

ANTI-SİTOMEGALOVİRUS (HCMV) İgM POZİTİF OLGULARDA HCMV ANTİJENEMİSİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATING CYTOMEGALOVIRUS (HCMV) ANTIGENEMIA IN ANTI-HCMV IgM POSITIVE CASES

Sedat KAYGUSUZ¹ İftihar KÖKSAL²

¹ Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale

² Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon

Anahtar Sözcükler: Sitomegalovirus (HCMV), antijenemi, IgM, immünfloresans yöntemi

Key Words: Cytomegalovirus (HCMV), antigenemia, IgM, immunfluorescence method

ÖZET

Sitomegalovirus (HCMV); gebelikte, yenidoğan döneminde ve immünsüpresif konakta önemli infeksiyonlara neden olan bir etkindir. Seroloji, kültür ve moleküler yöntemler erken ve pratik tanı için yetersiz kalmaktadır. Anti-HCMV IgM pozitifliği antijenemi döneminden sonra görülmektedir. Ancak özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde antijenemi ile anti-HCMV IgM pozitifliği eşzamanlı bulunabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, anti-HCMV IgM ile antijeneminin birlikte olduğu durumları saptamak idi. Anti-HCMV IgM pozitifliği saptanan ve gebelik, böbrek yetmezliği, malignensi ve akut ateşli hastalık gibi klinik tablolara sahip 56 değişik olguda, immünfloresans yöntemiyle HCMV antijenemisi (HCMV pp65) araştırıldı. Yalnız lenfoma nedeniyle kemoterapi alan bir olguda pozitiflik saptandı. HCMV antijenemisinin araştırılması anti-HCMV IgM pozitif olguların yerine, transplant alıcısı, seronegatif gebe gibi risk altındaki kişilerde periyodik olarak yapılması gerektiği sonucuna varıldı.

SUMMARY

Cytomegalovirus (HCMV) is an agent that can cause important infections at pregnancy, in newborn period and immunosuppressive cases. Serology, culture and molecular methods are insufficient for early and practice diagnosis. Although the anti-HCMV IgM appears after antigenemia and anti-HCMV IgM, anti-HVMV IgM antigenemia can be present simultone ously in certain cases. The purpose of the study was to determine the presence of cytomegalovirus (HCMV) antigenemia in cases with anti-HCMV IgM. Antigenemia was investigated in 56 cases who had pregnancy, renal disease, malignancy or acute fever disease. In these cases HCMV antigenemia (HCMV pp65) was investigated by immunofluorescence method. Only one positive was determined in a patient who took chemotherapy because of lymphoma. It is concluded that the investigation of HCMV antigenemia should be made periodically rather than anti-HCMV IgM in cases under risk.

GİRİŞ

Sitomegalovirus (HCMV) tüm dünyada yaygın olarak görülen ve genellikle asemptomatik infeksiyonlara yol açan Herpetoviridae grubuna ait bir virustur (1-3). Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar HCMV infeksiyonunun seroprevalansının % 30-100 arasında değiştiğini, özellikle

sosyo-ekonomik durum ve hijyenik koşulların kötü olduğu bölgelerde oranın önemli ölçüde arttığını göstermektedir (2, 4-7). Türkiye'de değişik gruplarda ve zamanlarda bulunan seropozitiflik oranları (anti-HCMV IgG) % 40-100, anti-HCMV IgM pozitiflik oranları ise % 0-32 arasında

rapor edilmiştir (8-12). Seroprevalansı etkileyen faktörler coğrafik konum, sosyo-ekonomik durum, ırk, cinsiyet, cinsel aktivite ve kan grubudur (2, 5-7, 13).

İnfeksiyonun başlıca bulaşma yolları plasental yol, cinsel ilişki, kan transfüzyonu ve organ transplantasyonu olup bulaşma kaynakları orofaringeal sekresyon, idrar, servikal ve vajinal sekresyon, semen, anne sütü, ter, dışkı ve kandır (1, 2, 11, 14).

Sitomegalovirus enfeksiyonu, virüsün kazanılma yaşıyla ilgili olarak değişmekle birlikte, enfekte olguların çoğunluğunda asemptomatik geçirilmektedir. Sitomegalovirusun meydana getirdiği en önemli klinik tablolar; yenidoğanlarda sitomegalik inklüzyon hastalığı, bağışıklık sistemi normal kişilerde heterofil negatif mononükleoz ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde interstisyel pnömonidir (2, 5, 13, 14). Tanı için sık kan alınan, aynı hemodiyaliz aletlerini kullanan ve sık kan transfüzyonu uygulanan hemodiyaliz hastaları ile taşıdığı mortalite ve morbidite riskiyle gebe hastalar diğer riskli grupları oluşturmaktadır (7, 8, 10).

Edinilme riski doğumla başlayıp seroprevalansı yaşla artış gösteren HCMV enfeksiyonunun çeşitli hasta gruplarında önemli mortalite ve morbidite nedeni olması ve konjenital enfeksiyonlarda başlıca etken olarak bilinmesi hastalığın hızlı ve kesin tanısını gündeme getirmiştir (7, 14).

Anti-HCMV IgM pozitifliği ya da IgG titresindeki artış enfeksiyonu (primer ya da reaktivasyon) göstermektedir. Antikor yanıtı antijenemiden sonra meydana gelmekte olup periferik lökositlerde virüsün iç matriks foproteini (protein kinaz) pp65 veya p65'in (65-68 kD) boyanması temeline dayanan antijeneminin saptanması ise aktif enfeksiyonun erken tanısı ve takibinde daha anlamlı bulunmaktadır (3, 15-19).

Özellikle yetersiz veya gecikmiş bağışıklığı olan bireylerde antijenemi ile antikor pozitifliği beraber seyrebilmektedir (17, 20). Anti-HCMV IgM pozitif olan çeşitli olgularda immüfloresan yöntem kullanılarak antijenemi (viremi) varlığının araştırılması amacıyla bu çalışma planlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma; Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda saptanan anti-HCMV IgM (AxSYM, ref: 69-1027/R3) pozitif olgular üzerinde, Ocak 1999- Temmuz 2000 tarihleri arasında prospektif olarak yapıldı. Değişik kliniklerden çeşitli indikasyonlarla istenen ve mikropartikül enzim immün assay (MEIA) (AxSYM System Abbott, G655 Graphic Series, ABD) yöntemiyle pozitif bulunan anti-

HCMV IgM antikoruna sahip olgularda HCMV antijenemi araştırıldı. Yalancı pozitifliği dışlamak amacıyla romatoit faktör (RF) ile eliminasyon uygulandı. Yine tüm olgularda anti-HCMV IgG (AxSYM, ref: 69-1027/R3) araştırıldı.

Antijenemi araştırılması amacıyla olgulardan 5 ml EDTA'lı tüpte kan örnekleri alındı. Kan örnekleri dekstren solüsyonu ile birlikte 10 ml'lik konik tipli Falcon tübünde bir pipet yardımıyla nazikçe karıştırıldıktan sonra 37°C'de 20 dakika kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonucu üstte kalan lökosit zengin kısım (buffy coat) eritrositlerle karıştırılmadan alındı ve başka bir konik tübe aktarıldı. Fosfatlı tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandıktan sonra santrifüj edildi. Eritrosit lizis solüsyonuyla kalan eritrositler hemoliz edildi. Elde edilen lökosit fraksiyonundan mililitrede 2×10^6 hücre olarak şekilde süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyondan 100 µl (2×10^5 hücre) üç dakika süreyle 900 rpm'de sitospinlendi. Biri kontrol olmak üzere iki slayt hazırlandı. Biri -80°C'de saklandı. Slaytlar kurutulup formaldehit fiksasyonu ve membran permeabilizasyonu uygulandıktan sonra yıkandı ve kurulandı. Slaytlar 30 µl anti-HHCMV pp65 (1C3+AYM-1 klonu) monoklonal antikor (CINAKIT 19-002, Argene-Biosoft, Fransa) ile 37°C'de nemli ortamda 30 dakika inkübe edildi. Fosfatlı tampon solüsyonu ile yıkanıp kurulandıktan sonra 30 µl floresin izotiyosiyanat (FITC) işaretli anti-mouse IgG+IgM F(ab')₂ ve Evans mavisi ile karıştırılıp 30 dakika 37°C'de nemli ve karanlık ortamda inkübe edildi. Önce PBS ile sonra distile su ile yıkandıktan sonra lamelle kapatılıp 40x veya 100x (immersiyon ile) büyütmede incelendi. Floresin izotiyosiyanat ile elma yeşili renginde nükleer boyanmış polimorf çekirdekli lökositler sayıldı. Tüm alanda iki ve üzeri sayıda yeşil floresans veren hücreler pozitif olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 56 olgunun 28'i (% 50) erkek, 28'i (% 50) kadın hasta olup yaş ortalamaları 36.89 ± 12.2 (2-67) olarak saptandı. Çalışmaya en fazla olgu Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nden (% 48.2) alınırken, diğer olgular İç Hastalıkları (% 23.2), Kadın-Hastalıkları ve Doğum (16.1), Çocuk Hastalıkları (% 7.1) Kliniklerinden katıldı.

İmmün sistemi değişik derecelerde etkileyen alta yatan hastalığa göre bakıldığında, olguların klinik tanı veya ön tanılarına göre en fazla klinik tablonun % 17.9 oranıyla gebe hastalar olduğu belirlendi. Ateş ve rutin takip nedeniyle değerlendirilen böbrek yetmezliği, gebelik, malignensi gibi klinik tablolar dışında ateş nedeniyle hastaneye başvuran ve yapılan etyolojik araştırmalarda başka bir etyoloji saptanmayan olgular, anti-CMV IgM saptan

masıyla kuşku HCMV infeksiyonu olarak değerlendirildi (Tablo 1).

Tablo 1. Anti-sitomegalovirus IgM pozitif bulunan olguların klinik tanı/öntanıları

Klinik tanı/ön tanı	Sayı	Yüzde
Gebelik	10	17.9
Böbrek yetmezliği	8	10.7
Transplante böbrek	2	3.6
Malignensi	8	14.3
Diğer*	30	53.5
Toplam	56	100.0

* 20 nedeni bilinmeyen ateş etyolojisi ve sistemik infeksiyon; beş organ infeksiyonu; beş kollajen doku hastalığı

Anti-HCMV IgM pozitifliği ortalama 1.412 MI (0.500-9.960 MI) titresinde saptandı (cut-off 0.500-0.750 MI). Tüm olgularda anti-HCMV IgG pozitif (> 250 AU/ml) bulundu. Antijenemi, NHL tanısıyla kemoterapi gören, tedavi sırasında ateşi yükselen ve başka bir etyolojik neden bulunamayan, anti-HCMV IgM titresi 0,600 MI olan bir olguda saptandı. Bu olguda 2×10^5 hücrede dokuz pozitif hücre sayıldı.

TARTIŞMA

Dünyanın her bölgesinde görülebilen HCMV infeksiyonunun tek kaynağı insandır ve doğal bulaşma yakın temas ile olmaktadır (1, 2, 6, 13). Hastalığın seroprevalansındaki en fazla artışlar perinatal dönem ile cinsel olgunluk dönemlerindedir (2, 11, 14). Primer infeksiyonu takiben infeksiyöz virüsün uzamış atılımı duyarlı nüfus arasında yayılımı artırmakta; virüs atılımı konjenital, perinatal ve erken postnatal infeksiyonlarda yıllarca sürebilmektedir (6, 13).

Sitomegalovirus infeksiyonunun tanısı immün sistemi baskılanmış hastalarda tedavi açısından çok önemlidir. Antijeneminin başlamasından sonra HCMV'ye karşı ortalama 7-10 gün sonra IgM yanıtı, 15 gün sonra IgG yanıtı saptanabilmektedir (2, 5, 15). Primer infeksiyon sonrası IgM pozitifliği 16-20 hafta kadar sürebilmekte, bazen de reaktivasyon ve eşcinseller gibi kronik infekte gruplarda IgM pozitifliği görülebilmektedir (2, 13). Bu nedenle, HCMV serolojisi birincil infeksiyon dışında çok yardımcı değildir.

Sitomegalovirus izolasyonu (örneğin shell-vial yöntemi) anlamlıdır (16, 18), ancak pahalı ve zaman alan bu yöntem özellikle Türkiye'de bir çok merkezde rutin olarak yapılamamaktadır. Sitomegalovirus'un moleküler biyolojik yöntemlerle tanısı ise henüz standardize edilmemiştir (2, 17, 20).

Sitomegalovirus hastalığının tanısı, kandan HCMV izolasyonuna alternatif olarak lökositlerde viral antijenlerin gösterilmesi (antijenemi testi) ile önem kazanmıştır (15, 18). Testin üç saat gibi kısa bir sürede sonuç vermesi, ciddi seyreden bir tablonun tedavisi için önemlidir. Deneyin duyarlılığı ve özgüllüğü % 80'in üstünde (semptomatik hastalarda % 100) bildirilmekte olup, viral izolasyon, hızlı kültür ve serolojiden daha duyarlıdır (15-18). Periferik kan lökositlerinden HCMV izolasyonu (viremi) ve/veya pp65 antijenemisinin saptanması aktif infeksiyonu göstermektedir. Pozitif pp65 antijenemisi asemptomatik duran veya viseral bir atakla meydana gelen yaygın infeksiyonu gösterir (2, 5, 13).

Düşük düzeydeki antijenemi asemptomatik infeksiyonla, şiddetli antijenemi semptomatik infeksiyonla ilişkili bulunmuştur. Negatif sonuçlar infeksiyonu ekarte etmemekte ve düşük düzeyde antijenemide en uygun stratejinin belli aralıklarla deneyin tekrarlanması olduğu vurgulanmaktadır. Çünkü ciddi infeksiyonlarda antijeneminin kantitatif değerinin hızla yükseldiği bilinmektedir (14, 16, 19). Antijeneminin kantitatif değerinin takibi; hastalığın gidişini değerlendirmek ve antiviral tedavinin süresini, ilaç direncini belirlemede kullanılabilir (13, 18).

Virüs primer infeksiyonun dışında konağın bağışıklık sisteminin baskılanmasıyla reaktive olur; ancak sadece immünsüpresyonla değil, kan transfüzyonu gibi değişik nedenlerle de primer veya rekürren infeksiyonlar (reinfeksiyon veya reaktivasyon) gelişebilmektedir (2, 13).

Gebelikte özellikle üçüncü trimesterde viral eksresyon artmaktadır. Buna karşılık, seronegatif kadınlarda gebelikte infeksiyon insidansı % 2-2.5 oranındadır (6). Gebe kadınların primer infeksiyonlarında başlıca kaynak subklinik infeksiyona sahip küçük bebek ve çocuklardır. Yirminci haftadan önce saptanan akut HCMV infeksiyonunda gebeliğin sonlandırılmasını öneren yazarların yanında, gebelikte görülen HCMV infeksiyonlarının çoğunun tekrarlayan infeksiyon olması, fetal sekel olasılığının azalması, gebeliğin her döneminde fetal infeksiyon olabilmesi nedeniyle rutin olarak gebelerin araştırılması ve gebeliğin sonlandırılmasını önermeyen yazarlar da vardır (7, 16). Gebelik öncesi veya başlangıcında seropozitiflik araştırılarak seronegatif olguların ateşli hastalık durumlarında HCMV antijenemisi açısından izlenmesi en uygun yaklaşım olacaktır.

Sitomegalovirus seropozitifliği; toplumun genelinde olduğu gibi, hemodiyaliz hastalarında da yaygın olarak bulunmaktadır. Hemodiyalize giriş sayısının HCMV infeksiyonuna etki edip etmediği saptanmamıştır (8), ancak infeksiyona yatkın olan hemodiyaliz hastalarında serolojik kontrollerin yapılması uygun olacaktır.

Bağışıklık sistemi normal olarak düşünülen bireylerde asemptomatik veya mononükleoz sendromu şeklindeki klinik tablolarda anti-HCMV IgM pozitifliği saptanabilmektedir (3, 13). Bu pozitiflik primer infeksiyon dışında reaktivasyon veya yanlış pozitiflik olarak yorumlanabilir.

Bu çalışmada; anti-HCMV IgM pozitifliği olan gebelik, böbrek yetmezliği, malignensi ve değişik risk altındaki olguların, yalnız birinde antijenemi testi pozitif olarak bulundu. Anti-HCMV IgG'si pozitif olan bu olgu reaktivasyon olarak yorumlandı ve gansiklovir ile tedavisi düzenlendi, ancak hasta kendi isteğiyle takipten ayrıldı. Diğer olgularda antijeneminin saptanması, ne HCMV akut infeksiyonunu ne de reaktivasyonunu dışlamamak-

tadır. Sitomegalovirus infeksiyonu düşünülen olgularda serolojik pozitiflik saptandığında, antijeneminin de araştırılması önemli bir yaklaşım olabilir. Her ne kadar antijenemi serolojik yanıtın önce görülse de yetersiz-gecikmiş immün yanıt nedeniyle antikorla beraber pozitif saptanabilir. Ancak bu çalışmada olguların yalnız birinde bu birliktelik bulundu. Bu durum, serolojik pozitiflikten sonra antijenemi testinin çok anlamlı olmadığını ortaya koymaktadır. İdeal olan antijeneminin özellikle transplant alıcısı gibi ciddi immünsupresif bireyler ile seronegatif gebe kadınlar ve hemodiyaliz hastalarının akut ateşli hastalığı durumlarında antikor yanıtından önce araştırılması ve buna göre tedavinin yönlendirilmesidir.

KAYNAKLAR

1. Günhan C. Sitomegalovirus infeksiyonları. Topçu-Willke A, Söyletir G, Doğanay M, ed. *İnfeksiyon Hastalıkları*'nda. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1996: 532-7.
2. Crumpacker CS. Cytomegalovirus. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 2000: 1586-98.
3. Bilgiç A, Özacar T. İnsan sitomegalovirusu. Ustaçelebi Ş, ed. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*'de. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 835-41.
4. Weber B, Fall EM, Berger A, Doerr HW. Screening of blood donors for human cytomegalovirus (HCMV) IgG antibody with an enzyme immunoassay using recombinant antigens. *J Clin Virol* 1999; 14: 173-81.
5. Kano Y, Shiohara T. Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. *J Dermatol Sci* 2000; 22: 196-9.
6. Lu SC, Chin LT, Wu FM, et al. Seroprevalence of CMV antibodies in a blood donor population and premature neonates in the south-central Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci* 1999; 15: 603-10.
7. Mustakangas P, Sama S, Ammala P, Muttillainen M, Koskela P, Koskiniemi M. Human cytomegalovirus seroprevalence in three socioeconomically different urban areas during the first trimester: a population-based cohort study. *Int J Epidemiol* 2000; 9: 587.
8. Sümer H, Şanlıdağ T, Poyraz Ö, Candan F. Hemodiyaliz hastalarında sitomegalovirus seropozitifliği. *İnfek Derg* 1998; 12: 199-201.
9. Cengiz T, Kıyan M, Dolapçı I G, Aysel D, Tibet M. Çeşitli yaşlardan çocukların serumlarında ELISA ile sitomegalovirus ve rubella virus IgG ve IgM antikorlarının araştırılması. *Mikrobiyol Bül* 1996; 30: 87-94.
10. Kaleli B, Kaleli İ, Aktan E, Yurdakul B, Akşit F. Gebelerde rubella ve sitomegalovirus infeksiyonu. *İnfek Derg* 1997; 11: 325-7.
11. Poyraz Ö, Özçelik S, Saygı G, Çeliksöz A. Genelev kadınlarında herpes simpleks virus ve sitomegalovirus antikorlarının araştırılması. *İnfek Derg* 1995; 9: 161-3.
12. Uluhan R, Yaman A, İkit M, Köksal F, Akan E. Hematolojik ve solid organ malignensili hastalarda HSV tip-2, HCMV ve adenoviruslara karşı oluşmuş antikorların (IgG) araştırılması. *Gaziantep Üniv Tıp Fak Derg* 1995; 6: 131-6.
13. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: Methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 533-7.
14. Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, Lanari M, Bovicelli L, Nicolosi A, Landini MP. Prenatal diagnosis of symptomatic congenita cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 476-9.
15. Chiaramonte S, Pellizzer G, Rasso M, et al. Role of antigenemia assay in the early diagnosis and treatment of CMV infection in renal transplant patients. *Clin Nephrol* 2000; 53: 10-12.
16. Weinberg A, Hodges T N, Li S, Cai G, Zamora 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.
17. Verschuuren EA, Harmsen MC, Limburg PC, et al. Towards standardization of the human cytomegalovirus antigenemia assay. *Intervirology* 1999; 42: 382-9.
18. George K, Rinaldo CR. Comparison of cytomegalovirus antigenemia and culture assays in patients on and off antiviral therapy. *J Med Virol* 1999; 59: 91-7.
19. Günseren F, Çolak D, Özkul A ve ark. Detection of cytomegalovirus antigenemia in a patient with acute myeloblastic leukemia. *İnfek Derg* 1998; 12: 245-7.
20. Zeytinoğlu A, Özacar T, Erensoy S ve ark. Renal transplant alıcılarında sitomegalovirus (HCMV) antijenemi testi ile HCMV hastalığı tanısı. *İnfek Derg* 1999; 13: 35-7.