

HERPES SİMPEKS VİRUS (HSV) ENFEKSİYONU ŞÜPHESİ OLAN HASTALARIN KLİNİK ÖRNEKLERİNDE ÜÇ FARKLI YÖNTEMLE HSV VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF HERPES SIMPLEX VIRUS (HSV) BY THREE DIFFERENT METHODS IN THE CLINICAL SPECIMENS OF PATIENTS WITH SUSPECTED HSV INFECTIONS

Gülhan YAĞMUR¹, Yusuf ÖZBAL², Selma GÖKAHMETOĞLU²

¹ Kayseri Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Kayseri. (gyagmur1970@hotmail.com)

² Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

ÖZET

Herpes simpleks virus (HSV) enfeksiyonları tüm dünyada yaygın bir klinik problemdir. Özellikle im-
mün sistemi baskılanmış hastalarda, enfeksiyon ciddi ve progresif seyretmekte ve önemli morbidite ve
mortaliteye yol açmaktadır. Bu nedenle HSV enfeksiyonlarının hızlı ve güvenilir laboratuvar tanısı erken
tedavi açısından önemlidir. Bu çalışmada, HSV enfeksiyonu ön tanılı hastalardan alınan klinik örneklerde
HSV tip 1 ve tip 2 varlığı, hücre kültürü, "in house" polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve direkt floresan
antikor (DFA) yöntemleri ile araştırılmıştır. Çalışmaya, Mart 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında Erciyes
Üniversitesi Gevher Nesibe Hastaneleri Kliniklerinde takip edilen meningoensefalit ön tanılı 38 hastadan
alınan beyin omurilik sıvısı (BOS) örnekleri ile herpes enfeksiyonu şüpheli 27 poliklinik hastasından (13
herpes labialis, 5 keratokonjunktivit, 4 gingivostomatit, 3 ekzama herpetikum, 1 herpetik dolama, 1 ge-
nital lezyon) alınan veziküler/konjunktival/genital sürüntü örnekleri dahil edilmiştir. Çalışmaya alınan top-
lam 65 hastanın 20'si çocuk, 45'i yetişkin olup, yaşları 1-68 yıl arasında değişmektedir. HSV varlığının
araştırılması için sürüntü örneklerine her üç yöntem de uygulanırken, BOS örnekleri için DFA yöntemi
önerilmediğinden sadece hücre kültürü ve PCR yöntemleri kullanılmıştır. Sürüntü örneklerinin %48.1
(13/27)'inde DFA ile HSV antijeni pozitif bulunmuş (12'sinde HSV-1, herpetik dolamalı hasta örneğinde
HSV-2); %51.8 (14/27)'inde Hep-2 hücre kültürlerinde HSV'ye özgü sitopatik etki saptanmış ve %66.6
(18/27)'sında PCR ile HSV-DNA varlığı belirlenmiştir. BOS örneklerinin ise %7.8 (3/38)'inde hücre kültü-
rü ile ve %47.4 (18/38)'ünde PCR ile HSV pozitifliği saptanmıştır. Sitopatik etki izlenen hücre kültürlerin-
deki virus üremesi, HSV-1 ve HSV-2'ye özgül floresanla işaretli monoklonal antikorların kullanıldığı DFA
yöntemi (Monofluo, Bio-Rad Laboratories, ABD) ile de doğrulanmıştır. Yöntemler arasındaki uyum Kap-
pa analizi ile değerlendirilmiş ve gerek sürüntü örnekleri için hücre kültürü ile DFA ve PCR arasındaki
uyum ($\kappa=0.7$), gerekse BOS örnekleri için hücre kültürü ile PCR arasındaki uyum ($\kappa=0.6$) orta düzeyde
bulunmuştur. Sonuç olarak HSV enfeksiyonlarının tanısında, sürüntü örneklerinde hızlı ve pratik olması
nedeniyle DFA yönteminin (ve mümkünse sırasıyla PCR ve hücre kültürü yöntemlerinin), BOS örneklerin-
de ise hızlı ve duyarlı olması nedeniyle PCR yönteminin tercih edilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Herpes simpleks virus, tanı, DFA, PCR, hücre kültürü.

ABSTRACT

Herpes simplex virus (HSV) infections are a common clinical problem worldwide. HSV infections have a severe and rapidly progressive course especially in immunocompromised patients, leading to significant morbidity and mortality. Therefore, rapid and reliable laboratory diagnosis of HSV infections is of crucial importance for the initiation of early antiviral therapy. In this study the aim was to investigate the presence of HSV type 1 and type 2 in clinical specimens by cell culture, in-house polymerase chain reaction (PCR) and direct fluorescein antibody (DFA) methods. The study was conducted at Erciyes University Gevher Nesibe Hospitals between March 2006 and June 2007. A total of 65 clinical specimens, 38 of them being cerebrospinal fluid (CSF) samples obtained from meningoencephalitis suspected cases and 27 being vesicular/conjunctival/genital swabs obtained from patients with different clinical presentations (13 herpes labialis, 5 keratoconjunctivitis, 4 gingivostomatitis, 3 eczema herpeticum, 1 herpetic whitlow, 1 genital ulcer). The age range of the 65 patients varied between 1-68 years, 20 being children. All the samples except CSF were investigated by 3 of the test methods, however, CSF samples were tested only by cell culture and PCR since DFA is not recommended. HSV was found positive in 48.1% (13/27) of the 27 swab specimens by DFA, in 66.6% (18/27) by PCR and in 51.8% (14/27) cytopathic effect consistent with HSV was observed. HSV positivity was detected in 7.8% (3/38) of the 38 CSF specimens by cell culture and in 47.4% (18/38) by in-house PCR. Viral growth in cell cultures showing cytopathic effect were further confirmed by DFA method using HSV-1 and HSV-2 specific fluorescein monoclonal antibodies (Monofluo, Bio-Rad Laboratories, USA). Agreement between the methods were investigated by Kappa analysis. Moderate level agreement was determined for both swab ($\kappa=0.7$) and CSF ($\kappa=0.6$) specimens for the tested methods when cell culture was considered as the reference method. In conclusion for swab specimens, primarily DFA which is a practical and rapid method, could be applied. This step might be followed by PCR and cell culture techniques sequentially. On the other hand CSF specimens should be investigated by the rapid and more sensitive PCR method.

Key words: *Herpes simplex virus, diagnosis, DFA, PCR, cell culture.*

GİRİŞ

Herpes simpleks virus (HSV), insanlarda en sık hastalık oluşturan viral etkenlerdendir. HSV tip 1 ve tip 2'nin neden olduğu enfeksiyonlar, çoğu kez oral ve genital lezyonlar şeklinde ortaya çıkmaktadır. Gerek primer gerekse reaktivasyon sonucu oluşan enfeksiyonlar, çoğu kez asemptomatik ya da deri ve mukoz membran lezyonları şeklinde seyretmekle birlikte, ağır stomatit, keratokonjunktivit, meningoensefalit ve sistemik yenidoğan enfeksiyonları gibi ciddi sendromlarla da karşılaşılabilir¹. Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda tanı ve tedavinin gecikmesi mortaliteyi artırmaktadır¹.

HSV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında; hücre kültüründe virus izolasyonu, virus antijenlerinin gösterilmesi, moleküler teknikler ve serolojik testler uygulanmaktadır². Klinik örneklerden virus izolasyonu altın standart olarak kabul görmesine karşın, tedavinin yönlendirilmesinde erken tanı için duyarlılığı yüksek olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile viral genlerin ve direkt floresan antikor (DFA) ile viral antijenlerin belirlenmesi önerilmektedir^{3,4}. PCR, HSV enfeksiyonlarının erken ve geç dönemlerinin tanısında hızlı ve duyarlılığı yüksek olan bir test olması nedeniyle günümüzde hücre kültürünün yerini almıştır³⁻⁵. Toplumda HSV enfeksiyonlarının yaygın olarak görülmesi nedeniyle serolojik testler tanıda yarar sağlamamakta, daha çok epidemiyolojik çalışmalarda uygulanmaktadır².

Bu çalışmada, HSV enfeksiyonu ön tanılı hastalardan alınan klinik örneklerden hücre kültürü, PCR ve DFA yöntemleri ile HSV varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Mart 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kliniklerinde meningoensefalit ön tanısıyla takip edilen hastalar ile polikliniklere başvuran ve herpes enfeksiyonu düşünülen toplam 65 hasta dahil edildi. Meningoensefalit şüpheli 38 hastadan beyin omurilik sıvısı (BOS) örnekleri ile 13 herpes labialis, 5 keratokonjunktivit, 4 gingivostomatit, 3 ekzama herpetikum, 1 herpetik dolama ve 1 genital enfeksiyon şüpheli 27 hastadan enfeksiyon bölgesine göre veziküler, konjunktival ve genital sürüntü örnekleri alındı. BOS örnekleri PCR ve hücre kültürü çalışmaları için ayrılarak ependorf tüplerde -70°C'de saklandı. İkışer adet alınan sürüntü örneklerinden birisi PCR ve DFA için kullanılmak üzere 0.4 ml %10'luk fosfat tampon solüsyonunun (PBS) içine eklendi. Diğeri ise hücre kültürü için viral transport besiyerine (Virocult, Vircell, Spain) koyularak -70°C'de saklandı.

Sürüntü örneklerinde HSV antijeni, DFA (Monofluo, Bio-Rad Laboratories, CA, ABD) yöntemiyle kit prosedürüne uygun olarak araştırıldı. BOS örneklerine, DFA ile antijen aranması önerilmediği için bu yöntem uygulanmadı¹. Sürüntü örneklerinden hazırlanan preparatlar, HSV-1 ve HSV-2'ye özgül floresanla işaretli monoklonal antikorlar ile muamele edildi ve sonuçlar floresan mikroskopunda x100 ve x400 büyütmede değerlendirildi. Her mikroskop alanında karakteristik floresan veren hücrelerden en az bir tane görüldüğünde test pozitif olarak değerlendirildi. Her çalışmaya pozitif ve negatif kontroller de dahil edildi.

HSV izolasyonu amacıyla Hep-2 hücre kültürleri kullanıldı. Doku kültürü şişelerinde (75 cm²'lik) tek tabaka halinde temin edilen Hep-2 hücreleri tripsinize edildikten sonra 10 ml'lik tüplere 2 x 10⁵ hücre/ml olacak şekilde pasajları yapıldı. İki-üç gün içinde tek tabaka halinde inokülasyona uygun şekilde üreyen hücreler inokülasyon yapıncaya kadar CO₂'li etüvde 37°C'de muhafaza edildi. Klinik örnekler oda ısısına getirildikten sonra, hazırlanan hücre kültürü tüplerine pastör pipeti ile 200 µl inoküle edildi. Hücreler invert mikroskop ile sitopatik etki (CPE) yönünden 7 gün boyunca izlendi. HSV'ye özgü CPE oluşan ve/veya oluşmayan tüm tüplerde DFA yöntemiyle HSV antijeni araştırıldı. Hücre kültüründe HSV üremesinin doğrulanmasında^{1,6} aynı DFA kiti (Monofluo, Bio-Rad) kullanıldı ve yukarıda anlatıldığı şekilde değerlendirildi.

PCR yönteminde, tüm örneklerden nükleik asit izolasyonu PureArt DNA Mini Kiti (QI-AGEN) kullanılarak test kiti prosedürüne göre yapıldı. HSV-DNA'sının saptanmasında "in house" PCR uygulandı. PCR yöntemi için 5'-GAG GGA CAT CCA GGA CTT TG-3' ve 5'-GCC ACC GTC TCC TCT ACC TC-3' dizilimindeki primerler kullanıldı⁷. Amplifikasyon için kullanılacak olan tampon solüsyonu, MgCl₂, dNTP, primer 1 ve 2 ve Taq DNA polimeraz -20°C'lik derin dondurucudan çıkarıldı. Taq DNA polimeraz çalışma anına kadar buz kalıbı üzerinde bekletildi. Örnek sayısı, pozitif ve negatif kontrol sayısı kadar PCR amplifikasyon karışımı tek ependorf tüpüne hazırlandı ve mikroplaktaki çukurlara 40 µl

dağıtıldı. Pozitif kontrol, negatif kontrol ve hasta örneklerinden elde edilmiş DNA izolatlarından 10'ar µl mikropiştirme çukurlarına dağıtıldı. Mikropiştirme GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD) PCR cihazına yerleştirilerek örneklerdeki nükleik asit çoğaltıldı. Reaksiyon sona erdikten sonra PCR ürünleri cihazın içinden alındı. 100 ml TBE 1X tamponu içerisinde 1 g agaroz ısıtılarak eritildi. Soğuduktan sonra 3 µl etidyum bromür katılarak yatay jel elektroforez tankına döküldü. Çoğaltılan örneklerden 10'ar µl alıp üzerine 5'er µl yükleme boyası karıştırılarak donmuş olan jeldeki kuyucukların dibine düşmesi sağlandı. Yatay jel elektroforez tankındaki jelin içindeki örnekler 120 voltta 20 dakika yürütüldü. Jel translüminatörde ultraviyole ışık altında incelendi. Örnekler 188 baz çifti (bp) uzunluğunda olan pozitif kontrol ile aynı bölgede bant verdiğinde pozitif kabul edildi.

İstatistiksel analizler Kappa uyum analizi ile yapıldı⁸.

BULGULAR

Çalışmaya alınan hastaların 20'si çocuk, 45'i yetişkin olup, yaşları 1-68 yıl arasında değişmektedir. BOS örnekleri, pediatrik ve yetişkin enfeksiyon hastalıkları, yoğun bakım, kemik iliği transplantasyon ünitesi ve nefroloji kliniklerinde yatan hastalardan; sürüntü örnekleri ise hematoloji/onkoloji, kemik iliği transplantasyon ünitesi, pediatrik ve yetişkin enfeksiyon hastalıkları kliniklerinde yatan hastalar ile göz ve dermatoloji polikliniğine başvuran hastalardan alınmıştır.

DFA yöntemi ile araştırılan sürüntü örneklerinin %48.1 (13/27)'inde HSV antijeni pozitif bulunmuştur (Tablo I). Bunların 12'si HSV-1 olarak saptanırken, herpetik dolaşıma şüpheli bir örnekte HSV-2 tespit edilmiştir. Hücre kültürü yöntemi ile sürüntü örneklerinin %51.8 (14/27)'inde, BOS örneklerinin ise %7.8 (3/38)'inde HSV'ye özgü CPE gözlenmiştir (Tablo I), CPE izlenen hücre kültürleri DFA yöntemi ile doğrulanmıştır (Resim 1,2).

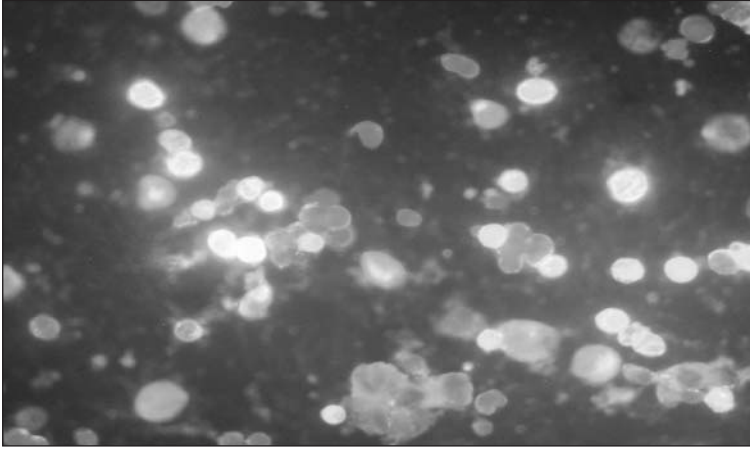
Tablo I. Enfeksiyon Ön Tanılarına Göre Üç Farklı Yöntemle Saptanan HSV Pozitifliği

Klinik ön tanı (hasta sayısı)	DFA pozitifliği	Hücre kültüründe CPE pozitifliği	PCR pozitifliği
Meningoensefalit (38)	Çalışmadı	3	18
Herpes labialis (13)	8	8	10
Keratokonjunktivit (5)	1	3	2
Gingivostomatit (4)	3	2	3
Ekzama herpetikum (3)	-	-	2
Herpetik dolaşıma (1)	1	1	1
Genital enfeksiyon (1)	-	-	-
Toplam (65)	13	17	36

HSV: Herpes simpleks virus, DFA: Direkt floresan antikor, CPE: Sitopatik etki, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.



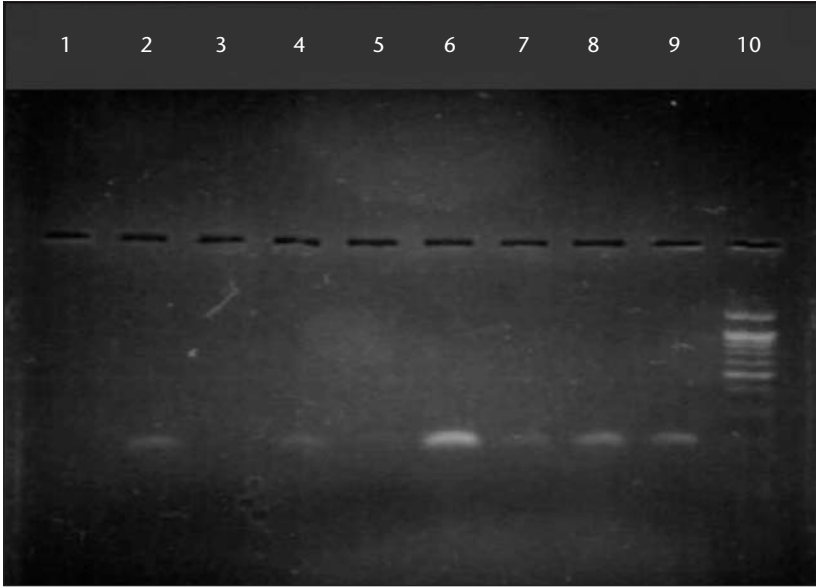
Resim 1. Hep-2 hücrelerinde yaygın yuvarlaklaşma ve kümeleşme ile karakterize HSV'ye özgü sitopatik etki (konjunktival sürüntü örneği, invert mikroskop, x40).



Resim 2. DFA yöntemi ile saptanan parlak yeşil refle veren hücreler ile karakterize HSV antijen pozitifliği (konjunktival sürüntü örneği, floresan mikroskop, x40).

PCR sonuçları incelendiğinde; sürüntü örneklerinin %66.6 (18/27)'sında ve BOS örneklerinin %47.4 (18/38)'ünde HSV-DNA pozitifliğinin saptandığı görülmüştür (Tablo I, Resim 3).

HSV tanısında kullanılan yöntemlerin performansları değerlendirildiğinde; sürüntü örnekleri için hücre kültürü ile DFA ve hücre kültürü ile PCR arasındaki uyumun istatistiksel açıdan orta düzeyde olduğu belirlenmiştir ($\kappa=0.7$) (Tablo II). Her üç yöntemle de pozitif bulunan 10 örneğin 6'sının herpes labialis, 2'sinin gingivostomatit, 1'inin keratokonjunktivit ve 1'inin de herpetik dolama ön tanılı hastalara ait olduğu izlenmiştir.



Resim 3. Jel elektroforezinde HSV-DNA varlığının saptanması (Hat 2, 4, 6, 7, 8, 9: HSV-DNA pozitif bulunan örnekler, Hat 10: Moleküler büyüklük belirteci).

Tablo II. Sürüntü Örneklerinde Hücre Kültürü ile DFA ve PCR Yöntemlerinin Karşılaştırmalı Sonuçları (n= 27)

		Hücre kültürü							
		Pozitif		Negatif		Pozitif		Negatif	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
DFA	Pozitif	10	37	3	11.1	PCR	Pozitif	12	44.4
	Negatif	4	14.8	10	37		Negatif	2	7.4

DFA: Direkt floresan antikor, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

Tablo III. BOS Örneklerinde Hücre Kültürü ile PCR Yöntemlerinin Karşılaştırmalı Sonuçları (n= 38)

		Hücre kültürü			
		Pozitif		Negatif	
		Sayı	%	Sayı	%
PCR	Pozitif	3	7.8	15	39.4
	Negatif	0		20	52.6

BOS: Beyin omurilik sıvısı, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

BOS örnekleri için yöntemlerin performansları değerlendirildiğinde; 3 örnekte her iki yöntemle de pozitif, 20 örnekte her iki yöntemle de negatif sonuç alındığı ($\kappa= 0.6$, orta düzeyde uyum), HSV-DNA'sı pozitif bulunan 15 örneğin hücre kültüründe negatif sonuç verdiği dikkati çekmiştir (Tablo III).

TARTIŞMA

HSV tarafından oluşturulan enfeksiyonlar, asemptomatik enfeksiyonlardan ölümle sonuçlanan dissemine hastalıklara kadar değişen geniş bir spektrumda ortaya çıkabilir⁹. Tekrarlayan HSV enfeksiyonları özellikle yenidoğanlarda ve immün sistemi baskılanmış hastalarda meningoensefalit, pnömoni ve hepatit gibi ağır klinik tablolara yol açmaktadır. Bu nedenle HSV'ye bağlı morbidite ve mortalitenin azaltılmasında doğru ve hızlı laboratuvar tanısının önemi büyüktür^{1,9,10}.

HSV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında DFA yöntemi hızlı, özgül ve duyarlı bir metottur. Bu metot özellikle mukokütanöz lezyonlarda ve vezikül varlığında uygulanmaktadır. İyileşme döneminde virus miktarının az olması nedeniyle duyarlılığı azalır¹¹. Ayrıca hücre kültürlerinde HSV'ye ait CPE'nin doğrulanmasında floresan ile işaretli monoklonal antikorlar kullanılmaktadır^{1,6}.

Kültürden virus izolasyonu geleneksel olarak altın standart bir yöntem olarak kabul edilir^{11,12}. Bu yöntem özellikle mukokütanöz, genital ve oküler lezyonlarda virusun saptanmasında kullanılan oldukça duyarlı ve güvenilir bir metottur, ancak yavaş sonuç verir¹³. Lezyonların taze olması ve hücre kültürüne ekiminin hemen yapılması izolasyon şansını artırır¹¹. Buna karşın BOS'tan virus izolasyonu çok düşük duyarlılığa sahiptir^{14,15}. Yapılan çalışmalarda BOS ve sürüntü örneklerinden virusun gösterilmesinde PCR'nin hücre kültürüne kıyasla daha hızlı, özgül ve duyarlı olduğu belirtilmektedir^{16,17}.

Megdam ve arkadaşları¹⁸ tarafından yapılan bir çalışmada, 33 sürüntü örneğinin 8'inde hem hücre kültürü hem de DFA ile HSV pozitifliği saptanmıştır. Bu araştırmacılar, DFA yönteminin atipik olgularda ve immün sistemi baskılanmış hastalarda klinik tanı için yardımcı olacağı sonucuna varmışlardır¹⁸. Bir başka çalışmada, 48 korneal kazıntı örneğinin %20.8'inde hücre kültürü ile, %29.2'sinde PCR ile ve %33.3'ünde DFA ile HSV pozitifliği belirlenmiştir¹⁹. Bu araştırmacılar da, kazıntı ile alınan korneal örneklerde DFA yönteminin daha duyarlı ve uygulanabilir bir metot olduğu sonucuna varmışlardır¹⁹. Bizim çalışmamızda, herpes keratokonjunktiviti şüphesi olan 5 hastaya ait örneklerin sadece 1'inde DFA ile HSV antijeninin gösterilmesi, örneklerin sürüntü şeklinde alınmasına bağlı olabilir.

Ülkemizde Biriken ve arkadaşlarının²⁰ yaptığı bir çalışmada, 33 korneal kazıntı ve sürüntü örneğinde direkt immünoperoksidad ve hücre kültürü yöntemi ile HSV araştırılmış, 4 olguda HSV'ye özgü CPE ve 2 olguda HSV antijen pozitifliği bulunmuştur. Bu çalışmada, HSV'nin izolasyonunun yanı sıra antijen tespitinin de yapılmasının laboratuvar tanısında yardımcı olacağı sonucuna varılmıştır²⁰. Bizim çalışmamızda, 27 sürüntü örneğinin 13 (%48.1)'ünde DFA ile HSV antijeni, 14 (%51.8)'ünde hücre kültüründe HSV'ye özgü CPE varlığı saptanmış; hücre kültürü ile DFA yöntemleri karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan orta derecede bir uyum belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Tablo II). Çalışmamızda, hücre kültüründe CPE görülen 4 örnekte HSV antijeni gösterilememiş, HSV antijeni gösterilen 3 örnekte ise hücre kültüründe CPE saptanamamıştır. Bunun nedeninin, örneklerin ayrı eküvyonlarla alınmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Corey ve arkadaşları¹⁷ tarafından, oral ve genital 24.345 sürüntü örneğinde gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) ve hücre kültürü yöntemleriyle HSV araştırılmış; 3131 (%12.9) örnekte PCR ile, 587 (%2.4) örnekte ise hücre kültürü ile pozitif sonuç alınmıştır. Bu araştırmacılar, oral ve genital mukoza örneklerinden HSV tespitinde Rt-PCR'nin daha duyarlı olduğunu ifade etmişlerdir¹⁷. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, herpetik keratit düşünülen 20 hastanın gözyaşı örneğine PCR uygulanmış ve 12 örnekte HSV-1 DNA'sı pozitif bulunmuştur²¹. Bozkaya ve arkadaşları²² tarafından yapılan bir çalışmada, 150 klinik örneğin 44'ünden hücre kültürü yöntemi ile HSV izole edilmiştir. Bu araştırmacılar, 14 BOS örneğinin sadece 1'inde hücre kültürü ile pozitiflik bulmuşlardır²². Bu sonuç, 38 BOS örneğinin sadece 3'ünde hücre kültürü pozitifliği elde ettiğimiz çalışmamızın verileri ile paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda, sürüntü örneklerinin %66.6 (18/27)'sında PCR ile, %51.8 (14/27)'inde ise hücre kültürü ile HSV pozitifliği bulunmuş, yöntemler arasındaki uyumun orta düzeyde olduğu belirlenmiştir ($\kappa = 0.7$) (Tablo II). İki örnekte hücre kültüründe CPE'nin görülmesi ancak PCR ile HSV-DNA'sının gösterilememesinin, örnek alımındaki yetersizliğe bağlı olabileceği düşünülmüştür. Hücre kültüründe negatif sonuç veren 6 örnekte PCR ile HSV-DNA'sının saptanması ise, PCR'nin daha duyarlı olmasından ya da kontaminasyona bağlı yanlış pozitiflikten kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Mitchell ve arkadaşlarının⁷ 1993-1996 yılları arasında yaptığı çalışmada, HSV enfeksiyonu şüphesi olan hastalara ait 2106 BOS örneğinin 150'sinde PCR ile pozitiflik saptanmış ve PCR'nin santal sinir sistemi (SSS) enfeksiyonlarında HSV tespitinde "altın standart" olarak kabul edildiği belirtilmiştir. Finlandiya'da 922 BOS örneği ile yapılan bir çalışmada, SSS enfeksiyon etkenleri PCR ve hücre kültürü ile araştırılmış ve örneklerin %4.6'sında PCR ile HSV-DNA pozitifliği saptanırken hiçbirinde hücre kültürü ile pozitiflik belirlenmemiştir²³. Benzer çalışmalardan da alınan sonuçlar, PCR'nin hücre kültürüne kıyasla hızlı, özgül ve daha duyarlı olduğunu göstermektedir^{24,25}. Hücre kültüründe virus izolasyonunun altın standart olma özelliğinin değişmesi ve kullandığımız "in house" PCR yönteminin standardize ticari bir yöntem olmaması nedeniyle, yöntemlerden herhangi birisinin referans kabul edilerek diğerlerinin özgüllük ve duyarlılık oranlarının belirlenmesi ile ilgili bir hesaplama yapılmamış, ancak Kappa analizi ile yöntemler arasındaki uyum araştırılmıştır.

Ülkemizde, Eroğlu ve arkadaşları²⁶ meningoensefalit ön tanılı 54 hastadan alınan örneklerin 14'ünde; Dağlar ve arkadaşları²⁷ ise 99 BOS örneğinin 7'sinde Rt-PCR ile HSV-1 DNA'sı saptamışlardır. Akçalı ve arkadaşlarının²⁸ çalışmasında, 17 BOS örneği PCR ve hücre kültürü yöntemleriyle araştırılmış ve yalnızca bir örnekte her iki yöntemle de HSV pozitifliği belirlenmiştir. Ergünay ve arkadaşları²⁹, toplam 400 BOS ve veziküler sürüntü örneğinin 17'sinde; Rota ve arkadaşları³⁰ da 328 BOS ve sürüntü örneğinin 8'inde Rt-PCR ile HSV-DNA varlığını göstermişlerdir. Rt-PCR ile hücre kültürü yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, 313 klinik örneğin 43'ünde PCR ile, 21'inde hücre kültürü ile pozitiflik saptanmış; PCR ile pozitif bulunan iki BOS örneği ise hücre kültüründe negatif sonuç vermiştir³¹. Çalışmamıza benzer olarak, Madhavan ve arkadaşlarının³² gerçekleştirdiği çalışmada ise, 20 BOS ve 34 çeşitli sürüntü örneğinden oluşan toplam 54 örnekte DFA, PCR ve hücre kültürü yöntemleri ile HSV varlığı araştırılmış, örneklerin 8'inde

DFA ile, 5'inde hücre kültürü ile ve 28'inde PCR ile HSV pozitifliği belirlenmiştir. HSV-DNA'sı pozitif bulunan 7 BOS örneğinin hiçbirisi hücre kültüründe pozitif sonuç vermemiştir. Bizim çalışmamızda, 38 BOS örneğinin 18 (%47.3)'inde PCR ile HSV-DNA saptanırken, sadece 3 (%7.8) örnekten hücre kültüründe pozitif sonuç alınmıştır. Yapılan birçok çalışmada, BOS örneklerinden hücre kültüründe virus izolasyon olasılığının çok düşük olduğu vurgulanmaktadır^{15,23,28,31,32}. Bunun nedeninin, BOS'ta mevcut olan özgül HSV antikorlarının virusa bağlanarak hücreye tutunmasını önlemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir^{22,32}. Diğer bir neden ise, BOS örneklerinin hücre kültürüne ekiminin hemen yapılamaması ve derin dondurucuda bekletilmiş olan örneklerden virus izolasyonunun güçleşmesidir. Dolayısıyla hızlı ve doğru tanının büyük önem taşıdığı HSV şüpheli menenjit ve ensefalitlerde, BOS'ta öncelikle HSV-DNA varlığının araştırılması önerilmektedir³².

Sonuç olarak, HSV enfeksiyonu ön tanılı hastaların laboratuvar tanısında, sürüntü örnekleri için hızlı ve pratik olması nedeniyle öncelikli olarak DFA yönteminin ve laboratuvarın koşullarına göre mümkünse PCR ve hücre kültürü yöntemlerinin; BOS örnekleri için ise hızlı ve duyarlı olması nedeniyle öncelikli olarak PCR yönteminin uygulanmasının gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Jerome KR, Ashley RL. Herpes simplex viruses and herpes B virus, pp: 1291-303. In: Murray PR (ed), Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8th ed. ASM Press, Washington DC.
2. Ustaçelebi Ş. Diagnosis of herpes simplex virus infections. J Clin Virol 2001; 21: 255-9.
3. Cinque P, Cleator GM, Weber T, et al. The role of laboratory investigation in the diagnosis and management of patients with suspected herpes simplex encephalitis: a consensus report. The EU Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. J Neurol Neurosurg Psych 1996; 61: 339-45.
4. Sauerbrei A, Wutzler P. Laboratory diagnosis of central nervous system caused by herpes viruses. J Clin Virol 2002; 25: 45-51.
5. 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.
6. Serter D. Herpes simplex virüsler, s: 1176-86. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2002, 2. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
7. Mitchell PS, Espy MJ, Smith TF, et al. Laboratory diagnosis of central nervous system infections with herpes simplex virus by PCR performed with cerebrospinal fluid specimens. J Clin Microbiol 1997; 35: 2873-7.
8. Özdamar K. Paket programlar ile istatistiksel veri analizi-1. 2004, 5. baskı. Kaan Kitabevi, Ankara.
9. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. Lancet 2001; 357: 1513-8.
10. Jones CA, Isaacs D. Management of herpes simplex virus infections in childhood. Curr Paediatr 2004; 14: 131-6.
11. Cunningham AL, Taylor R, Taylor J, Marks C, Shaw J, Mindel A. Prevalence of infection with herpes simplex virus types 1 and 2 in Australia: a nationwide population based survey. Sex Transm Infect 2006; 82: 164-8.
12. Burrows J, Nitsche A, Bayly B, Walker E, Higgins G, Kok T. Detection and subtyping of herpes simplex virus in clinical samples by Lightcycler PCR, enzyme immunoassay and cell culture. BMC Microbiol 2002; 2: 12.
13. Johnson FB, Leavitt RW, Richards DF. Comparison of the Scott Selecticult-HSV kit with conventional culture and direct immunoperoxidase staining for detection of herpes simplex virus in cultures of clinical specimens. J Clin Microbiol 1985; 21: 438-41.

14. Smalling TW, Sefers SE, Li H, et al. Molecular approaches to detecting herpes simplex virus and enteroviruses in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2317-22.
15. Tang YW, Mitchell PS, Espy MJ, et al. Molecular diagnosis of herpes simplex virus infections in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2127-36.
16. Read SJ, Burnett D, Fink CG. Molecular techniques for clinical diagnostic virology. *J Clin Pathol* 2000; 53: 502-6.
17. Corey L, Huang ML, Selke S, et al. Differentiation of herpes simplex virus types 1 and 2 in clinical samples by a real-time Taqman PCR assay. *J Med Virol* 2005; 76: 350-5.
18. Meqdam MM, Todd D, Al-Abosi M, et al. Detection of herpes simplex and varicella zoster viruses in clinical specimens using direct immunofluorescence and cell culture assays. *Microbios* 2001; 105: 111-8.
19. Abd El-Aal AM, El Sayed M, Mohammed E, et al. Evaluation of herpes simplex detection in corneal scrapings by three molecular methods. *Curr Microbiol* 2006; 52: 379-82.
20. Biriken D, Yıldız S, Özkul A ve ark. Keratitis ve keratokonjunktivitis olgularında HSV'nin varlığının hücre kültürü izolasyonu ve direkt immünperoksidadz tekniği ile gösterilmesi. 1. Ulusal Viroloji Kongresi, Kuşadası, Aydın, 2003. Kongre Kitabı, s: 260.
21. Özgan Y, Yağmur M, Güneşli A ve ark. Herpetik keratit tanısında polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile herpes simpleks virüs tip 1 tespiti. 1. Ulusal Viroloji Kongresi, Kuşadası, Aydın, 2003. Kongre Kitabı, s: 334.
22. Bozkaya E. İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Temel İmmünoloji ve Viroloji Bilim Dalında Kasım 1993-Kasım 1995 yılları arasında herpes simplex virüs izolasyonu. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg* 1995; 25: 125-30.
23. 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.
24. Tafreshi NK, Sadeghizadeh M, Amini-Bavil-Olyae S, et al. Development of a multiplex nested consensus PCR for detection and identification of major human herpesviruses in CNS infections. *J Clin Virol* 2005; 32: 318-24.
25. Calvario A, Bozzi A, Scarasciulli M, et al. Herpes consensus PCR test: a useful diagnostic approach to the screening of viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol* 2002; 25: 71-8.
26. Eroğlu C, Güldiken T, Sarıkaya H ve ark. Herpes simplekse bağlı meningoensefalitlerin RT-PCR metodu ile saptanması. 2. Ulusal Viroloji Kongresi, Kemer, Antalya, 2005. Kongre Kitabı, s: 230.
27. Dağlar D, Özcan A, Dilara I ve ark. BOS örneklerinde herpes simpleks virüs DNA'sının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. 2. Ulusal Viroloji Kongresi, Kemer, Antalya, 2005. Kongre Kitabı, s: 281.
28. Akçalı A, Özkaya E, Yılmaz D. Viral meningoensefalit şüpheli vakaların beyin omurilik sıvısı örneklerinde herpes simpleks virüs araştırılması. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 2004. Kongre Kitabı, s: 230.
29. Ergünay K, Gülmez D, Haşçelik G ve ark. Herpes simpleks virüs tanısında RT-PCR: Hacettepe deneyimi. 2. Ulusal Viroloji Kongresi, Kemer, Antalya, 2005. Kongre Kitabı, s: 310.
30. Rota S, Bozdayı G, Doğan B ve ark. Herpes simpleks virüsün klinik örneklerde RT-PCR ile saptanmasının önemi. 1. Ulusal Viroloji Kongresi, Kuşadası, Aydın, 2003. Kongre Kitabı, s: 333.
31. Mengelle C, Sandres-Saune K, Miedouqe M, et al. Use of two real-time PCR's to detect herpes simplex type 1 and 2-DNA after automated extraction of nucleic acid. *J Med Virol* 2004; 74: 459-62.
32. 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.