptomları, menenjit - ensefaliti düşündüren muayene bulguları, spesifik görüntüleme bulguları ve antibiyoterapi sonrası klinik progresyon temel alınmıştır.

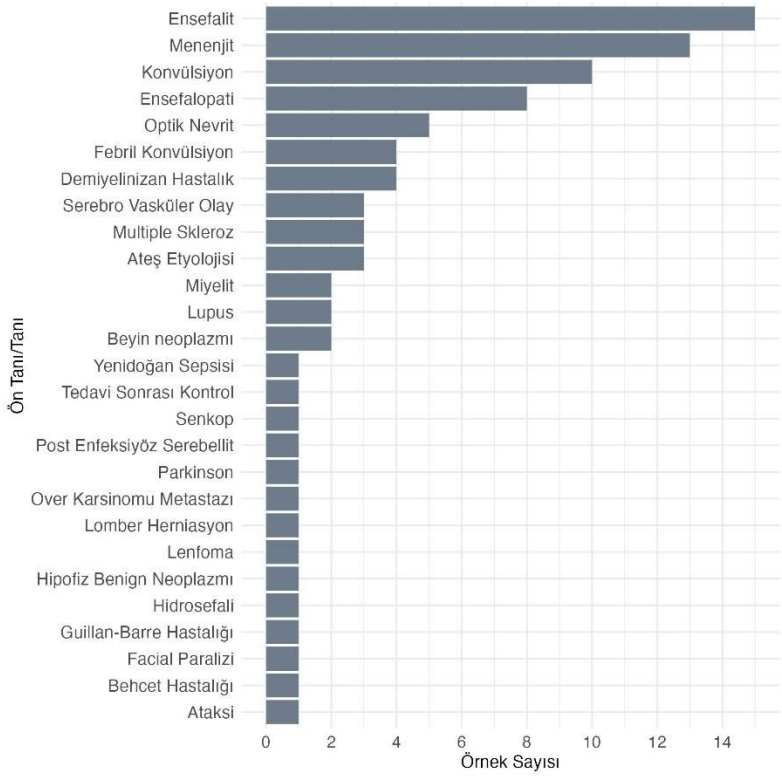
Etik Kurul Onayı

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 11 Nisan 2023 tarih, 2023-7/11 nolu karar ile onaylanmıştır.

BULGULAR

Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Haziran 2022 - Mart 2023 tarihleri arasında ensefalit veya menenjit şüphesi olan 88 hastadan gönderilen BOS örneği olası patojenlerin saptanmasına yönelik olarak test edilmiştir. PCR testinde internal kontrolü çalışmayan örnekler analiz dışı bırakılmıştır.

Hastane bilgi yönetim sisteminden toplanan verilere dayanarak klinik bulgularına göre BOS örneklerinin 15'i ensefalit, 13'ü menenjit tanı-ön tanılı hastalardan (%31,8) alınmıştır. SSS semptomları olan diğer hastalarda ise SSS enfeksiyonunun daha çok ayırıcı tanı olarak düşünüldüğü görülmüştür (Şekil 6).

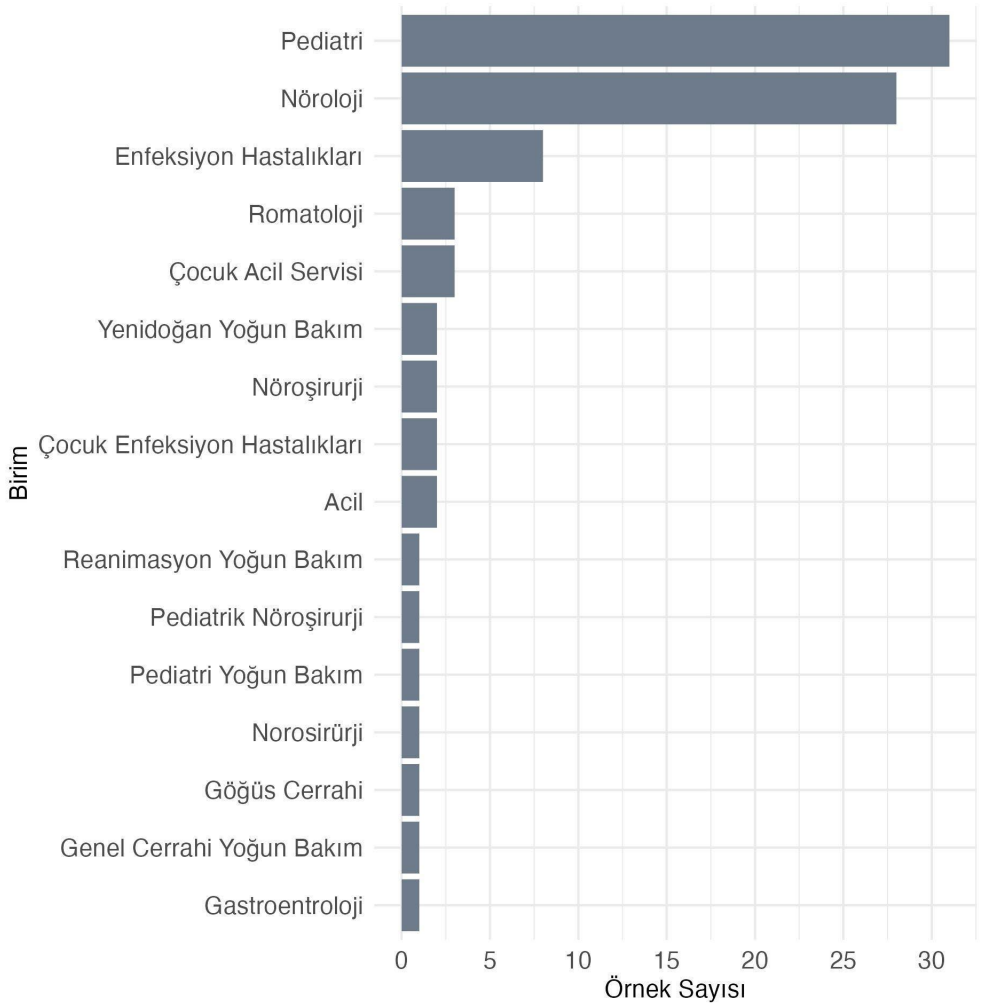


Şekil 6: Çalışmaya dahil edilen örneklerin ön tanılara göre dağılımı.

Çalışmaya dahil edilen örneklerin çoğu (%76,1) pediatri (%35,2, n=31), nöroloji (%31,8, n=28) ve enfeksiyon hastalıkları (%9,1, n=8) bölümlerinde tanı

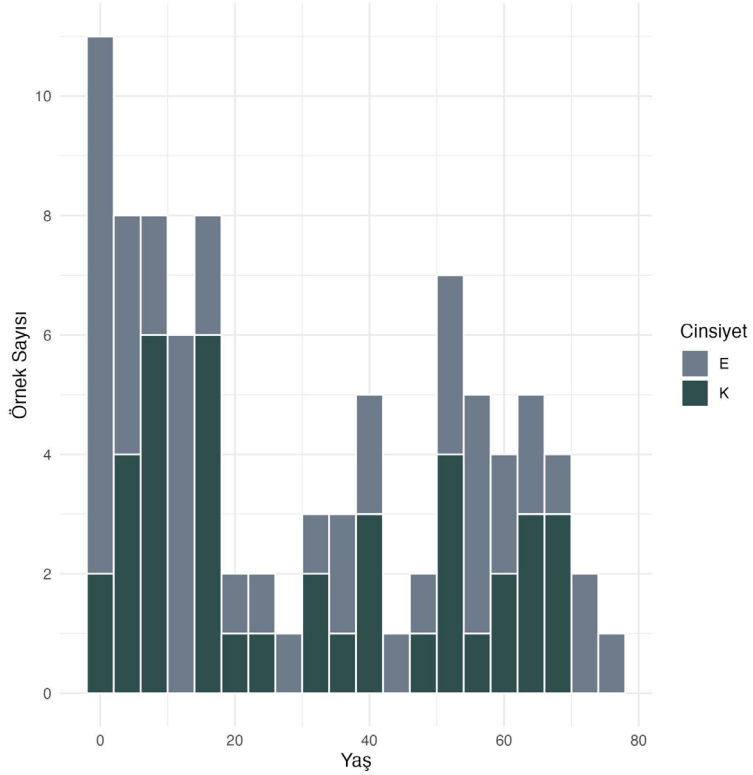
ve/veya tedavisi gerçekleştirilen hastalardan alınmıştır. Örneklerin dağılımı bar grafik olarak Şekil 7'de sunulmuştur.

Şekil 7: Çalışmaya dahil edilen örneklerin bölümlere göre dağılımı.



Çalışılan örneklerin 48'i erkek, 40'ı kadın hastalara aittir. Yaş dağılımı incelendiğinde hastaların çocuk yaş gurubunda ve 50-70 yaş gurubunda

kümelendiği dikkat çekmektedir (Şekil 8). Yaşamın ilk yıllarındaki hastalarda erkek cinsiyetin daha baskın olduğu görülmüştür.



Şekil 8: Örneklerin yaş ve cinsiyet dağılımlarını gösteren histogram

BOS örneklerinin 16'sında flow sitometri 100 hücre/mm³'ün üzerinde lökosit saptamıştır. Örneklerin %47'sinde lökosite rastlanmamıştır. Altı örnekte 6 hücre/mm³ ile 10 hücre/mm³ arasında lökosit sayılmıştır.

Tablo 4: Beyin omurilik sıvısı örneklerinde flow sitometri yöntemi ile belirlenen lökosit sayıları.

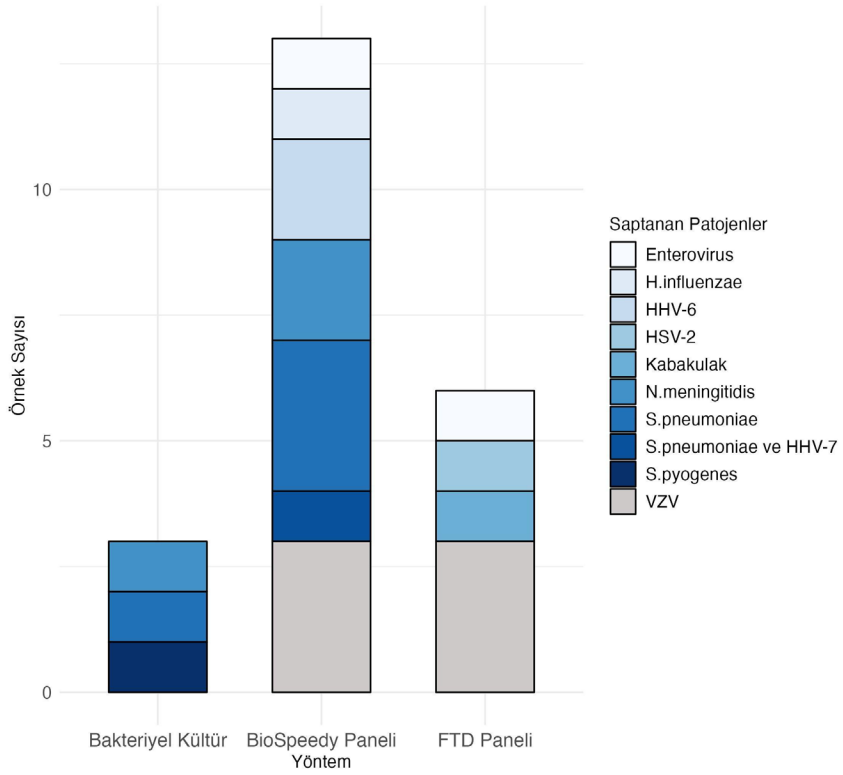
Lökosit Sayısı Aralıkları (mm³)	**0-5**	**6-10**	**11 -100**	**101 - 500**	**501 - 10000**	**>10000**
Örnek Sayısı	44	6	22	6	9	1

Lökosit sayısı 5 ve 5 hücre/mm³' ün altında olan 44 örneğin 34'ü (%79,1) pediatri ve nöroloji bölümlerinden gönderilmiştir. Çocuk yaş

gurubunda düşük lökositi olan BOS örneklerinde konvülsiyonla başvuran hastaların çoğunlukta olduğu görülmüştür.

İncelenen 88 örneğin 16'sında en az bir yöntemle bakteri ve/veya virüs tespit edilmiştir (Şekil 9). En fazla patojen (n=13) BioSpeedy paneli tarafından saptanmıştır. Bakteri kültüründe birer örnekte *S. pyogenes, S. pneumoniae, N. meningitidis* üremeleri olmuştur. FTD Viral Menenjit paneli ile 6 örnekte virüs tespit edilmiştir. Hiçbir örnekte fungal patojene rastlanmamıştır. Birden çok virüsün tespit edildiği örnek olmamıştır.

Hastaların klinik, radyolojik bulguları, BOS biyokimyasal özellikleri dikkate alındığında 12 BOS örneğinde tanımlanan patojenler DP olarak yorumlanmıştır.



Şekil 9: Virüs veya bakteri saptanan örnek sayısının kullanılan yöntemlere göre dağılımı

Uygulanan testlerle sekiz örnekte bakteriyel patojen saptanmış ve altısının çocuk yaş grubundaki hastalara ait olduğu görülmüştür.

Testlere göre tanımlanan etkenler incelendiğinde, BioSpeedy menenjit/ensefalit paneli ile yedi bakteriyel etken (5'i DP) tanımlanmış,

bunlardan sadece ikisinde kültürde üreme olmuştur (Tablo 5). Bir örnekte de sadece kültürde bakteri üremesi olmuştur.

Sadece Biospeedy paneli ile bakteriyel bir etken tanımlanan beş örnekten biri (örnek no: 14) meningokoksemi/meningokokal menenjit ön tanılı bir hastaya ait olup, flow sitometride 1265 lökosit/mm³ saptanmıştır. Lökositlerin %75'i polimorf nükleer lökosit (PNL) morfolojisinde görülmüştür. BOS proteini 185.6 mg/dL olarak ölçülmüş ve Bio-Speedy Menenjit/Ensefalit panelinde *N. meningitidis* DNA' sı (Ct: 24,96) tespit edilmiştir ve bu sonuç DP olarak değerlendirilmiştir.

Bio-Speedy panelinde *S. pneumoniae* DNA' sı (Ct: 14,96) ve HHV-7 DNA' sı (Ct: 21,09) pozitif saptanan bir örneğin (örnek no: 53) menenjit tanısıyla gönderilmiş olduğu ve 3520 hücre/mm³ lökosit olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5). Hastaya örnek alım öncesi antibiyotik tedavisi başlandığı saptanmış ve sonuç DP olarak değerlendirilmiştir.

BioSpeedy panelinde *H. influenzae* DNA'sı (Ct: 29,11) ve hücre sayımında 5150 eritrosit/ mm³ ve 2737 lökosit/ mm³ bulunan bir örnekte (örnek no: 13) ise %95 PNL hakimiyeti bulunmaktadır. Hastanın klinik raporlarında BOS örneği alınmadan önce antibiyoterapi öyküsü bulunmamıştır. Ancak, SSS anatomik defekti nedeniyle BOS kaçağı olan hastanın bakteriyel menenjit tablosu olduğundan test sonucu DP olarak değerlendirilmiştir.

Sadece Biospeedy paneliyle *S. pneumoniae* (Ct: 26,9, 26,0) nükleik asiti saptanan iki hastada test sonucu KAB olarak yorumlanmıştır. Bu hastalardan birinde *S. pneumoniae* Ct değeri (Ct: 26,9) kısmen yüksek olup, radyolojik görüntüleme bulguları multiple sklerozla uyumlu olup, antibiyotik tedavisi almamıştır ve BOS örneğinde lökosit görülmemiştir. BioSpeedy panelinde 29,6 Ct değeri ile *S. pneumoniae* saptananan diğer hastanın BOS örneğinde de (örnek no: 43) lökosit saptanmamıştır. Hipoksik iskemik ensefalopati ve yenidoğan sepsisi tanılarıyla yoğun bakımda takip edilen hastanın sonucu KAB olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 5: Bakteriyel patojenler açısından pozitif bulunan BOS örneklerinde hücre sayımı, BioSpeedy paneli ve bakteriyel kültürün karşılaştırılması

Örnek No	Ön Tanı/ Tanı	Yaş	Lökosit (mm^3)	MNL%	Proteini (mg/dL)	Bakteriyel Kültür	BioSpeedy Paneli	Yorum
4	Multiple Skleroz	15	0	0	21	Negatif	*S. pneumoniae*	KAB
13	Menenjit	35	2737	5	121	Negatif	*H. influenzae*	DP
14	Menenjit	6	1265	25	185,6	Negatif	*N. meningitidis*	DP
43	Yenidoğan Sepsisi	0	0	0	146,2	Negatif	*S. pneumoniae*	KAB
53	Menenjit	6	3520	70	79,2	Negatif	*S. pneumoniae* (ve HHV-7)	DP
76	Menenjit	54	1393	10	632	*S.pneumoniae*	*S. pneumoniae*	DP
77	Menenjit	9	17350	60	402,4	*N.meningitidis*	*N. meningitidis*	DP
88	Menenjit	7	3903	20	237,7	*S.pyogenes*	Panelde yok	DP

İki örnekte (örnek no 76 ve 77) BioSpeedy paneli ile saptanan *N. meningitidis* (Ct: 20) ve *S. pneumoniae* (Ct: 19) bakteri kültüründe de üremiştir (Tablo 4). Bu iki hasta da bakteriyel menenjit ile uyumlu klinik tablo ile takip ve tedavi edilmiştir.

Bakteriyel etkenlerde olduğu gibi, herhangi bir kit ile virüs saptanan dokuz örnekten altısı çocuk yaş grubundaki hastalara aittir. FTD Viral Menenjit paneli ile BioSpeedy Menenjit/Ensefalit paneli tüm örnekler arasında toplamda dokuz adet viral patojen saptanmış ve altı sonuç DP olarak yorumlanmıştır (Tablo 6). Her iki panelde üç örnekte VZV, bir örnekte Enterovirüs saptanmış ve bu sonuçlar DP olarak yorumlanmıştır.

FTD viral paneli daha kısıtlı sayıda patojeni tarayabilmektedir ve kitle bir örnekte Kabakulak virüsü ve diğer bir örnekte HHV-2 saptanmış bu sonuçlar da DP olarak yorumlanmıştır.

Denge kaybı şikayeti ve ensefalit ön tanısı olan bir hastanın BOS örneğinde (örnek no: 23) her iki panel tarafından VZV DNA varlığı gösterilmiştir (BioSpeedy paneli Ct: 33,68). BOS örneğinde lökosit saptanmamış olması dikkat çekicidir. Ancak hastanın öyküsünde bir hafta öncesinde VZV enfeksiyonu geçirme öyküsü olduğu belirlenmiş ve DP olarak yorumlanmıştır.

Ensefalit ve menenjit ön tanılarıyla ile gönderilen iki örnekte (örnek no: 78 ve 85) VZV DNA iki multiplex PCR paneli ile de tespit edilmiştir ve mononükleer lökosit (MNL) hakimiyeti ve 50 hücre/mm³ üzerinde lökosit saptanmıştır ve sonuç DP olarak değerlendirilmiştir (Tablo 6).

Ensefalit ön tasını ile gönderilen 1280 lökosit/mm³ ve %80 MNL gözlenen örnekte (örnek no: 61) her iki multiplex PCR paneli ile de Enterovirus RNA'sı saptanmıştır. BioSpeedy sonucu DP olarak değerlendirilmiştir (Tablo 6).

Ancak bir örnekte (örnek no: 26) FTD paneli yüksek Ct değerinde (Ct: 33) HSV-2 DNA'yı saptarken, BioSpeedy paneli tüm patojenler için negatif sonuçlanmıştır. FTD panel sonucu DP olarak yorumlanmıştır (Tablo 6)

Febril konvülsiyonu olan bir hastanın laboratuvarımıza gönderilen örneğinde (örnek no: 15) BioSpeedy panelinde HHV-6 DNA (Ct: 33) saptanmıştır (Tablo 6). BOS parametreleri ve hastanın kliniği bu bulguyu desteklemediğinden sonuç KAB olarak yorumlanmıştır. Benzer şekilde, menenjit ön tanısı ile gönderilen bir başka hastanın BOS örneğinde (örnek no: 55) lökosit yokken BioSpeedy panelinde HHV-6 DNA varlığı yüksek Ct değerinde saptanmıştır. Bu sonuç da KAB olarak yorumlanmıştır.

Menenjit ön tanısıyla takipli bir hastanın BOS örneği (örnek no: 83) FTD Viral Menenjit panelinde Kabakulak virüsü pozitif olarak bulunmuş ve DP olarak yorumlanmıştır. Bu etken BioSpeedy panelinin kapsamında değildir.

Tablo 6: FTD Viral Menenjit paneli ile BioSpeedy panellerinde pozitiflik saptanan virüslerin karşılaştırılması.

Örnek No	Ön Tanı/Tanı	Yaş	Bos Lökositi (mm^3)	Bos %MNL	Bos Proteini (mg/dL)	FTD Paneli	BioSpeedy Paneli	Yorum
15	Febril Konvülsiyon	1	NA	NA	NA	Panelde yok	HHV-6	KAB
23	Ensefalit	12	0	0	32,2	VZV	VZV	DP
26	Ensefalit	51	59	55	1351,4	HSV-2	Neg	DP
55	Menenjit	1	0	0	21,1	Panelde yok	HHV-6	KAB
61	Ensefalit	4	1280	80	41,5	Enterovirus	Enterovirus	DP
78	Ensefalit	67	65	90	48,5	VZV	VZV	DP
83	Menenjit	1	829	95	60,8	Kabakulak	Panelde yok	DP
85	Menenjit	32	570	95	223,1	VZV	VZV	DP
53	Menenjit	6	3520	70	79,2	Panelde yok	HHV-7 (ve *S.pneumoniae*)	KAB

Hastaların BOS örneklerinin 72'sinde (%81,8) herhangi bir patojen saptanmamıştır. Bunlardan 11'inde tanı/ön tanı ensefalit, 10'unda da konvülsiyon olarak belirtilmiştir. Bu tanıları ensefalopati, optik nevrit ve demiyelinizan hastalık tanıları sırasıyla 8, 5 ve 4 örnek ile izlemiştir.

Herhangi bir patojen saptanmayan örneklerin BOS parametreleri incelendiğinde ensefalit tanı/ön tanısıyla gelen örneklerin 4'ünde ≥5 lökosit/mm^3 tespit edilmiştir (Tablo 7). Menenjit tanı/ön tanısı ile gelen 1 örnekte ise ≥5 lökosit/mm^3 tespit edilmiştir (Tablo 7). Bu iki tanı grubunda < 5 lökosit/mm^3 saptanan örnek sayıları sırasıyla 7 ve 3 dür.

Tablo 7: Kültür veya moleküler yöntemle herhangi bir patojen tespit edilmeyen menenjit ve ensefalit tanı/ön tanısıyla gönderilen örneklerde lökosit sayılarının dağılımı

Tanı/ Ön Tanı	Bos Lökositi (mm^3)	Patojen	Örnek Sayısı
Ensefalit	Lökosit < 5	Saptanmadı	7
Ensefalit	Lökosit ≥ 5	Saptanmadı	4
Menenjit	Lökosit < 5	Saptanmadı	3
Menenjit	Lökosit ≥ 5	Saptanmadı	1

TARTIŞMA

Santral sinir sistemi enfeksiyonlarını tanısı için günümüzde kullanılan temel paradigma, hastanın tıbbi geçmişine, kliniğine ve görüntüleme bulgularına ve bir dizi laboratuvar testine dayanır (8). Bu yaklaşım, enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan nedenlerin örtüşen klinik bulguları nedeniyle nöroinflamatuar hastalıklar için yetersiz kalmaktadır. Akut menenjit/ensefalitte klinik tablo farklı şekillerde olabilir ve ateş, baş ağrısı, ense sertliği, bilinç değişikliği, nöbetler veya fokal nörolojik bulgular gibi semptomlar sıklıkla birden çok enfeksiyöz ajanlarla örtüşür. Üstelik akut menenjit/ensefalitte vakaların neredeyse yarısında etken saptanamamaktadır (62). BOS hücre sayımı ve biyokimyasal parametreleri gibi kolay ulaşılabilir rutin testler, enfeksiyon etkeninin türünü (bakteriyel; örneğin tüberküloz veya viral) ön görmede yardımcıdır ancak bu parametreler özgün değildir (63). Ayrıca, nadir görülen patojenler için tanı testlerinin yetersizliği ve lomber ponksiyonla alınan örnek miktarının sınırlı olması farklı etkenlere yönelik test uygulamalarını dolayısıyla SSS enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısını güçleştirmektedir (17). Bakteriyel menenjit için ise geleneksel yöntemlerden olan kültür daha öne çıkmaktadır. Ancak kültür iki ila beş gün sürer ve bazı bakterilerin üretilmesi diğerlerine göre daha güç olabilir (örneğin *N. meningitidis*). BOS alımından önce antibiyotik tedavisi uygulanması, bakterinin kültürde üremesi için gerekli optimum ortamın sağlanamaması gibi nedenlerle yanlış negatiflikler görülebilir. Bakteriyel kültür ve identifikasyon süreçlerinin zaman alıcı olması profilaksi ve enfeksiyon önleme prosedürlerinin zamanında uygulanamamasına yol açabilir. Ayrıca viral menenjit bakteriyel menenjitten sık görüldüğünden menenjit tanısı sadece kültüre dayalı yöntemlerle sınırlı kalmamalıdır (14). Çok sayıda patojenin neden olabildiği ensefalitte ise virüsler vakaların büyük bir kısmından sorumludur. BOS örnek miktarı tek tür virüsü hedefleyen PCR testlerinin kullanımı için kısıtlayıcı bir faktördür ve bu testler sadece güçlü klinik şüphe varlığında kullanılabilmektedir. Tanıdaki bu güçlükler istenmeyen klinik sonuçlara, yüksek mortalite-morbiditeye ve artan

hasta bakım maliyetlerine neden olmaktadır (16). Bu nedenlerle hasta tanısında hızlı, duyarlı ve özgül, aynı zamanda pek çok patojeni kapsayan tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Epidemiyolojik olarak yaygın enfeksiyöz menenjit-ensefalit etkenlerini kapsayan, hızlı, hassas ve küçük hacimde BOS örnekleriyle çalışan bir tanı testi, konvansiyonel laboratuvar yöntemlerinde karşılaşılan zorlukların üstesinden gelebilir. Günümüzde bu şartları sağlayan FDA onaylı multiplex-PCR panelleri olsa da, maliyetler bu panellerin klinik laboratuvarlarda kullanımını kısıtlayabilmektedir.

Bu çalışmada ülkemizde var olan, geniş etken saptama potansiyeliyle öne çıkan ve multiplex panellere bir alternatif olarak sunulan Bio-Speedy Menenjit/Ensefalit RT-qPCR MX-17S paneli ve FTD viral menenjit paneli klinik, radyolojik ve konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen BOS örneklerinin neredeyse yarısı pediatri kliniklerinden gönderilmiştir. Bunu nöroloji takip etmektedir. Örneklerin 1/3' ü menenjit ve ensefalit tanı - ön tanılı hastalardan alınmıştır. Fakat neredeyse her iki örnekten birinde 5 ve daha az lökosit/mm³ saptanmıştır. Bu durum ileri moleküler testlerin klinisyenler tarafından BOS hücre ve biyokimyasal parametrelerinin sonuçları gözetilmeksizin istendiğini göstermektedir.

Menenjit ve ensefalit pediatrik popülasyonda daha sık görülmektedir (64-66). Araştırmaya alınan örneklerin büyük kısmı pediatrik veya 50 yaş üstü hasta grubuna aittir. BOS örneklerinde DP olarak yorumlanan 12 (%13,6) bakteriyel veya viral etkenin yedisi pediatrik hasta grubuna ait örnekler olup bu grupta %22,6 olan pozitiflik oranı erişkinlerden (%8,8) fazladır. Merkezimizdeki bu bulgu geniş çaptaki epidemiyolojik çalışmalarla paralellik göstermektedir (62, 64, 65).

Bakteriyel menenjit vakalarının büyük bir kısmından sorumlu olan *S. pneumoniae*, *N. menengitidis* ve *H. influenzae* bu çalışmada da etken olarak doğrulanan bakterilerin çoğunu (n=5/6) oluşturmaktadır (28,64). *S. pyogenes* ise bir örnekte (DP) sadece kültür ile tespit edilmiştir Son iki yılda bakterinin neden olduğu invaziv enfeksiyonların insidansında bir artış bildirilmektedir (66). *S.pyogenes* kaynaklı menenjit olguların nadir olduğu kabul edilmektedir

(67). Ancak önümüzdeki yıllarda insidans artışı devam ederse multiplex PCR tanı panellerinde olası patojen olarak yaygınlaşabilir.

BioSpeedy kültürde üreyen iki bakteriyel etkeni de doğru bir şekilde saptayabilmiştir. Klinik ve laboratuvar bulguları menenjit ile uyumlu üç hastanın BOS kültüründe üreme olmamasına rağmen BioSpeedy paneli *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* ve *H. influenzae* DNA'larını saptayabilmiştir. Bu üç hastanın ikisine örnek alımı öncesinde başlanan antibiyotik tedavisi BOS kültüründe etkenin izole edilmesini engellemiş olabilir (28). Bu bulgu multiplex BOS PCR panellerinin özellikle erken dönemde antimikrobiyal tedavi başlanan ve lomber ponksiyonu geciken hastalarda önemini vurgulamaktadır. BOS'ta *H. influenzae* DNA'sı saptanan hastanın ardışık üç farklı kültüründe de üreme olmaması dikkat çekicidir. Bu durum moleküler yöntemlerin, bakteriyel menenjit düşünülen kültür negatif hasta gruplarında etkenin saptanmasındaki başarısını gösterir.

Bir hastanın *S. pneumoniae* pozitif saptanan örneğinde HHV-7 DNA'sı da tespit edilmiştir. HHV-7 de HHV-6 gibi ateş ve febril konvülsiyon ile ilişkilendirilmiştir, fakat primer ensefaliti immün kompetan kişilerde nadir olarak görülür (68). Ortalama yaşı 10 olan 2972 çocuk hastanın dahil edildiği, 1998 ve 2011 yılları arasında sürdürülen bir çalışmada örneklerin %1,9'unda (57 örnek) HHV-7 DNA'sı tespit edilmiştir (69). Sadece üç örnekte (ikisi ensefalit, biri Guillain-Barre sendromu) HHV-7 ile ilişkili nörolojik hastalık IgG avidite testi ile doğrulanmıştır. Menenjit, ensefalit ve demiyelinizan hastalık tanılarından birini alan 18 çocuk için klinik tabloyu açıklayabilecek başka bir etken saptanmadığından PCR pozitifliği muhtemel HHV-7 enfeksiyonu olarak değerlendirilmiştir. Kalan 36 hastada HHV-7 enfeksiyonu yüksek IgG aviditesi veya başka bir patojenin klinikle ilişkilendirilmesinden dolayı dışlanmıştır (69). Sunulan bu çalışmada örneğin alındığı hastanın sistemik lupus eritematozus tanısı nedeniyle tedavi almakta olduğu, yaşı ve BOS MNL hakimiyeti düşünüldüğünde HHV-7 ile koenfeksiyon muhtemeldir (69). Ancak HHV-7 CD4+ T hücrelerini enfekte eder ve orada latent kalabilir (69). Tıpkı HHV-6 gibi HHV-7 de kromozoma entegre olabilir (iciHHV-7) ve reaktivasyonu görülebilir (69). Bu özelliklerinden dolayı örnekte HHV-7 DNA'sının saptanmasının

hastanın kliniği ile olan ilişkisi net bir şekilde kurulamamıştır. Lökositlerde latent olarak kalabilen virüslerin genetik materyallerinin BOS'ta tespit edilmesi durumunda hastanın klinik özellikleri ve diğer laboratuvar testlerinin bir arada multidisipliner bir ekip tarafından değerlendirilmesi ve laboratuvar sorumlu hekiminin görüşü alınması gerekmektedir. Primer HHV-7 SSS enfeksiyonu düşünüldüğünde SSS'de antikor üretiminin gösterilmesi, avidite çalışmaları veya IgG düzeylerindeki periyodik artışlar tanıda yardımcı olabilir (69,70).

Daha önceki çalışmalar *S. pneumoniae*'nin multiplex BOS PCR panellerinde yanlış pozitifliklerin çoğundan sorumlu olduğunu göstermektedir (30). Yapılan çok merkezli bir araştırmada kültür negatif 15 örneğin 12'sinde PCR ile *S. pneumoniae* saptanmıştır ancak klinik veriler ve diğer laboratuvar testleri ile bunlardan sadece 5 tanesi konfirme edilebilmiştir (30). Bu bulgular BOS PCR pozitifliklerinde hasta kliniği ile doğrudan uyumlu olmayan sonuçların örneğin alınması/işlenmesi sırasında kontaminasyona veya yönteme ait teknik hatadan kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada iki örnekte BioSpeedy panelinde pozitiflik saptanan *S. pneumoniae* için KAB yorumu yapılmıştır. Klinik ve laboratuvar parametreleri bakteriyel menenjit ile uyumlu olmayan hastadan gönderilen 4 numaralı örnekteki *S. pneumoniae* DNA pozitifliği kullanılan multiplex PCR yöntemi kaynaklı yanlış pozitiflik olabilir. Diğer örnekte ise hastanın yenidoğan olması, klinik olarak septik tabloda yoğun bakımda takip edilmesi nedeniyle BOS PCR pozitifliğini yorumlamak güçtür. Klinik ve diğer laboratuvar bulgularını açıklamayan PCR pozitifliklerini yanlış pozitif olarak değerlendirmeden önce, yöntemin aktif çoğalan patojen varlığını değil sadece genetik materyalin varlığını gösterdiği unutulmaması gerekir.

Menenjit vakalarında viral etkenler son yıllarda daha öne çıkmaktadır. Yakın zamanda 2015 - 2018 yılları arasını kapsayan 6705 vakanın incelendiği Katar merkezli bir çalışmada tüm menenjit vakalarının 10%'unun viral kaynaklı olduğu rapor edilmiştir (65). Sunulan araştırmada toplam örnek sayısı kısıtlı olduğu için anlamlı karşılaştırma yapmak güç olsa da, menenjit ön tanısı ile gönderilen örneklerde viral etkenlerin sayısının düşük olması beklenen bir durumdur (65). FTD Viral Menenjit paneli VZV ve Kabakulak virüsünü

saptamış, ancak kabakulak virüsü Biospeedy panelinde bulunmadığından BioSpeedy panelinde pozitiflik saptanamamıştır. Bu sonuçlar BOS multiplex PCR panellerinin kapsamlarının test sonuçlarını etkileyen en önemli faktör olduğunu göstermektedir (30).

Önceki çalışmalarda viral menenjit vakalarının %60'ından fazlasında Enterovirüsler'in neden olduğu gösterilmiştir (62,65). Multiplex BOS PCR paneli ile yapılan çok merkezli bir yayında SSS örneklerinde viral pozitifliklerin %37,5'i Enterovirüs kaynaklıyken bunu %16,2 ile HHV-6 takip etmiştir. (30). İnsan Parechovirüs %8,8, HSV-2 %8,8, VZV %5,1, HSV-1 %2,9 oranlarında saptanmıştır (30). Çalışmamızda ise ensefalit tanısıyla gönderilen 15 BOS örneğinin dördünde viral bir etken tespit edilmiş ve tümü DP olarak yorumlanmıştır. Üç etken (iki örnekte VZV ve bir örnekte Enterovirüs) her iki multipleks tanı paneliyle saptanabilmiş ancak biri (HSV-2) sadece FTD tanı paneli ile saptanmıştır. VZV DNA pozitif saptanan BOS örneklerinin birinde BOS'un mikrobiyolojik ve biyokimyasal incelemeleri ensefalit ile uyumlu bulunmamıştır. Ancak hastanın özgeçmişi incelendiğinde yakın zamanda geçirilmiş VZV enfeksiyonu olduğu görülmüştür. Bu durum su çiçeği veya zona zoster enfeksiyonları sırasında, hemen sonrasında özellikle immün düşkün kişilerde VZV reaktivasyonunda BOS'ta VZV DNA bulunabilir şeklinde açıklanmıştır (30,42).

Ensefalit ön tanılı bir hastada FTD Panelinde saptanan HSV-2 BioSpeedy panelinde saptanamamıştır. Bu örneğin Ct değerinin yüksek olduğu ve FTD paneli çalışıldıktan sonra uygun şartlarda saklanmış olsa da (-80 °C'de) dondur/çöz işlemi nedeniyle viral nükleik asitin degredasyonuna bağlı olabileceği düşünülmüştür.

HHV-6 multiplex BOS PCR panellerinde sıklıkla saptanan virüsler arasındadır (30). Pozitifliklerin çoğu pediatrik popülasyonda görülür. Farklı ön tanılarla gönderilen 1560 örnek kullanılarak yapılan çok merkezli bir araştırmada 22 örnekte HHV-6 DNA tespit edilmiştir (30). Bunlardan 18 tanesi PCR ve ardından dizileme çalışmalarıyla doğrulanmıştır. Doğrulanan sonuçlardan biri aktif HHV-6 enfeksiyonu olan bir çocuk hastaya aitken diğeri anspesifik menenjit vakası olarak çalışmacılar tarafından raporlanmıştır (30).

Geri kalan 16 örneğin ise enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan tanılar almış hastalardan geldiği rapor edilmiştir (30). Bu çalışmada HHV-6 sadece Biospeedy panelinde bulunmaktadır ve iki BOS örneğinde saptanmıştır. BOS örneklerinden birinde biyokimya ve mikrobiyolojik incelemeleri SSS enfeksiyonunu desteklemediğinden (örnek no 55) sonuç KAB olarak yorumlanmıştır. Diğer hasta ise febril konvülsiyon nedeniyle tanı ve tedavisi uygulanan bir çocuktur ancak BOS örneği inceleme parametrelerine ulaşılamamıştır (örnek no 15). HHV-6 çocukluk çağı febril konvülsiyonlarından sorumlu virüsler arasındadır (52). İmmün kompetan ve immün kompromize hastalarda SSS enfeksiyonlarına yol açabilir (21,49). Ancak HHV-6'nın latent doğası ve sağlıklı kişilerde de SSS'deki yüksek prevelansından dolayı HHV-6 pozitifliklerini değerlendirmek oldukça güçtür (54, 55). Bu hastalarda HHV-6A ve HHV-6B'yi ayırabilen kantitatif PCR yöntemleriyle örneklerin tekrar test edilmesi veya dizileme çalışmaları panelin analitik performansı kaynaklı yanlış pozitifliklerin tespit edilmesine yardımcı olabilir. Buna karşın, iciHHV-6 nedeniyle yüksek titrede saptanan HHV-6 DNA sonucunun her zaman klinik ve diğer laboratuvar çıktılarıyla korelasyonu değerlendirilmelidir.

Çalışmada menenjit ensefalit tanı/ön tanısıyla gönderilen BOS örneklerinin 15/28'inde herhangi bir patojen tespit edilmemiştir. Önceki bir çalışmada da bu çalışmadaki bulgulara benzer şekilde SSS enfeksiyonundan şüphelenilen olguların neredeyse %50'sinde sorumlu patojen tespit edilememiştir (62). Anlaşıldığı kadarıyla SSS enfeksiyonlarının etyolojik tanısındaki zorluklar biyomedikal teknolojilerdeki gelişmelere rağmen devam etmektedir. Günümüzde patojen agnostik BOS metagenomik dizileme yaklaşımı SSS enfeksiyonlarının tanısında önümüzdeki yıllarda yeni çözümler sunmaktadır (71).

Multiplex PCR panellerinin santral sinir sistemi enfeksiyonlarına bağlı hastanede yatış süresini ve ampirik antibiyoterapi süresinin kısaltılmasında etkili olduğu gösterilmiştir (72). Bu nedenle uygun panel seçimi klinik çıktıları doğrudan etkilemektedir.

Bu çalışmada SSS enfeksiyonlarının tanısında iki multipleks PCR tanı panelinin klinik mikrobiyoloji laboratuvarında rutin tanıda kullanılabilirliği

değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın en önemli kısıtlılığı, toplam örnek sayısının daha kapsamlı çıkarımlar yapmak için yetersiz olmasıdır. Ayrıca multipleks PCR panelinde tespit edilen patojenlere ait nükleik asitlerin varlığı üçüncü bir yöntem ile doğrulanmamıştır. Bir diğer kısıtlılık ise retrospektif olarak elde edilen klinik verilerin yetersizliğidir. Bu alanda örnek sayısı yüksek çalışmaların çok merkezli, birden çok teknoloji ve yöntem kullanılarak gerçekleştirilmesi yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet Neurol 2019; 18:459–80.
2. McGill F, Griffiths MJ, Bonnett LJ, et al. Incidence, etiology, and sequelae of viral meningitis in UK adults: a multicentre prospective observational cohort study. Lancet Infect Dis 2018;18:992–1003.
3. Lakeman FD, Whitley RJ. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. J Infect Dis. 1995;171(4):857-63.
4. Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, et al. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. Clin Microbiol Rev 2011; 24:557–91.
5. Scheld WM, Koedel U, Nathan B, Pfister HW. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury. J Infect Dis. 2002;186(Suppl 2):225-33.
6. Widjaja H, Rusmawatiningtyas D, Makrufardi F, Arguni E. Neutrophil lymphocyte ratio as predictor of mortality in pediatric patients with bacterial meningitis: A retrospective cohort study. Ann Med Surg (Lond). 2021;73:103191.
7. Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. Clin Microbiol Rev. 1993;6(2):118-36.
8. Venkatesan A, Tunkel AR, Bloch KC, et al. Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: consensus statement of the international encephalitis consortium. Clin Infect Dis. 2013; 57(8) : 1114 - 28.
9. Hemachudha T, Ugolini G, Wacharapluesadee, et al. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. Lancet Neurol. 2013;12(5):498-513.
10. Steiner I. Herpes simplex virus encephalitis: new infection or reactivation?. Curr Opin Neurol. 2011;24(3):268-74.
11. van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, et al. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis N Engl J Med. 2004;351(18):1849-59.
12. Wall EC, Chan JM, Gil E, Heyderman RS. Acute bacterial meningitis. Curr Opin Neurol. 2021;34(3):386-95.
13. Takada S, Fujiwara S, Inoue T, et al. Meningococcemia in Adults: A Review of the Literature. Intern Med. 2016;55(6):567-72.
14. Kupila L, Vuorinen T, Vainionpää R, et al. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. Neurology. 2006;66(1):75-80.
15. Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, et al. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. Clin Infect Dis.

2006;43(12):1565-77.
16. Vora NM, Holman RC, Mehal JM, et al. Burden of encephalitis-associated hospitalizations in the United States, 1998-2010. Neurology. 2014;82(5):443-51.
17. Ellul M, Solomon T. Acute encephalitis - diagnosis and management. Clin Med (Lond). 2018;18(2):155-9.
18. Roos K, Wilson M, Tyler K. Encephalitis. In: Loscalzo J, Fauci A, Kasper D, et al. Harrison's Principles of Internal Medicine, Twenty-First Edition. McGrawHill; 2022. 1094-95
19. Hongo I, Bloch KC. Ehrlichia infection of the central nervous system. Curr Treat Options Neurol. 2006;8(3):179-84.
20. Wilking AN, Elliott E, Garcia MN, Murray KO, Munoz FM. Central nervous system manifestations in pediatric patients with influenza A H1N1 infection during the 2009 pandemic. Pediatr Neurol. 2014;51(3):370-6.
21. Trabue CH, Bloch KC, Myers JW, Moorman JP. Case report and literature review: HHV-6-associated meningoencephalitis in an immunocompetent adult. Herpes. 2008;15(2):33-5.
22. Barah F, Whiteside S, Batista S, Morris J. Neurological aspects of human parvovirus B19 infection: a systematic review. Rev Med Virol. 2014;24(3):154-68.
23. Greenlee JE. Approach to diagnosis of meningitis. Cerebrospinal fluid evaluation. Infect Dis Clin North Am. 1990;4(4):583-98.
24. Abassi M, Boulware DR, Rhein J. Cryptococcal Meningitis: Diagnosis and Management Update. Curr Trop Med Rep. 2015;2(2):90-9.
25. https://www.cdc.gov/meningitis/bacterial.html, Centre for Disease Control (CDC) (Erişim tarihi: 13 Mayıs 2023)
26. Tarafdar K, Rao S, Recco RA, Zaman MM. Lack of sensitivity of the latex agglutination test to detect bacterial antigen in the cerebrospinal fluid of patients with culture-negative meningitis. Clin Infect Dis. 2001;33(3):406-8.
27. Lu H, Zhou Y, Yin Y, Pan X, Weng X. Cryptococcal antigen test revisited: significance for cryptococcal meningitis therapy monitoring in a tertiary chinese hospital. J Clin Microbiol. 2005;43(6):2989-90.
28. Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. Clin Microbiol Rev. 2010;23(3):467-92.
29. 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.
30. Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat JM, et al. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. J Clin Microbiol. 2016;54(9):2251-61.
31. Gitman MR, Ferguson D, Landry ML. Comparison of Simplexa 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):3765-69.

32. Landry ML, Garner R, Ferguson D. Comparison of the NucliSens Basic kit (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) and the Argene Biosoft Enterovirus Consensus Reverse Transcription-PCR assays for rapid detection of enterovirus RNA in clinical specimens. J Clin Microbiol. 2003;41(11):5006-10.
33. Zanella MC, Cherkaoui A, Hinic V, et al. Unexpectedly High False-Positive Rates for Haemophilus influenzae Using a Meningoencephalitis Syndromic PCR Panel in Two Tertiary Centers. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11(4):639-58.
34. Kleines M, Scheithauer S, Schiefer J, Häusler M. Clinical application of viral cerebrospinal fluid PCR testing for diagnosis of central nervous system disorders: a retrospective 11-year experience. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;80(3):207-15.
35. Bradshaw MJ, Venkatesan A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis and Management. Neurotherapeutics. 2016;13(3):493-508.
36. Boivin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. Herpes. 2004;11 (Suppl 2):48A-56A.
37. Weil AA, Glaser CA, Amad Z, Forghani B. Patients with suspected herpes simplex encephalitis: rethinking an initial negative polymerase chain reaction result. Clin Infect Dis. 2002;34(8):1154-7. doi:10.1086/339550
38. Bhullar SS, Chandak NH, Purohit HJ, et al. Determination of viral load by quantitative real-time PCR in herpes simplex encephalitis patients. Intervirology. 2014;57(1):1-7.
39. Nagel MA, Niemeyer CS, Bubak AN. Central nervous system infections produced by varicella zoster virus. Curr Opin Infect Dis. 2020;33(3):273-8.
40. de Ory F, Avellón A, Echevarría JE, et al. Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study. J Med Virol. 2013;85(3):554-62.
41. Koskiniemi M, Piiparinen H, Rantalaiho T, et al. Acute central nervous system complications in varicella zoster virus infections. J Clin Virol. 2002;25(3):293-301.
42. Cinque P, Bossolasco S, Vago L, et al. Varicella-zoster virus (VZV) DNA in cerebrospinal fluid of patients infected with human immunodeficiency virus: VZV disease of the central nervous system or subclinical reactivation of VZV infection? Clin Infect Dis. 1997;25(3):634-9.
43. Rottenstreich A, Oz ZK, Oren I. Association between viral load of varicella zoster virus in cerebrospinal fluid and the clinical course of central nervous system infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79(2):174-7.
44. Kleinschmidt-DeMasters BK, Gilden DH. The expanding spectrum of herpesvirus infections of the nervous system. Brain Pathol. 2001;11(4):440-51.
45. Gilden DH, Mahalingam R, Cohrs RJ, Tyler KL. Herpesvirus infections of the nervous system. Nat Clin Pract Neurol. 2007;3(2):82-94.
46. Weinberg A, Li S, Palmer M, Tyler KL. Quantitative CSF PCR in Epstein-

Barr virus infections of the central nervous system. Ann Neurol. 2002;52(5):543-8.
47. Huang C, Morse D, Slater B, et al. Multiple-year experience in the diagnosis of viral central nervous system infections with a panel of polymerase chain reaction assays for detection of 11 viruses. Clin Infect Dis. 2004;39(5):630-5.
48. Zerr DM. Human herpesvirus 6 and central nervous system disease in hematopoietic cell transplantation. J Clin Virol. 2006;37 (Suppl 1):S52-S56.
49. Scheurer ME, Pritchett JC, Amirian ES, et al. HHV-6 encephalitis in umbilical cord blood transplantation: a systematic review and meta-analysis. Bone Marrow Transplant. 2013;48(4):574-80.
50. Kawamura Y, Sugata K, Ihira M, et al. Different characteristics of human herpesvirus 6 encephalitis between primary infection and viral reactivation. J Clin Virol. 2011;51(1):12-9.
51. Ward KN, Andrews NJ, Verity CM, Miller E, Ross EM. Human herpesviruses-6 and -7 each cause significant neurological morbidity in Britain and Ireland. Arch Dis Child. 2005;90(6):619-23.
52. Epstein LG, Shinnar S, Hesdorffer DC, et al. Human herpesvirus 6 and 7 in febrile status epilepticus: the FEBSTAT study. Epilepsia. 2012;53(9):1481-8.
53. Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, et al. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. Clin Infect Dis. 1998;26(1):132-7.
54. Ahlqvist J, Fotheringham J, Akhyani N, et al. Differential tropism of human herpesvirus 6 (HHV-6) variants and induction of latency by HHV-6A in oligodendrocytes. J Neurovirol. 2005;11(4):384-94.
55. Ward KN, Thiruchelvam AD, Couto-Parada X. Unexpected occasional persistence of high levels of HHV-6 DNA in sera: detection of variants A and B J Med Virol. 2005;76(4):563-70.
56. Komaroff AL, Pellett PE, Jacobson S. Human Herpesviruses 6A and 6B in Brain Diseases: Association versus Causation. Clin Microbiol Rev. 2020;34(1):e00143-20.
57. Ramers C, Billman G, Hartin M, Ho S, Sawyer MH. Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. JAMA. 2000;283(20):2680-5.
58. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreaks of aseptic meningitis associated with echoviruses 9 and 30 and preliminary surveillance reports on enterovirus activity--United States, 2003. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2003;52(32):761-4.
59. Casas-Alba D, de Sevilla MF, Valero-Rello A, et al. Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in Catalonia. Clin Microbiol Infect. 2017;23(11):874-81.
60. Welinder-Olsson C, Dotevall L, Hogevik H, et al. Comparison of broad-range bacterial PCR and culture of cerebrospinal fluid for diagnosis of community-aCtuired bacterial meningitis. Clin Microbiol Infect. 2007;13(9):879-86.

61. Wang Y, Guo G, Wang H, et al. Comparative study of bacteriological culture and real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR) and multiplex PCR-based reverse line blot (mPCR/RLB) hybridization assay in the diagnosis of bacterial neonatal meningitis. *BMC Pediatr*. 2014;14:224.
62. Granerod J, Ambrose HE, Davies NW, et al. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study Lancet Infect Dis. 2010;10(12):835-44.
63. Spanos A, Harrell FE Jr, Durack DT. Differential diagnosis of acute meningitis. An analysis of the predictive value of initial observations. JAMA. 1989;262(19):2700-7.
64. Castelblanco RL, Lee M, Hasbun R. Epidemiology of bacterial meningitis in the USA from 1997 to 2010: a population-based observational study. Lancet Infect Dis. 2014;14(9):813-9.
65. Mathew S, Al Khatib HA, Al Ansari K, et al. Epidemiology Profile of Viral Meningitis Infections Among Patients in Qatar (2015-2018). Front Med (Lausanne). 2021;8:663694.
66. de Gier B, Marchal N, de Beer-Schuurman I, et al. Increase in invasive group A streptococcal (Streptococcus pyogenes) infections (iGAS) in young children in the Netherlands, 2022. Euro Surveill. 2023;28(1):2200941.
67. Randhawa E, Woytanowski J, Sibliss K, Sheffer I. Streptococcus pyogenes and invasive central nervous system infection. SAGE Open Med Case Rep. 2018;6:2050313X18775584.
68. Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Human Herpesviruses 6A, 6B, and 7. Microbiol Spectr. 2016;4(3):10.1128.
69. Schwartz KL, Richardson SE, Ward KN, et al. Delayed primary HHV-7 infection and neurologic disease. Pediatrics. 2014;133(6):e1541-e1547.
70. Ongrádi J, Ablashi DV, Yoshikawa T, Stercz B, Ogata M. Roseolovirus-associated encephalitis in immunocompetent and immunocompromised individuals. J Neurovirol. 2017;23(1):1-19.
71. Wilson MR, Sample HA, Zorn KC, et al. Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis. N Engl J Med. 2019;380(24):2327-40.
72. Choi JJ, Westblade LF, Gottesdiener LS, et al. Impact of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Panel on Duration of Empiric Antibiotic Therapy in Suspected Bacterial Meningitis. Open Forum Infect Dis. 2021;8(10):467-72

EKLER

EK – 1: Araştırma İzinleri

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarının Moleküler Test Sonuçlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi**

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2011-KAEK-26
	AÇIK ADRESİ	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası Kat.1 Görükle Kampüsü Nilüfer/ Bursa
	TELEFON	0.224. 295 00 20
	FAKS	0.224. 295 00 29
	E-POSTA	uukaek@uludag.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.İmran Sağlık			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI	-Araş.Gör.Dr.Osman Merdan, Prof.Dr.Beyza Ener, Prof.Dr.Cüneyt Özakın, Prof.Dr.Harun Ağca -Prof.Dr.Mustafa Hacımustafaoğlu, Prof.Dr.Solmaz Çelebi, Uzm.Dr.Fatma Dilşad Aksoy			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	-Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı -Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Retrospektif araştırma			
	ARAŞTIRMANIN YAPILIŞ AMACI	Uzmanlık tez çalışması			
	ARAŞTIRMANIN BAŞLAMA TARİHİ/ SÜRESİ	20.04.2023/ 2 ay			
	GÖNÜLLÜ/DOSYA SAYISI	88			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

	Belge Adı	Tarihi	Dili
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU	27.03.2023	Türkçe
	Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	28.03.2023	Türkçe

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BÜTÇE FORMU	☒	Tarih: 28.03.2023
	ARAŞTIRICILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU	☒	Tarih: 28.03.2023
	PROSPEKTİF ÖZELLİKLİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA TAAHHÜTNAMESİ	☐	
	İKU klavuzunun okunduğuna dair taahhütname	☐	
	SONUÇ ÖZET RAPORU	☐	
	DİĞER:	☒	Araştırma ilk başvuru ön yazısı, (Tarih: 27.03.2023), hasta listesi, sorumlu araştırmacı özgeçmişi, tüm araştırıcılar tarafından imzalanmış Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi, literatür

Sayfa 1

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarının Moleküler Test Sonuçlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi

KARAR BİLGİLERİ

Karar No: 2023-7/11 **Tarih: 11 Nisan 2023**

Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelendi.

1-Araştırmanın başvurusu dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna,

2-Araştırmanın başlama tarihinin bildirilmesi ve araştırma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesine,

3-Araştırma protokolünde ve başvuru formunda yapılacak tüm değişiklikler için Etik Kuruldan izin alınması gerektiğinin sorumlu araştırıcılara iletilmesine toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI	Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU

ÜYELER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *	
Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	E ☒	K ☐	E ☒	H ☐	E ☒	H ☐
Prof.Dr.Elif BAŞAĞAN MOĞOL Başkan Yardımcısı	Anesteziyoloji	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof.Dr.M.Sertaç YILMAZ Üye	Farmakoloji	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof.Dr.Hilal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Yenidoğan BD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof.Dr.Hasan ARI Üye	Kardiyoloji	Bursa Yüksek İhtisas EAH Kardiyoloji Kliniği	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof.Dr.Alpaslan TÜRKKAN Üye	Halk Sağlığı	Bursa UÜ. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof.Dr.Özen ÖZ GÜL Üye	İç Hastalıkları Endokr.ve Metab.	BUÜ.Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD Endokrinoloji ve Metabolizma BD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç.Dr.Kağan HUYSAL Üye	Biyokimya	Bursa Yüksek İhtisas EAH Biyokimya	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒
Doç.Dr.Engin SAĞDİLEK Üye	Biyofizik	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Biyofizik AD	E ☒	K ☐	E ☒	H ☐	E ☒	H ☐
Doktor Öğretim Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi. Tıp Tarihi ve Etik AD.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒
Av. Ahmet BAYRAM	Hukuk	Bursa UÜ.Rektörlüğü Hukuk Bürosu	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Ayşe ŞEN Üye	Sağlık meslegi mensubu olmayan üye	Serbest Meslek	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐

*Toplantıda Bulunma

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde bana yol gösterip katkı sağlayan, başta Prof. Dr. Beyza Ener hocam olmak üzere, tez çalışmamın araştırma ve yazma süreciyle her aşamasında bilgisi ve tecrübesinden faydalandığım Doç. Dr. İmran Sağlık hocama, Prof. Dr. Cüneyt Özakın, Prof. Dr. Harun Ağca, Doç. Dr. Oktay Alver, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki diğer hocalalarıma, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı ve İmmünoloji Ana Bilim Dalı'ndan değerli hocalarıma teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Trabzon'da 13.01.1993 tarihinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Trabzon'da tamamladıktan sonra 2011 yılında Haaacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde başladığım tıp eğitimimi 2018 senesinde tamamladım. Artvin Devlet Hastanesi'nde başladığım mecburi hizmet görevimi yaklaşık 6 ay sürdürdükten sonra 2019'da Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak başladım.