



Viral Ensefalit / Menenjit Şüpheli Hastalarda, Beyin Omurilik Sıvısı Örneklerinde Herpes Simplex Virüslerinin Real-Time PZR ile Araştırılması

Investigation of Herpes Simplex Virus by Real-Time PCR in Cerebrospinal Fluid Samples of the Patients with Suspected Viral Encephalitis and Meningitis

Hüseyin Agah Terzi¹, Özlem Aydemir¹, Engin Karakeçe¹, Mehmet Köroğlu², Mustafa Altındiş²

¹Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya, Türkiye.

²Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya, Türkiye.

Özet

Amaç: Aseptik menenjit ve ensefalit olarak iki genel kategoride incelenen santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonlarının etiolojisinde insan herpes virüslerinin önemli rolü vardır. Bu çalışmada, bölgemizde viral SSS enfeksiyonları düşünülen olgulardan gönderilen beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinde Herpes Simplex virüsü (HSV-1/2) sıklığı ve incelenen BOS örneklerinin biyokimyasal özelliklerini ve aynı zamanda bakteriyolojik kültür üremelerinin de irdelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal-Metot: Ocak 2016-Aralık 2017 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen 110 adet BOS örneği çalışma kapsamında retrospektif olarak değerlendirildi. Artus® HSV ½ QS-RGQ kiti ve Rotor-Gene Q 5Plex HRM (Qiagen, Hamburg, Almanya) real-time PZR sistemi kullanılarak BOS örnekleri HSV yönünden kalitatif olarak incelendi. BOS örneklerinde protein ve glukoz ölçüm değerleri de kaydedilmiştir. Ayrıca gönderilen BOS örneklerinin eş zamanlı olarak bakteriyolojik kültürleri de yapıldı.

Bulgular: Laboratuvarımıza gönderilen örneklerin 5'inde (%4,5) HSV-1 pozitif saptanırken, hiçbir örnekte HSV-2 tespit edilmedi. BOS'un biyokimyasal parametreleri değerlendirildiğinde; örneklerin 42'sinde (%38) BOS glukoz düzeyleri, 27'sinde ise (%25) ise BOS protein değerleri normal düzeylerde saptandı. HSV-1 pozitif hastaların BOS glukoz düzeyi dördünde yüksek, protein düzeyi ise üç hastada yüksek bulundu. HSV ½ negatif olduğu tespit edilen 8 farklı örnekte kültürde üreme saptandı.

Sonuç: SSS enfeksiyonlarında mortalite ve morbidite oranı yüksek olduğundan etkenin çok hızlı tanımlanması sonrasında spesifik antiviral tedaviye başlanması hayati öneme sahiptir. Herpes virüslerinin neden olduğu ensefalit vakaları ile daha sık karşılaşılsa da diğer viral ve bakteriyel etkenler de akılda tutulmalıdır. Bu nedenle bir örnekte çok sayıda viral ve bakteriyel ajanın aynı anda ve kısa sürede saptanabildiği multiplex PZR paneli gibi moleküler testlerin gerekliliği ön plana çıkmaktadır.

Anahtar kelimeler: Herpes Simplex Virüs, SSS Enfeksiyonları, PZR

Abstract

Objective: Human herpes viruses have an important role in the pathogenesis of the central nervous system (CNS) infections separating two general category as aseptic meningitis and encephalitis. In this study we aimed to investigate the frequency of Herpes Simplex Virus (HSV-1/2) in cerebrospinal fluid (CSF), biochemical specifications and also bacteriological culture of CSF samples in suspected cases of viral infections of CNS in our region.

Material-Method: In this study, 110 CSF samples sent to our laboratory from patients with suspected CNS infection between January 2016- December 2017 were evaluated retrospectively. HSV-1/2 DNA presence was evaluated qualitatively with Real-time PCR technique by using Artus® HSV ½ QS-RGQ (Qiagen, Hamburg, Germany) kits on Rotor-Gene system (Qiagen, Hamburg, Germany). Also, protein and glucose levels in CSF samples were recorded. Furthermore bacteriological culture of CSF samples were evaluated simultaneously.

Results: While, HSV-1 DNA was detected by nucleic acid testing in 5 of the 110 patients (4.5%), HSV-2 DNA was not detected. The CSF glucose and protein levels were found normal in 42 (38%) and 27 (25%) patients, respectively. The CSF glucose levels of the patients, who were found to be positive for HSV-1 were high in four patients. Also CSF protein levels in HSV-1 positive group were detected high in 3 patients. HSV ½ negative 8 different samples were detected positive in bacteriological culture.

Conclusions: Because of the high mortality and morbidity rates in CNS infections, initiating of specific antiviral treatment after the rapid identification of the agent is crucial. Even though encephalitis caused by herpes viruses were seen more frequent, other viral and bacterial agents must be kept in mind. Therefore necessity of molecular methods are taking over like multiplex PCR which detects multiplexed viral and bacterial agents at the same time and in a short time.

Keywords: Herpes Simplex Virus, CNS Infections, PCR

Giriş

Viral santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları; menenjit, ensefalit, postenfeksiyöz ensefalomyelit ve yavaş ilerleyen nörolojik hastalıklar gibi pek çok farklı klinik tablo ile karşımıza çıkabilir. Bu klinik tablolar her yaşta görülebilmekte ve aseptik menenjit ve ensefalit olarak iki genel kategoride incelenmektedir. Enfeksiyonun tipine göre akut, subakut ya da kronik olabilen durumlara yol açabilmektedir (1).

Akut menenjit ve ensefalit enfeksiyonlarının etkenleri arasında Herpes Simplex Virüs (HSV) önemli bir yere sahiptir. Hızlı ilerleyen, ölüme veya kalıcı sekellere neden olabilecek şekilde ciddi seyir gösterebilen bu enfeksiyonların mutlaka erken tanı ve tedavisi gerekmektedir (2,3). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), bu enfeksiyonların tanısında yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip hızlı bir yöntem olarak tercih edilmektedir (4). Beyin omurilik sıvısında (BOS) PZR ile HSV DNA'nın saptanması, HSV ensefaliti tanısında altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (5).

Literatüre bakıldığında, ülkemizde bu konuda çok sayıda yayın olmadığı görülmektedir. Bölgemizde SSS enfeksiyonlarında HSV sıklığı ile ilgili veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, bölgemizde viral SSS enfeksiyonları düşünülen olgulardan gönderilen BOS örneklerinde HSV-1/2 sıklığı ve incelenen BOS örneklerinin biyokimyasal özelliklerini ve aynı zamanda bakteriyolojik kültür üremelerinin de irdelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal-Metot

Ocak 2016 ile Aralık 2017 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen viral ensefalit/menenjit şüpheli 110 hastanın BOS örneği çalışma kapsamında incelendi. BOS örneklerinden nükleik asit izolasyonu spin kolon yöntemi ile QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hamburg, Almanya) kullanılarak yapıldı. Artus® HSV ½ QS-RGQ kiti (Qiagen, Hamburg, Almanya) ve Rotor-Gene Q 5Plex HRM (Corbett Research 6000, Avusturalya) real-time PZR sistemi kullanılarak BOS örnekleri HSV-1/2 yönünden kalitatif olarak incelendi. Ayrıca HSV-1/2 istemiyle gönderilen BOS örneklerinin eş zamanlı olarak bakteriyolojik kültürleri de koyun kanlı agar, eozin metilen blue agar, çikolatamsı agara ekilerek, 24-48 saatlik inkübasyona bırakıldı. Üreyen kolonilerden tür tayini

ve antibiyotik duyarlılık testi VITEK 2 (BioMerieux, Fransa) ile yapıldı.

Bulgular

Laboratuvarımıza gönderilen toplam 110 örneğin 5'inde (% 4,5) HSV-1 pozitif saptanırken, HSV-2 hiçbir örnekte tespit edilmedi. HSV-1 pozitif hastaların BOS glukoz düzeyi dördünde yüksek, protein düzeyi ise üç hastada yüksek, iki hastada normal bulundu. (Tablo 1). Ayrıca HSV-1 pozitif tespit edilen 5 hastanın 4'ünün erişkin yaş grubunda olduğu görüldü.

BOS'un biyokimyasal parametreleri değerlendirildiğinde; örneklerin 42'sinde (%38) BOS Glukoz düzeyleri, 27'sinde ise (%25) ise BOS protein değerleri normal düzeylerde saptandı. Glukoz ve protein düzeyleri, genellikle yüksek düzeyde saptandı [glukoz; 51 örnek (%46), protein; 83 örnek (%75)]. Örneklerin BOS Biyokimyasal parametrelerine göre dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. BOS'ta HSV-1 DNA pozitif saptanan hastaların biyokimyasal verileri

Hasta No	BOS Glukoz (mg/dl)	Eş Zamanlı Kan Glukoz (mg/dl)	BOS Protein (mg/dl)
1	71	93	31
2	78	122	56
3	203	354	51
4	89	224	29
5	47	91	51

Tablo 2. BOS örneklerinin glukoz ve protein düzeylerine göre dağılımı

Parametre	Normal değerler (mg/dl)	Normal		Düşük		Yüksek	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
Glukoz	40-70	42	38	17	15	51	46
Protein	15-45	27	25	-	-	83	75

Tablo 3. Bakteri üreyen BOS kültürleri ve biyokimyasal özellikleri

Hasta No	Etken	BOS Glukoz (mg/dl)	BOS Protein (mg/dl)	Lökosit-PNL	Hücre sayısı
1	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-
2	<i>Escherichia coli</i>	139	532	az sayıda	40
3	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	578	çok sayıda	1000 ≤
4	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	648	çok sayıda	1000 ≤
5	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	134	222	çok sayıda	1000 ≤
6	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	618	çok sayıda	1000 ≤
7	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	12	744	görülmedi	görülmedi
8	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	91	35	-	-

HSV-1/2 negatif olduğu tespit edilen 8 farklı örneğin 5'inde *Streptococcus pneumoniae*, birer örnekte *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, ve *Listeria monocytogenes* üremesi saptandı. Kültürde üremesi olan örneklerin BOS protein düzeyleri çok yüksek saptanırken, glukoz değerleri çoğunlukla düşük düzeyde saptandı (Tablo 3).

Tartışma

HSV; primer herpetik gingivostomatit, tekrarlayan orofasiyal herpes, genital herpes, egzema herpetikum, herpes gladyatorum, herpetik dolama, oküler herpes, neonatal herpes ve SSS'de ensefalit ve menenjit gibi hastalıklara sebep olabilen yaygın bir enfeksiyon etkenidir (6). Yetişkinlerde HSV ensefaliti, nadiren HSV tip 1 ile ilişkili olan bir durumdur ve akut fokal nekrotizan ensefalit ile sonuçlanır ve tedavi edilmezse %70 gibi yüksek mortalite oranına sahiptir. Bunun aksine HSV menenjiti genellikle HSV-2 ile ilişkilidir ve sınırlayıcı özellikte olup, tedaviye gerek kalmadan kendiliğinden düzelerek, nadiren hafif nörolojik sekellerle sonuçlanır (5,7).

Akut HSV ensefaliti, önceleri morbiditesi çok yüksek bir hastalık iken, Asiklovir'in kullanımıyla tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiş ve HSV ensefaliti ile ilişkili morbidite oranı son yıllarda % 5-15'e kadar düşmüştür (8). Antiviral ilaç kullanımı, HSV'ye bağlı mortaliteyi erken tanı ve tedavide daha etkin olarak azaltmaktadır. Kötü prognozlu HSV ensefalitine ise hastalığın teşhisinde ve tedavisinde gecikme olduğu zaman rastlanılmaktadır (9). Bu nedenle SSS enfeksiyonunun en kısa sürede tanımlanması, etkenin belirlenip tedavinin başlanması büyük önem arz etmektedir. PZR, bu enfeksiyonların laboratuvar tanısında kullanılan altın standart yöntemdir (5). HSV'nin ensefalit/menenjit şüpheli vakalardaki etyolojik rollerini araştırdığımız bu çalışmada, HSV DNA'sının gösterilmesini sağlayan real-time PZR yöntemi kullanılmıştır.

Aseptik menenjit ve ensefalit olmak üzere iki grupta incelenen bu enfeksiyonların önemli bir kısmında etken tanımlanamamaktadır. Viral etkenlerin tanımlanmasındaki bu eksiklik, bazı vakalarda morbidite ve mortalite yönünden önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (5,6). Viral menenjit vakaları için bugüne kadar tanımlanan en yaygın etkenler olarak Enteroviruslar ilk sırada yer alırken, geri kalan vakaların önemli bir kısmındaki etkenler; sırasıyla HSV-2, VZV ve HSV-1 oluşturmaktadır (10). HSV-2'nin sorumlu tutulduğu menenjit tabloları, daha çok genital herpes enfeksiyonları sonrası reaktivasyonla oluşan sınırlı bulgulara sahip ve kendiliğinden düzelebilen özellikte olmaktadır (11). Viral ensefalitler için bu güne kadar elde edilen bulgulara göre en sık karşılaşılan etyolojik ajanın HSV-1 olduğu gösterilmiştir. Yıllık insidansı 1-4/1 milyon olan HSV-1; ensefalit vakalarının %0,8-30'unda, nekrotizan ensefalitlerin %20-75'inde etken olarak rapor edilmiştir (12-13). Ülkemizde, Gültepe ve ark. (14) ensefalit düşünülen olguların %5'inde HSV DNA varlığını göstermişlerdir. Son yıllardaki bazı araştırma sonuçları ise; HSV-1 ile beraber, VZV, Enteroviruslar ve İnfluenza virus A gibi ajanların başlıca viral etkenler olduğunu göstermektedir (15). HSV-2'ye bağlı gelişen ensefalit ise özellikle infantlar olmak üzere

her yaş grubunda nadiren ciddi ensefalit tablolarına neden olabilmektedir (11).

HSV'ye bağlı SSS enfeksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, Bhaskaran ve ark. (16) 1663 BOS örneğinde %0,9 oranında HSV DNA pozitif bulmuşlardır. Bir başka çalışmada viral SSS enfeksiyonu düşünülen 662 hastanın BOS örneğinde %2,87 oranında HSV-1 DNA, %1,5 oranında HSV-2 DNA pozitif saptamıştır (17). García-Bardeci ve ark. (18) 330 BOS örneğinde %1,2 oranında HSV-1 DNA, %0,3 oranında HSV-2 DNA pozitif bulmuşlardır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise elde edilen verilere göre HSV DNA pozitiflik oranının %1-19 arasında saptandığı gözlenmektedir (15,19-22). Çalışmamızda ise, literatürle uyumlu olarak 110 BOS örneğinin beşinde (%4,5) HSV-1-DNA pozitif olarak saptanmıştır. Ancak HSV DNA'nın enfeksiyonun ilerleyen günlerinde saptanmasındaki zorluk veya hastalara asiklovir tedavisi başlandıktan sonra örnek gönderilmesi gibi sebepler, çalışmamızdaki HSV-DNA saptanma oranlarını düşürmüş olabilir.

HSV-1 ensefalitlerinin literatüre göre daha çok erişkinlerde olduğu bildirilmiştir (23). Pişkin ve ark.'nın (24) bir çalışmasında ise incelenen olgularda belirgin bir cinsiyet hakimiyeti (%54,3 erkek, %46,9 kadın) tespit etmediklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise BOS örneğinde HSV-1 DNA varlığının belirlendiği 5 hastadan 2'si 40-60 yaş arasında, 2 hasta 60 yaşın üzerinde, 1 hasta ise 20 yaş altı bulundu. Pozitiflik saptanan olguların yaş ortalaması ise 53,2 olarak belirlenmiştir, beş hastanın dördünü kadın hastalar oluşturmuştur. Elde ettiğimiz verilere göre bu virüsün yol açtığı ensefalitler, çoğunlukla erişkin enfeksiyonu olarak geçmektedir.

BOS'un incelenmesinde glukoz normal, protein normal/ artmış saptanması olası viral ensefalit düşündürmektedir (25). Çalışmamızda BOS'un biyokimyasal parametreleri değerlendirildiğinde; örneklerin 42'sinde (%38) BOS glukoz düzeyleri, 27'sinde (%25) ise BOS protein değerleri normal düzeylerde saptandı. Glukoz ve protein düzeyleri klavuzlardan farklı olarak çoğunlukla yüksek düzeyde saptandı (sırasıyla 51 (%46) ve 83 (%75) hastada). HSV-1 pozitif olan 4 hastanın BOS glukoz düzeyi yüksek bulundu. Protein düzeyi ise 2 hastada normal, 3 hastada yüksek bulundu.

Sonuç

İnsan Herpes virüslerinin neden olduğu ensefalit vakaları ile daha sık karşılaşılsa da diğer viral ve bakteriyel etkenler de akılda tutulmalıdır. SSS enfeksiyonlarında mortalite ve morbidite oranı yüksek olduğundan etkenin çok hızlı tanımlanması hayati öneme sahiptir. Maliyetin yüksek olması ve gerektirdiği laboratuvar donanımı nedeni ile henüz tüm mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu testler rutin olarak çalışılmamaktadır. Ancak, bu testlerin maliyeti yüksek olsa da hayatı tehdit eden bir durum söz konusu olduğundan, ilgili donanımına sahip laboratuvarlar veya belirli merkezler tarafından bu testlerin hızlı bir şekilde çalışılması sağlanmalıdır.

Kaynaklar

1. Us AD. Viral santral sinir sistemi enfeksiyonları. In: Us AD, Ergünay K, editörler. *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2012; s. 271-94.
2. Glaser CA, Gilliam S, Schnurr D, Forghani B, Honarmand S, Khetsuriani N, et al. In search of encephalitis etiologies: diagnostic challenges in the California Encephalitis Project, 1998–2000. *Clin Infect Dis* 2003; 36(6): 731–42.
3. Hjalmarsson A, Blomqvist P, Skoldenberg B. Herpes simplex encephalitis in Sweden, 1990–2001: incidence, morbidity, and mortality. *Clin Infect Dis* 2007; 45(7): 875-80.
4. Delbue S, Tremolada S, Ferrante P. Application of molecular tools for the diagnosis of central nervous system infections. *Neurol Sci* 2008; 29(Suppl2): S283-5.
5. Boivin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes* 2004; (Suppl. 2): 48A-56A.
6. Nadelman CM, Newcomer VD. Herpes simplex virus infections. *Postgrad Med* 2000; 107(3): 189-200.
7. Tyler KL. Herpes simplex virüs infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes* 2004; (Suppl 2): 57A–64A.
8. Sili U, Kaya A, Mert A. Encephalitis Study Group. Herpes simplex virüs encephalitis: clinical manifestations, diagnosis and outcome in 106 adult patients. *J Clin Virol* 2014; 60(2): 112-8.
9. Bradshaw MJ, Venkatesan A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Neurotherapeutics* 2016; 13(3): 493-508.
10. Kohl S. Herpes Simplex Virüs. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 17th ed. Philadelphia, Saunders Company, 2004; p. 1051-7.
11. Momméja-Marin H, Lafaurie M, Scieux C, Galicier L, Oksenhendler E, Molina JM. Herpes simplex virus type 2 as a cause of severe meningitis in immunocompromised adults. *Clin Infect Dis* 2003; 37(11): 1527-33.
12. Logan SA, MacMahon E. Viral meningitis. *BMJ* 2008; 336(7634): 36-40.
13. Ibrahim AI, Obeid MT, Jouma MJ, Roemer K, Mueller-Lantsch N, Gärtner BC. Prevalence of Herpes Simplex Virus (Types 1 and 2), Varicella-Zoster Virus, Cytomegalovirus, and Human Herpesvirus 6 and 7 DNA in Cerebrospinal Fluid of Middle Eastern Patients with Encephalitis. *J Clin Microbiol* 2005; 43(8): 4172–4.
14. Gültepe B, Bayram Y, Güdücüoğlu H, Çıkman A, Berktaş M. Investigation of Bacterial and Viral Meningitis Agents with Different PCR Methods at a University Hospital. *Abant Med J* 2015; 4(2): 125-9.
15. Koskiniemi M, Rantalaiho T, Piiparinen H, von Bonsdorff CH, Färkkilä M, Järvinen A, et al. Study Group. Infections of the central nervous system of suspected viral origin: a collaborative study from Finland. *J Neurovirol* 2001; 7(5): 400-8.
16. Bhaskaran A, Racsá L, Gander R, Southern P, Cavuoti D, Alatoon A. Interpretation of positive molecular tests of common viruses in the cerebrospinal fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77(3): 236-40.
17. Studahl M, Hagberg L, Rekabdar E, Bergström T. Herpesvirus DNA detection in cerebral spinal fluid: differences in clinical presentation between alpha-, beta-, and gamma-herpesviruses. *Scand J Infect Dis* 2000; 32(3): 237-48.
18. Garcia-Bardeci D, Pena MJ, Suárez-Bordón P, Aladro Y, Pérez-González C, Lafarga B. Value of the polymerase chain reaction in the diagnosis of herpes infections of the nervous system. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(3): 150-5.
19. Kaşifoğlu N, Aslan M, Durmaz G, Us T. Santral sinir sistemi enfeksiyonlarında, herpes simplex virüs varlığının beyin omurilik sıvısı örneklerinde real-time PZR yöntemiyle araştırılması. *Osmangazi Tıp Dergisi* 2017; 39(3): 62-7.
20. Zeytinoğlu A, Altuğlu İ, Sayiner A, Şirin H, Sağduyu A, Erensoy S, ve ark. Herpes ensefalitinin beyin omurilik sıvısı örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu ile tanısı. *Flora* 2000; 5(3): 179-82.
21. Altuğlu I, Zeytinoglu A, Sirin H, Yuceyar N, Erensoy S. Comparison of different polymerase chain reaction methods for detection of herpes simplex virus types 1 and 2 encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25(10): 669-71.
22. Soylar M, Altuğlu I, Sertöz R, Aydın, D, Akkoyun F, Zeytinoğlu A. Ege Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran santral sinir sistemi enfeksiyonu olgularında saptanan viral etkenler. *Ege journal of medicine* 2014; 53(2): 65-70.
23. Whitley RJ. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res* 2006; 71(2-3): 141-8.
24. Pişkin N, Yalçın A, Aydemir H, Gürbüz Y, Tütüncü E, Türkyılmaz R. İkiyüz kırk dört erişkin santral sinir sistemi enfeksiyonu olgusunun değerlendirilmesi. *Flora* 2005; 10(4): 119-24.
25. Beckham JD, Tyler KL, editors. *Encephalitis*. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease, 7th ed. 2010, p. 1244.vv