

T.C.

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**SAĞLIK ÇALIŞANLARINDA ORAL HERPES SİMPLEX VİRUS
ATILIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ebru GENÇCELEP

Ağustos 2009

TRABZON

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SAĞLIK ÇALIŞANLARINDA ORAL HERPES SİMPLEX VİRUS ATILIMI

EBRU GENÇCELEP

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 14.08.2009

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 28.09.2009

Tez Danışmanı : Yard.Doç.Dr. Celal Kurtuluş BURUK

Jüri Üyesi : Prof.Dr. Murat ERTÜRK

Jüri Üyesi : Doç.Dr.Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Enstitü Müdürü : Prof.Dr. Orhan DEĞER

AĞUSTOS 2009

TRABZON

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimine başladığım ilk günden itibaren insani ve mesleki tecrübeme büyük katkıları olan, her konuda desteğini gördüğüm, bilgi ve yaklaşımı ile örnek aldığım, çalışma azmini bana yansıtan ve tez çalışmam sırasında yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Yard.Doç.Dr. Celal KURTULUŞ Buruk'a, yüksek lisans eğitimim süresince gerek ders gerekse tez dönemlerinde bana destek olan ve yol gösteren çok kıymetli hocalarım Sayın Prof.Dr. Murat ERTÜRK, Doç.Dr. Faruk AYDIN, Doç.Dr. Neşe KAKLIKAYA, Doç.Dr. İlknur TOSUN, Yard.Doç.Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU'na, sevgili meslektaşım ve dönem arkadaşım Nuray DEMİRCİ'ye, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında bulunduğum sürede bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim yüksek lisans, doktora ve uzmanlık eğitimi alan arkadaşlarıma, yüksek lisans eğitimim boyunca bana her zaman hoş görüşü ile yaklaşan KTÜ Farabi Hastanesi Koroner Yoğun Bakım Ünitesi Servis Sorumlu Hemşiresi Sayın Aysel KÖSE'ye, çalışmama katkıda bulunan sevgili KTÜ Farabi Hastanesi Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi Hemşirelerine, yaşamımın her anında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de hep yanımda olan, beni ben yapan hayatımın vazgeçilmez parçaları annem, babam ve kardeşlerime teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Ebru GENÇCELEP

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Tarihçe | 3 |
| 2.2. Herpes Virusların Genel Özellikleri | 3 |
| 2.3. Herpes Virusların Yapısı ve Sınıflandırılması | 4 |
| 2.3.1. Herpes Simplex Virus | 5 |
| 2.4. Patogenez | 7 |
| 2.5. İmmunite | 9 |
| 2.6. Herpes Virusların Oluşturduğu Hastalıklar ve Klinik Bulgular | 10 |
| 2.6.1. Primer Herpetik Gingivostomatit | 11 |
| 2.6.2. Tekrarlayan Orofasiyal HSV İnfeksiyonu | 11 |
| 2.6.3. Genital HSV İnfeksiyonu | 12 |
| 2.6.4. Egzema Herpetikum | 12 |
| 2.6.5. Herpes Gladyotorum | 12 |
| 2.6.6. Herpetik Dolama | 13 |
| 2.6.7. Oküler HSV İnfeksiyonu | 13 |
| 2.6.8. Neonatal HSV İnfeksiyonu | 13 |
| 2.6.9. MSS'de HSV İnfeksiyonu | 14 |
| 2.7. Herpes Simplex Virus İnfeksiyonlarını Epidemiyolojisi | 16 |
| 2.7.1. Virus Atılımı | 17 |
| 2.8. Herpes Simplex Virus İnfeksiyonların Tanısı | 18 |
| 2.8.1. Hücre Kültüründe HSV İzolasyonu | 18 |
| 2.8.2. Serolojik Yöntemlerle HSV Tanısı | 19 |
| 2.8.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile HSV tanısı | 19 |
| 2.9. Herpes Simplex Virus İnfeksiyonlarının Tedavisi | 20 |

| | |
|---|----|
| 3.MATERYAL VE METOD | 21 |
| 3.1. MATERYAL | 21 |
| 3.1.1. Tükürük Örnekleri | 21 |
| 3.1.2. Kimyasallar | 22 |
| 3.1.3. Araç ve Gereçler | 22 |
| 3.1.4. Solüsyonlar | 22 |
| 3.1.4.1. SDS (%10) Hazırlanması | 22 |
| 3.1.4.2. Tris HCl (1M) Hazırlanması | 22 |
| 3.1.4.3. EDTA (0.5M) Hazırlanması | 23 |
| 3.1.4.4. TE Hazırlanması | 23 |
| 3.1.4.5. TBE Hazırlanması | 23 |
| 3.1.4.6. Lizis Buffer Hazırlanması | 23 |
| 3.1.4.7. 3M Sodyum Asetat (pH 4.9 veya 5) Hazırlanması | 23 |
| 3.1.4.8. dNTP Mix Hazırlanması | 24 |
| 3.1.4.9. Primer Mix Hazırlanması | 24 |
| 3.1.4.10. Loading Buffer (Brom Fenol Mavisini) Hazırlanması | 24 |
| 3.1.4.11. 5M NaCl Hazırlanması | 24 |
| 3.1.4.12. Kloroform: İzooamil Alkol (24:1) Hazırlanması | 24 |
| 3.2. METOD | 24 |
| 3.2.1. DNA İzolasyonu | 24 |
| 3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) | 26 |
| 3.2.2.1. Master Mix Hazırlanması | 26 |
| 3.2.2.2. Thermal Cycler Koşulları | 27 |
| 3.2.2.3. Agaroz Jel Hazırlanması | 28 |
| 3.2.2.4. Elektroforez | 28 |
| 3.2.2.5. Real Time PCR | 28 |
| 4. BUGULAR | 30 |
| 5. TARTIŞMA | 35 |
| 6. SONUÇ ve ÖNERİLER | 37 |
| 7. ÖZET | 38 |
| 8. SUMMARY | 39 |
| 9. KAYNAKLAR | 40 |

TABLO LİSTESİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|------------------------|
| Tablo 1. İnsan herpesviridae ailesi üyeleri ve özellikleri | 5 |
| Tablo 2. Lisis buffer kompenetleri | 23 |
| Tablo 3. PCR işleminde kullanılan primerler | 26 |
| Tablo 4. Master mix bileşenleri ve miktarları | 27 |
| Tablo 5. Real time PCR’da kullanılan primerler ve prob sekansları | 28 |
| Tablo 6. Real Time PCR için master mix kompozisyonu | 29 |
| Tablo 7. Tükrük örneklerinin PCR sonuçları | 32 |
| Tablo 8. Sabah/akşam toplam örnek sayısına göre gönüllülerde 1 aylık dönemde virus atılım sıklığı | 33 |
| Tablo 9. Günler baz alındığında örnek sayısına göre gönüllülerde 1 aylık dönemde virus atılım sıklığı | 33 |
| Tablo 10. Real Time PCR ile pozitifliklerin uyumluluğu | 34 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|------------------------|
| Şekil 1. HSV infeksiyonunun gelişim aşamaları | 15 |

RESİM LİSTESİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|------------------------|
| Resim 1. Bazı örnekler ve kontrollere ait agaroz jel elektroforez görüntüsü | 30 |
| Resim 2. Bazı örnekler ve kontrollere ait agaroz jel elektroforez görüntüsü | 31 |

KISALTMALAR

- ADB: Amerika Birleşik Devletleri
ATP: Adenosine Tri Phosphate
BOS: Beyin Omurilik Sıvısı
CMV: Cytomegalovirus
DNA: Deoksiribo nükleik asid
EBV: Ebstein Barr Virus
ELISA: Enzyme linked immune assay
FDA: Food and Drug Administration
HEK: Human Embriyonik Kidney
HHV-6: Human Herpes Virus Tip -6
HHV-7: Human Herpes Virus Tip -7
HHV-8: Human Herpes Virus Tip -8
HSV-1: Herpes Simplex Virus Tip-1
HSV-2: Herpes Simplex virus Tip-2
HSV: Herpes Simplex Virus
HIV: Human Immunodeficiency Virus
HVEM: Herpes Virus Entery Mediator
IE: İmmediate Early
IFN: İnterferon
MHC: Major Histocompatibility Complex
MNL: Mono Nükleer Lenfositler
MSS: Merkezi Sinir Sistemi
ORF: Opening Reading Frame
PCR: Polimerase Chain Reaction
RIA: Radio Immune Assay
RNA: Ribo Nükleik Asit
SEM: Skin-Eye-Mouth
SSS: Santral Sinir Sistemi

TE: Tris EDTA

TBE: Tris Borik EDTA

TIF: Trans Încuding Factor

TNF: Tumor Necrosis Factor

VHS: Viral Host Shutoff

VZV: Varicella Zoster Virus

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Herpes simplex virus 1 ve 2 (HSV-1, 2) herpesviridae ailesinin üyeleri olup insanda önemli hastalıklara yol açan 200 nm çapında, zarflı, ikozahedral simetrik kapsite sahip, çift sarmallı DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) içeren büyük ve kompleks viruslardır (1, 2, 3, 4).

HSV infeksiyonları insanlarda en sık rastlanan viral hastalıklar arasında yer almaktadır. Oral, genital, oküler, deri, santral sinir sistemi (SSS) ve iç organlarda lezyonlara neden olurlar. Bu lezyonlar virusun primer infeksiyonundan veya latent virusun reaktivasyonundan kaynaklanabilir (5).

HSV infeksiyonları çoğu kez asemptomatik veya lokal belirtilerle seyretmektedir. Bu viruslar bazen ağır stomatit, keratokonjunktivit, meningoensefalit ve sistemik yenidoğan infeksiyonları yapabilir. Ayrıca immun sistemi baskılanmış kişilerde latent virusun aktive olmasıyla infeksiyon alevlenmekte ve önemli ölçüde morbitide ve mortalite nedeni olmaktadır (5).

HSV infeksiyonları dünyada en yaygın görülen infeksiyonlardandır. Dünya nüfusunun %60-95'inin herpesviridae ailesinin bir veya daha fazla üyesi tarafından enfekte edilmiş olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (6).

HSV'nin doğal rezervuarı insandır. Bulaş, yakın temas veya enfekte sekresyonlarla direk temas yoluyla olmaktadır. Sadece aktif hastalığı olanlar değil asemptomatik kişiler de bulaştırıcıdır. HSV-1 %80 oranında oral %20 oranında genital lezyonlara yol açar. Genital ve neonatal HSV infeksiyonların %70-80'inden HSV-2, geriye kalanından da HSV-1'in sorumlu olduğu düşünülmektedir (6). Ülkemizde yetişkinlerin %90'ında HSV seropozitifliği mevcuttur. Gelişmiş ülkelerde ise bu oran %30-50 arasındadır (7).

Primer HSV infeksiyonunun en sık karşılaşılan tipi gingivostomatittir. Genellikle 1-3 yaş arası çocuklarda görülür. HSV-1'e bağlı gingivostomatitin rekürrensleri trigeminal gangliondan virusün reaktivasyonu sonucu sıklıkla herpes labialis (uçuk) ortaya çıkar (7, 8). Herpes labialis etkeni HSV-1 ve azda olsa HSV-2'dir. Hastalığın prodromal döneminde oral kaviteden HSV-1 atıldığı yapılan araştırmalarda bilinmektedir (9). Yetişkinlerin %1-15'i HSV-1 veya HSV-2

yaymaktadır (8). Tekrar eden herpes labialis lezyonu olan hastaların büyük çoğunluğunda tükürkte HSV DNA'sı saptanabilmektedir. Klinik lezyonların ortaya çıkmasından sonra da bir süre atılım devam etmektedir (10).

Moleküler tanı yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda tükürük ve gözyaşı örneklerinde HSV DNA varlığı gösterilmektedir. Elli kişiden 30 gün boyunca belli aralıklarla alınan toplam 5529 tükürük ve gözyaşı örneklerinin ELISA yöntemiyle çalışıldığında %74'ünde HSV-1 veya 2 IgG (+), real time PCR yöntemi ile çalışıldığında ise %98'inde HSV-1 DNA'sının varlığı yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (11). Yapılan bir başka çalışmada ise 10 sağlıklı kişiden altı ay boyunca hafta üç kez tükürük ve gözyaşı örneği alınmış ve 5 kişide PCR yöntemiyle HSV-1 DNA'sı saptandığı rapor edilmiştir. Bunların 4'ünde tükürükte 1 kişide ise gözyaşında HSV DNA pozitif olarak bulunmuştur (12).

Yapılan araştırmalar nozokomiyal HSV infeksiyonlarının oluşabildiğini göstermektedir. Bir çalışmada belirli aralıklarla hastaneye yatan bebeklerde ortaya çıkan HSV infeksiyonlarında kaynağın hastane personeli olduğunun gösterilmesi (13), sağlık çalışanlarının özellikle immunolojik defekti bulunan hasta gruplarında risk oluşturabileceklerini düşündürmektedir. Bu riskin değerlendirilmesinde hastane çalışanlarında tükürükle asemptomatik HSV atılım sıklığının belirlenmesi önemli bir aşamadır.

Bu çalışmada, daha önceden herpes labialis (uçuk) çıkardığını beyan eden sağlık çalışanlarının bir aylık periyoddaki oral HSV atılma sıklığının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

Herpes virus infeksiyonları hakkındaki ilk bilgi, lezyonları “ürperten deri hastalığı” olarak tarif eden yunan tarihçi Heredot’a (MÖ 484-425) aittir. Genital herpes klinik olarak ilk kez 1736’da tanımlanmıştır. 1850–1900 yılları arasında histopatolojik özellikleri ve insandan insana bulaştığı ortaya konmuştur (14). Herpetik dolama ilk defa 1920’li yıllarda bir bayan kuaförün işaret parmağında tanımlanmıştır (15). 1930’larda genital ve non-genital herpes arasında farklılıklar olduğu öne sürülmüştür (14). HSV ile ilişkili neonatal infeksiyonlar ilk kez 1930’ların ortasında fatal bir vakanın histopatolojik bulgularını tarif eden Hass tarafından rapor edilmiştir. Batignani 1934 yılında yeni doğanda HSV’ye bağlı keratiti tarif etmiştir (16). Batignani’den sonra ilk kez 1934 yılında HSV ile enfekte bir yenidoğan rapor edilmiştir (17). 1960’da HSV-1 ve HSV-2 birbirinden ayırt edilmiştir. 1967’de cinsel yolla bulaşma olduğu doğrulanmıştır (14).

2.2. HERPES VİRUSLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

Herpes kelimesi Latince “herpein” kelimesinden gelmekte olup “sürünmek” ve “yayılmak” anlamında kullanılmaktadır. Herpes simplex virusunda içinde bulunduğu Herpesviridae ailesi içinde zarflı, ikozahedral kapsitli, büyük ve kompleks DNA virusleri bulunur. Morfolojileri, replikasyonları, latent/tekrarlayan infeksiyon yapmaları, infeksiyonun kontrol altına alınmasında ve belirtilerin ortaya çıkışında hücresel bağışıklık yanıtının önemli rol oynaması herpesviruslerin ortak özelliklerindedir. Herpesviruslar direkt doku hasarı, immünopatolojik yanıtın uyarılması ve neoplastik transformasyonun arttırılması yoluyla hastalık tablosu oluşturabilirler. Herpesviruslar insanda persistan infeksiyonlara yol açarlar. Başka bir deyişle herpesviruslarla bir kez enfekte olan bir kişi yaşam boyu enfekte kalır (3, 15).

2.3. HERPES VİRUSLARIN YAPISI VE SINIFLANDIRILMASI

Herpes viruslar 100-200nm çapında, 160 000 moleküler ağırlıktaki çift sarmallı DNA içeren, protein kılıf ve lipid zarfla çevrelenmiş yapıdadır. Olgun virus partikülü DNA çekirdeği (kor), 162 kapsomerden oluşan ikosahedral nükleokapsid (koruyucu protein tabaka) ve en dışta zarf (lipoprotein membran) içerir. Kapsid ve zarf arasında tegument adı verilen, elektron opak, amorf ve fibröz proteinlerden oluşan bir yapı vardır (3, 7, 8, 14).

Herpes virusların zarfları üzerinde poliaminlar, lipidler ve glikoproteinler (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM, gJ ve gN) bulunmaktadır. Glikoproteinler antijenik yapıda olup, konakta immun yanıt oluşturmakta ve her virusa ayırt edici özellik kazandırmaktadır. HSV-1'de gD, gG ve gJ bulunurken varicella zoster virusda (VZV) bu proteinler bulunmaz. Bütün herpes viruslarda gB, gH, gL ve gM bulunur. Glikoproteinlerin virusun hücre içine girebilmesi için virion zarfı ve hücrel membranların füzyonu, infekte virus partikülünün hücre içine girişi, hücreden hücreye geçişi, virus tarafından indüklenen hücrelerin füzyonu ve immun sistemden saklanmak gibi önemli görevleri vardır. Glikoproteinler bir veya daha fazla bulunan hidrofobik domainleri ile hücre reseptörüne tutunabilirler. HSV nin konak hücre ile ilk teması hücre yüzeyinde bulunan heparan sülfat veya kondroitin sülfat proteoglikanlarına gC'nin bağlanması ile başlar. gC'den yoksun virusun patojenik özelliği olmasına rağmen, konak hücreye bağlanması zayıftır. Diğer bir glikoprotein olan gB konak hücre yüzeyinde bulunan heparan sülfata bağlanabilir. gC bulunmadığı durumlarda hücre yüzeyine bağlanma gB'ye bağımlıdır. gB ve gC'den yoksun viruslar konak hücreye bağlanamazlar. HSV-2'nin yüzeyinde bulunan gB'nin hücreye tutunması için gerekli olan majör glikoprotein olduğu düşünülmektedir. Herpes viruslar viral zarf ve hücre membranının füzyonu ile hücre içine girerler. gB, gD ve gH HSV'nin hücrelere penetre olması için gereklidir. Virion içinde heterodimer halinde bulunan gH ve gL endoplazmik retikulumda meydana gelen matürasyonla ilişkilidir. gG'nin aminoasid dizileri HSV-1 ve 2 arasında % 30'dan daha az homoloji gösterir. Bu sebeple gG HSV-1 ve 2 ayırımı yapan serolojik testlerde antijen olarak kullanılır.(18,19)

Herpes virusların genomu 80 open reading frame (ORF) içerir ve en az 100 farklı proteini kodlayabilir (3).

İnsanlarda sıklıkla enfeksiyona neden olan 8 tip herpes virus vardır. Bunlar HSV Tip-1, HSV Tip-2, Varicella zoster virus (VZV), Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), Human herpes virus Tip -6 (HHV-6), Human herpes virus Tip-7 (HHV-7), Human herpes virus Tip -8 (HHV-8)'dur (3, 6, 20). Herpes simplex virus serolojik ve biyolojik olarak Tip-1 ve Tip-2 olmak üzere farklı iki tipe ayrılır (21).

Herpesviridae ailesinin üyeleri biyolojik özellikleri ve/veya genomik organizasyonları temel alınarak Alfa, Beta, Gama herpesviruslar olarak adlandırılan alt ailelere (**Tablo 1**) sınıflandırılırlar (3, 8).

Dünya nüfusunun % 60-95'inin herpesviridae ailesinin bir veya daha fazla üyesi tarafından enfekte olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmektedir (6).

Tablo 1: İnsan Herpesviridae ailesi üyeleri ve özellikleri (3)

| Alt aile | Virus adı | Hedef hücre | Latent kaldığı hücre |
|----------------------|-----------|---------------------|----------------------|
| Alfa herpes viruslar | HSV-1 | Mukoepitelial | Nöronlar |
| | HSV-2 | Mukoepitelial | Nöronlar |
| | VZV | Mukoepitelial | Nöronlar |
| Beta herpes viruslar | HHV-6 | MNL, epitelial hüç. | MNL |
| | HHV-7 | T lenfositler | T lenfosit |
| | CMV | T lenfositler | T lenfosit |
| Gama herpes viruslar | EBV | B lenfosit | B lenfosit |
| | HHV-8 | MNL | MNL |

Alfa herpesvirusların konak spektrumu geniş, üreme döngüsü hızlıdır. Beta herpesvirusların konak spektrumu sınırlı, üreme döngüsü uzundur. Gama herpesvirusların konak spektrumu çok kısıtlıdır (3).

2.3.1. Herpes Simplex Virus

HSV herpesviridae ailesinin genel özelliklerine sahip, ailenin ilk saptanan ve en sık karşılaşılan infeksiyonlardan birine neden olan bir virustur (8). Dudak, göz, burun ve genital bölgede, sıklıkla derinin mukoza ile birleştiği bölgelerde, veziküler lezyonlarla karakterize hastalıklara, bağışıklık cevabı baskılanmış kişilerde ise ciddi ve sıklıkla ölümcül yaygın infeksiyonlara neden olabilmektedir (15). HSV infeksiyonları genelde asemptomatik seyretmekte, akkiz veya neonatal (konjenital, natal ve postnatal) klinik şekilleri bulunmaktadır (6).

Herpes simplex virus serolojik ve biyolojik olarak Tip-1 ve Tip-2 olmak üzere farklı iki tipe ayrılır (21). HSV-1 daha çok üst bölgede infeksiyon oluştururken HSV-2 genital herpes infeksiyonlarının major etkenidir.

Geniş konakçı yelpazesi, virusun bağlanabileceği reseptörlerin birçok hücre tipinde bulunduğunu gösterir. HSV-1 ve HSV-2 hücre yüzeyinde farklı yerlere bağlanırlar. Virusun konak hücreye girişi zarf yüzeyinde bulunan glikoproteinler aracılığı ile gerçekleştirilir. On iki viral zarf glikoproteininden en az dört tanesinin koordineli çalışması gerekir. Bunlar gB, gC gD ve gH-gL heterodimeridir. Glikoprotein B ve C konak hücre yüzeyine tutunur. Glikoprotein B, hücre yüzeyinde bulunan 3-O-sülfatlı heparan sülfat glikoproteinlerine veya heparan sülfattan bağımsız virusun hücreye tutunmasını sağlayan bilinmeyen bir gB reseptörüne bağlanır (22). Daha sonra gD hücre yüzey reseptörü olan ve TNF reseptör ailesinden bir reseptör olan HVEM (Herpes virus entry mediator), immunglobulin süperfamilyasından bir reseptör olan nectin-1 veya heparan sülfata bağlanır (23). Hücre içine penetrasyon hücre membranı ile viral zarf proteinlerinin (gB, gD) doğrudan füzyonu ile gerçekleşir. Füzyon oluşturmayan virionlar endositoz ile hücre içine alınır ve endositik keseciklerde parçalanır. Sitoplazmada serbest hale geçen kapsid hücrel sitoskeleton ile çekirdek membranına taşınır ve viral DNA porlardan çekirdek içerisine bırakılır. Tegüment viral host shutoff (VHS) proteini hücre makro molekül sentezi durdurur ve alfa –trans- inducing factor (α -TIF) ilk gen ekspresyonunu başlatır (3, 15).

HSV transkripsiyonu ve viral protein sentezi biri diğerini etkileyen basamaklar şeklinde devam eder. Viral genler protein sentez düzeyleri farklı olmakla birlikte, gerekli oldukları yer ve zamanda aktive olmalarına göre , α , β ve γ genler diye üç büyük grup altında toplanırlar (15).

Alfa genler: En erken dönemde (immediate early, IE) α - TIF virion tarafından aktive edilen genlerdir. Bu genler kendilerinin ve erken genlerin sentezini düzenleyen proteinleri kodlar ve α -genleri hücrel RNA polimeraz II aracılığıyla transkripte edilir. Ürünler IE proteinleri olarak isimlendirilir (3).

Beta genler: Erken (Early, E) genler olarak bilinir. Bu genlerde hücrel RNA polimeraz II aracılığıyla transkripte olurlar. Ürünleri erken proteinler olarak isimlendirilirler. Herpes virus erken proteinleri genom replikasyonunu destekler. Timidin kinaz ve DNA polimeraz bunların en iyi bilinenleridir (3).

Gama genler: Hücrel infeksiyonun geç dönemlerinde viral kapsid proteinleri ve zarf proteinleri gibi yapısal proteinlerin sentezini gerçekleştiren genlerdir ve geç proteinler (late

proteinler) olarak adlandırılırlar (15). Glikoproteinler sentezlendikleri çekirdek membranında yerleşik kalırken, kapsid proteinleri viral DNA ile doldurulmak üzere çekirdek içerisine taşınırlar. DNA'sını kazanan kapsid çekirdek membranından glikoproteinlerini kazanarak tomurcuklanma yoluyla endoplazmik retikuluma ulaşır. Golgi sisteminde karbonhidrat rezidülerinin ilavesi ile olgunlaşan virus ekzositoz veya hücre parçalanması sonucunda dış ortama salınır (15)

2.4. PATOGENEZ

Primer HSV infeksiyonları virus içeren sekresyonlarla direk temas sonucu oluşur. Otoinokülasyon yoluyla da bulaş olabilir. HSV müköz membranlar veya tahrip olmuş deriden vücuda girer. Primer HSV infeksiyonları sıklıkla asemptomatik seyrederek, klinik olarak belirgin bir lezyon yoktur. HSV ektodermal orijinli hücreleri infekte etmeye eğilimlidir. HSV patogeneğinde virusun en önemli iki özelliği nörovirulans ve latensidir. Nörovirulans sorumlu γ 134,5 geni HSV DNA'nın uzun segmentinde bulunan tekrarlayan bölgelerinde yer alır (2).

HSV genellikle lokalize infeksiyonlara sebep olur. Histolojik olarak herpetik lezyonlarda derinin bazal tabakasında, multinükleer dev hücreler, intranükleer inklüzyon cisimcikleri (Cowdry A cisimcikleri), kromatin azalması, nekroz ve akut inflamatuvar reaksiyon görülür. Normalde konak hücre cevabı bu evrede virusun yayılımını sınırlar. Primer infeksiyon sırasında virus infeksiyon bölgesini innerve eden duysal ve otonom sinir uçlarına alınır. Daha sonra virus, aksonlar boyunca retrograd olarak hareket ederek yaşam boyu latent olarak kalacağı nöronun gövdesine ulaşır (24). Bu retrograd transport sırasında virus konak hücrenin miktotübüllerini kullanarak hareket eder. Primer infeksiyonu takiben virus, trigeminal, sakral, lumbal, torasik, superior servikal ve vagal gangliyonlar olmak üzere duysal gangliyonların dorsal köklerinde latent infeksiyon oluşturur (25). HSV-1 daha çok trigeminal ve servikal, HSV-2 ise sakral gangliyonlarda latent kalır. Primer infeksiyonun iyileşmesinden sonra infeksiyöz HSV gangliyonlarda uzun süre kalmaz. Primer infeksiyonun olduğu anatomik bölgede bulunan gangliyon hücrelerinde viral DNA %10-25 oranında tespit edilebilmektedir. HSV reaktivasyon sırasında duysal sinirlerden anterograd bir akımla kütanöz bölgeye geri gelir ve tekrar epitel hücrelerini infekte eder (26). Ultraviyole ışık, stres, travma, immunsupresyon, menstrüasyon, ateşli hastalık, infeksiyon reaktivasyona sebep olduğu düşünülen durumlardır (27). Reaktivasyon sıklığı, viral subtip ve etkilenen anatomik bölge arasındaki ilişkiye bağlı olarak değişebilir. İmmun sistemi yeterli olan kişiler HSV-1 i hem oral hem de genital yolla aldıklarında, HSV-1 reaktivasyonu oral bölgede, genital bölgeye göre daha sık olmaktadır. Aynı şekilde HSV-2 yi hem oral hem de genital yolla alan hastalarda genital bölgede reaktivasyon sıklığı oral bölgeden 8-10 kat daha fazla olmaktadır

(28). Konağa ait faktörler reaktivasyon oranlarını etkilemektedir. İmmün yetmezliği olan hastalarda reaktivasyon hem daha sık hem de daha ciddi olmaktadır. HSV, yenidoğanlar organ transplantı yapılan veya HIV ile infekte kişilerde sistemik infeksiyon oluşturmaya eğilimlidir. Virusun viseral organlara yayılımı yaşamı tehdit eden hastalıklara sebep olabilir (29).

Kutanöz HSV infeksiyonları infekte epitelyal hücrelerde nükleer dejenerasyon ve hücre membranlarının kaybı ile birlikte balonlaşmaya sebep olur. İnfekte hücreler ya lizise uğrar ya da multinükleer dev hücreler oluşturmak üzere birleşirler. Hücre lizisi ile birlikte bol miktarda virus içeren hücre sıvısı, hücresel artıklar ve inflamatuvar hücreler epidermal ve dermal tabakalar arasında birikir. Mutinükleer dev hücreler genellikle vezikülün tabanında bulunur. Yoğun inflamatuvar cevap vezikülün tabanından dermise doğru yayılır. Lezyonlar iyileşmeye başladığı zaman veziküler sıvı inflamatuvar hücrelerin yoğunluğu sebebiyle pürülan bir hal alır. Daha sonra kabuk oluşur. Vezikül yerinde nadiren skar kalır. İnfeksiyon müköz membranları da tutarsa, ince epitelin hızlı rüptürüne bağlı olarak vezikülden daha çok yüzeysel ülserler oluşur. Mukozal lezyonların histopatolojik bulguları deri lezyonları ile aynıdır (28).

HSV ensefaliti, virusun merkezi sinir sisteminde infeksiyona sebep olmasıyla gelişir. Virusun beyine girişi veya alternatif olarak virusun temporal loblarda reaktivasyonu tam olarak anlaşılammış bir fenomendir. Primer infeksiyon sistemik olabilir ve merkezi ve periferik sinir sistemi dışında diğer organlar da etkilenebilir. Yenidoğanda, gebelikte ve yaygın HSV infeksiyonu sırasında diğer organlarda etkilenebilir. Multiorgan hastalıkları, genellikle virusun mukozal yüzeylerdeki replikasyonunu sınırlandıramayan konaklarda vireminin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Hem primer hem de tekrarlayan HSV infeksiyonları MSS'de hastalığa sebep olabilir (30).

İnsanlarda primer infeksiyon sırasında virusun MSS'ne giriş yolu tartışma konusudur. Klasik çalışmalarda HSV'nin hayvanlarda beyine giriş yolları hem olfaktör hem de trigeminal yollarla olduğu gösterilmiştir. Fakat insanlarda bu virusun MSS'ne ulaşma yolları kesin olarak aydınlatılamamıştır. Olfaktör traktustan limbik sisteme sinirlerin anatomik dağılımı, virusu temporal loblardan izole edilişi bu yolun virusun MSS'ne ulaşması için uygun bir yol olduğu hipotezini destekler niteliktedir (31). Elektron mikroskopisi HSV ensefaliti gelişen bazı hastalarda olfaktör yolun giriş yolu olduğunu göstermiştir. Fokal herpes simpleks ensefaliti oluşumu ile sonuçlanan HSV reaktivasyonu patogeneizde asıl önemli problemdir. İnfekte beyin dokusunda latent virusun varlığı kanıtlanmış, fakat bu bölgelerde virus reaktivasyonu hipotez olarak kalmıştır. Virusun periferde reaktive olduğu ve nöronal yollarla MSS'ne taşındığı öne sürülmektedir. Buna karşılık rekürren herpes labialis ile ilgili incelemelerde virusun reaktivasyonunun trigeminal gangliyonlarda ortaya çıkarttığı ve HSV ensefalitinin bunun nadir bir

sonucu olduğu belirtilmektedir (32, 33). Konağın immün cevabı HSV ensefaliti patogeneğinde önemli fakat tam olarak tanımlanamamış bir role sahiptir. HSV ensefaliti immünyüprese konaklarda normal konaklara göre daha sık ortaya çıkmaz fakat ortaya çıktığı zaman atipik ve progresif seyir izler.

2.5. İMMÜNİTE

HSV'lerin en önemli özelliği nöronları infekte edebilme ve bu hücrelerde persiste kalarak duysal gangliyonlarda latent infeksiyonlara yol açabilme yeteneğidir. Primer HSV enfeksiyonunda lokal kontrol mekanizmaları virusun yayılımını sınırlar ve infeksiyöz ajanı nötralize eder. İmmünite başlangıçta lokal immün cevap, IFN- α ve IFN- β , aktif doğal öldürücü hücreler ve makrofajlar gibi spesifik olmayan savunma mekanizmaları sonrasında ise özgül sitotoksik T hücre cevabını kapsamaktadır. Viral infeksiyondan sonra doğal immün cevap tip I IFN- α ve IFN- β sentezi ve sekresyonu ile başlar. İnterferonlar infekte hücrede ve bu hücrelerin çevresini saran hücrelerde antiviral cevabı indükler. IFN bağımlı antiviral aktiviteye hücresel enzimler olan 2'-5' oligoadenilat sentetaz ve çift zincirli RNA bağımlı protein kinaz aracılık eder. HSV infeksiyonlarında IFN- α en erken gen ekspresyonunu inhibe etmektedir (34). Antiviral aktivitelerine ek olarak IFN'ler güçlü immünmodülatördürler. IFN'ler makrofaj ve doğal öldürücü hücrelerin aktivasyonunu tetiklerler. Ayrıca sitotoksik T hücrelerini aktive eder, MHC Class I ve II moleküllerinin ekspresyonunu artırır, hücre yüzeyindeki kostimülatör molekülleri indükler, sitokin sekresyonunu stimüle eder ve lokal inflamasyonu artırır. Merkezi sinir sisteminde $\gamma\delta$ T hücreleri, doğal öldürücü hücreler, CD4+ T hücreleri ve nöronların HSV infeksiyonuna karşı IFN- γ ve TNF (Tumor necrosis factor) ürettikleri bilinmektedir (35, 36, 37).

Kazanılmış bağışıklık sistemi infeksiyona karşı korumada daha güçlüdür. Doğal öldürücü hücreler infeksiyona karşı savunmada ilk sırada yer alırlar. Doğal öldürücü hücreler, patojen ile infekte hücreleri spesifik sitotoksik T hücre cevabından önce lizise uğratar. Bu hücreler ayrıca insanlarda herpes virüslara bağılı hastalıkların iyileşmesinde de önemli rol oynar. Doğal öldürücü hastalıkların aktivitesi azalırsa ciddi herpetik hastalıklar ortaya çıkar (38).

HSV ve dentritik hücreler arasındaki etkileşim incelendiğinde, HSV'nin immün sistemden kaçabilmesi için dentritik hücre fonksiyonlarını baskılaması gerektiği düşünülmektedir (39). HSV-1 invitro olarak human monosit derive dentritik hücreleri infekte eder ve infeksiyon sırasında bu hücreler zayıf T hücre stimülatörleri olarak davranırlar. HSV-2 de benzer bir inhibitör etkiye sahiptir. Bu etkinin, MHC Class I antijenlerinin oluşumunu engellemesiyle ortaya çıktığı öne sürülmektedir. HSV-1 infeksiyonları ayrıca dentritik hücrelerin morfolojisinde de değişiklik yapar ve kemotaktik stimuluslara karşı dentritik hücrelerin cevabını azaltır. HSV farklı stratejiler kullanarak profesyonel antijen sunan hücrelerin antijen sunumunu engeller. İnfeksiyondan sonra 3-4 gün içinde HSV spesifik CD4+ Th 1 hücreleri mukoza ve lenf nodlarında tespit edilebilir (40).

Humoral immun cevap HSV infeksiyonunun başlamasından hemen sonra gelişir. HSV-spesifik mukozal immun cevapta en fazla bulunan antikorlar, plazma hücrelerinden salınan IgA antikorlarıdır. IgA antikorları infeksiyonun başlangıcından itibaren ilk 3 günde görülür ve pik değerine 6. haftada ulaşır. HSV spesifik IgA antikorları en az 6 hafta ortamda bulunur ve seviyeleri giderek azalır. HSV'ye spesifik IgA'nın ortaya çıkmasından sonra IgG1 ve IgG3 antikorları görülmeye başlar. HSV spesifik IgM sekrete eden B hücreleri kadın genital mukozasının sekresyonlarında tespit edilebilir (41).

Tekrarlayan genital infeksiyonlarda sekretuar IgA'nın bulunması viral atılım süresini kısaltır. HSV spesifik IgA, IgG1, IgG3 antikorları tekrarlayan HSV-2 epizodları sırasında bütün hastaların serumlarında bulunur. HSV spesifik IgM ve IgG4 antikorları bu hastaların %70-80 inde tespit edilebilir (42).

HSV infeksiyonları sırasında konak immun cevabı persiste kalır ve HSV'ye bağlı hastalıkları kontrol etmeye çalışır. Bu yüzden genellikle tekrarlayan infeksiyonlar daha hafif geçer ve daha kısa sürer. HSV-1 ve HSV-2 arasında çapraz koruma olabileceği gibi, yenidoğanlarda anneden geçen antikorlar kısmen koruyucudur. HSV hastalığının iyileşmesinde hücresel immun cevap humoral immun cevaptan daha önemlidir (43). CD8 T hücre cevabı reaktif olmuş latent virusun oluşturduğu sekonder infeksiyonlardan da korunmada önemlidir. Uzun yıllardır HSV infeksiyonunun latent döneminde çok az veya hiç viral gen ekspresyonu olmadığına inanılıyordu, fakat farelerde yapılan çalışmalarda glikoprotein-B spesifik CD8 T hücrelerinin, dorsal kök gangliyonlarında bulunan nöronlarda HSV-1 reaktivasyonunu engellediği gösterilmiştir (44).

2.6. HERPES VİRUSLARIN OLUŞTURDUĞU HASTALIKLAR VE KLİNİK BULGULAR

HSV tip 1 ve 2'den ileri gelen patoloji farklı klinik durumda ortaya çıkabilir. Lezyonlar genellikle embriyonik ektodermden köken alan dokularda oluşur; deri, ağız çevresi ve ağız boşluğu, genital bölge ve sinir sistemi infeksiyonu en sık görülen bölgeleridir. Yenidoğanlarda ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde diğer dokularında enfekte olması mümkündür (15).

HSV'ye bağlı klinik formlar, infeksiyonun yeri, yaş, konağın immün durumu, virusun tipine göre değişkenlik gösterir. HSV-1 subtipi sıklıkla oral-labial infeksiyonlar (farenjit, gingivostomatit) ile ilişkili iken, HSV-2 subtipi genital infeksiyonlarla ilişkilidir. Ayrıca HSV antikorları yönünden negatif (infeksiyona hassas) bireylerin ilk defa HSV ile enfekte olmaları (primer infeksiyon) ile virusun latent dönemden çıkarak reaktivasyon neticesinde oluşturduğu

tablo (rekürrent infeksiyonlar) arasında klinik ve epidemiyolojik açıdan farklı olabilirler. Özellikle yıl itibarıyla çok sayıda herpetik ataklara maruz kalan kişilerin bağışıklık sisteminin başka bir nedenle baskılanmış olabileceğinin düşünülmesi gerekir (7, 15, 45).

2.6.1. Primer Herpetik Gingivostomatit

Primer herpetik gingivostomatit HSV-1 infeksiyonunun en sık rastlanılan klinik formudur. Oral veya perioral bölgede veziküler ve ülseratif lezyonlarla karakterizedir. HSV-1 ve HSV-2'ye karşı antikor cevabı olmayan kişilerin bu viruslarla ilk karşılaşmalarından sonra ortaya çıkar. Primer infeksiyonun çoğu subklinik seyreder. Tipik olarak 1-5 yaş arası çocuklar etkilenirken erişkinlerde de ortaya çıkabilir. İnfantlar yaşamın ilk altı ayında anneden geçen antikorlarla pasif olarak infeksiyona karşı korunurlar. Hem HSV-1 hem de HSV-2 primer oral infeksiyona sebep olabilirken vakaların hemen tamamına yakınında etken HSV-1 dir. Hastalığın toplam süresi 10-21 gündür. Primer gingivostomatitte oral sekresyonlardan ortalama 7-10 gün süreyle virus atılımı gerçekleşir. Virus, asemptomatik çocukların da tükürüklerinden izole edilebilir (3, 7, 15).

2.6.2. Tekrarlayan Orofasiyal HSV İnfeksiyonu

Primer infeksiyondan sonra latent olarak kalan HSV periyodik olarak reaktif olur ve duysal gangliyondan infeksiyon bölgesine doğru göç eder. HSV-2'ye bağlı tekrarlayan orofasiyal hastalık çok nadirdir. Toplumda HSV-1'in yüksek prevalansına rağmen seropozitif hastaların sadece % 10-40'nda semptomatik tekrarlayan orofasiyal hastalık ortaya çıkar. Reaktivasyon sıklığı 35 yaşından sonra oldukça azalır. Primer infeksiyonla karşılaştırıldığında tekrarlayan epizodlar daha hafif seyreder ve daha kısa sürer. Hastalığın ciddiyeti hafif bir rahatsızlık hissinden, dudaklar, burun, çene ve nazal septumu kapsayan bölgelerde yoğun veziküllere kadar değişir. Herpes labialis veya diğer adıyla uçuk tekrarlayan orofasiyal herpesin en sık rastlanılan klinik formudur. Hastaların büyük kısmı yılda 2-3 atak geçirirken, %5-10 kadarında yıllık atak sayısı 6'dan fazladır. Herpes labialis tipik olarak üst dudağın vermillon sınırı ve çevresindeki kütanöz bölgeyi tutar. Hastaların %60'ında vezikül ortaya çıkmadan önce o bölgede lokal ağrı, kaşınma ve yanma hissi bulunur. Prodromal semptomlar genellikle 6 saat sürer ve erken replikasyon mükokütanöz dermatomu innerve eden duysal sinirin uç kısmında olur. Tekrarlayan infeksiyonların dörtte biri prodromal evrede kalır, karakteristik veziküller oluşmaz. 24 saat içinde çok sayıda vezikül oluşur, bu veziküller birleşir, rüptüre olur ve hızla kabuklanır. Özellikle oral bölgeye travmatik işlem yapılan hastalarda tekrarlayan herpes infeksiyonları ilk kez oral kavitede görülebilir. Tekrarlayan intraoral herpes tipik olarak sert damağın keratinize dokularını etkiler ve büyük palatin sinir

ve bukkal sinir ile innerve edilen gingivaya dağılır. Sağlıklı insanlarda tekrarlayan intraoral herpes, herpes labialisin oluşmasından sonra gözlenir (3, 7, 15).

2.6.3. Genital HSV İnfeksiyonu

Genital herpes infeksiyonlarına hem HSV-2 hem de HSV-1 sebep olabilirler. Genital herpes, asemptomatik olabildiği gibi, hafif belirtilerden, üriner retansiyon ve menenjit gibi komplikasyonların görülebildiği ciddi hastalık tablosu ile de ortaya çıkabilir. Yapılan çalışmalar, HSV-2 infeksiyonlarının genellikle subklinik seyrettiğini göstermiştir. Klasik primer infeksiyon genital bölgede ağrı, yanma ve kaşıntı gibi prodromal belirtiler ile başlar. Prodromal dönem yaklaşık 24 saat sürer. Baş ağrısı, ateş, halsizlik ve inguinal lenfadenopati gibi sistemik belirtiler sıklıkla bulunur. Genital bölgede oluşan veziküller yavaş yavaş rüptüre olur ve düzensiz, yüzeysel ülserler oluşur. Bu ülserler kabuklanır ve skar bırakmadan iyileşir. Kadınlarda sistemik semptomlar olan aseptik menenjit ve dizüri gibi komplikasyonların gelişme ihtimali daha fazladır. Primer HSV infeksiyonu 2-6 hafta kadar sürebilir fakat virusun genital traktüsten atılımı daha uzun sürer. Primer infeksiyonun ardından virus bölgesel duysal veya otonom ganglionlarda latent kalır. Ciddi primer infeksiyon geçiren hastalarda asemptomatik tekrarlayan infeksiyon sıklığı daha fazladır (3, 7, 15, 46).

2.6.4. Egzema Herpetikum

Atopik dermatitlilerde veya baş-boyun bölgesinde kozmetik cerrahi girişim geçirenlerde oral veya perioral HSV infeksiyonları komplike olabilir ve egzema herpetikum denilen ciddi, progresif bir hastalık tablosu ortaya çıkabilir. Egzema herpetikumda impetigoya benzeyen ani başlayan, geniş alana yayılan veziküloülseratif nodüller ve plaklar gözlenir. Veziküller ve püstüller birleşip rüptüre olur ve bakteriyel süperinfeksiyonlara açık geniş yüzeysel ülserler oluşur. Ülserler süper infeksiyonlarla komplike olmazsa kabuklanır ve yaklaşık bir ay içinde sekel bırakmadan iyileşir (3).

2.6.5. Herpes Gladyatorum

Genellikle güreş ve futbol gibi sporlarla uğraşanların tahrip olmuş derilerinden HSV-1'in inokülasyonu sonucu oluşan bir hastalıktır. Yüzde, kulaklarda ve boyunda deriden deriye temas sonucu, iki hafta içinde karakteristik deri döküntüleri görülür. Tekrarlayan kutanöz infeksiyonlar görülebildiği gibi oküler ve sistemik belirtiler de görülebilir (3,7).

2.6.6. Herpetik Dolama

Kutanöz herpetik bir infeksiyon olan herpetik dolama genellikle sağlık çalışanları, genital HSV infeksiyonu olan erişkinler ve primer oral herpesi olan çocukların, el parmaklarının distal falankslarını etkiler. Dolama başka bir bölgede olan herpes infeksiyonunun parmaklardaki sıyrıklara otoinokülasyonu sonucu oluşur. Hem HSV-1 hem de HSV-2 etken olabilir. Primer herpetik gingivostomatiti olan küçük çocuklarda parmak emme ile otoinokülasyon olabilir. Sağlık çalışanlarında herpetik dolama önemli bir problemdir. Hastaların aktif oral veya genital lezyonlarından bulaşır. Hastalık 3-4 hafta içinde iyileşir, fakat tekrarlayan infeksiyonlar görülebilir (3, 15).

2.6.7. Oküler HSV İnfeksiyonu

Oküler HSV infeksiyonu korneal körlüklerin önemli bir sebebidir. Oküler HSV infeksiyonu olan hastaların %22'sinde eş zamanlı primer oral HSV infeksiyonu vardır. Hastaların % 58'inde ise primer oral HSV infeksiyonu kısa süre önce geçirilmiştir. Oküler HSV infeksiyonu tek veya çift taraflı keratokonjonktivit ve tekrarlayan oküler ülserlere sebep olur (15).

2.6.8. Neonatal HSV İnfeksiyonu

HSV'ye bağlı neonatal infeksiyonlar genellikle genital infeksiyonların bebeğe vertikal olarak geçişi sonucu ortaya çıkar. Çoğunlukla etken HSV-2'dir. HSV ile enfekte infantalar sklıkta prematüre ve düşük doğum ağırlıklıdır. Gebelik sırasında primer genital HSV infeksiyonu geçiren gebelerin bebeklerine virusu bulaştırma riski rekürren infeksiyon geçiren gebe kadınlara göre 10-30 kat daha fazladır (3, 15).

Ayrıca primer infeksiyon geçiren anneler genital traktüste virusu daha fazla yayarlar. Neonatal infeksiyonun oluşabilmesi için gebe kadının semptomatik veya asemptomatik olarak doğum sırasında virusu yayması gerekmektedir. Maternal infeksiyonun tipi (primer/rekürren), annenin antikor düzeyi, membranların rüptüre olma süresi, mukokütanöz bariyerlerin durumu (fetal kafa elektrodlarının kullanımını vb), doğumun şekli (sezeryan/vajinal doğum), neonatal dönemde bulaşı etkileyen faktörlerdir. Doğuma yakın zamanda primer genital herpes geçiren annelerin bebekleri neonatal hastalık gelişimi açısından en büyük risk altındadır. Daha önceden HSV-1'e karşı antikorları var ve genital traktüste HSV-2 infeksiyonu başlamışsa bu kişi primer olmayan infeksiyonun ilk epizodunu geçiriyordur. Uzamış membran rüptür zamanı neonatal infeksiyon riskini artırmaktadır. Aktif genital lezyonu olan gebe kadınların sezeryan ile doğum yaptırılması eğer membran rüptür zamanı 4 saati geçmemişse bebekte

infeksiyon riskini azaltmaktadır. Membranların rüptür zamanına bağlı olarak sezeryan sonrası da infeksiyon gelişebildiği gösterilmiştir (47).

Yenidoğana HSV infeksiyonu intrauterin, peripartum ve postpartum dönemde bulaşabilir. Transmisyon zamanı infekte yenidoğanlarda % 85 oranında peripartum dönemdedir. İnfeksiyon yenidoğanların % 10'unu postnatal bulaşırken, % 5'i intrauterin dönemde virüsü almaktadır (48). HSV infeksiyonu peripartum veya postpartum dönemde 3 şekilde ortaya çıkar:

- 1) Deri-göz ve ağızda lokalize hastalık (SEM; skin, eye, mouth) Neonatal HSV vakalarının % 45'ini oluşturur.
- 2) Ensefalit (SEM ile birlikte veya değil) vakaların % 30'unu oluşturur.
- 3) Yaygın infeksiyon. Multipl organ tutulumu vardır, vakaların % 25'inde MSS, akciğer, karaciğer, adrenal bezler, deri, gözler, ve veya ağız tutulumu vardır (3).

2.6.9. MSS'de HSV İnfeksiyonu

HSV 1 ve 2, insanlarda MSS'de çeşitli infeksiyonlara sebep olabilirler. Hem primer hem de tekrarlayan herpesvirus infeksiyonları MSS'de infeksiyon ve hastalığa yol açabilir. Bütün herpes simpleks ensefaliti gelişen hastalarının yarısı primer infeksiyonu, yarısı ise tekrarlayan infeksiyonu olan hastalardır. HSV ensefaliti 6 aydan büyük çocuklar ve erişkinlerde akut sporadik ölümcül ensefalitlerin en sık sebebidir. HSV bütün ensefalit vakalarının %2-19'unu oluştururken, bütün nekrotizan ensefalit vakalarının %20-75'ini oluşturur. Çoğunluğuna HSV-1 sebep olmaktadır (49).

HSV hem nöronları hem de glial hücreleri invaze ederek ve replike olarak beyin parenkiminde, özellikle temporal lobda nekrotizan ensefalit ve dissemine hemorajik nekroz yapar. MSS'de HSV infeksiyonları, yenidoğan döneminde (<1 ay) neonatal herpes olarak ortaya çıkabildiği gibi daha büyük çocuklar ve erişkinlerde hem hayatı tehdit eden HSV ensefalitine hem de klinik olarak daha hafif seyreden selim aseptik menenjitlere sebep olabilir. HSV ayrıca miyelit ve/veya radikülitte birlikte olabilen tekrarlayan aseptik menenjit etkeni olabilir. Tekrarlayan HSV menenjitleri Mollaret menenjiti adı verilen farklı bir grupta ele alınır. Mollaret menenjiti terimi şimdi "idiyopatik tekrarlayan menenjitler" için kullanılmaktadır (47).

İmmün sistemi normal olan erişkinlerde HSV Ensefalitleri vakalarının % 90'ından fazlası HSV-1 infeksiyonu ile oluşurken, geri kalan kısmı HSV-2 ile oluşmaktadır. HSV-2 ensefalit vakaları genellikle reaktivasyondan daha fazla primer infeksiyon ile ortaya çıkmaktadır (47). HSV'nin infeksiyon süreci ile ilgili basamaklar Şekil 1'de belirtilmiştir.

Deri ve mukozal hücrelere inokülasyon



İnokülasyon alanında replikasyon (vezikül gelişimi olabilir)



Duysal nöron terminallerindeki hücrelerin spesifik reseptörlerine bağlanma



Nöron hücrelerine penetrasyon ve intranükleer replikasyon



Periferik duysal sinir boyunca retrograd transport



Ganglionlarda replikasyon ve latentliğin oluşumu



Viral reaktivasyona neden olan stimulus



Viral gen replikasyonunun yeniden başlaması



Periferik sinirler boyunca epitelyal yüzeylere antegrad transport



HSV infeksiyonunun reaktivasyonu

Şekil 1: HSV infeksiyonunun gelişim aşamaları (14)

2.7. HERPES SİMPLEX VİRUS İNFEKSİYONLARININ EPİDEMİYOLOJİSİ

HSV infeksiyonları bütün dünyada yaygındır. Tek doğal konak insandır. Herpes simplex virüsler konakta akut gingivostomatit, tekrarlayan herpes labialis, genital herpes, neonatal herpes ve merkezi sinir sistemi infeksiyonları gibi çeşitli infeksiyonlara sebep olurlar. Bu hastalıkların tek tek epidemiyolojileri de farklıdır. İnfeksiyon kaynağı genellikle semptomatik herpetik lezyonu olan hastalar veya tükürüklerinde virus taşıyan asemptomatik (%1-5) kişilerdir. Erişkinlerin %70-100'ü HSV-1 antikorlarına sahiptir. HSV-2 antikor oranı ise %20-65 arasındadır. Bir kişide daha önceden HSV-1 veya HSV-2'ye karşı antikor yok ve bu kişide HSV infeksiyonu gelişirse primer HSV infeksiyonunun ilk epizodunu geçirmektedir. Daha önceden HSV-1'e karşı antikorları var ve genital traktüste HSV-2 infeksiyonu başlamışsa bu kişi primer olmayan infeksiyonun ilk epizodunu geçiriyordur. Latent dönemden sonra viral reaktivasyon gerçekleşmiş ve virus deri ve mukozalara geri dönerek infeksiyon oluşturursa tekrarlayan infeksiyondur (3, 7, 8, 15).

Bütün orolabial herpetik hastalıklar, (çok az bir oranda HSV-2'nin de etken olarak gösterilmesine karşın) HSV-1 tarafından oluşturulmaktadır. HSV-1 bütün dünyada yaygın olarak hem gelişmiş hem de gelişmemiş ülkelerde görülmektedir. İnsan HSV infeksiyonlarında hayvan vektörleri tanımlanmamıştır ve tek rezervuar insandan insana bulaştır. Virus, infekte insandan diğer insanlara yakın temasla bulaşır. İnfeksiyon insidansında mevsimsel bir farklılık yoktur. İnfeksiyon nadiren fataldir ve HSV latent olarak kalır. Dünya popülasyonunun üçte birinden fazlası tekrarlayan HSV-1 infeksiyonu geçirir ve HSV geçişi aktif infeksiyon sırasında olmaktadır. Toplumdaki HSV infeksiyonlarının en büyük rezervuarı tekrarlayan herpes labialis hastalığıdır. Tip spesifik serolojik deneyler kullanılarak Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) HSV-1 infeksiyonunun seroprevalansı araştırılmıştır. "National Health Examination Survey" tarafından randomize olarak serumlar incelenmiş. 5 yaşına kadar siyah çocukların % 35'inden fazlası ve beyaz çocukların % 18'inden fazlası HSV-1 ile infekte bulunmuştur. Ergenlik dönemine kadar siyah ırkta HSV-1'e karşı antikor prevalansı beyazlara göre iki kat artmış, kadınlarda antikor prevalansı erkeklerden hafif yüksek bulunmuştur. Antikor prevalansı 40 yaşına kadar hem siyahlarda hem de beyazlarda birbirine yakındır ve %70-80'i HSV-1 seropozitifdir (50).

Ensefalit vakaların üçte ikisinden daha fazlasında endojen latent HSV-1 in reaktivasyonu söz konusudur. HSV-2 ensefalit vakaları genellikle aktivasyondan daha çok primer infeksiyon ile ortaya çıkmaktadır (51, 52).

Genital herpes infeksiyonlarına hem HSV-2 hem de HSV-1 sebep olabilir. Epidemiyolojik çalışmalarda HSV-2 seroprevalansı HSV-2 genital hastalığını yansıtmaktadır. HSV-2 antikorları rutin olarak ergenlerde görülmez ve antikor prevalansı seksüel aktivite ile korele olarak yükselir. Kişinin kendi infeksiyonunu fark edememesi gizli yayılıma zemin hazırlamaktadır. Genital HSV-

2 infeksiyonunda hızlı yükselme ile birlikte dramatik bir biçimde genital HSV-1 infeksiyonunda da artışlar görülmektedir (47).

Gebelik döneminde görülen genital herpes infeksiyonlarının en sık rastlanılan formu tekrarlayan infeksiyonlardır. Primer genital HSV infeksiyonu olan kadınlar virüsü bebeklerine bulaştırmada en yüksek risk altındadırlar. HSV-2 seronegatif olan gebe kadınların % 10 kadarında HSV ile enfekte bebek doğuran kadınların %60-80 kadarında doğum sırasında genital infeksiyon belirtileri, geçirilmiş genital herpes hikayesi ve seksüel partnerinde genital herpes hikayesi bulunmamaktadır. Neonatal infeksiyonun oluşabilmesi için gebe kadının semptomatik veya asemptomatik olarak doğum sırasında virüsü yayması gerekmektedir. Gebe olmayan HSV seropozitif kadınlarda yapılan çalışmalarda HSV varlığı PCR ile araştırılmış ve bu kadınların her üç günde bir virüsü asemptomatik olarak genital traktüste yaydıkları gösterilmiştir. Geçmiş hikayelerine bakılmaksızın bütün gebe kadınlarda gebeliğin başlangıçtan doğuma kadar olan sürede HSV yayma oranları %0,20-0,39'dur. Bilinen tekrarlayan genital herpes infeksiyonu olan kadınlarda bu oran %0,77-1.4 arasındadır (47).

2.7.1. Virus Atılımı

HSV'nin salınımı sıklıkla enfekte kişiler tarafından oluşturulmaktadır. Genital HSV-2 infeksiyonlarının klinik ve subklinik reaktivasyonu çok yaygındır. Orolabialis bölgeden virus atılımını gösteren çalışma az olmasına rağmen bazı çalışmalar tükürkle asemptomatik virus atılımının sık olduğunu rapor etmektedir. Bu şekilde asemptomatik virus atılımının virus yayılımına yol açabileceği belirgin bir durumdur. Bununla birlikte atılan virusun titresi ve atılım sıklığı da bulaşın belirleyici faktörlerindedir. Hassas PCR tekniklerinin kullanıma girmesiyle subklinik virus atılımının saptanması kolaylaşmıştır. Subklinik veya klinik HSV-1 infeksiyonlarının çoğu infeksiyöz tükürük sekresyonları ile temastan köken almakta ve trigeminal gangliyonlarda latentlik ile sonlanmaktadır. Asemptomatik virus atılımı hücre kültürü ile yapılan bazı çalışmalarda %2.7 ile %6 bulunurken PCR ile yapılan çalışmalarda bu oranın daha yüksek olduğu bildirilmektedir (47). İmmün supresyon viral atılımın oranını artırmaktadır (47). Reaktivasyonun sıklığı 100 günlük bir sürede erkeklerde 2,7, kadınlarda ise 1,9 olarak rapor edilmiştir (2).

2.8. HERPES SİMPLİKS VİRUS İNFEKSİYONLARININ TANISI

HSV infeksiyonlarının çoğunda lezyonlar tipiktir ve tanı klinik olarak konulabilir. Fakat immün yetmezlikli konaklarda ve asemptomatik infeksiyonlarda klinik tanı yeterli olmayabilir. HSV infeksiyonları genellikle kendini sınırlayan infeksiyonlar olmalarına rağmen, neonatal

herpes infeksiyonları ve HSV ensefaliti gibi ciddi hastalık tablolarında erken tanı çok büyük önem taşır. Bu virusların sebep olduğu hastalıkların spesifik antiviral tedavisi olması ve tedavi ile özellikle ensefalit ve neonatal hastalıklarda mortalite ve morbiditenin çok önemli oranlarda azalması erken tanıyı çok daha önemli hale getirir. HSV izolasyonu veziküler sıvı, lezyon kazıntısı, boğaz sürüntüsü, konjonktiva kazıntısı, doku ve beyin omurilik sıvısından (BOS) yapılabilir. HSV infeksiyonlarında histolojik inceleme, hücre kültürü, antijen, antikor, DNA tespiti ve HSV için spesifik enzimlerinin tespiti ile tanı konabilir. HSV infeksiyonlarının tanısında klinik örneklerin direk incelenmesi yardımcı olabilir. Elektron mikroskopisi, Tzanck yayması ve floresan antikor boyama yöntemleri direkt tanı yöntemleridir. Çok çekirdekli dev hücreler veya intranükleer inklüzyonların görülmesi lezyonda HSV veya VZV varlığını düşündürür. Klinik örnekler floresan antikor yöntemi ile boyanarak viral antijenler araştırılabilir. Bu yöntemde klinik örnekte yeterli miktarda hücre bulunması gerekir. HSV spesifik floresan antikor yönteminin duyarlılığı %70 ile 100 oranında değişmekte olduğu rapor edilmiştir (53).

2.8.1. Hücre Kültüründe HSV İzolasyonu

HSV infeksiyonlarının en spesifik tanı metodu, virusun izolasyonudur. HSV çok çeşitli hücre kültürü tiplerinde kolaylıkla üreyebilir. Primer tavşan böbrek tavşan ve insan akciğer fibroblast hücre dizilerinde (MRC-5) iyi ürer. MRC-5 en yaygın kullanılan fetal diploid hücre dizisidir. Ayrıca primer insan embriyonik böbrek hücreleri (Human Embriyonik Kidney: HEK) ve Hep-2 ve HeLa gibi devamlı hücre dizileri de HSV izolasyonunda kullanılabilir. HSV hücre kültüründe çok çabuk ürer. Sitopatik etki sitoplazmik granülasyonla başlar, sonra hücreler büyür ve balonlaşır. Hücrelerin füzyonu ile çok çekirdekli dev hücreler ve sinsitya oluşumu gözlenir. Karakteristik sitopatik etkisi çok çekirdekli dev hücreler ve sinsitya oluşumudur. Sitopatik etki pozitif kültürlerin %50'sinde ilk 24 saatte ortaya çıkarken, %99'unda 4 gün içinde oluşmaktadır. HSV-2'de sinsitya oluşumu daha fazla gözlemlenmektedir. Sitopatik etki infekte hücre türüne göre de değişebilir. HSV'ye bağlı sitopatik etki MRC-5 hücre dizisinde daha iyi gözlemlenmektedir. HSV'nin kültürde izolasyonu neonatal HSV infeksiyonunda kesin tanı imkanı sağlar. Neonatal HSV MSS hastalığı olanların %40 kadarında viral kültürle tanı konabilirken, herpes simpleks ensefaliti tanısı almış büyük çocuklar ve erişkinlerde BOS'ın viral kültürü ile tanı koyma şansı %2-4'tür. Viral kültürlerin negatif çıkması herpes virus infeksiyonlarını ekarte etmez. Kurumuş, kabuklanmış ve eski veziküler lezyonlarda viral kültürlerin duyarlılığı düşüktür. Ayrıca primer infeksiyonlarda tekrarlayan infeksiyonlara göre viral kültürle tanı koyma olanağı daha

fazladır. Tekrarlayan genital herpes tanısında viral kültürler hastaların yaklaşık yarısında pozitifdir (53).

2.8.2. Serolojik Yöntemlerle HSV Tanısı

HSV'ye karşı oluşan antikorlar, nötralizasyon, kompleman birleşmesi, hemaglutinasyon, indirekt, immunofloresan, RIA (radioimmunoassay), ELISA (enzyme-linked immunosorbent), gibi çeşitli serolojik yöntemlerle araştırılabilir (20).

Son yıllara kadar HSV-1 ve HSV-2 arasında tam bir ayırım yapmak serolojik testlerle mümkün değildi. Son birkaç yılda tip spesifik antikor testleri FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylandı ve ticari olarak satılmaya başlandı. Diğer konjenital ve neonatal infeksiyonların aksine neonatal HSV infeksiyonunda serolojik tanının klinik değeri azdır. Neonatal HSV infeksiyonundan kuşkulanan bebeklerde tip spesifik testlerin yapılması serolojik sonuçların yorumlanmasına katkı sağlamıştır. Çocuklarda ve genç erişkinlerde başlangıç serum HSV antikorlarının ölçümü, infeksiyon zamanının belirlenmesine yardımcı olan HSV IgG avidite testleri, tek bir serum örneği ile primer infeksiyonla, reaktivasyon/reinfeksiyon ayırımına imkan sağlamaktadır. Primer infeksiyondan sonra oluşan erken spesifik IgG yanıtı, düşük aviditeli antikorlar içerirken, birkaç ay sonra avidite artmaktadır. Bu sebeple IgG aviditesi primer infeksiyonu, genital herpes infeksiyonunun rekürren veya primer olmayan ilk epizodu ayırt etmede önemli bir serolojik gösterge olabilmektedir. Düşük antikor avidite düzeyleri primer infeksiyonun özelliğidir ve neonatal infeksiyonda artmış riski gösterir. Yüksek antikor avidite düzeyleri daha önce geçirilmiş yada tekrarlayan infeksiyon göstergesidir ve neonatal infeksiyon riskinin düşük olduğunu gösterir. HSV-2 IgG avidite testleri geliştirilmiştir ve HSV-1 IgG avidite testlerinin de geliştirilmesi zorunlu olmuştur. Neonatal HSV hastalıklarının 1/3'ü HSV-1 tarafından oluşturulmaktadır. (53).

2.8.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle HSV İnfeksiyonlarının Tanısı

Polimeraz zincir reaksiyonu nükleik asitlerin ortamda bulunduğu herhangi bir hastalıkta tanı yöntemi olarak kullanılabilir. Herpesviruslarla ilgili hastalıklarda BOS gibi ayrıcalıklı bölgelerden infeksiyon ajanının kültürü zor hatta imkansızdır. BOS'ta PCR analizleri HSV, VZV ve CMV infeksiyonları için önerilmektedir. PCR, HSV ampikonlarının tespiti ve bu ampikonlara dizi analizi yapılmasına imkan vermektedir. PCR ile nörovirulans genlerinin tespiti, bu virus tarafından yapılan MSS infeksiyonlarına konağın yanıtını ve HSV' nin antiviral ilaçlara karşı fenotipik direnci ile genotipik direnci arasındaki korelasyonu anlamamızda klinik olarak çok faydalı bir yöntemdir. PCR yöntemi tekrarlayan virus infeksiyonu (HSV DNA pozitif) ve

postinfeksiyöz immün sistemle ilişkili hastalıkları (HSV DNA negatif) birbirinden ayırt etmede faydalı olabilir. Pozitif PCR reaksiyonu hastalığın rekürren virus infeksiyonlarından kaynaklandığını ve antiviral tedavinin yeniden düzenlenmesi gerektiğini gösterebilir. Negatif bir PCR sonucu ise hastalığın postinfeksiyöz immün sistemle ilişkili olduğunu ve ek bir antiviral tedaviye gerek görülmediğini belirtir (54).

HSV ensefalitinden şüphe duyulan hastalarda BOS'ta HSV PCR testi en güvenilir ve invaziv olmayan bir testtir. Böylece BOS PCR testleri spesifik intratekal antikor sentezi ve BOS kültürü yerine kullanılabilir. Menenjit veya meningoensefalitten şüphelenilen hastalarda, nörolojik semptomların ortaya çıktığı 1-2 gün içinde test sonuçları pozitif olur, bu sonuç 2 haftadan 4 haftaya kadar pozitif kalabilir. PCR sonuçları hastanın klinik durumu ile birlikte değerlendirilmelidir.(54).

2.9. HERPES SİMPLİKS VİRUS İNFEKSİYONLARININ TEDAVİSİ

HSV infeksiyonlarının tedavisi ile viral eradikasyon mümkün değildir. Fakat antiviral tedavi ile bulaştan korunma, tekrarlayan infeksiyonların baskılanması, viral yayılma ve komplikasyonlar engellenebilir, klinik iyileşme sağlanabilir. Tekrarlayan herpes infeksiyonlarının doğası göz önüne alındığında, replikasyonun başlamasından itibaren ilk 48 saatte tedaviye başlanırsa görünür lezyonlar ortaya çıkması engellenebilir. Topikal, oral ve intravenöz ajanlar HSV infeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilir. Topikal ajanların etkili olabilmesi için, ajanların epitele iyi penetre olması ve replikasyonun gerçekleştiği duysal sinir uçlarına ulaşabilmesi gerekir. Topikal ajanlar genellikle diğer ajanlara göre lezyon bölgesine daha zor ulaşırlar. Burun septumunu, iç kulağı, saçlı deriyi veya iç genital organları etkileyen lezyonlarda sistemik antiviraller daha iyi seçenektirler (55).

Dokazanolun%10'luk kremi, asiklovir, pensiklovir, valasiklovir, famsiklovir, foskarnet, vidarabin, idoxuridine ve sidofovir HSV infeksiyonlarının kullanılan topikal ve sistemik ajanlardır (55).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Tükrük Örnekleri

Bu çalışmada sağlık çalışanlarındaki oral asemptomatik HSV atılımının belirlenmesi hedeflendi. Bu amaçla yoğun çalışma temposuna sahip servislerden birinde çalışan hemşirelerden 1.5ml'lik santrifüj tüplerine yaklaşık 500µl tükrük örneği alınması planlandı. Kısa periyodlu virus atılımını kaçırmamak için günde iki kez (sabah 8:00; akşam 16:00) örnek alındı. Sabah örnekleri diş fırçalamadan önce alındı. Bu çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesinde çalışan altı gönüllü hemşire dahil edildi. Kişisel nedenlerden ötürü 40 örnek alınamadı. Böylece 02.02.2009- 03.03.2009 tarihleri arasında alınan toplam 320 tükrük örneği çalışmanın materyalini oluşturdu. Toplanan örnekler çalışmaya başlanıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Gönüllü katılımcıların genel özellikleri aşağıda verilmiştir.

1. S.İ.: Bekar,26 yaşında, sigara kullanmıyor ve 3 yıldır yenidoğan yoğun bakım ünitesinde çalışıyor.
2. G.İ.: Bekar, 29 yaşında, ara sıra sigara kullanıyor ve 9 yıldır yenidoğan yoğun bakım ünitesinde çalışıyor
3. M.E.: Bekar, 26 yaşında, sigara kullanmıyor ve 2 yıldır yenidoğan yoğun bakım ünitesinde çalışıyor
4. Y.K.: Bekar, 25 yaşında, sigara kullanmıyor ve 1 yıldır yenidoğan yoğun bakım ünitesinde çalışıyor

5. N.B.: Bekar, 34 yaşında, sigara kullanmıyor ve 14 yıldır yenidoğan yoğun bakım ünitesinde çalışıyor

6. A.C.:Bekar, 25 yaşında, sigara kullanmıyor ve 2 yenidoğan yoğun bakım ünitesinde çalışıyor

3.1.2. Kimyasallar

Tamponlu fenol (Amresco, ABD), Chloroform (Merck, Almanya), Isoamyl alkol (Merck, Almanya), Alkol (Riedel-de Haen, Almanya), Agaroz (Sigma), Sodyum asetat (Sigma), Tris HCl (Sigma), NaCl (Merck), EDTA (Sigma), SDS (Merck), Proteinase K (AppliChem), Borik asit (Riedel-de Haen), Amplifikasyon seti (Fermentas), Real-Time PCR master mix (Fermentas), dNTP seti (Fermentas), Ethidium bromür (Sigma), Primerler ve prob (IDT)

3.1.3. Araç ve Gereçler

1.5ml'lik santrifüj tüpü (grainer bio-one), 0.2ml'lik PCR tüpü (grainer bio-one), otomatik pipetler (Lab-mate), pipet ucu, vorteks (Heidolph), santrifüj (Sigma), elektroforez tankı (Owl), digital güç kaynağı (EC-105), jel dökme tepsisi ve tarak, 250ml erlenmayer, 50ml mezür, 56°C etüv (Dedeoğlu), 95°C ısıtıcı blok (Wealtec corp.), thermal cycler (ABI 9700, Applied biosystems), real time thermal cycler (Rotorgene 6000, Corbett Research), jel dökümantasyon sistemi (Bio-rad), terazi (Sartorius Laboratory), mikrodalga fırın (Beko), UV ilüminatör (Vilber lourmat), -20°C'lik dondurucu (Uğur), -80°C'lik dondurucu (Thermo), deiyonize su cihazı (Barnstead), distile su cihazı (GFL)

3.1.4. Solüsyonlar

3.1.4.1. SDS (%10) Hazırlanması

10 gr sodyum lauryl sulphate distile su ile 100ml'ye tamamlandı.

3.1.4.2. Tris HCL (1M) Hazırlanması

80 ml distile su üzerine 15,7 gr Tris HCl eklendi ve çözüldükten sonra pH'sı 8.0'e ayarlandı. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildi.

3.1.4.3. EDTA (0.5M) Hazırlanması

80 ml distile su üzerine 29,2 gr EDTA eklendi ve çözüldükten sonra pH'sı 8.0'a ayarlandı. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildi.

3.1.4.4. TE Hazırlanması

Son konsantrasyonları 10mM Tris HCl ve 1mM EDTA olacak şekilde Tris HCl (1M) stok solüsyonundan 1ml, EDTA (0.5M) stok solüsyonundan 200 µl alınarak 98.8 ml deiyonize suya eklendi. Otoklavda steril edildi.

3.1.4.5. TBE Hazırlanması

121.10 gr tris base, 61.83 gr borik asit, 5.84 gr EDTA'ya distile su eklendi ve çözüldükten sonra pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

3.1.4.6. Lizis Buffer Hazırlanması

Lizis tamponu **Tablo 2**'de belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 2: Lizis buffer komponentleri

| Stok kimyasallar | | 50 ml lizis sol. İçin (ml) |
|-------------------|---------|----------------------------|
| Tris HCl (pH 8.0) | 1M | 1 |
| NaCl | 5M | 1.5 |
| EDTA (pH 8.0) | 0.5M | 1 |
| SDS | %10 | 1 |
| Proteinase K | 10mg/ml | 0.1 |
| Distile su | | 45.4 |

Hazırlanan lizis solüsyonu kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.4.7. 3M Sodyum Asetat (pH 4.9 veya 5) Hazırlanması

24.6 gr sodyum asetat 100 ml distile su ile karıştırılarak hazırlandı. Glasiyel asetik asit eklenerek pH 4.9 -5.2 olarak ayarlandı.

3.1.4.8. dNTP Mix Hazırlanması

1.5ml'lik santifüj tüplerine 20'ar mikrolitre (μ l) dTTP, dATP, dGTP, dCTP koyuldu ve üzerine 720 μ l deiyonize su eklenerek hazırlandı. Hazırlanan karışım kısa bir vortekslendi. Kullanılncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.1.4.9. Primer Mix Hazırlanması

1.5 ml'lik santrifüj tüplerine 40'ar μ l HSV N1, HSV N2 koyuldu ve üzerine 720 μ l deiyonize su eklenerek hazırlandı. Hazırlanan karışım kısa bir vortekslendi. Kullanılncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.1.4.10. Loading Buffer Hazırlanması

30ml gliserol, 250mg bromphenol blue ve 250mg xylene cyanol deiyonize su içinde 100ml'ye tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 1.5ml'lik santrifüj tüplerine 1'er ml olarak dağıtıldı ve kullanılncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.1.4.11. 5M NaCl Hazırlanması

29.2gr NaCl 100 ml distile suda çözüldükten sonra otoklavlandı.

3.1.4.12. Kloroform:İzoamil alkol (24:1) Hazırlanması

24 ml choloroform ile 1ml izoamil alkol karıştırılarak elde edildi. Karışımın koyulduğu şişe ışıktan korundu.

3.2. METOD

3.2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu bazı değişikliklerle birlikte Cone ve ark. tarafından tarif edildiği şekilde, aşağıdaki protokole ve sıraya göre yapıldı (56).

- 1) 1.5ml'lik santrifüj tüpleri hazırlandı ve üzerlerine örnek numaraları yazıldı.
- 2) Herbir tüpe 200'er μ l lysis buffer pipetlendi.
- 3) Aynı tüplerin üzerine 200'er μ l örnek pipetlendi ve iyice vortekslendi.

- 4) 56°C'de 2 saat inkübe edildi.
- 5) Daha sonra 95°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- 6) İnkübasyondan sonra her bir tüpe 400 µl tamponlu fenol (+4°C'de muhafaza edilen) ile ekstrakte edildi. Tüpler 100 kez alt üst edilerek karıştırıldı.
- 7) Daha sonra tüpler 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- 8) Tüp içindeki sıvının üst kısmı pellete dokunulmadan pipetle steril eppendorflara aktarıldı.
- 9) Bu tüplerin üzerine 400 µl Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) ekstrakte edildi ve tüpler 50 kez alt üst edildi.
- 10) Daha sonra tüpler 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- 11) Tüp içindeki sıvının üst kısmı pellete dokunulmadan pipetle steril eppendorflara aktarıldı.
- 12) 40 µl 3M Sodyum aetat (pH 4.9 veya 5) ilave edildi ve tüpler birkaç kez alt üst edildi.
- 13) Aynı tüpler üzerine 800 µl %100 Etanol(-20 °C'de muhafaza edilen) ilave edildi ve tüpler 11 kez alt üst edildi.
- 14) -20°C'de bir gece presipite edildi.
- 15) Daha sonra 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve tüp içeriği uygun taraftan döküldü.
- 16) Boşaltılan tüpler üzerine 500 µl %75 Etanol (-20 °C'de muhafaza edilen) ilave edildi.
- 17) Tüpler 12.500 rpm'de 2 dk çevirerek yıkandı.
- 18) Tüp içeriğinin fazlası döküldü ve fazla alkol pipetle çekildi.
- 19) Tüp içindeki DNA 65°C'de 15 dk kurutuldu.
- 20) Daha sonra DNA 50 µl TE (ph8.0) içinde çözüldü.
- 21) Kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Örneklerde HSV varlığı öncelikli olarak PCR ile araştırıldı. Bu amaçla Read ve ark. tarafından kullanılan ve HSV-1 ve HSV-2’de ortak olan Glycoprotein D’yi kodlayan bölgeye özgül bir çift primer kullanıldı. Primerlerin sekansları ve ürün uzunlukları **Tablo 3**’de verilmiştir. Primerlerin gen üzerindeki konumları aşağıdaki sekans üzerinde kalın font kullanılarak gösterilmiştir. Sekansın giriş numarası NC_001806’dır (57).

5’_gcctgtccc**atccgaacgcagccccgctg**gaactactatgacagcttcagcgccgtcagcgaggataacctggggttctgatg
cagcccccgctttgagaccgccggcacgtacctgaggctcgtgaagataaacgactggacggagattacacagttatcctggag
caccgagccaagggtcctgtaagtacgccctcccgtgcgcacccccgcagcctgcctctccccccaggcctaccagcaggg
ggtgacggtggacagcatcgggatgctgccccgcttcacccccgagaaccagcgcaccgtcgccgtatacagcttgaagatcgccg
ggtggcacggggccaaggccccatacac**gagcaccctgctgccccggagctgtccgagaccccccaacgcca**-3’

Tablo 3: PCR işleminde kullanılan primerler

| Primer Adı | Sekansı | Ürün uzunluğu (bp) |
|------------|----------------------------|--------------------|
| HSVP1 | 5’-ATCCGAACGCAGCCCCGCTG-3’ | 383 |
| HSVP2 | 5’-TCCGSGGCAGCAGGGTGCT-3’ | |

3.2.2.1. Master Mix Hazırlanması

Master mix hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları **Tablo 4**’te verilmiştir.

Tablo 4: Master mix bileşenleri ve miktarları

| Komponent | Stok kons. | 1x (µl) | 20x |
|-------------------|------------|---------|-----|
| Buffer | 10X | 5 | 100 |
| dNTP mix | 2.5mM | 4 | 80 |
| MgCl ₂ | 25mM | 5 | 100 |
| Primer mix | 5pmol | 2.5 | 50 |
| Taq polimeraz | 5U/µl | 0.3 | 6 |
| ddw | | 23.2 | 464 |
| Template | | 10 | |
| Ürün uzunluğu | | 383bç* | |

*bç; baz çifti

Master mix hazırlamak için öncelikle bir kutu içerisine bir miktar buz koyuldu. Buz üzerine 1.5ml santrifüj tüpü yerleştirildi. Yukarıdaki tabloda gösterilen kimyasallar -20°C'deki dondurucudan çıkartıldı. Taq polimeraz işlem sırası geldiğinde çıkartıldı. Çözünen kimyasallar biraz vortekslendikten sonra **Tablo 4**'de belirtilen sıraya göre karıştırıldı. Taq polimeraz kullanılmadan önce kısa bir santrifüj edildi ve tüpe aktarılırken yukarı/aşağı pipetlendi. Deiyonize su konulduktan sonra tüp 30sn vortekslenerek master miks karıştırıldı. Bu işlemler sonunda master mix hazırlanmış oldu. Hazırlanan master mix 0.2ml'lik PCR tüplerine 40'ar µl olarak pipetlendi. Tüplerin üzerlerine örnek numaraları yazıldı ve numaralarına göre izole edilen DNA'lardan her bir tüpe 10'ar µl yüklendi. Bu şekilde hazırlanan tüpler Thermal Cyclere yerleştirildi. Her çalışmaya KTÜ tıp fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı koleksiyonunda bulunan ve 107plak oluşturan ünite/ml virus içeren HSV-1 wal ve HSV-2 333 suşlarının seri sulandırımından aynı yöntemle elde edilen DNA pozitif kontrol, elüsyon sıvısı (TE tamponu) negatif kontrol olarak uygulandı.

3.2.2.2. Thermal Cycler Koşulları

Amplifikasyon işlemi ABI 9700 adlı thermal cycler'da gerçekleştirildi. İlk denatürasyon 95°C'de 5dk olarak uygulandıktan sonra 40 siklus olarak 95°C'de 45sn, 55°C'de 1dk, 72°C'de 1dk amplifikasyon gerçekleştirildi. Eksik amplikonların tamamlanması için

72°C’de 7 dakikalık ekstra bir ekstensiyon aşamasında sonra örnekler 4°C’ye soğutulmuş olarak bekletildi.

3.2.2.3. Agaroz Jel Hazırlanması

Kırk ml 1X TBE tamponu ile 0.8gr agaroz erlenmayere koyuldu ve üzeri bir kapak ile kapatıldı. Agarozun tampon içerisinde çözünmesi için mikro dalga fırında medium şiddette, 3dk bekletildi. İçinde erimiş agaroz bulunan erlen, 60°C’ye ayarlanmış su banyosunda 15dk bekletildikten sonra içine 0.5µg/ml olacak miktarda (5mg/ml stoktan 40ml jel için 40µl) etidium bromür eklendi ve dağılması için çalkalandı. Geniş kuyucuk oluşturan tarak, düz bir zemindeki tepsi üzerine oturtuldu ve jel tepsiye döküldü. Tepsi sarsılmadan jel katılaşmaya bırakıldı.

3.2.2.4. Elektroforez

Katılaştıran agarozdan tarak çıkarıldı, tepsi ile birlikte elektroforez tankının içine yerleştirildi ve üzerini kapatacak şekilde TBE tamponu döküldü. DNA’yı ağırlaştırarak kuyucuklara pipetleyebilmek ve yürüyen DNA’nın yaklaşık konumunu belirlemek için yükleme tamponu kullanıldı. On µl PCR ürünü 3µl yükleme tamponuna karıştırılarak kuyucuklara aktarıldı. Seksen altı volta 20dk yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra UV ilüminatörde jel incelendi. Amplifikasyon ile elde edilen 383bp uzunluğundaki ürünler moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırılarak arandı ve uyan bantlar pozitif olarak not edildi. Jel dökümantasyon sistemi ile resimleri çekildi.

3.2.3. Real-Time PCR

Örneklere HSV varlığı aynı zamanda real-time PCR ile de araştırıldı. Bu amaçla Lakeman FD ve Whitley RJ. tarafından valide edilen primerler ve tarafımızca dizayn edilen FAM reporter/TAMRA quencher boyalı prob kullanıldı (**Tablo 5**) (58).

Tablo 5: Real Time PCR’da kullanılan Primerler ve prob sekansı

| Primer | Sekans |
|----------|---------------------------------------|
| Forward | TACGGCCCCGAGTTCGTGA |
| Reverse | CCGTACATGTCGATGTTTAC |
| HSVProbe | FAM-ACAACATCATCAACTTCGACTGGCCCT-TAMRA |

Primerlerin gen üzerindeki konumları aşağıdaki sekans üzerinde kalın font kullanılarak gösterilmiştir. Sekansın giriş numarası NC_001806'dır.

5'_cgagctggcggccaggggctgcccacgcccgtggttctggaattcgacagcgaattcgagatgctgttgccctcatgaccctt
gtgaaacag**ta**cg**gcccc**gag**ttc**gtgaccgggtacaacatcatca**acttc**gact**ggccctt**cttgctggccaagctgacggacat
ttacaaggtccccctggacgggtacggccgatgaacggccggggcgtgttcgctgtgggacataggccagagccactccaga
agcgcagcaagataaaggtgaacggcat**ggtgaacatcgacatgtac**gggattataaccgacaagatcaagctctcgagctacaag
ctcaacgccgtggccgaagccgtcctgaaggacaagaagaaggacctgagctatcgcgacatccccgcctactacgccggggc
ccg-3'

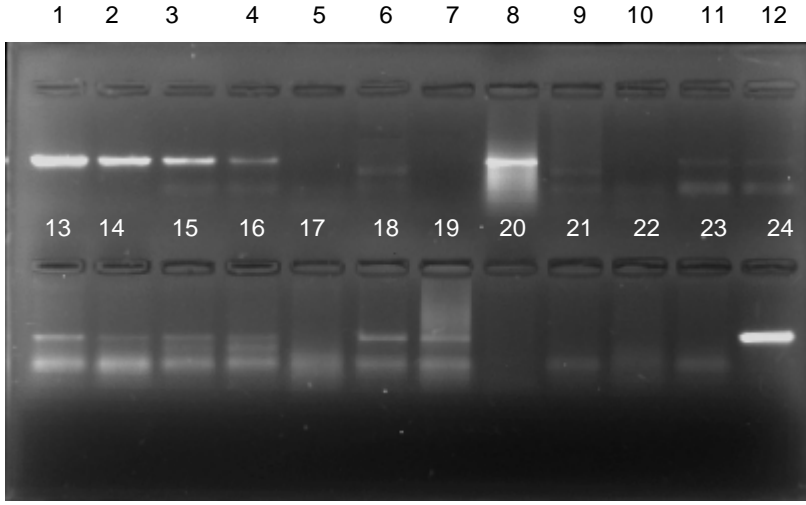
İki kat yoğun real-time PCR master miksi (Maxima™ Probe qPCR master mix 2X) kullanarak **Tablo 6**'da belirtildiği şekilde HSV real time master miks hazırlandı ve 20'şer µl olarak bölündü. Beş µl kalıp DNA eklenerek Rotorgene 6000 adlı thermal cycler'da 95°C'de 10dk ilk denatürasyondan sonra 45 siklus olarak 95°C'de 20sn, 60°C'de 30sn, 72°C'de 30sn amplifikasyon gerçekleştirilirken her 60°C'deki döngüde ışığa ölçtürüldü. İşlem sonunda analiz edilerek amplifikasyon eğrileri kontrol DNA'ları ile karşılaştırıldı. Her çalışmaya HSV-1 wal ve HSV-2 333 suşundan elde edilen DNA pozitif kontrol, elüsyon sıvısı (TE tamponu) negatif kontrol olarak uygulandı.

Tablo 6: Real time PCR için master mix kompozisyonu

| Komponent | Miktar µl | 20x |
|----------------------------------|-----------|-----|
| 2X master mix (fermentas maxima) | 12.5 | 250 |
| Primer Mix (5 pmol/µl-5µM) | 1.5 | 30 |
| TaqMan Prop (10 pmol/µl-10µM) | 0.5 | 10 |
| Template DNA | 5 | |
| ddw | 5.5 | 110 |
| Toplam Reksiyon hacmi: | 25 | |

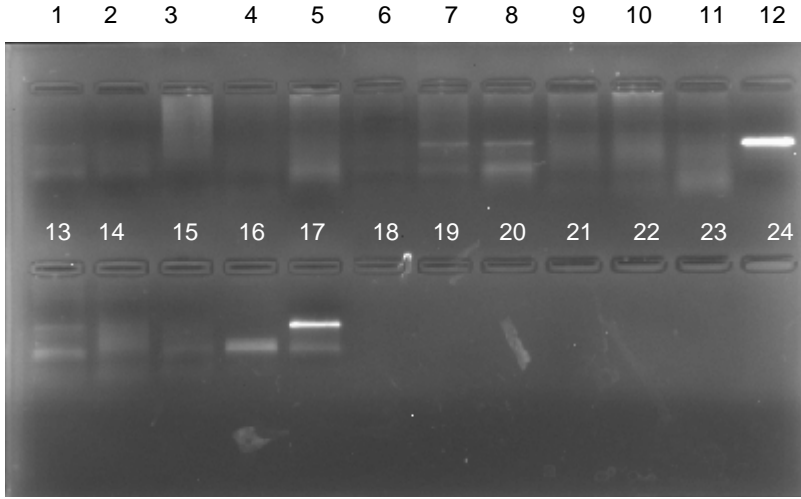
4. BULGULAR

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesinde çalışan altı gönüllü hemşireden alınan toplam 320 tükürük örneğinden izole edilen DNA'lar kullanılarak PCR yöntemiyle HSV-1 ve HSV-2 varlığı araştırıldı. Bazı örneklerle ait jel görüntüleri **Resim1** ve **2**'de verilmiştir.



Resim 1: Bazı örnekler ve kontrollere ait agaroz jel elektroforez görüntüsü

1: HSV DNA 10^7 kopya/ml. 2: HSV DNA 10^6 kopya/ml. 3: HSV DNA 10^5 kopya/ml. 4: HSV DNA 10^4 kopya/ml. 5: A-1 nolu örnek. 6: A-3 nolu örnek. 7: A-10 nolu örnek. 8: Y-21 nolu örnek. 9: G-15 nolu örnek. 10: G-32 nolu örnek. 11: S-2 nolu örnek. 12: S-3 nolu örnek. 13: S-15 nolu örnek. 14: S-16 nolu örnek. 15: S-45 nolu örnek. 16: S-51 nolu örnek. 17: N-2 nolu örnek. 18: N-4 nolu örnek. 19: N-5 nolu örnek. 20: N-15 nolu örnek. 21: N-16 nolu örnek. 22: N-17 nolu örnek. 23: N-18 nolu örnek. 24: HSV DNA 10^6 kopya/ml



Resim 2: Bazı örnekler ve kontrollere ait agaroz jel elektroforez görüntüsü

1: N-10 nolu örnek. 2: M-1 nolu örnek. 3: M-2 nolu örnek. 4: M-3 nolu örnek. 5: M-4 nolu örnek. 6: M-5 nolu örnek. 7: N-31 nolu örnek. 8: N-38 nolu örnek. 9: G-1 nolu örnek. 10: G-2 nolu örnek. 11: G-3 nolu örnek. 12: HSV DNA 10^7 kopya/ml. 13: N-44 nolu örnek. 14: N-13 nolu örnek. 15: N-49 nolu örnek. 16: Negatif kontrol. 17: HSV DNA 10^5 kopya/ml

Çalışma sonucunda elde edilen veriler **Tablo 7**'de sunulmuştur.

Tablo 7: Tükrük örneklerinin PCR sonuçları

| Günler | 1 ^a | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | |
|--------|----------------|----------------|---|---|----------------|---|---|---|---|---|---|---|
| | S ^b | A ^c | S | A | S | A | S | A | S | A | S | A |
| 1 | - ^d | + ^e | - | - | G ^f | G | - | - | - | - | - | - |
| 2 | + | - | - | - | - | G | - | - | + | + | - | - |
| 3 | - | G | - | - | - | - | - | G | + | + | - | G |
| 4 | G | - | - | - | G | - | - | - | + | + | + | - |
| 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - |
| 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - |
| 7 | G | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 8 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | G | + |
| 10 | - | - | - | + | - | G | - | - | - | - | - | G |
| 11 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | G | G |
| 13 | - | - | - | - | - | G | - | - | - | - | - | - |
| 14 | - | G | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | G | G | - | - | G | - | - | - | + | + | G | - |
| 16 | G | G | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 17 | G | G | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 18 | - | - | - | - | G | - | - | - | - | - | - | G |
| 19 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | G | - |
| 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | G |
| 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - |
| 22 | - | - | - | - | - | G | - | - | - | + | G | G |
| 23 | + | - | - | - | G | - | - | - | - | - | G | G |
| 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 25 | G | - | - | - | G | - | - | - | - | - | - | - |
| 26 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | G |
| 27 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 28 | - | G | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 29 | - | - | - | - | - | G | - | - | - | + | G | - |
| 30 | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - |

^a Örnek veren gönüllü hemşireler

^b Sabah alınan tükrük örneği

^c Akşam alınan tükrük örneği

^d HSV negatif örnek

^e HSV pozitif örnek

^f Örnek gelmedi

Altı hemşireye ait 320 örnekten 33'ünün (%10.3) pozitif olduğu belirlendi. Bunlardan 1'inin 1 aylık sürede asemptomatik olarak HSV atmadığı saptandı. Diğer 5 hemşirede atılım sıklığının farklılık gösterdiği gözlemlendi (Tablo 8, Tablo 9). Sabah ve akşam alınan örnekler iki örnek olarak kabul edildiğinde atılım oranlarının %1.7 ile %35 (Tablo 8), bir gün içinde gelen örnekler tek örnek kabul edilip değerlendirildiğinde atılım oranlarının %3.3 ile %46.7 arasında değiştiği belirlendi. Bu bir aylık dönemde saptanan atılımların tablosu (Tablo 7) incelendiğinde ve süresi değişmekle birlikte reaktivasyonun periyodlar halinde gerçekleştiği görüldü. Reaktivasyon sıklığı bu grupta 1 aylık dönemde ortalama 2.3 olarak belirlendi.

Tablo 8: Sabah/akşam toplam örnek sayısına göre gönüllülerde 1 aylık dönemde virus atılım sıklığı

| Objektif | Örnek sayısı | Pozitiflik n (%) | Reaktivasyon sıklığı |
|----------|--------------|------------------|----------------------|
| 1 | 48 | 6 (12.5) | 4 |
| 2 | 60 | 2 (3.3) | 2 |
| 3 | 48 | 0 (0) | 0 |
| 4 | 59 | 1 (1.7) | 1 |
| 5 | 60 | 21 (35) | 4 |
| 6 | 45 | 3 (6.7) | 3 |
| TOPLAM | 320 | 33 (10.3) | |

Tablo 9: Günler baz alındığında örnek sayısına göre gönüllülerde 1 aylık dönemde virus atılım sıklığı

| Objektif | Örnek sayısı | Pozitiflik n (%) |
|----------|--------------|------------------|
| 1 | 27 | 5 (18.5) |
| 2 | 30 | 2 (6.7) |
| 3 | 29 | 0 (0) |
| 4 | 30 | 1 (3.3) |
| 5 | 30 | 14 (46.7) |
| 6 | 27 | 3 (11.1) |
| TOPLAM | 320 | 33 (10.3) |

Pozitif örnekler real time PCR ile yeniden araştırıldı. Bu çalışmanın sonunda bazı örnekler negatif olarak saptandı (**Tablo 10**).

Tablo 10. Real time PCR ile pozitifliklerin uyumluluğu

| Obje | PCR ile Pozitif örnek sayısı | Real time PCR ile Pozitif örnek sayısı |
|--------|------------------------------|--|
| 1 | 6 | 1 |
| 2 | 2 | 0 |
| 3 | 0 | 0 |
| 4 | 1 | 1 |
| 5 | 21 | 18 |
| 6 | 3 | 0 |
| TOPLAM | 33 | 20 |

Pozitiflik oranı sabah örneklerinde 15/161 (%9.3) olurken, akşam örneklerinde 18/159 (%11.3) olarak bulundu.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesinde çalışan altı gönüllü hemşireden 1 aylık periyotta sabah ve akşam olmak üzere 320 tükürük örneği alındı. Fenol-kloroform ekstraksiyon ve etanol presipitasyon yöntemi kullanılarak bu örneklerden DNA izole edildi. Ortak primerler kullanılarak örneklerden PCR yöntemiyle HSV-1 ve HSV-2 varlığı araştırıldı.

Bir gönüllüde bu dönemde alınan örneklerde pozitiflik saptanmadı. Kaufman ve ark.'larının gözyaşı ve tükürük örneklerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada bir aylık süre içinde 50 gönüllüden birinde benzer şekilde HSV DNA saptayamamışlardır (11). da Silva ve ark. ise 25 denekle yaptıkları bir çalışmada tümünün 45 günlük periyoda en az bir kez pozitifleştiğini göstermişlerdir (1).

Çalışmaya katılan diğer gönüllülerden birinde bir aylık periyotta sadece bir gün içinde ve sabah örneğinde pozitif olarak bulundu.

Diğer 4 gönüllüden üçünde 2, 3 ve 4 dönem HSV DNA pozitifliği belirlendi. Pozitiflik sadece bir örnekte olduğu dönemlerin yanında, sabah-akşam veya akşam-sabah şeklindeki ardışık örneklerde de görüldü. Bir aylık dönemde atılım sıklığı ortalaması 2.3 olarak belirlendi. Whitley ve ark. genital reaktivasyonun sıklığını 100 günlük bir sürede erkeklerde 2,7, kadınlarda ise 1,9 olarak rapor etmişlerdir (2). Knaup ve ark. oral atılım sıklığını 0.5 olarak belirlemişlerdir (59).

Sonuncu bahsedilecek gönüllüde ise 4 dönem halinde gerçekleşen asemptomatik virus atılımında, toplam 60 örneğin 21'inde HSV DNA pozitif olarak bulundu. Bu pozitiflik büyük ölçüde sabah-akşam veya akşam-sabah şeklindeki ardışık örneklerde görüldü. Yoğun virus atılımı belirlenen bu gönüllü birim sorumlusu olup yoğun stres altında olduğunu belirtmekteydi.

Toplam altı gönüllüdeki pozitiflik oranı sabah örneklerinde 15/161 (%9.3) olurken, akşam örneklerinde 18/159 (%11.3) olarak bulundu. Bu oransal fark ışığın virus atılımını tetiklediği bilgisi ile paraleldir.

Çalışma sonucunda pozitif bulunan DNA'lar real-time PCR ile tekrarlandı ve bir kısmının negatif olduğu (20/33) görüldü. Bu farklılık tarafımızdan dizayn edilen real-time PCR'in optimizasyona ve /veya validasyona gereksinimi olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada kullanılan primerler, HSV-1 ve HSV-2'de ortak olan bir bölgeye özgül oldukları için tür ayrımı yapılamadı. Türe özgül primerler kullanarak PCR metoduyla veya hücre kültürüne tükrük örneklerinden ekimler yapıp HSV'yi çoğalttıktan sonra serolojik olarak tür ayrımına gidilebilir. Bununla birlikte Wald ve ark. HSV tanısında hücre kültürünün hassasiyetinin PCR'ye göre daha düşük olduğu bildirmektedirler (60).

Yapılan araştırmalar nozokomiyal HSV infeksiyonlarının oluşabileceğini göstermektedir. Sakaoka ve ark.'ları belirli aralıklarla hastaneye gelen bebeklerde ortaya çıkan HSV infeksiyonlarında kaynağın hastane personeli olduğunu göstermiştir (13). Bu da sağlık çalışanlarının özellikle immunolojik defekti bulunan hastalarda risk oluşturduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışma sağlık çalışanlarında sıklıkla asemptomatik HSV atılımının gerçekleştiğini göstermiştir. Normal popülasyona göre daha fazla antiviral ilaç kullanma nedeniyle dirençli HSV suşlarını bulundurma oranının daha yüksek olduğu düşünülen sağlık çalışanlarından kaynaklanabilecek bir bulaşın daha ciddi bir risk oluşturacağını düşündürmektedir.

Tükrükle atılan ve bu yolla bulaşabilen CMV ve EBV gibi diğer virusların da atılımının olduğu bilinmektedir. Bu örneklerde bahsedilen viral ajanların da bakılması yararlı olacaktır (61).

Bununla birlikte daha fazla sayıda ve her iki cinsiyetten gönüllü ile ve hücre kültür yöntemlerini de kullanarak tekrarlanmasının daha aydınlatıcı olacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yoğun Bakım Ünitesinde çalışan altı gönüllü hemşireden 1 aylık periyotta sabah ve akşam olmak üzere 320 tükürük örneği alındı ve PCR yöntemiyle HSV-1 ve HSV-2 DNA varlığı araştırıldı.

Otuz üç örnekte HSV DNA pozitif bulundu. Pozitif bulunan DNA örnekleri Real time PCR yöntemi kullanılarak yeniden çalışıldı ve 33 örnekten 20'si pozitif bulundu. Tarafımızdan dizayn edilen real-time PCR'ın optimizasyon ve validasyona gereksinim gösterdiğini vurgulamaktadır.

Altı gönüllüden 1'inde bir aylık periyotta hiç pozitifliğe rastlanmadı. Diğer beş gönüllüde ise belirli dönemlerde pozitiflik rastlandı. Bu beş gönüllüden birinde 1 aylık sürede toplam 21 örnekte HSV DNA pozitif olarak bulundu.

Bu çalışma sağlık çalışanlarında sıklıkla asemptomatik HSV atılımının gerçekleştiğini göstermektedir. HSV'ye bağlı hastane enfeksiyonunun önlenmesinde belli periyodlarla çalışanlarda HSV atılımının belirlenmesi, hastalara yaklaşımda kişisel koruyucu ekipman giyilmesi ve stresi azaltıcı önlemler alınması gerektiğini düşünmekteyiz.

Bununla birlikte daha fazla sayıda ve her iki cinsiyetten gönüllü sağlık çalışanı ile daha ileri çalışmaların yapılmasının daha açıklayıcı verilere ulaştıracağı düşünülmektedir.

7. ÖZET

Sağlık çalışanlarında oral herpes simplex virus atılımı.

HSV infeksiyonları insanlarda en sık rastlanan viral hastalıklar arasında yer almaktadır. Oral, genital, göz, deri, santral sinir sistemi (SSS) ve iç organlarda lezyonlara neden olurlar. Bu lezyonlar virüsün primer infeksiyonundan veya latent virüsün reaktivasyonundan kaynaklanabilir. HSV infeksiyonları dünyada en yaygın görülen infeksiyonlardandır. HSV'nin doğal rezervuarı insandır. Bulaş, yakın temas veya enfekte sekresyonlarla direkt temas yoluyla olmaktadır. Sadece aktif hastalığı olanlar değil asemptomatik kişiler de bulaştırıcıdır.

Bu çalışmada, sağlık çalışanlarında oral asemptomatik HSV atılımını belirlemek amacıyla, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesinde çalışan altı gönüllü hemşireden 1 aylık periyotta sabah ve akşam olmak üzere 320 tükürük örneği alındı ve PCR yöntemiyle HSV-1 ve HSV-2 DNA varlığı araştırıldı.

Sonuç olarak, 33 (%10.3) örnekte HSV DNA pozitif bulundu. Pozitif bulunan DNA örnekleri Real time PCR yöntemi kullanılarak yeniden çalışıldı ve 33 örnekten 20'si pozitif bulundu.

Bu çalışma sağlık çalışanlarında sıklıkla asemptomatik HSV atılımının gerçekleştiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Tükürük, Asemptomatik, HSV, PCR

8. SUMMARY

Herpes simplex virus shedding in oral cavity of health workers

HSV infections are one of the most common viral infections among human being. It causes lesions on oral, genital, eye, skin, central nerve system and internal organs. These lesions are results from the virus primer infection or reactivation of latent virus. HSV infections are one of the most common infections around the world. Human is one of the reservoir of HSV. Close contacts and secretions are main ways for contamination.

In this study, 320 saliva samples taken from six voluntry nurses who works in Karadeniz Technical University Faculty of Medicine Neonatal Intensive Care Unit in a period of 1 month. The samples have taken 2 times per day and looked for presence of HSV-1 and HSV-2 using PCR method to determine the oral asemptomatic HSV secretion.

In conclusion, HSV DNA was found positive at 33 samples (%10.3).These samples again with Real Time PCR and 20 out of 33 samples were found positive.

In this study, we establish that asemptomatic rezervers periyodicaly release virus

Key Words: Saliva, Asymptomatic, HSV, PCR

9.KAYNAKLAR

1. Da Silva, LM., Guimmaraes, ALS., Victoria, JMN., Gomez, RS.:Herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity of seropositive patients. Oral Diseases, 11:13-16, 2005.
2. Whitley, RJ., Roizman, B.: Herpes simplex virus infections. The Lancet, 12;357 (9267): 1513 -1518, 2001.
3. Tünger, A., Çavuşoğlu, C., Korkmaz, M.: Mikrobiyoloji, 4. Baskı. Asya Tıp Kitabevi, 305 -326, 2005.
4. Kabakuş, N., Aydın, M.: Herpes simpleks virüs Tip-1'in neden olduğu sinir sisteminin farklı enfeksiyöz ve postenfeksiyöz bozuklukları. Klinik seri. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 19(3): 213- 220, 2005.
5. Yağmur, G., Özbal, Y., Gökahmetoğlu, S.: Klinik Örneklerde Hücre Kültürü Yöntemi ile Herpes Simpleks Virüs Araştırılması. Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal), 31(2): 99 -103, 2009.
6. Cengiz, SA., Cengiz, L., Us, E., Cengiz, AT.: Gebe Kadınlarda Herpes Simplex Virus Tip-1 ve 2, IgG ve IgM Antikorlarının, ELISA ile Araştırılması. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 11(4): 227 -231, 2004.
7. www.infeksiyon.org/ Herpes Simplex Virus Enfeksiyonları
8. [http// tip.erciyes.edu.tr/ ders_notları/Dahili_Tip/ Klinik Mikrobiyoloji/ Orhan-Yıldız](http://tip.erciyes.edu.tr/ders_notları/Dahili_Tip/Klinik_Mikrobiyoloji/)

9. Scott, DA., Coulter, WA., Lamey, PJ.: Oral shedding of herpes simplex virus type 1: a review. *J Oral Pathol Med.*, 26(10): 441-447, 1997.
10. Gilbert, SC.: Oral shedding of herpes simplex virus type 1 in immunocompetent persons. *J Oral Pathol Med*, 35(9): 548-553, 2006.
11. Kaufman, HE., Azcuay, AM., Varnell, ED., Sloop, GD., Thompson, HW., Hill, Jm.: HSV-1 DNA in Tears and Saliva of Normal Adults. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 46(1): 241-247, 2005.
12. Oinaga, S.: Shedding of herpes simplex virus type 1 into tears and saliva in healthy japanese adults. *Kurume Med J.*, 47(4): 273-277, 2000.
13. Sakaoka, S., Saheki, Y., uzuki, K., Nakatika, T., Saito, H., Sekine, K., Fujinaga, K.: Two Outbreaks of Herpes Simplex Virus Type 1 Nosocomial İnfection among Newborns. *J Clin Microbiol.*, 24(1): 36-40, 1986.
14. Elmi, Ş.: HIV/ AIDS, HBV, HCV, Sifiliz ve genital herpes'in toplumda ve riskli davranış modeli gösteren seks işçilerinde karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul , 2007.
15. Ustaçelebi, Ş.: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 815-826, 1999.
16. Kimberlin, DW.: Neonatal Herpes Simplex İnfection. *Clinical Microbiology Reviews.*, 17(1): 1-13, 2004.
17. Jang, O. OH., Minasi, P.: Different Susceptibilities of Skin to Type 1 and Type 2 Herpes Simplex Viruses in Newborn Rabbits. *Infection and immunity*, 27(1): 168-174, 1980.
18. Roizman, B., Sears, A.E.: Herpes simplex viruses and their replication, In B. N. Fields, D., Knipe, M., Howley, P.M.: *Fields virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 72: 2399-2459, 2001.
19. Zhou, Z.H., Macnab, S.J., Jakana, J.: Identification of the sites of interaction between the

scaffold and outer shell in herpes simplex virus-1 capsids by difference electron imaging.

Proc. Natl. Acad. Sci. ,95: 2778–2783, USA ,1998.

20. Koray, M.: Herpes Virüsİnfeksiyonlarının Klinik, Laboratuar Teşhisi ve Tedavisi. Dr.İ.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı. http://www.istanbul.edu.tr/dishekimligi/Edergi/DHD_C38_2004/01-M_Koray.pdf

21. Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zingernagel, R.M.: Tıbbi Mikrobiyoloji, 9. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi, 425-432, 2002.

22. Shukla ,D., Spear, P.G.: Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. J Clin Invest ,108: 503-510, 2001.

23. Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J., Spear, P.G.: Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. Cell, 87: 427-436, 1996.

24. Brooks, G.F., Butel, J.S., Ornston, L.N., Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A.: Herpesviruses. In: Medical Microbiology. Jawetz. E., Melnick, J.L, Adelberg E.: 21:385,1998

25. Stevens, J.G., Cook, M.L.: Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. Science 173: 843-5, 1971.

26. Baringer, J.R., Pisani, P.: Herpes simplex virus genomes in human nervous system tissue analyzed by polymerase chain reaction. Ann Neurol, 36: 823–829, 1994.

27. Lautenschlager, S., Echmann, A.: The heterogenous clinical spectrum of genital herpes. Dermatology, 202: 211-9, 2001.

28. Mandel, Bennett & Dolin.: Principles and Practise of Infectious Disease, 6:1762-1778, 2005.

29. Pass, R.F., Whitley, R.J., Whelchel, J.D.: Identification of patients with increased risk of infection with herpes simplex virus after renal transplantation. J Infect Dis., 140:487, 1979.

- 30.** Richard, J., Whitley, M.D., David, W., Kimberlin, M.D.: Herpes Simplex: Encephalitis Children and Adolescents. *Semin Pediatr Infect Dis.*,16: 17-23, 2005.
- 31.** Dinn, J.J.: Transolfactory spread of virus in herpes simplex encephalitis. *Br Med J*, 281: 1392, 1980.
- 32.** Schlitt, M., Lakeman, F.D., Wilson, E.R.: A rabbit model of focal herpes simplex encephalitis. *J Infect Dis*, 153: 732-735, 1986.
- 33.** Stroop, W.G., Schaefer, D.C.: Production of encephalitis restricted to the temporal lobes by experimental reactivation of herpes simplex virus. *J Infect Dis*, 153: 721-731. 1986;
- 34.** De Stasio, P.R., Taylor, M.W.: Specific effect of interferon on the herpes simplex virus type 1 transactivation event. *J. Virol* , 64: 2588–2593 , 1990.
- 35.** Kadowaki, N. Antonenko, S., Lau, J.Y., Liu, Y.J.: Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.*,192: 219–226, 2000.
- 36.** Le Bon, A., Tough, D.F.: Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr. Opin. Immunol*, 14: 432–436, 2002.
- 37.** Medzhitov, R., Janeway, C.A.: Jr. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*; 64: 429–435, 1999.
- 38.** Polara, G., David, R., Katz, Benjamin, M.: Chain: The host immun response to herpes simplex virus infections. *Current Opinion in Infect Dis*, 17: 199-203, 2004.
- 39.** Koella, D.M., Corey, L.: Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. *Clin. Microbiol Rev.*, 16: 96-113, 2003.
- 40.** Milligan, G.N., Bernstein, D.I.: Analysis of herpes simplex virus-specific T cells in the murine female genital tract following infection with herpes simplex virus type 2. *Virology* , 212: 481–489, 1995.

41. Murphy, B.R.: Mucosal immunity to viruses. 695–707, Ogra, In P., Mestecky, J., Lamm, M., Strober, W., McGhee, J.R., Bienenstock, J. : Mucosal immunology. Academic Press, New York, 1998.
42. Hashido, M., Kawana, T.: Herpes simplex virus-specific IgM, IgA and IgG subclass antibody responses in primary and nonprimary genital herpes patients. *Microbiol. Immunol* ,41: 415–420, 1997.
43. Posavad, C.M., Koelle, D.M., Corey, L.: Tipping the scales of herpes simplex virus reactivation: The important responses are local. *Nat. Med*, 4: 381–382, 1998.
44. Khanna, K.M., Bonneau, R.H., Kinchington, P.R., Hendricks, R.L.: Herpes simplex virus specific memory CD8+ T cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. *Immunity*, 18: 593-603, 2003.
45. Yılmaz, Ş., Bayan, K., Altıntaş, A., Dursun, M., Canoruç, F.: İmmünkompetan Bir Erişkinde A kut Herpes Simplex Virüs Hepatiti. *Dicle Tıp Dergisi*, 33(1): 42-44, 2006.
46. Lafferty, W.: The challenging epidemiology of HSV-1 and HSV-2 and implications for serological testing. *Herpes*, 9: 51-5, 2002.
47. Sacks, S.L., Griffiths, P.D., Corey, L., Cohen, C., Cunningham, A., Dusheiko, G.M., Self, S., Spruance, S., Stanberry, L.R., Wald, A., Whitley, R.J.: HSV shedding, *Antiviral Research*, 63:19-26, 2004 .
48. Lund, J., Sato, A., Akira, S.: Toll-like reseptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*, 198: 513-520, 2003.
49. Whitley, R.J.: Herpes simplex viruses. In *Fields Virology*, 73 (4): 2461-2509, 2001.
50. Johnson, R.E., Nahmias, A.J., Magder, L.S.: A seroepidemiologic survey of the prevalence of herpes simplex virus type 2 infection in the United States. *N Engl Med*, 321: 7-12, 1989.

- 51.** Nahmias, A.J., Whitley, R.J., Visintine, A.N., Takei, Y., Alford, C.A.: Herpes simplex virus encephalitis: laboratory evaluations and their diagnostic significance. *J Infect Dis*, 145: 829–836, 1982.
- 52.** Skoldenberg, B., Forsgren, M.: Encephalitis in immunocompetent patients due to herpes simplex virus type 1 or 2 as determined by type-specific polymerase chain reaction and antibody assays of cerebrospinal fluid. *J Med Virol*, 39: 179–186, 1993.
- 53.** Michael, K.: Lindsay, MD, MPH.: HSV neutralizing antibodies further refinement in preventing neonatal Herpes infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*; 195: 4–6, 2006.
- 54.** DeBiasi, RL.; Tyler. KL.: Polymerase chain reaction in the diagnosis and management of central nervous system infections. *Arch Neurol*, 56:1215–1219, 1999.
- 55.** Greenberg, M.S.: Ulcerative, vesicular, and bullous lesions. Greenberg, M.S., Glick, M.: *Burket's oral medicine, diagnosis and treatment*. 10: 50-84, 2003.
- 56.** Cone, R.W., Huang, M.W., Ashley, R., Corey L.: Human Herpesvirus 6 DNA in Peripheral Blood Cells And Saliva From Immunocompetent Individuals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1262-1267, 1993.
- 57.** Read, S. J., Kurtz, J. B.: Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. *J. Clin. Microbiol*, 37: 1352–1355, 1999.
- 58.** Lakeman, F.D., Whitley, R.J.: Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. J Infect Dis.*, 171(4): 857-63, 1995.
- 59.** Knaup B., Schünemann S., Wolff M. H.: Subclinical reactivation of herpes simplex virus type 1 in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol*: 15: 281–283, 2000.

60. Wald, A., Koelle, D.M.: Herpes simplex virus: the importance of asymptomatic shedding. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45 (1): 1-8, 2000.

61. Zanghellini, F., Boppana, S.B., Emery, V.C., Griffiths, P.D., Pass, R.F.: Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. *J Infect Dis.*, 180 (3): 702-7, 1999.