



**T.C.**  
**BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**İstanbul'daki El Ayak Ağız Hastalığı Vakalarında**  
**Coxsackievirus A6 ve Coxsackievirus A16'nın Saptanması**

Dr. Ayşe Nur CEYLAN

(Uzmanlık Tezi)

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ

**İstanbul**

**2017**



## **TEŞEKKÜR**

Öncelikle asıl olarak iyi bir hekim olmamızı hedefleyen Atatürk Üniversitesi Tıp Fakóltesi 'ndeki değerli hocalarıma; uzmanlık eğitimimde ellerinden geldiğince yardımcı olan ve her soruma güler yüzle ve istekle cevap veren değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ ve Yrd. Doę. Dr. Bilge SÜMBÜL GÜLTEPE 'ye teşekkür ederim.

Bu güne kadar hayatımın her döneminde yardımlarını eksik etmeyen, ihtiyaç duyduğum her anda yanımda olan değerli annem Asiye Belkız BOZGEYİK ve babam Mustafa BOZGEYİK 'e, bu eğitim sürecinde maddi ve manevi zorlandığım her anda yanımda olan ve motive olmamı sağlayan canım ablama, yoğun tez yazma sürecinde yanımda olan ve çocuklarımla sevgiyle ilgilenerek bana destek olan kayınvalidem Meral CEYLAN 'a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalar sırasında bana sürekli destek olan çalışma arkadaşım Öğr. Gör. Elif KARAASLAN ve kayınbiraderim Öğr. Gör. Dr. Hamid CEYLAN 'a teşekkür ederim.

Asistanlık sürecimin tamamında her gün bana destek olan, çocuklarımızla en az benim kadar ilgilenen hayat arkadaşım Hasan Hüseyin CEYLAN 'a; günlerimizi neşelendiren zaten zor olan meslek hayatımızda bizi daha da yıpratmayan sevimli oğullarım Muhsin ve Ahmet Numan 'a teşekkür ederim.

**Dr. Ayşe Nur CEYLAN**

## ÖZET

El Ayak Ağız Hastalığı (EAAH) akut, febril, döküntülü bir hastalıktır. Döküntüler sıklıkla ağız içinde, el ayası ve ayak tabanında görülür. Hastalık genellikle selim seyirlidir ve tedavi gerektirmeden iyileşir. Sporadik olarak görülmekle birlikte, salgınlara da sebep olabilir. Salgınlar sırasında asıl etkilenenler 5 yaşın altındaki çocuklardır. En sık görülen etkenler enterovirus A71 (EV-A71) ve coxsackievirus A16 (CV-A16) olmasına rağmen diğer enterovirüsler de EAAH 'na sebep olabilir.

Türkiye'de EAAH ile alakalı yayınlanmış çalışmalar vardır, fakat bu çalışmalar hastalık demografisine odaklanmıştır ve klinik tanıyla ilgilidir. Çalışmalarda etkenin kesin tespiti yapılmamıştır.

Bu çalışmada EAAH şüpheli hastalarda virolojik ve moleküler yöntemlerle etkenin belirlenmesi amaçlanmıştır. Buna yönelik olarak, 2015-2017 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Pediatrik Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği'ne döküntü şikâyetiyle başvuran EAAH şüpheli hastaların cilt lezyonlarından alınan 27 sürüntü örneği çalışmaya dâhil edilmiştir. Alınan örnekler viral kültür amacıyla Vero hücrelerine inoküle edilmiş ve sitopatik etkiler gözlemlenmiştir. Sürüntü materyali ve kültür sıvılarından ekstrakte edilen RNA örneklerinden yapılan reverse-transkripsiyona eklenmiş polimeraz zincir reaksiyonu (RT\_PCR) ile pan-enterovirüs, CV-A16, coxsackievirus A6 (CV-A6) ve EV-A71'e özgü genetik materyal araması gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon ürünleri ayrıca sekanslanarak viral tiplendirmesi yapılmıştır. Hastalardan alınan 27 sürüntü örneğinin 19 'unda PCR ile *Enterovirus* tespit edilmiştir. *Enterovirus* tespit edilen 19 örneğin sekanslama sonucununun 15 'i CV-A6 ve 4 'ü CV-A16 ile uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışma, ülkemizdeki EAAH'nın etyolojisinde CV-A6 'nın baskın serotip olduğunu, bu serotipin CV-A16 tarafından takip edildiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmanın bulguları, son yıllarda yayınlanan CV-A6 'nın EAAH etkeni olarak baskın serotip olduğunu gösteren çalışmaların, doğrulanması olarak değerlendirilmektedir. Ancak, bu çalışmanın tüm ülkeyi temsil etmeyebileceği de göz önüne alınmalıdır. Benzer çalışmaların örnek sayısı artırılarak ve çok merkezli temelde gerçekleştirilmesi tavsiye edilebilir.

Anahtar kelimeler: El ayak ağız hastalığı, *Enterovirus*, coxsackievirus A6, coxsackievirus A16, enterovirus A71

## ABSTRACT

Hand Foot Mouth Disease (HFMD) is an acute, febrile and exanthematous disease. Rashes usually occur inside the mouth, palm and the sole. The disease is generally benign and heals without requiring treatment. While occurring sporadically, it may also cause epidemics. Those primarily affected by the epidemics are children under the age of 5. The most frequent agents are enterovirus A71 (EV-A71) and coxsackievirus A16 (CV-A16); however, other enteroviruses may also cause HFMD.

There are published studies in Turkey dealing with HFMD, but these studies focused on disease demography and relate to clinical diagnosis. They did not definitively determine the agent underlying the disease.

This study aimed to determine the underlying agent in HFMD suspected patients via virological and molecular methods. To that end, 27 vesicle samples were obtained from skin lesions of HFMD suspected patients complaining of rash who consulted with Bezmialem Vakıf University, Faculty of Medicine Hospital, Polyclinic of Pediatric Infection Diseases between 2015 and 2017. The samples taken were inoculated with Vero cells for viral culture and cytopathic effects were observed. Genetic material specific to pan-enterovirus, CV-A16, coxsackievirus A6 (CV-A6) and EV-A71 was searched by means of polymerase chain reaction (RT\_PCR) articulated onto the reverse transcription conducted with the RNA samples extracted from the vesicle material and culture fluids. Viral typing was performed by separately sequencing the amplification products. *Enterovirus* was detected with PCR in 19 out of 27 samples obtained from the patients. Out of the 19 samples in which *Enterovirus* was found, the sequencing result of 15 samples was found to conform to CV-A6 and that of 4 samples was found to conform to CV-A16.

In conclusion, this study revealed that CV-A6 is the dominant serotype in HFMD etiology in our country and that this serotype is followed by CV-A16. According to the study is interpreted as confirmation of the recently published studies showing that CV-A6 is the dominant serotype as the agent underlying HFMD. However, it should also be taken into consideration that this study may not represent the entire country. It is recommended that similar studies with larger sample sizes and based on multiple centers should be carried out.

Key words: Hand Foot Mouth Disease, *Enterovirus*, coxsackievirus A6, coxsackievirus A16, enterovirus A7

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
RESİMLER LİSTESİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Enterovirüsler	2
2.1.1 Taksonomi	2
2.1.2 Genel özellikler	3
2.1.3 Fiziksel özellikler	4
2.1.4 Viral yapı	4
2.1.5 Yaşam döngüsü ve replikasyon	7
2.1.6 Patogenez	7
2.1.7 Epidemiyoloji	8
2.2 Non-Polio Enterovirüslerle İlişkili Klinik Durumlar	8
2.2.1 Nonspesifik febril hastalık	9
2.2.2 Solunum yolu hastalıkları	9
2.2.3 Göz hastalıkları	9
2.2.4 Miyokardit ve perikardit	10
2.2.5 Gastrointestinal ve genitoüriner hastalıklar	10
2.2.6 Nörolojik hastalıklar	10
2.2.7 Miyozit ve artrit	11
2.2.8 Neonatal infeksiyonlar	11
2.2.9 Transplant ve malignite hastaları	12
2.2.10 Herpanjina (HA)	12
2.2.11 El ayak ağız hastalığı (EAAH)	13

3. MATERYAL METOD	33
3.1 Hasta seçimi	33
3.2 Örneklerin alınması ve saklanması	36
3.3 Hücre kültürü	37
3.4 RNA izolasyonu	37
3.5 Revers transkripsiyon	37
3.6 Clean-up (Saflaştırma)	37
3.7 Primerlerin tasarlanması	37
3.8 PCR ve jel elektroforezi	39
3.9 Sanger sekanslama	39
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
7. KAYNAKLAR	53
8. ÖZGEÇMİŞ	58

## **SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ**

Coxsackievirus A6	: CV-A6
Coxsackievirus A10	: CV-A10
Coxsackievirus A16	: CV-A16
El Ayak Ağız Hastalığı	: EAAH
Enterovirus A71	: EV-A71
Enterovirus D68	: EV-D68
Herpanjina	: HA

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1. Enterovirüslere ait bazı tür ve serotipler
- Şekil 2. EV-A71'in yapısı
- Şekil 3. EV-A71 kapsidinin üç boyutlu çizimi
- Şekil 4. Dünya Sağlık Örgütü'ne üye ülkelerin bölgesel olarak sınıflaması
- Şekil 5. Batı Pasifik Bölgesi
- Şekil 6. EV-A71'in üç genogrubunu (genogrup A,B,C) içeren bir filogenetik ağaç
- Şekil 7. Asya Pasifik Bölgesi'ndeki çeşitli ülkelerde sirküle olan EV-A71'in farklı subgenogruplarının zamansal dağılımı
- Şekil 8. EAAH/HA için vaka yönetim algoritması
- Şekil 9. Çalışmaya alınan çocukların kız erkek sayıları
- Şekil 10. Çalışmaya alınan çocukların yaş(yıl) dağılımı
- Şekil 11. Çalışmaya alınan EAAH tanılı çocukların aylara göre dağılımı
- Şekil 12. PCR Ürünlerinin CV-A6 ile uyumlu sekans verileri
- Şekil 13. PCR Ürünlerinin CV-A16 ile uyumlu sekans verileri
- Şekil 14. 2011-2012 yılları arasında Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde tanısı konulan EAAH vakalarının aylara göre dağılımı

## **TABLolar LİSTESİ**

- Tablo 1. PCR için kullanılan primerler
- Tablo 2. Çin'in Linyi kentinde meydana gelen EAAH salgınlarındaki etyolojik dağılım
- Tablo 3. Son yıllarda görülen CV-A6 etkenli EAAH salgınları

## RESİMLER LİSTESİ

- Resim 1. EV-D68'in elektron mikroskopik görüntüsü
- Resim 2. El içi, ayak tabanı ve dilde veziküler döküntüler
- Resim 3. Diz ve dirseklerde EAAH döküntüleri
- Resim 4. Onikomadezis
- Resim 5. Elde EAAH döküntüleri
- Resim 6. Dilde ve ağız çevresinde EAAH döküntüleri
- Resim 7. Elde ve kolda EAAH döküntüleri
- Resim 8. Yüzde EAAH döküntüleri
- Resim 9. Bacakta EAAH döküntüleri
- Resim 10. İnfekte olmayan (A) ve *Enterovirus* ile infekte olan Vero hücreleri (B)
- Resim 11. Nested PCR'in pan-EV outer primerleriyle yapılan ilk basamağı. A; 100 bp'lik marker, B; 530 bp'lik amplifikasyon ürünleri
- Resim 12. Nested PCR'in pan-EV inner primerleriyle yapılan 2. basamağı. A; 100 bp'lik marker, B; 389 bp'lik amplifikasyon ürünleri
- Resim 13. CV-A6 primerleriyle amplifikasyonu sağlanan PCR ürünlerinin %1,5 agaroz elektroforezinde görünümü. A; 100 bp'lik marker, B; 389 bp'lik amplifikasyon ürünleri

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

El ayak ağız hastalığı (EAAH) enterovirüslerin etken olduğu akut, febril, döküntülü bir hastalıktır. Sıklıkla ağız içinde, el ayası ve ayak tabanında görülen döküntüler maküler, papüler veya veziküler nitelikte olabilir. Hastalık genellikle selim seyirlidir ve tedavi gerektirmeden kendiliğinden iyileşir[1, 2].

Sporadik olarak görülmekle birlikte, EAAH salgınlara da sebep olur. Salgınlar sırasında asıl etkilenenler 5 yaşın altındaki çocuklardır. En sık görülen etkenler enterovirus A71 ve coxsackievirus A16'dır[1, 3].

Hastanemize başvuran EAAH şüpheli çocukların döküntülerinden alınan sürüntü örneklerinde etkeni tespit etmeyi amaçladık. Çünkü dünya çapında yapılmış çok sayıda çalışma olmasına rağmen ülkemizde EAAH etkenini belirlemeye yönelik tespit edebildiğimiz hiçbir yayınlanmış çalışma yoktu.

Bu çalışmadan elde edilen veriler ülkemizde hangi *Enterovirus* serotiplerinin EAAH'na sebep olduğunu belirlemeye yardımcı olacaktır. EAAH epidemiyolojisi açısından dünya literatürüne ülkemiz adına katkı sağlanacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

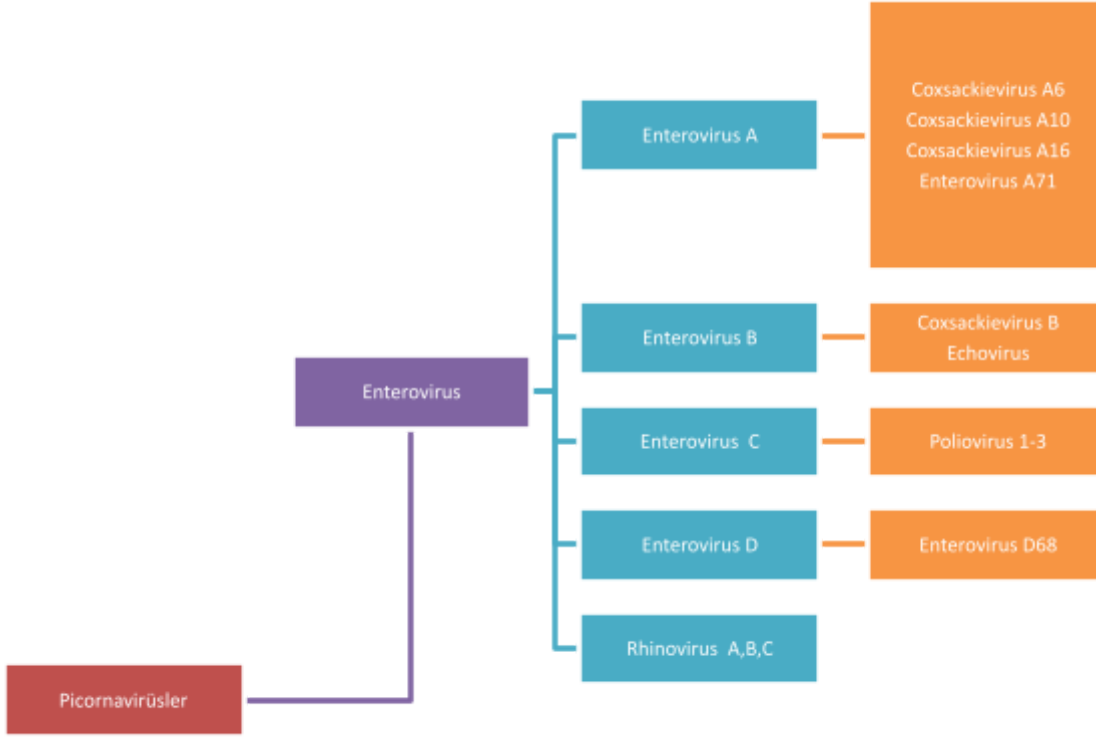
### 2.1 Enterovirüsler

#### 2.1.1 Taksonomi

*Picornaviridae* küçük RNA virüslerinden oluşan bir virüs ailesidir. Bu ailede 35 cins ve bu cinslerin altında 80 tür bulunmaktadır[4]. *Picornaviridae* ailesindeki cinslerden bazıları, *Rhinovirus*, *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Cardiovirus* ve *Aphthovirus*'tur. 2005 yılından itibaren *Rhinovirus*, *Enterovirus* cinsi içerisinde sınıflandırılmaktadır[5].

İnsanlarda ve deney hayvanlarındaki patojenite ve doku kültüründeki sitopatik etkilerine bakılarak insan enterovirüsleri geleneksel olarak dört sınıfa ayrılmıştır ve bu altgruplar; poliovirüsler (üç serotip), coxsackievirus A(CV-A) (23 serotip), coxsackievirus B(CV-B) (altı serotipler) ve echovirüsler (28 serotip)'dir. Bununla birlikte, bu sistemin sınırlamaları sebebiyle, 1970 yılından itibaren izole edilen serolojik olarak farklı insan enterovirüsleri, serotip sayıları ile belirlenmiştir, enterovirus A71(EV-A71) gibi. İnsan enterovirüslerinin orijinal sınıflaması, virüslerin moleküler ve biyolojik özelliklerine dayalı bir taksonomik şema ile oluşturulmuştur[6].

*Enterovirus* cinsi içerisinde 13 tür bulunur. Bunlar *EnterovirusA-J* ve *Rhinovirus A-C*'dir[4]. Enterovirüslere ait bazı türler ve serotipler Şekil-1'de gösterilmiştir. En çok çalışılan ve en iyi bilinen *Enterovirus* poliovirüstür ve parolitik polio hastalığının etkenidir. Coxsackievirusler ilk izole edildikleri yer olan New York'un Coxsackie bölgesinden isimlerini almışlardır. Echovirüslerin (echo: enteric cytopathic human orphan) başlangıçta klinik hastalıklarla ilişkisi anlaşılamamıştır.



Şekil 1. Enterovirüslere ait bazı tür ve serotipler

### 2.1.2 Genel özellikler

Enterovirüsler, aside (pH:3) direnç, optimum çoğalma sıcaklığı, bulaş şekli ve oluşturdukları hastalıklar açısından rhinovirüslerden ayrılmaktadırlar[5]. Rhinovirüsler soğuk algınlığının en sık görülen etkenleridir. Asidik pH'ya duyarlı olmaları ve 33<sup>0</sup>C'den yüksek sıcaklıklarda zayıf üremeleri sebebiyle oluşturdukları infeksiyonlar üst solunum yolunda sınırlı kalmaktadır [2, 3]. Belirli bir *Enterovirus* serotipi farklı hastalıklara sebep olabildiği gibi, bir hastalığı farklı *Enterovirus* serotipleri de oluşturabilmektedir. Enterovirüslerin kapsidleri kanalizasyonlar gibi zorlu çevresel şartlara ve gastrointestinal sisteme dayanıklıdır; bu özellikleri fekal-oral bulaşı kolaylaştırmaktadır. Gastrointestinal kanalda infeksiyon oluşturmalarına rağmen nadiren enterik hastalığa yol açarlar ve infeksiyonların çoğu asemptomatiktir[5].

### 2.1.3 Fiziksel özellikler

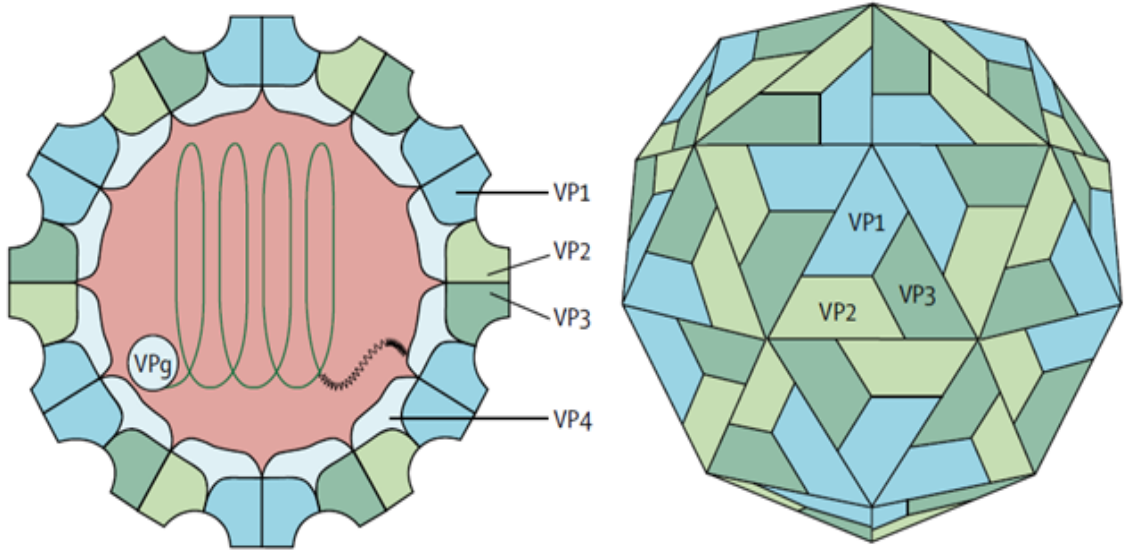
Bir lipid zarfının olmaması, insan enterovirüslerine gastrik asit de dâhil olmak üzere konak ortamında stabilite sağlar, birkaç gün boyunca oda sıcaklığında hayatta kalabilirler. Enterovirüsler organik çözücülere (örn. eter ve kloroform), alkole ve donmaya karşı dayanıklıdır, ancak 56 °C'nin üzerindeki sıcaklıklar, klorlama, formaldehit ve ultraviyole ile inaktive edilebilirler[6].

### 2.1.4 Viral yapı

Enterovirüsler 30 nm yarıçapında pozitif iplikli küçük RNA virüsleridir ve zarfları yoktur. RNA ikozahedral yapıda bir kapsid ile çevrilidir (Resim 1). Kapsidin 12 köşesinde pentamerler bulunur, her bir pentamer 5 protomerin birleşmesinden meydana gelir. Protomerleri VP1, VP2, VP3 ve VP4 isimli yapısal proteinler oluşturur (Şekil 2,3). VP1 kapsidin major proteinidir, VP1 proteinini kodlayan gen bölgesi enterovirüslerin moleküler tiplendirilmesinde en sık kullanılan hedef gen bölgesidir. VP2 ve VP4 ise öncül molekül olan VP0'ın kesilmesiyle oluşur. VP4 kapside sert bir yapı kazandırır ve genomun kapsid içine yerleşmesinden sonra viriona katılır. [5, 7, 8].

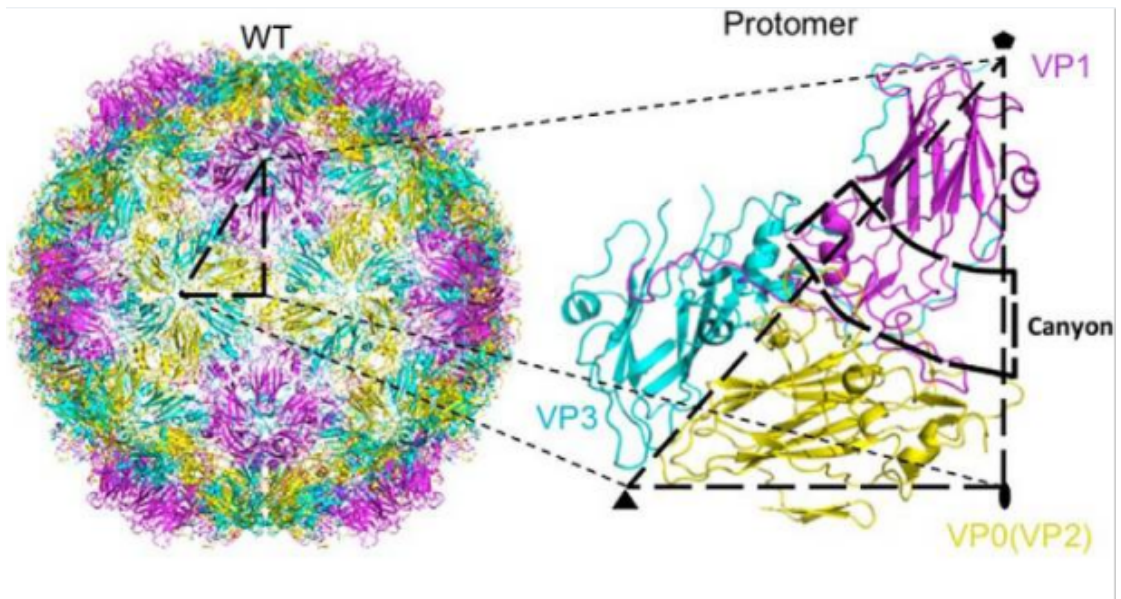
Enterovirüslerin genomu mRNA'ya benzer. 7200-8450 baz içeren pozitif polariteli tek iplikli bir moleküldür. Genomun 3' ucunda poli A (poliadenozin) ve 5' ucunda VPg isimli küçük bir protein bulunur. Poli A RNA'nın infektivitesini artırırken, VPg genomun paketlenmesi ve RNA sentezinin başlamasında rol oynar. Çıplak genomun hücreye verilmesi enfeksiyon oluşumu için yeterlidir[5].

Genom tarafından kodlanan poliprotein, enzimatik olarak kesilerek virüsün yapısal ve enzimatik proteinlerini oluşturur. Enterovirüsler; kapsid proteinleri, VPg, RNA bağımlı RNA polimeraz ve en az iki proteaz kodlarlar[5].



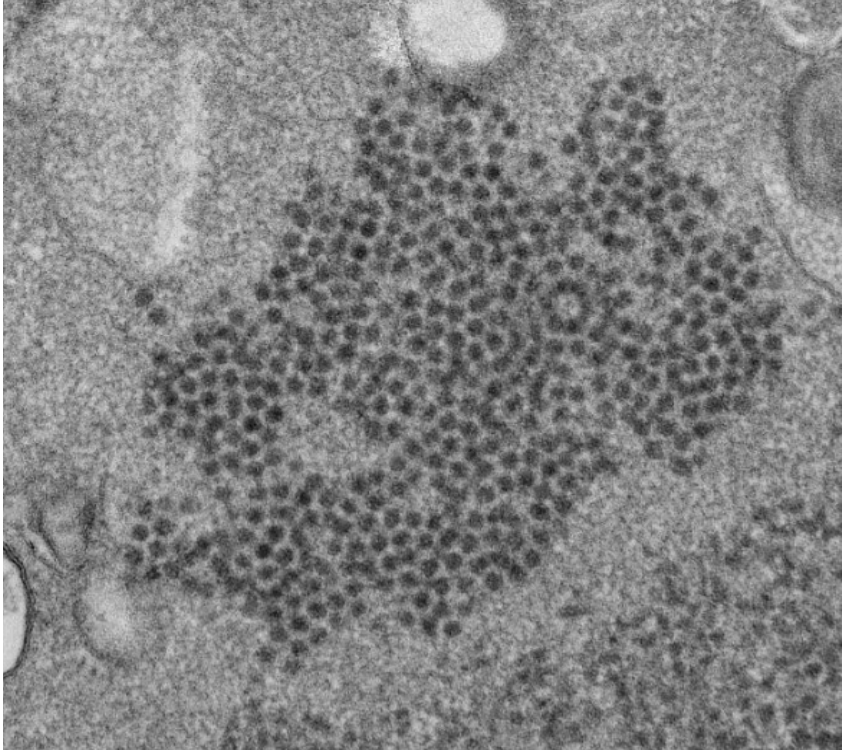
**Şekil 2. EV-A71'in yapısı**

\*Solomon, T., et al., Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus A71. The Lancet infectious diseases, 2010. 10(11): p. 778-790.



**Şekil 3. EV-A71 kapsidinin üç boyutlu çizimi**

\*Lyu, Ke, et al., Crystal structures of enterovirus A71 (EV-A71) recombinant virus particles provide insights into vaccine design. Journal of Biological Chemistry 290.6 (2015): 3198-3208.



**Resim 1. Enterovirus D68'in elektron mikroskopik görüntüsü**

\*Goldsmith C. S. , Enterovirus D68 (EV-D68) Photos.  
<https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/resources-ev68-photos.html>, 2017

### 2.1.5 Yaşam döngüsü ve replikasyon

Duyarlı hücreye virüs girişi spesifik reseptörlere bağlıdır. Spesifik reseptörlerden bazıları, poliovirüs reseptörü (CD155), üç integrin ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha \nu\beta 3$  ve  $\alpha \nu\beta 6$ ), yıkım hızlandırıcı faktör (CD55), coxsackievirus-adenovirus reseptörü ve hücre içi adezyon molekülü 1(ICAM-1)'dir[6].

Bir *Enterovirus*, hücre yüzeyi üzerinde spesifik bir reseptörle bağlandıktan sonra, virüs kapsidinde bir dizi yapısal değişiklik meydana gelir, VP4 yapıdan ayrılır ve virion zayıflar. Virionun köşesinde VP1 proteininin oluşturduğu kanal boyunca viral genom ilerler ve hücre yüzeyinde oluşan porlardan RNA'nın sitoplazmaya geçişi sağlanır[5, 6].

Pozitif iplikli viral RNA, sitoplazmaya girince mRNA olarak davranır ve tüm viral protein dizilerini içeren tek bir poliprotein kodlanır. Bu poliprotein kendi içinde kodlanan proteazlarla kesilerek yapısal olan ve olmayan 11 adet proteine parçalanır. Kesim sonucunda oluşan RNA bağımlı RNA polimeraz negatif iplikli bir kalıp RNA sentezler, bu sentezlenen RNA yeni mRNA/genom sentezinde kalıp görevi görür[5, 6].

Viral genomun replikasyonu devam ederken, proteazlar poliproteinleri keser ve VP0, VP1 ve VP3 yapısal proteinleri oluşturulur. Bu üç yapısal protein birleşerek alt üniteleri oluşturur. Beş alt ünitenin toplanmasıyla pentamer, 12 pentamerin toplanmasıyla prokapsid meydana gelir. Genom prokapsid içine yerleştirildikten sonra VP0'nun kesilmesiyle VP2 ve VP4 oluşturulur ve kapsid tamamlanmış olur. Her hücrede 100.000 kadar virion oluşabilir ve bu virionlar hücrenin lizisi sonucu salınır. Tüm replikasyon döngüsü 3-4 saat kadar kısa bir sürede tamamlanabilir [2].

### 2.1.6 Patogenez

Enterovirüsler mide asidine ve safraya dayanıklıdır. Virüsün replikasyonu farenks mukozası ve tonsiller dokuda başlar, sonrasında ilerleyerek Payer plaklarındaki M hücreleri ve lenfositleri infekte eder. Dışkı ile uzun süre atılabilirler. Primer viremide retikuloendotelial sisteme yayılır, bu bölgelerde virüsün replikasyonundan sonra sekonder viremi oluşur ve hastalık semptomları gelişir[5].

Enterovirüslerin çoğu infekte ettikleri hücrede hücresel RNA ve protein sentezini inhibe ederler. Viral mRNA, protein sentezinde kullanılan faktörler için hücresel mRNA ile

yarışabilir. Bu olaylar hedef hücrede sitopatik etki oluşmasına neden olur. İnfekte olan hedef doku gelişecek hastalığı belirler. Konağın verdiği immün cevaptan ziyade virüsün patolojik etkileri hastalığın oluşumundan sorumludur [5].

### **2.1.7 Epidemiyoloji**

*Enterovirus* infeksiyonları sık görülür ve tüm dünyada yaygındır. Sporadik hastalıklar tüm yıl boyunca görülebilmesine rağmen ılıman iklimlerde yaz ve sonbahar aylarında salgınlar artar. Tropik bölgelerde hastalık yıl boyunca benzer oranlarda görülür. Hastalığın sıklığı ve ciddiyeti; küçük yaş, erkek cinsiyet, çocuklarla temas, kötü hijyen, kalabalık ortam ve düşük sosyoekonomik durumlarda artar. Semptomatik infeksiyonların %25'inden fazlası 1 yaşından küçük çocuklarda görülür. Anne sütüyle beslenme, *Enterovirus* spesifik antikörlerin anne sütüyle geçmesinden dolayı infeksiyon riskini düşürür.

İnfeksiyon genellikle kişiden kişiye bulaş şeklinindedir, fekal-oral ve respiratuvar yolla olur. Bulaş aile içinde, bakım evlerinde, çocuk parklarında, yaz kamplarında, yetimhane ve hastane bakımı sırasında görülebilir[1].

Birçok ülkede epidemilere neden olan echovirus salgınları (sıklıkla echovirus 4, 6, 9, 13 ve 30); Asya ve Avustralya'da enterovirus A71 nedenli merkezi sinir sistemi ve/veya kardiyopulmoner hastalıkla seyredabilen el ayak ağız hastalığı (EAAH) salgınları; ABD ve İngiltere'de coxsackievirus A6 nedenli atipik EAAH salgınları; ABD, Avrupa ve Asya'da solunum problemi ve muhtemel akut flaks paraliziye sebep olan enterovirus D68 (EV-D68) salgını; tropik ve sıcak bölgelerde enterovirus D70, coxsackievirus A24, ve coxsackievirus A24 varyantı nedenli akut hemorajik konjonktivit salgınları; ve toplum kaynaklı üveit salgınları bildirilmiş *Enterovirus* salgınlarındandır[1].

## **2.2 Non-Polio Enterovirüslerle İlişkili Klinik Durumlar**

Enterovirüslerin sebep olduğu hastalıklar çok çeşitlilik gösterir. Çoğunlukla asemptomatik, tanımlanamayan ateş veya respiratuvar hastalık şeklinde seyreder. Daha az sıklıkla meningoensefalit, miyokardit ve neonatal sepsis gibi ciddi hastalıklara da yol açabilirler. Semptomatik hastalık küçük çocuklarda daha yaygındır[1].

### 2.2.1 Nonspesifik febril hastalık

Özellikle bebek ve küçük çocuklarda en sık görülen klinik durumdur. Hastalık genellikle ani başlar halsizlik, huzursuzluk ve 38,5-40°C ateş görülür. İştahsızlık, diyare, bulantı, kusma, döküntü, boğaz kızarıklığı, baş ağrısı gibi semptomlar da görülebilir. Ateş ortalama 3 gün sürer ve genelde bifaziktir. Beyaz küre de dâhil olmak üzere rutin laboratuvar testleri genellikle normaldir. Hastalık yaklaşık bir haftada geçer.

*Enterovirus* infeksiyonları maküler, makülopapuler, ürtikeryal, veziküler ve peteşiyal gibi değişik cilt döküntüleriyle seyredebilir. Genellikle cilt bulgularının görülme sıklığı yaşla ters orantılıdır. Cilt bulguları sıklıkla echovirus 9, 11, 16, 25; coxsackievirus A 2, 4, 6, 9, 16; coxsackievirus B 3-5 ve enterovirus A71 ile ilişkilidir[1].

### 2.2.2 Solunum yolu hastalıkları

Boğaz ağrısı ve burun akıntısı *Enterovirus* hastalıklarında sıklıkla görülebilir. Hırıltılı solunum, astımın şiddetlenmesi, apne, pnömoni, otitis media, bronşiyolit, krup, parotit ve faringotonsillit de görülebilen bulgulardır. Plörodinya (Bornholm hastalığı) coxsackievirus B ve echovirusler tarafından oluşturulan, epidemilere de sebep olabilen paroksizmal göğüs ağrısıyla seyreden bir hastalıktır. Enterovirus A71 ensefalitiyle birlikte hayatı tehdit eden pulmoner ödem ve hemorajiler görülebilir[1].

2014 yılının Ağustos ayında Missouri ve Illinois'teki iki ayrı hastanede önceki yıllarda bu aylarda görülme sıklığından fazla sayıda çocukta ciddi solunum yolu hastalığına rastlanmıştır. Bu ciddi vakaların etkeni araştırıldığında çoğunda EV-D68'e rastlanmıştır. O yılın Eylül ayına kadar dört farklı eyalet de eklenmek üzere toplam 82 vakada EV-D68 tespit edilmiş ve bu vakaların hiçbiri ölümle sonuçlanmamıştır. 2015 ve 2016 yıllarında ise ABD'de 2014 yılındaki gibi artmış bir EV-D68 prevalansı görülmemiştir[9, 10].

### 2.2.3 Göz hastalıkları

Akut hemorajik konjonktivit epidemilerinde etken genellikle enterovirus D70 ve coxsackievirus A24'tür. Bulaşta el-göz kontağı önemlidir. Sıklık okul çağındaki çocuklar, 20-50 yaş aralığındaki erişkinlerde artar. Ciddi göz ağrısıyla birlikte ışığa hassasiyetin

yanında, göz yaşarması, konjonktivada kızarıklık gibi başka bulgular da görülebilir. İyileşme 1-2 haftada tamamlanır. Epidemik veya sporadik üveitlerde etken genellikle enterovirus 11 ve 19'dur[1].

#### **2.2.4 Miyokardit ve perikardit**

Etkeni belirlenmiş perikardit ve miyokarditlerin %25-30'undan enterovirüsler sorumludur. En sık etken coxsackievirus B'dir, daha az sıklıkla coxsackievirus A ve echovirus de etken olabilir. Adolesanlar ve genç erişkinler, özellikle erkekler daha çok etkilenir. *Enterovirus* miyokarditinin akut mortalite oranı %0-4'tür. Bazen kronik kardiyomiyopati, inflamatuvar ventriküler mikroanevrizmalar ve konstruktif perikardit gelişebilir. Enterovirüslerin kalp transplantasyonu, miyokardiyal infarktüs, endokardit ve peripartum kardiyomiyopati gibi geç ortaya çıkan kardiyak etkileri de görülebilir[1].

#### **2.2.5 Gastrointestinal ve genitoüriner hastalıklar**

Kusma, diyare ve abdominal ağrı gibi semptomlar siktir fakat genellikle dominant değildir. Kreş salgınları sırasında prematüre bebeklerde diyare, hematokezya, pnömatozis intestinalis ve nekrotizan enterokolit görülebilir. Yeni doğanlarda ciddi hepatit ve pankreatite yol açabilir. Coxsackievirus B kabakulak virüsünden sonra ikinci en sık orşit etkenidir[1].

#### **2.2.6 Nörolojik hastalıklar**

Kabakulak aşısı yapılmış toplumlarda, etkeni belirlenmiş viral menenjitlerin %90'ından fazlasından enterovirüsler sorumludur. Menenjitler özellikle 3 yaşın altındaki çocukları ve bebekleri etkiler. İlişkili olan serotipler coxsackievirus B 2-5; echovirus 4, 6, 7, 9, 11, 13, 16, 30; enterovirus 70-71'dir. Bebek ve küçük çocuklarda görülen vakalar genelde hafif seyirlidir ve spesifik belirti ve bulgular yoktur. Bir-iki yaşın üstü çocukların yarısından fazlasında ense sertliği vardır. Bazı vakalar bifaziktir ve birkaç gün süren ateş ve nonspesifik bulgular görülür ve bundan birkaç gün sonra meningeal bulgularla birlikte ateş görülür. Üç-dört günde ateş düzelir, diğer bulguların düzelmesi bir haftayı bulur. Beyin omurilik sıvısı

bulguları arasında pleositoz (genellikle <500, ancak bazen 1.000-8.000 WBC/ $\mu$ L, çoğunlukla mononükleer hale gelmeden önce ilk 48 saatte ağırlıklı olarak polimorfonükleer hücreler) bulunur; normal veya biraz düşük glikoz seviyesi (%10 <40 mg/dL); normal veya hafif artmış protein seviyesi (genellikle <100 mg/dL) vardır. Küçük çocukların yaklaşık %10'unda komplikasyon gelişebilir, çocukların çoğunda prognoz iyidir[1].

Ensefalitlerde etken tanımlaması yapılan vakaların %10-20'sinden fazlasından enterovirüsler sorumludur. Sıklıkla ilişkili serotipler echovirus 3, 4, 6, 9, 11; coxsackievirus B 2, 4, 5; coxsackievirus A9 ve enterovirus A71'dir.

Nörolojik rahatsızlıklar, EV-A71'in Asya ve Avustralya'daki yeni epidemilerinde ve daha az oranda CV-A16 hastalığında göze çarpar. Gerçekleşen bu salgınlarda etkilenen çocukların çoğunluğunda EAAH, bazılarında ise herpanjina (HA) vardır ve diğerlerinde mukokutanöz bulgular görülmemiştir. Beş yaşından küçük çocuklarda, özellikle 1 yaşın altındaki çocuklarda yüksek ölüm oranları bildirilmiştir[1].

EV-D70; EV-A71; CV-A7,24;CV-B; birkaç echovirus ve muhtemelen EV-D68 dâhil olmak üzere çeşitli nonpolio enterovirüsler spinal kord anterior boynuzu tutulumu nedeniyle motor zayıflıkla birlikte poliomyelit benzeri akut flask felce sebep olabilir[1].

### **2.2.7 Miyozit ve artrit**

*Enterovirus* infeksiyonlarında miyalji sık görülür. Sık olmamakla birlikte rabdomiyoliz, kaslarda şişlik, fokal miyozit ve polimiyozit raporlanmıştır. *Enterovirus* ile infekte hipogammaglobulinemik hastalarda dermatomiyozit benzeri sendrom ve artrit görülebilir. Normal insanlarda *Enterovirus* ilişkili artrit nadirdir[1].

### **2.2.8 Neonatal infeksiyonlar**

Yenidoğan infeksiyonları nispeten sık görülür ve *Enterovirus* hastalıklarının insidansı yenidoğanın herpes simplex virus, cytomegalovirus ve B grubu streptokok hastalığı ile benzer veya daha fazladır. İnfeksiyon sıklıkla CV-B2-5 ve echovirus 6, 9, 11, 19 tarafından oluşturulur.

Yenidoğan infeksiyonu asemptomatikten (çoğunlukla) benign ateşli hastalığa ve ağır multisistem hastalığına kadar değişebilir. Sık karşılaşılan bulgular arasında ateş veya hipotermi, iritabilite, letarji, iştahsızlık, döküntü (genellikle makülopapüler, bazen peteşik veya papüloveziküler), sarılık, apne, hepatomegali, abdominal distansiyon, kusma, diyare bulunur.

Şiddetli neonatal hastalığın komplikasyonları arasında MSS nekrozu ve yaygın/ fokal nörolojik bulgular, aritmiler, konjestif kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü, perikardit, hepatik nekroz ve yetmezlik, kafa içi ve diğer kanamalar, adrenal nekroz ve kanama, hızlı ilerleyici pnömoni ve pulmoner hipertansiyon bulunur. Şiddetli hastalığa bağlı mortalite çoğunlukla hepatit ve kanama komplikasyonları, miyokardit veya pnömoni ile ilişkilidir. Yenidoğanlarda ciddi hastalık için risk faktörleri; yaşamın ilk birkaç gününde hastalık başlangıcı, doğum sırası ya da doğum öncesi anne hastalıkları, prematürüite, erkek cinsiyet, echovirus 11 ya da coxsackievirus B infeksiyonu, pozitif serum viral kültürü, etken virüse karşı nötralizan antikörlerin yokluğu ve şiddetli hepatit veya çoklu sistem hastalığına dair kanıttır[1].

### **2.2.9 Transplant ve malignite hastaları**

Kök hücre ve solid organ transplant alıcılarındaki *Enterovirus* infeksiyonları ciddi ve uzun süreli olabilir bu hastalarda ilerleyici pnömoni, şiddetli ishal, perikardit, kalp yetmezliği, meningoensefalit ve dissemine hastalık gelişebilir. Maligniteleri olan ve anti-CD20 monoklonal antikör ile tedavi edilen hastalarda *Enterovirus* ile ilişkili hemofagositik lenfositik lenfositosis, menenjit, ensefalit ve miyokardit bildirilmiştir. Bu gruptaki infeksiyonlar yüksek ölüm oranları ile ilişkilidir[1].

### **2.2.10 Herpanjina (HA)**

Herpanjina ani başlayan ateş, boğaz ağrısı, disfaji ve posterior farenkste lezyonlarla karakterizedir. Ateş normalden 41°C'ye kadar değişebilir; yaş küçüldükçe daha yüksek olma eğilimindedir. Baş ağrısı ve bel ağrısı daha büyük çocuklarda ortaya çıkabilir ve vakaların %25'inde kusma ve karın ağrısı oluşur. Tonsiller, yumuşak damak, uvula, posterior faringeal

duvar ve bazen posterior bukkal yüzeylerde bulunan karakteristik lezyonlar vezikül ve ülser şeklindedir; 2-3 gün içerisinde 1-2 mm'den 3-4 mm'ye kadar büyüyen ve büyüklüğü 10 mm'ye kadar varabilen eritamatoz halkayla çevrilidirler. Tipik olarak yaklaşık 5 lezyon vardır (1-15 arasında değişebilir). Çoğu vaka hafiftir ve komplikasyon gözlenmez, bazı vakalar ciddi hastalıklar ve menenjitte ilişkilendirilmiştir. Ateş genellikle 1-4 günde geçer ve semptomlar 3-7 günde geriler. Cocksackievirus A en sık rastlanan etken olmasına karşın, enterovirus A71 de dâhil olmak üzere çeşitli enterovirüsler HA'ya neden olabilir[1].

### **2.2.11 El ayak ağız hastalığı (EAAH)**

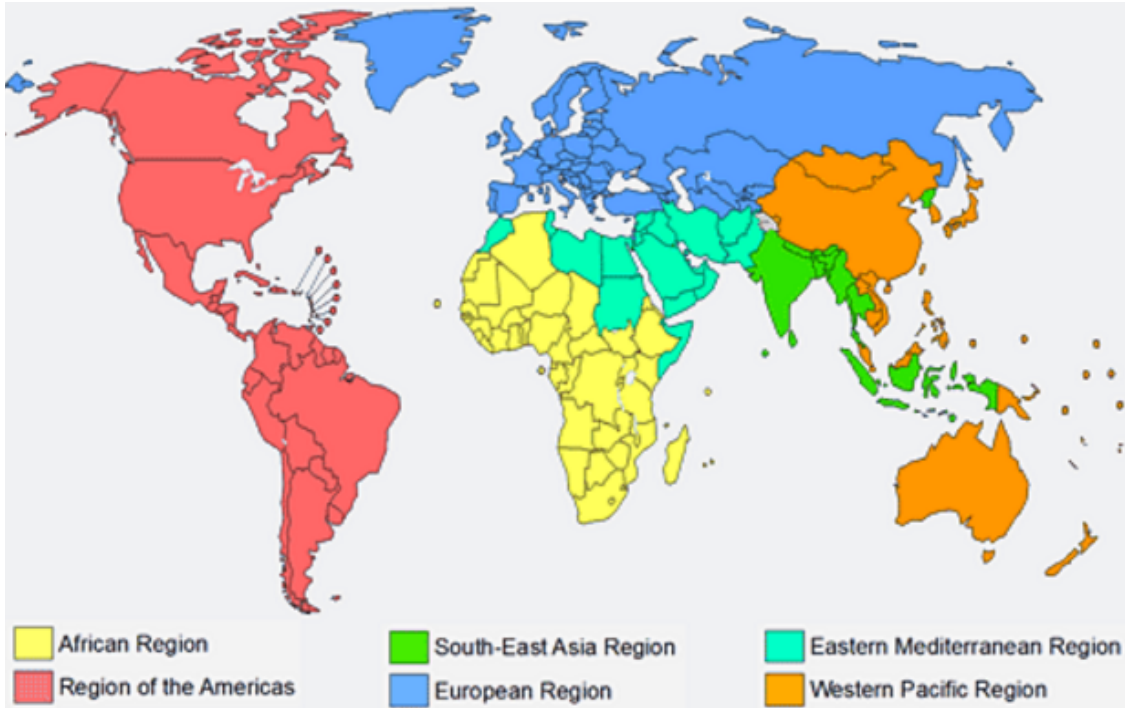
#### ***Tanım***

El ayak ağız hastalığı, oral enantemler ve el ve ayaklarda maküler, makülopapuler ve veziküler lezyonlarla karakterize klinik bir sendromdur[3, 11]. Çocuk ve erişkinlerde en iyi tanınan viral exantemlerden biridir. İlk kez 1957 yılında Toronto'da meydana gelen bir yaz salgınında tanımlanmış ve bu salgında etken coxsackievirus A16 olarak bulunmuştur[8]. EAAH'na, coxsackievirus A16 (CV-A16) ve enterovirus A71 (EV-A71) de dâhil olmak üzere birçok enterovirus sebep olabilir. EV-A71 ile infeksiyon, çocuklarda bazen ölümlerle sonuçlanabilen ciddi hastalığa neden olabileceği için çok endişe vericidir[12].

#### ***Epidemiyoloji***

1970'lerin başından beri dünya genelinde EV-A71 infeksiyonu ile ilişkili birçok salgın bildirilmiştir[6, 13]. Genellikle, enterovirüslerin coğrafi bölgelere göre değişen farklı bir mevsimsel sirkülasyon şekli vardır. Tropikal ve subtropikal ülkelerde, yağışlı mevsimlerde daha fazla salgın görülmekle birlikte sirkülasyon yıl boyunca devam eder. Salgınlar ılıman ülkelerde genellikle yaz aylarında ve sonbaharın başlarında ortaya çıkar[12, 14]. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1970-2005 arasında yapılan *Enterovirus* sürveyansı, EV-A71 ve CV-A16'nın endemik sirkülasyon paternine sahip olduğunu ve vakaların yaklaşık %70'inin sıcak mevsimlerde (Haziran-Ekim arasında) bildirildiğini göstermiştir[15].

Batı Pasifik Bölgesi'nde, Avustralya, Brunei, Çin, Japonya, Malezya, Moğolistan, Kore Cumhuriyeti, Singapur ve Vietnam da dâhil olmak üzere birçok ülkede yaygın salgınlar bildirilmiştir (Şekil 4,5). Özellikle EV-A71'in neden olduğu EAAH insidansının bu bölgelerde arttığı görülmektedir[12].



Şekil 4. Dünya Sağlık Örgütü'ne üye ülkelerin bölgesel olarak sınıflaması

\*<http://www.who.int/about/regions/en/>



Şekil 5. Batı Pasifik Bölgesi

\*<http://www.wpro.who.int/countries/en/> <http://www.wpro.who.int/countries/en/>

Batı Pasifik Bölgesi dışındaki ülkelerdeki EAAH veya EV-A71 infeksiyonunun ayrıntılı epidemiyolojisi ile ilgili daha az bilgi vardır. Bulgaristan'da 1975 yılında ve Macaristan'da 1978 yılında MSS tutulumuna bağlı ölümlerin de eşlik ettiği EV-A71 salgınları bildirilmesine rağmen, son 30 yılda az sayıda ölümcül vaka raporlanmıştır[12].

### ***Ayrıntılı Epidemiyoloji***

EV-A71 infeksiyonu ile ilişkili hastalık, ilk olarak Schmidt ve arkadaşları tarafından 1974 yılında tanımlanmıştır ve 1969-1972 yılları arasında Kaliforniya'da bir ölüm vakası da dâhil olmak üzere MSS hastalığına sahip 20 hastayı bildirmişlerdir[13]. EV-A71 ile ilişkili salgınlar bildirilmeye devam etmiştir; 1972 ve 1977'de New York, Amerika Birleşik Devletleri [16-18], 1972-1973 ve 1986'da Avustralya[19, 20], 1973'te İsveç[21], 1973 ve 1978'te Japonya [22-25], 1975'te Bulgaristan [26, 27], 1978'de Macaristan [28], 1979'da Fransa[12], 1985'te Hong Kong (Çin)[29] ve 1987'de Philadelphia, Amerika Birleşik Devletleri[30]. Bu salgınlar sırasında EV-A71; EAAH, aseptik menenjit, ensefalit, paralizi, akut solunum yolu hastalıkları ve miyokardit gibi geniş bir hastalık yelpazesine neden olmuştur.

1990'ların sonunda, EV-A71 infeksiyonu ile bağlantılı geniş çapta iki toplum salgını meydana gelmiştir; birincisi 1997'de Sarawak, Malezya'da, ikincisi 1998'de Tayvan'da (Çin), sırasıyla 2628 ve 129.106 vaka bildirilmiştir[31, 32].

#### **▪ *Avustralya***

1999'da Perth 'te, 2000-2001'de Sidney'de EV-A71'in etken olduğu nörolojik hastalık ve pulmoner ödemle birlikte 2 EAAH salgını bildirilmiştir[33, 34].

#### **▪ *Brunei***

Şubat-Ağustos 2006 tarihleri arasında EV-A71'in ilk büyük raporlanan salgını yaşanmıştır. 1681'den fazla çocuk ağır nörolojik hastalıktan etkilenmiş ve 3'ü ölümlle sonuçlanmıştır. EV-A71, EAAH veya HA tanısı alan en az 100 hastanın 34'ünden (ağır nörolojik komplikasyonların sonucu olarak ölen 2 hasta dâhil) alınan örneklerden izole edilmiştir[35].

#### **▪ *Çin***

Mart ve Mayıs 2007 arasında, Çin'in Shandong Eyaletindeki Linyi Şehri'nde EAAH salgını meydana gelmiş ve 22 Mayıs 2007'ye kadar, Çin'de ülke çapında bir hastalık bildirim sistemi aracılığıyla 1.149 vaka bildirilmiştir. Salgın sırasında üç (% 0,3) çocuk ölmüştür. Ağır EAAH olan 11 hasta dâhil 105 hastanede yatan hastadan 233 klinik örnek toplanmıştır.

Bunların arasında, 6 ağır vaka dâhil olmak üzere 55'inin (%52,4) EV-A71 infeksiyonu olduğu doğrulanmıştır[36].

1 Ocak ve 9 Mayıs 2008 tarihleri arasında 61.549 EAAH vakası ve 36 ölüm Çin hastalık bildirim sistemi aracılığıyla bildirilmiştir.

2009 yılında Çin'de bildirilen EAAH vakalarının sayısı 1.155.525, ciddi hastalık sayısı 13.810'e ulaşmıştır (%1,2). Vakaların 353 (%0,03)'ü ölümlerle sonuçlanmıştır. Erkek-kadın oranı 1,8: 1, vakaların %93'ü beş yaş ve altı, %75'i üç yaş ve altı olarak raporlanmıştır[12].

#### ▪ **Tayvan(Çin)**

Tayvan'da, EAAH ve HA, 3 Mart 1998'den beri ulusal hekim raporlama sistemine dâhil edilmiştir. 1998 yılında 129.106 EAAH/HA vakası bildirilmiştir. 2000 ve 2001 yıllarında daha küçük salgınlar meydana gelmiş ve bunlarda sırasıyla 291-389 ağır vaka ve 41-55 ölüm raporlanmıştır[37].

#### ▪ **Japonya**

2000 ve 2003 yıllarında bildirilen EAAH vakalarının sayısının sırasıyla 205.365 ve 172.659 olduğu büyük çaplı salgınlar meydana gelmiştir ve bu salgınlardaki primer etken EV-A71'dir[12].

#### ▪ **Malezya**

Sarawak, Malezya'da, Nisan 1997 başlarında primer etkenin EV-A71 olduğu yaygın EAAH salgınları başlamış ve 1 Haziran - 30 Ağustos 1997 tarihleri arasında, Sarawak Devlet Sağlık Departmanına 2.628 vaka bildirilmiştir. Bu salgın sırasında 6 yaşından küçük toplam 29 sağlıklı çocuk hızla ilerleyen kardiorespiratuvar yetmezlik nedeniyle ölmüştür.

Mart 1998-Haziran 2005 arasında, 2.950 çocuktan 4.290 örnek toplanmıştır. Bu süre içerisinde 2000 ve 2003 yıllarında meydana gelen 2 büyük salgında baskın olan etken EV-A71'dir[38]. Bu tarihlerden sonra Sarawak 'ta ilki 2006'da, ikincisi 2008/2009'da 2 salgın daha gerçekleşmiştir[12].

#### ▪ **Moğolistan**

Moğolistan'da EAAH 'nin resmi raporlaması 2008 yılında başlamış ve o yıl 3.210 vaka bildirilmiştir. İncelenen 245 örneğin 102'sinde (%41,6) etken olarak EV-A71 bulunmuştur[12].

#### ▪ **Kore Cumhuriyeti**

Cheju eyaletindeki 2000 yılında gerçekleşen EAAH / HA salgınıyla birlikte, EAAH / HA insidansı Kore Cumhuriyeti'nde artmıştır. *Enterovirus* infeksiyonu için sürveyans sistemi 2005 yılında başlatılmıştır[39].

Ocak 2008-30 Ekim 2009 tarihleri arasında 719 şüpheli EAAH/HA vakası tespit edilmiş, bu vakaların 447 (%62,2)'sinde etkenin *Enterovirus* olduğu gösterilmiştir. 2008'deki major patojen coxsackievirus A10 (CV-A10) (18 olgu, %34) iken, 2009 yılında en sık saptanan patojen EV-A71 olarak bulunmuştur (91 olgu,%55,2)[40].

#### ▪ **Singapur**

Eylül ve Ekim 2000 arasında Singapur'da EV-A71'in etken olduğu EAAH salgınları meydana gelmiş ve 3.790 vakanın üçü ölümlerle sonuçlanmıştır[41]. 2001'den 2007'ye kadar olan 7 yıllık dönemde, 2002'de (16.228 vaka), 2005'te (15.256 vaka), 2006'da (15.282 vaka) ve 2007'de (20.003 vaka) ülke çapında EAAH salgınları görülmüştür[12].

Mart ve Mayıs 2008 tarihleri arasında ülke çapında EV-A71 ile ilişkili EAAH salgını gerçekleşmiş ve bu salgın dönemindeki EV-A71'in pozitifliği, 2006'ya göre önemli derecede yüksek bulunmuştur[12].

#### ▪ **Vietnam**

Güney Vietnam'da, 2003 yılında Ho Chi Minh kentinde EAAH ile ilişkili bir akut ensefalit salgını bildirilmiştir. 2005 yılında, Ho Chi Minh kentindeki en büyük pediatri hastanesinde 764 çocuğa EAAH teşhisi konularak vakaların tamamından örnek alınmıştır, *Enterovirus* izole edilen 411 hastanın 173'ü (%42,1) EV-A71, 214'ü (%52,1) CV-A16 olarak tanımlanmıştır[42].

2007, 2008 ve 2009'da rapor edilen EAAH vakalarının ve ölümcül vakaların sayısı sırasıyla 5.719 ve 23, 10.958 ve 25 ve 10.632 ve 23'tür[12].

2008 yılında, 13 ilden 88 EAAH vakası bildirilmiştir. 88 vakadan virüs izolasyonunun sonuçları; 33 (%37,5) *Enterovirus* pozitif, 9 (%27,3) EV-A71 pozitif, 23 (%69,7) CV-A16 pozitif ve bir vakada CV-A10 pozitif olarak bulunmuştur[12].

#### ▪ **Batı Pasifik Bölgesi dışındaki ülkeler**

Batı Pasifik Bölgesi dışındaki ülkelerde EAAH ve EV-A71 infeksiyonunun ayrıntılı epidemiyolojisi ile ilgili daha az bilgi vardır.

Hollanda'da, ulusal sürveyans sisteminin bir parçası olarak sadece şiddetli ve hastaneye yatırılmış EV-A71 vakaları bildirilmektedir. 1963 ve 2008 yılları arasında EV-A71 ilişkili

ölümle ilgili bilgi yoktur ve 21 yıllık bir düşük endemili dönemden sonra, 2007'de hospitalizasyon gerektiren 58 EV-A71 infeksiyonu vakası bildirilmiştir[43].

İngiltere'de 1998 ve 2006 yılları arasında (2003 yılı dışında) EV-A71'in sürekli sirkülasyonuna dair kanıtlar vardır. EV-A71 infeksiyonu olan hastaların 32'sinde nörolojik komplikasyonlar eşlik etmiş ve bir kişide fatal ensefalit gelişmiştir[44].

Eylül 2001-Kasım 2003 arasında Norveç'te yapılan bir çalışma, EV-A71'in asemptomatik dolaşımını göstermiştir. Yaşları 3 ay olan toplam 113 bebek çalışmaya alınarak, 28 aylık olana kadar her ay gaita örnekleri toplanmış ve dışkı örneklerindeki EV-A71 prevalansı belirlenmiş ve EV-A71 sirkülasyonunun Ekim 2002 ile Ekim 2003 arasında devam ettiği gösterilmiştir[45].

Finlandiya'da 2008 yılının sonbahar aylarında ülke çapında bir EAAH salgını meydana gelmiştir. Klinik olarak teşhis konmuş önemli sayıda hasta yetişkin olmakla birlikte çoğu hastada EAAH akut fazından birkaç hafta sonra onikomadezise rastlanmıştır. 317 EAAH vakasının 212'sinde *Enterovirus*'e rastlanmıştır. Salgına neden olan etken olarak iki *Enterovirus* serotipi, coxsackievirus A6 (CV-A6) ve A10 (CV-A10) belirlenmiştir[46].

2008 yaz ve sonbaharında Valensiya, İspanya'da kümelenmiş ve sporadik olarak EAAH olguları meydana gelmiş ve ardından onikomadezis gelişmiştir. Onikomadezisli hastalardan (öncesinde EAAH olsun ya da olmasın) ve bu hastalarla temas eden sağlıklı çocuklardan gaita örnekleri toplanarak *Enterovirus* pozitifliği açısından test edilmiş ve CV-A10 ve coxsackievirus B1 (CV-B1), monoinfeksiyon veya koinfeksiyonu şeklinde tespit edilmiştir[47].

### ***Seroepidemioloji***

Batı Pasifik Bölgesi'ndeki EV-A71'in seroepidemiolojisi ile ilgili veriler sınırlıdır. Singapur'da, Ulusal Üniversite Hastanesi Pediatri Kliniği'nde serolojik bir çalışma yapılmış ve umbilikal kord kanlarına bakılarak annelerin %44'ünün kanında EV-A71 antikorunun pozitif olduğu gösterilmiştir. Test edilen çocuklardan hiçbiri, bir ay sonra EV-A71'e karşı maternal antikora sahip değilken ve 1-23 aylık çocuklardan alınan 124 örnekten sadece birinde antikor bulunmuştur. İki ile beş yaş arasındaki çocuklarda, seropozitivite oranı yılda ortalama %12 artmış, 5 yaş ve üstündeki çocuklarda, yaşa özel seroprevalans yaklaşık %50 oranında sabit kalmıştır[48].

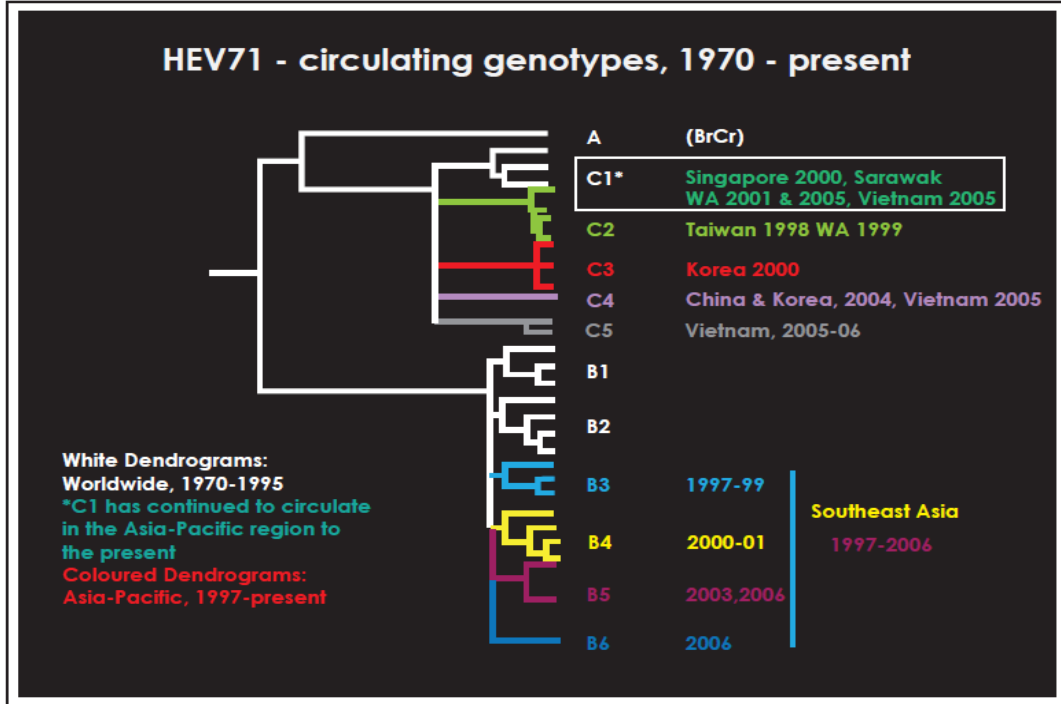
Tayvan'da yapılan bir diğer araştırmada, 1994, 1997 ve 1999 yıllarında toplanan üç seriye ait serumlar kullanılarak EV-A71 seroprevalans hızları incelenmiştir. Alınan zamana

bakılmaksızın, seropozitif oranlar altı aylıktan küçük bebeklerde nispeten yüksektir (%38 -%44). 7-11 aylık bebeklerde %0-15 olan oranlar altı yaşına kadar kademeli olarak artmış ve altı yaşından büyük çocuklarda %50'ye çıkarak plato şeklinde devam etmiştir[49].

### ***Viroloji***

El ayak ağız hastalığına neden olan başlıca etiyolojik ajanlar CV-A16 ve EV-A71'dir. EV-A71, son on yılda Batı Pasifik Bölgesi'ndeki nörolojik hastalık ve mortalite ile seyreden büyük salgınlarla ilişkilendirilmiştir[12, 33].

Enterovirus A71 ilişkili salgınlar incelendiğinde etken olan EV-A71'lerin farklı genogrurlara ait olduğu tespit edilmiştir. Şekil 6'da EV-A71'in üç genogrubunu (genogrup A, B, C) içeren bir filogenetik ağaç ve etken oldukları salgınlar gösterilmiştir.

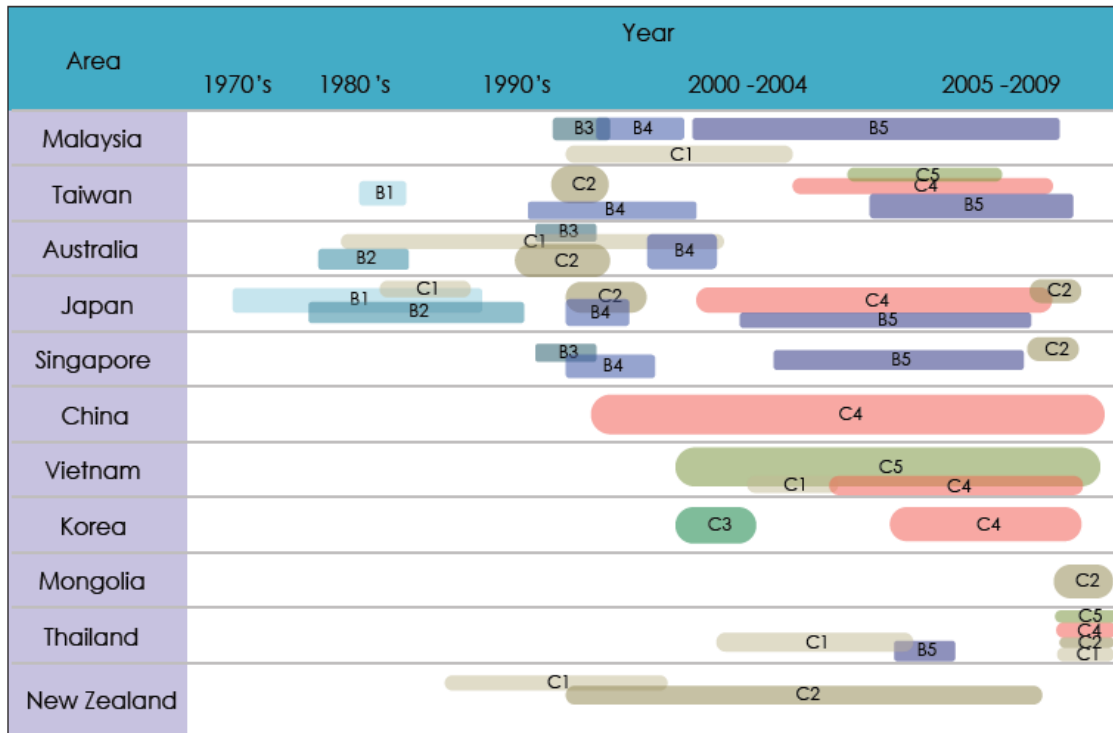


Şekil 6. EV-A71'in üç genogrubunu (genogrup A,B,C) içeren bir filogenetik ağaç

\*Organization, W.H., A guide to clinical management and public health response for hand, foot and mouth disease (EAAH). 2011, Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific.

1970'lerde Amerika, Avrupa, Japonya ve Avustralya'da subgenogrup B1 görülürken, subgenogrup B2 ise 1980'li yıllarda Amerika'da örneklenmiştir. Günümüzde görülen Asya Pasifik bölgesindeki EV-A71 salgınlarının ilki 1997'de Sarawak, Malezya'da gerçekleşmiş ve dolaşımdaki asıl virüs 1970 ve 1980'lerde örneklenen B genogrubundan farklı bir B grubu olarak bulunmuştur. Sonrasında bu etken subgenogrup B3 olarak isimlendirilmiştir. 1998'de, EV-A71'in etken olduğu Asya Pasifik Bölgesi'ndeki başka bir büyük EAAH salgını, bu kez Tayvan'da (Çin) meydana gelmiş ve majör etken subgenogrup C2 olarak tespit edilmiştir. Vietnam'da, C1 ve C4 subgenogrupları da etken olarak görülse de baskın subgenogrup C5'tir[12].

Şekil 7, Asya Pasifik Bölgesi'ndeki çeşitli ülkelerde sirküle olan EV-A71'in farklı subgenogruplarının zamansal dağılımını göstermektedir.



Şekil 7. Asya Pasifik Bölgesi'ndeki çeşitli ülkelerde sirküle olan EV-A71'in farklı subgenogruplarının zamansal dağılımı

\*Organization, W.H., A guide to clinical management and public health response for hand, foot and mouth disease (EAAH). 2011, Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific.

Coxsackievirus-A6 ve CV-A10 gibi diğer *Human Enterovirus A (HEV-A)* serotipleri de EAAH 'ye sebep olabilirler. Fakat 2008'e kadar sadece sporadik hastalıklarla ilişkilendirilmişlerdir. İlk olarak 2008 yılında Finlandiya'da meydana gelen EAAH salgınında CV-A6'nın etken olduğu tespit edilmiş ve bu CV-A6 sirkülasyonu Fransa, İspanya ve diğer Avrupa ülkelerinde 2009-2011 arasında devam etmiştir[50-52]

Coxsackievirus-A6 bu tarihten sonra Singapur'da 2009'da[53], Tayvan'da 2009-2010'da[54], Japonya'da 2011'de[55], Tayland'da 2012'de[56], Çin'de 2013'te [57] EAAH salgınlarına yol açmıştır. Kuzey Amerika'da CV-A6 ile ilişkili EAAH salgınları ABD ve Küba'da 2011-2013 yılları arasında bildirilmiştir[58, 59]. Ocak ve Şubat 2014 arasında Edinburgh, İngiltere'de CV-A6 ile ilişkili bir EAAH salgını bildirilmiştir[60]. CV-A6 ilişkili EAAH salgınlarında dikkati çeken özelliklerden biri hastalarda onikomadezis (tırnakların dökülmesi) görülmesidir[50].

### ***Enterovirüslerin rezervuarı***

Enterovirüsler, bağırsaklarda çoğalır ve genellikle iki-dört hafta boyunca ve bazen infeksiyondan sonraki 12 hafta boyunca fekal yolla atılır. Replikasyon ayrıca üst solunum yollarında da meydana gelir ve infeksiyon sonrası iki haftaya kadar virüs boğaz sürüntülerinden izole edilebilir. Bulaş, fekal-oral yolla ve respiratuvar sekresyonların, insandan insana direkt temas, damlacık veya fomitler yoluyla taşınmasıyla gerçekleşir. Hijyen düzeyi, su kalitesi ve kalabalık ortam bulaşı etkileyen faktörlerdendir[48].

Enterovirüslerin genellikle coğrafi bölgelere göre değişen farklı bir mevsimsel dolaşım şekli vardır. Tropikal ve subtropikal ülkelerde, sirkülasyon yağışlı mevsimlerde daha fazla olmak üzere yıl boyunca devam eder[12].

### ***Laboratuvar tanısı***

El ayak ağız hastalığı veya HA'yı düşündüren cilt lezyonları, toplumda salgın bulunması ve mevsimsel uygunluk *Enterovirus* infeksiyonlarını tanımada ipuçlarıdır. Yenidoğan için; *Enterovirus* mevsiminde annenin ateş, döküntü, abdominal ağrı öyküsünün olması hikâyede önemlidir[1].

El ayak ağız hastalığı etkeninin identifikasyonunun yapılması, özellikle EV-A71 için olası komplikasyonları öngörerek tedaviyi yönlendirmede önemlidir. Hastalardaki EV-A71, MSS hastalığı veya kardiyovasküler kollaps gibi diğer bulgularla birlikte bulunduğu, hızlı

viral tanı çok yardımcıdır, çünkü bu durumlar için belirlenmiş spesifik tedaviler vardır[61]. EAAH salgınlarından sorumlu olan etkenlerin belirlenmesi, salgının ciddiyetinin öngörülmesi ve uygun halk sağlığı müdahalelerinin başlatılması açısından önemlidir.

### ***Laboratuvar güvenliği***

Teşhis laboratuvarlarının yöneticileri ve tüm personeli; klinik numunelerin ve bulaşıcı materyallerin işlenmesi ve taşınması, iyi mikrobiyolojik teknikler ve tesislerin temel biyogüvenlik seviyesi (normalde birincil izolasyon için BSL-2) de dahil olmak üzere uluslararası ve yerel biyogüvenlik gerekliliklerini bilmelidir[62].

### ***Klinik örnekler***

Virüs taşıma besiyerinde gönderilen boğaz ve vezikül (varsa) sürüntü örnekleri, EAAH virüs tespiti bakımından en yararlı numuneler olarak kabul edilir. Enterovirüsler birkaç hafta boyunca fekal yolla atılır; gaita ve rektal sürüntü numuneleri de virüs tespiti ve izolasyonu için kullanılabilir. Bazı klinik örneklerde, özellikle de fekal numunelerde, devam eden infeksiyon yerine önceki infeksiyondan kalan etkeni tespit etme riski düşünülmelidir. Vezikül izolatları en faydalı olanlardır. Çünkü her zaman mevcut olan infeksiyonu temsil eder[63]. Etkeni yakalama olasılığını artırmak için tüm hastalardan boğaz sürüntüsü örneği ve bunun yanında en az iki vezikülden sürüntü alınması önerilmektedir. Vezikülü olmayan hastalarda boğaz örneğinin yanında rektal örnek alınmalıdır. Beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinde EV-A71 ve CV-A16'nın tespit edilme oranları oldukça düşüktür (%5'ten az)[63]. Bununla birlikte, BOS numuneleri, diğer enterovirüslerin (özellikle de HEV B ile ilişkili aseptik menenjitte) virüs tespiti için yararlıdır. Yatan hastaların serum örnekleri serolojik tanı için yararlı olabilir, ancak EV-A71 infeksiyonu için serolojik testlerin güvenilirliği dikkatle değerlendirilmeyi gerektirir[12, 63].

### ***Laboratuvar tanı metodları***

Diğer *Enterovirus* infeksiyonlarında olduğu gibi, poliomyelit de dâhil olmak üzere, doğrulanmış vakalarda enterovirüslerin hücre kültürüyle, virüs izolasyonunun yapıpı tanımlanması halen laboratuvar teşhisi için altın standart yöntemdir. Enterovirus A71'in moleküler karakterizasyonunun tespiti için virüs izolatları gerekli olmakla birlikte, virüs izolasyonu ve identifikasyonu genellikle zahmetli ve zaman alıcıdır ve bu yöntemler klinik karar verme için pratik değildir. Klinik örneklerde kullanan hızlı laboratuvar tanı yöntemleri mevcuttur, ancak hızlı testlerin standardizasyon ve güvenilirliğinin belirlenmesi için karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyaç vardır[12].

### ***Virüs izolasyonu***

Virüs izolasyonu ve enterovirüslerin tanımlanması için bir takım insan ve insan olmayan primat hücre hatları mevcuttur. Bu hücre hatlarından RD (insan rabdomiyosarkom hücreleri) ve Vero (Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri) hücreleri, nispeten yüksek duyarlılıkları ile EV-A71 ve CV-A16 tarafından indüklenen belirgin sitopatik etkileri nedeniyle EV-A71 ve CV-A16'nın izolasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. EV-A71 ve poliovirüsler de dâhil olmak üzere diğer enterovirüslerin virüs izolasyonu için ilave hücre hatları da (MRC-5, HEL, HeLa, L20B dâhil) kullanılabilir[12].

### ***Virüs izolatlarının identifikasyonu***

#### Nötralizasyon testleri

Hücre kültüründe virüs izolasyonunu takiben, EV-A71 ve CV-A16 izolatlarının serotiplendirmesi, geleneksel nötralizasyon yöntemleriyle tip-spesifik antiserumlar kullanılarak yapılabilir. Nötralizasyon testi, *Enterovirus* tanımlaması için halen güvenilir bir yöntemdir. Ancak testin tamamlanması 5-7 gün sürebilir[12].

#### Revers transkripsiyon-PCR(RT-PCR) ve sekanslama

Kültür hücrelerinde virüs izolasyonunu takiben, çeşitli hedef gen bölgeleri kullanılarak (5'UTR, VP1,VP4/VP2 genleri) viral RNA'nın RT-PCR ile amplifikasyonu ve oluşan DNA ampliconlarının sekanslanması enterovirüslerin moleküler identifikasyonu için sık kullanılan tetkiklerdir. Revers transkripsiyon-PCR ve sekanslama yöntemlerinin avantajı; enterovirüslerin genotipleri ve serotipleri ne olursa olsun, muhtemelen yeni ortaya çıkan varyantlar ve enterovirüslerin yeni serotipleri dâhil olmak üzere *Enterovirus* gen hedeflerinin evrensel tespiti ve çoğaltılmasıdır[12, 64]. Daha kısa olan VP4 bölgesinin (veya VP4 artı kısmi VP2) sekanslanması düzenli olarak yapılan sürveyans çalışmaları için yeterli iken, moleküler epidemiyolojik araştırmalarda verilerin doğrulanması için genomun VP1 bölgesi kullanılmalıdır[12].

#### İndirekt immünfloresan assay

Anti-EV-A71 monoklonal antikorları kullanılan indirect immunofluorescence assay (IFA) testleri, EV-A71'in tahmini tanısında faydalıdır. Bu yöntem teknik açıdan basit ve hızlıdır. Antikorlar ticari olarak mevcuttur, ancak nispeten pahalıdır

### Enterovirus-A71 türlerinin genotiplendirilmesi

Enterovirus-A71 suşlarının kapsid VP1 sekans veri tabanına dayanarak, EV-A71 suşlarının bölgesel bulaş ve mevcut prevalansını izlemek için hızlı yaklaşımlar geliştirmek mümkündür. Detaylı moleküler epidemiyolojik analiz için tüm VP1 sekansı belirlenmeli ve analiz edilmelidir.

### Serolojik analizler

Enterovirüslere karşı nötralizan antikorların test edilmesi, *Enterovirus* infeksiyonlarının teşhisinde rutin kullanım için önerilmez.

Yatan hastalardaki serum örnekleri, hızlı EV-A71 immunoglobulin M (IgM) saptaması için yararlı olabilir. Ancak EV-A71 infeksiyonu için serolojik testlerin özgüllüğü ve duyarlılığı, dikkatle değerlendirilmeye ihtiyaç duyulan bir alandır[12].

### ***Klinik Özellikler ve Vaka Yönetimi***

El ayak ağız hastalığı, çocuklarda kısa süreli ateşli hastalık ve tipik deri döküntüleri ile karakterizedir. Ağız ülserleri her vakada bulunmayabilir. Tipik olarak, döküntü papülovezikülerdir ve avuç içi veya ayak tabanlarını ya da her ikisini birden tutar (Resim 2). Bazı vakalarda döküntü veziküler olmaksızın makulopapüler özellikte olabilir ve özellikle küçük çocuklarda ve bebeklerde kalça, diz ve dirseklerde de döküntü görülebilir (Resim 3).



**Resim 2. El içi, ayak tabanı ve dilde veziküler döküntüler**

\*Goksugur, Nadir, and Sevil Goksugur. Hand, foot, and mouth disease. New England Journal of Medicine 362.14 (2010): e49.



**Resim 3. Diz ve dirseklerde EAAH döküntüleri**

\*Dhar, Sandipan. Color Atlas & Synopsis of Pediatric Dermatology. JP Medical Ltd, 2015.

Asya kıtasındaki EV-A71 ile ilişkili EAAH salgınları sırasında hastaneye kaldırılan vakaların yaklaşık %10-30'unda aseptik menenjit, ensefalit ve akut flask paralizi gibi bir dizi MSS komplikasyonu geliştirmiştir[32, 42, 65]. Stereotipik nöropatolojik özelliklere sahip bir ensefalit formu olan beyin sapı ensefaliti, 1990'lı yılların sonlarında başlayan ve son zamanlara kadar devam eden Asya'daki EV-A71 ilişkili şiddetli EAAH salgınlarının önemli bir özelliğidir. 1998'deki Tayvan salgını sırasında MSS tutulumu ile birlikte görülen EAAH vakalarının klinik özelliklerinin ayrıntılı bir çalışması şunu göstermiştir ki; tekrarlayan miyoklonus en sık görülen nörolojik bulgudur. Tremor, ataksi ve kranial sinir paralizileri de görülebilir. En şiddetli etkilenen çocuklarda fulminan kardiorespiratuar yetmezlik gelişebilir;

bu genellikle ölümcüldür ve yoğun bakım desteğine rağmen hayatta kalan kişiler arasında ciddi nörolojik ve muhtemel psikolojik davranışsal sekellere neden olur[66].

Fatal seyreden vakaların başlangıcında tipik olarak çok kısa ateşli bir hastalık ve belirgin olmayan nörolojik bulgular vardır, bunu takiben saatler içinde dramatik olarak ilerleyen taşikardi, zayıf periferel perfüzyon ve taşipneyle birlikte akut refraktör myokart disfonksiyonu ve fulminan pulmoner ödem gelişir. Rölatif nötrofiliyle birlikte beyaz küre artışı, hiperglisemi ve artmış BOS laktat miktarı gözlenebilen laboratuvar anormallikleridir[67, 68]. Beyin tomografisi kullanışlı bir tanı yöntemi değildir çünkü MSS 'deki primer tutulum yeri beyin sapıdır[12].

Beyin omurilik sıvısı pleositozu MSS tutulumu için objektif bir belirteçtir ve fatal vakalarda evrensel olarak gözlenmiştir. Ani kardiyopulmoner kollaps öncesi belirgin nörolojik bulguların olmamasına rağmen, BOS pleositozunun bulunması MSS tutulumunun kardiyopulmoner yetmezlik başlangıcından önce meydana geldiğini gösterir. MSS tutulumu olan çocukların erken tanınması, doktorların bu çocuklara özel ilgi göstermesine ve fulminan, dirençli kardiyopulmoner yetmezlik başlamadan önce zamanında müdahale etmesine olanak tanır[12].

### ***Komplikasyonlar***

El ayak ağız hastalığı sonrası ciddi komplikasyon gelişimi nadirdir. Aşağıdaki komplikasyonlar görülebilir;

- Oral alımın azalması (dehidratasyona sebep olarak hospitalizasyon gerektirebilir)
- Beyin sapı tutulumu
- Akut flask paralizi
- Aseptik menenjit
- Miyokardit
- Gebelerde düşük
- Konjoktival ülserasyon
- Onikomadezis (tırnaklar düşer ve medikal tedaviye gerek kalmadan kendiliğinden yeniden çıkar)(Resim 4)



**Resim 4. Onikomadezis**

\* Chiriac, Anca, et al. Hand, Foot and Mouth disease in northeastern part of Romania in 2012. Our Dermatol Online 4 (2013): 226-9.

#### ***Ayırıcı tanı***

El ayak ağız hastalığının ayırıcı tanısında HA, herpetik gingivostomatit, aftöz stomatit, uyuz hastalığı, suçiçeği, kızamık ve kızamıkçık da düşünülmelidir.

HA'da, oral lezyonlar tonsiller, yumuşak damak, uvula, posterior faringeal duvar ve bazen posterior bukkal yüzeylerde bulunur ve ekstremitelerde döküntü yoktur.

Herpetik gingivostomatitte, hastalar genellikle febril olup toksik görünürler. Dişetinde eritem, şişme ya da kanama ve buna eşlik eden servikal lenfadenopati olabilir. Ekstremitte tutulumu olmadan ağız çevresinde ülser veya veziküller bulunabilir.

Aftöz stomatit, dudakların, dilin ve bukkal mukozanın aşırı derecede ağrılı olan daha büyük, ülser lezyonları ile karakterizedir. Genellikle büyük çocukları ve yetişkinleri etkiler. Çoklu tekrarlamaları olabilir ve genel semptomlarla ilişkili değildir.

Uyuz hastalığı, bazen EAAH ile karıştırılabilir çünkü aynı şekilde el ve ayaklar üzerinde püstüller, kesecikler veya nodüler lezyonlara neden olur. Yoğun kaşıntı ve interdijital alanın dâhil olması, parazitik tutulum için yararlı klinik ipuçlarıdır.

Varisella lezyonları kabuk oluşturarak iyileşirken, EAAH lezyonları veziküler sıvının rezorbsiyonu ile giderilir.

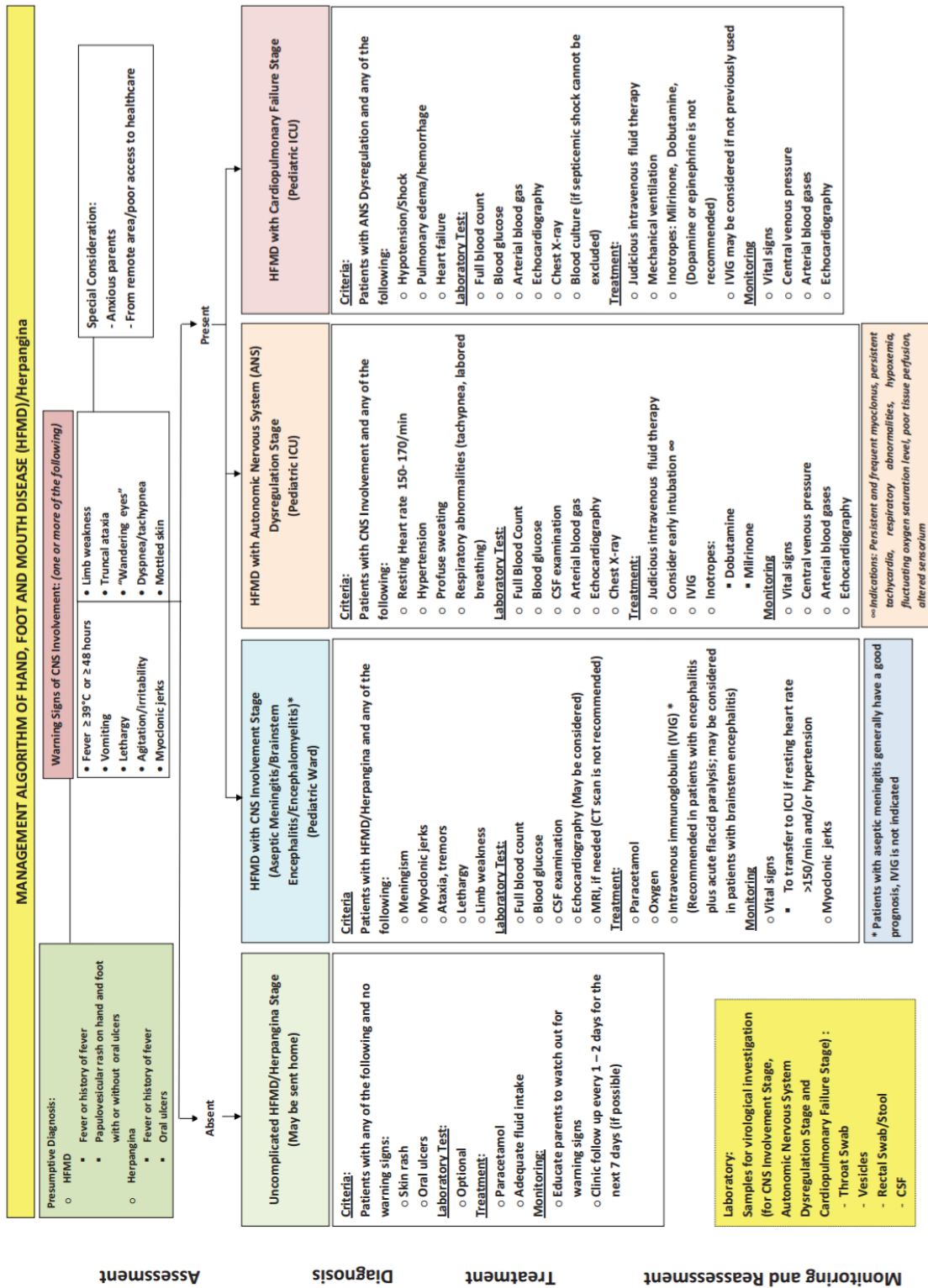
Kızamık infeksiyonu olan çocuklarda generalize makulopapüler döküntülerin yanı sıra, genellikle tipik bulgular olan öksürük, burun akıntısı ve konjonktivit görülür ve ağız muayenesinde kopluk lekeleri gözlenebilir.

Kızamıkçığıdaki deri döküntüsü, sentripedal dağılım gösterir ve oksipital lenfadenopati eşlik eder[2, 12].

### ***Klinik değerlendirme***

Vakaların çoğunda EAAH kendini sınırlayan bir hastalıktır ve çocukların çoğunluğu semptomatik tedavi ile kendiliğinden düzelir. El ayak ağız hastalığı olan çocukların yalnızca küçük bir kısmında nörolojik tutulum gelişir ve bu da potansiyel olarak fatal kardiyopulmoner yetmezliğe ilerleyebilir. Herpanjina ve EAAH vakalarını gözlemleyen birinci basamak hekimlerin temel amacı hastalığın şiddetli formuna dönüşebilecek vakaları tanımlamak ve bunları yakın gözlem, araştırma ve erken tedavi için hastaneye yönlendirmektir.

El ayak ağız hastalığının klinik yönetimi büyük oranda destekleyici niteliktedir ve spesifik antiviral tedavi yoktur. Malezya ve Vietnam'da çeşitli tedavi yaklaşımları kullanılmıştır ve daha güncel klinik uygulamaların akut morbidite ve mortalite oranlarını azalttığı görülmüştür, fakat henüz bu konuda yapılmış randomize kontrollü bir çalışma yoktur[12]. Herpanjina ve EAAH vakalarına yaklaşımla ilgili Dünya Sağlık Örgütü'nün önerdiği algoritma Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8. EAAH/HA için vaka yönetim algoritması

\* World Health Organization. A guide to clinical management and public health response for hand, foot and mouth disease (HFMD).(2011).

Değerlendirme, iyi bir öykü ve fizik muayene ile başlamalı ve MSS tutulumunu gösteren uyarıcı işaretlere dikkat edilmelidir. Kısa süren ateş, vakadaki tipik bir durumdur. Bununla birlikte, birkaç çalışmada ateşin şiddeti ve süresinin MSS tutulumu için önemli bağımsız risk faktörleri olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde kusma, letarji, ajitasyon veya iritabilite gibi diğer bulgular da MSS tutulumu ile ilişkilidir[65, 67]. Ağır hastalığın erken dönemindeki çocuklarda miyoklonik hareketler (genellikle uykunun erken safhasında gözlenir, aynı zamanda şiddetli vakalarda hastalar uyanık olduğunda da görülür), trunkal ataksi ve "dolambaçlı gözler" (fiksasyonsuz döner göz hareketi) gibi daha spesifik nörolojik bulgular sık görülür[69].

Asya Pasifik Bölgesi'nden 19 çalışmanın bir meta-analizinde (klasik EAAH 'den ziyade EV-A71 etkenli EAAH 'ye odaklanmış) şiddetli EAAH (nörolojik, solunum, dolaşımdaki komplikasyonlar ya da ölüm) aşağıdakilerle ilişkili bulunmuştur[70];

- Ateş  $\geq 37,5$  ° C
- $\geq 3$  gün süren ateş ( $\geq 37,5$ °C)
- Letarji
- Kusma
- EV-A71 infeksiyonu
- İleri yaş

Sadece mukokutanöz tutulumu olan çocuklar (komplike olmamış EAAH) kaygılı ebeveynler veya sağlık bakım tesislerine yetersiz erişim gibi endişe verici bir durum bulunmadığı sürece evde tedavi edilebilir[12].

Hospitalizasyon endikasyonları[3];

- Yeterli hidrasyonun sağlanamaması
- Nörolojik veya kardiyovasküler komplikasyon gelişimi, örneğin:
  - Ensefalit
  - Menenjit
  - Flask paralizi
  - Miyokardit
- Lezyonların egzama herpetikumdan ayırt edilememesi

## ***Tedavi***

Destekleyici bakım: Ağrı ve ateş genellikle kısa sürelidir. Ağrı ve ateş için ibuprofen ve asetaminofen kullanılabilir. Dehidratasyonu olan çocuklarda volüm düzeltilene kadar bu ilaçlardan kaçınılmalıdır. Şiddetli vakalarda oral opioidler gerekebilir. Oral lezyonların ağrısının giderilmesi için topikal lidokain gibi ilaçların kullanılması, klinik çalışmalarda faydalı olduğuna dair yeterli kanıt olmadığı için önerilmez. Hidrasyonu sağlamak için yeterince su içemeyen çocuklarda parenteral sıvı tedavisi için hospitalizasyon gerekir[3, 71].

Bir veya daha fazla uyarı işareti mevcutsa, klinisyen hastalığın ciddiyetini değerlendirmek ve bir tedavi ve izleme stratejisi üzerinde karar vermek için hastanın nörolojik ve hemodinamik durumunu dikkatlice değerlendirmelidir. Önceki salgınlar sırasında hastalık spektrumuna dair yapılan gözlemsel çalışmalar, şiddetli hastalığın üç farklı evre ile karakterize edildiğini göstermektedir: MSS tutulumu, otonom sinir sistem disregülasyonu ve daha sonra pulmoner ödem veya kanama da dâhil olmak üzere kardiyopulmoner yetmezlik[66, 72].

Salgınlardan etkilenen birçok ülke, antikor havuzunda *Enterovirus* için nötralizan antikorların bulunması varsayımına dayanarak intravenöz immunglobulini (IVIG) tedavide kullanmaktadır[72-74]. Bununla birlikte, IVIG kullanımı henüz randomize klinik araştırmalardan elde edilen kanıtlarla desteklenmemiştir.

Özellikle sık sık miyoklonik hareketlerden dolayı huzursuz ve dinlenemeyen çocuklar için erken entübasyon tavsiye edilir. Solunum anormallikleri, kalıcı taşikardi, zayıf doku perfüzyonu, hipoksemi ve dalgalı oksijen saturasyon seviyesi durumlarında da entübasyon gerekebilir[75].

## ***Korunma***

Hijyen: El temizliği toplum kaynaklı EAAH ve HA'dan korunmak için önemlidir[76]. Oral sekresyonlar veya dışkılarla temas eden yüzeyler temizlenmeli ve dezenfekte edilmelidir.

Çocuk bakımı: El hijyen protokollerine sıkı sıkıya uyma bebek bezlerini değiştirirken önemlidir. Çünkü enterovirüsler infeksiyonu izleyen haftalar boyunca gaitada bulunur.

Bebeğin ve çocuğun kreş gibi toplu ortamlardan çıkarılması EAAH 'nin yayılmasını engellemez. EAAH 'ye neden olan virüsler semptomları olmayan ve semptomları düzelmiş çocuklar tarafından da yayılabilir. Eğer çocuk ateşliyse, okula gidecek kadar kendini iyi hissetmiyorsa, çocuğun birçok açık deri lezyonu (ikincil deri infeksiyonunu önlemek için) veya ağız lezyonlarından geniş sızıntılar varsa çocuğun izole edilmesi gerekebilir[3].

İzolasyon: Hastaneye yatırılmış EAAH ve HA hastaları için, standart önlemlere ek olarak, temas önlemleri, hastalık süresi boyunca alınmalıdır.

Aşı: Poliovirüs dışındaki enterovirüslere karşı etkili aşılar henüz klinik olarak mevcut değildir. Birkaç faz III çalışmada, *Enterovirus* aşılarının EV-A71 alt-genotip C4'ün neden olduğu EAAH 'yi ve komplikasyonlarını başarıyla önlediği gösterilmiştir[77-79]. Aşıların diğer EV-A71 genotiplerine karşı çapraz koruyucu olup olmayacağı veya korunmanın ne kadar süreceği belirlenememiştir[12].

### 3. MATERYAL METOD

El ayak ağız hastalığı için en sık görülen etkenler CV-A16 ve EV-A71 olduğundan, yaptığımız çalışmada bu iki etkene yönelik, türe özgü primerlerle PCR uygulandı. *Enterovirus* için pozitif çıkan PCR ürünlerinde bilinen etkenler açısından pozitiflik yakalanamayan örnekler sekanslandı. Sekanslama sonucunda etkeni saptanan örneklerle türe özgü primerlerle teyit amaçlı tekrar PCR uygulandı.

#### 3.1 Hasta seçimi

2015-2017 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Pediatrik Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği'ne döküntü şikâyetiyle başvuran EAAH şüpheli çocuklar çalışmaya dâhil edildi (Resim 5-9).



Resim 5. Elde EAAH döküntüleri



**Resim 6. Dilde ve ağız çevresinde EAAH döküntüleri**



**Resim 7. Elde ve kolda EAAH döküntüleri**



**Resim 8. Yüzde EAAH döküntüleri**



**Resim 9. Bacakta EAAH döküntüleri**

### **3.2 Örneklerin alınması ve saklanması**

El ayak ağız hastalığı şüpheli çocukların oral mukozadaki veya vücutlarındaki döküntülerin en az ikisinden serum fizyolojik ile ıslatılmış steril pamuklu çubuk yardımıyla sürüntü örneği alındı. Alınan örnekler PBS (Phosphate buffered saline) içeren 1,5 ml'lik steril kapaklı tüplere daldırıldı ve çubuğun pamuk kısmı tüpün iç duvarında döndürülerek hasta

örneğinin sıvıya aktarılması sağlandı. Tüplere alınan örnekler ileri işlemlere alınmak üzere -80°C’de saklandı.

### **3.3 Hücre kültürü**

Vero E6 hücre çözeltilisi %10 FBS( Fetal Bovine Serum)’li DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) içerisinde kuyu başına 2 ml olmak koşuluyla 12 ‘lik mikropiğa pasajlandı. Hücreler %90-100 doluluğa ulaşınca kadar 37°C ’de %5 ‘lik CO<sub>2</sub>’li inkübatörde büyütüldü. Mikropiğdaki hücreler %90-100 doluluğa ulaşınca vasat kısmı boşaltılıp, dPBS ile yıkandı. Serum fizyolojik içindeki sürüntü örnekleri 0,45 µm’ lik filtreden geçirilerek her bir örnekten 20µl alınıp 1 ml serumsuz DMEM içerisine eklenerek mikropiğdaki bir kuyuya aktarıldı. Enfeksiyondan 3 gün sonra sitopatik etki oluşup oluşmadığı gözlemlendi. Sitopatik etki görülen kuyularda viral enfeksiyon olduğu kabul edildi (Resim 10). Mikropiğdaki her kuyudan hücre vasatı 2 ml ’lik tüplere alınıp 7000 rmp’de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı yeni bir 2 ml’lik tüpe alınarak -80 °C ’lik dondurucuya kaldırılarak RNA izolasyonu yapıncaya kadar saklandı.

### **3.4 RNA izolasyonu**

Viral kültür sonrası elde edilen sıvılardan nükleik asit ekstraksiyonu için Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) kullanıldı. Prosedürün tamamı üreticinin talimatlarına uyarak uygulandı.

### **3.5 Revers transkripsiyon**

İzolasyonu yapılan viral RNA’lardan cDNA sentezi için SensiFAST cDNA Synthesis Kit kullanıldı ve bütün basamaklarda üreticinin talimatlarına uyuldu.

### **3.6 Clean-up (Saflaştırma)**

Üreticinin talimatları doğrultusunda Zymo Research DNA Clean & Concentrator™-5 kiti kullanılarak revers transkripsiyon sonrası ürünlerden cDNA saflaştırma işlemi yapıldı.

### **3.7 Primerlerin tasarlanması**

5'UTR'yi hedefleyen *Enterovirus* cinsine spesifik pan-enterovirus primerleri nested-PCR için tasarlandı[80]. Ayrıca EV-A71, CV-A16 ve CV-A6 için VP1 gen bölgesini hedefleyen spesifik primerler kullanıldı. Kullanılan primerler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu için ticari bir kit (Illustra™ Hot Start Master Mix GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) kullanıldı. PCR tüplerinde hazır olarak bulunan master mix üzerine 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer, 1 µl clean-up sonrası saflaştırılmış cDNA ve 22 µl DNase-RNase free water eklendi. PCR cihazı Veriti® thermal cyclers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) PanEV, CV-A16 ve EV-A71 tespiti için sırasıyla 94°C 3 dk, 30 döngü 94 °C 30 sn, 59°C 30 sn, 72°C 30 sn ve 72°C 5 dk olarak ayarlandı. CV-A6 tespiti için ise PCR reaksiyonları, sırasıyla, 94°C 3 dk, ve 32 döngü; 94 °C 30 sn, 57°C 15 sn, 72°C 30 sn ve en son inkübasyonu 72°C 5 dk şeklinde belirlendi.

**Tablo 1. PCR için kullanılan primerler**

PanEV-5'UTR	Outer-primer Forward*	5'-CYTTGTGCGCCTGTTTT-3'
	Reverse*	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCC-3'
	Inner-primer Forward*	5'-CAAGYACTTCTGTMWCCCC-3'
	Reverse*	5'-CCCAAAGTAGTCGGTTCC-3'
EV-A71-VP1	Forward*	5'-AGAGCATGATTGAGACACG-3'
	Reverse*	5'-RTCTTTCTCYTGTTTGTGTTC-3'
CV-A16-VP1	Forward*	5'-TGCAGACATGATTGACCAG-3'
	Reverse*	5'-TGCCTACAGTTCTGATGCTA-3'
CV-A6-VP1	Forward	5'-GTGGAACACTTTACTCCCGTGC-3'
	Reverse	5'-GTAGGGTAACCATCATAAAACCACTG-3'

\* Y:C/T, R:A/G, M:A/C, W:A/T. PanEV, EV-A71 ve CV-A16 primerleri Ge, S ve arkadaşlarının 2013 yılında yayınladıkları makaleye göre dizayn edilmiştir [80]

### **3.8 PCR ve jel elektroforezi**

Amplifikasyon ürünleri ve 100 bp'lik marker %1,5'lik agaroz jele yüklendi, elektroforez cihazı 80V 'a ayarlanarak 40 dakika yürütüldü ve analize edildi.

### **3.9 Sanger sekanslama**

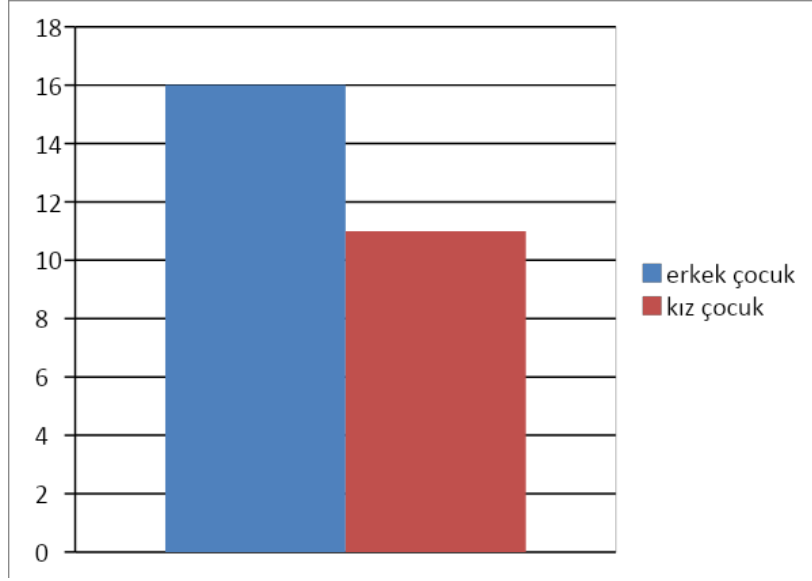
*Enterovirus* için elektroforez sonrası bant gözlenen PCR ürünlerinin sekanslanması için ticari olarak (Sentegen Biyotek, Ankara) hizmet alındı.

#### 4. BULGULAR

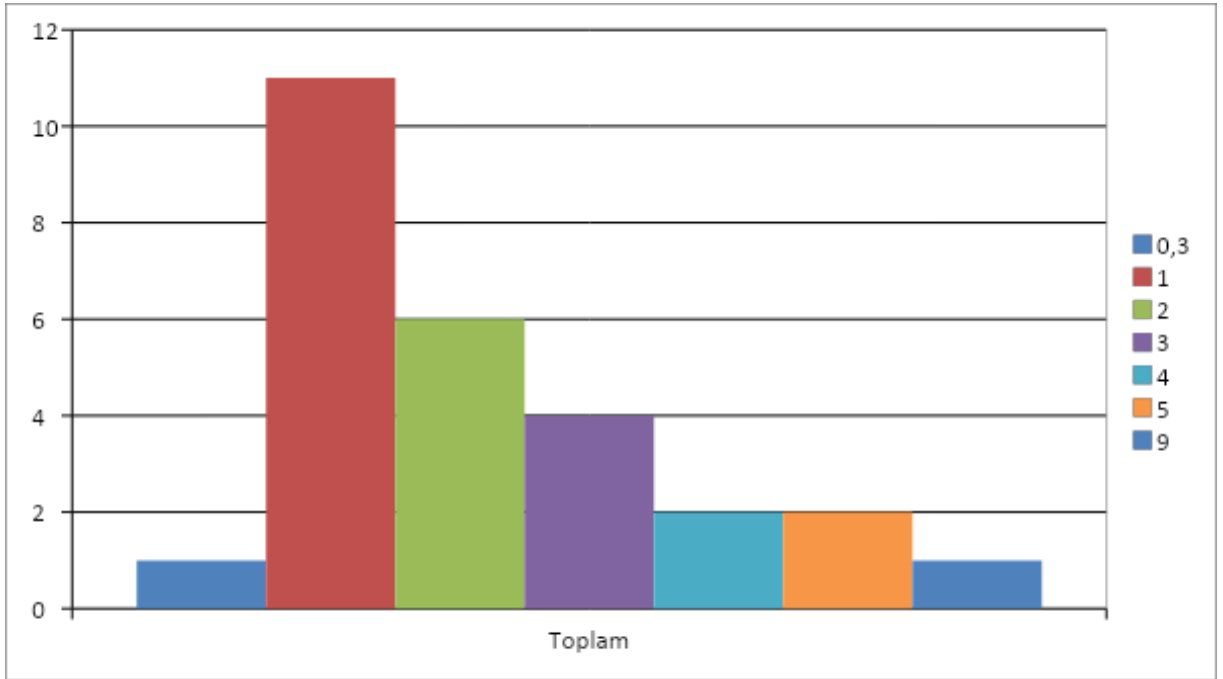
2015-2016 yıllarından 15, 2017 yılından 12 örnek olmak üzere toplam 27 örnek çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan 27 çocuğun 11'i kız, 16'sı erkekti (Şekil 9). Çocukların yaşları 4 ay ile 9 yaş arasında değişmekteydi ve çoğunluğu yaz aylarında hastanemize başvurmuştu (Şekil 10, 11).

2015-16 döneminde örnekleme yapılan 12 hastanın nested PCR sonuçlarına göre, pan-enterovirus outer primerleriyle 530 (Resim 11), inner primerleriyle 389 baz uzunluğunda amplifikasyon ürünleri tespit edildi (Resim 12). Bu bulgu örneklerin *Enterovirus* içerdiğinin kanıtı olarak değerlendirildi. CV-A16 ve EV-A71 etkenlerine yönelik türe özgü primerlerle PCR uygulanan örneklerin hiçbirinde CV-A16 ve EV-A71 için pozitiflik saptanmadı. Pozitiflik yakalanamaması üzerine 12 örneğin tamamı sekanslandı. Sekanslama sonucunda örneklerin tamamı CV-A6 ile uyumlu bulundu. Teyit amaçlı yapılan türe özgü PCR ile örneklerin CV-A6 olduğu doğrulandı (Resim 13).

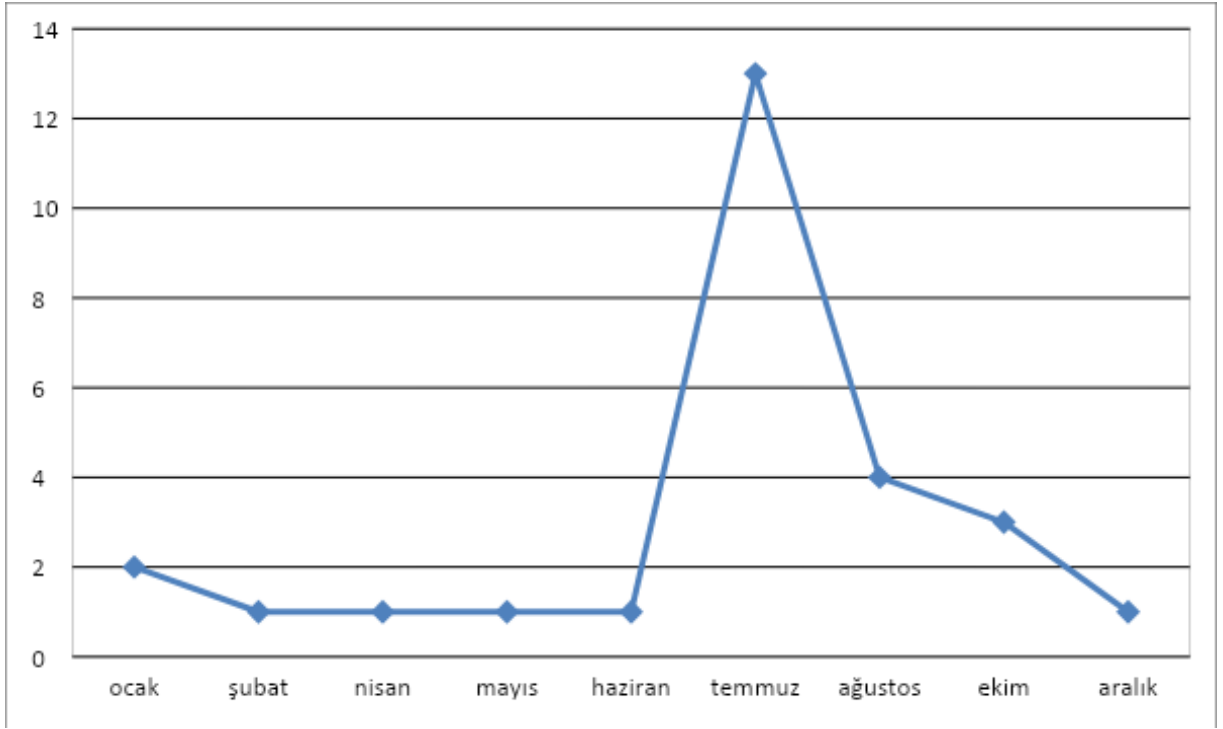
2017 yılında alınan 12 hasta örneğine *Enterovirus* için PCR uygulaması sonucunda 7 örnekte *Enterovirus* tespit edildi. Önceki verilerin negatif çıkmasından hareketle, bu hastalara EV-A71 ve CV-A16 için PCR uygulanmadan direk sekanslama yapıldı. Sekanslama sonucunda 7 örneğin 3'ünün sekans sonucu CV-A6 için uyumlu gelirken (Şekil 12), 4'ünün ise CV-A16 için uyumlu olduğu tespit edildi (Şekil 13).



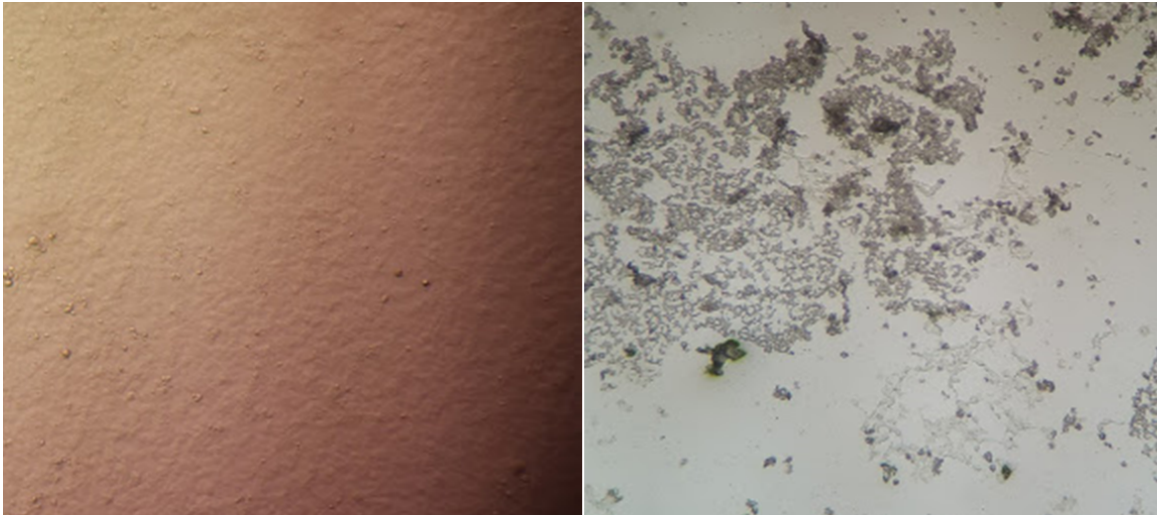
Şekil 9. Çalışmaya alınan çocukların kız erkek sayıları



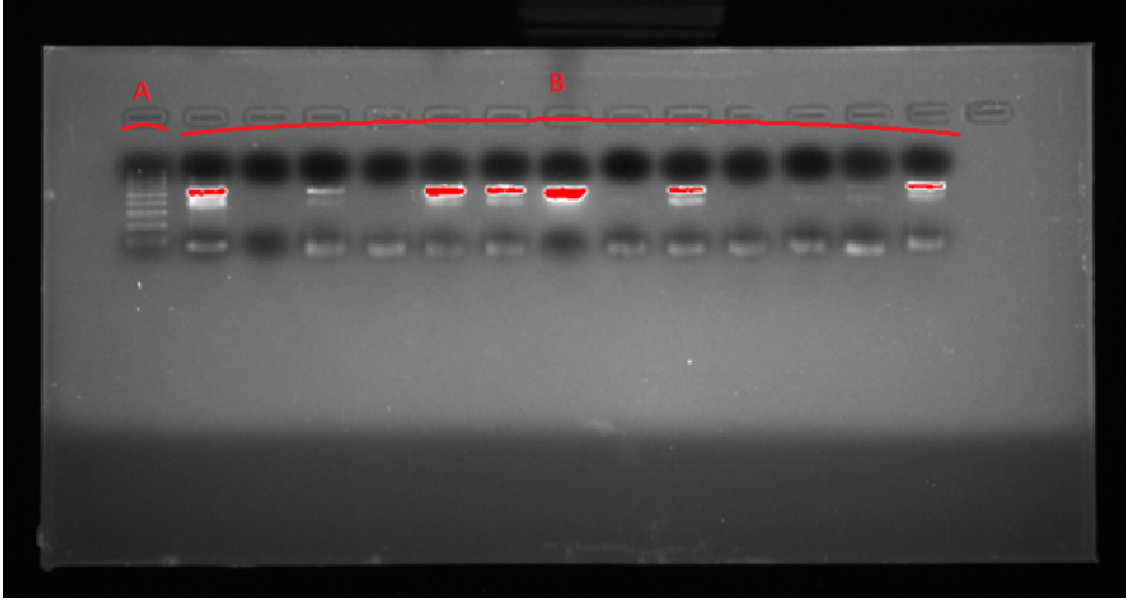
Şekil 10. Çalışmaya alınan çocukların yaş(yıl) dağılımı



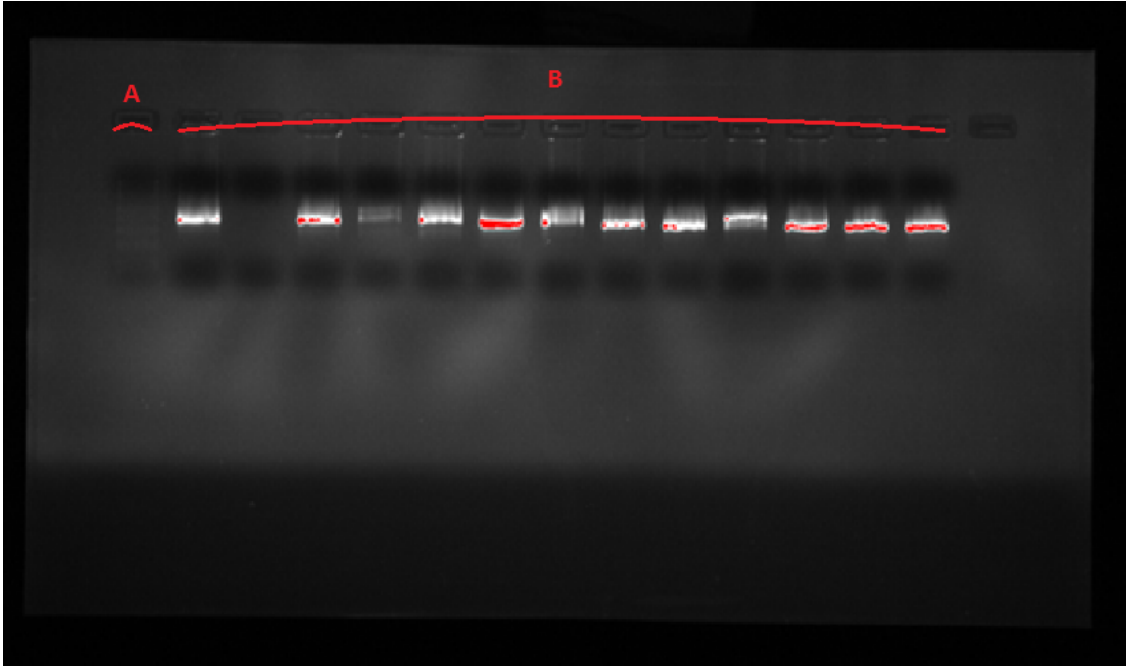
Şekil 11- Çalışmaya alınan EAAH tanılı çocukların aylara göre dağılımı



Resim 10. İnfekte olmayan Vero hücreleri (A), ve Enterovirus ile infekte Vero hücreleri (B)



**Resim 11.** Nested PCR'in pan-EV outer primerleriyle yapılan ilk basamağı. A; 100 bp'lik marker, B; 530 bp'lik amplifikasyon ürünleri



**Resim 12.** Nested PCR'in pan-EV inner primerleriyle yapılan 2. basamağı. A; 100 bp'lik marker, B; 389 bp'lik amplifikasyon ürünleri



**Resim 13. CV-A6 primerleriyle amplifikasyonu sağlanan PCR ürünlerinin %1.5 agaroz elektroforezinde görünümü. A; 100 bp'lik marker, B; 389 bp'lik amplifikasyon ürünleri**



**Şekil 12. PCR Ürünlerinin CV-A6 ile uyumlu sekans verileri**

```

AATAACAAAAGAACCAAAAAATGCTCTTTAAAAAAGCGGGCGTGAGGCGACAAACAGTCTTGCCAGGGGAATGTCTCCCGGACTGAGTATC
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TTATTGTTTTCTTGGTTTTTACGAGAAAATTTTTTTTTTCGCCCGCACTCCGCTGTTTGTGCAGAACCGGTCCCTTACAGAGGGGCTGACTCATAG
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
100

AATAGACTGCTCTCGCTGAAGAAGGAGAAAACGTTCTTATCCGGCTAACTACTTCGGGAAACCTAGTAGCGCCTTGAAAAGTTGCAGAGTGTTCGCTCA
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TTATCTGACGAGAGCGACTTCTTCTCTTTTGAAGCAATAGGCCGATTGATGAAGCCCTTGGATCATCGCGGAACCTTCAACGTCTCACAAAAGCGAGT
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
200

GCACTTCCCCCGTGTAGATCAGGCCGATGAGCCACTGCAAACCCACGGGCGACCGTGGCAGTGGCTGCGCTGGCGGCCTGCCATGGGGAAACCCATGG
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CGTGAAAGGGGGCACATCTAGTCCGGCTACTCGGTGACGTTTGGGGTGCCCGCTGGCACCGTCACCGACGCGACCGCCGGACGGGTACCCCTTTGGGTACC
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
300

GACGCTCTAATACAGACATGGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCTGAAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACCCCTC
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CTGCGAGATTATGCTGTACCACACTTCTCAGATGACTCGATCAATCATCAGGAGGCCGGGACTTACGCCGATTAGGATTGACGCCTCGTGTGTTGGAG
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
400

AACCAGGGGGCAGTGTGTCCTAACGGTAACCTGCCCCGGAACCGACTACTTTGGGTGACCGTGTTCCTTTTATTCTTTATTGGCTGCTTATGGTGA
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TTGGGTCCCCGTCACACAGGATTGCCATTGAGACGGGCTTGGCTGATGAAACCCACTGGCACAAAAGGAAAATAAGGAAATAACCGACGAATACCACT
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
500

CAATAAGGAATAAAAGGAACACGGTCACCCAAAGTAGTACGGTTTCCGCTGCAGAGTTACAC
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GTTATTCCTTATTTTCTTTGTGCCAGTGGGTTTCATCATGCCAAAGGCGACGTCTCAATGTG
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
3'
563
5'

```

**Şekil 13. PCR Ürünlerinin CV-A16 ile uyumlu sekans verileri**

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda 2015-2017 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Pediatrik Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği'ne döküntü şikâyetiyle başvuran EAAH şüpheli çocukların cilt lezyonlarından alınan sürüntü örnekleri incelenmiştir. 2015-2016 yıllarından 15, 2017 yılından 12 örnek olmak üzere toplam 27 örnek çalışmaya dâhil edilmiştir. 2015-2016 yıllarında toplanan 15 örnek hücre kültürü ve nested PCR yöntemleri izlenerek *Enterovirus* açısından değerlendirilmiş ve *Enterovirus* içerdiği tespit edilen 12 örneğe EAAH için en sık görülen etkenler olan CV-A16 ve EV-A71 serotiplerine özgü primerlerle PCR uygulanmıştır. Hiçbir örnekte CV-A16 ve EV-A71 için pozitiflik saptanmamıştır. Bunun üzerine 12 örnek sekanslanmış ve tamamının CV-A6 serotipi ile uyumlu olduğu görülmüştür. 2017 yılında alınan 12 hasta örneğinin 7'sinde PCR ile *Enterovirus* tespit edilmiş ve amplifikasyon sonrası sekanslama yapılmıştır. Sekanslama sonucunda 7 örneğin 3'ünün CV-A6, 4'ünün ise CV-A16 serotipi ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Toplam 27 EAAH örneğinin 19'unda PCR ile *Enterovirus* varlığı gösterilmiş ve tamamına sekanslama yapılmıştır. Bu 19 örneğin 4'ünün etkeni bilinen en sık iki serotipten biri olan CV-A16 olarak bulunmuş ve diğer 15 örneğin etkeni, güncel literatürde artış trendi gösterdiği bildirilen CV-A6 olarak tespit edilmiştir[50].

El ayak ağız hastalığı sporadik vakalar şeklinde görülebildiği gibi salgınlara da sebep olabilir. Salgınlar özellikle Batı Pasifik Bölgesi 'ndeki ülkelerden bildirilmektedir. Bu bölge dışındaki ülkelerde EAAH epidemiyolojisiyle alakalı yeterince bilgi yoktur[12, 33-39, 42]. Bildirim yapan ülkelerde de standart ve düzenli bir sürveyans sistemi oluşturulmamıştır. Hollanda 'da sadece hastaneye yatırılma gerektiren şiddetli EV-A71 vakaları bildirilmektedir[43]. İngiltere'de 1998-2006 arasında EV-A71'in sürekli sirküle olduğuna dair kanıtlar vardır[44]. 2001-2003 arasında Norveç'te yapılan bir çalışma, EV-A71'in asemptomatik dolaşımını göstermiştir[45]. Finlandiya'da 2008 yılında majör etkenlerinin

CV-A6 ve CV-A10 olduğu belirlenen bir salgın meydana gelmiştir[46]. 2008 yılında İspanya'da görülen EAAH vakalarından alınan gaita örnekleri toplanarak *Enterovirus* pozitifliği açısından test edilmiş, CV-A10 ve CV-B1 monoinfeksiyon veya koinfeksiyonu tespit edilmiştir[47]. Mart 2017'de Florida ABD'de döküntü şikâyeti olan yetişkin bir erkekte kandaki coxsackievirus B5 antikor titresinin 1/16 olduğu bulunmuştur ve hastanın anamnezinden küçük yaştaki çocuğunda birkaç hafta önce döküntülerin bulunduğu öğrenilmiştir [81].

Türkiye'de düzenli işleyen bir EAAH sürveyans sistemi yoktur. Yaptığımız kapsamlı literatür araştırmasına göre, ülkemizde de EAAH ile alakalı yayınlanmış makaleler vardır, fakat bu çalışmalar hastalık demografisine odaklanmış ve klinik tanıyla ilgilidir, hiçbirinde etken tespiti yapılmamıştır[82-85]. Benzer şekilde, vaka sunumlarında da hasta kliniği ve demografisi ele alınmış, etken açısından değerlendirilme raporlanmamıştır[85-88]. Çalışmamız etkene yönelik data ortaya koyması açısından orjinaldir.

El ayak ağız hastalığına neden olan major etiyolojik ajanlar *Enterovirus A* türüne ait olan CV-A16 ve EV-A71'dir[12, 33]. Bununla birlikte, *Enterovirus* cinsine ait diğer virüsler de EAAH 'na sebep olabilmektedir ve farklı yayınlara göre etyolojik ajan profili değişim göstermektedir. Bizim çalışmamızda etken olarak tespit ettiğimiz CV-A6 ve CV-A16 da *Enterovirus A* türü içerisinde yer almaktadır.

Çin'de yapılan bir çalışmada, 2011-2015 yılları arasında *Enterovirus* pozitif 2.130 örnek çalışılmış ve bunların 678'i (%32) CV-A16, 630'u (%30) EV-A71 olarak tespit edilmiştir[89]. Yine Çin'den yapılan diğer bir çalışmada 2009 ve 2010 yıllarında baskın olan serotip EV-A71 iken 2011 yılında CV-A16 olarak raporlanmıştır (Tablo 2)[90].

**Tablo 2. Çin'in Linyi kentinde meydana gelen EAAH salgınlarındaki etyolojik dağılım**

Enteroviral types	Number of isolates		
	2009	2010	2011
CVA			
HEV71	63	79	10
CVA16	16	14	46
CVA6	2	1	5
CVA4			5
CVA12	3		9
CVA2			1
CVA10	2		
CVB			
CVB1			3
CVB4			1
ECHO6			1
ECHO25		1	
ECHO30		1	4
CVA9		1	
CVB5	10		
Co-detected			
CVA16/B5	3		
Enterovirus			
CVA16/B5/A6	1		
CVA16/B1			1
CVA16/echo30			3
CVA16/B4			1
Total	100	97	90

\*Du, J., et al. "Changing aetiology of hand, foot and mouth disease in Linyi, China, 2009–2011." *Clinical Microbiology and Infection* 20.1 (2014).

Çin'de yapılan başka bir çalışmada, 2011-2015 yılları arasındaki EV-A71 ve CV-A16 pozitif olmayan 562 EAAH hasta örneğinin serotiplendirmesi ve genetik karakterizasyonu yapılmış ve örneklerin tamamının *Enterovirus A-D* cinslerine ait . 22 serotipten en sık CV-A6 (%57,8), CV-A10 (%21,0), CV-A4 (%6,8) ve CV-A2 (%2,7) serotiplerinden oluştuğu bildirilmiştir [91]. Japonya'da yapılan diğer bir çalışmada, 1999-2013 yılları arasındaki *Enterovirus* enfeksiyonu şüphesi olan vakalar incelenmiş ve laboratuvar konfirme *Enterovirus* pozitif 791 örneğin 133'ünün (%17) CV-A6 olduğu bildirilmiştir[92]. Önceki yıllarda EV-A71 ve CV-A16 dışındaki *Enterovirus* serotiplerinin sadece sporadik EAAH vakalarına sebep olduğu biliniyordu. Fakat 2008 yılında Finlandiya'da gerçekleşen EAAH salgınının primer etkeninin CV-A6 olduğunun tespit edilmesiyle bu görüş değişmiştir[52]. 2015 yılında yayınlanan bir derlemede CV-A6'nın majör etken olduğu salgınlardan bahsedilmiş ve aşı geliştirilmesi esnasında EV-A71 ve CV-A16'nın yanında CV-A6'nın da göz önünde

bulundurulması gerektiğine dikkat çekilmiştir (Tablo 3)[50]. Bizim çalışmamızda da *Enterovirus* tespit ettiğimiz 19 örneğin 15'inin sekans sonucu literatürle uyumlu olarak CV-A6, dördünün ki CV-A16 ile uyumlu bulunmuştur.

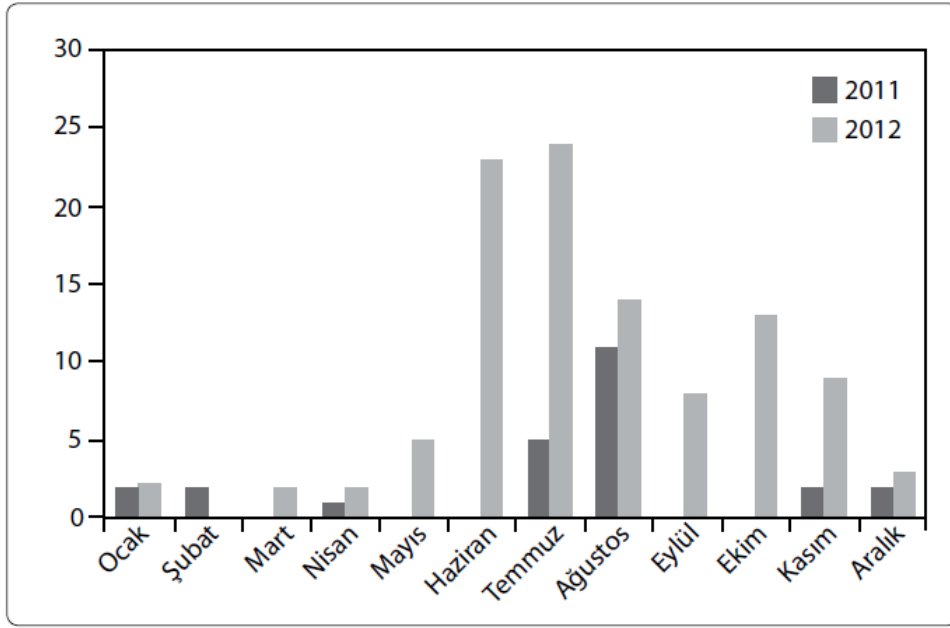
**Tablo 3. Son yıllarda görülen CV-A6 etkenli EAAH salgınları**

Study (year)	Countries/regions	Year	Age (average)	Main pathogens
<b>Europe</b>				
Blomqvist et al. (2010)	Finland	2008	2.5 months to 70 years (6 years)	CA6: 70.9% (83/117); CA10: 28.2% (33/117)
Mirand et al. (2012)	France	2010	5 weeks to 14 years (2.4 years)	CA6: 28.4% (40/141); CA10: 39.9% (56/141); CA16: 17.5% (25/141)
Montes et al. (2013)	Spain	2011	12–36 months (<4 years)	CA6: 90.0% (27/30); CA10: 6.7% (2/30)
<b>America</b>				
CDC report (2012)	The USA	2011–2012	63% < 2 years, 24% adults	CA6: 73.5% (25/34)
Fonseca et al. (2014)	Cuba	2011–2013	9 months to 8 years (1.8 years)	CA6: 75.0% (9/12); EV71: 16.7% (2/12)
<b>Asia</b>				
Wu et al. (2010)	Singapore	2009	66% <5 years	CA6: 23.5% (12/51); EV71: 21.6% (11/51); CA10: 11.8% (6/51)
Fujimoto et al. (2012)	Japan	2011	NA	CA6: 79.6% (74/93)
Puenpa J, et al. (2013)	Thailand	2012	4 days to 54 years (2.4 years)	CA6: 32.9% (221/672); EV71: 9.2% (62/672); CA16: 9.2% (62/672)
Wei SH, et al. (2011)	Taiwan	2010	0–44 years	CA6: 47.3% (130/275); CA16: 40.0% (110/275)
<b>Mainland China</b>				
Lu et al. (2014)	Guangdong Province	2013	NA	CA6:60.3% (483/800); EV71:14.8% (119/800); CA16:11.1% (89/800)
Li et al. (2014)	Shenzhen	2013	<5 years	CA6: 47.8% (96/201); EV71: 18.9% (38/201); CA10: 16.4 (33/201)
Wei et al. (2014)	Fujian Province	2011–2013	<4 years	CA6: 48.5% (182/375)
Hongyan et al. (2014)	Beijing	2013	2 months to 20 years (1.8 years)	CA6:43.1% (56/130); EV71: 14.6% (19/130); CA10: 4.6% (6/130)
Han et al. (2014)	Changchun	2013	<5 years	CA6: 66.9% (101/220); EV71: 19.2% (42/220); CA16: 5.9% (13/220)

\*Bian, Lianlian, et al. Coxsackievirus A6: a new emerging pathogen causing hand, foot and mouth disease outbreaks worldwide. Expert review of anti-infective therapy 13.9 (2015): 1061-1071.

El ayak ağız hastalığı yıl içerisinde sürekli görülebilir. Tayvan, Malezya ve Singapur gibi subtropikal ve tropikal iklimi olan ülkelerde EAAH 'nın görülme sıklığı yılda iki sefer

artış göstererek pik yapar. Finlandiya, Japonya, Çin'in kuzey bölgeleri ve Türkiye gibi daha yüksek enlemlerdeki ülkelerde ise yıl içerisinde yaz veya sonbaharda tek bir artış gösterir [46, 93, 94]. Ülkemizde EAAH için sürveyans sistemi olmamakla birlikte, bireysel olarak yapılmış çalışmalarda EAAH sıklığının yaz aylarında arttığı gösterilmiştir(Şekil 14) [95-97]. Çalışmamızın sonucunda Türkiye'deki diğer çalışmalara paralel olarak EAAH vakalarının çoğunluğunun (%67) yaz aylarında hastanemize başvurduğu görülmüştür.



**Şekil 14. 2011-2012 yılları arasında Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde tanısı konulan EAAH vakalarının aylara göre dağılımı**

\*Uğraş, Meltem, et al. İki yıllık periyot içinde el ayak ağız hastalığı olan çocukların değerlendirilmesi. J Kartal TR 25 (2014)

El ayak ağız hastalığı ile ilgili yapılmış geniş çaplı epidemiyolojik çalışmalara bakıldığında erkek çocuklarda görülme oranının kız çocuklara göre 1,5-2 kat fazla olduğu görülmektedir[94, 98]. Bu çalışmada da erkek/kız oranı 16/11 'dir. Bu bulgu çalışmanın yayınlanan verilerle uyumlu olduğunu göstermektedir.

El ayak ağız hastalığı sıklıkla beş yaşın altındaki çocukları etkilemektedir. Yapılan çalışmalara bakıldığında salgınlar sırasında etkilenen bireylerin yarısından fazlasının 1 ile 3 yaş arasında olduğu görülmektedir[94, 99]. Çalışmamıza dâhil edilen 27 çocuğun 21'inin yaşı 1 ile 3 arasında bulunmuştur (%78).

Boğaz sürüntüsü, ciltteki döküntülerden sürüntü, rektal sürüntü ve gaita örneği enterovirüslerin tespitinde ve izolasyonunda kullanılabilir. İnfeksiyon sonrasında virüs barsaklardan haftalarca atılmaya devam edebildiği için o anki infeksiyonu göstermede en güvenilir örneklerin döküntü olduğu bildirilmiştir [12]. İki ayrı bölgeden örnek alınması (boğaz ve cilt döküntüsü gibi) etkenin yakalanma olasılığını artırmaktadır[100]. Bizim çalışmamızda da rutin olarak hem boğaz hem cilt döküntülerinden eş zamanlı sürüntü örneği alınmış ve 27 hastanın 19'unda Vero E6 hücre kültürlerinde sitopatik etki gözlenmiş ve PCR ile *Enterovirus* tespit edilmiştir.

Klinik örneklerin hücre kültürüne ekilerek virüsün izole edilmesi ve ardından isimlendirme işlemlerinin yapılması halen altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir[12]. Tek etkene yönelik RT-PCR'lar olduğu gibi EV-A71, CV-A16 ve CV-A6'yu aynı anda tespit edebilecek mütipleks PCR'lar da geliştirilmiştir[101]. Hücre kültüründe virüs izolasyona gerek kalmadan hasta örneğinden direkt çalışılabilen PCR ve sekanslama metodları da yayınlanmıştır [102, 103]. Çalışmamızda hem pan-enterovirüs hem de EV-A71, CV-A16 ve CV-A6 için ayrı PCR uygulamaları geliştirilmiş ve PCR ürünlerinin baz dizileri sekanslanarak serotiplendirme yapılmıştır.

El ayak ağız hastalığı genellikle hafif seyretmekte ve bu sebeple spesifik bir tedavi önerisi geliştirilmemektedir. Ağrı ve ateş için semptomatik tedavi uygulanabilir. Dehidratasyonu olan çocuklarda sıvı replasmanı için hospitalizasyon gerekebilir. Nörolojik ve kardiyovasküler komplikasyonlarla seyreden ağır vakalarda komplikasyona göre tedavi belirlenir ve yoğun bakım gerekebilir[1, 3]. Çalışmamızdaki hastaların klinik seyri destek uygulamalarıyla komplikasyonsuz sonuçlanmıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada 2015-2017 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Pediatrik Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği'ne döküntü şikâyetiyle başvuran EAAH şüpheli hastaların cilt lezyonlarından alınan 27 sürüntü örneğine virolojik incelemeler yapılmıştır. 2015-2016 yıllarında alınan 15 örneğin 12'sinin Vero hücrelerinde viral kültürleri gerçekleştirilmiş ve pan-enterovirüse özgü nested PCR ile *Enterovirus* varlığı örneklerde tespit edilmiştir. Örneklerin serotipik identifikasyonunun yapılabilmesi için yapılan sekanslama çalışmaları sonucunda bu 12 olgunun CV-A6 tarafından oluşturulduğu tespit edilmiştir. Benzer yöntemle 2017 yılında alınan 12 hasta örneğinin 7'sinde *Enterovirus* tespit edilmiş ve sekanslama sonucunda bu 7 örneğin 3'ünün CV-A6, 4'ünün ki ise CV-A16 olduğu görülmüştür. Dünyada EAAH için en sık görülen etkenler CV-A16 ve EV-A71 olmasına rağmen, bizim hasta grubumuzda sadece 4 hastanın (%14,8) etkeninin CV-A16 serotipinde olduğu tespit edilmiş ve hiçbir olguda EV-A71'e rastlanmamıştır. Son yıllarda CV-A6'nin major etken olduğu EAAH salgınları dünyanın değişik bölgelerinden bildirilmiştir. Bu yönüyle çalışmamız literatürdeki verilerle uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızın en önemli özelliği; EAAH üzerinde ülkemizde yapılan en detaylı virolojik çalışmayı temsil etmesi ve yine Türkiye'de ilk olarak EAAH etkeni olan *Enterovirus* serotiplerinin kimliklendirilmesini rapor etmesidir. Örneklem sayısının daha fazla olduğu, hastaların klinik takibinin yapıldığı ve etkenin belirlendiği daha geniş çaplı epidemiyolojik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

7.

## 7. KAYNAKLAR

1. Kliegman, S. and S.S. Geme, *Nelson Textbook of Pediatrics, 2-Volume Set*. Medicine, 2015.
2. Masters, B.R., *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, (2015) Eds: John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser*. ISBN: 13-978-1-4557-4801-3, Elsevier Saunders. 2016, Springer.
3. Romero, J.R. and M.M. Torchia, *Hand, foot, and mouth disease and herpangina: an overview*. 2017, [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).
4. *The Picornavirus Pages*. 2017; Available from: <http://www.picornaviridae.com/>.
5. Murray, P.R., K.S. Rosenthal, and M.A. Pfaller, *Medical microbiology*. 2015: Elsevier Health Sciences.
6. Solomon, T., et al., *Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71*. The Lancet infectious diseases, 2010. **10**(11): p. 778-790.
7. Rossmann, M.G., et al., *Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses*. Nature, 1985. **317**(6033): p. 145-153.
8. Robinson, C., F.W. Doane, and A. Rhodes, *Report of an outbreak of febrile illness with pharyngeal lesions and exanthem: Toronto, summer 1957— isolation of group A coxsackie virus*. Canadian Medical Association Journal, 1958. **79**(8): p. 615.
9. Midgley, C.M., et al., *Severe respiratory illness associated with enterovirus D68—Missouri and Illinois, 2014*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2014. **63**(36): p. 798-799.
10. Prevention, C.f.D.C.a. *Enterovirus D68*. July 19, 2016 [cited 2017 Aug 20, 2017]; Available from: <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/ev-d68.html>.
11. Alsop, J., T. Flewett, and J. Foster, *"Hand-foot-and-mouth disease" in Birmingham in 1959*. British medical journal, 1960. **2**(5214): p. 1708.
12. Organization, W.H., *A guide to clinical management and public health response for hand, foot and mouth disease (HFMD)*. 2011, Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific.
13. Schmidt, N.J., E.H. Lennette, and H.H. Ho, *An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system*. Journal of Infectious Diseases, 1974. **129**(3): p. 304-309.
14. Hii, Y.L., J. Rocklöv, and N. Ng, *Short term effects of weather on hand, foot and mouth disease*. PLoS one, 2011. **6**(2): p. e16796.
15. Khetsuriani, N., et al., *Enterovirus surveillance—United States, 1970–2005*. MMWR Surveill Summ, 2006. **55**(8): p. 1-20.
16. Deibel, R., L.L. Gross, and D.N. Collins, *Isolation of a new enterovirus*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1975. **148**(1): p. 203-207.
17. Chonmaitree, T., et al., *Enterovirus 71 infection: report of an outbreak with two cases of paralysis and a review of the literature*. Pediatrics, 1981. **67**(4): p. 489-493.
18. Goldberg, F. and L.B. Weiner, *Cerebrospinal fluid white blood cell counts and lactic acid dehydrogenase in enterovirus type 71 meningitis*. Clinical pediatrics, 1981. **20**(5): p. 327-330.
19. Kennett, M., et al., *Enterovirus type 71 infection in Melbourne*. Bulletin of the World Health Organization, 1974. **51**(6): p. 609.
20. Gilbert, G.L., et al., *Outbreak of enterovirus 71 infection in Victoria, Australia, with a high incidence of neurologic involvement*. The Pediatric infectious disease journal, 1988. **7**(7): p. 484-487.
21. Blomberg, J., et al., *New ontero-virus type associated with epidemic of aseptic meningitis and/or hand, foot and mouth disease*. New ontero-virus type associated with epidemic of aseptic meningitis and/or hand, foot and mouth disease., 1974.

22. TAGAYA, I. and K. TACHIBANA, *Epidemic of hand, foot and mouth disease in Japan, 1972-1973: difference in epidemiologic and virologic features from the previous one*. Japanese Journal of Medical Science and Biology, 1975. **28**(4): p. 231-234.
23. Hagiwara, A., I. Tagaya, and T. Yoneyama, *Epidemic of hand, foot and mouth disease associated with enterovirus 71 infection*. Intervirology, 1978. **9**(1): p. 60-63.
24. Ishimaru, Y., et al., *Outbreaks of hand, foot, and mouth disease by enterovirus 71. High incidence of complication disorders of central nervous system*. Archives of disease in childhood, 1980. **55**(8): p. 583-588.
25. TAGAYA, I., R. TAKAYAMA, and A. HAGIWARA, *A large-scale epidemic of hand, foot and mouth disease associated with enterovirus 71 infection in Japan in 1978*. Japanese Journal of Medical Science and Biology, 1981. **34**(3): p. 191-196.
26. Shindarov, L., et al., *Epidemiological, clinical, and pathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis-like disease caused by enterovirus 71*. Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology, 1979. **23**(3): p. 284-295.
27. Chumakov, M., et al., *Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria*. Archives of virology, 1979. **60**(3): p. 329-340.
28. Nagy, G., et al., *Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978*. Archives of virology, 1982. **71**(3): p. 217-227.
29. Samuda, G.M., et al., *Monoplegia caused by Enterovirus 71: an outbreak in Hong Kong*. The Pediatric infectious disease journal, 1987. **6**(2): p. 206-208.
30. Hayward, J.C., et al., *Outbreak of poliomyelitis-like paralysis associated with enterovirus 71*. The Pediatric infectious disease journal, 1989. **8**(9): p. 611-615.
31. Chan, L., et al., *Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease*. Clinical infectious diseases, 2000. **31**(3): p. 678-683.
32. Ho, M., et al., *An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan*. New England Journal of Medicine, 1999. **341**(13): p. 929-935.
33. McMinn, P., et al., *Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Western Australia*. Clinical Infectious Diseases, 2001. **32**(2): p. 236-242.
34. Nolan, M., et al., *Survival after pulmonary edema due to enterovirus 71 encephalitis*. Neurology, 2003. **60**(10): p. 1651-1656.
35. AbuBakar, S., et al., *Enterovirus 71 outbreak, Brunei*. Emerging infectious diseases, 2009. **15**(1): p. 79.
36. Zhang, Y., et al., *An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China*. Journal of Clinical Virology, 2009. **44**(4): p. 262-267.
37. Lin, T.-Y., et al., *Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: occurrence and recognition*. Emerging infectious diseases, 2003. **9**(3): p. 291.
38. Podin, Y., et al., *Sentinel surveillance for human enterovirus 71 in Sarawak, Malaysia: lessons from the first 7 years*. BMC public health, 2006. **6**(1): p. 180.
39. Jee, Y., et al., *Genetic analysis of the VP1 region of human enterovirus 71 strains isolated in Korea during 2000*. Archives of virology, 2003. **148**(9): p. 1735-1746.
40. Ryu, W.-S., et al., *Clinical and etiological characteristics of enterovirus 71-related diseases during a recent 2-year period in Korea*. Journal of clinical microbiology, 2010. **48**(7): p. 2490-2494.
41. Chan, K.P., et al., *Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore*. Emerging infectious diseases, 2003. **9**(1): p. 78.
42. Van Tu, P., et al., *Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2005*. Emerging infectious diseases, 2007. **13**(11): p. 1733.
43. van der Sanden, S., et al., *Epidemiology of enterovirus 71 in the Netherlands, 1963 to 2008*. Journal of clinical microbiology, 2009. **47**(9): p. 2826-2833.

44. Bible, J.M., et al., *Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006*. Journal of clinical microbiology, 2008. **46**(10): p. 3192-3200.
45. Witsø, E., et al., *Asymptomatic circulation of HEV71 in Norway*. Virus research, 2007. **123**(1): p. 19-29.
46. Blomqvist, S., et al., *Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland*. Journal of Clinical Virology, 2010. **48**(1): p. 49-54.
47. Bracho, M.A., et al., *Enterovirus co-infections and onychomadesis after hand, foot, and mouth disease, Spain, 2008*. Emerging infectious diseases, 2011. **17**(12): p. 2223.
48. Ooi, E.-E., et al., *Seroepidemiology of human enterovirus 71, Singapore*. Emerging infectious diseases, 2002. **8**(9): p. 995.
49. Lu, C.Y., et al., *Incidence and case-fatality rates resulting from the 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan*. Journal of medical virology, 2002. **67**(2): p. 217-223.
50. Bian, L., et al., *Coxsackievirus A6: a new emerging pathogen causing hand, foot and mouth disease outbreaks worldwide*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015. **13**(9): p. 1061-71.
51. Mirand, A., et al., *Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study*. Clinical Microbiology and Infection, 2012. **18**(5).
52. Österback, R., et al., *Coxsackievirus A6 and hand, foot, and mouth disease, Finland*. Emerging infectious diseases, 2009. **15**(9): p. 1485.
53. Wu, Y., et al., *The largest outbreak of hand; foot and mouth disease in Singapore in 2008: the role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains*. Int J Infect Dis, 2010. **14**(12): p. e1076-81.
54. Chen, Y.-J., et al., *Comparative genomic analysis of coxsackievirus A6 strains of different clinical disease entities*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52432.
55. Fujimoto, T., et al., *Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011*. Emerging infectious diseases, 2012. **18**(2): p. 337.
56. Puenpa, J., et al., *Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Thailand, 2012*. Emerging infectious diseases, 2013. **19**(4): p. 641.
57. Han, J.-F., et al., *Hand, foot, and mouth disease outbreak caused by coxsackievirus A6, China, 2013*. Journal of Infection, 2014. **69**(3): p. 303-305.
58. Control, C.f.D. and Prevention, *Notes from the field: severe hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A6-Alabama, Connecticut, California, and Nevada, November 2011-February 2012*. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 2012. **61**(12): p. 213.
59. Fonseca, M.C., et al., *Coxsackievirus A6 and enterovirus 71 causing hand, foot and mouth disease in Cuba, 2011–2013*. Archives of virology, 2014. **159**(9): p. 2451-2455.
60. Sinclair, C., et al., *Atypical hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A6 infection, Edinburgh, United Kingdom, January to February 2014*. Euro Surveill, 2014. **19**(12): p. 20745.
61. Ooi, M.H., et al., *Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71*. The Lancet Neurology, 2010. **9**(11): p. 1097-1105.
62. Organization, W.H., *Polio laboratory manual*. 2004.
63. Ooi, M.H., et al., *Evaluation of different clinical sample types in diagnosis of human enterovirus 71-associated hand-foot-and-mouth disease*. Journal of clinical microbiology, 2007. **45**(6): p. 1858-1866.
64. Oberste, M.S., et al., *Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1*. Journal of clinical microbiology, 1999. **37**(5): p. 1288-1293.
65. Ooi, M.H., et al., *Identification and validation of clinical predictors for the risk of neurological involvement in children with hand, foot, and mouth disease in Sarawak*. BMC infectious diseases, 2009. **9**(1): p. 3.
66. Huang, C.-C., et al., *Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection*. New England Journal of Medicine, 1999. **341**(13): p. 936-942.

67. Chang, L.-Y., et al., *Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot, and mouth disease*. The Lancet, 1999. **354**(9191): p. 1682-1686.
68. Wang, S.-M., et al., *Pathogenesis of enterovirus 71 brainstem encephalitis in pediatric patients: roles of cytokines and cellular immune activation in patients with pulmonary edema*. The Journal of infectious diseases, 2003. **188**(4): p. 564-570.
69. Lu, H.-K., et al., *Prognostic implications of myoclonic jerk in children with enterovirus infection*. Journal of microbiology, immunology, and infection= Wei mian yu gan ran za zhi, 2004. **37**(2): p. 82-87.
70. Fang, Y., et al., *Risk factors of severe hand, foot and mouth disease: a meta-analysis*. Scandinavian journal of infectious diseases, 2014. **46**(7): p. 515-522.
71. Hopper, S.M., et al., *Topical lidocaine to improve oral intake in children with painful infectious mouth ulcers: a blinded, randomized, placebo-controlled trial*. Annals of emergency medicine, 2014. **63**(3): p. 292-299.
72. Lin, T.-Y., et al., *The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management*. Clinical Infectious Diseases, 2002. **34**(Supplement\_2): p. S52-S57.
73. WANG, J.N., et al., *Critical management in patients with severe enterovirus 71 infection*. Pediatrics International, 2006. **48**(3): p. 250-256.
74. Wang, S.-M., et al., *Clinical spectrum of enterovirus 71 infection in children in southern Taiwan, with an emphasis on neurological complications*. Clinical Infectious Diseases, 1999. **29**(1): p. 184-190.
75. Wang, S.-M. and C.-C. Liu, *Enterovirus 71: epidemiology, pathogenesis and management*. Expert review of anti-infective therapy, 2009. **7**(6): p. 735-742.
76. Ruan, F., et al., *Risk factors for hand, foot, and mouth disease and herpangina and the preventive effect of hand-washing*. Pediatrics, 2011. **127**(4): p. e898-e904.
77. Zhu, F.-C., et al., *Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjutant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. The Lancet, 2013. **381**(9882): p. 2024-2032.
78. Li, R., et al., *An inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy children*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(9): p. 829-837.
79. Zhu, F., et al., *Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(9): p. 818-828.
80. Ge, S., et al., *Specific primer amplification of the VP1 region directed by 5' UTR sequence analysis: enterovirus testing and identification in clinical samples from hand-foot-and-mouth disease patients*. Journal of virological methods, 2013. **193**(2): p. 463-469.
81. Andreoni, A.R. and A.S. Colton, *Coxsackievirus B5 associated with hand-foot-mouth disease in a healthy adult*. JAAD Case Rep, 2017. **3**(2): p. 165-168.
82. Bucak, İ.H., et al., *Pediatric ve dermatoloji kliniklerinin ortak tanısı: El ayak ağız hastalığı olan otuz dokuz hastanın prospektif izlemi*. 2017.
83. Demirhan, B.İ., et al., *On Dört Yaşındaki Bir Hastada El ayak ağız Hastalığı: Bir Olgu Sunumu*. Turkish Journal of Family Medicine and Primary Care, 2016. **10**(1).
84. Ekinci, A.P., E. Erbudak, and C. Baykal, *2012 yılı Haziran ayında İstanbul'da el-ayak-ağız hastalığı sıklığında önemli artış/A significant increase in the frequency of hand-foot-mouth disease in Istanbul in June 2012*. Turkderm, 2013. **47**(4): p. 192.
85. ÇÖL, D., et al., *El, Ayak, Ağız Hastalığını Takiben Gelişen Onikomadezis*. Türkiye Klinikleri Journal of Pediatrics, 2014. **23**(3): p. 146-149.
86. Büyükcım, A., et al., *El, Ayak, Ağız Hastalığı Seyrinde Tırnak Matriks Arresti: Onikomadezis Olgularının Değerlendirilmesi*. Journal of Pediatric Infection/Cocuk Enfeksiyon Dergisi, 2015. **9**(2).
87. Akpolat, N.D. and N. Karaca, *Nail changes secondary to hand-foot-mouth disease*. The Turkish Journal of Pediatrics, 2016. **58**(3).
88. Demirhan, B.İ., et al., *Hand-foot-mouth disease in 14 years-old: A Case Report*. Turkish Journal of Family Medicine & Primary Care, 2016. **10**(1): p. 49-51.

89. Sun, Z., et al., *Epidemiological characterizations, pathogen spectrum and molecular characteristics of Coxsackievirus A16 from patients with HFMD in Yantai, Shandong, China between 2011 and 2015*. Hum Vaccin Immunother, 2017: p. 1-8.
90. Du, J., et al., *Changing aetiology of hand, foot and mouth disease in Linyi, China, 2009-2011*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(1): p. O47-9.
91. Weng, Y., et al., *Serotyping and Genetic Characterization of Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD)-Associated Enteroviruses of No-EV71 and Non-CVA16 Circulating in Fujian, China, 2011-2015*. Med Sci Monit, 2017. **23**: p. 2508-2518.
92. Ogi, M., et al., *Characterization of genome sequences and clinical features of coxsackievirus A6 strains collected in Hyogo, Japan in 1999-2013*. J Med Virol, 2017. **89**(8): p. 1395-1403.
93. Wang, P., et al., *Seasonal modeling of hand, foot, and mouth disease as a function of meteorological variations in Chongqing, China*. Int J Biometeorol, 2017.
94. Huang, X., et al., *Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Henan, China, 2008-2013*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 8904.
95. Uğraş, M., et al., *İki yıllık periyot içinde el ayak ağız hastalığı olan çocukların değerlendirilmesi*. J Kartal TR, 2014. **25**: p. 34-8.
96. Yorulmaz, A. and N.K. Onat, *Clinical and Demographic Properties of Hand-Foot and Mouth Disease*. JOURNAL OF CLINICAL AND ANALYTICAL MEDICINE, 2017. **8**(3): p. 219-222.
97. Topkarcı, Z., *A clinical and demographic properties of hand-foot-mouth disease*. Medical Journal of Bakirköy, 2013. **9**(1): p. 12-15.
98. Sun, Z., et al., *Epidemiological Characterizations, Pathogen Spectrum and Molecular Characteristics of Coxsackievirus A16 from Patients with HFMD in Yantai, Shandong, China between 2011 and 2015*. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2017(just-accepted): p. 00-00.
99. Montes, M., et al., *Hand, foot, and mouth disease outbreak and coxsackievirus A6, northern Spain, 2011*. Emerging infectious diseases, 2013. **19**(4): p. 676.
100. Ooi, M.H., et al., *Evaluation of different clinical sample types in diagnosis of human enterovirus 71-associated hand-foot-and-mouth disease*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(6): p. 1858-66.
101. Puenpa, J., et al., *Development of single-step multiplex real-time RT-PCR assays for rapid diagnosis of enterovirus 71, coxsackievirus A6, and A16 in patients with hand, foot, and mouth disease*. J Virol Methods, 2017. **248**: p. 92-99.
102. Nguyen, A.T., et al., *Development and evaluation of a non-ribosomal random PCR and next-generation sequencing based assay for detection and sequencing of hand, foot and mouth disease pathogens*. Virol J, 2016. **13**: p. 125.
103. WANG, C.H., et al., *An Improved Barcoded Oligonucleotide Primers-based Next-generation Sequencing Approach for Direct Identification of Viral Pathogens in Clinical Specimens*. Biomedical and Environmental Sciences, 2017. **30**(1): p. 22-34.