

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nadja LORBER

**PRIMERJAVA PREKUŽENOSTI NOSEČNIC Z
VIRUSOMA *Herpes simplex* TIPA 1 IN 2 V SLOVENIJI
V DESETLETNEM RAZMIKU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nadja LORBER

PRIMERJAVA PREKUŽENOSTI NOSEČNIC Z VIRUSOMA *Herpes simplex* TIPA 1 IN 2 V SLOVENIJI V DESETLETNEM RAZMIKU

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**THE COMPARISON OF *Herpes simplex* TYPE 1 AND 2
PREVALENCE IN PREGNANT WOMEN IN SLOVENIA DURING A
TEN – YEAR PERIOD**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za viruse Oddelka za medicinsko mikrobiologijo na Inštitutu za varovanje zdravja Republike Slovenije v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Jožico Marin in za recenzenta prof. dr. Jerneja Logarja.

Mentorica: prof. dr. Jožica Marin

Recenzent: prof. dr. Jernej Logar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić Mulec, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Jožica Marin, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Jernej Logar, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nadja Lorber

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 578.7:616.9(043)=863
- KG virusne okužbe/ virus herpes simpleks 1/ virus herpes simpleks 2/ prekuženost nosečnic/ nosečnice/ Slovenija
- AV LORBER, Nadja
- SA MARIN, Jožica (mentorica)/LOGAR, Jernej (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2006
- IN PRIMERJAVA PREKUŽENOSTI NOSEČNIC Z VIRUSOMA *Herpes simplex* TIP 1 IN 2 V SLOVENIJI V DESETLETNEM RAZMIKU
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 64 str., 7 pregl., 14 sl., 52 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Virus herpes simpleks 1 in herpes simpleks 2 (HSV 1, HSV 2) spadata med najbolj pogoste povzročitelje virusnih okužb pri človeku. Virus herpes simpleks se prenaša z neposrednim stikom: HSV 1 predvsem horizontalno v otroštvu, HSV 2 pa najpogosteje s spolnim kontaktom. V nekaterih epidemioloških študijah v različnih državah ugotavljajo spremembe v seroprevalenci virusov HSV 1 in HSV 2. Ugotavljajo, da prihaja do upada prekuženosti s HSV 1 v mlajših starostnih skupinah v državah severne in zahodne Evrope in do porasta genitalnega herpesa, povzročene s HSV 1. V nekaterih državah opažajo zgodnejšo okužbo s HSV 2 kot nekoč, kar razlagajo s spremembami v vedenju mlajših starostnih skupin. V diplomski nalogi smo ugotavljali prekuženost nosečnic v Sloveniji z virusoma HSV 1 in HSV 2 na vzorcu serumov, zbranih v letu 2003. Dobljene rezultate smo primerjali s podatki iz leta 1992 in z drugimi, predvsem evropskimi državami. Serume smo testirali s testom ELISA, preizkusili pa smo tudi imunsko blot metodo. Ugotovili smo, da je v Sloveniji prekuženost nosečnic s HSV 1 visoka (86,9 %), podobno kot v državah srednje in jugovzhodne Evrope (Bolgarija, Češka, Nemčija). Prekuženost slovenskih nosečnic s HSV 2 je razmeroma nizka (8,4 %) in je podobna kot na Češkem in v Nemčiji. Od leta 1993 do 2003 smo opazili rahel padec prekuženosti s HSV 1 in porast s HSV 2, kar bi lahko nakazovalo trend, podoben tistemu v nekaterih državah severne in zahodne Evrope. To je najverjetneje posledica drugačnih kulturnih in socialnih navad (HSV 1) in spremembe v začetku spolne aktivnosti in sprememb v spolnih navadah (HSV 2). Preizkušena imunska blot metoda se je zaradi premajhne občutljivosti izkazala kot neprimerna za seroepidemiološke študije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 578.7:616.9(043)=863
CX viral infection/ Herpes simplex 1 virus/ Herpes simplex 2 virus/ pregnant women
seroprevalence/ pregnant women/ Slovenia
AU LORBER, Nadja
AA MARIN, Jožica (supervisor)/LOGAR, Jernej (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2006
TY THE COMPARISON OF *Herpes simplex* TYPE 1 AND 2 PREVALENCE IN
PREGNANT WOMEN IN SLOVENIA DURING A TEN-YEAR PERIOD
DT Graduation Thesis (University Studies)
NO X, 64 p., 7 tab., 14 fig., 52 ref.
LA sl
AL sl/en

AB Herpes simplex 1 and 2 viruses (HSV 1, HSV 2) belong to the most common causes of viral infection in humans. Herpes simplex virus is transmitted by direct contact: HSV 1 in childhood primarily horizontally, whereas HSV 2 by sexual contact. Some epidemiologic studies in various countries have found out many changes in HSV 1 and HSV 2 seroprevalence. In Northern and Western European countries a decrease in HSV 1 seroprevalence has been detected in younger age groups. On the other hand, an increase in genital herpes, caused by HSV 1 has been observed. In some countries a comparatively earlier infection with the HSV 2 has been detected. A change in behaviour patterns of these age groups has been suggested as a possible cause. The aim of the thesis was to study pregnant women seroprevalence with HSV 1 and HSV 2 serum samples collected in 2003 in Slovenia. Our results were compared with data obtained in 1992, and with other, mostly European countries. Serums were ELISA-tested. Also, immuno- blot method tests were carried out. The results show that there is a high HSV 1 prevalence in Slovenia (86,9 %), similar to other Middle and South-eastern European countries (Bulgaria, The Czech Republic, Germany). HSV 2 prevalence in Slovene pregnant women is relatively low (8,4 %), similar to the Czech Republic and Germany. In the period between 1993 and 2003 a slight decrease of HSV 1 seroprevalence was detected, as well as an increase of HSV 1 prevalence. This suggests a similar trend to the one observed in some Northern and Western European countries. A possible cause for this are changes in cultural and social practices (HSV 1) as well as changes in the start of social activity and changes in social habits (HSV 2). The immuno-blot method has proved inappropriate for seroepidemiologic studies due to its low sensitivity.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKAINFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HERPEŠVIRUSI.....	3
2.2.1 Zgradba herpesvirusov	3
2.1.2 Razdelitev virusov herpesa, ki okužijo ljudi	4
2.1.3 Genom virusa	5
2.1.4 Ovojnica virusa	6
2.1.5 Beljakovine virusa	6
2.1.6 Razmnoževanje herpesvirusov	7
2.2 OKUŽBE S HSV 1 IN HSV 2	9
2.2.1 Stopnje okužbe s HSV	9
2.3 BOLEZNI, KI JIH POVZROČATA HSV 1 IN HSV 2	10
2.3.1 Okužbe kože	11
2.3.2 Okužbe oči	11

2.3.3 Encefalitis	11
2.3.4 Genitalni herpes	11
2.3.5 Neonatalni herpes	12
2.3.6 Okužbe pri imunsko oslabljenih bolnikih	14
2.4 IMUNSKI ODZIV	14
2.4.1 Celična imunost	14
2.4.2 Humoralna imunost	15
2.5 EPIDEMIOLOGIJA	16
2.6 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽB S HSV	17
2.6.1 Protivirusna zdravila	17
2.6.2 Cepiva za zaščito proti HSV	19
2.7 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB S HSV	19
2.7.1 Neposredno dokazovanje virusov HSV v kužninah	19
2.7.1.1 Celične kulture in poskusne živali	20
2.7.1.2 Imunske metode za dokazovanje virusnih antigenov	20
2.7.1.3 Molekularno dokazovanje HSV	21
2.7.2 Posredno dokazovanje virusov – serološke metode	22
3 MATERIAL IN METODE	26
3.1 ZBIRANJE IN SHRANJEVANJE VZORCEV	26
3.2 ENCIMSKO IMUNSKI TEST (ELISA)	26
3.2.1 Princip testa Focus diagnostics HerpeSelect [®] ELISA IgG	27
3.2.2 Sestavine kompleta Focus diagnostics HerpeSelect [®] ELISA IgG	27
3.2.3 Postopek testa ELISA IgG	28

3.3 IMUNSKA BLOT METODA.....	31
3.3.1 Princip testa Focus Diagnostics HerpeSelect[®] 1 in 2 Immunoblot IgG.....	31
3.3.2 Sestavine kompleta Focus Diagnostics HerpeSelect[®] 1 in 2 Immunoblot IgG	31
3.3.3 Postopek imunske blot metode.....	32
3.4 OBDELAVA REZULTATOV.....	34
4 REZULTATI.....	36
4.1 VZORČENJE	36
4.2 STANDARDIZACIJA METODE ELISA	37
4.3 TESTIRANJE SERUMOV IZ SERUMSKE BANKE Z METODO ELISA	39
4.4 TESTIRANJE IZBRANIH SERUMOV IZ BANKE Z IMUNSKO BLOT METODO	41
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	44
5.1 RAZPRAVA.....	44
5.2 SKLEPI.....	54
6 POVZETEK	55
7 VIRI	57

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razdelitev humanih herpesvirusov (Brooks in sod., 1998:388; Cann, 2001:73)

Preglednica 2: Število serumov iz leta 2003 iz različnih področij in starostne skupine nosečnic

Preglednica 3: Število nosečnic v 4 starostnih skupinah, pri katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 1 in/ali proti HSV 2

Preglednica 4: Deleži nosečnic v 4 starostnih skupinah, pri katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 1 in/ali proti HSV 2

Preglednica 5: Primerjava serumov, ki so imeli pozitiven rezultat za skupna protitelesa za herpes simpleks (common antigen) z imunsko blot metodo z rezultati teh vzorcev v testu ELISA.

Preglednica 6: Primerjava serumov, ki so imeli pozitiven rezultat za specifična protitelesa proti HSV 1 z imunsko blot metodo z rezultati teh vzorcev v testu ELISA

Preglednica 7: Primerjava serumov, ki so imeli pozitiven rezultat za specifična protitelesa proti HSV 2 z imunsko blot metodo z rezultati teh vzorcev v testu ELISA

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema zgradbe HSV (Henderson, 2001)

Slika 2: Genom HSV 1 in mesto LAT genov (Lachmann, 2003)

Slika 3: Pritrjevanje in vstopanje virusa herpesa v gostiteljsko celico (Campadelli-Fiume, 2001)

Slika 4: Encimskoimunska metoda (ELISA) (Erickson, 2005)

Slika 5: Primer protokola za test ELISA IgG

Slika 6: Primer protokola in beleženja rezultatov za test Immunoblot IgG

Slika 7: Standardizacijska krivulja in enačba za HSV 1

Slika 8: Standardizacijska krivulja in enačba za HSV 2

Slika 9: Prekuženost nosečnic v Sloveniji s HSV 1 in HSV 2 v letu 2003 po posameznih starostnih skupinah

Slika 10: Prekuženost nosečnic s HSV 1 v Sloveniji po starostnih skupinah v letih 1993 in 2003

Slika 11: Primerjava prekuženosti s HSV 1 med državami (podatki o prekuženosti v drugih državah se nanašajo na celotno populacijo žensk določene starostne skupine in ne le na nosečnice)

Slika 12: Prekuženost nosečnic v Sloveniji s HSV 2 po starostnih skupinah v letih 1993 in 2003

Slika 13: Primerjava prekuženosti s HSV 2 med državami (podatki o prekuženosti v drugih državah se nanašajo na celotno populacijo žensk določene starostne skupine in ne le na nosečnice)

Slika 14: Različne kombinacije rezultatov testiranja na protitelesa proti HSV 1 in HSV 2 (ELISA)

SEZNAM OKRAJŠAV

CPU – citopatski učinek

CŽS – centralni živčni sistem

DNK – dezoksiribonukleinska kislina

ELISA – encimsko imunski test (angl.: enzyme linked immunosorbent assay)

HHV – človeški herpesvirus (angl.: human herpes virus)

HIV – virus človeške imunske pomanjkljivosti (angl.: human immunodeficiency virus)

HSV 1 – *Herpes simplex* virus 1

HSV 2 – *Herpes simplex* virus 2

IV – indeksna vrednost

kbp – kilo bazni par

OD – optična gostota (angl.: optical density)

PBS – fosfatni pufer (angl.: phosphate buffered saline)

PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl.: polymerase chain reaction)

1 UVOD

Virusi herpesa so med najpogostejšimi povzročitelji okužb pri ljudeh. Prekuženost z virusoma herpes simpleks 1 in 2 (HSV 1 in HSV 2) je visoka in je odvisna od starosti, načina življenja, ekonomskih razmer, števila spolnih partnerjev, narodnosti in rase (Whitley in Roizman, 2001).

HSV 1 in HSV 2 se razlikujeta po biokemičnih in bioloških lastnostih in na osnovi tipsko specifičnega glikoproteina G. Serološko navzkrižno reagirata, vendar je prav glikoprotein G značilen za posamezen tip in po njem ju lahko ločimo. Za oba virusa je značilna okužba epitelnih celic in vzpostavitev prikrite okužbe v nevronih (Brooks in sod., 1998). Po naravni okužbi je možna reinfekcija, reaktivacija endogenega virusa ali avtoinokulacija (Liesegang, 2001).

HSV 1 in HSV 2 povzročata razjede na ustni sluznici in na sluznici spolovil človeka. HSV 1 povzroča okužbe v predelu ust in je najpogosteje pridobljen v otroštvu, HSV 2 pa okuži sluznico spolovil s spolnim stikom (Vyse in Gay, 2000). Razlikujeta se v načinu prenosa. HSV 1 je največkrat povezan z okužbami obraza, ust in oči. Prenaša se z neposrednim stikom z okuženo slino ali stikom z mehurčki. HSV 2 običajno povzroča okužbe spolovil, ki se prenašajo s spolnimi odnosi (Brooks in sod., 1998). Bolezni, ki jih običajno povzroča HSV 2, lahko včasih povzroča tudi HSV 1 in tudi obratno (Straus, 2000).

Herpes novorojenčkov je posledica okužbe nosečnice s HSV 1 ali HSV 2 in predstavlja eno največjih nevarnosti okužb novorojenčkov. Okužba lahko povzroči hude okvare ali se konča s smrtnim izidom (Malkin in Beumont, 1999).

Laboratorijsko dokazovanje okužb z virusi herpesa zajema različne metode. Poskus osamitve virusa v celičnih kulturah je zlati standard, ki omogoča relativno hitro (v 24 do 48 urah) identifikacijo virusa. Dokazovanje virusnih antigenov neposredno v kužnini z

monoklonskimi protitelesi je hiter postopek, ki omogoča razlikovanje med tipoma 1 in 2. Prisotnost virusne DNK v kužnini dokazujemo z verižno reakcijo s polimerazo, ki velja za najbolj občutljivo in najbolj specifično metodo (White in Fenner, 1994; Whitley in Roizman, 2001). Akutne in pretekle okužbe z virusi herpesa določamo z dokazovanjem protiteles proti tem virusom v serumu z encimsko imunsko metodo (ELISA), imunsko blot metodo, imunofluorescenčno metodo in radioimunsko metodo (Brooks in sod., 1998).

1.1 NAMEN DELA

V raziskavi smo želeli ugotoviti prekuženost nosečnic v Sloveniji z virusoma HSV 1 in HSV 2 na vzorcu serumov, zbranih v letu 2003. Rezultate smo primerjali s podatki enake študije iz leta 1993 in skušali ugotoviti, ali se je v Sloveniji v obdobju desetih let pojavila sprememba v epidemiologiji okužb nosečnic z virusoma HSV 1 in HSV 2. Stopnjo prekuženosti slovenskih nosečnic s herpesvirusi smo primerjali z ugotovitvami študij iz drugih držav. Specifična protitelesa v serumih smo dokazovali z encimskoimunsko metodo ELISA. Preizkusili smo tudi imunsko blot metodo.

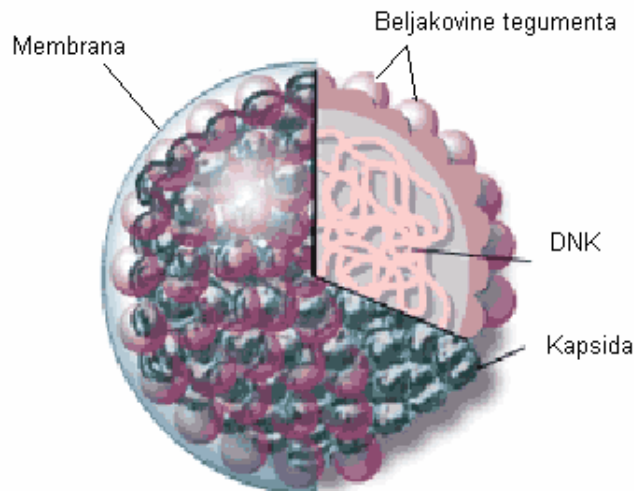
2 PREGLED OBJAV

2.1 HERPESVIRUSI

Družino herpesvirusov sestavlja več kot 100 virusov, patogenih za živali ali človeka. Znanih je osem človeških herpesvirusov. Pri vseh je dedni zapis na DNK, razlikujejo pa se na nivoju organiziranosti genoma in nukleotidnih zaporedij (Cann, 2001). Osnovna značilnost virusov herpesa je, da povzročijo doživljenjsko okužbo gostitelja in občasne reaktivacije, ki se lahko klinično razlikujejo od primarne okužbe (Brooks in sod., 1998).

2.1.1 Zgradba herpesvirusov

Vse herpesviruse sestavlja sredica z dvojnovijačno DNK, ikozaedrična kapsida in ovojnica (Slika 1).



Slika 1: Shema zgradbe HSV (Henderson, 2001)

2.1.2 Razdelitev virusov herpesa, ki okužijo ljudi

Glede na organizacijo in homologijo genoma, glede na gostitelja in glede na druge biološke lastnosti razvrščamo herpesviruse v tri poddružine: alfa, beta in gama (Preglednica 1). Tudi med posameznimi člani poddružin obstaja majhna antigenska raznolikost.

Preglednica 1: Razdelitev humanih herpesvirusov (Brocks in sod., 1998:388; Cann, 2001:73)

Poddružina	Rod	Uradno ime	Ime v rabi	Biološke značilnosti
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	HHV 1 HHV 2	HSV1 HSV 2	hiter rastni cikel, citolitičnost, latentna okužba v nevronih, genom velik 120-180 kbp
	<i>Varicellovirus</i>	HHV 3	VZV	
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	HHV 5	CMV	počasen rastni cikel, citomegaličnost, latentna okužba v žlezah slinavkah, ledvicah
	<i>Roseolovirus</i>	HHV 6 HHV 7	HHV 6 HHV 7	limfoproliferativnost, latentna okužba v limfoidnem tkivu, genom velik 140-235kbp
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	HHV 4	EBV (Epstein - Baar virus)	variabilen rastni cikel, limfoproliferativnost, latentna okužba v limfoidnem tkivu, genom velik 105-175 kbp
	<i>Rhadinovirus</i>	HHV 8	Herpesvirus Kaposijevega sarkoma	

2.1.3 Genom virusa

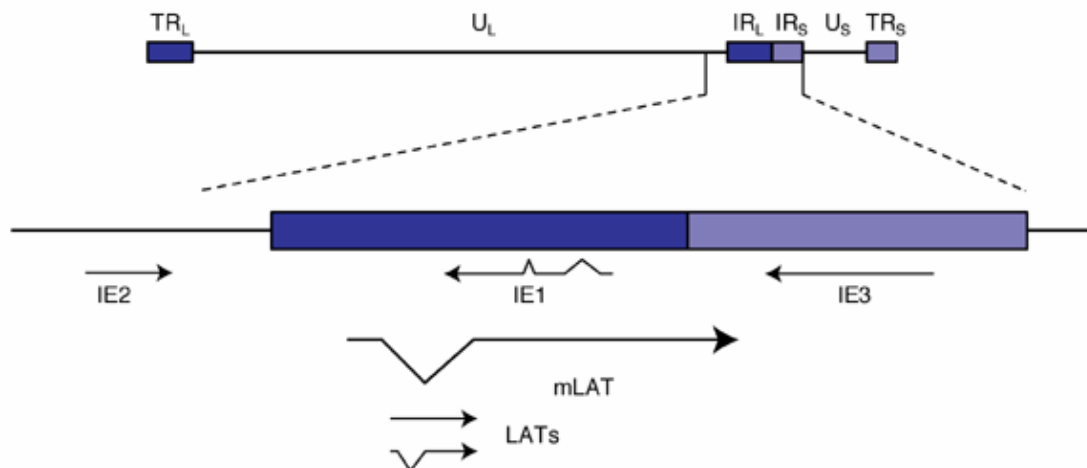
DNK herpesvirusov je linearna dvojna vijačnica, ki je velika okoli 150 kb parov in je relativno bogata z baznimi pari G – C. Genom virusa je iz dveh dolgih (angl. long unique- U_L) in dveh kratkih (angl. short unique- U_S) specifičnih zaporedij, ki imata na vsaki strani obrnjene ponovitve (Slika 2).

Na genomu je več kot 80 gosto spakiranih genov s prekrivajočimi se bralnimi okvirji. Vsak gen se izraža s svojim lastnim promotorjem (Cann, 2001).

Genom HSV kodira številne encime:

- od DNK odvisna DNK polimeraza
- timidinska kinaza (fosforilira timidin in druge nukleotide)
- ribonukleotidna reduktaza (preoblikuje ribonukleotide v deoksiribonukleotide)
- serinska proteaza (preoblikuje gradbene proteine v končno obliko)(Hunt R., 2004)

Med HSV 1 in HSV 2 ni razlik v strukturi in organizaciji genoma, ampak v nukleotidnih zaporedjih. Homologija zaporedij je 50 % (Brooks in sod., 1998).



Slika 2: Genom HSV 1 in mesto LAT genov (Lachmann, 2003)

2.1.4 Ovojnica virusa

Herpesvirusi dobijo ovojnico ob brstenju skozi jedrno membrano. Na površino celice potujejo v mešičkih endoplazemskega retikuluma. Celico zapustijo z brstenjem iz celične površine, pri čemer ostane celica nepoškodovana. Brstenje se začne tako, da virusni glikoproteini (peplomeri) spodrinejo celične beljakovine iz določenih predelov citoplazemske membrane. Hkrati se na notranjo stran citoplazemske membrane pripne matrična beljakovina, na njo pa še nukleokapsida. Tako spremenjena celična membrana se izboči in povleče za sabo nukleokapsido. Oblikuje se brstič, ki postopoma obda nukleokapsido. Končno se brstič odščipne in kot zrel virus sprosti v celično okolje (Koren in Marin, 1998).

Ker je virusna membrana precej občutljiva, virus s poškodovano ovojnico ne povzroči infekcije. HSV 1 in HSV 2 sta v okolju zelo nestabilna. Hitro ju inaktivirajo povišana temperatura, alkohol, detergenti, nizek pH izven celice in organska topila (Wiedbrauk in Johnston, 1993).

2.1.5 Beljakovine virusa

HSV 1 in HSV 2 imata zapis za najmanj 84 različnih polipeptidov. Vsaka beljakovina ima več funkcij, zato lahko geni HSV kodirajo številne različne funkcije (Whitley in Roizman, 2001).

Genom kodira 11 površinskih glikoproteinov. Pritrditev herpesvirusa na celico gostitelja omogočajo glikoproteini gB, gC, gD in gH. Zlitje virusne ovojnice z gostiteljsko celico omogoča glikoprotein gB. Za prikrivanje dejavnikom imunskega sistema so odgovorni glikoproteini gC, gE in gI (Hunt, 2004).

Regulatorne virusne beljakovine (ICPO, ICP4 in ICP22) so fosforilirane s celičnimi kinazami (cdc2) in virusnimi kinazami (U_S3 in U_L13). U_L13 fosforilira številne virusne in celične beljakovine in je pogosta tarča delovanja zdravil proti HSV. Pri nastanku virusne DNK sodeluje 7 virusnih beljakovin. Preostale beljakovine virusa, kot so timidinska kinaza, ribonukleotidna reduktaza, dUTPaza in uracil DNK glukozilaza, nadzorujejo metabolizem nukleinskih kislin virusa in so običajne (polimeraza in timidinska kinaza) ali potencialne tarče zdravil proti virusu herpesa. Namnožena virusna DNK potuje v formirane kapside (Whitley in Roizman, 2001).

2.1.6 Razmnoževanje herpesvirusov

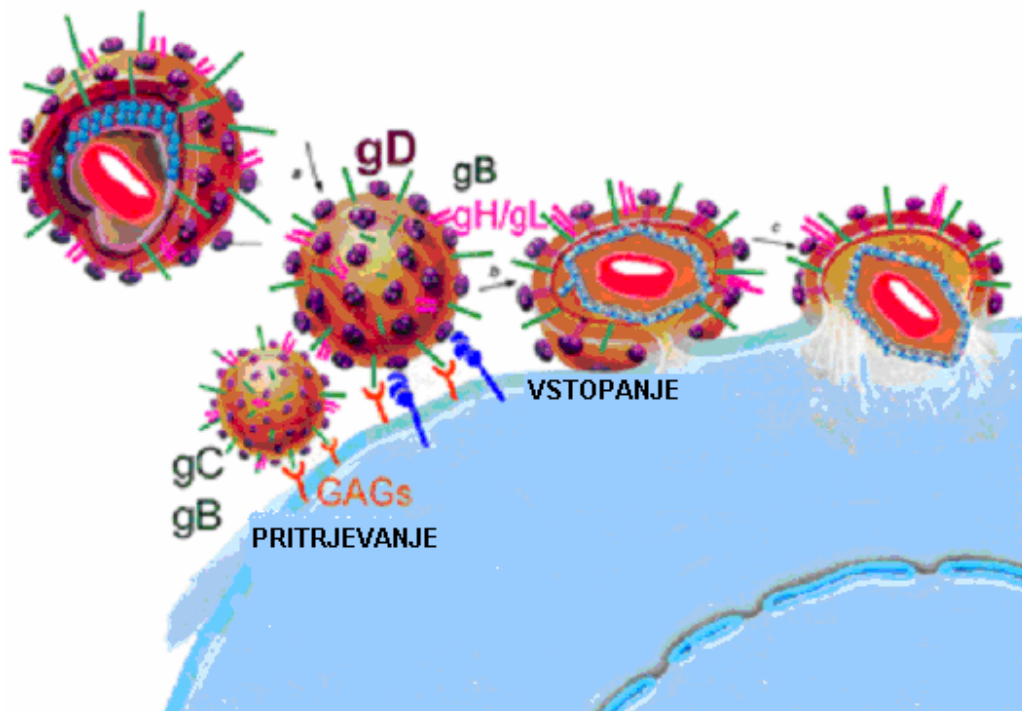
Vsi HSV se razmnožujejo na podoben način. Razmnoževalni cikel je hiter, poteče v 8 - 16 urah od okužbe. V številnih celicah, kot so endotelijske celice in fibroblasti, je okužba litična in celico uniči. V nevronih HSV vzpostavi mirujoče (latentno) stanje.

Od 84 znanih polipeptidov herpesvirusov jih najmanj 47 sodeluje pri razmnoževanju virusa v celičnih kulturah (Whitley in Roizman, 2001). Virusi vstopajo v gostitelja z zlitjem s celično membrano (fuzija), tako da pride do vezave virusnih receptorjev (gC, gD) s specifičnim glikoproteinskim receptorjem na tarčni celici (Slika 3).

Nukleokapsida se prenese preko citoplazme do jedrne membrane, kjer se virusna DNK skozi jedrne pore sprosti v jedro gostiteljske celice. V jedru virusna DNK uporablja gostiteljev mehanizem transkripcije in translacije. Transkripcija in posttranskripcijski dogodki potekajo v jedru, translacija pa v citoplazmi. Sintetizirajo se tri skupine virusnih polipeptidov: takojšnji zgodnji (α), zgodnji (β) in pozni (γ) polipeptidi virusa HSV.

Produkti takojšnjih zgodnjih genov so beljakovine, ki imajo regulatorno vlogo in so pomembne za izražanje zgodnjih (npr. genov za virusno DNK polimerazo) in poznih genov (geni za komponente kapside). Beljakovine β predstavljata dve vrsti encimov: prvi povečajo količino nukleotidov (timidinska kinaza, ribonukleotidna reduktaza), medtem ko so drugi potrebni za virusno podvajanje (DNK polimeraza, topoizomeraza,

helikaza, primaza in drugi). Ti dve skupini encimov omogočata začetek podvajanja virusne DNK. Beljakovine γ so strukturne beljakovine kapside in beljakovine ovojnice, ki se morajo glikozilirati (Singleton in Sainsbury, 2001; White, 1994). Nukleokapsida lahko zapusti jedro na dva načina. Z brstjenjem skozi notranjo lamelo jedrne membrane dobi ovojnico in v tem primeru zreli virusi potujejo na površino celice znotraj veziklov, vezanih na membrano in se sprostijo v zunanost. Lahko pa nukleokapsida vstopi v citoplazmo v nezreli obliki in dobi ovojnico kasneje – z brstjenjem v citoplazemsko vakuolo (Singleton in Sainsbury, 2001).



Slika 3: Pritrjevanje in vstopanje virusa herpesa v gostiteljsko celico (Campadelli-Fiume, 2001)

Herpesvirusi povzročajo lizo celic, v katerih se razmnožujejo. Nastale patološke spremembe so posledica nekroze okuženih celic in vnetnega odziva gostitelja.

Značilne citopatološke spremembe so: nabrekanje celic, nastanek inkluzijskih teles v jedru, marginacija kromatina in tvorba večjedrnih celic velikank (Brooks in sod., 1998).

2.2 OKUŽBE S HSV 1 IN HSV 2

Pogoj za uspešno okužbo s herpesvirusom je neposreden stik med virusom in sluznico (ustna votlina, očesna veznica, žrelo, maternični vrat) ali virusom in poškodovano kožo.

Prenos virusov herpesa iz ljudi, ki so okuženi, a nimajo kliničnih znakov, na še ne okužene posameznike, je vir več kot polovice vseh okužb s HSV. Takšnemu prenosu rečemo asimptomatski prenos.

HSV1 in HSV 2 se pogosto prenašata po različnih poteh in prizadeneta različne dele telesa, vendar so znaki, ki jih povzročata, podobni. Okužba s herpesvirusom je v redkih primerih smrtna (Whitley, 2001). Večinski delež svetovne populacije je okužen s HSV 1, prekuženost s HSV 2 pa je v posameznih državah zelo različna (Ades in sod., 1989; Mindel in sod., 2000; Jerome in Ashley, 2003).

2.2.1 Stopnje okužbe s HSV

O primarni okužbi govorimo, kadar predhodno ni protiteles proti HSV 1 oziroma proti HSV 2. Večina se s HSV 1 okuži že v zgodnjem otroštvu. Zaradi načina prenosa je okužba s HSV 2 večinoma pomaknjena v začetek oziroma kadarkoli v obdobje spolno aktivnega življenja. Tip okužbe, ki se razvije, je odvisen od imunskega stanja posameznika. Primarna okužba s HSV in reaktivacija virusa se kažeta z različnimi kliničnimi slikami ali mineta brez bolezenskih znamenj.

Na nevarnost primarne okužbe vplivajo:

- starost (posebej občutljivi so nedonošenčki),
- mesto okužbe (najnevarnejše so sistemske okužbe in okužbe centralnega živčnega sistema (CŽS)),
- imunska sposobnost (pri zaviranju okužbe je nujna T-celična imunost) (White in Fenner, 1994).

Primarni okužbi sledi vzpostavitev prikritega (latentnega) stanja v ganglijih. Virus se kasneje periodično reaktivira in po živčnih aksonih potuje v ustni predel ali predel spolovil. Tam se sprosti in v nekaterih primerih povzroča razjede. Temu pojavu pravimo reaktivacija. Ponovno okužbo z istim tipom virusa pa imenujemo reinfekcija in ima milejše simptome. Lezije so krajši čas kot pri primarni okužbi (Spruance, 1992).

Virusi HSV imajo več podtipov, zato lahko pride do ponovne okužbe z novim podtipom HSV 1 ali HSV 2. Okužba z novim podtipom je ponavadi blažja in jo klinično prepoznamo kot ponavljajočo se okužbo, čeprav gre za reinfekcijo (Straus, 2000). V latentnem stanju se izražajo le redki geni. Virus se v tem stanju ne razmnožuje in ne povzroča citotoksičnosti. Sposobnost virusa HSV, da vzpostavi latentno okužbo v nedelečih se nevronih, je učinkovit preživetveni mehanizem (Brooks in sod., 1998).

Za regulacijo latence je odgovoren gen LAT (angl. latency - associated transcript). Nahaja se v dolгих ponavljajočih se regijah virusnega genoma. Ne kodira nobene znane beljakovine. Signal, ki je potreben za aktivacijo gena LAT, je neznan. Funkcija gena LAT naj bi bila zaščita okuženih nevronov pred apoptozo (Perng, 1999).

HSV 1 običajno najdemo v ganglijih trivejnega živca, HSV 2 pa v ganglijih križnih živcev (Brooks in sod., 1998).

Reaktivacija virusa je možna kljub celični in humoralni imunosti gostitelja. Imunski sistem omeji lokalno razmnoževanje virusa. Tako so okužbe blažje in manj nevarne, pogosto so asimptomatske, čeprav se virus izloča.

Reaktivacijo virusa povzročajo: UV svetloba, povišana telesna temperatura, menstruacija, stres, bolezni, telesni napor in imunske okvare (Jones, 2003).

2.3 BOLEZNI, KI JIH POVZROČATA HSV 1 IN HSV 2

Virusa HSV 1 in HSV 2 povzročata številne bolezni na različnih delih telesa. Primarna okužba poteče pri osebah brez specifičnih protiteles. V takšnem primeru organizem tvori protitelesa. Kasneje virus preide v latentno fazo (Brooks in sod., 1998).

2.3.1 Okužbe kože

Nepoškodovana koža je odporna proti HSV, zato so okužbe zdravih ljudi redke. Okužbe kože so nevarnejše pri bolnikih z ekcemom in opeklinami (Brooks in sod., 1998).

2.3.2 Okužbe oči

Okužbe oči običajno povzročata HSV 1. HSV 2 lahko povzroči okužbe oči pri otrocih, ki se okužijo z genitalnimi izločki ob porodu ali skozi posteljico (Inoda in sod., 2001). Prenos HSV 2 s spolovil na oči je možen tudi pri odraslih.

Okužbe oči s HSV se izrazijo kot vnetje vek (blefaritis), očesne veznice (konjunktivitis), roženice (epitelijski keratitis, stromalni keratitis), šarenice in ciliarne mišice (iridociklitis) ali vnetje mrežnice (retinitis) (Liesegang, 2001).

2.3.3 Encefalitis

Povzročitelj encefalitisa je v več kot 95 % HSV 1. Pri otrocih in mladostnikih se lahko primarna okužba s HSV razvije v encefalitis. Virus se med primarno ali ponavljajočo okužbo razširi na možgane, čeprav na telesnih površinah mehurčkov običajno ne najdemo. V nosečnosti je encefalitis, ki bi ga pri plodu povzročil HSV, redek. Kadar pa se pojavi, je vzrok za to okužba s HSV 2 (Straus, 2000).

2.3.4 Genitalni herpes

Tako HSV 1 kot HSV 2 lahko povzročita simptomatsko ali asimptomatsko okužbo spolovil ter rektalnega in perianalnega predela, vendar je HSV 2 precej bolj pogost povzročitelj teh okužb. V primeru, da je povzročitelj HSV 1, gre običajno za oralno genitalni prenos (White in Fenner, 1994). Genitalni herpes predstavlja velik problem za zdravje človeka, saj je povzročitelj ene izmed najpogostejših spolno prenosljivih bolezni. Približno 90 milijonov ljudi po svetu je že imelo izpuščaje in bolečine, značilne za

okužbo s HSV 2. Genitalni herpes lahko pusti resne posledice na plodu ali novorojencu. Veliko je tudi tveganje prenosa virusa na spolnega partnerja (Halioua in sod., 1999; Wald, 1999). Kot povzročitelja genitalnega herpesa se HSV 1 in HSV 2 prenašata s spolno aktivnostjo tako med simptomatsko kot tudi med asimptomatsko okužbo. Pri okuženih ljudeh povzroča genitalni herpes tudi velik psihološki stres (Mindel, 1996).

Običajno je primarna okužba s HSV 1 ali HSV 2 asimptomatska, pri čemer ni značilnih mehurčkov, pogosto pa se pojavljajo znaki, kot so: vročina, glavobol, utrujenost in bolečine v mišicah. Sistemski simptomi se pojavljajo ob začetku bolezni in se stopnjujejo. Najhujši so 3. in 4. dan bolezni, v naslednjih 3 do 4 dneh pojenjajo. Lokalni simptomi so bolečina, srbenje, disurija (ovirano uriniranje), vaginalni ali uretralni izloček in povečane bezgavke v dimljah. Zapleti nastanejo pri razširjanju virusa na druge dele telesa. Najpogostejše so lezije na koži izven spolovila. Virus lahko skozi te vdre v kri, kjer povzroči razsoj okužbe, in v živčevje, kjer lahko povzroči meningitis ali encefalitis (Straus, 2000). Imunska pomanjkljivost poveča tveganje za resnejšo okužbo s HSV 2. Herpetične lezije se lahko razširijo na dihala, požiralnik in sluznico črevesa. To se največkrat zgodi ob reaktivaciji latentnega virusa (Brooks in sod., 1998).

2.3.5 Neonatalni herpes

Najresnejša oblika genitalne okužbe s HSV je neonatalni herpes. Novorojenci se s HSV 1 ali s HSV 2 najpogosteje okužijo med porodom, lahko pa že v maternici ali po porodu. Najpogostejši način okužbe je stik s herpetičnimi lezijami v porodnem kanalu. HSV je lahko v porodnem kanalu tudi brez simptomov kot posledica okužbe ali reaktivacije. Tudi okužba brez simptomov se lahko prenese na novorojenca (Malkin in Beumont, 1999).

V 75 % primerov je povzročitelj neonatalnega herpesa HSV 2 (Brooks in sod., 1998). Materina primarna okužba ali reinfekcija se iz porodnega kanala prenese na plod v

30 - 50 %. Ponavljajoča se okužba (reaktivacija) se prenese v 3 %. Materina protitelesa, ki prehajajo preko placentе, ublažijo bolezen. Na pogostost okužbe s HSV med nosečnostjo in posledično neonatalne okužbe s HSV vplivajo socialno ekonomsko stanje, starost in predhodna spolna aktivnost (Whitley in Roizman, 2001).

Novorojenec matere, ki se je s HSV okužila v zadnjem trimesečju nosečnosti, bo zelo verjetno okužen in bo imel posledice. Okužba nosečnice s HSV v zgodnji nosečnosti močno poveča možnost za spontani splav. Primarna okužba v drugem ali tretjem trimestru poveča nevarnost za predčasni porod in možnost okužbe novorojenca (Brown, 1991).

Nosečnice brez simptomov genitalnega HSV 2 lahko rodijo po normalni poti. Carski rez priporočajo za ženske z lezijami, vendar tudi porod s carskim rezom ne zagotavlja popolne zaščite ploda pred okužbo (Malkin in Beumont, 1999).

Neonatalni herpes se pri novorojencih pojavlja v eni izmed treh oblik:

- poškodbe na predelu kože, oči in ust,
- razširjena okužba (vključuje organe kot so jetra, pljuča, nadledvične žleze, lahko tudi možgani),
- poškodbe centralnega živčnega sistema z ali brez zapletov okužb kože, oči in ust (Malkin in Beumont, 1999).

Aktivna očesna okužba se pojavi pri 20 do 25 % okuženih novorojencev (Liesegang, 2001). Številni novorojenci z encefalitisom ali herpesom, razširjenim na notranje organe, umrejo. Več kot 70 % mater, ki so okužene s HSV, a ne kažejo simptomov, rodi novorojenca, ki so okuženi s HSV. Tveganje prenosa neonatalnega herpesa na plod pri ženski, prvič okuženi v zadnjem trimesečju nosečnosti, je približno 50 % (Malkin in Beumont, 1999). Za matere, ki so med nosečnostjo prišle prvič v stik s HSV, je priporočljivo zdravljenje s protivirusnimi zdravili. S tem se omeji širjenje virusa in pospeši celjenje razjed (Malkin in Beumont, 1999).

2.3.6 Okužbe pri imunsko oslabljenih bolnikih

Imunska pomanjkljivost poveča tveganje za resnejšo okužbo s HSV 2. Herpetične lezije so razširjene po telesu, vključno z dihali, požiralnikom in sluznico črevesa. V večini primerov gre za reaktivacijo virusa (Brooks in sod., 1998). Dejavniki, ki povečajo tveganje za razvoj diseminirane bolezni, so: imunska pomanjkljivost in malignost, imunosupresija, hujša podhranjenost in opekline (White in Fenner, 1994).

2.4 IMUNSKI ODZIV

Tako celična kot humoralna imunost imata pomembno vlogo. Čeprav so protitelesa pomembna pri zadrževanju širjenja virusa v akutni fazi okužbe, navadno ne morejo odstraniti virusa, ko je okužba že stekla, posebno ko se DNK vgradi v gostiteljevo kromosomsko DNK. Ko se okužba ustali, so za obrambo gostitelja najpomembnejši celično posredovani imunski mehanizmi (Vozelj, 2000).

2.4.1 Celična imunost

Celična imunost je pomembna pri preprečevanju razvoja okužbe. Ljudje z okvarjeno celično imunostjo imajo pogoste in resne okužbe s HSV (Jerome in Ashley, 2003). Na mestu okužbe antigen predstavljajoče celice (dendritične celice in makrofagi) predstavijo virusne antigene celicam pomagalkam CD4⁺ Th1. Te začno izločati citokine, kot je interferon γ (IFN- γ), ki spodbudijo in aktivirajo makrofage, naravne celice ubijalke (NK; angl. natural killers) ter delitev in zorenje citotoksičnih limfocitov T (CD8⁺). Celice CD4⁺, CD8⁺, celice NK ter s celicami posredovana od protiteles odvisna citotoksičnost povzročijo lizo okužene celice. Raziskovalci so z eksperimenti dokazali pomembno vlogo celic CD8⁺, ki poleg uspešne omejitve primarne okužbe ovirajo popolno izražanje virusne DNK v latentnem stanju (White in Fenner, 1994). Celična imunost in nespecifični

gostiteljevi dejavniki (NK celice, interferoni) so pomembni pri nadzoru primarne okužbe in reinfekcije s HSV (Brooks in sod., 1998).

2.4.2 Humoralna imunost

Ker se posamezni virusni antigeni vgradijo v celično membrano, še preden se začnejo sestavljati novi virusi, uničenje celic s citotoksičnimi limfociti T učinkovito zavre razmnoževanje virusov in širjenje po telesu. Možna sta dva načina razširjanja. Pri prvem načinu se sproščajo virusi z brstenjem s površine okužene celice. Te viruse navadno nevtralizirajo humoralna protitelesa. Na drug način razširjanja, kjer virus prehaja z ene celice na drugo skozi medcelične povezave, pa protitelesa ne morejo vplivati, pač pa je učinkovita celično posredovana imunost (Vozelj, 2000). Protitelesni odgovor vključuje od komplemента odvisno in od komplemента neodvisno nevtralizacijo virusa. Imunoglobulini IgG, IgM in IgA se pojavljajo kot odgovor na posamezne beljakovine virusa. Pojavijo se v prvih tednih po okužbi. Najprej se poviša titer protiteles IgM in nato po dveh do treh mesecih upade. Kasneje se ta protitelesa pojavljajo le občasno. Nato se pojavijo protitelesa IgA in IgG. Protitelesa IgG se pojavijo 7 - 14 dni po okužbi in so lahko v krvi okuženih ljudi prisotna vse življenje (Jerome in Ashley, 2003).

Serokonverzija ali štirikratni porast titra protiteles IgG v enem do treh tednih kaže na nedavno okužbo. Količina protiteles IgG se poveča tudi med reaktivacijo virusa (Brooks in sod., 1998). Razen v serumu lahko protitelesa IgG najdemo tudi v likvorju, sekretorna protitelesa IgA pa najdemo še v sluznicah, solzah in materinem mleku. Vse tri vrste protiteles lahko nevtralizirajo virus. Nevtralizacijska protitelesa proti glikoproteinom virusne ovojnice (gB in gD) lahko učinkovito preprečijo primarno okužbo in omejijo širjenje iz epitelnih celic v živčne končiče (White in Fenner, 1994). Protitelesa se z matere pasivno prenašajo na plod, vendar to ne zagotavlja popolne zaščite novorojenčka pred okužbo. Protitelesa ne preprečijo reinfekcije in reaktivacije latentnega virusa (Brooks in sod., 1998).

2.5. EPIDEMIOLOGIJA

Edini gostitelj virusov HSV 1 in HSV 2 je človek. Oba virusa sta razširjena po vsem svetu. Velik del populacije se predvsem s HSV 1 okuži v zgodnjem otroštvu. Okužba običajno poteka brez znakov - asimptomatsko, virus pa ostane v človeku vse življenje.

Največ novih okužb s HSV 1 je med otroki, starimi od 6 mesecev do 3 let. Sedemdeset do devetdeset odstotkov odraslih ima protitelesa proti HSV 1. Vir okužbe otrok so pogosto starejše osebe z izraženimi herpetičnimi lezijami, lahko pa se okužijo s slino odraslega, ki nima znakov bolezni (Brooks in sod., 1998).

HSV 2 se najpogosteje prenaša s spolnimi odnosi, zato protitelesa proti HSV 2 najpogosteje najdemo pri spolno aktivnih starostnih skupinah. HSV 2 se reaktivira pogosteje kot HSV 1 (Brooks in sod., 1998). V ZDA je s HSV 2 okužene približno 20 % populacije, v Evropi pa od približno 5 % na Češkem do 24 % v Bolgariji (Fleming in sod., 1997; Pebody in sod., 2004).

Prenos HSV 2 s spolnimi odnosi med posamezniki, ki nimajo znakov bolezni, ima pomembno vlogo pri širjenju virusa (Pebody in sod., 2004). Novorojenčki okuženih mater se lahko okužijo pred, med in po rojstvu. Zaradi nerazvitega imunskega sistema dojenčka lahko okužba s HSV 2 povzroči celo smrt (Brooks in sod., 1998).

Stopnja prekuženosti s HSV 1 in HSV 2 je po svetu zelo različna. Odvisna je od socialno ekonomskih razmer, načina življenja in starosti. Prekuženost s HSV 2 ostaja nizka do adolescence, v zadnjih letih pa je število okužb s HSV 2 v svetu močno naraslo (Whitley in Roizman, 2001).

Pebody in sod. (2004) so v študiji, kjer so proučevali prekuženost s HSV 1 in 2 v Evropi, prišli do naslednjih rezultatov:

- opazne so velike razlike v prekuženosti s HSV 2 tako med državami kot med starostnimi skupinami,

- prekuženost žensk s HSV 2 je povsod večja kot prekuženost moških,
- med državami so velike razlike v prekuženosti s HSV 1 in HSV 2.

Upadanje prekuženosti HSV 1 pred puberteto v razvitih državah ter porast oralno-genitalnih spolnih navad sta spremenila epidemiologijo HSV 1 in HSV 2. HSV 1 sedaj povzroča poškodbe na mestih, kjer jih je sprva povzročal le HSV 2 in obratno. HSV 2 povzroča manj kot 10 % okužb v obraznem predelu, razen v nekaterih spolno aktivnih populacijah, kjer je pogosta oralno - genitalna spolna praksa in je s tem omogočen prenos HSV 2 v obrazni predel (Liesegang, 2001). HSV 2 je verjetno sodejavnik okužbe s HIV (Pebody in sod., 2004).

2.6 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽB S HSV

2.6.1. Protivirusna zdravila

Zdravila proti HSV ovirajo sintezo virusne DNK. Ne preprečujejo latence in učinkujejo le na aktiven virus, ki se razmnožuje v okuženih celicah.

Prvo zdravilo, učinkovito proti HSV, je bil aciklovir. Aciklovir je neciklični nukleozidni analog, ki je substrat za virusno timidinsko kinazo (Straus, 2000).

Prvo fosforilacijo izvrši timidinska kinaza, ki jo kodira virus in povzroči, da aciklovir postane aktiven samo v celicah, okuženih z virusom herpesa. Drugo in tretjo fosforilacijo omogoči celična timidinska kinaza. Nastane aciklogvanozin trifosfat, ki je hkrati substrat in kompetitivni inhibitor virusne DNK polimeraze. Ko se vgradi v virusno DNK, pretrga njeno izdelovanje, ker nima 3'-hidroksilne skupine, ki so nujne za vezavo naslednjega nukleotida in podaljševanje vijačnice DNK (Morfin in Thouvenot, 2002).

Odpornost virusov na aciklovir povzročajo mutacije genov, ki kodirajo timidinsko kinazo ali DNK polimerazo. Nekateri virusi prenehajo izdelovati timidinsko kinazo, drugi jo izdelujejo v spremenjeni obliki (De Clercq, 2004).

Supresivna terapija z aciklovirjem zmanjša pogostost pojavljanja izbruha bolezni pri ljudeh, ki imajo 6 ali več reaktivacij virusa herpesa na leto. Ta terapija je primerna za nosečnice in lahko zmanjša tveganje za reaktivacijo virusa v času poroda in zmanjša verjetnost carskega reza. Zdravljenje nima stranskih učinkov za plod. Zaradi povezanosti je koncentracija zdravila v serumu matere in ploda enaka, vendar se zdravilo akumulira v amnijski tekočini v širitokrat višji koncentraciji kot v serumu. To na plod nima škodljivega učinka (Malkin in sod., 1999). Začetno genitalno ali oralno okužbo s HSV lahko z aciklovirjem zdravimo lokalno, oralno ali intravensko. Lokalno zdravljenje je manj učinkovito kot oralno ali intravensko (Whitley in Roizman, 2001). Intravenski vnos je najbolj učinkovit pri zdravljenju težjih okužb s HSV, encefalitisa, neonatalnega herpesa in diseminiranega herpesa pri imunsko pomanjkljivih bolnikih (White in Fenner, 1994). Na tak način lahko zdravimo tudi primarni genitalni herpes. Oralno zdravljenje z aciklovirjem, valaciklovirjem ali famciclovirjem zatre genitalni herpes pri bolnikih s pogostimi reaktivacijami (Whitley in Roizman, 2001).

Valaciklovir se v jetrih in črevesju spremeni v aciklovir in ima enak mehanizem delovanja kot aciklovir. Zaužiti je potrebno manj odmerkov dnevno kot pri acikloviru. Vidarabin je analog deoksiadenin trifosfata in ovira sintezo virusne DNK. Čeprav se veliko bolj učinkovito vgrajuje v virusno kot v celično DNK, lahko povzroča stranske učinke predvsem v celicah prebavil in kostnega mozga. Uporablja se ga za zdravljenje sistemskih okužb s herpes virusi.

Penciklovir za razliko od aciklovira lahko vstopa in izstopa iz celice. Če celica ni okužena, jo penciklovir nespremenjen zapusti. Pri vstopu v okuženo celico se fosforilira z virusno timidinsko kinazo v monofosfatno obliko. V taki obliki celice ne more zapustiti. Celični encimi nato monofosfatno obliko pretvorijo v aktivno trifosfatno obliko, ki ob vezavi na virusno DNK polimerazo deluje kot njen inhibitor in s tem prepreči elongacijo verige DNK. Famciclovir se v jetrih in črevesju pretvori v penciklovir in ima enak mehanizem delovanja (De Clercq, 2004).

2.6.2 Cepiva za zaščito proti HSV

Zaradi ponavljanja okužb je težko razviti zaščitna cepiva.

Preizkusili so dva glikoproteina (gD in gB), a nista bila primerna, ker nista imela ne zaščitnega in ne terapevtskega učinka (Whitley in Roizman, 2001). Cepiva, ki jih razvijajo, vključujejo osljabljene seve virusov HSV (mutante z γ_1345 delecijo), očiščene glikoproteinske antigene ali sintetične glikoproteinske peptide, modificiran virus vakcinije z vstavljenim genom za imunizacijski glikoprotein (Brooks in sod., 1998; Whitley in Roizman, 2001).

Kljub številnim raziskavam učinkovitega cepiva proti virusu herpesa še vedno nimamo.

Pri živih cepivih proti HSV obstaja nevarnost latence z reaktivacijo, medtem ko je za izdelavo učinkovitega mrtvega cepiva potrebno pridobiti veliko količino virusa, kar je tehnično zahtevno in drago. Raziskave cepiva proti HSV potekajo na miših, podganah, hrčkih, morskih prašičkih in kuncih (Mims in sod., 2004).

2.7 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB S HSV

2.7.1. Neposredno dokazovanje virusov HSV v kužninah

Za uspešen dokaz virusa moramo kužnino odvzeti pravilno in ob pravem času.

Bris lahko vzamemo iz odprtih kožnih mehurčkov in razjed na sluznicah. Viruse lahko dokazujemo tudi v likvorju, veznici, koščkih tkiv, kužnini gornjih dihal, v krvi ali serumu. Material, iz katerega želimo osamiti virus, hitro prenesemo v laboratorij, kjer ga moramo čimprej inokulirati v primeren sistem. Kadar to ni mogoče, ga hranimo pri 4 °C do 4 dni. Če želimo material hraniti dalj časa, ga zamrznemo pri -70 °C (Marin, 1998).

2.7.1.1 Celične kulture in poskusne živali

Kadar želimo virus osamiti, ga naneseemo v celično kulturo. HSV ima velik razpon gostiteljev, zato lahko za njegovo namnoževanje uporabljamo več različnih celičnih kultur. Za osamitev virusa HSV so primerne trajne celične kulture. Takšne so celice Vero, pridobljene iz opičjih ledvic in fibroblasti iz pljuč embrijev (diploidne celične kulture - MRC). Virusi HSV se hitro razmnožujejo tudi v trajnih celičnih kulturah iz malignih tumorjev (celice HeLa in Hep-2) (White in Fenner, 1994).

Virus v celični kulturi opazimo s pojavom citopatskega učinka (CPU) 2 - 3 dni po inokulaciji (Brooks in sod., 1998). CPU je posledica znotrajceličnega razmnoževanja virusa HSV. Hitrejši CPU se zgodi, kadar je koncentracija virusa visoka. CPU se kaže kot propad celic (nekroza), pojav večjedrnih celic velikank (sincicijev) in virusnih vključkov. Za kateri virus gre, običajno dokažemo z eno od imunskih ali molekularnih tehnik. Izolacija virusa v celičnih kulturah ostaja kljub hitrejšim diagnostičnim testom zlati standard. S praktičnega vidika je postopek manj primeren, ker da rezultat razmeroma pozno (po nekaj dneh ali celo tednih) (Marin, 1998).

Največ raziskav z virusom herpesa poteka na laboratorijskih miškah seva BALB/c.

2.7.1.2 Imunske metode za dokazovanje virusnih antigenov

Virusne antigene dokazujemo s specifičnimi protitelesi z več metodami. Najpomembnejše so encimskoimunska, radioimunska in imunofluorescenčna metoda. Z uporabo monoklonskih protiteles, uperjenih proti specifičnim epitopom, močno povečamo specifičnost imunskih metod. Viruse lahko dokazujemo neposredno v kužninah ali dokazujemo, kateri virus se je namnožil v celični kulturi (Marin, 1998).

Imunofluorescenčna metoda

Z imunofluorescenčnimi testi ugotavljamo mesto virusnih antigenov v celicah. Pogoj za uspešno preiskavo je zadostno število celic v odvzeti kužnini. Pri tej metodi so specifična protitelesa označena s fluorokromom. Protitelesa, ki so se vezala na iskani antigen, opazujemo s fluorescenčnim mikroskopom (Marin, 1998).

Encimskoimunska metoda

Metoda ima visoko občutljivost. Najpogosteje je v uporabi sistem dvojnih protiteles. Prva protitelesa, ki so vezana na trden nosilec, vežejo antigen, ki ga želimo dokazati. Na nastale komplekse protiteles in antigena vežemo z encimom označena protitelesa.

Nastalemu kompleksu dodamo substrat, ki po delovanju encima spremeni barvo. Z opazovanjem spremembe barve ali z merjenjem optične gostote pri predpisani valovni dolžini ugotovimo, ali je antigen navzoč ali ne (Marin, 1998).

Radioimunska metoda

Pri tej metodi virusne antigene dokazujemo s protitelesi, ki so označena z radioaktivnimi izotopi. Metoda je zelo občutljiva, zahteva drago opremo in je nevarna zaradi uporabe radioaktivnih izotopov. Namesto te metode danes običajno uporabljamo encimskoimunsko metodo (Marin, 1998).

2.7.1.3 Molekularno dokazovanje HSV

Molekularne metode so zahtevnejše za izvedbo in precej drage, a hitre, občutljive in specifične, zato jih uporabljamo predvsem za:

- odkrivanje zgodnjega obdobja virusne okužbe pred pojavom specifičnega imunskega odziva,
- zanesljiv dokaz virusne okužbe pri bolnikih z nerazvitim ali pomanjkljivim imunskim sistemom,
- odkrivanje in kvantifikacijo viremije,
- spremljanje učinkovitosti protivirusnega zdravljenja,
-

- odkrivanje prisotnosti virusov v kliničnih materialih, kjer so klasične neposredne diagnostične metode manj uspešne in zelo zahtevne (Poljak, 1998).

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR (angl. polymerase chain reaction) omogoča pomnoževanje majhnega dela virusnega genoma. To je hitra, občutljiva in specifična metoda. Tako kot druge metode ima tudi ta svoje pomanjkljivosti. Izvedba PCR je v primerjavi s klasično osamitvijo virusa veliko dražja, poleg tega pa s to metodo ne moremo razlikovati med aktivnimi ("živimi") in neaktivnimi ("mrtvimi") virusi. Njena slabost je tudi možnost pojavljanja lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov (Müller in sod., 1997).

Osamljeni DNK dodamo mešanico, ki poleg temperaturno obstojne polimeraze vsebuje deoksinukleotidtrifosfate, par začetnih oligonukleotidov, soli in ustrezen pufer v določenih koncentracijah. Mešanico za kratek čas inkubiramo pri treh točno določenih temperaturah, kar pomeni en ciklus PCR. Pri 95 °C se dvojnovijačna molekula DNK razdvoji v dve enojnovijačni molekuli. Pri drugi temperaturi, ki je navadno med 45 °C in 75 °C, se začetni oligonukleotidi pripenjajo na komplementarna dela vzorčne DNK. Podaljševanje začetnih oligonukleotidov oz. sinteza nove komplementarne molekule DNK v smeri od konca 5' proti koncu 3' poteka med tretjo inkubacijo pri 72 °C.

Novi molekuli DNK sta med seboj komplementarni in sposobni v novem ciklu s tremi inkubacijami vezati enake začetne oligonukleotide. Vsak naslednji temperaturni ciklus podvoji količino tarčnega dela virusne DNK (Poljak, 1998).

2.7.2. Posredno dokazovanje virusov – serološke metode

Da se je človek srečal z virusom, lahko posredno ugotovljamo z dokazovanjem specifičnih protiteles v serumu. O zgodnjem stadiju okužbe govorijo protitelesa IgM in skokovit porast količine protiteles IgG. Okužbo, ki se je zgodila že pred časom, dokazujemo s protitelesi IgG proti določenemu antigenu. Za uspešno dokazovanje

okužbe je pomembno, da odvzamemo dva seruma. Prvega takoj ob pojavu bolezenskih znakov in drugega dva do tri tedne kasneje in tako lahko zaznamo dinamiko titra protiteles (Avšič Županc, 1998).

Za epidemiološke študije čas odvzema ni pomemben, saj nas zanimajo le protitelesa IgG, ki so znak pretekle okužbe. Serume lahko hranimo pri temperaturi 4 °C nekaj dni, za daljše shranjevanje jih zamrznemo (-20 °C).

Reakcija vezave komplementa

Reakcija vezave komplementa je ena najstarejših metod za dokazovanje protiteles v serumu, vendar z njo ne moremo ločiti različnih tipov protiteles (IgG, IgM, IgA). Zato za diagnostiko s to metodo vedno potrebujemo dva seruma, odvzeta v pravilnem časovnem razmiku, da lahko opazujemo dinamiko celokupnih protiteles. Je tehnično zahtevna in precej zamudna metoda (Avšič Županc, 1998).

Nevtralizacijski test

Pri nevtralizacijskem testu uporabimo celično kulturo, ki je občutljiva za virus, ki ga dokazujemo. V sistem s celično kulturo dodamo določeno koncentracijo virusa in bolnikov serum. Če so v serumu protitelesa proti temu virusu, se bodo z njim vezala – ga nevtralizirala – in zato v celični kulturi ne bomo opazili citopatskega učinka. Če ustreznih protiteles v serumu ni, bomo lahko opazili citopatski učinek. Metoda je precej zahtevna in dolgotrajna; ni primerna za dokazovanje zelo majhnih količin protiteles (Avšič Županc, 1998).

Posredna imunofluorescenčna metoda

Na mikroskopsko stekelce so pritrjeni virusni antigeni. Na stekelce naneseemo bolnikov serum in če so v njem protitelesa proti temu virusu, se bodo vezala na antigen. Kompleksu dodamo s fluorescentnim barvilom označena sekundarna protitelesa, ki se vežejo na bolnikova protitelesa. Rezultate opazujemo s fluorescenčnim mikroskopom. S to metodo lahko dokazujemo protitelesa tipa IgG in IgM, je zelo specifična in hitra. Ker

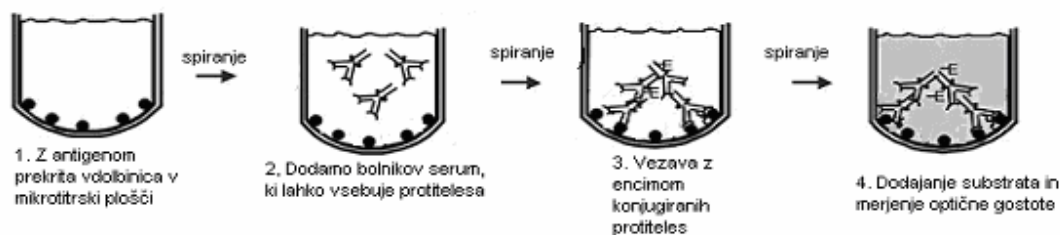
je odčitavanje subjektivno, je pomembno, da ga opravi izkušena oseba (Avšič Županc, 1998).

Encimskoimunski test (ELISA)

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je med vsemi serološkimi metodami zaradi visoke specifičnosti in občutljivosti najbolj uporaben diagnostični test (Slika 4).

Z metodo ELISA lahko poleg protiteles IgG dokaj hitro in zanesljivo določimo tudi protitelesa IgM, ki so zelo pomembni kazalci akutne okužbe. ELISA je uporabna tudi za ugotavljanje protiteles IgM v krvi novorojenčka, s čimer lahko dokažemo znotrajmaternično in obporodno okužbo (Avšič Županc, 1998).

Pri testu ELISA je izbrani virusni antigen vezan na trdi nosilec. Kot trden nosilec je najpogosteje v uporabi polistirenska mikrotitrna ploščica z vdolbinicami. V vdolbinice nanese serum. Nastane kompleks antigen - protitelo. Na nastali kompleks vežemo sekundarna protitelesa, ki so označena z encimom (najpogosteje alkalna fosfataza ali hrenova peroksidaza). S spiranjem odstranimo nevezana sekundarna protitelesa. Dodamo ustreznemu substratu in iz količine razgrajenega substrata sklepamo na količino protiteles v primarnem imunskem kompleksu (Avšič Županc, 1998).



Slika 4: Encimskoimunska metoda (ELISA) (Erickson, 2005)

Imunska BLOT metoda

Imunska blot metoda je različica testa Western blot. Rekombinantne ali sintetične virusne beljakovine so nanešene na nitrocelulozno membrano kot jasni omejeni pasovi.

Membrano z virusnimi antigeni najprej inkubiramo z bolnikovim serumom, po spiranju dodamo z encimom označena protitelesa (konjugat), uperjena proti človeškim imunoglobulinom, in substrat. Pri pozitivni reakciji se obarvajo določeni pasovi, kar nam pove, s katerimi virusnimi antigeni reagirajo protitelesa v bolnikovem serumu (Avšič Županc, 1998).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ZBIRANJE IN SHRANJEVANJE VZORCEV

V raziskavo smo vključili 4000 serumov nosečnic, zbranih v letu 2003. To so ostanki serumov, ki so bili namenjeni rednemu testiranju nosečnic za sifilis in virus HIV. Serumi so bili brez osebnih podatkov nosečnic. Poznali smo le starostno skupino in geografsko področje. Za dodatno testiranje glede protiteles proti virusoma HSV 1 in HSV 2 smo pridobili dovoljenje etične komisije. Podatke o banki serumov smo vnesli v računalniški program Excel.

Serumi so bili iz sedmih področij: Ljubljana, Maribor, Celje, Kranj, Novo mesto, Koper, Nova Gorica; nosečnice so bile iz naslednjih starostnih skupin:

- do vključno 19 let (prva starostna skupina)
- 20 – 24 let (druga starostna skupina)
- 25 – 29 let (tretja starostna skupina)
- 30 in več let (četrti starostna skupina)

Shranjeni so bili pri -70°C .

Število serumov iz posamezne starostne skupine in geografskega področja smo določili glede na statistične podatke o prebivalstvu v Sloveniji v letu 2003, ki smo jih dobili na Inštitutu za varovanje zdravja Republike Slovenije. Tako smo zagotovili, da je bil vzorec serumov reprezentativen. Enako metodo izbora serumov so v laboratoriju uporabili za testiranje leta 1993.

3.2 ENCIMSKO IMUNSKI TEST (ELISA)

Z encimsko imunskim testom smo dokazovali specifična protitelesa IgG, usmerjena proti specifičnim antigenom gG-1 oziroma gG-2.

Uporabili smo encimsko imunski test (ELISA) proizvajalca Focus diagnostics, ZDA.

3.2.1 Princip testa Focus diagnostics HerpeSelect[®] ELISA IgG

V testu Focus diagnostics ELISA so bili očiščeni rekombinantni antigeni gG-1, značilni za HSV 1 in gG-2, značilni za HSV 2, ki so specifični za posamezen tip virusa. Vezani so bili na polistirensko mikrotitrsko ploščo. Če je preiskovani serum vseboval specifična protitelesa, so se ta vezala na ustrezne antigene v prvi inkubaciji. Nevezana protitelesa smo odstranili s spiranjem. V naslednjem koraku smo vezanim protitelesom IgG dodali monoklonska protitelesa proti človeškim protitelesom IgG, ki so označena s peroksidazo. Po inkubaciji smo s spiranjem odstranili nevezana sekundarna protitelesa. V zadnji stopnji smo dodali substrat, ki skupaj z encimom, vezanim na kompleks antigen - protitelo povzroči barvno reakcijo, pri kateri je intenzivnost barve sorazmerna s koncentracijo protiteles v serumu. Intenziteto nastale barve (OD, angl. optical density) smo izmerili s spektrofotometrom pri valovni dolžini 450 nm.

3.2.2 Sestavine kompleta Focus diagnostics HerpeSelect[®] ELISA IgG

- **mikrotitrna ploščica:** 96 vdolbinic, prekritih z rekombinantnim antigenom gG-1 za detekcijo protiteles proti HSV 1 oziroma rekombinantnim antigenom gG-2 za detekcijo protiteles proti HSV 2,
- **visoko pozitivna kontrola IgG:** 0,3 mL,
- **nizko pozitivna kontrola IgG:** 0,3 mL,
- **negativna kontrola:** 0,3 mL,
- **umeritveni kalibrator IgG:** 0,3 mL (vsebuje 0,1% natrijev azid kot konzervans),
- **konjugat IgG:** 16 mL, kozja protitelesa proti človeškim protitelesom IgG, označena z encimom
- **pufer za redčenje (sample diluent):** 100 mL, fosfatni pufer,
- **pufer za spiranje:** 100 mL, 10X koncentriran PBS (fosfatni pufer),
- **substrat:** 16 mL, tetrametilbenzidin (TMB) in peroksid v pufru,
- **reagent za ustavitev reakcije:** 16 mL, 1M žveplova kislina (H₂SO₄)

3.2.3 Postopek testa ELISA IgG

Test smo izvedli po navodilih proizvajalca.

1. Pripravili smo si načrt pipetiranja v mikrotitrsko ploščo (Slika 5).

HSV1	Št. Plošče:											
TEST	FOCUS HerpesSelect 1 ELISA IgG EL0910G, lot: 050535											
VZORCI	Control panel 2000											
DATUM												
DELAL	Nadja Lorber											

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
B	Neg K	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
C	Poz low	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
D	Poz high	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
E	Stan.s er.	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
F	Stan.s er.	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90

Slika 5: Primer protokola za test ELISA IgG

2. Serume smo odtalili. Vse reagente iz diagnostičnega kompleta smo pustili, da se ogrejejo na sobno temperaturo.
3. Priprava pufru za spiranje: koncentriran pufer za spiranje smo redčili 1:1000 z destilirano vodo (900 mL destilirane vode + 100 mL 10X pufer za spiranje). Vsi drugi reagenti so bili pripravljani za uporabo.
4. Serume in kontrole smo dobro premešali (vorteksirali) in redčili v plastičnih epruvetkah za enkratno uporabo. V vsako epruvetko smo dali po 1000 μ L pufru za redčenje in 10 μ L seruma, kontrole ali kalibratorja (redčina 1:101). Redčine serumov, kontrol in kalibratorjev smo dobro premešali s pipetiranjem.
5. Priprava - vlaženje mikrotitrne plošče: v testne vdolbinice smo z avtomatsko pipeto odpipetirali po 100 μ L razredčenega pufru za spiranje, inkubirali 5 min pri sobni temperaturi, odstranili pufer in mikrotitrsko ploščo potolkli ob staničevino.
6. V pripravljeno ploščo smo z multikanalno pipeto nanesti po 100 μ L razredčenih serumov, kontrol in kalibratorjev v vse testne vdolbinice, razen v eno (oznaka vdolbinice A1 – blank). V vdolbinico A1 smo nanesti po 100 μ L pufru za redčenje. Vdolbinice smo prelepili s folijo in inkubirali 60 min pri temperaturi 20 – 25 °C.
7. Odstranili smo folijo. Vdolbinice smo 3x sprali z razredčenim pufrom za spiranje, vsakič z 200 μ L pufru. Spirali smo z avtomatskim spiralnikom (Columbus plus, Tecan M8/2R, Tecan Avstrija). Po zadnjem spiranju smo mikrotitrsko ploščo krepko potolkli ob staničevino.
8. V vse vdolbinice, razen v vdolbinico z oznako A1 - blank, smo z multikanalno pipeto odpipetirali po 100 μ L konjugata (HSV 1 IgG Conjugate oz. HSV 2 Conjugate), ki je bil

že pripravljen za uporabo. Vdolbinice smo prelepili s folijo in inkubirali 30 min pri 20 – 25 °C.

9. Odstranili smo folijo in mikrotitrsko ploščo 3x sprali kot je opisano v točki 7.

10. V vse vdolbinice smo z multikanalno pipeto nanegli po 100 µL substrata (Substrate Reagent), ki je bil že pripravljen za uporabo. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 10 min pri 20 – 25 °C.

11. V vse vdolbinice smo z multikanalno pipeto odpipetirali 100 µL reagenta za ustavitev reakcije v enakem vrstnem redu kot smo nanegli substrat.

12. S spektrofotometrom (Sunrise Remote, Tecan ST, Tecan Avstrija) smo pri valovni dolžini 450 nm izmerili optično gostoto (OD).

Računalniški program Magelan podjetja Tecan iz Avstrije, ki je prilagojen za serološke metode, nam je odšteval ozadje (od vseh vednosti OD je odštel vrednost OD, ki jo je spektrofotometer izmeril v vdolbinici A1 - blank, v kateri ni bilo nobenega vzorca ali kontrole), preverjal ustreznost vrednosti OD kalibratorjev in kontrol (ugotavljal veljavnost testa). Vedno smo tudi ročno preverili, ali so vrednosti, ki določajo veljavnost testa, ustrezne. Po formuli, ki smo jo vnesli, je program iz vrednosti OD izračunaval vrednosti IV (indeksne vrednosti). Na podlagi indeksnih vednosti smo rezultat ovrednotili kot pozitiven ali negativen. Povprečje OD umeritvenih kalibratorjev je moralo biti med 0,1 in 0,7. Nobena od OD vrednosti umeritvenih kalibratorjev se od povprečja ni smela razlikovati za več kot 0,1. Indeksna vrednost (IV) je izračunana tako, da je OD vzorca deljen s povprečjem OD umeritvenih kalibratorjev. Visoko pozitivna kontrola mora imeti IV večji kot 3,5, nizko pozitivna pa med 1,5 in 3,5. Negativna kontrola mora imeti IV manjši kot 0,8. Rezultate z IV manjšim od 0,7 smo ovrednotili kot negativne, rezultate z vrednostjo nad 1,3 pa kot pozitivne. Vmes so bili rezultati ovrednoteni kot mejni. V primeru, da smo dobili mejni rezultat, smo testiraje ponovili v dvojniku.

3.3 IMUNSKA BLOT METODA

Kakor z encimsko imunskim testom smo tudi z imunsko blot metodo dokazovali specifična protitelesa IgG, usmerjena proti specifičnim antigenom gG–1 oziroma gG–2. Uporabili smo test Focus Diagnostics Herpes Select[®] 1 in 2 Immunoblot IgG proizvajalca Focus diagnostic, ZDA.

3.3.1 Princip testa Focus Diagnostics HerpeSelect[®] 1 in 2 Immunoblot IgG

Test Focus Diagnostics Herpes Select[®] 1 in 2 Immunoblot IgG je dvostopenjski. V prvem koraku redčimo serume in jih inkubiramo s posameznimi trakovi, na katere so nanešeni različni antigeni. Prvi antigen reagira s človeškim serumom, ne glede na to ali so v njem prisotna protitelesa ali ne. Če so v serumu protitelesa proti specifičnemu antigenu HSV 1 ali HSV 2 ali protitelesa proti skupnemu antigenu HSV, se bodo vezala na antigene, ki so vezani na nitrocelulozne trakove na določenih mestih. V drugem koraku trakove inkubiramo s substratom.

3.3.2 Sestavine kompleta Focus Diagnostics HerpeSelect[®] 1 and 2 Immunoblot IgG

- **24 označenih nitroceluloznih trakov.** Na vsakem traku so štirje pasovi. Na njih so vezani: nespecifični antigen človeškega seruma, skupni antigen HSV, zmes naravnih virusnih antigenov HSV 1 in HSV 2 ter rekombinantni antigen gG1 in rekombinantni antigen gG2,
- **IgG konjugat:** 50 mL, vsebuje kozja protitelesa proti človeškim protitelesom IgG, ki so označena z alkalno fosfatazo,
- **umeritvena pozitivna kontrola:** 0,2 mL človeškega seruma,
- **negativna kontrola:** 0,2 mL človeškega seruma,
- **substrat:** 50 mL bromo- kloro-indolil fosfat in nitromoder tetrazol,
- **posneto mleko v prahu** (Blotting powder),

- **fosfatni pufer za spiranje** (10x koncentriran), ki je hkrati tudi **pufer za redčenje**: 50 mL
- **pladenj za inkubacijo**: dva pladnja z dvanajstimi vdolbinami

3.3.3 Postopek imunske blot metode

Test smo izvedli po navodilih proizvajalca. Pred začetkom testa smo vse reagente in serume segreti na sobno temperaturo. Pufer za spiranje smo pripravili z redčenjem 10X koncentriranega pufera v 450 mL destilirane vode (450 mL destilirane vode + 50 mL 10X koncentriranega pufera za spiranje).

Pufer za redčenje smo pripravili z raztapljanjem 4 g posnetega mleka v prahu v 100 mL pripravljenega pufera za spiranje. Pred uporabo smo pufer za redčenje dobro premešali.

Vsi drugi reagenti so bili pripravljene za uporabo.

1. Pripravili smo si načrt za izvedbo testa Immunoblot (Slika 6).

Specimen ID (sera, control)	Developed Antigen Strips				Observed Bands				Interpretation
	anti-human serum	HSV common antigen	gG1	gG2	anti-human serum	HSV common antigen	gG1	gG2	
1 SORT KONTROLA	+	+	+	+	+	+	+	+	✓
2 NEGAT. KONTROLA	+	-	-	-	+	-	-	-	
3 9	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
4 14	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
5 62	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
6 87	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
7 175	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
8 189	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
9 193	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
10 267	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
11 276	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
12 297	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
13 305	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
14 329	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
15 399	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
16 427	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
17 559	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
18 573	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
19 581	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
20 622	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
21 685	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
22 753	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
23 813	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-
24 326	+	+	+	-	+	+	+	-	HSV 1+ HSV 2-

Institution: LABORATORIJ ZA VIRUSE		Performed by: Nadja Lorber		Date: 5.9.2005	
Material	Lot #	Exp. Date	Material	Lot #	Exp. Date
Kit	052601	2006-03	Negative Control	050246	2006-03
Antigen Strip	053682	2006-03	Substrate	050306	2007-02
Conjugate	050247	2006-12	Blotting Powder	050430	2006-02
Positive Control	050210	2006-04	10X Wash Buff./Dil.	050205	2007-03
Substrate Time	15 MIN.				

Slika 6: Primer protokola in beleženja rezultatov za test Immunoblot IgG

2. Antigenske trakove smo namestili v vdolbine pladnja za inkubacijo in jih prelili z 2 mL pripravljene pufra za spiranje. Inkubirali smo jih 5 min s stresanjem. Pufer za spiranje smo nato odlili.

3. Vzorce in kontroli smo redčili v razmerju 1:101 (2000 μ L pripravljenega pufra za redčenje in 20 μ L seruma ali kontrole) v vdolbinah inkubacijskega pladnja. Najprej smo v vdolbine pipetirali pufer in nato serume in kontrole.
4. Antigenske trakove smo 1 uro inkubirali pri sobni temperaturi in jih ves čas stresali.
5. Po inkubaciji smo antigenske trakove sprali z 2 mL pufra za spiranje. Spiranje smo ponovili dvakrat.
6. Po spiranju smo antigenim trakovom dodali 2 mL konjugata IgG in inkubirali v pladnju 30 min pri sobni temperaturi s stresanjem.
7. Po inkubaciji smo antigenske trakove trikrat spirali s po 2 mL pufra za spiranje in trikrat s po 2 mL destilirane vode.
8. Antigenim trakovom smo dodali 2 mL substrata in pladenj inkubirali pri sobni temperaturi s stresanjem, dokler se na pozitivnem kontrolnem traku niso prikazali jasni pasovi v območju, kjer so vezani antigeni.
9. Reakcijo smo ustavili tako, da smo odlili substrat in trakove petkrat sprali z destilirano vodo.
10. Antigenske trakove smo osušili na vpojnem papirju in odčitali rezultate. Posamezen test je bil veljaven, kadar se je na traku pokazal pas, kjer so bila vezana protitelesa proti človeškemu serumu (dokaz, da je bil serum resnično navzoč). Rezultat je bil pozitiven, kadar se je obarval pas, kjer je bil vezan skupni antigen za HSV in eden od pasov z vezanimi specifičnimi antigeni za HSV 1 oz. HSV 2.

3.4. OBDELAVA REZULTATOV

Za našo študijo smo uporabili rezultate, ki smo jih dobili z encimsko imunskim testom ELISA, saj so bili z enako metodo obdelani tudi serumi iz leta 1993. Za harmonizacijo našega testiranja s testiranjem serumske banke iz leta 1993 smo testirali 91 serumov iz

stare serumske banke in 69 referenčnih serumov iz laboratorija v Londonu (Communicable Diseases Surveillance Centre). Ugotavljali smo korelacijo med rezultati in iskali linijo najboljšega prileganja med njimi. Po enačbi, ki ustreza liniji najboljšega prileganja, smo transformirali rezultate testiranja naše serumske banke. Da smo zgoščene vrednosti razporedili, smo rezultate (vrednosti IV) logaritmirali (\log_{10}). Nato smo jih transformirali po ustrezni enačbi (Sliki 7 in 8) ter jih po transformaciji antilogaritmirali. Rezultate, ki so imeli IV manjšo od 0,7, smo vrednotili kot negativne, tiste z IV večjimi od 1,3 pa kot pozitivne. Vzorce z mejnimi rezultati smo testirali ponovno v dvojniku. Ker za epidemiološko študijo mejen rezultat ni uporaben, smo enako kot v študiji iz leta 1993 rezultate, ki so ostali mejni, razdelili tako, da smo kot pozitivne vrednotili vse z IV večjim ali enakim 1, kot negativne pa vse z IV manjšim od 1. Rezultatov, dobljenih z imunsko blot metodo, nismo upoštevali, saj je šlo le za preizkus metode. Vse rezultate smo vnesli v razpredelnice v računalniški program Excel ter izračunali deleže vzorcev, v katerih smo dokazali protitelesa proti HSV 1 oziroma HSV 2.

4 REZULTATI

4.1 VZORČENJE

Na voljo so nam bili ostanki serumov nosečnic iz 7 področij v Sloveniji, ki so bili razdeljeni v štiri skupine glede na starost nosečnic (do 19 let, od 20 do 24, od 25 do 29 in nad 30 let). Glede na statistične podatke o prebivalstvu v Sloveniji v letu 2003 in glede na število razpoložljivih serumov smo določili število serumov iz posameznega področja in starostne skupine tako, da smo zagotovili čim bolj reprezentativen vzorec (Preglednica 2).

Preglednica 2: Število serumov iz leta 2003 iz različnih področij in starostne skupine nosečnic

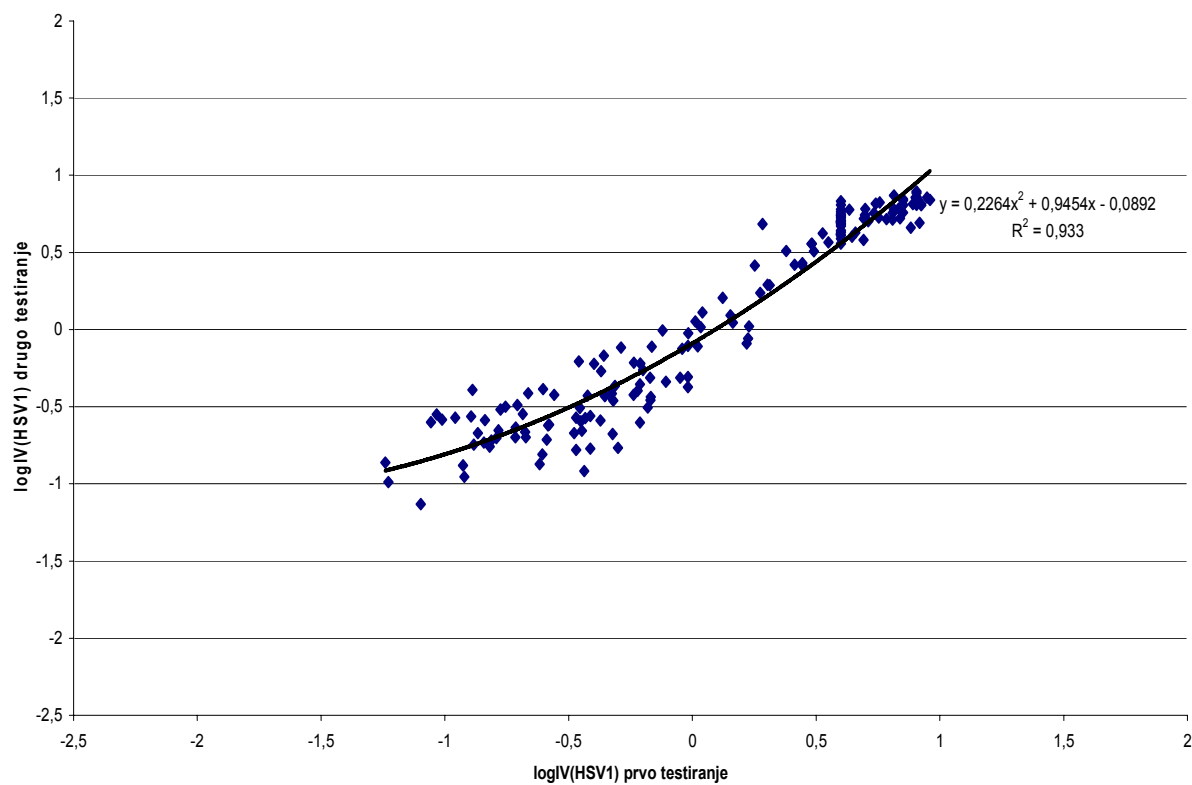
Področje/starostna skupina	<19 let	20-24 let	25-29 let	30 in več let	SKUPAJ
Maribor	61	266	266	257	850
Celje	50	231	228	175	684
Koper	3	84	84	79	250
Novo mesto	50	83	70	77	280
Kranj	18	121	129	120	388
Nova Gorica	14	35	87	60	196
Ljubljana	54	325	376	597	1352
SKUPAJ	250	1145	1240	1365	4000

Za odkrivanje protiteles IgG proti HSV 1 in HSV 2 smo uporabili test ELISA. Preizkusili smo tudi imunsko blot metodo. Ugotavljali smo protitelesa IgG proti HSV 1 in 2 pri 4000 nosečnicah iz leta 2003.

4.2. STANDARDIZACIJA METODE ELISA

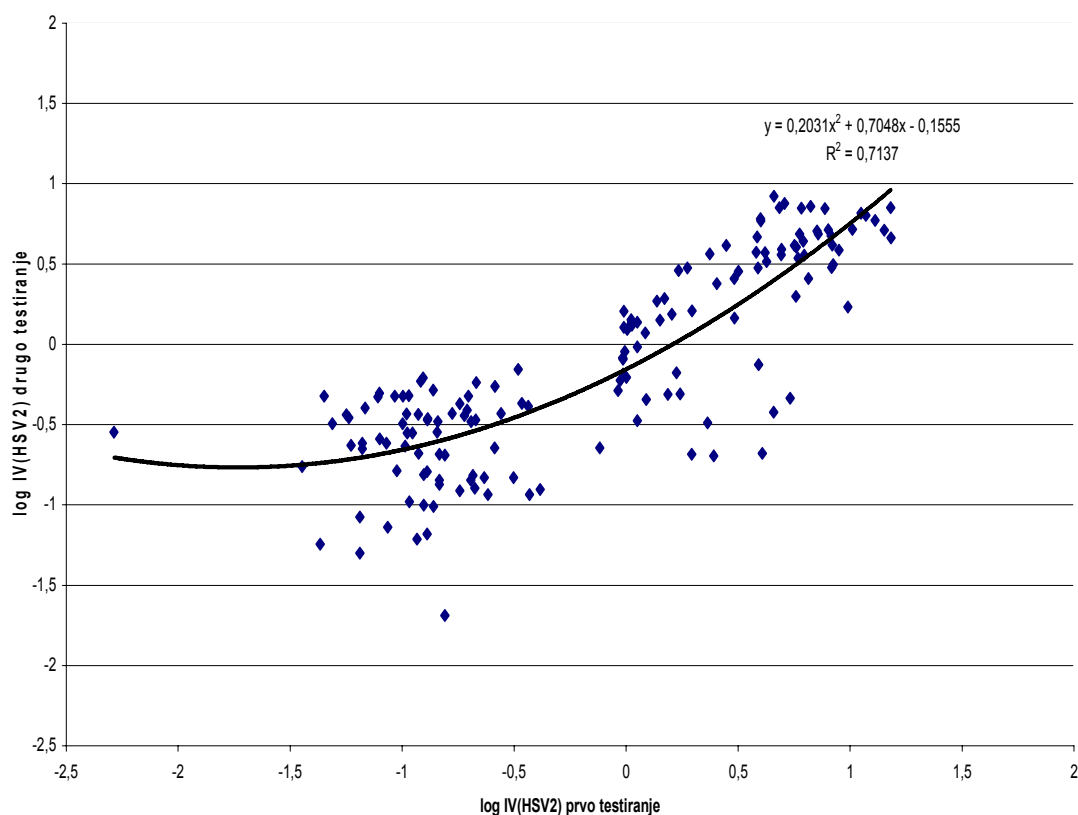
Pred testiranjem serumske banke smo metodo ELISA harmonizirali z metodo, ki je bila uporabljena za testiranje serumske banke iz leta 1993, da smo zagotovili primerljivost rezultatov. V obeh primerih je bil uporabljen enak komplet diagnostičnih reagentov istega proizvajalca (Focus diagnostics, ZDA). V Communicable Diseases Surveillance Centre v Londonu so prvo testiranje ocenili kot primerno. Ocena je pokazala, da je laboratorij dokazoval IgG protitelesa proti HSV 1 z občutljivostjo 97,6 % in specifičnostjo 97,8 % ter protitelesa proti HSV 2 z občutljivostjo 100 % in specifičnostjo 100 %. Da bi naše testiranje čim bolj uskladili s tem prvim testiranjem, smo testirali 91 serumov iz stare serumske banke (1993) in 69 referenčnih serumov iz laboratorija v Londonu. Ugotavljali smo korelacijo med starimi in našimi rezultati in izračunali standardizacijske enačbe. Preizkusili smo linearno, kvadratno in kubično enačbo in ugotovili, da je pri kvadratni enačbi korelacija tako za rezultate testiranja HSV 1 kot HSV 2 (HSV 1: $R^2 = 0,933$ in HSV 2: $R^2 = 0,7182$) bistveno boljše kot pri linearni, pri kubični enačbi pa se R^2 bistveno več ne spremeni. Krivulji najboljšega ujemanja in enačbi sta prikazani na slikah 7 in 8. Naše podatke smo pred vrednotenjem transformirali po teh enačbah in tako omogočili neposredno primerjavo z rezultati študije iz leta 1993.

Standardizacijska krivulja in enačba za HSV 1



Slika 7: Standardizacijska krivulja in enačba za HSV 1

Standardizacijska krivulja in enačba za HSV 2



Slika 8: Standardizacijska krivulja in enačba za HSV 2

4.3 TESTIRANJE SERUMOV IZ SERUMSKE BANKE Z METODO ELISA

Pri testiranju 4000 serumov z metodo ELISA smo dokazali protitelesa proti HSV 1 v 3475 serumih (86,9 %), protitelesa proti HSV 2 pa pri 337 serumih (8,4 %). Navzočnost protiteles proti HSV 1 in hkrati odsotnost protiteles proti HSV 2 smo ugotovili pri 3189 (79,7 %) serumih. Odsotnost protiteles proti HSV 1 in hkratno navzočnost protiteles proti HSV 2 smo ugotovili pri 51 (1,3 %) serumih. Protitelesa proti obema HSV smo dokazali pri 286 (7,1 %) serumih, odsotnost protiteles proti HSV 1 in HSV 2 pa pri 474 (11,8 %)

serumih. Natančni rezultati po starostnih skupinah nosečnic so podani v preglednicah 3 in 4.

Preglednica 3: Število nosečnic v 4 starostnih skupinah, pri katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 1 in/ali proti HSV 2

	Število serumov nosečnic z ustreznimi rezultati glede na starostno skupino				SKUPAJ
	< 19 let	20 – 24 let	25 – 29 let	30 in več let	
HSV 1 poz	214/250	998/1145	1087/1240	1176/1365	3475/4000
HSV 2 poz	14/250	85/1145	86/1240	152/1365	337/4000
HSV 1 poz in HSV 2 neg	202/250	928/1145	1011/1240	1048/1365	3189/4000
HSV 1 neg in HSV 2 poz	2/250	15/1145	10/1240	24/1365	51/4000
HSV 1 poz in HSV 2 poz	12/250	70/1145	76/1240	128/1365	286/4000
HSV 1 neg in HSV 2 neg	34/250	132/1145	143/1240	165/1365	474/4000

HSV 1 poz – serumi v katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 1

HSV 2 poz – serumi v katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 2

HSV 1 poz in HSV 2 poz - serumi v katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 1 in hkrati proti HSV 2

HSV 1 poz in HSV 2 neg - serumi v katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 1, ne pa proti HSV 2

HSV 1 neg in HSV 2 poz - serumi v katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 2, ne pa proti HSV 1

HSV 1 neg in HSV 2 neg – serumi v katerih nismo dokazali protiteles proti HSV 1 ali HSV 2

Preglednica 4: Deleži nosečnic v 4 starostnih skupinah, pri katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 1 in/ali proti HSV 2

	Delež serumov nosečnic z ustreznimi rezultati glede na starostno skupino (%)				
	< 19 let	20 – 24 let	25 – 29 let	30 in več let	SKUPAJ
HSV 1 poz	85,6	87,2	87,7	86,1	86,9
HSV 2 poz	5,6	7,4	6,9	11,1	8,4
HSV 1 poz in HSV 2 neg	80,4	81,0	81,5	76,8	79,7
HSV 1 neg in HSV 2 poz	0,4	1,3	0,8	1,8	1,3
HSV 1 poz in HSV 2 poz	5,2	6,1	6,1	9,4	7,1
HSV 1 neg in HSV 2 neg	14,0	11,5	11,5	12,1	11,8

HSV 1 poz – serumi v katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 1

HSV 2 poz – serumi v katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 2

HSV 1 poz in HSV 2 poz - serumi v katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 1 in hkrati proti HSV 2

HSV 1 poz in HSV 2 neg - serumi v katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 1, ne pa proti HSV 2

HSV 1 neg in HSV 2 poz - serumi v katerih smo dokazali IgG protitelesa proti HSV 2, ne pa proti HSV 1

HSV 1 neg in HSV 2 neg – serumi v katerih nismo dokazali protiteles proti HSV 1 ali HSV 2

4.4 TESTIRANJE IZBRANIH SERUMOV IZ BANKE Z IMUNSKO BLOT METODO

Z imunsko blot metodo smo testirali 138 serumov. Izbrali smo serume, ki so imeli v testu ELISA pozitiven in negativen rezultat in zajeli širok spekter indeksnih vrednosti (IV). Pri HSV 1 je bil IV testiranih vzorcev od 0,099 do 7,9 in pri HSV 2 od 0,025 do 14,9. Imunska blot metoda je pokazala skupni marker za protitelesa proti virusom herpes simpleks v 72 od 138 serumov. Od teh je bilo 66 pozitivnih na HSV 1 in 6 na HSV 2 (Preglednica 5). Štirje so pokazali protitelesa proti obema virusoma. Kadar pasu za navzočnost skupnega markerja ni bilo (v takem primeru smatramo rezultat vedno za negativen), se pasova za HSV 1 in HSV 2 nikoli nista pojavila. Rezultate imunske blot metode smo primerjali z rezultati validirane metode ELISA. Ugotovili smo, da so bili serumi s pozitivnim rezultatom v imunski blot metodi vedno pozitivni tudi v testu ELISA. Vendar pa je bilo v testu ELISA pozitivnih tudi precej serumov, ki so z imunsko

blot metodo dali negativen rezultat (Preglednica 5). Pri ugotavljanju protiteles proti HSV 1 je bilo takšnih vzorcev 28, pri ugotavljanju protiteles proti HSV 2 pa 56 (Preglednici 6 in 7). Pri testiranju z imunsko blot metodo smo dobili pozitiven rezultat, kadar je bila indeksna vrednost dobljena s testom ELISA višja kot 3,5 za HSV 1 in višja kot 7,2 pri HSV 2. Z metodo ELISA smo kot pozitivne smatrali vse vzorce z IV višjim kot 1,0. Nikoli pa nismo opazili, da bi z eno metodo dokazali protitelesa proti drugačnemu antigenu kot z drugo metodo. V primerjavi s testom ELISA je torej imunska blot metoda enako specifična. Glede na metodo ELISA smo izračunali občutljivost imunske blot metode in znaša 71,4 % za dokazovanje protiteles proti HSV 1 in 9,7 % za ugotavljanje protiteles proti HSV 2.

Preglednica 5: Primerjava serumov, ki so imeli pozitiven rezultat za skupna protitelesa za herpes simpleks (common antigen) z imunsko blot metodo z rezultati teh vzorcev v testu ELISA

	Št. pozitivnih BLOT (skupna protitelesa)	ELISA HSV 1		ELISA HSV 2	
		poz	neg	poz	neg
HSV1 poz in HSV2 poz	4	4	0	4	0
HSV1 poz in HSV2 neg	66	66	0	43	23
HSV1 neg in HSV2 poz	2	2	0	2	0
HSV1 neg in HSV2 neg	0	0	0	0	0
SKUPAJ	72	72	0	49	23

Preglednica 6: Primerjava serumov, ki so imeli pozitiven rezultat za specifična protitelesa proti HSV 1 z imunsko blot metodo z rezultati teh vzorcev v testu ELISA

Imunska blot metoda HSV 1	ELISA HSV 1	
	poz	neg
poz	70	0
neg	28	40

Preglednica 7: Primerjava serumov, ki so imeli pozitiven rezultat za specifična protitelesa proti HSV 2 z imunsko blot metodo z rezultati teh vzorcev v testu ELISA

Imunska blot metoda HSV 2	ELISA HSV 2	
	poz	neg
poz	6	0
neg	56	76

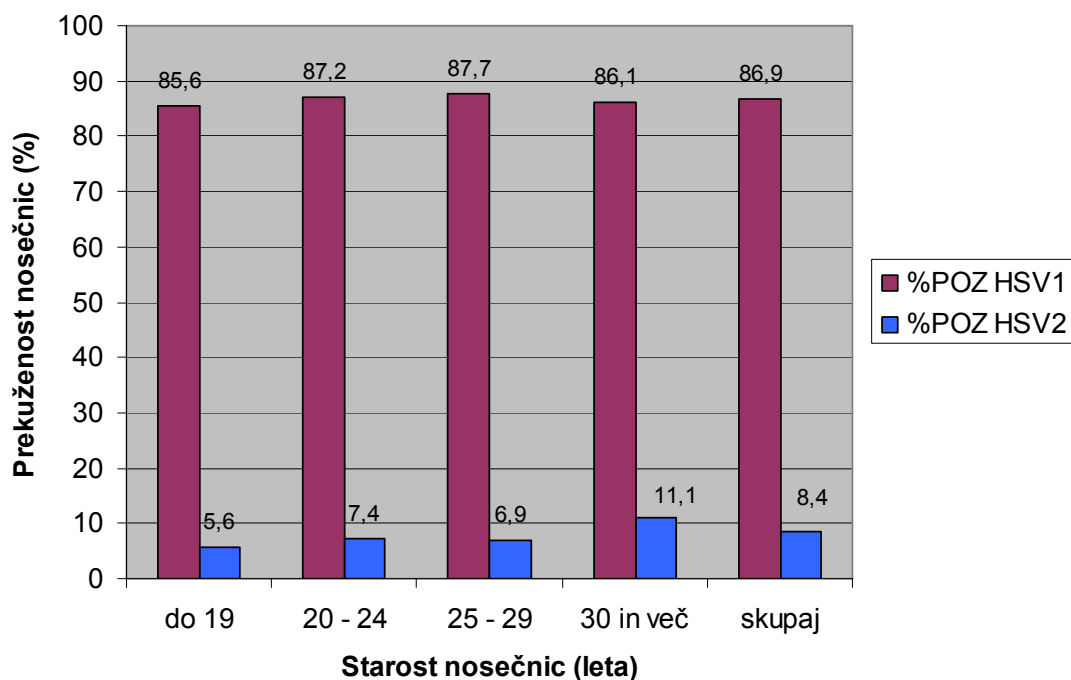
5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Virusi herpesa so med najpogostejšimi povzročitelji okužb pri ljudeh. Prekuženost s HSV 1 in HSV 2 je visoka in je odvisna od starosti, načina življenja, ekonomskih razmer, števila spolnih partnerjev, narodnosti in rase. Oba tipa virusov sta razširjena po vsem svetu. Velik del populacije se predvsem s HSV 1 okuži v zgodnjem otroštvu, okužbe s HSV 2 pa se v večini pojavijo s pričetkom spolne aktivnosti (Jerome in Ashley, 2003).

V diplomski nalogi smo ugotavljali prekuženost nosečnic z virusoma HSV 1 in HSV 2 v Sloveniji na serumih, zbranih v letu 2003. Rezultate smo primerjali s podatki enake študije, ki je bila narejena leta 1993 (Prosenc in sod., 2002), in skušali ugotoviti, ali se je v Sloveniji v obdobju desetih let pojavila sprememba v epidemiologiji okužb nosečnic z virusoma HSV 1 in HSV 2. Stopnjo prekuženosti slovenskih nosečnic s herpesvirusi smo primerjali z ugotovitvami študij iz drugih držav.

V naši študiji se je izkazalo, da prekuženost s HSV 1 s starostjo pričakovano narašča, saj je v daljšem obdobju verjetnost stika z virusom večja. Kljub temu pa med posameznimi starostnimi skupinami nismo opazili velikih razlik (Slika 9). Najvišja prekuženost je pri nosečnicah iz 3. starostne skupine (87,7 %), najnižja pa pri nosečnicah iz 1. starostne skupine (85,6 %). Podatki kažejo, da prekuženost slovenskih nosečnic s HSV 1 od najstniških let do starosti nad 29 let nekoliko narašča in je v povprečju 86,9 %. Majhne razlike v prekuženosti s HSV 1 med posameznimi starostnimi skupinami, ki smo jih opazili v naši študiji, potrjujejo ugotovitve drugih raziskav, ki ugotavljajo, da se večina ljudi z virusom HSV 1 okuži že v otroštvu (Ades in sod., 1989; Jerome in Ashley, 2003).

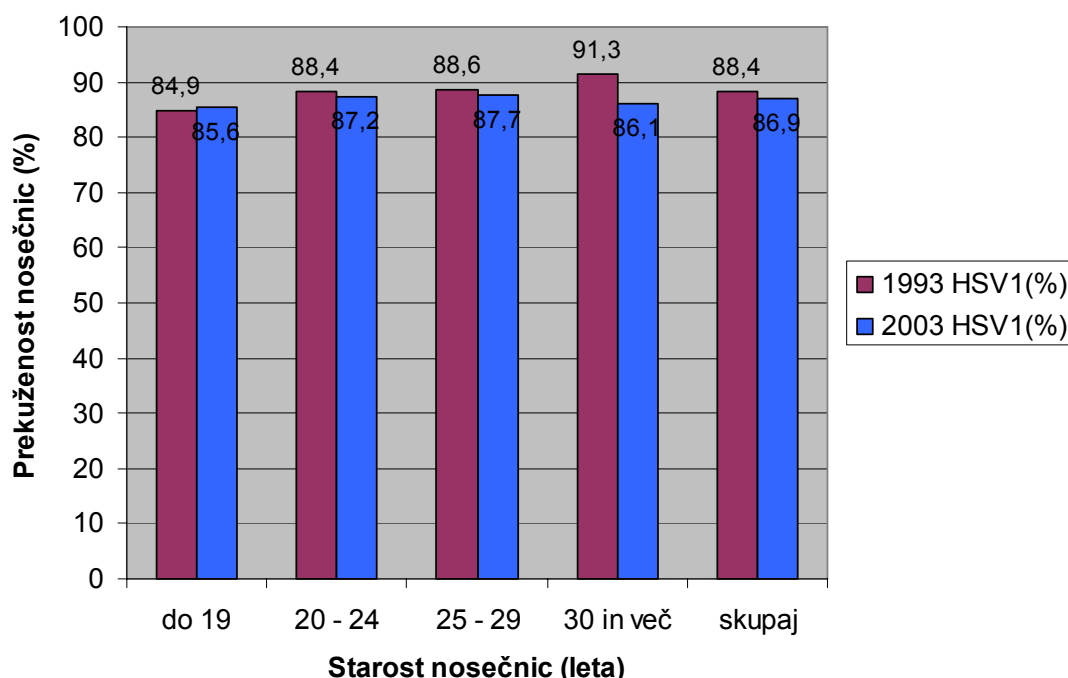


SI

Slika 9: Prekuženost nosečnic v Sloveniji s HSV 1 in HSV 2 v letu 2003 po posameznih starostnih skupinah

Primerjava med nosečnicami v Sloveniji v letih 2003 in 1993 kaže, da je z izjemo v prvi starostni skupini prekuženost s HSV 1 leta 2003 nekoliko nižja kot leta 1993; leta 1993 so dokazali protitelesa proti HSV 1 v 88,4 % serumov nosečnic, leta 2003 pa v 86,9 %. Razlike v prekuženosti s HSV 1 v desetletnem razmiku so zelo majhne (Slika 10). Največji padec v stopnji prekuženosti s HSV 1 je viden pri 4. starostni skupini (za 5,1 %). V prvi starostni skupini je bil delež nosečnic s protitelesi proti HSV 1 v letu 1993 za 0,7 % nižji kot v letu 2003. To je edina starostna skupina, kjer se je delež prekuženosti s HSV 1 leta 2003 nekoliko povečal. Skupna prekuženost s HSV 1 v vseh starostnih skupinah je leta 1993 za 1,5 % višja kot leta 2003. Čeprav je v desetletnem razmiku prekuženost s HSV 1 upadla, je odstotek HSV 1 pozitivnih v primerjavi z drugimi državami še vedno visok (Ades in sod., 1989; Davidovici in sod., 2005; Pebody in sod., 2004). Da bi zaznali opaznejše razlike v prekuženosti s HSV 1 bi bilo smiselno spremljati rezultate v daljšem časovnem obdobju.

Zanimiva je tudi švedska študija (Christenson in sod., 1992), kjer so 16 let (1972 – 1987) spremljali skupino 839 odraščajočih deklet (14 do 15 let). Ob začetku je bila seroprevalenca HSV 1 v skupini 23 %, po štirih letih 36 % in na koncu študije, ko je bila starost preiskovank 30 – 31 let, 61 %. Opazimo lahko nizko prekuženost s HSV 1, ki je zanjilna za veliko severnih in zahodnih evropskih držav in pozen stik z virusom v primerjavi z našo študijo, kjer je že v prvi starostni skupini (do 19 let) prekuženost s HSV 1 85,6 % in se v višjih starostnih skupinah le še malo spreminja.



SI

ika 10: Prekuženost nosečnic s HSV 1 v Sloveniji po starostnih skupinah v letih 1993 in 2003

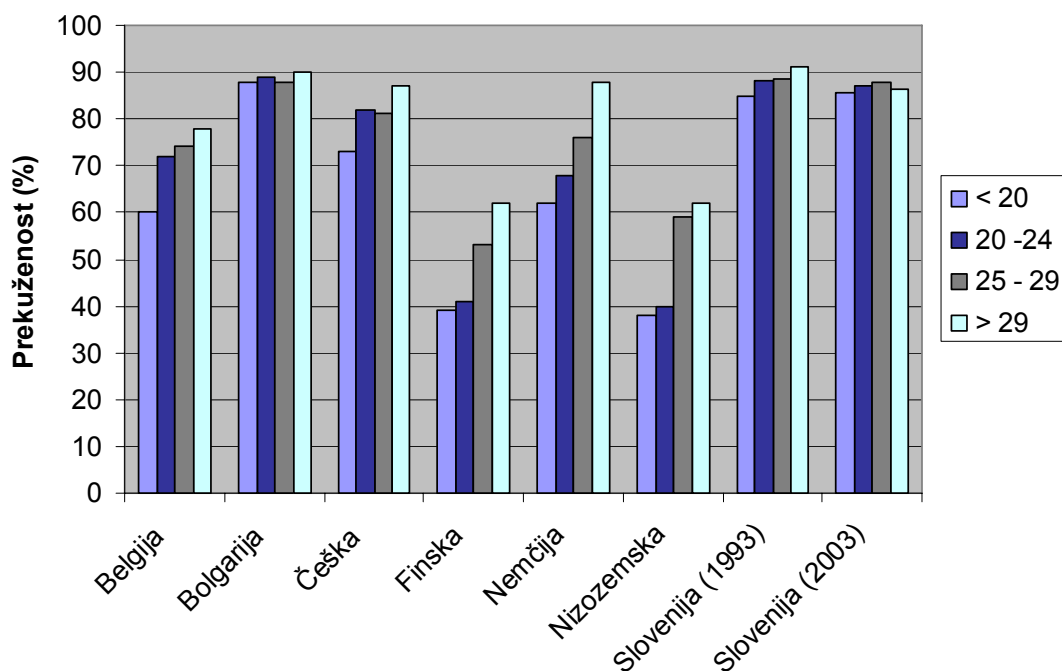
Delež ljudi, okuženih s HSV 1, je nižji predvsem v razvitih deželah, kar gre pripisati socialnim in ekonomskim razmeram. Nekatere evropske države, kot so Finska, Anglija in Wales, imajo v primerjavi z drugimi evropskimi državami bistveno nižjo HSV 1 seroprevalenco (Pebody in sod., 2004). Najverjetneje je to posledica drugačnih življenjskih navad v teh državah. Ena možnih razlag nižje in kasnejše prekuženosti s

HSV 1 v severnih in zahodnih državah Evrope so drugačne kulturne in socialne navade (manj dotikanja med ljudmi, tudi med starši in otroci). Prekuženost s HSV 1 na Finskem znaša 52 %, na Nizozemskem 57 % in v Belgiji 67 % (Pebody in sod., 2004).

V študiji, ki je zajela nosečnice različnih ras, starosti, socialnih razmer in stanu, so ugotovili, da je razlika v prekuženosti s HSV 1 med posameznimi etničnimi skupinami majhna, čeprav so temnopolte nosečnice s Karibov ali Afrike v večjem deležu HSV 1 pozitivne (92 % - 96%) kot Azijke ali nosečnice (črnke ali belke), ki živijo v Veliki Britaniji (73 % - 80 %). Ugotovili so, da je prekuženost s HSV 1 med nosečnicami iz višjih socialno - ekonomskih slojev nižja kot pri tistih iz nižjih slojev (Ades in sod., 1989).

Povsod s starostjo prekuženost s HSV 1 narašča, saj je v daljšem časovnem obdobju tudi več priložnosti za okužbo. V državah kot so Bolgarija, Češka, Nemčija in Slovenija je prekuženost s HSV 1 višja (Slika 11) in že pri nižjih starostnih skupinah je opazen višji odstotek oseb, ki imajo protitelesa proti HSV 1. Med posameznimi državami so opazne velike razlike v prekuženosti s HSV 1. Slovenijo uvrščamo med države z visoko prekuženostjo s HSV 1.

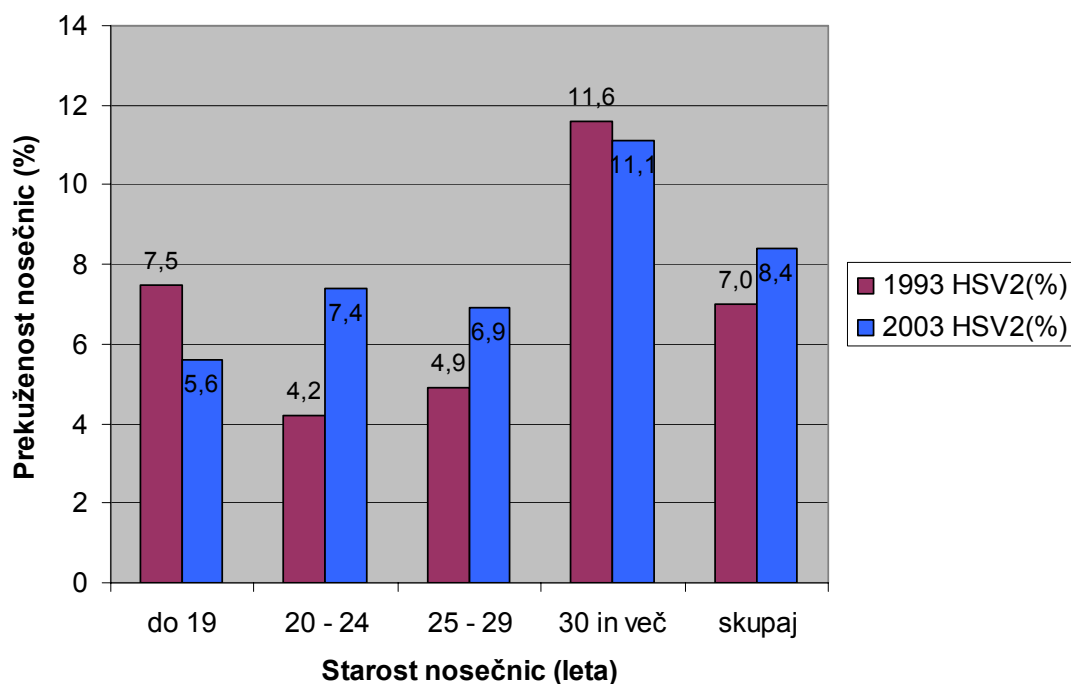
HSV 1 lahko povzroča poškodbe tudi na predelih, kjer je običajno prisoten HSV 2. Kot povzročitelja genitalnega herpesa se HSV 1 in HSV 2 prenašata s spolno aktivnostjo tako med simptomatsko kot tudi med asimptomatsko okužbo. Študija na Norveškem je pokazala, da je bil pri ženskah in v populaciji nasplošno, mlajših od 21 let, v 70 - 90 % primerov povzročitelj genitalnega herpesa HSV 1 (Nilsen in sod., 2000). Do podobnih ugotovitev so prišli v Izraelu, kjer so med leti 1993 in 2000 pri 66 % ljudi z genitalnim herpesom odkrili HSV 1 (Samra in sod., 2003). Ker se vse pogosteje pojavlja oralno-genitalna spolna praksa, upad zgodnje prekuženosti s HSV 1 zveča verjetnost izbruha genitalne okužbe s HSV 1 (Pebody in sod., 2004).



Slika 11: Primerjava prekuženosti s HSV 1 med državami (podatki o prekuženosti v drugih državah se nanašajo na celotno populacijo žensk določene starostne skupine in ne le na nosečnice)

Rezultati naše študije so pokazali mnogo manjšo prekuženost nosečnic s HSV 2 kot s HSV 1. Rezultat je pričakovan, saj je prekuženost s HSV 2 tudi na splošno v populaciji nižja kot s HSV 1 (Murray in sod., 2003). Starostni porast prekuženosti je pri HSV 2 bolj opazen kot pri HSV 1. Povprečna prekuženost s HSV 2 v letu 2003 je 8,4 % (Slika 12).

Najnižja prekuženost s HSV 2 je v prvi starostni skupini (5,6 %), najvišja pa v četrti (11,1 %), kar je pričakovano, saj so starejše osebe že dalj časa spolno aktivne in s tem je verjetnost okužbe s HSV 2 večja. Največji skok v prekuženosti s HSV 2 je med 3. in 4. starostno skupino (s 6,9 % na 11,1 %), kar bi lahko razložili z aktivnim spolnim življenjem v tem starostnem obdobju, to je od 25. leta naprej.



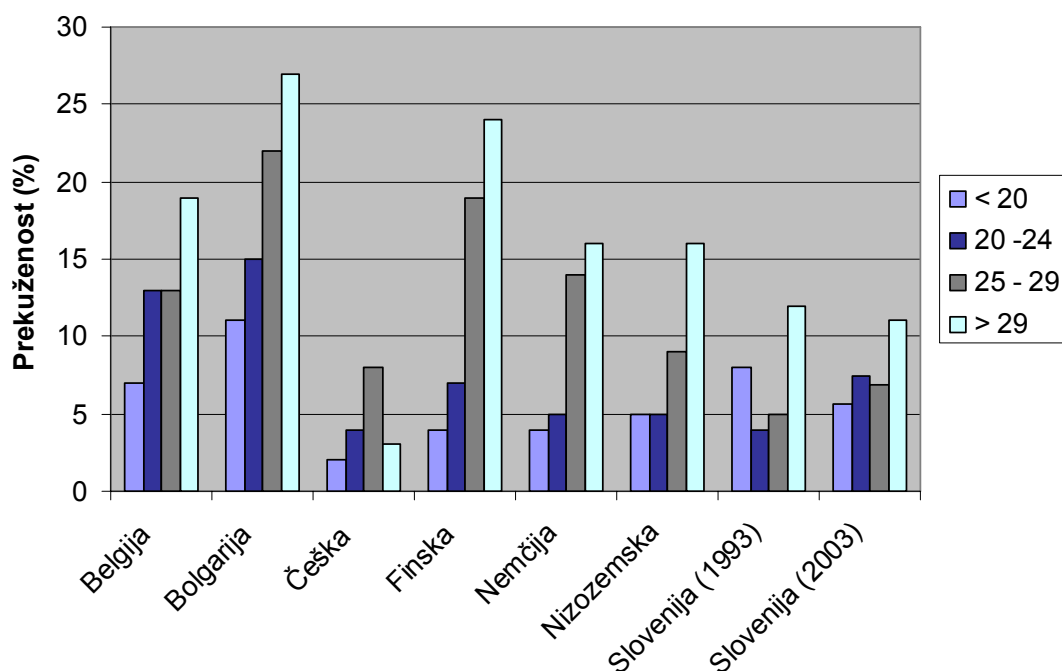
SI

ika 12: Prekuženost nosečnic v Sloveniji s HSV 2 po starostnih skupinah v letih 1993 in 2003

Prekuženost s HSV 2 med nosečnicami v Sloveniji leta 1993 kot tudi 2003 se med starostnimi skupinami dinamično spreminja. Skupna prekuženost s HSV 2 leta 1993 znaša 7,0 %, leta 2003 pa 8,4 %. Razlika ni zelo velika, vendar bi lahko kazala na rast prekuženosti s HSV 2. Leta 1993 je najnižja v drugi (4,2 %), najvišja pa v četrti (11,6 %) starostni skupini. Leta 2003 je prekuženost s HSV 2 najnižja v 3. (4,9 %), najvišja pa v 4. starostni skupini (11,1 %). V letu 2003 smo opazili relativno visoko prekuženost s HSV 2 v 2. in 3. starostni skupini, kar morda govori o premiku začetka spolno aktivnega življenja v mlajše starostno obdobje kot v študiji iz leta 1993.

Pri širjenju HSV 2 ima pomembno vlogo asimptomatski prenos virusa. Moški imajo pogosto asimptomatsko okužbo s HSV 2, kar verjetno povzroči večjo možnost prenosa virusa na žensko (Pebody in sod., 2004). V študiji, narejeni v letih 1980/81, na

nosečnicah različnih starosti, narodnosti, socialnega statusa in stanu, so prišli do naslednjih ugotovitev: odstotek HSV 2 pozitivnih nosečnic je večji med samskimi ženskami in temnopoltimi ženskami kot pa med poročenimi ženskami, Azijkami in belkami. V raziskavah se je pokazalo, da je prekuženost s HSV 2 močno odvisna od rase: najnižja je pri Azijkah (3,4 %), sledijo belke (7,2 %) in črnke (38 %) (Ades in sod., 1989). V nemški študiji je bila prekuženost nosečnic s HSV 2 9 % (Enders in sod., 1998). V študiji, kjer so preučevali prekuženost s HSV 1 in HSV 2 med španskimi adolescenti (14 - 17 let) ugotavljajo, da je prekuženost s HSV 2 2% (Gil in sod., 1998).

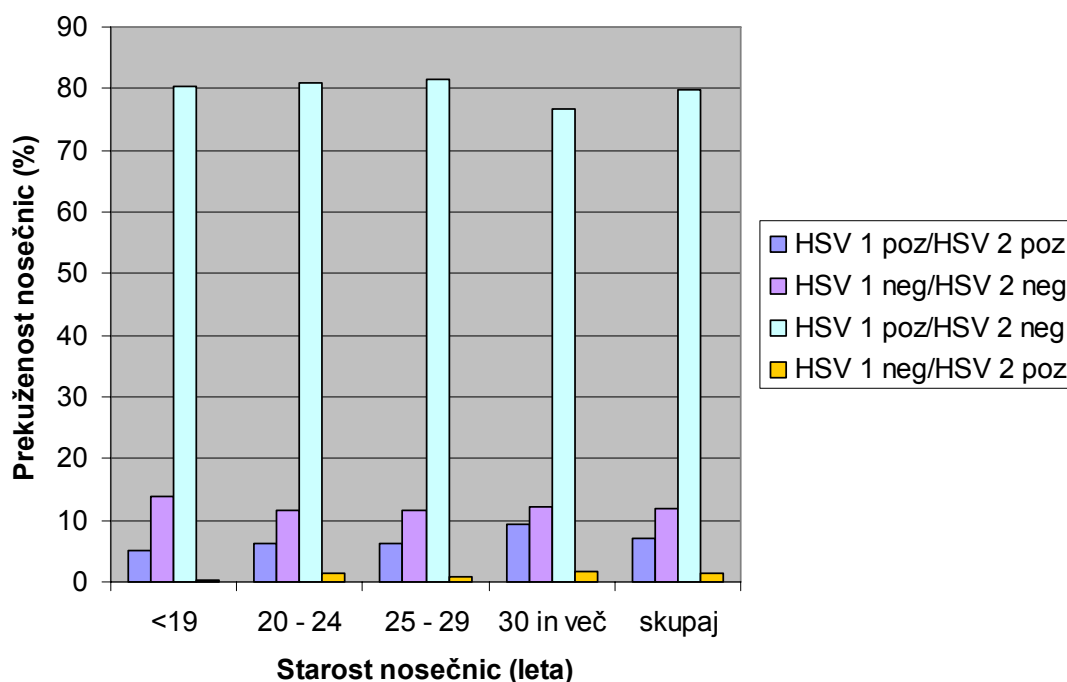


Slika 13: Primerjava prekuženosti s HSV 2 med državami (podatki o prekuženosti v drugih državah se nanašajo na celotno populacijo žensk določene starostne skupine in ne le na nosečnice)

Primerjava naših rezultatov z drugimi študijami v različnih državah Evrope kaže, da je prekuženost nosečnic s HSV 1 v Sloveniji razmeroma visoka, prekuženost s HSV 2 pa sorazmerno nizka. Seroprevalenčne študije v različnih državah Evrope kažejo na spremembe v epidemiologiji HSV 1 in HSV 2, in sicer upad prekuženosti s HSV 1 in premik prekuženosti s HSV 2 v nižje starostne skupine (Christenson in sod., 1992; Vyse

in sod., 2000). Ker se prekuženost z genitalnim herpesom iz leta v leto pomika v nižje starostne skupine, bi morali biti adolescenti ciljna populacija za obveščanje in preprečevanje širjenja okužb s HSV. Prekuženost s HSV 2 v vseh državah v posameznih starostnih skupinah iz leta v leto narašča. To je pomemben podatek za zdravstvo, saj je HSV 2 med drugim sodejavnik pri prenosu drugih spolnih bolezni (HIV in okužbe s HSV v povezavi z novorojenčki) (Davidovici in sod., 2005).

V naši študiji je bila najbolj pogosta kombinacija okužbe z virusom herpesa HSV 1 pozitivno, HSV 2 negativno, kar je pri visoki prekuženosti s HSV 1 in nizki s HSV 2 pričakovano. Takšna kombinacija se pojavi pri 79,7 % nosečnic v vseh starostnih skupinah (Slika 14). Zelo redki pa so primeri, ko smo pri nosečnicah dokazali protitelesa proti HSV 2 in odsotnost protiteles proti HSV 1 (1,3 %). Protitelesa proti obema virusoma smo dokazali pri 7,1 % nosečnicah, 11,8 % nosečnic pa ni imelo protiteles niti proti HSV 1, niti proti HSV 2.



SI

ika 14: Različne kombinacije rezultatov testiranja na protitelesa proti HSV 1 in HSV 2 (ELISA)

Seroepidemiološke študije kažejo na to, da tako HSV 1 kot tudi HSV 2 seroprevalenca z leti narašča in je višja pri ženskah. Te se okužijo mlajše v primerjavi z moškimi (Batya in sod., 2005; Pebody in sod., 2004; Vyse in sod., 2000).

Pomen ugotavljanja seroprevalence herpes simpleksa v populaciji in posebej pri nosečnicah je v možnosti okužbe novorojenčka. Neonatalni herpes v 75 % povzroči HSV 2 (Brooks in sod., 1998). V Sloveniji je genitalni herpes med spolno prenosljivimi boleznimi, ki jih je treba prijaviti, vendar je prijava slaba. V letu 2004 je bilo prijavljenih 40 primerov genitalnega herpesa (Epidemiološko spremljanje, 2005) in v letu 2005 50 primerov (Klavs Irena, ustno), kar je gotovo močno podcenjeno število. Neonatalni herpes ni opredeljen kot prijavljiva bolezen.

Nevarnost za predčasni porod in možnost okužbe novorojenca poveča primarna okužba nosečnice v drugem ali tretjem trimesečju nosečnosti (Brown, 1991). Tveganje za okužbo s HSV med nosečnostjo je odvisno od dejavnikov, kot so: prekuženost populacije s HSV 1 in HSV 2, spolne navade nosečnic, starost, okuženost partnerjev in morebitna druga spolno prenosljiva bolezen (Mindel in sod., 2000; Brown in sod., 1997). Pri nosečnicah s protitelesi proti HSV 1 in HSV 2, pridobljenimi pred nosečnostjo, je tveganje okužbe ploda minimalno. Prav tako je majhna verjetnost, da se bo plod okužil v primeru, ko sta oba partnerja ali seronegativna ali seropozitivna (Mindel in sod., 2000). Po svetu so deleži novorojenčkov, ki se rodijo okuženi s herpesom, zelo različni. V Združenih državah Amerike se rodi 50/100 000 okuženih novorojencev (Nahmias in sod., 1989), na Švedskem 6/100 000 (Malm in sod., 1995), v Avstraliji 8/100 000 (Garland, 1992) in 3/100 000 v Veliki Britaniji (Hall in sod., 1992). V avstralski študiji so ugotavljali povezanost med prekuženostjo z virusom HSV 2 in incidenco okužb novorojenčkov s tem virusom. Ugotovili so, da je bilo pri nižji prekuženosti s HSV 2 tudi manj novorojenčkov z neonatalnim herpesom. Tako je bila v tej študiji seroprevalenca HSV 2 v Avstraliji ocenjena na 12 % in incidenca neonatalnega herpesa 7,5/100 000, v Seattlu in Atlanti je bila seroprevalenca HSV 2 28 %, incidenca neonatalnega herpesa pa 28,2/100 000 v Seattlu in 40/100 000 v Atlanti (Mindel in sod., 2000). Glede na nizko

seroprevalenco HSV 2 v Sloveniji (8,4 %) je verjetno tudi incidenca neonatalnega herpesa nizka. Seroepidemiološke študije so nam tako lahko v pomoč pri ocenjevanju bremena bolezni, kadar je prijava slaba. Izjemno zanimiva bi bila študija, v kateri bi vzpostavili mrežo zdravnikov, ki bi dosledno prijavljali genitalni herpes in pošiljali tudi klinični material v laboratorijsko potrditev. Tako bi lahko dobili podatek o pogostosti tega obolenja in tudi o tem, v kolikšni meri ga pri nas povzroča HSV 1 in v kolikšni meri HSV 2. Na Norveškem in v Izraelu so namreč ugotovili, da je v novejšem času tudi HSV 1 zelo pogost povzročitelj genitalnega herpesa (Nielsen in sod., 2000; Samra in sod., 2003). V raziskavah iz Velike Britanije in Nizozemske pa ugotavljajo tudi večji pomen HSV 1 kot povzročitelja herpesa novorojenčkov (Tookey in Peckham, 1996; Gaytant in sod., 2000).

Kot drugo, alternativno metodo za dokazovanje protiteles proti virusom HSV 1 in HSV 2, smo preizkusili imunsko blot metodo, saj je tehnično manj zahtevna. Odčitavanje je vizualno in zanj ne potrebujemo spektrofotometra. Metodo smo preizkusili na 138 serumih. Izkazalo pa se je, da je pri določanju protiteles proti HSV 1 in HSV 2 ta metoda bistveno manj občutljiva, saj je primerjava z metodo ELISA, ki jo je validiral referenčni laboratorij pokazala, da bi zgrešili kar 28,6 % pozitivnih vzorcev pri HSV 1 in 90,3 % pri HSV 2. Prednosti metode ELISA so kljub višji ceni in zahtevnejšemu postopku naslednje: bistveno višja občutljivost, obdelava več vzorcev hkrati in strojno odčitavanje rezultatov, ki ni odvisno od ocene izvajalca.

5.2 SKLEPI

- Prekuženost nosečnic v Sloveniji s HSV 1 je visoka, podobno kot v državah Srednje in Jugovzhodne Evrope (Bolgarija, Češka, Nemčija).
- Prekuženost nosečnic v Sloveniji s HSV 2 je razmeroma nizka in je podobna kot na Češkem in v Nemčiji.
- Od leta 1993 do leta 2003 smo opazili rahel padec prekuženosti s HSV 1 in porast s HSV 2. To bi lahko nakazovalo trend, opazen v nekaterih državah v Severni in Zahodni Evropi, ki je verjetno posledica drugačnih kulturnih in socialnih navad (HSV 1) in spremembe v začetku spolne aktivnosti ter sprememb v spolnih navadah (HSV 2).
- Za boljšo oceno bi bila potrebna študija v daljšem časovnem obdobju (20 let).
- Imunska blot metoda, ki smo jo preizkusili, za seroepidemiološke študije ni primerna, saj je premalo občutljiva.

6 POVZETEK

Virusa HSV 1 in HSV 2 spadata med najpogostejše povzročitelje okužb pri človeku. Povzročata številne bolezni na različnih delih telesa, kot so poškodbe kože, oči in možganov. S HSV 1 pride večina ljudi v stik že v otroštvu, s HSV 2 pa v obdobju spolne aktivnosti. Za oba tipa je značilna okužba epitelnih celic in vzpostavitev prikrite okužbe v nevronih (Brooks in sod., 1998). Herpes novorojenčkov je posledica okužbe nosečnice s HSV 1 ali HSV 2 in predstavlja eno največjih nevarnosti okužb novorojenčkov. Okužba lahko povzroči hude okvare ali se konča s smrtnim izidom (Malkin in Beumont, 1999).

HSV lahko laboratorijsko diagnosticiramo z neposrednim dokazovanjem virusov v kužnini (osamitev virusa v celični kulturi, imunodetekcija virusnih antigenov, molekularne metode) ali na posreden način (serološke metode - encimsko imunska metoda, imunska blot metoda).

V diplomski nalogi smo ugotovili prekuženost nosečnic v Sloveniji z virusoma HSV 1 in HSV 2 na serumih, zbranih v letu 2003. Rezultate smo primerjali s podatki iz enake študije, narejene leta 1993 in skušali ugotoviti, ali je prišlo v Sloveniji v obdobju 10 let do sprememb v epidemiologiji okužb slovenskih nosečnic z virusoma HSV 1 in HSV 2. Stopnjo prekuženosti slovenskih nosečnic s herpesvirusi smo primerjali z ugotovitvami študij iz drugih držav. Specifična protitelesa v serumih smo dokazovali z encimskoimunsko metodo ELISA. Preizkusili smo tudi imunsko blot metodo.

Na reprezentativnem vzorcu serumov nosečnic iz leta 2003 iz različnih starostnih skupin in področij smo ugotovili, da je v primerjavi s serumi, zbranimi na enak način leta 1993, prekuženost s HSV 1 nekoliko nižja (leta 1993 je 88,4 %, leta 2003 pa 86,9 %), a vendar visoka v primerjavi z drugimi evropskimi državami. Prekuženost s HSV 2 se med posameznimi starostnimi skupinami dinamično spreminja. V primerjavi s študijo izpred desetih let je prekuženost s HSV 2 med slovenskimi nosečnicami nekoliko višja (leta 1993 je 7 %, leta 2003 je 8,4 %), v primerjavi z drugimi evropskimi državami pa

nekoliko nižja. Rast deleža nosečnic okuženih s herpesvirusi s starostjo je bolj opazna pri HSV 2, saj se večina ljudi s HSV 1 okuži že v otroštvu.

7 VIRI

Ades A.E., Peckham C.S., Dale G.E., Best J.M., Jeansson S. 1989. Prevalence of antibodies of herpes simplex virus types 1 and 2 in pregnant women, and estimated rates of infection. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 43:53-60

Avšič Županc T., 1998. Posredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S., Avšič Županc T., Drinovec B., Marin J., Poljak M. Ljubljana, Medicinski razgledi: 119-128

Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. 1998. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical microbiology. 21st ed. Connecticut, Appleton & Lange, 357-358, 358-396

Brown Z.A., Benedetti J., Ashley R., Burchett S., Selke S., Berry S. 1991. Neonatal herpes simplex virus infection in relation to asymptomatic maternal infection at the time of labor. *New England Journal of Medicine*, 324: 1247-1252

Brown Z.A., Selke S., Zeh J., Kopelman J., Maslow A., Ashley R., Watts H., Berry S., Herd M., Corey L. 1997. The acquisition of herpes simplex during pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 337:509-515

Campadelli-Fiume G. 2001. Molecular basis of herpes simplex virus penetration into cells and control of virus-induced fusion. Bologna, *Experimental evolutionary biology*. (april 2001)

<http://www.dipartimentobiologia.it/doctoraltraining/campadelli.htm> (marec 2006): 2 str.

Cann A.J. 2001. Principles of molecular virology. 3rd ed. London, Academic Press, 72-74

Christenson B., Böttiger M., Svensson A., Jeansson S. 1992. A 15 year surveillance study of antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 in a cohort of young girls. *Journal of Infections*, 25:147-54

Davidovici B. B., Green M., Marouni M. J., Bassal R., Pimenta J. M., Cohen D. 2006. Seroprevalence of herpes simplex virus 1 and 2 and correlates of infection in Israel. *Journal of Infection*, v tisku

Enders G., Risse B., Zauke M., Bolley I., Knotek F. 1998. Seroprevalence study of herpes simplex virus type 2 among pregnant women in Germany using a type-specific immunoassay. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 18:870-872

Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezní v Sloveniji v letu 2004. 2005. Ljubljana, 2005, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije; Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 46-56

<http://www.ivz.rs.si>

Erickson J. 2005. A possible case of Lyme disease. Scarborough, Foundation for Blood Research. (december 2005).

<http://www.fbr.org/swkswweb/immunolymeoutline.html> (december 2005): 2 str.

Fleming D.T., McQuillan G.M., Johnson R.E. 1997. Herpes simplex virus type 2 in the United states, 1976 to 1994. *New England Journal of Medicine*, 337:1105-1111

Garland S.M. 1992. Neonatal herpes simplex: Royal Women's Hospital 10-year experience with management guidelines for herpes in pregnancy. *Australian & New Zeland Journal of Obstetrics & Gynaecology* , 32:331-334

Gaytant M., Steegers E.A., van Cromvoirt P.L., Semmekrot B.A., Galama J.M. 2000. Incidence of herpes neonatorum in Netherlands. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 144, 38:1832-1836

Gil A., González A., Dal-Ré R., Ortega P., Dominguez V. 1998. Prevalence of antibodies against *Varicella zoster*, *Herpes simplex* (Types 1 and 2), Hepatitis B and Hepatitis A viruses among Spanish adolescents. *Journal of Infection*, 36:53-56

Hall S.M., Glickman M. 1992. Report from the British pediatric surveillance unit. *Archives of Disease in Childhood*, 65:807-809

Halioua B., Malkin J.E. 1999. Epidemiology of genital herpes-recent advances. *European Journal of Dermatology*, 9:177-184

Henderson M. 2001. Ionic contra viral therapy. Birmingham, Metropolitan house. (november 2001).

http://www.henderson-morley.com/main/scientific_programme.html (marec 2006): 1 str.

Hunt R. 2004. Microbiology and immunology on – line. South Carolina, University of South Carolina. (november 2004)

<http://pathmicro.med.sc.edu/virol/herpes.htm> (december 2005): 5 str.

Inoda S., Wakakura M., Hirata J., Nakazato N., Toyo-Oka Y. 2001. Stromal keratitis and anterior uveitis due to herpes simplex virus-2 in a young child. *Japan Journal of Ophthalmology*, 45: 618-621

Jerome K. R., Ashley R.L. 2003. Herpes simplex viruses and herpes B virus. V: Manual of clinical microbiology. Murray P., Tenenbaum B.C., Tenenbaum B.C., Tenenbaum B.C., Tenenbaum B.C. (eds.). Washington, ASM Press: 1291-1303

Jones C. 2003. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 79-95

Lachmann R. 2003. Organisation of the Herpes simplex virus type 1 genome, showing the origin or latency-associated transcripts. Cambridge, Cambridge University Press. (december 2003)

<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/03007002h.htm> (marec 2006): 1 str.

Liesegang T.J. 2001. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea*, 20, 1: 1-13

Malkin J.E., Beumont M.G. 1999. Herpes simplex virus infection in pregnancy. *Herpes*, 6, 2: 50-53

Malm G., Berg U., Forsgreen M. 1995. Neonatal herpes simplex: clinical findings and outcome in relation to type of maternal infection. *Acta Paediatrica*, 84:256-260

Marin J. 1998. Neposredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S., Avšič Županc T., Drinovec B., Marin J., Poljak M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 109-128

Mims C.A., Dockrell H.M., Goering R.V., Roitt I., Wakelin D., Zuckerman M. 2004. *Medical microbiology*. 3rd ed. Edinburgh; New York, Mosby: 513-538

Mindel A. 1996. Psychological and psychosexual implications of herpes simplex virus infections. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Suppl.* 100:27-32

Mindel A., Taylor J., Tideman R.L., Seifert C., Berry G., Wagner K., Page J., Marks C., Trudinger B., Cunningham A. 2000. Neonatal herpes prevention: a minor public health problem in some communities. *Sexually Transmitted Infections*, 76:287-291

Morfin F., Thouvenot D. 2002. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *Journal of Clinical Virology*, 26: 29-37

Munch M., Hvas J., Christensen T., Haar S. 1998. A single subtype of EBV in members of multiple sclerosis clusters. *Acta Neurologica Scandinavica*, 98:395-399

Müller F.-M.C., Hoppe J.E., Wirsing von König C.-H. 1997. Laboratory diagnosis of pertussis: State of the art in 1997. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 10: 2435-2443

Nahmias A.L., Keyserling H.L., Lee F.K. 1989. Herpes simplex viruses 1 and 2. V: Evans A.S. (ed.). *Viral infections of humans: Epidemiology and control*. 3rd ed. New York, Plenum Press: 393-417

Nilsen A., Myrmet H. 2000. Changing trends in genital herpes simplex infection in Bergen, Norway. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 79,8:693-696

Pebody R.G., Andrews N., Brown D., Gopal R., de Melker H., Francois G., Gatcheva N., Hellenbrand W., Jokinen S., Klavs I., Kojouharova M., Kortbeek T., Kriz B., Prosenc K., Roubalova K., Teocharov P., Thierfelder W., Valle M., Van Damme P., Vranckx R. 2004. The seroepidemiology of herpes simplex virus type 1 and 2 in Europe. *Sexually Transmitted Infections*, 80:185-191

Perng G.-C., Slainina S.M., Yukht A., Drolet B.S., Keleher W., Ghiasi H., Nesburn A.B., Wechsler S.L. 1999. A Herpes Simplex virus type 1 latency-associated transcript mutant with increased virulence and reduced spontaneous reactivation. *Journal of Virology*, 73:920-929

Poljak M. 1998. Molekularno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S., Avšič Županc T., Drinovec B., Marin J., Poljak M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 129-142

Prosenc K., Klavs I., Marinič Fišer N., Grgič Vitek M. 2002. Seroepidemiološka študija prekuženosti nosečnic z virusoma herpesa simpleksa tipa 1 in 2 v Sloveniji. V: 3. slovenski kongres preventivne medicine, Ljubljana, 17.-22. maj 2002. Knjiga izvlečkov. Ljubljana, Sekcija za preventivno medicino Slovenskega zdravniškega društva: 134 str.

Roizmann B., desRosiers RC, Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C., Studdert M.J. 1992. The family Herpesviridae: An update. *Archives of Virology*, 123:425-449

Samra Z., Scherf E., Dan M. 2003. Herpes simplex virus type 1 is the prevailing cause of genital herpes in the Tel Aviv area, Israel. *Sexually Transmitted Diseases*, 30:794-796

Singleton P., Sainsbury D. 2001. *Dictionary of microbiology and molecular biology*. 3rd ed. Chichester, Wiley: 366-366

Spruance S.L. 1992. The natural history of recurrent oral-facial herpes simplex virus infection. *Seminars in Dermatology*, 11,3:200-206

Straus S.E. 2000. Introduction to Herpesviridae. V: Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (eds.) Philadelphia, Churchill Livingstone:1557-1564

Tookey P., Peckham C.S. 1996. Neonatal herpes simplex virus infection in the British Isles. *Pediatric and Perinatal Epidemiology*, 10:432-42.

Vozelj M. 2000. *Temelji imunologije*. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 551 str.

Vyse A.J., Gay N.J. 2000. The burden of infection with HSV-1 and HSV-2 in England and Wales: implication for the changing epidemiology of genital herpes. *Sex Transmission Infections*, 76:183-187

Wald A. 1999. New therapies and prevention strategies for genital herpes. *Clinical Infectious Diseases*, 28,Suppl. 1:S4-S13

White O.D., Fenner F.J. 1994. *Medical virology*. 4th ed. San Diego, Academic Press: 205-207, 317-330

Whitley R.J., Roizman B. 2001. Herpes simplex virus infections. *Lancet*, 357: 1513-1518

Wiedbrauk D.L., Johnston S.L.G. 1993. *Manual of clinical virology*. 7th ed. New York, Raven Press: 96-96

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Jožici Marin se iskreno zahvaljujem za ves trud pri izdelavi diplomskega dela.

Najlepša hvala mag. Katarini Prosenc Trilar za strokovno pomoč in vodenje ter koristne nasvete in spodbude pri izdelavi diplomske naloge. Hvala za vso pozitivno energijo in lepe trenutke, ki sem jih preživela na Inštitutu.

Za recenzijo diplomske naloge se zahvaljujem prof. dr. Jerneju Logarju.

Za pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem Damjani, Heleni in Mariji, ki so mi pomagale, ko je bilo potrebno.

Največja zahvala velja mojim staršem, ki so mi študij omogočili in me ves čas spodbujali.