

Türkiye’de Farklı Coğrafi Bölgelerde ve Farklı Hasta Gruplarındaki Sitomegalovirus İzolatlarının Glikoprotein B Genotiplerinin Belirlenmesi

Determination of Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Different Geographical Regions and Different Patient Groups in Turkey

Duygu EREN DAĞLAR¹, Gözde ÖNGÜT², Dilek ÇOLAK², Aykut ÖZKUL³, Derya MUTLU², Ayşın ZEYTİNOĞLU⁴, Kenan MİDİLLİ⁵, Selma GÖKAHMETOĞLU⁶, Filiz GÜNSEREN⁷, Dilara ÖĞÜNÇ², Meral GÜLTEKİN²

¹ Aydın Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Aydın.

¹ Aydın State Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Aydın, Turkey.

² Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

² Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Antalya, Turkey.

³ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Ankara University Faculty of Veterinary, Department of Virology, Ankara, Turkey.

⁴ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁴ Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey.

⁵ İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁵ Istanbul University, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

⁶ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

⁶ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kayseri, Turkey.

⁷ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

⁷ Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Antalya, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 29.11.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 02.01.2016

ÖZ

Tüm dünyada yaygın olarak bulunan sitomegalovirus (cytomegalovirus; CMV), immün sistemi normal konaklarda sıklıkla belirtisiz enfeksiyonlara yol açarken, immün yetmezliği olanlarda ve fetusta çok ciddi komplikasyonlara neden olabilmektedir. CMV’nin zarf yapısında yer alan glikoprotein B (gB), bu proteini kodlayan UL55 genindeki polimorfizmlere göre dört genotipe ayrılmaktadır. CMV gB geninde saptanan nükleotid polimorfizmlerinin; virusun hücre tropizmini, konağın immün yanıtını ve sonuçta CMV’nin patogenezi etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu araştırmanın amacı, Türkiye’nin farklı bölgelerinden ve farklı hasta gruplarından elde edilen CMV izolatlarının gB genotiplerinin belirlenmesidir. Çalışmaya,

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Dilek Çolak, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 07070, Arapsuyu, Antalya, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 242 249 6405, **E-posta (E-mail):** dcolak@akdeniz.edu.tr

Akdeniz, Ege, İstanbul Cerrahpaşa ve Erciyes Üniversiteleri Tıp Fakültesi Hastanelerinde 2001-2014 yılları arasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve/veya antijenemi testi ile CMV enfeksiyonu saptanmış olan toplam 136 hastaya (66 kadın, 70 erkek; yaş aralığı: 0-65 yıl, yaş ortalaması: 24.03 ± 17.17) ait klinik örnek dahil edilmiştir. Olguların 80'i böbrek transplant (BT) alıcısı, 35'i kök hücre transplant (KHT) alıcısı, 13'ü yenidoğan, yedisi kalp transplant (KT) alıcısı ve biri gebeden oluşmaktadır. CMV gB genotiplendirme PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) yöntemiyle gerçekleştirilmiş; farklı genotiplerden rastgele seçilen 15 izolatın DNA dizi analizi sonucunda filogenetik analiz yapılmıştır. İncelenen 136 (135 plazma, 1 amniyon sıvısı) örnekte en sık saptanan genotip gB1 (n= 44, %32.4) olmuş, bunu gB2 (n= 39, %28.6), gB3 (n= 36, %26.5) ve gB4 (n= 8, %5.9) izlemiş, dokuz (%6.6) örnekte ise tiplendirme yapılamamıştır. Hasta gruplarına göre incelendiğinde; BT alıcılarında gB1 %32.3, gB2 %28.7, gB3 %26.5 ve gB4 %5.9; KHT alıcılarında gB1 %34.3, gB2 %28.6, gB3 %22.9 ve gB4 %5.7; KT alıcılarında gB3 %57.1, gB1 %14.3 ve gB2 %14.3; yenidoğanlarda gB1 %38.4, gB3 %30.8, gB2 %15.4 ve gB4 %7.7 oranlarında saptanmış, bir gebe hastada ise gB2 genotipi tanımlanmıştır. Çalışmamız, CMV gB genotiplerinin belirlenmesine yönelik tanımlayıcı bir araştırma niteliğinde olduğundan, genotiplerin viral yük, semptomatik hastalık ve prognoz gibi değişkenlerle ilişkisi araştırılmamıştır. Sonuç olarak; dört ayrı ilimizdeki değişik olgu gruplarından farklı CMV gB genotiplerinin izole edilmiş olması, ülkemizdeki CMV gB çeşitliliğini vurgulamaktadır.

Anahtar sözcükler: CMV; transplantasyon; PCR-RFLP; genotip; glikoprotein B; Türkiye.

ABSTRACT

Cytomegalovirus (CMV), a common virus found all around the world, usually causes asymptomatic infections in immunocompetent hosts, however it may lead to serious complications in immunodeficient patients and in the fetus. CMV is divided into four genotypes according to the polymorphisms in UL55 gene that encodes for envelope glycoprotein B. Nucleotide polymorphisms of CMV gB gene can affect the cell tropism of the virus and host immune response and believed to have important changes in the pathogenesis of CMV. The aim of this study was to determine the gB genotypes of CMV isolates from different patient groups selected from different regions of Turkey. A total of 136 clinical specimens from patients (66 female, 70 male; age range: 0-65 years, mean age: 24.03 ± 17.17) who were diagnosed to have CMV infection by polymerase chain reaction (PCR) and/or antigenemia tests, between 2001-2014, in the medical school hospitals of Akdeniz, Ege, İstanbul Cerrahpaşa and Erciyes Universities (located at Mediterranean, Aegean, northwest and central Anatolia regions, respectively), were included in the study. The patient group consisted of 80 renal transplant (RT) recipients, 35 stem cell transplant (SCT) recipients, 13 newborns, seven heart transplant (HT) recipients and one pregnant woman. CMV gB genotypes were determined by PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) method, and DNA sequencing and phylogenetic analysis were performed for the randomly selected 15 isolates with different genotypes. Among 136 (135 plasma, 1 amnion fluid) samples, the most frequent genotype was gB1 (n= 44, 32.4%), followed by gB2 (n= 39, 28.6%), gB3 (n= 36, 26.5%) and gB4 (n= 8, 5.9%); however nine (6.6%) samples could not be genotyped. When analysis were interpreted according to the patient groups, it was determined that the genotypes in RT recipients were gB1 32.3%, gB2 28.7%, gB3 26.5% and gB4 5.9%; in SCT recipients gB1 34.3%, gB2 28.6%, gB3 22.9% and gB4 5.7%; in HT recipients gB3 57.1%, gB1 14.3% and gB2 14.3%; in newborns gB1 38.4%, gB3 30.8%, gB2 15.4% and gB4 7.7%, and gB2 genotype in the pregnant woman. As our study was a descriptive study to determine the genotypes of CMV gB, the relationship between the genotypes and the variants such as viral load, symptomatic disease and prognosis were not analyzed. As a result, the isolation of different gB genotypes in various case groups from four distinctive provinces, underlines the diversity of CMV gB genotypes in Turkey.

Keywords: CMV; transplantation; PCR-RFLP; genotype; glycoprotein B, Turkey.

GİRİŞ

Sitomegalovirus (Cytomegalovirus; CMV); *Herpesviridae* ailesinin betaherpesviruslar alt grubunda bulunan, çift iplikli, zarflı bir DNA virusu olup, insan herpesviruslarının en büyüğüdür. CMV; plasenta yolu, cinsel ilişki, kan transfüzyonu, solid organ ve kemik iliği transplantasyonu ve virusu saçan kişilerle yakın temas sonucunda bulaşmakta; diğer herpesviruslarla benzer olarak primer enfeksiyon, latent enfeksiyon ve reaktivasyon ya da reenfeksiyon şeklinde sekonder enfeksiyona yol açmaktadır. İmmün sistemi normal kişilerde genellikle belirtisiz enfeksiyonlara neden olan CMV, immün yetmezlikli hastalarda ciddi klinik tabloların sorumlusudur. CMV ayrıca intrauterin enfeksiyonlara da yol açmakta; yenidoğanda sağırılık ve nörolojik anomalilerin en önemli viral etkenlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır¹.

CMV patogenezi etkileyen faktörler arasında, nakledilen organ tipi, immün yetmezlik derecesi, uygulanan immün süpresif tedavi, gebelik dönemi gibi konağa ait özelliklerin yanında, virusa ait bazı özellikler de önemli rol oynamaktadır. Bunlar arasında; antiviral ilaçlara direnç ve genotip farklılıkları son yıllarda üzerinde en çok durulan konulardır¹. Viral zarfta yer alan glikoprotein B (gB), yüksek immünojenik özellikte olup, güçlü nötralizan antikor ve sitotoksik T lenfosit yanıtı oluşturmada, virusun konak hücreye tutunmasını, hücreden hücreye geçişini ve enfekte hücrelerin füzyonunu sağlamaktadır^{2,3}. Glikoprotein B'yi kodlayan gende (UL55) saptanan nükleotid polimorfizmlerinin, virusun hücre tropizmini, konak immün yanıtını ve sonuçta CMV patogenezi etkileyebileceği düşünülmektedir⁴. Doğada bulunan CMV suşlarında bugüne kadar dört temel gB genotipi (gB1-4) tarif edilmiş, daha nadir olarak gB5-7 genotipleri de bildirilmiştir^{5,6}.

CMV gB fonksiyonlarına dayanarak, gB genindeki herhangi bir değişikliğin; viral replikasyonu kolaylaştırarak ya da şiddetli bir immünopatolojik yanıt oluşturarak insanda CMV hastalığına yatkınlık sağladığı düşünülebilir⁷. Dünyada bu konuda farklı coğrafi bölgelerde ve farklı hasta gruplarında CMV gB genotiplerinin araştırıldığı çalışmalar yapılmaktadır⁸⁻¹⁰. Ülkemizde bu konudaki çalışmalar sınırlı olup, sadece yenidoğanda yapılmış tek bir çalışma bulunmaktadır¹¹. Böbrek, kök hücre ve kalp transplant alıcılarını kapsayan bir çalışma henüz yapılmamıştır. Bu araştırmanın amacı, Türkiye'nin farklı bölgelerinden ve farklı hasta gruplarından elde edilen CMV izolatlarının gB genotiplerinin belirlenmesidir.

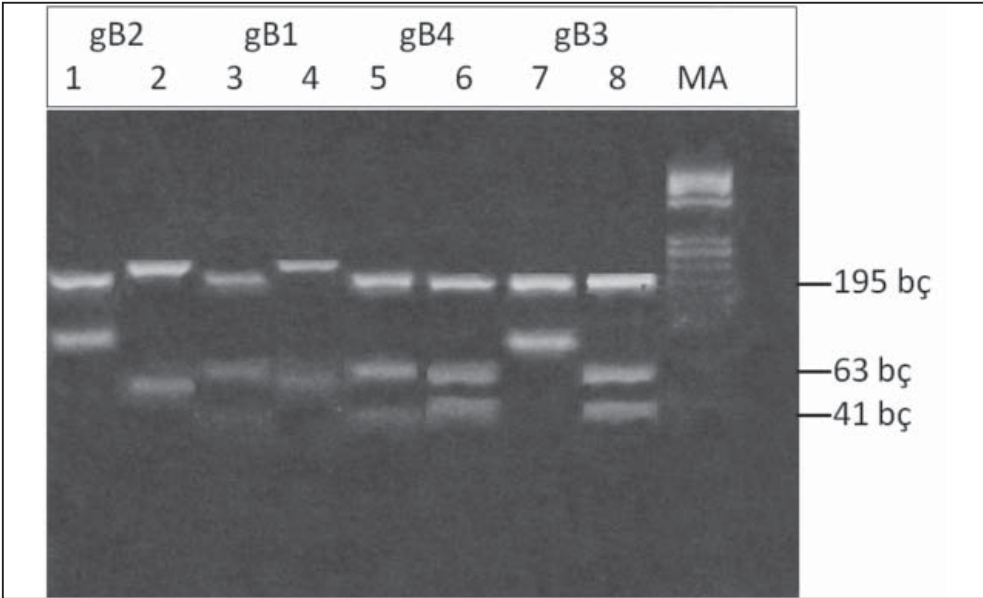
GEREÇ ve YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanan (392/23.12.2015) bu çalışmaya, Akdeniz, Ege, İstanbul Cerrahpaşa ve Erciyes Üniversiteleri Tıp Fakültesi Hastanelerinde 2001-2014 yılları arasında CMV polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve/veya CMV antijenemi testi ile CMV enfeksiyonu saptanmış olan toplam 136 hastaya (80 böbrek transplant alıcısı, 35 kök hücre transplant alıcısı, 13 yenidoğan, 7 kalp transplant alıcısı ve 1 gebe) ait klinik örnek (135 plazma, 1 amniyon sıvısı) dahil edildi.

CMV gB Genotiplendirmesi

DNA ekstraksiyonu ticari bir kit ile (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche Diagnostics; Almanya) üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. CMV gB ge-

notiplendirmesi iki turlu (nested) PCR ve ardından RFLP (restriction fragment length polymorphism) uygulanarak yapıldı. Birinci tur amplifikasyon 5’CTGGGAAGCCTCGGA-ACG’3 ve 5’GAAACGCGCGGCAATCGG’3 primerleri kullanılarak termal çevirici cihazda (Techne, İngiltere); tek döngü 94°C’de 5 dakika; 30 döngü 94°C’de 20 sn, 60°C’de 35 sn, 72°C’de 60 sn ve tek döngü 72°C’de 5 dakika olarak gerçekleştirildi. İkinci tur amplifikasyon ise 5’TGGAACTGGAACGTTTGGC’3 ve 5’GGCAATCGGTTTGTGTA’3 primerleri kullanılarak, tek döngü 94°C’de 5 dakika; 30 döngü 94°C’de 20 sn, 55°C’de 30 sn, 72°C’de 40 sn ve tek döngü 72°C’de 5 dakikada gerçekleştirildi. PCR ürününün %2’lik agaroz jelde elektroforezi ve etidyum bromür boyamayı takiben; 293 baz çifti (bç) bölgesine karşılık gelen bandın UV transilüminatörde (Fotodyne, Foto 21 x 21 cm, ABD) aranması ile amplifikasyon sonuçları analiz edildi. RFLP için CMV izolatlarına ait gB PCR ürünleri farklı tüplerde *RsaI* (10 ünite/μl) ve *HinfI* (10 ünite/μl) kesim enzimleri ile 37°C’de bir gece inkübe edildi. Kesim ürünleri %3’lük agaroz jelde elektroforez sonrası UV transilüminatörde değerlendirildi. *RsaI* kesimi ile genotip 1, 2 ve 3, 4 ayırımı yapıldı. Genotip 1 bant uzunluğu 239 bç ve 66 bç; genotip 2 bant uzunluğu 239 bç ve 63 bç; genotip 3 bant uzunluğu 195 bç, 63 bç ve 41 bç; genotip 4 bant uzunluğu 195 bç, 66 bç ve 44 bç olarak görüldü. *HinfI* kesimi ile genotip 1 ve 2’nin kendi arasındaki ayırımı ile genotip 3 ve 4’ün kendi arasındaki ayırımı yapıldı. Genotip 1 için 202 bç, 67 bç ve 36 bç; genotip 2 için 202 bç ve 100 bç; genotip 3 için 202 bç ve 97 bç; genotip 4 için 202 bç, 67 bç ve 36 bç bant uzunluğu aranarak genotiplendirme yapıldı (Şekil 1). Belirlenen kalıplara uymayan kesimler “tiplendirilemedi” olarak kaydedildi.



Şekil 1. Restriksiyon enzim kesimine göre CMV gB genotipleri (Hat 1 ve 2: Genotip 2, sırasıyla *HinfI* ve *RsaI* kesimi; Hat 3 ve 4: Genotip 1, sırasıyla *HinfI* ve *RsaI* kesimi; Hat 5 ve 6: Genotip 4, sırasıyla *HinfI* ve *RsaI* kesimi; Hat 7 ve 8: Genotip 3, sırasıyla *HinfI* ve *RsaI* kesimi; MA: Moleküler ağırlık).

DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi ekonomik kısıtlılık nedeniyle sadece 15 örneğe uygulanabildi. Bu amaçla; farklı genotiplerden rastgele seçilen 15 CMV izolatının (5 gB1, 4 gB2, 5 gB3 ve 1 gB4), gB genotiplerine ait PCR ürünleri ticari sistemler kullanılarak reaksiyon bileşenlerinden temizlendikten sonra, Thermo Sequenase Dye Terminator Sequence Kit (Amersham Biosciences, ABD) kullanılarak ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, ABD) sisteminde DNA dizi analizi uygulandı. Elde edilen dizilerin edisyonu LaserGene paketi içinde yer alan SeqMan programı kullanılarak gerçekleştirildi ve diziler fasta formatına çevrilerek kaydedildi.

Filogenetik Analiz

Bu amaçla, DNA dizi analizi yapılan 15 izolatın CMV UL55 gen bölgesine ait gB'nin kesim bölgelerini kapsayan 200 bç'lik fasta formatındaki dizileri (JN204332-JN204346 olarak GenBank'a kaydedilmiştir) ile GenBank'tan indirilmiş olan prototip gB genotiplerine ait diziler (M60927 gB1, M60929 gB1, M60931 gB2, M60933 gB3, M60926 gB4, AC146906 gB5) kullanıldı. UPGMA yöntemi ile filogenetik ağacın çiziminde MEGA v5 yazılımı kullanıldı. Filogenetik ağacın güvenilirliği için "bootstrap" değeri 1000 olarak ayarlandı¹².

BULGULAR

Çalışma grubunu oluşturan 136 hastanın 66'sı kadın, 70'i erkek olup, yaş ortalamaları 24.03 ± 17.17 yıldır (yaş aralığı: 0-65 yıl; ortanca yaş: 22). İncelenen 136 örneğin 127'si kullanılan iki türlü PCR ve RFLP yöntemine göre (Şekil 1) tiplendirilebilmiş; 9 örnekte ise farklı kesim kalıpları görülmüş ve bu örneklerde gB 1-4 arasında tiplendirme yapılamamıştır. Saptanan CMV gB genotiplerinin hastanelere ve hasta gruplarına göre dağılımları sırasıyla Tablo I ve II'de gösterilmiştir. RFLP ile genotiplendirme yapılan 15 örneğin DNA

Tablo I. CMV gB Genotiplerinin Hastanelere Göre Dağılımı

Hastane	Örnek sayısı	gB1 n (%)	gB2 n (%)	gB3 n (%)	gB4 n (%)	TY n (%)
Akdeniz Üni. TFH						
BT	57	19 (33.4)	15 (26.3)	15 (26.3)	4 (7)	4 (7)
KHT	31	11(35.5)	8 (25.8)	7 (22.6)	2 (6.4)	3 (9.7)
YD	10	4 (40)	2 (20)	3 (30)	0	1 (3)
KT	7	1 (14.3)	1 (14.3)	4 (57.1)	0	1(14.3)
G	1	0	1 (100)	0	0	0
Ege Üni. TFH						
BT	21	7 (33.3)	9 (42.8)	4 (19)	1 (4.7)	0
Erciyes Üni. TFH						
BT	2	0	1 (50)	1 (50)	0	0
YD	3	1 (33.3)	0	1 (33.3)	1(33.3)	0
Cerrahpaşa TFH						
KHT	4	1 (25)	2 (50)	1 (25)	0	0
Toplam	136	44 (32.4)	39 (28.6)	36 (26.5)	8 (5.9)	9 (6.6)

TFH: Tıp Fakültesi Hastanesi; BT: Böbrek transplant alıcısı; KHT: Kök hücre transplant alıcısı; YD: Yenidoğan; KT: Kalp transplant alıcısı; G: Gebe; TY: Tiplendirme yapılamayan.

Tablo II. CMV gB Genotiplerinin Hasta Gruplarına Göre Dağılımı

Hasta grubu	gB1 n (%)	gB2 n (%)	gB3 n (%)	gB4 n (%)	TY n (%)	Toplam n (%)
BT	26 (32.5)	25 (31.3)	20 (25)	5 (6.2)	4 (5)	80 (100)
KHT	12 (34.3)	10 (28.6)	8 (22.9)	2 (5.7)	3 (8.5)	35 (100)
YD	5 (38.4)	2 (15.4)	4 (30.8)	1 (7.7)	1 (7.7)	13 (100)
KT	1 (14.3)	1 (14.3)	4 (57.1)	0	1 (14.3)	7 (100)
G	0	1 (100)	0	0	0	1 (100)
Toplam	44 (32.3)	39 (28.7)	36 (26.5)	8 (5.9)	9 (6.6)	136 (100)

BT: Böbrek transplant alıcısı; KHT: Kök hücre transplant alıcısı; YD: Yenidoğan; KT: Kalp transplant alıcısı; G: Gebe;
TY: Tiplendirme yapılamayan.

dizi analizi sonucunda, her iki yöntemle aynı genotiplerin saptandığı görülmüştür (Tablo III). DNA dizi analizi yapılan izolatların genotip dağılımı filogenetik ağaçta gösterilmiştir (Şekil 2).

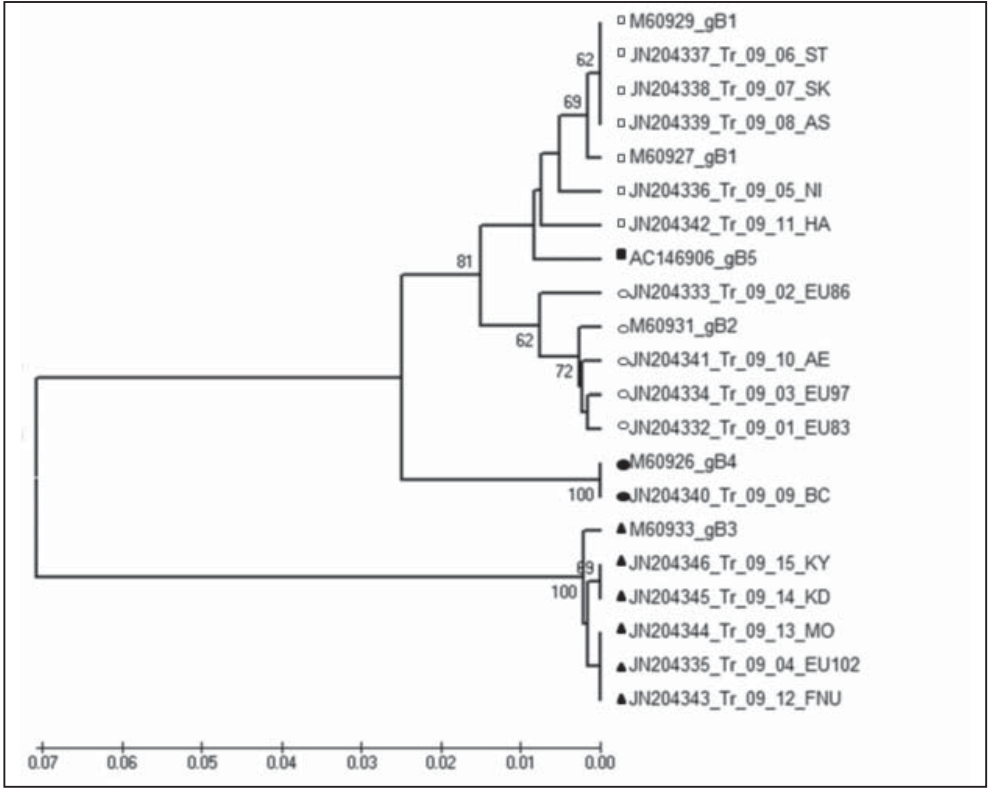
TARTIŞMA

Bu çalışmada; ülkemizde dört farklı şehirdeki böbrek, kök hücre ve kalp transplant alıcıları ile yenidoğanlar ve bir adet gebeye ait örneklerden izole edilen CMV izolatlarında gB genotipleri araştırılmış; dünyanın çeşitli yörelerinde bugüne kadar belirlenmiş dört farklı CMV gB genotipinin tümü de farklı oranlarda saptanmıştır. Ulaşabildiğimiz kadarıyla, bu çalışma ülkemizde farklı olgu gruplarında CMV gB genotiplerinin araştırıldığı ilk çalışmadır ve böbrek transplant (BT) alıcılarında gB1 (%32.5), kök hücre transplant (KHT) alıcılarında gB1 (%34.3), kalp transplant (KT) alıcılarında gB3 (%57.1), yenidoğanlarda gB1 (%38.4) ve bir

gebe hastada gB2, en sık olarak saptanan genotipler olarak bulunmuştur. Ülkemizde bu konuda yapılmış ulaşabilen tek çalışmada Şahiner ve arkadaşları¹¹ konjenital CMV enfeksiyonu olan 18 bebekte %83.3 oranında gB1 genotipi saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise, 13 yenidoğanda saptanan genotipler sırasıyla gB1 (%38.4), gB3 (%30.8), gB2 (%15.4) ve gB4 (%7.7) olmuştur. Brezilya’da yapılan bir çalışmada, konjenital CMV enfeksiyonu olan bebeklerde gB1, gB2 ve gB3 genotiplerinin oranları sırasıyla %39, %37 ve %24 olarak bildirilmiştir⁹. Hindistan’da yapılan bir çalışmada ise, konjenital ya da perinatal CMV enfeksiyonu olan semptomatik bebeklerde gB3 genotipinin yaygın olduğu, ancak uzun dönemde sekel gelişimi ile gB2 genotipinin ilişkili olduğu belirtilmektedir¹³. Meksika’da çocuklarda yapılmış farklı çalışmalardan birinde gB1 diğerinde gB2 saptandı-

Tablo III. RFLP ve DNA Dizi Analizi ile Genotiplendirme Yapılan Örnekler ve gB Genotipleri

Gen Bankası Kayıt Numarası	Genotip
JN204332_Tr_09_01_EU83	gB 2
JN204333_Tr_09_02_EU86	gB 2
JN204334_Tr_09_03_EU97	gB 2
JN204335_Tr_09_04_EU102	gB 3
JN204336_Tr_09_05_NI	gB 1
JN204337_Tr_09_06_ST	gB 1
JN204338_Tr_09_07_SK	gB 1
JN204339_Tr_09_08_AS	gB 1
JN204340_Tr_09_09_BC	gB 4
JN204341_Tr_09_10_AE	gB 2
JN204342_Tr_09_11_HA	gB 1
JN204343_Tr_09_12_FNU	gB 3
JN204344_Tr_09_13_MO	gB 3
JN204345_Tr_09_14_KD	gB 3
JN204346_Tr_09_15_KY	gB 3



Şekil 2. Filogenetik analiz.

ğı, Çek Cumhuriyeti’nde ise bebeklerde gB4 oranının yüksek olduğu rapor edilmiştir¹⁴⁻¹⁶. Avrupa ülkelerinde konjenital CMV enfeksiyonu olan bebeklerde sıklıkla gB1 genotipinin saptandığı bildirilmektedir^{8,17,18}. Bununla birlikte Polonya’da konjenital ya da postnatal CMV enfeksiyonu olan 150 bebekte en sık gB2 genotipi olduğu rapor edilmiş, genotiplerle semptomatik enfeksiyon ve viral yük arasında bir ilişki saptanmadığı bildirilmiştir¹⁹.

Çalışmamızda, BT alıcılarında sırasıyla gB1 (%32.3), gB2 (%28.7), gB3 (%26.5) ve gB4 (%5.9) genotipleri saptanmıştır. Manuel ve arkadaşları¹⁰ çok merkezli çalışmalarında, CMV enfeksiyonu olan 239 solid organ transplant alıcısında %26 gB1, %10 gB2, %10 gB3 ve %5 gB4 genotiplerini bulmuşlar; %49 oranında birden fazla genotiple enfeksiyon bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, dokuz örnekte RFLP yöntemiyle beklenenden fazla bantlar görüldüğünden genotiplendirme yapılamamıştır. Bu örneklerde birden fazla genotip olabilir, ancak RFLP bu ayırmada yetersiz kalmıştır. Manuel ve arkadaşlarının¹⁰ kullandığı gerçek zamanlı PCR yöntemi bu ayırmada daha kullanışlı olabilir. Bununla birlikte RFLP ile tiplendirdiğimiz 15 örnekte DNA dizi analizi ile aynı genotipler saptanmıştır. Nogueira ve arkadaşları²⁰, 71 BT alıcısında en yüksek oranda gB1 genotipini saptadıklarını belirtmektedirler.

Kök hücre transplant alıcılarında, BT alıcıları ile benzer olarak sıklık sırasına göre gB1 (%34.3), gB2 (%28.6), gB3 (%22.9) ve gB4 (%5.7) bulunmuştur. Brezilya’da allojenik hematopoetik kök hücre nakli sonrası aktif CMV enfeksiyonu gelişen alıcılarda, PCR-RFLP ve dizi analizi ile CMV genotiplerinin belirlendiği bir çalışmada, çalışmamızın sonuçları ile benzer şekilde en sık saptanan genotiplerin gB1 (%39) ve gB2 (%35) olduğu bildirilmiş; CMV gB3’ün, yüksek CMV hastalığı gelişimi ve düşük sağ kalım oranı ile antiviral tedavi sırasında daha yüksek viral yük görülmesi bakımından diğer genotiplerden farklılık gösterdiği vurgulanmıştır²¹. Çin’de ise KHT alıcılarında en sık gB3, ardından gB1 genotipi olduğu rapor edilmiştir⁶. Benzer şekilde Çek Cumhuriyeti’nde de bu grup hastada gB3 genotipinin daha sık görüldüğü bildirilmiştir¹⁴. Bununla birlikte KT alıcılarında CMV gB genotipleri ile ilgili bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Bizim çalışmamızda ise, KT alıcılarında en sık gB3 (%57.1) daha nadir olarak gB1 (%14.3) ve gB2 (%14.3) genotipleri saptanmıştır.

Brezilya ve Meksika’da yapılan çalışmalarda, doğurganlık çağındaki kadınlarda gB2 daha sık bulunmuştur^{10,12}. Bizim tek gebe hastamızda da gB2 genotipi mevcuttur. Bu hastada gebelik ölü doğumla sonuçlanmış ve fetal dokulardan CMV izole edilmiştir (yayınlanmamış bulgu). Bununla birlikte Ding ve arkadaşları²², genotip farklılığının gebelik prognozuna etki etmediğini belirtmektedirler.

CMV gB genotiplerinin; viral yük, invazif hastalık, prognoz ve tedaviye yanıt gibi farklı değişkenlerle ilişkisi çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Nogueira ve arkadaşları²⁰ BT alıcılarında gB1 genotipinin invazif hastalıkla ilişkili olduğunu belirtmiş; bu genotipin ayrıca korneal endotelit, iridosiklit ve ülseratif kolitle de ilişkili olduğu rapor edilmiştir^{23,24}. Çin’de Tang ve arkadaşları²⁵, gB2 ve gB3’ün birlikte etken olduğu enfeksiyonu, esansiyel hipertansiyonla ilişkili bulmuşlardır. Jin ve arkadaşları²⁶ da, bebeklerde gB1 genotipinin sarılık, malformasyon ve pnömoni ile ilişkili olduğunu belirtmektedirler. Coaquette ve arkadaşları²⁷, immün yetmezliği olanlarda birden fazla genotiple enfeksiyonun, CMV hastalığına ilerlediğini, bu hastalarda greft rejeksiyonunun, viral yükün ve diğer herpesvirüslerle koenfeksiyonun daha fazla olduğunu ifade etmektedirler. CMV gB genotiplerinin antiviral tedaviye yanıtının araştırıldığı bir başka çalışmada; birden fazla genotiple enfeksiyonda bazal viral yük düzeyinin daha yüksek olmasına rağmen, tedavinin ilk günlerinde diğer genotiplere göre daha çabuk düştüğü, gB1 genotipinin tedaviye ilk günlerde daha geç yanıt verdiği gösterilmiştir²⁸. Tüm bu çalışmalara rağmen, insanda CMV hastalığı gelişiminde ve prognozunda farklı gB genotiplerinin riskli olup olmadığı henüz belirsizliğini korumaktadır. Diğer yandan gB; çok güçlü nötralizan antikor yanıtı uyandırması nedeniyle aşı çalışmalarında üzerinde en çok durulan antijendir²⁹. Farklı genotiplerin aşı etkinliğinde rolleri olabilir ya da farklı genotipler yeni antiviral ajanların hedefi olabilirler⁷. Bu nedenle CMV gB genotiplerinin coğrafi bölgelere ve hasta gruplarına göre özelliklerinin bilinmesi önemlidir.

Çalışmamızda CMV genotipleri RFLP yöntemiyle belirlenmiştir. Bu yöntem, birden fazla genotiple enfeksiyonun belirlenmesinde yetersiz kalabilir; nitekim dokuz (%6.6) örnekte fazla sayıda bant görülmüş ve tiplendirme yapılamamıştır. Bununla birlikte RFLP, CMV gB genotiplerinin belirlenmesinde çok kullanılan bir yöntem olup, PCR ile benzer duyar-

lılıkta olduğu bildirilmiştir^{22,30}. Bizim de RFLP ile tiplendirdiğimiz ve farklı genotiplerden rastgele seçtiğimiz 15 örnek, DNA dizi analizi ile aynı genotipte çıkmıştır. Bununla birlikte genotipe özgün primerlerin kullanıldığı gerçek zamanlı PCR yönteminin duyarlılığı daha fazla olabilir¹⁹. Bizim çalışmamızda, ekonomik kısıtlılık nedeniyle sınırlı sayıda örnekte DNA dizi analizi yapılabilmektedir.

Sonuç olarak sunulan çalışmada, ülkemizin dört farklı ilindeki BT, KHT ve KT alıcıları ile yenidoğanlar ve bir gebede farklı CMV gB genotipleri izole edilmiştir. Çalışmamız CMV gB genotiplerinin belirlenmesine yönelik tanımlayıcı bir araştırma niteliğinde olduğundan, genotiplerin viral yük, semptomatik hastalık, prognoz gibi değişkenlerle ilişkisi araştırılmamış ve yenidoğanlarda konjenital ya da postnatal enfeksiyon ayırımı yapılmamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda bu konuların da araştırılması daha fazla bilgiye ulaşmamızı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol* 2015; 235(2): 288-97.
2. Alberola J, Tamarit A, Igual R, Navarro D. Early neutralizing and glycoprotein B (gB)-specific antibody responses to human cytomegalovirus (HCMV) in immunocompetent individuals with distinct clinical presentations of primary HCMV infection. *J Clin Virol* 2000; 16(2): 113-22.
3. Hopkins JI, Fiander AN, Evans AS, Delchambre M, Gheysen D, Borysiewicz LK. Cytotoxic T cell immunity to human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Med Virol* 1996; 49(2): 124-31.
4. Renzette N, Pokalyuk C, Gibson L, et al. Limits and patterns of cytomegalovirus genomic diversity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(30): 4120-8.
5. Shepp DH, Match ME, Lipson SM, Pergolizzi RG. A fifth human cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *Res Virol* 1998; 149(2): 109-14.
6. Wu X, Wang Y, Xu Y, et al. Cytomegalovirus glycoprotein B genotype in hematopoietic stem cell transplant patients from China. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16(5): 647-52.
7. Renzette N, Gibson L, Jensen JD, Kowalik TF. Human cytomegalovirus intrahost evolution-a new avenue for understanding and controlling herpesvirus infections. *Curr Opin Virol* 2014; 8: 109-15.
8. Barbi M, Binda S, Caroppo S, et al. CMV gB genotypes and outcome of vertical transmission: study on dried blood spots of congenitally infected babies. *J Clin Virol* 2001; 21(1): 75-9.
9. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, de Deus Wagatsuma VM, Marin LJ, Duarte G, Figueiredo LT. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Brazilian mothers and their congenitally infected infants. *J Med Virol* 2007; 79(8): 1164-8.
10. Manuel O, Asberg A, Pang X, et al. Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Clin Infect Dis* 2009; 49(8): 1160-6.
11. Sahiner F, Cekmez F, Cetinkaya M, et al. Congenital cytomegalovirus infections and glycoprotein B genotypes in live-born infants: a prevalence study in Turkey. *Infect Dis* 2015; 47(7): 465-71.
12. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28(10): 2731-9.
13. Gandhoke I, Hussain SA, Pasha ST, Chauhan LS, Khare S. Glycoprotein B genotyping in congenital/perinatal cytomegalovirus infection in symptomatic infants. *Indian Pediatr* 2013; 50(7): 663-7.
14. Gonzalez-Sanchez HM, Alvarado-Hernandez DL, Guerra-Palomares S, Garcia-Sepulveda CA, Noyola DE. Cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Mexican children and women. *Intervirology* 2015; 58(2): 115-21.

15. Arellano-Galindo J, Villanueva-García D, Cruz-Ramirez JL, et al. Detection and gB genotyping of CMV in Mexican preterm infants in the context of maternal seropositivity. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8(6): 758-67.
16. Roubalová K, Zufanová S, Vítek A, Stanková M. Prevalence of glycoprotein B (gB) genotypes in the patients with high risk of symptomatic cytomegalovirus infection. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2009; 58(4): 148-53.
17. de Vries JJ, Wessels E, Korver AM, et al. Rapid genotyping of cytomegalovirus in dried blood spots by multiplex real-time PCR assays targeting the envelope glycoprotein gB and gH genes. *J Clin Microbiol* 2012; 50(2): 232-7.
18. Nijman J, Mandemaker FS, Verboon-Macielek MA, et al. Genotype distribution, viral load and clinical characteristics of infants with postnatal or congenital cytomegalovirus infection. *PLoS One* 2014; 9(9):e108018.
19. Paradowska E, Studzińska M, Suski P, et al. Human cytomegalovirus UL55, UL144, and US28 genotype distribution in infants infected congenitally or postnatally. *J Med Virol* 2015; 87(10): 1737-48.
20. Nogueira E, Ozaki KS, Tomiyama H, Câmara NO, Granato CF. Clinical correlations of human cytomegalovirus strains and viral load in kidney transplant recipients. *Int Immunopharmacol* 2009; 9(1):26-31.
21. Dieamant DC, Bonon SH, Peres RM, et al. Cytomegalovirus (CMV) genotype in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 310.
22. Ding ZY, Xu F, Chen DZ, et al. A multifactorial analysis of the pregnancy outcomes in cytomegalovirus-infected women. *Gynecol Obstet Invest* 2015; 80(2): 106-12.
23. Oka N, Suzuki T, Inoue T, Kobayashi T, Ohashi Y. Polymorphisms in cytomegalovirus genotype in immunocompetent patients with corneal endotheliitis or iridocyclitis. *J Med Virol* 2015; 87(8): 1441-5.
24. Taherkhani R, Farshadpour F, Makvandi M, et al. Determination of cytomegalovirus prevalence and glycoprotein B genotypes among ulcerative colitis patients in ahvaz, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8(2): e17458.
25. Tang N, Li JW, Liu YM, et al. Human cytomegalovirus infection is associated with essential hypertension in Kazakh and Han Chinese populations. *Med Sci Monit* 2014; 20: 2508-19.
26. Jin H, Wang X, Li S. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotype correlates with different symptoms of infected infants. *Intervirology* 2007; 50(3): 219-23.
27. Coaquette A, Bourgeois A, Dirand C, Varin A, Chen W, Herbein G. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2004; 39(2): 155-61.
28. Emery VC, Manuel O, Asberg A, et al. Differential decay kinetics of human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes following antiviral chemotherapy. *J Clin Virol* 2012; 54(1): 56-60.
29. Rieder F, Steininger C. Cytomegalovirus vaccine: phase II clinical trial results. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(5): 95-102.
30. Sowmya P, Dhanya V, Madhavan HN, Therese KL. Comparative efficacy of PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) & multiplex PCR for glycoprotein B (gB) genotyping of human cytomegalovirus. *Indian J Med Res* 2007; 126(2): 122-7.