

SİTOMEGALOVİRUS (CMV) HASTALIĞININ TANISINDA ANTİJENEMİ VE CMV-DNA HİBRİT YAKALAMA TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

COMPARISON OF CYTOMEGALOVIRUS (CMV) ANTIGENEMIA AND CMV-DNA HYBRID CAPTURE ASSAYS USED IN THE DIAGNOSIS OF CMV INFECTION

Selma GÖKAHMETOĞLU¹ Melek İNCİ¹ Yusuf ÖZBAL¹ Mustafa ÇETİN² Tamer GÜNEŞ³

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri

¹ Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

² Hematoloji Bilim Dalı

³ Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Anahtar Sözcükler: Sitomegalovirus (CMV), CMV antijenemi testi, CMV-DNA hibrid yakalama testi, tanı

Key Words: Cytomegalovirus (CMV), CMV antigenemia assay, CMV-DNA hybrid capture assay, diagnosis

ÖZET

Transplant alıcılarında görülen infeksiyonların en önemli etkeni olan sitomegalovirus (CMV), konjenital infeksiyonlara da neden olmaktadır. Sitomegalovirus hastalığının tanısında kanda pp65 antijeninin veya viral genomun gösterilmesi önemlidir. Bu çalışmada, CMV infeksiyonunun tanısında CMV antijenemi ve CMV-DNA testlerinin karşılaştırılması amaçlandı. Sitomegalovirus hastalığı öntanısı ile gönderilen 24 hastaya ait 49 kan örneği çalışmaya alındı. Hastaların 12'si yenidoğan, diğer 12'si ise kemik iliği ve renal transplantasyon hastası idi. Transplantasyon ünitelerinden gelen örnekler transplantasyon sonrası bir-üç ay dönemine aitti. Sitomegalovirus antijenemi testinde lökositlerde pp65 varlığı indirekt floresans yöntemi ile (CINAKit, Argene-Biosoft, Fransa), CMV-DNA ise hibrid yakalama yöntemi (Digene, ABD) ile araştırıldı. Örneklerin 30 (% 61)'unda CMV antijeni ve CMV-DNA negatif; beş örnekte ise her ikisi pozitif bulundu. Antijenemisi pozitif olan dokuz örnekte ise CMV-DNA test negatifti. Beş örnekte CMV antijeni saptanamazken CMV-DNA pozitif bulundu. Her iki test ile elde edilen bulgularının istatistiksel analizinde (χ^2 testi), her iki test arasında fark bulunmadı. Sonuç olarak, CMV hastalığının laboratuvar tanısında ve takibinde CMV antijenemi ve CMV-DNA testlerinin birlikte uygulanmasının önemi belirlendi.

SUMMARY

Cytomegalovirus (CMV) is a major cause of severe infection in transplant recipients and also causes congenital infection in newborns. Detection of CMV pp65 antigen and CMV-DNA is important for the diagnosis of CMV disease. The aim of this study was to compare CMV antigenemia and CMV-DNA assays used in the diagnosis of CMV infection. Totally of 49 blood samples from 24 patients suspected of CMV disease were included in the study. Twelve of the patients were newborns and 12 were bone marrow and renal transplant recipients. The blood samples of transplant recipients were collected in months 1-3 following transplantation. Cytomegalovirus pp65 antigen was detected by indirect immunofluorescence technique (CINAKit, Argene-Biosoft, France), and CMV-DNA by hybrid capture assay (Digene, USA). Cytomegalovirus antigen and CMV-DNA were negative in 30 (61%) of the samples. Both assays were found positive in five. Nine samples were antigenemia positive, but CMV-DNA negative. Five samples were CMV-DNA positive, but antigenemia negative. No significant difference was found between the two methods by χ^2 test. It is concluded that CMV antigenemia and CMV-DNA assays should be performed together for the diagnosis of CMV infection.

GİRİŞ

Sitomegalovirus tüm dünyada yaygın olarak görülen, Herpesviridae ailesinden bir DNA virusudur. İmmunosupresif hastalar ve yenidoğanlarda, özellikle solit organ ve kemik iliği transplantasyon hastalarında ciddi infeksiyonlara neden olmaktadır (1).

Sitomegalovirus infeksiyonu tanısında serolojik testler, kültür yöntemleri, CMV antijenemi testi ve nükleik asit saptama yöntemleri kullanılmaktadır. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda serolojik yanıtın eksik, virusun gösterildiği kültür yöntemlerinin zaman alıcı ve duyarlılığının düşük olması nedeniyle CMV infeksiyonu tanısı esas olarak CMV viremisinin gösterilmesine dayanmaktadır. Sitomegalovirus pp65 antijenemi testi ve kanda CMV genomunun saptanması viremiyi göstermektedir ve son yıllarda yapılan çalışmalarda en güvenilir yöntemler olarak bildirilmektedir (2).

Bu çalışmada CMV infeksiyonunun tanısında CMV antijenemi ve CMV-DNA testlerinin karşılaştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı'na CMV hastalığı öntanısıyla gönderilen 24 hastaya ait 49 kan örneği çalışmaya alındı. Hastaların 12'si yenidoğan, altısı kemik iliği transplant alıcısı, altısı da renal transplant alıcısı idi. Transplantasyon hastalarından alınan örnekler transplantasyon sonrası bir-üç ay dönemine aitti.

Sitomegalovirus infeksiyonu; herhangi bir semptom olmaksızın hasta örneklerinden virusun izole edilmesi, viral antijenlerin veya anlamlı antikor yanıtının saptanmasıdır. Sitomegalovirus hastalığı ise; CMV infeksiyonu ile birlikte semptomların da bulunması durumudur (2). Yaşamın ilk üç haftasında alınan idrar ve solunum örneklerinde CMV ekskresyonunun veya viral nükleik asitlerin gösterilmesi konjenital infeksiyon tanısında değerlidir. Transplant alıcılarında klinik örneklerde (idrara, solunum örneği) virusun ortaya çıkarılması aktif infeksiyonu göstermektedir ve hastalığın gelişebilme riski nedeniyle hastanın takibe alınması önerilmektedir (3).

Sitomegalovirus antijenemi ve CMV-DNA testleri için EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Sitomegalovirus antijenemi testinde lökositlerde pp65 (matriks proteini) varlığı indirekt floresans yöntemiyle (CiNAkit, Argene-Biosoft, Fransa), CMV-DNA ise hibrid yakalama yöntemi (Digene, ABD) ile araştırıldı.

Sitomegalovirus antijenemi testinde gelen kan örnekleri eritrosit lizis ile işleme alındı. Elde edilen lökositler yaklaşık olarak 2×10^5 hücre/spot olacak şekilde lama yapııştırıldı. Formaldehit fiksasyonu ve membran permeabilizasyonu

uygulandıktan sonra hücreler antiCMV pp65 monoklonal antikoruna ile 30 dakika 37°C 'de inkübe edildi. Fosfat tampon ile yıkama işleminden sonra floresein izotiyosiyonat işaretleli antifare IgM + GF (ab')₂ ile 30 dakika 37°C 'de inkübe edildi. Preparatlar x400 büyütme ile floresans mikroskopunda incelendi. Floresein izotiyosiyonat ile elma yeşili renginde nükleer boyanmış polimorf çekirdekli lökositler sayıldı. Tüm alanda iki ve üzeri sayıda yeşil floresan hücre saptanan lamalar pozitif olarak değerlendirildi.

Sitomegalovirus-DNA testinde kan örneği lizis solüsyonuyla işleme alındı ve polimorf çekirdekli lökositlerden elde edilen DNA denatüre edildikten sonra CMV probu (RNA) ile DNA: RNA hibritleri oluştu ve bu hibritler öze hazırlanmış tüplere alınarak yakalama işlemi yapıldı. Sonuçlar kemiluminometre yardımıyla okundu.

İstatistiksel analiz için ² testi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 49 kan örneğinin 30 (%61)'unda CMV antijeni ve CMV-DNA negatif; beş örnekte ise her ikisi pozitif bulundu. Antijenemisi pozitif olan dokuz örnekte ise CMV-DNA testi negatifti. Beş örnekte CMV antijeni saptanamazken CMV-DNA pozitif bulundu. Tablo 1'de 24 hastaya ait 49 kan örneğinde, CMV antijenemi ve CMV-DNA sonuçları gösterilmiştir.

Sitomegalovirus antijenemi ve CMV-DNA bulgularının istatistiksel analizinde her iki test arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Her iki testle negatif sonuç alınan olguların hiçbirinde takip döneminde CMV hastalığı gelişmedi. Antijenemisi pozitif, CMV-DNA negatif olan dokuz örneğin alındığı beş hastadan sadece kemik iliği transplant alıcısı olan bir hastada CMV hastalığı gelişti. Her iki test pozitif olan kısıtlı sayıda hastada (ikisi yenidoğan, biri renal transplant alıcısı) CMV hastalığı görüldü. Antijenemisi negatif, CMV-DNA pozitif olan toplam beş örneğin alındığı hastalardan sadece birinde CMV hastalığı gelişti.

Tablo 1. Örneklerin CMV antijenemi ve CMV-DNA sonuçları

	CMV-DNA pozitif	CMV-DNA negatif
CMV antijenemi pozitif	5	9
CMV antijenemi negatif	5	30

CMV: Sitomegalovirus

TARTIŞMA

Sitomegalovirus bağışıklık sistemi normal olan bireylerde nadiren semptomatik hastalık oluşturmaya karşılık, immunsupresif bireylerde özellikle transplant alıcılarında ve intrauterin infeksiyon sonrası yenidoğanda, önemli

morbitide ve mortalite nedenleri arasındadır. Sitomegalovirus hastalığı tanısında CMV antijeni ve CMV-DNA'nın gösterilmesi önemlidir (3, 4).

Yapılan çalışmalarda hasta gansiklovir ile tedavi edildiği sırada hücre kültüründe CMV gösterilememesine karşın CMV antijenemi testinin pozitif olduğu bildirilmektedir (5). Düşük viremi durumlarında CMV antijeni saptanamayabilirken, CMV-DNA'nın gösterildiği çalışmalar vardır (6). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) bazlı kantitatif teknikler ve DNA bazlı yöntemler virus yükü ve CMV hastalığı arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Moleküler tekniklerde CMV-DNA'nın antijenemi testinden daha önce saptandığı ve antiviral tedavi gören hastalarda CMV-DNA pozitifliğinin antijenemi testinden daha sonra negatifleştiği gösterilmiştir (7, 8). Konjenital CMV enfeksiyonu olan veya transplantasyondan sonra lökopenik olan olgularda CMV antijenemi testi negatif sonuç verebilir. Bu durumda, CMV-DNA'nın PZR ile araştırılması önerilmektedir (9). Nelson ve ark. (10) semptomatik konjenital CMV enfeksiyonlu 18 hastanın hepsinde CMV-DNA'yı PZR ile göstermişlerdir.

İmmünsuprese hastalarda CMV antijenemi ve CMV-DNA testlerinin birlikte yapıldığı birçok çalışma vardır. Mazzulli ve ark. (11) çeşitli hasta gruplarında yaptıkları çalışmada, CMV'yi hibrit yakalama, antijenemi, shell vial ve tüp kültür yöntemleri ile araştırmışlar ve yöntemlerin duyarlılıklarını, sırasıyla, %95, 94, 43 ve 46 olarak bulmuşlardır. Yirmidört renal transplant alıcısından elde edilen 123 kan örneği ile yapılan bir çalışmada (4) CMV antijeni 35 örnekte, CMV-DNA (hibrid yakalama tekniği ile) 39'unda gösterilmiştir. Aynı çalışmada sekiz örnekte CMV-DNA pozitif antijenemi negatif; dört örnekte antijenemi pozitif, CMV-DNA negatif bulunmuştur (4). Çolak ve ark. (12) yaptıkları çalışmada, immün yetmezlikli hastalarda CMV antijenemi ve CMV-DNA hibrid yakalama testleri ile CMV enfeksiyonlarını araştırmışlar ve 56 kan örneğinin 11'inde her iki testle pozitif sonuç bulmuşlar, antijenemisi pozitif olan dokuz kan örneğinde CMV-DNA saptamamışlardır. Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada (13); toplam 13 örnekten dokuzunda CMV antijenemi ve DNA sonuçları uyumlu; dört örnekte ise antijenemi negatif, CMV-DNA pozitif bulunmuştur.

Bu çalışmada 49 kan örneğinden 30'unda (% 61) CMV antijeni ve CMV-DNA negatifti ve bu hastaların hiçbirinde CMV hastalığı gelişmedi. Her iki testin pozitif olduğu, beş örneğin alındığı üç hastada CMV hastalığı görüldü.

Üç hastanın biri renal transplant alıcısı, diğer ikisi yenidoğan idi. Yenidoğanlardan birinde gelişen pnömoni antibiyotik tedavisine karşın düzelmemiştir. Bu hastada CMV inklüzyon cisimciği, CMV antijenemi ve CMV-DNA araştırılmıştır. Hiperbillurbinemi, hidrosefali ve pnömonis olan diğer bebekte konjenital CMV enfeksiyonu kuşkusu üzerine CMV antijen ve CMV-DNA aranmıştır. Renal transplant alıcısı olan hastanın transplantasyon sonrası antibiyotik tedavisine yanıt vermeyen pnömonisi gelişmesi üzerine CMV antijenemi ve CMV-DNA bakılmış, testlerin pozitif çıkması üzerine hastaya gansiklovir tedavisi başlanmış ve hastanın kliniği düzelmiştir.

Antijenemisi pozitif, CMV-DNA negatif olan dokuz örneğin alındığı beş hastadan sadece birinde CMV hastalığı gelişti. Bu hasta kemik iliği transplant alıcısı idi. Allogenik kemik iliği transplantasyonu yapılan hastada akut "graft-versus-host" hastalığı gelişmesi üzerine etiyolojide CMV olabileceği düşünülüp CMV antijenemi ve CMV-DNA testleri yapılmış, sitomegalovirus antijeni pozitif, CMV-DNA negatif bulunmuştur. Hastaya gansiklovir tedavisi başlanmış ve hasta tedavi sonrası iyileşmiştir.

Antijenemisi negatif, CMV-DNA pozitif olan toplam beş örneğin alındığı hastalardan sadece birinde CMV hastalığı görüldü. Renal transplant alıcısı olan bu hastanın transplantasyon sonrası pnömonisi gelişmesi üzerine CMV antijenemi ve CMV-DNA testleri yapılmış CMV antijenemi negatif ve CMV-DNA pozitif bulunmuştur. Hastaya gansiklovir başlanmış ve hasta tedavi alırken mantar enfeksiyonu nedeniyle kaybedilmiştir. Antijenemisi negatif, CMV-DNA pozitif olan, CMV hastalığı gelişmeyen olgularda latent enfeksiyon olabileceği gibi, hibrit yakalama tekniğinde yalancı pozitiflik de olabilir. Hibrit yakalama tekniğinde yalancı pozitifliğin RNA problemlerinin nonspesifik bağlanmasına veya anti RNA:DNA antikörlerine veya laboratuvaradaki hataya bağlı olması olasıdır. Ayrıca bu hasta grubunda antijenemi testinin saptayamadığı bir düşük viremi olabileceği gibi antijenemiye bağlı yalancı negatiflik de olabilir (11). Antijenemisi pozitif, CMV-DNA negatif olgulardan sadece birinde CMV hastalığının görülmesi ise yalancı pozitiflikle veya asemptomatik viremi ile açıklanabilir (5,14).

Sonuç olarak, CMV hastalığının tanısında CMV antijenemi ve CMV-DNA testleri birlikte uygulanmalıdır. Kısıtlı sayıda hastada yapılan bu çalışmanın sonuçları diğer çalışmalarla desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. **Crumpacker CS.** Cytomegalovirus. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. New York Churchill Livingstone, **2000**: 1586-99.
2. **Çolak D, Ögünç D.** Sitomegalovirüs enfeksiyonlarında tanı yöntemleri. *Flora* **1999**; 4: 82-9.
3. **Hodinka RL.** Human cytomegalovirus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology* Washington, DC: American Society for Microbiology, **1999**: 888-99.

4. **Ho KNH, Li FK, Lai KN, Chan TM.** Comparison of the CMV Brite Turbo Assay and the digene hybrid capture CMV-DNA (version 2.0) assay for quantitation of cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 3743-5.
5. **Niubo J, Perez JL, Lacosa JTM, et al.** Association of quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant recipients. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1996**; 24:19-24.
6. **Weinberg A, Hodges TN, Cai G, Zamoja MR.** Comparison of PCR, antigenemia assay, and rapid blood culture for detection and prevention of cytomegalovirus disease after lung transplantation. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 768-72.
7. **Solano C, Munoz I, Gutierrez A, et al.** Qualitative plasma PCR assay (Amplicor CMV test) versus pp65 antigenemia assay for monitoring cytomegalovirus viremia and guiding preemptive gancyclovir therapy in allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 3938-41.
8. **Griscoli F, Barrois M, Chavvin S, Lastere S, Bellet D, Bourhis JH.** Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 4362-9.
9. **Boeckh M, Boivin G.** Quantitation of cytomegalovirus: Methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* **1998**; 11: 533-54.
10. **Nelson CT, Ista AS, Wilkerson MK, Demmler GJ.** PCR detection of cytomegalovirus DNA in serum as a diagnostic test for congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* **1995**; 33: 3317-8.
11. **Mazzulli JT, Drew LW, Lieberman BY, et al.** Multicenter comparison of the digene hybrid capture CMV-DNA assay (version 2.0), the pp65 antigenemia assay, and cell culture for detection of cytomegalovirus viremia. *J Clin Microbiol* **1999**; 37: 958-63.
12. **Çolak D, Ögünç D, Tuncer D, Mutlu G.** CMV saptanmasında CMV antijenemi ve hybrid capture CMV-DNA hibridizasyon testlerinin karşılaştırılması. 8. *Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (6-10 Ekim 1997, Antalya)* kitabında. İstanbul: KLİMİK Derneği, **1997**: D-35.
13. **Özkan E, Önal D, Çiftçi S, Beşişik SK, Yılmaz G, Badur S.** Cytomegalovirus pp65 antijenemi testi ile pozitiflik saptanan allogeneik kök hücre nakilli hastalardaki sonuçların 'murex hybrid capture CMV-DNA assay' ile karşılaştırılması. 9. *Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, (3-8 Ekim 1999, Antalya)* kitabında. İstanbul: KLİMİK Derneği, **1999**: T-015.
14. **Lesprit P, Scieux C, Lemann M, et al.** Use of the cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay for the rapid diagnosis of primary CMV infection in hospitalized adults. *Clin Infect Dis* **1998**; 26: 646-50.