

SİTOMEGALOVİRÜS-DNA SAPTANMASINDA IN-HOUSE PCR VE GERÇEK ZAMANLI PCR YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

COMPARISON OF IN-HOUSE PCR WITH REAL-TIME PCR FOR THE DETECTION OF CYTOMEGALOVIRUS-DNA

Esmâ DENİZ¹, Selma GÖKAHMETOĞLU², M. Altay ATALAY²

¹Nuh Naci Yazgan Göğüs Hastalıkları Hastanesi;

²Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; Kayseri

Anahtar Sözcükler: Sitomegalovirüs, in-house PCR, gerçek zamanlı PCR

Keywords: Cytomegalovirus, in-house PCR, real time PCR

Geliş: 20 Mayıs 2009

Kabul: 01 Haziran 2009

ÖZET

Sitomegalovirüs (CMV) immunsuprese kişilerde ciddi hastalık yapabilen Herpes grubuna ait bir virüstür. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerde CMV-DNA saptanmasında in-house PCR ve gerçek zamanlı PCR yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmaya; 22 serum, bir idrar, bir bronko-alveoler lavaj ve bir balgam örneği olmak üzere toplam 25 klinik örnek alınmıştır. Klinik örneklerde in-house PCR yöntemiyle (Maksim Biotech, Inc., ABD) ve gerçek zamanlı PCR yöntemiyle (Fluorion, Iontek, Türkiye) CMV-DNA araştırılmıştır. İstatistiksel analiz için McNemar ki kare testi kullanılmıştır. Dört örnekte in-house PCR ve gerçek zamanlı PCR ile, iki örnekte sadece gerçek zamanlı PCR ile, bir örnekte sadece in-house PCR ile CMV-DNA pozitifliği saptanmıştır. Onsekiz örnekte ise hem in-house PCR hem de gerçek zamanlı PCR ile CMV-DNA negatif bulunmuştur. Toplam 22 (%88) örnekte in-house PCR ve gerçek zamanlı PCR arasında uyum saptanmıştır. İstatistiksel analizde her iki testin sonuçları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Sonuç olarak, gerçek zamanlı PCR ve in-house PCR yöntemlerinin CMV-DNA saptanmasında uyumlu olduğu görülmüştür.

SUMMARY

Cytomegalovirus is a member of the Herpes family, causing severe disease in immunocompromised hosts. The aim of this study was to compare in-house PCR with real-time PCR for the detection of CMV-DNA in clinical specimens.

Twentyfive clinical specimens were included in the study. These specimens were 22 sera, one urine, one bronchoalveolar lavage and one sputum. Cytomegalovirus-DNA was detected in clinical specimens with in-house PCR (Maksim Biotech, Inc., USA) and real-time PCR (Fluorion, Iontek, Turkey). The results from two techniques were compared with McNemar chi square test for statistical analysis. Cytomegalovirus-DNA was found positive in four specimens both by in-house PCR and real-time PCR, in two specimens only by real-time PCR and in one specimen only by in-house PCR. Cytomegalovirus-DNA was found negative in 18 specimens both by in-house PCR and real-time PCR methods. The agreement between the methods were estimated as 22 (88%). There was no statistically significant difference between in-house PCR and real-time PCR ($p>0.05$). It was concluded that real-time PCR and in-house PCR methods are in agreement for detection of CMV-DNA in clinical specimens.

GİRİŞ

Sitomegalovirüs (CMV), immunsuprese kişilerde ciddi hastalık yapabilen Herpes grubuna ait bir virüstür (1). Dünya üzerindeki bireylerin %40-100'ü CMV ile hayatla-

rının bir döneminde karşılaşmıştır. Sitomegalovirüs enfeksiyonu genellikle çocukluk döneminde subklinik olarak geçirilmektedir (2, 3). Sitomegalovirüs transplant alıcılarında, AIDS hastalarında ve yenidoğanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır (4-7).

Sitomegalovirüs infeksiyonunun tanısında serolojik testler, kültür yöntemleri, CMV antijenemi testi ve moleküler yöntemler uygulanmaktadır. Sitomegalovirüs-DNA saptaması yapan moleküler yöntemlerden Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nin en duyarlı yöntem olduğu pek çok araştırmacı tarafından belirtilmektedir. Gerçek zamanlı (real-time) PCR teknolojisi temel olarak nükleik asit dizisinin eş zamanlı olarak çoğaltılması ve kantitasyonuna dayanır. Bu amaçla, floresans veren bazı boya ya da probalar ile oluşan floresansı saptayabilen ısı-döngü aygıtları (thermal cyclers) kullanılır. Gerçek-zamanlı PCR teknolojisi kullanılan sistemlerde çoğaltma ürünlerinin belirlenmesinde elektroforez gibi ayrı bir basamak kullanılmadığından hem zamandan kazanç sağlanılmakta hem de kontaminasyon riskini azaltmaktadır (8, 9).

Bu çalışmada; çeşitli klinik örneklerde CMV-DNA saptamasında in-house PCR (Maksim Biotech, Inc., ABD) ve gerçek zamanlı PCR (Fluorion, Iontek, Türkiye) yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı'na CMV-DNA saptaması için gönderilen 25 klinik örnek çalışmaya alındı. Bu örnekler; 22 serum, bir idrar, bir bronkoalveoler lavaj ve bir balgam örneğinden oluşmaktaydı. Örneklerin altısı Pediatri, beşi Hematoloji, 11'i Kemik İliği Transplantasyon Merkezi, biri Yoğun Bakım Ünitesi, biri Beyin Cerrahisi, biri Kadın-Doğum Ünitesi'nden gelmişti. Klinik örnekler çalışma gününe kadar -20° C'de saklandı.

DNA izolasyonu: Serum örneklerinden DNA izolasyonu QIAamp® MiniElute® VirusSpin (QIAGEN, Almanya), serum dışı örneklerden DNA izolasyonu ise QIAamp® Mini Kit® VirusSpin (QIAGEN, Almanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Her iki DNA amplifikasyon işlemlerinde de aynı izolatlar kullanıldı.

Gerçek zamanlı PCR yöntemiyle DNA amplifikasyonu: PCR karışımı flurion CMV QNP 2.0 amplifikasyon kiti (Iontek, Türkiye) kullanılarak hazırlandı. Her bir örnek için PCR karışımından 15'er µL optik tüplere eklendi. Üzerlerine izole edilen DNA'dan 10'ar µL eklendi. PCR amplifikasyonunun gerçekleşebilmesi için iCycler (BioRad, ABD) aygıtına yerleştirildi. Örneklerin 95° C'de 13.30 dakika başlangıç denatürasyon basamağından sonra 95° C'de 0.30 dakika, 54° C'de 1.30 dakika sürelerinde 50 döngüde amplifikasyonu gerçekleştirildi.

BioRad iCycler aygıtına bağlı bilgisayarda teste uygun program oluşturularak amplifikasyon verileri toplandı. Gerçek zamanlı PCR yönteminin dinamik aralığı 1.2×10^3 - 1.2×10^6 kopya/mL olarak, testin analitik saptama sınırı 100 kopya/mL olarak kabul edildi. Gerçek zamanlı PCR yönteminde hiç amplifikasyon görülmeyen örneklerin sonucu <100 kopya/mL; CMV-DNA 100-1200 kopya/mL arasında olanların sonucu ise <1200 kopya/mL olarak rapor edildi.

In-house PCR: PCR karışımı Maxim Biotech CMV-DNA kiti kullanılarak hazırlandı. Her bir örnek için PCR karışımından 15'er µL optik tüplere eklendi. Üzerlerine izole edilen DNA'dan 10'ar µL eklendi. PCR amplifikasyonunun gerçekleşebilmesi için in-house PCR cihazına (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, ABD) yerleştirildi. Örneklerin 96° C'de 1 dakika denatürasyon basamağından sonra 94° C'de 1 dakika, 58° C'de 1 dakika 72° C'de 1 dakika sürelerinde 45 döngüde amplifikasyonu gerçekleştirildi ve 72° C'de 10 dakika son uzama basamağı ile sonlandırıldı. Oluşan amplifikasyon ürününden 12 µL ve yükleme boyasından 3 µL karıştırılarak etidyum bromütle boyanmış %1'lik agaraya yüklendi. 150 voltta 30 dakika yürütüldükten sonra transluminatörde incelendi. Sonuçlar CMV pozitif kontrolü ve negatif kontrolü ile karşılaştırılarak verildi.

İstatistiksel analiz: İstatistiksel analiz için SPSS 13.0 programı kullanıldı. Her iki yöntem arasında fark anlamlılığı için McNemar ki kare testi kullanıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada, 25 klinik örneğin altısında (%24) CMV-DNA gerçek zamanlı PCR yöntemi ile pozitif, 19 (%76)'unda negatif bulundu. In-house-PCR yöntemi ile beşinde (%20)'inde pozitif ve 20 (%80)'sinde negatif bulundu.

Her iki yöntemle CMV-DNA dört örnekte pozitif ve 18 örnekte negatif bulundu. Bir örnekte sadece CMV-DNA in-house PCR yöntemi ile pozitif bulundu. İki örnekte ise sadece gerçek zamanlı PCR yöntemi ile CMV-DNA pozitif bulundu.

McNemar ki kare testi ile yapılan analizde in-house PCR ve gerçek zamanlı PCR testlerinin pozitif ve negatif sonuçları saptamada istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediği saptandı ($p=1$, $p>0.05$). Gerçek zamanlı PCR yöntemi ve in-house PCR yöntemi ile elde edilen sonuçlar Tablo 1'de gösterildi.

Tablo 1. Gerçek zamanlı PCR ve in house-PCR ile elde edilen CMV-DNA sonuçları

Testler	Real-time PCR Pozitif	Real-timePCR Negatif	Toplam
In house-PCR pozitif	4	1	5
In-house PCR negatif	2	18	20
Toplam	6	19	25

TARTIŞMA

Sitomegalovirüs bağışıklık sistemi normal olan bireylerde nadiren semptomatik hastalık oluşturmaya karşın immunsuprese bireylerde özellikle transplant alıcılarında ve intra-uterin infeksiyon sonrası yenidoğanda önemli morbidite ve mortalite nedenleri arasındadır.

Transplant alıcılarında semptomlar oluşmadan önce CMV infeksiyonunu belirlemek ve pre-emptif tedaviye başlamak mortalite açısından çok önemlidir (6, 10). Klasik olarak antijenemi belirlenmesi aktif hastalığın önemli bir göstergesi olsa da özellikle kemik iliği transplant alıcılarında moleküler yöntemlerle CMV-DNA belirlenmesi daha duyarlı ve özgül bulunmuştur (8, 11). Konjenital CMV infeksiyonu geçiren yenidoğanlar da moleküler yöntemlerle CMV-DNA saptanmasının önemi çalışmalarda gösterilmiştir (4, 5).

Sitomegalovirüs infeksiyonlarının tanısında konvansiyonel yöntemlere göre PCR daha pratik ve duyarlıdır. Kalitatif ve kantitatif yöntemlerin viral DNA belirlenmesinde birlikte kullanımının, CMV infeksiyonunun tanımlanmasında daha etkili olduğu düşünülmektedir (12). Gabriele ve ark. (11) çalışmalarında, kalitatif ve kantitatif in-house PCR ile CMV-DNA araştırmışlardır. Bu çalışma her iki yöntemin birlikte kullanımı asemptomatik hastalığın belirlenmesinde daha iyi sonuçlar verebileceği göstermiştir (11).

Bizim çalışmamızda CMV infeksiyonu şüpheli çeşitli hasta gruplarından CMV-DNA in-house PCR ve gerçek zamanlı PCR yöntemleriyle araştırılmıştır. Her iki yöntemle CMV-DNA dört (%16) örnekte pozitif bulunurken 18 (%72) örnekte negatif bulunmuştur. Çalışmada toplam 22 (%88) örnekte uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Ülkemizde Çırak ve ark. (13)'ün çalışmalarında da yine kalitatif ve kantitatif moleküler yöntemler karşılaştırılmış ve yöntemlerin uyumluluğu %76.2 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, gerçek zamanlı PCR ve in-house PCR yöntemlerinin CMV-DNA saptanmasında pozitif ve negatif sonuçlarının uyumlu olduğu görüldü. Bununla birlikte, iki farklı PCR yönteminin eş zamanlı kullanımı CMV-DNA belirlenmesinde pozitiflik oranını arttıracığından, daha doğru sonuç verilmesine olanak sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

1. **Hodinka RL.** Human Cytomegalovirus. In: Murray PR, ed., *Manual of Clinical Microbiology*. Vol 2. 8th ed. Washington, DC: ASM Press, **2003**: 1304-18.
2. **Doymaz MZ.** *Medikal Viroloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **1994**: 334-41.
3. **Griffiths P.** Cytomegalovirus infection of the central nervous system. *Herpes* **2004**; 11 (Suppl 2): 95-104.
4. **Paixao P, Almeida S, Gouveia P, et al.** Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools. *J Virol Methods* **2005**; 128: 1-5.
5. **Distefano AL, Alonso A, Martin F, et al.** Human Cytomegalovirus: detection of congenital and perinatal infection in Argentina. *BMC Pediatr* **2004**; 23: 4-11.
6. **Piiparinen H, Höckerstedt K, Grönhagen-Riska C, et al.** Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of loads from peripheral blood of organ transplant patients. *J Clin Virol* **2004**; 30: 258-66.
7. **Tarrago D, Mateos ML, Avellon A, et al.** Quantitation of CMV DNA in CSF and serum specimens from AIDS patients using a novel highly sensitive nested competitive PCR and the Cobas Amplicor CMV Monitor. *J Med Virol* **2004**; 72: 249-56.
8. **Kulkarni A, Westmoreland D, Fox JD.** Molecular based strategies for assessment of CMV infection and disease in immunosuppressed transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* **2001**; 7: 179-86.
9. **Abacıoğlu H.** Moleküler yöntemlerde yeni gelişmeler ve yeni teknolojiler. KLİMİK Adana 2001 Kitabında, 191-192.
10. **Pumannova M, Roubalova K, Vitek A, et al.** Comparison of quantitative competitive polymerase chain reaction enzyme linked immunosorbent assay with LightCycler based polymerase chain reaction for measuring CMV-DNA in patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2006**; 54: 115-20.

11. **Gabriele HB, Martie WT, Günter E, et al.** Cytomegalovirus diagnosis in renal and bone marrow transplant recipients: the impact of molecular assays. *J Clin Virol* **2001**; 20: 49-57.
12. **Çırak MY, Rota S, Maral I, Türet S, Sindel Ş.** A follow up study of cytomegalovirus infection in a group of Turkish renal transplant recipients using molecular assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* **2005**; 100: 263-7.
13. **Çırak MY, Külâh C, Aydın A, Türet S, Rota S.** İmmünsupresif hastalarda sitomegalovirüs DNA'sının kalitatif ve kantitatif moleküler yöntemlerle araştırılması. *Mikrobiyol Bül* **2002**; 36: 177-81.

İLETİŞİM

Doç. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
KAYSERİ
e-posta: selmag@erciyes.edu.tr