

Gansiklovir Tedavisi Alan İmmün Yetmezlikli Hastalarda, CMV UL54 ve UL97 Gen Bölgelerinde Gansiklovir Direncinin Araştırılması*

Investigation of Ganciclovir Resistance in CMV UL54 and UL97 Gene Regions in Immunocompromised Patients Receiving Gancyclovir Treatment

Safiye DELİCE¹, Selma GÖKAHMETOĞLU¹, Leylagül KAYNAR², Musa KARAKÜKCÜ³

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

¹ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kayseri, Turkey.

² Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

² Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Hematology, Kayseri, Turkey.

³ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Hematoloji, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri.

³ Erciyes University Faculty of Medicine, Division of Pediatric Hematology, Department of Pediatrics, Kayseri, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 20.11.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 25.03.2015

* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSU-12-3776 no'lu proje ile desteklenmiştir.

ÖZ

Sitomegalovirus (CMV), immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi morbidite ve mortalite nedeni olabilmektedir. Bu tip hastalarda, CMV hastalığının önlenmesi ve tedavisinde gansiklovir (GCV) başarıyla kullanılmakla birlikte, GCV direnci giderek artan oranlarda bildirilmektedir. Bu çalışmada, GCV tedavisi görmekte olan, ancak viral yükün (≥ 1000 kopya/mL) gerilemediği hastalarda, GCV direncinin dizi analizi yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, kemik iliği transplantasyonu (KİT) yapılan 25 hasta ile hematoloji bölümünde izlenen beş hasta (non-hodgkin lenfoma, akciğer kanseri, difüz büyük B hücreli lenfoma, kombine immün yetmezlik ve kronik lenfositler lösemi) olmak üzere toplam 30 hasta dahil edilmiştir. Hastalarda CMV-DNA düzeyi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (QIASymphony, Artus® CMV QS-RGQ kit, Qiagen, Almanya) ile izlenmiş; CMV antiviral ilaç direncine yol açan mutasyonların saptanması için UL97 gen bölgesinde 420-664 kodonlarını, UL54 gen bölgesinde 261-588 ve 740-987 kodonlarını kapsayan gen bölgelerinin DNA dizi analizi (ABI 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, ABD) yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 30 hastanın birinde (%3.3) (1. hasta) CMV UL97 gen bölgesinde M460V mutasyonu; birinde (%3.3) (2. hasta) ise UL54 gen bölgesinde L802M mutasyonu ve ayrıca

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Safiye Delice, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 38039 Talas, Kayseri, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 505 530 2028, **E-posta (E-mail):** safiyedelice@hotmail.com

P887S ve S897L varyant dizileri tespit edilmiştir. Birinci hasta, 20 yaşında erkek olup akut miyeloid lösemi nedeniyle KİT uygulanan bir hastadır. Antiviral ilaç direnci araştırılan kan örneği, transplantasyonun 117. gününde alınmıştır (eş zamanlı viral yük 4470 kopya/mL) ve bu örnek alındığında hasta 70 gündür GCV kullanılmaktadır. Birinci hastanın tedavisinde valgansiklovir (VGCV) ve foskarnet (FOS) kullanılmış ve izleme alınmıştır. İkinci hasta, 19 yaşında erkek olup, akut lenfoblastik lösemi nedeniyle KİT uygulanan bir hastadır. Antiviral ilaç direnci araştırılan kan örneği, transplantasyonun 109. gününde alınmıştır (eş zamanlı viral yük 4830 kopya/mL) ve bu örnek alındığında, hasta 26 gün GCV ve 40 gün VGCV kullanmıştır. İkinci hastanın tedavisinde FOS ve sidofovir kullanılmış, ancak hasta altta yatan hastalıklar nedeniyle kaybedilmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, GCV tedavisi alan immün yetmezlikli hastaların %6.6 (2/30)'sında ilaç direnci mutasyonları saptanmış ve CMV antiviral ilaç direncinin belirlenmesinin, antiviral tedavinin planlanmasında klinisyene yardımcı olacağı kanaatine varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Sitomegalovirus; gansiklovir; antiviral direnc; dizi analizi.*

ABSTRACT

Cytomegalovirus (CMV) is a main cause of severe morbidity and mortality in immunocompromised patients. Ganciclovir (GCV) is used for both prophylaxis and treatment of CMV disease with successful results, however GCV resistance has been increasingly reported. The aim of this study was to investigate the GCV resistance in patients whose viral loads did not decline (≥ 1000 copies/mL) despite of receiving GCV treatment, by using sequence analysis method. A total of 30 patients, 25 of them were bone marrow transplant (BMT) and five who were followed in hematology clinics (non-Hodgkin lymphoma, lung cancer, diffuse large B cell lymphoma, combined immune deficiency, chronic lymphocytic leukemia) were included in the study. CMV-DNA levels were monitored by real-time polymerase chain reaction (QIASymphony, Artus[®] CMV QS-RGQ kit, Qiagen, Germany), and DNA sequence analysis (ABI 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA) was performed to detect the mutations leading to CMV antiviral drug resistance in following gene regions: 420-664 codons in UL97 gene region and 261 to 588 and 740 to 987 codons in UL54 gene region. Of 30 patients included, M460V mutation in CMV UL97 gene region was detected in one (3.3%) (1st case) and L802M mutation in UL54 gene region, in addition to P887S and S897L variant sequences in another patient (3.3%) (2nd case). The first patient was a 20-year-old male with acute myeloid leukemia who underwent BMT. The blood sample for the investigation of antiviral drug resistance was taken on the 117th day of transplantation (with simultaneous viral load 4470 copies/mL) and the patient has been using GCV for 70 days when the sample was taken. Valganciclovir (VGCV) and foscarnet (FOS) were used for the therapy of the first patient and monitored. The second patient was a 19-year-old male with acute lymphoblastic leukemia who underwent BMT. The blood sample for the investigation of antiviral drug resistance was taken on the 109th day of transplantation (with simultaneous viral load 4830 copies/mL) and the patient received GCV for 26 days and VGCV for 40 days when the sample was taken. FOS and cidofovir were used for the therapy of the second patient but the patient was lost due to the underlying diseases. In conclusion, mutations responsible for GCV resistance was detected in 6.6% (2/30) of immunocompromised patients receiving GCV, indicating that the determination of CMV antiviral drug resistance may help clinicians for planning the antiviral therapy.

Keywords: *Cytomegalovirus; ganciclovir; antiviral resistance; sequence analysis.*

GİRİŞ

Tüm dünyada son derece yaygın olan sitomegalovirus (CMV), erken yaşlarda, sıklıkla belirtisiz olarak kazanılmakta ve vücutta latent olarak kalmaktadır. İmmün sistemi normal olan kişilerde sorun oluşturmamasına karşın, CMV, solid organ veya kemik iliği transplant

alıcıları, kemoterapi alan kanser hastaları ve AIDS'li hastalar gibi immün yetmezliği olanlar konaklarda ciddi hastalıklara neden olmaktadır^{1,2}. Bu tip hastalarda virus atılımı daha fazla ve uzun sürelidir; yaygın enfeksiyon ve komplikasyonların görölme olasılığı fazladır³.

Gansiklovir (GCV), CMV'ye bağlı enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi için ilk seçenek olarak kullanılmaktadır⁴. CMV hastalığının tedavisinde etkinliği ilk gösterilmiş ilaç olup hem immün süpresif hastalardaki pnömoni, hepatit, retinit, meningoensefalit, özofajit, kolit gibi tablolarda etkin olduğu bulunmuş, hem de kemik iliği, karaciğer, kalp ve akciğer alıcılarında enfeksiyon insidansını belirgin olarak düşürdüğu gösterilmiştir². CMV antiviral ilaç direncinin en yaygın iki nedeni, protein kinazı kodlayan UL97 geni ve UL54 DNA polimeraz genindeki mutasyonlardır. Literatür incelendiğinde, CMV antiviral ilaç direnç çalışmalarında en sık çalışılan gen bölgesinin UL97 olduğu görölmektedir⁵. Tedavi sonrası GCV'e dirençli CMV izolatlarının %90'ından fazlasında UL97 mutasyonları bulunmaktadır^{6,7}. UL97 geninde mutasyon olmaksızın UL54 mutasyonu, GCV direncine nadiren neden olmaktadır⁸. UL97 gen bölgesindeki GCV direnç mutasyonları yoğun olarak 460., 520. ve 590-607. kodonlarda kümelenmiştir⁹.

CMV'nin antiviral ajanlara duyarlılığını test etmek için fenotipik ve genotipik testler uygulanmaktadır¹⁰. Genotipik testler fenotipik testler ile karşılaştırıldığında daha ucuz ve hızlı sonuç verirler; ancak seçilen hedef dışındaki mutasyonları saptayamazlar¹¹. Bu çalışmada, kemik iliği transplantasyonu ve hematoloji bölümlerinde takip edilen hastalardan izole edilen CMV suşlarında GCV direncinin DNA dizi analizi yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakóltesi Etik Kurul onayı (20.09.2011 tarih ve 2011/07 no'lu karar) ile gerçekleştiren bu çalışmada; kemik iliği transplantasyonu (KİT) ve hematoloji bölümlerinde takip edilen, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonucuna göre CMV DNA viral yükü 1000 kopya/mL ve üzerinde olup gansiklovir tedavisi alan, tedaviye rağmen viral yükün gerilemediği, hatta artmaya devam ettiği 30 hastanın plazma örneği retrospektif olarak araştırıldı. Çalışmaya dahil edilen 30 hastanın 25'i KİT alıcısı ve 5'i hematoloji bölümünde non-hodgkin lenfoma (NHL), akciğer kanseri, difüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL), kombine immün yetmezlik (KİY) ve kronik lenfositer lösemi (KLL) tanısı ile takip edilen hastalardı. KİT alıcılarının 23'üne allojenik KİT (AKİT), 2'sine otolog KİT (OKİT) yapılmıştı. AKİT yapılan 23 hastanın 2'si çocuk hasta idi. Anti-CMV IgG ve anti-CMV IgM varlığı hastaların ve vericilerin serumlarında ELISA yöntemi ile ticari kitler (Euroimmun, Almanya) kullanılarak araştırıldı.

Plazma örneklerinde CMV DNA tayini gerçek zamanlı PCR yöntemi (QIASymphony, Artus® CMV QS-RGQ kit, Qiagen, Almanya) ile araştırıldı. CMV-DNA kit ölçüm aralığı 80-100.000.000 kopya/mL, analitik duyarlılığı ise 42 kopya/mL idi. CMV suşlarında GCV direnci, UL97 ve UL54 gen bölgelerinde DNA dizi analizi (ABI 310 Genetic Analyzer) yöntemiyle belirlendi. Örneklerden DNA izolasyonu EZ1 Advanced cihazı (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın ön gördüğu EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, Almanya) test kiti prosedürüne uygun olarak yapıldı. CMV'nin UL97 (fosfotransferaz) gen bölgesin-

de bilinen GCV direncine neden olan mutasyonları belirlemek üzere PCR yönteminde Zeytinoğlu ve arkadaşları¹² tarafından daha önce tanımlanan primer çiftler kullanıldı. CMV'nin UL54 (DNA polimeraz) gen bölgesinde bilinen GCV direncine neden olan mutasyonları belirlemek üzere "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) veri tabanından CMV Towne suşu (FJ616285) gen dizileri alındı ve ilgili bölgeleri çoğaltmak üzere gerekli primerler tasarlandı. CMV dizileri Clustral W2 Multipl Sequence Alignment programı ile hizalandı ve oligonükleotidler, bu alignment üzerindeki konsensus bölgeler üzerinden belli direnç mutasyonlarını dışarıda bırakmayacak şekilde Vector NTI (Invitrogen) programı kullanılarak tasarlandı. Hem pozitif kontrol olarak hem de PCR optimizasyonunda gerçek zamanlı PCR kiti (QIASymphony, Artus® CMV QS-RGQ kit, Qiagen, Almanya) ile pozitif olduğu belirlenen DNA'lar kullanıldı. CMV genomunun UL97 ve UL54 bölgelerinde GCV direnci ile ilişkili kodonları kapsayan bölgeyi PCR ile çoğaltmak için tasarlanan primer dizileri Tablo I'de gösterildi.

Mutasyonları belirlemek üzere UL54 gen bölgesi iki PCR reaksiyonu, UL97 bölgesi bir PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı. UL97 bölgesi için 732 baz çifti (bç); UL54 bölgesi için ise 981 ve 741 bç'lik iki bölge amplifiye edildi. PCR reaksiyonu Bio-Rad DNA Engine (ABD) cihazında gerçekleştirildi. Amplifikasyon işlemi için kullanılan protokoller Tablo II'de belirtildi.

PCR ürünleri, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Almanya) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda saflaştırıldı ve PCR ürünlerinin dizi analizi, her iki dizi için

Tablo I. PCR primerleri

Hedef Bölge	Primer Dizisi (5' - 3')	PCR Ürünü (bç)
UL54 1. Bölge	F - TGGTGTTCCTGGAATCGTTA R - GGATCTGCTGTCCGTCAAAG	981
UL54 2. Bölge	F - GCCCACAACCTCTGCTACTC R - GCACGCCGTATTCTTGACT	741
UL97	F - GTTCCACACAGACATGTTT R - GCTTCTACCACGAATGCT	732

F: Forward; R: Reverse; bç: baz çifti.

Tablo II. PCR protokolleri

Aşama	UL54 Ortak PCR Protokolü	UL97 PCR Protokolü
Aktivasyon	95°C 15 dk	95°C 15 dk
Denatürasyon	95°C 35 sn	95°C 40 sn
Bağlanma	58°C 45 sn	56°C 45 sn
Uzama	72°C 45 sn	72°C 1.5 dk
Son uzama	72°C 5 dk	72°C 5 dk

F: Forward; R: Reverse; bç: baz çifti.

ayrı ayrı gerçekleştirildi (İontek Laboratuvarı, İstanbul). Dizilerin analizi için referans dizi ile karşılaştırırken Technelysium ChromasPro yazılımı kullanıldı ve mutasyondan sorumlu nükleotid değişimleri incelendi. Hasta takipleri esnasında CMV-DNA yükündeki artış 0.5 log'dan (veya bazal seviyenin 3 katı) fazla ise, anlamlı olarak kabul edildi¹³.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 30 hastanın birinde UL97 gen bölgesinde M460V; birinde ise UL54 gen bölgesinde L802M mutasyonu ve ek olarak P887S, S897L varyant dizileri tespit edilmiştir. Antiviral ilaç direnci tespit edilen hastaların özellikleri Tablo III'de gösterilmiştir.

Birinci hastada, AKİT sonrası 1. ayda ishal gelişmesi ve kanda CMV-DNA yükünün 1120 kopya/mL olması üzerine, CMV koliti ön tanısıyla rektum biyopsisi planlanmıştır. Hastanın kan (7370 kopya/mL), gaita ve rektum biyopsi örneklerinde CMV-DNA pozitif bulunması üzerine GCV tedavisi başlanmıştır. Hasta, GCV tedavisi almaya devam ederken kan CMV-DNA düzeyinin 9930 kopya/mL ve 36100 kopya/mL bulunması nedeniyle GCV tedavisine VGCV eklenmiştir. Transplantasyonun 120. gününde bulantı, kusma ve ishal şikayeti olan hastaya gastrointestinal sistem endoskopisi yapılmış ve biyopsi sonucuna göre CMV özefajiti olarak değerlendirilmiştir. Aynı dönemde ikili antiviral tedavi alan hastanın CMV-DNA sonuçlarının 704 kopya/mL ve 4470 kopya/mL'ye yükselmesinden

Tablo III. CMV Antiviral İlaç Direnci Saptanan Hastaların Özellikleri

Özellik	1. Hasta	2. Hasta
Mutasyonlar	M460V (UL97)	L802M (UL54) P887S; S897L (Varyant)
Transplant tipi	AKİT	AKİT
Yaş / Cinsiyet	20 / E	19 / E
Altta yatan hastalık	AML	ALL
CMV serolojisi (IgG)	Verici pozitif; alıcı pozitif	Verici pozitif; alıcı pozitif
CMV-PCR (maksimum, kopya/mL)	36100	8110
CMV hastalığı	CMV koliti; CMV özefajiti; GVHD cilt, GIS, KC	---
Klinik semptomlar	Cilt lezyonları, ishal, bulantı, kusma, nötropenik ateş, atelektazi	Nötropenik ateş, böbrek fonksiyon testlerinde bozulma, solunum sıkıntısı
Laboratuvar bulguları	Trombositopeni; hematüri; yük- sek BDG düzeyi; C.difficile toksin (+); yüksek KCFT	Trombositopeni; hematüri; BKV-DNA (+)
Ek hastalık	Osteoporoz	<i>P. jirovecii pnömonisi</i> , nöropati
Aldığı antiviral ilaç	GCV (iv), VGCV (oral), FOS (iv)	VACV (oral), GCV (iv), VGCV (oral), FOS (iv), CDV (iv)
Prognoz	Yaşıyor	Eksitus

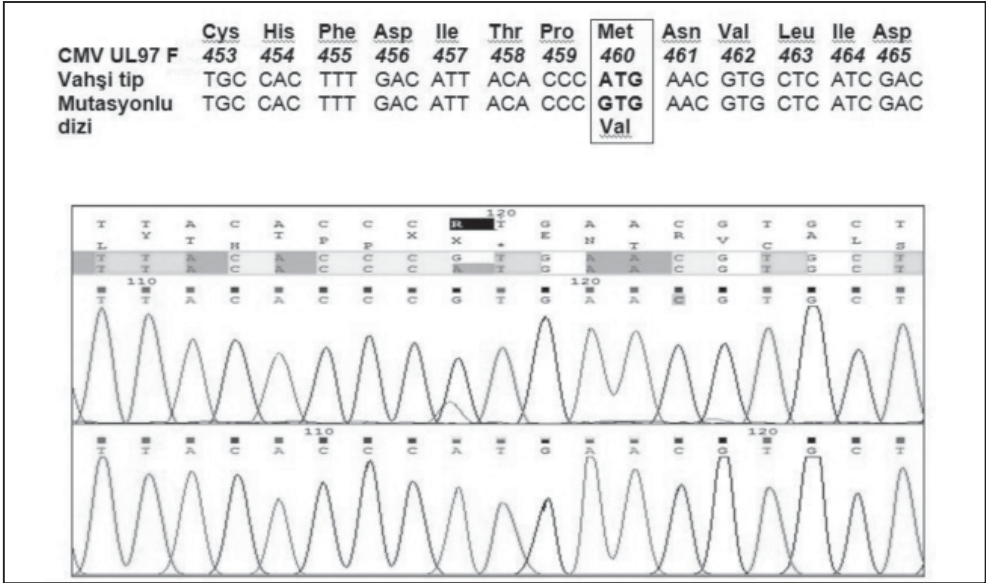
AML: Akut miyeloblastik lösemi; ALL: Akut lenfoblastik lösemi; BDG: Beta-D-Glukan; BKV: BK virus; CDV: Sidofovir; FOS: Foskarnet; GCV: Gansiklovir; GVHD: Graft-versus-host hastalığı; iv: intravenöz; KCFT: Karaciğer fonksiyon testleri; VACV: Valasiklovir; VGCV: Valgansiklovir.

dolayı antiviral ilaç direnci olduğu düşünülüp FOS tedavisine geçilmiştir. Eş zamanlı yapılan rektum biyopsi sonucu CMV koliti ile uyumlu gelmiştir. FOS tedavisinin başlamasıyla CMV viremi düşmeye başlamış ve 2 hafta sonra düşük pozitif (< 80 kopya/mL) olarak saptanmıştır. Hastanın kanında CMV-DNA saptanmaması üzerine FOS tedavisi 40. gününde sonlandırılmıştır. Takipleri 7 ay normal seyreden hastanın karaciğer fonksiyon testlerinin yüksek bulunması üzerine karaciğer biyopsisi yapılmış ve GVHD ile uyumlu bulunmuştur. Hasta cilt, gastrointestinal ve karaciğer GVHD'si için üçlü immünosüpresif (siklosporin, mikofenolat mofetil, prednizolon) tedavisi almakta ve takipleri hematoloji bölümünde halen devam etmektedir. Antiviral ilaç direnci araştırılan kan örneği, transplantasyonun 117. gününde elde edilen örnek olup, CMV yükü 4470 kopya/mL'dir. Bu kan örneği alındığında, hasta 70 gündür GCV ve 50 gündür VGCV tedavisi almaktadır. CMV antiviral ilaç direncine yol açan UL97 ve UL54 mutasyonlarının tespiti için yapılan çalışma sonucunda; UL54 gen bölgesinde antiviral direnç saptanmazken hastada UL97 gen bölgesinde M460V mutasyonu tespit edilmiştir.

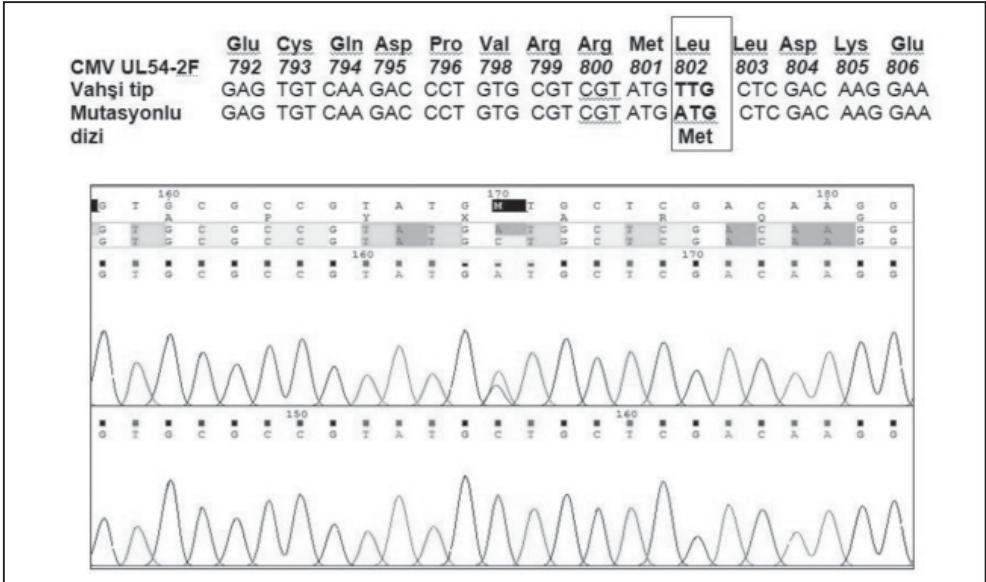
İkinci hasta, ALL tanısı ile takip edilmekte olup, 40 günlük GCV tedavisi sonucu CMV-DNA'sının negatif bulunması üzerine tedavi sonlandırılmış ve KİT planlanmıştır. Hastaya AKİT (α/β T hücre seleksiyonlu haploidentik nakil) yapılmış ve GVHD profilaksisi için herhangi bir immünosüpresif tedavi uygulanmamıştır. Hastanın ateşinin yükselmesi ve CMV-DNA'nın düşük pozitif (< 80 kopya/mL) bulunması üzerine GCV başlanmıştır; ancak GCV'nin kemik iliğini baskılayacağı ve engraftmanı geciktireceği düşüncesiyle VACV'ye geçilmiştir. Kan CMV-DNA düzeyinin artmasıyla VACV tedavisinden tekrar GCV tedavisine geçilmiştir. Hasta GCV alırken CMV viral yükünün 1050 kopya/mL ve 2270 kopya/mL olarak artmaya devam etmesi üzerine VGCV tedavisine başlanmıştır. Tedavi altında CMV-DNA düzeyinde gerileme olmaması üzerine FOS tedavisine başlanmıştır. FOS tedavisinin 26. gününde hematürisi olan hastada, BK virus DNA'sı pozitif bulunmuş ve bu sonuç hematüri nedenini açıklamıştır. FOS tedavisi altında CMV viral yükü 8110 kopya/mL'den 94.5 kopya/mL'ye kadar gerilemiş; ancak tekrar yükselme eğilimine geçip 3030 kopya/mL olunca hastaya CDV tedavisi verilmiştir. Hasta transplantasyonun 100. gününde ALL nüks olarak rapor edilip kemoterapi almaya başlamış ve hastada bir hafta sonra nötropenik ateş gelişmiştir. Hastanın toraks tomografi sonucuna göre *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi düşünülmüş ve trimetoprim-sülfametoksazol, meropenem, levofloksasin başlanmıştır. Tedavi altında iken solunum sıkıntısı artan hastada solunum ve kardiyak arrest gelişmiş ve transplantasyonun 110. gününde kaybedilmiştir. Bu hastanın, CMV antiviral ilaç direnci araştırılan kan örneği, transplantasyonun 109. gününde alınmış ve CMV yükü 4830 kopya/mL olarak bulunmuştur. Hastadan izole edilen CMV suşunda UL97 gen bölgesinde antiviral direnç saptanmazken; UL54 DNA polimeraz gen bölgesinde L802M mutasyonu ile birlikte P887S, S897L varyant dizileri tespit edilmiştir. Antiviral direncin saptandığı bu dönemde hasta; 17 gün VACV, 26 gün GCV, 40 gün VGCV, 52 gün FOS ve 15 gün CDV tedavisi almıştır. Çalışmada saptanan dirençle ilişkili mutasyonların hizalama ve kromatogram sonuçları Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

CMV'de görülen UL97 mutasyonları arasında belirlenmiş en yaygın gansiklovir (GCV) direnç mutasyonu M460V mutasyonudur. Başlangıç tedavisi olarak GCV almış hastala-



Şekil 1. UL97 gen bölgesinde saptanan M460V mutasyonu hizalama ve kromatogram sonucu.



Şekil 2. UL54 gen bölgesinde saptanan L802M mutasyonu hizalama ve kromatogram sonucu.

rın dirençli izolatlarının %80'den fazlasında M460V/I, H520Q, C592G, A594V, L595S ve C603W mutasyonları saptanmıştır¹⁰. Hanz ve arkadaşlarının¹⁴ çalışmasında, M460V (3/17), A594V (2/17), L595S (6/17) ve L595F (2/17) direnç mutasyonlarını; Boivin ve arkadaşları¹⁵ ise GCV'ye dirençli klinik izolatların yaklaşık %70'inin UL97 kodonundaki

üç mutasyondan (460, 594 ve 595) birini içerdiğini gösterilmiştir. Kim ve arkadaşları¹⁶ da, pediatrik kemik iliği transplant hastalarında GCV direncini %5.1 oranında tespit etmişlerdir. Rapor edilmiş GCV'ye dirençli CMV hastalığının insidansı, transplantasyon sonrası yetişkin kalp transplant alıcılarında %1.5, pediatrik AKİT alıcılarında %3.8 olarak bulunmuştur¹⁷. Bir başka çalışmada, 30 pediatrik AKİT alıcısından birinde (%3.3), CMV UL97 gen bölgesinde GCV direnci (M460V ve M460I) bulunmuştur¹⁸. Türkiye'de, UL97 gen bölgesindeki GCV direncini araştırmaya yönelik, ulaşılabilen üç çalışma bulunmaktadır^{12,19,20}. Bu çalışmaların biri renal transplant alıcılarında yapılmış olup herhangi bir mutasyon saptanmazken¹⁹; CMV ensefaliti olan bir hematopoetik kök hücre alıcısında UL97 M460V direnç mutasyonu saptanmıştır²⁰. Olgu sunumu olan diğer çalışmada ise UL97 gen bölgesinde C607F direnç mutasyonu tespit edilmiştir¹². Bizim çalışmamızda, CMV enfeksiyonu gelişen immün süpresif 30 hastanın birinde (%3.3) UL97 gen bölgesinde M460V mutasyonu bulunmuştur. Bu hasta, mutasyonla uyumlu olarak GCV tedavisine yanıt vermemiş, foskarnet (FOS) tedavisinden yanıt alınmıştır. Tedavi sonrası bu hastanın viral yükündeki değişiklik, CMV hastalığının nüks ve/veya gelişiminde, vireminin önemli bir belirleyici olduğunu vurgulamaktadır.

CMV antiviral ilaç direncinin, uzun süreli antiviral tedavi sonrasında görüldüğü çalışmalarla gösterilmiştir¹⁶. Yapılan çalışmalarda, beş UL54 gen bölgesinde antiviral ilaç direnç mutasyonu doğrulanmış; N408K, D413E ve A987G'nin GCV ve sidofovir (CDV) direncine; L802M'nin GCV ve FOS direncine ve A834P mutasyonunun çoklu ilaç direncine yol açtığı belirlenmiştir^{14,21-23}. Jabs ve arkadaşları²⁴ yaptıkları çalışmada, CMV retinitli 210 hastanın 26'sında antiviral ilaç direnci tespit etmişler ve bu hastalardan 8 (%3.8)'inde UL54 gen bölgesinde antiviral ilaç direnç mutasyonlarını saptamışlardır. Bovin ve arkadaşları²⁵ da, solid organ transplant alıcısı olan 275 hastada yapmış oldukları çalışmada, 13 (%4.7) hastada GCV direncine neden olan mutasyon tespit etmişler; bu mutasyonların 10 (%3.6)'unun UL97, 2 (%0.7)'sinin UL54 ve birinin (%0.3) hem UL97 hem de UL54 gen bölgesinde olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, CMV enfeksiyonu gelişen 30 hastanın birinde (%3.3) UL54 gen bölgesinde L802M mutasyonu bulunmuş ve ayrıca iki varyant dizisi P887S, S897L tespit edilmiştir. Bu hasta, hem uzamış antiviral tedavi, hem de CMV enfeksiyonundan kaynaklanan immün yetmezlikle antiviral direnç için potansiyel riske sahiptir. Ancak, çalıştığımız kan örneklerinin hastalar tedaviye başladıktan sonra alınmış olması ve tedavi öncesi serumların incelenmemiş olması nedeniyle, hastalardaki ilaç direncinin uzun süreli tedavi ile ilişkilendirilmesi mümkün olamamıştır. Tespit edilen L802M mutasyonunun FOS ve GCV'e direnç kazandırdığı bilinmektedir. Bu hastada FOS tedavisine rağmen viral yükün artmış olması bu bilgiyi desteklemektedir. Literatür incelendiğinde UL54 gen bölgesinde antiviral ilaç direncinin nadiren görüldüğü anlaşılmaktadır. Bu çalışmada, UL97 gen bölgesi ile birlikte UL54 gen bölgesinin çalışılmış olması, çalışmaya dahil edilen hastaların birinde yalnızca UL54 gen bölgesinde gelişen mutasyonun saptanmasına olanak sağlamıştır.

Çalışmamızda, CMV UL54 gen bölgesinde L802M mutasyonu saptanan hastada P887S ve S897L varyant dizileri tespit edilmiştir. UL54 gen bölgesinin varyant dizileri (S897L, P887S, S655L, N685S, A885T, D898N), sıklıkla diğer çalışmalarda da bildirilmiş

ve fenotipik testlerle GCV, FOS ve CDV'e duyarlı oldukları bulunmuştur²⁶⁻²⁸. Chou ve arkadaşları²² transplant alıcıları ve AIDS'li hastalardan izole ettikleri CMV klinik izolatlarında yapmış oldukları çalışmada, S897L ve D898N aminoasit değişikliklerini tespit etmişler, aynı zamanda fenotipik testlerle bu varyant dizilerin üç antiviral ilaca da (GCV, FOS, CDV) duyarlı olduğunu göstermişler.

UL97 ve UL54 mutasyonlarının kombinasyonu ve mutasyonlar ile birlikte polimorfik mutasyon kombinasyonlarının, tedavi yetmezliği ve ölümcül klinik sonuca ilişkin rolü olabilir²⁹. Hem mutasyonlarla ilişkili polimorfizmlerin hem de UL97 ve UL54 mutasyonlarının kombinasyonlarının rolü, klinik sonuçlar ve tedavi yetmezliği açısından incelenmelidir. Klinik başarısızlık, ilaca dirençli virus ile ilişkili olabileceği gibi, hastanın immün durumu ve ilacın hastaya özgü farmakokinetik özellikleri gibi başka faktörlerle de ilişkili olabilir. Bazı ilaçların oral emiliminin ve plazma proteinlerine bağlanmasının zayıf olması, biyoyararlanımını sınırlayabilir³⁰. Klinisyenler bu hastaların tedavileri sırasında; transplantasyonun zamanı, immün süpresyonun yoğunluğu ve tipi, UL97 mutasyonlarının sıklığı ve testlerin yorumlanmasını da içeren faktörler arasında dengeleyici kararlar vermek zorundadır⁷. Direnç araştırmaları sonucunda saptanan her genetik mutasyon, klinik dirence yol açmayabilir. Herhangi bir mutasyonun antiviral dirence yol açıp açmadığının belirlenmesinde, referans yöntem olarak fenotipik testler önerilmektedir. Sonuç olarak çalışmamızda, bir (%3.3) hastada CMV UL97 gen bölgesinde M460V mutasyonu, bir (%3.3) hastada da UL54 gen bölgesinde L802M mutasyonu saptanmış; CMV antiviral ilaç direncinin belirlenmesinin, antiviral tedavinin planlanmasında klinisyene yardımcı olacağı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Hodinka RL. Human Cytomegalovirus, pp: 1549-63. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
2. Us T. Cytomegalovirus (HHV5), s:1679-89. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed), İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2008, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
3. Çolak D, Mutlu D. Herpes grubu viruslar, s: 509-52. Us AD, Ergünay K (ed), Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 2012, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
4. Peixoto M, Mascarenhas L, Cunha A, et al. Recurrent and persistent cytomegalovirus infection in a kidney recipient caused by the L595S mutation in UL97 phosphotransferase gene. Antivir Ther 2012; 17(3): 585-8.
5. Gilbert C, Boivin G. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(3): 873-83.
6. Shafer RW, Einav S, Chou S. Mechanism of resistance to antiviral agents, pp:1689-704. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
7. Benzi F, Vanni I, Cassina G, et al. Detection of ganciclovir resistance mutations by pyrosequencing in HCMV infected pediatric patients. J Clin Virol 2012; 54(1): 48-55.
8. Göhring K, Hamprecht K, Jahn G. Antiviral drug and multidrug resistance in cytomegalovirus infected SCT patients. Comput Struct Biotechnol J 2015; 13: 153-9.
9. Gilbert C, Bestman-Smith J, Boivin G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. Drug Resist Updat 2002; 5(2): 88-114.

10. Eckle T, Prix L, Jahn G, et al. Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes. *Blood* 2000; 96(9): 3286-9.
11. Smith IL, Cherrington JM, Jiles RE, et al. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis* 1997; 176(1): 69-77.
12. Zeytinoğlu A, Büke A.Ç, Turhan A ve ark. Tedavi sırasında gelişen gansiklovir direnci; Olgu sunumu. 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 10-13 Kasım 2013, Antalya. Kongre Kitabı, s: 397, PS464.
13. Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 2009; 113(23): 5711-9.
14. Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazon MC, et al. Drug resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(12): 2628-40.
15. Boivin G, Gilbert C, Gaudreau A, et al. Rate of emergence of cytomegalovirus (CMV) mutations in leukocytes of patients with acquired immunodeficiency syndrome who are receiving valganciclovir as induction and maintenance therapy for CMV retinitis. *J Infect Dis* 2001; 184(12): 1598-602.
16. Kim YJ, Boeckh M, Cook L, et al. Cytomegalovirus infection and ganciclovir resistance caused by UL97 mutations in pediatric transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2012; 14(6): 611-7.
17. Li F, Kenyon KW, Kirby KA, et al. Incidence and clinical features of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease in heart transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2007; 45(4): 439-47.
18. Arellano-Galindo J, Vázquez-Meraz E, Jiménez-Hernández E, et al. The role of cytomegalovirus infection and disease in pediatric bone marrow transplant recipients in Mexico City in the context of viral drug resistance. *Pediatr Transplant* 2011; 15(1): 103-11.
19. Turhan A, Zeytinoğlu A, Utkun E ve ark. Renal transplant alıcılarında gansiklovir direncinin araştırılması. 7. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi, 5-8 Haziran 2012, Ankara. Kongre Kitabı, s: 319, PP-092.
20. Arslan F, Tabak F, Avşar E, et al. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus encephalitis in a hematopoietic stem cell transplant recipient. *J Neurovirol* 2010; 16(2): 174-8.
21. Scott GM, Weinberg A, Rawlinson WD, Chou S. Multidrug resistance conferred by novel DNA polymerase mutations in human cytomegalovirus isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(1): 89-94.
22. Chou S, Lurain NS, Thompson KD, et al. Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus. *J Infect Dis* 2003; 188(1): 32-9.
23. Chou S, Marousek G, Bowlin TL. Cyclopropavir susceptibility of cytomegalovirus DNA polymerase mutants selected after antiviral drug exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(1): 197-201.
24. Jabs DA, Martin BK, Forman MS, et al. Mutations conferring ganciclovir resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis. *J Infect Dis* 2001; 183(2):333-7.
25. Boivin G, Goyette N, Rollag H, et al. Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *Antivir Ther* 2009; 14(5): 697-704.
26. Fillet AM, Auray L, Alain S, et al. Natural polymorphism of cytomegalovirus DNA polymerase lies in two nonconserved regions located between domains delta-C and II and between domains III and I. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(5): 1865-8.
27. Shao PL, Lu MY, Liau YJ, et al. Lack of resistance-associated mutations in UL54 and UL97 genes of circulating cytomegalovirus strains isolated in a medical center in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2012; 111(8): 456-60.
28. Chou S, Lurain NS, Weinberg A, Cai GY, Sharma PL, Crumpacker CS. Interstrain variation in the human cytomegalovirus DNA polymerase sequence and its effect on genotypic diagnosis of antiviral drug resistance. *Adult AIDS Clinical Trials Group CMV Laboratories. Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(6): 1500-2.
29. Göhring K, Wolf D, Bethge W, et al. Dynamics of coexisting HCMV-UL97 and UL54 drug-resistance associated mutations in patients after haematopoietic cell transplantation. *J Clin Virol* 2013; 57(1): 43-9.
30. Arens MQ, Swierkosz EM. Susceptibility Testing Methods: Viruses, pp: 1705-18. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2007, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.