



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

ASEPTİK MENENJİTLİ HASTALARIN BOS ÖRNEKLERİNDE ENTEROVİRÜS VE  
HERPESVİRÜSLERİN HÜCRE KÜLTÜRÜ VE PCR YÖNTEMLERİ İLE  
ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Esmâ DENİZ

KAYSERİ-2006

## 2.1. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında ve tez çalışmalarında yanımda olan, desteklerini esirgemeyen anneme, babama, eşime ve ablama teşekkür etmek isterim.

Uzmanlık eğitimim süresince anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Yusuf ÖZBAL başta olmak üzere emeği geçen bütün öğretim üyelerine teşekkür etmek isterim.

Tez çalışmalarımda ve yanında çalıştığım eğitim döneminde bilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU'na yardımları için teşekkür ederim.

Tezimi çalışmamda ve eğitimimde bana destek olan birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve laboratuvarında çalıştığım arkadaşlarıma teşekkür ederim.

## 2.2. İÇİNDEKİLER

2.1. TEŞEKKÜR .....	i
2.3. KISALTMALAR .....	iii
2.4. TABLO LİSTESİ .....	v
2.5. ŞEKİL LİSTESİ .....	vi
2.6. ÖZET .....	vii
2.7. ABSTRACT .....	ix
<b>3.1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>3.2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
3.2.1. ENTEROVİRÜSLER.....	3
3.2.2.HERPES SİMPLİKS VİRÜS .....	14
3.2.3.SİTOMEGALOVİRÜS .....	23
3.2.4.VARİCELLA-ZOSTER VİRÜS .....	30
<b>3.3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>36</b>
<b>3.4. BULGULAR .....</b>	<b>50</b>
<b>3.5. TARTIŞMA .....</b>	<b>56</b>
<b>3.6. SONUÇLAR.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1. KAYNAKLAR.....</b>	<b>64</b>

## 2.3.KISALTMALAR

<b>Bp</b>	: Base pair
<b>BOS</b>	: Beyin omurilik sıvısı
<b>CA</b>	: Cocksackie A
<b>CB</b>	: coxsackie B
<b>CPE</b>	: Sitopatik etki
<b>CMV</b>	: Sitomegalovirüs
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>ELISA</b>	: Enzyme Linke ImmunoSorbent Assay
<b>ELVIS</b>	: Enzim bağlı virüs indüksiyon sistemi
<b>EV</b>	: Enterovirüs
<b>G</b>	: Glikoprotein
<b>Hep-2</b>	: Larinks epitelyal karsinoma hücre kültürü
<b>HeLa</b>	: Serviks epiteli karsinoması hücre kültürü
<b>HIV</b>	: Human Immunodeficiency Virus
<b>HSV</b>	: Herpes Simplex Virüs
<b>ICVT</b>	: International Committee on Taxonomy of Viruses
<b>kbp</b>	: Kilobase pair
<b>LBM</b>	: Lim ve Benyesh-Melnick
<b>MRC-5</b>	: Medical Research Council 5 (İnsan embriyonu akciğer fibroblast hücre kültürü)
<b>mRNA</b>	: Messenger RNA
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>MSS</b>	: Merkezi sinir sistemi
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>NPEV</b>	: Non polio enterovirüsler

<b>ORF</b>	: Open reading frame
<b>PP</b>	: Fosfoprotein
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>RT-PCR</b>	: revers transcription- PCR
<b>rpm</b>	: Rotation per minute
<b>SSS</b>	: Santral sinir sistemi
<b>Tm</b>	: Melting temperature
<b>TBE</b>	: Tris-Borate-EDTA
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>Vero</b>	: Afrika yeşil maymun böbrek hücre kültürü
<b>VZV</b>	: Varicella Zoster Virus
<b>WI-38</b>	: Wistar Institute-38 (İnsan embriyonu akciğer fibroblast hücre kültürü)

## 2.4.TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa no</b>
<b>Tablo 1:</b> BOS örneklerinden elde edilen PCR sonuçları .....	53
<b>Tablo 2:</b> BOS örneklerinden elde edilen hücre kültürü sitopatik etki sonuçları .....	53
<b>Tablo 3:</b> BOS örneklerinden elde edilen PCR ve Hep-2 hücre kültürü sonuçları .....	54

## 2.5. ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no

- Şekil 1:** Jel elektroforez sisteminde HSV-DNA pozitifliği ..... 52
- Şekil 2.1.** A.Hep-2 hücre kültürü. B.Hep-2 hücrelerinde HSV ile uyumlu sitopatik etki C. MRC-5 hücre kültürü D. MRC-5 hücrelerinde HSV ile uyumlu sitopatik etki. .... 55

## 2.6.ÖZET

**Amaç:** Aseptik menenjit birçok nedene bağı olarak gelişebilen, inflamatuvar bir meninks hastalığıdır. Virüsler akut aseptik menenjitin önde gelen etkenidir. Enterovirüsler viral menenjitlerin %80-95'inden sorumludur. HSV tüm aseptik menenjit vakalarının %0.5-3'ünü oluşturur. Bu çalışmada, aseptik menenjitli hastaların BOS örneklerinde hücre kültürü ve PCR yöntemleri ile enterovirüs, HSV, VZV ve CMV araştırılması amaçlandı.

**Gereç ve yöntem:** Mart 2004-Haziran 2005 dönemleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastaneleri Kliniklerinde takip edilen aseptik menenjit ön tanılı 30 hastadan alınan BOS örnekleri çalışmaya dahil edildi. BOS örneklerinde HSV-DNA HSV QL 1.0 (Fluorion, Iontek, Türkiye); CMV DNA CMV QL 1.0 (Fluorion, Iontek, Türkiye); VZV-DNA VZV DNA RealArt (Artus, Almanya) ve Enterovirus-RNA ise RealArt enterovirüs LC kitleri (Roche Diagnostics, ABD) ile araştırıldı.

Enterovirüs, HSV, VZV ve CMV izolasyonu için Hep-2 ve MRC-5 hücre kültürleri kullanıldı. Otuz örneğin 23'ünden Hep-2 ve MRC-5 hücre kültürlerine ekim yapıldı.



**Bulgular:** Çalışmaya alınan 30 örneğin 15'inde HSV-DNA pozitif bulundu. Örneklerin hiçbirinde CMV-DNA, VZV-DNA ve enterovirüs-RNA gösterilemedi. Hep-2 hücre kültürüne ekimi yapılan 23 örneğin 7'sinde 2. günde HSV ile uyumlu sitopatik etki görüldü. Bu örneklerin hepsinde HSV-DNA pozitif idi. HSV-DNA pozitif bulunan 1 örnekte ise HSV ile uyumlu sitopatik etki izlenmedi. MRC-5 hücre kültürüne ekimi yapılan 23 örneğin sadece birinde HSV ile uyumlu sitopatik etki izlendi, bu örnekte Hep-2 hücresinde HSV ile uyumlu sitopatik etki gözlemlendi ve HSV-DNA pozitif bulundu.

**Sonuç:** Sonuç olarak; aseptik menenjit ön tanılı hastaların BOS örneklerinde enterovirüs, HSV, CMV ve VZV'yi hücre kültürü ve PCR yöntemi ile araştırılması uygundur. Aseptik menenjit etkenlerinin hızlı ve doğru olarak belirlenmesinde her iki yöntemin birlikte kullanımı önerilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Aseptik menenjit, CMV, Enterovirüs, HSV, Hücre kültürü, PCR, VZV

**DETECTION OF ENTEROVIRUSES AND HERPESVIRUSES IN CSF OF THE  
PATIENTS WITH ASEPTIC MENINGITIS BY CELL CULTURE AND PCR  
METHODS**

**2.7. ABSTRACT**

**Aim:** Aseptic meningitis is an inflammatory disease of the meninges that caused by variety of agents. Viruses are the major cause of the acute aseptic meningitis. Enteroviruses are responsible for the 80-95% of viral meningitis. Herpes simplex meningitis consists of 0.5-3% of the all aseptic meningitis cases. In this study the aim was to investigate enterovirus, HSV, VZV and CMV in cerebrospinal fluid of the aseptic meningitis patients by cell culture and PCR methods.

**Materials and methods:**

Cerebrospinal fluid specimens of the 30 patients with suspicious aseptic meningitis treated in Erciyes University Gevher Nesibe Hospitals Clinics between march 2004 and june 2005 were included in this study. HSV-DNA was investigated in cerebrospinal fluid with HSV QL 1.0 (Fluorion, Iontek, Turkey); CMV DNA was investigated in cerebrospinal fluid with CMV QL 1.0 (Fluorion, Iontek, Turkey); VZV-DNA was investigated in

cerebrospinal fluid with VZV DNA RealArt (Artus, Germany) and Enterovirus-RNA was investigated in cerebrospinal fluid with RealArt enterovirus LC (Roche Diagnostics, USA) kits.

Hep-2 and MRC-5 cell cultures were used for isolation of enterovirus, HSV, VZV and CMV. Twentythree of the 30 specimens were inoculated to Hep-2 and MRC-5 cell cultures.

**Results:**

HSV-DNA was found positive in 15 of the 30 specimens. CMV-DNA, VZV-DNA and enterovirus-RNA was not found in any of the specimens. Seven of the HSV-DNA positive specimens could not be inoculated to cell culture because of the inadequate specimen. Cytopathic effect consistent with HSV was observed on the second day of inoculation in 7 of the 23 specimens which were inoculated to Hep-2 cell culture. HSV-DNA was found positive in all of these 7 specimens. Cytopathic effect consistent with HSV was not observed in one of the HSV-DNA positive specimens. Cytopathic effect consistent with HSV was observed in one of the 23 specimens which inoculated to MRC-5 cell culture, cytopathic effect consistent with HSV in Hep-2 cell culture was shown in this specimen and HSV-DNA was found positive.

**Conclusion:**

As a result; it is appropriate to investigate the cerebrospinal fluid specimens of the patients with suspicious aseptic meningitis for enterovirus, HSV, VZV and CMV by cell culture and PCR methods. It is suggested that these two methods be applied together for a rapid and correct detection of the aseptic meningitis agents is.

**Key words:** Aseptic meningitis, CMV, Enterovirus, HSV, Cell culture, PCR, VZV

### 3.1.GİRİŞ VE AMAÇ

Merkezi sinir sistemi (MSS) infeksiyonları, ciddi kalıcı sekellere veya ölüme yol açabilmesi nedeniyle, hızlı tanı gerektiren hastalıkların başında gelir. Aseptik menenjit birçok nedene bağlı olarak gelişebilen, inflamatuvar bir meninks hastalığıdır. Beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda pleositoz (lenfositler hakimiyette) ve protein artımının görüldüğü; rutin inceleme, boyama ve kültürlerde bir nedenin gösterilemediği durumlar aseptik menenjit olarak tanımlanır (1).

Virüsler akut aseptik menenjitin önde gelen etkenlerindedir. Ayrıntılı epidemiyolojik ve mikrobiyolojik araştırmalarda hastalarda %55-70'e varan oranlarda viral etken belirlenebilmektedir (2). Çeşitli çalışmalarda, viral menenjit ve ensefalit insidansı yılda 10-20/ 100.000 kişi olarak saptanmıştır. Çocuklarda özellikle bir yaş altında, olgu sayısının arttığı görülmektedir (3).

Viral menenjitlerin %80-95'inin etkeni enterovirüs (EV)'lerdir (1). Herpes Simplex Virüsleri (HSV) tüm aseptik menenjit vakalarının %0.5-3'ünün etkenidir (1). HSV tip 1 merkezi sinir sistemi infeksiyonları, tedavisiz kaldıklarında genellikle ölüme sonuçlanan ensefalit olarak seyrederken; HSV tip 2 menenjiti sağlıklı bireylerde kendiliğinden iyileşebilmektedir. Primer Varicella Zoster Virüs (VZV) infeksiyonunda nörolojik tutulum genellikle ensefalit olarak görülür. Herpes zosterli hastalarda da menenjit gelişebilmektedir. Sitomegalovirüs (CMV) özellikle immun yetmezliği olanlarda bir mononükleoz sendromu eşliğinde aseptik menenjite yol açabilir.

Viral menenjitlerin erken tanısı ve tedavisi morbidite ve mortalite oranlarında düşmeye neden olmaktadır. Viral etkenlerin tanısı, gereksiz antibiyotik veya antiviral kullanımını, invaziv ve pahalı ek testlerin yapılmasını önleyerek ve hastanede kalış süresini azaltarak ek yarar sağlamakta; epidemiyolojik bilgiler toplanabilmekte; koruyucu tedavi edici çalışmalar yapılabilmektedir.

Viral menenjitlerin laboratuvar tanısında antijen saptayan yöntemler, moleküler yöntemler, izolasyon ve serolojik yöntemler uygulanmaktadır. Santral sinir sistemi (SSS) infeksiyonu tanısında virüs antijenleri saptayan yöntemlerinin heterojenite göstermeleri ve çapraz reaksiyona açık olmaları bu yöntemlerin olumsuz yönleridir. BOS'da antikor düzeyleri araştırılırken; enterovirüslerin yaygın serotiplerinin olması IgM düzeylerinin güvenilirliğini kısıtlamaktadır. HSV'e bağlı aseptik menenjitlerde ise Ig düzeylerinin ölçümü primer-sekonder infeksiyon ve santral-periferel sinir sistemi infeksiyonlarının ayırımını yapamamaktadır (4,5). Moleküler yöntemlerin gelişmesinden sonra viral etkenlerin belirlenmesinde duyarlılık ve özgüllük artmıştır. BOS'ta Herpesvirüs-DNA ve Enterovirüs-RNA saptanmasında standart laboratuvar testi olarak uygulanmaktadır (6,7). Enterovirüsler ve herpesvirüs hücre kültürlerinde izole edilebilen virüslerdir.

Bu çalışmada aseptik menenjitli hastaların BOS örneklerinde; HSV, CMV, VZV ve enterovirüslerin hücre kültürü ve PCR (Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile araştırılması amaçlandı.

## 3.2.GENEL BİLGİLER

### 3.2.1. ENTEROVİRÜSLER

*Picornaviridae* ailesinin üyeleri, RNA içeren virüslerin en küçükleri arasında yer alır. İnsan ve bitki patojenlerini içeren geniş ve önemli ailelerden biridir. *Picornaviridae* ailesinde Enterovirüs, Hepatovirüs, Rhinovirüsler, Aphovirüs ve Cardiovirüs yer almaktadır (8).

#### 3.2.1.1. Tarihçe

Poliovirüs tanımlandıktan ancak 50 yıl sonra EV cinsi içinde sınıflandırılmıştır. Poliomyelitinin klinik ve epidemiyolojik yönlerine ilişkin ilk bulgular 19. yüzyıl sonlarında belirlense de, poliovirüs ile ilgili temel çalışmalar 1908 yılında Landsteiner'in hastalığı maymunlara geçirip incelemesiyle başlamıştır. Paul ve Trask, 1930'larda hastaların ve sağlıklı taşıyıcıların dışkıında poliovirüsü izole etmiş ve poliomyeliti bir enterik infeksiyon olarak tanımlamışlardır (9).

Poliovirüsler 1949 yılında Enders ve arkadaşları tarafından *in vitro* hücre kültüründe üretilen ilk virüslerdir. Bu çalışmalarla aynı zamanda modern anlamda ilk hücre kültürü doğmuştur. Bu çalışmaların ışığında polio aşılı geliştirilmiştir (10).

#### 3.2.1.2. Sınıflandırma

*Picornaviridae* ailesinde Rhinovirüsler, Enterovirüsler, Aphovirüsler (veya foot mouth disease virus), Cardiovirüsler ve Hepatovirüsler bulunmaktadır. Aphovirüsler ve Cardiovirüsler genellikle hayvanlarda hastalık

yapmaktadır. Enterovirüs cinsinde poliovirüsün 3 serotipi, coxsackie virüslerin 23 serotipi, echovirüslerin 31 serotipi, insan enterovirüs 68-71, hepatit virüs A ve insanda hastalık yapmayan enterik virüsler bulunmaktadır (11). Hepatit A virüs önceleri enterovirüs 72 olarak isimlendirilse de “International Committee on Taxonomy of Viruses” tarafından Hepatovirüs ismiyle yeni bir cins olarak değerlendirilmiştir (12,13).

Enterovirüslerin geleneksel taksonomik sınıflaması hücre kültürlerindeki her serotipin üreme özelliklerine ve hayvan sistemlerindeki hastalık oluşturmalarına göre yapılmaktadır (11).

### **3.2.1.3.Genel Özellikler**

Picornavirüslerin diğer üyeleri gibi EV’ler küçük, zarfsız, tek sarmallı pozitif polariteli RNA’ya sahiptir. Asit, eter, kloroform ve noniyonik deterjanlara karşı duyarsızdırlar. Formaldehit, 56°C üstündeki ısılarda, UV ışığında ve klorlama ile inaktive olurlar (11).

Enterovirüslerin RNA genomu yaklaşık 7.4 kb uzunluğundadır. Bu genomun 5’ ucunda bulunan ORF (“open reading frame”) üç bölgeye ayrılır (P1- P3). P1 viral kapsidi de içeren dört yapısal protein (VP1-VP4); P2 ve P3 ise yedi yapısal olmayan proteini kodlamaktadır (9,11).

Genomun 3’ ucuna yapışık olarak bulunan poly A proteini RNA’nın infektivitesini arttırırken 5’ ucunda bulunan VPg viral RNA sentezini başlatır. Bu bölgeler reverse transkriptaz-PCR ’da primer ve prob dizaynı için kullanılabilir (11).

### **3.2.1.4.Replikasyon**

Picornavirüslerin replikasyonu sitoplazmada gerçekleşir. VP1 hücrenin membranındaki özgül reseptöre bağlanır ve bağlanma yeri antikor nötralizasyonundan korunur. Reseptöre bağlanınca VP4 salınır ve virion güçsüzleşir. Genom membranda açılan bir kanaldan içeri enjekte edilir ya da endositozla içeri alınır. Bağlanmanın sonrasında RNA genomu hücre sitozolüne iletilir ve translasyon başlar. Yeni viral RNA’nın sentezlenmesinde ilk aşama gelen genomik RNA’nın tamamlayıcı negatif sarmallı RNA

oluşturmak üzere kopyalanmasıdır. Negatif sarmallı RNA, yeni pozitif sarmalların sentezlenmesi için kalıp oluşturur. Viral genom replikasyonu ve translasyonu sonucunda viral proteaz, poliproteinden yapısal proteinler oluşmasını sağlar. Virüs partikülü oluşmadan önce immatür VP0, VP1 ve VP3 protomerleri ayrılmalıdır. Bu aşamada oluşan provirion infeksiyöz değildir. İnfektif partikülün oluşumu için VP0'nun dört yapısal proteine (VP1-VP4) ayrılması gerekir. Virion genellikle hücreyi eriterek dışarı çıkar (9,14).

### **3.2.1.5. Patogenez ve Patoloji**

Enterovirüslerin vücuda girişinin ağızdan sindirim yoluyla olduğuna inanılmaktadır. İnkübasyon periyodu, genellikle 7-14 gün olmakla birlikte 2-35 gün arasında değişebilir. Virüsün ilk çoğalması farinks ve sindirim sistemi lenfoid dokularında olur. Viremi geliştikten sonra virüs yeniden retikuloendotelyal sisteme döner ve çoğalmaya devam eder. Sonuç olarak spinal kord, beyin, meninks, myokardium, cilt gibi hedef organlara giderek tutulurlar (9).

Genellikle virüs dışkı ile haftalarca atılır ve klinik ya da subklinik infeksiyon geçirenlerde infeksiyondan sonra 1-2 hafta farinkste bulunur. Enterovirüsler; dışkı, faringeal sürüntü, BOS, kan, konjunktival sıvı, cilt ya da müköz membrandaki lezyonlarda ya da hedef organda gösterilebilir (9).

Gastrointestinal sistemde iki ya da daha fazla EV eş zamanlı olarak çoğalabilir. Ancak birçok durumda bir virüsün çoğalması heterolog tipin çoğalmasıyla etkileşir. Bu nedenden dolayı aktif bir EV infeksiyonu ağız yoluyla alınan polio aşısını bloke edebilir. İmmünizasyonun sağlanması için aşılanmanın tekrarlanması gerekir (9).

Enterovirüslerle oluşan en ciddi hastalık poliomyelittir. Poliovirüs önce tonsillerde, boyun lenf düğümünde, Peyer plaklarında ve ince bağırsaklarda çoğalır. Ardından da kan yoluyla MSS tutulur. Poliovirüs, abortif form (minör hastalık) gelişen hastaların kanında, paralitik olmayan veya paralitik poliomyelit gelişen hastaların kanında klinik tablo gelişmeden gösterilmiştir (9).



Poliovirüs dışı enterovirüslere (non polio enterovirüsler = NPEV) bağlı olarak oluşan tablo, polio infeksiyonunun başlangıç aşamalarına benzer ancak hedef organlar çeşitlidir. Bazıları (echovirüs 4, enterovirüs 71) MSS etkileyerek menenjit, paraliz, bazıları da (Coxsackievirus B) infantlarda kardit ve pankreatit oluşturabilir. Diğer enterovirüslerden farklı olarak EV 70 parmak kontaminasyonu ile korneaya bulaşır ve 12-72 saat inkübasyon periyodu ile hızla infeksiyon oluşturur (9).

### **3.2.1.6.Klinik Özellikler**

Enterovirüsler; insan viral patojenlerinin en önemlileri ve en yaygınları arasındadır. NPEV'ler her yıl Amerika birleşik Devletleri'nde 30-50 milyon kişiyi infekte etmektedir. Bu infeksiyonlar nedeni ile iş gücü kaybı ve okul devamsızlıkları olmaktadır. Enterovirüs infeksiyonları yaz ve bahar aylarında sık görülür ve en çok çocukları etkiler. Enterovirüsler diğer patojenleri taklit edebileceği için sadece klinik olarak tanı konulması güçtür. Enterovirüslerin neden olduğu hiçbir hastalık herhangi bir EV serotipine özgül olmadığı gibi hiçbir serotipte tek bir hastalığa spesifik değildir. Bu nedenle genellikle bir hastalığa enterovirüsün neden olduğunu belirlemek yeterlidir (11).

### **Asemptomatik İnfeksiyonlar**

Enterovirüs infeksiyonlarının büyük kısmı asemptomatiktir ya da minör hastalıkla karakterizedir.

### **Poliomyelit**

İnfeksiyona duyarlı birey poliovirüse maruz kalırsa; semptomlar olmaksızın hafif infeksiyon, minör hastalık, aseptik menenjit, paralitk poliomyelit, polio aşısına bağlı poliomyelit ya da postpolio sendromu gelişebilir. Hastalık ilerlerken, genellikle bifazik bir giriş gözlenir. Minör hastalığı takiben semptomsuz birkaç günden sonra major hastalık gelişebilir. İnfeksiyonların yalnızca %1'i klinik hastalığa yol açar (9)

Paralitik olmayan poliomyelit poliovirüsün oluşturduğu aseptik menenjit tablosudur. Genel hafif hastalık bulgularına ek olarak, sırt ve boyunda ağrı ve sertlikle seyreder (9).

### **Menenjit**

Viral menenjitlerin en sık nedeni enterovirüslerdir. Enterovirüse bağlı viral menenjitlerde klinik bulgular konağın yaşı ve bağışıklık durumuna bağlıdır. Yenidoğan döneminde gelişen MSS infeksiyonunda ateş her zaman vardır. Kusma, emme güçlüğü, döküntü, üst solunum yolu hastalığı bulguları da eşlik edebilir. Enterovirüs meningoensefaliti bu dönemde yüksek morbidite ve mortalite riski taşır. Yenidoğan döneminde enteroviral MSS hastalığına sıklıkla diğer organ sistemlerinin tutulumu eşlik eder (14, 15).

Yenidoğan döneminden sonra karşılaşılan enteroviral menenjitte ağır klinik tablo nadiren görülmektedir. Hastalığın başlangıcı genellikle anidir. Bazı hastalarda ise birkaç gün süreli ateşli hastalık durumu görülebilir. Meningeal irritasyon bulguları, baş ağrısı, bulantı, kusma, iştahsızlık, döküntü, karın ağrısı, ishal, öksürük, kas ağrısı eşlik eden belirtilerdendir. Meningeal bulgular bir yaş altındaki çocuklarda belirlenemeyebilir. Mental durum bozulabilir ama fokal nörolojik bulgular beklenmez. Yüksek ateşle eş zamanlı çocuklarda konvülzyonlar görülebilir. Farenjit tüm nörotropik enterovirüs infeksiyonları seyrinde sıklıkla gelişir (14).

Poliovirüslerin üç tipi; coxsackie A (CA) tip 2, 4, 7, 9, 10; coxsackie B (CB) tip 1-6; echovirüs 1-11, 13-23, 25, 27, 28, 30, 31 enterovirüslerin aseptik menenjit yapan serotipleridir. Echovirüsün bazı tipleri de ensefalite neden olabilir. Enterovirüs tip 70, 71 de meningoensefalit etkenleri arasındadır (9).

### **Enterovirüslerin oluşturduğu diğer hastalıklar**

Enterovirüsler bu hastalıkların dışında; CB virüsü plörodinya, CA 1, 6, 8, 10, 22 herpanjina; CA 16 el, ayak, ağız hastalığı, CA 2, 10, 21, CB 2, 5 ise solunum yolu hastalıklarından sorumludur. Akut hemorajik konjunktivitten ise CA 24 ve enterovirüs tip 70 sorumludur. Coxsackie virüslerin alt grupları

akut myiokardiyopati ve perikardiyopati, kronik kardiyovasküler hastalıklar, pankreatit, ekzantemli yaz hastalığı, postviral yorgunluk sendromu ve neonatal hastalıklara neden olabilir. Pek çok enterovirüs suşu da diareye neden olabilir. Enterovirüsler içerisinde hepatit A ilk olarak enterovirüs tip 72 adıyla sınıflandırılırken daha sonra Hepatovirüs cinsi olarak sınıflandırılmıştır (9). Bunların dışında insüline bağımlı diyabet hastalarında coxsackie virüslerin etken olabileceği düşünülmektedir (9,11).

### **3.2.1.7.Laboratuvar Tanı**

Enterovirüslerin laboratuvar tanısı örneklerin direkt incelenmesi, virüs izolasyonu, virüs identifikasyonu. serolojik testler başlıkları altında toplanmaktadır.

#### **Örneklerin toplanması ve saklanması**

Enterovirüsler haftalarca su, vücut sıvılarında ve lağım sularında yaşayabilirler. Isıya dayanıklılık özellikleri; aside dayanıklı olmalarından ve zarfının olmamasından kaynaklanmaktadır. BOS, serum, tam kan ve idrar örnekleri steril tüplerde; rektal veya boğaz sürüntü örnekleri viral transport mediumunda laboratuvara gönderilmelidir. Biyopsi materyalleri ani dondurma işleminden sonra veya az miktarda steril izotonik tuz solüsyonu içerisine konularak laboratuvara ulaştırılmalıdır. Viral infektivitenin uzun süre korunabilmesi için örnekler  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmalıdır. Tekrarlanan dondurma çözdürme işlemleri sırasında viral kapsid bozulacağı için, örneklerin miktarı çok ise küçük miktarlara bölünerek saklanmalıdır (9,11).

#### **Örneklerin direkt incelenmesi**

Elektromikroskopik inceleme enterovirüslerin laboratuvar tanısında nadiren uygulanmaktadır. Enterovirüslerin ortak antijenlerinin olmaması immunolojik metodların gelişimini engellemiştir (9,11).

Enterovirüslerin tanısında nükleik asit hibridizasyonuna dayanan ELISA testleri de geliştirilmiştir (16). Ama enterovirüslerin direkt tanımlanmasında en önemli gelişme PCR yönteminin uygulanmasıyla olmuştur.

### PCR yöntemi

PCR Kary B. Mullis tarafından 1983 yılında tanımlanmış çok güçlü bir amplifikasyon tekniğidir. Enterovirüs için PCR uygulamalarında 3 genel yöntem belirlenmiştir. Bütün serotipleri belirleyen evrensel yöntem, belirli serotipleri belirleyen tür spesifik yöntem ve tek serotipi belirleyen serotip-suş spesifik yöntemlerdir. Grup spesifik enterovirüs PCR uygulamaları klinik örneklerdeki polio ve NPEV ayrımını yapmak için kullanılmaktadır. Serotip spesifik PCR ise genellikle moleküler epidemiyoloji veya enterovirüs suşlarının tek olarak filogenetik analizi için uygulanmaktadır. PCR yöntemi ile enterovirüslerin hücre kültüründe üremesi beklenmeden veya hücre kültürde üreyemeyen serotipler araştırılmaktadır (11).

PCR yöntemi örnekten nükleik asit izolasyonu, DNA'nın çoğaltılması ve belirlenmesi basamaklarından oluşur. Teorik olarak çoğaltma aşamasında her döngüde DNA iki katına çıkar. Virüsün nükleik asidi RNA ise çoğaltma işlemi başlamadan reverse transkripsiyon basamağı ile RNA DNA dönüşümü sağlanmalıdır (17).

Gerçek zamanlı (real time) PCR teknolojisi temel olarak nükleik asit dizisinin eş zamanlı olarak çoğaltılması ve kantitasyonuna dayanır. Bu amaçla, floresans veren bazı boya ya da proplar ile oluşan floresansı saptayabilen ısı-döngü aygıtları (thermal cyclers) kullanılır. Boyalar arasında en sık kullanılanı çift iplikli DNA'ya bağlanan SYBR Green I'dir. Tepkime sırasında hedef nükleik asit dizilerinin sayısı arttıkça, oluşan çift iplikli DNA moleküllerine giderek daha fazla sayıda SYBR Green I molekülü bağlanır ve daha fazla floresans oluşur. Oluşan floresans eş zamanlı olarak okunur. Gerçek zamanlı PCR uygulamalarında floresan veren oligonükleotid proplarda kullanılmaktadır. Taqman sisteminde propların 5' ucunda bir florofor, 3' ucunda ise bir sönmüleyici molekül bulunur. Prob serbest halde iken sönmüleyicinin etkisi ile floresan sinyali oluşmaz. Oysa prob hedef diziye bağlandığında, polimerazın 5' nükleaz etkinliği ile flor grubu serbest kalır ve oluşan sinyal aygıt tarafından saptanabilir. Gerçek zamanlı PCR teknolojisi

kullanılan sistemlerde çoğaltma ürünlerinin belirlenmesinde elektroforez gibi ayrı bir basamak kullanılmadığından hem zamandan kazanç sağlanılmakta hem de kontaminasyon riski azalmaktadır (18).

Enterovirüs genomu BOS, serum, idrar, perikardial sıvı gibi vücut sıvılarından; kalp, karaciğer, kas gibi dokulardan; gayta, rektal ve faringeal sürüntüden izole edilebilir (11).

### **Virüs izolasyonu**

Enterovirüs izolasyonu için genellikle dışkı, rektal sürüntü ve boğaz sürüntüsü kullanılmakla birlikte aseptik menenjit olgularında BOS örneğinden yararlanılmaktadır. Bu örneklerin dışında virüs vezikül sıvısı, idrar, burun salgıları ve konjunktivadan da izole edilebilir (11).

Enterovirüs infeksiyonlarının laboratuvar tanısında virüs izolasyonu önemli bir yer tutmaktadır (11). Hücre kültüründe üreyebilen enterovirüs serotipleri genellikle maymun böbrek hücrelerinde üretilmektedir. Ancak tüm olası tiplerin üretilmesi isteniyorsa en azından bir insan hücre kültürüne ( Hep-2, MRC-5, WI-38) inokülasyon yapılmaktadır (9). Ayrıca yeni doğmuş fareler, hücre kültürlerinde üremeyen grup A Coxsackievirüsün bazı tiplerinin tanımlanabilmesi için kullanılmalıdır (11).

Hücre kültüründe enterovirüslerin gelişimi genellikle sitopatik etki (CPE) ile belirlenir. İnfekte hücreler yuvarlaklaşır, küçülür, belirgin nükleer piknoz gösterir, refraktil olur ve sonuçta dejenere olarak besiyerine dökülürler (9).

Enterovirüslerin CPE'si ortalama 3,7-8,2 gün arasında görülmektedir. Enterovirüslerin izolasyonunda shell vial hücre kültürü kullanılabilir. Bu yöntemle tanı 2-3 gün içerisinde konulabilir ama geleneksel hücre kültürü yöntemine göre daha az duyarlıdır (19).

### **Virüs identifikasyonu**

Enterovirüslerin spesifik identifikasyonu genellikle nötralizasyon testleriyle yapılır. Bazı örneklerde, Hemagglütinasyon İnhibisyon, Kompleman Birleşmesi, İmmunfloresan Presipitin testleri uygulanmıştır. Kalabalık

enterovirüs ailesinin spesifik identifikasyonu için, standardize edilmiş iki set liyofilize tiplene antiserumu vardır. Sekiz havuz (A-H), hücre kültürlerinde kolayca üreyen 42 enterovirüse karşı antiserum; yedi havuz (J-P) ise hücre kültüründe üremeyen, yalnızca yenidoğan farelerde üretilebilen 19 adet CA serotipine karşı antikor içerir. Uluslararası standardize edilebilen hiperimmun antiserumların geliştirilmesinden sonra işlemler kolaylaşmıştır. Lim ve Benyesh-Melnick (LBM)'in tanımladığı kalıpta kombine antiserum havuzları oluşturulmuştur. LBM havuzları liyofilize formda Dünya Sağlık Örgütü laboratuvarlarından temin edilebilmektedir. (9).

### **Serolojik tanı**

Serolojik deneylerin EV serotipleri arasında büyük farklılıklar olması ve tek bir ortak antijenin bulunmaması nedeni ile enterovirüs tanısında sınırlı yeri vardır. Enterovirüslere karşı tipe özgül antikor varlığının araştırılması aşağıda belirtilen durumlarda gereklidir. Hastadan alınan örnekte bilinen bir enterovirüs izolatu varsa ve infeksiyon yapan serotipin doğrulanması gerekiyorsa, plörodinya ve miyokardit gibi hastalıklarda az sayıda antijenin serumda test edilmesi gerekiyorsa, tek bir serotipe bağlı salgın ilerliyorsa, bir seroepidemiolojik çalışma belli bir serotipe yönelik olarak başlatılmışsa, tipe özgül antikor araştırılması uygundur (9, 14, 20).

Nötralizan antikorlar infeksiyonun erken döneminde yükselir ve yıllarca yüksek kalırlar. Nötralizasyon testleri; tip spesifik bir testtir. Akut ve nekahat dönem serumları, belirli bir spesifik virüs miktarına karşı eş zamanlı olarak belirli dilüsyonlarda test edilir. Antikor titresinin dört kat artması, aktif infeksiyonun göstergesidir. Başlangıç ve nekahat dönemlerindeki antikor titreleri aynı ise daha önce geçirilmiş enterovirüs infeksiyonunu düşündürür. Oluşan nötralizan antikorlar yıllarca tespit edilebilir (9, 14, 20).

Kompleman birleşmesi antikorları infeksiyon sırasında belirir ancak, antikorlar birkaç ay içinde kaybolur ya da çok düşük düzeylere iner. İnfeksiyondan sonra gelişen tipler arası çapraz reaksiyonlar sebebiyle kompleman birleşmesi, birçok enterovirüsün tip özgüllüğü belirlenmesi

açısından minimal önem taşır. Buna karşın bu test poliovirüs infeksiyonunun tanısında başarılı olarak kullanılmalıdır (9, 14, 20).

Hemagglütinasyon inhibisyon testi enterovirüslerin tanısında uygulanmaktadır. Enterovirüslerle infekte olan hastalarda tipe özgül antikorlarla agglütinasyon gelişir ve bunlar yıllarca devam edebilir. Ayrıca enterovirüslerin serolojik tanısında ELISA yöntemi uygulanmaktadır (9, 14, 20).

### **3.2.1.8.Epidemiyoloji**

Enterovirüsler dünyanın her yerinde yaygın olarak bulunur, oldukça bulaşıcıdır ve sıklıkla asemptomatik infeksiyon yapar. Fekal-oral ve solunum yoluyla bulaşır. Enterovirüs taşıyıcılığı genellikle birkaç hafta ile sınırlıdır. Enterovirüslerin bilinen doğal kaynağı insandır, fakat poliovirüsler maymunlarda, coxsackievirüsler özellikle yeni doğmuş farelerde yüksek patojenite gösterir. Echovirüsler ise nadiren deney hayvanlarında hastalık oluşturur. Enterovirüs infeksiyonları, ılıman iklim kuşağında yaz ve sonbahar döneminde, tropik ve subtropik bölgelerde ise yıl boyu görülür (14, 20).

Çocuklar enterovirüs infeksiyonları için hedef kitledir. İnfeksiyon direkt veya indirekt olarak fekal-oral ve solunum yoluyla bulaştığı için, hijyenin bozuk olduğu ve kalabalık yaşam koşullarında daha yaygındır. Özellikle 5 yaş altı çocuklarda insidans daha yüksektir. Ekonomik seviyesi yüksek toplumlarda infeksiyon daha ileri yaşlarda görülmekte ve ciddi seyretmektedir. Virüsün çevre şartlarına dayanıklı olması, kişilerin dört aya kadar virüsü dışkıları ile çıkartabilmeleri ve mekanik olarak eklem bacaklılarla taşınabilmesi, infeksiyonun yayılmasının nedenleri arasındadır. Enterovirüs hastalıklarının inkübasyon periyodu genellikle 1-2 hafta olmakla birlikte bu süre kliniğe bağlı olarak 2-35 gün arasında değişebilir (14, 20).

### **3.2.1.9.Tedavi**

Yakın zamana kadar enterovirüs infeksiyonlarının spesifik bir tedavisi yoktu. Ciddi enteroviral infeksiyonlarda immunglobulin tedavi amaçlı kullanılabilir. İmmunglobulin tedavisinin agammaglobulinemi ve kronik

enterovirüs infeksiyonlarında sınırlı başarısı vardır. Yenidoğan bebeklerde ise immunglobulin tedavisi kesin bir etki göstermemektedir (14).

Son zamanlarda ise pleconaril ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Pleconaril viral kapsid proteinine bağlanarak virüsün hücreye girişini engellemektedir. Pleconaril genel dolaşımında bulunan enterovirüs suşlarının %90'ından fazlasına etki etmektedir. Pleconaril'in enteroviral menenjit ve immun yetmezliği olan hastalardaki enteroviral solunum yolu infeksiyonlarında etkisi araştırılmaktadır. Pleconaril tedavisi ile menenjit semptomlarının gerilediği ve hastaların günlük hayata dönüşünün daha erken olduğu gösterilmiştir (15,21).

### **3.2.1.10.Korunma ve Kontrol**

Poliovirüslerle oluşan hastalığın ciddiyeti sebebiyle bu hastalığa yoğun ilgi gösterilmiştir. İnfeksiyon oluşturan poliovirüs tipine karşı immunité kalıcıdır. Pasif immunité anneden bebeğe geçer. Maternal antikor zamanla azalıp altı aydan sonra kaybolur. Pasif olarak uygulanan antikorlar üç- beş hafta kadar koruyuculuk sağlar (9,14,20).

Virüs ile karşılaşılmasından sonraki birkaç gün içerisinde genellikle hastalık başlamadan nötralizan antikorlar oluşur ve hayat boyu kalır. Bu erken oluşan antikorların sebebi virüsün intestinal sistem ve derin dokulardan sinir sistemine invazyonundan önce çoğalmasıdır (9,14,20).

Polio aşısı, Jonas Salk tarafından geliştirilen inaktive aşısı ve Albert Sabin tarafından geliştirilen zayıflatılmış canlı oral aşısı olarak iki tiptir. Her iki tipte 3 polio suşunu içerir. Canlı aşısı uygulandıktan sonra sekretuar antikor cevabı oluşur. İnaktif aşısı ile immunizasyon virüsün bağırsakta üremesini engellemez. İnaktif polio aşısının yan etkisi yokken, canlı oral aşısının çok düşük oranda paralitik hastalık yapma riski vardır.Coxsackie ve Echovirüsler için aşısı bulunmamaktadır (9,14,20).



### 3.2.2.HERPES SİMPLEX VİRÜS

*Herpesviridae* ailesinin üyesi olan herpes simplex virüsü tarihin en eski dönemlerinden beri bilinen bir virüsdür. Değişik nedenlere bağlı olarak deride sinsice gelişen ve yayılım gösteren yaraları tarif eden “Herpes” kelimesi milat öncesinden beri kullanılmıştır.

*Herpesviridae* ailesinin üyeleri lineer çift sarmallı DNA içeren, ikosahedral kapsidi olan ve zarflı virüslerdir.

#### 3.2.2.1.Tarihçe

Antik Yunan döneminden beri bilinen virüsün lezyonları Romalı bilgin Herodotus ateşle ağızdaki lezyonlar ve dudak vezikülleri arasındaki ilişkiyi “herpes febralis” olarak tanımlanmıştır (22).

Herpes infeksiyonlarının lezyonları 18. ve 19. yüzyıllar arasında tarif edilmiştir. Andrews ve Carmichael 1930’da HSV’ye karşı nötralizan antikorların varlığını daha önce infekte olmuş erişkinlerin kanında göstermişler ve sadece böyle kişilerde tekrarlayan herpetik hastalığın meydana geldiğini bulmuşlardır. Birkaç yıl sonra, virüsün izole edildiği anatomik bölgenin genellikle antijenik tipte uygunluk gösterebileceğini gözlemişler ve HSV-1’in sıklıkla genital olmayan bölgelerde, HSV-2’nin genital infeksiyonla ilişkili olduğu bildirmişlerdir (22,23).

#### 3.2.2.2.Sınıflandırma

*Herpesviridae* ailesinde 100’den fazla virüs yer almaktadır. Sıcak ve soğukkanlı omurgalı ve omurgasız hayvanlar da virüsün konak alanları arasındadır. *Herpesviridae* ailesinin üyeleri lineer çift sarmallı DNA içeren, ikosahedral kapsidi olan ve zarflı virüsler ve ortak yapısal, kimyasal, biyolojik ve antijenik özellikleri paylaşırlar. Bu ailede yer alan insanı etkileyen herpes virüsler konak alanı, replikasyon süresi, sitotoksik özellikleri ve latentliğin daha sık meydana geldiği hücre tipi gibi fenotipik özelliklerine dayanarak üç alt aileye (alfa, beta, gama *herpesvirinae*) ayrılmıştır (23, 24).

Alfaherpesvirüsler çeşitli konaklarda bulunabilirler. Replikasyon süreleri diğer gruplara göre nispeten kısadır. Kültürlerde infekte ettikleri

hücrelerin bozulmasıyla hızla yayılırlar. Primer olarak ganglionlarda latent infeksiyon oluşturabilirler. Bundan dolayı nörotropik virüslerdir. Bu grupta HSV-1, HSV-2, VZV ve herpes B virüs bulunmaktadır (23,24).

Betaherpesvirüslerin konak alanları dardır. Replikasyon süreleri uzun olduğu için kültürlerde yavaş ürerler. İnfekte ettikleri hücreleri büyütme (sitomegali) özellikleri vardır. Salgı bezleri, lenforetiküler hücreler, böbrek ve diğer dokularda latent kalabilirler. Bu grupta CMV ve insan herpes virüs 6a, 6b ve 7 bulunmaktadır (23,24).

Gamaherpesvirüslerin konak alanı çoğunlukla doğal olarak infekte ettiği konağın aile ve takımı ile sınırlıdır. Gamaherpesvirüsler *in vitro* olarak lenfoblastoid hücrelerde replike olurlar. Bazıları aynı zamanda bazı tip epitelooid ve fibroblastoid hücrelerde litik infeksiyonlara neden olurlar. Bu virüsler B ve T lenfositlere özeldirler. Bu grupta Epstein-Barr virüs ve insan herpes virüs 8 yer almaktadır (23,24).

### **3.2.2.3.Genel Özellikler**

HSV tip-1 ve tip-2 herpesvirüs ailesinin alfaherpesvirüs subailesinde yer alır. HSV-1'in 152 kbp ve HSV-2'nin 155 kbp'lik lineer çift sarmallı genomları vardır. HSV-1 ve HSV-2'nin protein kodlayan bölgelerinde %83 oranında nükleotid benzerliği vardır. Tam virüs partikülünün çapı yaklaşık 120-300 nm dir. Dışta konak hücrenin nükleus membranından tomurcuklanarak alınan zarf bulunmaktadır. Zarfin yüzeyinde glikoprotein yapısında çıkıntılar bulunur. Zarf ile kapsid arasında tegument adı verilen fibröz proteinler içeren bir yapı bulunmaktadır. İkosahedral kapsidi 162 kapsomerden oluşmaktadır (22,23).

HSV'nin genomu 11 glikoprotein (gB-gM), kapsid proteini, viral protein kinaz, DNA polimeraz ve replikasyon için gerekli olan proteinleri kodlar. Glikoprotein C, E, G, I, J, M virüsün hücreye girişi ve infekte hücrelerden çıkışta rol oynamamaktadır. Glikoproteinlerden gB, gD, gH virüsün hücreye bağlanması ve girişi için önemlidir. Ayrıca nötralizan antikorların bağlandığı major epitoplara taşırlar. Glikoprotein D enfeksiyon için

esastır ve HSV-1 ve HSV-2 arasında yapı ve antijenitesi çok az değişir. Glikoprotein B ve D nötralizan antikorlara karşı esas epitoplari taşırlar ve virüsün hedef hücreye tutunmasını sağlarlar. Glikoprotein C infekte hücrelerin yüzeyindeki kompleman sisteminin C3b kompenentine bağlanır. Glikoprotein E ise IgG'nin Fc parçasına bağlanır. Glikoprotein G antijenik özgülüğü belirlediği için HSV-1 ve HSV-2 arasında antijenik cevapla ayrımı sağlar. Glikoprotein I'da glikoprotein E gibi IgG'nin Fc parçasına bağlanır. Glikoprotein J, K, L ve M'nin görevleri henüz tam anlaşılmamıştır (22,23).

HSV ısıya oldukça duyarlıdır. Virüsün yarılanma ömrü 37°C'de 1.5-3 saattir. Virüs infektivitesini -70°C'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, 56°C ve üstündeki sıcaklıklarda inaktive olur. Ultraviyole ışınlarına maruz kaldığında yarılanma ömrü 5-7 saniye kadardır. Formaldehitin %1'lik solüsyonu virüsü tahrip eder (22,23).

#### **3.2.2.4.Replikasyon**

HSV, birçok insan hücre tipini, hatta bazı hayvan hücrelerini de infekte eder. HSV genellikle fibroblast ve epitelyal hücrelerin litik infeksiyonuna sebep olurken nöronlarda latent infeksiyon oluşturur. HSV'nin her iki tipine ait reseptörler benzer hücrelerde bulunmasına rağmen farklı yapılara bağlanırlar. HSV'nin penetrasyonu viral zarf ve hücre yüzey membranının füzyonu ile gerçekteşir. Nükleokapsid hücre içine girdikten sonra kapsid genom ayrılır ve DNA sitoplazmada serbest kalır. Viral DNA nükleusa girer ve burada genomun transkripsiyonu ve replikasyonu olur. Genomun transkripsiyonu çok erken (alfa), erken (beta) ve geç (delta) olmak üzere üç fazdan oluşur. Viral proteinlerin sentezi sitoplazmada olur. Çok erken gen ürünleri DNA sentezini stimüle eden ve erken viral genlerin transkripsiyonunu başlatan DNA bağlayan proteinlerdir. Latent infeksiyon sırasında virüs replikasyonu çok erken fazdan sonra ilerlemez. İlk sentez edilen glikoproteinler gB ve gD, sınıya oluşumu için gereklidir ve virüsün hücre içinde yayılımını

uyarırlar. Kapsid proteinleri oluştuktan sonra nükleusa göç eder ve DNA moleküllerini çevreler. İleri aşamalarda kapsidler nükleus membranının viral glikoproteinlerle modifiye olmuş bölgelerinden tomurcuklanır. Viral partiküller daha sonra hücreyi terk eder. HSV'nin sinsityal suşları infekte hücrelerin füzyonuna sebep olup hücreden hücreye yayılır. Virüs uzun süre hücreye bağlı kalabilir. Virüsle infekte hücrelerde nükleer inklüzyon cisimcikleri görülmektedir. Viral replikasyonun tam siklusu infeksiyonu takiben yaklaşık 15 saat sürer ve üretilen her 100-1000 virüs partikülünden sadece 1'i infeksiyözdür (22,23).

#### **3.2.2.5.Patogenez ve Patoloji**

HSV'nin primer infeksiyonu genellikle asemptomatiktir. Önemli özelliği insanda latent duruma geçme eğilimi ve düzensiz aralıklarla aktive olmasıdır. HSV deri ve mukoza membranından vücuda girer. Genellikle lokalize infeksiyon yapar. Konağın immun durumu iyi değilse viremi oluşabilir. Akut herpes infeksiyonlarının karakteristik patolojik değişiklikleri; çok nükleuslu dev hücreler, epitel hücrelerinin balon dejenerasyonu, ödem, fokal nekroz ve eozinofilik Cowdry A tipi inklüzyon cisimcikleridir. İnfeksiyonda öncelikle polimorfonükleer lökositlerin daha sonrada mononükleer hücrelerin infiltrasyonu görülmektedir. Epitel hücrelerinin lizisi vezikül oluşumu ile sonuçlanır. Lezyon daha sonra püstüler hale gelir ve kabuk oluşur. Kabuklu lezyonlardan virüs çok az veya hiç izole edilemez. Virüs lezyon tabanındaki hücrelerden veya vezikül sıvısından izole edilebilir. Genellikle skar bırakmadan lezyon iyileşir. Primer infeksiyon sırasında bu bölgedeki sinir uçlarına geçen virüs retrograt aksonal akım ile arka kök ganglionlarına ulaşır. Arka kök ganglionlarında ikinci bir üreme ve daha sonra latent infeksiyon gerçekleşir. Tekrarlayan HSV infeksiyonları hemen daima homolog virüse karşı nötralizan antikorları olan kişilerde meydana gelir. HSV çeşitli stimülüslerle (stres, lokal travma, ateş, güneş ışığı, hormonlar ve menstruasyon) ile aktive olur. HSV-1 ektoderm kökenli dokuların (deri, mukoza, korneal epitel) genellikle trigeminal sinir ile innerve olan bölgelerin

infeksiyon oluşturur. HSV-2 ise daha çok genital mukozada infeksiyona neden olup sakral gangliyonda latent kalır. Hmoral ve hücrenel bağışıklık mekanizmaları virüs yayılmasını önlemeye yardımcı olmakta ancak hücrenel bağışıklık bozukluğu olan hastalarda ağır dissemine HSV infeksiyonu daha sık görülmektedir (22,25).

### **3.2.2.6.Klinik zellikler**

HSV-1 ve HSV-2' ye bağlı infeksiyonlar primer ve tekrarlayan infeksiyonlar şeklinindedir.

#### **Primer HSV infeksiyonları**

Bu grup infeksiyonlar virüsle ilk kez karşılaşan bireylerde görülür. İnfeksiyon genellikle semptomatik geçer. Orofaringeal hastalıklar, keratokonjunktivit, genital herpes ve herpetik dolama en sık görülen primer infeksiyon formlarıdır (22,25).

#### Sinir sistemi infeksiyonları

Herpes ensefaliti bütün yaş gruplarında ve yıl boyunca görülebilir ve ensefalitler arasında klinik tablonun ağırlığu ve %50-75'lik ölüm oranı ile birinci sırayı alırlar. Ensefalit, primer herpes infeksiyonu veya tekrarlayan mukokutanöz HSV infeksiyonu olan hastalarda oluşabilir. Beyin dokusu değişiklikleri başlamadan tedaviye başlanırsa mental ve nörolojik bozukluklar gibi kalıcı sekeller oluşumu engellenebilir. Yenidoğanlar hariç olguların tümünün etkeni HSV-1'dir. Klinik görünüm virüsün frontoorbital ve temporal korteksi tutmasına bağlı olarak gelişir. Hastaların %75'inde kişilik değişikliğu görülür. Ateş, baş ağrısı, ataksi, hemiparazi, disfazi, görme alanı bozukluğu, otonomik disfonksiyon, kusma, papil ödemi ve kasılmalar görülebilir. Olguların yaklaşık yarısında BOS'ta 500/mm<sup>3</sup> kadar eritrosit bulunur (22,25).

HSV-1 veya HSV-2 ile menenjit nadiren görülür. Ensefalite göre daha hafif seyreder. Bağışıklık sistemi yeterli olanlarda kendiliğinden ve sekel bırakmadan iyileēebilir (22,25).

### Neonatal herpes

Genital herpesi olan annelerin bebeklerinde görülmektedir. MSS infeksiyonları, jeneralize infeksiyonlar, deri, göz ve ağız infeksiyonlarına neden olabilir. Hafif olgular bile merkezi sinir sistemi infeksiyonlarına dönüşebileceği için mortalitesi yüksektir (22,25).

### **Tekrarlayan HSV infeksiyonları**

Bu grup infeksiyonlardan en sık görüleni herpes labialistir. Yineleyen herpes infeksiyonları vücudun diğer bölgelerinde de görülebilir. Bağışıklık sistem yetmezliği olan hastalarda suçiçeğini taklit eden yaygın deri döküntüleri oluşabilir (22,25).

Bazı durumlarda da ağız salgılarında bulunan HSV-1'in aspire edilmesi ile solunum yollarında infeksiyon yapabilir. İmmünsüpresif hastalarda özafajit görülebilen diğer hastalıklardandır (22,25).

Yenidoğan bebeklerde, immünsüpresif ve beslenme yetersizliği olan hastalarda dissemine HSV infeksiyonu olabilir (22,25).

### **3.2.2.7.Laboratuvar Tanı**

HSV laboratuvar tanısı örneklerin direkt incelenmesi, virüs izolasyonu, serolojik testler başlıkları altında toplanmaktadır.

### **Örneklerin Toplanması ve Saklanması**

Herpes virüsler vezikül sıvısı, boğaz çalkantı suyu, boğaz sürüntüsü, tükürük, vajinal sekresyon, BOS, idrar, konjuktival sürüntü, kan lökositleri ve organlardan alınan biyopsilerde bulunabilir (23).

Örnekler kültür ekimi için ısı kontrollü özel dengeli tuz solüsyonlarında (Hanks) gönderilmelidir. Örnekler 48 saat içerisinde ekimi yapılacaksa 4°C'de, süre uzayacaksa -70°C'de muhafaza edilmelidir. Nükleik asit araştırılan testlerde örnekler 72 saate kadar çalışılacaksa 4°C'de, süre uzarsa -20°C'de saklanılmalıdır (23).

### **Örneklerin direkt incelenmesi**

Herpes virüsünün histolojik tanısında mukokutanoz lezyonların taban kazıntısından alınan örnekler Giemza ve Wright boyama ile boyanarak incelenir. Tzanck testi denilen bu yöntemle çok çekirdekli dev hücreler görülür.

Klinik örneklerde HSV antijeni immunofloresan ve ELISA yöntemleri ile araştırılabilir (23,26).

### **Virüs izolasyonu**

Hücre kültüründe HSV'nin izolasyonu lezyonun safhası ile ilişkilidir. Virüs lezyon tabanındaki hücrelerden veya vezikül sıvısından izole edilebilir.

Diğer virüsler, bazı toksik faktörler HSV'nin sitopatik etkisini taklit edebileceği için oluşan CPE genel veya tip spesifik monoklonal antikorlarla doğrulanmalıdır. Bunun için en sık floresan konjugatlı antikor kullanılır (23).

Herpes virüsler en iyi insan diploid fibroblast hücrelerinde (WI-38, MRC-5), Afrika yeşil maymun böbrek (Vero), Hep-2 hücrelerinde üremektedirler. HSV'nin sitopatik etkisi genellikle 48-72 saat içinde gözlenir. Örneklerde yüksek titrede virüs bulunduğu CPE sıklıkla 24 saat içerisinde görülür. HSV'nin CPE'si sitoplazmik granülasyonla başlar, sonra hücreler büyür ve yuvarlaklaşır. İntranükleer inklüzyon cisimcikleri görülür. Özellikle yenidoğanlardan ve beyin dokusundan izole edilen virüslerde HSV tip tayini gerekmektedir (23).

Başka bir yöntemde HSV-1'nin UL39 geni sayesinde hücrede  $\beta$ -galaktosidazın varlığını araştıran ELVIS (enzim bağlı virüs indüksiyon sistemi) yöntemidir. HSV ile infekte olan hücre tarafından  $\beta$ -galaktosidaz salgınır ve oluşan renk değişikliğine göre ELVIS testi değerlendirilir (23,27,28)

### **PCR yöntemi**

HSV'nin laboratuvar tanısında diğer pek çok virüste olduğu gibi hücre kültürü altın standarttır. Ancak örneklerde virüsün saptanmasında PCR yöntemi hücre kültürüne kıyasla daha hızlı ve duyarlıdır (29,30). HSV menenjit ve ensefalit tanısında BOS'ta öncelikle HSV-DNA araştırılması önerilmektedir (31,32,33). İn-house PCR ile HSV-DNA araştırılabileceği gibi kontaminasyon

riskinin daha az olduğu ve daha hızlı sonuç veren gerçek zamanlı PCR yöntemiyle de araştırılabilir (23, 26).

### **Serolojik tanı**

HSV'ye karşı oluşan antikorlar kompleman birleşmesi, indirekt immunofloresan, ELISA ve nötralizasyon gibi serolojik yöntemlerle araştırılabilir. Bu yöntemlerle geçirilmiş HSV infeksiyonu IgG titresine bakılarak belirlenebilir. Ancak HSV-1 ve HSV-2 arasında çapraz reaksiyon olması tanıda problem yaratmaktadır. Tekrarlayan HSV infeksiyonlarında ise antikor titresi her zaman yükselmeyeceği için anlamlı değildir. Primer HSV infeksiyonlarında ise standart bir yöntem ile birlikte serolojik yöntemlerin kullanılması yararlıdır. HSV-IgM antikorları en çok yenidoğan infeksiyonlarında tanıya yardımcıdır ( 22,23,26).

### **3.2.1.8.Epidemiyoloji**

HSV-1 ve HSV-2 dünyada yaygın olarak bulunan virüslerdir. Mevsimsel dağılım göstermemektedir. Deney hayvanlarında kolayca infeksiyon yapabildikleri halde doğal rezervuarları insandır. Virüs ile infekte sekresyonlarla direkt temasla bulaş görülür. HSV-1 daha çok oral, HSV-2 ise daha çok genital sekresyonlardan bulaşır. Bulaş hem belirgin hastalığı olanlardan hem de asemptomatik taşıyıcılardan kaynaklanabilir. Herpes virüsler vücut dışında uzun süre canlı kalamadıkları için günlük kullanılan eşyalar ile bulaşma çok nadirdir (22,23,25).

Primer HSV infeksiyonu çoğunlukla 6 ay ile 5 yaş arasında meydana gelmektedir. Erişkinlerin %80'inden fazlasının HSV ile infekte olduğu gösterilmiştir. HSV-1 antikorı hayatın ilk on yılında ve HSV-2 püberteden sonra erişkinliğin erken yıllarında kazanılır. HSV-1 antikorı hayatın ilk dört yılında hızla yükselmekte ve muhtemelen aile içi bulaşı yansıtmaktadır (22,23,25).

### **3.2.2.9.Korunma ve Kontrol**

HSV infeksiyonundan korunabilmek için; sağlık personeli ve diş hekimlerinin infeksiyöz lezyonlar ile direkt temastan kaçınması, belirgin ve



yaygın herpetik lezyonları olan kişilerle sağlıklı kişilerin yakın ilişkiden kaçınması, aktif lezyonu olan veya geçirilmiş infeksiyon öyküsü olan HSV-2 seropozitif kişilerin cinsel ilişki sırasında kondom kullanmaları ve bebeklerin perinatal infeksiyondan korunması gerekmektedir. Annede tekrarlayan genital herpes hikayesi varsa, ama semptomatik değilse vajinal doğum yapılabilir (22,25).

Yineleyen genital herpesli hastalar yılda 12 veya daha fazla atak geçiriyorsa ve uzun sürüyorsa proflaksi uygulanmalıdır. Ancak hastanın bağışıklık yetmezliği varsa tekrarlama sıklığı ve şiddetine bakılmaksızın proflaksi yapılmalıdır. HSV infeksiyonlarından korunmak için çok sayıda aşı çalışması yapılmıştır (34). Son olarak çalışılan vaksinya virüsü ile HSV'nin rekombinasyonu ile elde edilmiş rekombinan aşı, vaksinya virüsüne ait yan etkilerden dolayı henüz kullanımda değildir. Diğer aşı ise HSV'nin glikoproteinlerinden hazırlanan bir subünit aşısıdır. Ama bu aşının sağladığı korumanın kısa süreli ve düşük düzeyde olması yaygın kullanımını kısıtlamıştır (22,25).

### **3.2.2.10.Tedavi**

HSV infeksiyonlarının tedavisinde birçok antiviral geliştirilmiştir. Ancak kullanılan ilaçlardan hiçbiri latent herpes virüsüne etki edememektedir. En çok kullanılan ilaç asiklovirdir. Asiklovir bir nükleozid analogudur ve HSV-1 ve HSV-2'ye etkilidir. Timidin kinaz ve hücrel kinazlar ile etkileşerek DNA polimeraz enzimini inaktive eder. Asiklovirin serum düzeyinin %50'si BOS'a geçer. Akut HSV gingivostomatitte oral kullanımı uygundur. Herpes labialiste prodromal dönemde oral kullanılır. Genital herpes infeksiyonunda oral yolla tedavi uygulanır. Neonatal herpes infeksiyonunda, ensefalit gelişen hastalarda, immunsupresif hastalarda, komplikasyon geliştiğinde ve ağır lokal infeksiyonda asiklovirin parenteral formu kullanılır. Tekrarlayan herpes ataklarında asiklovir yıllarca kullanılabilir. Asiklovire direnç gelişen hastalarda vidarabin ve foskarnet tedavisi uygulanabilir. Asiklovir ile birlikte

famsiklovir, valasiklovir HSV infeksiyonlarında kullanılan diğer antivirallerdir (22,23,25).

### **3.2.3.SİTOMEGALOVİRÜS**

CMV immun supresif kişilerde ciddi hastalık yapabilen herpes grubuna ait bir virüstür. CMV dünya üzerinde her bölgede görülebilir. Mevsimsel ya da epidemik değişiklik göstermemektedir (35). Dünya üzerindeki bireylerin %40-100'ü CMV ile hayatlarının bir döneminde karşılaşmıştır. CMV infeksiyonu en fazla sublinik olarak çocukluk döneminde geçirilmektedir (36,37).

#### **3.2.3.1.Tarihçe**

İnsan sitomegalovirüsü ilk defa 1904 yılında bebek otopsilerinde “protozoa benzeri” hücreler görülmesi ile tanınmıştır. Virüs 1956 yılında Weller, Smith ve Rowe tarafından ayrı ayrı izole edilmiştir. Sitomegalovirüs adı Weller tarafından infekte ettiği hücrelerde yaptığı değişikliklerden ötürü kullanılmıştır. Daha sonra ise virüs taksonomi komitesi tarafından Herpesvirüs 5 olarak adlandırılmıştır (38).

#### **3.2.3.2.Sınıflandırma**

Sitomegalovirüs *Herpesviridae* ailesinin betaherpesvirüs alt ailesinin üyesidir. Betaherpesvirüslerin konak alanları dardır. Replikasyon süreleri uzun olduğu için kültürlerde yavaş ürerler. İnfekte ettikleri hücreleri büyütme (sitomegali) özellikleri vardır. Salgı bezleri, lenforetiküler hücreler, böbrek ve diğer dokularda latent kalabilirler. Bu grupta CMV ve insan herpes virüs 6a, 6b ve 7 bulunmaktadır (24,35).

#### **3.2.3.3.Genel Özellikler**

Sitomegalovirüs herpesvirüs ailesinin genel özelliklerini taşımaktadır. CMV 120-200 nm çapında çift iplikli lineer DNA genomu içerir. İkosahedral kapsidi 162 kapsomer oluşturmaktadır. Kapsid dışında tegüment veya matriks olarak bilinen bir tabaka ve en dış kısımda da fosfolipidden zengin zarf vardır. Matriks proteinlerinin görevi henüz tam olarak anlaşılmamıştır ama pp65

(ppu183) protein kinazların yaptığı fosforilasyonun ana hedefidir ve antijenemi testinde araştırılan proteindir. Fosfoprotein UL32 (p150), ppUL44 (p52), ppUL80a (p38) ve ppUL57 (p130) immunojenik olup, serolojik tanıda yarar sağlar. CMV ısıyla (56°C'de 30 dakika), düşük pH, lipid çözücüler, ultraviyole ve dondurma-çözdürme işlemleri ile inaktive olur (35, 38, 39).

#### **3.2.3.4.Replikasyon**

CMV replikasyonu konak hücre çekirdeğinde gerçekleşir ve en erken, erken ve geç olmak üzere 3 gen ürünü eksprese eder. Virüsün hücre içinde çoğaldığı prodüktif infeksiyonda hemen daima değişik derecelerde hücre harabiyeti oluşur. Latent infeksiyonda ise hücre harabiyeti yoktur (35,38,40).

CMV infeksiyonu üç aşamada görülür. Replikasyon yaklaşık 48-72 saat sürmektedir. CMV replikasyonu farklılaşmış insan hücrelerinde, deri ve akciğer fibroblastlarında, aktive olmuş makrofajlarda ve farklılaşmış monositlerde gerçekleşmektedir (35,38,40).

CMV replikasyonu virüsün zarf glikoproteinlerinin hücreye tutunması ile başlar. Tutunmayı viral zarf ve hücre zarının füzyonu ile gerçekleştiren penetrasyon takip eder. Böylece kapsid açığa çıkar ve viral DNA çekirdek zarı porlarından çekirdeğe ulaşır. İlk aşamada yeni protein sentezine gereksinim duymadan eksprese edilen en erken gen ürünleri sentezlenir. Bu ürünler infeksiyonun geç dönemine kadar salgılanır ve muhtemelen düzenleyici rolü vardır. Geç dönemde ise yapısal proteinler salgılanır. Bunlardan nükleokapsid proteinleri çekirdekte toplanır ve DNA'yı sarar. Oluşan yapı hücre zarına taşınır ve ekzositoz ile salınır (35,38,40).

#### **3.2.3.5.Patogenez ve Patoloji**

CMV bazı hücresel proteinlerin ekspresyonunu arttırarak veya azaltarak hücre çoğalması gibi bazı hücre fonksiyonlarını bozabilmektedir. Bu sayede litik infeksiyon olmadan CMV sınırlı olarak eksprese edilmekte ve hücrelerde minimal CPE oluşturmaktadır. CMV aynı zamanda komşu hücrelerin fonksiyonlarını da engelleyebilir (35,38,40,41).

Semptomatik veya asemptomatik seyreden bir infeksiyonu takiben CMV konakçı dokularda devamlı olarak bulunur. Bu kişilerden yapılan kan transfüzyonu ve organ transplantasyonu sonucu virüs nakledilebilir (35,38,40,41).

CMV'ye karşı normal konakta özgül immün yanıt koruyucu olarak görülmektedir. Bu grupta klinik infeksiyon nadirdir. Eğer konakçının T hücre cevabı bazı hastalıklar veya iatrojenik olarak baskılanırsa latent virüs reaktifte olabilir (35,38,40,41).

### **3.2.3.6.Klinik Özellikler**

CMV infeksiyonun kuluçka süresi 4-8 haftadır. CMV bağışıklık sistemi normal olan bireylerde nadiren semptomatik hastalık oluştururken, immün yetmezlikli bireylerde özellikle transplant alıcılarında, HIV ile infekte kişilerde ve intrauterin infeksiyon sonrası yenidoğanda ciddi klinik tablolara neden olmaktadır (38,40).

#### **Normal konaktaki infeksiyonlar**

Bu grupta hastalık genellikle semptom vermez. CMV nadiren mononükleoz tablosuna neden olur. Olguların çok az bir kısmında hepatit, Guillain-Barre sendromu, aseptik menenjit görülebilir (39-41).

#### **Solid organ transplant alıcıları**

CMV transplant alıcılarında, CMV sendromuda denilen hafif derecede semptomatik olan, genellikle ateş, iştahsızlık ve halsizlikle karakterize bir infeksiyona neden olur. CMV sendromu genellikle kendiliğinden iyileşebilir. Bazı hastalarda da organ tutulumuna bağlı lokalize infeksiyonlar ve klinik bulgular oluşabilir. Lokalize infeksiyonlar genellikle akciğer, gastrointestinal sistem, karaciğer ve böbrekte olur (39-41).

#### **Kemik iliği transplant alıcıları**

Kemik iliği transplantasyonu sonrasında CMV'e bağlı olarak ateş, halsizlik, lökopeni, trombositopeni ve interstisyel pnömoni transplantasyon sonrasında genellikle ilk 120 gün içinde görülür. Pnömoni ağır seyirli olup mortalite hızı %84'tür (39-41).

### **AIDS’li olgular**

En sık olarak CMV retiniti görülür. AIDS’li olgularda santral sinir sistemi tutulumu sıktır ve CMV infeksiyonuna bağlı olarak genellikle poliradikülopati görülür. BOS incelemesinde polimorfonükleer lökositler, protein miktarında hafif artış ve şeker miktarında orta derecede azalma saptanır. Bakteriyel menenjitlerden bakteriyel kültürlerde üreme olmaması ile ayrılır. SSS ile ilgili olarak ayrıca meningoensefalit, periferel nöropati ve mononörit gelişebilir (39-41).

### **Konjenital CMV infeksiyonları**

Annede CMV infeksiyonu sonucunda intrauterin dönemde infekte olan bebeklerin yaklaşık %10-20’si doğumda semptomatiktir. Bu oranın ancak yarısında fulminan sitomegalik inklüzyon hastalığı görülür. SSS ile ilgili olarak mikrosefali, motor bozukluklar, korioretinit ve serebral kalsifikasyonlar görülebilir. CMV’e bağlı sarılık ve hepatosplenomegali bir süre sonra azalır, ancak nörolojik sekeller, mikrosefali ve mental retardasyon kalıcıdır. Doğum sonrasında alınan CMV infeksiyonlarında diffüz visseral tutulum ve SSS hastalığı gelişmez (39-41).

### **3.2.3.7.Laboratuvar Tanı**

Günümüzde sitomegalovirüs infeksiyonunun tanısında örneklerin direkt incelenmesi, virüs izolasyonu ve serolojik testler kullanılmaktadır.

### **Örneklerin direkt incelenmesi**

Histolojik ve sitolojik teknikler, elektron mikroskobu, viral proteinleri veya nükleik asitleri direkt tanımlayan yöntemler uygulanmaktadır. CMV varlığı antijenemi veya nükleik asit tayini ile belirlenecekse doku, solunum sekresyonları, idrar sedimenti, BOS, amnion sıvısı ve periferel kan lökositleri kullanılabilir (35).

CMV antijenemi testi periferik kan polimorfonükleer lökositlerinde CMV alt matriks proteini olan pp65’i saptamaya yönelik hızlı ve kantitatif sonuç verebilen bir testtir. Antijenemi testinin duyarlılığı hücre kültürlerinden yüksektir ve infeksiyonu daha erken dönemde saptayabilmektedir (35,39-41).

### PCR yöntemi

CMV hücre kültüründe geç ürer ve kullanılan klinik örnekler hücrelere toksik etki yapabilirler. Konjenital infeksiyonların tanısında ise virüs izolasyonu yetersiz kalabilir. Bu nedenle nükleik asit dizilerinin tayinine yönelik moleküler testler son yıllarda daha çok kullanılmaya başlanmıştır (37, 42) PCR yönteminin duyarlılığı antijenemi testi ve hücre kültüründen yüksektir ve bu testlerden daha erken dönemde virüsü saptayabilmektedir (35,39-41).

### **Virüs izolasyonu**

Virüs izolasyonu için idrar, solunum sekresyonları, BOS, tam kan örnekleri toplanabilir. İmmun yetmezlikli hastalarda özellikle kan lökositleri izolasyon için daha uygun örneklerdir. İzolasyon dokulardan yapılacaksa uygun viral transport besiyerleri kullanılmalıdır. Tüm örnekler en kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. CMV’de diğer virüsler gibi dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında canlılığını yitireceği için örnekler ya hemen çalışılmalı, 24-48 saat içerisinde çalışılacaksa 4°C’de saklanmalıdır. Örnek daha fazla bekleyecekse -70°C’de muhafaza edilmelidir (35,39-41).

Hücre kültürleri CMV infeksiyonu ve hastalıklarının tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. CMV en iyi MRC-5 ve diğer insan embriyonu akciğer fibroblast hücrelerinde üretilmektedir. CMV’nin hücre kültüründe replikasyonu oldukça yavaştır. Konvansiyonel hücre kültürlerinde 1-4 hafta arasında sitopatik etki izlenmektedir. Hızlı hücre kültürlerinde (shell-vial gibi) 24-48 saat arasında sonuç verilebilmektedir. Bu yöntemde CPE beklenmeden virüsün oluşturduğu en erken ve erken proteinler monoklonal antikorlarla araştırılmaktadır (35,39-41).

### **Serolojik tanı**

Serolojik olarak nötralizasyon testleri, hemaglutinasyon, enzim immünassay gibi yöntemlerle CMV’e karşı oluşan IgM ve IgG antikorları belirlenebilmektedir. Genel olarak CMV IgM antikorlarının veya iki farklı serum örneğinde CMV IgG antikorlarının titresinde dört kat artışın belirlenmesi akut CMV infeksiyonunu gösterir. Normal bireylerde CMV

mononükleozu ve konjenital CMV infeksiyonlarının tanısında CMV IgM pozitifliği anlamlıdır. Ancak immun yetmezlikli olgularda akut CMV infeksiyonlarının tanısında CMV IgM tayini anlamlı değildir. CMV IgM primer infeksiyonlarda olduğu kadar reaktivasyonlarda da yükselmektedir veya IgM pozitifliği primer infeksiyondan uzun süre sonra bile devam edebilmektedir. Gebede saptanan CMV IgM pozitifliğinin primer infeksiyondan kaynaklandığını kanıtlamak için en sık CMV IgG avidite testi kullanılmaktadır. Primer infeksiyonda IgG aviditesi düşük iken, sekonder infeksiyonda ise avidite yüksektir (35,39-41).

### **3.2.3.8.Epidemiyoloji**

CMV infeksiyonları tüm dünyada ve yaş gruplarında yaygın olarak görülmektedir. Seropozitivite oranları gelişmiş ülkelerde %50-60, gelişmekte olan ülkelerde ise %90-100 civarındadır. CMV infeksiyonu erken çocukluk döneminde ve cinsel aktivitenin artmasına paralel olarak reproduktif dönemde pik yaptığı bilinmektedir. Ülkemizde de CMV seroprevalansı yüksektir. Virüsün bulaşması plasenta yolu, cinsel ilişki, kan transfüzyonu, solid organ ve kemik iliği transplantasyonu ve virüs taşıyan kişilerle yakın temas sonucu olabilir (39,41).

CMV diğer herpes virüsler ile benzer olarak; primer infeksiyon, latent infeksiyon ve reaktivasyon ya da reinfeeksiyon şeklinde sekonder infeksiyona yol açabilir (39,41). CMV solid organ transplantasyonu, kemik iliği transplantasyonu ve HIV hastalarında görülen fırsatçı infeksiyonların başında yer almaktadır (43,44). Konjenital CMV infeksiyonu görülme oranı ise tüm canlı doğumlarda %0.2-2.2 arasındadır. Bu hastaların ancak %10-20'si semptomatiktir (42, 45).

### **3.2.3.9.Tedavi**

Gansiklovir, foskarnet, sidofovir ve famivirsen viral DNA polimerazı inhibe ederek CMV hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (39,41,46).

Gansiklovir CMV ile infekte hücrelerde hücresel enzimlerle aktif formuna dönüşür. Hücre içi aktif gansiklovir asiklovire göre 10 kat yüksek

düzye de bulunur. Gansiklovir BOS'ta %24-70 düzeyine ulaşır. Vitreus içi uygulamalar için göz implantı geliştirilmiştir. Gansiklovir CMV retinitinde ve pnömonisinde önerilmektedir. Gansiklovir, pnömoni, kolit, özofajit ve SSS infeksiyonunda daha az etkilidir. İlaça karşı hücre içi fosforilasyonunu sağlayan UL97 protein kinaz geninde değişiklik ile ve viral DNA polimeraz enziminde nokta mutasyon sonucu direnç gelişebilmektedir. Gansiklovi re direnç durumunda foskarnet kullanılabilir. Foskarnet, immunsupresif hastalarda CMV infeksiyonlarında önerilir. Viral DNA polimeraz geninde mutasyona bağlı olarak foskarnete direnç gelişebilir. Direnç durumunda sidofovir kullanılabilir (39,41,46).

Gansiklovir veya foskarnete dirençli CMV retinitinde sidofovir kullanımı önerilmektedir. Sidofovir direnci gansiklovi re benzer şekilde gelişebilir. İki ilaç arasında çapraz direnç söz konusudur (39,41,46).

Famivirs en başka tedavilere cevap vermeyen veya kontraendike olan CMV retinitinde intravitreal tedavi olarak önerilmektedir (39,41,46).

### **3.2.3.10.Korunma ve Kontrol**

Yenidoğanların ve CMV seronegatif transplant alıcıların CMV açısından korunması önemlidir. Korunma için genel olarak çevre hijyeni ve hastanede ellerin sık yıkanması önerilmektedir. Toplumda seroprevalans yüksek olduğu için kan ve kan ürünlerinin CMV yönünden değerlendirilmesi ancak özel durumlarda yapılmaktadır (39,41,46).

Kemik iliği ve böbrek transplant alıcılarında profilaktik olarak antiviral ilaçlar kullanılmaktadır. Asiklovir *in vitro* çalışmalarda etkili bulunmamıştır. Gansiklovir profilaksisi ise transplant alıcılarında infeksiyon insidansını belirgin olarak düşürmektedir. AIDS hastalarının retinit tedavisinde intra venöz gansiklovir uygulanması stabilizasyon ve gerileme sağlar. Bu hastalarda reaktivasyon daima görülür. Yaşam boyu supresyon tedavisi önerilir (39,41,46).

CMV hastalığı açısından risk grubu olan hastaların korunmasında aşı uygulaması henüz tam bir açıklık kazanamamıştır. CMV'den korunma için



canlı attenüe virüs, glikoprotein ve DNA plazmid aşu çalışmaları yapılmaktadır (47).

CMV infeksiyonundan korunmada diğer bir yolda pasif immunizasyondur. Özellikle transplantasyonda risk grubunu oluşturan vericinin seropozitif, alıcının seronegatif olduğu grupta alıcıların korunması ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (48,49).

### **3.2.4.VARICELLA-ZOSTER VİRÜS**

*Herpesviridae* ailesinin üyesi olan VZV morfolojik olarak HSV'ye benzer. Primer infeksiyon olarak varicella (suçiçeği, Chickenpox), reaktive olduğu zaman ise zona (Herpes zoster, Shingles) hastalığına neden olur. VZV'nin tek doğal kaynağı insandır.

#### **3.2.4.1.Tarihçe**

Suçiçeği eski zamanlarda iek hastalığı ile karıştırılıyordu. İlk kez Heberden 1769 yılında suieğinin ayrı bir hastalık olduğunu, Steiner ise 1875'de bunun bir infeksiyon hastalığı olduğunu bildirmiştir. Weller 1958 yılında varicella ve zona hastalığından VZV'i izole etmiştir. Varicella ve zona veziküllerinden izole edilen VZV'nin morfolojisi ve DNA moleküler ağırlıkları ile endonükleaz kalıplarının benzer olması, her iki hastalıkta aynı tip histopatolojik veziküller ve doku kùltürlerinde eozinofilik intranükleer inklüzyonlar ile çok çekirdekli dev hücreler oluşması nedeniyle, bu iki hastalığın etkenlerinin VZV olduğu gösterilmiştir (50-52).

#### **3.2.4.2.Sınıflandırma**

VZV herpesvirüs ailesinin alfaherpesvirüs alt ailesinin üyesidir. Alfaherpesvirüsler çeşitli konaklarda bulunabilirler. Replikasyon süreleri diğer gruplara göre nispeten kısadır. Kùltürlerde infekte ettikleri hücrelerin bozulmasıyla hızlı yayılırlar. Primer olarak ganglionlarda latent infeksiyon oluşturabilirler. Bundan dolayı nörotropik virüslerdir. Bu grupta HSV-1, HSV-2, VZV ve herpes B virüs vardır (24,53).

### **3.2.4.3.Genel Özellikler**

VZV'nin genel özellikleri diğer herpes virüslerine benzer. Lineer çift sarmallı DNA'sı 125 000 baz çifti uzunluğundadır ve 75 protein kodlamaktadır. Virüsün lipid yapısında zarfı ve glikoprotein çıkıntıları vardır. Sadece zarflı virionlar infeksiyözdür. Zarf deterjanlara ve etere duyarlıdır. VZV hücreden hücreye direkt temas ile bulaşmaktadır. İnfeksiyöz virüs, plazma membranına füzyondan sonra hücrelere yapışarak yayılmaktadır. VZV herpes simpleks virüslerinin aksine deney hayvanlarında hastalık oluşturmaz (50-52).

### **3.2.4.4.Replikasyon**

VZV infekte ettiği hücrenin çekirdeğinde ve uzun zamanda ürer. Replikasyonu herpes simpleks virüsüne benzer. Hücredeki infeksiyöz virüs hücreye bağlı kalır ve hücre harabiyeti sonucu infekte ettiği hücrenin çekirdek zarından kılıf alarak salınır (52,53).

### **3.2.4.5.Patogenez ve Patoloji**

Virüsün vücuda giriş yolu ya üst solunum yoludur ya da konjunktiva mukozasıdır. Burada virüs replike olduktan sonra kan dolaşımına geçip viremi oluşturur. Viremi genellikle düşük düzeyde ve geçicidir. Ancak şiddetli ve progresif VZV varlığında viremi devam eder. Viremi döneminde virüs deriye lokalize olur. Virüsün infeksiyonu ile kütanöz ve mukozal lezyonlar ortaya çıkar. Epitel hücrelerinde şişme ve balonlaşma görülür, doku sıvısının birikimi sonucu veziküller oluşur. Virüsün replikasyonu ve yayılımı konağın humoral ve hücrel immün yanıtı ile sınırlandırılır. Virüs duyu ganglionlarında latent olarak kalır (50-52).

Reaktivasyonun en önemli nedeninin hücrel immunitedeki zayıflık olduğu ve bunun ganglionda viral replikasyonla sonuçlanarak inflamasyon ve ağrı oluşturduğu düşünülmektedir (50-52).

VZV'nin gebelikte önemli etkileri vardır. Hem gebede hem de fetüste hastalık yapabilir. Gebelerde primer infeksiyon normal popülasyona göre daha ağır seyretmektedir (50-52).

### **3.2.4.6.Klinik Özellikler**

VZV'nin oluşturduğu primer infeksiyon olan suçiçeği en sık 10 yaş altı çocuklarda görülür. İnkübasyon dönemi 10-21 gündür. Genellikle hafif şiddette, jeneralize veziküler lezyonlarla karakterize bir infeksiyon oluşturur. Lezyonlar ilk olarak baş ve gövde de ortaya çıkar ve ekstremitelere yayılım gösterir. Aynı anda farklı evrelerde lezyonlar (papül, vezikül, krut) gözlenmesi tipiktir (50,51).

Primer VZV infeksiyonu çocuklarda genellikle komplikasyonsuz seyrederken, erişkinlerde oldukça ciddi klinik tablolara yol açabilir. Pnömoni ve ensefalit gibi komplikasyonlara yol açabilecekleri gibi hastalık ölümle de sonuçlanabilir. Zona latent VZV infeksiyonunun reaktivasyonu sonucu meydana gelir ve daha sık olarak erişkinlerde görülür. Hem primer hem de sekonder infeksiyonlar immün yetmezliği olan hastalarda yaygın ve fatal seyreden infeksiyonlar oluşturabilirler (50,51).

### **3.2.4.7.Laboratuvar Tanı**

VZV infeksiyonları çoğu zaman klinik olarak tanınır. Laboratuvar tanısı nadiren gereklidir. Virüsü doku veya sıvılarda göstermek için; örneğin direkt incelemesi, virüs izolasyonu ve serolojik yöntemler uygulanmaktadır (53).

### **Örneklerin Toplanması ve Saklanması**

VZV'i göstermek için veziküler lezyonlardan sürüntü, cilt kazıntı örneği, veziküler sıvı, BOS ve otopsi doku örnekleri kullanılabilir. İmmunfloresan boyama yöntemi için uygun örnek lezyonun selüler kısmından sürüntü alınmasıdır (51-53).

### **Örneklerin direkt incelenmesi**

VZV ile infekte hücrelerde indirekt immunfloresan yöntemiyle membran antijenlerini belirleyen floresans antikör membran antijen testi kullanılmaktadır (50). VZV infeksiyonu tanısında PCR ve immunfloresan boyama yöntemleri virüs izolasyon yöntemlerine göre daha duyarlı bulunmuştur (54).

### PCR yöntemi

İmmünesupresif hastaların BOS ve kan örneklerinde PCR yöntemi ile virüs araştırılmaktadır. VZV enfeksiyonu tanısında in house, gerçek zamanlı PCR ve “touchdown PCR” yöntemleri uygulanmaktadır. (17).

“Touchdown PCR” optimal primer bağlanma derecesini belirlemektedir. Amplifikasyonun ilk siklusunda bağlanma derecesi olarak, hesaplanan T<sub>m</sub> derecesinin yaklaşık 15°C üzerinden başlanmakta, takip eden sikluslar esnasında 1-2 derece düşürülerek T<sub>m</sub> derecesinin takriben 5°C üzerine kadar gelmektedir. Kalan sikluslar, belirlenen sıcaklıkta tamamlanmaktadır. Böylece hedef bölgeye özgü ampikonlar elde edilmektedir (52,53)

### **Virüs izolasyonu**

Örnekler uygun ve steril transport besiyerlerinde soğuk zincirle bir an önce laboratuvara ulaştırılmalıdır. Örnekler hemen çalışılmayacaksa -70°C’de saklanmalıdır (51-53).

VZV insan fötal diploid böbrek veya insan diploid akciğer hücrelerinde iyi üretilmektedir. VZV doku kültüründe fokal sitopatik etki yapmaktadır. VZV’nin sitopatik etkisi hücrelerde küçülme, birbirinden ayrılma, refraktil hücrelerin hilal şeklinde dizilimi ile karakterizedir. CPE 2-14 gün arasında izlenmektedir. Genellikle 3-7 gün içerisinde sitopatik etkisi görülmeye başlanır (51-53).

### **Serolojik tanı**

Suçiçeğinin tanısında serum örneklerinde VZV IgM ve IgG antikorlarının gösterilmesine yönelik floresan antikor, ELİSA, immunoblotting, latex aglütinasyon ve antikomplementer immun floresan testleri uygulanmaktadır. Varicella öyküsü olmayan erişkinlerde ve toplumun %75’inden fazlasında VZV antikorları bulunduğu halde semptomsuz varicella geçirenlerde serolojik tanı önemlidir. (50-52).

### **3.2.4.8.Epidemiyoloji**

VZV’nin tek doğal kaynağı insandır. Duyarlı kişilerde virüsün primer enfeksiyonu suçiçeği şeklinde seyrederek. En sık 2-6 yaş arasında görülür. Yıllık

epidemileri daha çok kış sonu ve bahar aylarındadır. İnsandan insana veziküllerin direkt teması, damlacık infeksiyonu ve hava yolu ile bulaşarak epidemilere neden olur (50,51).

Herpes zoster sadece primer VZV infeksiyonu geçiren kişilerde görülür. VZV ile infekte kişilerin yaklaşık %10-20'sinde zona gelişir. Zoster lezyonlarında canlı virüs bulunur ve suçiçeği geçirmemiş bağışık olmayan çocuklar için infeksiyon kaynağı olabilir. Zona latent virüs reaktivasyonu sonucu ortaya çıkan bir klinik durum olduğundan mevsimlerle ilişkili değildir (50,51).

#### **3.2.4.9.Tedavi**

Asiklovir, valasiklovir, famsiklovir ve vidarabin VZV infeksiyonunun tedavisi için kullanılan lisanslı ilaçlardır.

Asiklovir, hastalığın başlangıcında yayılmayı önlemektedir. İmmün yetmezliği olan hastalarda ve varicellaya bağlı komplikasyon geliştiğinde asiklovir uygulanmalıdır. Zonali hastalarda virüsün bulaşma riskini, akut ağrının süresini ve şiddetini, oküler, motor ve merkezi sinir sistemi komplikasyonlarını azaltmak için asiklovir önerilmektedir (39,46,50).

Valasiklovir asiklovirin L-valil esteri olan bir ön ilaçtır. Oral emilimi asiklovirden %20-80 daha fazladır. İyi emilimi ve kullanım kolaylığı nedeni ile herpes zoster hastalığında önerilir. Famsiklovir normal immüniteli hastalarda akut, komplike olmayan herpes zoster infeksiyonlarında kullanılır. Vidarabin ise yeni lezyonların oluşumunu baskılamaktadır (39,46,50).

#### **3.2.4.10.Korunma ve Kontrol**

Hastalar su çiçeğinin tipik belirtileri görülmeden 24-48 saat önce de virüsü bulaştırabildiğinden duyarlı kişiler bu dönemde infekte olabilirler. Daha çok okul çağı çocuklarda salgınlar görülür. Hafif seyirli bir hastalık olduğu için korunmaya yönelik bir çalışma yapılmamaktadır. Ancak immün sistem yetmezliği olan hastalarda ağır ve ölümcül seyredebileceğinden bu hastaların VZV ile infekte hastalar ile teması engellenmelidir. VZV Oka suşundan

hazırlanan canlı attenüe aşı bir çok ÷lkede kullanılmaya başlanmıştır. Çocuklarda tek doz aşı klinik olarak etkili immunitte sağlar (39,50,51).

Varicella zoster immunglobulin proflaksisi, varicella veya herpes zosterli hastalarla yakın temasta olan immun yetmezlikli çocuklar, gebeler gibi riskli ve daha önce virüsle karşılaşmamış duyarlı kişilerde ilk 96 saat içerisinde uygulanmalıdır (39,50,51).

### 3.3. GEREÇ VE YÖNTEM

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

#### 3.3.1. HASTALAR VE ÖRNEKLER

Mart 2004-Haziran 2005 dönemleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastaneleri Kliniklerinde takip edilen aseptik menenjit ön tanıli 30 hastadan alınan BOS örnekleri çalışmaya dahil edildi.

Hastaların 12'si pediatrik infeksiyon hastalıkları, 12'si infeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji, 2'si çocuk acil, 1'i büyük acil, 1'i dahiliye yoğun bakım, 1'i pediatrik yoğun bakım, 1'i nöroloji servisinde takip edildi. Hastaların 15'i pediatrik yaş grubunda (6 ay-11 yaş), 15'i erişkin yaş grubunda (19-67 yaş) idi. Hastaların 20'si kadın 10'u erkekti. Hastaların 5'i klinik takip altındayken ex oldu, 25 hasta taburcu edildi.

Hastalardan BOS örnekleri steril şartlarda lomber ponksiyon ile klinisyen tarafından alındı. BOS örnekleri çalışılincaya kadar ikişer tüp olarak -70°C'de saklandı. Yedi hastadan alınan BOS örneği azdı.

BOS örneklerinden HSV-DNA, VZV-DNA, CMV-DNA, enterovirüs-RNA izolasyon ve amplifikasyonu Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji laboratuvarında yapıldı.

Virüs izolasyonu Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'da Hep-2 ve MRC-5 hücreleri kullanılarak yapıldı.

### **3.3.2. HSV-DNA, VZV-DNA, CMV-DNA, ENTEROVİRÜS- RNA PCR TESTLERİ**

Örneklerden nükleik asit izolasyonu PureArt DNA Mini Kiti (QIAGEN, Almanya) ile yapıldı. Tüm amplifikasyon işlemlerinde aynı izolatlar kullanıldı.

HSV-DNA belirlenmesinde HSV QL 1.0 (Fluorion, Iontek, Türkiye); CMV DNA belirlenmesinde CMV QL 1.0 (Fluorion, Iontek, Türkiye); VZV-DNA belirlenmesinde VZV DNA RealArt (Artus, Almanya) ve Enterovirus-RNA belirlenmesinde RealArt enterovirüs LC (Roche Diagnostics, ABD) kitleri kullanıldı. Nükleik asit izolasyon ve amplifikasyon çalışmaları üretici firmaların önerileri doğrultusunda yapıldı.

#### **Örneklerden nükleik asit izolasyonu**

Çalışılacak BOS örnekleri çalışmadan önce 15-25°C oda sıcaklığına getirildi.

#### **Kit içeriği:**

- QIAamp Spin kolonu
- Toplama tüpleri (2 mL'lik)
- Bufffer AL
- Buffer ATL
- Buffer AW1 (konsantre)
- Buffer AW2 (konsantre)
- Buffer AE
- Proteinaz K

#### **Kit içeriği dışında kullanılan malzemeler:**

- Vorteks
- 56°C'de etüv
- Santrifüj
- %96'lık etil alkol
- 1,5 mL'lik steril ependorf tüpleri



### **Testte kullanılan solüsyonların hazırlanışı:**

19 mL buffer AW1 üzerine 25 mL etil alkol ilave edildi.

13 mL buffer AW2 üzerine 30 mL etil alkol ilave edildi.

### **Nükleik asit izolasyon prosedürü**

- 1- Steril ependorf tüpleri hazırlandı ve her tüpe 20 µL proteinaz K eklendi.
- 2- Tüplere 200 µL örnek eklendi.
- 3- Tüplere 200 µL buffer AL eklendi ve tüpler 5 saniye vortekslendi.
- 4- Tüpler 56°C etüvde 10 dakika inkübe edildi.
- 5- Tüpler kapakta biriken damlacıkların tabana inmesi için kısa süreli santrifüj edildi.
- 6- Tüplere 200 µL etil alkol ilave edilip 15 saniye vortekslendi. Tüpler kapakta biriken damlacıkların tabana inmesi için kısa süreli santrifüj edildi.
- 7- Tüplerdeki karışımın tamamı toplama tüplerine konulan kolonlara alındı ve 6000 x g'de (8000rpm) 1 dakika santifüj edildi.
- 8- Kolonlar santrifüjden alınıp temiz toplama tüplerine alındı. Kolonların kapakları dikkatlice açılıp ve üzerine 500 µL buffer AW1 eklendi ve 6000 x g'de (8000rpm) 1 dakika santifüj 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 000rpm) 3 dakika santifüj edildi.
- 10- Kolonlar santrifüjden alınıp temiz toplama tüplerine alındı ve 20 000 x g'de (14 000rpm) 1 dakika santifüj 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 (8000rpm) 1 dakika santifüj edildi.
- 12- Kolonlar atılıp ependorf tüplerindeki saf nükleik asit PCR çalışması için saklandı.

**HSV-DNA, VZV-DNA, CMV-DNA, enterovirüs-RNA  
amplifikasyonu**

**1- HSV-DNA amplifikasyonu**

**HSV-DNA amplifikasyon karışımı:**

- PCR miks ( HotStarTaq polimeraz, QuantiTect Probe PCR tamponu, dUTP içeren dNTP karışımı, 8mM MgCl <sub>2</sub> )	12.50µL
- Deteksiyon miks ( HSV genomu için özgül forward ve reverse primerler -0.8µM- )	0.70 µL
- Distile su	1.80 µL
<hr/>	
Toplam	15.0 µL

**Testin uygulanması:**

- 1- Amplifikasyon aşaması izolasyon odasından farklı bir odada yapıldı. Önceden %10'lik hipokloridli su ile silinmiş ve ultraviyole ışığı ile sterilize edilmiş laminer akım içerisinde çalışıldı. Amplifikasyon kiti çalışma anına kadar buz kalıbı üzerinde bekletildi.
- 2- Örnek sayısı, pozitif ve negatif kontrol sayısı kadar PCR tüpü hazırlandı.
- 3- Örnek sayısı, pozitif ve negatif kontrol sayısı kadar PCR amplifikasyon karışımı tek ependorf tüpüne hazırlandı ve PCR tüplerine 15'er µL dağıtıldı.
- 4- Kit içerisinde çıkan pozitif kontrol, HSV-DNA içermeyen negatif kontrol ve hasta örneklerinden 10'ar µL PCR tüplerine dağıtıldı.
- 5- Tüpler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD) PCR cihazına yerleştirildi.

6- Örneklerdeki nükleik asit “thermocycler” cihazında aşağıdaki sikluslar kullanılarak çoğaltıldı.

95°C’de	13.30 dakika	} 50 döngü
95°C’de	00.30 dakika (denatürasyon)	
55°C’de	00.45 dakika (bağlanma)	
72°C’de	00.45 dakika (uzama)	
72°C’de	03.00 dakika	

7- Reaksiyon sona erdikten sonra PCR ürünleri 100 mL TBE 1X tamponu içerisine 1gr agaroz (%1) ısıtılarak eritilip, el yakmayacak kadar soğuduktan sonra 6 µL “ethidium bromide” katılarak yatay jel elektroforez tankına döküldü.

8- Çoğaltılan örneklerden 9’ar µL alıp üzerine 1’er µL yükleme boyası karıştırılarak donmuş olan jeldeki kuyucukların dibine düşmesi sağlandı.

9- Yatay jel elektroforez tankındaki jelin içindeki örnekler 150 voltta 20 dakika yürütüldü.

10- Jel translüminatörde ultraviyole ışık altında incelendi. Örnekler 188 bp uzunluğunda olan pozitif kontrol ile aynı bölgede bant verdiği pozitif kabul edildi.

## 2- CMV-DNA amplifikasyonu

### CMV-DNA amplifikasyon karışımı:

- PCR miks	12.50 µL
( HotStarTaq polimeraz, QuantiTect Probe PCR tamponu, dUTP içeren dNTP karışımı, 8mM MgCl <sub>2</sub> )	
- Deteksiyon miks 1	1.30 µL
( CMV genomu için özgül forward ve reverse primerler -0.7µM- )	
- Distile su	1.20 µL
<hr/>	
Toplam	15.0 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 kiti çalışma anına kadar buz kalıbı üzerinde bekletildi.
- 2- Örnek sayısı, pozitif ve negatif kontrol sayısı kadar PCR tüpü hazırlandı.
- 3- Örnek sayısı, pozitif ve negatif kontrol sayısı kadar PCR amplifikasyon karışımı tek ependorf tüpüne hazırlandı ve PCR tüplerine 15'er µL dağıtıldı.
- 4- Kit içerisinde çıkan pozitif kontrol, CMV-DNA içermeyen negatif kontrol ve hasta örneklerinden 10'ar µL PCR tüplerine dağıtıldı.
- 5- Tüpler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD) PCR cihazına yerleştirildi.
- 6- Örneklerdeki nükleik asit "thermocycler" cihazında aşağıdaki sikluslar kullanılarak çoğaltıldı.

95°C'de	13.30 dakika	}	50 döngü
95°C'de	00.30 dakika (denatürasyon)		
54°C'de	01.00 dakika (bağlanma)		
72°C'de	01.00 dakika (uzama)		
- 7- Reaksiyon sona erdikten sonra PCR ürünleri 100mL TBE 1X tamponu içerisine 1gr agaroz (%1) ısıtılarak eritilip, el yakmayacak kadar soğuduktan sonra 6 µL "ethidium bromide" katılarak yatay jel elektroforez tankına döküldü.
- 8- Çoğaltılan örneklerden 9'ar µL alıp üzerine 1'er µL yükleme boyası karıştırılarak donmuş olan jeldeki kuyucukların dibine düşmesi sağlandı.
- 9- Yatay jel elektroforez tankındaki jelin içindeki örnekler 150 voltta 20 dakika yürütüldü.
- 10- Jel translüminatörde ultraviyole ışık altında incelendi. Örnekler 224 bp uzunluğunda olan pozitif kontrol ile aynı bölgede bant verdiği pozitif kabul edildi.

### 3- VZV-DNA amplifikasyonu

#### VZV -DNA amplifikasyon karışımı:

- VZV GEL Master 45 µL

---

Toplam 45 µL

#### Testin uygulanması:

- 1- Amplifikasyon aşaması izolasyon odasından farklı bir odada yapıldı. Önceden %10'lik hipokloridli su ile silinmiş ve ultraviyole ışığı ile sterilize edilmiş laminer akım içerisinde çalışıldı. Amplifikasyon kiti çalışma anına kadar buz kalıbı üzerinde bekletildi.
- 2- Örnek sayısı, pozitif ve negatif kontrol sayısı kadar PCR tüpü hazırlandı.
- 3- PCR tüplerine 45'er µL VZV GEL Master dağıtıldı.
- 4- Kit içerisinde çıkan pozitif kontrol, VZV-DNA içermeyen negatif kontrol ve hasta örneklerinden 5'er µL PCR tüplerine dağıtıldı.
- 5- Tüpler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD) PCR cihazına yerleştirildi.
- 6- Örneklerdeki "thermocycler" cihazında aşağıdaki sikluslar kullanılarak çoğaltıldı.
  - a) Hot start enziminin başlangıç aktivasyonu:  
94°C'de 05.00 dakika

b) DNA amplifikasyonu ( Touchdown PCR):

94°C'de	00.30 dakika	}	5 döngü
55°C'de	00.30 dakika		
72°C'de	00.40 dakika		

94°C'de	00.30 dakika	}	5 döngü
53°C'de	00.30 dakika		
72°C'de	00.40 dakika		

94°C'de	00.30 dakika	}	35 döngü
50°C'de	00.30 dakika		
72°C'de	00.40 dakika		

c) Son elangasyon:

72°C'de 10.00 dakika

- 7- Reaksiyon sona erdikten sonra PCR ürünleri 100 mL TBE 1X tamponu içerisine 2 gr agaroz (%2) ısıtılarak eritilip, el yakmayacak kadar soğuduktan sonra 6 µL “ethidium bromide” katılarak yatay jel elektroforez tankına döküldü.
- 8- Çoğaltılan örneklerden 9’ar µL alıp üzerine 1’er µL yükleme boyası karıştırılarak donmuş olan jeldeki kuyucukların dibine düşmesi sağlandı.
- 9- Yatay jel elektroforez tankındaki jelin içindeki örnekler 150 voltta 40 dakika yürütüldü.
- 10- Jel translüminatörde ultraviyole ışık altında incelendi. Örnekler 224 bp uzunluğunda olan pozitif kontrol ile aynı bölgede bant verdiği pozitif kabul edildi.

#### 4- Enterovirüs-RNA amplifikasyonu

##### Enterovirüs-RNA amplifikasyon karışımı:

- Enterovirüs LC Master 15.0 µL

---

Toplam 15.0 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 kiti çalışma anına kadar buz kalıbı üzerinde bekletildi.
- 2- Örnek sayısı, kantitatif standartlar ve negatif kontrol sayısı kadar LightCycler® kapiller tüpü 4°C ısıdaki LightCycler® soğuk bloklara konuldu.
- 3- Örnek sayısı, kantitatif standartlar ve negatif kontrol sayısı kadar PCR amplifikasyon karışımı tek ependorf tüpüne hazırlandı ve LightCycler® kapiller tüplerine 15'er µL dağıtıldı.
- 4- Kit içerisinde çıkan enterovirüs (60 000 kopya/µL, 6000 kopya/µL, 600 kopya/µL ve 60 kopya/µL) kantitatif standartlar, enterovirüs-RNA içermeyen negatif kontrol ve hasta örneklerinden 5'er µL LightCycler® kapiller tüplerine dağıtıldı. Kapiller tüplerin ağızları kapatıldı.
- 5- Kapiller tüpler özel santrifüj tüplerine konularak 400 x g'de ( 2000 rpm) 10 saniye santrifüj edildi.
- 6- Örneklerdeki nükleik asit LightCycler® termal cihazında aşağıdaki sikluslar kullanılarak çoğaltıldı. LightCycler® termal cihazına bağlı bilgisayarda teste uygun program oluşturularak amplifikasyon verileri toplandı.

a) RNA'nın reverse transkripsiyonu:

50°C'de 10.00 dakika

b) Hot start enziminin başlangıç aktivasyonu:

95°C'de 00.10 dakika

c) cDNA amplifikasyonu:

94°C'de 00.01 dakika

55°C'de 00.15 dakika

72°C'de 00.15 dakika

} 50 döngü

d) Soğutma:

40°C'de 00.30 dakika

7- LightCycler® termal cihazında gerçek zamanlı PCR metodu ile yapılan çalışmada kullanılan prob hedef diziye bağlandığında florimetrik renkler oluşur. Cihaz tarafından algılanan renkler bilgisayar programı ile veri haline getirildi.

8- Florimetrik kanallarda sinyal algılandığında sonuç pozitif olarak değerlendirildi.

### **3.3.3. HSV, VZV, CMV ve ENTEROVİRÜS'ÜN KLASİK HÜCRE KÜLTÜR YÖNTEMLERİ**

Virüs izolasyon aşamaları ise DEKAM'da Hep-2 ve MRC-5 hücreleri kullanılarak yapıldı. Bu çalışmada kullanılan Hep-2 hücre kültürleri İstanbul Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarından, MRC-5 hücreleri ise Ankara Şap Enstitüsü'nden temin edildi. Otuz örneğin 23'ünden Hep-2 ve MRC-5 hücre kültürlerine ekim yapıldı. Hep-2 hücreleri 14 gün, MRC-5 hücreleri ise 28 gün süreyle CPE açısından incelendi.



### **Kullanılan besiyerleri ve malzemeler:**

#### **1- Hanks' dengeli tuz solüsyonu;**

- Hanks' solüsyonu ( Sigma, 10X)	10 mL
- Steril deiyonize su	90 mL
- %4.4'lük NaHCO <sub>3</sub>	1 mL

#### **2- Gelişme besiyeri;**

- RPMI 1640 besiyeri (10X)	10 mL
- Steril deiyonize su	90 mL
- %4.4'lük NaHCO <sub>3</sub>	3.5 mL
- 200 mM L-glutamin	1 mL
- Fetal bovine serumu (56°C'de 30 dakika inaktive edilmiş)	10 mL
- 10 000 U/mL penisilin (final konsantrasyon 100 U/mL)	1 mL
- 10 000 U/mL streptomisin (final konsantrasyon 100 U/mL)	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;**

- Tripsin ( Sigma)	2.5 mg
- Hanks' dengeli tuz solüsyonu	100 mL

Tripsin ve Hanks' dengeli tuz solüsyonu karışımı 1 saat manyetik karıştırıcıda işlem gördükten sonra kullanıma hazır hale geldi.

### **Hücre kültürü laboratuvarında kullanılan cihazlar:**

- 1- CO<sub>2</sub>'li etüv
- 2- Class 2A koruma kabini (hücre kültür çalışmalarının bütün aşamaları önceden %70'lik alkol ile silinip ultraviyole ışınlarla steril edilmiş bu kabinde yapıldı.)
- 3- Santrifüj
- 4- Benmari
- 5- İvert mikroskop

### **Hep-2 ve MRC-5 hücrelerinin çoğaltılması:**

- 1- Doku kültürü şişelerinde (75 cm<sup>2</sup>'lik) tam tabaka halinde bulunan Hep-2 ve MRC-5 hücrelerinin üzerindeki besiyeri alındı.
- 2- Doku kültürü şişesi üzerine 10 mL Hanks' dengeli tuz solüsyonu eklenerek hücreler yıkandı. Hanks' dengeli tuz solüsyonu döküldü.
- 3- 10 mL Hanks' dengeli tuz solüsyonu içerisine 1 mL tripsin eklenerek elde edilen solüsyon doku kültürü şişesi üzerine eklendi. Birkaç dakika bekletildikten sonra karışım döküldü. Doku kültürü şişeleri 37 °C'de 5-10 dakika bekletilerek hücrelerin şişenin yüzeyinden ayrılması sağlandı.
- 4- Hücreler doku kültürü şişesinin yüzeyinden ayrılıp hareket etmeye başlayınca üzerine 10 mL gelişme besiyeri konuldu. Hücrelerin kümeleşmesini önlemek için iyice pipetaj yapıldıktan sonra 2 adet boş doku kültürü şişesine eşit biçimde dağıtıldı.
- 5- Yeni hazırlanan doku kültürü şişeleri üzerine şişe hacminin % 10'unu tamamlayacak kadar (yaklaşık 20-25 mL) gelişme besiyeri konuldu ve pipetaj yapıldı.
- 6- Tripsin uygulanan doku kültürü şişesi üzerine 25-30 mL kadar gelişme besiyeri eklendi.
- 7- Doku kültürü şişeleri %5 CO<sub>2</sub>'li 37°C'de etüvde inkübe edildi.
- 8- Hücreler doku kültürü şişelerinin yüzeyini tek tabaka halinde tamamen kaplayana kadar besiyeri 24-48 saatte bir gelişme besiyeri ile değiştirildi.

### **Hücrelerin daha sonra kullanılmak üzere dondurulması:**

- 1- Hücreler üzerlerindeki besiyeri alınarak yukarıda anlatılan pasaj işlemlerindeki gibi tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı.
- 2- Hücreler santrifüj tüpüne alınarak 750-1000 rpm devirde 5-10 dakika santrifüj edildi.
- 3- Üstteki süpernatant atıldı. Gelişme besiyeri ve fetal bovine serumu bire bir oranında karıştırıldığı solüsyon hücre pelleti üzerine konuldu ve süspanse edilip mL'de  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde ticari saklama tüpüne (kriyotüp) dağıtıldı.
- 4- Hazırlanan hücre karışımı üzerine %10 dimetilsülfoksit konuldu ve pipetaj yapıldı.
- 5- Hücreler  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika bekletildikten sonra,  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat ve takiben  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece tutulduktan sonra kriyotüpler alınıp sıvı azot tankına kaldırıldı.

### **Donmuş hücrelerinin çözündürülüp doku kültürü şişelerine alınması:**

- 1- Kriyotüp  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de sıvı azot tankından çıkarılır ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'deki su banyosunda ani olarak çözündürüldü.
- 2- Kriyotüp içerisindeki hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne alınarak 1000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi.
- 3- Süpernatant atıldı ve hücre pelleti üzerine 5-10 mL % 20 fetal bovine serumu içeren besiyeri konularak iyice pipetaj yapıldı. Hücre süspansiyonu steril doku kültürü şişesine transfer edildi. Üzerine doku kültürü şişesinin hacminin %10'u kadar olacak şekilde besiyeri ilave edildi ve pipetaj yapıldı.
- 4- Doku kültürü şişeleri %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda  $37^{\circ}\text{C}$ 'de etüvde inkübe edildi.
- 5- Bir gece bekletildikten sonra besiyeri dimetilsülfoksitin toksik etkisinden korumak için gelişme besiyeri ile değiştirildi.

### **Örneklerin inokülasyonu :**

- 1- Hücreler üzerlerindeki besiyeri alınarak yukarıda anlatılan pasaj işlemlerindeki gibi tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı.
- 2- Süspansiyon halindeki hücreler steril tüplere 2 mL konuldu.
- 3- Tüpler CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de muhafaza edildi.
- 4- Hücreler tek tabaka halinde tüpleri kaplayınca besiyeri devam besiyeri ile değiştirildi.
- 5- Hücreler tek tabaka halinde tüpleri kaplayınca üstündeki besiyeri döküldü. Oda sıcaklığına getirilen BOS örneklerinden 200 µL pastör pipeti ile ekildi. 1 saat %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C'de etüvde inkübe edildi.
- 6- Süre sonunda BOS örneği hücrelerin üstünden alındı ve üzerlerine 2mL devam besiyeri konuldu.
- 7- Tüpler %5 CO<sub>2</sub>'li 37°C'de etüvde inkübe edildi.
- 8- Sitopatik etkiyi değerlendirmek için gün aşırı olarak hücreler invert mikroskopla incelendi.
- 9- Değerlendirme sırasında besiyeri rengi sarıya dönüşürse (hücre metabolizmasından dolayı asidik ortamın meydana gelmesi) besiyerleri değiştirildi.
- 10- Sitopatik etki değerlendirilirken hücrelerde görülen değişiklikler kayıt edildi.
- 11- Hücrelerdeki sitopatik etkinin HSV, CMV, VZV ve enterovirüs için özgü olup olmadığı değerlendirildi.
- 12- Sitopatik etki görülmeyen kültürler HSV, CMV, VZV ve enterovirüs açısından negatif kabul edildi.

### 3.4. BULGULAR

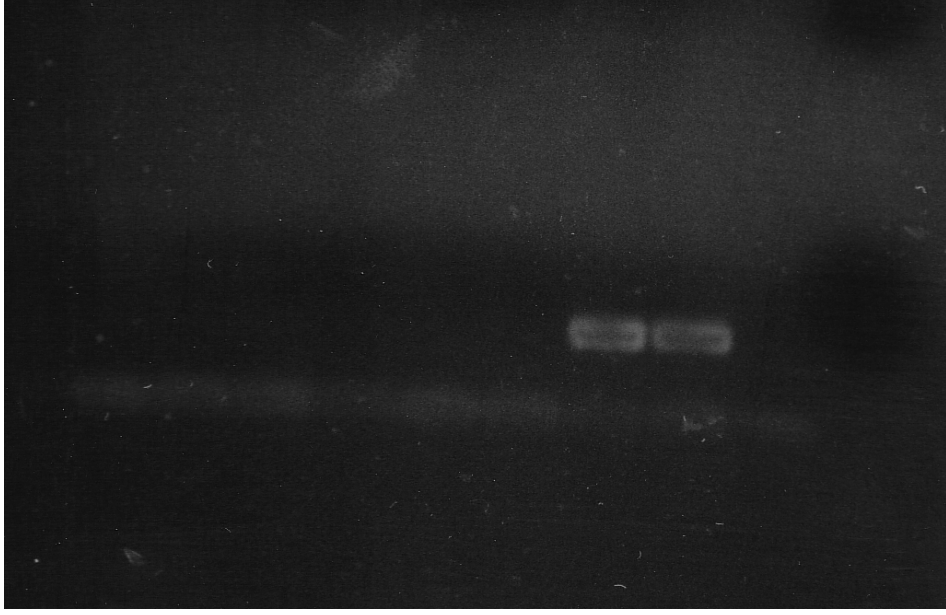
Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastaneleri Kliniklerinde takip edilen aseptik menenjit ön tanılı 30 hastadan alınan BOS örnekleri çalışmaya dahil edildi.

Bütün hastaların BOS örnekleri rutin biyokimyasal, rutin bakteriyolojik incelemeye alındı. BOS örneklerinin hiçbirinde gram boyama ve kültürde bakteri gösterilemedi. Örneklerin biyokimyasal bulguları ise aseptik menenjit, ensefalit ile uyumlu (mononükleer hücre hakimiyeti, protein miktarının hafif artmış, glukoz miktarının normal olması) idi.

Çalışmaya alınan 30 örneğin 15'inde (%50) HSV-DNA pozitif bulundu (Şekil 1). Örneklerin hiçbirinde CMV-DNA, VZV-DNA ve enterovirus-RNA gösterilemedi (Tablo-1).

Hep-2 hücre kültürüne ekimi yapılan 23 örneğin 7'sinde HSV ile uyumlu sitopatik etki görülürken, 16 örnekte CPE izlenmedi. CPE görülen 7 örnekte HSV-DNA pozitif bulundu. HSV-DNA pozitif olan 1 örnekte Hep-2 hücre kültüründe CPE izlenmedi. HSV-DNA pozitif bulunan 7 örnekte ise örnek yetersizliğinden dolayı hücre kültürü çalışması yapılamadı. Hep-2 hücrelerinde HSV ile uyumlu CPE görülen hücrelerde 2. günden itibaren yuvarlaklaşma görüldü. Gün aşırı yapılan takiplerde hücrelerdeki yuvarlaklaşma ve hücreler arasındaki mesafede artış gözlemlendi (Tablo-2, Tablo-3) (Şekil 2A, 2B).

MRC-5 hücre kültürüne ekimi yapılan 23 örneğin sadece birinde HSV ile uyumlu sitopatik etki izlendi. Bu örnekte Hep-2 hücrelerinde HSV ile uyumlu sitopatik etki gözlemlendi ve HSV-DNA pozitif bulundu. MRC-5 hücre temininde sıkıntı yaşandığı için MRC-5 hücrelerine inokülasyon Hep-2 hücrelerine kıyasla daha geç yapıldı (Şekil 2C, 2D).



Şekil 1: Jel elektroforez sisteminde HSV-DNA pozitifliği

Tablo 1: BOS örneklerinden elde edilen PCR sonuçları

<b>Testler</b>	<b>Pozitif</b>	<b>Negatif</b>
HSV-DNA PCR	15	15
CMV-DNA PCR	-	30
VZV-DNA PCR	-	30
Enterovirüs-RNA PCR	-	30

Tablo 2: BOS örneklerinden elde edilen hücre kültürü sitopatik etki sonuçları

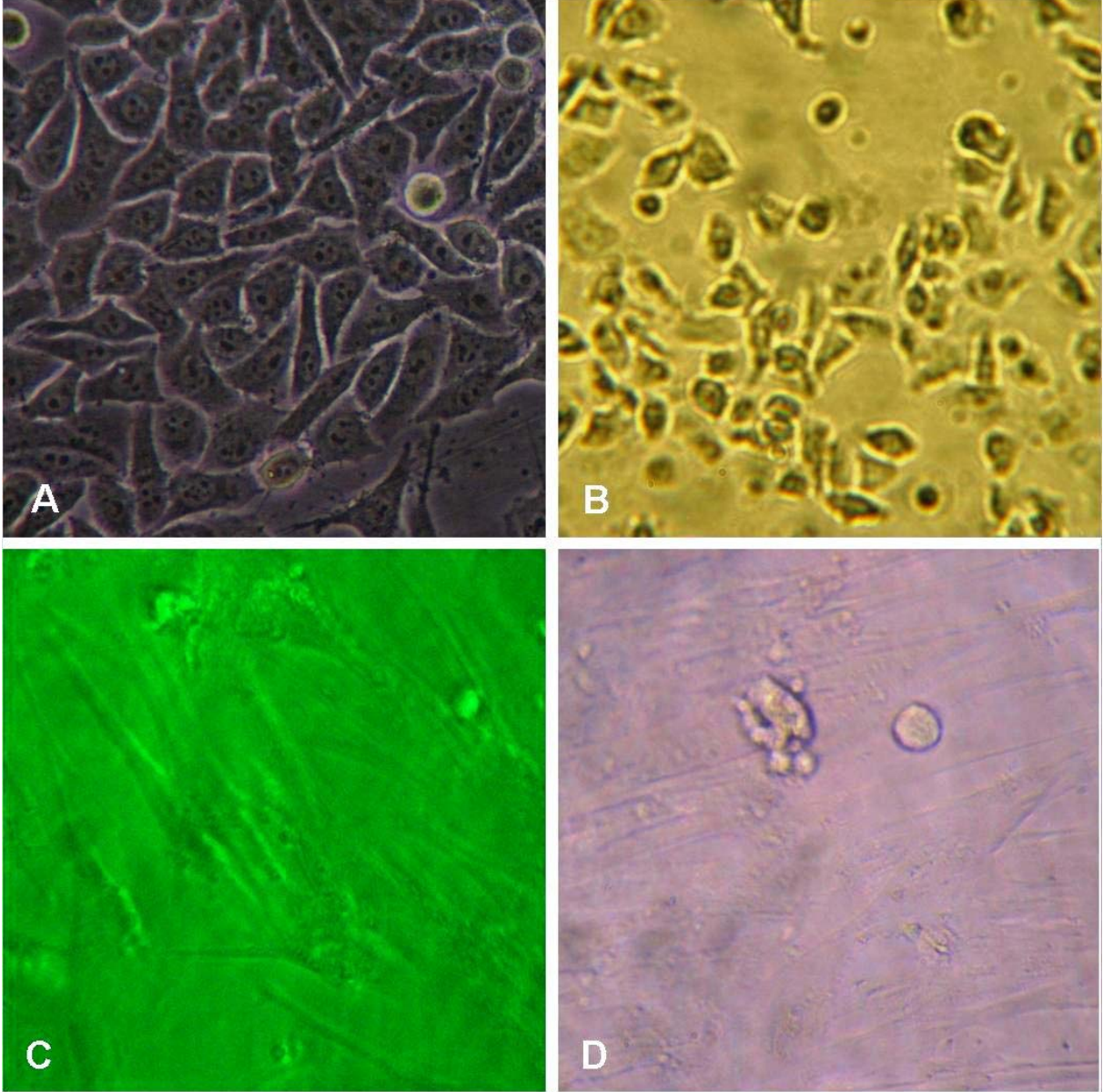
<b>Virüsler</b>	<b>Hep-2</b>		<b>MRC-5</b>	
	<b>Pozitif</b>	<b>Negatif</b>	<b>Pozitif</b>	<b>Negatif</b>
HSV ile uyumlu	7	16	1	22
CMV ile uyumlu	-	-	-	23
VZV ile uyumlu	-	-	-	23
Enterovirüs ile uyumlu	-	23	-	23



Tablo 3: BOS örneklerinden elde edilen PCR ve Hep-2 hücre kültürü sonuçları

<b>PCR</b>	<b>Hücre Kültürü*</b>	
	<b>CPE Pozitif</b>	<b>CPE Negatif</b>
HSV-DNA PCR Pozitif	7	1
HSV-DNA PCR Negatif	-	15
Enterovirüs-RNA PCR Pozitif	-	-
Enterovirüs-RNA PCR Negatif	-	23

\* 7 örnekte örnek yetersizliğinden dolayı ekim yapılamadı.



Şekil 2: A. Hep-2 hücre kültürü. B. Hep-2 hücrelerinde HSV ile uyumlu sitopatik etki  
C. MRC-5 hücre kültürü D. MRC-5 hücrelerinde HSV ile uyumlu sitopatik etki

### 3.5. TARTIŞMA

MSS infeksiyonları, ciddi kalıcı sekellere veya ölüme yol açabilmesi nedeniyle, hızlı tanı gerektiren hastalıkların başında gelir. Aseptik menenjit birçok nedene bağlı olarak gelişebilen, inflamatuvar bir meninks hastalığıdır. Virüsler akut aseptik menenjitin önde gelen etkenlerindedir. Ayrıntılı epidemiyolojik ve mikrobiyolojik araştırmalarda hastalarda %55-70'e varan oranlarda viral etken belirlenebilmektedir (1,2). Çeşitli çalışmalarda, viral menenjit ve ensefalit insidansı yılda 10-20/ 100.000 kişi olarak saptanmıştır. Çocuklarda özellikle bir yaş altında, olgu sayısının arttığı görülmektedir (3).

Viral menenjitlerin %80-95'inin etkeni EV'lerdir (1). HSV tüm aseptik menenjit vakalarının %0.5-3 'ünün etkenidir (1). Primer VZV infeksiyonunda nörolojik tutulum genellikle ensefalit olarak görülür. Herpes zosterli hastalarda da menenjit gelişebilmektedir. CMV özellikle immun yetmezliği olanlarda bir mononükleoz sendromu eşliğinde aseptik menenjite yol açabilir.

Viral menenjitlerin laboratuvar tanısında antijen tayini yapan yöntemler, moleküler yöntemler, izolasyon ve serolojik yöntemler uygulanmaktadır. SSS infeksiyonu tanısında virüs antijenleri belirleyen yöntemlerinin heterojenite göstermeleri ve çapraz reaksiyona açık olmaları bu

yöntemlerin olumsuz yönleridir. BOS'da antikor düzeyleri araştırılırken; enterovirüslerin yaygın serotiplerinin olması IgM düzeylerinin güvenilirliğini kısıtlamaktadır. HSV'e bağlı aseptik menenjitlerde ise Ig düzeylerinin ölçümü primer-sekonder infeksiyon ve santral-periferel sinir sistemi infeksiyonlarının ayrımını yapamamaktadır (4,5).

Viral SSS infeksiyonlarının başlangıç semptomları ve klinik bulguları spesifik bir tanı konulmasını zorlaştırır. SSS hastalıklarında BOS örneklerinde virüsün gösterilmesi viral infeksiyonun kesin delili olarak kabul edilmektedir. SSS'nin viral etyolojisini belirlemek için BOS'ta yapılan çalışmalarda geçmişte hücre kültürü altın standart olarak kabul edilmiştir (55). Ancak hücre kültürlerinin yavaş sonuç vermesi ve duyarlılığının düşük olması hızlı ve doğru tanı koymada problem oluşturmaktadır (31,32). Yapılan çalışmalarda aseptik menenjit tanısında BOS örneklerinden virüsün gösterilmesinde PCR yönteminin hücre kültürüne kıyasla daha hızlı ve duyarlı olduğu belirtilmektedir (29,30). Son yıllarda özellikle HSV-1, HSV-2 ve CMV için moleküler teknikler altın standart olarak kabul edilmektedir (56).

Viral menenjitlerin erken tanısı ve tedavisi morbidite ve mortalite oranlarında düşmeye neden olurken, gereksiz antibiyotik veya antiviral kullanımını ve hastanede kalış süresini azaltarak ek yarar sağlamaktadır (4,57). Enterovirüs infeksiyonları genellikle tedavi edilmese de pleconaril uygulaması ile hastanede yatış süresi kısalmaktadır. Herpes simplex ensefaliti yüksek mortalite riski taşıdığı için tanısı önem taşımaktadır. HSV'de asiklovir kullanılmadan mortalite oranı %60-70 arasında iken, tedavi ile oran %19-38'e düşmektedir (4).

Aseptik menenjitlerin etkenlerini araştıran çalışmalarda genellikle en sık iki etken olan HSV ve enterovirüs ayrı ayrı araştırılmış; çok az çalışmada ise enterovirüs, HSV, CMV ve VZV birlikte araştırılmıştır. İngiltere'de 1683 hastalık bir çalışmada BOS'ta PCR yöntemi ile 58 hastada HSV, 51 hastada enterovirüs ve 28 hastada VZV gösterilmiştir (31).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise aseptik menenjitli hastalarda viral etyoloji serolojik yöntemlerle araştırılmıştır (58). Aynı çalışmada HSV %31.2, coxsackie B %20.7, VZV ve CMV %4.2 oranında bulunmuştur.

Capaul ve ark. (59) yaptıkları çalışmada ise 126 BOS örneğinin 35'inde PCR yöntemi ile enterovirüs pozitif bulmuşlardır. Aynı çalışmada HSV-1, HSV-2, CMV ve VZV araştırılmış ve negatif bulunmuştur.

Ülkemizde yapılan, 21 aseptik menenjitli çocuğun BOS örneğinde HSV'nin PCR yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada ise 3 örnekte HSV-2 ve bir örnekte HSV-1 gösterilmiştir (60).

Markoulatos ve ark. (6) yaptıkları çalışmada 86 SSS infeksiyonlu hastada herpes ailesinin üyeleri PCR yöntemi ile araştırmışlar ve 4 hastada VZV, 4 hastada HSV ve 1 hastada CMV pozitif bulmuşlardır.

Herpes virüs ailesinin neden olduğu ensefalitlerde yetişkin hastalarda BOS'ta hücre kültürü ile virüs nadiren (%4) pozitif bulunmuştur (61,62). Bununla birlikte HSV ensefalit şüpheli yenidoğan hastalarda ise %25-40 oranında hücre kültüründe pozitif bulunmuştur (61,62). Yapılan çalışmalarda BOS'ta HSV, VZV ve CMV infeksiyonlarını belirlemede PCR yönteminin uygulanması önerilmektedir (5,29,63).

Normal immuniteye sahip aseptik menenjit veya ensefalitli 156 hastanın BOS örneğinde PCR yöntemi ile yapılan bir çalışmada 49 örnekte enterovirüs, 3'er örnekte ise HSV ve VZV belirlenmiştir. Aynı çalışmada CMV ise ancak 44 immunsuprese hastanın 5'inde gösterilebilmiştir (64).

VZV ile infekte olan hastaların ancak %0.1-0.2'sinde komplikasyon olarak VZV ensefaliti görülebilir ve BOS'ta virüsü belirlemek için hücre kültüründen çok PCR yöntemi ile VZV-DNA saptanması önerilmektedir (65).

SSS infeksiyonlarında enterovirüsleri belirlemek için altın standart olarak hücre kültürü yöntemi gösterilmektedir. Enterovirüslerin hücre kültüründe üreme süreleri uzun olduğundan sonuç verebilmek en az 10 gün beklenmesi önerilmektedir (55,59,66,67).

Enterovirüslerin belirlenmesinde PCR yöntemi ise altın standart olarak kabul edilmemekte ancak hücre kültürü ile birlikte tanıda önemli bir yeri olduğunu belirtilmektedir (68). Bütün enterovirüsleri belirleyen primerlerin kullanımı ile çok sayıda enterovirüs tipi PCR yöntemiyle daha kısa sürede belirlenebilmektedir (69).

Petitjean ve ark. (70) BOS'ta enterovirüsü Lightcycler cihazında gerçek zamanlı PCR yöntemiyle araştırmışlar ve sonuçları Taqman gerçek zamanlı PCR yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Aynı çalışmada Lightcycler cihazında çalışılan gerçek zamanlı PCR yöntemiyle elde edilen sonuçların özgüllük, duyarlılık, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerlerini daha yüksek olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda da enterovirüs-RNA gerçek zamanlı PCR yöntemi ile Lightcycler cihazında çalışıldı.

Lina ve ark. (71) BOS'ta enterovirüs RNA'sı gerçek zamanlı PCR yöntemiyle araştırmışlar ve in house PCR ile karşılaştırıldığında duyarlılığı %98 olarak bulmuşlardır ve PCR yönteminin hücre kültüründen daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Virüs izolasyonu için teorik olarak tek bir infeksiyöz partikül yeterli olduğu düşünülse de transport ve saklama koşulları yanlış negatiflik oranını yükseltmektedir. Aynı zamanda HSV BOS'ta hücre kültüründe nadiren izole edilebilmektedir (33). Bunun nedeni ise BOS'ta HSV'ye karşı spesifik antikorların virüse bağlanması ve virüsün hücrede üremesini önlemesidir (33).

Beyin biyopsisinden hücre kültürü ile HSV'nin izolasyonunun özgüllüğü %100 olarak kabul edilmektedir (30). Lakeman ve ark. beyin biyopsisinde hücre kültürü ile HSV izole edilen örneklerin %98'inde PCR yöntemiyle HSV pozitif bulunmuştur (72). Başka bir çalışmada HSV'i belirlemek için PCR ve hücre kültürü yöntemlerini karşılaştırmışlar ve PCR yöntemi ile 20 BOS örneğinin 7'sinde HSV pozitif bulunurken, hücre kültüründe örneklerin hiçbirinde HSV izole edilememiştir (33).

Finlandiya'da Hukkanen ve ark. (5) 922 BOS örneğinde SSS infeksiyon etkenlerini PCR yöntemi ve hücre kültürü ile araştırmışlardır. PCR

yöntemi ile örneklerin %6.8'inde enterovirüs, %5.8'inde VZV, %4.6'sında HSV ve %3.8'inde CMV göstermişlerdir. Ancak örneklerin %3.23'ünde hücre kültürü ile enterovirüsü izole edilirken VZV, HSV, CMV izole edilememiştir.

SSS infeksiyonlarında enterovirüslerin araştırıldığı çalışmalarda genellikle PCR ve hücre kültürü yöntemleri birlikte uygulanmıştır (7,63,73). Yapılan bir çalışmada aseptik menenjit şüpheli 34 hastanın 19'unda PCR ve hücre kültürü yöntemleri ile enterovirüs pozitif bulunmuş, 10 hastada ise PCR ile enterovirüs pozitif bulunurken hücre kültüründe üreme görülmemiştir (63).

Avrupa'da 9 merkezde yapılan bir çalışmada 476 BOS örneğinde enterovirüs gerçek zamanlı PCR ve hücre kültürü yöntemleriyle araştırılmış ve gerçek zamanlı PCR yöntemi ile %14.4, hücre kültürü ile %10.4 oranında pozitif bulunmuştur (7). Başka bir çalışmada ise menenjitli hastalarda enterovirüs BOS'ta, hücre kültürü ve PCR yöntemleri ile araştırılmıştır ve PCR yönteminin duyarlılığının hücre kültürü yöntemine kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur (73).

Ülkemizde yapılan çalışmada ise 50 aseptik menenjitli hastanın BOS örneklerinde enterovirüs PCR ve hücre kültürü yöntemleriyle araştırılmış ve 15 (%30) hastada PCR yöntemi ile enterovirüs pozitif bulunurken, bu hastaların 9'unda hücre kültüründe enterovirüs üretilmiştir (74).

Bu çalışmada aseptik menenjit ön tanılı hastalardaki viral etyolojiyi belirlemek için hastalardan alınan BOS örneklerinde HSV, CMV, VZV ve enterovirüs, PCR ve hücre kültürü yöntemleriyle araştırıldı. Çalışmaya alınan 30 örneğin 15'inde HSV-DNA pozitif bulundu. Örneklerin hiçbirinde CMV-DNA, VZV-DNA ve enterovirus-RNA gösterilemedi. Hep-2 ve MRC-5 hücre kültürüne 23 örnekten ekim yapıldı. Hep-2 hücre kültüründe 7 örnekte, MRC-5 hücre kültüründe bir örnekte HSV ile uyumlu sitopatik etki izlendi.

SSS infeksiyonlarında enterovirüs ve herpes virüsleri bir arada araştıran çalışmaların çoğunda en sık etken olarak enterovirüs bulunmuştur. Bu çalışmada ise sadece HSV bulunmuş, enterovirüse ise örneklerde rastlanmamıştır. Bu çalışmada BOS örneği alınan hastaların çoğu serviste

yatarak takip edilen hastalardı. Çalışma süresince menenjit şüphesi olan ama genel durumu iyi olan hastaların acil serviste gözlem altında tutulup serviste takip edilmeden taburcu edildikleri anlaşılmıştır. Acil serviste gözlem altında olan pediatrik yaş grubundaki hastalardan bazen BOS alınmamasından, bazen de alınan BOS örneğinin miktarının az olmasından dolayı hastaların çoğundan BOS örneği elde edilemedi. Enterovirüslerin yaptığı menenjitler genellikle hafif seyirli olduğundan, yukarıda belirtilen hasta grubu içerisinde muhtemelen enteroviral menenjitli hastaların bulunabileceği ve çalışma grubu içine alınamadıkları için bu çalışmada enterovirüs saptanamadığı düşünülmektedir.

VZV ve CMV'e bağlı aseptik menenjit ise nadiren görülmektedir (5,31,64,65). Çalışmaya alınan hasta sayısının fazla olmamasından dolayı çalışmada VZV ve CMV'ye rastlanmamış olabilir.

HSV'e bağlı SSS infeksiyonları ise pek çok çalışmada araştırılmış ve araştırılan hasta gruplarında yüksek oranda pozitif bulunmuştur (31,58). HSV ensefaliti genellikle ağır bir klinik tablo ile seyretmektedir ve bu hastalar serviste takip edilmektedir. Bu çalışmada HSV pozitif bulunan hastalar serviste takip edilen hastalardı.

Bu çalışmada PCR yöntemi ile HSV pozitif bulunan bütün örneklerde Hep-2 ve MRC-5 hücre kültürlerinde virüs üretilmemiştir. HSV-DNA pozitif olan örneklerin 7'sinde örnek yetersizliğinden dolayı hücre kültürüne ekim yapılamadı. HSV-DNA pozitif ve BOS miktarı yeterli olan 8 örneğin 7'sinde Hep-2 hücre kültüründe; birinde MRC-5 hücre kültüründe HSV ile uyumlu sitopatik etki görüldü. Çalışma esnasında Hep-2 hücre kültürlerinin temini MRC-5 hücre kültürlerine kıyasla daha önce olduğundan Hep-2 hücre kültürüne örneklerin inokülasyonu daha erken yapıldı. MRC-5 hücre kültüründe HSV ile uyumlu sitopatik etkinin az görülmesi beklemeye bağlı olarak virüsün canlılığını yitirmiş olabileceği ile açıklanabilir.

SSS infeksiyonlarında PCR yöntemi etkenin hızlı belirlenmesinde iyi bir yöntemdir. Ancak her zaman için tek yöntemle etken araştırılması yanlış pozitiflik ve yanlış negatiflik riskini taşımaktadır. Uzun yıllar boyunca hücre



kültürü yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir ve hücre kültürü yöntemiyle birlikte PCR yönteminin kullanılması verilen sonuçların doğruluğu açısından önemlidir (21).

Sonuç olarak; aseptik menenjit ön tanılı hastaların BOS örneklerinde enterovirüs, HSV, CMV ve VZV'yi hücre kültürü ve PCR yöntemi ile araştırılması uygundur. Aseptik menenjit etkenlerinin hızlı ve doğru olarak belirlenmesinde her iki yöntemin birlikte kullanımı önerilmektedir.

### 3.6. SONUÇ

Aseptik menenjitli hastaların BOS örneklerinde hücre kültürü ve PCR yöntemleri ile enterovirüs, HSV, VZV ve CMV'nin araştırıldığı bu çalışmada; 30 örneğin 15'inde HSV-DNA pozitif bulundu. Örneklerin hiçbirinde CMV-DNA, VZV-DNA ve enterovirüs-RNA gösterilemedi. Hep-2 hücre kültürüne ekimi yapılan 23 örneğin 7'sinde 2. günde HSV ile uyumlu sitopatik etki görüldü. MRC-5 hücre kültürüne ekimi yapılan 23 örneğin sadece birinde HSV ile uyumlu sitopatik etki izlendi.

Sonuç olarak; aseptik menenjit ön tanılı hastaların BOS örneklerinde enterovirüs, HSV, CMV ve VZV'yi hücre kültürü ve PCR yöntemi ile araştırılması uygundur. Aseptik menenjit etkenlerinin hızlı ve doğru olarak belirlenmesinde her iki yöntemin birlikte kullanımı önerilmektedir.

## 4.1.KAYNAKLAR

1. Arısoy EM. Akut viral menenjitler. Kitabında: Topçu AW, Söyletir G,Doğanay M(eds), İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi 2. baskı Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2002, s. 1266-74.
2. Tunkel AR ,Scheld WM. Acute menengitis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell ,Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease'. 5th ed. vol. 2. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:1083-119.
3. Koskiniemi M, Korppi M, Mustonen K et al. Epidemiology of encephalitis in children. A prospective multicenter study. Eur J Pediatr 1997;156:541-5.
4. Smalling TW, Sefers SE, Li H, Tang Y. Molecular approaches to detecting HSV and Enteroviruses in the CNS. J Clin Microbiol 2002;40:2317-2322.
5. 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.
6. Markoulatos P, Georgopoulou A, Siafakas N et al. Laboratory diagnosis of Herpesvirus infections of the CNS by a multiplex PCR assay. J Clin Microbiol 2001; 39:4426-32.
7. Vlient KE, Glimaker M, Lebon P, Taylor CE Multicenter evaluation of the amplicor Enterovirus PCR test with CSF from patients with aseptic meningitis. J Clin Microbiol 1998; 36: 2652-7.

8. Rueckert RR. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. (eds), Fields Virology (3th ed.) vol. 1. Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia 1996, pp.609-54.
9. Melnick JL. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. (eds), Fields Virology (3th ed.) vol. 1. Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia 1996, pp.655-712.
10. Picornaviridae. Medikal viroloji kitabında (1. baskı), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 1994, s. 381-406.
11. Romero JR, Rotbart HA. Enterovirusues. In: Murray PR. (ed), Manuel of Clinical Microbiology (8th ed.) vol. 2. ASM Press, Washington DC 2003, pp. 1427-38.
12. International Committee on Taxonomy of Viruses dB descriptions, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/52000000.htm>
13. International Committee on Taxonomy of Viruses dB descriptions, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/52010000.htm>
14. Yağcı A, Söylenir G. Picornavirus Ailesi. Kitabında: Topçu AW, Söyletir G,Doğanay M(eds), İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi (2. baskı) vol. 2. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2002, s. 1007-19.
15. Sawyer MH. Enteroviruses infections: diagnosis and treatment. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18: 1033-40.
16. Yolken RH, Torsch VM. Enzym-linked immunosorbent assay for detection of coxsackie A. *Infect Immun* 1981;31:742.
17. Köksal F. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. Kitabında: Durmaz R (ed), Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji (2. baskı) Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2001, s. 15-43.
18. Abacıoğlu H. Moleküler yöntemlerde yeni gelişmeler ve yeni teknolojiler. KLİMİK Adana 2001 Kitabında, s. 191-2.

19. Van Doornum GJ, De Jong JC. Rapid shell vial culture technique for detection enteroviruses and adenoviruses in fecal specimens: comparison with conventional virus isolation method. *J Clin Microbiol* 1998;36:2865-8.
20. Günaydın M. Enterovirüsler. Kitabında: Ustaçelebi Ş. (ed), *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* (1. baskı) Güneş Kitabevi , Ankara 1999, s. 901-12.
21. DeBiasi RL, Tyler KL. Viral meningitis and encephalitis. *American Academy of Neurology Continuum*, 2006 April: 58-94.
22. Whitley RJ. Herpes simplex viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et. Al. (eds), *Fields Virology* (3th ed.) vol. 2. Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia 1996, pp.2297-342.
23. Jerome KR, Ashley RL. Herpes simplex viruses and Herpes B virus. In: Murray PR. (ed), *Manuel of Clinical Microbiology* (8th ed.) vol. 2. ASM Press, Washington DC 2003, pp. 1291-303.
24. Roizman B. Herpesviridae. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et. Al. (eds), *Fields Virology* (3th ed.) vol. 2. Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia 1996, pp.2221-96.
25. Serter D. Herpes simplex virüsler. Kitabında: Topçu AW, Söyletir G,Doğanay M(eds), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi* (2. baskı) vol. 2. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2002, s. 1176-86.
26. Ertürk M. Herpes simplex virusları. Kitabında: Ustaçelebi Ş. (ed), *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* (1. baskı) Güneş Kitabevi , Ankara 1999, s. 815-27.
27. Huang YT, Hite S, Duane V et al. CV-1 and MRC-5 mixed cells for simultaneous detection of herpes simplex viruses and varicella zoster virus in skin lesions. *J Clin Virol*, 2001;24:37-43.
28. Turchek BM, Huang YT. Valuation of ELVIS™ HSV ID/Typing System for the detection and typing of herpes simplex virus from clinical specimens. *J Clin Virol*, 1999;12:65-69.
29. Boivin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes* 2004;11:Supplement 2: 48-56.

30. Tyler KL. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. Herpes 2004;11:Supplement 2: 57-64.
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, Mitchell JL, Fink 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 standart laboratory methods for the detection of HSV in cerebrospinal fluid specimens. J Clin Virol 1999;14:145-51.
34. McLean CS, Erturk M, Jennings R et al. Protective vaccination against primary and recurrent disease caused by herpes simplex virus (HSV) type 2 using a genetically disabled HSV-1. J Infect Dis. 1994;170:1100-9.
35. Hodinka RL. Human Cytomegalovirus. In: Murray PR. (ed), Manuel of Clinical Microbiology (8th ed.) vol. 2. ASM Press, Washington DC 2003, pp. 1304-18.
36. Doymaz MZ. Sitomegalovirüs. Medikal viroloji kitabında (1. baskı), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 1994, s. 334-41.
37. Griffiths P. Cytomegalovirus infection of the central nervous system. Herpes 2004;11:Supplement 2: 95-104.
38. Bilgiç A, Özacar T. İnsan sitomegalovirüsü . Kitabında: Ustaçelebi Ş. (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (1. baskı) Güneş Kitabevi , Ankara 1999, s. 835-41.
39. Çolak D, Mutlu D. Herpesvirüsler. Kitabında: Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S(eds), Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji (1.baskı), Güneş Kitabevi, Ankara 2004, s. 113-44.

40. Britt WJ, Alford CA. Cytomegalovirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et. Al. (eds), Fields Virology (3th ed.) vol. 2. Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia 1996, pp.2493-523.
41. Günhan C. Cytomegalovirus infeksiyonları. Kitabında: Topçu AW, Söyletir G,Doğanay M(eds), İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi (2. baskı) vol. 2. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2002, s. 1191-97.
42. Paixao P, Almeida S, Gouveia P et al. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools. J Virol Methods 2005; 128:1-5.
43. Tarrago D, Mateos ML, Avellon A et al. Quantitation of CMV DNA in CSF and serum specimens from AIDS patients using a novel highly sensitive nested competitive PCR and the Cobas Amplicor CMV Monitor. J Med Virol 2004;72:249-56.
44. Piiparinen H, Höckerstedt K, Grönhagen-Riska C et al. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of loads from peripheral blood of organ transplant patients. J Clin Virol 2004;30:258-66.
45. Distefano AL, Alonso A, Martin F et al. Human Cytomegalovirus: detection of congenital and perinatal infection in Argentina, BMC Pediatr 2004;23: 4-11.
46. Ergünay K. Antiviral ilaçlar, etki ve direnç mekanizmaları. Kitabında: Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S(eds), Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji (1.baskı), Güneş Kitabevi, Ankara 2004, s. 331-42.
47. Velipaşaoğlu S. CMV infeksiyonlarından korunmada aktif bağışıklama. I.Ulusal CMV Simpozyumu Tanı ve Tedavi Yaklaşımları: Sorunlar ve Çözümleri Kitabında, Antalya 2001, s 84-87.
48. Kusne S, Shapiro R, Fung J. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. Transpl Infect Dis 1999; 1:187–203.

49. Künzle N, Petignat C, Francioli P et al. Preemptive treatment approach to cytomegalovirus (CMV) infection in solid organ transplant patients: relationship between compliance with the guidelines and prevention of CMV morbidity. *Transpl Infect Dis* 2000; 2:118–26.
50. Baysal B, Tuncer İ. Varicella-Zoster virüsü. Kitabında: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M(eds), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi* (2. baskı) vol. 2. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2002, s. 1186-91.
51. Özbal Y. Varicella-Zoster virüsü. Kitabında: Ustaçelebi Ş. (ed), *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* (1. baskı) Güneş Kitabevi , Ankara 1999, s. 829-33.
52. Arvin AM. Varicella-Zoster Virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. (eds), *Fields Virology* (3th ed.) vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 1996, pp. 2547-85.
53. Gershon AA, Larussa P, Steinberg S. Varicella-Zoster virus. In: Murray PR. (ed), *Manuel of Clinical Microbiology* (8th ed.) vol. 2. ASM Press, Washington DC 2003, pp. 1319-30.
54. Bezold GD, Lange ME, Gall H et al. Detection of cutaneous varicella zoster virus infections by immunofluorescence versus PCR. *Eur J Dermatol* 2001;11:108-11.
55. Chonmaitree T, Ford C, Sanders C et al. Comparison of cell culture for rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol* 1998;26:2576-80.
56. 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.
57. Chonmaitree T, Baldwin CD, Lucia HL. Role of the diagnosis and management of patients with central nervous system disease. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2:1-14.
58. Yarkın F, Hazar S, Kocabaş E ve ark. Aseptik meninjitli çocuklarda viral etyoloji. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2000;25:6-10.
59. Capaul SE, Hrisoho MG. Detection of enterovirus RNA in CSF using NucliSens EasyQ enterovirus assay. *J Clin Virol* 2005;32:236-40.



60. Yarkın F. PCR metodu ile aseptik menenjitli çocuklarda HSV tip 1 ve HSV tip 2'nin insidansının tespiti. Viroloji yan dal tezi; Adana 1996.
61. 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.
62. 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.
63. Kupila L, Vuorinen T, Vainionpää R et al. Diagnosis of enteroviral meningitis by use of PCR of CSF, stool and serum specimens. *Clin Infect Dis* 2005;40:982-7.
64. Casas I, Pozo F, Trallero G et al. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpesviruses in a prospective study. *J Med. Virol* 1999;57:145-51.
65. Gildea D. Varicella zoster virus and central nervous system syndromes. *Herpes* 2004;11:Supplement 2: 89-94.
66. Muir P, Kammerer U, Korn K et al. Molecular typing of enteroviruses: Current status and future requirements. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:202-27.
67. Chonmaitree T, Menegus MA, Powell KR. The clinical relevance of CSF viral culture. A two year experience with aseptic meningitis in Rochester, NY. *J Am Med Assoc* 1982;13:1843-7.
68. Colimon R. Introduction to the virological diagnosis of the most frequent infections of the central nervous system. *J Clin Virol* 2002;25:S1-S3.
69. Rotbart HA. Nucleic acid detection system for enteroviruses. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:156-68.
70. Petitjean J, Vabret A, Dina J et al. Development and evaluation of a real time RT-PCR assay on the LightCycler for the rapid detection of enterovirus in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Virol* 2006;35:278-84.

71. Lina B, Pozzetto B, Andreoletti L et al. Multicenter evaluation of a commercially available PCR assay for diagnosing enterovirus infection in a panel of cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:3002-6.
72. 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 Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis* 1995;171:857-63.
73. Buck GE, Wiesemann M, Stewart L. Comparison of mixed cell culture containing genetically engineered BGMK and CaCo-2 cells (super E-Mix) with RT-PCR and conventional cell culture for the diagnosis of enterovirus meningitis. cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Virol* 2002;25:S13-S18.
74. Horasanlı SD. Aseptik menenjit düşünülen olguların beyin omurilik sıvısı örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu ve hücre kültürü ile enterovirüs varlığının araştırılması. Uzmanlık tezi; İstanbul, 2000.

