

# Sitomegalovirüs İzolatlarında Gansiklovir Direncinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması

## Investigation of Ganciclovir Resistance in Cytomegalovirus Isolates by Phenotypic and Genotypic Methods

Rabia Can SARINOĞLU<sup>1</sup> (ID), Dilek ÇOLAK<sup>2</sup> (ID), Osman Alphan KÜPESİZ<sup>3</sup> (ID), Mert Ahmet KUŞKUCU<sup>4,5</sup> (ID), Koray YALÇIN<sup>6</sup> (ID), İmran SAĞLIK<sup>7</sup> (ID), Derya MUTLU<sup>2</sup> (ID), Kenan MİDİLİ<sup>4</sup> (ID), Bilal Olcay PEKER<sup>8</sup> (ID), Betil ÖZHAK<sup>2</sup> (ID), Aykut ÖZKUL<sup>9</sup> (ID), Kataline FOLDES<sup>9</sup> (ID)

<sup>1</sup> Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

<sup>1</sup> Bahçeşehir University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

<sup>2</sup> Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

<sup>2</sup> Mediterranean University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Antalya, Türkiye.

<sup>3</sup> Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Anabilim Dalı, Antalya.

<sup>3</sup> Mediterranean University Faculty of Medicine, Department of Pediatric Hematology-Oncology, Antalya, Türkiye.

<sup>4</sup> İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

<sup>4</sup> İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

<sup>5</sup> Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

<sup>5</sup> Koç University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

<sup>6</sup> Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Medical Park Göztepe Hastanesi Pediatrik Hematoloji-Onkoloji ve Kemik İliği Nakil Ünitesi, İstanbul.

<sup>6</sup> Bahçeşehir University Faculty of Medicine, Medical Park Göztepe Hospital Pediatric Hematology-Oncology and Bone Marrow Transplantation Unit, İstanbul, Türkiye.

<sup>7</sup> Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

<sup>7</sup> Uludağ University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Bursa, Türkiye.

<sup>8</sup> İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>8</sup> İzmir Atatürk Training and Research Hospital, Department of Medical Microbiology, İzmir, Türkiye.

<sup>9</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>9</sup> Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Ankara, Türkiye.

\*Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (BAP) tarafından desteklenmiş (Proje No: 2014.04.013.010) ve 2. Ulusal Viroloji Günleri (21-24 Mart 2018, İzmir)'nde sözel bildiri olarak sunulmuştur.

**Makale Atfı:** Sarinoğlu RC, Çolak D, Küpesiz OA, Kuşkucu MA, Yalçın K, Sağlık İ ve ark. Sitomegalovirüs izolatlarında gansiklovir direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması. Mikrobiyol Bul 2023;57(3):401-418.

### ÖZ

Gansiklovir (GCV) dirençli sitomegalovirüs (CMV) suşları özellikle immünsupresif hastalarda uzun dönem antiviral kullanımını takiben bildirilmektedir. Bu çalışmada, kök hücre transplantasyonu (KHT) veya solid organ transplantasyonu (SOT) yapılan ve nakil sonrası CMV enfeksiyonu saptanan hastalarda GCV direncine yol açan CMV'nin UL97 genindeki mutasyonların genotipik ve fenotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Akdeniz Üniversitesi Hastanesinde KHT veya SOT yapılmış ve rutin izlem sırasında CMV viral yükü 1000 kopya/mL'nin üzerinde saptanan 30 hasta alınmıştır. CMV DNA kantitatif

**İletişim (Correspondence):** Prof. Dr. Dilek Çolak, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 07070, Antalya, Türkiye. Tel (Phone): +90 242 249 6000/6405-6264, E-posta (E-mail): dcolak@akdeniz.edu.tr

olarak otomatize sistem ile (Cobas Ampliprep/COBAS Taqman CMV Test, Roche Diagnostics, Almanya) araştırılmıştır. Antiviral dirence yol açan mutasyonların saptanması için UL97 gen bölgesinde 420-664 kodonlar arası DNA dizi analizi (Sanger sequencing) yapılmış ve tanımlanmış mutasyonlar ile karşılaştırılmıştır. Antiviral direncin fenotipik yöntemlerle araştırılması için hastaların heparinli kan örnekleri toplanmış, 'buffy coat (lökosit tabakası)' MRC-5 hücrelerine santrifügasyon yöntemiyle inoküle edilmiş ve bu hücrelerde CMV üremesi monoklonal antikorlarla kontrol edilmiş, üreme saptandığında virüs titresi belirlenerek plak azaltma testi önerilen şekilde uygulanmıştır. Otuz hastadan 22'sinin KHT, sekizinin SOT (beş böbrek, üç karaciğer) alıcısı olduğu belirlenmiştir. Nakil öncesi hastaların CMV serolojileri değerlendirildiğinde, 29 (%96.7) hastanın seropozitif, bir (%3.3) hastanın seronegatif olduğu bulunmuştur. Altısı seropozitif, biri seronegatif toplam yedi (%23.3) KHT alıcısı pediatrik hastada toplam dokuz adet CMV UL97 mutasyonu saptanmıştır. Saptanan mutasyonlardan beşi; beş farklı alıcıda, her birinde birer adet olacak şekilde, GCV'ye karşı klinik direnci tanımlanmış UL97 mutasyonları olarak gözlenmiştir (C603W, C592G, H520Q, M460V, A594T). Ek olarak, seronegatif bir alıcıda GCV direncine yol açmadığı bilinen bir mutasyon (D605E) ve seronegatif bir alıcıdaysa daha önce tanımlanmamış üç mutasyon (1474T, F499S, V559A) saptanmıştır. Genotipik yöntemle M460V, H520Q, C592G, C603W ve A594T mutasyonları saptanan beş hastanın buffy coat örneklerinden hücre kültüründe izole edilen CMV suşlarında GCV'nin 3 mikromolar ( $\mu\text{M}$ ), 12  $\mu\text{M}$ , 48  $\mu\text{M}$  ve 96  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları kullanılarak yapılan plak azaltma testinde, IC50 değeri beş CMV suşu için de  $\geq 8 \mu\text{M}$  olarak saptanmış, fenotipik olarak da GCV direnci varlığı gösterilmiştir. Çalışmaya alınan 22 KHT hastasından beşinde (%22.7) klinik dirence ilişkili CMV UL97 mutasyonu saptanmış ve fenotipik yöntemler ile de GCV direnci gösterilmiştir. SOT yapılan hastaların hiçbirinde UL97 mutasyonu saptanmamıştır.

**Anahtar kelimeler:** CMV; fenotipik yöntem; GCV direnci; UL97; transplantasyon.

## ABSTRACT

Ganciclovir-resistant cytomegalovirus (CMV) strains are reported following long-term antiviral agent use, especially for immune-suppressive patients. In this study, it was aimed to investigate the mutations in the UL97 gene of CMV, which causes ganciclovir (GCV) resistance by genotypic and phenotypic methods in patients who developed CMV infection following hematopoietic cell (HCT) or solid organ transplantation (SOT). Thirty patients who had HCT or SOT in Mediterranean University Hospital and developed CMV infection during routine follow-up with a viral load of CMV over 1000 copies/mL were included in the study. CMV DNA was analyzed by an automated system (Cobas Ampliprep/COBAS TaqMan CMV Test, Roche Diagnostics, Germany) quantitatively. DNA sequence analysis of the regions including codons 420-664 in the UL97 gene region was done by the Sanger sequencing method to detect mutations causing antiviral resistance and compared with defined mutations. In order to investigate antiviral resistance by phenotypic methods, heparinized blood samples of the patients were collected, 'buffy coat (leukocyte layer)' was inoculated into MRC-5 cells by centrifugation method and CMV growth in these cells was controlled with monoclonal antibodies when growth was detected, virus titer was determined and plaque reduction test was applied as recommended. It was determined that 22 of the 30 patients were HCT recipients and eight were SOT (five kidney, three liver) recipients. When the CMV serology pattern of the patients was evaluated before transplantation, 29 (96.7%) patients were found to be seropositive and one (3.3%) patient was found to be seronegative. Totally, nine CMV UL97 mutations were detected in seven (23.3%) pediatric patients who had HCT, including six seropositive and one seronegative case. In addition, one mutation (D605E) not known to cause GCV resistance was detected in a seronegative recipient and three previously unidentified mutations were detected (1474T, F499S, V559A) in a seronegative recipient. Five of the mutations defined were UL97 mutations with a defined clinical resistance against GCV in each of the five recipients (C603W, C592G, H520Q, M460V, A594T). In the plaque reduction test using 3  $\mu\text{M}$ , 12  $\mu\text{M}$ , 48  $\mu\text{M}$  and 96  $\mu\text{M}$  concentrations of GCV in CMV strains, the IC50 value was determined to be  $\geq 8 \mu\text{M}$  for the five CMV strains, and the phenotypic presence of GCV resistance was shown. Clinical resistance associated with CMV UL97 mutation was detected in five (22.7%) of 22 patients who had HCT. GCV resistance was also demonstrated in these patients by phenotypic methods. No UL97 mutation was detected in the patients who had SOT.

**Keywords:** CMV; phenotypic method; GCV resistance; UL97; transplantation.

## GİRİŞ

Solid organ transplantasyonu (SOT) ve hematopoitik kk hücre transplantasyonu (HKHT) alıcılarını kapsayan immnsupresif hasta grubu sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonu aısından byk risk taşıtmaktadır. Transplantasyon sonrası CMV enfeksiyonları artmış morbidite, mortalite ve azalmış greft sağkalımı ile ilişkilendirilmektedir<sup>1</sup>. Dünyada CMV enfeksiyonu insidansı %36-90 arasında değişmektedir. Seroprevalans Türkiye’de yüksektir ve Antalya kent merkezinde %93.6 olarak bildirilmiştir<sup>2</sup>.

SOT alıcılarında görülen fırsatçı enfeksiyonların birinci sıklıktaki etkeni CMV’dir, transplantasyon sonrası primer CMV enfeksiyonuna bağlı CMV hastalığı gelişme riski %40-60 civarındadır. Primer CMV enfeksiyonu seronegatif alıcılarda nakledilen organdaki latent virüsün reaktivasyonu ile gelişir. Sekonder CMV enfeksiyonu ise seropozitif alıcılarda endojen virüsün reaktivasyonu, nakledilen organdaki latent virüsün reaktivasyonu veya yeni bir suş ile reenfeksiyon şeklinde geçirilebilir. HKHT yapılan hastalar da CMV enfeksiyonu açısından büyük risk taşıtmaktadır. Alıcı ve vericinin seropozitiflik durumları, riski belirleyen başlıca faktörlerdendir. Profilaktik antiviral tedavi yapılmadığında; allojenik transplant alıcılarının yaklaşık %50’sinde aktif enfeksiyon, %20-25’inde de CMV hastalığı gelişir. SOT alıcılarında CMV hastalığını önlemede preemtif ve profilaktik tedavi seçenekleri bulunmaktadır. Profilakside transplantasyon sonrası tüm hastalara 3-6 ay süreyle antiviral verilmekte, böylece CMV’nin her türlü replikasyonu önlenmektedir. Preemtif tedavi ise, CMV hastalığı gelişecek hastaların önceden belirlenerek bu hastalara viral yük negatifleşinceye kadar antiviral tedavi uygulanmasıdır. Bu amaçla; gansiklovir (GCV), valgansiklovir (val-GCV) ve valasiklovir (VASV) kullanılır. GCV, val-GCV, foskarnet (FOS) ve sidofovir; gelişen CMV hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır ve viral DNA polimerazı inhibe ederek etki göstermektedir. GCV, 9-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxymethyl] guanine, bir deoksiguanozin analogu olup DNA polimerazın doğal substratı olan deoksiguanozin trifosfatın kompetitif inhibitörüdür. GCV alındığında inaktiftir, antiviral aktivitesi için pUL97 aracılı fosforilasyon gerekir. CMV’nin UL97 geni, GCV’yi gansiklovir monofosfata geçiren bir protein kinaz olan fosfotransferaz enzimini kodlamaktadır. İlacın difosfat ve trifosfat formlarıysa hüresel kinazlar tarafından oluşturulur<sup>3-6</sup>.

Antiviral tedavinin hasta sağkalımına büyük katkıları yanında yoğun bir şekilde kullanımı, transplantasyon alıcılarında antiviral direnci önemli bir problem haline getirmiştir. Son yıllarda SOT ve KHKT yapılan erişkin ve pediyatrik hasta grubunda profilaksi alırken ya da tedavi sırasında GCV dirençli CMV suşlarının görüldüğünü bildiren yayınların sayısında artış olmuştur<sup>7,8</sup>. Bu yüzden antiviral direnç testleri bir ihtiyaç haline gelmiştir.

Genotipik yöntemlerde, CMV’nin ilaç direncinden sorumlu genlerindeki mutasyon ve/veya delesyonlar araştırılabilmektedir. Bu amaçla bu gen bölgelerinin DNA dizi analizinin yapılması altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemlerle ilgili başlıca problem direnç mutasyonlarının fenotipik yöntemlerle doğrulanmasının gerekliliğidir nk tanımlanmış mutasyonlar dışında saptanan varyantlar klinik olarak direnç oluşturamayabilir<sup>5</sup>.

Fenotipik yöntemlerle ilaç direncinin saptanması; hücre kültüründe viral büyümeyi azaltacak ilaç konsantrasyonunun belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Bu ilacın varlığında ve yokluğunda kantitatif viral replikasyon ve standardize bir inokulumun hazırlanmasını gerektirir. Bu basamaklar hücre kültürü ve viral replikasyonun saptanması basamaklarını içerir. Bu amaçla en çok plak redüksiyon nötralizasyon testi (PRNT) kullanılır. PRNT, ilaç direncinin fenotipik olarak belirlenmesinde altın standart yöntemdir<sup>9</sup>.

Bu çalışmada, üniversite hastanesinde SOT veya KHKT yapılan ve nakil sonrası CMV enfeksiyonu saptanan hastalarda GCV direncine yol açan CMV'nin UL97 genindeki mutasyonların fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 26.03.2014, Karar No: 181). Çalışmaya katılan gönüllülerin (reşit olmayan çocuklar için veli veya vasileri) bilgilendirilerek aydınlatılmış onam alındı.

### Hasta Grubu

Çalışmaya, Akdeniz Üniversitesi Hastanesinde böbrek, karaciğer veya hematopoietik kök hücre transplantasyonu yapılan, organ nakli merkezi, pediyatrik nefroloji, pediyatrik hematoloji-onkoloji bölümlerinde takip edilen, rutin izlem sırasında CMV enfeksiyonu gelişen ve CMV-DNA kantitatif revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)] testi (Cobas Ampliprep/COBAS Taqman CMV Test; Roche, Almanya) ile plazma CMV-DNA düzeyi > 1000 kopya/mL saptanan 30 hasta dahil edildi. Hastaların transplantasyon sonrası ilk 120 gün-deki klinik bulguları, uygulanan tedavi rejimleri, plazma CMV-DNA düzeylerinin takibi ve sağkalımları retrospektif olarak analiz edildi.

### Sitomegalovirüste Gansiklovir Direncinin Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması

Hastaların heparinli kan örnekleri toplandı, 'buffy coat (lökosit tabakası)' ayrılarak hücre kültürü için uygun koşullarda saklandı. CMV'nin klinik örneklerden izolasyonu için buffy coat örnekleri MRC-5 hücrelerine santrifügasyon yöntemiyle inoküle edildi. Bu hücrelerde CMV üremesi monoklonal antikolarla kontrol edildi, üreme saptandığında virüs titresi belirlenerek PRNT önerilen şekilde uygulandı<sup>9</sup>.

### MRC-5 Hücre Hattı Oluşturulması, Kültür Pasajı Yapılması ve Dondurulması

Hücre kültürü çalışması için ATCC'den elde edilen MRC-5 (ATCC® CCL-171) hücreleri ve HEPES, L-glutamin, sodyum bikarbonat içeren steril "Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma D 8437 DMEM-F12)" sıvı üretme besiyeri kullanıldı. Besiyeri içine 100 U/mL penisilin, 100 ug/mL streptomisin, 8 ug/mL gentamisin ve hücreyi ilk çözerken %20 oranında fetal sığır serumu (PAN-Biotech GmbH, Almanya) eklendi. Hücreler üç pasajdan sonra istenen sayıya ulaştı ve hücre çökeltisi -80°C'de donduruldu.

## Klinik rneklerden Sitomegalovirüs İzolasyonu

Hazırlık için önce stoklanan MRC-5 hücreleri 24 kuyucuklu mikroplağa inoküle edildi, daha sonra hastaların 'buffy coat' örnekleri mikropalak santrifyasyon yöntemiyle MRC-5 hücrelerine inoküle edildi. Klinik örneklerden izole edilecek CMV virüsünün pp 72 antijeninin indirekt immün peroksidaz yöntemiyle boyanması aşamasında; anti pp 72 [Anti-Cytomegalovirus IE1 72 antibody (IE1.G10) ab30924 ABCAM] primer antikoru, peroksidaz işaretili anti mouse IgG (Sigma) konjugatı ve 3,3'-Diaminobenzidine (DEAB) (Vectorlab sk-4100---1kit) substratı kullanıldı. Mikroskopta incelenip anti pp 72 Ag'si pozitif saptanan hastalarda hücre kültürü sıvıları viral titrasyon için donduruldu.

## Klinik rneklerden İzole Edilen Virüslerin ve Standart Suş AD-169'un Titrasyonu

Önceden zdrlp buz üzerinde bekletilen virüs stoğundan  $10^1$ 'den  $10^6$ 'ya kadar virüs dilüsyonu hazırlandı. Hücreler 24 kuyucuklu mikroplağa inoküle edildi, mikropalak kuyucukları %100 hücre ile kaplandığında mikropalak içindeki vasat döküldü, her bir dilüsyon için dört kuyucuğa 0.2 ml virüs ekimi yapılıp iki kuyucuk virüs kontrol ve iki kuyucuk hücre kontrol için kullanıldı. Değerlendirme için öncelikle hücre kontrol kuyucuğunda plak olmadığı kontrol edildi, plaklar oluşunca sayılabilen dört kuyucuktaki plaklar sayılarak ortalaması alındı ve 1 ml'deki sayı için sulandırım katsayıları ile çarpıldı [ $10^6$  kuyucukta toplam 60 plak varsa dörde bölünür, plaque forming unite (pfu)/ml=  $15 \times 10^6 \times 5$ ] ve ml'de 400-500 plak oluşturan virüs konsantrasyonunun dilüsyon oranı belirlenip kaydedildi.

## Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi ile Antiviral Duyarlılık alışması

Yirmi dört kuyucuklu hücre kültürü mikroplağı MRC-5 hücresiyle kaplandı, AD-169 standart suş ve klinik izolatların ml'de 400-500 pfu oluşturan konsantrasyonları 0.2 ml kuyucuklara eklenerek hücrelere inokülasyonu sağlandı (ml'de 400 pfu, 0.2 ml'de 80 pfu), bir saat etüvde inkübe edildi. Süre sonunda hücre kültürü besiyerinde 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan GCV stok zltisinden 3, 12, 48 ve 96 mikromolar ( $\mu$ M) hacimlerde alınarak 1.5 ml karboksil metil selüloz (CMS) karıştırıldı. Hazırlanan her antiviral konsantrasyonu için dört kuyucuk kullanıldı. Test mikroplağı 5-7 gün etüvde inkübe edildi. Hücrelerin fikse edilmesi için %10 formaldehit eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Daha sonra içerik döküldü, eşme suyunda yıkandı. Boyama aşaması için kuyucukların zeminini kaplayacak kadar kristal viyole (%0.075) eklendi. Oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra boya döküldü ve mikropalak yıkandı ve kurutuldu. Antiviral eklenmeyen kontrol kuyucuğundaki plak sayısının yarısı kadar plak oluşumuna neden olan antiviral konsantrasyonlar (IC50) belirlendi<sup>9</sup>. Fenotipik değişikliğin tespiti, GCV ile muamele edilen virüslerin hücre kültürü ortamında oluşturdukları plakların çap ölçümündeki (mm olarak) farklılığın tespitiyle yapıldı. Yapılan incelemelerde GCV duyarlı olan virüslerde GCV kullanılmayan kültür ortamındaki plak çapı ( $1.5 \text{ mm} \pm 0.3$ ) antiviralin kullanıldığı kültür ortamındaki plak çaplarından ( $0.5 \text{ mm} \pm 0.1$ ) daha büyük olarak tespit edildi.

## Sitomegalovirüste Gansiklovir Direncinin Genotipik Yöntemlerle Saptanması

Genotipik direnç için CMV izolatlarının UL97 geninde klinik olarak gansiklovir direnciyle ilişkilendirilen gen bölgelerine DNA dizi analizi yapıldı.

DNA izolasyonu: CMV DNA plazma örneklerinden "Qiagen DSP Virus/Pathogen Kit (QIAGEN, Almanya)" ile "QIASymphony (QIAGEN, Almanya)" cihazında tam otomatik olarak izole edildi.

Polimeraz zincir reaksiyonu ve saflaştırma: CMV'nin UL97 (fosfotransferaz) gen bölgesinde GCV direncine neden olduğu bilinen M460V, M460I, H520Q, A591V, C592G, A594V, A594T, L595S, E596G, K599T, C603V, C607F ve C607Y mutasyonlarını belirlemek üzere 460-664 kodonları kapsayan gen bölgesi nested PCR yöntemiyle çoğaltıldı. Yaklaşık 732 baz çifti büyüklüğünde bir bölgenin amplifikasyonu ısı döngü cihazı (Bio-Rad, ABD) kullanılarak aşağıda verilen primer çifti kullanılarak gerçekleştirildi.

CMV\_UL97\_Forward primer baz dizisi: GTT TCC ACA CAG ACA TGT TT

CMV\_UL97\_Revers primer baz dizisi: GCA TTC GTG GTA GAA GC

PCR ürünlerinin saflaştırılması "Purelink PCR saflaştırma kiti (Lifetech)" ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. PCR sonrası ürünler saflık ve kantitasyon kontrolü için %1'lik jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntülendi.

Dizi Analizi: Sanger dizileme yöntemi ile dizileme gerçekleştirildi. Öncelikle baz pozisyonlarının BigDye sonlandırıcılar kullanılarak saptanması için PCR reaksiyonu gerçekleştirildi ve ürünler "Sephadex (Santa Cruz)" (G50 25 g) kiti kullanılarak saflaştırıldı. Kapiler jel elektroforezi tam otomatik olarak ABI 3130 cihazında çalışıldı ve sonuçlar veri tabanında tanımlanmış mutasyonlar ile karşılaştırıldı<sup>10</sup>.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan hastaların demografik verileri ve özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Hastaların ortanca yaş değeri 10 yıl (yaş aralığı= 10 ay-67 yıl) olarak bulunmuştur. Hastaların 24 (%80.0)'ü çocuk (yaş aralığı= 10 ay-18 yıl) ve altısı (%20.0) erişkin (yaş aralığı= 22-67 yıl) yaş grubundadır. Nakil öncesi hastaların CMV serolojileri değerlendirildiğinde, 29 (%96.7) hastanın seropozitif, bir (%3.3) hastanın seronegatif olduğu tespit edilmiştir. Otuz hastadan 22 (%73.3)'ünün HKHT, sekizinin (%26.7) SOT (beş böbrek, üç karaciğer) alıcısı olduğu belirlenmiştir.

Yedi (n= 7/30, %23.3) hastada CMV UL97 geninde dokuz adet mutasyon saptanmıştır. Bu hastaların tümü allojenik HKHT (AHKHT) yapılan hastalardır. Beş AHKHT alıcısında tanımlanmış GCV ilaç direnci mutasyonları (C603W, C592G, H520Q, M460V, A594T), bir hastada UL97 fonksiyonu üzerinde önemli bir etkisi olmadığı ve GCV direncine yol açmadığı bilinen bir mutasyon (D605E) ve bir hastadaysa daha önce tanımlanmamış üç mutasyon (1474T, F499S, V559A) saptanmıştır (Tablo I).

Tablo 1. Genotipik Direnç Testi Çalışılan Hastaların Özellikleri (n= 30)

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Alıcı CMV Serolojisi	CMV Log <sub>10</sub> Kopya/ml	Tanı	Nakil Türü- Verici Tipi	Kök Hücre Kaynağı- Uyum Skoru*	Profilaksi	Başlangıç Tedavisi/ Değişim	Virolojik Direnç	Klinik Direnç	Klinik	Sağkalım
H1	5.8	E	P	2.90	ALL	HKHT- MSD	Ki-10/10	ASV	GCV	yok	yok		Sağ
H2	14.9	E	P	3.02	KML	HKHT- MRD	PKKH-10/10	ASV	GCV	yok	yok		Sağ
H3	9.9	K	P	3.08	FAA	HKHT- MUD	Ki-10/10	ASV	GCV/FOS	yok	yok	GIS GVHH	Eks
H4	5.0	K	P	3.09	AA	HKHT- MSD	Ki-8/10	ASV	GCV	yok	yok		
H5	7.7	K	P	3.36	KML	HKHT- MUD	Ki-10/10	ASV	GCV	yok	yok		Sağ
H6	10.7	K	P	3.37	SDNS	Böbrek-CV	-	VASV	GCV/ Valgansiklovir	yok	yok		Sağ
H7	1.1	K	P	3.41	HLH	HKHT- MUD	PKKH-10/10	ASV	GCV/FOS	yok	var	Cilt GVHH	Sağ
H8	27.2	K	P	3.49	ABY	Böbrek-CV	-	VASV	GCV/ Valgansiklovir	yok	yok	Renal greft rejeksiyonu	Sağ
H9	22.4	E	P	3.49	KBY	Böbrek-CV	-	-	GCV	yok	yok		Sağ
H10	14.6	K	P	3.53	ALL	HKHT- MSD	Ki-10/10	ASV	GCV	yok	yok	Relaps ALL	Eks
H11	17.2	E	P	3.54	OHA	HKHT- MSD	Ki-10/10	ASV	GCV	1474T, F499S, V559A	yok	GIS GVHH	Sağ
H12	13.1	E	P	3.69	FAA	HKHT- MSD	Ki-10/10	ASV	GCV	yok	yok	Deri GVHH	Sağ
H13	3.9	K	P	3.84	HLH	HKHT- MUD	Ki-9/10	ASV	GCV	M460V	var	GIS GVHH	Sağ
H14	56.2	E	P	3.86	KBY	Böbrek-CV	-	VASV	GCV	yok	yok		Sağ

Tablo 1. Genotipik Direnç Testi Çalışılan Hastaların Özellikleri (n= 30) (devamı)

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Alıcı CMV Serolojisi	CMV Log <sub>10</sub> Kopya/ml	Tanı	Verici Tipi	Nakil Türü-	Kök Hücre Kaynağı-Uyum Skoru*	Profilaksi	Başlangıç Tedavisi/Değişim	Virolojik		Klinik	Sağkalm
											Direnç	Direnç		
H15	136	K	P	3.94	AKİY	HKHT-MUD	Ki-10/10	Ki-10/10	ASV	FOS/ FOS+GCV	H520Q	var	CMVkolit, retinit, pnömoni GIS GVHH	Eks
H16	3.5	E	P	4.07	KC siroz	KC-CV	-	-	VASV	GCV	yok	yok		Sağ
H17	66.6	E	P	4.13	KC siroz	KC-KV	-	-	VASV	GCV	yok	yok	Akut GVHH	Sağ
H18	0.8	K	P	4.15	OS	HKHT-MUD	KK-5/6	KK-5/6	ASV	FOS/GCV	yok	var	GVHH	Eks
H19	17.9	E	P	4.16	ALL	HKHT-MUD	Ki-10/10	Ki-10/10	ASV	GCV/FOS	yok	var	Akut Cilt GVHH	Sağ
H20	27.3	E	P	4.31	MDS	HKHT-MSD	Ki-10/10	Ki-10/10	VASV	GCV	yok	yok	KC GVHH	Sağ
H21	18.2	E	P	4.33	Relaps-ALL	HKHT-MUD	Ki-9/10	Ki-9/10	ASV	GCV/FOS + GCV	C603W	var	CMV Pnömoni, Relaps ALL	Eks
H22	10.5	E	P	4.40	FAA	HKHT-MUD	Ki-9/10	Ki-9/10	ASV	GCV/FOS + GCV	A594T	var	Cilt/GIS GVHH	Sağ
H23	5.4	K	P	4.42	AKİY	HKHT-MUD	KK-5/6	KK-5/6	FOS	GCV/FOS + GCV	C592G	var	Pnömoni	Eks
H24	1.5	E	P	4.43	WAS	HKHT-MUD	Ki-10/10	Ki-10/10	ASV	GCV/FOS	yok	var		Sağ
H25	0.8	K	N	4.46	AKİY	HKHT-MUD	KK-5/6	KK-5/6	ASV	GCV/FOS + GCV	D605E	yok	GIS GVHH	Eks
H26	2.1	K	P	4.53	AML Relaps	HKHT-MUD	KK-5/6	KK-5/6	ASV	GCV	yok	var	GIS GVHH	Eks
H27	16.5	E	P	4.59	WAS	HKHT-MUD	Ki-10/10	Ki-10/10	ASV	GCV	yok	var	GIS, KC, Deri GVHH	Eks



Tablo I. Genotipik Direnç Testi alışılan Hastaların zellikleri (n= 30) (devamı)

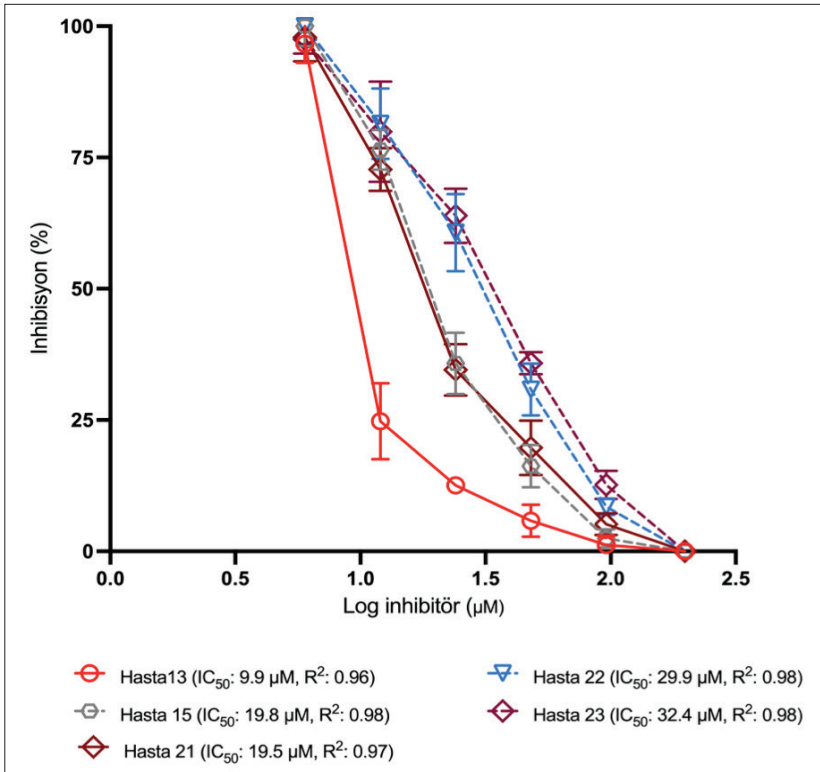
Hasta	Yaş	Cinsiyet	Alıcı CMV Serolojisi	CMV Log <sub>10</sub> Kopya/ml	Tanı	Verici Tipi	Kök Hücre Kaynağı-Uyum Skoru*	Profilaksi	Başlangıç Tedavisi/ Değişim	Virolojik Direnç	Klinik Direnç	Klinik	Sağkallım
H28	15.9	E	P	5.29	KBY Nörojenik Mesane	Böbrek-KV	-	VASV	VGCV/VASV/ GCV	yok	yok	Grade IV PKD	Sağ
H29	45.4	K	P	5.35	KC sifroz	KC-KV	-	-	GCV	yok	yok	Solumum Yetmezliği	Eks
H30	3.9	E	P	5.40	KAT	HKHT-MUD	Kİ-10/10	ASV	GCV/ FOS+GCV	yok	var	ilt GVHH	Sağ

AA: Aplastik anemi, ABY: Akut böbrek yetmezliği, AKİY: Ağır kombine immün yetmezlik, ALL: Akut lenfoblastik lösemi, AML: Akut myeloblastik lösemi, ASV: Asiklovir, CMV: Sitomegalovirüs, CV: Canlı verici, E: Erkek, Eks: Eksits, FAA: Fankoni aplastik anemi, FOS: Foskarnet, GCV: Gansiklovir, GVHH: Graft versus Host hastalığı, HKHT: Hematopoietik kök hücre transplantasyonu, HLH: Hemofagositik lenfositosis, K: Kız, KAT: Konjenital amegakaryositik trombositopeni, KBY: Kronik böbrek yetmezliği, KC: Karaciğer, Kİ: Kemik iliği, KK: Kordon kanı, KML: Kronik miyelositik lösemi, KV: Kadaverik verici, MDS: Myelodisplastik sendrom, MRD: Match related donör, MSD: Match sibling donör, MUD: Match unrelated donör, N: Negatif, OS: Osteopetrozis, P: Pozitif, PKD: Pelvikalisyon Dilataasyon, PKKH: Periferik kan kök hücre, SDNS: Steroid dirençli nefrotik sendrom (NPHS-2, homozigot podosin mutasyonu), WA: Wiscott-Aldrich sendromu, VASV: Valansiklovir, VGCV: Valgansiklovir.

\*Kök hücre kaynağı ve uyum skoru kemik iliği nakli yapılan bireyler için verildi.

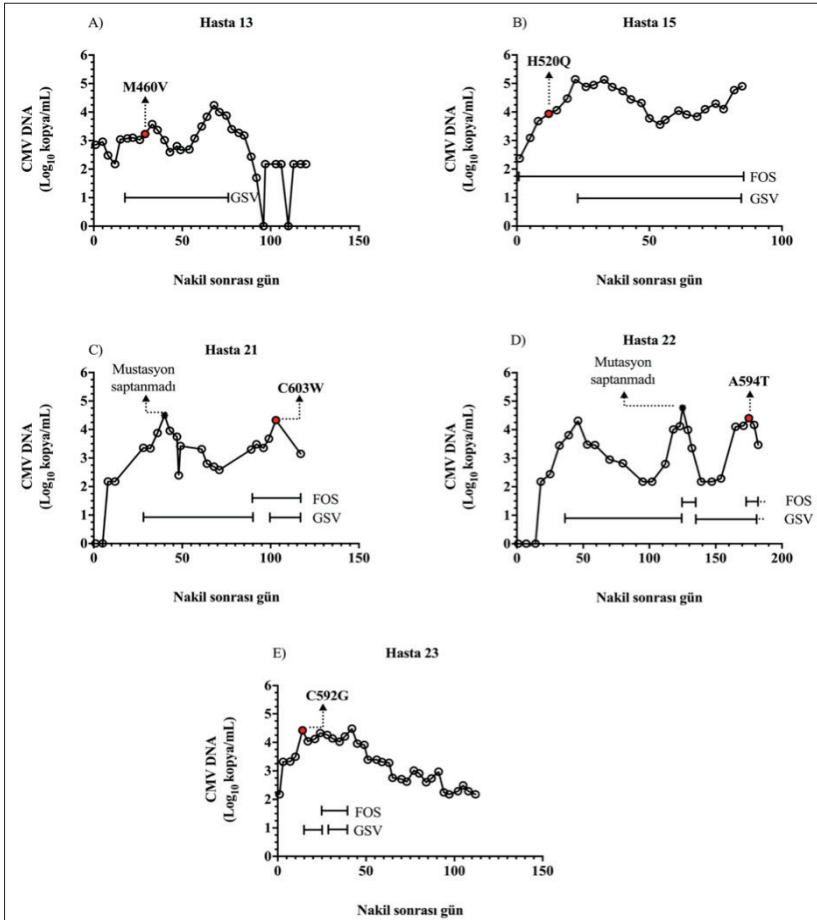
Genotipik testleriyle C603W, H520Q, M460V, A594T ve C592G direnç mutasyonları saptanan beş hastanın (hasta 13, hasta 15, hasta 21, hasta 22, hasta 23) hücre kültüründe, PRNT'de saptanan IC<sub>50</sub> değerleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Genotipik testler ile UL97 geninde mutasyon saptanmayan klinik CMV izolatları ve AD169 standart suşu, fenotipik testler ile GCV duyarlı olarak tespit edilmiştir.

Hastalara AHKHT sonrası yüksek doz asiklovir ile 3-6 ay profilaksi uygulanmış, aynı zamanda haftada 1-2 defa plazma örneklerinde CMV-DNA varlığı araştırılmıştır. Plazma CMV-DNA düzeyi 400 kopya/mL üzerine çıktığında IV GCV tedavisi başlanmış, klinik olarak GCV direnci düşünülmesi durumunda tedavi FOS ile değiştirilmiştir. Antimikrobiyal profilaksi için siprofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol ve flukonazol kullanılmıştır. Graft versus Host hastalığı (GVHH) profilaksisi için siklosporin A (CsA) uygulanmıştır. Hasta tanısına ve donör tipine göre GVHH profilaksisi için diğer immünosupresanlar (anti-timosit globulin, metotreksat, mikofenolat mofetil ve/veya kortikosteroidler) tedaviye eklenmiştir. Hazırlık rejimleri (miyeloablative ve miyeloablative olmayan) çalışma protokolüne (hastalık, yaş ve donör tipi) göre tanımlanmıştır. CMV enfeksiyonunun tanı ve yönetiminde, CMV hastalığıyla ilişkili risk faktörleri (cinsiyet, yaş, altta yatan hastalık, donör tipi, hazırlık rejimi, GVHH göz önünde bulundurularak immünomodülasyon uygulanmıştır.



Şekil 1. Genotipik testler ile C603W, H520Q, M460V, A594T ve C592G direnç mutasyonları saptanan beş hastanın hücre kültüründe, PRNT'de saptanan IC<sub>50</sub> değerleri.

Hasta 13: Hemofagositik lenfositosisi tanısıyla izlenen dört yaşında kız hastaya, "match unrelated donor (MUD)" 9/10 uyumlu AHKHT yapılmıştır. Nakilden sonraki 17. günde CMV viral yükünün artması nedeniyle IV GCV başlanmış, 19. günde evre 1-2 akut GIS GVHH nedeniyle metil prednizolon (MPZ) 2 mg/kg/gün dozunda başlanmıştır. Nakilden sonraki 28. gün CMV-DNA 6900 kopya/mL saptanan örneğinden çalışılan genotipik direnç testinde GCV direncine yol açtığı bilinen M460V mutasyonu saptanmıştır. İzleminde ek sorunu olmayan hasta, nakilden iki ay sonra önerilerle taburcu edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Genotipik olarak direnç mutasyonu saptanan hastaların viral yük izlemleri ve tedavi süreçleri.

CMV: Sitomegalovirüs, FOS: Foskarnet, GCV: Gansiklovir.

Hasta 15: Doğuştan ağır kombine immün yetmezlik tanısıyla takip edilen 14 yaşında erkek hastaya, MUD 10/10 uyumlu AHKHT yapılmıştır. Çocukluğundan beri sık tekrarlayan CMV pnömonisi, CMV enfeksiyonuna bağlı özofagus darlığı ve CMV koliti tanılarıyla uzun süreli IV GCV ve son üç ay Val-GCV tedavisi alan hastaya nakilden önceki yedinci günde GCV + FOS tedavisi başlanmıştır. Nakilden sonraki 14. günde, viral yük 8680 kopya/mL saptanan örnekten genotipik yöntemle direnç testi çalışılmış ve GCV direncine yol açan H520Q mutasyonu saptanmıştır. Nakilden sonraki 30. günde evre 1-2 akut GIS GVHH nedeniyle MPZ 2 mg/kg/gün dozunda başlanmıştır. Nakilden sonraki 60. günde sol gözde geçirilmiş CMV retinit aktif nüksü düşünülerek servise yatırılmıştır, intravitreal GCV enjeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra CMV pnömonisi tanısıyla takip edilen hasta, nakilden sonraki 80. günde bilinç bulanıklığı gelişmesi üzerine pediyatrik yoğun bakıma devredilmiştir. GCV kesilip FOS günde iki kez, 1800 mg dozuna yükseltilmiştir. Yaygın CMV enfeksiyonu gelişen hasta nakilden sonraki 87. günde eksitus olmuştur (Şekil 2).

Hasta 21: Relaps akut lenfoblastik lösemi (ALL) tanısıyla izlenen 18 yaşında erkek hastaya, MUD 9/10 uyumlu CMV seronegatif vericiden AHKHT yapılmıştır. Nakil sonrası 28. gün CMV-DNA'nın 2280 kopya/mL saptanması üzerine GCV (2 x 350 mg IV) başlanmıştır. Nakil sonrası 40. gün GCV tedavisi altında plazma CMV-DNA düzeyi 31300 kopya/mL'ye yükselmiştir. Bu örnekte GCV mutasyonu saptanmamıştır. Nakilden sonraki 90. günde viral yük tekrar yükselmeye başlamış, reaktivasyon düşünülüp FOS'a geçilmiş, 10 gün sonra tedaviye GCV eklenmiştir. Nakilden sonraki 103. günde CMV DNA düzeyi tekrar pik yaparak 21300 kopya/mL'ye ulaşmıştır. Bu tarihteki plazma örneğinde, CMV'nin UL97 geninde GCV direncine yol açtığı bilinen C603W mutasyonu saptanmıştır. Nakilden sonraki dördüncü ayda hasta relaps ALL kabul edilerek kemoterapi başlanması karar verilmiş, aile tedaviyi kabul etmemiştir. Nakilden sonraki beşinci ayda hasta eksitus olmuştur (Şekil 2).

Hasta 22: Fanconi aplastik anemi tanısıyla altı yıldır izlenen 10 yaşında erkek hastaya, MUD 9/10 uyumlu AHKHT yapılmıştır. Yirmi beşinci günde CMV-DNA 278 kopya/mL saptanmış, 35. günde IV GCV (2 x 135 mg/IV) başlanmış, 39. günde akut cilt GVHH tanısıyla mevcut profilatik MPZ tedavi dozuna geçilmiş, 46. günde CMV-DNA 20500 kopya/mL'ye, 125. günde 58300 kopya/mL düzeyine ulaşmıştır. Bu dönemde hasta servise yatırılarak 20 gün FOS tedavisi almıştır. Nakilden sonraki 175. günde CMV-DNA 25 200 kopya/mL olarak saptanmıştır. Bu örnekten çalışılan direnç testinde A594T mutasyonu saptanmıştır. Hastanın takibinde grade 2 GIS GVHH gelişmiştir. Bu hasta 2017'ye kadar tedavi altında kalmıştır (Şekil 2).

Hasta 23: Kombine immün yetmezlik tanısıyla izlenen beş yaşında kız hastaya, MUD 5/6 uyumlu kordon kanı nakli yapılmıştır. CMV-DNA düzeyleri; nakilden sonraki 14. günde 26500 kopya/mL'ye yükselmiştir. FOS tedavisi alan hastada nakilden sonraki 15. günde GCV'ye geçilmiş (FOS temin edilemediği için), 29. günde GCV + FOS tedavisi uygulanmış ve nakil sonrası 39. güne kadar devam edilmiştir. Bu hastada CMV DNA 26500 kopya/mL saptanan plazma örneğinden yapılan çalışmada CMV'nin UL97 geninde GCV

direncine yol açtığı bilinen C592G mutasyonu saptanmıştır. Nakilden sonraki üçüncü ayda CMV pnömonisi nedeniyle tekrar servise yatırılan hasta, nakilden sonraki beşinci ayda eksitus olmuştur (şekil 2).

## TARTIşMA

Bu çalışmada; beş pediyatrik AHKHT alıcısında, CMV'nin UL97 geninde, %22.7 oranında GCV direncine yol açan klinik dirençle ilişkili mutasyonlar (C603W, C592G, H520Q, M460V, A594T) saptanmıştır. Bu hastalarda fenotipik yöntemlerle de gansiklovir direnci gösterilmiştir, SOT yapılan sekiz hastada ise UL97 mutasyonu saptanmamıştır (Tablo I). Fosfotransferaz enzimini kodlayan UL97 genindeki mutasyon ve delesyonlar CMV'deki GCV direncinin en yaygın mekanizmasıdır. GCV fosforilasyonunu bozan veya engelleyen 460'tan 607'ye kadar olan kodon bölgelerinde en azından 11 gen değişimi tanımlanmıştır. M460V, en sık görülen ve iyi bilinen GCV direnç mutasyonu olup, duyarlı bir virüsle karşılaştırıldığında GCV direncini sekiz kat (IC50 değeri) artırmaktadır. 590-607 kodonlar arasında, GCV direncinin en sık görüldüğü C592G, A594V ve L595S mutasyonları dahil, değişen derecelerde dirençle ilişkilendirilen önemli bir mutasyon çeşitliliği bildirilmiştir<sup>11</sup>. 590-607 kodonlarındaki; tek bir kodon (rn; 595, 600 veya 601), birkaç kodon (rn; 591-4) veya bu segmentin büyük kısmını (rn; 595-603) kapsayan delesyon mutasyonlarının GCV direnci kazandırdığı gösterilmiştir. M460V/I, H520Q, A594V ve C603W mutasyonları GCV ile başlangıç tedavisi başlanan hastalardan izole edilen izolatların %80'inde ortaya çıkmaktadır<sup>12,13</sup>. Boivin ve arkadaşları<sup>14</sup> ise GCV'ye dirençli klinik izolatların yaklaşık %70'inin UL97 geninde  mutasyondan (460, 594 ve 595) birini içerdiğini göstermiştir. Yapılan çalışmalarda klinik dirence neden olan mutasyonların UL97 geninde daha sık saptandığı görülmekte ve tedavi sonrası GCV'ye dirençli CMV izolatlarının %90'ından fazlasında UL97 mutasyonları bulunmaktadır<sup>15</sup>. UL97 geninde mutasyon olmaksızın UL54 mutasyonu, GCV direncine nadiren neden olmaktadır<sup>16</sup>. Bu nedenle, çalışmada UL97 geni araştırılmış ancak hastada klinik direnç var ve UL97 geninde mutasyon saptanmamışsa UL54 geninde GCV direncine neden olan mutasyonların varlığı araştırılmalıdır. Bu çalışmada, altı hastada (H18, H19, H24, H26, H27 ve H30) klinik direnç olmasına rağmen UL97 geninde mutasyon saptanmamıştır. Bu hastalarda GCV direncinden de sorumlu olan UL54 genindeki mutasyonların araştırılması yararlı olacaktır.

Klinik pratikte, bir bireyde klinik olarak anlamlı GCV direncinin gelişmesi için hastada muhtemelen birden fazla faktörün bir araya gelmesi gerekir. Özellikle AHKHT yapılan hastalarda nakil ncesi T lenfositlerin uzaklaştırılması, uzun süreli antiviral tedavi (> 3 ay), çok sayıda CMV hastalığı epizodu ve alıcının seropozitif olması direnç gelişiminde hazırlayıcı rol oynamaktadır. Yüksek viral yük varlığında, suboptimal ilaç konsantrasyonları ve yeterli bağışık yanıtın yokluğu durumunda dirençli mutantların seçimi ve popülasyon içinde oranının artması için daha büyük bir olasılık bulunmaktadır<sup>17</sup>. Bu çalışmada takip edilen hastalardan ikisinde (H21, H22) AKHT sonrasında tekrarlayan CMV enfeksiyonları gelişmiştir ve her iki hastada da ilk viral yük artışında alınan örneklerde mutasyon saptan-

mazken ikinci viral yük artışında GCV direncine neden olan C603W ve A594T mutasyonları saptanmıştır. Antiviral tedavide klinik/viral yük izleminde yanıt alınamayan olgularda UL97 mutasyonları araştırılmalıdır.

Türkiye’de, UL97 gen bölgesindeki GCV direncini araştırmaya yönelik yayımlanmış dört çalışmaya ulaşılmıştır<sup>18-21</sup>. Arslan ve arkadaşlarının olgu sunumunda<sup>18</sup>, HKHT alıcısı olup CMV ensefaliti gelişen bir olguda UL97 geninde M460V mutasyonu bildirilmiştir. Zeytinoğlu ve arkadaşları<sup>19</sup>, bir renal transplant alıcısı ve HKHT alıcısı üç hastada UL97 gen bölgesinde sırasıyla C607F, A594V ve C603W mutasyonlarını saptamışlardır. Delice ve arkadaşlarının çalışmalarında<sup>20,21</sup>, 25’i HKHT olan 30 immün yetmezlikli hastanın birinde (%4.0) UL97 gen bölgesinde M460V mutasyonu ve 20 çocuk, 29 erişkin immün yetmezlikli hastadan elde edilen CMV izolatlarında AHKHT alıcısı bir çocuk hastada C592G, AML ve lenfoma tanılı iki erişkin hastada (%6.1) sırasıyla M460I ve C607S GCV direnç mutasyonları tespit edilmiştir.

GCV direncinin genel prevalansı SOT alıcılarında %5-12 arasında, AHKHT alıcılarında ise %0-4 arasında saptanırken GCV direnç oranlarının akciğer nakli alıcılarında %18’e ve donör uyumsuz, haploidentik, akraba dışı AHKHT alıcılarında ise %14.5’e kadar yükselebildiği bildirilmektedir<sup>22,23</sup>. Kuzey Amerika transplant merkezleri arasındaki CMV direncinin genel prevalansının, akciğer alıcılarında %10-11.9’luk piklerle SOT’ta %12.1 ve AHKHT’de haploidentik alıcılarda %14.5’lik piklerle %7.9 oranında olduğu bildirilmektedir<sup>24</sup>. Benzer şekilde Avrupa’da, SOT’ta %10.7 ve AHKHT’de %6.9 oranları bildirilmiş ancak SOT olgularının sadece %5.9’u ve HKHT olgularının %1.7’si CMV mutasyonlarıyla ilişkili bulunmuştur<sup>25</sup>. İtalya’da ise, tek merkezli çalışmalarda AHKHT’de %3.8 ve SOT’ta %0.1’in altında oranlar bildirmiştir<sup>26,27</sup>. Bu çalışmada İtalya’da, HKHT hastalarına ve düşük riskli SOT hastalarına preemtif yaklaşım uygulanırken, SOT hastalarına, özellikle de yüksek riskli SOT hastalarına neredeyse rutin olarak profilaksi uygulandığı bildirilmiştir.

SOT ve HKHT alıcılarında GCV direnci prevalansı; incelenen özgül popülasyona, kullanılan immünosupresif ajanlara, antiviral profilaksiye, alıcı ve vericinin seropozitiflik durumuna göre değişmektedir. SOT alıcılarında birçok transplantasyon merkezinde rutin GCV profilaksisinin kullanılmaya başlanmasıyla, CMV enfeksiyonunun başlangıcı ve hastalığın gelişmesi transplantasyon sonrası geç dönemde görülmeye başlamıştır. Bu çalışmada, SOT yapılan beş böbrek ve üç karaciğer transplant alıcısının altısında VASV profilaksisi uygulanmış ve bu sekiz transplant alıcısının da seropozitif olduğu saptanmıştır (Tablo I). Yapılan çalışmalarda AHKHT alıcıları için daha yüksek GCV direnç oranları bildirilmektedir, bu çalışmada da GCV direnci saptanan beş hastanın AHKHT alıcısı ve donörlerinin MUD olmasının GCV direnci risklerini artırdığı düşünülmektedir.

Çalışmalarda, konjenital CMV enfeksiyonu ve primer immün yetmezlik olmasının hem kalıcı viremi hem de yüksek viral yük için risk oluşturduğu ve potansiyel olarak uzun süreli tedaviye ve onu izleyen dirence yol açtığı, özellikle primer immün yetmezliği olan pediatrik transplant alıcılarının, antiviral tedavi sırasında ortaya çıkan direnç gelişimi için yüksek risk altında oldukları bildirilmiştir<sup>7</sup>. Bu çalışmaya dahil edilen HKHT alıcısı pediatrik

hasta grubunda, UL97 mutasyonu saptanan hastalardan  (H15, H23, H25) doğuştan kombine immün yetmezlik tanularıyla takip edilmekteydi ve nakil öncesi tekrarlayan CMV enfeksiyonları nedeniyle uzun dönem GCV tedavisi almışlardı. Bu hastalardan ikisinde (H15, H23) GCV dirençli CMV enfeksiyonu gelişmiştir. Nakil sonrasında üç hasta da yaygın CMV hastalığı, GVHH gibi komplikasyonlarla kaybedilmiştir. CMV hastalığı ve GVHH için yüksek riskli primer immün yetmezlikli pedyatrik transplant alıcılarında dirençli GCV mutasyonlarının araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada; seronegatif bir alıcıda GCV direncine yol açmadığı bilinen D605E mutasyonu saptanmıştır. Rekombinant virüslerle yapılan bir direnç fenotip çalışmasında, D605E'nin tek başına veya M460V, C592G, A594V, L595S gibi diğer mutasyonlar ile kombinasyon halinde GCV direncine neden olmadığı gösterilmiştir<sup>11</sup>. Bir hastada ise daha önce tanımlanmamış  mutasyon (I474T, F499S, V559A) saptanmıştır. I474T mutasyonu bir doktora tezinde NGS ile CMV popülasyonunda %14 yani minör varyant düzeyinde gösterilmiş ama fenotipik test çalışılmamıştır<sup>28</sup>. Bu çalışmada, bu üç farklı yeni varyantın GCV direnciyle ilişkisi fenotipik testlerle gösterilememiştir. Ancak bu hasta, kemik iliği nakli sonrası 16 ay takip edilmiş, CMV viral yükü bir kez 3450 kopya/mL düzeyinde saptanmış ve GCV tedavisi sonrası başarılı bir şekilde baskılanmıştır. Hastanın takip eden haftalık viral yük izleminde CMV enfeksiyonu gelişmemiş, bu nedenle klinik olarak GCV direnci düşünülmemiştir.

Genotipik yöntemlerde, hedef gen bölgesinin amplifikasyonu ve dizi analiziyle saptanan tüm nükleotit ve aminoasit kodon değişiklikleri ile ortaya çıkan varyant kodonların, ilaç direnci yönünden fenotipik olarak test edilerek doğrulanması gerekir. Herhangi bir mutasyonun antiviral dirence yol açıp açmadığının belirlenmesinde, referans yöntem olarak fenotipik testler önerilmektedir<sup>29</sup>. Referans yöntem olarak kullanılan PRNT'de, hücreleri enfekte eden plak sayısı hesaplanarak bu plak sayısını %50 oranında azaltan antiviral ilaç konsantrasyonu belirlenmektedir. Çalışmada, GCV'nin 3 M, 12 M, 48 M ve 96 M konsantrasyonları kullanılarak yapılan plak azaltma testinde; IC50 değeri beş dirençli CMV suşu için de  $\geq 8$  M olarak saptanmış, fenotipik olarak da GCV direnci varlığı gösterilmiştir (şekil 1).

Genotipik yöntemlerde, CMV'nin ilaç direncinden sorumlu genlerindeki mutasyon ve/veya delesyonların araştırılmasında en çok kullanılan yöntemlerden biri Sanger temelli DNA dizi analizidir. Bu yöntemde çok sayıda örnek çalışılabilmekte, hücre kültürü yöntemlerine göre daha kısa süre içinde sonuç alınabilmekte ve sonuçların değerlendirilmesi objektif kriterlere dayanmaktadır. Günümüzde GCV direncini saptamaya yönelik ileri düzey genetik tanı yöntemleri de tanı aracı olarak kullanılmaya başlanmıştır. HCMV UL97 mutasyonlarının saptanmasında yeni nesil dizileme yöntemleri; yüksek verimlilik, kısa sürede sonuç alınabilmesi ve karışık virüs popülasyonlarında bulunan minör varyantların saptanmasında klasik Sanger dizilemesine göre daha duyarlı sonuçlar ortaya koymektedir<sup>30</sup>. Halen, rutin tanıdaki rolünü tanımlamak için maliyetlerin iyileştirilmesi ve duyarlılığının değerlendirilmesi gerekmektedir.

Çalışmaya alınan 22 HKHT hastasından beşinde (%22.7) klinik dirençle ilişkili CMV UL97 mutasyonu saptanmıştır. Bu hastalarda fenotipik yöntemler ile de GCV direnci gösterilmiştir. Çalışmanın kısıtlılığı, UL54 geninde antiviral dirence neden olan mutasyonların araştırılmamış olmasıdır. SOT yapılan hastaların hiçbirinde UL97 mutasyonu saptanmamıştır. Genotipik yöntemler antiviral direncin araştırılmasında hızlı sonuç veren yöntemlerdir. Dirençle ilişkisi henüz tanımlanmamış mutasyonların fenotipik yöntemlerle dirence yol açıp açmadığının araştırılması gereklidir.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 26.03.2014, Karar No: 181).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Fishman JA, Emery V, Freeman R, Pascual M, Rostaing L, Schlitt HJ, et al. Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo. *Clin Transplant* 2007; 21(2): 149-58. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2006.00618.x>
2. Ataman S, Colak D, Günseren F, Senol Y, Colak T, Aktekin MR, et al. Antalya'da sitomegalovirus seroepidemiolojisinin toplum kaynaklı kesitsel bir çalışma ile araştırılması ve Türkiye verilerinin derlenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41(4): 545-55.
3. Springer KL, Chou S, Li S, Giller RH, Quinones R, Shira JE, et al. How evolution of mutations conferring drug resistance affects viral dynamics and clinical outcomes of cytomegalovirus-infected hematopoietic cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1): 208-13. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.208-213.2005>
4. Griffiths PD, Boeckh M. Antiviral therapy for human cytomegalovirus, in: Humman Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21348080> (Accessed date: 11.09.2021).
5. Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(4): 689-712. <https://doi.org/10.1128/CMR.00009-10>
6. Haidar G, Boeckh M, Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ and hematopoietic cell transplantation: State of the evidence. *J Infect Dis* 2020; 221(Suppl 1): S23-S31. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz454>
7. Kim YJ, Boeckh M, Cook L, Stempel H, Jerome KR, Boucek R, et al. Cytomegalovirus infection and ganciclovir resistance caused by UL97 mutations in pediatric transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2012; 14(6): 611-7. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2012.00760.x>
8. Majeed A, Latif A, Kapoor V, Sohail A, Florita C, Georgescu A, et al. Resistant cytomegalovirus infection in solid-organ transplantation: Single-center experience, literature review of risk factors, and proposed preventive strategies. *Transplant Proc* 2018; 50(10): 3756-62. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.02.091>
9. Landry ML, Stanat S, Biron K, Brambilla D, Britt W, Jokela J, et al. A standardized plaque reduction assay for determination of drug susceptibilities of cytomegalovirus clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(3): 688-92. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.688-692.2000>
10. Lurain NS, Weinberg A, Crumpacker CS, Chou S. Adult AIDS Clinical Trials Group-CMV Laboratories, sequencing of cytomegalovirus UL97 gene for genotypic antiviral resistance testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(10): 2775-80. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2775-2780.2001>



11. Chou S, Van Wechel LC, Lichy HM, Marousek GI. Phenotyping of cytomegalovirus drug resistance mutations by using recombinant viruses incorporating a reporter gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(7): 2710-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2710-2715.2005>
12. Chou SW. Cytomegalovirus drug resistance and clinical implications. *Transpl Infect Dis* 2001; 3 Suppl 2: 20-4. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3062.2001.00004.x>
13. Chevillotte M, von Einem J, Meier BM, Lin FM, Kestler HA, Mertens T, et al. A new tool linking human cytomegalovirus drug resistance mutations to resistance phenotypes. *Antiviral Res* 2010; 85(2): 318-27. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.004>
14. Boivin G, Gilbert C, Gaudreau A, Greenfield I, Sudlow R, Roberts NA, 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. <https://doi.org/10.1086/324672>
15. Razonable RR. Drug-resistant cytomegalovirus: Clinical implications of specific mutations. *Curr Opin Organ Transplant* 2018; 23(4): 388-94. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000541>
16. Göhring K, Hamprecht K, Jahn G. Antiviral drug and multidrug resistance in cytomegalovirus infected SCT patients. *Comput Struct Biotechnol J* 2015; 13: 153-9. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.01.003>
17. Drew WL. Cytomegalovirus resistance testing: Pitfalls and problems for the clinician. *Clin Infect Dis* 2010; 50(5): 733-6. <https://doi.org/10.1086/650463>
18. Arslan F, Tabak F, Avşar E, Midilli K, Mert A, Ozaras R, et al. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus encephalitis in a hematopoietic stem cell transplant recipient. *J Neurovirol* 2010; 16(2): 174-8. <https://doi.org/10.3109/13550281003682539>
19. Zeytinoglu A, Turhan A, Keskinoglu A, Aksoylar S, Dincel N, Devci B, et al. The first two ganciclovir resistant cytomegalovirus isolates from kidney and pediatric stem cell transplant recipients in Turkey. *J Immunol Clin Microbiol* 2016; 1(3). <https://doi.org/10.5455/jicm.12.2016070>
20. Delice S, Gökahmetoğlu S, Kaynar L, Karakükçü M. Gansiklovir tedavisi alan immün yetmezlikli hastalarda, CMV UL54 ve UL97 gen bölgelerinde gansiklovir direncinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(3): 393-402. <https://doi.org/10.5578/mb.9185>
21. Coşkun A, Gökahmetoğlu S, Özmen P, Çevik Ş, Karakükçü M, Kaynar L, et al. İmmün yetmezlikli hastalardan elde edilen sitomegalovirüs izolatlarındaki gansiklovir direncinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2020; 54(4): 619-28. <https://doi.org/10.5578/mb.70062>
22. Grossi PA, Baldanti F, Andreoni M, Perno CF. CMV infection management in transplant patients in Italy. *J Clin Virol* 2020; 123: 104211. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.104211>
23. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. The Transplantation Society International CMV Consensus Group, the third international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2018; 102(6): 900-31. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002191>
24. El Chaer F, Shah DP, Chemaly RF. How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood* 2016; 128(23): 2624-36. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-688432>
25. Birkeland Kro GA. Usage of antivirals and the occurrence of antiviral resistance in Norway 2017 RAVN, 2018. Available from: [https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2018/ravn-rapport-2017\\_publicisert\\_2.pdf](https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2018/ravn-rapport-2017_publicisert_2.pdf) (Accessed date: 11.09.2021).
26. Allice T, Busca A, Locatelli F, Falda M, Pittaluga F, Ghisetti V, et al. Valganciclovir as pre-emptive therapy for cytomegalovirus infection post-allogeneic stem cell transplantation: Implications for the emergence of drug-resistant cytomegalovirus. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(3): 600-8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn521>
27. Baldanti F, Lurain N, Gerna G. Clinical and biologic aspects of human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Hum Immunol* 2004; 65(5): 403-9. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.02.007>

28. Mitteldorf J. Evaluierung moderner Sequenziermethoden in der frühzeitigen diagnostik therapieresistenter mutanten des humanen zytomegalievirus, Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.17169/refubium-11736> (Accessed date: 11.09.2022).
29. Drew WL, Paya CV, Emery V. Cytomegalovirus (CMV) resistance to antivirals. *Am J Transplant* 2001; 1(4): 307-12. <https://doi.org/10.1034/j.1600-6143.2001.10403.x>
30. Lodding IP, Jørgensen M, Bennedbæk M, Kirkby N, Naegele K, Gustafsson F, et al. Development and dynamics of cytomegalovirus ul97 ganciclovir resistance mutations in transplant recipients detected by next-generation sequencing. *Open Forum Infect Dis* 2021; 8(10): ofab462. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab462>