

**DIE TOEPASSING VAN 'N POLIMERASE KETTINGREAKSIE OP  
SEREBROSPINALE VOG VIR DIE VROEë DIAGNOSE VAN  
HERPES SIMPLEX ENKEFALITIS**

deur

**HEILIE MARTHINA MAGDALENA VISAGIE**

Verhandeling voorgelê ter vervulling van die vereistes vir die

**NASIONALE MEESTERS DIPLOMA:  
GENEESKUNDIGE TEGNOLOGIE**

in die

Fakulteit Toegepaste Wetenskap  
(Departement Paramediese Wetenskappe)  
Technikon van die Oranje-Vrystaat  
Bloemfontein

1993

**STUDIELEIER:** Prof M.S. Smith

**MEDESTUDIELEIER:** Dr J.G. Barnard

**MEDESTUDIELEIER:** Prof G.H.J. Pretorius

Ek verklaar dat hierdie verhandeling wat hierby vir die Meestersdiploma in Geneeskundige Tegnologie aan die Technikon van die Oranje-Vrystaat deur my ingedien word, my selfstandige werk is en nie voorheen deur my vir 'n kwalifikasie by 'n ander tersiêre instelling ingedien is nie.



HMM Visagie

Bloemfontein

November 1993

Ek verklaar dat hierdie verhandeling wat hierby vir die Meestersdiploma in Geneeskundige Tegnologie aan die Technikon van die Oranje-Vrystaat deur my ingedien word, my selfstandige werk is en nie voorheen deur my vir 'n kwalifikasie by 'n ander tersiêre instelling ingedien is nie.



HMM Visagie

Bloemfontein

November 1993



# INHOUDSOPGAWE

---

	<b>BLADSY</b>
<b>BEDANKINGS</b>	i
<b>LYS VAN FIGURE</b>	iii
<b>LYS VAN TABELLE</b>	iv
<b>LYS VAN BELANGRIKE AFKORTINGS</b>	v
<b>HOOFSTUK 1 INLEIDING</b>	<b>1</b>
1.1 DOEL VAN DIE STUDIE	3
<b>HOOFSTUK 2 LITERATUUROORSIG</b>	<b>4</b>
2.1 HERPES SIMPLEX	4
2.1.1 Herpes simplexvirus	4
2.1.1.1 Klassifikasie	4
2.1.1.2 Argitektuur en chemiese samestelling	5
2.1.1.3 Biologiese eienskappe	10
2.1.1.4 Patogenese	11
2.2 HERPES SIMPLEX ENKEFALITIS	14
2.2.1 Epidemiologie	14
2.2.2 Kliniese manifestasie	15
2.2.3 Patogenese	18
2.2.4 Patologie	19
2.2.5 Kliniese patologie	20
2.2.6 Voorkoming	21
2.2.7 Behandeling	23
2.3 HUIDIGE LABORATORIUMMETODES EN TEGNIEKE VIR DIE DIAGNOSE VAN HERPES SIMPLEX ENKEFALITIS	 24
2.3.1 Aantoon van virus in breinweefsel	24

2.3.2	Aantoon van virus en virus antiliggame in serebrospinale vog	26
2.3.3	Elektroënkefalogram	29
2.3.4	Skanderingstegnieke	30
2.3.4.1	Breinperfusie enkelfoton-emissie rekenaartomografie	30
2.3.4.2	Rekenaartomografie	31
2.3.4.3	Magnetiese resonansie	32
2.3.4.4	Radionuklied afbeelding en serebrale angiografie	33
2.4	NUWE DIAGNOSTIESE METODE VIR HERPES SIMPLEX ENKEFALITIS	34
2.4.1	Die polimerase kettingreaksie	34
2.4.1.1	Meganisme van die polimerase kettingreaksie	34
	<b>HOOFSTUK 3 MATERIALE EN METODES</b>	41
3.1	PASIËNT MONSTERS	41
3.2	KONTROLE MONSTERS	42
3.3	PLAAKESAI VAN HERPES SIMPLEXVIRUS TIPE 1 EN 2	44
3.3.1	Die plaakessai	44
3.4	VOORBEREIDING VAN SSV EN KONTROLE MONSTERS VIR DIE POLIMERASE KETTINGREAKSIE	47
3.4.1	Metode vir voorbereiding	48
3.5	OLIGONUKLEOTIED PEILER EN INLEIERS	49
3.6	DIE POLIMERASE KETTINGREAKSIE	51
3.6.1	Metode vir die polimerase kettingreaksie	51
3.6.2	Voorsorgmaatreëls om sensitiwiteit en spesifisiteit van die polimerase kettingreaksie te verseker en kontaminasie te verhoed	52

3.7	ANALISE VAN GEAMPLIFISEERDE PRODUKTE	53
3.7.1	Agarose jel elektroforese	53
3.7.1.1	Vorbereiding van agarose jel	54
3.7.1.2	Elektroforese toestande	55
3.7.2	Southern klad	56
3.7.2.1	Metode vir oordrag	57
3.7.3	Merking van peiler met digoxigenin dideoksie-uridien trifosfaat	59
3.7.3.1	Metode vir merking	60
3.7.4	Hibridisasie van die digoxigenin-gemerkte peiler	61
3.7.4.1	Metode vir hibridisasie	61
3.7.5	Serologiese aantoon van hibried molekules	62
3.7.5.1	Metode vir serologiese reaksie	62
	<b>HOOFSTUK 4 RESULTATE</b>	64
4.1	TIPERING VAN HSV	64
4.2	ANALISE VAN DIE SENSITWITEIT EN SPESIFISITEIT VAN DIE POLIMERASE KETTINGREAKSIE	65
4.3	AANTOON EN TIPERING VAN HSV IN SSV	65
	<b>HOOFSTUK 5 BESPREKING</b>	68
5.1	AANBEVELINGS	73
	<b>OPSOMMING</b>	74
	<b>SUMMARY</b>	77
	<b>BYLAAG</b>	79
	<b>VERWYSINGS</b>	87

# BEDANKINGS

---

*My opregte dank en waardering aan die volgende persone:*

*Prof M.S. Smith vir sy geduld, ondersteuning en leiding gedurende die studie en die versorging van hierdie verhandeling;*

*Dr J.G. Barnard vir sy leiding, advies en versorging van hierdie verhandeling;*

*Prof G.H.J. Pretorius vir sy leiding, advies en versorging van hierdie verhandeling;*

*Al die personeel van die departement Molekulêre Biologie vir hul onbaatsugtige hulp, geduld en tyd met die aanleer en uitvoer van tegnieke, sonder wie se hulp hierdie studie nie moontlik sou wees nie;*

*Dr S. de Lange en Dr T. Nel vir hul hulp met die insameling van pasiëntmonsters en pasiëntinligting;*

*Al die personeel van die afdeling Virologie vir hul geduld tydens die studie, belangstelling in die studie en hulp tydens die uitvoer van sommige tegnieke;*

*Die Technikon van die Oranje-Vrystaat, vir die geleentheid om die studie te onderneem;*

*Die Stigting vir Poliomiëlitisnavorsing vir finansiële steun tydens die uitvoer van die studie;*

*My ouers, skoonouers en vriende vir hul belangstelling en aanmoediging tydens die studie;*

*My man, KOBUS, vir sy wonderlike geduld, ondersteuning en voortdurende aanmoediging tydens die hele studie;*

*Aan my Skepper, wat dit vir my moontlik gemaak het om hierdie werk te voltooi en so baie in die proses te leer.*

*HMM Visagie*

HMM Visagie

Bloemfontein

November 1993



# LYS VAN FIGURE

---

	<b>BLADSY</b>
<b>Figuur 2.1</b>	'n Geïdealiseerde illustrasie van die herpesvirus virion 6
<b>Figuur 2.2</b>	Elektronmikrograwe van HSV-1 partikels. (a) Volledige virion met omhulsel. (b) Naakte partikels met ontblote kapsiede 7
<b>Figuur 2.3</b>	Die eerste rondte van die PKR 36
<b>Figuur 2.4</b>	Produkte teen die einde van die inisiële PKR siklusse 39
<b>Figuur 3.1</b>	Basisvolgordes en plasings van die peiler en inleiers. Interne peiler HSVP3 en opstroom inleier DNAP5 is geselekteer van die gebiede waar HSV-1 en HSV-2 identies was. Afstroom inleiers is geselekteer van die gebiede waar die basisvolgordes verskillend tussen HSV-1 en HSV-2 was. 'n <i>Kol</i> dui die verskil tussen HSV-1 en HSV-2 aan. 'n <i>Pyl</i> dui die punt waar 'n weglating van drie nukleotiede in HSV-1 voorkom, aan 50
<b>Figuur 3.2</b>	Southern klad 58
<b>Figuur 3.3</b>	Die merking van die peiler met DIG-ddUTP en die serologiese aantoon van hibried molekules 59
<b>Figuur 4.1</b>	Tipering van HSV deur middel van die PKR; agarose jel analise van geamplifiseerde produkte 64
<b>Figuur 4.2</b>	(a), (b) Sensitiwiteit en spesifisiteit van die PKR. (a) Agarose jel analise van geamplifiseerde produkte. (b) Southern klad analise van dieselfde monsters 66

# LYS VAN TABELLE

---

	<b>BLADSY</b>
<b>Tabel 2.1</b> Kliniese beeld in pasiënte met biopsie-bevestigde HSE	16
<b>Tabel 2.2</b> Geïdentifiseerde siektes wat HSE naboots	18

# LYS VAN BELANGRIKE AFKORTINGS

---

<b>ACV</b>	asiklovir
<b>anti-DIG-AP</b>	anti-digoxigenin alkaliese fosfatase
<b>bp</b>	basispaar/basispare
<b>C</b>	sitosien
<b>C3b</b>	komplement komponent 3b
<b>CCID<sub>50</sub></b>	50% selkultuur infektiewe dosis
<b>ddUTP</b>	dideoksie-uridien trifosfaat
<b>DIG</b>	digoxigenin
<b>DIG-ddUTP</b>	digoxigenin dideoksie-uridien trifosfaat
<b>DNA</b>	deoksiribonukleïensuur
<b>dNTP</b>	deoksiribonukleotied trifosfaat
<b>dsDNA</b>	dubbelstring DNA
<b>dUTPase</b>	deoksie-uridien trifosfatase
<b>EBV</b>	Epstein-Barrvirus
<b>EDTA</b>	etileendiamientetra-asynsuur
<b>EEG</b>	elektroënkefalogram
<b>ELISA</b>	ensiem-gekoppelde immunosorbent essai
<b>EM</b>	elektronmikroskopie
<b>esDNA</b>	enkelstring DNA
<b>Fc</b>	kristaliseerbare fragment van IgG
<b>FITC</b>	fluoressien isotiosianaat
<b>G</b>	guanien
<b>gB</b>	glikoproteïen B
<b>gC</b>	glikoproteïen C



<b>gD</b>	glikoproteïen D
<b>gE</b>	glikoproteïen E
<b>gG</b>	glikoproteïen G
<b>gH</b>	glikoproteïen H
<b>gI</b>	glikoproteïen I
<b>gJ</b>	glikoproteïen J
<b>HF</b>	menslike fibroblaste
<b>HIV</b>	menslike immuungebrekvirus
<b>HM-PAO</b>	hexametil-propileenamienoksiem
<b>HSV</b>	herpes simplexvirus
<b>HSE</b>	herpes simplex enkefalitis
<b>HSV-1</b>	herpes simplexvirus tipe 1
<b>HSV-2</b>	herpes simplexvirus tipe 2
<b>ICP4</b>	geïnfekteerde selproteïen 4
<b>IEF</b>	isoëlektriese fokusering
<b>IgG</b>	immunoglobulien G
<b>IgM</b>	immunoglobulien M
<b>IMP</b>	iodofentamien
<b>KBT</b>	komplementbindingtoets
<b>kb</b>	kilobasisse
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>MHV6</b>	menslike herpesvirus 6
<b>MR</b>	magnetiese resonansie
<b>MSMV</b>	menslike sitomegaalvirus
<b>NBT</b>	nitroblou tetrazolium
<b>nt</b>	nukleotied/nukleotiede
<b>PFE</b>	plaakvormende eenhede
<b>PKR</b>	polimerase kettingreaksie

<b>RIA</b>	radio-immuunessai
<b>RT</b>	rekenaartomogram
<b>SMV</b>	sitomegaalvirus
<b>SPECT</b>	enkelfoton-emissie rekenaartomografie
<b>SSS</b>	sentrale senuweestelsel
<b>SSV</b>	serebrospinale vog
<b>UV</b>	ultraviolet
<b>VIGS</b>	verworwe immuungebreksindroom
<b>VZV</b>	varicella-zostervirus
<b>X-fosfaat</b>	5-bromo-4-chloro-3-indoliel fosfaat

# HOOFSTUK 1

---

## INLEIDING

Herpes simplexvirus (HSV) is een van die mees algemene virale agente verantwoordelik vir erge nekrotiserende enkefalitis (herpes simplex enkefalitis [HSE]) by die mens. Die tipiese kliniese verloop word gekenmerk deur 'n febrile, influensa-agtige siekte gevolg deur serebrale verlamming met neurologiese versakings (Pohl-Koppe *et al.*, 1992).

Sonder spesifieke antivirale terapie kan die mortaliteit van HSE so hoog as 70% wees. Die prognose van erge HSE het baie verbeter met die ontwikkeling van 'n effektiewe antivirale middel, asiklovir (ACV), en het die mortaliteit geassosieer met HSE tot tussen 20% en 30% verlaag. Die middel behoort egter vroeg in die siekte (Rozenberg & Lebon, 1991) net na die begin van neurologiese simptome toegedien te word (Klapper *et al.*, 1990). Vir die effektiewe toepassing van antivirale chemoterapie en die kliniese hantering van HSE is die vroeë en spesifieke diagnose van die siekte dus baie belangrik (Klapper *et al.*, 1990).

Dit is egter moeilik om HSE klinies te diagnoseer aangesien ander siektes (byvoorbeeld, Epstein-Barrvirus enkefalitis, togavirus enkefalitis en tuberkulose meningitis) dieselfde beeld kan toon (Rowley *et al.*, 1990). Elektroënkefalogram (EEG) ondersoek (Nahmias *et al.*, 1982) en rekenaartomogram (RT) skanderings mag normaal wees in die vroeë stadiums van die siekte (Launes *et al.*, 1988). Abnormaliteite wat deur middel van hierdie tegnieke waargeneem word mag ook nie-spesifiek vir HSE wees (Whitley, 1990b) en word nie beskou as 'n spesifieke

diagnostiese hulpmiddel nie.

Die mees betroubare vroeë diagnostiese tegniek is die isolasie van HSV en/of die aantoon van virale antigeen in breinweefsel. Dit is egter nie die metode van keuse nie aangesien dit die uitvoer van 'n breinbiopsie noodsaak. Dit is 'n indringende prosedure met potensiële risiko's en kan die toediening van antivirale terapie vertraag (Klapper *et al.*, 1990).

Pogings om infektiewe HSV vanuit serebrospinale vog (SSV) deur middel van selkulture te isoleer of om virale antigeen deur middel van die ensiem-gekoppelde immunosorbent essai (ELISA) aan te toon is selde suksesvol (Pohl-Koppe *et al.*, 1992). Serologiese diagnostiese prosedures is gebaseer op die aantoon van HSV spesifieke antiliggame in serum en SSV. Die bepaling van intratekaal-geïntetiseerde virus-spesifieke antiliggame deur gebruik te maak van 'n sensitiewe ELISA of deur Westerse klade het tot hede die beste resultate gelever. Maar aangesien 'n virus-spesifieke humorale immuunrespons redelik laat in die verloop van die siekte ontwikkel, is 'n betroubare en sensitiewe antigeen aantoon-metode belangrik vir die vroeë diagnose van HSE (Pohl-Koppe *et al.*, 1992).

Die polimerase kettingreaksie (PKR) is 'n aantreklike nuwe tegniek vir die aantoon van virus deoksiribonukleïensuur (DNA) en infektiewe virus word nie benodig nie (Kimura *et al.*, 1990). Die PKR is in effek soortgelyk aan die "groei" van virus, en is daarom veral bruikbaar vir virusse wat andersins nie in die laboratorium gekweek kan word nie (Schoub, 1992).

Die PKR maak dit dus moontlik om die genoom van 'n virus, vinniger as enige selkultuur en baie serologiese tegnieke, te amplifiseer (Schoub, 1992). Sodoende kan genoegsame genetiese materiaal vir diagnostiese doeleindes verkry word. Tipe-



spesifieke inleiers kan gebruik word om die tipe van infekterende virus te identifiseer. Die PKR is reeds met groot sukses op verskeie virusse toegepas (Erlich, 1989; Innis *et al.*, 1990), toon om baie spesifiek en sensitief te wees en bied 'n moontlik alternatiewe prosedure vir die vroeë en nie-indringende diagnose van HSE.

### **1.1 DOEL VAN DIE STUDIE**

Aangesien die basisvolgordes van herpes simplexvirus tipe 1 (HSV-1) en herpes simplexvirus tipe 2 (HSV-2) DNA bekend is, kan gebiede van hierdie genome, deur die gebruik van geskikte gesintetiseerde oligonukleotied inleiers, geamplifiseer word. In hierdie studie is gebruik gemaak van drie gesintetiseerde inleiers vanuit die DNA polimerase geen van HSV-1 en HSV-2. Deur al drie die inleiers by die reaksiemengsel te voeg is dit moontlik om vir die teenwoordigheid van beide HSV-1 en HSV-2 DNA te toets.

Die PKR is aangepas en op die SSV van pasiënte met reeds bevestigde HSE en op pasiënte met moontlike HSE toegepas. Die doel van die studie was dus om die teenwoordigheid van HSV-1 en HSV-2 DNA in die SSV van pasiënte met moontlike HSE te bepaal.

# HOOFSTUK 2

---

## LITERATUUROORSIG

### 2.1 HERPES SIMPLEX

Herpes simplex is 'n kliniese beskrywing vir 'n vesikulêre uitslag (Longson, 1990). Die woord "herpes" (Grieks) verwys na die kruipende, kronkelende verspreiding van die herpes uitslag (Whitley, 1990a).

#### 2.1.1 Herpes simplexvirus

Daar kom ongeveer 100 herpesvirusse in die natuur voor. Die etiologiese agent van herpes simplex is HSV. HSV tesame met varicella-zostervirus (VZV), sitomegaalvirus (SMV), Epstein-Barrvirus (EBV), menslike herpesvirus 6 (McKendall, 1989; Roizman, 1990) en menslike herpesvirus 7 (Frenkel *et al.*, 1990; Roizman, 1991), vorm die groep van menslike herpesvirusse (Roizman, 1990).

##### 2.1.1.1 Klassifikasie

Die herpesvirusse behoort aan die familie *Herpetoviridae* en is op grond van hul biologiese eienskappe in drie subfamilies onderverdeel: die *Alphaherpesvirinae*, die *Betaherpesvirinae* en die *Gammaherpesvirinae* (White & Fenner, 1986; Longson, 1990; Roizman, 1990; Roizman, 1991).

Lede van die *Alphaherpesvirinae* subfamilie word geklassifiseer op grond van hul verskeidenheid van gasheerreëse, relatief kort reprodutiewe siklus, vinnige sel-tot-sel verspreiding in selkulture, effektiewe afbreek van geïnfekteerde selle en die vermoë om 'n latente infeksie in die neuronale weefsels te veroorsaak. HSV-1 en

HSV-2 behoort aan hierdie subfamilie en aan die genus *Simplexvirus* (Roizman, 1991).

### 2.1.1.2 Argitektuur en chemiese samestelling

HSV bestaan uit vier basiese komponente (figuur 2.1):

#### *Die kern*

Die kern van die volwasse virion bevat die HSV DNA in die vorm van 'n ring (toroïed). In sommige herpesvirione omring die DNA die fibreuse spoelagtige kern, wat uit histone saamgestel is. Die fibrille is aan die onderkant van die omringende kapsied vasgeheg en beweeg deur die holte van die ring (White & Fenner, 1986; Roizman, 1990; Roizman, 1991).

#### *Die kapsied*

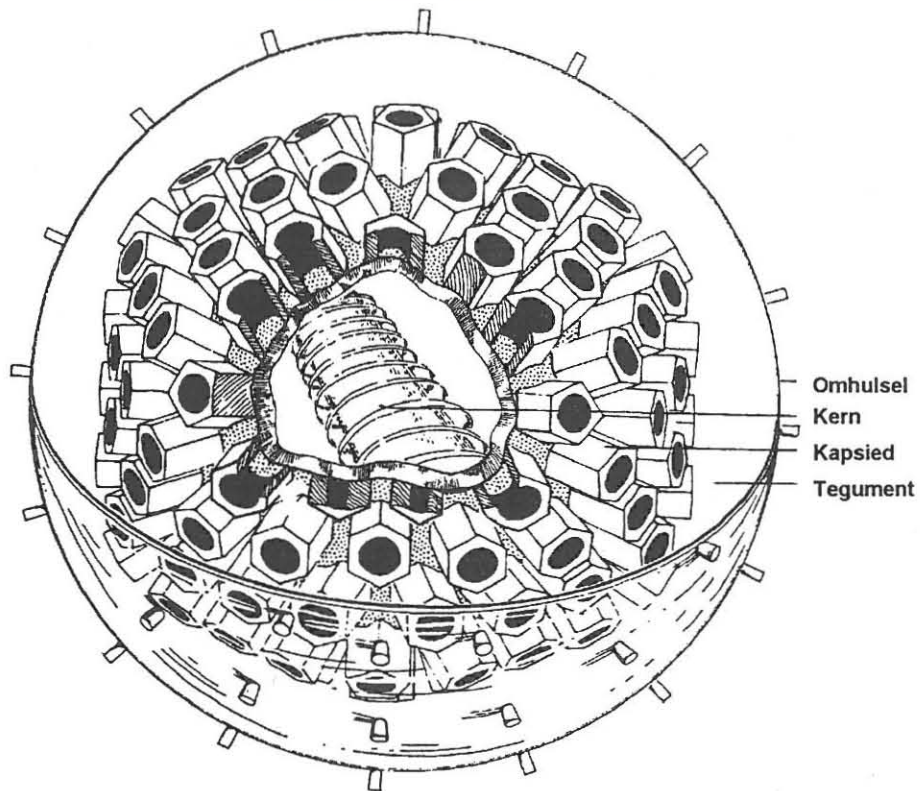
Die kapsied is 'n ikosahedron, 100 nm in deursnee en saamgestel uit 162 proteïenkomplekse of kapsomere (Roizman, 1991) waarvan 150 heksameriese en 12 pentameriese proteïensubeenhede is (figuur 2.2b) (White & Fenner, 1986).

#### *Die tegument*

Die *tegument* omskryf die laag proteïenstrukture tussen die kapsied en die omhulsel. Die tegument is asimmetries gerangskik en die dikte of hoeveelheid daarvan varieer afhangende van die setel van die virion in die geïnfekteerde sel (Roizman, 1990).

#### *Die omhulsel*

Die tegument word deur 'n lipiedomhulsel omring (figuur 2.2a). Die omhulsel is lospassend en tesame met die wisseling in dikte van die tegument dra dit tot die wisseling in deursnee van die virion by wat ongeveer tussen 120 nm en 300 nm is (Roizman, 1990).



**Figuur 2.1 'n Geïdealiseerde illustrasie van die herpesvirus virion (Longson, 1990)**

Die herpesvirus se omhysel is vanaf sellulêre membrane afkomstig (Roizman, 1991). Buite op die omhysel kom uitsteeksels, 5 nm uit mekaar en tot 24 nm in lengte, wat uit virusgekodeerde glikoproteïene bestaan, voor (figuur 2.1) (Longson, 1990).

#### *Chemiese samestelling*

HSV is uit 60% tot 80% proteïene, 20% tot 25% fosfolipiede, 6% tot 7% DNA, en 1,5% suikers saamgestel. Die lipiede is tot die virus omhysel beperk (Longson, 1990).

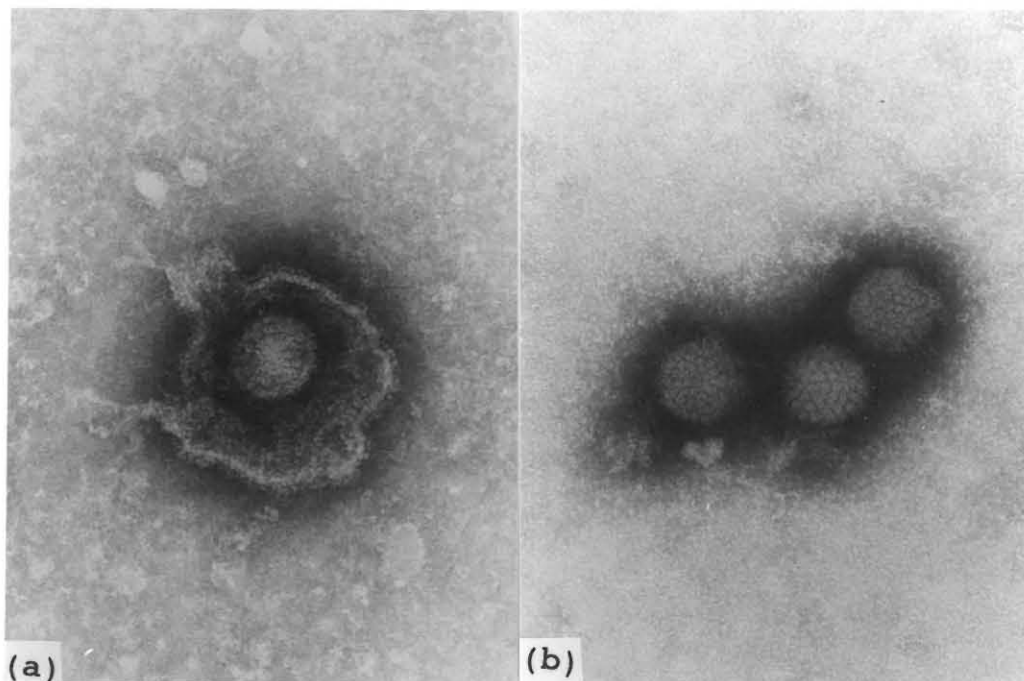
Daar is ten minste 40 tot 50 strukturele polipeptiede; sommige mag voorlopers wees maar die meeste proteïene word geassosieer met die kapsied en is óf



polipeptiede óf fosfoproteïene. Agt van die proteïene is geglikosileer en kom op die omhulsel voor (Longson, 1990).

'n Onbekende aantal proteïene kom aan die binnekant van die omhulsel voor. Die kapsied bevat ongeveer tien proteïene. 'n Verdere tien tot 15 polipeptiede kom in die tegument, tussen die omhulsel en die kapsied, voor (Roizman, 1991).

Die agt glikoproteïene wat op die omhulsel van HSV-1 en HSV-2 voorkom staan as glikoproteïen B (gB), glikoproteïen C (gC), glikoproteïen D (gD), glikoproteïen E (gE), glikoproteïen G (gG), glikoproteïen H (gH), glikoproteïen I (gI) en glikoproteïen J (gJ) bekend. Die biologiese eienskappe van sommige van die glikoproteïene is bekend (Whitley, 1990a).



**Figuur 2.2** Elektronmikrograwe van HSV-1 partikels. (a) Volledige virion met omhulsel. (b) Naakte partikels met ontblote kapsiede (Longson, 1990)

Die gB en gD is belangrik vir infektiwiteit. Laasgenoemde word benodig vir die aanvanklike aanhegting aan die sel se plasmamembraan en is die belangrikste induseerder van neutraliserende antiliggame. Eersgenoemde word benodig vir die fusie van die omhulsel van die virus met die plasmamembraan. Die nukleokapsied word gevolglik in die sel se sitoplasma vrygestel (McKendall, 1989; Whitley, 1990a).

Die gC het die vermoë om met die komplement komponent 3b (C3b), wat by immuunaanhegting betrokke is, te bind. Die gE is 'n reseptor vir die kristaliseerbare fragment (Fc) van immunoglobulien G (IgG). Dit is onduidelik wat die voordeel van hierdie reseptorfunksies van gC en gE vir die virus is (McKendall, 1989; Whitley, 1990a).

Antiliggame teen gB, gC, en gE is neutraliserend en benodig soms die teenwoordigheid van komplement (McKendall, 1989).

Die gG voorsien antigeniese spesifisiteit aan HSV. Dit het 'n antiliggaam respons wat HSV-1 (gG-1) en HSV-2 (gG-2) van mekaar onderskei, tot gevolg (Whitley, 1990a).

Die gI, is moontlik saam met gE as Fc reseptor betrokke. Die rol van gJ is nog nie bekend nie (Whitley, 1990a).

Die oorblywende proteïene (nie-strukturele proteïene) is ensieme wat deur die virus gebruik word om verskeie intrasellulêre funksies wat nodig is vir die sintese van strukturele proteïene en die replikasie van toekomstige nukleïensuur uit te voer (McKendall, 1989).

Die nie-strukturele proteïene word in twee groepe ingedeel: regulatoriese proteïene

en ensieme benodig vir DNA replikasie (McKendall, 1989).

Die regulatoriese proteïene is meestal fosfoproteïene waarvan die belangrikste geïnfekteerde selproteïen 4 (ICP4) is. Dié proteïen bind aan DNA en is by transkripsie regulasie betrokke (McKendall, 1989).

Daar is ten minste ses nie-strukturele proteïene by DNA replikasie betrokke: alkaliese eksonuklease (82 kilodalton (kDa)), timidien kinase (43 kDa), 'n DNA bindings proteïen (127 kDa), DNA polimerase (145 kDa), ribonukleotied reduktase (148 en/of 38 kDa) en deoksipirimidien trifosfatase (molekulêre massa onbekend) (McKendall, 1989).

Die kapsied bestaan uit 'n groter strukturele proteïen van 155 kDa, verskeie proteïene van ongeveer 50 kDa elk, 'n 26 kDa proteïen en 'n 37 kDa proteïen (McKendall, 1989).

Die HSV DNA is lineêr en 'n dubbelstring DNA (dsDNA) nukleoproteïen kompleks. Die molekulêre massa van die DNA molekule van beide HSV-1 en HSV-2 is ongeveer 100 kDa en bestaan uit 150 kilobasisse (kb). Die guanien (G) en sitosien (C) inhoud van HSV-1 DNA is kenmerkend verskillend van dié van HSV-2 DNA, maar by beide is dit hoog (ongeveer 68%). Die genoom kan vir tot 50 000 aminosure of meer as 200 polipeptiede kodeer (Longson, 1990).

Daar is ongeveer 50% homologie in die basisvolgorde van HSV-1 en HSV-2 DNA. Die homologie sluit omtrent alle proteïene in, en sluit ook die gene wat vir die glikoproteïene kodeer in. Baie monoklonale antiligggame teen een serotipe sal dus die ander kruis-neutraliseer (McKendall, 1989).



### 2.1.1.3 Biologiese eienskappe

Volgens Roizman (1990) het die herpesvirusse vier kenmerkende biologiese eienskappe in gemeen:

- (a) alle herpesvirusse, dus ook HSV, kodeer vir 'n groot reeks ensieme betrokke by:
- **nukleïensuurmetabolisme**, byvoorbeeld timidien kinase, timidilaat sintetase, deoksie-uridien trifosfatase (dUTPase) en ribonukleotied reduktase,
  - **DNA-sintese**, byvoorbeeld DNA polimerase, helikase en primase,
  - moontlik die **prosessering van proteïene**, byvoorbeeld proteïen kinase.
- (b) beide die sintese van virus DNA en die samestelling van kapsiede geskied in die kern,
- (c) die produksie van infektiewe virus word vergesel deur onomkeerbare afbreek van die geïnfekteerde sel,
- (d) die herpesvirusse bly in hul natuurlike gasheer in selle latent. In selle waarin die virus latent is, neem die virale genoom die vorm van geslote sirkulêre molekules aan en slegs 'n klein aantal van virusgenome word uitgedruk (White & Fenner, 1986).

HSV besit 'n groot gasheerreëks, vermeerder effektief en vernietig die geïnfekteerde selle vinnig (Roizman, 1990).

HSV groei in kultuur in verskeie selle (menslike fibroblaste is veral geskik) en toon 'n waarneembare sitopatiesse effek na een tot vyf dae. HSV groei op die chorio-allantoïese membraan van hoendereiers met die produksie van klein wit pokke. HSV is ook patogenies vir laboratoriumdiere met gevolglike enkefalitis (Timbury,

1986).

HSV is termolabiel. In gewone media is die halfleeftyd van HSV teen 30°C tussen 90 minute en 14 ure. Die samestelling van die vloeistof is egter belangrik. In gedistilleerde water, in teenstelling met fisiologiese soutoplossings, neig die virus om meer stabiel te wees, veral teen baie koue (-70 tot -180°C) temperature (Longson, 1990).

Selvrye suspensies van infektiewe virus kan vir baie maande, selfs jare, in die volgende medium gestoor word: 'n bikarbonaat-vrye medium waarby 50% afgeroomde melk, of 50% gliserol, of 5% tot 10% fetale kalfserum, of 35% sorbitol voor verkoeling teen +4°C of -70°C (stabiliteit teen -20°C is onbetroubaar) gevoeg word. Alternatiewelik kan HSV suksesvol gevriesdroog word. HSV kan ook vir 'n onbepaalde tyd in vloeibare stikstof in dimetielsulfoksied gepreserveer word (Longson, 1990).

Eter in water (20%) en ander lipied oplosmiddels, soos 70% alkohol of chloroform, inaktiveer HSV volkome (Longson, 1990). Die meeste algemene ontsmettingsmiddels soos hipochloriet (Timbury, 1986), formaldehyd asook glutaraldehyd inaktiveer ook HSV. Ultraviolet (UV), X en gamma bestraling inaktiveer HSV (Longson, 1990).

#### **2.1.1.4 Patogenese**

Die mens is die enigste natuurlike gasheer van HSV (Longson, 1990). HSV infeksies kan in twee groepe verdeel word naamlik primêre en terugkerende infeksies. Primêre infeksies is dikwels asimptomaties wat verklaar waarom baie persone IgG antiliggame teen HSV het sonder dat die persoon ooit klinies met HSV gemanifesteer het. Vir individue wat toeganklik vir HSV-infeksies (seronegatiewe

persone) is, sal die eerste blootstelling aan HSV tot 'n primêre infeksie lei (Whitley, 1990a). Wanneer primêre infeksies egter klinies voorkom is dit gewoonlik meer ernstig as daaropvolgende opflikkerings by dieselfde setel (White & Fenner, 1986).

HSV het die vermoë om die immuunstelsel se werking te ontsnap en, sonder enige ooglopende skade aan die gasheer, lewenslank in sekere weefsel te persister. Geskikte toetse het die virus in ongeveer 50% van ewekansig-geselekteerde (gesonde) menslike trigeminale ganglia getoon en in 'n minder mate in servikale, sakrale en vagus ganglia, nieteenstaande die donor se herpetiese geskiedenis nie (Longson, 1990).

Die patogenese van HSV infeksies in die mens is afhanklik van persoonlike kontak tussen die ontvanklike persoon (seronegatiewe persoon) en 'n persoon wat HSV uitskei (Whitley, 1990a).

Die virus moet in kontak met die mukosale oppervlaktes of beskadigde vel kom voordat 'n infeksie ontstaan. Met virus-replikasie by die setel van infeksie word die intakte virion of die nukleokapsied in die neurone na die dorsale wortelganglia vervoer, waar ná nog 'n siklus van replikasie, die virus daarna latent bly (Whitley, 1990a).

Tydens die latente fase sal 'n toepaslike stimulus reaktivering van die virus veroorsaak; dit beweeg langs senuwees af en presenteer by mukokutane setels as velvesikels of mukosale ulkuse (Whitley, 1990a).

Reaktivering kan deur verskeie faktore veroorsaak word (Whitley, 1990a; Longson, 1990) byvoorbeeld, fisieke of emosionele stres, UV bestraling, koors, swangerskap, weefselbeskadiging, immuun-onderdrukkende medikasies (Whitley, 1990a),



menstruasie en infeksies (Longson, 1990).

By primêre infeksies is dit moontlik dat die virus verder as die dorsale wortelganglia kan versprei en sistemies presenteer byvoorbeeld, gedissemineerde neonatale HSV infeksie met multi-orgaan betrokkenheid, multi-orgaan aantasting in swanger vroue en gedissemineerde infeksie in pasiënte wat aansienlike immuun-onderdrukkende terapie ontvang (Whitley, 1990a).

Wydverspreide orgaan-betrokkendheid is die gevolg van 'n viremie in 'n gasheer wat nie die vermoë het om die replikasie van die virus tot die mukosale oppervlak te beperk nie (Whitley, 1990a).

HSV-1, wat gewoonlik beperk is tot die orofarinks, word oorgedra deur respiratoriese druppels of deur direkte kontak met 'n persoon wat geïnfecteerde sekresies uitskei. Dus vind aanvanklike replikasie van virus in die orofaringeale mukosa plaas. Die trigeminale ganglia word gelyktydig gekoloniseer en dien as setel vir latente virus (Whitley, 1990a).

HSV-2 infeksies is gewoonlik die gevolg van die oordrag van die virus via genitale roetes. Virus repliseer in die vaginale kanaal of op die vel van die penis met gevolglike latentheid in sakrale ganglia (Whitley, 1990a).

Die epidemiologiese en kliniese eienskappe van 'n primêre infeksie verskil van dié wat geassosieer word met 'n terugkerende of herinfeksie. Ná die vorming van 'n latente fase word die terugkeer van HSV as 'n geheraktiveerde of terugkerende infeksie beskou en staan ook as 'n endogene herinfeksie bekend. Hierdie vorm van infeksie kan tot herhalende vesikulêre velletsels soos herpes simplex labialis of herhalende herpes simplex genitalis lei (Whitley, 1990a).

Dit is moontlik dat indiwidue met antiliggame teen een serotipe HSV (byvoorbeeld HSV-1 of HSV-2) 'n eerste infeksie met die ander serotipe by 'n ander setel kan kry. Onder sulke omstandighede staan die infeksie as 'n inisiële infeksie eerder as 'n primêre infeksie bekend (Whitley, 1990a).

Herinfeksie met 'n ander stam van HSV kan ook plaasvind en staan as eksogene herinfeksie bekend (Whitley, 1990a).

## **2.2 HERPES SIMPLEX ENKEFALITIS**

Enkefalitis is 'n diffuse inflammatoriese proses in die brein (Whitley, 1990a), in hierdie geval met HSV as die veroorsakende agent.

### **2.2.1 Epidemiologie**

HSE is die mees algemene oorsaak van erge sporadiese enkefalitis by die mens en daar is geen seisoenale of geografiese variasie in die aantal gevalle nie (Jackson & Johnson, 1989). Ongeveer een derde van die gevalle ontwikkel in pasiënte jonger as 20 jaar en een helfte in pasiënte ouer as 50 jaar (Whitley, 1990b).

Die siekte skyn nie méér algemeen te wees in immuun-onderdrukte pasiënte nie, maar die voorkoms mag toenemend hoër wees in pasiënte wat geïnfekteer is met die menslike immuungebrekvirus (HIV) (Whitley, 1990b).

Pasiënte met beide HSE en orolabiale herpes simplex mag geïnfekteer wees met HSV-1 of HSV-2 (Whitley *et al.*, 1982). Enkefalitis mag die gevolg van 'n inisiële of primêre infeksie wees (met 'n nuwe eksogene blootstelling). Dit mag ook die gevolg van die aktivering van 'n latente infeksie, moontlik in assosiasie met 'n herinfeksie deur 'n tweede virus, wees (Jackson & Johnson, 1989).



'n Primêre infeksie met enkefalitis kom meer algemeen in jonger persone voor (gemiddelde ouderdom, 18 jaar), terwyl terugkerende of herinfeksies wat in enkefalitis uitloop, meer in ouer persone (gemiddelde ouderdom, 46 jaar) voorkom (Nahmias *et al.*, 1982).

HSV-1 veroorsaak enkefalitis meer dikwels as HSV-2. Dit gebeur waarskynlik omdat die nasofarinks meer gereeld deur HSV-1 as HSV-2 geïnfekteer word (Nahmias *et al.*, 1982).

### 2.2.2 Kliniese manifestasie

In volwassenes en ouer kinders presenteer HSE as 'n akute koorssiekte, geassosieer met tekens van beide fokale en diffuse neurologiese betrokkenheid. 'n Veranderde vlak van bewussyn, hoofpyn en gedragsverandering is van die mees algemene simptome. Afasie, hemiparese, kraniale sensuê-afwykings en fokale konvulsies is die mees algemene fokale tekens (tabel 2.1) (Rabinowitz, 1980; Jackson & Johnson, 1989; Whitley, 1990a, Whitley, 1990b).

Hierdie kliniese bevindings onderskei 'n pasiënt met enkefalitis van een met virus meningitis wat gewoonlik slegs met nekstyfheid, hoofpyn, fotofobie en koors presenteer (Whitley, 1990b). Die mortaliteit en morbiditeit in pasiënte met meningitis is baie laer as in pasiënte met enkefalitis (Rabinowitz, 1980).

Die verloop van die siekte wissel; dit mag vinnig ontwikkel en binne twee tot drie dae tot 'n koma lei of dit kan 'n meer subakute verloop hê. Sommige pasiënte herstel volkome, selfs in tye voordat antivirale chemoterapie gebruik is (McKendall, 1989).

**Tabel 2.1 Die kliniese beeld in pasiënte met biopsie-bevestigde HSE (McKendall, 1989)**

SIMPTOME	MORBIDITEIT(%)
Veranderde vlak van bewussyn	97
Koors	92
Gedragsverandering	85
Hoofpyn	81
Disfasie	76
Konvulsies	38
Fokale konvulsies	25
Hemiparese	38
Kraniale senuwee afwykings	32
Geheueverlies	24
Visuele veld verlies	14
Papiledoem	14

Daar is egter geen karakteristieke reekse van bevindings kenmerkend vir HSE nie. Dit varieer en is nie-spesifiek. Pasiënte wat egter, in die afwesigheid van ander oorsake, met die volgende simptome presenteer behoort hoogs verdag te wees: koors, 'n akute koorsagtige enkefalitis, wat verward is, progressiewe verswakte vlakke van bewussyn toon, wat 'n fokale motoriese afwyking of fokale of algemene konvulsie-aktiwiteit het, en wie 'n fokale EEG of RT skandering abnormaliteit toon, (DiSclafani *et al.*, 1981; Morawetz *et al.*, 1983).

Ander diagnostiese evaluasies moet onmiddellik uitgevoer word aangesien ander behandelbare en onbehandelbare siektes HSE kan naboots en 'n diagnose kan bemoeilik (tabel 2.2) (Whitley, 1990b). 'n Beduidende aantal pasiënte met HSE presenteer klinies met 'n beeld van verhoogde intrakraniale druk wat soortgelyk is aan die beeld wat deur 'n temporale lob tumor veroorsaak word (McKendall, 1989).

Die siekte in pasgeborenes verskil klinies van dié in ouer kinders en volwassenes. Neonatale HSV-2 infeksie kan transplasentaal opgedoen word, maar word meer

algemeen tydens kraam deur 'n geïnfecteerde geboortekanaal opgedoen (McKendall, 1989).

Neonatale HSV-1 word gewoonlik postnataal deur kontak met geïnfecteerde familieledede opgedoen waarvan baie die virus asimptomaties uitskei (McKendall, 1989).

Infeksie van die sentrale senuweestelsel (SSS) kan as 'n komponent van multi-orgaan gedissemineerde infeksie voorkom of slegs as enkefalitis mét of sonder betrokkenheid van die vel, oog en mond. Ongeveer een derde van alle babas met neonatale HSV infeksie het slegs die enkefalitis komponent van die siekte (Illis & Gostling, 1972).

Volwassenes met HSE het 'n swakker prognose as kinders, maar kinders tot en met twee maande se mortaliteit kan tot 100% wees. Dood as gevolg van HSE kan in enige stadium van die siekte intree, maar die mees algemene tyd is in die tweede week vanaf die begin van enkefalitis (Illis & Gostling, 1972).

Die oorsaak van dood is gewoonlik as gevolg van respiratoriese of hartversaking en tekens van verhoogde intrakraniale druk is gewoonlik teenwoordig (Illis & Gostling, 1972).

Die mees algemene nagevolge by pasiënte wat nie volkome herstel nie is 'n merkbare verandering in geheue of geheueverlies wat soms op die hele tydperk van die voorafgaande lewe van die pasiënt betrekking het (Illis & Gostling, 1972).



**Tabel 2.2** Geïdentifiseerde siektes wat HSE naboots (Whitley, 1990b; Whitley *et al.*, 1989).

BEHANDELBAAR	ONBEHANDELBAAR
<b>Infektief</b> <b>Absesse of subdurale empieem</b> <b>Bakterieë en Fungi</b> Tuberkulose Cryptococcus meningitis Rickettsia Toxoplasmose Mucormikose Meningococcale meningitis <b>Tumore</b> <b>Subdurale hematome</b> <b>Adrenale leukodistrofie</b> <b>Sistemiese lupus eritematose</b>	<b>Nie-viraal</b> Vaskulêre siekte Toksiese enkefalopatie Reye sindroom <b>Viraal</b> Togavirus infeksies Ander herpesvirsusse Epstein-Barrvirus Sitomegaalvirus Echovirus Influenza A Mumps Adenovirus <b>Progressiewe multifokale leukoënkefalopatie</b> <b>Limfositiese choriomeningitis</b> <b>Subakute skleroserende panenkefalitis</b>

### 2.2.3 Patogenese

HSV kan, afhangend van die tipe infeksie, deur drie moontlike roetes toegang tot die SSS verkry (Whitley, 1990a).

Tydens 'n primêre infeksie is direkte neuronale oordrag via óf die trigeminale óf olfaktoriese baan 'n moontlikheid. Inokulasie van die virus deur die olfaktoriese roete in diermodelle het 'n fokale enkefalitis, soortgelyk aan dié in mense, tot gevolg gehad (Whitley, 1990a). Hierdie roete van infeksie is waarskynlik die rede waarom HSE dikwels beskou word as 'n temporale lob sindroom, vanweë die toegang van die virus na die brein via die nasofarinks (Nahmias *et al.*, 1982).

Tydens 'n terugkerende of herinfeksie is die teenwoordigheid van 'n meer neurovirulente virus, wat die verhoogde moontlikheid van trans-sinaptiese verspreiding tot gevolg kan hê, 'n moontlikheid. Die direkte reaktivering van 'n

latente infeksie in die brein is ook 'n moontlikheid (Whitley, 1990a).

Die laaste roete is via die bloedstroom waardeur die grootste aantal enkefalitis-veroorsakende virusse toegang tot die SSS verkry. Dit is ook die mees aanvaarbare roete waardeur pasgeborens die infeksie opdoen (Illis & Gostling, 1972).

Virus wat deur die mond van pasiënte met HSE uitgeskei word mag identies wees met dié in die brein of die twee mag heeltemal van mekaar verskil. 'n Pasiënt kan dus gelyktydig met HSV-1 en HSV-2 geïnfekteer wees (Whitley, 1990a).

Daar is bevind dat ongeveer die helfte van pasiënte met HSE (bevestig deur 'n breinbiopsie en virusisolasië) moontlik 'n primêre infeksie, en die oorblywende pasiënte 'n terugkerende infeksie, opdoen (Nahmias *et al.*, 1982).

#### **2.2.4 Patologie**

Die kenmerkende patologiese respons in HSE bestaan uit inflammatoriese infiltrasie, mikrogliale hiperplasie en neuronale hiperplasie (Rabinowitz, 1980).

Perivaskulêre infiltrasie is algemeen. Vaskulêre veranderinge wat voorkom sluit die swelling van endoteel selle, nekrose van bloedvate, perivaskulêre bloeding en trombi in klein bloedvate in. Die vaskulêre veranderinge dra by tot die abnormale deurlaatbaarheid en veroorsaak die intense nekrose van senuweeweefsel wat kenmerkend van HSE is (Illis & Gostling, 1972; Rabinowitz, 1980).

Beide die grys- en witstof van die brein is geneig om aangetas te word deur 'n inflammatoriese proses gekenmerk deur 'n merkbare infiltrasie van fagositiese selle. In die akute stadium word die inflammatoriese infiltraat deur gesegmenteerde neutrofiële gekenmerk. Later, tydens die inflammatoriese proses, oorheers

limfosiete, mononukleêre selle en plasmasele (Rabinowitz, 1980).

Areas om die nekrotiese brein toon gewoonlik ook infiltrasie met mikroglia en astrosiete. Daar is gebiede wat die afsterf van senuweeselle toon. Die witstof toon edeem en in latere stadiums kan sistvorming ook teenwoordig wees (Illis & Gostling, 1972).

Die intensiteit van die inflammatoriese respons is beduidend laer met 'n terugkerende infeksie aangesien gasheerweerstand teenwoordig is en die invloed van mononukleêre selle in die geïnfekteerde weefsel aangetoon kan word (Whitley, 1990a).

Die patologie van HSV infeksie in neonate verskil van dié in volwassenes en groter kinders. Trombositopenie, hipoprotrombinemie en die gevolglike hemoragiese neiging is 'n algemene komplikasie van HSV infeksie in die pasgeborene. Hierdie afwykings en gedissemineerde intravaskulêre stolling kan vir noodlottige bloeding verantwoordelik wees (Illis & Gostling, 1972).

Herpes simplex viremie kan veral in premature pasgeborenes gedissemineerde nekrotiese letsels veroorsaak. Die lewer, biniere, milt, longe, esofagus, maag, niere, beenmurg, limfatiese sisteem en brein mag geaffekteer wees. Na die ouderdom van agt dae is die SSS die dominante setel van infeksie (Illis & Gostling, 1972).

### **2.2.5 Kliniese patologie**

#### *Perifere bloedbeeld*

In die meeste gevalle van HSE mag die bloedtelling 'n perifere leukositose toon (Illis & Gostling, 1972; Jackson & Johnson, 1989; McKendall, 1989).



### *Serebrospinale vog*

In die algemeen is daar 'n limfositose en 'n matige verhoging in die proteïenvlak. Glukosevlakke is gewoonlik normaal. Eritrosiete in die SSV is nie 'n ongewone verskynsel nie (Illis & Gostling, 1972; Jackson & Johnson, 1989; McKendall, 1989).

### **2.2.6 Voorkoming**

#### *Neonatale herpes simplex enkefalitis*

Neonatale HSV infeksie as 'n gevolg van genitale herpes by die moeder en die erge, soms noodlottige siekte wat by die pasgeborene kan volg, is rede vir die voorkoming van die infeksie.

ACV is die aangewese antivirale middel. Dit werk spesifiek teen HSV en is baie veilig maar kan kristalvorming in die niertubulus tot gevolg hê (weens lae oplosbaarheid) indien dit in oormaat toegedien word.

Die toediening van ACV aan neonate wat onwetend deur 'n geïnfekteerde geboortekanaal gebore is, mag waardevol wees in die voorkoming van neonatale herpes simplex. Die profilaktiese gebruik van ACV in swanger vroue wat 'n geskiedenis van genitale letsels het is ook voorgestel. Geen data bestaan om die waarde van profilaktiese terapie vir pasgeborenes te evalueer nie (Whitley, 1990a).

Onderdrukkende terapie vir genitale herpes in vroue met 'n geskiedenis van terugkerende infeksie mag 'n risiko vir die fetus inhou. Uit 'n studie wat gedoen is op nie-swanger vroue met gereelde terugkerende genitale herpes, is getoon dat reaktivering van die virus plaasvind ten spyte van die toediening van 200 mg ACV p.o. drie keer per dag. (Whitley, 1990a).

Die farmakokinetika en metabolisme van ACV in die fetus is onbekend. Die

moontlikheid van ACV nefrotoksisiteit in die fetus kan 'n potensiële risiko skep (Whitley, 1990a).

Die enigste profilaktiese benadering vir die effektiewe voorkoming van neonatale HSV infeksie is die toepassing van 'n keisersnit op swanger vroue met aktiewe genitale herpes (Whitley, 1990a). 'n Keisersnit is baie minder effektief as daar meer as vier uur verloop het sedert die ruptuur van vliese.

### *Postnatale infeksie*

Vroue met terugkerende orolabiale HSV-infeksie sowel as kutane HSV infeksies op ander setels (borsletsels) is 'n soortgelyke risiko vir die oordrag van virus na hul pasgeborenes. Aangesien oordrag tydens direkte kontak met die virus geskied, behoort voldoende voorsorg getref te word vir die voorkoming van infeksie (Whitley, 1990a).

Die opvolg van die baba is baie belangrik. Ten tye van geboorte behoort 'n genitale depper van die moeder geneem te word en vir die teenwoordigheid van HSV deur middel van selkulture ondersoek word. Indien geen HSV gekweek word nie kan die baba ontslaan word, mits die ouers voorligting ontvang het. Indien die kwekings van die moeder positief toets vir die teenwoordigheid van HSV, behoort op 24 tot 48 uur begin te word met gereelde kwekings van die baba (vanaf die orofarinks, nasofarinks, oog, vel en enige suggestiewe letsels). Die kwekings behoort elke twee tot drie dae herhaal te word tot en met vier weke. Sodra 'n positiewe kultuur aangetoon word behoort met antivirale terapie begin te word.

Verpleegpersoneel met labiale HSV infeksie is 'n risiko vir die oordrag van virus. Hierdie persone mag nie in aanraking met pasgeborenes kom wat 'n risiko vir die



opdoen van neonatale HSV infeksie is nie. Personeel behoort oor die risiko van die oordrag van virus en die belang van die was van hande en die dra van maskers, indien letsels teenwoordig is, ingelig te word (Whitley, 1990a).

### **2.2.7 Behandeling**

#### *Ondersteunende behandeling*

Behandeling van alle vorme van virus enkefalitis en dus ook HSE vereis goeie ondersteunende sorg. Pasiënte behoort in die intensiewe-sorg eenheid geplaas te word aangesien enkefalitis vinnig kan ontwikkel en vererger (Davis, 1992).

Simptome soos konvulsies, hipertensie en verhoogde intrakraniale druk behoort dienooreenkomstig behandel te word. Serum osmolariteit en intraveneuse vogvolume behoort ook gemonitor te word (Davis, 1992).

Tydens die herstelproses mag pasiënte fisioterapie en spraakterapie benodig. Neuropsigologiese toetsing om die verstandelike skade te bepaal is gereeld nodig. Die tydperk van opvolg-rehabiliterende terapie hang van die graad van die enkefalitis af (Davis, 1992).

#### *Antivirale behandeling*

Onbehandelde HSE het 'n mortaliteit van 70% (McKendall, 1989).

ACV het maksimum effektiwiteit wanneer dit vroeg in die verloop van enkefalitis toegedien word. Dit behoort teen 15 tot 30 mg/kg per dag toegedien te word, verdeel in drie dosisse. Die middel behoort intraveneus, stadig oor 'n tydperk van een uur, toegedien te word. Bolus toediening kan nier-toksisiteit veroorsaak. ACV behoort vir ten minste tien dae toegedien te word (Davis, 1992).

Corey *et al.* (1988) het gevind dat die langtermyn prognose van babas met neonatale HSV-1 enkefalitis, wat vroeg in die verloop van die siekte behandel is, baie goed is; hulle ontwikkeling was normaal met geen neurologiese gevolge nie. Daarenteen het babas met HSV-2 enkefalitis neurologiese gevolge soos serebrale verlamming, verstandelike vertraging en oftalmologiese afwykings getoon, ten spyte van vroeë diagnose en behandeling.

Daar is verskeie faktore wat die terapeutiese respons kan beïnvloed. Die hoeveelheid virus in die brein skyn 'n prognostiese faktor te wees. Omdat HSV 'n sitolitiese virus is, kan die hoeveelheid virus wat gegeneer word tot die graad van breinnekrose bydra en is 'n indikasie van die onomkeerbaarheid van die patologiese proses. Ander faktore soos die tydperk van die betrokkenheid van die brein en moontlik die lokale immunologiese respons, speel ook 'n rol in die eindresultaat (Nahmias *et al.*, 1982)

Pasiënte met verworwe immuniteitsgebreksindroom (VIGS) ontwikkel dikwels 'n progressiewe demensiesiekte. HIV speel 'n rol in die patogenese van hierdie demensie alhoewel dit belangrik is om ander tipes van SSS infeksies uit te skakel voordat dit as VIGS-verwant gediagnoseer word (Davis, 1992).

## **2.3 HUIDIGE LABORATORIUMMETODES EN TEGNIEKE VIR DIE DIAGNOSE VAN HERPES SIMPLEX ENKEFALITIS**

### **2.3.1 Aantoon van virus in breinweefsel**

Die aantoon van HSV in breinweefsel is die mees sensitiewe en spesifieke metode vir die vroeë diagnose van HSE en siektes wat dit naboots (Nahmias *et al.*, 1982; Whitley, 1990b).

Die neem van 'n biopsie vanuit die brein word deur 'n volledige neurochirurgiese prosedure uitgevoer. Die mees gepaste setel van biopsie is die anterior-inferior temporale girus (McKendall, 1989). 'n Biopsie word van die temporale lob, aan die kant waar kliniese, EEG en RT abnormaliteite voorkom, geneem (Morawetz *et al.*, 1983).

Ongeveer 3 g weefsel word in die vorm van 'n kubus geneem, verdeel en gebruik vir die volgende ondersoeke (Morawetz *et al.*, 1983): die aantoon van virus deur middel van selkulture, histopatologie, die aantoon van HSV-antigene deur middel van immunofluoressensie, immunohistochemiese tegnieke en elektronmikroskopie (EM) (McKendall, 1989).

Volgens Nahmias *et al.* (1982), is die aantoon van virus deur middel van selkulture die mees sensitiewe diagnostiese hulpmiddel. Daarna volg immunofluoressensie (70%), histopatologie (56%) en EM (45%).

Alhoewel daar komplikasies ná 'n breinbiopsie mag voorkom is die voorkoms laag, wisselend van 0% tot 3% (McKendall, 1989). Soms kan 'n ander definitiewe diagnose, deur middel van 'n breinbiopsie, in nie-HSE gevalle gemaak word (Morawetz *et al.*, 1983).

Die aanvanklike gebruik van adenien arabinosied (vidarabine) as middel teen HSV infeksies het die neem van breinbiopsies genoodsaak as gevolg van die toksiese effekte van die middel. Nie-HSE gevalle moes dus nie onnodig blootgestel word aan die middel nie (Robert & Fishman, 1987).

Die beskikbaarstelling van ACV, 'n baie minder-toksies en meer-effektiewe middel, het die gebruik van vidarabine verouder. Die middel mag teoreties potensiele



newe-effekte tot gevolg hê, veral oor 'n lang termyn of by pasiënte met nierversaking. Die insidensie van newe-effekte is egter baie laag wanneer die middel vir nie meer as tien dae toegedien word nie en sulke newe-effekte is ook omkeerbaar (Whitley *et al.*, 1986; Robert & Fishman, 1987).

Behandeling van HSE met ACV word vertraag deur die besluit op die neem van 'n biopsie: die tyd benodig vir die verkryging van toestemming van familie en die voorbereidings vir neurochirurgie is 'n faktor. Die beskikbaarheid van gesofistikeerde neurochirurgiese en laboratoriumfasiliteite vir die isolering van virusse in klein hospitale ver van groot verwysingsentrums is ook 'n probleem (Robert & Fishman, 1987).

Breinbiopsies bly steeds positief vir die teenwoordigheid van HSV 48 tot 72 uur nadat behandeling met ACV begin is. Indien vordering teen daardie tyd merkbaar is, is die uitvoer van 'n breinbiopsie onnodig (Robert & Fishman, 1987).

Robert & Fishman (1987) voel dit is meer wenslik om nie-HSE eerder onnodig met ACV te behandel as om groot hoeveelhede onnodige kraniotomies vir breinbiopsies uit te voer.

Aangesien dit nie ekonomies regverdigbaar is (ongeveer R500 tot R1 800 per dag) om pasiënte onnodig vir 'n minimum van tien dae met ACV te behandel nie, sal 'n vinniger, veiliger metode vir die diagnose van HSE van groot waarde wees.

### **2.3.2 Aantoon van die virus en virus antiliggame in serebrospinale vog**

In 'n studie wat deur Nahmias *et al.* (1982) uitgevoer is, was die isolasie van die virus uit SSV of die aantoon van antigene in SSV selle deur immunofluoressensie, in biopsie-positiewe pasiënte, 'n rare verskynsel (4% en 4,2% onderskeidelik).



Isolasie van HSV van ander anatomiese setels insluitend lip, mond en nasofarinks, is nie bruikbaar vir die identifisering van pasiënte met HSE nie: 15% van biopsie-positiewe pasiënte en 11% biopsie-negatiewe pasiënte het HSV vanaf ander setels uitgeskei (Nahmias *et al.*, 1982). Daarbenewens kom daar in pasiënte met HSE dikwels perifere infeksies voor as gevolg van 'n herinfeksie met 'n tweede stam van HSV (Whitley *et al.*, 1982).

In 'n studie deur middel van isoëlektriese fokusering (IEF) met behulp van 'n affiniteit immunoklad en ELISA vir die aantoon van antiliggamete teen HSV, is bepaal dat die vlakke van IgG-antiliggamete teen HSV in die SSV van die meeste pasiënte met HSE betekenisvol styg tydens die eerste maand ná aanvang van simptome. Nie alle pasiënte met bevestigde HSE produseer egter intratekale antiliggamete teen HSV nie (Nahmias *et al.*, 1982; Koskiniemi *et al.*, 1984). Die nadeel van hierdie toetse is die onvermoë om HSV vroeg in die siekte, wanneer antivirale terapie die effektiëste is, aan te toon (Lakeman *et al.*, 1987).

IgG-antiliggamete mag vir meer as vier jaar in die SSV aangetoon word. Die aantoon van hierdie HSV-antiliggamete in die SSV mag aanleiding gee tot 'n diagnose van HSE in die later fases van die siekte. Dit is egter nooit oortuigend nie aangesien spesifieke IgG-antiliggamete gevind mag word by pasiënte met herpes labialis of wat 'n geskiedenis daarvan het en by pasiënte met bloedsreinskans-skade (Russel & Saertre, 1976). IgG-antiliggamete is ook nie in alle gevalle van HSE teenwoordig nie. In 'n studie deur Koskiniemi *et al.* (1984), is aangetoon dat geen IgG-antiliggamete in monsters wat so laat as dag 12 van die siekte versamel is, aangetoon kon word nie.

As gevolg van die geassosieerde hemorragiese nekrose van die brein is dit onmoontlik om te bepaal of die waargeneemde stygings as gevolg van plaaslike

antiliggaam sintese, lekkende serum antiliggame of beide is nie. Die styging in antiliggaamvlakke in biopsie-negatiewe pasiënte was egter beduidend minder. Die styging in IgG-antiliggaamvlakke geskied egter nie vroeg genoeg in die verloop van die infeksie vir die neem van effektiewe terapeutiese besluite nie (Nahmias *et al.*, 1982).

Normaalweg is daar 'n bloedbreinskans wat diffusie van antiliggame vanaf bloed na SSV voorkom sodat baie laer vlakke van antiliggame, gewoonlik minder as 100-voudig, in die SSV gehandhaaf word. Met infeksie van die brein mag antiliggame in die SSS plaaslik geproduseer word wat tot 'n vinniger styging van vlakke in die SSV as in die serum lei. Dit lei tot die verlaging in die differensiële verhouding (Nahmias *et al.*, 1982).

Levine *et al.* (1987) het aangetoon dat verhoudings van serum tot SSV antiliggame teen HSV van  $\leq 20$  dikwels voorgekom het in HSE en dat hoër verhoudings voorgekom het by ander siektes van die brein. Hulle het voorgestel dat die demonstrasie van hierdie verlaagde vlakke van serum tot SSV antiliggame teen HSV beduidend was vir die diagnose van HSE, op voorwaarde dat die isolasie van virus vanuit breinweefsel aanvullend uitgevoer word.

Nahmias *et al.* (1982) het in hulle studie verlaagde verhoudings van serum tot SSV antiliggaamvlakke met 'n sensitiviteit van 50% tydens die eerste tien dae van HSE aangetoon. Hulle voel dat isolasie van virus vanuit die brein steeds die belangrikste is vir 'n diagnose vroeg in die verloop van die infeksie. Die aantoon van verlaagde verhoudings van serum tot SSV antiliggaamvlakke vir retrospektiewe diagnose van HSE, 'n maand na aanvang, net so effekief is as die aantoon van stygende antiliggaamvlakke in die SSV.

Lae vlakke van HSV IgM-antiliggame word soms in die SSV aangetoon, maar in die meeste gevalle word dit nie opgespoor nie of verdwyn vinnig na aanvang van die siekte (Koskiniemi *et al.*, 1984).

Koskiniemi *et al.* (1984) het gevind dat die komplementbindingstoets (KBT) en die radio-immunuessai (RIA) gewoonlik vir die aantoon van antiliggame in die eerste week van die siekte onsuksesvol is.

Lakeman *et al.* (1987) het 'n immunokladessai vir die aantoon van HSV antigeen in SSV uitgevoer. Die sensitiwiteit en akkuraatheid van die toets was beide 88%. Die nadeel van hierdie toets was weereens die onvermoë om HSV vroeg in die siekte, wanneer antivirale terapie die effektiëste is, aan te toon.

'n ELISA metode vir die aantoon van HSV antigeen in SSV monsters het getoon dat slegs 48% van die monsters binne tien dae positief getoets het, toenemend tot 79% binne 11 tot 20 dae en 83% vir pasiënte langer as 20 dae in die siekteverloop (Lakeman *et al.*, 1987).

Coleman *et al.* (1983) het ook 'n ELISA vir die aantoon van HSV antigeen in SSV van pasiënte met HSE, uitgevoer. Die toets was in slegs 47% van gevalle in die eerste tien dae na aanvang van die siekte sensitief. Die sensitiwiteit het ook, soos in eersgenoemde studie, met die verloop van die siekte toegeneem.

### **2.3.3 Elektroënkefalogram**

By pasiënte met HSE word die EEG deur diffuse ritmiese of aritmiese stadige aktiwiteit, dikwels met 'n laterale of fokale verergering veral oor die temporale lob aan die geaffekteerde kant gekenmerk. Die graad van verstadiging gee gedeeltelik die graad en uitgebreidheid van die siekte, die vlak van bewussyn en enige



metaboliese en sistemiese veranderings weer. Opeenvolgende herhalende hoë amplitude of stadige golf komplekse kan op die stadige agtergrond verskyn. Dit ontwikkel gewoonlik tussen die tweede en vyftiende dag van die siekte maar verskyn dikwels eers later (Aminoff, 1986; Illis & Gostling, 1972).

Die EEG bevindings is nie patognomonies vir HSE nie maar wel bruikbaar in die opvolg van die verloop van die siekte. Persistering of vordering van die EEG abnormaliteite dui op 'n toenemende siekte, komplikasies of residuele breinskade. Kliniese en EEG verbetering het nie noodwendig dieselfde tydsverloop nie. Residuele neurologiese gevolge of komplikasies soos konvulsie afwyking, mag ontwikkel selfs al keer die EEG na normaal terug na die akute fase van die siekte. EEG mag help om die beste setel vir die neem van 'n biopsie te bepaal (Illis & Gostling, 1972; Aminoff, 1986).

Nahmias *et al.* (1982) het gevind dat die EEG positief was in 81% van HSV biopsie-positiewe pasiënte. Dit het egter ook die hoogste positiwiteit in die HSV biopsie-negatiewe pasiënte, naamlik 59% getoon, wat dit dus nie 'n baie spesifieke diagnostiese hulpmiddel maak nie.

### **2.3.4 Skanderingstegnieke**

#### **2.3.4.1 Breinperfusie enkelfoton-emissie rekenaartomografie**

Deur gebruik te maak van die merker  $^{123}\text{I}$ -iodophentamien (IMP) óf die merker  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hexametiel-propileenamienoksiem (HM-PAO) en enkelfoton-emissie rekenaartomografie (SPECT), kan die breinperfusie van pasiënte met akute HSE geëvalueer word (Launes *et al.*, 1988).

Launes *et al.* (1988) het in HSE-positiewe pasiënte 'n duidelike area van verhoogde merker akkumulاسie in die geaffekteerde temporale lob aangetoon. Die



hiperperfusie het verhoog en is baie later opgevolg deur progressiewe hipoperfusie. Geeneen van die pasiënte met nie-HSE het fokale hiperperfusie of 'n latere hipoperfusie getoon nie.

Dit blyk dat die gebruik van IMP of HM-PAO SPECT, indien beskikbaar, waardevol kan wees om onderskeid tussen HSE en ander HSE-agtige siektes te tref en die tegniek word aanbeveel. Daar kan egter nie aanbeveel word om ACV te staak indien geen fokale abnormaliteite deur SPECT aangetoon word nie (Launes *et al.*, 1988).

#### **2.3.4.2 Rekenaartomografie**

Deur gebruik te maak van RT kan temporale of frontale lob abnormaliteite soos lae digtheidsletsels, massa-effekte, kontrasverdigting en bloeding waargeneem word (McKendall, 1989).

Die mees algemene RT verskynsels in pasiënte met HSE is unilaterale, lae-digtheid letsels, wat dui op edeem in die mediale temporale lob insulêre korteks (Greenberg *et al.*, 1981; McKendall, 1989).

Volgens Schroth *et al.* (1987) kan die afbraak van die bloedbreinskans ook deur RT in pasiënte met HSE waargeneem word. Die afbreek van die bloedbreinskans lei tot die kontrasverdigting as gevolg van inflammatoriese, ekstrasellulêre ekstrasvasie van vog. Bloeding word in 'n kleiner aantal pasiënte aangetref.

Greenberg *et al.* (1981) het egter gevind dat al vyf pasiënte in hul studie met biopsie-positiewe HSE normale RT skanderings een tot sewe dae na aanvang van simptome getoon het.

In 'n studie wat deur Enzmann *et al.* (1978) uitgevoer is, was die RT skanderings abnormaal in 12 uit 13 pasiënte vier tot 14 dae na aanvang van simptome.

In 'n studie wat deur Launes *et al.* (1988) uitgevoer is om die breinperfusie van pasiënte met HSE te evalueer, deur gebruik te maak van twee merkers en SPECT, was die aanvanklike RT ondersoek, wat op HSE-positiewe pasiënte uitgevoer was, vier tot 11 dae na aanvang van simptome normaal.

In 'n studie wat deur Schroth *et al.* (1987) uitgevoer is om die waarde van magnetiese resonansie (MR) vir die vroeë diagnose van HSE te evalueer, was die aanvanklike RT skanderings in al vier HSE-positiewe pasiënte normaal

Alhoewel 'n abnormale RT skandering waardevol kan wees in die diagnose van HSE, sluit 'n vroeë normale studie nie die diagnose uit nie (Greenberg *et al.*, 1981). In die meeste bogenoemde studies wat uitgevoer is, is die RT skanderings normaal in die eerste week na aanvang van simptome. Dit kan lei tot die vertraging in die maak van 'n diagnose.

#### **2.3.4.3 Magnetiese resonansie**

Deur van MR gebruik te maak kan, soos in die geval met RT skandering, die unilaterale of spesifieke bilaterale inflammasie van die temporale lobbe aangetoon word. Die afbreek van die bloedsreinskans kan ook hierdeur aangetoon word (Schroth *et al.*, 1987).

In 'n vergelykende studie tussen RT en MR vir die vroeë diagnose van HSE is gevind dat bogenoemde bevindings verskeie dae, voordat RT veranderinge aangetoon is, deur middel van MR verkry kan word. MR is 'n meer sensitiewe metode en behoort, indien beskikbaar, eerder as RT skandering gebruik te word

(Schroth *et al.*, 1987).

#### 2.3.4.4 Radionuklied afbeelding en serebrale angiografie

Deur gebruik te maak van  $^{99m}\text{Tc}$ -petechnetaat kan 'n verhoogde opname van hierdie stof die gebied van aantasting in die brein lokaliseer (Karlin *et al.*, 1978).

In die studie wat deur Karlin *et al.* (1978) uitgevoer is, kon 'n verhoogde opname van  $^{99m}\text{Tc}$ -petechnetaat nul tot 21 dae na aanvang van die simptome in al die pasiënte wat in die studie gebruik is, aangetoon word, en in een pasiënt, vier dae na aanvang van die simptome. Die temporale lob het die grootste affiniteit vir die verhoogde opname getoon. Na outopsie kon dit by verskeie pasiënte getoon word dat daar egter ook ander areas van aantasting teenwoordig was.

Angiografiese bevindings is nie-spesifiek aangesien tumore, absesse, meningitis, meningoënkefalitis, subdurale hematome en subdurale empieem dieselfde beeld as HSE kan toon (Karlin *et al.*, 1978).

In 'n studie wat deur Greenberg *et al.* (1981) uitgevoer is om RT skandering op positiewe HSE pasiënte te evalueer, het drie uit vyf pasiënte geen angiografiese abnormaliteit getoon nie.

Die vroeë veranderings van 'n fokale letsels by breinskanderings deur middel van bogenoemde skanderingmetodes is deur verskeie groepe nie baie suksesvol uitgevoer nie (Greenberg *et al.*, 1981). Aangesien HSE gewoonlik met simptome soos malaise, letargie, hoofpyn en koors begin wat soortgelyk is aan dié van influensa, word breinstudies en angiografie gewoonlik uitgevoer nadat neurologiese simptome ingetree het (Karlin *et al.*, 1978). Dit veroorsaak 'n vertraging in die maak van 'n diagnose en vir die aanvang van terapie.



## **2.4 NUWE DIAGNOSTIESE METODE VIR HERPES SIMPLEX ENKEFALITIS**

### **2.4.1 Die polimerase kettingreaksie**

Die ontwikkeling van die PCR is een van die belangrikste tegniese vooruitgange in molekulêre genetica. Die prosedure se belang lê in die vermoë om onsuiver DNA, óf gefragmenteerd óf intakt, deur die eenvoudige chemiese, eerder as biologiese proliferasie van 'n voorafbepaalde deel van DNA, te amplifiseer (Eisenstein, 1990).

Dit is moontlik om spesifieke DNA basisvolgordes - van so kort as 50 basispare (bp) tot meer as 2000 bp in lengte - tot meer as 'n miljoenvoud te amplifiseer. Dit neem slegs 'n paar uur om die geoutomatiseerde prosedure te voltooi (Eisenstein, 1990).

Die vermoë om groot hoeveelhede DNA vanaf hoeveelhede té min vir standaard-amplifikasie (byvoorbeeld klonering) te produseer, gee dié metode buitengewone vermoë en sensitiwiteit. PCR maak dit moontlik dat die DNA in gefikseerde patologiese monsters, bukkale selle van mondspoelings, menslike hare, 'n enkele limfoïed- of 'n spermsel, of antieke mummies nou geanaliseer kan word (Eisenstein, 1990).

#### **2.4.1.1 Meganisme van die polimerase kettingreaksie**

Hierdie metode is ontwikkel deur Mullis en Faloona (1987) en is gebaseer op die herhaalde siklusse van drie eenvoudige reaksies waarvan die toestande slegs in die temperatuur van die inkubasie verskil. Al drie reaksies vind in een klein buisie plaas en met temperatuur-stabiele reagense; die herhalende siklusse is self-bedienend en ten volle geoutomatiseer (Eisenstein, 1990).

Tesame met die teiken DNA wat geamplifiseer moet word, is die belangrike



reagense twee enkelstring oligonukleotiede (inleiers), gesintetiseer om komplimentêr tot die bekende basisvolgordes van die teiken DNA te wees, groter hoeveelhede van die vier deoksiribonukleotied trifosfate (dNTP's) en die hitte-stabiele DNA polimerase (Eisenstein, 1990). Laasgenoemde is geïsoleer van die termofiliese bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*), wat verlengde inkubasie teen 95°C kan oorleef (Saiki *et al.*, 1988).

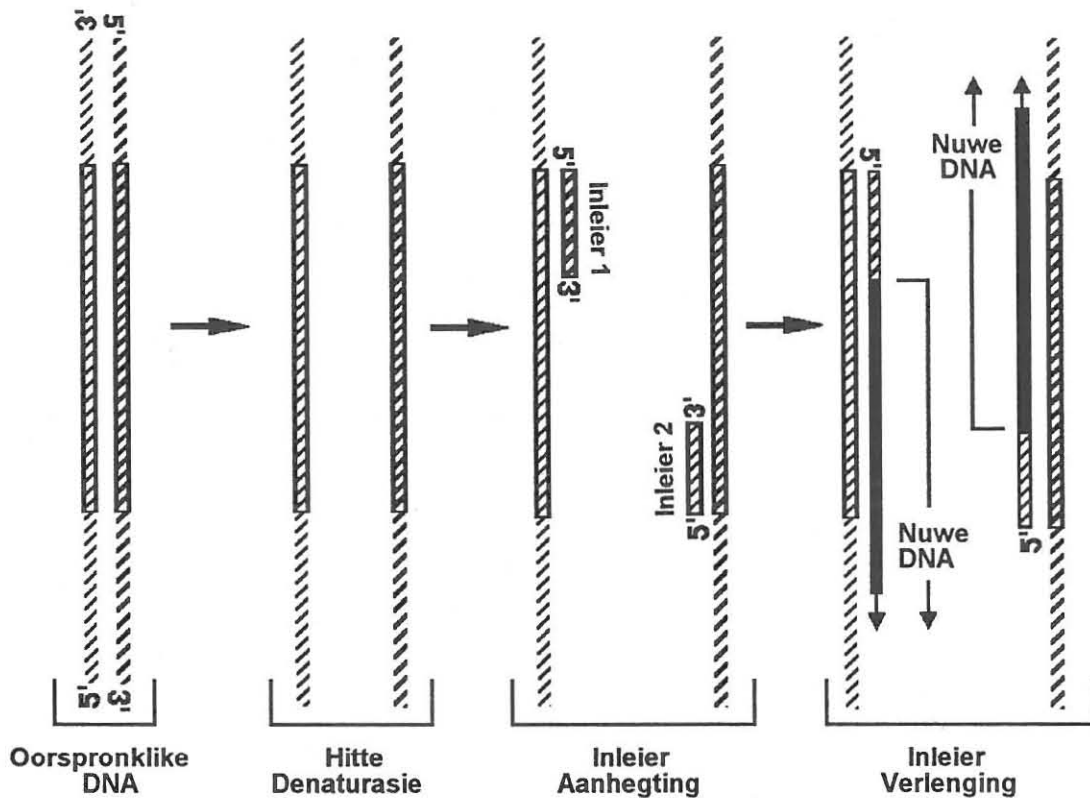
Aanvanklik is die Klenow fragment van *Escherichia coli* DNA polimerase I gebruik om die aangehegde inleiers te verleng. Die ensiem is geïnaktiveer deur die hoë temperatuur wat benodig word om die twee komplimentêre DNA stringe aan die begin van elke siklus van mekaar te skei. Vars ensiem moes dan aan die begin van elke siklus bygevoeg word (Erlich *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1988)

Die beskikbaarheid van die hitte-stabiele *Taq* DNA polimerase het die PKR getransformeer tot 'n eenvoudige en vinnige reaksie wat deur 'n outomatiese sikleerder geoutomatiseer kon word (Saiki *et al.*, 1988; Erlich, 1989; Eisenstein, 1990).

Die eerste stap in die prosedure (figuur 2.3) is hitte denaturasie van die oorspronklike dsDNA, wat gewoonlik direk vanuit enige kliniese, laboratorium, forensiese of argeologiese monster gebruik kan word. Die teiken DNA smelt by temperature wat hoog genoeg is om die waterstofbindings wat die stringe bymekaar hou, te breek. Enkelstring DNA (esDNA) wat weer sal bind met DNA wat komplementêre basisvolgordes bevat word gevorm (Eisenstein, 1990).

In die tweede stap van die siklus, wat uitgevoer word teen verlaagde temperatuur, word twee kort DNA inleiers aan komplementêre basisvolgordes op die

teenoorgestelde stringe van die teiken DNA aangeheg (figuur 2.3) (Eisenstein, 1990).



**Figuur 2.3 Die eerste rondte van die PCR (Eisenstein, 1990)**

Hierdie inleiers is gekies om die verlangde genetiese materiaal in te sluit; hulle definieer die twee eindpunte van die geamplifiseerde lengte van die DNA. Die twee inleiers behoort nie aan mekaar te kan bind nie. Die inleiers se setels van aanhegting behoort ook 'n voldoende afstand van mekaar te wees om die gevolglike sintese van nuwe produkte te bewerkstellig. Die akkuraatheid van die PCR-metode ontstaan vanaf die akkuraatheid van hierdie DNA-DNA aanhegting reaksie, selfs met kort inleiers (Eisenstein, 1990).

Die siklus se derde stap is die werklike sintese van 'n komplementêre tweede string

van nuwe DNA. Dit geskied deur die verlenging van elke aangehegde inleier deur middel van *Taq* polimerase in die teenwoordigheid van oormaat dNTP's (figuur 2.3). 'n Nuwe esDNA word vir elke aangehegte inleier gesintetiseer. Elke nuwe string bestaan uit die inleier by sy 5'-eindpunt, gevolg deur 'n string basisvolgorde skakels wat komplementêr is tot die ooreenstemmende templaar (Eisenstein, 1990).

'n Wesenlike kenmerk van die PCR is dat alle vorige gesintetiseerde produkte as templaar vir nuwe inleier-verlengingsreaksies (DNA sintese) in elke daaropvolgende siklus dien. Die gevolg van hierdie sogenaamde "kettingreaksie" is die geometriese amplifikasie van nuwe DNA produkte (Eisenstein, 1990).

Aangesien die inleiers die kerne van alle nuwe DNA stringe vorm, behoort elk van die twee inleiers, sowel as die vier dNTP's (die boublokke van die DNA polimeer), aanvanklik in groot hoeveelhede teenwoordig te wees in vergelyking met die hoeveelheid teiken DNA. Die uitsonderlike akkuraatheid van die aanhegtingsreaksie (tweede stap) en die geometriese amplifikasie van die PCR produkte (derde stap) gee saam aan die metode sy uitsonderlike sensitiwiteit vir die aantoon van teiken DNA (Eisenstein, 1990).

Na verlenging van die inleiers word die siklus herhaal. Eerstens deur die verhoging van die temperatuur sodat alle dsDNA omgeskakel kan word na esDNA, dus die beëindiging van enige voortgaande polimerisasie. Daarna, deur die verlaging van die temperatuur, word die stappe van aanhegting en verlenging bewerkstellig (Eisenstein, 1990).

Die outomatisasie van die PCR is afhanklik van die hitte stabiliteit van al die komponente: polimerase, inleiers en dNTP's. Die prosedure vereis ook voldoende kennis van die sekvensie van die teiken DNA, ten minste by die setel van inleier



aanhegting, vir die geskikte sintese van komplementêre inleiers (Eisenstein, 1990).

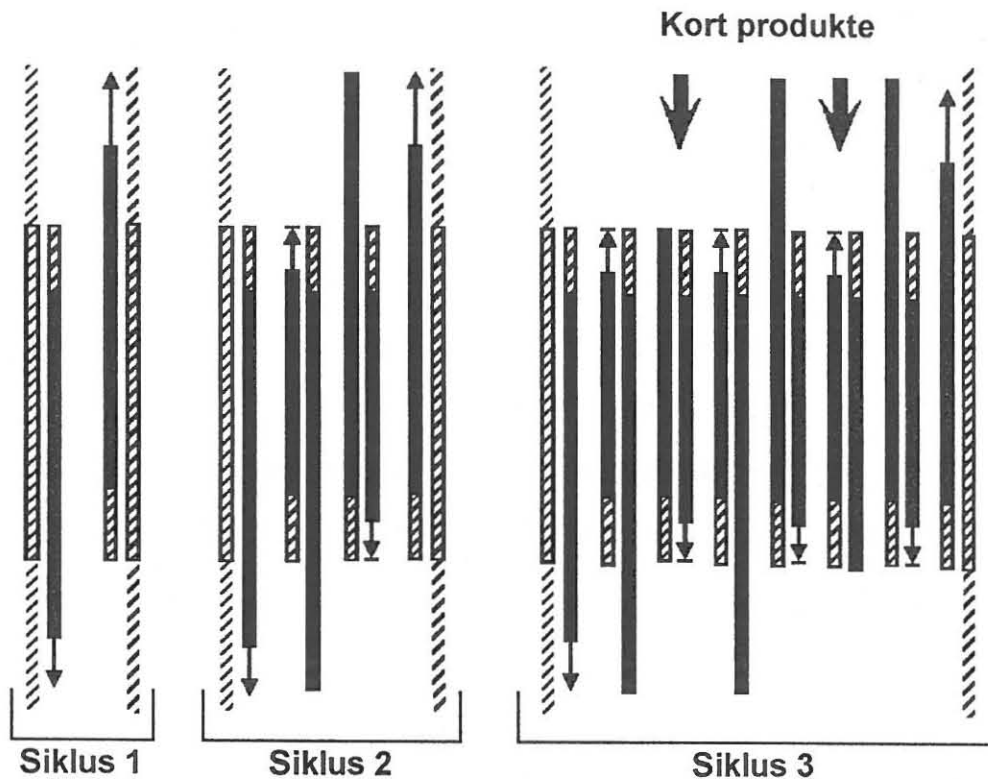
Soos wat die stappe in die reaksie verloop, gewoonlik vir ongeveer 30 siklusse, neem die hoeveelheid inleiers en dNTP's progressief af en die aantal nuwe DNA stringe neem toe (figuur 2.4) (Eisenstein, 1990).

Krities vir die metode se sukses, maar nie opvallend in die resultate van die eerste siklus nie, is die geometriese toename in die getal "kort produkte" - identiese dubbele stringe van DNA, waarvan die eindpunte presies gebind is deur die twee inleiers en hul ooreenstemmende komplementêre basisvolgordes. Hierdie kort produkte verskyn nie voor die einde van die derde siklus nie (figuur 2.4); die aantal neem dan geometries toe (Eisenstein, 1990).

In kontras met bogenoemde neem die hoeveelheid esDNA "lang produkte", wat die inleier-verlenging produkte van die aanhegting aan die oorspronklike template is en wat 3'-eindes van verskillende lengtes bevat, slegs rekenkundig toe. Die gevolg van hierdie differensiële sintese van goed-gedefinieerde kort segmente van DNA is dat wanneer die PCR siklusse voltooi is, bestaan die reaksiemengsel hoofsaaklik net uit kort produkte (Eisenstein, 1990).

Tesame met genoemde voordele van die PCR, naamlik, dat dit vinnig en akkuraat is, is nog 'n voordeel dat die teiken DNA nie noodwendig suiwer of in 'n groot hoeveelheid teenwoordig hoef te wees nie; dit kan 'n klein deel van 'n komplekse mengsel bestaande uit ander DNA en ander substansie wees (Eisenstein, 1990). Saiki *et al.* (1988) het deur eksperimente getoon dat amplifikasie moontlik is in 'n monster waar daar slegs een molekule teiken DNA teenwoordig is. Dit maak die PCR die mees sensitiewe tegniek vir die aantoon van spesifieke DNA basisvolgordes.





**Figuur 2.4**      **Produkte teen die einde van die inisiële PCR siklusse (Eisenstein, 1990)**

Die PCR is potensieel bruikbaar in enige situasie wat die ondersoek van DNA vereis (Eisenstein, 1990). Beide DNA of getruanskripteerde RNA kan as 'n templaats gebruik word vir amplifikasie (Erich, 1989).

Die PCR is 'n aantreklike tegniek vir die aantoon van virus DNA aangesien infektiewe virus nie benodig word nie (Kimura *et al.*, 1990). Die PCR is in effek soortgelyk aan die "groeï" van virus, en is daarom veral bruikbaar vir virusse wat andersins nie in die laboratorium gegroeï kan word nie (Schoub, 1992).

Die PCR maak dit dus moontlik om die genoom van 'n virus vinnig te amplifiseer, vinniger as alle selkultuur tegnieke en baie serologiese tegnieke (Schoub, 1992).

Sodoende kan genoegsame genetiese materiaal vir diagnostiese doeleindes verkry word. Die PCR is reeds met groot sukses op verskeie virusse toegepas (Erlich, 1989; Innis *et al.*, 1990).

Aangesien die basisvolgordes van HSV-1 en HSV-2 bekend is, kan gebiede van hierdie genome, deur die gebruik van gepaste gesintetiseerde oligonukleotied inleiers, geamplifiseer word. In hierdie studie is gebruik gemaak van drie gesintetiseerde inleiers vanuit die DNA polimerase geen van HSV-1 en HSV-2. Deur al drie die inleiers by die reaksiemengsel te voeg was dit moontlik om vir die teenwoordigheid van beide HSV-1 en HSV-2 te toets. Spesifieke toestande waarteen optimale resultate verkry is, is geselekteer.

## MATERIALE EN METODEDES

### 3.1 PASIËNT MONSTERS

In 'n retrospektiewe soektog na SSV monsters, in hierdie laboratorium se monsterbank, wat vir hierdie studie geskik sou wees, is agt SSV monsters waarvan die kliniese diagnose by die pasiënte moontlike HSE was, gevind. Hierdie diagnose is by twee pasiënte bevestig (in 1988 en 1990 onderskeidelik) deurdat HSV en HSV IgG-antiliggame in die SSV aangetoon is.

Die diagnose by een van die laasgenoemde pasiënte was meningitis met 'n limfositose in die SSV. Die pasiënt het positief getoets vir HSV IgG-antiliggame in die SSV. Die ander pasiënt het met tuberkulose perikarditis en erge kageksie gepresenteer. Die aantoon van moontlike HSV antiliggame was nie uitgevoer nie.

Die ses oorblywende pasiënte (van 1986 tot 1990) waar geen HSV in die SSV aangetoon is nie, het positief vir HSV IgG-antiliggame in die SSV getoets en het met onder andere nekstyfheid, koors, meningitis, delerium en verswakte bewussyn gepresenteer.

'n Verdere 152 pasiënte se SSV wat in die studie gebruik is, is vanaf Junie 1991 tot Junie 1993 ingesamel en het uit pasiënte met 'n kliniese diagnose en simptome wat moontlik 'n aanduiding van HSE kon wees bestaan. Die pasiënte het in die algemeen met konvulsies, koors en verswakte bewussyn gepresenteer. In sommige pasiënte is EEG abnormaliteite aangetoon. Hierdie SSV het vyf van die Grootte

Schuur Hospitaal, Kaapstad, van pasiënte met moontlike HSE ingesluit.

Ongeveer 1 ml SSV is van elke pasiënt aangevra. Die volgende roetine laboratoriumtoetse is op elke SSV uitgevoer: mikrobiologiese kwekings, seltellings (limfosiete, rooiselle en polimorfs) en biochemiese waarde bepalinge (chloried, glukose en proteïene). In baie ernstige gevalle is 'n EEG en RT uitgevoer. Die geskiedenis, die duur van die siekte en die neurologiese simptome van elke pasiënt is ingewin.

In hierdie laboratorium is 'n standaard roetine ELISA vir die aantoon van HSV IgM- en HSV IgG-antiliggame (Behringwerke AG), asook die aantoon van HSV deur middel van standaard roetine selkultuur prosedures op die SSV uitgevoer (Hoskins, 1967). Alle SSV monsters is as roetine laboratoriummonsters hanteer.

Ongeveer 200  $\mu$ l SSV, of dit wat nadat alle roetine laboratoriumtoetse afgehandel is beskikbaar was, is teen  $-70^{\circ}\text{C}$  weggevries vir latere voorbereiding vir die PKR. Indien minder as 500  $\mu$ l SSV van 'n pasiënt ontvang is, is geen roetine virusisolasië in selkulture uitgevoer nie.

### **3.2 KONTROLE MONSTERS**

Daar is van menslike genoom, ongeïnfekteerde selkulture en virus-geïnfekteerde selkulture om as positiewe en negatiewe kontroles in die PKR te dien gebruik gemaak.

SMV en VZV is vanuit roetine kliniese monsters deur middel van roetine virusisolasië tegnieke (Hoskins, 1967) in 'n menslike fibroblaste (HF) selstam, geïsoleer. Laasgenoemde selstam word in hierdie laboratorium voorberei. Die identiteite van SMV en VZV is bevestig deur fluoressien gemerkte anti-mens



immunoglobuliene (skaap) (Wellcome). EBV is vanuit die Epstein-Barr-3 (EB-3) sellyn (menslike sellyn wat EBV uitdruk) verkry. Laasgenoemde sellyn is vanaf die Nasionale Instituut vir Virologie, Sandringham, Johannesburg verkry. Ongeveer 5 ml van elk van die drie virusstamme in die onderskeidelike sellyne is in selsuspensie teen  $-70^{\circ}\text{C}$  vir latere gebruik weggevries. SMV, VZV en EBV het as negatiewe kontroles gedien en om die spesifisiteit van die inleiers wat in die PKR gebruik sou word te bepaal. Ongeveer 1 ml selsuspensie van HF en Veroselle is weggevries.

HSV-1 en HSV-2 is in hierdie laboratorium vanuit roetine kliniese monsters deur middel van roetine virusisolasië tegnieke (Hoskins, 1967) in 'n Verosellyn, 'n groenaap niersellyn, geïsoleer. Laasgenoemde sellyn is vanaf die Nasionale Instituut vir Virologie, Sandringham, Johannesburg verkry. HSV-1 en HSV-2 is deur middel van Imagen<sup>TM</sup> tipe-spesifieke fluoressien isotiosianaat gekonjugeerde (FITC) muis monoklonale antiliggamme (Novo Diagnostics) onderskei. Ongeveer 10 ml van onderskeidelik HSV-1 en HSV-2 in Veroselle is in suspensie teen  $-70^{\circ}\text{C}$  vir latere gebruik weggevries.

HSV-1 en HSV-2 het as positiewe kontroles gedien en om die sensitiwiteit van die PKR te bepaal. Om die sensitiwiteit van die PKR te bepaal moes die infektiwiteit van die aanvanklike virus bereken word.

'n Meer presiese bepaling van infektiwiteit as die 50% selkultuur infektiewe dosis (CCID<sub>50</sub>) eindpunt, kan verkry word deur die plaking van virusse in 'n monolaag van selkulture (Schmidt, 1979).

### 3.3 PLAAKESSAI VAN HERPES SIMPLEXVIRUS TIPE 1 EN 2

'n Plaak is 'n gelokaliseerde fokus van virus-geïnfekteerde selle wat onder optimale toestande hul oorsprong van 'n enkele infektiewe partikel het. Die enumerisering van hierdie fokusse is 'n hoogs kwantitatiewe metode vir die bepaling van virale infektiwiteit (Schmidt, 1979).

In enige selkultuur monolaag wat geïnokuleer is met 'n klein hoeveelheid van infektiewe partikels van 'n sitopatiese virus, word 'n aantal primêre fokusse van infeksie, elk bestaande uit 'n enkel sel, gevorm. Soos virusgroeï voortgaan word die aangrensende selle geïnfekteer (Hoskins, 1967).

In 'n sisteem waarin die virus stadig repliseer is die gelokaliseerde sitopatiese effekte as diskrete letsels of mikroplake waarneembaar. Onder geskikte omstandighede kan hulle getel word. In gewone selkulture geskied virus replikasie te vinnig vir letsels om getel te word. Maar deur die byvoeging van agarose in die medium word die virus vasgevang en beperk tot die onmiddellike omgewing. Op hierdie manier kan die letsel of plaak tot 'n makroskopiese grootte groei (Hoskins, 1967).

Die plaakessai tegniek berus op die beperking van virus van aanvanklik-geïnfekteerde selle sodat slegs aangrensende selle geïnfekteer word. Die fokus van dooie selle wat geproduseer word, word makroskopies sigbaar gemaak deur kleuring. 'n Kleurstof soos kristalviolet word gebruik om die lewende selle te kleur en die plake staan as bleek areas uit (Hoskins, 1967).

#### 3.3.1 Die plaakessai

Die medium van 'n aaneenlopende monolaag van Veroselle, in 'n 80 cm<sup>2</sup> selkultuur fles (Nunclon<sup>R</sup> Delta) is verwyder deur dit in 'n steriele houer uit te gooi. Die selle

is drie keer met fostaat-gebufferde soutoplossing (PBS) (bylaag 3.1) sonder kalsium en magnesium gespoel. Al die PBS is verwyder en 5 ml tripsien etileendiamientetra-asynsuur (tripsien EDTA) oplossing (bylaag 3.2), vooraf verhit tot 37°C, is by die selle gevoeg. Die fles is gekantel sodat die hele monolaag bedek is en die oorvloedige vloeistof is uitgegooi. Die fles is vir ongeveer 5 minute by 37°C geïnkubeer of totdat die selle van mekaar en van die flesoppervlak los gekom het. Tien milliliter Vero groeimedium (bylaag 3.3) is by die selle gevoeg om die werking van tripsien te inhibeer en die selle is getritureer totdat 'n homogene selsuspensie verkry is.

Die metode vir die uitvoer van 'n plaakessai deur Schmidt (1979) is aangepas en uitgevoer.

'n Seltelling is op die Veroselle wat deur tripsiniasie verkry is uitgevoer en hulle is in Vero groeimedium tot 'n konsentrasie van  $1,5 \times 10^6$  selle/ml verdun. Die selsuspensie is in volumes van 3 ml in elke put van 'n ses-put plaat ((Nunclon<sup>R</sup> Delta) gevoeg. Die plate met die selsuspensies is teen 37°C in 'n humiede 5% CO<sub>2</sub> atmosfeer geïnkubeer totdat aaneenlopende selmonolae gevorm is (een tot twee dae).

Die Vero groeimedium op die aaneenlopende selmonolae in die plate is verwyder en die selle is een keer met PBS gewas. Tienvoudige verdunnings ( $10^{-1}$  tot  $10^{-8}$ ) van onderskeidelik HSV-1 en HSV-2 wat uit Veroselle geïsoleer en weggevries is, is in Vero onderhoudmedium (bylaag 3.4) voorberei. Van elke verdunning is 400  $\mu$ l by elk van twee selmonolae gevoeg. 'n Volume van 400  $\mu$ l Vero onderhoudmedium is by een ongeïnfekteerde selmonolaag gevoeg wat as selkultuur kontrole gedien het. 'n Volume van 400  $\mu$ l onverdunde virus is by een selmonolaag gevoeg wat as virus kontrole gedien het.



Die plate is gekantel sodat die virussuspensie eweredig oor die selmonolae kon versprei. Die geïnfekteerde selmonolae is vir een en 'n half uur teen 37°C in 'n humiede 5% CO<sub>2</sub> inkubator geïnkubeer sodat die virus aan die sellag kon adsorbeer. Die plate is elke 10 minute gekantel om die eweredige verspreiding van die virus te verseker.

'n Dubbel gekonsentreerde voedingsbolaag (bylaag 3.5) is voorberei en tot 'n temperatuur van 37°C gebring. Ongeveer 50 ml van die dubbel gekonsentreerde voedingsbolaag is met 'n gelyke volume van gesmelte 1% Seakem LE agarose (FMC) in gedistilleerde water teen 50°C gemeng. Die agarose-voedingsbolaag mengsel is teen ongeveer 45°C gehou totdat dit benodig is.

Die mengsel is in 3 ml volumes by elke kultuurput gevoeg. Die plate is gekantel sodat die virussuspensie en die agarose-voedingsbolaag kon meng. Die bolaag is vir ongeveer 15 minute toegelaat om te stol waarna die plate met die kulture teen 37°C in 'n CO<sub>2</sub> inkubator geïnkubeer is. Die virus is vir drie tot vier dae toegelaat om plake te vorm.

Die gestolde agarose-voedingsbolae op elke selmonolaag is versigtig verwyder. Ongeveer 2 ml kristalviolet oplossing (bylaag 3.6) is binne 30 tot 60 sekondes by elke selmonolaag gevoeg en vir 2 minute toegelaat om die selle te kleur. Die kristalviolet oplossing is afgegooi waarna die monolae met kraanwater gespoel is. Aangesien sommige plake baie klein was is die plake mikroskopies getel

Die infektiwiteit van die aanvanklike virus is bereken vanaf die aantal plake wat



teen toepaslike verdunnings waargeneem is. Dit is uitgedruk as plaakvormende eenhede (PFE) /ml. Die titer van die oorspronklike HSV-1 en HSV-2 is soos deur Hoskins (1967) uiteengesit is, bepaal.

### **3.4 VOORBEREIDING VAN SSV EN KONTROLE MONSTERS VIR DIE POLIMERASE KETTINGREAKSIE**

Dit is van groot belang dat die DNA van SSV geëkstraheer word voordat PKR amplifikasie plaasvind. Hematien is 'n besondere potensiele inhibeerder van *Taq* DNA polimerase, die termostabiele DNA polimerase mees algemeen in PKR gebruik (Dennett *et. al.*, 1991).

Die aktiwiteit van *Taq* DNA polimerase is ook sensitief vir verskeie ander faktore, insluitend sommige proteïene en magnesiumione, wat in SSV aangetref word. Die direkte byvoeging van SSV tot 'n PKR reaksiemengsel mag die optimum magnesiumioon konsentrasie benodig vir optimale *Taq* polimerase aktiwiteit, versteur (Dennett *et. al.*, 1991).

Aangesien die SSV van pasiënte met HSE dikwels 'n beduidende aantal proteïene en eritrosiete en/of die produkte van geliseerde eritrosiete bevat, is 'n effektiewe metode vir die verwydering van hierdie potensiele inhibitore deur effektiewe voorafbehandeling van SSV vir 'n betroubare diagnose van HSE belangrik (Dennett *et. al.*, 1991).

Dit is ook van belang dat die virusstamme wat in selkulture geïsoleer is, se DNA geëkstraheer word aangesien die virussuspensie Verosel afvalstowwe en media bevat wat 'n inhiberende effek op die PKR kan hê.

### 3.4.1 Metode vir voorbereiding

Ongeveer 100  $\mu\text{l}$  of dit wat beskikbaar was van elke SSV is gebruik. 'n Gelyke volume proteïenase K (1 mg/ml) (Boehringer Mannheim) opgemaak in 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA (TE buffer) (bylaag 3.7) en 20  $\mu\text{l}$  van 'n 10% natrium dodesielsulfaat (SDS) (BDH) oplossing is by die SSV gevoeg. Die oplossing is goed gemeng en teen 50°C vir een en 'n half uur geïnkubeer.

'n Gelyke volume (220  $\mu\text{l}$ ) van onderskeidelik fenol (bylaag 3.8) en chloroform/iso-amiel alkohol (bylaag 3.9) is by die oplossing gevoeg en teen 12 000 opm vir 5 minute gesentrifugeer. Die bo-vloeistof (wat die DNA bevat) is afgetrek en die fenol-chloroform/iso-amiel alkohol proses is daarop herhaal. Die proses is weer herhaal met slegs chloroform/iso-amiel alkohol.

Die bo-vloeistof is afgetrek en 'n 1/10 volume van 3 M natrium asetaat (NaAs) (BDH) en twee volumes koue (-20°C) 100% etanol (Merck) is bygevoeg. Die oplossing is goed gemeng en die DNA is teen -70°C vir 30 minute gepresipiteer. Die oplossing is vir 10 minute teen 12 000 opm gesentrifugeer. Die bo-vloeistof is afgetrek en die sediment in dieselfde hoeveelheid koue 70% etanol gewas. Die oplossing is weer vir 10 minute teen 12 000 opm gesentrifugeer. Die bo-vloeistof is afgetrek en die sediment vir 10 tot 15 minute in 'n desikkator gedroog. Die sediment is in 15  $\mu\text{l}$  steriele water opgelos en teen -70°C gevries. Hiervan is 10  $\mu\text{l}$  gebruik om direk by die PKR reaksiemengsel te voeg.

Ongeveer 1 ml van die virussuspensie van elk van die kontrole virusstamme (HSV-1 en HSV-2, SMV, VZV en EBV) wat uit selkulture geïsoleer is, en die HF en Vero selsuspensies is gebruik om die DNA van te ekstraheer. Die virus-Vero selsuspensies is teen 6 000 opm vir 10 minute afgeswaai waarna die sediment in 100  $\mu\text{l}$  van die bo-vloeistof opgelos is. Die DNA is op dieselfde metode as vir die

SSV geëkstraheer. Die gedroogde sediment is in 15  $\mu\text{l}$  steriele water opgelos en teen  $-70^{\circ}\text{C}$  weggevries. Hiervan is 10  $\mu\text{l}$  gebruik om direk by die PCR reaksiemengsel te voeg.

Die genomiese DNA wat ook as negatiewe kontrole in die PCR gebruik is, is vanuit die suspensie van 1 ml ongeïnfekteerde HF selle op dieselfde wyse geëkstraheer.

Om die sensitiwiteit van die PCR te bepaal is gebruik gemaak van die SSV van pasiënte wat geen tekens of simptome van neurologiese afwykings getoon het nie (verkry vanaf miëlogram ondersoek vir laer rugpyn, Departement Radiologie, Universitas Hospitaal, Bloemfontein). Roetine laboratorium seltellings en biochemiese waardes is verkry en slegs SSV met normale waardes en geen rooi- of witselle nie, is in die studie gebruik.

Volumes van 100  $\mu\text{l}$  normale SSV is met onderskeidelik 40  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 4  $\mu\text{l}$ , 2  $\mu\text{l}$ , 0.4  $\mu\text{l}$  en 0.2  $\mu\text{l}$  van 'n  $10^{-2}$  verdunning van HSV-1 "geïnfekteer". Dit is gelykstaande aan onderskeidelik 144, 74, 18, 9, 0 en  $<0$  PFE. Dieselfde volumes van 'n  $10^{-3}$  verdunning van HSV-2 is in volumes van 100  $\mu\text{l}$  normale SSV gevoeg wat gelykstaande is aan 179, 89.5, 1, 0.5, 0 en  $<0$  PFE. Die DNA van elke geïnfekteerde SSV is geëkstraheer en teen  $-70^{\circ}\text{C}$  vir gebruik in die PCR gevries.

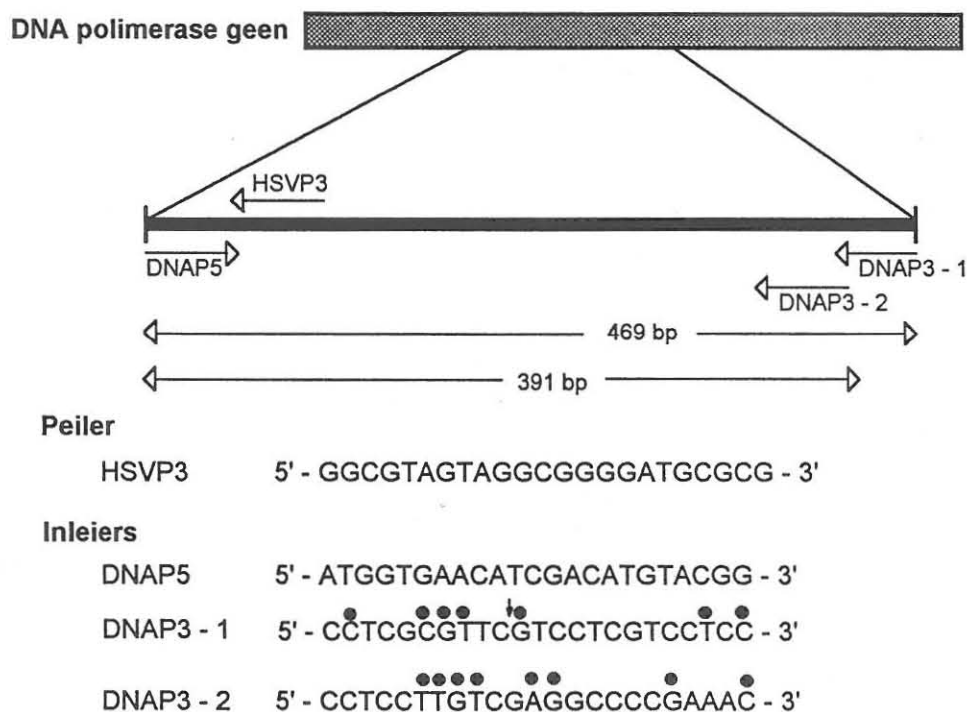
### **3.5 OLIGONUKLEOTIED PEILER EN INLEIERS**

Die oligonukleotied peiler van 24 nukleotide (nt) en oligonukleotied inleiers van 23 nt elk, van die HSV DNA polimerase geen wat kodeer vir 'n 136 kDa proteïen, is geselekteer. Hierdie proteïen is belangrik vir virale replikasie en word beskou as hoogs gekonserveerd. Dit is bekend dat hierdie geen ooreenstemmende basisvolgordes met die polimerase geen van ander virusse en prokariote bevat. Daarom is gebiede wat nie ooreenstemmende basisvolgordes met ander bekende



DNA polimerase gene bevat nie, geselekteer (Kimura *et al.*, 1990). Die oligonukleotiede is deur die Departement Biochemie, Universiteit van Kaapstad, gesintetiseer.

Die interne peiler HSVP3 (1675 tot 1699) en die opstroom inleier DNAP5 (1561 tot 1583) is van basisvolgordes spesifiek vir HSV-2 geselekteer. Hierdie peiler en inleier is ook identies tot basisvolgordes spesifiek vir HSV-1 (figuur 3.1) (Kimura *et al.*, 1990).



**Figuur 3.1** Basisvolgordes en plasinge van die peiler en inleiers. Interne peiler HSVP3 en opstroom inleier DNAP5 is geselekteer van die gebiede waar HSV-1 en HSV-2 identies was. Afstroom inleiers is geselekteer van die gebiede waar die basisvolgordes verskillend tussen HSV-1 en HSV-2 was. 'n *Kol* dui die verskil tussen HSV-1 en HSV-2 aan. 'n *Pyl* dui die punt waar 'n weglating van drie nukleotiede in HSV-1 voorkom, aan (Kimura *et al.*, 1990)



Die afstroom inleiers DNAP3-1 en DNAP3-2 is van gebiede waar die basisvolgordes tussen HSV-1 en HSV-2 verskil geselekteer (figuur 3.1). DNAP3-1 (2337 tot 2359) is van 'n basisvolgorde spesifiek vir HSV-1, en DNAP3-2 (1929 tot 1951) vir HSV-2 geselekteer (Kimura *et al.*, 1990).

Die opstroom inleier en beide afstroom inleiers is in die PKR reaksiemengsel ingesluit sodat beide tipe HSV-1 en HSV-2 aangetoon kon word. 'n Fragment van 469 bp is van HSV-1 en 'n fragment van 391 bp van HSV-2 verwag, wat ook direkte tipering toegelaat het (figuur 3.1) (Kimura *et al.*, 1990).

### 3.6 POLIMERASE KETTINGREAKSIE

#### 3.6.1 Metode vir die polimerase kettingreaksie

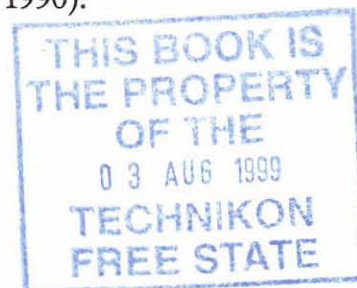
*Voorraad reaksiemengsel vir die PKR*

Die voorraad reaksiemengsel was genoeg vir 10 reaksies en die finale volume was 25  $\mu$ l/reaksiebuisie (Eppendorf Safelock).

Die volgende reagense is in volgorde in 'n reaksiebuisie in 'n ysbad gevoeg:

- \* 55  $\mu$ l steriele water
- \* 25  $\mu$ l tienvoudig gekonsentreerde
  - reaksiebuffer - voorraad konsentrasie: (bylaag 3.10)
- \* 25  $\mu$ l dNTP's - voorraad konsentrasie: (bylaag 3.11)
- \* 15  $\mu$ l Inleier DNAP5
- \* 15  $\mu$ l Inleier DNAP3-1
- \* 15  $\mu$ l Inleier DNAP3-2 - voorraad konsentrasie: (bylaag 3.12)
- \* 3  $\mu$ l *Taq* DNA polimerase (5 eenhede/ $\mu$ l) (Promega)

Bogenoemde reagense is sagkens gemeng en vinnig afgeswaai. Daarna is dit in



vooraf-verkoelde reaksiebuisies verdeel ( $15 \mu\text{l}$ /reaksiebuisie).

By elke reaksiebuisie met reaksiemengsel is  $10 \mu\text{l}$  DNA gevoeg (pasiëntmonsters en negatiewe en positiewe kontroles). 'n Nulkontrolle naamlik 'n reaksiemengsel wat geen DNA bevat het nie is ook geamplifiseer. Deur middel van die nul kontrolle kon vasgestel word of daar enige kontaminasie deur middel van die positiewe kontroles was en of enige reagens wat in die reaksiemengsel gebruik word, gekontamineer is.

'n Bolaag van  $30 \mu\text{l}$  paraffienolie (Merck) is bo-op elke reaksiemengsel geplaas. Daar is onmiddellik met die PKR in 'n programmeerbare DNA termiese blok (Hybaid) begin.

Die PKR is vir 30 siklusse uitgevoer. Die siklusse het uit DNA-denaturasie teen  $93^{\circ}\text{C}$  vir 1 minuut, inleier-aanhegting teen  $68^{\circ}\text{C}$  vir 1 minuut en inleier-verlenging teen  $72^{\circ}\text{C}$  vir 2 minute bestaan. Vir die laaste siklus van die PKR is die DNA's toegelaat om vir 5 minute teen  $72^{\circ}\text{C}$  te verleng en vir 5 minute teen  $30^{\circ}\text{C}$  af te koel. Die DNA's is toegelaat om vir 3 minute teen  $94^{\circ}\text{C}$  te denatureer voordat met die werklike siklusse begin is.

### **3.6.2 Voorsorgmaatreëls om sensitiwiteit en spesifisiteit van die PKR te verseker en kontaminasie te verhoed.**

- \* 'n Voorraad-oplossing van die reaksiemengsel is voorberei en daarna in die reaksiebuisies gevoeg
- \* Alle reaksiebuisies is op ys geplaas tydens die opstel van 'n reaksie
- \* Alle pre-PKR en post-PKR prosedures is in verskillende vertrekke uitgevoer
- \* Die termiese blok is vooraf verhit
- \* Reagense soos water en paraffienolie is in klein volumes gedispenseer en

geoutoklaveer voor gebruik

- \* Alle pipetpunte is vooraf geoutoklaveer
- \* Die werksoppervlak is na gebruik met 100% etanol gedekontamineer
- \* Persoonlike pipette en reagense is gebruik
- \* Daar is deurgaans van handskoene gebruik gemaak
- \* Daar is van wegdoenbare materiaal, pipette en buisies gebruik gemaak
- \* Alle reagense wat ontdooi is, is op ys geplaas
- \* Alle PCR reagense behalwe die DNA polimerase is in klein volumes verdeel en teen  $-70^{\circ}\text{C}$  gestoor waarna dit net eenkeer vir gebruik ontdooi is en daarna weggedoen is
- \* Indien verskillende stelle pipette nie beskikbaar vir die hantering van DNA monsters en reagense was nie is die pipette na die opstel van 'n reaksie gedekontamineer deur dit met 100% etanol te tritureer en met kiemdodende ultraviolet lig te bestraal.

### **3.7 ANALISE VAN GEAMPLIFISEERDE PRODUKTE**

#### **3.7.1 Agarose jel elektroforese**

Agarose word van seewier geëkstraheer en is 'n lineêre polimeer. Agarose jelle word voorberei deur die agarose in die teenwoordigheid van buffer te smelt totdat dit helder en deurskynend is. Die gesmelte oplossing word in 'n jelvorm gegiet en toegelaat om te verhard. Gepaard met verharding vorm die jel ook 'n matriks waarvan die digtheid bepaal word deur die konsentrasie van die agarose (Sambrook *et al.*, 1989a).

Wanneer 'n elektriese veld oor die jel toegepas word, migreer die DNA, wat negatief gelaai is na die anode. Molekules van lineêre dsDNA migreer deur die matriks teen tempos wat omgekeerd eweredig is aan die  $\log_{10}$  van die molekulêre massa. Groter molekules migreer stadiger as gevolg van groter friksionele



terughouding deurdat hulle moeiliker deur die porieë van die matriks wurm (Sambrook *et al.*, 1989a).

Horisontale jelle word gewoonlik in 'n plastiese gietvorm wat op 'n platvorm in 'n elektroforese tenk geïnstalleer kan word, gegiet. Elektroforese word, met die jel net onder die oppervlak van die buffer gedompel uitgevoer. Die weerstand van die jel teen die gang van die elektriese stroom is bykans dieselfde as van die buffer, gevolglik beweeg 'n genoegsame fraksie van die toegepaste stroom deur die lengte van die jel (Sambrook *et al.*, 1989a).

### 3.7.1.1 Voorbereiding van agarose jel

Die metodes vir die voorbereiding, en toestande vir elektroforese van die agarose jelle deur Sambrook *et al.* (1989a) en Rolfs *et al.* (1992) beskryf, is aangepas en uitgevoer.

'n Geskikte grootte gietvorm (Lasec) met 'n kam wat 'n geskikte hoeveelheid putte sal vorm is horisontaal op 'n bank geplaas. 'n 2 % agarose jel is voorberei deur die geskikte hoeveelheid verpoeierde agarose (Seravac) in die afgemete hoeveelheid elektroforese buffer, Tris boraat (TBE) (bylaag 3.13) in 'n Erlenmeyer fles te voeg.

Die mengsel is in 'n mikrogolfoond gekook totdat die agarose opgelos was. Indien enige van die volume verdamp het is dit opgevol met gedistilleerde water. Die oplossing is afgekoel tot 60°C en etidiumbromied (10 mg/ml) (Boehringer Mannheim) teen 'n finale konsentrasie van 0.5 µg/ml is bygevoeg, gemeng en die jel is onmiddellik in die vorm gegiet. Die lugborrels in die jel is deur middel van 'n vlam verwyder. Nadat die jel gestol het (30 tot 45 minute teen kamertemperatuur)



is dit in die elektroforese tenk (Lasec) geplaas. Genoeg TBE buffer om die jel tot 'n diepte van 1 mm te bedek is bygevoeg. Die kam is versigtig verwyder.

### 3.7.1.2 Elektroforese toestande

Ongeveer 20  $\mu\text{l}$  van die geamplifiseerde produkte is onder die paraffienolie bolaag uitgetrek. Die olie is van die pipetpunt afgewas deur dit in die TBE buffer by die anode kant in die elektroforese tenk te doop. Die monsters is met 'n verlangde hoeveelheid (3  $\mu\text{l}$  tot 5  $\mu\text{l}$ ) jel laaibuffer (bylaag 3.14) gemeng. Die onderskeie mengsels is stadig, deur middel van 'n outomatiese pipet (Gilson) en wegdoenbare pipetpunte (Greiner), in die putte gelaai. DNA merker VI oplossing (bylaag 3.15) is gebruik as 'n molekulêre gewig standaard om die teenwoordigheid van die fragmente 469 bp en 391 bp van onderskeidelik HSV-1 en HSV-2 te identifiseer. Ongeveer 5  $\mu\text{l}$  tot 7  $\mu\text{l}$  hiervan is in die eerste en laaste put van die jel gevoeg.

Die deksel van die elektroforese tenk is toegemaak en die elektriese koorde is gekoppel sodat die DNA na die anode sou migreer. 'n Konstante spanning van 90 V is toegepas totdat die bromofenolblou die verlangde lengte gemigreer het. Die elektriese stroom is afgeskakel en die deksel en elektriese koorde is van die elektroforese tenk verwyder.

Foto's van die onderskeie jelle is deur UV transilluminasie geneem. Maksimum fluoressensie teen 302 nm UV transilluminasie word verkry by dsDNA met geïnterkaleerde etidiumbromied, wat vir roetine gebruik geskik is. Die jel is direk op die transillumineerder (Fotodyne) geplaas en 'n swart en wit Polaroid foto is van alle jelle geneem.

### 3.7.2 Southern klad

Die fragmentgroottes wat deur die PCR geamplifiseer is kan bepaal word deur jel elektroforese, maar dit is gewoonlik nie voldoende vir die bevestiging van die spesifisiteit van die PCR nie. Na jel analise behoort geëvalueer te word of die PCR gewerk het en of die algehele eksperiment geïnterpreteer kan word. Fotografiese of video dokumentasie sisteme is dikwels meer sensitief as die oë. Die jel behoort roetneweg na 'n geskikte membraan vir latere hibridisasie analise, geklad te word. Hierdie is gewoonlik meer sensitief as etidiumbromied fluoressensie en bevestig die identiteit van die DNA fragmente (of smere) (Rolfs *et al.* 1992)

In die kapillêre oordrag metode (Southern, 1975) word DNA fragmente deur die jel in 'n vloeï van vloeistof oorgedra en neergelê op die oppervlak van die soliede oppervlak (nylonmembrane of nitrosellulose filters). Die vloeistof word deur 'n kapillêre aksie deur die jel getrek wat veroorsaak en instandgehou word deur 'n stapel droë absorberende papierhanddoeke of -doeke. Die tempo van oordrag van die DNA fragmente is afhanklik van die grootte van die DNA fragmente en die konsentrasie van agarose in die jel (Sambrook *et al.*, 1989b).

Positief-gelaaide nylonmembrane word aanbeveel vir oordrag en hibridisasie. Die membrane is meganies robuust en weerstaan skeuring en kraging. Die fisiese en chemiese eienskappe van die nylonmembrane maak hulle veral bruikbaar as 'n matriks vir die hibridisasie van onder andere Southern klad met byvoorbeeld digoxigenin (DIG) -gemarkte DNA peilers. Hulle is kationies en behou hul positiewe lading oor 'n wye pH reeks. Hierdie membrane het dus 'n hoë bindingskapasiteit vir DNA onder standaard Southern klad toestande en ook in alkaliese oordrag prosedures (Voubiljet, Boehringer Mannheim, kat. no. 1417 240).

Beide DNA en RNA en kan geëlektroforeer word. Alle roetine Southern en

Northern oordrag prosedures is geskik vir gebruik met die nylon membrane. As gevolg van hul hoë DNA bindingskapasiteit en alkaliweerstand, verleen hierdie membrane hulle veral tot gebruik met 'n aangepaste vinnige alkaliese oordrag prosedure waar die oordrag van agarose jelle uitgevoer word in 0.4 M natriumhidroksied (NaOH) direk na elektroforese. Vooraf denaturasie of neutralisasie stappe is nie nodig nie. Alkaliese Southern klad oordragte benodig die bak daarvan teen 120°C vir 15 tot 30 minute om die DNA tot die membrane te fikseer (Boehringer Mannheim).

### **3.7.2.1 Metode vir oordrag**

Die agarose jel met geamplifiseerde produkte is direk na elektroforese en fotografie vir die Southern klad gebruik.

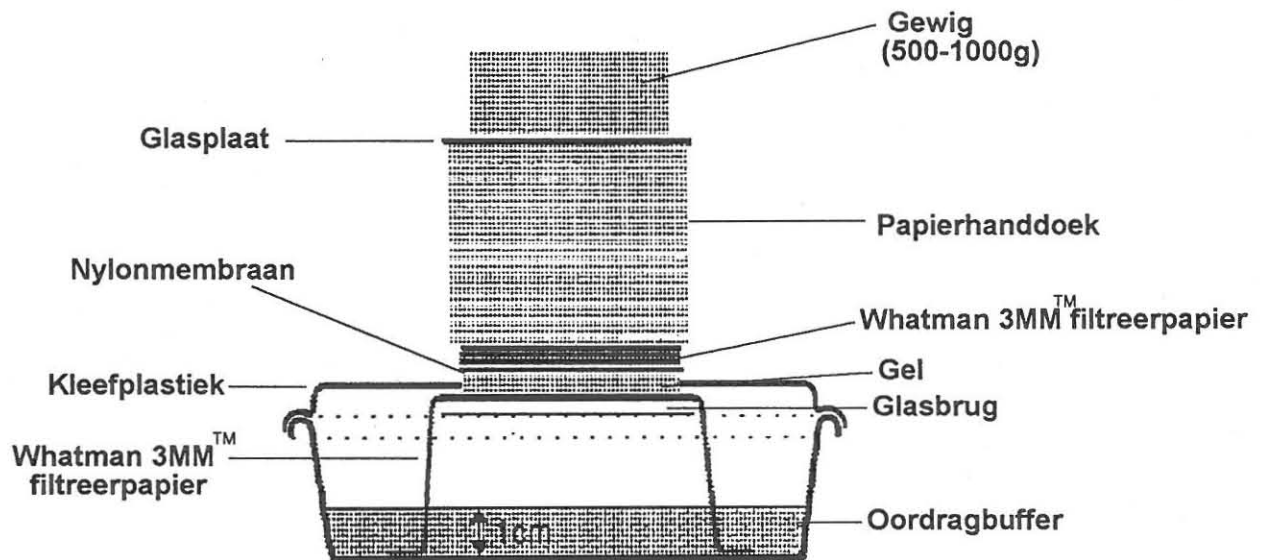
'n Reghoekige tenk (25 x 22 x 7.5 cm) is tot 'n diepte van ongeveer 1 cm met 0.4 M NaOH wat as oordragbuffer dien gevul. 'n Glasplaat-brug is oor die houer geplaas. Whatman 3MM<sup>TM</sup> filtreerpapier is oor die glasplaat-brug gevou sodat dit in die oordragbuffer hang. Die oordragbuffer is deur die filtreerpapier opgetrek totdat dit heeltemal benat is. Alle lugborrels is met 'n plastiese pipet uitgerol (figuur 3.2).

'n Positief-gelaaide nylonmembraan (Boehringer Mannheim) en drie velle Whatman 3MM<sup>TM</sup> filtreerpapier is tot dieselfde grootte as die jel gesny. Die regter boonste hoek van die membraan is afgesny om die bo-kant van die membraan tydens hibridisasie te identifiseer. Die filtreerpapier is vooraf met oordragbuffer benat. Alle hantering van die membraan, jel en papier is met handskoene uitgevoer.

Die jel is onderstebo op die nat papier ondersteunings-oppervlak geplaas. Lugborrels is met 'n plastiese pipet uitgerol. Die nat papier rondom die jel is met



kleefplastiek bedek sodat die papierhanddoeke nie met oordragbuffer in kontak sou kom nie.



**Figuur 3.2 Southern klad (Rolfs *et al.*, 1992)**

Die nylonmembraan en drie velle Whatman 3MM<sup>TM</sup> filtreerpapier is op die jel geplaas en alle lugborrels is na elke laag verwyder. 'n Dik laag papierhanddoeke en 'n glasplaat is daarop geplaas en 'n gewig van 500 tot 1000 g is bo-op geplaas. Ongeveer 8 tot 12 ure is toegelaat vir oordrag.

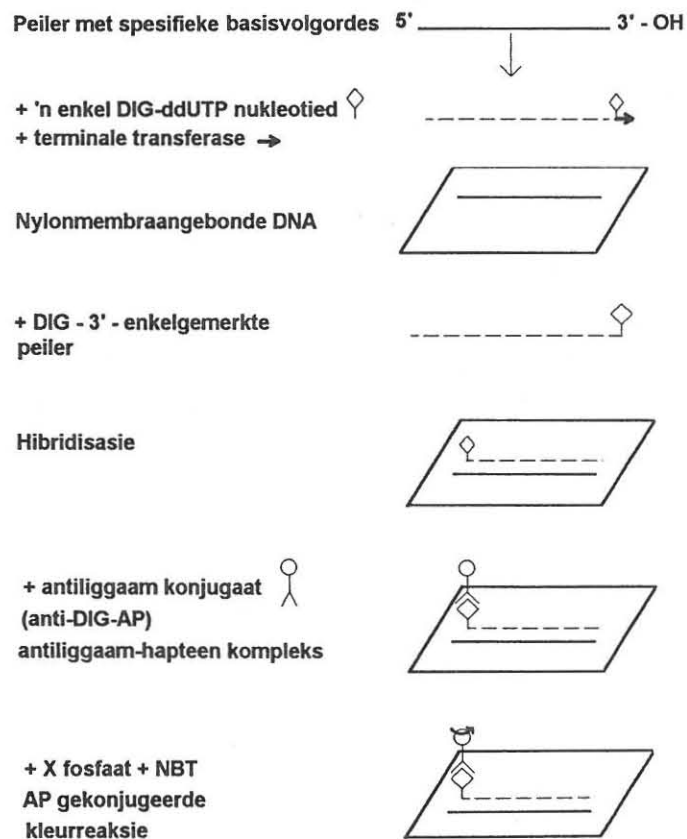
Na oordrag is alles behalwe die membraan van die jel verwyder. Die membraan is met 'n potlood gemerk terwyl dit op die jel gelê het. Die membraan is daarna teen 120°C vir 30 minute gebak. Alle gebakte membrane is droog en stofvry tussen filtreerpapier bewaar vir latere gebruik of is dadelik na oordrag gebruik.



### 3.7.3 Merking van peiler met digoxigenin dideoksie-uridien trifosfaat

Die beskryfde beginsel en metode is volgens die protokol van die "DIG Oligonukleotied 3'-einde merking toetsstel" (Boehringer Mannheim, kat. no. 1362 372).

Nukleïensuur molekules word nie-radio-aktief gemerk deur die inkorporasie van 'n DIG-gemerkte nukleotied. Die stereoïed haptien DIG word aan dideoksie-uridien trifosfaat (ddUTP) gekoppel. Oligonukleotiede word ensimaties aan hul 3'-eindes met terminale transferase gemerk deur die invoeging van 'n enkel digoxigenin dideoksie-uridien trifosfaat (DIG-ddUTP) (figuur 3.3).



**Figuur 3.3 Die merking van die peiler met DIG-ddUTP en die serologiese aantoon van hibried molekules (Boehringer Mannheim)**

Die DIG 3'-einde merking metode maak nie-radioaktiewe merking van konvensioneel-vervaardigde oligonukleotiede moontlik. Daarom is geen spesiale reagentie vir oligonukleotied sintese nodig om die nie-radioaktiewe merker aan die oligonukleotied te bind nie. DIG-gemerkte oligonukleotiede het die volgende voordele:

- \* omdat dit klein is, is die hibridisasie kinetika baie vinniger as wat dit met langer nukleïensuur fragmente is,
- \* omdat dit enkelstring is renatureer dit nie soos in die geval van DNA nie,
- \* dit kan ontwerp word dien ooreenkomstig die eksperiment,
- \* omdat dit klein is, is dit veral geskik vir *in situ* hibridisasie eksperimente aangesien dit maklik in gefikseerde weefsel en selle saamsmelt.

### 3.7.3.1 Metode vir merking

Die volgende reagentie uit die toetsstel is in 'n reaksiebuisie in 'n ysbad gemeng:

- \* 4  $\mu\text{l}$  end-merkingsbuffer (buisie 1 uit die Boehringer Mannheim toetsstel)
- \* 4  $\mu\text{l}$   $\text{CoCl}_2$  oplossing (buisie 2)
- \* 0.5  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}$ ) van die oligonukleotied peiler
- \* 1  $\mu\text{l}$  DIG-ddUTP oplossing (buisie 3)
- \* 1  $\mu\text{l}$ , 50 eenhede terminale transferase (buisie 4)

Bogenoemde is met steriele water opgemaak tot 'n finale volume van 20  $\mu\text{l}$ .

Die reaksiemengsel is teen 37°C vir 15 minute geïnkubeer en dadelik op ys geplaas.

'n Volume van 1  $\mu\text{l}$  glikogeen oplossing (buisie 8) is met 200  $\mu\text{l}$  0.2 M EDTA, pH 8 gemeng. 'n Volume van 2  $\mu\text{l}$  van die verdunning is by die reaksiemengsel gevoeg om die reaksie te stop. 'n Volume van 2.5  $\mu\text{l}$  4 M litiumchloried (LiCl) (BDH) en 75  $\mu\text{l}$  koue 100% etanol is by die oplossing gevoeg en goed gemeng. Die gemerkte

oligonukleotied is teen  $-70^{\circ}\text{C}$  vir 30 minute gepresipiteer.

Die oplossing is teen 12 000 opm vir 10 minute gesentrifugeer Die sediment is met  $50\ \mu\text{l}$  vooraf-verkoelde 70% etanol gewas en weer gesentrifugeer. Die sediment is in 'n desikkator gedroog en in  $50\ \mu\text{l}$  steriele water opgelos. Die gemerkte oligonukleotiede is teen  $-20^{\circ}\text{C}$  gestoor indien dit nie dadelik gebruik is nie.

### **3.7.4 Hibridisasie van die digoxigenin-gemerkte peiler**

#### **3.7.4.1 Metode vir hibridisasie**

Die beskryfde metode is volgens die protokol van die "DIG Oligonukleotied 3'-einde merking toetsstel" (Boehringer Mannheim kat. no. 1362 372).

Alle hibridisasie prosedures is in 'n Techne hibridisasie oond wat konstante temperature behou, uitgevoer. Dik en dun glas hibridisasie buise (Techne), geskik vir groot en klein filters kan in die oond gebruik word. Die buise roteer in die oond op buishouers.

Die hibridisasie oplossing (bylaag 3.17) is 1 uur voor gebruik opgemaak en die hibridisasie oond is vooraf tot  $68^{\circ}\text{C}$  verhit.

Die gebakte membrane is in geskikte-grootte skoon droeë glasbuis geplaas. Die DNA kant van die membrane het na bo gewys.

Die membrane is vir ten minste 1 uur teen  $68^{\circ}\text{C}$  met ten minste 20 ml hibridisasie oplossing/ $100\ \text{cm}^2$  membraan geprehibidiseer. Die oplossing is met ongeveer  $2,5\ \text{ml}/100\ \text{cm}^2$  membraan hibridisasie oplossing wat  $4\ \mu\text{l}/\text{ml}$  (10 pmol/l) gemerkte oligonukleotied peiler bevat het vervang.

Die membrane is vir een tot ses ure teen 54°C vir die hibridisasie van onderskeidelik die gemerkte oligonukleotied peiler en DNA merker VI geïnkubeer.

Die membrane is twee keer vir 5 minute teen hibridisasie temperatuur met ten minste 50 ml wasoplossing 1 (bylaag 3.18) gewas. Die membrane is weer twee keer vir 5 minute teen hibridisasie temperatuur met ten minste 50 ml wasoplossing 2 (bylaag 3.19) gewas.

Die membrane kon dan direk gebruik word vir die aantoon van gehibridiseerde oligonukleotiede of luggedroog gestoor word vir latere aantoon.

### **3.7.5 Serologiese aantoon van hibried molekules**

Die beskryfde metode is volgens die protokol van die "DNA merking en aantoon toetsstel, nie-radio-aktief" (Boehringer Mannheim kat. no. 1093 657).

Die DIG-gemerkte peiler word na hibridisasie aan teiken nukleïensure, deur 'n ELISA aangetoon deur gebruik te maak van 'n antiliggaam-konjugaat (anti-digoxigenin alkaliese fosfatase konjugaat, anti-DIG-AP). 'n Daaropvolgende ensiem-gekataliseerde kleurreaksie met 5-bromo-4-chloro-3-indoliel fosfaat (X-fosfaat) en nitroblou tetrazolium (NBT) soute gee 'n onoplosbare blou presipitaat wat hibried molekules visualiseer (figuur 3.3).

#### **3.7.5.1 Metode vir serologiese reaksie**

Alle inkubasies het teen kamertemperatuur in die hibridisasie oond plaasgevind. Alle volumes van die oplossings was geskik vir membrane van 100 cm<sup>2</sup> en is aangepas vir die groter membrane.

Die membrane is vinnig (1 minuut) met 100 ml buffer 1 (bylaag 3.20) gewas. Die



filters is daarna vir 30 minute in ongeveer 100 ml buffer 2 (bylaag 3.21) geïnkubeer. Die membrane is weer vinnig in 100 ml buffer 1 gewas.

Die antiliggaam-konjugaat (buisie 8 uit die Boehringer Mannheim toetsstel) is na 150 mU/ml (1:5000) in buffer 1 verdun. Die membrane is vir 30 minute met ongeveer 20 ml van die verdunde antiliggaam-konjugaat oplossing geïnkubeer.

Die ongebonde antiliggaam-konjugaat is verwyder deur die membrane twee keer vir 15 minute in buffer 1 te was. Die membrane is vir 2 minute met 20 ml buffer 3 (bylaag 3.22) gewas.

Die membrane is in die donker in 'n verseëlde plastiese sakkie met ongeveer 10 ml vars voorbereide kleuroplossing (bylaag 3.23) geïnkubeer. Die membrane is nie geskud terwyl die kleurreaksie plaasgevind het nie. Die kleur presipitaat verskyn binne 10 minute en die reaksie is gewoonlik binne 4 ure voltooi.

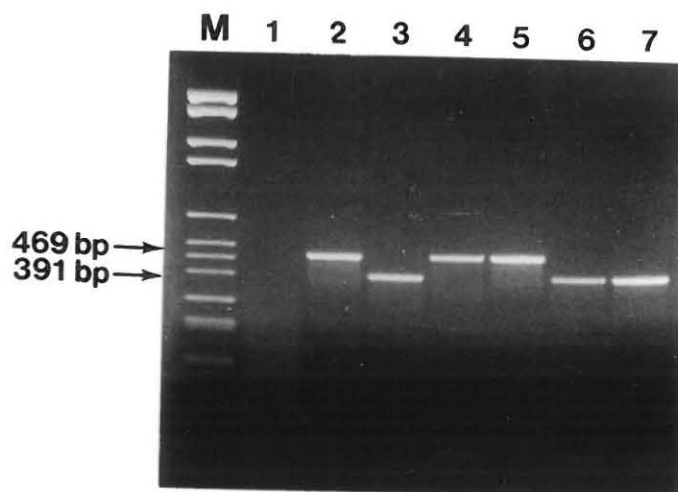
Nadat die verlangde bande gevorm is, is die reaksie gestop deur die membraan vir 5 minute met ongeveer 50 ml buffer 4 (bylaag 3.24) te was.

Die resultate is gefotokopieer of gefotografeer. Die membrane is droog teen kamertemperatuur gestoor. Die kleur is opgehelder deur die benatting van die membraan met buffer 4.

## RESULTATE

### 4.1 TIPERING VAN HSV

Dit was moontlik om maklik tussen HSV-1 en HSV-2 te onderskei. HSV-1 het 'n fragment van 469 bp en HSV-2 'n fragment van 391 bp op 'n 2% agarose jel gelewer, wat duidelik op die jel sigbaar was (figuur 4.1).



M, molekulêre gewig DNA merker VI

Baan 1, nul kontrole

Baan 2, positiewe kontrole, HSV-1

Baan 3, positiewe kontrole, HSV-2

Baan 4 tot 7, kliniese isolate verteenwoordigend van HSV-1 en HSV-2

**Figuur 4.1** Tipering van HSV deur middel van die PKR; agarose jel analise van geamplifiseerde produkte

Om te bevestig of die basisvolgordes van die inleiers vir verskeie HSV stamme gekonserveer is, is 15 isolate wat uit kliniese monsters deur middel van

virusisolasie gekweek is en bevestig is deur immunofluoressensie met tipe-spesifieke monoklonale antiligggame (tien stamme van HSV-1 en vyf stamme van HSV-2) deur middel van die PKR getoets. Die analises van sommige van hulle word in figuur 4.1 uitgebeeld. Die DNA van al 15 isolate is geamplifiseer en die serotipes soos deur die PKR bepaal het met die resultate deur immunofluoressensie verkry, ooreengestem.

#### **4.2 ANALISE VAN DIE SENSITIWITEIT EN SPESIFISITEIT VAN DIE POLIMERASE KETTINGREAKSIE**

Die sensitiwiteit van die PKR is soos in hoofstuk 3 (3.4) uiteengesit bepaal. Nul PFE van HSV-1 (figuur 4.2a; baan 5) en 0 PFE van HSV-2 (figuur 4.2a; baan 14) kon deur direkte agarose jel analise opgespoor word. Met gebruik van Southern klad hibridisasie het die sensitiwiteit vir HSV-1 tot <0 PFE (figuur 4.2b; baan 6) verhoog en dié van HSV-2 het 0 PFE (figuur 4.2b; baan 15) gebly.

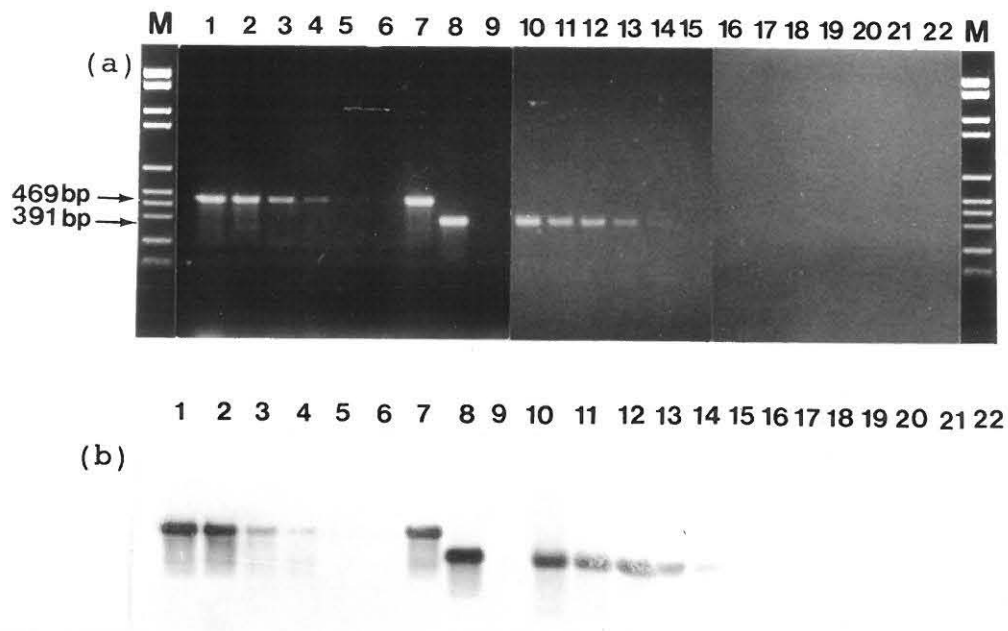
Om die spesifisiteit van die PKR te bepaal is van 'n aantal negatiewe kontroles gebruik gemaak, naamlik, menslike genoom DNA en die DNA van ongeïnfekteerde Veroselle, VZV, SMV en EBV. Geen amplifikasie is in hierdie gevalle aangetoon nie (figuur 4.2a,b; baan 17 tot 21).

#### **4.3 AANTOON EN TIPERING VAN HERPES SIMPLEX VIRUS IN SEREBROSPINALE VOG**

Die PKR is toegepas om die teenwoordigheid van HSV in 'n totaal van 160 SSV monsters van pasiënte met moontlike HSE te ondersoek.

Die twee pasiënte van 1988 en 1990 wat positief vir HSV deur middel van selkulture getoets het, het herhaaldelik positief vir die teenwoordigheid van HSV-1 in die SSV met behulp van die PKR getoets. In beide gevalle was 'n 469 bp fragment op 'n

etidiumbromied-gekleurde agarose jel sigbaar wat deur middel van Southern klad hibridisasie bevestig is. In beide gevalle het dit minstens tien dae geneem om 'n definitiewe diagnose deur middel van selkulture te maak terwyl een dag verloop het vir 'n voorlopige PKR resultaat deur middel van direkte agarose jel analise en 'n verdere twee dae vir Southern klad hibridisasie.



M, molekulêre gewig DNA merker VI  
*Baan 1 tot 6*, reeks tien-voudige verdunnings van HSV-1;  
*Baan 1*, 144 PFE  
*Baan 2*, 74 PFE  
*Baan 3*, 18 PFE  
*Baan 4*, 9 PFE  
*Baan 5*, 0 PFE  
*Baan 6*, <0 PFE  
*Baan 7*, positiewe kontrole, HSV-1  
*Baan 8*, positiewe kontrole, HSV-2  
*Baan 10 tot 15*, reeks tien-voudige verdunnings van HSV-2;

*Baan 10*, 179 PFE  
*Baan 11*, 89,5 PFE  
*Baan 12*, 1 PFE  
*Baan 13*, 0,5 PFE  
*Baan 14*, 0 PFE  
*Baan 15*, <0 PFE  
*Baan 17 tot 21*, negatiewe kontroles  
*Baan 17*, menslike genoom DNA  
*Baan 18*, Veroselle  
*Baan 19*, SMV  
*Baan 20*, VZV  
*Baan 21*, EBV  
*Baan 9, 16, 22*, nul kontroles

**Figuur 4.2 (a), (b) Sensitiwiteit en spesifisiteit van die PKR. (a) Agarose jel analise van geamplifiseerde produkte. (b) Southern klad analise van dieselfde monsters**



In een SSV wat van Grootte Schuur Hospitaal, Kaapstad, ontvang is, is HSV-1 deur middel van PKR aangetoon en deur middel van Southern klad hibridisasie bevestig. Slegs 'n volume van 20  $\mu$ l was egter beskikbaar vir die herhaling van die PKR en dit het negatief getoets. HSV-1 is uit die keeldepper van die pasiënt geïsoleer. Die pasiënt, 'n baba, het die onvermoë gehad om te kruip en het 'n verswakte neurologiese toestand en abnormale brein skandering getoon. Geen abnormale seltellings, biochemiese waardes of mikrobiologiese kwekings is waargeneem nie.

By 64 pasiënte se SSV monsters was daar geen intratekale sintese van HSV IgM- of HSV IgG-antiligggame soos deur middel van ELISA bepaal nie. By 93 SSV monsters is die teenwoordigheid van HSV IgG-antiligggame deur middel van ELISA aangetoon. Die ELISA vir HSV IgM- en HSV IgG-antiligggame is in die geval van vyf SSV monsters (Grootte Schuur Hospitaal) nie uitgevoer nie weens die beperkte volume wat ontvang is. Weens die beperkte volume van SSV wat ontvang is, ten spyte van die aanvraag van 1 ml, was dit nie moontlik om alle SSV vir die aantoon van HSV deur middel van selkulture te toets nie. Alle SSV wat wel getoets is het negatief vir die teenwoordigheid van HSV getoets. Alle bogenoemde SSV monsters het negatief vir die teenwoordigheid van HSV DNA deur middel van PKR getoets.

Aangesien slegs drie pasiënte positief vir HSV deur middel van die PKR getoets het, was dit nie moontlik om die resultate in tabelvorm uiteen te sit nie.

# HOOFSTUK 5

---

## BESPREKING

Resultate uit hierdie studie toon dat deur middel van 'n nie-indringende hoogs sensitiewe en spesifieke tegniek (PKR), herpesvirus genome vroeg in die verloop van HSE in die SSV van pasiënte met HSE aangetoon en getipeer kan word.

Die vroeë en spesifieke aantoon van HSV in die SSV van pasiënte met moontlike HSE skep 'n diagnostiese probleem. HSV word selde uit die SSV van pasiënte met HSE deur middel van selkulture geïsoleer aangesien die teenwoordigheid van infektiewe virus benodig word. Aangesien die infeksie by HSE in die meeste gevalle sekondêr is, mag die virus met spesifieke antiligggame wat in die SSV ten tye van die siekte teenwoordig is gebind wees. Dit bemoeilik die taak om die virus in selkulture te kweek (Aurelius *et al.*, 1991).

Die gebruik van serologiese toetse vir die aantoon van virale antigeen of virus-spesifieke antiligggame in die SSV is nie van groot waarde vir die vroeë diagnose van HSE nie en is nie van waarde as 'n diagnostiese toepassing nie. Die virus kan deur middel van breinbiopsies in 'n vroeë stadium van die siekte aangetoon word maar as gevolg van die indringendheid van die tegniek word dit gewoonlik nie uitgevoer nie (Puchhammer-Stöckl *et al.*, 1990)

In hierdie studie is 'n PKR tegniek ontwikkel, toegepas en geëvalueer vir die amplifikasie en tipering van HSV DNA in SSV wat daarna deur middel van Southern klad hibridisasie bevestig is.

In 'n studie deur Aurelius *et al.* (1993) is getoon dat ten minste 6/100 gevalle van HSE veroorsaak word deur HSV-2. Die gebruik van 'n kombinasie van HSV-1 en HSV-2 inleiers of tipe spesifieke inleiers is deur hulle, vir 'n doeltreffende diagnose van HSE in die vroeë fase van die siekte, aanbeveel. Die algemene gevolgtrekking uit hulle studie is egter dat dit blyk of HSE selde 'n komplikasie by HSV-2 infeksie is.

In hierdie studie is gebruik gemaak van drie inleiers wat die gelyktydige aantoon en tipering van HSV moontlik gemaak het. Vir die teken van amplifikasie is die HSV DNA polimerase geen gekies wat vir 'n 136 kDa proteïen kodeer. Hierdie proteïen is belangrik vir virus replikasie en is hoogs gekonserveerd. Dit is bekend dat hierdie geen basisvolgordes bevat wat ooreenkomste met die polimerase gene van ander virusse en prokariote toon. Daarom is gebiede wat nie ooreenkomste van basisvolgordes met ander bekende DNA polimerase gene bevat het nie geselekteer (Kimura *et al.*, 1990). Aangesien die DNA van al 15 stamme wat deur die PKR getoets is aangetoon kon word, het dit geblyk dat die inleiers se basisvolgordes tussen HSV stamme gekonserveerd is en wel spesifiek vir HSV is.

Die PKR het getoon dat <0 PFE van HSV-1 en 0 PFE van HSV-2 na Southern klad hibridasie aangetoon kon word. Dit is 'n aanduiding van die sensitiwiteit van die tegniek. In hierdie studie is daar meerendeels minder as 500  $\mu$ l SSV in die laboratorium ontvang en was dit moeilik om al die laboratoriumtoetse uit te voer. Aangesien die DNA uit 'n volume van slegs 100  $\mu$ l SSV geëkstraheer is, was dit van groot belang dat die toets sensitief moes wees.

'n Aantal negatiewe kontroles is in die PKR ingesluit, naamlik, menslike genoom DNA, die DNA van ongeïnfekteerde Veroselle en die DNA van SMV, VZV en



EBV wat deel uitmaak van die menslike herpesvirusse. Dit het getoon dat die inleiers spesifiek vir HSV-1 en HSV-2 was en dat geen kruisreaksie met enige van die genoemde herpesvirusse plaasgevind het nie. Dit bevestig die spesifisiteit van die PKR.

Die resultate van 2 pasiënte met viologies-geïdentifiseerde HSE het getoon dat die DNA van HSV-1 in die SSV teenwoordig was. Die een pasiënt is 'n week ná die begin van siekte opgeneem. Dus kon nie vasgestel word hoe vroeg die HSV DNA aangetoon kon word nie. Geen inligting behalwe kliniese simptome van die ander pasiënt was beskikbaar nie.

In 'n studie deur Rozenberg & Lebon (1991) is egter getoon dat HSV DNA in die eerste dae na infeksie van die SSS in die SSV aangetoon kan word. 'n Studie deur Puchhammer-Stöckl *et al.* (1990) het getoon dat HSV DNA so gou as die eerste dag na aanvang van neurologiese simptome in die SSV aangetoon kan word. In beide bogenoemde gevalle het dit minstens tien dae geneem om 'n definitiewe diagnose deur viruskweking in selkulture te maak.

In die geval van 'n derde pasiënt waar die DNA van HSV-1 in die SSV aangetoon is, kon die PKR slegs herhaal word met 'n baie klein volume SSV waarin geen HSV DNA aangetoon is nie. HSV-1 is uit die keeldepper van hierdie pasiënt gekweek. Hoewel voorsorg tydens die studie getref is om kontaminasie deur eksterne DNA te verhoed en kontaminasie in die studie nie 'n probleem was nie kan dit nietemin nie uitgeskakel word nie.

Alhoewel Dahm *et al.* (1991) van baie klein volumes SSV gebruik gemaak het en die DNA nie geëkstraheer het nie is in hierdie studie gebruik gemaak van fenol en chloroform DNA-ekstrasie. In hierdie studie en in ooreenstemming met Klapper



*et al.* (1990), het die direkte amplifisering van "normale" SSV wat geïnfecteer was met HSV, getoon dat meer effektiewe en sensitiewe resultate gelewer word wanneer die DNA geëkstraheer word. Die vermoede is egter dat hierdie drastiese metode van DNA-ekstraksie te streng kan wees vir klein volumes SSV (soos in bogenoemde geval) en die klein hoeveelheid DNA wat in die SSV teenwoordig is, verlore kan gaan.

Volgens Aurelius *et al.* (1991) persister HSV DNA na die begin van ACV behandeling vir ten minste vyf dae en is tot so laat as 12 dae na 'n tien-dae kursus nog aangetoon. Omdat die laboratorium diagnose van HSE in die verlede 'n probleem was en breinbiopsies nie die tegniek van keuse is nie, was en word pasiënte in hierdie inrigting in elke geval met ACV behandel. Omdat die behandeling baie duur is, sal die resultate wat binne een dag (vir direkte agarose jel analise) deur middel van die PKR gelewer kan word, van groot geldelike waarde wees. Dit neem 'n verdere twee dae vir die bevestiging deur Southern klad en hibridisasie aan die oligonukleotied peiler.

In die geval van die 93 pasiënte wat HSV IgG-antiliggame, soos deur middel van ELISA bepaal, in hul SSV gehad het is dit 'n aanduiding van die intratekale sintese van antiliggame. Al die monsters was negatief vir HSV DNA deur middel van die PKR getoets. In 'n studie deur Pohl-Koppe *et al.* (1992) is getoon dat die PKR negatief getoets het vir HSV DNA wanneer intratekaal-gesintetiseerde antiliggame aangetoon kon word. Dit was 'n aanduiding dat neutralisasie van virus tydens die verloop van die infeksie plaasgevind het. Daar was egter pasiënte wat beide PKR positief getoets het vir HSV DNA en die intratekale sintese van HSV antiliggame.

Russel & Saertre (1976) het aangetoon dat 42 uit 56 normale gesonde pasiënte, wat roetine miëlogram-ondersoeke ondergaan het, HSV antiliggame in hul SSV gehad

het. Al hierdie persone het ook serum antiliggame teen HSV gehad. Hierdie resultate bevestig die suggestie dat HSV antiliggame vir die instandhouding van die latentheid van HSV verantwoordelik kan wees. In hierdie studie is 18 gesonde pasiënte wat miëlogram-ondersoeke ondergaan het se SSV vir HSV IgG-antiliggame ondersoek. Al die pasiënte het negatief getoets (resultate nie weergegee nie).

Spesifieke HSV IgG-antiliggame mag ook by pasiënte met herpes labialis of met 'n geskiedenis daarvan gevind word asook by pasiënte met bloedsreinskans-skade (Russel & Saertre, 1976). IgG-antiliggame is ook nie in alle gevalle van HSE teenwoordig nie. In 'n studie deur Koskiniemi *et al.* (1984), is aangetoon dat geen IgG-antiliggame in monsters wat so laat as dag 12 van die siekte versamel is, aangetoon kon word nie.

As gevolg van die geassosieerde hemorragiese nekrose van die brein is dit onmoontlik om te bepaal of enige antiliggam stygings as gevolg van plaaslike antiliggam sintese, lekkende serum antiliggame of beide is nie (Nahmias *et al.*, 1982).

HSV IgG-antiliggame kan ook in die SSV aangetoon word wanneer rooibloedselle as gevolg van 'n "bloederige tap" teenwoordig is.

Negatiewe resultate in die PKR kan ook 'n gevolg wees van variasies in die virale genoom. 'n Toetsstelsel wat twee verskillende gebiede van die HSV genoom amplifiseer kan die effektiwiteit van die toets verhoog (Puchhammer-Stöckl *et al.*, 1990).

Die 64 pasiënte wat geen HSV IgM- of HSV IgG-antiliggame sowel as HSV DNA

deur middel van die PKR in hul SSV's getoon het nie kan beskou word as om HSE-negatief te wees. Aangesien daar egter verskeie ander oorsake van behandelbare en onbehandelbare toestande van enkefalitis wat HSE kan naboots is, behoort die moontlikheid van HSV infeksie uitkakelbaar te wees.

PKR analise behoort ook te help by die opsporing van antivirale middelweerstandige stamme van die virus en by die direkte analise van nukleotied basisvolgordes geassosieer met chemoterapie weerstandigheid (Rozenberg & Lebon, 1991).

Hierdie bevindinge bevestig dat die tegniek 'n vinnige en nie-indringende prosedure is vir die aantoon van HSV DNA in SSV en dus die vroeë diagnose van HSE; dit is hoogs spesifiek en sensitief en behoort van waarde te wees vir terapeutiese toepassings, prognostiese evaluasie en epidemiologiese studies.

## **5.1 AANBEVELINGS**

Alhoewel DNA ekstraksie deur middel van fenol en chloroform-iso-amielalkohol die meeste DNA gelewer het, sal 'n tegniek wat die gebruik daarvan uitkakel van waarde wees. Ten spyte daarvan dat die toets <0 PFE en 0 PFE vir onderskeidelik HSV-1 en HSV-2 kan aantoon is baie min DNA in klein volumes SSV teenwoordig en kan verlore gaan deur middel van hierdie tegniek.

Soos reeds genoem kan 'n toetsstelsel wat twee verskillende gebiede van die HSV genoom amplifiseer die effektiwiteit van die toets verhoog.



Die vroeë diagnose van herpes simplex virus (HSV) in die sentrale senuweestelsel (SSS) monsters van pasiënte met moontlike herpes simplex enkefalitis (HSE) is 'n probleem. Huidige diagnostiese laboratoriumtoetse kan nie altyd met sukses aangewend word vir die aantoon van HSV in serebrospinale vog (SSV) nie. Die ontwikkeling van effektiewe antivirale terapie teen HSV infeksies genoodsaak die ontwikkeling van 'n vinnige en sensitiewe diagnostiese metode vir HSE. Antivirale terapie is die effektiwste wanneer dit vroeg in die verloop van die siekte toegedien word.

Die polimerase kettingreaksie (PKR) is 'n aantreklike nuwe tegniek vir die aantoon van virus deoksiribonukleïensuur (DNA) aangesien infektiewe virus nie teenwoordig hoef te wees nie.

Die doel van die studie was om die toepassing van die PKR vir die gelyktydige aantoon en tipering van HSV DNA in SSV vir die vroeë diagnose van HSE te evalueer.

Ander metodes, naamlik, die ensiem-gekoppelde immunosorbent essai (ELISA) vir die aantoon van intratekaal-gesintetiseerde HSV spesifieke antiliggamte, en die aantoon van virus deur middel van virusisolasië is ook op die SSV uitgevoer.

Vir die PKR reaksie is een algemene opgaande inleier en twee tipe-spesifieke afgaande inleiers gebruik om gebiede van die DNA van die HSV tipe 1 (HSV-1) en



HSV tipe 2 (HSV-2) DNA polimerase geen te amplifiseer. Die PKR is op 15 isolate van HSV toegepas (tien stamme van HSV-1 en vyf stamme van HSV-2).

Deur die drie inleiers gelyktydig by die reaksiemengsel te voeg was dit moontlik om beide tipes HSV DNA te amplifiseer. Twee produkte van verskillende groottes is geproduseer wat deur direkte agarose jel elektroforese aangetoon is. Daar is van Southern klad en oligonukleotied peiler hibridisasie gebruik gemaak om die spesifisiteit van amplifikasie te bevestig. Die resultate het ooreengestem met die tipering van die virusse deur middel van immunofluoressensie met tipe-spesifieke monoklonale antiligggame.

Die sensitiwiteit van die toets was baie hoog. Minder as nul plaak-vormende eenhede (PFE) van HSV-1 en nul PFE van HSV-2 was na hibridisasie aantoonbaar. Die spesifisiteit van die toets is bevestig deurdat geen positiewe resultate aangetoon is waar gebruik gemaak is van menslike genoom DNA, die DNA van ongeïnfekteerde Veroselle asook die DNA van sitomegaaalvirus (SMV), varicella-zostervirus (VZV) en Epstein-Barrvirus (EBV) nie.

Die PKR tegniek is op 160 SSV monsters waarvan twee pasiënte bevestigde HSE gehad het toegepas. Die PKR het positief getoets vir die teenwoordigheid van HSV DNA by albei pasiënte sowel as by een verdere pasiënt. 'n Totaal van 93 pasiënte het HSV IgG-antiligggame in hul SSV gehad terwyl 64 pasiënte geen antiligggame gehad het nie. Geeneen van bogenoemde monsters was positief met die PKR of met virusisolasië nie.

Hierdie bevindinge bevestig dat die tegniek 'n vinnige en nie-indringende prosedure is vir die aantoon van HSV DNA in SSV en dus die vroeë diagnose van HSE; dit is

hoogs spesifiek en sensitief en behoort van waarde te wees vir terapeutiese toepassings, prognostiese evaluasie en epidemiologiese studies.

# SUMMARY

---

The early detection of herpes simplex virus (HSV) in the central nervous system (CNS) of patients with possible herpes simplex encephalitis (HSE) represents a major problem in viral diagnostics. Current diagnostic laboratory tests can not always be implemented with success to demonstrate HSV in cerebrospinal fluid (CSF). The development of effective antiviral therapy has resulted in an increased need for the rapid and sensitive diagnosis of HSE. Antiviral therapy is the most effective when given early in the course of the disease.

The polymerase chain reaction (PCR) is a highly specific and sensitive method for detection of viral nucleic acid (DNA) in clinical specimens.

The aim of the study was to evaluate the application of the PCR technique for the detection and direct typing of HSV type 1 (HSV-1) or HSV type 2 (HSV-2) in CSF.

Apart from the PCR, other diagnostic methods were applied to the CSF, namely HSV-specific antibody detection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and virus isolation by standard virus culture techniques.

For the PCR reaction, one common upstream primer and two type-specific downstream primers were used to amplify the DNA from the HSV-1 and HSV-2 DNA polymerase gene. Using these three primers simultaneously in the PCR reaction mixtures, both types of HSV DNA were amplified to produce products of different sizes. The products were detected by agarose gel electrophoresis. Southern blotting and hybridization to a specific oligonucleotide probe was used to

confirm the specificity of the amplification.

The test proved to be very sensitive. Less than nil plaque forming units (PFU) of HSV-1 and 0 PFU of HSV-2 yielded positive signals after hybridization.

The test proved to be very specific in that no positive signals were obtained with human DNA and with DNA from uninfected Vero cells, cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV) and Epstein-Barr virus (EBV).

The assay was applied to 162 CSF samples of which two had confirmed HSE verified by the detection of HSV by virus culture. The PCR tested positive for HSV DNA in both patients as well as in another patient. A total of 93 patients had HSV IgG-antibodies in their CSF's. A total of 64 patients had no antibodies to HSV. None of the above specimens contained HSV DNA as determined by PCR.

These results show that the PCR is a highly sensitive and specific technique for the identification of HSV DNA in CSF that should be of value for the early and rapid diagnosis, therapeutic decisions, prognostic evaluation and epidemiological studies on HSE.



---

## HOOFSTUK 3 MATERIALE EN METODEDES

### 3.1 Fosfaat-gebufferde soutoplossing (PBS)

9.7 g Dulbecco's PBS (Gibco)

1 l Gedeïoniseerde water

pH 7.5

Die PBS poeier is in die water opgelos en gesteriliseer deur filtrering deur 'n 0.22  $\mu\text{m}$  membraanfilter (Sartorius) en gestoor teen 4°C.

### 3.2 Tripsien Etileendiamien tetra-asynsuur (Tripsien-EDTA)

Die inhoud van een houer tripsien EDTA poeier (Gibco) is in 200 ml PBS opgelos en gesteriliseer deur middel van positiewe drukfiltrasie deur 'n 0.20  $\mu\text{m}$  mikro membraanfilter. Die tripsien EDTA is in 20 ml volumes in steriele McCartney botteltjies verdeel en gestoor teen -20°C. Elke botteltjie met tripsien EDTA is ontdooi en eenkeer gebruik.

### 3.3 Vero groeimedium

400 ml Eagles minimum essential medium met Earle se soute  
(MEM) (Gibco)

40 ml Fetale kalfserum (FKS) (Delta Bioproducts)

2 ml PSN (Penisillien, Streptomisien en Neomisien. Gebruik teen 'n finale konsentrasie van 100, 100, en 50 eenhede/ml onderskeidelik)

6 ml 5% natriumbikarbonaat oplossing ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Merck)

pH 7 - 7.2

Bogenoemde is asepties bymekaar gevoeg en gestoor teen  $4^\circ\text{C}$ .

### **3.4 Vero onderhoudmedium**

400 ml MEM met Earle se soute

8 ml FKS

2 ml PSN oplossing

8 ml 5%  $\text{NaHCO}_3$

pH 7.2 - 7.4

Bogenoemde is asepties bymekaar gevoeg en gestoor teen  $4^\circ\text{C}$ .

### **3.5 Dubbel gekonsentreerde voedingsbolaag**

90 ml dubbel gekonsentreerde MEM met Earle se soute

10 ml FKS

1 ml PSN

2,5 ml 5%  $\text{NaHCO}_3$

pH 7.2 - 7.4

Boegenoemde is asepties bymekaar gevoeg en teen  $4^\circ\text{C}$  gestoor.

### **3.6 Kristalviolet oplossing**

1,3 g kristalviolet (BDH)

Opgelos in 50 ml 95% 2-propanol (HOLPRO)

Opgemaak tot 1 l met 300 ml formalien (SAARCHEM) en kraanwater. Gestoor

teen kamertemperatuur.

### **3.7 2-Amino-2(hidroksiemetiel)-1,3-propandiol (Tris basis) EDTA (TE) buffer**

10 mM Tris basis (Boehringer Mannheim)

1 mM EDTA

pH 7.6

Die Tris basis is in ongeveer 600 ml gedistilleerde water opgelos. Die EDTA is bygevoeg en opgelos. Opgevol tot 800 ml. pH is ingestel en die volume is daarna opgevol tot 1 l. Gesteriliseer deur outoklaving. Gestoor teen kamertemperatuur.

### **3.8 Fenol oplossing**

121,1 g Tris basis in 1 l gedistilleerde water.

fenol kristalle (HOLPRO)

pH 8

Die fenol kristalle is in die verpakkings houer in 'n waterbad teen 68°C gesmelt. Hidroksiequinolien tot 'n finale konsentrasie van 0.1% (Sigma) is by die oplossing gevoeg.

'n Gelyke volume van 0.5 M Tris.HCl (pH 8) is by die gesmelte fenol gevoeg. Die oplossing is met 'n magnetiese roerder vir 15 minute geroer totdat die twee fases geskei het. Die boonste waterfase is deur middel van 'n glaspipet afgetrek en die pH is gemeet deur druppels van die fenol-Tris mengsel met 'n pH papiertjie te toets.

Die proses is herhaal totdat die pH korrek was (pH 8).

Die oplossing is versadig deur dit op te vul met gedistilleerde water en goed te skud.

Die fles is bedek met foelie. Die organiese en water fase is toegelaat om te skei deur dit oornag teen 4°C te laat staan.

Die Tris is met 'n glaspipet afgetrek. Die oplossing is in 400 ml hoeveelhede in donker glas bottels of bottels wat toegedraai was in foelie, verdeel. 'n Laag TE buffer is bo-op die oplossings in elke bottel gevoeg. Gestoor teen 4°C.

### **3.9 Chloroform/Iso-amielalkohol mengsel (24:1)**

'n Volume van 10 ml iso-amielalkohol (Merck) is by 240 ml chloroform (Merck) gevoeg. Die mengsel is geëkwilibreer, met 'n laag TE bo-op die oplossing versadig en goed geskud.

### **3.10 Tienvoudig gekonsentreerde TAQ Polimerase buffer**

0,8 g Tris basis

0,22 g Ammonium sulfaat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck)

350 µl 1 M Magnesiumchloried (MgCl<sub>2</sub>) (Merck)

330 µl 50 mg/ml BSA (Boehringer Mannheim)

pH 8.8

Opgemaak tot 9 ml met TE en pH ingestel. Opgevul tot 10 ml en gesteriliseer deur middel van positiewe drukfiltrasie deur 'n 0.20 µm mikro membraanfilter. Verdeel in 500 µl hoeveelhede in Eppendorf buisies en gestoor teen -20°C. 3,5 µl 2-merkpto etanol (Merck) is voor gebruik by elke buisie gevoeg.

### **3.11 Voorraad konsentrasie dNTP's**

Die onderskeie dNTP's (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) is in steriele water opgelos.

Die pH 7 van elk is deur middel van pH papiertjies met Tris basis 0.05 M ingestel.

Die konsentrasie van elk is spektrofotometries bepaal. Elke dNTP is verdun tot 'n



voorraad konsentrasie van 2,5 mM en teen -20°C vir gebruik weggevries.

### **3.12 Peiler en inleiers voorraad konsentrasie**

Die gesintetiseerde peiler en inleiers is verdun tot 'n voorraad oplossing van 1.35  $\mu$ M elk en teen 4 °C vir gebruik gestoor.

### **3.13 Vyfvoudig gekonsentreerde Tris-boraat (TBE) buffer**

54 g Tris basis (Boehringer Mannheim)

27,5 g Boorsuur (BDH)

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) (SAARCHEM)

pH 8.3

Opgemaak tot 1 l. Gestoor teen kamertemperatuur.

### **3.14 Sesvoudig gekonsentreerde sukrose jel laaibuffer**

0.25% bromofenolblou (Merck)

40% (w/v) sukrose in water

Sukrose is by bromofenolblou gevoeg baie goed gevortex en afgeswaai. Gestoor teen 4°C en bo-vloeistof is gebruik as gel laaibuffer.

### **3.15 Merker VI oplossing**

10  $\mu$ l Merker VI (0,25  $\mu$ g/ $\mu$ l) (Boehringer Mannheim)

40  $\mu$ l TE buffer

50  $\mu$ l Sukrose gel laaibuffer

Bymekaar gevoeg en teen kamertemperatuur gestoor.

### **3.16 Twintigvoudig gekonsentreerde natriumchloried-natriumsitraat (SSC) buffer**

175,3 g Natriumchloried (NaCl) (SAARCHEM)

88,2 g Natriumsitraat (NaSi) (BDH)

Opgemaak tot 1 l.

pH 7. Gesteriliseer deur outoklaving. Gestoor teen kamertemperatuur

### **3.17 Hibridisasie oplossing**

Vyfvoudig gekonsentreerde SSC buffer (bylaag 3.16)

0,1% (w/v) Sarkosiel (BDH)

0,02% (w/v) SDS

1% (w/v) Blokkerings reagens (houer 11 in die Boehringer Mannheim toetsstel)

Berei die oplossing 1 uur voor gebruik teen 50-70°C voor. Die oplossing word nie helder nie.

### **3.18 Wasoplossing 1**

Tweevoudig gekonsentreerde SSC

0,1% (w/v) SDS

### **3.19 Wasoplossing 2**

Tienvoudig verswakte SSC

0,1% (w/v) SDS

### **3.20 Buffer 1**

100 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

pH 7.5

Gestoor teen kamertemperatuur.

### **3.21 Buffer 2**

0.5% (w/v) Blokkerings reagens (soos deur die vervaardiger voorsien) in buffer 1.

Berei 1 uur voor gebruik teen 50-70°C voor.

### **3.22 Buffer 3**

100 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

50 mM MgCl<sub>2</sub>

pH 9.5

Gestoor teen kamertemperatuur.

### **3.23 Kleur oplossing**

45 µl NBT oplossing (buisie 9 van die Boehringer Mannheim toetsstel)

35 µl X-fosfaat oplossing (buisie 10)

Boegenoemde is bymekaar in 10ml buffer 3 gevoeg.

### 3.24 Buffer 4

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

pH 8.0

Gestoor teen kamertemperatuur.



- AMINOFF, M.J. 1986. Electroencephalography: General principles and clinical applications. In: Aminoff, M.J. (Ed). *Electrodiagnosis in clinical neurology*. Second edition. Churchill Livingstone. 21-75.
- AURELIUS. E.; JOHANSSON, B.; SKÖLDENBERG. B.; STALAND, A. & FORSGREN, M. 1991. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet*. **337**; 189-192.
- AURELIUS. E.; JOHANSSON, B.; SKÖLDENBERG. B. & FORSGREN, M. 1993. Encephalitis in immunocompetent patients due to herpes simplex virus type 1 or 2 as determined by type-specific polymerase chain reaction and antibody assays of cerebrospinal fluid. *J Med Virol*. **39**; 179-186.
- COLEMAN, R.M.; BAILEY, R.J.; WHITLEY, R.J.; KEYSERLING, H. & NAHMIAS, A.J. 1983. Elisa for the detection of herpes simplex virus antigens in the cerebrospinal fluid of patients with encephalitis. *J Virol Methods*. **7**; 117-125.
- COREY, L.; STONE. E.Y.; WHITLEY, R.J. & MOHAN, K. 1988. Difference between herpes simplex virus type 1 and type 2 neonatal encephalitis in neurological outcome. *Lancet*. **1**; 1-4.

- DAHM, C.; POHL-KOPPE, A.; TER MEULEN, V.; BRAUN, R.W. & KÜHN, J.E. 1991. Diagnosis of herpes simplex encephalitis (HSVE) by polymerase chain reaction. In: Rolfs, A., Schumacher, H.C. & Marx, P. (Eds). *PCR topics. Usage of polymerase chain reaction in genetic and infectious diseases*. Springer-Verlag, Berlin. 113-116.
- DAVIS, L.E. 1992. Viral meningitis and encephalitis. In: Rakel, R.E. (Ed.) *Conn's Therapy*. W.B. Saunders company. 853-856.
- DENNETT, C.; KLAPPER, P.E.; CLEATOR, G.M. & LEWIS, A.G. 1991. CSF pretreatment and the diagnosis of herpes encephalitis using the polymerase chain reaction. *J Virol Methods.*, **34**; 101-104.
- DISCLAFANI, A.; KOHL, S. & OSTROW, P.T. 1981. The importance of brain biopsy in suspected herpes simplex encephalitis. *Surg Neurol.*, **17**; 101-106.
- EISENSTEIN, B.D. 1990. The polymerase chain reaction. *N Engl J Med.*, **322**; 178-183.
- ENZMANN D.R.; RANSON, B.; NORMAN, D. & TALBERTH, E. 1978. Computed tomography of herpes simplex encephalitis. *Radiology*. **128**; 419-425.
- ERLICH, H.A. 1989. Basic methodology. In: Erlich, H.A., (Ed). *PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification*. New York, Stockton Press. 7-38.
- ERLICH, H.A.; GELFAND, D.H. & SAIKI, R.K. 1988. Specific DNA amplification. *Nature*, **331**; 461-462.

- FRENKEL, N.; SCHIRMER, E.C.; WYATT, L.S.; KATSAFANAS, G.; ROFFMAN, E.; DANOVICH, R.M. & JUNE, D.H. 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD<sup>4+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci.*, **87**; 748-752.
- GREENBERG, S.B.; TABER L.; SEPTIMUS, E.; KOHL, S.; PUCK, J. & BRYAN, R.N. 1981. Computerized tomography in brain biopsy-proven herpes simplex encephalitis. Early normal results. *Arch Neurol.* **38**; 58-59.
- HOSKINS, J.M. 1967. *Virological procedures*. First edition. Butterworth & Co. (Publishers)Ltd., London. 358pp.
- ILLIS, L.S. & GOSTLING, J.V.T. 1972. *Herpes simplex encephalitis*. Scientotechnica (Publishers) LTD, Bristol. 117pp.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. & SNINSKY, J.J. 1990. *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc. San Diego, California. 482pp.
- JACKSON, A.C. & JOHNSON, R.T. 1989. Aseptic meningitis and acute viral encephalitis. In: Vinken, P.J. & Bruyn, G.W. (Eds). *Handbook of Clinical Neurology. Viral disease*. Elsevier Science Publishers B.V. 125-148.
- KARLIN, C.A.; ROBINSON, R.G.; HINTHORN, D.R. & CHIEN LIU. 1978. Radionuclide imaging in herpes simplex encephalitis. *Radiology.* **126**; 181-184.

- KIMURA, H.; SHIBATA, M.; KUZUSHIMA, K.; NISHIKAWA, K.; NISHIYAMA, Y. & MORISHIMA, T. 1990. Detection and direct typing of herpes simplex virus by polymerase chain reaction. *Med Microbiol Immunol.* **179**; 177-184.
- KLAPPER, P.E.; CLEATOR, G.M.; DENNETT, C. & LEWIS, A.G. 1990. Diagnosis of herpes encephalitis via southern blotting of cerebrospinal fluid DNA amplified by polymerase chain reaction. *J Med Virol.* **32**; 261-264.
- KOSKINIEMI, M.; VAHERI, A. & TASKINEN, E. 1984. Cerebrospinal fluid alterations in herpes simplex virus encephalitis. *Rev Infect Dis.* **6**; 608-618.
- LAKEMAN, F.D.; KOGA, J. & WHITLEY, R.J. 1987. Detection of antigen to herpes simplex virus in cerebrospinal fluid from patients with herpes simplex encephalitis. *J Infect Dis.* **155**; 1172-1178.
- LAUNES, J.; LINDROTH, L.; LIEWENDAHL, K.; NIKKINEN, P.; BROWNELL, A. & IIVANAINEN, M. 1988. Diagnosis of acute herpes simplex encephalitis by brain perfusion single photon emission computed tomography. *Lancet.* **1**; 1188-1191.
- LEVINE, D.P.; LAUTER, C.B. & LERNER, A.M. 1987. Simultaneous serum and CSF antibodies in herpes simplex virus encephalitis. *JAMA.* **240**; 356-360.
- LONGSON, M. 1990. Herpes Simplex. In: Zuckerman, A.J., Banatvala J.E. & Pattison J.R. (Eds). *Principles and practice of clinical virology*. Second edition. John Wiley & Sons Ltd. England. 3-42.



- McKENDALL, R.R. 1989. Herpes simplex. In: Vinken P.J., Bruyn, G.W. & Lawans, H.L. (Eds). *Handbook of Clinical Neurology. Viral disease*. Elsevier Science Publishers B.V. 207-227.
- MORAWETZ, R.B.; WHITLEY, R.J. & MURPHY, D.M. 1983. Experience with brain biopsy for suspected herpes encephalitis: A review of forty consecutive cases. *Neurosurgery*. **12**; 654-657.
- MULLIS, K.B. & FALOONA, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase - catalyzed chain reaction. *Methods Enzym.* **155**; 335-350.
- NAHMIAS, A.J.; WHITLEY, R.J.; VISTINE, A.N.; TAKEI, Y. & ALFORD, C.A. 1982. Herpes simplex encephalitis: laboratory evaluations and their diagnostic significance. *J Infect Dis*. **145**; 829-836.
- POHL-KOPPE, A.; DAHM, C., ELGAS, M., KÜHN, J.E.; BRAUN, R.W. & TER MEULEN, V. 1992. The diagnostic significance of the polymerase chain reaction and isoelectric focusing in herpes simplex virus encephalitis. *J Med Virol*. **36**; 147-154.
- PUCHHAMMER-STÖCKL, E.; POPOW-KRAUPP, T.; HEINZ, F.Z.; MANDL, C.W. & KUNZ, C. 1990. Establishment of PCR for the early diagnosis of herpes simplex encephalitis. *J Med Virol*. **32**; 77-82.
- RABINOWITZ, S.G. 1980. Viral meningitis and encephalitis. In: Youmans, G.P., Paterson, P.Y. & Sommers, H.M. (Eds). *The biologic and clinical basis of infectious diseases*. Second edition. W.B Saunders Company, Philadelphia. 610-622.

- ROBERT, A. & FISHMAN, M.D. 1987. No, brain biopsy need not be done in every patient suspected of having herpes simplex encephalitis. *Arch Neurol.* **44**; 1291-1292.
- ROIZMAN, B. 1990. Herpesviridae: A Brief Introduction. In Fields, B.N. & Knipe, D.M. (Eds). *Fields Virology*. Second edition. Raven Press, New Yo 1787-1794.
- ROIZMAN, B. 1991. Herpesviruses. In: Dulbecco, R. (Ed). *Encyclopedia of Human Biology*. Academic Press, Inc. California. **4**; 187-194.
- ROLFS, A.; SCHULLER. I.; FINCKH, U. & WEBER-ROLFS, I. 1992. *PCR: Clinical diagnostics and research*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. 271pp.
- ROWLEY, A.H.; WHITLEY, R.J.; LAKEMAN, F.D. & WOLINSKY, S.M. 1990. Rapid detection of herpes-simplex-virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis. *Lancet.* **335**; 440-441.
- ROZENBERG, F. & LEBON, P. 1991. Amplification and characterization of herpesvirus DNA in cerebrospinal fluid from patients with acute encephalitis. *J Clin Microbiol.* **29**; 2412-2417.
- RUSSEL, A.S. & SAERTRE A. 1976. Antibodies to herpes simplex virus in "normal" cerebrospinal fluid. *Lancet.* **1**; 64-65.

- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS K.B. & ERLICH, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**; 487-491.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989a. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. **1**; 6.2-6.62.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989b. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. **2**; 9.2-9.62.
- SCHMIDT, N.J. 1979. Cell culture techniques for diagnostic virology. In: Lennette, E.H. & Schmidt N.J. (Eds). *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5th edition, Byrd PrePress, Inc., Springfield, USA. 65-139.
- SCHOUB, B.D. 1992. VIRUS SA. *A bimonthly update of viral diseases of man*. **1**; 1-7.
- SCHROTH, G.; GAWEHN, J.; THRON, A.; VALLBRACHT, A. & VOIGT, K. 1987. Early diagnosis of herpes simplex encephalitis by MRI. *Neurology*. **37**; 179-183.
- SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**; 503-517.

- TIMBURY, M.C. 1986. *Notes on Medical Virology*. Eighth edition. Longman Singapore Publishers (Pte) Ltd. 159pp.
- WHITE, D.O. & FENNER, F.J. 1986. *Medical Virology*. Third edition. Academic Press, Inc. London. 655pp.
- WHITLEY, R.J. 1990a. Herpes simplex viruses. In: Fields, B.N. & Knipe B.N (Eds). *Fields Virology*. Second edition. Raven Press, New York. 2; 1843-1888.
- WHITLEY, R.J. 1990b. Viral encephalitis. *N Engl J Med*. 23; 242-250.
- WHITLEY, R.; LAKEMAN, A.D.; ROIZMAN, B. 1982. DNA restriction-enzyme analysis of herpes simplex virus isolates obtained from patients with encephalitis. *N Engl J Med*. 307; 1060-1062.
- WHITLEY, R.J.; ALFORD, C.A.; HIRSCH, M.S.; SCHOOLEY, R.T.; LUBY, J.P.; AOKI, F.Y.; HANLEY, D.; NAHMIAS, A.J. & SOONG, S-J. 1986. Vidarabine versus acyclovir therapy in herpes simplex encephalitis. *N Engl J Med*. 314; 144-149.
- WHITLEY, R.J.; COBBS, C.A.; SOONG, S-J.; HIRSCH, M.S.; CONNOR, J.D.; COREY, L.; HANLEY, D.F.; LEVIN, M. & POWELL, D.A. 1989. Diseases that mimic herpes simplex encephalitis. *JAMA*. 262; 234-239.



