

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PERİODONTİTLİ HASTALARDA HERPESVİRÜSLERİN GÖRÜLME
SIKLIĞININ PCR İLE BELİRLENMESİ

DR. AZİZ RAMAZAN DİLEK
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ.DR. YASEMİN BULUT
ELAZIĞ – 2008

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr.....

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

.....
.....**Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafınızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

.....

Danışman

Uzmanlık Sınavı jüri Üyeleri

.....
.....
.....
.....
.....
.....

TEŞEKKÜR

Öncelikle uzmanlık eğitimim boyunca bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Zülal Aşçı TORAMAN'a ve Tez Danışmanım Yrd. Doç. Dr. Yasemin BULUT'a, Öğretim Üyelerimiz Prof. Dr. Mustafa YILMAZ, Prof. Dr. Adnan SEYREK ve Doç. Dr. Ahmet KIZIRGİL'e teşekkürü borç bilirim. Ayrıca örnek toplama aşamasındaki yardımlarından dolayı Elazığ Diş Hastanesi Başhekimi ve Diş Hastanesi çalışanlarına, primer dizaynında bize katkılarından dolayı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Viroloji Bilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Ayhan KUBAR ve Doç. Dr. Mehmet YAPAR'a, çalışmada kullanılan virüs pozitif kontrollerini bizlerle paylaştıkları için sırasıyla İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Rıza DURMAZ ve Yrd. Doç. Dr. Barış OTLU'ya, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Murat ERTÜRK, Doç. Dr. Faruk AYDIN ve Yrd. Doç. Dr. Kurtuluş BURUK'a ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Cemalattin CANBAY ile Prof. Dr. Vedat BULUT'a, çalışmada elde edilen sonuçların istatistiksel olarak yorumlanmasında yardım ve katkılarından dolayı Fırat Üniversitesi Veteriner fakültesi Zootekni Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. İbrahim ŞEKER'e, laboratuvar çalışmalarında yardımlarından dolayı teknisyen ve laborant arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Bunun yanında varlıkları ile bana her zaman güç ve güven veren dostlarıma, bana gösterdikleri sevgi ve sabırlarından dolayı değerli aileme, sevgili eşim ve çocuklarıma teşekkürlerimi ve minnettarlığımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	5
3.1. Periodontal Hastalıklar.....	6
3.1.1. Etiyoloji ve Patogenez.....	9
3.1.2. Mikroorganizmalar ve Periodontitis.....	12
3.1.3. Teşhis.....	15
3.1.4. Korunma ve Tedavi.....	15
3.2. Herpesvirüsler.....	17
3.2.1. Herpes Simpleks Virüs Tip 1 ve 2	21
3.2.2. Epstein-Barr Virüs	23
3.2.2.1. EBV' nin Sebep Olduğu Hastalıklar.....	25
3.2.2.2. EBV İnfeksiyonlarının Tanı ve Tedavisi.....	26
3.2.3. Sitomegalovirüs.....	28
3.3. PCR Yöntemi.....	30
4. GEREÇ VE YÖNTEM	34
4.1. Hastaların Seçimi.....	34
4.2. Örneklerin Toplanması ve analize hazırlanması.....	34

4.3. Cihazlar.....	36
4.4. Kontrol Virüsleri.....	36
4.5. Hücre Kültürü ve Virüs Üretilmesi.....	37
4.6. Kontrol Virüslerinden DNA izolasyonu.....	38
4.7. PCR'in Dedeksiyon Limitinin Tespiti.....	38
4.8. Paper pointlerden DNA İzolasyonu.....	38
4.9. Oligonükleotidler.....	40
4.10. PCR Aşaması	41
4.10.1. EBV ve HSV-1 için spesifik PCR.....	41
4.10.2. CMV ve HSV-2 için spesifik nested PCR.....	42
4.11. Agaroz Jel Elektroforez.....	43
5. BULGULAR.....	45
5.1. HSV-1 ve HSV-2 Virüslerinin Üretilmesi.....	45
5.2. PCR Dedeksiyon Limiti	45

5.3. Klinik Örneklerle PCR Sonuçları

47

6. TARTIŞMA..... 52

7. KAYNAKLAR..... 59

8. ÖZGEÇMİŞ..... 68

TABLO LİSTESİ

	<u>SAYFA NO</u>
Tablo 1. Plak indeksi	34
Tablo 2. Gingival indeks.....	35
Tablo 3. Çalışmada kullanılan primerler.....	40
Tablo 4. Hasta grubunda PCR’la tespit edilen virüs sıklığı.....	48
Tablo 5. Sağlıklı grupta PCR’la tespit edilen virüs sıklığı.....	50
Tablo 6. Virüs varlığı ile plak indeksi, gingival indeksi ve cep derinliği arasındaki korelasyon	51

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil 1. Sağlıklı diş, gingivitis, periodontitis.....	7
Şekil 2. Herpesvirüslerin genel morfolojik yapısı	18
Şekil 3. Herpesvirüslerin replikasyonu	20
Şekil 4. Paper point'ler kullanılarak örnek alımı.....	35
Şekil 5. Virüs ekilmeyen kontrol MDBK hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.	46
Şekil 6. HSV-1 enfekte MDBK hücrelerin ekimden yaklaşık 48 saat sonra mikroskopik görüntüsü	46
Şekil 7. EBV pozitif ve negatif PCR ürünleri.....	47
Şekil 8. CMV pozitif ve negatif PCR ürünleri.....	48
Şekil 9. HSV-1 pozitif PCR ürünleri.....	49
Şekil 10. HSV-2 pozitif ve negatif PCR ürünleri.....	50

KISALTMALAR LİSTESİ

bç: Baz çifti

CD: Cep derinliği

CMV: Sitomegalovirüs

CPE: Sitopatik etki

dk.: Dakika

dH₂O: Distile su

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EA: Erken antijenler

EBNA: EBV nükleer antijeni

EBV: Epstein–Barr virüs

EMN: Enfeksiyon mononükleoz

ELISA: Enzime bağlı immunosorbent deneyi

FBS: Fötal Sığır Serum

Gİ: Gingival indeks

HCMV: Human sitomegalovirüsü

HHV 6: Human herpesvirüs 6

HHV 7: Human herpesvirüs 7

HIV: Human immun yetmezlik virüsü

HSV-1: Herpes simpleks virüs tip 1

HSV-2: Herpes simpleks virüs tip 2

İFA: İmmunofloresan deneyi

kbç: Kilobaz çifti

LMP: Latent membran proteini

MDBK: Madin-Darby sığır böbrek hücre kültürü

μ l: Mikrolitre

ml: Mililitre

NAA: Nükleik asit amplifikasyonu

NFK: Nazofaringeal karsinom

PI: Plak indeksi

PCR: Polymerase Chain Reaction

sn: Saniye

VCA: Viral kapsit antijeni

VHS: viral-host-shutoff

VZV: Varisella zoster virüs

α -TIF: α trans-inducing factor

1. ÖZET

Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda herpesvirüslerle periodontit şiddeti arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Bu çalışmalar hastalığın etiopatogenezinin daha ayrıntılı olarak anlaşılması yönündeki çalışmalara katkı sağlamıştır. Mevcut çalışmada periodontitli hastalardan alınan subgingival krevikular sıvı örneklerinde farklı herpesvirüslerin (herpes simpleks virüs tip 1 ve 2; HSV-1 ve HSV-2, Epstein–Barr virüs; EBV ve insan sitomegalovirüs; HCMV) varlığının araştırılması ve bu hastalardaki herpesvirüs sıklığı ile, periodontitin seyrini belirlemede önemli olan, plak indeksi (Pİ), gingival indeks (Gİ) ve cep derinliği (CD) gibi parametreler arasında bir ilişki olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı.

Bu amaçla, 2007 yılında Elazığ Diş Hastanesi Periodontoloji Kliniğine başvuran periodontitli 52 hastadan ve periodontit yönünden sağlıklı 20 bireyden paper pointler periodontal ceplere yerleştirilerek krevikular sıvı örnekleri alındı. Daha sonra, bu örneklerden DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'lar ve dört herpesvirüse özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulandı.

Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına göre, 52 periodontitli hasta örneğinin %61.5'inde EBV, %53.8'ünde CMV, %32.6'sında HSV-1 ve %25'inde HSV-2 pozitifliği tespit edildi. Sağlıklı kişilerde ise %20'sinde EBV, %10'unda CMV, %10'unda HSV-1 ve %5'inde ise HSV-2 pozitifliği belirlendi. EBV varlığı ile klinik parametreler kıyaslandığında; hastaların Pİ, Gİ ve CD ile EBV varlığı arasında pozitif bir korelasyon tespit edildi (spearman's rho). Hasta gruptaki CMV varlığı ile klinik parametreler kıyaslandığında CMV varlığı ile Pİ ve CD arasında pozitif bir korelasyon tespit edilirken gingival indeks ile bir korelasyona

rastlanmadı. Hem HSV-1 hem de HSV-2 varlığı ile klinik parametreler arasında bir ilişki belirlenmedi.

Sonuç olarak, periodontitler ve bunların klinik seyirleri ile EBV ve CMV arasında kuvvetli, HSV'lar ile de zayıf bir etyolojik ilişkinin olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Periodontit, PCR, HSV-1, HSV-2, EBV, CMV

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF HERPES VIRUS FREQUENCY IN PERIODONTITIS PATIENTS BY USING PCR.

Recently a relation was revealed between herpesvirus and severity of periodontitis. This study contributes to understanding the etiopathogenesis of periodontitis. The aim of this study was to determine the prevalence of herpesvirus (Herpes simplex virus type 1 and 2 (HSV-1,2), Epstein-Barr virus (EBV), Cytomegalovirus (CMV)) in crevicular fluid samples which were taken from patients with periodontitis and to reveal a relation between clinical parameters (plaque index; PI, gingival index; GI and probing depth; PD) and the presence of herpesvirus.

For this aim, as a sample; 52 patients with periodontitis and 20 healthy persons who attend to the periodontology clinic of Elazığ Tooth Hospital were accepted in 2007. Crevicular fluid samples were taken with a paper point. Later DNA was extracted from this sample. The presence of herpesvirus (HSV-1,2, EBV, CMV) was investigated with Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific primers.

EBV was determined in 61.5% of 52 patients' samples. CMV was determined in 53.8% of 52 samples. HSV-1 and HSV-2 were determined in 32.6% and 25% of 52 samples. EBV was determined in 20% of 20 samples of healthy persons. CMV was determined in 10% of the 20 samples. HSV-1 and HSV-2 were determined in 10% and 5% of the 20 samples. A correlation between EBV and clinical parameters (PI, GI, PD) was determined (Spearman's rho). A correlation between CMV and clinical parameters (PI, PD) was determined but a correlation between CMV and GI was not determined. A correlation between HSV-1, 2 and clinical parameters (PI, GI, PD) was not determined.

As result; present of a strong etiologic relation between present of EBV, CMV and periodontitis, its clinic condition were convinced. Weak etiologic relation between HSV and periodontitis, its clinic condition were convinced.

Key Words: Periodontitis, PCR, HSV-1, HSV-2, EBV, CMV

3. GİRİŞ

Periodontit, dişetlerinde başlayan iltihabi değişikliklerin derin periodontal dokulara yansıdığı bir diş hastalığıdır. Bu hastalık toplumda oldukça yaygındır ve etiyojisinde, plak ile periodontal cepteki mikroorganizmaların ve toksik ürünlerinin primer rolü olduğu günümüzde kabul edilmektedir. Ancak, bilinen bu faktörlere rağmen periodontitin etiyojisi tam olarak aydınlatılamamıştır (1,2).

Kronik periodontit, periodontal hastalıkların en sık rastlanılan tipi olup 35-40 yaşından sonra popülasyonun büyük bir kısmını etkilemektedir. Kronik periodontit, primer etiyojik ajan olarak mikrobiyal plağın ve plak birikimini kolaylaştırıcı lokal faktörlerin sorumlu tutulduğu inatçı ve ilerleyici bir periodontit formudur. Kronik periodontitlerde yüksek oranda (%90) anaerob ve gram negatif bakteriler izole edilmektedir. Bu bakteriler arasında *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *Actinobacillus*, *actinomycetemcomitans* kronik periodontitte önemli patojenler olarak sayılabilir (4, 5). Bu patojen mikroorganizmalara ek olarak, *T. forsythia*, *E. corrodens*, *Eubacterium türleri*, *F. nucleatum*, *B. forsythus*, *S. intermedius* da kronik periodontitden sorumlu tutulan mikroorganizmalardır. Özellikle gingival sulkus bölgesinin dış yüzeylerindeki bakteri sayısındaki artış epitelyum ve bağ dokusu yapılarını etkilemekte, diş yüzeylerinden ayrılmalarına neden olmaktadır (1-3).

Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda herpesvirüslerle periodontit şiddeti arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Bu çalışmalar hastalığın etyopatogenezinin daha ayrıntılı olarak anlaşılması yönündeki çalışmalara katkı sağlamıştır. Ancak, bugün için periodontit etyopatogenezinde herpesvirüslerin rolü ile ilgili tartışmalar devam etmektedir (6).

Bu çalışmada, periodontitli hastalardan alınan subgingival krevikular sıvı örneklerinde, farklı herpesvirüslerin (Herpes simpleks virüs tip 1 ve 2; HSV-1 ve HSV-2, Epstein–Barr virüs; EBV ve insan sitomegalovirüs; HCMV) varlığının araştırılması ve bu grup hastalardaki herpesvirüs sıklığı ile, periodontitin seyrini belirlemede önemli olan, plak indeks'i (PI), gingival indeks (GI) ve cep derinliği (CD) gibi parametreler arasında bir ilişki olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

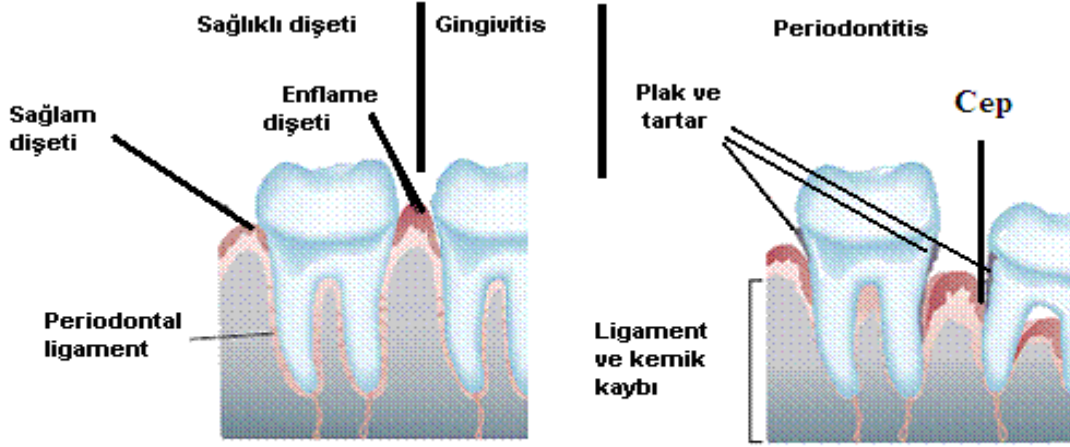
3.1. Periodontal Hastalıklar

Periodontal hastalıklar, dişi destekleyen ve tutunmasını sağlayan dokunun etkilendiği bir grup hastalıktır. Tedavi edilmediği takdirde dişeti ve alveolar kemiğin hasarı ile sonuçlanmaktadır (7).

Periodontal hastalıklar toplumda yaygın olmasına rağmen şiddetli formları toplumun %10-15'ini geçmemektedir. Periodontit diş çekimine sebep olan durumların %30-35'ini teşkil etmektedir (8).

Periodontal hastalıklar genellikle kronik enflamatuvar hastalıklar şeklinde görülür. Periodontal dokunun akut enfeksiyonları görülse de diş hekimlerine bu konuda çok sık başvurulmaz. Periodontal hastalıklarda etkilenen dokular; gingiva, periodontal ligament, sementum ve alveolar kemiktir. Gingiva dişin ve alveolar kemiğin bir kısmını örten pembe renkli mukoz membrandır. Periodontal ligament ise diş etini oluşturan en önemli parçadır. Sementum dişlerin alt kısmını örten kalsifiye yapıdır. Alveolar kemik ise maksilla ve mandibulada dişlerin gömülü bulunduğu kısımdır (3,9).

Periodontal hastalıkların birkaç formu vardır. Bunlar; gingivit, akut nekrotizan ülseratif gingivit, yetişkin periodontiti ve lokalize juvenil periodontitdir.



Şekil 1. Sağlıklı diş, gingivit, periodontit (7).

Gingivit ve periodontit, periodontal dokuyu etkileyen enflamatuvar hastalıkların iki majör formudur (Şekil 1). Gingivit dişetin yumuşak dokusunun enflamasyonudur. Gingivitte gingiva kırmızı renkli ve inflamasyon vardır. Hastalıkta gingivanın normal kenarlarının kaybı, dokunmayla kolayca kanaması söz konusudur. Klinik olarak tutunma dokusu kaybına sebep olmayan şekilde gingivanın enflamasyonu mevcuttur. Gingivit periodontal dokunun diğer kısımlarını etkilemeden yıllarca kronik bir şekilde seyredebilir. Kronik gingivit, gingival sulkusun derinleşmesine sebep olabilir. (7,9).

Gingivitin oluşumuna göre birçok farklı tipi tanımlanmıştır. En sık görüleni plak tarafından indüklenen tipidir. Bu tip birçok kişinin ağızında mevcuttur. Klasik görünümü kızarıklık, şişlik ve proba dokununca kanamadır. Çoğu kez hasta diş fırçalama esnasındaki kanamadan şikâyetçidir. Bu tip gingivit dental plak varlığına bağlı olarak (bu plaklar floranın değişmesine sebep olur) gelişen düşük seviye enfeksiyondur (8).

Diğer bir gingivit türü sistemik faktörler tarafından modifiye edilenlerdir. Bunlar; puberteye bağlı gingivit, menstrual siklusu bağlı gingivit, gebeliğe bağlı gingivit, piyojenik granuloma, diyabetes mellitusa bağlı gingivit ve kan diskrazilerine bağlı gingivittir. Lösemiye bağlı gingivit kan diskrazilerine bağlı gingivite örnek verilebilir (8).

Medikasyona bağlı gingivitler ise ilaçların sebep olduğu türlerdir. Bu tür gingivitelere yol açan ilaçlara oral kontraseptifler, fenitoin, siklosporin gibi ilaçlar örnek verilebilir (8).

Başka bir gingivit türü beslenme bozukluğu veya eksikliğine bağlı gelişen türlerdir. Askorbik asit ve protein eksikliği bu grupta yer alır (8,9).

Kronik gingivit; gingival dokunun inflamasyonu olarak tanımlanır. Bu klinik durumda alveolar kemik rezorpsiyonu ve junctional epitelyumun apikal deviasyonu yoktur. Cep derinliği 2mm den fazla ise kronik gingivit denir ve hiperplazi veya ödemden kaynaklanır (8).

Periodontit ise gingiva ve bitişiğindeki tutunma dokusunun enflamasyonudur. Alveolar kemik ile bağ doku kaybına sebep olmasıyla karakterizedir. Periodontit, gingivitin dişlere, destek yapılara ve kemik yapıya ulaşmış formu olarak da tanımlanabilir. Plak ve tartar, diş eti ile diş arasında genişlemeye sebep olarak büyük cepler oluşturmakta ve anaerobik bakterilerin buralarda üremesine yardımcı olmaktadır. Bunlar da diş destekleyen kemik yapıların hasarına sebep olmaktadır. Sonuç olarak bu süreç dişin kaybına sebep olabilmektedir. Diyabet, Down sendromu, Crohn's hastalığı, AIDS ve diğer kan

beyaz küre azalmasına sebep olan hallerde periodontit gelişme sıklığı artmaktadır (3,7).

Periodontitin başlangıç semptomu yangısal değişiklik ve kanamalı diş etleri ve kötü kokulu ağızdır. Periodontitin karakteristik özelliklerinden biri de dişte geniş ceplerinin olmasıdır. Ağrı, hastalığın geç evrelerine kadar yoktur, ancak apse ya da dişin düşeceği zaman meydana gelir ve bu dönemin en önemli belirtisidir.

Yetişkinlerde görülen periodontit; periodontal hastalıkların en ciddi formudur. Bu hastalıkta gingiva, periodontal ligament ve alveolar kemik tutulumu olur. Derin bir periodontal cep oluşur. Eğer tedavi edilmezse bu cebin içinde plak, kalkulus ve debris oluşumu meydana gelir. Periodontal ligament hasarlanır ve alveolar kemiğin rezorbsiyonu meydana gelir. Bu da dişin kolayca hareket etmesini sağlar ve sonuçta diş kaybına sebep olur. Yetişkin periodontitinin büyük bir kısmı kroniktir (7).

Kronik periodontit gingivadaki enflamasyon ve enfeksiyon kombinasyonunun ilerlemesi sonucu olayın periodontal membranın derin dokusuna invazyonu olarak kabul edilir. Bu form servikal sınırdaki fiber bağların hasarlaşması, alveolar kemiğin rezorbsiyonu, amelosemental kavşak epitelinin apikal proliferasyonu ile karakterizedir (8,9).

3.1.1. Etiyoloji ve Patogenez

Periodontal hastalıkların etiyoloji ve patogenezi ile ilgili yakın zamana kadarki bilgilerimiz epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarına, doku histolojik çalışmalarına, klinik deneme ve hayvan deneylerine bağlı olarak elde edilen bilgilerden ibaretti. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, periodontal hastalıkların oluşumunun birden fazla sayıda etyolojik ajandan kaynaklandığı,

periodontitin bulunma sıklığı ve şiddetinin ise birçok risk faktörleri ile arttığı görülmüştür. Değiştirilebilir risk faktörleri arasında uygunsuz oral hijyen, sigara kullanımı, diabetes mellitus, alkol, stres faktörleri, kazanılmış immün süpresyon (HIV), uygunsuz fiziksel aktivite ve osteoporoz sayılabilir (8,10).

Periodontal hastalıkların başlangıç odağı dental plaklar olarak kabul edilmektedir. Dental plak, mukopolisakkarit matris içinde bakterilerin bir birine sıkıca tutunması ile oluşturdukları kümelerdir ve biofilm olarak isimlendirilir. Ağızın yıkanması ile temizlenmediği halde fırçalama ile uzaklaştırılabilir. Bu yapı birçok dental problemin kaynağıdır. Diş temizliğini takiben 1 saat içinde diş yüzeyinin mm² başına 10⁶ bakteri tespit edilebilmektedir. *S. Mutans*, ekstraselüler polisakkaritler sentezler (glukan ve fruktan) ve bu yapılar bakterinin erkenden kolonizasyonuna yardımcı olur. Dişlerin temizlenmemesi durumunda 6-10 gün içinde gingivitlerle ilişkili olan vibrio ve spiroketler dental plağın içinde tespit edilmeye başlar. Plaktaki bakterilerin yoğunluğunun Gram negatif ve anaeroba doğru kayması, gingivit ve periodontal hastalığa doğru progresyonu gösterir. Dişin servikal sınırındaki plak miktarı ile gingivitin şiddeti arasında direkt bir ilişki vardır (8).

Plak, periodontal hastalıkların bütün formlarında temel etiyolojik faktördür. Periodontal hasar, gingival sulkusun mikroorganizmalar tarafından dental plak şeklinde kolonizasyonunun bir sonucudur. Buna rağmen, gingivitin periodontit'e ilerlemesi kompleks bir durumdur. Konağın savunması, oral ortam, organizmanın patojenitesi, plağın olgunluk düzeyi gibi durumlar gingivitin periodontite ilerlemesini etkileyen faktörlerdir. Periodontal hastalıklara, konağın enflamatuar

cevabı ile komplike edilmiş çok faktörlü enfeksiyon şeklinde bakmanın en kolay bakış açısı olacağı düşünülmektedir (3,8).

Periodontal hastalıkların çoğunda, bakteriler, periodontal plağın içinde kalmakta çevre dokuya invazyon yapmamaktadır. Böyle olduğu halde çevre doku hasarının nasıl meydana geldiği çok iyi anlaşılmamıştır. Bakterilerin ortama saldığı bazı ürünlerin bu hasarı yapabileceği düşünülmektedir. Bakteriyel endotoksinler hücreleri öldürebilme yeteneklerinden dolayı çevre doku hasarından sorumlu tutulmuşlardır. Bakteriyel proteolitik enzimler de doku hasarından suçlanan diğer bakteriyel ürünlerdir. Sorumlu tutulan diğer nedenler arasında İmmün mekanizmalar da vardır. Bölgeye enfeksiyon için gelen savunma hücrelerinin bakterileri elimine etmek için verdikleri çabanın doku hasarına yol açması olasıdır (7).

Gingivit ve periodontitin patogenezinde genellikle diş yüzeyindeki bakteri kolonizasyonun çok önemli olduğuna inanılmaktadır. Bu görüşün temelinde, yapılan çalışmalardaki bakteriyel plak varlığı ile gingivit ve periodontit varlığı arasındaki ilişki yatmaktadır. Bunu destekler nitelikte yapılan çalışmalarda bu bakteriyel plakların uzaklaştırıldığı durumlarda gingivitin klinik bulgularının gerilediği görülmüştür. Aynı şekilde klorheksidin gibi antiseptiklerin kullanıldığı durumlarda bunun bakteriyel kolonizasyonu azalttığı ve gingivit bulgularını geriletteği görülmüştür (10,11).

Gingivit, genellikle bozuk oral hijyenin bir sonucudur. Uygun diş fırçalaması ve iplikle yapılan temizlemeler plak oluşumunu azaltmaktadır. Plak, bakteriler tarafından yapılan yapışkan film benzeri yapılardır. Tartar, sertleşmiş plaklardır. Plaklar fırçalanıp temizlenmezse birkaç gün içinde tartara

dönnebilmektedir. Tartarın ise fırçalama ile uzaklaştırılması zordur. Gingivit, hormonlar tarafından provoke edilebilir ve bazen hamilelik esnasında, pübertede ve doğum kontrol hapı alanlarda daha kötüleşebilir. Vitamin C ve niasin eksiklikleri de dişetlerinde kanamaya ve gingivit'e sebep olabilir (7, 8).

Mevcut bilgi birikimine rağmen dental plağın yapısı ve fonksiyonu ile ilgili daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır. Subgingival bakteriler ve onların gingival krevikular sıvı ile ilişkileri hakkında ileri çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır (12).

3.1.2. Mikroorganizmalar ve Periodontit

Yetişkin bir insan vücudu 10^{13} kadar hücreden oluşurken, 10^{14} kadar normal veya kommensal mikroorganizmayı da üzerinde taşımaktadır. Oral kavite bu mikroorganizmaların hemen hemen yarısını içermektedir. 300-600 kadar türden oluşan yaklaşık 6 milyar mikroorganizma oral kavitede bulunmaktadır (13).

Doğumdan birkaç saat sonra ağızda aerobik ve fakültatif anaerobik bakteriler kolonize olur. Diş etrafındaki yapılarda üç yüz den fazla türün oluşturduğu bir eko sistem oluşmaktadır (8).

Ağızda tespit edilen önemli mikroorganizmalar şunlardır (8):

Streptococcus mutans grup; bu grubun içinde *S. mutans* ve *S. sobrinus* yer alır. Bu mikroorganizmalar hem dekstran sentezlemekte hem de birçok şekerden asit oluşturabilmektedir.

Streptococcus oralis grup; bu grubun içinde *S. sanguis*, *S. mitis*, ve *S. oralis* yer alır. Plak içindeki streptokokların %50'sinden fazlasını bu grup oluşturur. Bu grup enfektif endokarditli hastaların % 50'si ile ilişkilendirilir.

Streptococcus salivarius grup; tükürükteki streptokokların yarısı bu gruptur. *S. intermedius*, *S. angiosus*, *S. constellatus* (önceleri *S. milleri* grubu olarak isimlendirilirdi) ağızdaki apselerden en çok izole edilen gruptur.

Lactobacillus, taşıyıcılarında sekonder olarak kolonize olur ve diş protezi olanlarda sıktır ve asit üretimi fazladır.

Porphyromonas gingivalis, zorunlu anaeroptur, kronik periodontit ve agresif periodontit ile ilişkilidir.

Prevotella intermedia, kronik periodontit hastalarında, lokalize agresif periodontitte ve nekrotizan periodontal hastalıklarda bulunur.

Fusobacterium, zorunlu anaerobdur. Nekrotizan periodontal hastalıklarda temel patojenlerden biri olarak kabul edilmektedir.

Candida albicans, ağızdaki fırsatçı patojenlerden biridir ve birçok insanın ağızında kommensal olarak bulunur (8).

Başlangıç safhasındaki bir plağa karşı gingivanın vereceği enflamatuvar cevap bakteriyel kolonizasyon için ideal bir çevre vazifesi gören gingival cep oluşumuna sebep olmaktadır. Enflamatuvar cevabın dental plak varlığında periodontal hasarın oluşmasındaki katkıları histolojik olarak tespit edilebilmektedir. İlave olarak gingival ceplerin içindeki düşük oksijen seviyesi periodontal hastalık ilerlemesi ile ilişkili olan zorunlu anaerob mikroorganizmaların üremesine yardımcı olmaktadır. Yüksek CO₂ seviyeleri lokalize agresif periodontitle ilişkilendirilen kapnofilik organizmaların üremesine yardımcı olacaktır. Kısacası, sağlıklı gingiva Gram pozitif kok ve basillerin florada hakim olması ile ilişkilidir. Floranın anaerob ve Gram negatiflerin lehine kayması periodontitle ilişkili bulunmuştur. Her ne kadar *P. gingivalis*, *P. intermedia* ve *P.*

denticola, yapılan çalışmalarda periodontit ile ilişkili bulunsa da bugün'e kadar yapılan araştırmalarda bir mikroorganizmanın ya da bir grup mikroorganizmanın periodontal hastalıkların başlangıç ve ilerlemesinde tek başına sorumlu olduğuna dair bir kanaat oluşmamıştır (8).

İmmün durum, stres, endokrin fonksiyon (diyabet), sigara kullanımı, ilaçlar, yaş, beslenme alışkanlığı gibi sistemik faktörler, dişin pozisyonu ve morfolojisi, diş taşları, dişlerin bir birinin üstüne doğru deviasyonları ve travma gibi lokal faktörler hastalığın ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (8).

Plak oluşumu, bakteriler ve bunların toksinlerinin periodontal hastalıklardaki rolleri bilinmekle birlikte, son yıllarda yapılan çalışmaların ışığında, herpesvirüslerin de bu hastalıklarda önemli bir etyolojik ajan olabileceği kabul edilmeye başlanmıştır. Bu nedenle, periodontit bakterilerin, mantarların ve muhtemelen herpesvirüslerin dahil olduğu bir enfeksiyon hastalığı olarak tanımlanabilir. Teorik olarak viral enfeksiyonlar periodontal dokunun hasarını immünoşüpresyon yaparak veya immünite aracılığıyla hızlandırabilir (12-14). Ayrıca, herpesvirüsler periodontium dokusunun yapısal hücrelerini ve immün defans hücrelerini enfekte edebilir veya hücre popülasyonunu değiştirebilir ve bu şekilde dokunun bakteriyel enfeksiyonlara direncini azaltabilir (15). Birçok bakteriyel enfeksiyonun viral enfeksiyonun üzerine eklenerek süper enfeksiyon şeklinde meydana geldiği de bilinen bir durumdur. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda bazı virüslerin periodontal hastalık gelişimini ve şiddetini etkileyebileceği rapor edilmiştir (11). Herpesvirüslerden özellikle CMV ve EBV-1'in periodontitle yakın ilişki içinde olduğu kanaati önem kazanmıştır (15). Ancak bu konu ile ilgili tartışmalar ve çalışmalar halen devam etmektedir.

3.1.3. Teşhis

Periodontitin genel teşhisi prob kontrolü ile kanamanın olması (hastalık aktivitesinin en önemli göstergesidir), cep derinliğinin ölçümü, dişin çevre dokuya tutunma durumu, subgingival taşların tespiti, dişlerin mobilitesi, sağlık durumu, radyografik incelemeler yapılarak konmaktadır (8).

3.1.4. Korunma ve Tedavi

Gingivitin ve periodontitin etiolojisinde primer olarak subgingival biyofilm oluşumu olduğu için günümüzde plakların temizlenmesi tedavide ve korunmada en önemli yoldur (16). Dünya nüfusunun önemli bir kısmının gingivitis ve periodontitis hastası olduğu düşünüldüğünde plak eliminasyonunun kolay olmayacağı ortadadır. Sigara kullanımının hastalığı arttırdığı bilinen bir durumdur ve hastalara bırakmaları yönünde telkin verilmelidir. Hastalığın sebepleri, seyri hakkında hastalar bilgilendirilmeli iyi bir oral hijyenin önemi anlatılmalıdır. Plakların hastalığın gelişmesindeki önemi belirtilmeli ve plakların ancak diş fırçalaması ile temizlenebileceği anlatılmalıdır. Diş fırçasının küçükbaşlı olması ve naylon kılıklı olmasının önemi açıklanmalı ve floridli, anti tartar diş macunlarının bu duruma katkılarının olabileceği belirtilmelidir. Klorheksidine içeren diş macunları plaktaki mikroorganizmalara karşı etkili olabilmektedir. İnterdental bölgenin temizlenmesinde diş fırçaları yeterli olmayabilir buralarda diş ipleri kullanılabilir. Düzenli diş sağlığı kontrolünün önemi hastalara anlatılmalı ve düzenli kontrol yaptırılmaları sağlanmalıdır (8,16).

Periodontal hastalığın plağa bağlı olarak ortaya çıkan enfeksiyon hastalığı olduğu unutulmamalı ve tedavide bu husus göz önünde tutulmalıdır. Etkif plak kontrolünün olmadığı tedavi yöntemleri ne kadar kompleks olurlarsa olsun

başarısızlıkla sonuçlanacaktır. Periodontal cerrahi de dahil olmak üzere bütün tedavi yöntemlerinin amacı sağlıklı bir ağız ortamı oluşturmak ve bu ortamın sürdürülebilirliğini sağlamaktır (8,16).

Periodontal tedavinin prensipleri üç fazda incelenir:

1- Başlangıç fazı: Gingivitin kontrol veya eliminasyonu ve daha ileri periodontal hastalıklara ilerlemesinin engellenmesi ve plakların temizlenmesini içerir

2- Düzeltici faz: Bu fazda temel olarak fonksiyonların restorasyonu ve ilgili yerlere estetik yaklaşım yapılmasını içerir.

3- Bakım (destek) fazı: Hastalığın rekürrensinden korunmak için hastanın motivasyonunun artırılması ve hastanın takibe alınması ile ilgili fazdır.

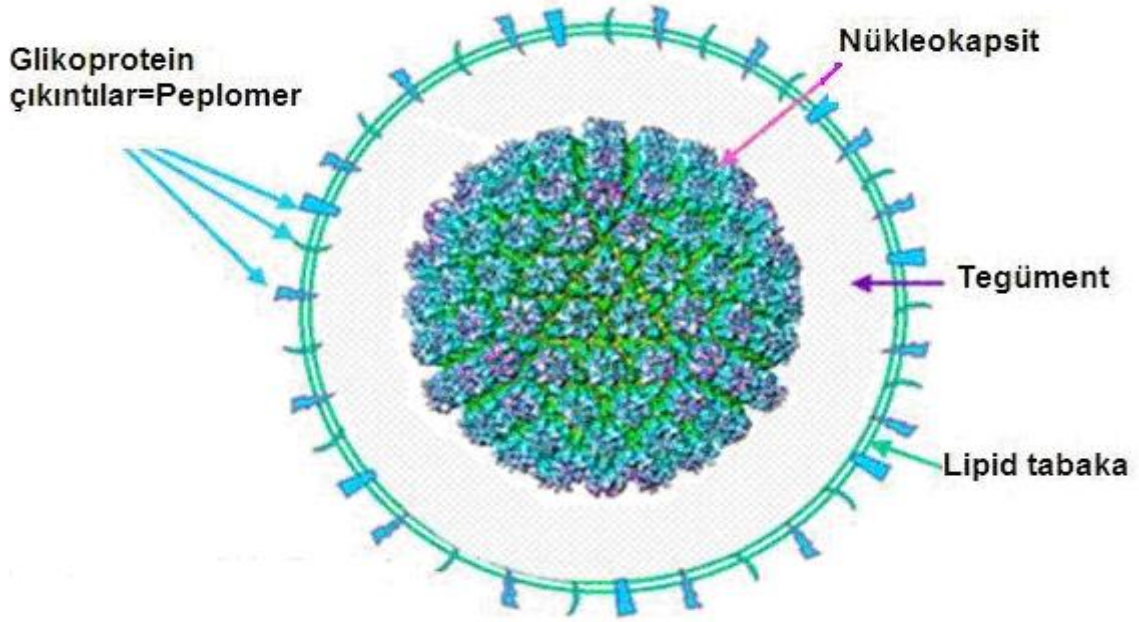
Periodontal hastalıklarda cerrahi olmayan tedavi yöntemleri debritleme, restorasyon (hastalığı alevlendirecek faktörlerin uzaklaştırılması), antiseptik ve antibiyotik kullanımından ibarettir. Periodontal hastalıklarda tek bir patojen etkili olmadığı halde Gram negatiflerin ve anaerobların eliminasyonunun periodontal iyileşmeye katkıları gösterilmiştir (7).

Tartarların profesyonel diş hekimleri tarafından temizlenmesi gerekmektedir. Tedaviden sonra periodontal doku hızla iyileşmektedir. Vitamin eksikliğine bağlı gingivitin tedavisinde vitamin desteği önemli bir unsurdur. Bazen antibiyotik tedavisi gingival ve dental temizlenme için gerekli olabilir. Periodontitin tedavisi profesyonel dental tedavi gerektirir. Dişin çevresindeki cepler, tartar ve plaklar temizlenmelidir. Apseler antibiyotik ve gerekli hallerde cerrahi ile kombine olarak tedavi edilmelidir. Apsel kemiğe ulaşırsa antibiyotik tedavisi uzun tutulmalı ve güçlü antibiyotikler verilmelidir (7).

Periodontal cerrahinin amaçları ise diş yüzeyinden tortuların uzaklaştırılması, temizlenebilir subgingival diş yüzeyinin oluşturulması ve hasarlanmış periodontal dokunun iyileşebilmesi için gerekli müdahaleleri gerçekleştirmektedir (8).

3.2. Herpesvirüsler

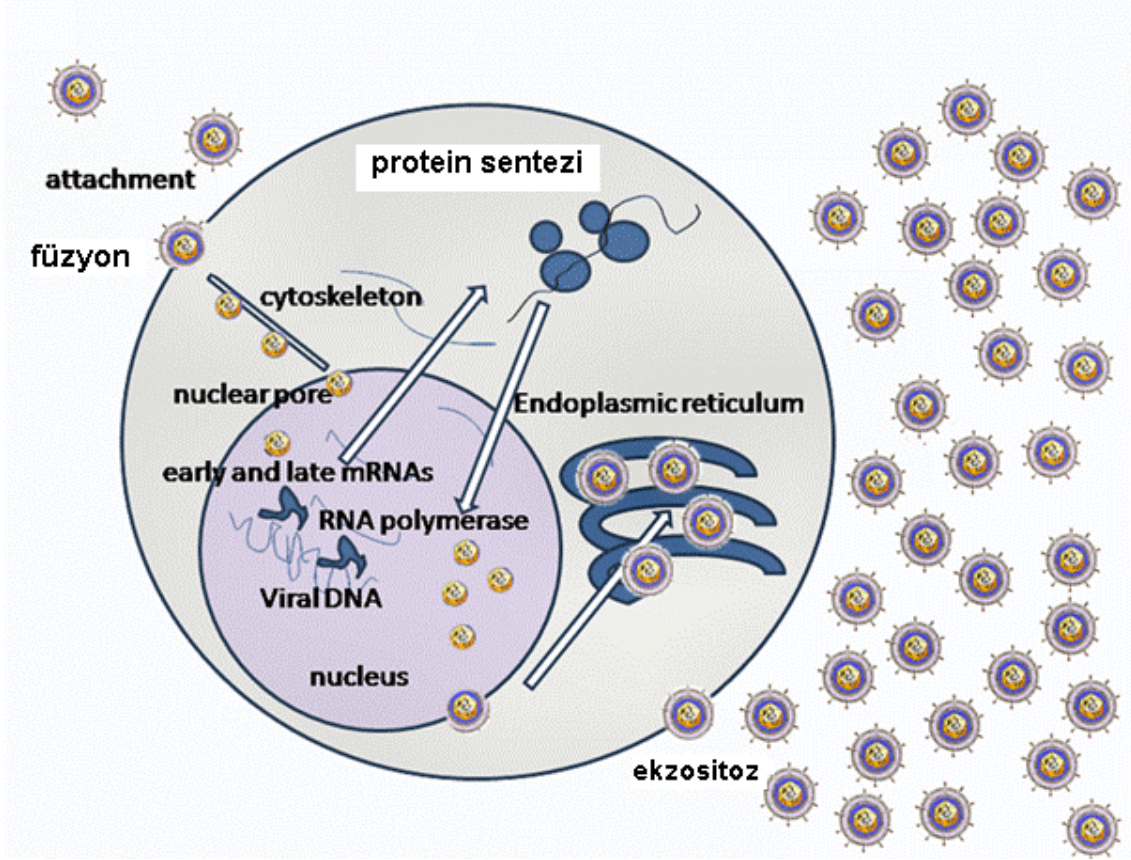
Herpesvirüsler zarflı, ikozahedral kapsitli, büyük ve kompleks DNA virüslerdir (şekil 2). Virion morfolojileri, replikasyonları, latent/tekrarlayan enfeksiyon yapmaları, enfeksiyonun kontrol altına alınmasında ve semptomların ortaya çıkışında hücresel bağışıklık yanıtının önemli rol oynaması herpesvirüslerin ortak özellikleridir. Herpesvirüs ailesi içinde 100 dolayında virüs bulunur. Bu virüsler içinde Herpes simpleks virüs tip 1 ve 2 (HSV-1 ve HSV-2), varisella zoster virüs (VZV), human sitomegalovirüs (HCMV), Epstein-Barr virüs (EBV), human herpesvirüs 6 ve 7 (HHV-6,HHV-7), Kaposi sarkomuyla ilişkili virüs (HHV-8) insanlarda sıklıkla enfeksiyona neden olan virüslerdir (17).



Şekil 2. Herpesvirüslerin genel morfolojik yapısı (18).

Herpesvirüsler; zarf glikoproteinleriyle (gB ve gC) konak hücre zarında bulunan özgül hücre reseptörlerine (özellikle heparan sülfat ve glikozaminoglikanlar vasıtasıyla) tutunarak, füzyon ile hücre içine girerler. Virüsle konak hücrenin füzyonu sonucu viriondan viral-host-shutoff (VHS), α trans-inducing factor (α -TIF) ve fosfoprotein adı verilen proteinlerin salınmasına yol açar. VHS konak hücrenin mRNA'sını bloke ederek hücrenin protein sentezini durdurur. α -TIF ve fosfoprotein ise hücre çekirdeğine taşınır. DNA kapsitten kurtulur ve çekirdek zarının porlarından geçerek fosfoprotein yardımıyla hemen halkasal forma dönüşür. Enfeksiyondan kısa süre sonra çok erken genler (α -genleri) transkripte edilir. Bu genler kendilerinin ve erken genlerinin sentezini düzenleyen proteinleri kodlar. α -genleri hücresel RNA polimeraz aracılığı ile transkripte edilir. Transkripsiyon α -TIF tarafından indüklenir. Sitoplazmada translasyona uğrayan proteinler (Çok erken proteinler: İmmediate early protein) hücre çekirdeğine

taşınır. Bunlar erken gen grubunun transkripsiyonuna sebep olur. Bu proteinlerde viral timidin kinaz ve DNA polimeraz genom replikasyonunu destekler. Konak hücrenin kromatini parçalanır ve çekirdek zarına doğru itilir. Viral DNA dönen halka mekanizmasıyla replike olur ve bu esnada virüsün yapısal proteinlerini oluşturan gama proteinleri (geç proteinler; late protein) sentezlenir. Kapsit proteinleri tarafından boş kapsit oluşturulur ve yeni sentezlenen virüs DNA'ları bu kapsitlerin içine yerleşir. Sonuç olarak virüs çekirdek zarından tomurcuklanarak zarf yapısını da kazanmış olur (Şekil 3) (17).



Şekil 3. Herpesvirüslerin replikasyonu (19).

Herpesvirüsler insanlarda persistan enfeksiyonlara yol açarlar. Bu persistanlık latent ve tekrarlayan enfeksiyonlar şeklinde olabilir (17). Herpesvirüsler insanlarda bir çok farklı sistemde ve farklı seyirde hastalığa yol açabilmektedir. Takip eden bölümde çalışmamıza konu edilen herpesvirüsler ve bu virüslerin sebep olduğu hastalıklar hakkında genel bilgiler sunulacaktır. Yapılan çalışmalarda EBV ve CMV ile periodontitler arasındaki etiyolojik ilişki HSV-1 ve HSV-2'ye göre daha kuvvetli olduğu için, konu anlatımında EBV ve CMV daha ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

3.2.1. Herpes Simpleks Virüs Tip 1 ve 2

HSV-1 ve HSV-2 öncelikle oral ve genital mukoza epitel hücrelerini etkilemekte ve buralarda primer enfeksiyon odakları oluşturmaktadırlar. Daha sonra, buradan nöronlara nöronlardan da nöron çekirdeğine ilerleyerek nöronlarda genom formunda latent olarak kalabilmektedir. HSV-1 ve HSV-2 enfeksiyonları toplumda oldukça yaygındır ve çoğunlukla da erken çocukluk dönemlerinde virüs ağız ya da burun yoluyla alınmaktadır. Hastanın immünitesi düştüğünde latent enfeksiyon aktive olabilmekte epitelyum hücrelerinde çoğalarak yaralara sebep olmaktadır. Latent HSV-1 enfeksiyonları immünsüpresif hastalarda ensefalit gibi ciddi komplikasyonlara sebep olabilmektedir. HSV-2 genital herpesin etkenidir. Seksüel olarak bulaşmaktadır. Yeni doğanlarda çok ciddi seyredebilir (20).

HSV-1 ve HSV-2'nin DNA homolojisi, antijenik yapı, doku tropizmi ve benzer hastalık belirtileri gibi birçok özellikleri ortaktır. HSV hızlı çoğalır ve oldukça sitolitikdir. HSV'nin genomu yaklaşık 150 kilobaz çifti (kbç) uzunluktadır ve bu genom yaklaşık 70 polipeptidi kodlar. Bu proteinlerin bir çoğunun replikasyon ve latentlikteki fonksiyonları halen bilinmemektedir (17).

HSV çok farklı hücrelerde replike olabilir. Buna bağlı olarak gingivostomatit, keratokonjunktivit, ensefalit, genital hastalıklar ve yeni doğan enfeksiyonları gibi çok farklı hastalıklara yol açabilir. HSV sinir hücrelerinde latent enfeksiyona neden olur ve tekrarlar sık görülür. Virüs tükürükle, vaginal sekresyonlarla, semenle veya herhangi bir lezyondaki sıvıdan bulaşabileceği gibi viremi sırasında plasentadan geçerek konjenital enfeksiyonlara da yol açabilir. HSV sitolitik enfeksiyona neden olur patolojik değişiklikler enflamatuvar yanıtla birlikte enfekte hücrelerin nekrozuna bağlıdır. HSV-1 ve HSV-2 deri ve

mukozalarda benzer görünümlü lezyonlara sebep olur. Her iki virüs de veziküler lezyonlara yol açar ve virüsler genellikle veziküllerden izole edilebilir. Enfekte hücrelerde balonlaşma, Cowdry Tip A intranükleer inklüzyon cisimciklerinin oluşması, kromatinin marjinasyonu ve çok çekirdekli dev hücrelerin oluşması karakteristik histopatolojik değişikliklerdir. Nötralizan antikörlerin varlığında bile olabilen hücre füzyonu HSV'nin hücreden hücreye yayılırken kullandığı etkili bir yöntemdir. Orofaringeal HSV-1 enfeksiyonları trigeminal gangliyonlarda latent enfeksiyona neden olurken, genital HSV-2 enfeksiyonları sakral gangliyonlarda latent olarak kalırlar. Primer HSV enfeksiyonları genellikle ağır seyretmez veya asemptomatiktir. Sistemik enfeksiyon gelişimi çok nadirdir. Viral replikasyonu ve viremiyi sınırlandıramayan bağışıklık sistemi baskılanmış konaklarda yaygın organ tutulumu görülebilir. Konakta HSV'ye karşı özgül sıvısal ve hücresele bağışıklık yanıtının oluşmasına karşın spontan reaktivasyonlar görülebilir. Bununla birlikte, bağışıklık yanıtı viral replikasyonu sınırlandırır. Bu nedenle tekrarlayan enfeksiyonlar daha sınırlı ve daha hafif seyirlidir. Primer enfeksiyon sırasında geçici IgM antikörleri oluşur bunu IgG ve IgA tipi antikörlerin oluşumu izler ve bu antikörler uzun süre kalır. HSV-2'nin viremi yapma potansiyeli HSV-1'den daha yüksektir (17,20).

HSV-1 ve HSV-2'nin sitolojik tanısında Tzanck testi yapılır. Vezikül tabanından hazırlanan preparatın Giemza veya Wright boyasıyla boyanması ile HSV ve VZV için karakteristik olan intranükleer Cowdry A inklüzyon cisimcikleri, multinükleer dev hücre ve sinsiya oluşumu görülür (20).

HSV-1 ve HSV-2'de kesin tanı yöntemi virüsün izolasyonudur. Virüsün üretilme şansı en yüksek olan lezyonlar başta veziküller olmak üzere sırasıyla püstüle lezyonlar, ülserler ve kurutlardır. Bu virüsler HeLa, Hep-2, insan

embriyonik fibroblast veya tavşan böbrek hücre kültüründe 1-3 gün içinde sitopatik etki oluşturur. Ardından üreyen virüs immunofloresan testi (İFA) veya DNA problrarı ile tanımlanabilir. Serolojik tanı yalnız primer hastalığın tanısı ve epidemiyolojik çalışmalarda yararlıdır. Anlamlı bir titre artışı olmayacağı için tekrarlayan enfeksiyonların tanısında kullanılmaz. Ayrıca moleküler yöntemlerle virüs DNA'sı tespit edilebilir. Tedavide bir nükleozid analogu olan asiklovir halen HSV'ye karşı kullanımda olan en etkili ilaçtır (17).

3.2.2. Epstein–Barr Virüs

Epstein–Barr virüs (EBV) herpesvirüslerin gamma *herpesvirinae* alt ailesine dahil bir DNA virüstür. Bu virüs yaklaşık 172 kbç uzunluğunda bir lineer çift zincirli DNA'ya sahiptir ve DNA'da GC oranı %59'dur. Geç antijenleri viral kapsit antijen (VCA) ve membran antijen (MA) virüsün yapısal komponentleridir. MA'ya karşı oluşan antikorlar virüsü nötralize etmektedir. Epstein–Barr virüs nükleer antijen (EBNA), latent membran proteinleridir (LMP). Virüsün bir kaç tane EBNA bölgesi vardır. Yalnız immortalizasyonun başlaması için EBNA-2 gereklidir (21).

Hayatın ilk yılında insanların % 90'ından fazlası Epstein-Barr virüs ile enfekte olur. Gelişmiş ülkelerde enfeksiyon adolesan dönemine kadar sarkabilmektedir (18). EBV, primer enfeksiyondan sonra tükürükten izole edilebilir. Sıklıkla öpüşmeyle bulaşabilir. İnkübasyon periyodunun 30-50 gün olduğu tahmin edilmektedir (21).

EBV'nin semptom ve bulguları lokal olarak tonsillite sebep olurken sistemik olarak ateş, yorgunluk, lenfositoz (atipik lenfositler), lenfadenopati, splenomegaliye yol açar. Semptomlar yaklaşık 10 gün kadar sürer (1-4 hafta), çocuklardaki bir çok enfeksiyon asemptomatiktir. Yetişkinlerde yorgunluk belirgin

olmakla birlikte uzamış bir nekahet dönemi olabilir (21). Ampisilin kullanımı sonrası alerjik rash yaygındır. Nadir komplikasyonu dalak rüptürü, hava yolu obstruksiyonu, fatal miyokardit, meningoensefalit, ikter, nefrit, pnömoni, trombositopenik purpura ve Guillain-Barre sendromuna sebep olabilir. Bazı hastalarda kronik yorgunluk sendromu EBV enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. EBV aynı zamanda bazı malign tümörler ve eritrofagositozla ilişkilendirilmiştir (21).

EBV tükürükte bulunabildiği için öpüşme, bardak veya diş fırçası gibi ortak kullanılan eşyalar ile bulaşabilir. EBV'nin doku tropizmi kısıtlıdır. EBV'nin hücre reseptörü komleman C3b'nin reseptörü ile aynıdır. Her ikisi de CR2(CD21)'i kullanır. CR2 nazofarinks, orofarinks epitelyum hücreleri ile B lenfositlerde bulunur. Lenfositlerde replikasyonunu tamamlamadan latent forma geçer. EBV ile enfekte hücrelerde immortalizasyon oldukça yüksektir. Yalnız bu hücrelerin %10'unun azından virüs partikülü salınır. Viral DNA büyük bir kısmı immortal hücreler içinde uç uca eklenmiş şekilde halkasal epizomlar halinde bulunur. İmmortal hücrelerden 6 farklı EBV nükleer antijeni (EBNA1-6) ve iki adet latent membran proteininin (LMP1, LMP2) içinde bulunduğu en az 10 viral genom ürünü açıklanmaktadır. Hücre çeşitli indükleyicilerle uyarıldığında latentlik bozulup EBV genomu aktive olarak replikasyona başlayabilir. EBV antijenleri viral replikasyon döngüsünün hangi döneminde açıklandıkları temel alınarak üç grupta toplanır.

- 1- Latent olarak enfekte olmuş hücrelerde sentezlenen latent faz antijenleri: Bu antijenler EBV genomu bulunan bütün hücrelerden açıklanır. Bunlar EBV nükleer antijenleri (EBNA1-6) ve latent membran proteinleridir (LMP1 ve LMP2). Bu

antijenlerden yalnız EBNA-1 sürekli olarak açıklanmaktadır. Latent faz antijenleri hücre zarında sitotoksik T hücreleri için hedef oluştururlar.

- 2- Erken antijenler (early antijen: EA): Yapısal olmayan proteinlerdir. Bu proteinlerin sentezi üretimli viral replikasyonun başladığını gösterir. EA'nın EA-R (sitoplazmada sınırlı) ve EA-D (hem çekirdek hem sitoplazmada yaygın) olmak üzere iki tipi vardır.
- 3- Geç antijenler: Viral kapsit antijeni (VCA) ve viral zarfın membran antijenidir. Bu antijenler üretimli viral replikasyonun sürdüğü hücrelerde bol miktarda üretilir (18).

EBV genomu içeren B lenfositleri ölümsüz olmakta veya transforme olmaktadır. Bu hücrelerde EBV antijenleri veya genomu tespit edilebilmektedir. İmmortal hücrelerdeki EBV genomu çoğu kez epizomal, çift zincirli, sirküler durumdadır. Buna rağmen bazıları hücre genomuna entegre olabilmekte ve bu şekilde B hücre mitojenizasyon süreci başlatılmış olmaktadır (21).

3.2.2.1. EBV'nin Sebep Olduğu Hastalıklar

Enfeksiyöz mononükleoz :

Enfeksiyöz mononükleoz (EMN) genelde enfekte tükürükle bulaşır ve farenjit tablosuna sebep olur. Bunu lenfoid doku ve B lenfositlerin enfeksiyonu izler. Virüs, B lenfositler için mitojenik olduğu için hücrelerde poliklonal transformasyona sebep olur. Bu non-spesifik aktivasyon sonucu heterofil antikorlar oluşur. Enfekte B hücrelerinin kontrolü için baskılayıcı T hücreleri (CD8) aktive olur. Bu ise hastalık sırasında görülen mononükleer hücre artışının oluşmasına ve atipik lenfositlerin (downey hücreleri) oluşmasına yol açar. Hastalık esnasında hepatosplenomegali (HSM) ve yaygın lenfadenopati görülür. Hücresel bağışıklığı

yeterli olanlarda enfeksiyon kontrol altına alınır ve virüs B lenfositlerinde latent forma geçer ve konağın hayatı boyunca taşınır (18).

Burkitt lenfoma :

Burkitt lenfomaların büyük kısmında EBV tespit edilmiştir. Afrika'daki burkitt lenfoma tümörlerinin yaklaşık %90'ında EBV DNA'sı ve EBNA-1 antijeni saptanır. Dünyanın diğer bölgelerindeki burkitt lenfomalarda EBV DNA pozitifliği ise %20'dir.

Nazofaringeal karsinom :

Nazofaringeal karsinom (NFK) Çinli erkeklerde sık görülen epitelyal hücre kanseridir. Tümör hücreleri az diferansiye olmuştur ve hızla ilerler. Genetik ve çevresel faktörler de gelişmesinde etkilidir.

EBV'nin indüklediği lenfoproliferatif hastalıklar :

EBV, hücrel bağışıklık yanıtının normal olmadığı kişilerde çeşitli lenfoproliferatif hastalıklara yol açabilir. Transplant hastaları primer enfeksiyondan veya latent virüsün reaktivasyonundan sonra transplantasyon sonrası lenfoproliferatif hastalık için risk altındadır. Lenfomalar genellikle multiklonaldır. Burkitt lenfomaya benzer kromozom anomalileri göstermezler.

Hairy oral lökoplaki :

Hairy oral lökoplaki AIDS'li hastalarda ve transplantasyon yapılanlarda görülen dilde siğil benzeri lezyonlarla karakterize fırsatçı bir EBV enfeksiyonudur (18).

3.2.2.2. EBV İnfeksiyonlarının Tanı ve Tedavisi

Enfeksiyon mononükleozun etiyolojik teşhisi serolojiktir. Lam aglutinasyon testi heterofil antikorların tespitinde kullanılabilen kolay bir yöntemdir. Heterofil antikorlar direkt viral antijenlere yönelik değildir koyun, at, keçi ve deve

eritrositlerine karşı reaksiyon vermektedir. Genellikle bu antikolar hastalığın ilk haftasında ortaya çıkmakta ve 8 hafta kadar sürmektedir. Heterofil antikolar EMN için patogonomiktir. Bu antikoların varlığının hassasiyeti on'lu yaşlarda ve yetişkinlerde %95'dir. Yalnız küçük çocuklarda bu antikolar olmayabilir. EBV'nin spesifik serolojisinde VCA ve EBNA'ların tespiti önemlidir. Akut enfeksiyonda VCA antikoları tespit edilebilir. EBNA antikoları akut enfeksiyondan haftalar veya aylar sonra tespit edilebilir (21).

EMN'lilerin orofaringeal örneklerinin virüs kültürü ile %80-90 hastada EBV tespit edilebilir. Buna rağmen EBV'nin tanı amaçla kültürü zahmetli bir iştir. Virüsün enfeksiyonundan haftalar hatta aylar sonra bile oral tespiti mümkün olduğundan enfeksiyonun teşhisinde kültürün yorumu zordur. DNA hibridizasyon yöntemleri ve PCR ile virüs genomunun tespiti de teşhiste kullanılan yöntemlerdendir (21).

EMN'li hastalarda tam kan sayımı ve periferik yaymada mutlak lenfositöz saptanır. Yaklaşık 12000-18000/mm³ olan beyaz küre sayısının %60-70'i lenfosit ve monositlerden oluşur. Bazı hastalarda çok az sayıda anormal lenfosit görülürken bir kısım hastada bu lenfositlerin oranı %90'lara kadar çıkabilir. Bunlara atipik lenfositler (downey hücreleri) de denir. Atipik lenfositler olgun lenfositlerden daha büyük modifiye sitotoksik T hücreleridir. Nükleusları büyük ve lobüler, sitoplazmaları ise çoğu kez vakuollü ve bazofiliktir. Bu lenfositler CMV enfeksiyonu gibi bazı başka hastalıklarda da görülebilir.

EBV spesifik antikor testleri arasında en sık kullanılan serolojik testler EBV'ye karşı oluşmuş anti-VCA antikolarının araştırıldığı enzime bağlı immunosorbent assay (ELISA) ve immunofloresan antikor (IFA) testleridir. VCA-IgM yanıtı akut EMN tanısında kullanılır. VCA-IgG yanıtı ise geçirilmiş hastalığın

tanısında kullanılır. anti-VCA antikollarının negatifliği kişinin EBV enfeksiyonu geçirmediğini gösterir.

VCA-IgA pozitifliğinin nazofarinks karsinomu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. IFA yöntemi ile akut EMN li hastaların %70'inde anti-EA-D , çok az bir bölümünde ise anti-EA-R antikolları pozitifdir. Burkitt lenfomada EA-R antikoru (yüksek titrede), nazofarinks karsinomunda ise EA-D antikoru pozitifdir. Ayrıca anti-EBNA antikolları da EMN geçirenlerde yaşam boyu kalır ve geçirilmiş enfeksiyonu gösterir.

Tedavisinde kullanılacak etkili bir antiviral ilaç yoktur (18).

3.2.3. Sitomegalovirüs (CMV)

Herpesvirüsler içinde en büyük genoma sahip olan virüstür. Kodladığı çok sayıda proteinden yalnız küçük bir bölümü karakterize edilmiştir. CMV, hücre kültürlerinde karakteristik sitopatik etki oluşturur. Herpesvirüslerdeki tipik intranükleer inklüzyon cisimciklerine ek olarak perinükleer sitoplazmik inklüzyonlar ve çok çekirdekli sitomegalik hücrelerde görülür. CMV, yüksek sıklıkta konjenital enfeksiyona neden olduğu için önemli bir halk sağlığı problemidir. Ayrıca, sağlıklı bireylerde hafif seyirli, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ise ağır CMV enfeksiyonları görülebilir.

İnsan CMV idrarda, tükürükte, semende, anne sütünde, sekresyonlarda ve dolaşımdaki beyaz kan hücrelerinde bulunabilir. Oral ve solunum yoluyla yayılım CMV'nin muhtemelen en önde gelen bulaşma yoludur. Buna karşın virüs plasenta yoluyla konjenital olarak bulaşabileceği gibi kan transfüzyonu ve cinsel ilişki ile de bulaşabilmektedir. Amerika'da yapılan bir çalışmada doğan bebeklerin %1'inin CMV ile enfekte olduğu belirlenmiştir. Enfekte olarak doğanların da %7'sinde

virüse bağlı küçük beyin çapı ve hepatoslenomegali gibi doğumsal problemler tespit edilmiştir (20).

CMV polimorf nüveli lökositlerde, mononükleer hücrelerde, B lenfositlerinde, epitelyum hücrelerinde, kalp, böbrek, tükürük bezi, adrenal bezi gibi organlarda, kemik iliği stromal hücrelerinde latent enfeksiyona neden olur. Primer CMV enfeksiyonu T süpresör hücrelerde artışa yol açarak CD4/CD8 oranının azalmasına neden olur. Ayrıca, Ig'lerin Fc bölgesine non-spesifik olarak bağlanıp Fc reseptörü gibi rol oynayan ve böylece enfekte hücrelerin immün temizlemeden korunmasına yardım eden bir glikoprotein üretir. Birçok insanın serumunda CMV' ye karşı özgül IgM, G ve A sınıfı antikorlar saptanabilir.

CMV en sık konjenital defekte sebep olan virüstdür. Gebelik sırasında geçirilen primer maternal enfeksiyonlar sitomegalik inklüzyon hastalığının büyük bir bölümünden sorumludur. Daha önce CMV ile enfekte olmuş kadınlarda gebelik sırasında reaktivasyon sıktır. Term'e yakın gebelerin yaklaşık %13'ünün genital sekresyonlarında CMV saptanmaktadır. Bu gebelerden doğan bebeklerin yaklaşık yarısı doğum esnasında CMV ile enfekte olmaktadır.

Büyük çocuklarda ve yetişkinlerde primer CMV enfeksiyonları çoğu kez asemptomatik olarak geçirilmesine karşın EBV'nin yol açtığı mononükleoz enfeksiyonuna benzer bir klinik tabloda görülebilir. CMV, mononükleozunda farenjit daha hafiftir. Atipik lenfositler görülmesine karşın heterofil antikorlar negatiftir. CMV heterofil antikor negatif mononükleoz olgularının %20-50'sinden sorumludur. CMV bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda karakteristik fırsatçı enfeksiyon ajanlarından biridir. Yaygın hastalıkta birçok organda tipik sitomegalik inklüzyon hücreleri bulunabilir.

CMV enfeksiyonlarının histolojik karakteristiği multinükleer dev hücrelerdir. İdrar, tükürük, kan, BAL ve doku biyopsilerinden alınan örneklerin HE ile boyanması ile CMV için karakteristik santral yerleşimli, yoğun *owl's eye* (baykuş gözü) olarak adlandırılan bazofilik intranükleer inklüzyon cisimcikleri görülür.

CMV hücre kültüründe virüs boğaz çalkantı sıvısı ve idrardan kolaylıkla izole edilebilir. CMV sadece insan diploid fibroblast hücre kültürlerinde ürer. Kültürde sitopatik etki oluşturur. Serojik olarak fetusda CMV IgM pozitifliği konjenital enfeksiyonu gösterir. Normal konakta serokonversiyon primer CMV enfeksiyonu için iyi bir göstergedir. Bağışık yetmezlikli hastalarda yeterli antikor yanıtı olmadığından böyle hastalarda CMV reaktivasyonunu saptamak için CMV antijeni testi yapılmaktadır. Bu yöntemde CMV antijeni IFA ile semi kantitatif olarak saptanmaktadır. Son yıllarda özellikle immünsüprese hastalarda CMV'nin kalitatif ve kantitatif saptanmasında PCR yöntemi de kullanılmaktadır. Tedavide gansiklovir, foskarnet ve sidofovir bağışık yetmezlikli hastalardaki CMV enfeksiyonlarında yararlıdır (18).

3.3. PCR Yöntemi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA yapısının tam olarak aydınlatılması ve rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesinden sonra moleküler biyoloji alanında ortaya çıkan en büyük yenilik olarak kabul edilmektedir. Bu teknik herhangi bir tek kopya gen diziliminin *in vitro* şartlarda bir kaç saat içinde milyonlarca kez çoğaltılmasına imkan vermektedir (22-24). Dolayısıyla, çok az sayıdaki hedef DNA'nın kısa sürede çoğaltılmasını ve daha sonra DNA'nın hibridizasyon deneylerinde etiketli prob kullanılarak kolaylıkla kimliklendirilmesini sağlayabilmektedir. Ayrıca, PCR RNA'nın tespiti için

uygulanabilmektedir. Bu durumda, öncelikle RNA'nın DNA'ya dönüştürülmesi için reverse transkriptaz adımı deneye dahil edilmektedir. PCR tekniğinin RNA'da da kullanılması RNA virüsler'in tespiti ile birlikte özellikle rekombinant DNA teknolojisinde mRNA'dan DNA'ya akışı sağlaması bakımında da çok önem arz etmektedir. PCR tekniğinde genomun tamamını çoğaltmak gerekli değildir ve genellikle bütün genom çoğaltılmaz. Çoğaltılması istenen genom içindeki kısa dizilimin iki ucunu temsil eden iki oligonükleotid primerin sentezlenebilmesi için bu dizilimin iki ucunun bilinmesi gerekmektedir. Ancak, bu seçilen bölgeye uygun primerlerin aynı genom veya elde edilecek örnekte bulunabilecek diğer DNA'lar üzerinde bulunmaması gerekmektedir. Bu nedenle primer seçimi PCR'de kritik bir adım olarak değerlendirilmektedir. Primer seçiminden sonra, bir PCR döngüsü şu aşamalardan oluşur :

1-Ayrılma (Denaturasyon): Çift iplikli DNA'nın birkaç saniye 94-96 °C ısı ile tek iplikli DNA'ya ayrılmasıdır.

2-Bağlanma (Annealing): Örneğin, bir kaç dk. 30-60 °C'de tutularak, primerlerin (spesifik sentetik oligonükleotidler) tek iplik DNA'daki hedef bölgelere bağlanmasının sağlanmasıdır.

3-Uzatma (Extansion): Polimeraz enzimi yardımı ile tek iplik DNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5'→3' yönünde başlayarak yeni DNA'yı sentezlemesidir. DNA zincirinin komplementerini sentezlemesi için 65-72 °C de birkaç dk. beklenir. Bağlanma sikluslarını takiben orijinal DNA segmenti yeni komplementer DNA'lar oluşturur. Böylece her PCR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkmaktadır. Bu işlem 30 kez tekrarlanarak bir milyardan fazla hedef DNA parçacığının sentezlenmesi mümkün olur (22-24).

Çoğaltma işleminden sonra PCR ürünleri genellikle agaroz jel üzerindeki kuyucuklara yüklenir ve daha sonra elektroforez işlemine tabi tutulur. Ayrıca prob teknolojisiyle işaretli DNA dizilimleri kullanılarak da PCR ürünleri gösterilebilir (22-24).

PCR'nin en önemli avantajı 25 baz çifti (bç)'den 10000 bç'ye kadar olan spesifik DNA dizilerini çoğaltma kabiliyetine sahip olmasıdır. Primer spesifik hedef dizileri kullanmaktadır ve bir DNA parçası sadece 3 saat içerisinde milyon defa kopyalanabilir. PCR'nin dezavantajları yanlış negatif ve pozitif sonuç verme ihtimaline sahip olmasıdır. Bu durumlara sebep olan faktörler belirlenmiş bunlara karşı çözüm yolları geliştirilmiştir (22). Bu nedenle, PCR yöntemi iyon konsantrasyonu, ısı, primer konsantrasyonu ve nükleotid konsantrasyonu gibi şartların çok dikkatlice ayarlandığı bir ortamda yürütülmelidir. Bu kontrollü şartlardan sapma halinde özgül olmayan çoğaltmalar ortaya çıkabilir. Bu problemler, PCR'nin araştırma metodu olma kimliğinden rutin teşhis metodu kimliğine geçmesini geciktirmiştir. Bu nedenle, bugün, kılı kırk yararcasına gösterilen dikkat neticesinde ve deneyimli laboratuvar çalışanlarının varlığında, PCR yöntemi, güvenilir bir metod olarak kabul edilmektedir (22-24).

PCR, tıbbi araştırma alanlarının birçoğunda önemli kullanım alanı bulmuştur. Özellikle mikrobiyolojide yavaş üreyen veya kültürü yapılamayan birçok mikroorganizmanın direkt tanısında oldukça başarı sağlamaktadır. Amplifikasyon metodları günümüzde, amplifiye ürünlerin hızlı tespitini sağlayan metotlarla kombine olarak kullanılmakta olup rutin tanı için oldukça hassas hale gelmişlerdir. Amplifikasyon yöntemlerinin bu kadar hızlı gelişiminde iki önemli gelişmenin payı vardır. Bunlardan birincisi daha önce bahsedildiği gibi termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus* adlı bakteriden ısıya dayanıklı DNA

polimerazın izolasyonudur. Bu enzim *Taq* DNA polimeraz olarak tanımlanmış olup, farklı ısı aralıklarında aktivitesini sürdürebilmektedir. İkinci olarak da bilgisayar kontrollü termal döngü cihazlarının geliştirilmesidir. Klasik PCR dışında, RNA'nın amplifikasyonu için reverz transkriptaz PCR (RT-PCR), ön amplifikasyonla elde edilen uzun gen dizileri içerisindeki daha spesifik ve kısa dizilerin amplifikasyonu için "nested" PCR ve örnekteki birden fazla mikroorganizmaya ait veya bir mikroorganizmanın geni üzerindeki farklı bölgeleri aynı anda çoğaltmak amacıyla geliştirilmiş multipleks PCR yöntemleri mevcuttur (22-24).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Hastaların Seçimi

Çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile Elazığ Diş Hastanesi'nin ortak katkıları ile gerçekleştirildi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nca onaylanan çalışmada Elazığ Diş Hastanesi Periodontoloji Kliniği'ne başvuran periodontitli 52 hastadan alınan krevikular sıvı örnekleri hasta grubunu oluştururken kontrol grubu olarak 20 sağlıklı bireyden krevikular sıvı örnekleri alındı. Hasta grubunu yaşları 33-67 arasında değişen (ortalama 49.9) 23 bayan ve 29 erkekten toplanan örnekler oluştururken, sağlıklı grubu da yaşları 30-56 arasında değişen (ortalama 43.3) 10 erkek ve 10 bayandan toplanan örnekler teşkil etti.

4.2. Örneklerin toplanması ve analize hazırlanması

Çalışmada kullanılan örnekler periodontoloji polikliniğinde hasta başında alındı. Örnekler son altı ay içinde antibiyotik almamış hastalardan temin edildi. Genellikle bu tip çalışmalarda sıkça kullanıldığı ve bu sayede çalışmalar arasında mukayese imkânı sağladığı için, örnek alınan hastaların Silness- Loe'un plak indeksi ve gingival indeksi skorlandı (Tablo 1 ve 2). Ayrıca hastaların diş cep derinliği belirlendi.

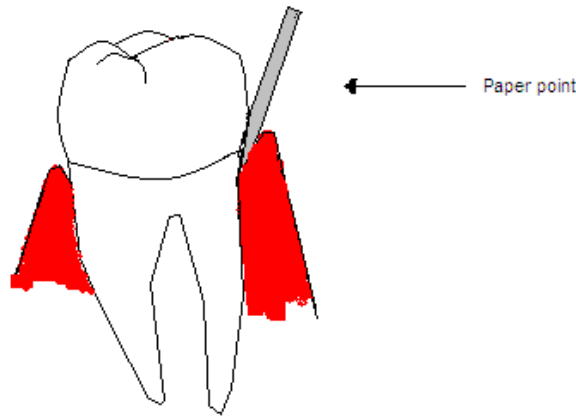
Tablo 1. Plak indeksi (Pİ).

Skor	Kriter
0	ak yok
1	işin gingival kenarına yapışmış film plağı mevcut ancak görüntü sağlayacak solusyonlar ya da diş yüzeyine prob kullanarak görülebilmekte.
2	ingival cebin içinde veya diş yüzeyinde çıplak gözle görülebilen orta derecede yumuşak depozit birikimi
3	ingival cep veya diş yüzeyinde bol miktarda yumuşak depozit birikimi mevcut.

Tablo 2. Gingival indeks (Gİ).

Görünüm	Kanama	inflamasyon	kor
ormal	Yok	Yok	0
ingivanın renginde hafif değişiklik ve gingivanın sertliğinde hafif değişiklikle birlikte hafif ödem	Yok	Hafif	1
ızarıklık, hipertrofi, ödem	'rob dokunması ve bastırma ile kanama	Orta	2
elirgin kızarıklık, hipertrofi, ödem, ülserasyon	pontan kanama	Şiddetli	3

Hastalardan örnekler alınmadan önce hastaların ağızlarını 30 sn kadar klorhexidine ile yıkamaları istendi. Paper pointler (micro-IDent-plus/Hain-Lifescience) diş hekimleri tarafından periodontal ceplere yerleştirildi (Şekil 4). Krevikular sıvıyı emmesi için 30 sn bekletildikten sonra, paper pointler steril kapaklı ependorflara alındı. Örnekler buz aküleri ile birlikte hızlı bir şekilde laboratuvara ulaştırıldı. Örnekler laboratuvarında çalışılacak zamana kadar -80°C derecede stoklandı.



Şekil 4. Paper point'ler kullanılarak örnek alımı.

4.3. Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan demirbaş malzemelerin başlıcaları; hücre kültür etüvü (Heraus Co. UK), elektroforez cihazı (Consort E833, Belgium), elektroforez tankı, fotoğraf makinesi (Polaroid, UK) ve fotoğraf filmi (Polaroid 667), ısı bloğu (Major Science MD-02, Belgium), santrifüj cihazı (Hettich Zentrifugen Mikro 22R, Germany), PCR cihazı (AB Applied Biosystems 2720 thermal Cycler, Singapur), ultraviyole transilluminatör (Vilber Lourmat, France), elektronik hassas terazi (Sartorius BÇ 410, Germany) ve hız ayarlı vorteks (VELP Scientifica, Italy) .

4.4. Kontrol Virüsleri

Tüm PCR aşamalarında pozitif kontrol olarak kullanılan HSV-1 wal ve HSV-2/333 virüs suşları Karadeniz Teknik Üniversitesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Kuru buz içerisinde getirtilen virüsler hücre kültürüne ekilinceye kadar - 80 °C'de saklandı. HSV-1 ve HSV-2'ye ilave olarak yine PCR aşamalarında pozitif kontrol olarak EBV ile enfekte olduğu bilinen lökosit hücre (EBV/NCL-BL1514) kültürü (Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji A.D) kullanıldı. CMV için ise kullanılan pozitif kontroller ise İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Bu amaçla CMV DNA pozitifliği yönünden araştırılmak üzere laboratuara gönderilen serum örnekleri kullanıldı. Bu örneklerle "Real-Time" PCR yöntemi için "Arthus CMV PCR" kiti kullanılarak Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) cihazı ile viral yükler araştırıldı (yöntemin duyarlılığı 0.24 kopya/µl, P=0.005). Kitlerin içeriğinde PCR inhibisyonunu saptamak için iç kontroller ve DNA izolasyonunu denetlemek için dış kontroller mevcuttu. Standartların eşik değerleri göz önüne alınarak örneklerdeki viral yük kantitatif olarak değerlendirildi.

4.5. Hücre Kültürü ve Virüs Üretilmesi

HSV-1 ve HSV-2 virüslerinin üretilmesi amacıyla devamlı hücre hattı olan Madin-Darby sığır böbrek hücreleri (MDBK; American Type Culture Collection, MD, USA) kullanıldı.

Hücre kültürü esnasında, hücrelerin çoğaltılması için, %10 Fötal Sığır Serum (FBS; SIGMA, F-2442)'u içeren hazır Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM; SIGMA) vasatı tercih edildi. Vasatların hazırlanması esnasında her ml vasat için 0,01 mg streptomisin, 100 ünite penisilin (SIGMA) vasata ilave edildi. Virüs üretimi amacıyla ise %1 FBS içeren DMEM vasatından faydalanıldı (25).

HSV-1 ve HSV-2 virüsleri 25 cm²'lik hücre kültür kaplarında üretilen ve kap yüzeyinin % 80'inde tek tabaka oluşturmuş olan MDBK hücrelerine adsorpsiyona bağlı metot ile ekildi. Hücreleri günlük olarak mikroskopta incelendi (26).

Hücrelerin yaklaşık %70'inde sitopatik etkinin (CPE) görüldüğü aşamada hücre kapları önce - 20 °C'ye kaldırıldı ve burada 1 saat tutuldu. Daha sonra, hücre kapları 37 °C'ye alındı. Tam çözünmeden sonra, kaplardaki içerik 10 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 3000 rpm'de (Hettich, Tuttlingen, Germany) 10 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüjle hücre artıklarından arındırılan üst sıvılar 0,5 ml'lik kısımlara bölünerek, PCR'de kullanılmaya kadar - 80 °C'ye kaldırıldı. Ayrıca, dondurulan HSV-1 virüslerinin biri çıkartılarak bu virüsün titresi yine MDBK hücrelerinde ve 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında klasik titrasyon metoduna göre gerçekleştirildi

4.6. Kontrol Virüslerinden DNA İzolasyonu: HSV-1 ve HSV-2 enfekte hücre üst sıvılarında, CMV pozitif serum ve EBV enfekte hücrelerden DNA izolasyonu klasik fenol-klorform ekstraksiyon metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla, - 80 °C’de çıkartılan ve 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılan 100 µl virüs örnekleri üzerine 500 µl K-Tamponu (20 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, % 0.5 SDS ve 2 mg/ml proteinase-K) ilave edildi. Sindirim için 37 °C’de 2 saat beklendi. Tüplere 600 µl fenol-klorform ilave edildi ve 1 dk’lık vorteks işlemi gerçekleştirildi. Tüpler 12000 rpm’de 15 dk. santrifüj edildikten sonra, üst sıvılar 0,5 ml’lik temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplere 1/10 volüm 3 M Na-Asetat (pH 5.2) ve 2 volüm saf ethanol ilave edildi. Vorteksleme ve -80 °C’de 2 saat beklemeyi takiben, 12000 rpm’de 15 dk’lık santrifüj işlemi tekrarlandı. Üst sıvılar uzaklaştırıldı ve pelet DNA’lar üzerine %70’lik ethanol eklenip ve hafif vorteksleme gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi tekrar edildikten sonra, üst sıvılar döküldü ve tüplerde bulunabilecek alkolün tam olarak uzaklaşması için DNA peletleri oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kurutulmuş DNA peletleri 50 µl steril distile H₂O ile sulandırıldı ve PCR’de kullanılmaya kadar - 20 °C’ye kaldırıldı.

4.7. PCR’nin Deteksiyon Limitinin Tespiti: Çalışmada yer alan viral etkenlerin ekstraksiyon ve PCR’nin duyarlılığını test etmek için pozitif kontrol olarak kullanılan ve titresi belirlenen HSV-1 standart suşunun 10 kat azalan dilasyonları ile PCR işlemi gerçekleştirildi (26).

4.8. Paper pointlerden DNA izolasyonu

Tüm dış örneklerinden QIAamp DNA Mini Kit ile üretici firmanın (Qiagen) önerileri doğrultusunda DNA izolasyonu yapıldı.

İzolasyon protokolü şu şekilde uygulandı:

Ön hazırlık aşamasında, örnekler oda ısısına getirildi. Daha sonra solüsyon AW1 (19 ml AW1'e 25 ml etanol ilave edilip toplam volüm 44 ml şeklinde ayarlandı) ve solüsyon AW2 (13 ml solüsyon üzerine 30 ml etanol bırakılarak toplam volüm 43 ml şeklinde ayarlandı) taze olarak hazırlandı.

Bu hazırlık aşamalarını takiben;

1- Paper pointler 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine (eppendorf) kesilerek yerleştirildi. Üzerlerine 180 µl solüsyon ATL ilave edildi.

2- Örnekler 85 °C'lik ısı bloğunda (Major Science MD-02, Belgium) 10 dk. inkübe edildi. Takiben kısa bir süre (45 sn) 3000 rpm'de santrifüj (Hettich Zentrifugen Mikro 22R, Germany) yapıldı.

3- Tüplere kit içinde yer alan 20 µl proteinaz solüsyonu ilave edilip karışım vortekslendi (Labinco L46, Netherlands). Örnekler 56 °C derecede bir saat bekletildi. Santrifüj işlemi tekrarlandı.

4- Tüplere 200 µl buffer solüsyon AL ilave edilip, tüpler vortekslendi. Örnekler 70 °C derecede 10 dk. inkübe edildi ve santrifüj işlemi tekrar edildi.

5- Tüplere 200 µl etanol (%100) ilave edilip vortekslendikten sonra kısa bir süre santrifüj işlemi tekrarlandı.

6- Karışım 2 ml'lik tüpün içine alındıktan sonra 8000 devirde bir dk. santrifüj edildi. Takiben kolon yeni 2 ml'lik tüpe alındı.

7- Karışımın üstüne 500 µl buffer solüsyon AW1 ilave edilip 8000 devirde bir dk. santrifüj edildi. Kolon yeni bir 2 ml lik tüpe alındı.

8- Kolona 500 µl solüsyon AW2 ilave edilip, kolon 14000 devirde üç dk. santrifüj edildi.

9- Kolonlar 1.5 ml tüplere alındı. Üzerlerine 150 µl buffer AE ilave edilip oda ısısında 5 dk. inkübe edildi. Takiben 8000 rpm'de bir dk. santrifüj edildi.

10- Elde edilen yaklaşık 150 µl'lik DNA materyali PCR aşamasında kullanılmak üzere - 20 °C derecede saklandı.

4.9. Oligonükleotidler (Primerler)

Çalışmada, Iontek firmasına sentezletirilmiş olan oligonükleotidler (primerler) kullanıldı. Ayrıca kullanılan diğer primerlerden farklı olarak, HSV-1 DNA varlığını belirlemek için ise özel bir primer dizayn programıyla elde edilen primerler (oligoyap 3.0-GATA Viroloji Bilim Dalı, ANKARA) dizayn edildi. Primerlerin nükleotid dizileri ve PCR ürün boyutları Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan primerler (27-29).

Virus	Hedef Bölge	Ürün uzunluğu (bp)	Primer Dizilimleri
HSV-1	gpC	450 bp	P1 (5' TGA CGT TTG CCT GGT TCC TG 3')
HSV-1	gpC	450 bp	P2 (5' GAA GAG AGG GTG GCG GCT TTA 3')
HSV-2 1.PCR	gpG	184 bp	P1 (5' TCA GCC CAT CCT CCT TCG GCA GTA 3')
HSV-2 1.PCR	gpG	184 bp	P2 (5' GAT CTG GTA CTC GAA TGT TCT CCG 3')
HSV-2 2.PCR	gpG	100 bp	P3 (5' AGA CGT GCG GGT CGT ACA CG 3')
HSV-2 2.PCR	gpG	100 bp	P4 (5' CGC GCG GTC CCA GAT CGG CA 3')
EBV	gp220	239 bp	P1 (5' AGG GAT GCC TGG ACA CAA GA 3')
EBV	gp220	239 bp	P2 (5' TGG TGC TGC TGG TGG TGG CAA T 3')
CMV-1.PCR	UL123	438 bp	P1 (5' CAA GCG GCC TCT GAT AAC CAA GC 3')
CMV-1.PCR	UL123	438 bp	P2 (5' CTC TTC CTC TGG GGC AAC TTC CTC 3')
CMV-2.PCR	UL123	190 bp	P3 (5' CCG ATC CTC TGA GAG TCT GCT CTC 3')
CMV-2.PCR	UL123	190 bp	P4 (5' CAG CCA CAA TTA CTG AGG ACA GA 3')

4.10. PCR Aşaması

4.10.1. EBV ve HSV-1 virüsleri için spesifik PCR

Bu aşamada EBV için, gp220 gen bölgesine spesifik olan ileri P1 (5' GGC TGG TGT CAC CTG TGT TA 3') ve geri P2 (5' GGC TGG TGT CAC CTG TGT TA 3') primerleri kullanılırken, HSV-1 için ise özel bir primer dizayn programıyla elde edilen ileri P1 (5' TGA CGT TTG CCT GGT TCC TG 3') ve geri P2 (5' GAA GAG AGG GTG GCG GCT TTA 3') primerleri (oligoyap 3.0-GATA Viroloji Bilim Dalı, ANKARA) kullanılmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu için, her bir tüpe örnek başına 5 µl MgCl₂ (25mM), 5 µl buffer, (10x) 4 µl dNTP (2.5 mM/Fermentas), her bir ileri ve geri primerden 1 µl, 0.5 µl Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve 24.5 µl dH₂O'dan oluşan PCR karışımı ve 10 µl kalıp DNA konularak toplam 50 µl üzerinden PCR kuruldu. Tüpler ısı döngü cihazına (AB Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, Singapur) yerleştirilerek ilk aşamada çift sarmal DNA moleküllerinin denatüre edilmesi amacıyla 94°C'de 4 dk.lık bir döngüye tabi tutuldu. Polimeraz zincir reaksiyonu işleminin ikinci aşaması ise sırasıyla 94°C'de 1 dk. ayrılma (denaturation), 56°C'de 1 dk. bağlanma (annealing), 72°C'de 1 dk. uzatma (elongation) olmak üzere, 40 döngü üzerinden ısı döngü cihazında gerçekleştirildi. Kırk siklusun sonunda üçüncü aşama olan uzatma periyodu için 72°C'de 10 dk. tutuldu. Çoğaltma sonrası, EBV için 239 (bç) ve HSV-1 için ise 450 bç uzunluğundaki ürünler etidyum bromidli (Sigma Co., UK) % 2'lik agaroz jelde yürütülerek elektroforezle ayırt edildi ve UV transilluminatör (Vilber Lourmat, France) ile oluşan bantlar incelendi. Sonuçlar fotoğraf makinesi (Polaroid, UK) ve fotoğraf filmi (Polaroid 667) kullanılarak görüntülendi.

Bu aşamada örneklere uygulanan bütün işlemler, EBV ve HSV-1 virüs pozitif kontrolleri için de uygulandı.

4.10.2. CMV ve HSV-2 virüsleri için spesifik nested PCR

Herpesvirüs ailesinden olan CMV ve HSV-2 virüslerini belirlemeye yönelik nested PCR aşamasında kullanılan primerler, CMV virüs için UL123 ve HSV-2 virüs için ise gpG gen bölgeleri üzerinden seçilmiştir (27-29). Nested PCR'nin birinci aşamasında CMV DNA pozitifliğini belirlemek için Tablo 3'de belirtilen içsel primerler P1 (5' CAA GCG GCC TCT GAT AAC CAA GC 3') ve P2 (5' CTC TTC CTC TGG GGC AAC TTC CTC 3') primerler kullanılırken, HSV-2 DNA pozitifliğini tespit edebilmek için ise P1 (5' TCA GCC CAT CCT CCT TCG GCA GTA 3') ve P2 (5' GAT CTG GTA CTC GAA TGT TCT CCG 3') içsel primerlerinden yararlanılmıştır.

Reaksiyon miksi için, her bir tüpe örnek başına 5 µl MgCl₂ (25mM), 5 µl buffer, (10x) 4 µl dNTP (2.5 mM), her bir içsel ileri ve geri primerlerinden 1 µl, 0.5 µl Taq DNA polimeraz ve 24.5 µl dH₂O'dan oluşan PCR karışımı ve 10 µl template DNA konularak toplam 50 µl üzerinden PCR kuruldu. Tüpler cihaza yerleştirilerek, EBV ve HSV-1 için kullanılan PCR şartları uygulandı.

Nested PCR'nin ikinci aşaması için, birinci PCR ürünlerinden 2 µl DNA kalıp olarak kullanılırken, primer olarak CMV için dışsal ileri P3 (5' CCG ATC CTC TGA GAG TCT GCT CTC 3') ve geri P4 (5' CAG CCA CAA TTA CTG AGG ACA GA 3') primerlerinden yararlanılırken, HSV-2 için ise dışsal ileri P3 (5' AGA CGT GCG GGT CGT ACA CG 3') ve geri P4 (5' CGC GCG GTC CCA GAT CGG CA 3') primerleri kullanıldı. Reaksiyon karışımı birinci PCR

aşamasında anlatıldığı gibi 50 µl üzerinden hazırlandı. Tüplerin cihaza tekrar yerleştirilmesinden sonra ise yukarıdaki PCR şartlarında fakat 32 döngüde işlem gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda CMV için 190 bç ve HSV-2 için ise 100 bç uzunluğundaki ürünler etidyum bromidli %2'lik agaroz jelde yürütülerek elektroforezle ayırt edildi. Daha sonra ise UV transilluminatör ile oluşan bantlar incelenerek bant profilleri fotoğraf makinesi ve fotoğraf filmi ile görüntüledi.

Bu aşamada örnekler üzerine uygulanan bütün işlemler, HSV-2 virüs suşuna ve CMV virüs pozitif DNA kontrolü için de uygulandı.

Çalışmanın her aşamasında pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. PCR denemelerinde optimum sonucun elde edilebilmesi için siklularda, bağlanma ısılarında ve templat DNA miktarlarında bazı değişiklikler yapıldı. Pozitif kontrollerle gerçekleştirilen 52°C, 56°C, 58°C bağlanma ısılarına yapılan PCR'de en iyi sonucun 56°C de saptandığı görüldü.

4.11. Agaroz Jel Elektroforezi

Tüm PCR çoğaltma ürünleri etidyum bromidli %2'lik agaroz jelde yürütülerek elektroforezle göç ettirildi ve UV transilluminatörde incelenerek oluşan bantlar görüldü. %2'lik agaroz jel hazırlamak için 2 gr agaroz tartılarak 100 ml TAE (Bu solüsyonun önce 50X'lik stok şekli hazırlandı. Bu amaçla 242 gr TRIS-base, 57.1 gr glacial asetik asit ve 100 ml 0.5 M EDTA (etilendinitrilotetraasetik asit, pH 8) 1 litre distile suda çözüldü. Bu stok solüsyon kullanılırken 50 kat distile suda karıştırılarak kullanılabilir hale getirildi) solüsyonunda kaynatılmak suretiyle eritildi. Eriyen agaroz-TAE solüsyonu karışımı 60 °C'ye soğutulduktan sonra, içine DNA bantların ultraviyole ışık altında görünür hale gelmesini sağlamak için 15 µl etidyum bromid eklenerek iyice homojenize edildi. Sıvı halde olan jel, katılaşması

için jel kalıbına döküldü. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ürünlerinden 10 µl alınıp 3 µl yükleme tamponu (bromphenol blue ve xylene cyanole) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Beklenen bant boyutlarının belirlenebilmesi amacıyla 100 bp'lik DNA markeri de jele yüklendi. Jel 15-20 dk. süre ile 150 volt sabit akımda elektroforez edildi ve UV transilluminatör cihazı ile görüntüledikten sonra bantlar değerlendirildi. Hastalıklı gruptaki EBV,CMV varlığı ile sağlıklı gruptaki EBV,CMV varlığı arasındaki farkın anlamlı olup olmadığını tespit etmek için fisher's exact testi uygulandı. Virüs varlığı ile Pİ, Gİ ve cepderinliği arasındaki ilişki spearman's korelasyon analizi ile gerçekleştirildi.

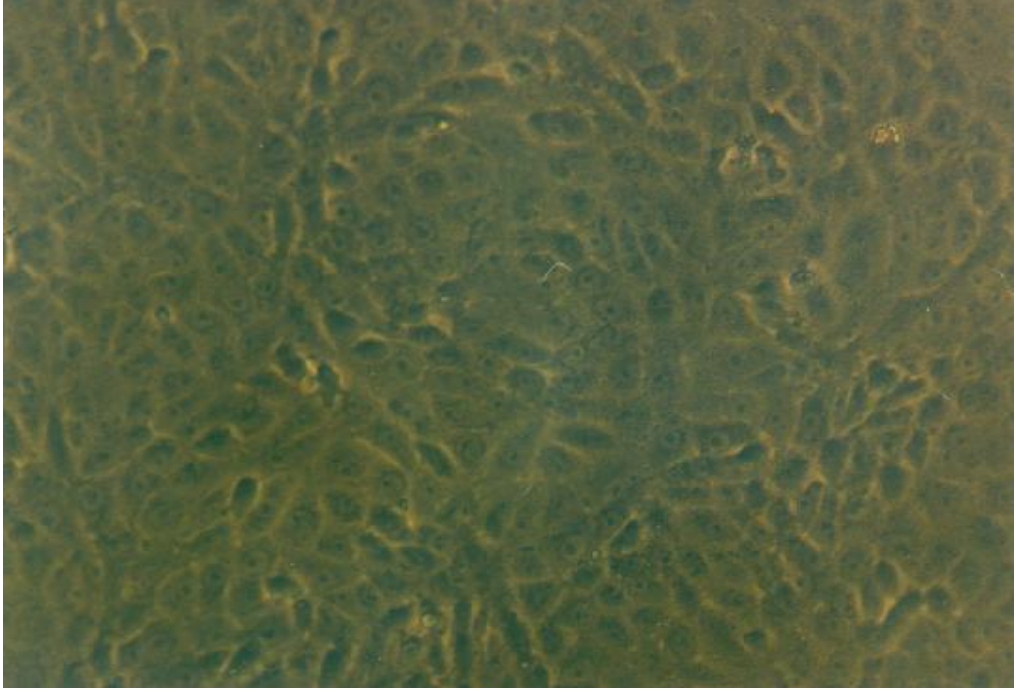
5. BULGULAR

5.1. HSV-1 ve HSV-2 Virüslerinin Üretilmesi:

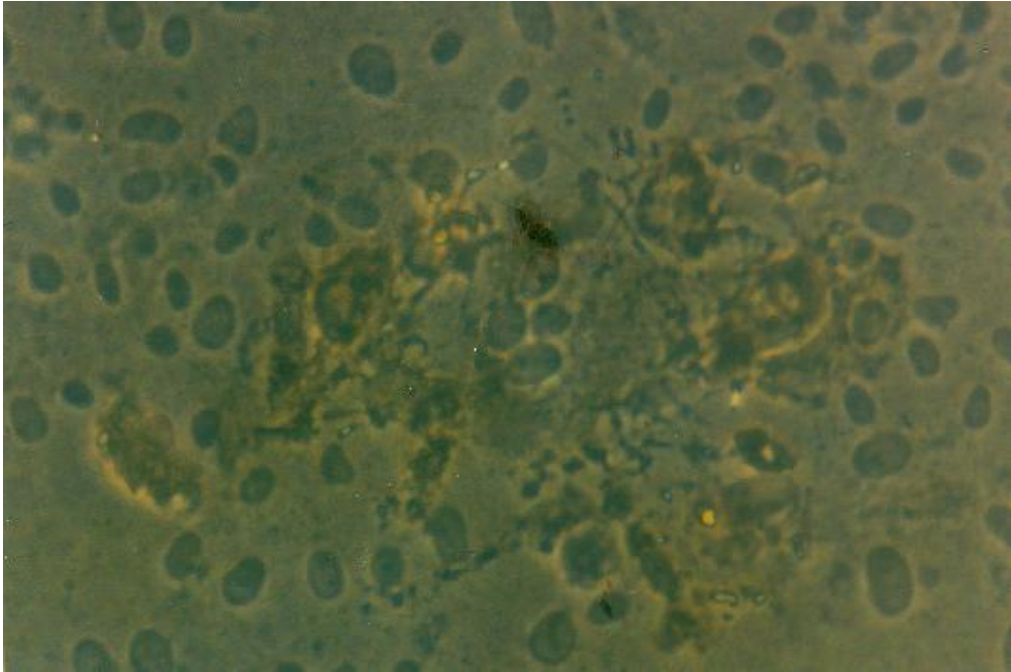
Adsorpsiyona bağımlı metotla MDBK hücrelerine ekilen HSV-1 ve HSV-2 virüslerinin hücreye etkileri mikroskopik olarak takip edildi. Mikroskopik bakıda, virüs ekilmeyen kontrol MDBK hücrelerine (Şekil 5) kıyasla, özellikle HSV-1 enfekte hücrelerde, ekimden yaklaşık 24 saat sonra hücre şişmeleri ile karakterize ilk CPE odakları görülmeye başladı. HSV-2 enfekte hücrelerde ise aynı CPE'ler ekimden yaklaşık 36 saat sonra görülmeye başladı. Bu CPE odaklarının yine HSV-1 enfekte hücrelerde ekimden yaklaşık 48 saat sonra parçalanmaya başladıkları tespit edildi (Şekil 6). HSV-1 enfekte ise enfeksiyondan yaklaşık 60 saat sonra hücre parçalanmaları tespit edildi. Elde edilen HSV-1 üst sıvısı ile gerçekleştirilen titrasyon deneyi neticesinde virüsün titresi doku kültür enfeksiyöz doz₅₀ (DK.ID₅₀); $\log 10^{5.25/ml}$ olarak tespit edildi.

5.2. PCR'nin Deteksiyon Limiti:

Çalışmada ekstraksiyon ve PCR'nin duyarlılığını test etmek için pozitif kontrol olarak HSV-1 standart suşunun 10 kat azalan dilüsyonları ile gerçekleştirilen çalışmada, PCR'nin deteksiyon limiti yaklaşık 20 virüs partikeli olarak kaydedildi.



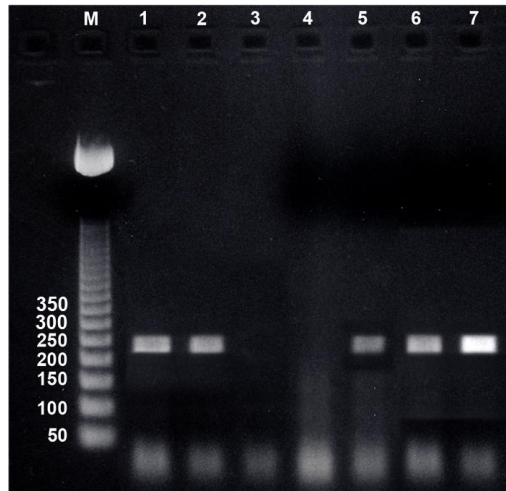
Şekil 5. Virüs ekilmeyen kontrol MDBK hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.



Şekil 6. HSV-1 enfekte MDBK hücrelerin ekimden yaklaşık 48 saat sonraki mikroskopik görüntüsü.

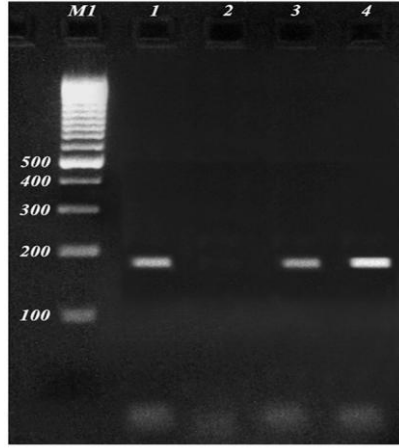
5.3. Örneklerin PCR Sonuçları:

Çalışmaya alınan periodontitli hasta grubunun krevikular sıvı örneklerinden elde edilen DNA'lardan EBV primerleri kullanılarak yapılan PCR neticesinde 52 örneğin 32 sinde (%61.5) EBV pozitif olarak belirlendi. EBV için, gp220 gen bölgesine spesifik olan primerler kullanılarak yapılan PCR'de beklenildiği gibi yaklaşık 239 bç'lik bant profilleri %2'lik agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilmiştir. EBV DNA yönünden pozitif ve negatif olan bazı örneklerin PCR ürünlerinin jel görüntüsü Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. EBV pozitif ve negatif PCR ürünleri (239 bç). M: 50 bç'lik DNA markeri (Fermentas), 7: EBV için pozitif kontrol-EBV DNA'sından elde edilen PCR ürünü, 1,2,5,6: EBV yönünden pozitif örnekler, 3: PCR negatif kontrol, 4: DNA izolasyonu negatif kontrol. Aynı örneklerden CMV DNA pozitifliğini belirlemek için yapılan nested PCR sonucunda ise örneklerin 28 inde (%53.8) CMV DNA pozitifliği tespit edildi. CMV virüs için UL123 gen bölgesine spesifik olan primerlerin

kullanılmasıyla uygulanan PCR yöntemi sonucunda, elde edilen çoğaltma ürünlerinin agaroz jel elektroforez bant görüntülerinin değerlendirilmesiyle beklenildiği gibi pozitif örneklerde 190 bp'lik bantlar elde edilmiştir (Şekil 8).



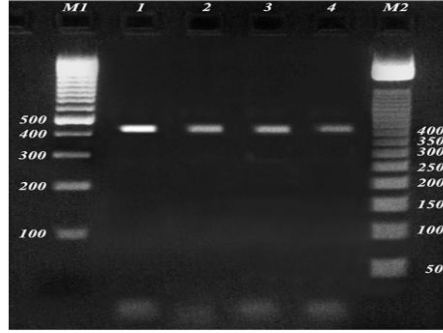
Şekil 8. CMV pozitif ve negatif PCR ürünleri (190 bp). M1: 100 bp'lik DNA markeri (Fermantas), 1,3: CMV yönünden pozitif örnekler, 2: PCR negatif kontrol, 4: CMV pozitif kontrol.

Hasta grubunun HSV-1 ve HSV-2 primerleri ile kurulan PCR sonuçlarında ise HSV-1 ve HSV-2 pozitifliği sırayla 17 (%32.6) ve 13 (%25) olarak kaydedildi (Tablo 4).

Tablo 4. Hasta grubunda PCR'la tespit edilen virüs sıklığı.

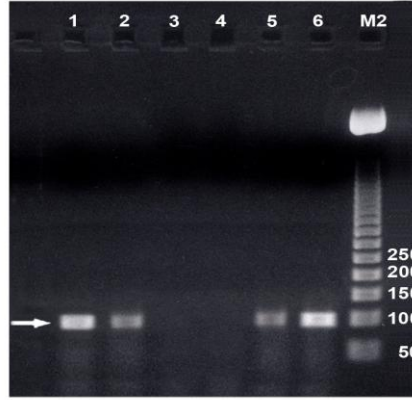
Virüsler	Yüzde (n:52)
EBV	32 (%61.5)
CMV	28 (%53.8)
HSV-1	17 (%32.6)
HSV-2	13 (%25)

HSV-1 için özel bir primer dizayn programıyla (oligoyap 3.0) elde edilen gpC gen bölgesine spesifik olan primerler kullanılarak yapılan PCR'da, HSV-2 virüs suşunda ve pozitif örneklerde beklenildiği gibi 450 bç'lik bantlar, örneklerin %2'lik agaroz jel elektroforezde göç ettirilmesiyle belirlenmiştir. Elektroforez sonrası pozitif örneklere ait olan bant profilleri Şekil 9'da yer almaktadır.



Şekil 9. HSV-1 pozitif PCR ürünleri (450 bç). M1: 100 bç'lik DNA markeri, 1: HSV-1 için pozitif kontrol, 2,3,4: HSV-2 yönünden pozitif örnekler, M2: M: 50 bç'lik DNA markeri.

CMV virüs DNA pozitifliğini belirleyebilmek için uygulanan nested PCR yöntemi, HSV-2 DNA pozitifliğini de tespit etmek için kullanılmıştır. Bunun için primerler HSV-2 gpG gen bölgesi üzerinden seçilmiştir. Uygulanan PCR yöntemi sonucunda ise, elde edilen çoğaltma ürünlerinin agaroz jel elektroforez bant görüntülerinin değerlendirilmesiyle beklenildiği gibi pozitif örneklerde 100 bç'lik bantlar elde edilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. HSV-2 pozitif ve negatif PCR ürünleri (100 bç). M2: 50 bç'lik DNA markeri (Fermentas), 6: EBV için pozitif kontrol-EBV DNA'sından elde edilen PCR ürünü, 1,2,,5,: EBV yönünden pozitif örnekler, 3: PCR negatif kontrol, 4: DNA izolasyonu negatif kontrol.

Hasta grubu ile aynı primerler kullanılarak ve aynı PCR şartları uygulanarak yapılan PCR sonucunda ise sağlıklı bireylerin 4'ünde (%20) EBV, 2'sinde (%10) CMV, 2'sinde (%10) HSV-1 ve 1'inde (%5) ise HSV-2 DNA pozitifliği belirlendi (Tablo 5).

Tablo 5. Sağlıklı grupta PCR'le tespit edilen virüs sıklığı.

Virüsler	Yüzde (n:20)
EBV-1	4 (%20)
CMV	2 (%10)
HSV-1	2 (%10)
HSV-2	1 (%5)

Elde edilen pozitif PCR sonuçlarının hastaların plak indeksi, gingival indeksi, cep derinliği ile yapılan spearman's rho korelasyon analizinde EBV-1 varlığı ile bahsedilen üç parametre arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir ($p < 0.01$).

Elde edilen PCR sonuçlarına göre CMV varlığı ile 2 parametre (plak indeksi ($p <$

0.01), cep derinliği ($p < 0.05$) arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilirken gingival indeks ile anlamlı bir ilişki gösterilememiştir. Elde edilen sonuçlara göre HSV-1 ve HSV-2 varlığı ile plak indeksi, gingival indeksi, cep derinliği arasında anlamlı bir korelasyon ilişkisi tespit edilmemiştir (Tablo 6).

Sağlıklı grupta klinik parametreler ile virüs varlığı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Hastalıklı gruptaki EBV,CMV varlığı ile sağlıklı gruptaki EBV,CMV varlığı arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (fisher's exact testi). HSV-1 ve HSV-2 için istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

PCR bulgularına göre çalışmada konu edilen 4 insan herpesvirsnn hasta grubunda varlığı ile sağlıklı grupta varlığı arasında ilişkiye bakıldığı zaman ise, herpesvirüslerin varlığı ile periodontit görülmesi arasında bir korelasyon belirlenmiştir.

Tablo 6. Virüs varlığı ile plak indeksi, gingival indeksi, cep derinliği arasındaki korelasyon (n:52).

Virüsler	Plak indeks	Gingival indeks	Cep derinliği
EBV-1	,846**	,807**	,828**
CMV	,373**	,273	,281*
HSV-1	-,213	-,209	-,241
HSV-2	,051	,033	,107

* Korelasyon anlamlı $p < 0.05$

** Korelasyon anlamlı $p < 0.01$

TARTIŞMA

Gingivitis ve periodontitis genellikle diş yüzeyinde kolonize olan bakteriler tarafından başlatılan hasarın sonucunda meydana geldiğine inanılmaktadır (11). Bu görüşün temelinde, plak varlığı ile gingivitis ve periodontitis arasındaki pozitif ilişki yatmaktadır. Plak mevcudiyetinde gingivitis ve periodontitis şiddeti artmaktadır (30,31). İlave olarak yapılan çalışmalarda diş yüzeyindeki plak ve bakteriler mekanik olarak uzaklaştırıldıklarında ya da klorheksidin gibi ajanlarla bakteri kolonizasyonu engellendiğinde inflamatuvar olayın gerilediği görülmüştür (32,33). Benzer şekilde antibiyotik kullanımı plak skorunu azaltmakta ve gingivitis klinik durumunda gerileme olmaktadır (34). Bakteriyel plağın periodontitis patogeneziindeki önemine ait kanıtların olmasına rağmen bozuk oral hijyen, sigara kullanımı gibi ekzojenik faktörler, insanlar arasındaki immün cevap farklılıkları gibi endojen faktörler hastalığın meydana gelmesine katkı yapmaktadır (35-38). Yapılan çalışmalarda şiddetli periodontitis dünya genelinde %7-15 arasında olduğu bildirilmiştir (11).

Viral enfeksiyonların çoğunda bakteriyel süper enfeksiyonlar görülmektedir. Bu durumun en iyi bilinen örneklerinden biri influenza'dır. İnfluenza epidemileri sırasında en sık ölüm, yaşlı insanlarda meydana gelmekte ve genellikle bu hastalarda *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* veya *Haemophilus influenzae* gibi etkenlerin sebep olduğu ikinci bir bakteriyel enfeksiyon bulunmaktadır (37). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda bazı virüslerin periodontal hastalık gelişimi ve şiddetine katkılarının olabileceği ileri sürülmüştür (11).

Yapılan çalışmalarda herpesvirüslerin periodontal hastalık patogeneziinde katkılarının olabileceğine dair bulgular elde edilmiştir (11,14,15). Herpesvirüs

enfeksiyonlarına genellikle çocukluk çağında oral sekresyonlar ile temas yoluyla yakalanılmaktadır (40-44). HSV-1 ve 2 tüm dünyada yaygındır ve genellikle deri ve mukozaları etkiler (38). Bu virüsler kişiden kişiye mukozal sekresyonlar ya da lezyona direk temasla bulaşmaktadır (45-47). Her ikisi de oral ve genital enfeksiyon yapabilir (48). Ganglionlara yerleşen virüsün ne şekilde aktive olduğu çok iyi anlaşılmamıştır ancak, immün süpresyon, stres, travma, ultraviyole veya ateş aktivasyona sebep olabilmektedir (43). Primer herpetik gingivitis viral orjinli gingivitisin en sık sebebidir (49). Bu virüslerin rekürrensleri herpes labialis’de olduğu gibi genellikle mukokutanöz birleşim yerlerinde olmaktadır. Damak ve gingiva rekürrenslerin diğer sık görüldüğü yerlerdir (43,44). İnsanların %90’ ından fazlası EBV ile enfektedir (50-52). EBV Kanla veya oral sekresyonlarla bulaşmakta ve orofarinksin epitelyal hücrelerinde veya B lenfositlerinde replike olmaktadır (50). EBV enfeksiyonları çocuklarda subklinik seyrederken yetişkinlerde EMN’ye sebep olmaktadır. EMN nin en sık rastlanan semptomu ateş, lenfadenopati ve faranjittir. Oral ülserler, damakta peteşi ve daha az yaygın olarakda gingival ülserasyon görülebilir (50,53). CMV. konjenital ve perinatal enfeksiyonların en sık sebebidir (54). Endüstrileşmiş ülkelerde CMV 20 li yaşlara kadar popülasyonun %90’ını etkilemektedir (54-56). CMV birçok farklı epitelyum hücrelerini, endotel hücrelerini, düz kas hücrelerini, mezenşimal hücreleri, hepatositleri, granülositleri enfekte edebilmektedir. CMV tükürük, idrar, semen, süt gibi birçok vücut sekresyonunda bulunabilmektedir. CMV enfeksiyonları genelde subklinik seyretmesine karşın immünitesi baskılanmış kişilerde değişik klinik durumlara sebep olabilmektedir (54-56).

Herpesvirüslerin periodontal hastalık etyolojisinde yer almaları ile ilgili hipotezler bu virüslerin periodontal hastalığı olan kişilerin gingival dokularında,

gingival krevikular sıvılarında, subgingival plaklarında tespit edilmesine dayanmaktadır (11,57). Gingival dokuda HSV-1 antijenlerinin tespitine yönelik öncü çalışmalardan biri Ehrlich ve ark. tarafından yapılmıştır. Çalışmada indirek immünoflorasan yöntemiyle periodontal hastalığı olan hastalardan alınan gingival örneklerinde HSV-1 antijenleri gösterilmiştir (58). Saboia-Dantas ve ark. yaptığı benzer bir çalışmada immünohistokimyasal yöntemlerle diş ekstraksiyonu yapılmış 35 asemptomatik apikal periodontiti olan hastanın diş örneklerinin %31'inde EBV pozitif olarak tespit edilirken, %23'ünde CMV antijen pozitifliği belirlenmiştir. Aynı çalışmada %14 örnekte ise her iki virüs pozitif olarak tespit edilmiştir (59).

Viral antijenlerin gösterilmesine veya virüslerin izolasyonuna yönelik dizayn edilen yukarıdakine benzer çalışmalar uzun süre almaktadır, sonuçların değerlendirilmesi zordur. Hücre kültürü ve immunohistopatolojik deney ekipmanlar gerekmektedir. Bu nedenle, son yıllarda pek çok mikrobiyal etkenin hızlı, özgül ve duyarlı bir şekilde teşhisinde olduğu gibi, periodontitli hastalarda herpesvirüs varlığını belirlemeye yönelik çalışmalarda PCR yönteminin kullanıldığını görmekteyiz. Contreras ve ark. 11 periodontiti olmayan sağlıklı kişinin ve 14 tane de periodontitli hastanın cep örnekleri ve gingival doku örneklerini toplayarak ve bu örneklerde nested-PCR ile EBV ve CMV DNA varlığını araştırmıştır. Bu çalışmada sağlıklı kişilerin cep örneklerinin %9'unda CMV tespit edilirken %18'inde EBV tespit edilmiştir. Aynı kişilerin doku örneklerinde ise CMV %18'inde tespit edilirken EBV %27'sinde belirlenmiştir. Periodontitli hastalardan alınan cep örneklerinde ise CMV DNA pozitiflik %64'iken doku örneklerinde pozitiflik %86 olarak bildirilmiştir (15). Contreras ve ark. yaptıkları diğer bir çalışmada 26 hastanın periodontal ceplerinden alınan örneklerde PCR ile HSV-1 ve HSV-2 araştırmışlar çalışılan örneklerin hepsinde

HSV-1 DNA pozitifliği saptanırken HSV-2 örneklerin hiç birinde tespit edilememiştir (60). Klemenc ve ark. yaptığı benzer bir çalışmada paper pointle alınan 66 adet periodontitli hastanın krevikular sıvı örneğinde PCR yöntemi ile EBV DNA'sı örneklerin %43.9'unda tespit edilirken CMV DNA'sı örneklerin %3'ünde tespit edilmiştir. Aynı çalışmada EBV pozitifliği ile Pİ, CD ve Gİ arasındaki korelasyona da bakılmıştır. EBV pozitifliği ile Pİ ve CD arasında pozitif korelasyon tespit edilirken, Gİ ile arasında korelasyon tespit edilememiştir (14). Parra ve ark. ise yaptıkları çalışmada 56 hastanın krevikular sıvısında PCR ile EBV pozitifliğini %30, CMV pozitifliğini %60 ve HSV pozitifliğini ise %20 olarak tespit etmişlerdir (61). Wu ve ark. yaptıkları benzer bir çalışmada, 65 adet kronik periodontitli hastanın, 65 adet gingivitli hastanın ve 24 adet sağlıklı bireyin paper pointlerle aldıkları subgingival örneklerinde PCR ile amplifikasyon ardından yaptıkları restriction fragment length polymorphisms (RFLP) analizinde EBV-1 ve EBV-2 DNA varlığına bakmışlardır. Bu çalışmada EBV-1'i periodontitli hastaların %47.7'sinde, gingivitli hastaların %24.6'sında ve sağlıklı kişilerin %16.7 sinde tespit etmişlerdir. EBV-2'yi ise periodontitli hastaların %15.4'ünde, gingivitli hastaların %7.7'sinde saptarken sağlıklı kişilerde EBV-2'yi tespit etmemişlerdir. Klinik parametre olarak kullandıkları proba dokununca kanama (BOP) ile virüs varlığı arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (62). Konstantinidis ve ark. ise kronik periodontitli hastalarda dişin farklı bölgelerinden aldıkları örneklerde PCR yöntemi ile çalışmışlar ve cep derinliği > 7 mm olanlarda EBV varlığını %56 bulurken cep derinliği < 4 mm olanlarda EBV varlığını %9 olarak tespit etmişlerdir. Ancak farklı bölgelerden elde edilen sonuçları ve hastaların EBV serolojisini de dikkate aldıklarında EBV ile periodontal hastalık arasındaki ilişkinin çok kuvvetli olmadığına dair kanaat belirtmişlerdir (63). Sunden ve ark. marjinal ve

apikal periodontit örneklerinde gerçekleştirdikleri yakın bir zamandaki çalışmada apikal periodontitte EBV DNA varlığını %50 olarak belirlerken, CMV varlığını tespit etmemişlerdir. Aynı çalışmada marjinal periodontitte EBV DNA varlığı %40 ve CMV varlığı %12 olarak kaydedilmiştir (64). Yukarıdaki çalışmaların tamamında hasta ve kontrol gruplarında EBV ve CMV prevalansları arasında istatistiksel bir fark bildirilmiş olmasına rağmen, Santangelo ve ark. yaptıkları çalışmada iki grup arasında bu virüsler bakımından istatistiksel bir fark olmadığını bildirmişlerdir (65).

Periodontitli vakalarda yapılan çalışmalarda genel olarak EBV ve CMV varlığına bakılmıştır. Herpesvirüs ailesi içinde bulunan ve çoğunlukla bu iki virüsle birlikte periodontitli hastalarda çalışılan diğer bir virüs de HSV'dir (61,65-78). HSV virüsleri bazı çalışmalarda genel primerlerle yalnızca HSV olarak (70,72,75,78) bazı çalışmalarda da HSV-1 ve HSV-2 primerleri ile araştırılmıştır (68,69,77). Yapılan çalışmaların pek çoğunda değişken oranlarda genel HSV veya HSV-1'in varlığı bildirilirken, HSV-2 varlığı ya düşük oranlarda belirlenmiş ya da tespit edilmemiştir (65,66,70,72,74-78).

Ülkemizde de son yıllarda periodontal örneklerde herpesvirüslerin varlığını belirlemeye yönelik çalışmalara rastlanmaktadır. Ancak, bu çalışmaların sayısı oldukça azdır (66,67,74,79-81). Saygun ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmada agresif periodontit olgularında EBV varlığını %72 olarak saptarken sağlıklı kişilerde bu oranı %6 olarak tespit etmişlerdir (66). Saygun ve ark. gerçekleştirdikleri diğer bir çalışmada periodontal apselerde, apse bölgesinde yüksek bir oranda EBV ve CMV varlığını bildirmişlerdir (67). Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada Kubar ve ark. EBV varlığını agresif periodontitli hastalarda

%89 olarak tespit ederken kronik periodontitli hastalarda %46 olarak bildirmişlerdir (79). Kubar ve ark. yaptığı diğer çalışmada ise 16 adet agresif periodontiti olan hastadan periodontal kürele elde ettikleri örneklerde reel time PCR ile CMV varlığı taramışlar ve bu hastaların %68.8'inde CMV DNA'sını tespit etmişlerdir (80). Yapar ve ark. agresif periodontitli hastalarda herpesvirüslerin varlığını belirlemeye yönelik gerçekleştirdikleri çalışmada yüksek prevalansta EBV ve CMV DNA varlığı bildirmişlerdir (81).

Sunulan çalışmada 52 periodontit hasta örneğinin %61.5'inde EBV pozitifliği tespit edilirken bu oran sağlıklı kişilerde %20 olarak bulunmuştur. EBV varlığı ile klinik parametreler kıyaslandığında; hastaların plak indeksi, gingival indeksi, cep derinliği ile EBV varlığı arasında anlamlı pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir. CMV ise 52 hastanın %53.8'ünde pozitif olarak bulunmuştur. Sağlıklı grupta CMV oranı %10 olarak belirlenmiştir. Hastalıklı gruptaki CMV varlığı ile klinik parametreler kıyaslandığında CMV varlığı ile plak indeksi ve cep derinliği arasında pozitif bir korelasyon tespit edilirken gingival indeks ile bir korelasyon saptanmamıştır. HSV-1 hastalıklı grupta %32.6 olarak tespit edilirken sağlıklı grupta %10 olarak tespit edilmiştir. HSV-2 hastalıklı grupta %25 olarak tespit edilirken sağlıklı grupta %5 olarak tespit edilmiştir. Hem HSV-1 hem de HSV-2 varlığı ile klinik parametreler arasında bir ilişki tespit edilmemiştir. Yaptığımız çalışmadaki EBV pozitifliği oranları hem yurt dışı hem de yurt içinde yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Çalışmadaki CMV pozitifliği oranları ile uyumlu yurt dışı ve yurt içi çalışmalar olmasına rağmen, uyumlu olmayan çalışmalara da rastlanmıştır. EBV ve CMV ile kıyaslandığı zaman, periodontitli hastalarda HSV-1 ve HSV-2 bulunma sıklığı ile ilgili az sayıda çalışmaya

rastlanmaktadır ve mevcut çalışmadakine benzer ve/veya farklı sonuçlar bildirilmektedir.

Sonuç olarak, EBV ve CMV varlığı ile periodontit ve periodontit'in klinik şiddeti arasında kuvvetli bir ilişki olduğu kanaatine varılırken HSV ler ile periodontit arasındaki ilişkinin zayıf olduğu düşünülmektedir.

Fakat konu ile ilgili yapılan çalışmaların az olması, çalışmalarda pek çok farklı parametreye bakılma zorunluluğu ve değişken sonuçların elde edilmesi dikkate alındığı zaman, eldeki bulgulara göre herpesvirüslerle periodontit arasında sebep-sonuç ilişkisinin tam olarak aydınlatılması için benzer çalışmaların artırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Eisenberg L, Suchow R, Coles RS, Deasy MJ. The effects of metronidazole administration on clinical and microbiologic parameters of periodontal disease. Clin Prev Dent 1991; 13:28-34.
2. Grant DA, Stern IB, Everett FG. Periodontics. Fifth edition. The Mosby Company, London, 1979.
3. Harvey RF. Clinical impressions of a new antibiotic in periodontics: Spiramycine. J Can Dent Assoc 1961; 27: 576-85.
4. Klinge B, Attström R, Karring T, Kisch J, Lewin B, Stolze K. 3 regimens of topical metronidazole compared with subgingival scaling on periodontal pathology in adults. J Clin Periodontol 1992; 708-14.
5. İpek F, Gül K. Kronik periodontitisin klasik mekanik tedavisine ek olarak sistemik metronidazol uygulananının klinik ve mikrobiyolojik etkilerinin incelenmesi. Dicle Tıp Derg 2007; 34: 203-10.
6. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. J Periodontal Res 2000; 35: 3-16.
7. Longe JL, Phelps S, Fundukian L, Lehman J, Narins B. Periodontal disease. The Gale Encyclopedia of Medicine, 3th Thomson Gale Corporation. 2006: 2844-8.
8. Mitchell DA, Mitchell L Periodontology . Oxford Handbook of Clinical Dentistry, 4th Copyright Oxford University Press. 2005: 200-53.
9. American Academy of Periodontology-Research, Science, and Therapy Committee Treatment of Plaque-induced Gingivitis, Chronic Periodontitis, and Other Clinical Conditions. 2004.

10. Ramseier CA. Potential impact of subject-based risk factor control on periodontitis . J Clin Periodontol 2005; 32: 283–90.
11. Cappuyns I, Gugerli P, Mombelli A. Viruses in periodontal disease – A review. Oral Diseases 2005; 11, 219–29.
12. Sanz M, Quirynen M. The European Workshop in Periodontology group A. Advances in the aetiology of periodontitis consensus report of the 5th European workshop in periodontology. J Clin Periodontol 2005; 32 : 54–56.
13. Rose LE, Genco RJ, Cohen DW, Mealey BL. Periodontal disease and Systemic Disease. Periodontal Medicine. B.C. Decker Inc. 2000:1-11.
14. Klemenc P, Skaleric U, Artnik B, Nogrsek P, Marin J. Prevalence of some herpesviruses in gingival krevikular fluid. J Clinic Virol 2005: 34; 147–52.
15. Contreras A , Nowzari H, Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. Oral Microbiol Immunol 2000:15:15-8.
16. Kinane DF, Attström R. Advances in the pathogenesis of periodontitis consensus report of the fifth European workshop in periodontology. J Clin Periodontol 2005; 32: 130–131.
17. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Herpesvirüsler. Asya Mikrobiyoloji.4. Baskı, İzmir: Asya Tıp Kitabevi, 2005: 304-27.
18. <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/dna15.jpg>
19. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/thumb/3/35/HSV_replication.png/450px-HSV-replication.png
20. Carter J, Saunders V. Herpesviruses. *In* Virology Principles and Applications. John Wiley & Sons Ltd.2007: 121-37.

21. Haaheim LR, J. R. Pattison JR, Whitley RJ. Epstein–Barr Virus (EBV). *In A Practical Guide to Clinical Virology*. John Wiley & Sons Ltd. 2002: 157-66.
22. Durmaz R. Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti. 2001: 15-33
23. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In Vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. *In Molecular Cloning ; A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988: 14.4-14.22.
24. Arda M. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. *Biyoteknoloji, Bazı Temel İlkeler*. Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara. 1995: 200-22.
25. George VG, Hierholzer JC, Ades EW. Cell culture. *In “Virology Methods Manual”* Eds: B. WJ. Mahy, and H. O. Kangro. Academic Press, San Diego. 1996: 3-7.
- 26- Hierholzer JC, Killington RA. Virüs isolation and quantitation. *In “Virology Methods Manual”* (B. WJ. Mahy, and H. O. Kangro), Academic Press, San Diego.1996: 35-41.
27. Kalkan A, Ozdarendeli A, Bulut Y, Yekeler H, Cobanoglu B, Doymaz MZ. Investigation of Epstein-Barr virus DNA in formalin-fixed and paraffin- embedded breast cancer tissues. *Med Princ Pract* 2005;14:268-71.
28. Schmutzhard J, Riedel HM, Wirgart BZ, Lena Grillner L. Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin lesions: Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *J Clinical Virol* 2004: 29;120–6.

29. Druce J, Catton M, Chibo D, Minerds K, Tyssen D, Kostecki R, Maskill B. Utility of a multiplex PCR assay for detection of herpesvirus DNA in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1728–32.
30. O’Leary GJS, Prignace JR. Clinical correlation and systemic status in periodontal disease. *Southern Californian Dental Journal* 1962.
31. Migliorati CA, Madrid C. The interface between oral and systemic health: the need for more collaboration. *Clin Microbiol Infect* 2007;13 :11-6.
32. Løe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965; 36:177-87.
33. Davies RM, Ellwood RP, Davies GM. The rational use of fluoride toothpaste. *Int J Dent Hyg* 2003; 1:3-8.
34. Ciancio SG, Slots J, Reynolds HS, Zambon JJ, McKenna JD. The effect of short term administration of minocycline HCl on gingival inflammation and subgingival microflora. *J Periodontol* 1982; 53: 557–61.
35. Eisenmann AC, Eisenmann R, Sousa O, Slots J. Microbiological study of localized juvenile periodontitis in Panama. *J Periodontol* 1983; 54: 712–13.
36. McNabb H, Mombelli A, Gmür R, Mathey-Dinc, S, Lang NP. Periodontal pathogens in shallow pockets in immigrants from developing countries. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 267–72.
37. Bergström J. Cigarette smoking as a risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989; 17: 245–7.
38. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000; 14: 33–53.

39. Cate TR. Impact of influenza and other community-acquired viruses. *Semin Respir Infect.* 1998; 13: 17-23.
40. Roizman B. Herpesviridae. In *Fields Virology*. 3th edn. Lippincott – Raven Publishers: Philadelphia, 1996. New York.
41. De Araujo T, Berman B, Weinstein A. Human herpesviruses 6 and 7. *Dermatol Clin* 2002; 20: 301–6.
42. Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 1992; 123: 425–49.
43. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet* 2001; 357: 1513–8.
44. Buxbaum S, Geers M, Gross G, Schofer H, Rabenau HF, Doerr HW. Epidemiology of herpes simplex virus types 1 and 2 in Germany: what has changed? *Med Microbiol Immunol* 2003; 192: 177–81.
45. Xu F, Schillinger JA, Sternberg MR et al. Seroprevalence and coinfection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in the United States, 1988–1994. *J Infect Dis* 2002; 185: 1019–24.
46. Kuzushima K, Kimura H, Kino Y et al. Clinical manifestations of primary herpes simplex virus type 1 infection in a closed community. *Pediatrics* 1991; 87: 152–8.
47. McMillan JA, Weiner LB, Higgins AM, Lamparella VJ. Pharyngitis associated with herpes simplex virus in college students. *Pediatr Infect Dis* 1993; 12: 280–4.

48. Leigh IM. Management of non-genital herpes simplex virus infections in immunocompetent patients. *Am J Med* 1988; 85: 34–38.
49. Nikkels AF, Pierard GE. Chronic herpes simplex virus type I glossitis in an immunocompromised man. *Br J Dermatol* 1999; 140: 343–6.
50. Cohen JI. Epstein–Barr virus and the immune system. Hide and Seek. *JAMA* 1997; 278: 510–3.
51. Yao QY, Rickinson AB, Epstein MA. Oropharyngeal shedding of infectious Epstein–Barr virus in healthy virusimmune donors. A prospective study. *Chin Med J* 1985; 98: 191–196.
52. Rivera-Hidalgo F, Stanford TW. Oral mucosal lesions caused by infective microorganisms. I. Viruses and bacteria. *Periodontol* 2000; 21: 106–124.
53. Birx DL, Redfield RR, Tosato G. Defective regulation of Epstein–Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related disorders. *N Engl J Med* 1986; 314: 874–9.
54. Pass RF. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Infect Dis* 1985; 152: 243–8.
55. Numazaki KA, Chiba S. Latent infection and reactivation of human cytomegalovirus. *Serodiagn Immunother Infect Disease* 1995; 7: 70–74.
56. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 2003; 98: 269–97.
57. Scully C, Porter S. Orofacial disease: update for the dental clinical team: 2. Ulcers, erosions and other causes of sore mouth. Part I. *Dent Update* 1998; 25: 478–84.

58. Ehrlich J, Cohen GH, Hochman N. Specific herpes simplex virus antigen in human gingiva. *J Periodontol* 1983; 54: 357–60.
59. Saboia-Dantas CJ, Coutrin de Toledo LF, Sampaio-Filho HR, Siqueira JF Jr. Herpesviruses in asymptomatic apical periodontitis lesions: an immunohistochemical approach *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 320–5.
60. Contreras A, Slots J. Typing of herpes simplex virus from human periodontium. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 63–4.
61. Parra B, Slots J. Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:289-93.
62. Yan-Min W, Jie Y, Li-Li C, Wei-Lian S, Zhi-Yuan G. Infection frequency of Epstein-Barr virus in subgingival samples from patients with different periodontal status and its correlation with clinical parameters *J Zhejiang Univ Science B* 2006; 7: 876-83.
63. Konstantinidis A, Sakellari D, Papa A, Antoniadis A. Real-time polymerase chain reaction quantification of Epstein–Barr virus in chronic periodontitis patients. *J Periodont Res* 2005; 40; 294–8.
64. Sunde PT, Olsen I, Enersen M, Beiske K, Grinde B. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in apical and marginal periodontitis: a role in pathology. *J Med Virol* 2008;80:1007-11.
65. Santangelo R, D'Ercole S, Graffeo R, Marchetti S, Deli G, Nacci A, Piccolomini R, Cattani P, Fadda G. Bacterial and viral DNA in periodontal disease: a study using multiplex PCR. *New Microbiol* 2004;27:133-7.

66. Saygun I, Kubar A, Özdemir A, Yapar M, Slots J. Herpesviral-bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. *J Periodont Res* 2004; 39: 207–12.
67. Saygun I, Yapar M, Ozdemir A, Kubar A, Slots J. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus type 1 in periodontal abscesses. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:83-7.
68. Nishiyama SA, Nakano V, Velásquez-Melendez G, Avila-Campos M. Occurrence of herpes simplex virus 1 and three periodontal bacteria in patients with chronic periodontitis and necrotic pulp. *Can J Microbiol* 2008; 54: 326-30.
69. Tabanella G, Nowzari H. Cytomegalovirus-associated periodontitis and Guillain-Barré syndrome. *J Periodontol* 2005; 76: 2306-11.
70. Ling LJ, Ho CC, Wu CY, Chen YT, Hung SL. Association between human herpesviruses and the severity of periodontitis. *J Periodontol* 2004; 75: 1479-85.
71. Sabeti M, Simon JH, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus are associated with symptomatic periapical pathosis. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 327-8.
72. Slots J, Kamma JJ, Sugar C. The herpesvirus-*Porphyromonas gingivalis*-periodontitis axis. *J Periodontal Res* 2003; 38: 318-23.
73. Sabeti M, Valles Y, Nowzari H, Simon JH, Kermani-Arab V, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA transcription in endodontic symptomatic lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:104-8.
74. Saygun I, Sahin S, Ozdemir A, Kurtiş B, Yapar M, Kubar A, Ozcan G. Detection of human viruses in patients with chronic periodontitis and the relationship between viruses and clinical parameters. *J Periodontol* 2002;73:1437-43.

75. Nowzari H, Jorgensen MG, Ta TT, Contreras A, Slots J. Aggressive periodontitis associated with Fanconi's anemia. A case report. *J Periodontol* 2001;72:1601-6.
76. Kamma JJ, Contreras A, Slots J. Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 879-85.
77. Contreras A, Slots J. Typing of herpes simplex virus from human periodontium. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 63-4.
78. Ting M, Contreras A, Slots J. Herpesvirus in localized juvenile periodontitis. *J Periodontal Res* 2000; 35: 17-25.
79. Kubar A, Saygun I, Özdemir A, Yapar M, Slots J. Real-time polymerase chain reaction quantification of human cytomegalovirus and Epstein–Barr virus in periodontal pockets and the adjacent gingiva of periodontitis lesions. *J Periodont Res* 2005; 40: 97–104.
80. Kubar A, Saygun I, Yapar M, Özdemir A, Slots J. Real-time PCR quantification of cytomegalovirus in aggressive periodontitis lesions using TaqMan technology. *J Periodont Res* 2004; 39: 81–86.
81. Yapar M, Saygun I, Ozdemir A, Kubar A, Sahin S. Prevalence of human herpesviruses in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2003;74:1634-40.

8.ÖZGEÇMİŞ

Konya'nın Bozkır ilçesinde 1971 yılında doğdum. İlköğretimimi Konya Şehit Albay İbrahim Karaoğlanoğlu İlköğretim Okulunda, orta ve lise eğitimimi ise Konya da tamamladım. 1992-1999 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'inde öğrenim gördüm. 2000 yılında Niğde'nin Bor ilçesi 6 nolu Sağlık Ocağı'nda Pratisyen Hekim olarak görev yaptım. 2004 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ında uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım