
Herpes Ensefalitinin Beyin Omurilik Sıvısı Örneklerinden Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanısı

Ayşın ZEYTİNOĞLU*, İmre ALTUĞLU*, Arzu SAYINER*,
Hadiye ŞİRİN**, Ayşe SAĞDUYU**, Selda ERENŞOY*, Altınay BİLGİÇ*

* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, İZMİR

ÖZET

Herpes ensefaliti yaşamı tehdit eden bir hastalık olduğundan özgül, duyarlı, pratik ve hızlı tanısı gereklidir. Bu çalışmada, beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinde herpes virüs DNA'sı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırıldı ve sonuçlar diğer nörodiagnostik yöntemler ile karşılaştırıldı.

Hastaneye viral ensefaliti düşündürülen konfüzyon ve nörolojik belirtiler ile başvuran 21 hastanın (13 kadın, 8 erkek; yaş: 17-83, yaş ortalaması: 47.1) BOS örneklerinde, HSV-1, HSV-2 ve HHV-6 DNA'sı PCR ile araştırıldı.

Bu olguların BOS örneklerinin dördünde HSV-1 DNA (%19.05) olumlu iken, diğer örneklerde HSV-2 ve HHV-6 DNA'sı saptanmadı. İzlemede HSV-1 DNA olumlu olguların ikisi şifa ile taburcu olurken, diğer iki olgu kaybedilmiştir. Olguların hiçbirinde semptomlar ve BOS biyokimyası tanı için yönlendirici değildi. Bu olguların 11'i manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile herpes ensefaliti dışında bir tanı aldı. HSV-1 DNA'sı olumlu olan 4 hastanın herpes ensefalit tanısı MRI ile desteklenmiştir.

Herpes ensefaliti tanısında MRI, diğer nörodiagnostik yöntemler arasında en duyarlı yöntemdir. Ancak özgül tanıda BOS'da herpes virüs DNA'sının gösterilmesi ile karşılaştırılmaz.

Anahtar Kelimeler: Herpes simpleks ensefaliti, Viral ensefalit, Polimeraz zincir reaksiyonu

SUMMARY

Diagnosis of Herpes Encephalitis with PCR Test of Cerebrospinal Fluid Samples

Specific, sensitive, practical and rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis is necessary, since it is a life threatening condition. In this study, herpes virus DNA test in cerebrospinal fluid by polymerase chain reaction was evaluated and the results were compared with the findings of neurodiagnostic tests.

Twenty one patients (13 female, 8 male; age: 17-83, mean age: 47.1), who were admitted to the hospital with confusion and neurologic manifestations which were raising suspicion of viral encephalitis, were evaluated for HSV-1, HSV-2 and HHV-6 DNA by polymerase chain reaction in their cerebrospinal fluid samples.

Only four samples were positive for HSV-1 DNA (19.05%) and none for HSV-2 and HHV-6 DNA. Two of HSV-1 DNA positive patients recovered completely but the other two died during the follow up. Symptoms and cerebrospinal fluid evaluation were not diagnostic in any of the patients. Diagnosis other than herpes encephalitis was established with magnetic resonance imaging (MRI) in 11 of the patients and MRI supported the diagnosis of herpes encephalitis in 4 patients who were positive for HSV-1 DNA.

Magnetic resonance imaging appears to be the most sensitive method among other neurodiagnostic procedures in herpes encephalitis, but it can not be compared with detecting herpes virus DNA in cerebrospinal fluid for a specific diagnosis.

Key Words: Herpes simplex encephalitis, Viral encephalitis, Polymerase chain reaction

Herpes virüsler, santral sinir sistemi (SSS) viral infeksiyonlarının önemli etkenlerinden biridir^[1,2]. Herpes simpleks ensefaliti (HSE) yüksek mortaliteye sahip, hayatı tehdit eden bir tablodur. Beyin omurilik sıvısı (BOS)'nın biyokimyasal incelemesi, elektroensefalografi (EEG) ve MRI gibi nörodiagnostik testler, HSE'nin tanısında yardımcı olmakla beraber özgül değildir^[3,4]. Beyin omurilik sıvısından virüs izolasyonu ve antijen saptanması ise hızlı ve duyarlı tanı yöntemleri değildir^[2,3]. Beyin biyopsilerinin histolojik incelemesi tanıya yardımcı olmakla beraber invaziv bir yöntem olması nedeniyle rutin olarak uygulanması zordur^[4,5]. Herpes ensefaliti tablolarında tanı yöntemi duyarlı ve güvenilir olmalıdır. BOS'ta polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile herpes virüs DNA'sının saptanması duyarlı ve özgül bir yöntem olması nedeni ile bu virüs grubu için tanıda altın standart olmaya adaydır^[1,3,6-9].

Herpes simpleks ensefalitinde erken antiviral tedavinin prognozu olumlu olarak etkilemesi nedeni ile hızlı tanı yöntemlerinin kullanımı önemlidir. Antiviral tedavi verilmeyenlerde mortalite %70 iken, tedaviye başlandığında bu oran %20'ye düşmektedir^[1-5,10].

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada, klinik tablo ve BOS değerlendirilmeleri ile herpes ensefalitini düşündüren olguların BOS örnekleri, herpes simpleks virüs tip 1 (HSV-1), herpes simpleks virüs tip 2 (HSV-2) ve insan herpes virüs 6 (HHV-6) DNA açısından PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmaya Nöroloji Anabilim Dalı Yoğun Bakım Bölümü'nde Kasım 1998-Ağustos 1999 tarihlerinde izlenmiş 13 kadın ve 8 erkek, toplam 21 olgu alınmıştır. Olguların tümü hastaneye viral ensefaliti düşündüren konfüzyon ve/veya fokal nörolojik bulgular ile başvurmuştur. Yaşları 17-83 ve yaş ortalaması 47.1'dir. Olguların hastanede kalış süreleri ortalama 16 (7-30) gündür. Olguların özgeçmiş ve MRI sonuçları değerlendirilmiştir.

BOS örnekleri lomber ponksiyon yöntemi ile alınmış ve PCR için en az 1 mL örnek en geç yarım saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Laboratuvarda nükleik asit ekstraksiyonuna kadar örnekler -80°C'de saklanmıştır. Ayrıca BOS'un rutin biyokimyasal ve bakteriyolojik incelemeleri yapılmıştır.

DNA ekstraksiyonunda proteinaz-K kullanılmıştır. İkiyüz mikrolitre BOS öncelikle, Tris HCl, EDTA, SDS ve proteinaz K (sonuç konsantrasyonları sırasıyla 100 mM, 10 mM, %0.5, 200 µg/mL olacak şekilde) ile işleme sokulmuştur. Nükleik asit ekstraksiyonu fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) ile yapılmıştır. Nükleik asitler, sodyum asetat ile alkolde presipite edilmiştir. Çökelti %70 etanol ile yıkanmış ve ardından 30-40 µL steril distile su içinde sulandırılmıştır. DNA örnekleri, amplifikasyona kadar -20°C'de saklanmıştır.

Amplifikasyon ve saptama için Herpes Consensus kiti (Herpes Consensus, Hybridowell, Argene-Biosoft, Fransa) kullanılmıştır. PCR işlemi dNTP (200 µM son konsantrasyon), x 10 herpes "consensus" amplifikasyon tampon solüsyonu, 10 µL sol "consensus" primer ve 10 mL sağ "consensus" primer (2 µM) içeren 35 µL PCR karışımı ile gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler otomatik ısı döngü sisteminde (thermal cyclers) (model 9600, Perkin Elmer, USA) 3 basamaklı bir protokol ile amplifiye edilmiştir:

a. 94°C'de 30 sn denatürasyon, 57°C'de 75 sn yapışma ve 50°C'de 50 sn uzama-5 siklus,

b. 94°C'de 30 sn denatürasyon, 55°C'de 75 sn yapışma ve 72°C'de 50 sn uzama-15 siklus,

c. 94°C'de 30 sn denatürasyon, 55°C'de 75 sn yapışma ve 72°C'de 50 sn uzama-20 siklus.

Amplifikasyon basamağının ardından, amplifikasyon ürünü, HSV-1, HSV-2 ve HHV-6'ya özgül biotinli proplar ile hibridize edilerek mikropakta EIA formatında saptanmıştır. Özet olarak, 15 µL amplifikasyon ürünü denatüre edilmiş ve çukurları kapla-

mak için kullanılmıştır. Biotin ile işaretli proplar ile inkübasyonun ardından, streptavidin peroksidaz konjugat ve substrat olarak O-fenilen diamin kullanılmıştır. Optik dansite 492 nm'de okunmuştur.

BULGULAR

Olguların tümünde konfüzyon, 11 olguda (%52.38) ateş ve 6 olguda (%28.57) ense sertliği gözlenmiştir. Diğer semptomlar fokal nöbetler, kusma, halsizlik, karakter değişikliği, görme bozukluğu ve baş ağrısıdır.

BOS örneklerinin PCR analizi sonuçlarında 4 olguda (%19.05) HSV-1 DNA olumluluğu saptanırken, HSV-2 ve HHV-6 olumluluğuna rastlanmamıştır. HSV-1 DNA olumlu 4 olgudan birinde semptomlar görülmeden önce kutanöz herpes lezyonları öyküsü vardır. HSV-1 ensefaliti tanısı alan olguların ikisinde klinik tablo oluşmadan 3 ve 9 gün önce üst solunum yolu infeksiyonu (ÜSYİ) öyküsü varken diğer

17 olgunun beşinde ÜSYİ tablosu gözlenmiştir ($p > 0.05$). HSV ve HHV-6 DNA açısından olumsuz olan 17 olgunun beşi ve HSV-1 DNA olumlu 4 olgunun ikisi hospitalizasyon sırasında ölmüştür ($p > 0.05$). Tüm olguların herpes DNA PCR ve MRI sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Herpes DNA olumsuz 17 olgunun tanıları şöyledir: 4 olgu dissemine ensefalomyelit (ADEM), 4 olgu inme, bir olgu sistemik lupus eritematozisin santral sinir sistemi (SSS) tutulumu ve bir olgu kültür ile kanıtlanan tüberküloz menenjitisi olgusudur. Geriye kalan 7 olgunun altısında normal MRI bulguları saptanmış ve bunlar iki gün içerisinde tamamen iyileşmiştir. Diğer bir olguda ise *S. aureus*'a bağlı pnömoni gelişmiş olan demans tablosu olarak değerlendirilmiş ve 2 gün içinde kaybedilmiştir.

Biyokimyasal testler için BOS örnekleri, ensefalit tablosu başladıktan sonraki 1-9. günler arasında

Tablo 1. Hastaların herpes DNA PCR ve MRI sonuçları

Hasta	Herpes DNA PCR	MRI
1	-	Bilateral talamik infarkt
2	-	T ₂ ağırlıklı kesitlerde subkortikal beyaz cevherde hiperintens lezyonlar
3	-	Periventriküler kronik iskemik değişiklikler
4	-	T ₂ ağırlıklı kesitlerde subkortikal beyaz cevherde hiperintens lezyonlar
5	-	Normal
6	+ HSV-1	Sağ temporal bölgede T ₂ ağırlıklı kesitlerde hiperintens lezyonlar
7	-	Sağ talamik infarkt
8	+ HSV-1	Bilateral temporal bölgede T ₂ ağırlıklı kesitlerde hiperintens lezyonlar
9	-	Temporal ve hipokampal bölgelerde T ₂ ağırlıklı kesitlerde bilateral simetrik hiperintens lezyonlar
10	-	Multipl serebral infarkt
11	+ HSV-1	Sol temporoparietal bölgede T ₂ ağırlıklı kesitlerde hiperintens lezyonlar
12	-	Normal
13	-	Normal
14	-	Periventriküler ve servikal bölgede demiyelinizan plaklar
15	-	Periventriküler ve servikal bölgede demiyelinizan plaklar
16	-	Normal
17	-	Yaşla uyumlu periventriküler lökoriazis
18	-	Normal
19	-	Normal
20	-	Sağ pontoserebellar bölgede meninkslerde boyanma
21	+ HSV-1	Bilateral temporal bölgelerde insüler ve singulat girusta T ₂ ağırlıklı kesitlerde hiperintens lezyonlar

alınmıştır. Tüm BOS örneklerinde lökosit sayısı 100 hücre/mm³'ün altında, protein 28-117 mg/dL, klorür ve glukoz normal düzeylerde saptanmıştır. HSV-1 olumlu olguların birinin BOS örneğinde 300 eritrosit/mm³ bulunmuştur. BOS bakteriyolojik kültürlerinde olumluluk saptanmamıştır.

Manyetik rezonans görüntülemesine göre herpes ensefaliti olarak değerlendirilen 4 olgunun hepsine antiviral tedavi verilmiştir.

HSV-1 DNA olumlu olgularda EEG incelemelerinde HSE için özgül olan temporal bölgede difüz yavaşlama veya fokal değişiklikler ya da zemin ritminde periyodik yavaş dalga kompleksleri gözlenmiştir^[3,4].

TARTIŞMA

Herpes ensefalitinin hızlı ve özgül tanısı hayati önem taşıdığından bir tek örnekle sonuç veren ve beyin biyopsisi gibi bir girişim gerektirmeyen herpes DNA'nın PCR ile saptanması, bu gereksinim için önemlidir^[5].

Bu çalışmada klinik özellikleri ve BOS değerlendirmeleri ile herpes ensefalitini düşündüren 21 olgu incelenmiştir. MRI ile 9 olgu HSE dışı bir tanı almış, geriye kalan 12 olgunun 4'ünde HSE tanısı desteklenmiştir. Bu olguların BOS örneklerinin PCR ile incelenmesinde HSV-1 olumluluğu ile kesin tanı konulmuştur. Farklı çalışmalarda herpes simpleks ensefaliti tanımlı erişkin hastaların %95'inden HSV tip 1'in sorumlu olduğu gösterilmiştir^[3,10].

Bu çalışma grubunda, BOS örneklerinde HSV-1 DNA olumluluğu benzer diğer çalışmalara göre daha yüksek olarak saptanmıştır (%19.05). Bu yüksek olumluluğun, olgu seçimine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Mitchell ve arkadaşları HSV DNA olumluluğunu %7 olarak saptamıştır. Ancak sözü edilen çalışmaya alınan örnekler rutin testler için laboratuvara ulaştırılan BOS örnekleridir^[8]. Bu çalışmaya ise klinik olarak herpes ensefaliti kuşkusuz olan olgular alınmıştır. Olguların tümünün BOS biyokimyasal incelemeleri beklenildiği gibi nonspesifiktir. HSV-1 olumlu olgulardan birinde hemorajik BOS saptanmıştır.

EEG ve MRI bulgularında değişiklikler hastalık başlangıcı veya ilk haftada gözlenmiştir. Herpes simpleks ensefaliti için tipik MRI bulguları, frontal ve temporal lobların inferior bölümlerinde ödem ile çevrili düşük sinyal yoğunluğu ve bazen bu bölgelerde dağınık hemorajik alanlardır. T₂ ağırlıklı görüntüler ve etkilenmiş bölgelerde artmış sinyal gözlenir^[11]. Herpes simpleks ensefaliti tanısı alan 4 olgunun tümünde benzer MRI bulguları gözlenmiş ve EEG bulguları HSE tanısını desteklemiştir.

Özgül HSE tanısı için MRI diğer nörodiagnostik yöntemler arasında en duyarlı olduğu düşünülen yöntemdir. Ancak özgül tanı için herpes virüs DNA PCR ile karşılaştırılmaz. Herpes simpleks ensefaliti tanısında BOS örneklerinde herpes virüs DNA amplifikasyonu hızlı, duyarlı, özgül bir yöntemdir ve laboratuvar tanıda altın standart olma yolundadır.

KAYNAKLAR

1. Bale JR. Viral encephalitis. *Med Clin North Am* 1993; 77:25-42.
2. Whitley RJ. Viral encephalitis. *NEJM* 1990;323:242-50.
3. Jubelt B, Miller JR. Viral infections. In: Rowland LP (ed). *Merritt's Textbook of Neurology*. Ninth edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995:142-78.
4. Schooley RT. Encephalitis. In: Ropper AH (ed). *Neurological and Neurosurgical Intensive Care*. Third edition, New York: Raven Press Ltd, 1993:411-6.
5. Whitley RJ, Lakeman FD. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: Therapeutic and diagnostic considerations. *Clin Infect Dis* 1995;20:414-20.
6. Fujiki N, Tashiro K. Herpes viruses: Herpes simplex virus, varicella-zoster virus, epstein-barr virus, cytomegalovirus. *Nippon Rinsho* 1997;55:855-60.
7. 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. *J Infect Dis* 1995;171:857-63.
8. 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.
9. Revello MG, Baldanti F, Sarasini A, Zella D, Zavattoni M, Gerna G. Quantitation of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex virus encephalitis by the polymerase chain reaction. *Clin Diagn Virol* 1997;7:183-91.
10. Bhabha SK, Bharucha NE, Bharucha EP. Viral infections. In: Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM (eds). *Neurology in Clinical Practice. The Neurological Disorders*. Second edition, Boston: Butterworth-Heinemann, 1996: 1259-75.
11. Adams RD, Victor M, Ropper AH. Viral infections of the nervous system. In: Adams RD, Victor M, Ropper AH (eds). *Principles of Neurology*. Sixth edition, New York: McGraw-Hill Companies, 1997:742-76.

Yazışma Adresi:

Dr. Aysin ZEYTİNOĞLU

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

35100 Bornova - İZMİR

Makalenin Geliş Tarihi: 10.02.2000

Kabul Tarihi: 11.06.2000