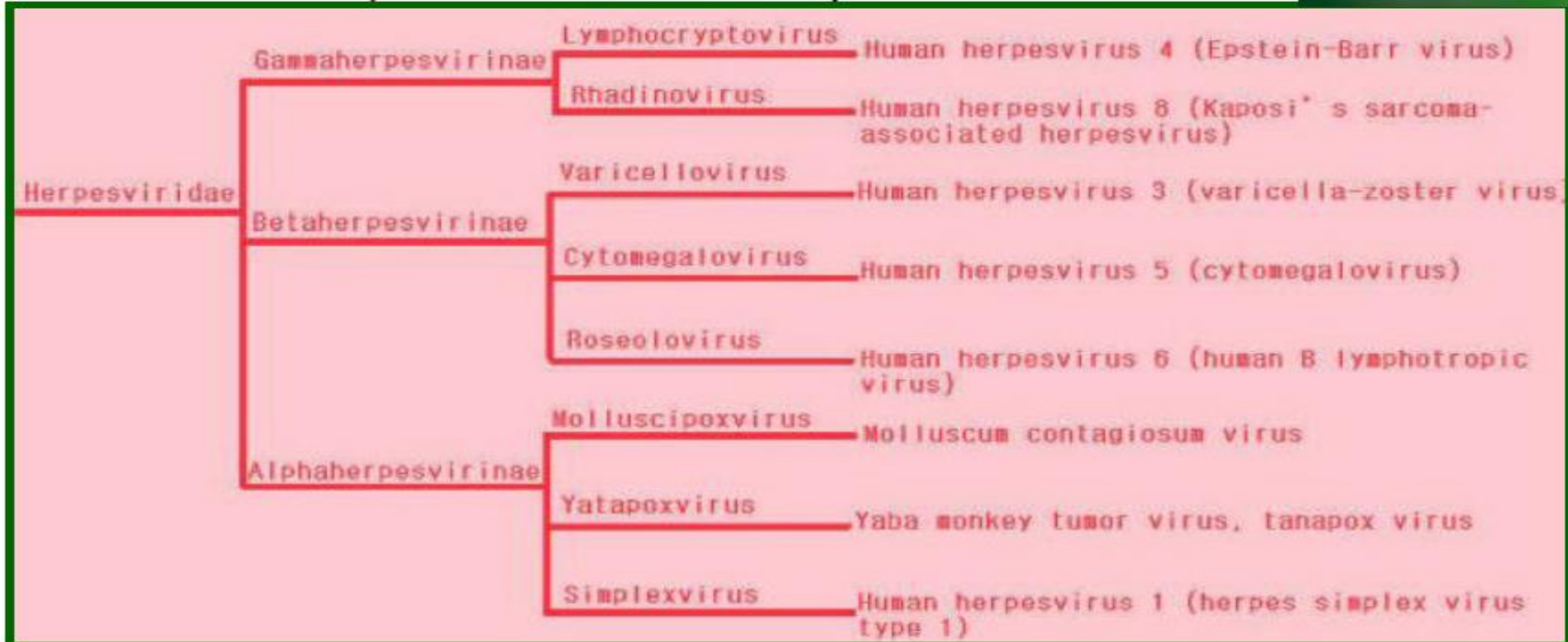
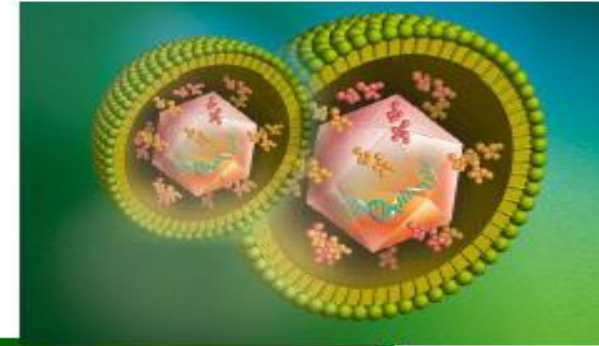


Cytomegalovirus Enfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı

Doç. Dr. Harun AĞCA

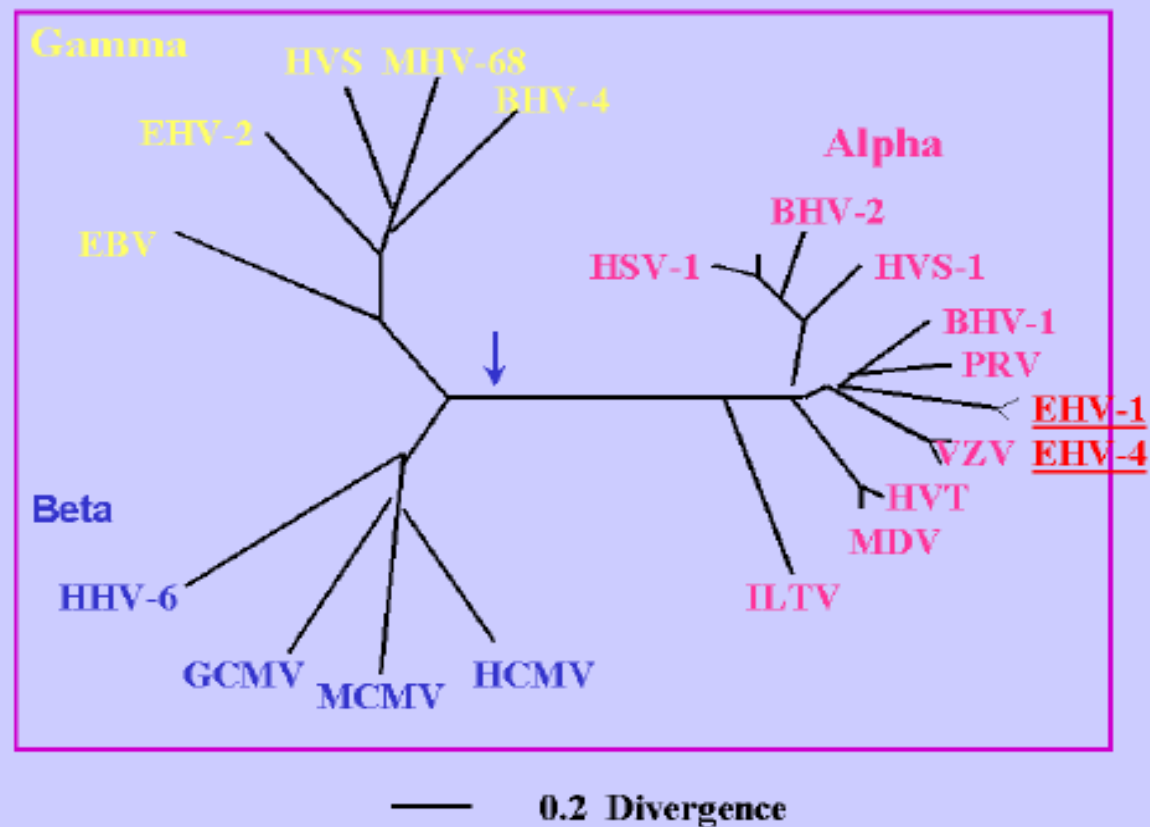
Cytomegalovirus

Cytomegalovirus (CMV) International Committee for Taxonomy of Viruses tarafından **İnsan Herpesvirus 5** olarak tanımlanan *Herpesviridae* ailesi üyesi



- Tükürük bezlerine olan tropizmi, hücre kültüründe geç üremesi ve sınırlı tür spesifitesinden dolayı *Betaherpesvirinae* alt ailesinde yer alır.
- Virus ismini enfekte hücrelerin büyümesinden dolayı (cyto=hücre, mega=büyük) almaktadır.

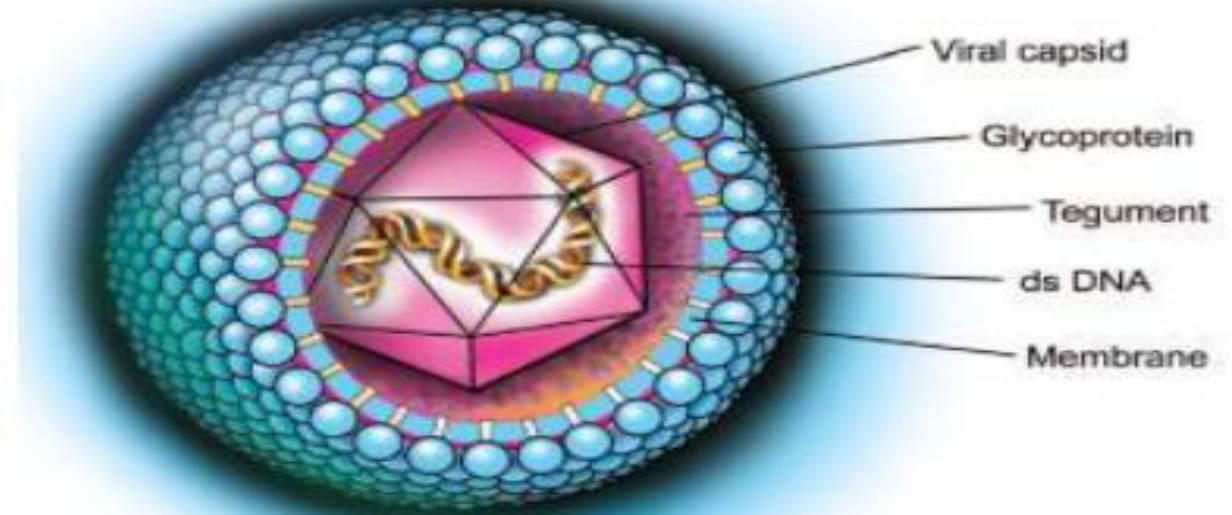
Evolutionary relatedness of herpesviruses and their subfamilies



(Based on McGeoch et al. 1995 J. Mol. Biol. 247 443-458)

Cytomegalovirus

- 120-200 nm
- Genom 235 kb lineer çift iplikli DNA ve spesifik mRNA'lar
- 162 kapsomerden oluşan ikozahedral kapsidi, amorf tegümenti ve en dışta fosfolipidten zengin zarf
- Sadece insan hücreleri:
 - Fibroblast
 - Epitelyal hücreler
 - Granülositler
 - Makrofajlar
- Latent enfeksiyon:
 - Miyeloid kök hücreler
 - Monositler
 - Lenfositler
 - KI stromal hücreleri



HCMV Human Cytomegalovirus

Patogeneze ve immünite

- Persistan ve latent enfeksiyonlar
- Lenfosit ve lökositler gibi enfekte hücrelerle yayılım
- İmmünsupresyon ve allojenik stimulasyonla reaktivasyon
- Hücresel immüniteye karşı CMV:
 - MHC I molekül ekspresyonunu önleyerek ve sitokinle indüklenen MHC II molekül ekspresyonunu engelleyerek CD8 ve CD4 hücrelerin antijen sunumunu bozar.
 - Viral bir protein ile NK hücrelerini bloke eder.
 - IL-10 analogu ile TH1 koruyucu immünitesini bozar.

Cytomegalovirus

- CMV'nin elektron mikroskopisinde **defektif partiküller**
- CMV
 - 56°C'de 30 dakikada
 - düşük pH'da
 - lipid çözücülerde
 - UV ışığı altında ve dondurup-çözdürme işlemlerinden sonra **inaktif** olur.

Cytomegalovirus

İnsan cytomegalovirus enfeksiyonları, bütün dünyada yaygındır ve gelişmekte olan ülkelerde çocukları, gelişmiş ülkelerde erişkinleri enfekte etmektedir.

İmmunsuprese bireylerde ise **ölümcül** olabilmekte ve **hem gelişmiş, hem de gelişmekte olan** ülkelerde oldukça önemli bir yer tutmaktadır.

Intrauterin enfeksiyonları gelişmiş ülkelerde ciddi önem taşımaktadır..





- **Cytomegalovirusun tanı güvenilirliği**
tekrarlayan ve latent kalabilen bir enfeksiyon etkeni olmasından dolayı **azdır.**
- *Bu nedenle virusun varlığını araştıran testlerin pozitif olması her zaman aktif hastalığı göstermemektedir.*

CMV TANI YÖNTEMLERİ

Cytomegalovirus Tanı Yöntemleri

- Direkt inceleme
 - Histopatoloji
 - Antijenemi
 - Moleküler yöntemler
- Virusun izolasyonu
 - Hücre kültürü
 - Hızlı hücre kültürleri (Shell vial yöntemi)
- Seroloji
 - EIA
 - IFA
 - Avidite

Örnekler

- İdrar
- Kan
- Tükürük
- Gözyaşı
- Bronkoalveolar lavaj sıvısı
- Semen
- Anne sütü
- Amniyotik sıvı
- Vajinal ve servikal sekresyonlar
- Transplantasyon sırasında elde edilen dokular

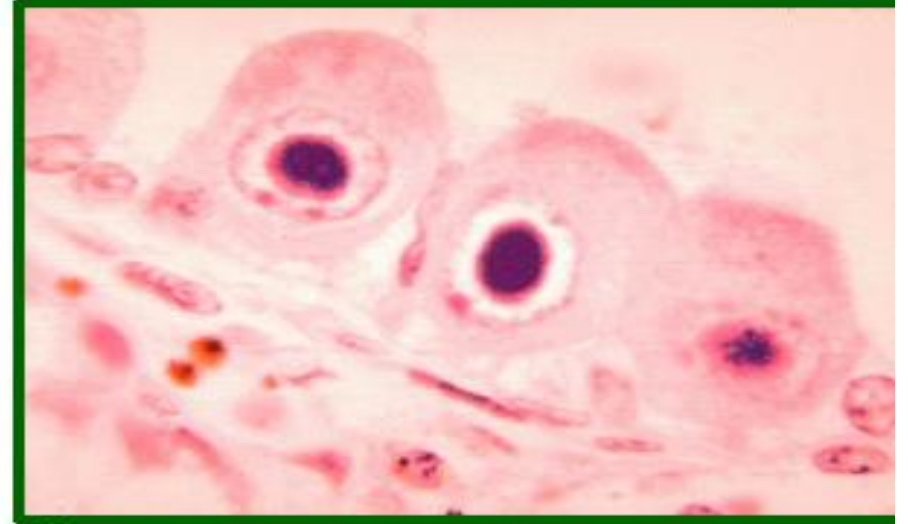
MOLEKÜLER OLMAYAN TESTLER

Histopatoloji

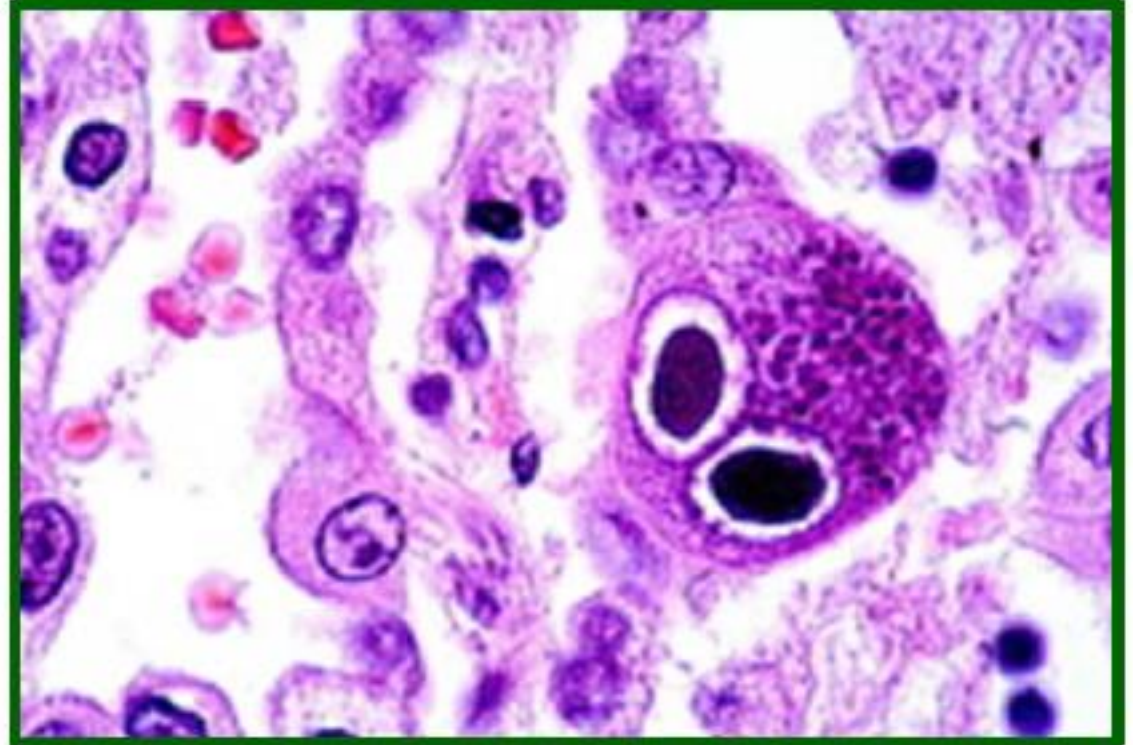
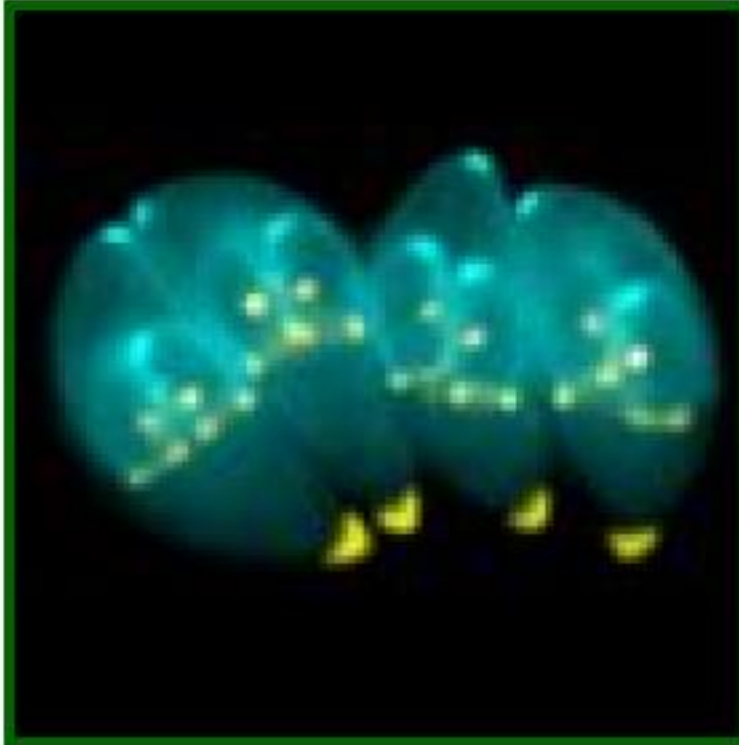
- Biyopsi veya otopsi materyallerinin incelenmesinde geçerli bir yöntemdir.
- Viral yük saptanamaz.
- Özgüllüğü yüksek duyarlılığı düşük

Böbrek ve akciğer biyopsilerinde

- Wright-Giemza
- Hematoksilen eozin
- Papanicolaou boyalı preperatlarda
 - bazofilik intranükleer inklüzyonları olan karakteristik büyük hücreler (sitomegalik hücreler) görülebilir.

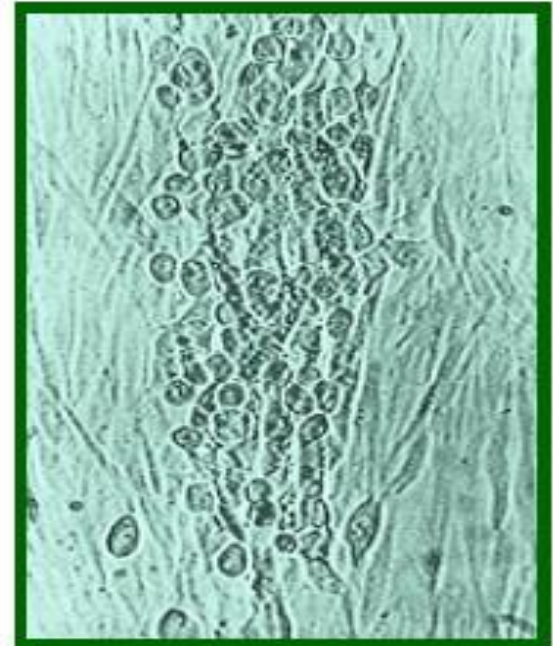
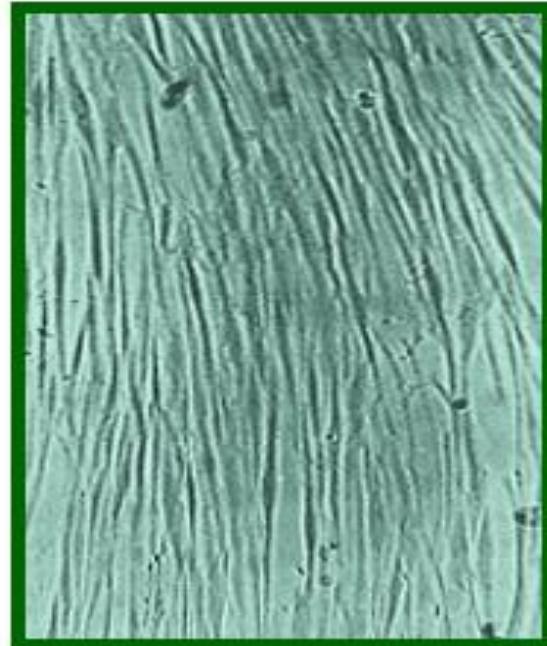


Nükleer inklüzyon; sınırı belirgin kromatin içerdiği ve bunun etrafındaki açık alan nükleer membrana kadar uzandığı için “*baykuş gözü*” görünümüne sahiptir ve çoğunlukla aktif enfeksiyon ile birlikte.



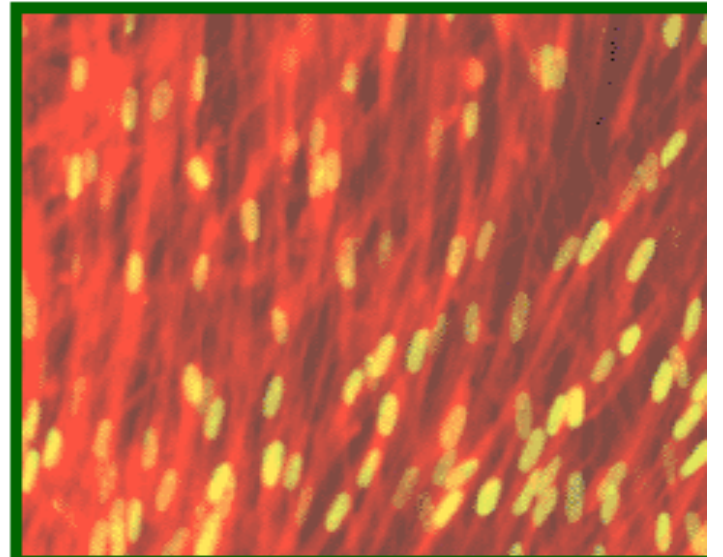
Hücre kültürü

- İnsan fibroblast hücreleri
- CMV tanısında altın standart
- Moleküler yöntemlerin kullanıma girmesi ile kullanımı **sınırlı**
- Özel ekip ve alt yapı gerektiren bu yöntemin **duyarlılığı da göreceli olarak daha düşüktür.**



Hızlı hücre kültürü (Shell vial yöntemi)

- Düşük hızda santrifüj sonrası virusun hücre kültüründe çoğalması temeline dayanmakta
- Sitopatik etki oluşmadan önce , CMV replikasyonunun **erken döneminde oluşan viral antijenler** saptanır.
- Viral replikasyon **24-48 saat** içerisinde tespit edilebilmektedir.



Antijenemi Testi

Viral proteinlerin saptanması amacıyla kullanılan bir yöntemdir.

Semikantitatif floresan esaslı bir testtir.

Akut enfeksiyonda tegüment proteini pp65'i periferik lökositlerde saptayarak sonuç alınır.

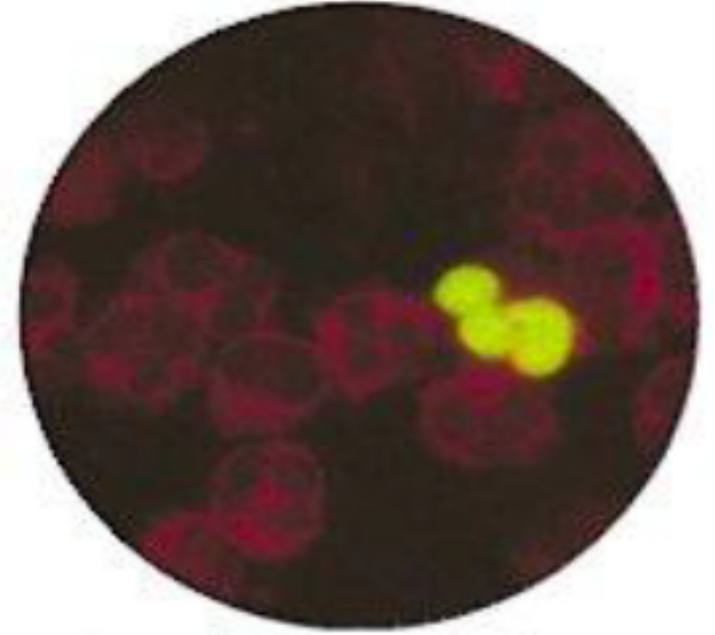
Aktif replikasyon göstergesidir.

Kantitatif sonuç

Duyarlılığı hücre kültüründen yüksek



Örnek alındıktan sonra 4 saat içinde çalışılmalı



Periferik kan polimorfonükleer lökosit nükleuslarında CMV pp65 antijenlerinin gösterilmesi

Tanı yanı sıra,

- tedavi izlemi
- antivirallere direnç gelişimi
- preemptif izlem

Seroloji

1. EIA (Enzyme Immune Assay)
2. IFA (Immune Floresence Antigen/Antibody)
3. Avidite testleri

Serolojik Yöntemler

1. EIA

Hızlı olması nedeniyle avantajlı

- duyarlı ve özgül

Akut CMV tanısında **CMV IgM pozitifliği** veya iki farklı serum örneğinde **CMV IgG titresinin dört kat artışı** kullanılır.

- Gebelerde primer CMV enfeksiyonunu tespit etmede ve konjenital CMV enfeksiyonunun tanısında **IgM pozitifliği kıymetlidir.**
- P150, p52, p38, p130 rekombinant antijenleri

Serolojik Yöntemler

1. EIA

Ancak IgM pozitifliği;

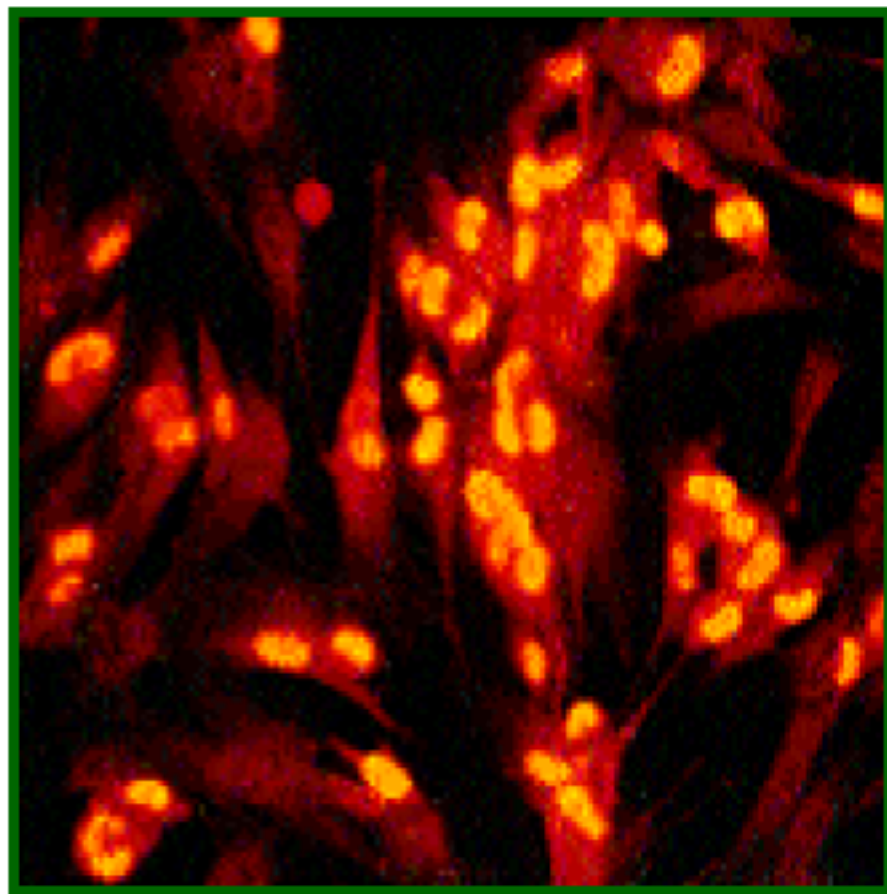
- 3-4 ay sürmesi
- iki yıla kadar uzayabilmesi
- reenfeksiyon ve reaktivasyon sırasında da pozitif olması nedeni ile her zaman primer enfeksiyon lehine değildir.
- Otoantikör olan hastalarda yalancı pozitif sonuçlar
- İmmün yetmezlikli konakta akut enfeksiyon tanısında (primer enf sırasında saptanamayabilir, uzun süre pozitif kalabilir)



Serolojik Yöntemler

2. IFA

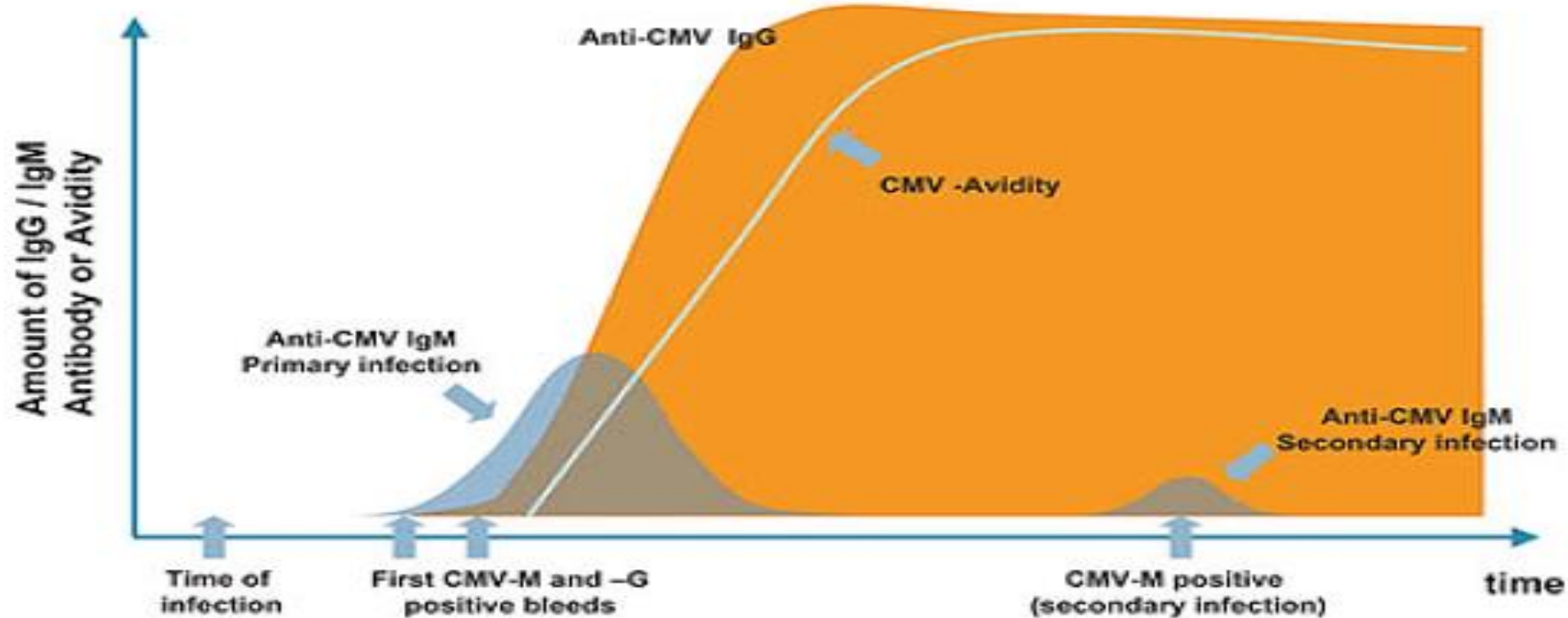
- İndirekt IFA'da mikroskop lamına fikse edilmiş **virus ile enfekte hücreler** test serumu dilüsyonları ile inkübe edilir.
- **Spesifik antijen-antikor kompleksleri** fluoressenin izotiyosiyanat ile konjuge antikor ve floresan mikroskop kullanılarak saptanır.



Serolojik Yöntemler

3. Avidite testi

Gebelik başta olmak üzere, solid organ transplantasyonunda **CMV enfeksiyonunun primer** olup olmadığının ayırımını yapmada oldukça önemli bir testtir.



Serolojik Yöntemler

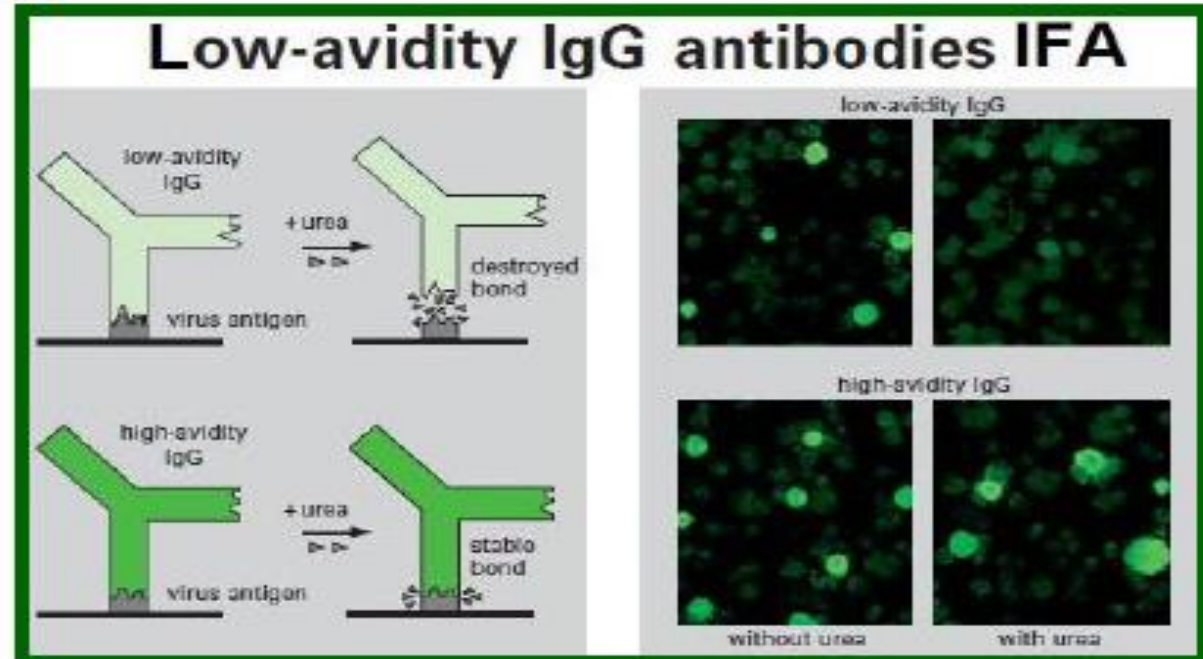
3. Avidite testi

CMV IgM pozitif kadınlarda **düşük aviditeli CMV spesifik IgG antikorlarının** bulunmasının mevcut primer CMV enfeksiyonu tanısını desteklediği ve fetal enfeksiyonla ilişkisi konusunda prognostik değeri (enfeksiyonun ilk üç ayı)

Serolojik Yöntemler

3. Avidite testi

Düşük aviditeli CMV spesifik IgG'ler primer enfeksiyonu takiben ilk haftalar boyunca üretilir, **primer olmayan enfeksiyonlarda** ise **yüksek aviditeli IgG antikorları** (altıncı aydan sonra) oluşur.



Ülkemizde CMV

- Ülkemizde CMV pozitifliği oldukça yüksek
- Çolak et al., % 97.8 IgG (+)
- Ağca H, %98.9 IgG (+)

Çolak D. Antalya bölgesinde CMV IgG prevalansının araştırılması. Akdeniz Üniversitesi

Tıpta Uzmanlık Tezi. Proje Kodu: 2002

AĞCA H. Doğurganlık Çağındaki Kadınlarda Rubella ve Sitomegalovirus Antikorlarının Araştırılması. TMC Dergisi 2011;41:015-017

MOLEKÜLER TESTLER

CMV DNA ve mRNA

- a. Nükleik asit amplifikasyon testleri
- b. Nükleik asit hibridizasyon testleri

Nükleik asit amplifikasyon testler

- Kalitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)
- Kantitatif PZR
 - Gerçek zamanlı PZR
 - Cobas Amplicor CMV Monitor
- Nuclisens pp67 (NASBA)

Nükleik asit hibridizasyon testleri

- Hibrid yakalama DNA testi

Kalitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

- Virusun glikoprotein B (gB)
- UL54 gen bölgelerine ya da erken/çok erken viral proteinleri kodlayan genlere spesifik primer dizileri

Kantitatif PZR

- Gerçek zamanlı PZR
- Tam kan örneği önerilmekte
(Tam kandaki viral yük plazmadan 0.67 log10 daha fazla)
- Elde edilmesi de daha kolay

- Spesifik CMV **mRNA dizilerinin** saptanması aktif enfeksiyon göstergesidir.
- RT-PZR (reverse- transcription PZR) ve NASBA (nucleic acid sequence–based amplification) yöntemleri
- Nükleik asit hibridizasyon testleri
 - Hibrid yakalama DNA testi
- Bu yöntemlerin duyarlılıkları hücre kültürlerinden fazla, ancak antijenemi testi ve PZR'den daha az düşüktür.

Tanı, preemptif ve tedavi izlem için...

1. Kantitasyon yapabilmeli (uluslararası kantitasyon standardı kullanılmalı)
2. Sonuçlar kopya/ml olmalı
3. İnternal kontrol içermeli
4. Kısa sürede (aynı gün) sonuç vermeli
5. Kontaminasyon riski en aza indirilmiş olmalı (Otomasyon, amplikon kontrolü)
6. Örnekler bozulmadan saklanabilmeli

Bunlara dikkat!!!

- Seropozitif bireylerde aktif enfeksiyon olmasa bile PZR pozitifliği olabilmekte bu nedenle **seropozitif** bireylerde kalitatif yerine **kantitatif** PZR testlerinin kullanılması önerilmektedir.
- Viral yük miktarı;
 - transplant alıcılarında
 - HIV pozitif olgularda gelişebilecek olan ya da var olan CMV hastalığının belirlenmesi
 - preemptif tedavi uygulanacak hastaların seçilmesi (eşik değerlerin belirlenmesi)
 - tedavi monitörizasyonu

RT-PCR kitleri

- Abbott RealTime CMV DNA kit: LLQ 20 kopya/ml, 31 IU/ml
- artus CMV RG PCR Kit: LLQ: 57 kopya/ml, 93IU/ml
- artus CMV QS-RGQ Kit: LLQ 43 kopya/ml, 70 IU/ml
- COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV Test: LLQ 55 kopya/ml, 61 IU/ml

PZR vs pp65

Tablo III. ROC Analizi Sonuçları

CMV-DNA PCR (kopya/ml)	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
161	94.4	89.2
181	91.7	89.2
189	91.7	89.8
205	91.7	90.3
218	88.9	90.3
230	86.1	90.3
240	86.1	90.9

Özkarataş E, Özbek A, Oğuz V, Sayiner A; Solid Organ Nakli Alıcılarında CMV Antijenemi Testi ve CMV-DNA PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması, Mikrobiyol Bul; 2016;50:44-52

PZR vs pp65

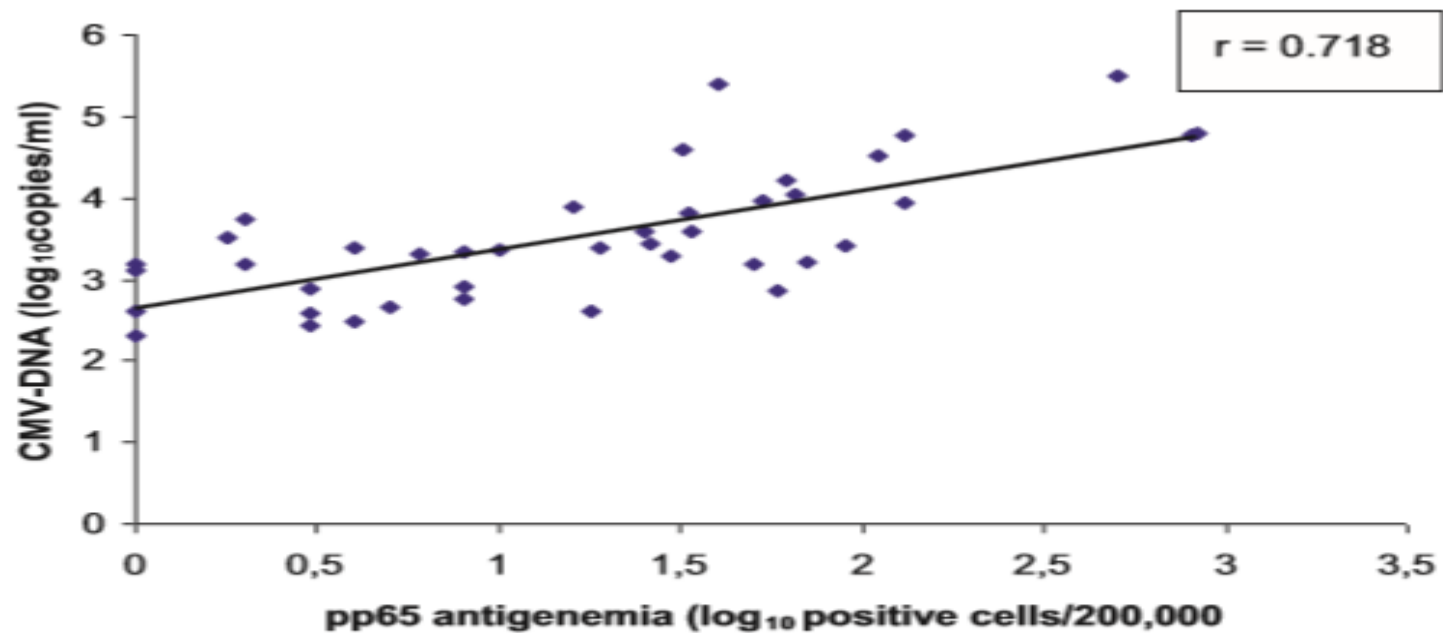


Fig. 1. Correlation between CMV-DNA load (log₁₀ copies/ml) in plasma samples and pp65 antigenemia values (log₁₀ positive cells/200,000 examined) among all samples testing positive by the real-time PCR assay and the antigenemia assay.

CMV-pp65 Antijenemi testi:

- Kanda, immunflorasan mikroskopi yöntemi
Semikantitatif Yöntem
- Kullanım alanları;
- Tanı/Preemptif tedavi kararı/Tedavi takibi
- Avantajları:
Pahalı değil/Kolay
- Dezavantajları:
Standardize değil
Mutlak nötrofil < 1000 ise çalışamaz
Çalışan bağımlı
Kan alındıktan sonra 4 saatte çalışılmalı

Kantitatif Nükleik Asit testleri

- Tam kan/ plazma
- “Real-time” PZR en çok kullanılan yöntem
- Kullanım alanları:

Tanı /Preemptif tedavi kararı/Tedavi takibi

- Avantajları
 - Kolay uygulanabilir
 - Hemen çalışılması gerekmiyor
- Dezavantajları
 - Pahalı ekipman ve yetkin çalışan gerektiriyor

CMV deęiřik klinik gruptarda tanı

Cytomegalovirus

- •İmmünpetent konak
- •İmmün baskılanmış konak
 - Transplant alıcıları
 - HIV+ hastalar
- •Konjenital CMV enfeksiyonu

İmmünpetant konak

ELISA

IgM ve IgG

IgM+, IgG-



akut enfeksiyon

IgG 4 kat artış



akut enfeksiyon

IgM-, IgG+



geçirilmiş enfeksiyon

IgM+, IgG+



avidite

İmmün baskılanmış konak

(AIDS, organ transplantasyonu vs)

ELISA

IgM ve IgG

IgM+, IgG-



akut enfeksiyon

IgG 4 kat artış



akut enfeksiyon

IgM-, IgG+



geçirilmiş enfeksiyon

IgM+, IgG+



avidite

İmmün baskılanmış konak (AIDS, organ transplantasyonu vs)

- ELISA
- Moleküler yöntemler
- Antijenemi

Transplant Alıcılarında CMV Viral Yüğü Kaç Olursa Tehlikeli?

- Kullanılan teste göre her merkez kendi hasta grubunda kendi kritik düzeyini ve antiviral tedavi için eşik değerini belirlemeli
- Viral yükteki artış izlenmeli

<1000 kopya/mL	→	>5 kat artış
>1000 kopya/mL	→	>3 kat artış önemli
- Tedavi başlanılan güne ait viral yük düzeyi bilinmeli, saptama sınırı üstündeyse dilusyonla gerçek değer belirlenmeli (Virusun plazmada yarılanma ömrü 3-8 gün)

- Viral replikasyonda anlamlı fark var diyebilmek için düşük düzeylerde en az >5 , orta düzeylerde en az >3 kat artış olmalıdır.
- Viral yük çok yüksek (>10000 kopya/mL) olmadıkça ardışık değerler daha yol göstericidir.
- Antiviral tedavi başlandığı gün **bazal viral yük** mutlaka bilinmelidir .
- Tedavi başladıktan sonra en sık 5-7 günlük aralarla viral yük bakılmalıdır, erken dönemde artış olması direnç göstergesi değildir .
- Tedavi ile viral yük negatifleşmelidir.
- Sürekli artış olması antiviral direnci akla getirmelidir.

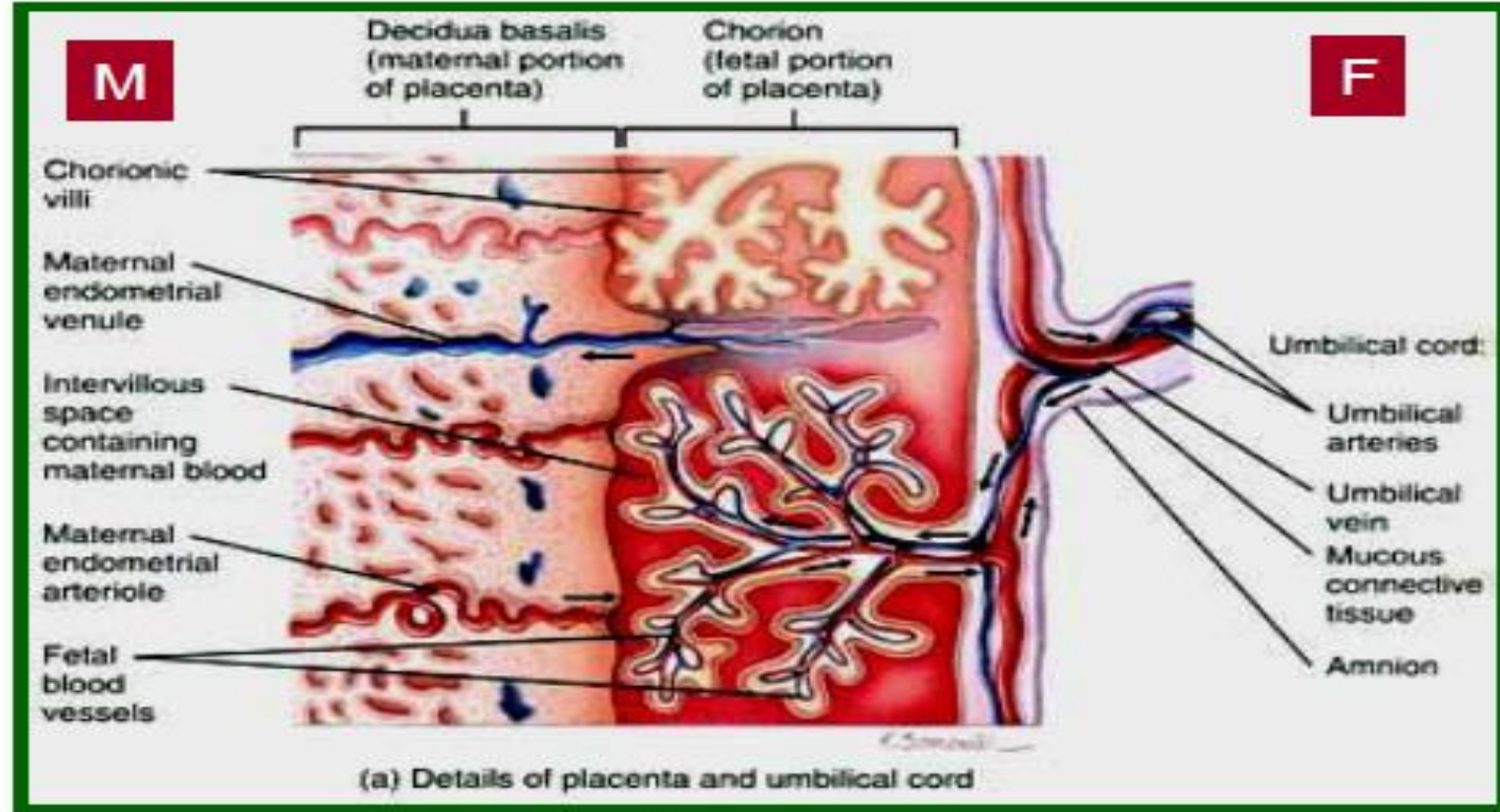
Konjenital CMV enfeksiyonu

SSS anomalileri, mental retardasyon,
koryoretinit, sağırlık, beyinde kalsifikasyonlar,
hepatomegali, nörolojik sekel gelişimi



Maternal CMV enfeksiyonu

1. Primer
 2. Rekürren
- Reaktivasyon
Reinfeksiyon



Plasenta



Koruma / Bulaştırma

Maternal CMV Enfeksiyonu

1. Primer → viremi +

2. Rekürren

Reinfeksiyon → viremi +

Reaktivasyon → viremi –

uterus makrofajlarında
CMV reaktivasyonu
servikal sekresyonlarda virus
varlığı

Maternal CMV Enfeksiyonu

**%1-4
primer**

**%40
fetal bulaş**

**%10-15
enfekte infant
semptomatik**

**%85-90
enfekte infant
asemptomatik**

**%10 normal
gelişim+**

**%90 sekelli
gelişim+**

**%5-15 sekelli
gelişim+**

**%85-95 normal
gelişim+**

Maternal CMV Enfeksiyonu

Primer
maternal CMV enf



Rekürren
maternal CMV enf

**Fetusa bulaş
%20-40**

**Fetusa bulaş
%0.2-2.2**

Gebede **Primer** CMV Enfeksiyonu Tanısı

- Seroloji
- Virusun, viral antijen/nükleik asitlerin kanda saptanması (kalitatif PZR)

Gebede Primer CMV Enfeksiyonu Tanısı

Seroloji:

- CMV IgM +
- Serokonversiyon: CMV IgG'nin pozitifleşmesi

Gebede Primer CMV Enfeksiyonu Tanısı

Seroloji:



Gebede **Rekürren** CMV Enfeksiyonu

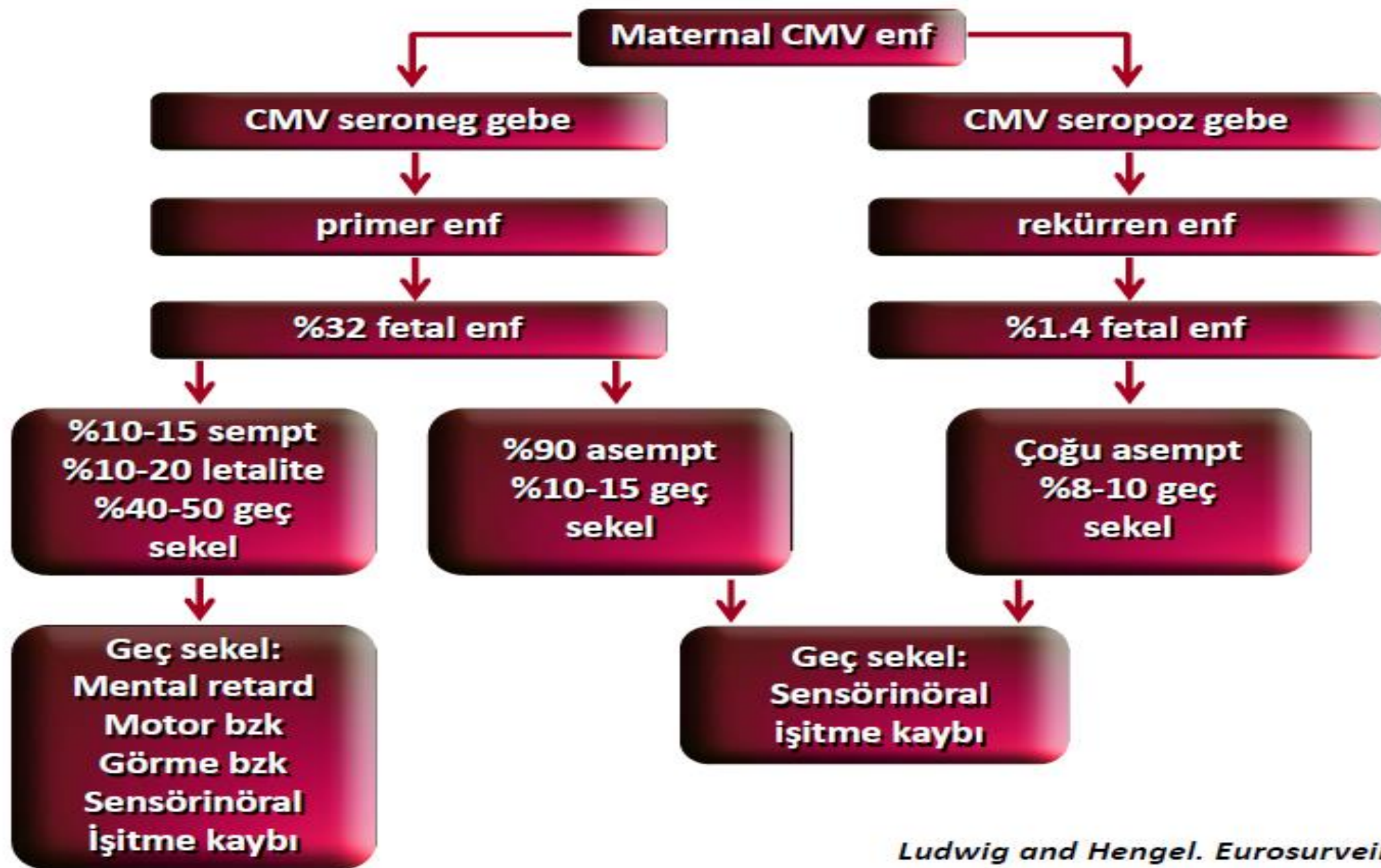
- Reaktivasyon/Reinfeksiyon
- Humoral+hücresele immün yanıt varlığında virus replikasyonu
- Reaktivasyon  viremi (-)
genital sekresyonda CMV (+)
- Reinfeksiyon  viremi (+)

Gebede Primer CMV Enfeksiyonu

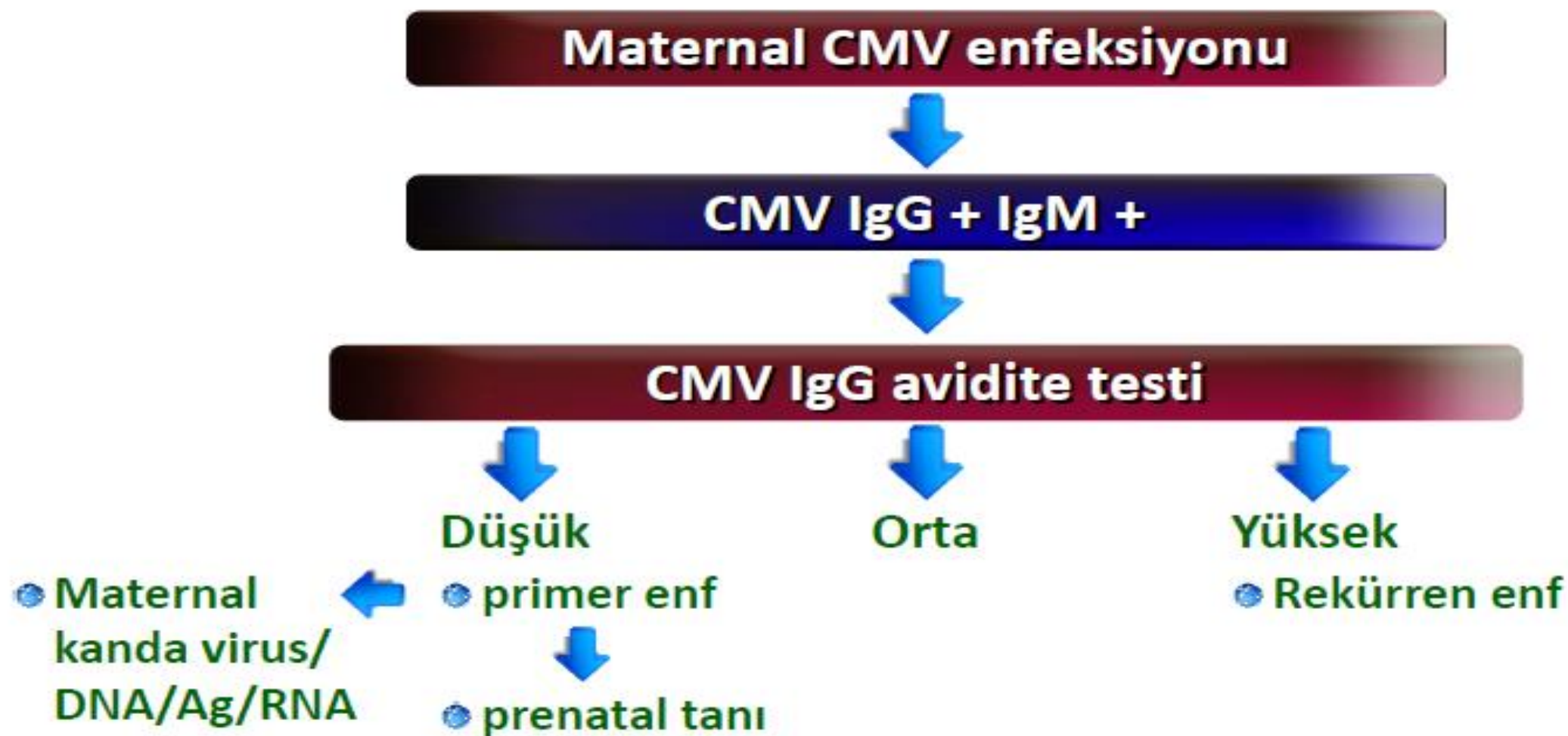
- Fertilizasyondan hemen önce geçirilirse fetusu etkileme riski ↓
- Fertilizasyondan sonraki ilk haftalarda geçirilirse fetusu etkileme riski
- Prenatal tanı zamanlaması çok önemli

Gebede CMV Enfeksiyonu

1. Fetus enfekte mi?
2. Fetus enfekte ise semptom var mı?



Maternal CMV Enfeksiyonu



Prenatal Tanı: CMV

- Hamilede primer CMV enfeksiyonu
- Fetusta anormal ultrasonografik bulgular
 - gelişme geriliği
 - hidrosefali/mikrosefali
 - asit
 - SSS anomalisi

**Prenatal
tanı gerekli**

**Sıklıkla
kordosentez + amniyosentez**

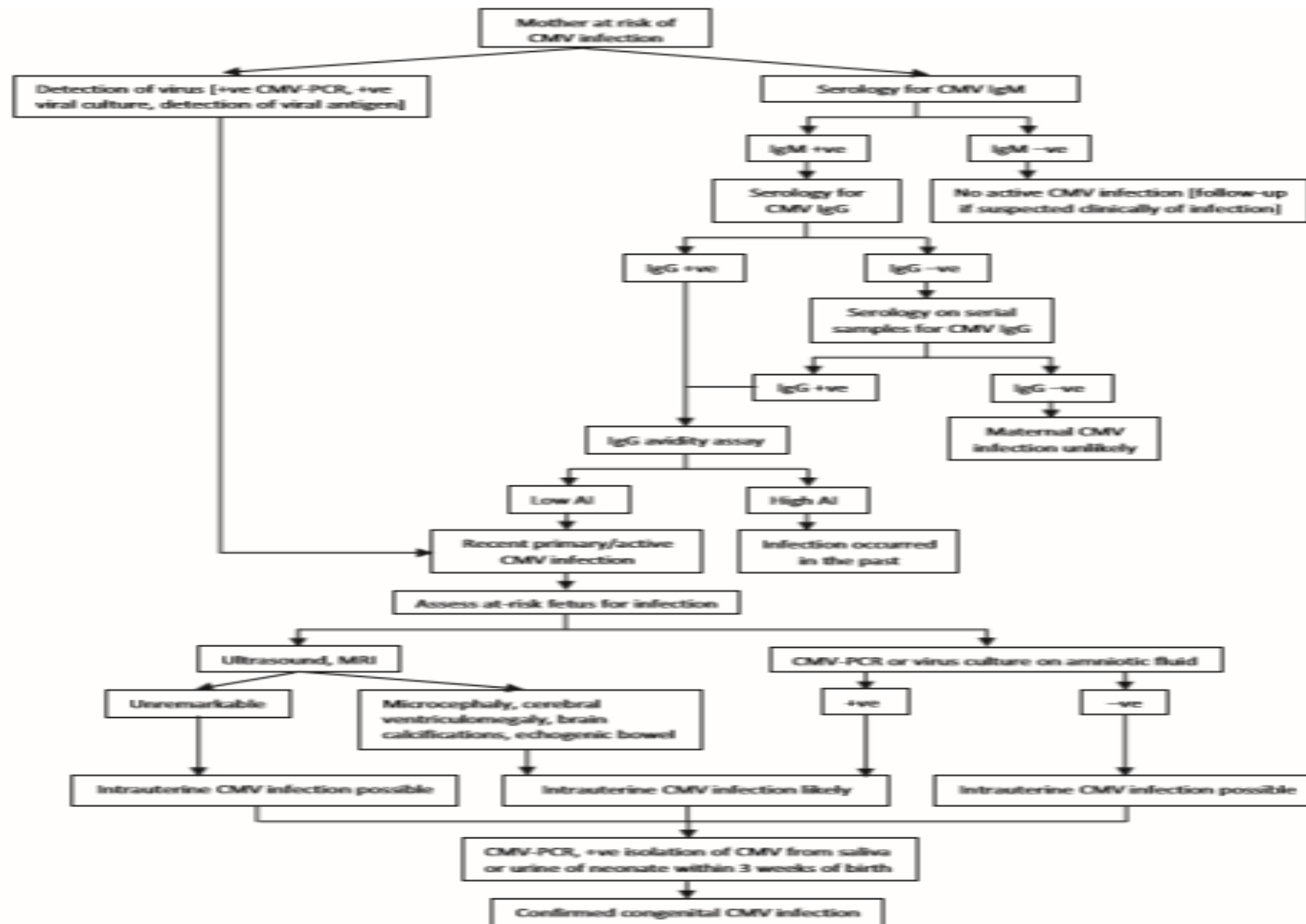


Figure 1 Schematic of the diagnosis of primary maternal CMV infection, and infection in fetus and newborn infant, including serologic, virologic, ultrasonic and magnetic resonance imaging approaches. AI, avidity index; MRI, magnetic resonance imaging; +ve, positive; -ve, negative.

Prenatal Tanı: CMV

Ne zaman yapılmalı?

- Maternal enfeksiyondan 6-8 hafta sonra
- Kordosentez 17. gebelik haftasından sonra
- Amniyosentez 21. gebelik haftasından sonra

İntrauterin CMV Enfeksiyonu

Tanı:

Kordosentez

- 17. gebelik hft. sonra
- Komplikasyon



geçici kanama
fetal bradikardi %7-9
prematür eylem <%2-5
fetal kayıp %1.7-1.9

- CMV IgM
 - Hb, trombosit, KCFT
 - Virus/viral nükleik asitler/viral Ag kalitatif/kantitatif (Hücre kültürü, antijenemi, PZR)

İntrauterin CMV Enfeksiyonu

Tanı:

Amniyosentez

- 21. gebelik hft. sonra
- Komplikasyon
 - vajinal kanama
 - amniyon sıvısının azalması
 - fetal kayıp <%1

Virus/viral nükleik asitler/viral Ag kalitatif/kantitatif

Yenidoğanda Konjenital CMV Enfeksiyonu Tanısı

Test	Duyarlılık %	Özgüllük %
Rt-PZR	≈100	≈100
Antijenemi	42.5	≈100
IgM	70.7	≈100

SONUÇ

- Hasta grubu
 - Çalışılacak materyal
 - Çalışılacak test yöntemi
-
- Doğru tanıda oldukça büyük önem taşımaktadır!!!!

