

SANTRAL SİNİR SİSTEMİ HERPESVİRUS İNFEKSİYONLARININ TANISI İÇİN BİR MULTİPLEKS POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU DENEMESİ

A MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY FOR THE DIAGNOSIS OF HERPESVIRUS INFECTIONS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Hüseyin TAŞLI¹ ve Murat SAYAN²

¹ Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

² Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı, PCR Ünitesi, Kocaeli

Anahtar Sözcükler: Herpesviruslar, santral sinir sistemi infeksiyonları, beyin-omurilik sıvısı, polimeraz zincir reaksiyonu

Keywords: Herpesviruses, central nervous system infections, cerebrospinal fluid, polymerase chain reaction

Geliş: 26 Aralık 2008

Kabul: 23 Ocak 2009

ÖZET

Günümüzde santral sinir sistemi (SSS) herpesvirus infeksiyonlarının tanısı için beyin-omurilik sıvısının (BOS) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi yaygın olarak kullanılmaktadır. Herpesvirusların sayıca fazla olması ve BOS miktarının sınırlı olması gibi nedenlerle virusların tek tek taranmasında PCR kullanımı sınırlıdır. Bu ön hazırlık çalışmasında, Herpes simpleks virus tip 1 ve 2 (HSV-1, HSV-2), Varisella-zoster virus (VZV), Sitomegalovirus (CMV) ve Epstein-Bar virus (EBV) olmak üzere beş herpesvirusun BOS örneklerinde eş zamanlı taranmasını sağlayabilecek bir multipleks PCR (M-PCR) yönteminin gerçekleştirilmesi ve optimizasyonu amaçlanmıştır. Geleneksel virus spesifik PCR reaksiyonları ile CMV dışında HSV-1, HSV-2, VZV ve EBV pozitif bulunan ikişer BOS örneği M-PCR ile incelendi. Birden fazla virus varlığını saptamak için BOS örnekleri karıştırılarak inceleme tekrarlandı. Çalışma sonucunda her örnekte beklenen virus DNA'ları ve karıştırılan örneklerde birden fazla virus DNA'sı M-PCR ile saptanabildi. Bu ön çalışmayla, beş herpesvirusun tek tüp amplifikasyon ile kolaylıkla saptanabileceği gösterilse de yöntemin çok sayıda klinik örnekte denenmesi gereklidir.

SUMMARY

Today, the polymerase chain reaction (PCR) analysis of the cerebrospinal fluid (CSF) is commonly used for the diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system (CNS). Due to the great number of herpesviruses and limited amount of CSF, PCR application offers limited throughput when viruses are screened individually. The purpose of this preliminary study was to create and optimize a multiplex PCR (M-PCR) method that enables the simultaneous screening of five viruses including Herpes simplex virus type 1 and type 2 (HSV-1, HSV 2), Varicella-zoster virus (VZV), Cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Bar virus (EBV) in CSF samples. Pairs of CSF samples, which were found positive for HSV-1, HSV-2, VZV and EBV but not for CMV by virus-specific PCR reactions, were examined by M-PCR. In order to determine the presence of multiple viruses, CSF samples were mixed and the examination was repeated. At the end of the study, expected virus DNAs could be determined in each sample and multiple viruses could be determined in the mixed samples by M-PCR. Although this study shows that five herpesviruses can be easily detected via a single amplification reaction, the method should be further evaluated by numerous clinical samples.

GİRİŞ

Herpesviruslar hem primer infeksiyon hem de virusun reaktivasyonu veya re-infeksiyonu sırasında nörolojik bir hastalığa neden olabilir (1, 2). Santral sinir sistemi (SSS) infeksiyonlarından çok sayıda virus sorumlu olabilir. Herpesvirusların spesifik klinik bulguları olsa da infeksiyonun kesin etiyolojik tanısında zorluklar vardır. Klinik ve laboratuvar bulgularının gerek herpesvirus gerekse herpesvirus dışı infeksiyonlarda benzerlikler göstermesi tanıyı güvenilirmez kılar. Son yıllarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve PCR tabanlı testler hızlı ve güvenilir testler olarak sıklıkla önerilmektedir (3-5). Günümüzde SSS herpesvirus infeksiyonlarının tanısı için beyin-omurilik sıvısı (BOS)'nda virus DNA'sının PCR ile saptanması yaygın olarak rutin kullanıma girmiştir (2, 6-8). Başlangıçta her virus için bir seri PCR testi uygulaması zaman ve maliyet açısından sıkıntı yaratmıştır (6). Birden çok herpesvirusun tek tek taranması gerekliliği ve BOS miktarının sınırlı olması gibi nedenlerle bir reaksiyonda birden fazla virusun eş zamanlı aranmasına olanak tanıyan bir çok PCR yöntemi geliştirilmiştir (7, 9-11).

Bu ön hazırlık çalışmasında, Herpes simpleks virus tip 1 ve 2 (HSV-1, HSV-2), Varisella-zoster virus (VZV), Sitomegalovirus (CMV) ve Epstein-Bar virus (EBV) olmak üzere beş herpesvirusun BOS örneklerinde eş zamanlı taranmasını sağlayabilecek bir multipleks PCR (M-PCR) yönteminin gerçekleştirilmesi ve optimizasyonu amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Beyin-omurilik sıvısı örnekleri üniversite hastanesi PCR laboratuvarından sağlandı. Rutin inceleme kapsamında geleneksel virus spesifik "in-house" PCR reaksiyonları ile

HSV-1, HSV-2, VZV ve EBV pozitif rapor edilen ikişer BOS örneği ve yine rutin PCR sonuçlarına göre virus içermeyen iki BOS örneği olmak üzere toplam 10 örnek incelemeye alındı. Sitomegalovirus içeren BOS örneği bulunamadığından çalışmada yer almamış, ancak CMV primer setleri çalışmaya dahil edilmiştir. M-PCR uygulamalarından önce çalışmaya alınan BOS örnekleri, içerdikleri virusları doğrulamak amacıyla Tablo 1'deki primer setleri kullanılarak tek PCR testleri ile incelendi. Virus DNA'ları High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Almanya) ile izole edildi ve izole edilen DNA'lar M-PCR ile incelendi. Herpes simplex virus-1 içeren bir BOS örneği saptanabilir en yüksek dilüsyonda pozitif kontrol, virus içermeyen iki BOS örneği ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan primer setleri (7) Tablo 1'de gösterilmiştir. Primer setlerinden alfa-tubulin, DNA ekstraksiyonu eksikliği veya amplikasyon inhibitörlerinin neden olduğu yalancı negatiflik durumunu görebilmek için kullanıldı (7). Birden fazla virus varlığını saptamak için BOS örnekleri ikili ve üçlü karıştırılarak inceleme tekrarlandı. Yönteminin optimizasyonu için bir dizi reaksiyon gerçekleştirildi ve en uygun karışım ve koşullar belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda M-PCR reaksiyonu için dNTP'ler 200 µM, her bir primer 20 pmol, MgCl₂ 1.5 mM, Taq polimeraz 2.5 U, DNA miktarı 5 µl ve toplam hacim 50 µl olacak şekilde içerik hazırlandı. Isı döngü cihazında (Techne, Barloworld Scientific Ltd., İngiltere); 94° C'de 5 dakika ön denatürasyonu takiben 40 döngü olacak şekilde 94° C'de 30 sn denatürasyon, 60 °C'de 40 sn birleşme, 72° C'de 50 sn uzama ve 72° C'de 10 dakika son uzama koşulları uygulandı. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri 50 bp DNA marker eşliğinde agaroz jel elektroforezi (% 3,5 jel, 100 V) ve etidyum bromit yöntemi ile incelendi.

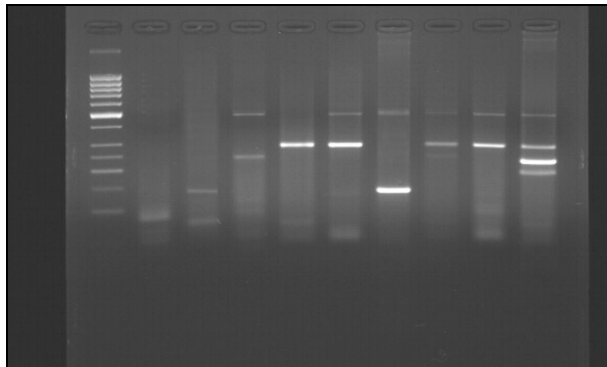
Tablo 1. Çalışmada kullanılan primer setleri

Primer	Sekans (5' → 3')	Ürün uzunluğu (bp)
HSV-1-F	TGGGACACACATGCCTTCTTGG	147
HSV-1-F	ACCCTTAGTCAGACTCTGTACTTACCC	
EBV-F	AACATTGGCAGCAGGTAAGC	182
EBV-R	ACTTACCAAGTGTCCATAGGAGC	
HSV-2-F	GTACAGACCTTCGGAGG	227
HSV-2-R	CGCTTCATCATGGGC	
CMV-F	GTACACGCACGCTGGTTACC	256
CMV-R	GTAAGAAAGCCTCGACATCGC	
VZV-F	CACACGATAATGCCTGATCGG	275
VZV-R	TGCTGATATTTCCACGGTACAGC	
Alfa-tubulin-F	CACCCGTCTTCAGGGCTTCTTGGTTT	527
Alfa-tubulin-F	CATTCACCATCTGGTTGGCTGGCTC	

BULGULAR

Multipleks-PCR'in optimizasyonu çalışmalarında farklı primer, $MgCl_2$ ve dNTP konsantrasyonları kullanılması yanında döngü sayısı, primer bağlanma ısı ve süresi gibi farklı reaksiyon koşulları uygulandı. Primer konsantrasyonları 10, 20 ve 50 pmol, dNTP konsantrasyonları 0.2, 0.3 ve 0.4 mM, magnezyum konsantrasyonları 1.25, 1.5 ve 2 mM, kalıp DNA miktarı 2, 5 ve 10 μL olacak şekilde bir dizi reaksiyon gerçekleştirildi. En uygun sonuçlar 20 pmol primer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP 5 μL of DNA değerleri ile elde edildi. M-PCR koşullarının optimizasyonu da döngü sayıları (30, 35, 40 döngü) ve primer birleşme ısıları (54- 60° C) değiştirilerek gerçekleştirildi. En ideal koşullar 40 döngü ve 60° C birleşme ısı olarak belirlendi.

Multipleks-PCR uygulamasından önce çalışmaya alınan BOS örneklerinde virus DNA varlığı virus spesifik PCR testleri ile doğrulandı. Multipleks-PCR çalışmaları sonucunda her örnekte beklenen virus DNA'ları, ikili karıştırılan örneklerde iki virus DNA'sı ve üç virusun karıştırıldığı bir örnekte üç virus DNA'sı M-PCR ile saptanabildi (Şekil 1). Sitomegalovirus içeren BOS örneği bulunamadığından reaksiyonlarda yer almamıştır. HSV-1, HSV-2, VZV ve EBV için sırasıyla 147 bp, 227 bp, 275 bp ve 182 bp uzunluğunda ürün bantları elde edildi. Alfa-tubulin primer seti içeren PCR reaksiyonlarında 527 bp ürün bandı izlenirken, negatif BOS örneklerinde herhangi bir ürün görülmedi.



Şekil 1. Multipleks PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. Sıra 1: 50 bp DNA marker. 2: Negatif kontrol. 3: Pozitif kontrol (HSV-1). 4: HSV-2 + alfa-tubulin. 5: VZV. 6, 9: VZV + alfa-tubulin. 7: HSV-1 + alfa-tubulin. 8: VZV + HSV-2 + alfa-tubulin. 10: EBV + HSV-2 + VZV + alfa-tubulin.

TARTIŞMA

Beyin omurilik sıvısının PCR analizi özellikle insan herpesviruslarına bağlı sinir sistemi infeksiyonlarının tanısında bir devrim yaratmıştır (8). Polimeraz zincir reaksi-

yonu testleri ile BOS'ta virus DNA'sının saptanması ve özellikle de kantitasyonunun; hastalık prognozunun aydınlatılması, farklı SSS bulgularının önceden tahmini, virus ilişkili hastalıklar arasında ayırım yapılması ve BOS'ta spesifik olmayan virus varlığının belirlenmesi açısından çok önemli olduğu vurgulanmıştır (12). Beyin omurilik sıvısı miktarının sınırlı olması, fazla zaman alması ve maliyetin yüksek olması gibi nedenlerle PCR ile virusların tek tek aranması yerine birden çok virusun tek bir PCR reaksiyonu ile eş zamanlı saptanmasına olanak sağlayan M-PCR yöntemlerinin kullanımı artmıştır (13-15). Bu çalışmada da BOS örneklerinde tek PCR ile beş herpesvirusun (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV ve CMV) saptanabilirliğini göstermek için bir M-PCR üzerinde çalışılmış, yöntemin örnekteki virus DNA'sını veya DNA'larını hızlı ve kolaylıkla saptadığı görülmüştür. Sitomegalovirus pozitif BOS örneği sağlanamadığı için test edilememiştir, ancak CMV primer setleri PCR reaksiyonlarında yer almıştır. Sitomegalovirus primer setleri çalışmaya dahil edilse de pozitif bir BOS örneğinde CMV'nin saptanabilirliği de M-PCR ile incelenmelidir.

Multipleks PCR uygulamalarında fazla primer varlığı istenmeyen ürünlerin oluşma şansını arttırmaktadır (6). Tafreshi ve ark. (11) bunu engellemek için herpesvirus konsensus primerleri seçerek primer sayısını azaltma yoluna gitmişler, bununla birlikte, nested PCR yapılmasını önermişlerdir. Herpes konsensus PCR yöntemini öneren diğer bazı araştırmacılar da yöntemin hızlı, spesifik ve yüksek derecede duyarlı olduğunu vurgulamışlardır (9, 10). Çalışmamızda beş virus ve bir de alfa-tubulin olmak üzere altı primer çifti kullanılmış ve primer fazlalığına bağlı herhangi bir hatalı ürün gözlenmemiştir. Ayrıca PCR optimizasyonunun doğru yapılması ve kalıp DNA miktarının 5-10 mL olması koşuluyla nested PCR'a ihtiyaç duyulmamıştır. Yöntemin optimizasyonu için BOS miktarları ölçüsünde çok sayıda deneme yapılmıştır. Optimal sonuçlar 20 pmol primer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP ve 5 μL DNA ekstraktı ile optimal koşulları ise 40 döngü ve 60° C birleşme ısı ile elde edilmiştir.

Çalışmanın kalite kontrolü açısından, çalışmada kullanılan BOS örneklerinde bilinen virus varlığı tek PCR reaksiyonları ile doğrulanmıştır. Bunun yanında, potansiyel kontaminasyonlara bağlı ortaya çıkabilen yalancı pozitiflikleri gözlemek için negatif kontroller, DNA ekstraksiyonundan itibaren tüm PCR reaksiyonlarında yer almıştır. Yalancı negatiflik durumu da PCR'in önemli sorunlarından biridir. Beyin omurilik sıvısının PCR inhibitörleri içerdiği çok iyi bilinmektedir. Bunlar DNA polimeraz aktivitesini kısmen veya tamamen engelleyebilir. Gerek

inhibitörler gerekse DNA ekstraksiyon eksikliği gibi nedenlerle ortaya çıkan yalancı negatiflikleri gözlemlmek için PCR reaksiyonlarında Markoulatos ve ark. (7)'nin yaptığı gibi alfa-tubulin primer setlerini kullanmıştır. Alfa-tubulin primer seti içeren tüm PCR çalışmalarında 527 bp alfa-tubulin bandı izlenmiş (Şekil 1) ve yalancı negatiflikleri gözlemlmek adına etkili bir yöntem olduğu görülmüştür.

Bu ön multipleks PCR çalışmasının; kolay ve hızlı olması yanında az miktar örnekle çalışılabilmesi, maliyetin düşük olması gibi avantajlara sahip invazif olmayan bir tanı aracı olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu yöntemle beş herpesvirusun tek tüp amplifikasyon ile kolaylıkla saptanabileceği gösterilse de yöntemin çok sayıda klinik örnekte denenmesine, duyarlılık ve özgüllüğünün tam olarak belirlenmesine gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Serter D. Herpes simplex virus infections. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* **2006**; 2: 19-24.
2. Boivin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes* **2004**; 11 (Suppl 2): 48A-56A.
3. Minjolle S, Michelet C, Jusselin I, Joannes M, Cartier F, Colimon R. Amplification of the six major human herpesviruses from cerebrospinal fluid by a single PCR. *J Clin Microbiol* **1999**; 37: 950-3.
4. Sauerbrei A, Wutzler P. Laboratory diagnosis of central nervous system infections caused by herpesviruses. *J Clin Virol* **2002**; 25 (Suppl 1): S45-51.
5. Demkin V, Kruglova AI, Nikolaeva NP, Yurchenko JV. Detection and species identification of herpesviruses using polymerase chain reaction coupled with restriction endonuclease analysis. *J Virol Methods* **2002**; 103: 121-8.
6. Elnifro M, Ashsli MA, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* **2000**; 13: 559-70.
7. Markoulatos P, Georgopoulou A, Siafakas Plakokefalos NE, Tzanakaki G, Kourea-Kremastinou J. Laboratory diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 4426-32.
8. DeBiasi RL, Kleinschmidt-DeMasters BK, Weinberg A, Tyler KL. Use of PCR for the diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol* **2002**; 25 (Suppl 1): S5-11.
9. 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 (Suppl 1): S71-8.
10. Minjolle S, Arvieux C, Gautier AL, et al. Detection of herpesvirus genomes by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid and clinical findings. *J Clin Virol* **2002**; 25 (Suppl 1): S59-70.
11. Tafreshi NK, Sadeghizadeh M, Amini-Bavil-Olyae S, Ahadi AM, Jahanzad I, Roostaei MH. 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.
12. Aberle SW, Puchhammer-Stockl E. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol* **2002**; 25 (Suppl 1): S79-85.
13. Quereda C, Corral I, Laguna F, et al. Diagnostic utility of a multiplex herpesvirus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 3061-7.
14. Yamamoto T, Nakamura Y. A single tube PCR assay for simultaneous amplification of HSV-1/-2, VZV, CMV, HHV-6A/-6B, and EBV DNAs in cerebrospinal fluid from patients with virus-related neurological diseases. *J Neurovirol* **2000**; 6: 410-17.
15. Druce J, Catton M, Chibo D, et al. Utility of a multiplex PCR assay for detecting herpesvirus DNA in clinical samples. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 1728-32.

İLETİŞİM

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin TAŞLI
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
35100 Bornova, İZMİR
e-posta: huseyin.tasli@ege.edu.tr