



Aziz Ramazan DİLEK
Yasemin BULUT
Adnan SEYREK
Yasemin Aslan ATAŞ

Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2014; 28 (1): 17 - 20
http://www.fusabil.org

Periodontitli Hastalarda Herpes Virüslerin Görülme Sıklığının PCR ile Belirlenmesi

Amaç: Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda herpesvirüslerle periodontit şiddeti arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Mevcut çalışmada periodontitli hastalardan alınan subgingival krevikular sıvı örneklerinde farklı herpesvirüslerin varlığının araştırılması ve bu hastalardaki herpesvirüs sıklığı ile periodontitin seyrini belirlemede önemli olan, plak indeksi (PI), gingival indeks (GI) ve cep derinliği (CD) gibi parametreler arasında bir ilişki olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla, Elazığ Diş Hastanesi Periodontoloji Kliniğine başvuran periodontitli 52 hastadan ve periodontit yönünden sağlıklı 20 bireyden paper pointler periodontal ceplere yerleştirilerek krevikular sıvı örnekleri alındı. Daha sonra, bu örneklerden DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'larda ve dört herpesvirüse özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile herpes virüs varlığı araştırıldı.

Bulgular: Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına göre, 52 periodontitli hasta örneğinin %61.5'inde EBV, %53.8'ünde CMV, %32.6'sında HSV-1 ve %25'inde HSV-2 pozitifliği tespit edildi.

Sonuç: Sonuç olarak, periodontitler ve bunların klinik seyirleri ile EBV ve CMV arasında kuvvetli, HSV'lar ile de zayıf bir etyolojik ilişkinin olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Periodontit, PCR, HSV-1, HSV-2, EBV, CMV.

Investigation of Herpes Virus Frequency in Patients with Periodontitis by Using PCR

Objective: Recently, a relation was revealed between herpesvirus and severity of periodontitis. The aim of this study was to determine prevalence of herpesvirus in crevicular fluid sample which were taken from patients with periodontitis and to reveal a relation between clinical parameter (plak indeksi; PI, gingival indeksi; GI and probing depth; PD) and present of herpesvirus.

Materials and Methods: For this aim, total of 52 patients with periodontitis and 20 healthy persons who attend to periodontology clinic of Elazığ Tooth Hospital were included the study. Crevicular fluid of sample of participants was taken with paper point. Later, DNAs of the samples was extracted. The presence of herpes viruses were investigated with Polymerase Chain Reaction (PCR) using four specific primers.

Results: EBV was determined in 61.5% of 52 patient's sample. CMV was determined in 53.8% of 52 samples. HSV-1 and HSV-2 were determined respectively in 32.6 % and 25 % of 52 samples.

Conclusion: As result, presence of a strong etiologic relation between presence of EBV, CMV and periodontitis, its clinic condition and a weak etiologic relation between HSV and periodontitis, its clinic condition were convinced.

Key Words: Periodontitis, PCR, HSV-1, HSV-2, EBV, CMV.

Geliş Tarihi : 25.11.2013
Kabul Tarihi : 10.03.2014

Yazışma Adresi Correspondence

Aziz Ramazan DİLEK
Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı,
Elazığ-TÜRKİYE

ar.dilek@hotmail.com

Giriş

Periodontit, dişetlerinde başlayan iltihabi değişikliklerin derin periodontal dokulara yansıdığı bir diş hastalığıdır (1). Kronik periodontit, periodontal hastalıkların en sık rastlanılan tipi olup 35-40 yaşından sonra popülasyonun büyük bir kısmını etkilemektedir. Kronik periodontit, primer etyolojik ajan olarak mikrobiyal plağın ve plak birikimini kolaylaştırıcı lokal faktörlerin sorumlu tutulduğu inatçı ve ilerleyici bir periodontit formudur. Kronik periodontitlerde yüksek oranda (%90) anaerob ve gram negatif bakteriler izole edilmektedir (2, 3). Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda herpes virüslerle periodontit şiddeti arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Bu çalışmalar hastalığın etyopatogenezinin daha ayrıntılı olarak anlaşılması yönündeki çalışmalara katkı sağlamıştır. Ancak, bugün için periodontit etyopatogenezinde herpesvirüslerin rolü ile ilgili tartışmalar devam etmektedir (4). Mevcut çalışmada, periodontitli hastalardan alınan subgingival krevikular sıvı örneklerinde, farklı herpes virüslerin (Herpes simpleks virüs tip 1 ve 2; HSV-1 ve HSV-2, Epstein-Barr virüs; EBV ve insan sitomegalovirüs; HCMV) varlığının araştırılması ve bu grup hastalardaki herpesvirüs sıklığı ile, periodontitin seyrini belirlemede önemli olan, plak indeksi (PI), gingival

indeks (Gİ) ve cep derinliği (CD) gibi parametreler arasında bir ilişki olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile Elazığ Diş Hastanesi'nin ortak katkıları ile gerçekleştirildi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nca onaylanan çalışmada Elazığ Diş Hastanesi Periodontoloji Kliniği'ne başvuran periodontitli 52 hastadan alınan krevikular sıvı örnekleri hasta grubunu oluştururken kontrol grubu olarak 20 sağlıklı bireyden krevikular sıvı örnekleri alındı. Hasta grubunu yaşları 33-67 arasında değişen (ortalama 49.9) 23 bayan ve 29 erkekten toplanan örnekler oluştururken, sağlıklı grubu da yaşları 30-56 arasında değişen (ortalama 43.3) 10 erkek ve 10 bayandan toplanan örnekler teşkil etti.

Örneklerin toplanması ve analize hazırlanması: Çalışmada kullanılan örnekler periodontoloji polikliniğinde hasta başında alındı. Örnekler son altı ay içinde antibiyotik almamış hastalardan temin edildi.

Genellikle bu tip çalışmalarda sıkça kullanıldığı ve bu sayede çalışmalar arasında mukayese imkânı sağladığı için, örnek alınan hastaların Silness- Løe'ün plak indeksi ve gingival indeksi skorlandı (Tablo 1 ve 2). Ayrıca hastaların diş cep derinliği belirlendi.

Hastalardan örnekler alınmadan önce hastaların ağızlarını 30 sn kadar klorhexidine ile yıkamaları istendi. Paper pointler (micro-IDent-plus/Hain-Lifescience) diş hekimleri tarafından periodontal ceplere yerleştirildi. Krevikular sıvıyı emmesi için 30 sn bekletildikten sonra, paper pointler steril kapaklı ependorflara alındı. Örnekler buz aküleri ile birlikte hızlı bir şekilde laboratuvara ulaştırıldı. Örnekler laboratuvarında çalışılacak zamana kadar -80°C derecede stoklandı.

Tüm diş örneklerinden QIAamp DNA Mini Kit ile üretici firmanın (Qiagen) önerileri doğrultusunda DNA izolasyonu yapıldı.

Aşağıda belirtilen primerler kullanılarak In-House PCR ile HSV-1, HSV-2, EBV, CMV-1, CMV-2 varlığı izole edilen DNA örneklerinde araştırıldı (Tablo 3).

Tablo 1. Plak indeksi (Pİ)

Skor	Kriter
0	PI Plak yok
1	D Dişin gingival kenarına yapışmış film plağı mevcut ancak görüntü sağlayacak solusyonlar ya da diş yüzeyine prob kullanarak görülebilmekte.
2	G Gingival cebin içinde veya diş yüzeyinde çıplak gözle görülebilen orta derecede yumuşak depozit birikimi
3	G Gingival cep veya diş yüzeyinde bol miktarda yumuşak depozit birikimi mevcut.

Tablo 2. Gingival indeks (Gİ).

Görünüm	Kanama	inflamasyon	Skor
N Normal	Yok	Yok	0
Gingivanın renginde hafif değişiklik gingivanın sertliğinde hafif değişiklikle birlikte hafif ödem	Yok	Hafif	1
K Kızarıklık, hipertrofi, ödem	P Prob dokunması ve bastırma ile kanama	Orta	2
B Belirgin kızarıklık, hipertrofi, ödem, ülserasyon	Spontan kanama	Şiddetli	3

Tablo 3. Çalışmada kullanılan primerler

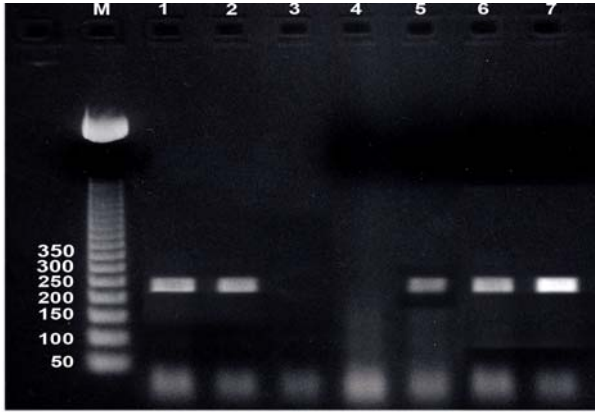
Virus	Hedef Bölge	Ürün uzunluğu (bp)	Primer Dizilimleri
HSV-1	gpC	450 bp	P1 (5' TGA CGT TGT CCT GGT TCC TG 3')
HSV-1	gpC	450 bp	P2 (5' GAA GAG AGG GTG GCG GCT TTA 3')
HSV-2 1.PCR	gpG	184 bp	P1 (5' TCA GCC CAT CCT CCT TCG GCA GTA 3')
HSV-2 1.PCR	gpG	184 bp	P2 (5' GAT CTG GTA CTC GAA TGT TCT CCG 3')
HSV-2 2.PCR	gpG	100 bp	P3 (5' AGA CGT GCG GGT CGT ACA CG 3')
HSV-2 2.PCR	gpG	100 bp	P4 (5' CGC GCG GTC CCA GAT CGG CA 3')
EBV	gp220	239 bp	P1 (5' AGG GAT GCC TGG ACA CAA GA 3')
EBV	gp220	239 bp	P2 (5' TGG TGC TGC TGG TGG TGG CAA T 3')
CMV-1.PCR	UL123	438 bp	P1 (5' CAA GCG GCC TCT GAT AAC CAA GC 3')
CMV-1.PCR	UL123	438 bp	P2 (5' CTC TTC CTC TGG GGC AAC TTC CTC 3')
CMV-2.PCR	UL123	190 bp	P3 (5' CCG ATC CTC TGA GAG TCT GCT CTC 3')
CMV-2.PCR	UL123	190 bp	P4 (5' CAG CCA CAA TTA CTG AGG ACA GA 3')

Tüm PCR çoğaltma ürünleri etidyum bromidli %2'lik agaroz jelde yürütülerek elektroforezle yürütüldü ve UV transilluminatörde incelenerek oluşan bantlar değerlendirildi.

Hastalıklı gruptaki EBV, CMV varlığı ile sağlıklı gruptaki EBV, CMV varlığı arasındaki farkın anlamlı olup olmadığını tespit etmek için fisher's exact testi uygulandı. Virüs varlığı ile Pl, Gl ve cep derinliği arasındaki ilişki spearman's korelasyon analizi ile gerçekleştirildi.

Bulgular

Yapılan PCR neticesinde 52 örneğin 32'sinde (%61.5) EBV pozitif olarak belirlendi. EBV DNA yönünden pozitif ve negatif olan bazı örneklerin PCR ürünlerinin jel görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. EBV pozitif ve negatif PCR ürünleri (239 bp)

Aynı örneklerden CMV DNA pozitifliğini belirlemek için yapılan nested PCR sonucunda ise örneklerin 28 inde (%53.8) CMV DNA pozitifliği tespit edildi.

Hasta grubunun HSV-1 ve HSV-2 primerleri ile kurulan PCR sonuçlarında ise HSV-1 ve HSV-2 pozitifliği sırayla 17 (%32.6) ve 13 (%25) olarak tespit edildi. Hasta ve sağlıklı grubun örneklerinde virüslerin görülme sıklığı tablo 4 de gösterildi (Tablo 4).

Tablo 4. Hasta grubunda PCR'la tespit edilen virüs sıklığı.

Virüsler	Hasta (n: 52)	Sağlıklı (n: 20)
EBV	32 (%61.5)	4 (%20)
CMV	28 (%53.8)	2 (%10)
HSV-1	17 (%32.6)	2 (%10)
HSV-2	13 (%25)	1 (%5)

Elde edilen pozitif PCR sonuçlarının hastaların plak indeksi, gingival indeksi, cep derinliği ile yapılan spearman's rho korelasyon analizinde EBV-1 varlığı ile bahsedilen üç parametre arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilirken ($P < 0.01$) CMV varlığı ile 2 parametre (plak indeksi ($P < 0.01$), cep derinliği ($P < 0.05$)) arasında

anlamlı bir korelasyon tespit edilmiş fakat gingival indeks ile anlamlı bir ilişki gösterilememiştir.

Elde edilen sonuçlara göre HSV-1 ve HSV-2 varlığı ile plak indeksi, gingival indeksi, cep derinliği arasında anlamlı bir korelasyon ilişkisi yoktur.

Tartışma

Gingivitis ve periodontitin genellikle diş yüzeyinde kolonize olan bakteriler tarafından başlatılan hasarın sonucunda meydana geldiğine inanılmaktadır (5). Bu görüşün temelinde, plak varlığı ile gingivitis ve periodontit arasındaki pozitif ilişki yatmaktadır. Plak mevcudiyetinde gingivitis ve periodontitin şiddeti artmaktadır (6). Bakteriyel plağın periodontit patogenezindeki önemine ait kanıtların olmasına rağmen bozuk oral hijyen, sigara kullanımı gibi ekzojen faktörler, insanlar arasındaki immün cevap farklılıkları gibi endojen faktörler hastalığın meydana gelmesine katkı yapmaktadır (7-10). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda bazı virüslerin periodontal hastalık gelişimi ve şiddetine katkılarının olabileceği ileri sürülmüş ve buna dair kanıtlar elde edilmiştir (5, 11, 12). Herpesvirüs enfeksiyonlarına genellikle çocukluk çağında oral sekresyonlar ile temas yoluyla yakalanılmaktadır (13-16). Primer herpetik gingivitis viral orijinli gingivitis en sık sebebidir (17). Bu virüslerin rekürrensleri herpes labialis'de olduğu gibi genellikle mukokutanöz birleşim yerlerinde olmaktadır. Damak ve gingiva rekürrensleri diğer sık görüldüğü yerlerdir (18, 19). İnsanların %90'ından fazlasının EBV ile enfekte olduğu düşünülürken, CMV nin endüstrilemiş ülkelerde 20 li yaşlara kadar popülasyonun %90'ını etkilediği hesaplanmaktadır (20-25). Herpes virüslerin periodontal hastalık etyolojisinde yer almaları ile ilgili hipotezler bu virüslerin periodontal hastalığı olan kişilerin gingival dokularında, gingival krevikular sıvılarında, subgingival plaklarında tespit edilmesine dayanmaktadır (5, 26) Yaptığımız çalışmadaki EBV ve CMV pozitifliği oranları hem yurt dışı hem de yurt içinde yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (11, 12). Yapılan çalışmaların pek çoğunda değişken oranlarda genel HSV veya HSV-1'in varlığı bildirilirken, HSV-2 varlığı ya düşük oranlarda belirlenmiş ya da tespit edilmemiştir (27-29).

Sonuç olarak, EBV ve CMV varlığı ile periodontit ve periodontit'in klinik şiddeti arasında kuvvetli bir ilişki olduğu kanaatine varılırken HSV ler ile periodontit arasındaki ilişkinin zayıf olduğu düşünülmektedir. Fakat konu ile ilgili yapılan çalışmaların az olması, çalışmalarda pek çok farklı parametreye bakılma zorunluluğu ve değişken sonuçların elde edilmesi dikkate alındığı zaman, elde edilen bulgulara göre herpesvirüslerle periodontit arasında sebep-sonuç ilişkisinin tam olarak aydınlatılması için reseptör düzeyinde çalışmaların artırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Eisenberg L, Suchow R, Coles RS, Deasy MJ. The effects of metronidazole administration on clinical and microbiologic parameters of periodontal disease. *Clin Prev Dent* 1991; 13: 28-34.
2. Klinge B, Attström R, Karring T, et al. 3 regimens of topical metronidazole compared with subgingival scaling on periodontal pathology in adults. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 708-714.
3. İpek F, Gül K. Kronik periodontitisin klasik mekanik tedavisine ek olarak sistemik metronidazol uygulananının klinik ve mikrobiyolojik etkilerinin incelenmesi. *Dicle Tıp Derg* 2007; 34: 203-210.
4. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontol Res* 2000; 35: 3-16.
5. Cappuyns I, Gugerli P, Mombelli A. Viruses in periodontal disease – A review. *Oral Diseases* 2005; 11: 219-229.
6. Migliorati CA, Madrid C. The interface between oral and systemic health: The need for more collaboration. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 11-16.
7. Eisenmann AC, Eisenmann R, Sousa O, Slots J. Microbiological study of localized juvenile periodontitis in Panama. *J Periodontol* 1983; 54: 712-713.
8. McNabb H, Mombelli A, Gmür R, Mathey-Dinc, S, Lang NP. Periodontal pathogens in shallow pockets in immigrants from developing countries. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 267-272.
9. Bergström J. Cigarette smoking as a risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989; 17: 245-247.
10. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: Assembling the players. *Periodontol* 2000; 14: 33-53.
11. Klemenc P, Skaleric U, Artnik B, Nogrsek P, Marin J. Prevalence of some herpesviruses in gingival krevikular fluid. *J Clin Virol* 2005; 34: 147-152.
12. Contreras A, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 15-18.
13. De Araujo T, Berman B, Weinstein A. Human herpesviruses 6 and 7. *Dermatol Clin* 2002; 20: 301-306.
14. Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, et al. The family Herpesviridae: An update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 1992; 123: 425-249.
15. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet* 2001; 357: 1513-1518.
16. Buxbaum S, Geers M, Gross G, et al. Epidemiology of herpes simplex virus types 1 and 2 in Germany: what has changed? *Med Microbiol Immunol* 2003; 192: 177-181.
17. Nikkels AF, Pierard GE. Chronic herpes simplex virus type I glossitis in an immunocompromised man. *Br J Dermatol* 1999; 140: 343-346.
18. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet* 2001; 357: 1513-1518.
19. Buxbaum S, Geers M, Gross G, et al. Epidemiology of herpes simplex virus types 1 and 2 in Germany: What has changed? *Med Microbiol Immunol* 2003; 192: 177-181.
20. Cohen JI. Epstein-Barr virus and the immune system. Hide and Seek. *JAMA* 1997; 278: 510-513.
21. Yao QY, Rickinson AB, Epstein MA. Oropharyngeal shedding of infectious Epstein-Barr virus in healthy virusimmune donors. A prospective study. *Chin Med J* 1985; 98: 191-196.
22. Rivera-Hidalgo F, Stanford TW. Oral mucosal lesions caused by infective microorganisms. I. Viruses and bacteria. *Periodontol* 2000; 21: 106-124.
23. Pass RF. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Infect Dis* 1985; 152: 243-248.
24. Numazaki KA, Chiba S. Latent infection and reactivation of human cytomegalovirus. *Serodiagn Immunother Infect Disease* 1995; 7: 70-74.
25. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 2003; 98: 269-297.
26. Scully C, Porter S. Orofacial disease: update for the dental clinical team: 2. Ulcers, erosions and other causes of sore mouth. Part I. *Dent Update* 1998; 25: 478-484.
27. Santangelo R, D'Ercole S, Graffeo R, et al. Bacterial and viral DNA in periodontal disease: A study using multiplex PCR. *New Microbiol* 2004; 27: 133-137.
28. Saygun I, Kubar A, Özdemir A, Yapar M, Slots J. Herpesviral-bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. *J Periodont Res* 2004; 39: 207-212.
29. Ling LJ, Ho CC, Wu CY, Chen YT, Hung SL. Association between human herpesviruses and the severity of periodontitis. *J Periodontol* 2004; 75: 1479-1485.