



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**KLİNİK ÖRNEKLERDE ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE
HERPES SİMPEKS VİRÜS ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Gülhan YAĞMUR

KAYSERİ – 2008



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

KLİNİK ÖRNEKLERDE ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE
HERPES SİMPEKS VİRÜS ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Gülhan YAĞMUR

Danışman
Prof. Dr. Yusuf ÖZBAL

KAYSERİ - 2008

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----------|
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| KISALTMALAR..... | iv |
| TABLO VE ŞEKİL | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | viii |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1.TARİHÇE..... | 3 |
| 2.2.SINIFLANDIRMA | 4 |
| 2.3. GENEL ÖZELLİKLER | 5 |
| 2.4. REPLİKASYON | 6 |
| 2.5. PATOGENEZ VE İMMÜNİTE..... | 8 |
| 2.6. KLİNİK ÖZELLİKLERİ | 11 |
| 2.6.1. Primer HSV enfeksiyonları | 11 |
| 2.6.2. Tekrarlayan HSV enfeksiyonları..... | 14 |
| 2.7. LABORATUVAR TANI | 15 |
| 2.7.1. Örneklerin toplanması ve saklanması..... | 15 |
| 2.7.2. Direkt inceleme | 16 |
| 2.7.3. Virüs izolasyonu | 16 |
| 2.7.4. Moleküler biyolojik yöntemler..... | 17 |
| 2.7.5. Serolojik yöntemler | 18 |
| 2.8. EPİDEMİYOLOJİ..... | 18 |

| | |
|---|-----------|
| 2.9. KORUNMA | 20 |
| 2.10. TEDAVİ | 21 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 23 |
| 3.1. ÖRNEKLER..... | 23 |
| 3.2. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE DİREKT HSV ANTİJENİNİN ARAŞTIRILMASI | 23 |
| 3.3. HSV’NİN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İZOLASYONU | 24 |
| 3.4. HSV-DNA’NIN PCR İLE ARAŞTIRILMASI..... | 27 |
| 3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ | 31 |
| 4. BULGULAR | 32 |
| 4.1. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE DFA BULGULARI | 33 |
| 4.2. SÜRÜNTÜ VE BOS ÖRNEKLERİNDE HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARI | 34 |
| 4.3. SÜRÜNTÜ VE BOS ÖRNEKLERİNDE PCR BULGULARI | 36 |
| 4.4. DFA, PCR VE HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARININ KARŞILAŞTIRILMASI | 37 |
| 5. TARTIŞMA | 39 |
| 6. SONUÇLAR..... | 45 |
| 7. KAYNAKLAR..... | 46 |
| KABUL ONAY SAYFASI | 54 |

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam tez danışmanım Prof. Dr. Yusuf Özbal'a ve laboratuvar çalışmalarında beni yönlendiren ve yardım eden Doç. Dr. Selma Gökahmetoğlu'na ve emeği geçen diğer bütün öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim sırasında ve tez dönemimde yanımda olan eşime ve beni bu dönemde anlayışla karşılayan oğullarım Emirhan ve Bedirhan'a teşekkür ederim.

Tezimi çalışmamda her türlü desteği benden esirgemeyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve DEKAM çalışanlarına teşekkür ederim.

KISALTMALAR

| | |
|--------------------|--|
| Bp | : Base pair |
| BOS | : Beyin omurilik sıvısı |
| CD ₄ TH | : Yardımcı T lenfositleri |
| CD ₈ TC | : Sitotoksik T lenfositleri |
| CPE | : Sitopatik etki |
| CMV | : Sitomegalovirüs |
| DFA | : Direkt Immunofloresan Antikor |
| EBV | : Epstein-Barr Virüs |
| ELISA | : Enzyme Linke ImmunoSorbent Assay |
| ELVIS | : Enzim bağılı virüs indüksiyon sistemi |
| FITC | : Fluorescein isothiocyanate |
| G | : Glikoprotein |
| Hep-2 | : Larinks epitelyal karsinoma hücre kültürü |
| HHV-8 | : İnsan herpes virüs 8 |
| HIV | : Human Immunodeficiency Virus |
| HSV | : Herpes Simpleks Virüs |
| ICP | : Infected cell protein |
| IL-2 | : İnterlökin-2 |
| Kbp | : Kilobase pair |
| LAP | : Lenfadenopati |
| MRC-5 | : Medical Research Council 5 (İnsan embriyonu akciğer fibroblast hücre kültürü sistemi) |

| | |
|--------|---|
| MSS | : Merkezi sinir sistemi |
| nm | : Nanometre |
| NK | : Naturel killer |
| PBS | : Phosphate Buffered Saline |
| PCR | : Polymerase Chain Reaction |
| RNA | : Ribonükleik Asit |
| RT-PCR | : Revers transcription- PCR |
| rpm | : Rotation per minute |
| SSS | : Santral sinir sistemi |
| TBE | : Tris-Borate-Edta |
| UV | : Ultraviyole |
| Vero | : Afrika yeşil maymun böbrek hücre kültürü sistemi |
| VZV | : Varicella Zoster Virüs |
| VP | : Viral protein |
| WI-38 | : Wistar Institute-38 (İnsan embriyonu akciğer fibroblast hücre kültürü sistemi) |

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1: Alınan örneklerin klinik ve polikliniklere göre dağılımı | 33 |
| Tablo 2: Sürüntü örneklerinde DFA bulguları | 33 |
| Tablo 3: Hücre kültürü bulguları | 34 |
| Tablo 4: PCR bulguları | 36 |
| Tablo 5: Sürüntü örneklerinde DFA ve PCR bulgularının hücre kültürü bulgularıyla karşılaştırılması | 37 |
| Tablo 6: BOS örneklerinde PCR bulgularının hücre kültürü bulgularıyla karşılaştırılması | 38 |
| Şekil 1: Hep-2 hücrelerinde HSV'ye özgü CPE | 35 |
| Şekil 2: DFA yöntemi ile virüs antijeninin gösterilmesi | 35 |
| Şekil 3: Jel elektroforez sisteminde HSV-DNA pozitifliği | 36 |

KLİNİK ÖRNEKLERDE ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE HERPES SİMPEKS VİRÜS ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Herpes simpleks virüs enfeksiyonları tüm dünyada yaygın bir klinik problemdir. Özellikle immünsüprese hastalarda enfeksiyon şiddetli ve hızlı seyretmekte, önemli morbidite ve mortalite nedeni olmaktadır. Bu nedenle HSV enfeksiyonlarının hızlı ve güvenilir laboratuvar tanısı erken tedavi açısından önemlidir. Bu çalışmada klinik örneklerde DFA, PCR ve hücre kültürü yöntemleri ile HSV'nin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Mart 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastaneleri kliniklerinde takip edilen ve polikliniklerine başvuran herpes enfeksiyonu düşünülen 65 hastadan alınan çeşitli klinik örnekler çalışmaya dahil edildi. Sürüntü örneklerinden HSV antijeni DFA yöntemiyle araştırıldı. Bütün örneklerden HSV-DNA belirlenmesi için "in house" PCR uygulandı. Virüs izolasyonunda Hep-2 hücre kültürü kullanıldı.

Bulgular: Çalışmaya alınan 27 sürüntü örneğin 13'ünde (%48,1) DFA ile HSV antijeni pozitif bulundu. Hep-2 hücre kültürüne ekimi yapılan 27 sürüntü örneğin 14'ünde (%51,8), 38 BOS örneğin 3'ünde (%7,8) HSV'ye özgü sitopatik etki görüldü. Sitopatik etki izlenen hücre kültürleri DFA yöntemi ile doğrulandı. "In house" PCR yapılan 27 sürüntü örneğin 18'inde (%66,6), 38 BOS örneğin 18'inde (% 47,3) HSV -DNA pozitif bulundu.

Sonuç: Sürüntü örneklerinde DFA, PCR ve hücre kültürü yöntemleri birlikte uygulanmalıdır. BOS örneklerinde ise HSV-DNA daha hızlı ve daha duyarlı bir metod olan PCR ile araştırılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Herpes simpleks virüsleri, DFA, PCR, hücre kültürü.

DETECTION OF HERPES SIMPLEX VIRUS IN CLINICAL SAMPLES BY VARIOUS METHODS

ABSTRACT

Aim: Herpes simplex virus infections are a common clinical problem worldwide. Especially HSV disease in the immunocompromised patients can be severe and rapidly progressive that is a significant cause of morbidity and mortality. Therefore, rapid and reliable laboratory diagnosis of HSV infections is important for early antiviral therapy. In this study the aim was to investigate of HSV in clinical specimens by DFA, PCR and cell culture methods.

Materials and methods: Various clinical specimens of the 65 patients with suspicious HSV infections treated in Erciyes University Gevher Nesibe Hospitals clinics and applied polyclinics between March 2006 and June 2007 were included in this study. HSV antigen was investigated in swab specimens by DFA method. HSV-DNA was investigated 'in house' PCR in all clinical specimens. Hep-2 cell culture was used for isolation of HSV.

Results: HSV antigen was found positive in 13 (48,1%) of the 27 specimens by DFA. Cytopathic effect consistent with HSV was observed in 14 (51,8%) of the 27 swab specimens and 3 (7,8%) of the 38 cerebrospinal fluid specimens which were inoculated to Hep-2 cell culture. Cell culture which was observed CPE was confirmed by DFA method. HSV-DNA was found positive in 18 (66,6%) of the 27 swab specimens and 18 (47,3%) of the 38 cerebrospinal fluid specimens by 'in house' PCR.

Conclusion: DFA, PCR and cell culture methods would be applied to investigate the swab specimens. Detection of HSV-DNA in cerebrospinal fluid specimens is investigated with PCR which is rapid and more sensitive method .

Key words: Herpes simplex viruses, DFA, PCR, cell culture.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Deri ve mukozalarda sinsice gelişen ve yayılım gösteren yaraları tarif eden ‘Herpes’ kelimesi tarihin en eski dönemlerinden bu yana kullanılmaktadır. Bu hastalığın etyolojisinden *Herpesviridae* ailesinin bir üyesi olan HSV sorumlu tutulmaktadır (1,2). Herpes simpleks virüs (HSV) enfeksiyonları insanlarda en sık rastlanan viral hastalıklar arasında yer almaktadır. Oral, genital, göz, deri, santral sinir sistemi (SSS) ve iç organlarda lezyonlara neden olur. Bu lezyonlar virüsün primer enfeksiyonundan veya latent virüsün reaktivasyonundan kaynaklanır (3). HSV enfeksiyonları çoğu kez asemptomatik ve lokal belirtilerle seyrederek. Bu virüsler bazen ağır stomatit, keratokonjunktivit, meningoensefalit ve sistemik yenidoğan enfeksiyonları yapabilirler. Ayrıca immünsüprese kişilerde latent virüsün reaktive olmasıyla enfeksiyon alevlenmekte ve önemli ölçüde morbidite ve mortalite nedeni olmaktadır (4,5).

HSV enfeksiyonları günümüzde asiklovir başta olmak üzere çeşitli antiviral ilaçlarla tedavi edilebilmektedir. Bu virüsün vücutta latent kalma özelliğine bağlı olarak HSV eradikasyonu sağlanamamakta, ancak tekrarlayan enfeksiyonları daha az görülmektedir. Özellikle immünsüprese hastalarda bu virüsün tanı ve tedavisinde geç kalınması mortaliteyi artırmaktadır (3).

HSV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında hücre kültüründe virüs izolasyonu, virüs antijenlerinin direkt gösterilmesi, moleküler teknikler ve serolojik testler uygulanmaktadır (3). Klinik örneklerde virüs izolasyonu altın standart olarak kabul görmesine karşın, tedavinin yönlendirilmesinde erken tanı için duyarlılığı yüksek

olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve direkt floresan antikor (DFA) ile birlikte viral antijenlerin belirlenmesi gereklidir. Toplumda HSV enfeksiyonlarının yaygın olarak görülmesi nedeniyle serolojik testler tanıda yarar sağlamamakta, daha çok epidemiyolojik çalışmalarda uygulanmaktadır (6-8).

Bu çalışmada HSV enfeksiyon ön tanılı hastalardan alınan klinik örneklerden (BOS, vezikül sıvısı, konjunktival ve genital sürüntü örnekleri) hücre kültürü, PCR ve DFA yöntemleri uygulanarak HSV'nin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.TARİHÇE

HSV hastalıkları çok eskiden beri bilinmektedir. Yunan uygarlığının bilginleri deride görülen lezyonların yayılma özelliğine dayanarak sürünme, çok yavaş ilerleyen anlamına gelen ‘Herpes’ kelimesini kullanmışlardır (1, 2). Romalı bilgin Herodotus tarafından ateşle birlikte ağızdaki lezyonlar ve dudak vezikülleri arasındaki ilişki ‘herpes febralis’ olarak adlandırılmış ve herpes enfeksiyonlarının lezyonları ise 18. ve 19. yüzyıllar arasında tarif edilmiştir. On sekizinci yüzyılda genital herpes enfeksiyonu Fransa kralının doktoru Astruc tarafından gösterilmiştir. Vidal 1893 yılında insana inokülasyon deneyleri ile HSV’nin enfeksiyöz olduğunu ve insandan insana geçişin olabileceğini göstermiştir. Gruter ve Lowenstein 20. yüzyılın başlarında herpes keratitis ve labialis lezyonlarından alınan örnekleri tavşan korneasına inoküle ederek virüsü izole etmişlerdir (1).

Andrew’s ve Carmichael 1930’da HSV’ye karşı nötralizan antikörlerin varlığını daha önce enfekte olmuş erişkinlerin kanında göstermişler ve sadece böyle kişilerde tekrarlayan herpetik hastalığın meydana geldiğini bulmuşlardır. Lipschütz tarafından 60 yıl önce öne sürülen HSV tipleri arasındaki antijenik farklar 1968 yılında Nahmias ve Dowdle tarafından antijenik ve biyolojik olarak kesin gösterilip, iki farklı antijenik tipin varlığı bulunmuştur. Birkaç yıl sonra bu iki araştırmacı, virüsün izole edildiği anatomik bölgenin genellikle antijenik tipte uygunluk gösterebileceğini

gözlemişler ve HSV-1'in sıklıkla genital olmayan bölgelerde, HSV-2'nin genital enfeksiyonla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (1, 3).

2.2.SINIFLANDIRMA

Herpesviridae ailesinde 120'den fazla virüs türü yer almaktadır. Sıcak ve soğukkanlı omurgalı ve omurgasız hayvanlar virüsün konak alanları arasındadır. *Herpesviridae* ailesinin üyeleri lineer çift sarmallı DNA içeren, ikozahedral simetrik kapsidi olan zarflı virüslerdir. Yapısal, kimyasal, biyolojik ve antijenik özellikler yönünden benzer özelliklere sahiptirler. Bu ailede yer alan herpes virüsler konak alanı, replikasyon süresi, sitotoksik özellikleri ve latentliğin daha sık meydana geldiği hücre tipi gibi fenotipik özelliklerine dayanarak *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae* olmak üzere üç alt aileye ayrılmışlardır (9,10).

1. *Alphaherpesvirinae*

- Simplexvirus* generusu: - *Herpes simplex virus* tip 1 (HSV tip 1)
- *Herpes simplex virus* tip 2 (HSV tip 2)
- *Maymun B virus*

- Varicellovirus* generusu: - *Varicella-zoster virus* (VZV)

2. *Betaherpesvirinae*

- Cytomegalovirus* generusu: - *Cytomegalovirus* (CMV)

3. *Gammaherpesvirinae*

- Lymphocryptovirus* generusu: - *Epstein-Barr virus* (EBV)
- *Beta lymphotropic virus*

Alfaherpesvirüsler çeşitli konaklarda bulunabilirler. Replikasyon süreleri diğer gruplara göre nispeten kısadır. Kültürlerde enfekte ettikleri hücrelerin bozulmasıyla hızla yayılırlar. Primer olarak ganglionlarda latent enfeksiyon oluşturabilirler. Bu grupta HSV-1, HSV-2, VZV ve herpes B virüs bulunmaktadır (3, 9,10).

Betaherpesvirüslerin konak alanları dardır. Replikasyon süreleri uzun olduğu için hücre kültürlerinde üremeleri yavaştır. Hücre kültürleri yönünden seçici olup insan

orjinli fibroblastlarda ürerler. Enfekte ettikleri hücreleri büyütme özellikleri vardır. Salgı bezleri, lenforetiküler hücreler, böbrek ve diğer dokularda latent kalabilirler. Bu grupta CMV ve insan herpes virüs 6a, 6b ve 7 bulunmaktadır (3, 9,10).

Gammaherpesvirüslerin konak alanı çoğunlukla doğal olarak enfekte ettiği konağın aile ve takımı ile sınırlıdır. Gammaherpesvirüsler *in vitro* olarak lenfoblastoid hücrelerde replike olurlar. Bazıları aynı zamanda bazı tip epitelooid ve fibroblastoid hücrelerde litik enfeksiyonlara neden olurlar. Bu grupta B ve T lenfositleri tutan Epstein-Barr virüs ile insan herpes virüs 8 (HHV-8) yer almaktadır (3, 9,10).

2.3. GENEL ÖZELLİKLER

HSV tip 1 ve tip 2 herpesvirüs ailesinin alfa herpesvirüs alt ailesinde yer alır. HSV tip 1'in 152 kilobase pair (kbp) ve HSV tip 2'nin 155 kbp'lik lineer çift sarmallı genomları vardır. HSV tip 1 ve HSV tip 2'nin protein kodlayan bölgelerinde %83 oranında nükleotid benzerliği vardır (3). Tam virüs partikülü yaklaşık 180-250 nanometre (nm) çapındadır. Viral DNA 85-110 nm çapında bir kapsidle çevrilidir. Viral partikülü dıştan saran lipid yapısında bir zarf bulunur. Zarfın yüzeyinde glikoprotein yapısında çıkıntılar yer alır. Zarf ile kapsid arasında tegument adı verilen fibröz proteinler içeren bir yapı bulunmaktadır. İkozahedral kapsidi 162 kapsomerden oluşan 20 eşkenar üçgen yüzey ve 12 köşesi olan oldukça sert bir yapıdır. Eşkenar üçgenler 5:3:2 düzenindedir. Her köşede yer alan kapsomer beş ayrı kapsomerle (penton), kenarlarda yer alan kapsomerler ise altı ayrı kapsomerle çevrilir (hekzon). Buna göre virüsün 12 pentonu ve 150 hekzonu vardır. (1, 3, 9).

HSV genomu; 11 adet glikoprotein (gB-gM), 6 tip kapsid proteini ve replikasyondan sorumlu enzimler dahil en az 84 farklı polipeptidi kodlar (2). Bunların 25-30 tanesi virionun yapısını oluşturan proteinlerdir. Diğerleri DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunun regülasyonu için gerek duyulan yapısal olmayan proteinlerdir. Bunlar sadece enfekte hücrelerde tespit edilebildiklerinden ICP (infected cell protein) olarak adlandırılırlar (11). ICP0, ICP4 ve ICP22 selüler kinaz ve viral protein kinaz tarafından fosforilize edilir. ICP47 enfeksiyonun erken döneminde RNA bağlantısını bloke eder, geç dönemde ise nükleustan stoplazmaya viral mRNA'yı sentezler (2).

HSV virionu kapsid tegument ve zarf katmanlarını oluşturan 30'a yakın yapısal protein içerir. Bunlardan VP21 ve VP22a ikozahedral kapsidi oluşturan diğer

proteinlere iskelet vazifesi gören iki önemli proteindir. Diğer bir tegüment proteini olan VP16 alfa genlerinin ekspresyonunu artırır (2, 11).

Diğer viral proteinler arasında DNA'yı bağlayan proteinler ve DNA'ya bağımlı DNA polimeraz, deoksiribonükleaz, timidin kinaz, ribonükleotid redüktaz ve protein kinaz gibi enzimler bulunur. Ribonükleotid redüktaz, ribonükleotidleri deoksiribonükleotidlere çevirir. Timidin kinaz viral genomun replikasyonu için gereken deoksiribonükleotidleri fosforilize eder (2).

Virion zarf glikoproteinleri 11 adettir ve latin büyük harflerle ifade edilirler. (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL ve gM). Glikoprotein C, E, G, I, J, M virüsün hücreye penetrasyonu ve enfekte hücrelerden salınımında rol oynamaktadır. Glikoproteinlerden gB, gD, gH virüsün hücreye bağlanması ve girişi için önemlidir. Glikoprotein D enfeksiyon için temel yapı olup, HSV tip 1 ve HSV tip 2 arasında antijenite yönünden çok az fark vardır. Glikoprotein B ve D HSV'ye karşı oluşan nötralizan antikorların bağlandığı majör epitoplara taşırlar ve virüsün hedef hücreye tutunmasını sağlarlar. Glikoprotein C enfekte hücrelerin yüzeyindeki kompleman sisteminin C3b komponentine, glikoprotein E ise IgG'nin Fc parçasına bağlanır. Glikoprotein G antijenik özgülüğü belirlediği için HSV tip 1 ve HSV tip 2 arasında antijenik yanıtta ayrımı sağlar. Glikoprotein I da glikoprotein E gibi IgG'nin Fc parçasına bağlanır. Glikoprotein J, K, L ve M'nin görevleri henüz tam anlaşılamamıştır (1, 2).

HSV ısıya duyarlıdır. Virüsün yarılanma ömrü 37⁰C 'de 1.5-3 saattir. Virüs enfektivitesini -70⁰C'de uzun süre korur. Diğer zarflı virüsler gibi eter, kloroform ve alkolde kolayca inaktive olur. Tripsin, proteaz, aminopeptidaz gibi proteolitik enzimlerin çoğuna duyarlıdır. Virüs pH 4'ün altında, pH 10.5'in üstünde, 56⁰C ve üstündeki sıcaklıklarda inaktive olur. Ultraviyole ışınlarına maruz kaldığında yarılanma ömrü 5-7 saniye kadardır. Formaldehitin %1'lik solüsyonu virüsü tahrip eder (1). HSV deride 2 saat, kumaş üzerinde 3 saat, plastik yüzeyde 4 saat canlılığını koruyabilmektedir (12).

2.4. REPLİKASYON

HSV birçok insan hücre tipini, hatta bazı hayvan hücrelerini de enfekte eder. HSV genellikle fibroblast ve epitelyal hücrelerin litik enfeksiyonuna sebep olurken

nöronlarda latent enfeksiyon oluşturur. HSV'nin penetrasyonu viral zarf ile hücre yüzey membranının arasında oluşan füzyon ile gerçekleşir. Virüs hücreye endositoz yoluyla da girmektedir (9,13).

Nükleokapsid hücre içine girdikten sonra kapsid soyulur ve DNA stoplazmada serbest kalır. Viral DNA nükleusa geçer, transkripsiyon ve replikasyon nükleusta gerçekleşir. Tegüment içinde taşınan viral proteinler arasında enfeksiyonu başlatıcı transkripsiyonel regülatör protein ve protein kinaz bulunur. Genomun transkripsiyonu çok erken (alfa: α), erken (beta: β) ve geç (delta: δ) olmak üzere üç fazdan oluşur. Her faz bir sonraki faz için gereklidir. Transkripsiyonun bu üç fazı alfa, beta, gamma proteinlerin üretimini sağlayan mRNA'ların sentezi ile sonuçlanır (9,13).

Viral proteinlerin sentezi stoplazmada gerçekleşir. Çok erken gen ürünleri DNA sentezini stimüle eden ve erken viral genlerin transkripsiyonunu uyaran DNA bağlayan proteinlerdir. Latent enfeksiyon sırasında virüsün replikasyonu çok erken fazdan sonra ilerlemez. Erken proteinlerin çoğu enzimlerdir. DNA'ya bağımlı DNA polimeraz, deoksiribonükleaz, timidin kinaz ve ribonükleotid redüktaz erken proteinlerdir. Bu enzimler replikasyon için substratları sağlar. Erken proteinler aynı zamanda hücresel mRNA ve DNA sentezini inhibe eder. Erken transkripsiyon fazı süresinde yapılan polimeraz, genomun replikasyonunu sağlar, sonra geç genler transkribe edilir ve viral partiküllerin yapı komponentlerini oluşturan gamma polipeptidler sentez edilir. İlk sentez edilen glikoproteinler gB ve gD olup sınırsız oluşumu için gereklidir ve virüsün hücre içinde yayılımını uyarır. Diğer geç genler, gC ve gE gibi kapsid proteinleri ile virüse ait başka proteinler ve enzimleri kodlar. Kapsid proteinleri nükleusa göç eder (kondensasyon) ve DNA moleküllerini çevreler. Daha sonra kapsid proteinleri nükleus membranının viral glikoproteinleri ile birleşir. Bu virüs partikülleri endoplazmik retikulum aracılığıyla golgi kompleksine geçer ve hücreden ekzositoz yoluyla tomurcuklanarak ayrılır. Ayrıca HSV'nin sınırsız suşları enfekte hücrelerin füzyonuna sebep olup hücreden hücreye yayılır. Virüs hücrede uzun süre latent olarak kalabilir veya litik faza geçebilir. Viral replikasyonun tam siklusu enfeksiyonu takiben yaklaşık 15 saat sürer ve üretilen her 100- 1000 virüs partikülünden sadece biri enfeksiyözdür (9,13).

2.5. PATOGENEZ VE İMMÜNİTE

HSV'nin doğal konağı insandır ve primer enfeksiyonu genellikle asemptomatiktir. Önemli özelliği, insanda latent duruma geçme eğilimi ve düzensiz aralıklarla aktivitesinin tekrarlanmasıdır. HSV deri ve mukoza membranından vücuda girer ve genellikle lokalize enfeksiyona sebep olur. İnkübasyon süresi 2-12 gündür. Virüs organizmaya girdiği yerdeki epitel hücrelerinde çoğalır, hücreler parçalanır ve lokal inflamatuvar yanıt oluşur. Bu odaklardan bölgesel lenf düğümlerine yayılarak çoğalır. Viremi; bebekler ve beslenme bozukluğu olanlar ile immun sistemi baskılanmış kişiler dışında nadiren görülür (1).

Normal bir konakta gelişen primer HSV enfeksiyonları özgül olmayan bağışık mekanizmalarla sınırlanır. Bu erken savunmada granülositler, mononükleer fagositler, NK hücreleri, interferon ve interlökin-2 (IL-2) rol oynar. Bu engelleri aşabilen virüs ikinci olarak duyuşal sinir gangliyonlarında engellenir. Ayrıca B, yardımcı T lenfositleri (CD₄TH) ve sitotoksik T lenfositleri (CD₈Tc) de santral sinir sisteminde viral replikasyonu sınırlar. HSV enfeksiyonu esnasında oluşan antikorlar, korunmada bir derece önemlidir. Ancak yüksek antikor titrelerinin varlığında bile atakların yinelenmesi, bunların enfeksiyonun kontrolünde pek rolü olmadığını göstermektedir (14).

HSV'nin yayılımı hücreden hücreye yayılım şeklinde olmaktadır. Antikora bağılı hücrel sitotoksisite, HSV ile enfekte hücrelerin yok edilmesinde çok etkili bir mekanizmadır. Bu mekanizma yeni doğanlarda tam olarak gelişmemiş olduğundan HSV enfeksiyonları bunlarda daha ağır seyreder (14).

Akut herpes enfeksiyonunun karakteristik patolojik değişiklikleri; çok nükleuslu dev hücrelerin oluşması, epitel hücrelerinin balonlu dejenerasyonu, ödem, fokal nekroz ve eozinofilik Cowdry A tipi cisimciklerinin oluşmasıdır. Enfeksiyonda öncelikle polimorfonükleer lökositlerin, daha sonra da mononükleer hücrelerin infiltrasyonu görölmektedir. Epitel hücrelerinin parçalanması ve vezikül oluşumu ile sonuçlanır. Lezyon daha sonra püstüler hale gelir ve kabuk oluşur. Kabuklu lezyonlardan virüs çok az izole edilir veya hiç izole edilemez. Virüs lezyon tabanındaki hücrelerden veya vezikül sıvısından izole edilebilir. Lezyon genellikle skar bırakmadan iyileşir.

Müköz membranda veziküller nadiren gözlenir. Burada epitelyum çok ince olduğundan lezyonlar çabucak ülsere olur (1).

Primer enfeksiyon sırasında bu bölgedeki sinir uçlarına geçen virüs retrograd aksonal akım ile arka kök ganglionlarına ulaşır. En sık olarak trigeminal ve sakral ganglionlarda olmak üzere, daha birçok duyuşal ve otonom ganglionlarda latent hale geçer. HSV-1 daha çok trigeminal gangliyonun maksiller ve mandibuler bölümlerinde latent olarak yerleşir. HSV-2 ise daha çok genital mukozada enfeksiyona neden olup sakral gangliyonda latent kalır (1,15).

Primer enfeksiyon esnasında ilk 4 gün içinde lenf bezlerinde bol miktarda antiviral aktiviteye sahip CD₈Tc görülür. Virüsle enfekte hücreleri ortadan kaldıran bu hücrelere yanıt ilk 6-9 gün içerisinde en yüksek düzeydedir. Henüz bu aşamada nötralizan antikorlar gelişmediğinden bu yanıt enfeksiyonu kontrol altına almada önemlidir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda HSV, enfekte hücrelerde MHC tip I antijen ekspresyonunu bozarak spesifik CD₈Tc hücre sitotoksitesinden korunabilmektedir (11,15).

Antikor yanıtının primer HSV enfeksiyonundaki koruyucu rolü çok azdır. Nötralizan antikorlar virüs atılımı ve rekürrent enfeksiyonu önleyemez, ancak reenfeksiyonu önlemede kısmen etkilidir. Antikor yanıtı klasik olarak önce IgM antikor sentezi ile başlar, daha sonra 5-15 gün içerisinde IgA ve IgG ile devam eder. Bu antikorlar sırasıyla gD, gB, ICP4, gE, gG ve gC gibi proteinlere karşı oluşur. IgM antikorları 6-8 hafta sürer. Antikor pozitif bireylerin aynı veya farklı tiplerde tekrar veya rekürrent enfeksiyonu antikor titresinde çok önemli bir değişiklik yapmaz. Ancak bu enfeksiyonların çok ağır geçtiği hallerde IgM yanıtı ve konvelasan dönemde IgG titresinde bir artış görülebilir (1,11).

HSV reaktivasyonu yaş, hücre tipi ve hücre farklılaşma safhası ile ilgilidir. HSV reaktivasyon enfeksiyonlarının sayısı ve şiddeti yaş ilerledikçe azalır. Genç, farklılaşmamış epidermal hücreler HSV enfeksiyonuna daha duyarlıdır. UV ışınlanması geçici olarak epidermiste bu özellikteki hücre sayısını artırmaktadır (11).

Tekrarlayan HSV enfeksiyonları hemen daima homolog virüse karşı nötralizan antikorları olan kişilerde meydana gelir. Bu tip enfeksiyonların genellikle latent virüsün reaktivasyonu sonucu olduğu düşünülür. HSV çeşitli stimuluslar (stres, lokal

travma, ateş, güneş ışığı, hormonlar ve menstruasyon) ile aktive olur ve duyu gangliyonlarından sinir aksonları boyunca ilerleyerek ilgili dermatomda lezyonlar oluşturur. Rekürren HSV enfeksiyonları primer enfeksiyonlara göre daha hafif seyreder. Rekürren enfeksiyonlardan endojen latent virüsün reaktivasyonu sorumlu olmasına rağmen, HSV tipinin farklı suşları ile de eksojen enfeksiyonlar oluştuğu gösterilmiştir (1,15).

Latent enfeksiyon nöronlarda oluşur. Bu hücrelerde sadece çok erken bazı proteinler sentez edilir. Genomun aktivasyonu ile az sayıda virüs üretimi olur, fakat hücreyi öldürmez. Latent HSV enfeksiyonun oluşması, devamı ve reaktivasyonu ile ilişkili mekanizmalar iyi anlaşılmamıştır. Latent olarak infekte hücrelerde virüs partikülleri tespit edilemez (1,15). HSV'nin nöronlarda latent olarak kalma nedenleri iki mekanizmaya bağlanmaktadır:

1-Nöronlarda istirahat fazında olan virüse ait çok az viral protein üretilmekte ve immün hücrelere sunulmak üzere MHC-I üzerinde çok az viral peptid yer almakta, virus CD₈Tc lenfositlerin etkisinden korunmaktadır.

2-Nöronlarda MHC-I'in çok az oranda bulunması, CD₈Tc lenfositlerin enfekte nöronları tanımasını zorlaştırmaktadır. Böylece rejenere olamayan nöronların CD₈Tc lenfositleri tarafından yok edilme riski de önlenmiş olmaktadır (1,15).

İmmünite esas olarak tipe özgüdür, ancak bazı durumlarda çapraz koruma olabilir. Bununla birlikte immünite tam değildir; özgül IgG varlığında bile hem reenfeksiyon hem de reaktivasyon görülmektedir. HSV enfeksiyonlarının sınırlanmasında hücrel immünite önemlidir, çünkü baskılanması sıklıkla reaktivasyon, yayılım ve şiddetli enfeksiyonla sonuçlanmaktadır (12).

Herpes simpleks virüsleri ile bazı kötü huylu insan tümörleri arasında ilişki bulunmaktadır. Örneğin, HSV-2'nin serviks kanserlerinde önemli rolü olduğundan kuşku lanılmaktadır. Seroepidemiyolojik araştırmalarda servikal displazi ve karsinoma in situsu olan kadınlarda HSV-2'ye karşı yüksek oranda antikolar saptanmıştır. Genital HSV-2 öyküsü olan kadınların servikal kansere yakalanma risklerinin yüksek olduğu bilinmektedir. Ayrıca HSV-2'nin vulvar skuamöz hücreli karsinoma in situ ile de ilişkisi gösterilmiştir (16).

2.6. KLİNİK ÖZELLİKLERİ

HSV semptomatik ve asemptomatik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Etkilenen bölgeler daha çok deri, dudak, ağız boşluğu, göz, genital mukozalar ve santral sinir sistemidir. Yeni doğanlarda ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde HSV enfeksiyonları sistemik enfeksiyonlar şeklindedir (3,12). HSV-1 ve HSV-2'ye bağlı enfeksiyonlar primer ve tekrarlayan enfeksiyonlar şeklindedir. HSV enfeksiyonlarının kuluçka süresi 2-12 gündür (ortalama 6 gün) (1,2).

2.6.1. Primer HSV enfeksiyonları

Virüsle ilk kez karşılaşan bireylerde görülen enfeksiyonlardır. Olguların büyük bölümü asemptomatiktir. Hastalık sonrası özgül antikorlar oluştuğu gibi virüs duyuşal ganglionlarda latent olarak da kalabilmektedir (16)

a) Gingivostomatit (Aftlı stomatit)

Çocuklarda primer enfeksiyonun en yaygın belirtisi gingivostomatit ve farenjit olup daima HSV tip 1 ile oluşur. Daha çok 1-5 yaş arası çocuklarda görülür. Hastalık ateş ve ağızda ağrı ile başlar. Farinkste eritem ve ödem vardır. Daha sonra farinks, yanak mukozası, damak, gingiva ve dilde veziküller oluşur. Bu lezyonlar birleşir ve yerini yüzeysel ülserlere bırakır. Servikal ve submandibuler lenfadenopati (LAP) eşlik edebilir. Erişkinlerde tabloya farenjit ne tonsillit belirtileri egemendir. Hastalık yaklaşık 2-3 hafta içinde sekel bırakmadan iyileşir. İlk enfeksiyondan sonra HSV trigeminal ganglionlarda latent halde kalır (1,16).

b) Herpes labialis

HSV tip 1 enfeksiyonlarının en çok görülenidir. Lezyonlar dudak, deri ve mukozanın birleştiği yerde dudak kenarında görülür. Rekürren enfeksiyonlar yaygındır ve her defasında aynı yerde ortaya çıkar. Lezyonlar ortaya çıkmadan önce, lezyon yerinde ağrı, yanma, kaşıntı ve sızlama vardır. Eritem 24 saat içinde veziküle dönüşür. Vezikül 48 saat içinde ülser olur ve krutlanır. Sekonder bakteriyel enfeksiyonun gelişmediği bağışıklık sistemi normal bireylerde veziküllerin patlaması, kabuk şekillenmesi ve iyileşme 8-10 gün içinde olur (1,9,16)

c) Egzema herpetikum

Egzemalı hastalar HSV enfeksiyonlarına duyarlıdır. Egzemalı bir hastada ani ateş ve egzematöz bölgede çok sayıda veziküller oluşur. Bu veziküller çabucak püstül şekline dönüşür ve sonra kabuklanır. Nadiren adrenal bez, karaciğer ve diğer organlara yayılım olabilir. Lezyonlar 3 haftada iyileşir, ancak bakteriyel süper enfeksiyonlar oluşabilir (1,11).

d) Herpetik dolama

Herpetik dolama, genellikle parmak epitel bütünlüğünün bozulduğu durumlarda diş hekimleri ve hastane çalışanlarında veya primer labial/genital herpesin bir komplikasyonu olarak görülür. Enfekte parmakta ağrı, kaşıntı, ödem ve vezikül ortaya çıkar. Veziküller deri altında derin olarak meydana gelir. Sıklıkla ateş ve LAP eşlik eder. HSV tip 1 ve tip 2 sorumlu olabilir. Lezyonlar 2-3 haftada tedavi gerektirmeden iyileşir (1,11,16)

e) Herpetik keratokonjunktivit

HSV ile oluşan göz enfeksiyonları primer olarak veya vücudun başka bir yerinde bulunan bir lezyondan yayılım sonucu gelişirler. Yenidoğanlar hariç genellikle etken HSV tip 1'dir (16). Gelişmiş ülkelerde korneal hasar ve körlüğün en yaygın sebebidir. Herpetik keratokonjunktivit tipik olarak tek taraflıdır. Primer göz enfeksiyonları genellikle asemptomatiktir. Semptomatik vakalarda blefarit ve folliküler konjunktivit tek taraflı olarak görülür. Bölgesel LAP oluşabilir. Bazı hastalarda keratitden dentritik ülsere kadar değişebilen lezyonlar görülür. Olguların çoğu 3 hafta içinde iyileşir. Rekürren enfeksiyonlar korneada opasitelere sebep olarak görme bozukluğuna yol açar (1,3). Herpes keratitinde şiddetli korneal incelmeye ve perforasyon görülebilmektedir (17).

f) Herpes ensefaliti ve menenjit

Herpes ensefalitinde yenidoğan hariç etken HSV tip 1'dir. HSV ensefaliti fatal sporadik ensefalitin en sık sebebidir. ABD'de her yıl yaklaşık 1250 ensefalit olgusu görülmektedir (18). Hastalığın mortalitesi yüksektir (%70) (15). Ensefalit primer herpes enfeksiyonu veya rekürren mukokütanöz HSV enfeksiyonu olan hastalarda oluşabilir. Ateş, baş ağrısı, ense sertliği, davranış değişiklikleri ve fokal nörolojik

bulgular görülebilir. Temporal lob tutulması karakteristiktir. Virüsün temporal loba olfaktor sinirle ulaştığı düşünülür. Beyinde gelişen ağır hasar antiviral tedavi ile önlenemez. Hasta iyileşse bile önemli mental ve nörolojik bozukluklar gibi kalıcı sekeller bırakır. Ancak sekellerin oluşmaması için beyin dokusundaki değişiklikler başlamadan önce tedaviye başlanması önerilmektedir. Tedavi edilmeyenler 3 hafta içinde ölür (11,16).

HSV daha çok aseptik menenjitte neden olmaktadır. Herpes menenjiti HSV tip 1'den çok HSV tip 2 ile ilişkilidir. Genital herpesin bir komplikasyonu olarak daha çok kadınlarda ortaya çıkan menenjit, meninkslere sinir yoluyla ulaşan virüs tarafından oluşturulur. Ensefalite göre daha hafif seyirlidir. Bağışık sistemi yeterli olanlarda kendiliğinden ve sekel bırakmadan iyileşir (15, 16).

g) Genital herpes

Genital herpes genellikle HSV tip 2 ile oluşmaktadır (%70-90). Primer genital herpes daha çok adolesan ve genç erişkinlerde görülür. Çoğu asemptomatik seyredir. Lezyonlar kadında vagina, serviks ve perinede, erkekte peniste görülür. Lezyonlar papül olarak başlar, veziküle ve 3-5 gün içinde ağrılı ülser dönüşür. Daha sonra kabuk oluşur ve skar bırakmadan iyileşir. İnguinal LAP eşlik edebilir. Hastalık 20-30 gün sürer. %10'nunda menenjit tablosu gelişebilir. Primer genital HSV enfeksiyonu olan hastaların yaklaşık %80'inde bir yıl içinde rekürrens görülür. Tekrarlayan genital enfeksiyonların çoğu sakral 3 ve sakral 4 dorsal ganglionlardaki virüsün reaktivasyonu ile oluşur. Rekürren enfeksiyonlar daha kısa sürelidir ve hafif seyredir. Sistemik semptomlar ortaya çıkmaz. Lezyonlar ortaya çıkmadan önce perianal veya genital bölgede parestezi oluşur. Daha sonra veziküller ortaya çıkar. Ağrı ve kaşıntı tabloya eşlik eder. Lezyonlar 10-14 gün içinde iyileşir (11,15,16).

h) Neonatal herpes

Genital herpes enfeksiyonu olan anneler neonatal herpes enfeksiyonlarının primer kaynağıdır. Virüs genellikle genital herpesli annenin doğum kanalından geçerken, perinatal veya daha az sıklıkla intrauterin alınır (11). Neonatal HSV enfeksiyonlarının %70-90'ı HSV tip 2'ye bağlıdır. Neonatal herpesli bebeklerde üç tip enfeksiyon tablosu saptanır: i)Deri, göz ve ağızda lokalize lezyonlar, ii) MSS enfeksiyonları, iii) Dissemine enfeksiyonlar. Deri, göz ve ağızı tutan enfeksiyonlar

kısmen daha iyi seyirlidir (1,16). Ancak tedavi edilmediği takdirde MSS ve dissemine hastalık şeklindeki enfeksiyonların mortalite oranı oldukça yüksektir. Yenidoğanda neonatal herpes enfeksiyonlarının mortalitesi % 70'in üzerindedir (19,20).

Neonatal herpes enfeksiyonlarının %30'una postpartum dönemde HSV tip 1 sebep olur. Kaynak genellikle aile üyeleri ve hastane personelidir. Doğum sırasında HSV'e maruz kalan bebeklerin hepsinde neonatal enfeksiyon gelişmez. İntrauterin geçiş riski annenin enfeksiyonunun tipi ve HSV'e karşı annedeki nötralizan antikorların varlığına bağlıdır. Gebelik sırasında primer enfeksiyonu olan annelerden vajinal yolla doğan bebeklerde HSV enfeksiyonuna yakalanma riski yüksek olduğundan, bu annelerin obstetrik takibi önemlidir. Sezeryan sadece doğum öncesinde klinik olarak bariz lezyonları olan olgularda düşünülür. Ancak, daha önce tekrarlayan genital herpes öyküsü olan hastalarda doğum öncesi servikal sürüntü örneklerinin HSV kültürü önerilmelidir (1,11).

1) Diğer HSV enfeksiyonları

Yanık veya yaygın malign hastalıkları olan olgularda herpetik trakeobronşit ve HSV pnömonisi görülebilir. Yenidoğanların dissemine enfeksiyonları dışında özofajit görülebilir. Konakçıya özgü bağışık yanıt olarak düşünülen Erythema multiforme ile HSV arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. HSV enfeksiyonlarının yetişkinler için görülen en önemli komplikasyonu kişilerde yarattığı psikososyal travmalardır (11).

2.6.2. Tekrarlayan HSV enfeksiyonları

Tekrarlayan HSV enfeksiyonlarından en sık görüleni herpes labialistir. Özellikle deri ve mukozaların birleştiği ağız ve burun etrafında vezikülle karakterizedir ve aynı yerde tekrar tekrar çıkar. Latent HSV-1 enfeksiyonunun vücuttaki kaynağı genellikle trigeminal gangliyondur. Enfeksiyonu ateşli hastalıklar, heyecan, korku, menstruasyon tetikler. Enfeksiyon hastalıklarından epidemik menenjit, pnömokoksik pnömoni, malarya ve çeşitli virüslerin neden olduğu enfeksiyonlarda sıklıkla herpes ile birliktelik bulunur. Buna karşın tifoda herpes çıktığı hiç görülmez (1,14,16).

Yineleyen herpetik enfeksiyonlar burun deliklerinin içinde, kulak kepçesinde ve kaşlar üzerinde de olabilir. Tekrarlayan göz enfeksiyonu olan olguların bir çoğunun anamnezinde bir göz enfeksiyonu veya travma öyküsü vardır (16).

İmmünsüprese olan hastalarda herpetik enfeksiyonlar, latent virüsün reaktive olmasıyla ağır klinik tablolara yol açabilir. Hastalarda su çiçeğini taklit eden yaygın deri döküntüleri oluşabilir. Bazı durumlarda ağız salgısında HSV-1'in aspire edilmesiyle solunum yollarında enfeksiyon görülebilir. HSV'ye bağlı özefajitler en çok bu grup hastalarda ortaya çıkar. Yenidoğan bebeklerde, immunsupresif ve beslenme yetersizliği olan hastalarda da dissemine HSV enfeksiyonları oluşabilir (1,14,16).

2.7. LABORATUVAR TANI

2.7.1. Örneklerin toplanması ve saklanması

HSV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında vezikül sıvısı, lezyon tabanından kazıntıyla alınan hücreler, boğaz çalkantı suyu ve sürüntüsü, vajinal sekresyon, BOS, idrar, konjonktival sürüntü, kan ve biyopsi örnekleri kullanılır (1,3). Vezikül sıvısı, deri lezyonları ve mukozalardan örnekler eküvyon çubuklar ile alınır. Heparinli kan, kalsiyum alginatlı çubuklarla alınan örnekler virüsün izolasyonunu azaltacağı için tercih edilmemektedir (6,21).

Mukokutanöz lezyonlardan kültür ekimi için alınan örnekler transport besiyeri içine koyularak laboratuvara gönderilmektedir (22). Besiyeri içine bovine serum albumin ve bakteriyel üremeyi engelleyen antibiyotikler eklenir (3). Örnekler 48 saat içinde ekimi yapılacaksa $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, uzun süre saklanacaksa -70°C 'de muhafaza edilir. Örneklerin hücre kültürüne ekiminin hemen yapılması ideal olanıdır. Dondurma ve çözme işlemleri enfeksiyöz virüs partiküllerinin harabiyetine neden olduğundan virüsün izolasyon şansını azaltır (3,6). PCR için örnekler 72 saat içinde çalışılacaksa $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, uzun süre saklanacaksa -20°C 'de saklanmalıdır (23).

HSV enfeksiyonlarının tanısında; direkt inceleme, doku kültüründe virüs izolasyonu, moleküler biyolojik yöntemler (PCR gibi) ve serolojik yöntemler uygulanmaktadır.

2.7.2. Direkt inceleme

Işık mikroskopu: Klinik örneklerde HSV'nin direkt aranmasında mukokütanöz lezyonların taban kazıntısından alınan örnekler Giemsa ve Wright boyama ile boyanarak incelenir. Tzanck testi denilen bu yöntemle çok çekirdekli dev hücrelerin görülmesi viral enfeksiyon için patognomonik olarak kabul edilir. Papanicolau boyası gibi sitolojik yöntemlerle de hücre içi inklüzyonların görülmesi olasıdır. Ancak bu sellüler değişiklikler sadece HSV için spesifik değildir. Varisella zoster virüs gibi diğer virüs enfeksiyonlarında da görülebilir (3,6).

Elektron mikroskopu: Örneklerin elektron mikroskopunda incelenmesi çabuk sonuç verir. Ancak HSV'i diğer herpes virüslerinden ayırt etmek mümkün değildir (6).

Virüs antijenlerinin direkt gösterilmesi: Viral proteinlerin klinik örneklerde direkt aranması en hızlı tanı yöntemidir. Direkt incelemede kullanılan en yaygın yöntem mukokütanöz lezyonlarda HSV antijeninin immunfloresan yöntem ile boyanarak gösterilmesidir. Örnekler lezyon tabanından eküvyonla alınır, lama sürülür ve kurutulur. Asetonla tespit edildikten sonra HSV antijenlerine özgül 'fluorescein isothiocyanate (FITC)' ile işaretli monoklonal antikolar ile boyanır (3,6). Duyarlılık ve özgüllüğünü artırmak için viral kültür ile birlikte yapılması önerilir. Floresan antikor yöntemi PCR'dan daha az duyarlıdır (24).

HSV proteinlerini bağlayabilen monoklonal antikolar kullanılarak ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), immunperoksidaz yöntemleri ile de klinik örneklerde HSV antijenleri araştırılmaktadır (3,6).

2.7.3. Virüs izolasyonu

HSV enfeksiyonlarının tanısında en duyarlı ve spesifik yöntem enfekte doku ve sekresyonlardan virüsün izolasyonudur. HSV 12 günlük embriyonlu yumurtada ve deney hayvanlarında üretilmektedir. Döletli yumurtanın koriyoallantoik zarına inoküle edilen HSV tip 1 küçük ve çok sayıda, HSV tip 2 daha büyük ve az sayıda pock'lar oluşturur (6). Birçok hayvan bu virüse duyarlıdır, fareler ile tavşanlar sıklıkla deney hayvanı olarak kullanılır. Korneaya inokülasyon keratit veya keratokonjunktivit, beyne inokülasyon ise fatal bir ensefalit ile sonuçlanır. Bunlardan başka kobay, hamster, sıçan ve civcivler de deney hayvanı olarak kullanılırlar (1).

HSV tanısında kullanılan en duyarlı yöntem hücre kültüründen virüs izolasyonudur. Virüsün üretilmesinde çeşitli primer, diploid ve devamlı hücre kültürleri kullanılır. Herpes virüsler en iyi insan diploid fibroblast hücrelerinde (WI-38, MRC-5), Afrika yeşil Maymun böbrek (Vero) ve Hep-2 hücrelerinde üremektedirler. Klinik örnek hücre kültürüne inokule edildikten sonra 33-37⁰C'de inkübe edilmelidir. Ekim yapılan hücre kültürleri her gün mikroskop altında kontrol edilir. HSV'nin sitopatik etkisi (CPE) genellikle 48-72 saat içinde gözlenir (3). Örneklerde yüksek titrede virüs bulunduğu CPE sıklıkla 24 saat içerisinde görülür. Kesin negatif değerlendirme için kültürün en az 5-6 gün takip edilmesi gerekir. Viral kültürün duyarlılığı işlenen örneğe veya alındığı yere göre değişebilir. En yüksek virüs titresi veziküler lezyonlarda bulunur. Ensefalit olgularında virüs izolasyonu nadirdir (11). HSV'nin CPE'si sitoplazmik granülasyonla başlar, sonra hücreler büyür ve yuvarlaklaşır, intranükleer inklüzyon cisimcikleri görülür. Diğer virüsler, bazı toksik faktörler HSV'nin sitopatik etkisini taklit edebileceği için oluşan CPE genel veya tip spesifik monoklonal antikorlarla doğrulanmalıdır. Hücre kültüründe pozitif sonuçların değerlendirilmesinde ELISA, immünofloresan veya nötralizasyon testleri kullanılır (3).

HSV tip 1'in UL39 geni sayesinde hücrede beta galaktozidazın varlığını araştıran ELVIS (enzim bağlı virüs indüksiyon sistemi) yöntemi de tanıda uygulanmaktadır. HSV ile enfekte olan hücre tarafından β -galaktozidaz salgınır ve oluşan renk değişikliğine göre ELVIS testi değerlendirilir. Bu yöntemde HSV pozitif hücreler HSV tip 1 ve HSV tip 2 olarak değerlendirilir (25-27).

2.7.4. Moleküler biyolojik yöntemler

Klinik örneklerde viral genomun kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesinde moleküler biyolojik yöntemlerden PCR sıklıkla uygulanmaktadır. PCR hücre kültürüne kıyasla daha hızlı ve duyarlıdır (6,28-30). Direkt antijen aranması yöntemlerine göre asemptomatik enfeksiyonlarda ve özellikle BOS'da viral genomun belirlenmesinde tercih edilmektedir. HSV menenjit ve ensefalit tanısında BOS'ta öncelikle HSV-DNA araştırılması önerilmektedir (31-33). İn-house PCR ile HSV-DNA araştırılmakta, ancak kontaminasyon riski daha az olan ve daha hızlı sonuç veren gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) tercih edilmektedir (3,16).

2.7.5. Serolojik yöntemler

HSV'ye karşı oluşan antikorlar kompleman birleşmesi, indirekt immunfloresan, ELISA ve nötralizasyon gibi serolojik yöntemlerle araştırılabilir. Toplumdaki bireylerin büyük çoğunluğu HSV'ne karşı antikor taşırlar. Geçirilmekte olan bir enfeksiyonun tanısı antikor titresinin artışı ve IgM antikorlarının oluşumu ile belirlenir. Bunun için hastalığın başlangıcında ve sonrasında alınan kan örneklerinde antikor titrelendirilir. Antikor titresinde dört kat artış ve serumda IgM antikorlarının gösterilmesi aktif HSV enfeksiyonunu gösterir. Diğer virüs enfeksiyonlarından farklı olarak vücutta antikor sentezlenmesine rağmen virüs varlığını devam ettirir (3).

HSV tip 1 ve HSV tip 2 arasında geniş çapraz reaksiyon olduğundan geçirilmiş HSV tip 1 enfeksiyonunu HSV tip 2'den ayırt etmek mümkün değildir (3,6). Yenidoğanlarda HSV IgM antikorlarının saptanması tanıda yardımcı olsa da ileri yaşlarda primer ve yineleyen herpetik enfeksiyonların ayırt edilmesinde önemli bir katkısı yoktur (3,16).

2.8. EPİDEMİYOLOJİ

HSV enfeksiyonları bütün dünyada yaygındır. Bu virüsün neden olduğu latent enfeksiyondan dolayı dünya nüfusunun üçte birinin yineleyen HSV enfeksiyonu geçirdiği tahmin edilmektedir. Oral ve genital enfeksiyonların morbiditesi çok yüksek olmasına karşın, mortalite daha çok neonatal enfeksiyonlarda görülmektedir (11,16).

Deney hayvanlarında kolayca enfeksiyon yapabildikleri halde hayvan vektörü bilinmemektedir. İnsanlar tek doğal rezervuardır. Virüs ile enfekte sekresyonlarda direkt temasla bulaş görülür. HSV tip 1 daha çok oral, HSV tip 2 ise daha çok genital sekresyonlardan bulaşır. Bulaş hem belirgin hastalığı olan kişilerden, hem de asemptomatik taşıyıcılardan kaynaklanabilir. Aktif lezyonu olan hastalarda virüs titrasyonu yüksek olduğundan virüs yayılımı daha fazladır. Herpes virüsler vücut dışında uzun süre canlı kalamadıkları için günlük kullanım eşyaları ile bulaşma çok nadirdir. HSV'nin böbrek ve karaciğer transplantasyonu ile geçtiği bildirilmiştir (3,16).

Çalışmalar erişkinlerin %80'inden çoğunun HSV enfeksiyonu geçirdiğini göstermiştir. Primer HSV tip 1 enfeksiyonu çoğunlukta 6 ay- 5 yaş arası çocuklarda görülür. HSV tip 2 enfeksiyonu genellikle 15 yaş üzeri kişilerde genital enfeksiyon veya neonatal enfeksiyon şeklinde görülmektedir. HSV tip 1 antikorları hayatın ilk on yılında, HSV tip 2 puberteden sonra erişkinliğin erken yıllarında kazanılır. HSV tip 1 antikorları hayatın ilk 4 yılında hızla yükselmekte ve aile içi bulaşı yansıtmakta ve ömür boyunca saptanmaktadır (9). Virüsün bulaşması ve herpes enfeksiyonları sosyoekonomik düzeyi düşük aile gruplarında daha fazladır. Bu gibi ailelerde kişi sayısının fazlalığı ve hijyen kurallarına uyulmaması virüsün yayılmasında etkili olmaktadır (16).

HSV tip 2 cinsel ilişkiyle yayılım gösterir. Bu nedenle bulaşması puberteden sonra olur. HSV tip 2 antikor prevalansı HSV tip 1 antikor prevalansına göre daha düşüktür. HSV tip 2 antikor prevalansı bakirelerde %3, hayat kadınlarında %80, yüksek sosyoekonomik gruplarda %25, düşük sosyoekonomik gruplarda %60 oranında değişmektedir. HSV tip 2'nin servikste yayılımı gebelik sırasında olabilir veya vajinal doğum sırasında virüsün bebeğe vertikal geçişi olabilir (1).

HSV enfeksiyonlarının insidansında mevsimlere göre farklılık kesin olmamakla birlikte, deri enfeksiyonları daha çok yaz aylarında, herpes keratiti ve labialisin ise kış aylarında yaygın olduğu ileri sürülmektedir. Mukokütanöz HSV enfeksiyonları herpes enfeksiyonlarının çoğunluğunu oluşturur ve öncelikle oral ve genital bölgeleri tutar. Göz kliniklerine başvuranların %5'inde HSV keratiti olduğu tahmin edilmektedir (1,16).

HSV-2 prevalansının yüksek olduğu toplumlarda HIV enfeksiyonu riskinin de yüksek olduğu saptanmıştır. Hastalarda bulunan genital ülserlere bağlı olarak epitel bütünlüğünün bozulması sonucunda virüs transferi kolaylaşmaktadır (1).

Bazen HSV-1 ve HSV-2 birlikte enfeksiyon yapabilir. Geçirilmiş HSV-1 enfeksiyonuna bağlı antikorlar HSV-2'ye karşı az da olsa koruma sağlayabilir ve HSV-1 enfeksiyonu varlığında HSV-2 enfeksiyonları subklinik seyredebilir. Ancak HSV-2 enfeksiyonunun HSV-1'e karşı korunma sağlayıp sağlamadığı henüz bilinmemektedir (16).

2.9. KORUNMA

HSV enfeksiyonlarından korunmak için;

1. Sağlık personeli ve dış hekimlerinin enfeksiyöz lezyonlar ile doğrudan temas etmekten kaçınmaları,
2. Belirgin ve yaygın herpetik lezyonları bulunan hastaların sağlıklı kişilerle yakın ilişkide bulunmamaları,
3. Aktif lezyonları veya geçirilmiş enfeksiyon öyküsü olan ya da HSV-2 seropozitif bulunan eşlerle cinsel ilişki sırasında kondom kullanılması ve
4. Neonatal enfeksiyonların çok sık görülmemekle birlikte, çok ağır seyretmeleri ve kalıcı sekellere yol açabilmeleri nedeniyle, bebeklerin perinatal HSV enfeksiyonlarından korunmaları gerekir (16).

Genital herpes öyküsü veya genital herpesli eşi olan kadınlar doğum başlangıcında herpes belirtileri ve bulguları açısından dikkatle sorgulanmalı ve incelenmelidirler. Enfeksiyon belirti ve bulguları göstermeyen kadınlarda doğum vajinal yoldan gerçekleştirilebilir (15,34). Gebelik döneminde HSV enfeksiyonu varsa ve membranlar yırtılmamışsa bebeğin virüsle enfekte lezyonlarla temasını önlemek için sezeryan tavsiye edilir. Yineleyen genital herpesli hastalar yılda 12 veya daha fazla atak geçiriyorsa ve uzun sürüyorsa proflaksi uygulanmalıdır. Ancak hastanın bağışıklık yetmezliği varsa tekrarlanma sıklığı ve şiddetine bakılmaksızın proflaksi yapılmalıdır (2).

Etkili antiviral tedaviye rağmen HSV ile enfeksiyonlar önemli sağlık sorunudur. Bu nedenle HSV enfeksiyonlarından korunmak için çok sayıda proflaktik ve terapötik aşı çalışması yapılmıştır. Ancak bunların hiç birisi arzu edilen düzeyde bir koruma sağlamamıştır (35). Korunma ve tedavi için subünit aşilar geliştirilmiştir. gB ve gD subünit aşiların denemelerinin sonucunda proflaksi ve tedavi edici etkilerinin olmadığı gözlenmiştir (36). Diğer gD subünit aşı çalışmasında; aşılanmanın kadınları koruduğu ancak erkekleri korumadığı sonucuna varılmıştır (2). Primer enfeksiyonları önlemede başarılı olabilecekleri düşünülmekle birlikte, aşiların rekürrent enfeksiyonları önlemede ne kadar başarılı olacakları henüz bilinmemektedir (11).

Son olarak vaksinya virüsü ile HSV'nin rekombinasyonu ile elde edilmiş rekombinan aşı, vaksinya virüsüne ait yan etkilerden dolayı henüz kullanımda değildir (16).

2.10. TEDAVİ

HSV enfeksiyonları bebeklerde ve immun sistemi baskılanmış kişilerde daha şiddetli ve hızlı ilerlemektedir (37). Bu hastalarda erken tedaviye başlanması morbidite ve mortaliteyi etkilemesi açısından önemlidir (38).

HSV enfeksiyonlarının tedavisinde birçok antiviral ilaç geliştirilmiştir. Ancak kullanılan ilaçlardan hiçbiri latent herpes virüsüne etki edememektedir. En etkili ve en çok kullanılan ilaç asiklovirdir. HSV enfeksiyonlarının standart tedavisinde sentetik bir pürin nükleozid analogu olan asiklovir oral veya parenteral yolla uygulanır. Timidin kinaz ve hücresel kinazlar ile etkileşerek DNA polimeraz enzimini inaktive eder (2,38).

Asiklovir normal hücrelerde herhangi bir etki göstermezken virüsle enfekte hücrelerde timidin kinaz tarafından monofosfat ve difosfat formlarına fosforilize edilir. Hücresel enzimlerce aktif trifosfata dönüştürüldüğünde hücre DNA polimerazına etki etmezken viral DNA polimeraza seçici olarak bağlanır ve aktivitesini inhibe eder. Normal hücrelere etki etmediği bilinen en az toksisiteli ilaçtır (11).

Başlangıç genital veya oral HSV enfeksiyonları topikal, oral veya parenteral asiklovir ile tedavi edilebilir. Parenteral asiklovir ile tedavi ilk genital herpes atağında çok daha etkilidir. Neonatal herpes enfeksiyonlarında, HSV ile ensefalit gelişen veya herpesli immunsupresif hastalarda parenteral olarak asiklovir kullanılır. Hepatit, pulmoner enfeksiyon, herpetik özefajit, egzema herpetikum, eritema multiforme, herpetik dolama, HSV konjunktivit, blefarit ve dendritik keratit enfeksiyonlarında ve diğer herpes enfeksiyonlarında asiklovir başarıyla kullanılmaktadır (2,37,38).

Asiklovir dışında valasiklovir, pensiklovir ve famsiklovir herpes enfeksiyonlarında kullanılan diğer ilaçlardır. Bu ilaçlar da timidin kinaz üzerinden etki gösterirler. Foskarnet ve sidofovir timidin kinazdan bağımsız viral DNA sentezini inhibe eden

antiherpetik ilaçlardır. Foskarnet, asiklovire dirençli şiddetli HSV enfeksiyonlarında önerilmektedir (38). Vidarabin HSV enfeksiyonlarında kullanılan bir diğer ilaçtır (3).

Asiklovir direnci immun sistemi baskılanmış hastalarda (%4-14) ve özellikle allogenik kemik iliği transplant hastalarında (%30) rapor edilmiştir. Asiklovir direnci timidin kinaz veya DNA polimeraz genlerindeki mutasyona bağlı olarak gelişir. Olguların %95'inde asiklovir direnci timidin kinaza bağlıdır (39,40). Timidin kinaz mutasyonu gansiklovir ve pensiklovire, DNA polimeraz mutasyonu ise foskarnete karşı çapraz direnci ortaya çıkarabilir. Mutasyon sıklığı antiviral tedavinin klinik kullanımını ile artmaktadır (41).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarıyla Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'da yapıldı.

3.1. ÖRNEKLER

Mart 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerinde meningoensefalit ön tanısıyla takip edilen ve polikliniklerine başvuran herpes enfeksiyonu düşünülen 65 hastadan alınan çeşitli klinik örnekler çalışmaya dahil edildi. Meningoensefalit ön tanılı hastalardan 2-3 mL BOS, diğer herpes enfeksiyonu olan hastaların herbirinden ikişer adet steril eküvyon çubuk ile lezyon kenarından veya vezikül sıvısından sürüntü örnekleri alındı. Sürüntü örneklerinden birisi PCR için kullanılmak üzere 0,4 mL %10'luk fosfat buffer solüsyonunun (PBS) içine eklendi. Diğer sürüntü örneği ise hücre kültürü için viral transport besiyerine (Virocult, Vircell, Spain) koyularak ve hastalardan alınan BOS örnekleri ise hem PCR ve hem de hücre kültürü için ependorf tüplerde -70°C ' de saklandı.

3.2. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE DİREKT HSV ANTİJENİNİN ARAŞTIRILMASI

Sürüntü örneklerinde HSV antijeni DFA (Monofluo, BIO-RAD) yöntemiyle kit prosedürüne uygun olarak araştırıldı.

Direkt Immunofloresan Antikor (DFA) Testi

Kit içeriği:

- HSV tip 1 Monoclonal Antibody
- HSV tip 2 Monoclonal Antibody
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Mounting medium

Testin uygulanması:

1. Sürüntü örnekleri teflon kaplı lam üzerindeki iki farklı kuyucuğa yayılarak 5-10 dakika kuruması için beklenildi.
2. Kuruyan preparat 10 dakika asetonla tespit edildi.
3. Preparat nemli ortam oluşturulmuş Petri içine yerleştirildi.
4. Preparattaki örneğin bulunduğu alan üzerindeki birinci kuyucuğa bir damla FITC ile işaretli HSV tip 1 Monoklonal antikor, ikinci kuyucuğa bir damla FITC ile işaretli HSV tip 2 Monoklonal antikor damlatıldı.
5. Preparat oda ısısında 30 dakika bekletildi.
6. Daha sonra PBS ile 10-15 dakika şale içinde çalkalanarak yıkandı, kurulandı ve mounting medium damlatılarak lamelle kapatıldı.
7. Preparattaki her iki kuyucuk floresan mikrokobunda x10 ve x40'lık objektif ile incelendi.
8. HSV tip 1 ve tip 2 i Monoklonal antikor ile boyalı kuyucuktaki stoplazmik floresan veren hücrelerden en az bir tane görüldüğünde test pozitif olarak değerlendirildi.

3.3. HSV'NİN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İZOLASYONU

HSV izolasyonunda Hep-2 hücre kültürü kullanıldı. Hücre kültürü çalışmalarının bütün aşamaları önceden %70'lik alkolle ve ultraviyole ışınlarla temizlenmiş Class 2A kabininde yapıldı. Bütün örneklerden Hep-2 hücre kültürüne ekim yapıldı ve 37⁰C'de CO₂'li etüvde inkübe edildi. Hücrelerde CPE olup olmadığı invert mikroskopuyla incelendi.

Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar:

1. Hanks' solüsyonunun hazırlanması

| | |
|---------------------------------------|-------|
| - Hanks' solüsyonu (Biochrom KG, 10X) | 10 mL |
| - Steril deiyonize su | 90 mL |
| - %4.4'lük NaHCO ₃ | 1 mL |

2. Gelişme besiyeri

| | |
|---|--------|
| - RPMI 1640 besiyeri (Biological Industries,10X) | 10 mL |
| - Steril deiyonize su | 90 mL |
| - %4.4'lük NaHCO ₃ | 3.5 mL |
| - 200 mM L-glutamin | 1 mL |
| - Fetal bovine serumu (56 ⁰ C'de 30 dakika inaktive edilmiş) | 10 mL |
| - 10 000 U/mL penisilin | 1 mL |
| - 10 000 U/mL streptomisin | 1 mL |

3. Devam besiyeri

Gelişme besiyeri hazırlanırken kullanılan solüsyonlar ve miktarları aynı şekilde kullanıldı ancak fetal bovine serumu 2 mL olarak eklendi.

4. Tripsin solüsyonunun hazırlanması

| | |
|---------------------|--------|
| - Tripsin (Amresco) | 2.5 mg |
| - Hanks' solüsyonu | 100 mL |

Tripsin ve Hanks' solüsyonu karışımı bir saat manyetik karıştırıcıda işlem gördükten sonra kullanıma hazır hale geldi.

Hücre kültürü

1. Doku kültürü şişelerinde (75 cm² lik) tam tabaka halinde temin edilen Hep-2 hücreleri tripsinize edildikten sonra 10 mL'lik tüplere 2x10⁵ hücre/mL olacak şekilde pasajları yapıldı.

2. 2-3 gün içinde tek tabaka halinde inokülasyona uygun şekilde üreyen hücreler inokülasyon yapılmaya kadar CO₂'li etüvde 37⁰C'de muhafaza edildi.
3. Oda sıcaklığına getirilen klinik örneklerden 200 µL pastör pipeti ile inokülasyon için hazırlanan hücre kültürü tüplerine ekimleri yapıldı.
4. Tüpler 1 saat CO₂'li etüvde 37⁰C'de inkübe edildikten sonra tüpler içindeki besiyeri tamamen boşaltıldı ve üzerlerine 2 mL devam besiyeri konuldu.
5. Tüpler CO₂'li etüvde 37⁰C'de inkübe edildi.
6. Hücreler invert mikroskop ile CPE yönünden 7 gün boyunca gün aşırı incelendi.

Hücre kültüründe HSV antijeninin DFA ile araştırılması

7 gün takip edilen tüplerde HSV'ye özgü CPE oluşan ve/veya oluşmayan tüm tüplerde DFA yöntemiyle HSV antijeni araştırıldı. Bunun için sırasıyla;

1. Tüplerdeki besiyeri döküldü.
2. Hücreler ucu künt plastik pastör pipetleri ile kazındı.
3. Tüpün üzerine 1mL PBS eklenerek pipetaj yapıldı. Oluşan süspansiyon teflon kaplı lam üzerine 20 µL konularak oda ısısında kuruyuncaya kadar bekletildi.
4. Kuruyan preparat nemli ortam oluşturulmuş Petri içine yerleştirildi. Preparatın üzerini kaplayacak kadar aseton eklendi ve 10 dakika bekletildi.
5. Preparattaki örneğin bulunduğu alan üzerindeki birinci kuyucuğa bir damla FITC ile işaretli HSV tip 1 Monoklonal antikor, ikinci kuyucuğa bir damla FITC ile işaretli HSV tip 2 d Monoklonal antikor damlatıldı.
6. Preparat oda ısısında 30 dakika bekletildi.
7. Preparat daha sonra PBS ile 10-15 dakika şale içinde çalkalanarak yıkandı, kurulandı ve mounting medium damlatılarak lamelle kapatıldı.
8. Preparattaki her iki kuyucuk floresan mikrokobunda x10 ve x40'luk objektif ile incelendi.

9. HSV tip 1 ve tip 2 Monoklonal antikor boyalı kuyucuktaki stoplazmik floresan veren hücrelerden en az bir tane görüldüğünde test pozitif olarak değerlendirildi.

3.4. HSV-DNA'NIN PCR İLE ARAŞTIRILMASI

Bütün örneklerde nükleik asit izolasyonu PureArt DNA Mini Kiti (QIAGEN) kullanılarak test kiti prosedürüne uygun çalışıldı. HSV-DNA belirlenmesi için “in house” PCR uygulandı.

Nükleik asit izolasyonu

Örnekler çalışmadan önce 15-25⁰C oda sıcaklığına getirildi. Nükleik asit izolasyonu için BOS ve sürüntü örneklerinde farklı prosedür uygulandı.

Kit içeriği

- Proteinaz K
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer AE
- QIAamp spin kolonu
- Toplama tüpleri (2 mL'lik)

Testte kullanılacak solüsyonların hazırlanışı

Buffer AW1 solüsyonunun üzerine 25 mL %96'lık etil alkol, buffer AW2 solüsyonunun üzerine ise 30 mL %96'lık etil alkol eklendi.

BOS örneklerine uygulanan nükleik asit izolasyon prosedürü

1. Steril ependorf tüpleri ependorf sporlarına dizildi. Her bir ependorf tüpüne 20 µL proteinaz K konuldu.
2. Tüplere 200 µL BOS örnekleri eklendi.
3. Ayrıca 200 µL buffer AL eklenerek 15 saniye vortekslendi.
4. 56⁰C'de etüvde 10 dakika inkübe edildi.

5. Tüpler kapakta biriken damlacıkların tabana inmesi için kısa süreli santrifüj edildi.
6. Tüplere 200 µL etil alkol ilave edildikten 15 saniye vortekslendi. Kapakta biriken damlacıkların tabana inmesi için kısa süreli santrifüj edildi.
7. Tüplerdeki karışımın tamamı toplama tüplerine konulan kolonlara alındı ve 6000 x g'de (8000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
8. Toplama kolonları santrifüjden alınıp temiz toplama tüplerine alındı. Kolonların kapakları dikkatlice açılıp üzerine 500 µL buffer AW1 eklendi ve 6000 x g'de (8000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
9. Kolonlar santrifüjden alınıp temiz toplama tüplerine alındı. Kolonların kapakları dikkatlice açılıp üzerine 500 µL buffer AW2 eklendi ve 20.000 x g'de (14.000 rpm/dak.) 3 dakika santrifüj edildi.
10. Kolonlar santrifüjden alınıp temiz toplama tüplerine alındı ve 20.000 x g'de (14.000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
11. Kolonlar santrifüjden alınıp temiz 1,5 mL'lik ependorf tüplerine alındı. Kolonların kapakları dikkatlice açıldı ve üzerine 50 µL buffer AE eklendi. Oda sıcaklığında bir dakika bekletildi ve 6000 x g'de (8000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
12. Kolonlar atılıp ependorf tüplerindeki saf nükleik asit PCR çalışması için saklandı

Sürüntü örneklerine uygulanan nükleik asit izolasyon prosedürü

1. 1.5 mL'lik ependorf tüpte 400 µL PBS eklenen sürüntü örnekleri ependorf sporlarına dizildi.
2. Her tüpe 20 µL proteinaz K konuldu.
3. 400 µL Buffer AL eklenerek 15 saniye vortekslendi
4. 56°C'de etüvde 10 dakika inkübe edildi.
5. Tüpler kapakta biriken damlacıkların tabana inmesi için kısa süreli santrifüj edildi.

6. Tüplere 400 µL etil alkol ilave edildikten sonra 15 saniye vortekslendi. Tüpler kapakta biriken damlacıkların tabana inmesi için kısa süreli santrifüj edildi.
7. Tüpler içindeki 700 µL'lik karışımın tamamı toplama tüplerine konulan kolonlara alındı ve 6000 x g'de (8000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
8. Kolonlar santrifüjden alınıp temiz toplama tüplerine alındı. Kolonların kapakları dikkatlice açılıp üzerine 500 µL buffer AW1 eklendi ve 6000 x g'de (8000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
9. Kolonlar santrifüjden alınıp temiz toplama tüplerine alındı. Kolonların kapakları dikkatlice açılıp üzerine 500 µL buffer AW2 eklendi ve 20.000 x g'de (14.000 rpm/dak.) 3 dakika santrifüj edildi.
10. Kolonlar santrifüjden alınıp temiz 1,5 mL'lik ependorf tüplerine alındı. Kolonların kapakları dikkatlice açıldı ve üzerine 50 µL buffer AE eklendi. Oda sıcaklığında bir dakika bekletildi ve 6000 x g'de (8000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
11. Kolonlar atılıp ependorf tüplerindeki saf nükleik asit PCR çalışması için saklandı

HSV-DNA Amplifikasyonu

Bütün örneklerde HSV-DNA belirlenmesi için "in house" PCR uygulandı.

HSV-DNA Amplifikasyon Karışımı

| | |
|--|---------|
| - 10X Hot Start PCR Buffer | 5 µL |
| - 25 mM MgCl ₂ | 5 µL |
| - 100 mM dNTP karışımı (dTTP, dGTP, dATP, dCTP) | 5 µL |
| - Primer 1(5'- GAG GGA CAT CCA GGA CTT TG-3') | 0,4 µL |
| - Primer 2(5'- GCG ACC GTC TCC TCT ACC TC-3') | 0,4 µL |
| - Hot Start <i>Taq</i> DNA Polimeraz | 0,25 µL |
| - Distile su | 24 µL |

Testin uygulanması

1. Amplifikasyon aşaması izolasyon odasından farklı bir odada yapıldı. Önceden %10'lık hipokloridli su ile silinmiş ve ultraviyole ışığı ile sterilize edilmiş laminer akım içerisinde çalışıldı. Amplifikasyon için kullanılacak Buffer, MgCl₂, dNTP, Primer 1, 2 ve *Taq* DNA Polimeraz -20⁰C'lik derin dondurucudan çıkarıldı. *Taq* DNA Polimeraz çalışma anına kadar buz kalıbı üzerinde bekletildi.
2. Örnek sayısı, pozitif ve negatif kontrol sayısı kadar PCR amplifikasyon karışımı tek ependorf tüpüne hazırlandı ve mikrolaktaki çukurlara 40 µL dağıtıldı.
3. Pozitif kontrol, negatif kontrol ve hasta örneklerinden elde edilmiş DNA izolatlarından 10'ar µL mikrolaktaki çukurlara dağıtıldı.
4. Mikrolak GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD) PCR cihazına yerleştirildi.
5. Örneklerdeki nükleik asit 'thermal cycler' cihazında aşağıdaki sikluslar uygulanarak çoğaltıldı.

| | | |
|----------------------|--------------|------------|
| 95 ⁰ C'de | 12.00 dakika | |
| 95 ⁰ C'de | 01.00 dakika | } 3 döngü |
| 60 ⁰ C'de | 01.00 dakika | |
| 72 ⁰ C'de | 01.00 dakika | |
| 95 ⁰ C'de | 01.00 dakika | } 37 döngü |
| 55 ⁰ C'de | 00.45 dakika | |
| 72 ⁰ C'de | 01.00 dakika | |
| 72 ⁰ C'de | 03.00 dakika | |

6. Reaksiyon sona erdikten sonra PCR ürünleri cihazın içinden alındı.
7. 100 mL TBE 1X tamponu içerisinde 1 gr agaroz ısıtılarak eritildi. El yakmayacak kadar soğuduktan sonra 3 µL 'ethidium bromide' katılarak yatay jel elektroforez tankına döküldü.

8. Çoğaltılan örneklerden 10'ar μL alıp üzerine 5'er μL yükleme boyası karıştırılarak donmuş olan jeldeki kuyucukların dibine düşmesi sağlandı.
9. Yatay jel elektroforez tankındaki jelin içindeki örnekler 120 voltta 20 dakika yürütüldü.
10. Jel translminatrde ultraviyole ışık altında incelendi. Örnekler 188 basepare (bp) uzunluğunda olan pozitif kontrol ile aynı bölgede bant verdiğinde pozitif kabul edildi.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler 'Kappa uyum analiz' metoduyla yapıldı (42).

4. BULGULAR

Mart 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastaneleri kliniklerinde meningoensefalit ön tanısıyla takip edilen ve polikliniklerine başvuran herpes enfeksiyonu düşünülen 65 hastadan alınan çeşitli klinik örnekler çalışmaya dahil edildi. Örneklerden 27'si sürüntü, 38'i BOS örneği idi (Tablo 1).

BOS örnekleri pediatrik ve yetişkin enfeksiyon hastalıkları, yoğun bakım, kemik iliği transplantasyon ünitesi ve nefroloji kliniklerinde yatan hastalardan temin edildi. Sürüntü örnekleri ise hematoloji ve onkoloji, kemik iliği transplantasyon ünitesi, pediatrik ve yetişkin enfeksiyon hastalıkları kliniklerinde yatan hastalar ile göz ve dermatoloji polikliniğine başvuran hastalardan alındı.

Sürüntü örneklerin alındığı hastaların 13'ü herpes labialis, 5'i keratokonjunktivit, 4'ü gingivostomatit, 3'ü egzama herpetikum, 1'i herpetik dolama, 1'i genital enfeksiyon ön tanılı hastalardı (Tablo 1). Sürüntü örneklerin alındığı hastaların 7'si çocuk, 20'si yetişkin, BOS örneklerinin ise 13'ü çocuk, 25'i yetişkindi.

Tablo 1. Alınan örneklerin klinik ve polikliniklere göre dağılımı

| | KLİNİK ÖN TANI | PEHK | BEHK | YBÜ | KİTÜ | NK | HOK | GP | DP | Toplam |
|--------------------------|--------------------|------|------|-----|------|----|-----|----|----|--------|
| BOS örnekleri (n:38) | Meningoensefalit | 10 | 12 | 9 | 4 | 3 | | | | 38 |
| Sürüntü örnekleri (n:27) | Herpes labialis | 1 | 2 | | | | 8 | 1 | 1 | 27 |
| | Keratokonjunktivit | | | | | | | 5 | | |
| | Gingivostomatit | | | | 1 | | 3 | | | |
| | Egzema herpetikum | 2 | | | | | | | 1 | |
| | Herpetik dolama | 1 | | | | | | | | |
| | Genital enfeksiyon | | | | | | | | 1 | |
| TOPLAM | | 14 | 14 | 9 | 5 | 3 | 11 | 6 | 3 | 65 |

PEHK: pediatri enfeksiyon hastalıkları kliniği; BEHK: büyük enfeksiyon hastalıkları kliniği; YBÜ: yoğun bakım ünitesi; KİTÜ: kemik iliği transplantasyon ünitesi; NK: nefroloji kliniği; HOK: hemotoloji onkoloji kliniği; GP: göz polikliniği; DP: dermatoloji polikliniği.

4.1. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE DFA BULGULARI

Çalışmaya alınan 27 sürüntü örneğin 13'ünde (%48,1) HSV antijeni pozitif bulundu. Herpes labialis düşünülen 13 örneğin 8'inde, keratokonjunktivit düşünülen 5 örneğin 1'inde, gingivostomatit düşünülen 4 örneğin 3'ünde ve herpetik dolama düşünülen 1 örnekte HSV antijeni pozitif idi (Tablo 2). Bunlardan herpetik dolama düşünülen bir örnek HSV tip 2, diğer 12 örnek ise HSV tip 1 olarak değerlendirildi. BOS örneklerine DFA yöntemi ile antijen aranması önerilmediği için uygulanmadı (3).

Tablo 2. Sürüntü örneklerinde DFA bulguları (n:27)

| KLİNİK ÖN TANI | DFA | | TOPLAM |
|--------------------|---------|-------------------|--------|
| | Negatif | Pozitif | |
| Herpes labialis | 5 | 8 | 13 |
| Keratokonjunktivit | 4 | 1 | 5 |
| Gingivostomatit | 1 | 3 | 4 |
| Egzema herpetikum | 3 | | 3 |
| Herpetik dolama | | 1 | 1 |
| Genital enfeksiyon | 1 | | 1 |
| TOPLAM | 14 | 13 (%48,1) | 27 |

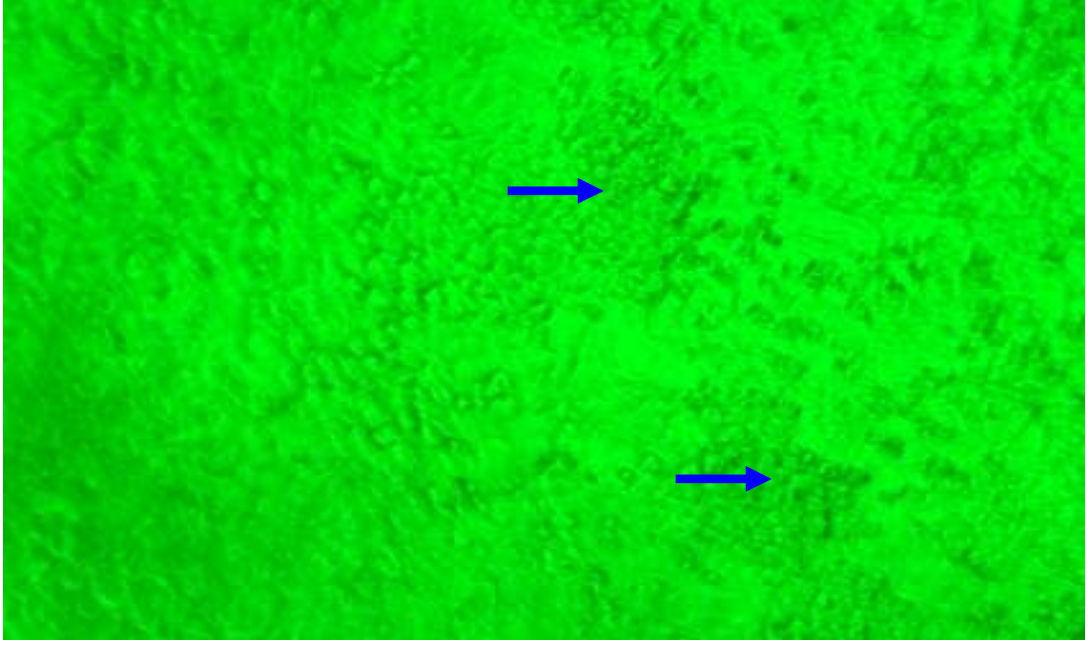
4.2. SÜRÜNTÜ VE BOS ÖRNEKLERİNDE HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARI

Hep-2 hücre kültürüne ekimi yapılan 27 sürüntü örneğinin 14'ünde (%51,8), 38 BOS örneğinin 3'ünde (%7,8) HSV'ye özgü CPE gözlemlendi (Tablo 3). Sitopatik etki izlenen hücre kültürleri DFA yöntemi ile doğrulandı (Şekil 1,2).

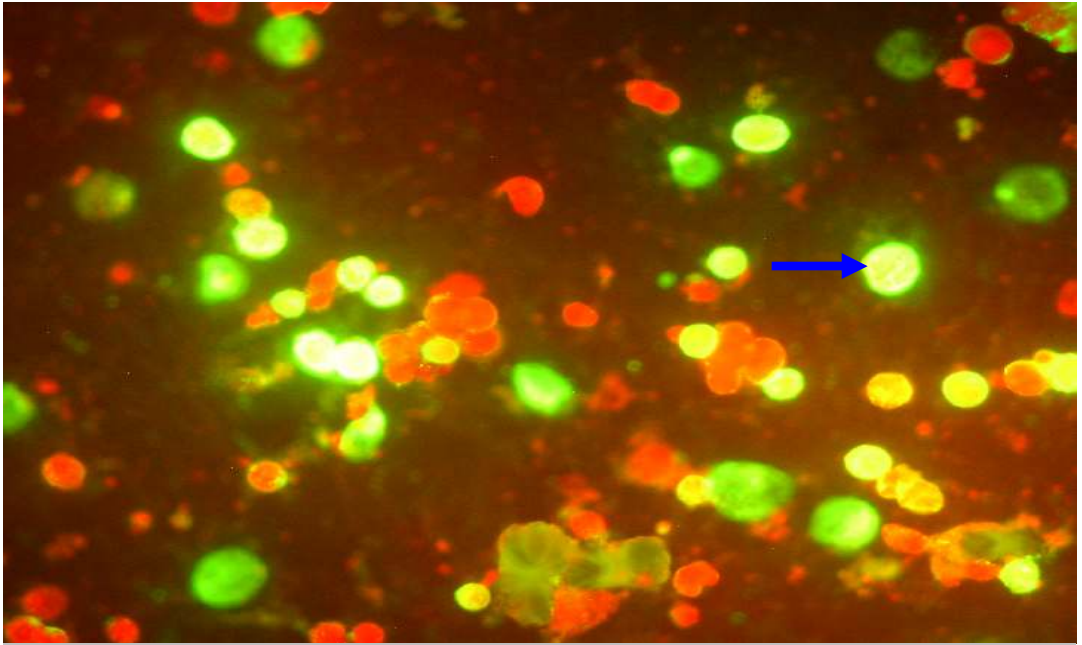
Sürüntü örneklerinden herpes labialis düşünülen 13 örneğin 8'inde, keratokonjunktivit düşünülen 5 örneğin 3'ünde, gingivostomatit düşünülen 4 örneğin 2'sinde ve herpetik dolama düşünülen 1 örnekte HSV'ye özgü CPE gözlemlendi (Tablo 3).

Tablo 3. Hücre kültürü bulguları

| ÖRNEKLER | KLİNİK ÖN TANI | Hücre Kültüründe CPE | | Toplam |
|--------------------------|--------------------|----------------------|-------------------|-----------|
| | | Negatif | Pozitif | |
| BOS örnekleri (n:38) | Meningoensefalit | 35 | 3 (%7,8) | 38 |
| Sürüntü örnekleri (n:27) | | 13 | 14 (%51,8) | 27 |
| | Herpes labialis | 5 | 8 | |
| | Keratokonjunktivit | 2 | 3 | |
| | Gingivostomatit | 2 | 2 | |
| | Egzema herpetikum | 3 | | |
| | Herpetik dolama | | 1 | |
| | Genital enfeksiyon | 1 | | |



Şekil 1. Hep-2 hücrelerinde HSV'ye özgü CPE



Şekil 2. DFA yöntemi ile virüs antijeninin gösterilmesi

4.3. SÜRÜNTÜ VE BOS ÖRNEKLERİNDE PCR BULGULARI

“In house” PCR ile çalışılan toplam 27 sürüntü örneğinin 18’inde (%66,6), toplam 38 BOS örneğinin yine 18’inde (%47,3) HSV-DNA pozitif bulundu (Tablo 4 ve Şekil 3).

Sürüntü örneklerinden herpes labialis düşünülen 13 örneğin 10’unda, keratokonjunktivit düşünülen 5 örneğin 2’sinde, gingivostomatit düşünülen 4 örneğin 3’ünde, egzema herpetikum düşünülen 3 örneğin 2’sinde ve herpetik dolama düşünülen 1 örnekte HSV-DNA pozitif bulundu (Tablo 4).

Tablo 4. PCR bulguları

| ÖRNEKLER | KLİNİK ÖN TANI | PCR | | TOPLAM |
|--------------------------|--------------------|---------|-------------------|-----------|
| | | Negatif | Pozitif | |
| BOS örnekleri (n:38) | Meningoensefalit | 20 | 18 (%47,3) | 38 |
| Sürüntü örnekleri (n:27) | | 9 | 18 (%66,6) | 27 |
| | Herpes labialis | 3 | 10 | |
| | Keratokonjunktivit | 3 | 2 | |
| | Gingivostomatit | 1 | 3 | |
| | Egzema herpetikum | 1 | 2 | |
| | Herpetik dolama | | 1 | |
| | Genital enfeksiyon | 1 | | |



Şekil 3. Jel elektroforez sisteminde HSV-DNA incelenmesi
No: 2, 4, 6, 7, 8, 9: HSV-DNA pozitif bulunan örnekler

4.4. DFA, PCR VE HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Sürüntü örneklerinde DFA ve PCR bulguları hücre kültürü bulgularıyla karşılaştırıldı ve tablo 5’de özetlendi.

Sürüntü örneklerinde DFA bulguları ile hücre kültürü bulguları karşılaştırıldı. 10 örnekte hem DFA ile HSV antijeni pozitif bulundu, hem de hücre kültürü ile HSV’ye özgü CPE görüldü. 10 örnekte ise her iki yöntemle de negatif bulgular elde edildi. 4 örnekte hücre kültüründe CPE gözlenirken, DFA ile HSV antijeni negatif bulundu. 3 örnekte DFA ile HSV antijeni pozitif iken, hücre kültüründe CPE saptanmadı. Hücre kültürü bulguları ile DFA bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan orta düzeyde uyum bulundu ($p<0,05$).

Sürüntü örneklerinde PCR ve hücre kültürü bulguları karşılaştırıldı. 12 örnekte hem PCR ile HSV-DNA pozitif bulundu, hem de hücre kültüründe HSV’ye özgü CPE görüldü. 7 örnekte ise her iki yöntemle de negatif bulgular elde edildi. 2 örnekte hücre kültüründe CPE gözlenirken, PCR ile HSV-DNA negatif bulundu. 6 örnekte PCR ile HSV-DNA pozitif iken hücre kültüründe CPE saptanmadı. Hücre kültürü bulguları ile PCR bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan orta düzeyde uyum bulundu ($p<0,05$).

Her üç yöntemle pozitif bulunan 10 örneğin 6’sı herpes labialis, 2’si gingivostomatit, 1’i keratokonjunktivit, 1’ herpetik dolama ön tanılı hastalar idi.

Tablo 5. Sürüntü örneklerinde DFA ve PCR bulgularının hücre kültürü bulgularıyla karşılaştırılması(n:27)

| | | Hücre Kültürü | | | | | |
|-----|---------|---------------|-----------|-----|---------|------------|-----------|
| | | pozitif | negatif | | pozitif | negatif | |
| DFA | pozitif | 10 (%37) | 3 (%11,1) | PCR | pozitif | 12 (%44,4) | 6 (%22,2) |
| | negatif | 4 (%14,8) | 10 (%37) | | negatif | 2 (%7,4) | 7 (%25,9) |

($p<0,05$)

($p<0,05$)

BOS örneklerin 15'inde PCR ile HSV-DNA pozitif iken hücre kültürü ile HSV'ye özgü CPE görülmedi. Sadece 3 örnekte hem PCR ile HSV-DNA hem de hücre kültüründe CPE gözlendi. 20 örnekte ise hem hücre kültüründe CPE hem de PCR ile HSV-DNA saptanmadı (Tablo 6).

Tablo 6. BOS örneklerinde PCR bulgularının hücre kültürü bulgularıyla karşılaştırılması(n:38)

| | | Hücre Kültürü | |
|------------|----------------|----------------------|----------------|
| | | pozitif | negatif |
| PCR | pozitif | 3 (%7,8) | 15 (%39,4) |
| | negatif | 0 (%0) | 20 (%52,6) |

5. TARTIŞMA

HSV'nin neden olduğu hastalıklar insanlarda en sık rastlanan viral hastalıklar arasında yer almakta ve oral, genital, göz, deri, SSS ve iç organları tutmaktadır. Asemptomatik enfeksiyonlardan ölümlle sonuçlanan dissemine hastalıklara kadar değişen geniş bir spektruma sahiptir (2,3). Herpes simpleks ensefaliti yüksek mortalite riski taşıdığı için önem taşımaktadır. Özellikle HSV'nin neden olduğu ensefalit ve yenidoğanlardaki dissemine enfeksiyonlar tedavi edilmediği takdirde mortalite oranı %70'in üzerine çıkmaktadır (43). HSV'de asiklovir kullanılmadan önce mortalite oranı %60-70 iken, tedavi ile bu oran %19-38'e düşmektedir (44). Uygun antiviral tedavi semptomatik rekürrens genital herpesin de azalmasına neden olmaktadır (45). Buna bağlı olarak neonatal enfeksiyonların morbidite ve mortalitesinde düşme gözlenir. HSV enfeksiyonlarının kontrolünde; HSV ile enfekte hastaların erken tanı ve tedavisinin yapılması ve kişisel korunma önlemlerinin alınması önerilmektedir (18).

Pimer HSV enfeksiyonlarından sonra HSV'nin dorsal kök ganglionlarında latent kalması ve buna bağlı olarak tam iyileşmenin sağlanamaması nedeniyle bu virüse bağlı tekrarlayan enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır (45). Tekrarlayan HSV enfeksiyonları özellikle yenidoğan ve immun sistemi baskılanmış hastalarda çeşitli organlara yayılmakta, meningoensefalit, pnömoni, hepatit gibi ağır klinik tablolara yol açmaktadır. Yoğun kemoterapi alan kanser hastalarında, organ transplantasyonu yapılan hastalarda ve immunsuprese hastalarda HSV enfeksiyonları daha şiddetli seyretmektedir (46). Bu tür hastalarda profilaktik olarak asiklovir tedavisinin

verilmesine bağlı asiklovir dirençli HSV enfeksiyonlarının insidansında artış görölmektedir (41). HSV enfeksiyonlarının erken tanı ve tedavisi morbidite ve mortalite oranlarını düşürecek, gereksiz ve uzun süre antiviral kullanımını ve asiklovir direncini azaltacaktır.

HSV'ye bağlı morbidite ve mortalitenin azaltılmasında doğru ve hızlı laboratuvar tanının önemi büyüktür (3,37). HSV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında; virüs antijenlerinin direkt olarak gösterilmesi, hücre kültüründe virüs izolasyonu, moleküler teknikler ve serolojik testler uygulanmaktadır (3).

HSV tanısında DFA yöntemi hızlı, özgöl ve duyarlı bir metoddur. Bu metod özellikle mukokütanöz lezyonlarda ve veziköl varlığında uygulanmaktadır. İyileşme döneminde virüs miktarının az olması nedeniyle duyarlılığı azalır (45).

Kültürde virüs izolasyonu geleneksel olarak altın standart bir yöntem olarak kabul edilir (45,47). Bu yöntem özellikle mukokütanöz, genital ve oküler lezyonlardaki enfeksiyonlarda kullanılan oldukça duyarlı ve güvenilir bir metoddur, ancak yavaş sonuç verir (48). Lezyonların taze olması ve hücre kültürüne ekiminin hemen yapılması izolasyon şansını artırır (45). Ancak BOS'ta virüs izolasyonu çok düşük duyarlılığa sahiptir (49,50).

Yapılan çalışmalarda BOS ve sürüntü örneklerinden virüsün gösterilmesinde PCR'ın hücre kültürüne kıyasla daha hızlı, özgöl ve duyarlı olduğu belirtilmektedir (51,52). PCR, HSV enfeksiyonlarının erken ve geç dönemlerinin tanısında hızlı ve duyarlılığı yüksek olan bir test olması nedeniyle hücre kültürünün yerini aldığı bildirilmektedir (45,53,54).

Megdam ve ark (55) tarafından yapılan bir çalışmada 33 sürüntü örneğine DFA ve hücre kültürü yöntemleri uygulanmış; 8 örnekte hem hücre kültüründe CPE, hem de DFA ile HSV antijeni pozitif bulunmuştur. DFA yönteminin atipik olgularda ve immun sistemi baskılanmış hastalarda klinik tanı için yardımcı olacağı sonucuna varmışlardır.

Korneal kazıntından alınan 48 örnekte DFA, PCR ve hücre kültürü yöntemleri uygulanarak yapılan bir çalışmada; %20,8'inde hücre kültüründe CPE, %29,2'sinde PCR ile HSV-DNA, %33,3'ünde DFA ile HSV antijeni pozitif bulmuşlardır (17). Kazıntı ile alınan korneal örneklerde DFA yönteminin daha duyarlı ve uygulanabilir

bir metod olduğu sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada keratokonjunktivit düşünölen 5 örneğinin sadece 1'inde DFA ile HSV antijeninin gösterilmesi örneklerin sürüntü ile alınmasına bağılı olacağı şeklinde yorumlandı.

Ölkemizde Briken ve ark (56) tarafından yapılan bir çalışmada 33 korneal kazıntı ve sürüntü örneğinde direkt immünperoksidaz ve hücre kültürü yöntemi uygulanmış, 4 olguda HSV'ye özgü CPE ve 2 olguda HSV antijeni pozitif bulunmuştur. HSV izolasyonu yanında HSV antijenine bakılmasının laboratuvar tanıda yardımcı olacağı sonucuna varılmıştır. Başka bir çalışmada 100 sürüntü örneğinde DFA ve 2 farklı hücre kültürü yöntemi ile HSV varlığı araştırılmış; standart hücre kültürü ile 36'sında, santrifüjli hücre kültürü ile 32'sinde HSV'ye özgü CPE gözlenmiş ve DFA ile 27'sinde HSV antijeni saptanmıştır (57). Hücre kültürü yönteminin başarılı bir yöntem olduğu ancak hızlı tanı gerektiren durumlarda DFA yönteminin de kullanılmasının yararlı olacağı bildirilmektedir.

Bu çalışmada HSV enfeksiyonu düşünölen hastalardan alınan BOS örneklerinde PCR ve hücre kültürü ile; sürüntü örneklerinde ise PCR, DFA ve hücre kültürü yöntemleri ile HSV araştırıldı.

Bu çalışmada 27 sürüntü örneğinin 13'ünde (%48,1) DFA ile HSV antijeni, 14'ünde (%51,8) hücre kültüründe HSV'ye özgü CPE bulundu. Hücre kültürü bulguları ile DFA bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan orta derecede uyum bulundu ($p<0,05$). Bu bulgular yurtiçi ve yurtdışı bazı araştırmacıların (55,57) bulgularıyla paralellik göstermektedir. Bu çalışmada hücre kültürü ile CPE görölen 4 örnekte HSV antijeni gösterilemedi. HSV antijeni gösterölen 3 örnekte ise hücre kültüründe CPE saptanamadı. Bunun nedeni; örneklerin ayrı ayrı çubuklarla alınmasından kaynaklanabileceğı şeklinde yorumlandı.

Corey ve ark. (52) tarafından oral ve genital 24.345 sürüntü örneğinde real-time PCR ve hücre kültürü yöntemleriyle HSV araştırılmış; 3.131 (%12,9) örnekte RT-PCR ile HSV-DNA pozitif bulunmuş, 587 (%2,4) örnekte ise hücre kültüründen CPE gözlenmiştir. RT-PCR bulgularıyla hücre kültürü bulguları karşılaştırılmış, oral ve genital mukoza örneklerinde RT-PCR'ın daha duyarlı olduğu belirtilmiştir.

Boivin ve ark. (58) tarafından yapılan başka bir çalışmada herpes labialis ön tanılı 36 örneğe RT-PCR ile hücre kültürü yöntemleri uygulanmış; 22 (%61,1) örnekte RT-

PCR ile HSV-1 DNA pozitif bulunmuş, 18 (%50) örnekte ise hücre kültüründe CPE izlenmiştir. Benzer bir çalışmada toplam 668 sürüntü örneğinde RT-PCR ve hücre kültürü yöntemleriyle HSV araştırılmış; RT-PCR ile 143 (%21,4) örnekte HSV-1 DNA, 97 (%14,5) örnekte HSV-2 DNA pozitif bulunmuş; hücre kültürü ile 127 (%19) örnekte HSV-1, 72 (%10,8) örnekte ise HSV-2 izole edilmiştir (59).

Deri ve genital lezyonlardan alınan 110 örnekle yapılan bir çalışmada RT-PCR, in-house PCR ve hücre kültürü yöntemleri karşılaştırılmıştır (60). In-house PCR ile 24 (%22) örnekte HSV-1 DNA ve 41 (%37) örnekte HSV-2 DNA; RT-PCR ile 26 (%24) örnekte HSV-1 DNA ve 40 (%36) örnekte HSV-2 DNA; hücre kültüründe 24 (%22) örnekte HSV-1 ve 28 (%25) örnekte HSV-2 izole edilmiştir. RT-PCR'ın deri lezyonlarında, HSV tanısında hızlı ve kontaminasyon riski az olan uygun bir metod olduğu sonucuna varmışlardır.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada herpetik keratit düşünülen 20 hastanın gözyaşı örneğine PCR uygulanmış ve 12 örnekte HSV 1 DNA pozitif bulunmuştur (61). Bozkaya ve ark. (62) tarafından yapılan bir çalışmada 150 çeşitli klinik örnekten hücre kültürüne ekim yapılmış ve 44 örnekte HSV izole edilmiştir. 14 BOS örneğin sadece 1'inde CPE saptamaları çalışmamızdaki bulgularla paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada 27 sürüntü örneğinin 18'inde (%66,6) PCR ile HSV-DNA pozitif bulundu ve hücre kültürü ile 14'ünde (%51,8) CPE gözlemlendi. Hücre kültürü bulguları ile PCR bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan orta derecede uyum bulundu ($p<0,05$). Bu oranların Boivin ve ark. (58)'nin bildirdiği oranlarla yakın olduğu; ancak Corey ve ark. (52)'nin bildirdiği oranlardan yüksek olduğu gözlemlendi. 2 örnekte hücre kültüründe CPE görülmesi ancak PCR ile gösterilememesi örnek alımındaki yetersizliğe bağlı olabileceği şeklinde yorumlandı. 6 örnekte HSV'ye özgü CPE gözlenmeden in-house PCR ile HSV-DNA'nın gösterilmesi ise PCR'ın daha duyarlı olduğu ya da kontaminasyona bağlı yanlış pozitiflik olabileceği şeklinde yorumlandı.

Mitchell ve ark. (43) yaptıkları çalışmada 1993-1996 yılları arasında HSV enfeksiyonu düşünülen 2106 BOS örneğinin 150'sinde PCR ile HSV-DNA'yı pozitif bulmuşlardır. SSS enfeksiyonlarında bu virüsün belirlenmesinde PCR'ın 'altın standart' olarak kabul edildiği belirtilmiştir.

HSV-2 menenjitisi düşünölen 110 hastanın BOS örneği alınarak yapılan başka bir çalışmada, RT-PCR ile 53 hastada, nested PCR ile 47 hastada HSV-2 DNA pozitif bulunmuştur (63). Kessler ve ark. (64) tarafından yapılan bir çalışmada 59 BOS örneğinde RT-PCR ile in-house PCR bulgularını karşılaştırmışlardır. Bu BOS örneğinden 20'sinde her iki yöntemle, 4 BOS örneğinden 2'sinde RT-PCR ile, 2'sinde in-house PCR ile pozitif bulunmuşlardır. Real-time PCR'ın in-house PCR'a göre daha hızlı sonuç veren, kullanımını kolay, kontaminasyona bağlı yanlış pozitif sonuçların az olabileceği bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır.

Ölkemizde Eroğlu ve ark. (65) tarafından yapılan bir çalışmada meningoensefalit ön tanılı hastalardan alınan 54 örnekte RT-PCR ile HSV-DNA araştırılmış ve 14 örnekte HSV tip 1 bulunmuştur. Benzer bir çalışma da Dağlar ve ark. (66) tarafından 99 BOS örneğinde yapılmış ve RT-PCR ile 7 örnekte HSV tip 1 bulunmuştur.

Finlandiya'da Hukkanen ve ark. (67) tarafından 922 BOS örneğinde SSS enfeksiyon etkenlerini PCR ve hücre költürü ile araştırılmış ve PCR ile örneklerin %4,6'sında HSV-DNA'yı pozitif bulunmuşlar ancak hücre költüründe HSV'ye özđü CPE izlenmemiştir. Herpes virüs ailesinin neden olduğu ensefalitlerde yetişkin hastalarda BOS'un hücre költüründe virüs izolasyonu %4 oranında pozitif bulunmuştur. Bununla birlikte HSV ensefalit şüpheli yenidoğan hastalarda ise %25-40 oranında hücre költür pozitifliği elde edilmiştir (68,69).

Beyin biyopsi örneklerinde hücre költürü ile HSV'nin izolasyonunun özđüllüđü %100 olarak kabul edilmektedir (29). Lakemen ve ark. (70) tarafından beyin biyopsisinde hücre költürü ile HSV'ye özđü CPE gözlenen örneklerin %98'inde PCR yöntemiyle HSV pozitif bulunmuştur. Yapılan diğer çalışmalarda SSS enfeksiyonu düşünölen hastalarda BOS'ta HSV'ün belirlenmesinde PCR ve hücre költürü yöntemi karşılaştırılmış ve PCR'ın hücre költürüne kıyasla hızlı, özđül ve daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır (71,72).

Ölkemizde Akçalı ve ark. (73) tarafından yapılan bir çalışmada 17 BOS örneğinde PCR ve hücre költürü uygulanmış; yalnızca bir örnekte hem PCR ile HSV-DNA hem de hücre költüründe CPE bulunmuştur. Başka bir çalışmada 30 BOS örneğinin 15'inde in-house PCR ile HSV-DNA, 7'sinde hücre költüründe HSV'ye özđü CPE saptanmıştır (74).

Ergünay ve ark. (75) tarafından toplam 400 BOS ve veziküler sürüntü örneklerinde RT-PCR ile 17 örnekte HSV-DNA saptanmıştır. Yapılan benzer bir çalışmada ise 328 BOS ve sürüntü örneği değerlendirilmiş RT-PCR ile yalnızca 8 örnekte HSV-DNA bulunmuştur (76).

Mengelle ve ark. (77) tarafından BOS ve sürüntü örneklerinden oluşan toplam 313 klinik örnekte yapılan bir çalışmada iki farklı PCR ile hücre kültürü yöntemini karşılaştırmışlar; her iki PCR ile 43 örnekte HSV-DNA, hücre kültürü ile 21 örnekte CPE pozitif bulmuşlardır. PCR ile 2 BOS örneğinde HSV-DNA pozitif bulmalarına rağmen hücre kültüründe CPE saptanmamıştır.

Madhavan ve ark. (33) tarafından 20 BOS ve 34 çeşitli sürüntü örneğinden oluşan toplam 54 örnek çalışmaya alınmış ve örnekler DFA, PCR ve hücre kültürü yöntemleri uygulanmıştır. Bu örneklerden 8'inde DFA ile HSV antijeni, 5'inde hücre kültüründe HSV'ye özgü CPE, 28'inde PCR ile HSV-DNA pozitif bulunmuştur. HSV-DNA pozitif olan 7 BOS örneğinin hiç birinde HSV'ye özgü CPE görülmemiştir.

Bu çalışmada 38 BOS örneğinin 18'inde (%47,3) PCR ile HSV-DNA saptanırken sadece 3 örneğin (%7,8) hücre kültüründe CPE gözlemlendi. Yapılan yurtiçi ve yurtdışı çalışmalarda da (33,67,73,77) BOS örneklerinde hücre kültüründe virüs izolasyonu ya hiç yapılamamış ya da az sayıda örnekte CPE saptanmıştır. BOS hücre kültüründe HSV nadiren izole edilebilmektedir (33,50). Bunun nedeni; BOS'ta HSV'ye karşı özgül antikorların virüse bağlanması ve virüsün hücrede üremesini önlemesidir (33). Ayrıca, BOS örneklerinden hücre kültürüne ekimin hemen yapılamaması, çalışma gününe kadar derin dondurucuda bekletilmiş olması virüs izolasyonunu güçleştirmektedir. Virüs izolasyonu için tek bir enfeksiyöz partikülün yeterli olduğu düşünülse de transport ve saklama koşulları yanlış negatiflik oranını yükseltmektedir. Dondurma ve çözme işlemleri enfeksiyöz virüs partiküllerinin harabiyetine neden olduğundan virüsün izolasyon şansını azaltmaktadır. Bu nedenle HSV menenjit ve ensefalit tanısında BOS'ta öncelikle HSV-DNA araştırılması önerilmektedir (33).

6. SONUÇLAR

HSV enfeksiyonu ön tanılı hastaların laboratuvar tanısı için alınan sürüntü örneklerinde DFA, PCR ve hücre kültürü yöntemleri birlikte uygulanmalıdır. DFA yöntemi, hücre kültürü yöntemine kıyasla çabuk sonuç veren, hızlı bir tanı metodudur. SSS enfeksiyonlarında tedavinin yönlendirilmesinde hızlı ve özgül tanı önemlidir. Bu nedenle BOS örneklerinde HSV-DNA daha hızlı ve daha duyarlı bir metod olan PCR ile araştırılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Whitley RJ. Herpes simplex viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds). Fields Virology (3th ed) vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkens, 1996: 2297-330.
2. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. Lancet 2001; 357: 1513-18.
3. Jerome KR, Ashley RL. Herpes simplex viruses and Herpes B virus. In: Murray PR (eds). Manuel of Clinical Microbiology (8th ed) vol. 2. Washington: ASM Press, 2003: 1291-303.
4. Serter D. Virüs, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 1997:124.
5. Mertz GJ. Herpes Simplex Virus Infections. In: Galasso GJ, Whitley RJ, Merigan TC (eds). Antiviral agents and human viral diseases. (4th ed) Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers, 1997: 305-341.
6. Ustaçelebi Ş. Diagnosis of herpes simplex virus infections. J Clin Virol 2001; 21(3): 255-9.
7. Cinque P, Cleator GM, Weber T, et al. The role of laboratory investigation in the diagnosis and management of patients with suspected herpes simplex encephalitis: a consensus report. The EU Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. J Neurol Neurosurg Psych 1996; 61: 339-45.
8. Domingues RB, Tsanaclis AMC, Pannuti CS, Mayo MS, Lakeman FD. Evaluation of the range of clinical presentations of herpes simplex encephalitis by using polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid samples. Clin Infect Dis 1997; 25: 86-91.

9. Davison AJ, Clements JB. Herpesviruses: general pruperties. In: Mahy BWJ, Ter Maulen V (eds). Topley and Wilson's Virology (10th ed) vol. 1. Washington: ASM Press, 2005: 488-505.
10. Roizman B. *Herpesviridae*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds). Fields Virology (3th ed) vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkens, 1996: 2221-96.
11. Ertürk M. Herpes simplex virüsleri. Kitabında: Ustaçelebi Ş (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (1. Baskı) Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 815-27.
12. Çolak D, Mutlu D. Herpesvirüsler. Kitabında: Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 2004: 119-27.
13. Holland DJ, Miranda Saksena M, Boadle RA, et al. Anterograde transport of herpes simplex virus proteins in axons of peripheral human fetal neurons: an immunoelectron microscopy study. J Clin Virol 1999; 73: 8503-11.
14. Corey L. Herpes Simplex Virus. In: Mandell GL, Bennett JE Dolin R (eds), Principles and Practise of Infectious Diseases (4th Ed) New York: Churchill Livingstone, 2000:1564.
15. Minson AC. Alphaherpesviruses: herpes simplex and varicella-zoster. In: Mahy BWJ, Ter Maulen V (eds). Topley and Wilson's Virology (10th ed) vol. 1. Washington: ASM Press, 2005: 506-19.
16. Serter D. Herpes Simplex Virüsler. Kitabında: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi (2. baskı) vol. 2. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2002: 1176-86.
17. Abd El-Aal AM, El Sayed M, Mohammed E, et al. Evaluation of herpes simplex detection in corneal scrapings by three molecular methods. Current Microbiology 2006; 52: 379-82.
18. Kimberlin DW. Herpes simplex virus infections of the central nervous system 2003; 14: 83-89.

19. Whitley RJ, Arvin AM. Herpes simplex virus infections. In: Remington J, Klein J (eds). *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. Philadelphia: W B. Saunders Co, 1995: 354-76.
20. Whitley RJ, Kimberlin DW. Treatment of viral infections during pregnancy and the neonatal period 1997; 24: 267-83.
21. Specter S, Jeffries D. Detection of virus and viral antigens. In: Mahy BWJ, Kangro HL (eds). *Virology Methods Manual*. New York: Harcourt Brace & Co, 1996: 309-22.
22. Ashley R. Herpes viruses: types 1 and 2. In: Lennette E (eds). *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. (3th ed) New York: Marcel Dekker, 1999: 489-513.
23. Jerome KR, Huang ML, Wald A, et al. Quantitative stability of DNA after extended storage of clinical specimens as determined by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2609-11.
24. Coyle PV, Desai A, Wyatt D, et al. A comparison of virus isolation, indirect immunofluorescence and nested multiplex polymerase chain reaction for the diagnosis of primary and recurrent herpes simplex type 1 and type 2 infections. *J Virol Methods* 1999; 83: 75-82.
25. La Rocco MT. Evaluation of an enzyme-linked viral inducible system for the rapid detection of herpes simplex virus. *Eur J Clin Microbiol* 2000; 19:233-35.
26. Patel N, Kauffmann L, Baniewicz G, et al. Confirmation of low-titer, herpes simplex virus- positive specimen results by the enzyme-linked virus inducible system (ELVIS) using PCR and repeat testing. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3986-89.
27. Turchek BM, Huang YT. Evaluation of ELVIS™ HSV ID/Typing system for the detection and typing of herpes simplex viruses from clinical specimens. *J Clin Virol* 1999; 12: 65-69.
28. Bovin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes* 2004; 11: Supplement 2: 48-56.

29. Tyler KL. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes* 2004; 11: Supplement 2: 57-64.
30. Slomka MJ. Current diagnostic techniques in genital herpes: their role in controlling the epidemic. *Clin Lab* 2000; 46: 591-607.
31. Read ST, Kurtz JB. Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1352-5.
32. Read SJ, Mitckell JL, Fing CG. Lightcycler multiplex PCR for the laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3056-9.
33. Madhavan HN, Priya K, Anand AR, et al. Detection of HSV genome using PCR in clinical samples comparison of PCR with standard laboratory methods for the detection of HSV in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Virol* 1999; 14: 145-51.
34. Cowan FM, Munday P. Guidelines for the management of herpes simplex virus infection in pregnancy. *Sexually Transmitted Infections* 1998; 74: 93-94.
35. Deback C, Huraux JM. Herpes simplex virus vaccines: perspectives. *Rev Med Interne* 2007; 28: 16-21.
36. Ferenczy MW. Prophylactic vaccine strategies and the potential of therapeutic vaccines against herpes simplex virus. *Curr Pharm Des* 2007; 13:1975-88.
37. Jones CA, David I. Management of herpes simplex virus infections. *Current Pediatrics* 2004; 14; 131-6.
38. Arduino PG, Porter SR. Oral and perioral herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection: review of its management. *Oral Diseases* 2006; 12; 254-70.
39. Lebel A, Boivin G. Pathogenicity and response to topical antiviral therapy in a murine model of acyclovir - sensitive and acyclovir- resistant herpes simplex viruses isolated from the same patient. *J Clin Virol* 2006; 37: 34-37.

40. Morfin F, Thouvenot D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol* 2003; 26: 29-37.
41. Crumpacker C. Antiviral therapy. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE (eds). *Fields Virology*. (4th ed) vol. 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 393-433.
42. Özdamar K. Paket programlar ile istatistiksel veri analizi-1. 5. baskı. Ankara: Kaan Kitabevi, 2004: 211.
43. Mitchell PS, Espy MJ, Smith TF, et al. Laboratory diagnosis of central nervous system infections with herpes simplex virus by PCR performed with cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2873-77.
44. Smalling TW, Sefers SE, Li H, et al. Molecular approaches to detecting herpes simplex virus and enteroviruses in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2317-22.
45. Taylor J. Herpes Simplex Virus. Australian Herpes Management Forum, 2006.
46. De Jalon EG, Blanco-Prieto MJ, Ygartua P, et al. Increased efficacy of acyclovir- loaded microparticles against herpes simplex virus type 1 in cell culture. *Eur J Pharm Biop* 2002; 56: 183-7.
47. Burrows J, Nitsche A, Bayly B, et al. Detection and subtyping of Herpes simplex virus in clinical samples by Lightcycler PCR, enzyme immunoassay and cell culture. *BMC Microbiology* 2002; 2: 12.
48. Johnson FB, Leavitt RW, Richards DF. Comparison of the Scott Selecticult-HSV kit with conventional culture and direct immunoperoxidase staining for detection of herpes simplex virus in cultures of clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 438-41.
49. Smalling TW, Sefers SE, Li H, et al. Molecular approaches to detecting herpes simplex virus and enteroviruses in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2317-22.

50. Tang YW, Mitchell PS, Espy MJ et al. Molecular diagnosis of herpes simplex virus infections in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2127-36.
51. Read SJ, Burnett D, Fink CG. Molecular techniques for clinical diagnostic virology. *J Clin Pathol* 2000; 53:502-6.
52. Corey L, Huang ML, Selke S, et al. Differentiation of herpes simplex virus types 1 and 2 in clinical samples by a Real-Time Taqman PCR assay. *J Med Virol* 2005; 76:350-55.
53. Sauerbrei A, Wutzler P. Laboratory diagnosis of central nervous system caused by herpes viruses. *J Clin Virol* 2002; 25: 45-51.
54. Cinque P, Bossolasco S, Lundkvist A. Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol* 2003; 26: 1-28.
55. Meqdam MM, Todd D, Al-Abosi M, et al. Detection of herpes simplex and varicella zoster viruses in clinical specimens using direct immunofluorescence and cell culture assays. *Microbios* 2001; 105: 111-8.
56. Briken D, Yıldız S, Özkul A ve ark. Keratitis ve keratokonjunktivitis olgularında HSV'nin varlığının hücre kültürü izolasyonu ve direkt immünperoksidaz tekniği ile gösterilmesi. 1. Ulusal Viroloji Kongre Kitabı, Kuşadası , Aydın, 2003, s.260.
57. Velai F. Herpes simpleks virüs enfeksiyonlarının tanısında direkt immünofloresan, standart hücre kültürü ve santrifüjlü hücre kültürü yöntemlerinin karşılaştırılması. Uzmanlık tezi; İstanbul, 1995.
58. Boivin G, Goyette N, Sergerie Y, et al. Longitudinal evaluation of herpes simplex virus DNA load during episodes of herpes labialis. *J Clin Virol* 2006; 37: 248-51.
59. Doornum GJJ, Guldemeester J, Osterhaus ADME, et al. Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 576-80.

60. Schmutzhard J, Riedel HM, Wirgart Z, et al. Detection of herpes simplex type 1, herpes simplex type 2 and varicella-zoster virus in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *J Clin Virol* 2004; 29: 120-6.
61. Özgan Y, Yağmur M, Güneşli A ve ark. Herpetik keratit tanısında polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile herpes simpleks virüs tip 1 tespiti. 1. Ulusal Viroloji Kongre Kitabı, Kuşadası, Aydın, 2003, s.334.
62. Bozkaya E. İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Temel İmmünoloji ve Viroloji Bilim Dalında Kasım 1993 - Kasım 1995 yılları arasında herpes simplex virüs izolasyonu. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 1995; 25 (1-4): 125-130.
63. Franzen-Röhl E, Lindell AT, Grillner L, et al. Increased detection rate in diagnosis of herpes simplex virus type 2 meningitis by real-time PCR using cerebrospinal fluid samples. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2516-20.
64. Kessler HH, Mühlbauer G, Rinner B, et al. Detection of herpes simplex virus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2638-42.
65. Eroğlu C, Güldiken T, Sarıkaya H ve ark. Herpes simplekse bağlı meningoensefalitlerin RT-PCR metodu ile saptanması. 2. Ulusal Viroloji Kongre Kitabı, Kemer, Antalya, 2005, s.230.
66. Dağlar D, Özcan A, Dilara İ ve ark. BOS örneklerinde Herpes simpleks virüs DNA'sının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. 2. Ulusal Viroloji Kongre Kitabı, Kemer, Antalya, 2005, s.281.
67. Hukkanen V, Vuorinen T. Herpesviruses and Enteroviruses in infections of the CNS: a study using time-resolved fluorometry PCR. *J Clin Virol* 2002; 25: 87-94.
68. Nahmias AJ, Whitley RJ, Visintine AN, et al. Herpes simplex virus encephalitis: laboratory evaluations and their diagnostic significance. *J Infect Dis* 1982; 145: 829-36.

69. Skoldenberg B, Forsgren M, Alestig K, et al. Acyclovir versus vidarabine in herpes simplex encephalitis. Randomised multicenter study in consecutive Swedish patients. *Lancet* 1984; ii: 707-711.
70. Lakeman FD, Whitley RJ. 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 Infections Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis* 1995;171: 857-63.
71. Tafreshi NK, Sadeghizadeh M, Amini- Babil- Olyae S, et al. Development of a multiplex nested consensus PCR for detection and identification of major human herpesviruses in CNS infections. *J Clin Virol* 2005; 32: 318-24.
72. Calvario A, Bozzi A, Scarasciulli M, et al. Herpes Consensus PCR test: a useful diagnostic approach to the screening of viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol* 2002; 25: 71-78.
73. Akçalı A, Özkaya E, Yılmaz D. Viral meningoensefalit şüpheli vakaların beyin omurilik sıvısı örneklerinde herpes simpleks virüs araştırılması. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongre Kitabı, Ankara, 2004, s.230.
74. Saatçi Deniz E. Aseptik menenjitli hastaların BOS örneklerinde enterovirüs ve herpesvirüslerin PCR yöntemiyle araştırılması. Uzmanlık tezi; Kayseri, 2007.
75. Ergünay K, Gülmez D, Haşçelik G ve ark. Herpes simpleks virüs tanısında RT-PCR: Hacettepe deneyimi. 2. Ulusal Viroloji Kongre Kitabı, Kemer, Antalya, 2005, s.310.
76. Rota S, Bozdayı G, Doğan B ve ark. Herpes simpleks virüsün klinik örneklerde RT-PCR ile saptanmasının önemi. 1. Ulusal Viroloji Kongre Kitabı, Kuşadası , Aydın, 2003, s.333.
77. Mengelle C, Sandres- Saune K, Miedouqe M, et al. Use of two real-time PCR's to detect herpes simplex type 1 and 2-DNA after automated extraction of nucleic acid. *J Med Virol* 2004; 74: 459-62.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Gülhan YAĞMUR'a ait "Klinik Örneklerde Çeşitli Yöntemlerle Herpes Simpleks Virüs Araştırılması" adlı çalışma, jürimiz tarafından Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 05/05/08

İmza

Başkan .. Prof. Dr. Yusuf Sebati .. İmza

Üye .. Prof. Dr. A. Süleyman SÜMERKAN .. İmza

Üye .. Prof. Dr. A. Nedret KOC .. İmza

Üye .. Bilgehan Aygen .. İmza

Üye .. Dr. Dr. Selma Çelebioğlu .. İmza