

Bufavirusun Çocuklar ve Erişkinlerdeki Viral Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarının Etiyolojisi Açısından Çok Merkezli Olarak Araştırılması*

Multicenter Investigation of Bufavirus in the Etiology of Viral Central Nervous System Infections of Adults and Children

Aylin ALTAY KOÇAK¹, Murat ÖCAL², Meltem POLAT^{3,4}, Saliha KANIK YÜKSEK⁴, Anıl AKTAŞ TAPISIZ³, Hasan TEZER^{3,4}, Aykut ÖZKUL⁵, Koray ERGÜNAY², Gülendam BOZDAYI¹, Kamruddin AHMED^{6,7,8}

¹ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

³ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

³ Gazi University Faculty of Medicine, Department of Child Health and Diseases, Ankara, Turkey.

⁴ Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, Ankara.

⁴ Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Training and Research Hospital, Clinic of Child Health and Diseases, Ankara, Turkey.

⁵ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara.

⁵ Ankara University Faculty of Veterinary, Department of Virology, Ankara, Turkey.

⁶ Malezya Sabah Üniversitesi, Tıp ve Sağlık Bilimleri Fakültesi, Patobiyoloji ve Tıbbi Tanı Anabilim Dalı, Kota Kinabalu, Malezya.

⁶ Department of Pathobiology and Medical Diagnostics, Faculty of Medicine and Health Sciences, University Malaysia Sabah, Kota Kinabalu, Malaysia.

⁷ Oita Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yufu, Japonya.

⁷ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Oita University, Yufu, Japan.

⁸ Oita Üniversitesi, Araştırma Destek Enstitüsü, Yufu, Japonya.

⁸ Research Promotion Institute, Oita University, Yufu, Japan.

* Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (Onay No. FON:12/05-5) ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (Onay No:341) onayı almış ve 19. Avrupa Klinik Viroloji Derneği Yıllık Toplantısı (19th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology) (14-17 Eylül 2016. Lizbon, Portekiz)'nda poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 21.02.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 07.04.2017

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Gülendam Bozdayı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

Tel (Phone): +90 312 202 6979, E-posta (E-mail): gbozdayi@hotmail.com

ABSTRACT

Bufavirus (BuV) is a newly-identified parvovirus in the family of Parvoviridae. Metagenomic analysis of fecal samples from children in Burkina Faso with acute diarrhea showed a highly divergent parvovirus, which was named bufavirus (BuV). The global distribution, epidemiology and genetic characteristics of BuVs infections are obscure. It was first discovered as an agent causing gastroenteritis but the association of BuV infections with various clinical presentations mostly remain to be explored. The aims of this study were to investigate probable impact of BuV in central nervous system infections in a region where it was previously reported to cause human infections and to detect enteroviruses (EV) which are reported as a cause of central nervous system infections in our country. The study was undertaken in three institutions in Ankara province, Central Anatolia, Turkey. Patients, clinically diagnosed with febrile disease and/or central nervous system infections of presumed viral etiology, were enrolled in the study with informed consent. Cerebrospinal fluid specimens were collected from 93 children attended to Gazi University Hospital and Dışkapı Yıldırım Beyazıt Hospital from October 2011-April 2015 and 33 adult patients, attended to Hacettepe University Hospital from June 2012 to March 2013. Clinical history and follow-up, physical examination and standard laboratory findings of the patients were recorded. Nucleic acid extraction was performed via commercially available spin-column assays and complementary DNA (cDNA) synthesis was performed by using commercially available cDNA synthesis kit with randomised hexamer primers. BuV detection was carried out by in house nested-polymerase chain reaction (PCR) utilized with previously-described primers. EV detection was carried out by in house PCR with pan-enterovirus primers. Seventy-four percent (93/126) and 26% (33/126) of the patients were children (0-18) and adults (19-86), respectively. In all patients, bacterial, mycobacterial and fungal cultures were negative, as well as PCR for herpes simplex virus (HSV) types 1 and 2. PCR results of all samples were negative for BuV and EV. This is the first study that evaluates a probable association of BuV and central nervous system infections. Although Parvovirus B19, a well-characterized human pathogen can rarely cause encephalitis, our findings did not confirm such an association for BuV in this preliminary investigation. However, long-term evaluation of individual cases with unknown etiology is required to reveal the relationship of the virus with specific environments.

Keywords: *Bufavirus; parvovirus; central nervous system infections.*

Sayın Editör,

Akut menenjit ve ensefalit (AME), nörolojik hasara ve ölüme yol açabilecek bir santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonudur. Enfeksiyona bakteriler, virüsler, mantarlar veya parazitler neden olabilmektedir. Dünya genelinde yılda 200.000 civarında viral ensefalit olgusu bildirilmektedir. AME etiyojisinde 100'den fazla virus tanımlanmıştır. Ancak, ensefalitin kesin etiyojisi çalışmaların çoğunda bulunamamaktadır¹. Günümüze kadar yapılan çalışmalar, *Parvoviridae* ailesindeki virüslerin çoğunun ensefalitle ilişkili olduğunu göstermektedir²⁻⁴.

Bufavirus (BuV) ise, Burkina Faso'daki ishalleri hastaların dışkılarında 2012 yılında tanımlanmış yeni bir parvovirustur. Kodlama bölgesindeki nükleik asit dizisi bilinen parvovirüsler ile < %31 benzerlik göstermiştir. *Parvoviridae* familyasındaki Protoparvovirus genusunda yer almaktadır. Tek zincirli DNA'sı ve BuV1, BuV2 ve BuV3 olmak üzere üç genotipi bulunmaktadır. BuV enfeksiyonlarının küresel dağılımı, epidemiyolojisi ve genetik özellikleri henüz tam olarak belirlenmemiştir⁵. Öncelikli olarak, gastroenterite neden olan bir ajan olarak düşünülen BuV enfeksiyonlarının, çeşitli klinik durumlar ile ilişkisi

ve neticeleri keşfedilmeyi beklemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada BuV'un daha önce insanlarda gastroenterite yol açtığı bildirilen bir bölgedeki SSS enfeksiyonlarındaki olası etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Çalışmamıza, Gazi Üniversitesi ve Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanelerinden Ekim 2011-Nisan 2015 ve Hacettepe Üniversitesi Hastanesinden Haziran 2012-Mart 2013 tarihleri arasında, viral ateşli hastalık ve/veya SSS enfeksiyonu tanısı almış hastaların beyin omurilik sıvısı (BOS) örnekleri alınmıştır. Bu çalışmada, çalışmanın geriye dönük olarak planlanması nedeniyle, dışkı örnekleri toplanmamıştır. Çalışma için ilgili kurumlardan Etik Kurul onayı alındı (Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, Onay No: FON: 12/05-5; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, Onay No: 341) ve tüm hasta yakınları "Aydınlatılmış Onam Formu" ile bilgilendirildi. BOS örneklerinden rutin olarak standart yöntemlerle yapılan kültürlerinde üremesi olanlar ve ilgili kurumda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile HSV tip 1 ve 2 tanısı dışlandıktan sonra etiyolojisi belirsiz toplam 126 örnek çalışmaya alınmıştır. Hastaların %74 (93/126)'ü çocuk (0-18), %26 (33/126)'sı yetişkin (18-96, ortalama 36.3, medyan 32) olan yaş gruplarına aitti ve %40 (51/126)'ı kadın, %60 (75/126)'ı erkek hastaydı. Nükleik asit izolasyonu için spin-kolon yöntemi içeren ticari bir kit (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Komplementer DNA (cDNA) sentezi için, randomize heksamerler ile RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, Japonya) kullanılmıştır. Örneklerde BuV DNA'sının varlığı, in-house nested-PCR yöntemi ile NS1 gen bölgesi hedef alınarak daha önce tasarlanan primerler ile incelenmiştir⁶. Amplifikasyonlar için PCR MasterMix (Promega Corporation, ABD) kullanılmıştır. Önceki çalışmamızdan⁷ elde ettiğimiz BuV pozitif örnekler (440 baz çifti) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. EV DNA varlığı panenterovirus primerleri kullanılarak in-house PCR yöntemi ile incelenmiştir. Amplifiye edilen hedef DNA'lar %2'lik agaroz jelde yürütülerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

BuV'un, Afrika, Bhutan, Hollanda, Tayland ve son olarak da Türkiye'de yapılan çalışmalarla ishal ile olan ilişkisi kanıtlanmıştır⁵⁻⁹. BuV ülkemizde ilk kez Ankara'da, ishalleri çocuklardan toplanan 583 dışkı örneğinin %1.4'ünde saptanmıştır⁷. Bu çalışmada da, aynı bölgedeki etiyolojisi belirlenememiş aseptik AME hastalarından toplanan BOS örneklerinde BuV araştırılmıştır.

Dünya genelinde, çeşitli tanı yöntemleri kullanılmasına rağmen, ensefalit olgularının %60-85'ine tanı konulamamaktadır². İnsanlarda tanımlanan ilk parvoviruslar; patojen olmayan, adeno-ilişkili viruslardır (AAV). Yakın zamana kadar, *Parvoviridae* ailesinden insanlarda hastalık yapan tek cins B19V olarak bilinmekteydi. Daha sonraları, insan bocavirus 1-4 (HBoV1-4), parvovirus 4 (PARV4) ve BuV cinslerinin de insan hastalıkları ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Parvovirus B19'un neden olduğu 5. hastalığı geçirmekte olanların, nadiren nörolojik semptomlara da sahip olduğu bilinmektedir ve parvovirus enfeksiyonunun ensefalit, menenjit, felç ve nöropati gibi çeşitli nörolojik komplikasyonlarla ilişkili olduğu bildirilmektedir¹⁰. Aynı şekilde bir diğer parvovirus olan HBoV'un ensefalite nasıl yol açığının mekanizması kesin olarak bilinmemektedir, ancak viremi yaptığı kanıtlanmıştır ve bu nedenle virusun kan beyin bariyerini geçebilme potansiyeli bulunduğu bilinmektedir².

BuV; *Parvoviridae* ailesinin en son bulunan üyesi olup, viral gastroenterit etiolojisinde rolü olduğu kesinleşmiştir. Ancak, üyesi olduğu ailenin başka klinik tablolar da gösterildiğinden esinlenerek^{5-7,10}, etiyojisi bulunamayan ensefalit olgularında rolü olup olmadığını araştırmayı hedeflediğimiz bu çalışmada, BuV pozitifliğine rastlanılamamıştır. Çalışılan örneklerde aynı zamanda EV pozitifliğine de rastlanılamamıştır. Bu durum, hasta sayımızdaki kısıtlılık ve konu ile ilgili başka çalışmaların olmaması nedeniyle tam olarak tarafımızca açıklığa kavuşturulamamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmaların tümü değerlendirildiğinde, *Parvoviridae* ailesinin ensefalit ile ilişkisinin sadece Parvovirus B19 ile sınırlı olmadığı ve bu aileye ait diğer üyelerin de ensefalit etkeni olabilecekleri gösterilmiştir. SSS'de parvovirus enfeksiyonu olasılığı, B19V'ye özgü klinik belirtilerin olmayıp nörolojik semptomların da görüldüğü hastalarda immün durum gözetilmeksizin araştırılmalıdır. Çalışmamız, BuV ve SSS enfeksiyonları arasındaki olası ilişkiyi değerlendiren ilk çalışmadır. *Parvoviridae* ailesinin ensefalit ile ilişkisinin gösterilmiş olması; bu ön çalışmada bizim bulgularımız BuV için böyle bir ilişkiyi doğrulamamış olsa bile, etiyojisi bilinmeyen olguların BuV açısından da değerlendirilmesi gerektiğini ekarte etmemektedir. Dolayısı ile BuV konusunda daha geniş hasta sayısı ile araştırmalar yapılarak konu aydınlığa kavuşturulabilir.

Anahtar sözcükler: *Bufavirus; parvovirus; santral sinir sistemi enfeksiyonları.*

KAYNAKLAR

1. Xie Y, Tan Y, Chongsuvivatwong V, et al. A population-based ccute meningitis and encephalitis syndromes surveillance in Guangxi, China, May 2007-June 2012. PLoS One 2015; 10(12): e0144366.
2. Mori D, Ranawaka U, Yamada K, et al. Human bocavirus in patients with encephalitis, Sri Lanka, 2009-2010. Emerg Infect Dis 2013; 19(11): 1859-62.
3. Prakash S, Jain A, Seth A, Singh AK, Jain B. Complete genome sequences of two isolates of human parvovirus 4 from patients with acute encephalitis syndrome. Genome Announc 2015; 3(1): e01472-14.
4. Barah F, Valley PJ, Chiswick ML, Cleator GM, Kerr JR. Association of human parvovirus B19 infection with acute meningoencephalitis. Lancet 2001; 358(9283): 729-30.
5. Yahiro T, Wangchuk S, Tshering K, et al. Novel genotype 3 human bufavirus from children with severe diarrhea in Bhutan. Emerg Infect Dis 2014; 20(6): 1037-9.
6. Phan TG, Vo NP, Bonkougou IJ, et al. Acute diarrhea in West African children: diverse enteric viruses and a novel parvovirus genus. J Virol 2012; 86(20): 11024-30.
7. Altay A, Yahiro T, Bozdayi G, et al. Bufavirus genotype 3 in Turkish children with severe diarrhoea. Clin Microbiol Infect 2015; 21(10): 965.
8. Smits SL, Schapendonk CME, van Beek J, et al. New viruses in idiopathic human diarrhea cases, the Netherlands. Emerg Infect Dis 2014; 20(7): 1218-22.
9. Chieochansin T, Vutithanachot V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Bufavirus in fecal specimens of patients with and without diarrhea in Thailand. Arch Virol 2015; 160(7): 1781-84.
10. Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human parvoviruses. Clin Microbiol Rev 2017; 30(1): 43-113.