

# Klinik Örneklerde Hücre Kültürü Yöntemi ile Herpes Simpleks Virüs Araştırılması

## Detection of Herpes Simplex Virus in Clinical Samples by Cell Culture Method

### Gülhan Yağmur

M.D.  
Department of Clinical Microbiology  
Erciyes University Medical Faculty  
gyagmur@erciyes.edu.tr

### Yusuf Özbal

Prof. M.D.  
Department of Clinical Microbiology  
Erciyes University Medical Faculty  
ozbaly@erciyes.edu.tr

### Selma Gökahmetoğlu

Prof. M.D.  
Department of Clinical Microbiology  
Erciyes University Medical Faculty  
selmagk@gmail.com

This study was supported by Research Found of Erciyes University.

Submitted : March 18, 2008  
Revised : August 12, 2008  
Accepted : March 27, 2009

#### Corresponding Author:

Dr. Gülhan Yağmur  
Department of Clinical Microbiology  
Faculty of Medicine University of Erciyes  
Kayseri, Turkey

Telephone: +90- 352 240 81 54  
E- mail: gyagmur@erciyes.edu.tr

#### Özet

**Amaç:** Herpes simpleks virüs (HSV) enfeksiyonları tüm dünyada yaygın bir klinik problemidir. Özellikle immünsüpre hastalarda enfeksiyon şiddetli ve hızlı seyretmekte, önemli morbidite ve mortalite nedeni olmaktadır. Bu çalışmada klinik örneklerde hücre kültürü yöntemi uygulanarak HSV'nin araştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntemler:** Mart 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastaneleri kliniklerinde takip edilen ve polikliniklerine başvuran herpes enfeksiyonu düşünülen 65 hastadan alınan çeşitli klinik örnekler çalışmaya dahil edildi. Virüs izolasyonunda Hep-2 hücre kültürü kullanıldı.

**Bulgular:** Hep-2 hücre kültürüne ekimi yapılan 27 sürüntü örneğinin 14'ünde (%51,8), 38 BOS örneğinin 3'ünde (%7,8) HSV'ye özgü sitopatik etki görüldü. Sitopatik etki izlenen hücre kültürleri DFA (direkt floresan antikor) yöntemi ile doğrulandı.

**Sonuç:** Herpes enfeksiyonu ön tanı hastalardan alınan sürüntü örneklerinde hücre kültürü yönteminin uygulanabilir bir yöntem olduğu ancak BOS örneklerinde diğer tanı metodlarına başvurulması gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Herpes Simpleks Virüsleri; Hücre kültürü.

#### Abstract

**Purpose:** Herpes simplex virus (HSV) infections are a common clinical problem worldwide. Especially HSV disease in the immunocompromised patients can be severe and rapidly progressive that is a significant cause of morbidity and mortality. In this study the aim was to investigate of HSV in clinical specimens by cell culture method.

**Material and Methods:** Various clinical specimens of the 65 patients with suspicious HSV infections treated in Erciyes University Gevher Nesibe Hospitals clinics and applied polyclinics between March 2006 and June 2007 were included in this study. Hep-2 cell culture was used for isolation of HSV.

**Results:** Cytopathic effect (CPE) consistent with HSV was observed in 14 (51.8%) of the 27 swap specimens and 3 (7.8%) of the 38 cerebrospinal fluid specimens which were inoculated to Hep-2 cell culture. Cell culture that was observed CPE was confirmed by DFA (direct fluorescent antibody) method.

**Conclusion:** Cell culture method would be applied to investigate the swab specimens which were taken from patients with HSV infection but CSF specimens is investigated by other methods.

Key Words: Cell culture; Herpes Simplex Viruses.

## Giriş

Herpes simpleks virüs (HSV) enfeksiyonları insanlarda en sık rastlanan viral hastalıklar arasında yer almaktadır. Oral, genital, göz, deri, santral sinir sistemi (SSS) ve iç organlarda lezyonlara neden olur. Bu lezyonlar virüsün primer enfeksiyonundan veya latent virüsün reaktivasyonundan kaynaklanır (1). HSV enfeksiyonları çoğu kez asemptomatik ve lokal belirtilerle seyreder. Bu virüsler bazen ağır stomatit, keratokonjunktivit, meningoensefalit ve sistemik yenidoğan enfeksiyonları yapabilirler. Ayrıca immünsüprese kişilerde latent virüsün reaktive olmasıyla enfeksiyon alevlenmekte ve önemli ölçüde morbidite ve mortalite nedeni olmaktadır (2,3).

Günümüzde asiklovir başta olmak üzere çeşitli antiviral ilaçlar HSV'nin vücutta latent kalma özelliğine bağlı olarak virüsü eradike etmez, ancak tekrarlayan enfeksiyonlar daha az görülür. Özellikle immünsüprese hastalarda bu virüsün tanı ve tedavisinde geç kalınması mortaliteyi artırmaktadır (1).

HSV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında hücre kültüründe virüs izolasyonu, virüs antijenlerinin direkt gösterilmesi, moleküler teknikler ve serolojik testler uygulanmaktadır (1). Klinik örneklerde virüs izolasyonu altın standart olarak kabul görmesine karşın, tedavinin yönlendirilmesinde erken tanı için duyarlılığı yüksek olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve direkt floresan antikor (DFA) ile birlikte viral antijenlerin belirlenmesi gereklidir. Toplumda HSV enfeksiyonlarının yaygın olarak görülmesi nedeniyle serolojik testler tanıya yarar sağlamamakta, daha çok epidemiyolojik çalışmalarda uygulanmaktadır (4-5).

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

## Gereç ve Yöntem

Mart 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerinde meningoensefalit ön tanısıyla takip edilen ve polikliniklerine başvuran herpes enfeksiyonu düşünülen 65 hastadan alınan çeşitli klinik örnekler çalışmaya dahil edildi. Hastalardan alınan sürüntü örnekleri viral transport besiyerine (Virocult, Vircell, Spain), BOS örnekleri ise ependorf tüplere koyularak -70°C'de saklandı.

HSV izolasyonunda Hep-2 hücre kültürü kullanıldı. Hücre kültürü çalışmalarının bütün aşamaları önceden %70'lik alkolle ve ultraviyole ışınlarla temizlenmiş Class 2A kabininde yapıldı. Doku kültürü şişelerinde (75cm<sup>2</sup>) tam tabaka halinde temin edilen Hep-2 hücreleri tripsinize edildikten sonra 10 mL'lik tüplere 2x10<sup>5</sup> hücre/mL olacak şekilde pasajları yapıldı. 2-3 gün içinde tek tabaka halinde inokülasyona uygun şekilde üreyen hücreler inokülasyon yapılmaya kadar CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de muhafaza edildi. Oda sıcaklığına getirilen klinik örneklerden 200 µL pastör pipeti ile hücre kültürü tüplerine ekimleri yapıldı. Tüpler 1 saat CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C' de inkübe edildikten sonra tüpler içindeki besiyeri tamamen boşaltıldı ve üzerlerine 2 mL devam besiyeri konularak tekrar CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de inkübe edildi. Hücreler invert mikroskop ile sitopatik etki yönünden 7 gün boyunca gün aşırı incelendi. 7 gün takip edilen HSV'ye özgü CPE oluşan tüm tüplerde DFA yöntemiyle HSV antijeni araştırıldı. DFA (Monofluo, BIO-RAD) yöntemi kit prosedürüne uygun şekilde çalışıldı.

## Bulgular

Hastalardan alınan örneklerden 27 tanesi sürüntü, 38 tanesi BOS örneği idi. Sürüntü örneklerin alındığı hastaların 13'ü herpes labialis, 5'i keratokonjunktivit, 4'ü gingivostomatit, 3'ü egzema herpetikum, 1'i herpetik dolama, 1'i genital enfeksiyon ön tanılı hastalardı. Sürüntü örneklerin alındığı hastaların 7'si çocuk, 20'si yetişkin, BOS örneklerinin ise 13'ü çocuk, 25'i yetişkindi.

Hep-2 hücre kültürüne ekimi yapılan 27 sürüntü örneğin 14'ünde (%51,8), 38 BOS örneğin 3'ünde (%7,8) HSV'ye özgü CPE gözlemlendi (Tablo I). Sitopatik etki izlenen hücre kültürleri DFA yöntemi ile doğrulandı (Resim 1 ve 2). Herpes labialis düşünülen 13 örneğin 8'inde, keratokonjunktivit düşünülen 5 örneğin 3'ünde, gingivostomatit düşünülen 4 örneğin 2'inde ve herpetik dolama düşünülen 1 örnekte HSV'ye özgü CPE gözlemlendi (Tablo I).

**Tablo I.** Mart 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerinde meningoensefalit ön tanısı almış herpes enfeksiyonu düşünülen hastalardan alınan 65 klinik örneğin hücre kültürü bulguları.

Örnekler	Klinik ön tanı	Hücre Kültüründe CPE		Toplam
		Negatif	Pozitif	
BOS örnekleri	Meningoensefalit	35	3 (%7,8)	38
Sürüntü örnekleri		13	14 (%51,8)	27
	Herpes labialis	5	8	13
	Keratokonjunktivit	2	3	5
	Gingivostomatit	2	2	4
	Egzema herpetikum	3		3
	Herpetik dolama		1	1
	Genital enfeksiyon	1		1

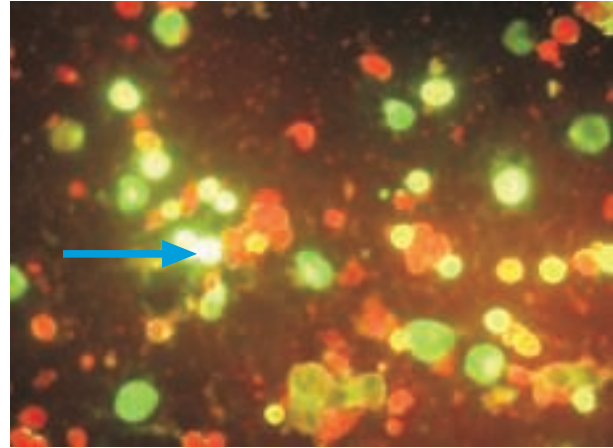
CPE: Sitopatik etki.



**Resim 1.** Hep-2 hücrelerinde *Herpes simplex* virüsüne özgü hücrelerde yaygın yuvarlaklaşma ve kümelenme ile karakterize sitopatik etki. Bir keratokonjunktivit örneği. (İnvert mikroskop görüntüsü; X40)

### Tartışma

HSV'nin neden olduğu hastalıklar insanlarda en sık rastlanan viral hastalıklar arasında yer almakta ve oral, genital, göz, deri, SSS ve iç organları tutmaktadır. Asemptomatik enfeksiyonlardan ölümlü sonuçlanan dissemine hastalıklara kadar değişen geniş bir spektruma sahiptir (6). *Herpes simplex* ensefaliti yüksek mortalite riski taşıdığı için önem taşımaktadır. Özellikle HSV'nin neden olduğu ensefalit ve yenidoğanlardaki dissemine enfeksiyonlar tedavi edilmediği takdirde mortalite oranı %70'in üzerine çıkmaktadır (7). HSV enfeksiyonlarının



**Resim 2.** Direkt Floresan Antikor yöntemi ile boyamada parlak yeşil refle veren hücreler ile karakterize virüs antijeninin gösterilmesi. Bir keratokonjunktivit örneği. (Floresan mikroskop görüntüsü; X40)

kontrolünde; HSV ile enfekte hastaların erken tanı ve tedavisinin yapılması ve kişisel korunma önlemlerinin alınması önerilmektedir (8).

HSV'ye bağlı morbidite ve mortalitenin azaltılmasında doğru ve hızlı laboratuvar tanının önemi büyüktür (1). HSV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında; virüs antijenlerinin direkt olarak gösterilmesi, hücre kültüründe virüs izolasyonu, moleküler teknikler ve serolojik testler uygulanmaktadır (1).

HSV tanısında DFA yöntemi hızlı, özgül ve duyarlı bir metottur. Bu metod özellikle mukokütanöz lezyonlarda ve vezikül varlığında uygulanmaktadır. İyileşme döneminde virüs miktarının az olması nedeniyle duyarlılığı azalır (9). Kültürde virüs izolasyonu geleneksel olarak altın standart bir yöntem olarak kabul edilir (9). Bu yöntem özellikle mukokütanöz, genital ve oküler lezyonlardaki enfeksiyonlarda kullanılan oldukça duyarlı ve güvenilir bir metottur, ancak yavaş sonuç verir (10). Lezyonların taze olması ve hücre kültürüne ekiminin hemen yapılması izolasyon şansını artırır (9). Ancak BOS'ta virüs izolasyonu çok düşük duyarlılığa sahiptir (11). Diğer virüsler ve bazı toksik faktörler HSV'nin CPE'sini taklit edebileceği için hücre kültürü pozitifliği direkt floresan antikor (DFA) yöntemi ile doğrulanmalıdır (1).

Yapılan çalışmalarda BOS ve sürüntü örneklerinden virüsün gösterilmesinde PCR'ın hücre kültürüne kıyasla daha hızlı, özgül ve duyarlı olduğu belirtilmektedir (12, 13). PCR, HSV enfeksiyonlarının erken ve geç dönemlerinin tanısında hızlı ve duyarlılığı yüksek olan bir test olması nedeniyle hücre kültürünün yerini aldığı bildirilmektedir (14,15) .

Velai ve arkadaşları (16) 100 sürüntü örneğinde 2 farklı hücre kültürü yöntemi ile HSV varlığını araştırmış; standart hücre kültürü ile 36'sında, santrifüjlü hücre kültürü ile 32'sinde HSV'ye özgü CPE gözlemiştir. Bozkaya ve arkadaşları (17) hücre kültürüne ekim yaptığı 150 çeşitli klinik örnekten 44'ünde HSV izole etmiştir. Araştırmacıların, on dört BOS örneğin sadece birinde CPE saptamaları, BOS örneklerinden çalışmamızda elde edilen bulgularla paralellik göstermektedir.

Korneal kazıntıdan alınan 48 örnekte hücre kültürü yöntemi uygulanarak yapılan bir çalışmada; %20,8'inde hücre kültüründe CPE saptanmıştır (18). Bu çalışmada keratokonjunktivit ön tanılı hastalardan alınan 5 sürüntü örneğin 3'ünde HSV'ye özgü CPE saptanmış ve DFA yöntemi ile de doğrulanmıştır. Buna göre keratokonjunktivit düşünülen hasta örneklerinde hücre kültürünün tanıda önemli bir parametre olduğu sonucuna varılmıştır.

Madhavan ve arkadaşları (19) 20 BOS ve 34 çeşitli sürüntü örneğinden oluşan toplam 54 örnekten hücre kültürüne ekim yapmışlar ve 5'inde HSV'ye özgü CPE saptarken, 7 BOS örneğinin hiç birinde HSV'ye özgü CPE saptamamışlardır. Mengelle ve arkadaşları (20) BOS ve

sürüntü örneklerinden oluşan toplam 313 klinik örneğin hücre kültüründen 21 sürüntü örneğinde CPE gözlerken, BOS örneklerinde CPE saptamamışlardır.

Bu çalışmada 27 sürüntü örneğin 14'ünde (%51,8), 38 BOS örneğin 3'ünde (%7,8) hücre kültüründe CPE gözlemlendi. Yapılan bazı çalışmalarda (16, 17, 18) sürüntü örneklerinde hücre kültüründe CPE görülme oranı ve diğer iki çalışmada (19, 20) ise BOS örneklerinde hücre kültüründe virüs izolasyonunun yapılamamış olması bu çalışmanın bulgularını desteklemektedir. HSV ön tanılı sürüntü örneklerinde BOS hücre kültüründe HSV nadiren izole edilebilmektedir. Bunun nedeni; BOS'ta HSV'ye karşı özgül antikorların virüse bağlanması ve virüsün hücrede üremesini önlemesidir (19). Ayrıca, BOS örneklerinden hücre kültürüne ekimin hemen yapılamaması, çalışma gününe kadar derin dondurucuda bekletilmiş olması virüs izolasyonunu güçleştirmektedir.

Sonuç olarak; sunulan çalışmanın bulguları herpes enfeksiyonu ön tanılı hastalardan alınan sürüntü örneklerinde hücre kültürü yöntemiyle olguların yarısında tanı konulabileceğini ancak BOS örneklerinde diğer tanı yöntemlerine başvurulması gerektiğini düşündürmektedir.

## Kaynaklar

1. Jerome KR, Ashley RL. Herpes simplex viruses and Herpes B virus. In: Murray PR, editors. *Manuel of Clinical Microbiology (8th ed) vol. 2*. Washington; ASM Pres: 2003. p.1291-303.
2. Serter D. *Virüs, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 1997. s.124.
3. Mertz GJ. Herpes Simplex Virus Infections. In: Galasso GJ, Whitley RJ, Merigan TC, editors. *Antiviral agents and human viral diseases. (4th ed)* Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers; 1997. p.305-341.
4. Ustaçelebi Ş. Diagnosis of herpes simplex virus infections. *J Clin Virol* 2001; 21: 255-259.
5. Domingues RB, Tsanaclis AMC, Pannuti CS, Mayo MS, Lakeman FD. Evaluation of the range of clinical presentations of herpes simplex encephalitis by using polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid samples. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 86-91.
6. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet* 2001; 357: 1513-1518.
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: 2873-2877.
8. Kimberlin DW. Herpes simplex virus infections of the central nervous system. 2003; 14: 83-89.
9. Cunningham AL, Taylor R, Taylor J, Marks C, Shaw J and Mindel A. Prevalence of infection with herpes simplex virus types 1 and 2 in Australia: a nationwide population based survey. *Sexually Transmitted Infections* 2006; 82:164-168.
10. 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: 438-441.
11. Smalling TW, Sefers SE, Li H, Tang YW. Molecular approaches to detecting herpes simplex virus and enteroviruses in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2317-2322.
12. Read SJ, Burnett D, Fink CG. Molecular techniques for clinical diagnostic virology. *J Clin Pathol* 2000; 53:502-506.
13. Corey L, Huang ML, Selke S, Wald A. Differentiation of herpes simplex virus types 1 and 2 in clinical samples by a Real-Time Taqman PCR assay. *J Med Virol* 2005; 76:350-355.
14. Sauerbrei A, Wutzler P. Laboratory diagnosis of central nervous system caused by herpes viruses. *J Clin Virol* 2002; 25: S45-51.
15. 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.
16. Velai F. Herpes simpleks virüs enfeksiyonlarının tanısında direkt immüno Floresan, standart hücre kültürü ve santrifüjlü hücre kültürü yöntemlerinin karşılaştırılması. *Yayınlanmamış uzmanlık tezi; İstanbul, 1995*.
17. Bozkaya E. İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Temel İmmünoloji ve Viroloji Bilim Dalında Kasım 1993 - Kasım 1995 yılları arasında herpes simplex virüs izolasyonu. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 1995; 25: 125-130.
18. El-Aal AM, El Sayed M, Mohammed E, Ahmed M, Fathy M. Evaluation of herpes simplex detection in corneal scrapings by three molecular methods. *Curr Microbiol* 2006; 52: 379-82.
19. Madhavan HN, Priya K, Anand AR, Therese KL. Detection of herpes simplex virus (HSV) genome using polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples comparison of PCR with standard laboratory methods for the detection of HSV. *J Clin Virol* 1999; 14: 145-151.
20. Mengelle C, Sandres- Saune K, Miedouqe M, Mansuy JM, Bouquies C, Izopet J. 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-