T. C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CYTOMEGALOVIRUS (CMV)* SUŞLARININ GENOTİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Aytekin KILINÇ

KAYSERİ - 2010

T. C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CYTOMEGALOVIRUS (CMV)* SUŞLARININ GENOTİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Aytekin KILINÇ

Danışman

Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU

KAYSERİ 2010

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER i

KISALTMALAR iii

TABLO LİSTESİ vi

ŞEKİL LİSTESİ vii

ÖZET x

ABSTRACT xi

1.GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. CYTOMEGALOVIRUS 3

2.1.1.Tarihçe 3

2.1.2.Sınıflandırma 3

2.1.3.Virüsün Genel Özellikleri 4

2.1.3.1.CMV'nin Replikasyonu 6

2.1.3.2.Fiziksel ve Kimyasal Ajanlara Direnç 7

2.1.4. Epidemiyoloji Ve Bulaş 7

2.1.5. Patogenez Ve İmmünite 8

2.1.6. Klinik önemi 10

2.1.7. CMV Genotipleri 11

2.1.8. CMV'nin Laboratuvar Tanısı 13

2.1.8.l . Direkt incelenme 13

2.1.8.2. Virüs izolasyonu, ... 17

2.1.8.3. Serolojik Testler 19

2.1.9. Tedavi ve Antiviral Duyarlılık Testi **26**

2.1.10. Korunma **29**

3. GEREÇ VE YÖNTEM **31**

3.1. HASTALAR VE ÖRNEKLER **31**

3.2. CMV GENOTİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI **31**

3.2.1. Otomatize Cihazla DNA izolasyonu **32**

3.2.2. CMV DNA amplifikasyonu **33**

3.2.3. PCR Ürünlerinin Streptavidin Sepharose Bilyelerine Yapıştırılması, Saflaştırılması Ve Sekans Primerinin Tek Sarmal DNA'ya Bağlanması: ... **34**

3.2.4. Dizi analizi: **36**

3.2.5.Pyromark cihazının çalıştırılması **37**

3.2.6.Genotiplerin belirlenmesi **38**

4. BULGULAR **40**

5. TARTIŞMA **48**

6. SONUÇLAR **55**

7. KAYNAKLAR **56**

ONAY SAYFASI **71**

KISALTMALAR

ABY	: Akut Böbrek Yetmezliği
AD	: Antijenik Determinant
ADP	: Adenozine diphosphate
AKİT	: Allojenik kemik iliği transplantasyonu
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	: Akut Myeloid Lösemili
APS	: Adenozin 5' fosfosülfat
ATP	: Adenozine triphosphate
Bp	: Base pair
BAL	: Bronkoalveoler Lavaj
^{0}C	: Santigrad derece
CMV	:Cytomegalovirus
CPE	: Sitopatik etki
DBBL	: Diffüz Büyük Hücreli Lenfoma
gB1	: Glikoprotein B 1
gB2	: Glikoprotein B 2
gB3	: Glikoprotein B 3
gB4	: Glikoprotein B 4
DFA	: Direkt Immunofloresan Antikor
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNase	: Deoksiribonükleaz
dATPaS	: deoksiadenozin alfa-tio trifosfat
Dntp	: 4-deoksribonükleotid trifosfat

dk	: Dakika
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EIA	: Enzyme immunoassay
ELİSA	: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ETA	: Endotrakeal Aspirat
g	: Gravite
GVHD	: Graft Versus Host Disease
HMA	: Heteroduplex Motility
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IFA	: İndirekt Floresans Antikor
IgG	: İmmünglobulin G
İL-1	: İnterlökin-1
Irs	: Inverted repeat short
Kbp	: Kilobase pair
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
kDa	: Kilodalton
KİT	: Kemik İliği Tranplantasyonu
KLL	: Kronik Lenfoblastık Lösemi
KML	: Kronik Myeloid Lösemi
KOAH	: Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı
MHC	: Major Histocompatibility Complex
ml	: Mililitre
MM	: Multibl Myeloma
mM	: Milimolar
NHL	: Non-Hodgin Lenfoma
nm	: Nanometre

NTA	: Nazotrakeal aspirat
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PPi	: pirofosfat
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
rpm	: Rotation per minute
sn	: Saniye
SSCPA	: Single-Strand Conformation Polymorphism
STR	: Short Tandem Repeats
OKİT	: Otolog Kemik İliği Transplantasyonu
ORF	: Open Reading Frame
TBE	: Tris-Borate-Edta
TRs	: Terminal repeat short
UL	: Unique Long
Us	: Unique short:
µl	: Mikrolitre

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. PCR reaksiyon kompozisyonu 33

Tablo 2. PCR protokolü 34

Tablo 3. CMV Sekans Tablosu 39

Tablo 4. Hastaların klinik servislere ve örneklere göre dağılımı 41

Tablo 5. CMV 'li hastaların özellikleri 42

Tablo 6. Hastaların genotip dağılımı 43

Tablo 7. Klinik örneklerde CMV genotip dağılımı 43

Tablo 8. CMV miks genotip saptanan hastalar 44

Tablo 9. CMV genotiplerin transplant hastalara göre dağılımı 45

Tablo 10. Hastaların klinik tanıları ve CMV genotip dağılımı……. ...46

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. CMV'ün morfolojik yapısı 4

Şekil 2. CMV DNA genomunun organizasyonu ve genom izomerleri 5

Şekil 3. Shell vial kültür ve İFA boyama sonrası enfekte MRC-5 hücrelerinde CMV erken antijenlerin nükleusta gösterilmesi 19

Şekil 4. Pyrosekans yöntemi 24

Şekil 5. Pyromark Q24 Cihazı 37

Şekil 6. CMV gB genotip gruplarının viral yük dağılımı 47

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN SİTOMEGALOVİRÜS (CMV) SUŞLARININ GENOTİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: CMV gB genotipleme açısından en çok üstünde çalışılan proteindir. Doğada bulunmakta olan CMV suşlarında bugüne kadar dört farklı gB genotipi (gBl-4) tarif edilmiştir. Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen CMV suşlarının genotiplerinin araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metod: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerinin poliklinik ve servislerinde takip edilen hastalara ait örneklerden CMV DNA'sı pozitif bulunanlar çalışmaya alındı. Çalışmaya 53 farklı hastadan elde edilen toplam 74 örnek dahil edildi. Örnekler plazma, nazotrakeal aspirat (NTA), bronkoalvoeler lavaj (BAL) idi. CMV genotiplerinin araştırılması pyrosekans yöntemi ile (Pyromark Qiagen-Almanya) yapıldı.

Bulgular: CMV genotiplerinin dağılımı ; 33/74'ünde gB1 (%45), 7/74'ünde gB2 (%9), 14/74'ünde gB3 (%19), 2/74'ünde gB4 (%4), 18/74'ünde miks genotip (%24) olarak bulundu. Miks genotip bulunan 17 hastanın 18 klinik örneğinin 10 (%55)'unda gB1+gB3, 4 (%22)'ünde gB2+gB3 , 2 (%11)'sinde gB1+gB2, 1 (%6) 'inde gB1+gB4 , 1 (%6) 'indede gB2+gB4 olarak bulundu.

Sonuç: Sonuç olarak çalışmaya dahil edilen hastalarda en sık CMV genotip gB1 bulundu. CMV gB1'den sonra en sık görülen genotip miks genotip idi. Bir hastada birden fazla CMV genotip analizinin yapılmasının miks genotip bulunma oranını artıracağı kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Cytomegalovirus, genotip, pyrosekans, glikoprotein B

INVESTIGATION OF GENOTYPES OF CYTOMEGALOVIRUS (CMV) STRAINS ISOLATED IN CLINICAL SAMPLES.

ABSTRACT

Aim: CMV glycoproteins B is the most studied protein in terms of genotype. So far four different gB genotypes (gB1-4) have been identified in CMV strains found in nature. In this study, it was aimed to investigate genotypes of Cytomegalovirus (CMV) strains isolated in clinical samples.

Materials and Method: CMV DNA positive samples that have been taken from patients who treated in Erciyes University Faculty of Medicine polyclinics and services were included in the study. A total of 74 samples obtained from 53 different patients were used in the study. Samples were plasma, nasotracheal aspirat (NTA), bronchoalveolar lavage (BAL). CMV genotypes of samples were investigated by pyrosequencing (Pyromark Qiagen-Germany).

Results: The distribution of CMV genotypes was: In 33/74 gB1 (45%), in 7/74 gB2 (9%), in 14/74 gB3 (19%), in 2/74 gB4 (4%) and in 18/74 mix genotypes (24%). Mix genotypes were found in 18 clinical samples obtained from 17 patients , distribution of mix genotypes was; 10 gB1+gB3 (55%), 4 (22%) gB2+gB3, 2 (11%) gB1+gB2, 1 (6%) gB1+gB4 and 1 (6%) gB2+gB4.

Conclusion: As a result, CMV genotype gB1 was detected most frequently in the patients included in the study. Following CMV gB1, the most frequently observed genotype was mix genotype. It is conclued that CMV genotype analysis more than once in one patient can increase the ratio of mix genotypes.

Key words: Cytomegalovirus, genotypes, pyrosequencing, glycoprotein B

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Cytomegalovirus (CMV), tüm dünyada yaygın olarak görülen ve genellikle asemptomatik enfeksiyonlara yol açan Herpesviridae ailesine ait bir virüstür. Enfeksiyonun başlıca bulaşma yolları plasental yol, cinsel ilişki, kan transfüzyonu ve organ transplantasyonu olup, bulaşma kaynakları; orofaringeal sekresyon, idrar, servikal ve vajinal sekresyon, semen, anne sütü, ter, dışkı ve kandır (1, 2).

CMV enfeksiyonu, virüsün kazanılma yaşıyla ilgili olarak değişmekle birlikte, enfekte olguların çoğunluğunda asemptomatik geçirilmektedir. Sitomegalovirüs'ün meydana getirdiği en önemli klinik tablolar; bağışıklık sistemi normal kişilerde, heterofil negatif mononükleozis, yenidoğanlarda sitomegalik inklüzyon hastalığı ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde interstisyel pnömonidir (1,3). İmmünsupresif hastalarda ve yenidoğanlarda özellikle solid organ ve kemik iliği transplantı yapılan kişilerde ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir.

CMV genomu 235 kb büyüklüğündedir ve yapısında 60'dan fazla glikoprotein bulunmaktadır. Majör CMV glikoproteinlerinden biri olan glikoprotein B (gB) (gpUL55), CMV zarfında bulunan protein kütlesinin %50'den fazlasını oluşturur ve virüsün konak hücreye tutunmasını, hücreden hücreye transferini ve enfekte hücrelerin füzyonunu sağlar (4). Glikoprotein B konak immün yanıtını uyarmakta ve kendisine karşı antikor sentezlenmektedir Bu yüzden gB'deki genetik varyasyonlar virüsün hücre tropizmini, konak immün yanıtını ve sonuçta da CMV patogenezini etkileyebilir. Glikoprotein B'nin bu özelliklerinin; hücreden

hücreye yayılmada ve virus nötralizasyonundaki görevi nedeni ile patogenezdeki bazı soruları yanıtlayabileceği düşünülmüştür.

CMV glikoproteinlerinden gB genotipleme açısından en çok üstünde çalışılan proteindir. Doğada bulunmakta olan CMV suşlarında bugüne kadar dört farklı gB genotipi (gBl-4) tarif edilmiştir (5).

CMV genotiplerinin belirlenmesi için DNA dizi analizi (sekanslama), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) "single-strand conformation polymorphism" analizi (SSCPA), "heteroduplex motility" analizi (HMA) ve multiplex PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemleri uygulanmaktadır (4).

Çeşitli çalışmalarda gB genotipleri ile hastalık bulguları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bölgemizde daha önce CMV genotipleriyle ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen CMV suşlarının genotiplerinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *CYTOMEGALOVIRUS*

2.1.1.Tarihçe

CMV ilk defa 1904 yılında bebek otopsilerinde 'protozoa benzeri hücreler' görülmesi ile dikkati çekmiştir. CMV 1956'da önce farede Smith tarafından ve daha sonra insanda Smith, Rowe ve Weller tarafından ayrı ayrı izole edilmiştir. Cytomegalovirus adı Weller tarafından enfekte hücrelerde yaptığı değişikliklerden ötürü kullanılmıştır. Daha sonra Virüs Taksonomi Komitesi tarafından insan herpes virüsü 5 (HHV-5) olarak adlandırılmıştır (6,7,8).

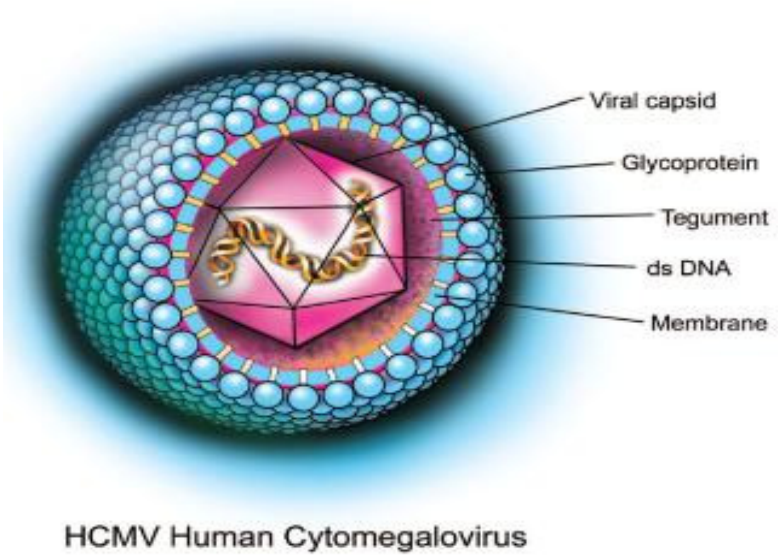
2.1.2.Sınıflandırma

İnsan CMV'i Cytomegalovirüs cinsi içindedir ve ismi virüsle enfekte hücrelerin büyümesinden (cyto: hücre, mega: büyük) kaynaklanmıştır. "*International Committee for Taxonomy of Viruses*" tarafından İnsan Herpesvirüs 5 (HHV-5) olarak tanımlanan insan CMV herpesviridae ailesi içinde bulunur. Herpesviridae ailesinin içinde herpes simplex virüs tip 1 (HSV-l) ve 2 (HSV-2), varicella-zoster virüs (HHV-3), Epstein-Barr virüs (HHV-4), HHV-6, HHV-7 ve HHV-8 bulunmaktadır. CMV diğer hayvan cytomegalovirus izolatları ile birlikte tükrük bezlerine olan tropizmi, hücre kültüründe geç üremesi ve sınırlı tür özgüllüğünden dolayı *Betaherpesvirinae* alt ailesinde yer alır. CMV ile HHV-6 ve HHV-7 arasında homolog sekans bölgeleri saptanmıştır ve bugün HHV-6 ve HHV-7 CMV ile birlikte betaherpesvirüsler arasında sınıflandırılmaktadır. CMV suşları arasındaki farklılıklar

moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Çalışmalarda CMV suşlarının birbirleri ile yakınlıklıkları HSV- 1 ve 2'nin birbirlerine olan yakınlıklarından daha fazla oranda olduğu söylenmektedir. CMV suşları arasında çapraz-nötralizasyon ve diğer serolojik testlerde antijenik heterojenite saptanmıştır fakat, farklı serotipler için kanıtlar sınırlıdır (9).

2.1.3.Virüsün Genel Özellikleri

Tam CMV partikülü 120-200 nm çapındadır, lineer çift iplikli DNA genomu içeren kor, 162 kapsomerden oluşan ikozahedral kapsid, tegüment veya matriks ve en dışta fosfolipidden zengin zarf bölümlerinden oluşmaktadır. CMV'nin elektron mikroskobisinde; morfolojik olarak diğer herpesvirüslerden ayırt edilemeyen virionlar, yüksek oranda defektif viral partiküller ve "dense body" denilen sferik partiküller görülmektedir. Viral replikasyon konak hücre nükleusunda gerçekleşir ve çok erken (α), erken (β) ve geç (γ) sınıf genlerin ekspresyonu söz konusudur. Viral zarf; nükleokapsidin nükleer membranın iç yüzeyinden tomurcuklanması sırasında oluşur (9). CMV'nin morfolojik yapısı şekil l'de gösterilmiştir.



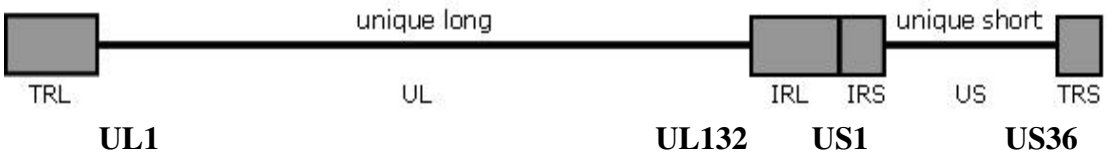
Şekil 1. CMV'nin morfolojik yapısı.

(http://renalfellow.blogspot.com/2009/12/link-between-cmv-status-epo.html)

CMV genomu 235 kb büyüklüğündedir ve yapısında 60'dan fazla glikoprotein bulunmaktadır. CMV DNA yapısı daha fazla AD 169 suşunda çalışılmıştır. Viral DNA kısa (unique short:Us) ve uzun (unique long:UL) olarak adlandırılan iki

bölgeden oluşur. Us bölgesinde “Inverted repeat short“(Irs) ve “Terminal repeat short“(TRs) bölgeleri mevcuttur. Ayrıca bu bölgeler UL bölgesindede bulunur ve IRL, TRL olarak adlandırılır. Bu inverted bölgelerinin herhangi bir U bölgesinde bulunması sonucu virion DNA’sının 4 izomeri ortaya çıkmaktadır (Şekil 2). CMV enfekte hücrelerde bu izomerlerden eşit miktarlarda mevcuttur. Ancak bu izomerlerin herhangi bir patolojik önemi mevcut değildir. Viral DNA genom dizisi 1990 yılında tamamen çözümlenmiştir. CMV'nin DNA'sı 208 open reading frame (ORF) içerir ki, parçalanma olaylarından sonra 202 proteinin sentezlenmesi yönetilir (8,10) . Ancak tekrar bölgeleri nedeni ile bazı protein ORF'leri çift kopya olarak bulunmaktadır. Bunun sonucunda 178 özgül proteinin sentez edildiği öngörülmektedir. CMV ORF’lerinin 1/4'ü DNA sentezi ve metabolizmasını yönetmektedir. Diğer 3/4'ü CMV yapısı ve olgunlaşmasından sorumludur (10). ORF'den bazıları tüm herpes virüslerde benzer iken, bazıları Herpes simpleks virüs tip l (HSV-1), Varisella-Zoster virüs (VZV) ve Ebstein-Barr virüs (EBV) ile benzer bulunmuştur. Kırkaltı ORF ise CMV için korunmuş bölgelerdir. Genomun G+C içeriği % 54-59 arasında değişmektedir. Değişik CMV suşlarının nükleik asit analizleri, bu suşlar arasında % 80 DNA dizi benzerliği göstermiştir. CMV, insan herpes virüslerinin en büyük genoma sahip olanıdır (1,8,11).

CMV kapsid proteinleri arasında başlıca majör kapsid proteini (pUL86) ve minör kapsid proteini (pUL46) bulunmaktadır. Majör kapsid proteini yapısal olup, minör kapsid proteini DNA ile birleşir. Ayrıca pUL80 kapsidle ilgili başka bir protein olup virüsün hücreden olgunlaşmasında rol oynamaktadır (9,11). CMV matriks proteinleri 20 adet olup % 95'ini ppUL83 (pp65) oluşturur. Aynı zamanda pp65 proteini 'lower matriks proteini' olarak da adlandırılır, Antijenemi testi ile pp65 antijeni araştırılmaktadır. Aynı zamanda pp65 proteini büyük doku uygunluk kompleksi (Majör Histocompatibility Complex, MHC)-I kısıtlı sitotoksik T (Tc) lenfositler için en önemli hedeftir (7,10).



Şekil 2. CMV DNA genomunun organizasyonu ve genom izomerleri.

2.1.3.1.CMV'nin Replikasyonu

CMV replikasyonu diğer herpes virüsler ile ortak özellik gösterir. Viral DNA'nın kapsid içerisine yerleşmesi hücre çekirdeğinde gerçekleşir. Viral zarf ise konak hücre çekirdek zarından kazanılır. Virüsün çoğaldığı hücrenin içerisinde enfektif provirüsün oluşması, hemen daima değişik derecelerde hücre harabiyeti ile sonuçlanır. Latent enfeksiyonda ise hücre harabiyeti yoktur ve viral genom sirküler yapıdadır ve viral antijenlerin bir kısmı eksprese edilir (7,9,12).

CMV replikasyonunda en erken, erken ve geç dönemler olmak üzere üç aşama görülür. Replikasyon yaklaşık 48-72 saat kadar sürer. En erken gen ürünlerinin ekspresyonu çabuk olmasına karşın, erken ve geç gen ürünlerinin ekspresyonu 24-36 saat sonra başlar ve 72 saat sonra en yüksek düzeye ulaşır. CMV replikasyonuna izin veren hücreler farklılaşmış insan hücreleri, makrofajlar, deri ve akciğer fibroblastlarıdır (7,9,10,12). CMV replikasyonunda ilk aşama virüsün zarf glikoproteinleri ile hücre yüzeyine tutunması ve penetrasyonudur. Diğer herpes virüsler gibi heparan sülfat virüs-hücre ilişkisinin ilk aşamasında rol alır. Ancak tutunmada henüz tam olarak belirlenememiş farklı reseptörlerin de olaya katıldığı düşünülmektedir. Tutunmada beta-2 mikroglobülin molekülü, hücre yüzeyi reseptörleri ile viral glikoproteinler arasında köprü oluşturarak rol alır. Tutunmayı viral zarf ve hücre zarının füzyonu ile gerçekleşen penetrasyon izler. Kapsid açığa çıkar ve viral DNA'yı çekirdek zarı porlarından çekirdeğe ulaştırır. Çekirdekte konak hücrenin RNA polimeraz II enzimi kullanılarak DNA'nın transkripsiyonu gerçekleşir. İlk aşamada yeni protein sentezine gereksinim duymadan eksprese edilen en erken gen ürünleri sentezlenir. Bu gen ürünleri enfeksiyonun geç dönemine kadar eksprese edilirler ve viral genom üzerinde pozitif ve negatif düzenleyici etkileri vardır. En erken dönem proteinleri sentezlendikten hemen sonra sitoplazmada kümelenirler. Bu dönemde erken ve geç döneme ait mRNA'lar gözlenebilmesine karşın translasyonları hemen olmamaktadır. Bu aşamada en erken proteinlerin düzenleyici etkileri olduğu düşünülmektedir. Erken replikasyon döneminde viral DNA polimeraz tarafından DNA'nın sentezi gerçekleşir. Bu dönemde ayrıca nükleik asit bağlayan proteinler de sentezlenir. Geç dönemde yapısal proteinlerin sentezi olur. Bunlardan nükleokapsid proteinleri çekirdekte toplanır ve viral DNA kapsid içine yerleşir. DNA'yı içine alan nükleokapsidler çekirdek zarından zarflarını alarak

perinükleer sisternalara tomurcuklanırlar ve sitoplazmik veziküller içinde hücre zarına taşınır, ekzositoz ile salınırlar (7,10,12).

2.1.3.2.Fiziksel ve Kimyasal Ajanlara Direnç

CMV fiziksel ve kimyasal ajanlara çok dayanıklı değildir. Düşük pH'ya (pH 5'in altındaki asit ortamlarda 2 saatte harap olur), lipid çözücülere, antikoagülanlara ve ısıya duyarlıdır. CMV 56°C'de 30 dakikada, % 20'lik eter solüsyonunda ve ultraviyole ışınları ile 5 dakikada harap olur. CMV'ün 37°C'de yarı ömrü 60 dakikadır. Sodyum hipokloridin % 10'luk solüsyonu CMV'ün enfektivitesini belirgin bir şekilde düşürür. CMV ile enfekte hücrelerin etkilenmeden saklanabilmeleri için genellikle % 20 fetal calf serum ve % 10 dimetilsülfoksit ilave edilmiş Eagle besiyeri kullanılmaktadır (7,8,11)

2.1.4. Epidemiyoloji ve Bulaş

CMV tüm dünyada yaygındır ve her yaşta insanı enfekte eder, bulaşmanın mevsimsel veya epidemik özelliği yoktur. CMV seroprevalansı tüm toplumlarda yaşla birlikte artmaktadır ve oranı %40-100 arasındadır. Virüs hayatın erken yıllarında kazanılır ve prevalans kalabalık yaşam koşullarına sahip düşük sosyoekonomik gruplarda en yüksektir. CMV vertikal ve horizontal olarak bulaşabilir ve enfeksiyonlar doğumdan önce (konjenital), doğum sırasında (perinatal) veya doğumdan sonra (postnatal) kazanılanlar olarak sınıflandırılabilir (9).

Enfeksiyonların büyük kısmı virüsü saçan kişilerle direkt yakın kişisel temas sonucunda kazanılır. CMV tükrük, idrar, anne sütü, gözyaşı dışkı, vajinal ve servikal sekresyonlar, kan ve semen gibi pek çok vücut sıvısında saptandığı için; bulaşmanın çok çeşitli yollarla olabileceği açıktır. Konjenital veya kazanılmış CMV enfeksiyonlarından sonra; primer enfeksiyon sonrası haftalarca, aylarca ve hatta yıllarca virüsün uzun süre etrafa saçılması virüs yayılımına kolaylık sağlamaktadır

Gebe bir kadında primer veya tekrarlayan enfeksiyon sonrası transplasental enfeksiyon meydana gelebilir, fetusa CMV bulaşma riski ve semptomatik fetal enfeksiyon oranı primer maternal enfeksiyonda daha yüksektir. Yenidoğanlar enfeksiyonu doğum sırasında doğum kanalındaki virüsle temas ederek de kazanabilirler. Kadınların yaklaşık %10'unun doğumda veya doğuma yakın dönemde genital kanallarında CMV bulunmaktadır ve virüs yenidoğanların yaklaşık %50’ sine bulaşmaktadır. Bu infantlar 3-12 haftalık olduklarında virüsü ekskrete etmeye

başlarlar ve genellikle asemptomatik kalırlar. CMV'nin anneden infanta anne sütü ile bulaşı çok sıktır ve düşük doğum ağırlıklı prematür infantlar hastalık gelişimi açısından en yüksek riske sahiptirler. Gündüz bakımevine giden yürümeye yeni başlayan çocuklarda, bir iki yıl içinde %20-70 oranında CMV enfeksiyonu geçirilmektedir. Enfeksiyon genellikle asemptomatiktir, ancak çocuklar CMV'yi anne-babalarına ve diğer bakıcılarına bulaştırabilirler ve bu sırada kadın gebe ise doğmamış fetus için risk yaratılmış olur. Adölesan ve erişkinlerde CMV'nin cinsel yolla bulaşı olabilir, bu şekilde bulaş CMV yayılımında önemli bir yoldur. Diğer herpesvirüslerin enfeksiyonları ile benzer olarak primer CMV enfeksiyonu persistan veya latent enfeksiyonla sonuçlanmaktadır. Latent enfeksiyon bölgeleri; endotelyal hücreler, lökositler ve çeşitli dokular olabilir. Bu nedenle CMV, kan transfüzyonu ve organ transplantasyonu ile bulaşabilir. Virüsün reaktivasyonu immünsüpresyon gibi çeşitli uyaranlara cevap olarak gelişebilir (9).

2.1.5. Patogenez ve İmmünite

CMV enfeksiyonu çeşitli dokuları tutan yaygın bir enfeksiyondur. Virüsün alımından sonra tükrük bezi duktal epitel hücreleri ve fibroblastlar infekte olmaktadır. Tükrük bezi tutulumu genellikle kroniktir; bebekler ve çocuklarda sıktır, yaşla azalır. CMV litik bir virüstür. Sitomegalik hücrelerle karakterize sitopatik etkiye yol açar. Enfekte hücreler histolojik olarak büyümüştür, nükleusda belirgin genişleme vardır. Sitoplazmanın genişlemesi daha azdır. Çekirdek ortadadır ve kromatini kenarda yerleşmiştir. Çekirdekte etrafı boşlukla çevrelenmiş olarak görülen çok sayıda inklüzyon cisimciği bulunur. Bu görünüm baykuş gözüne benzetilmiş ve 'owl eye' inklüzyon cisimcikleri olarak adlandırılmıştır (6,7).

CMV enfeksiyonunun patogenezinde virüse karşı konak immün yanıtı tüm çalışmaların odak noktasını oluşturmaktadır. CMV, bazı hücresel proteinlerin ekspresyonunu arttırarak veya azaltarak hücre çoğalması gibi bazı konak fonksiyonlarım bozabilmektedir. Bu durumda litik enfeksiyon olmadan CMV sınırlı olarak eksprese edilmekte, hücrelerde minimal viral sitopatolojik etkiler oluşmaktadır. Ayrıca CMV, bazı faktörlerin salınımını etkileyerek komşu hücrelerin fonksiyonlarım engelleyebilmektedir. Fetal CMV enfeksiyonunda görülen merkezi sinir sistemi anomalileri bu şekilde hücre proliferasyonu ve migrasyonunun engellenmesi sonucunda oluşmaktadır. Transplasental geçen antikorlar virüs tutunmasını ve hücrelere girişini bloke ederek enfeksiyonu engelleyebilirler.

Hücresel sitotoksiteye aracı olan antikorlar ise yeni virüs salımı olmadan hücre lizisini indüklerler (6,7).

Bir çok *in vitro* çalışma lenfoid hücrelerin CMV ile litik olmayan enfeksiyonlannda virüsün immünsüpresif etkisini göstermektedir. Bu etki virüsün MHC-I ağır zincir homologu olan bir protein (pUL18) sentezlemesi ve bunun hafif zincire (β2 mikroglobulin) bağlanması ile olur. Bu sayede CMV ile enfekte hücreler MHC-I molekülü eksprese edemezler. Ayrıca pUL18 β2 mikroglobülini sekestre ederek MHC-I molekülünün olgunlaşmasını engeller. Bu da enfekte hücrelerin Tc lenfositler tarafından tanınmasını önler. Bu mekanizma hem irnmün baskılanmaya neden, olur hem de latent infeksiyona zemin hazırlar (6,7). CMV'e karşı normal konakta özgül immün yanıt koruyucu olarak görünmektedir. Bu grupta klinik enfeksiyon nadirdir. Bazı grup hastalarda ve farklı riskler taşıyan sağlıklı konaklarda subklinik reenfeksiyonunun görülmesi ise; bağışıklığın reenfeksiyonu engelleyemediğini göstermektedir. Koruyucu yanıtın yapısı tam olarak bilinmemektedir. Hem hücresel hem de sıvısal bağışık yanıt rol oynamaktadır (6,7).

Hücresel Bağışık Yanıt: Hücresel bağışıklıkta MHC-I aracılıklı CD_8^+ Tc lenfositler, naturel killer (NK) hücre aktivitesi ve antikora bağımlı hücresel sitotoksisite etkin rol oynamaktadır. Virüse özgül T lenfosit yanıtlarının iyileşmedeki doğrudan rolü belirlenememiştir. Konjenital olarak enfekte bebeklerde T lenfosit yanıtının normal olgunluğa gelmesinden sonra virüs salımının durması bu yanıtın önemini göstermektedir. Aynca HIV ile enfekte olgularda da $CD4^+$ T lenfosit sayısının 50/mm3'ün altına düştüğü dönemlerde CMV enfeksiyonu sıklığında artış görülmektedir. Tüm bu veriler CMV enfeksiyonunun iyileşmesinde en önemli rolü T lenfositlerin üstlendiğini göstermektedir (6,7).

Sıvısal Bağışık Yanıt: Viral proteinlere karşı antikorlar saptanmış olmasına karşın koruyucu yanıttaki önemleri açık değildir. Seropozitif annelerden doğan bebeklerde anneden geçen antikorların CMV'e karşı koruyucu olması ve seropozitif annelerdeki antikorların fetal infeksiyonu engellemesi CMV enfeksiyonundan korunmada önemli olduğunu göstermektedir (6,7,).

2.1.6. Klinik Önemi

CMV enfeksiyonları sağlıklı çocuklar ve erişkinlerde sıktır ve genellikle asemptomatiktir. Bununla birlikte; hastalığın yenidoğanlar ve immün yetmezlikli konaklardaki insidansı ve spektrumu bu virüsün önemli bir insan patojeni olduğunu göstermiştir. CMV enfeksiyonu yenidoğan infantların %0.2-2,5'unda saptanmaktadır ve CMV; konjenital enfeksiyonların en sık saptanan nedenidir. Konjenital olarak enfekte infantların %5'den azında yenidoğan döneminde semptom gelişir; olası belirtiler intrauterin gelişme geriliği, sarılık, hepatosplenomegali, peteşi, trombositopenik purpura, miyokardit, pnömoni, santral sinir sistemi anomalileri ve koriyoretinit gibi şiddetli hastalıktan daha sınırlı tutuluma kadar değişebilir. Semptomatik infantlar hayatın ilk ayı içinde komplikasyonlar nedeni ile ölebilirler; ancak daha sık olarak nörolojik hasarla birlikte yaşamaları söz konusudur. Konjenital olarak enfekte infantlarda; doğumda asemptomatik olsalar bile, sonraki yıllarda işitme kaybı, psikomotor ve/veya entelektüel yetersizlik gelişebileceği anlaşılmıştır. Bugüne kadar, perinatal olarak enfekte olan infantlarda enfeksiyonun geç nörolojik sekelinin geliştiği görülmemiştir(9).

CMV enfeksiyonunu postnatal dönemde kazanan immunitesi sağlam çocuk ve erişkinlerin büyük çoğunluğu asemptomatik olarak kalmaktadır. Kan transfüzyonu ile enfekte olan yüksek riskli prematür yenidoğanlarda morbidite ve mortalite önemli olabilir ve hepatosplenomegali, trombositopeni, atipik lenfositoz ve hemolitik anemi gelişimi tanımlanmıştır. Genç erişkinlerde semptomlar Epstein-Barr virüs tarafından oluşturulan enfeksiyöz mononükleoz sendromunu taklit edebilir ve heterofil antikor üretiminin olmadığı, uzamış ateş (2-3 haftadır devam eden), halsizlik, atipik lenfositoz ve orta derecede hepatit bulguları görülebilir. Son zamanlarda, immünitesi sağlam konakta CMV enfeksiyonu ve ateroskleroz arasında bir bağlantı olduğu ileri sürülmüştür. CMV'nin belirli kişilerde vasküler hastalık gelişimine yardımcı faktör olduğuna dair giderek artan sayıda kanıt bulunmaktadır (13).

CMV enfeksiyonları; AİDS, kanser hastaları (özellikle kemoterapi alan lösemi ve lenfoma hastaları), solid organ veya kemik iliği transplant alıcıları gibi konjenital veya kazanılmış hücresel immün yetmezliği olan çocuk veya erişkinlerde sıktır ve

zaman zaman şiddetli seyredebilir. Bu hastalarda enfeksiyonlar; latent virüsün reaktivasyonu veya verilen kan ya da nakledilen organdaki ekzojen virüsle primer enfeksiyon veya reenfeksiyon sonucu gelişebilir. Primer enfeksiyon sonrasında daha şiddetli semptomlar oluşur, bununla birlikte ağır immün yetmezliği olan konakta meydana gelen reaktivasyon veya reenfeksiyon da ciddi hastalık tablosu oluşturabilir. Aktif enfeksiyon sıklıkla, transplantasyondan sonra immünsüpresyonun en üst noktaya ulaştığı 1-4 aylar arasında veya HIV ile enfekte kişiler için $CD4^{+}$lenfosit sayısı 50 hücre /µl altına düştüğünde gelişir. Organ transplant alıcılarında CMV enfeksiyonu sıklığı ve şiddeti transplant tipine, nakledilen organın kaynağına, alıcının immün durumuna ve immünsüpresif tedavinin süresine bağlıdır. Bu hastalarda belli başlı semptomlar genellikle ateş, halsizlik, letarji, miyalji veya artralji, lökopeni, trombositopeni ve hepatit şeklindedir. Spesifik organ hasarları; akciğer veya kalp-akciğer alıcılarında pnömoni, kardiyak alıcılarda myokardit, retinit, ilerleyici vasküler hasar ve ateroskleroz, karaciğer ve pankreas alıcılarında sırası ile hepatit ve pankreatit ile sonuçlanabilir, gastrointestinal hastalık gelişebilir. Transplant alıcılarındaki CMV enfeksiyonu ayrıca yetersiz yada gecikmiş kemik iliği engrafmanı, graft-versus-host-hastalığı şiddetinde veya insidansında artış ve solid organ transplant alıcılarında artmış rejeksiyon riski ile de ilişkili bulunmuştur. Kemik iliği transplantasyonundan sonra CMV enfeksiyonu, özellikle pnömoni ile ilişkili olduğunda, morbidite ve mortalitenin önemli sebeplerinden biridir. HIV ile enfekte hastalarda CMV; ateş, görmeyi tehdit eden retinit, ensefalit, poliradikülomyelopati ve özofajit, gastrit, ülseratif kolit gibi gastrointestinal enfeksiyonların önemli sebebidir(14) .

2.1.7. CMV Genotipleri

Uluslararası CMV "Workshop"'unda 1993 yılında kabul edilen adlandırmaya göre CMV proteinleri tarif edilmektedir. Buna göre protein için "p", glikoprotein için "gp" veya fosfoprotein için "pp" kısaltmaları kullanılmaktadır. Örneğin gpUL55 (gB) UL bölgesindeki 55. "open reading frame" (ORF) tarafından kodlanan glikoprotein anlamına gelmektedir(10). CMV glikoproteinlerinde 55 kadar ORF ve zarfta ise en az 10 glikoprotein tanımlanmıştır. Zarf glikoproteinleri konak hücreye tutunmada, penetrasyonda, bir hücreden diğer hücreye yayılmada ve bağışık yanıtta hedef proteinlerdir. Doğada bulunmakta olan CMV suşlarında bugüne kadar dört farklı gB genotipi (gBl-4) tarif edilmiştir (15). Bununla birlikte yapılan çalışmalarda

gB 5.-6.-7. genotipinin olduğu gösterilmiştir (6). Glikoprotein B dışında gH (UL75) , gN(UL73) , gM(UL100) , UL4 ,UL144 ve "short tandem repeats" (STR) ile de genotipleme çalışmaları yapılmıştır (16,17,18,19).

CMV'ün zarf yapısında bulunan en önemli proteinler glikoprotein B (gB) ve glikoprotein H (gH)'dır. CMV'de bulunan gB (gpUL55) HSV ile bir miktar benzerlik göstermektedir. Bu antijenik yapının iki antijenik determinantı (AD) mevcut olup AD-1 ve AD-2 olarak adlandırılmaktadır. İnsanlardak enfeksiyonlar sırasında AD-1 e karşı çok yüksek oranda, AD-2'ye karşı daha az miktarda anti-gB antikorları oluşmaktadır. AD-1 ve AD-2 bölgelerinde genetik varyasyon görülmekte ve mutantları oluşabilmektedir. Bu epitoplara karşı elde edilen monoklonal antikorlar CMV'ün hücre içerisine penetrasyonunu önlemektedir. Bu nedenle gB, CMV aşısı için aday bir antijen niteliği taşımaktadır (7,10).

Diğer bir zarf glikoproteini olan gH (gpUL75) linear nötralizan bir epitop içermektedir. Bu proteine karşı elde edilen monoklonal antikorlar nötralizan etki göstermektedir. Ancak bu etkinin olabilmesi için kompleman gereksinimi vardır. Konak hücre reseptörlerine bağlanma yönünden gH önemli görev yapmaktadır. gH proteininde genetik varyasyon gösterilememiştir (7,10).

Genotipleme "restriction fragment length polymorhism" (RFLP) ile *(HinfL* ve *Rsal* enzimleri kullanılarak) gB'deki restriksiyon bölgesinde nükleotid sekans değisikliğinin gösterilmesi ile saptanır (5,20). Tanımlanan 4 genotip dışında nadir olarak 5, 6 ve 7 genotiplerine de rastlanmaktadır (13). Bazı araştırmacılar RFLP ile tanımlanan bu nadir görülen genotip 6 ve 7'nin "heteroduplex motility" analizi (HMA) ve sekanslama ile genotip 1 ve 3'ün varyantları olduğunu göstermişlerdir Tüm sekanstaki değişikliği izlemek için "single-strand conformation polymorphism" analizi (SSCPA), HMA ve sekanslama yapılabilir. RFLP bazı örnekleri genotiplemede diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında sınırlı kalmaktadır (21) .

Farklı araştırmacılarda CMV gibi kompleks bir virüste patogenezi açıklamak için sadece bir varyant genin sorumlu olmasının gerçekçi olmadığı sonucuna varmışlardır. Çoklu gen varyantları ve diğer bazı faktörlerin birlikteliklerinin daha detaylı olarak araştırılması gerektiği belirtilmektedir (19,22).

CMV genotiplendirme ile ilgili yapılan çalışmalarda miks genotiplere rastlanmaktadır. Miks genotip tabiri gB1 ,gB2, gB3 ve gB4 ikili veya üçlü grublar

halinde bulunma durumudur.İstatiksel olarak miks genotip sayısı nadir olarak bulunmaktadır.Miks hastalar,yüksek CMV hastalık riski ile ilişkiliydi.miks genotip saptanan kişilerde yaşam süresinin diğerlerine kıyasla daha az olduğu belirtilmektedir.

CMV glikoproteinlerinden gB genotipleme açısından en çok üstünde çalışılan proteindir. Konjenital nörolojik anomalileri olan CMV enfeksiyonlu çocuklarda postnatal enfeksiyonlu çocuklara kıyasla gB3 genotipi daha fazla bulunmuştur (13). Retinitli AIDS hastalarında gB2'nin bulunduğu belirtilmektedir. Solid organ transplant alıcılarında en çok gB1 bulunmuştur. Başka bir çalışmada böbrek transplant alıcılarında canlı dönorden nakil yapılanlarda kadavradan nakil yapılanlara göre gB1 fazla oranda bulunmuş. Kemik iliği nakli yapılan hastalarda gB3 ve gB4 olanlarda 1 ve 2'ye kıyasla GVHD (Graft versus host disease) daha az görülmüş (23-26).

2.1.8.CMV'nin Laboratuvar Tanısı

CMV infeksiyonunun laboratuvar tanısı üç ana başlıkta toplanabilir.

Direkt İnceleme

Virüs İzolasyonu,

Serolojik Testler

2.1.8.1.Direk İnceleme

a. Histopatolojik İnceleme

Lokalize CMV organ hastalığının tanısında; Wright-Giemsa, hematoksilen ve eozin veya Papanicolaou boyalı akciğer ve diğer biyopsi örneklerinin histolojik olarak incelenmesi kullanışlı olabilir. Biyopsi veya otopsi materyallerinin rutin kesitlerinde; bazofilik intranükleer inklüzyonları olan karakteristik büyük hücreler (sitomegalik hücreler) görülebilir, hücreler nadiren eozinofilik sitoplazmik inklüzyonlar içerebilirler. Nükleer inklüzyon; sınırı belirgin kromatin içerdiği ve bunun etrafındaki açık alan nükleer membrana kadar uzandığı için "baykuş gözü" görünümüne sahiptir. Karakteristik sitolojik değişikliklerin bulunması CMV enfeksiyonunu akla getirmektedir, ilave virolojik veya serolojik doğrulama yapılması önerilmesine rağmen, olguların çoğunda aktif hastalık ile uyumludur. Genel olarak CMV hastalığının histopatolojik tanısı, CMV dokuları morfolojik değişiklik

yapmadan enfekte edebileceği ve tipik sitomegalik hücrelerin bulunmaması hali CMV enfeksiyonu olasılığını yok edemeyeceği için nispeten duyarsızdır. Histopatolojik incelemenin duyarlılığı CMV antijenlerini saptamak için immünohistokimyasal boyama kullanılarak veya CMV nükleik asitlerinin saptanması için in situ hibridizasyon yapılarak artırılabilir (9).

b. Antijenemi Testi

CMV antijenemi testi solid organ ve kemik iliği transplant alıcıları ve HIV ile enfekte kişilerde kan lökositlerinde CMV'nin saptanması ve kantite edilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (27- 29). Antijenemi testi; CMV enfeksiyonunun erken tanısında duyarlı, özgül ve hızlı bir metoddur, ciddi CMV hastalığı açısından yüksek riskli kabul edilen hastaların rutin monitörizasyonu için kullanılabilir, testin yapılması nispeten basittir ve periferal kan lökositlerinde virüsün 65 kDa alt matriks fosfoproteininin immünohistokimyasal olarak saptanması esasına dayalıdır. Pozitif sonuçlar enfekte hücre nükleusunda homojen elma yeşili floresan varlığı olarak görülür. Bu test kullanılarak CMV semptomların başlangıcından önce saptanabilir ve viral yük kantite edilebilir, bu kantitasyon CMV hastalığını öngörmede ve asemptomatik enfeksiyondan ayırt etmede yardımcıdır . Test aynı zamanda, antiviral tedavi etkinliğini değerlendirmede, preemptif tedavi başlanmasındada kullanılmaktadır. CMV pp65 proteini immün yetmezlikli hastaların kanında dolaşan endotelyal hücrelerde de bulunmaktadır ve bazı araştırmacılar bu hücrelerdeki enfeksiyonun organ tutulumu ve daha ileri hastalıkla ilişkili olduğunu ileri sürmektedirler. Bu testin performansını kandan CMV izolasyonu için kullanılan konvansiyonel ve shell vial kültür yöntemleri ile karşılaştıran çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Antijenemi testinin sonuçları, moleküler amplifikasyon testleri ile lökositlerde veya plazmada CMV DNA'nın kantitatif olarak saptanması ile uyumludur. Antijenemi testinin en büyük avantajı kanda CMV saptanmasında hücre kültürlerinden (konvansiyonel tüp veya shell vial) daha yüksek duyarlılıkta olmasıdır; sonuçların aynı gün içinde bildirilmesine olanak sağlayacak şekilde 2-4 saat içinde tamamlanabilir ve prosedür viral yükün ölçülmesine olanak sağlayacak şekilde modifiye edilmiştir. Özellikle fazla sayıda örnek olduğunda zahmetli ve zaman alıcı olması ve immünositokimyasal teknikler konusunda deneyimli personel gerektirmesi testin dezavantajlarıdır (30- 34)

c. Moleküler Amplifikasyon

Moleküler amplifikasyon testleri CMV enfeksiyonlarının tanısında ve monitorizasyonunda giderek artan oranda moleküler olmayan testlerin yerini almaktadırlar. PCR; CMV DNA ve mRNA saptanmasında halen en yaygın kullanılan moleküler metoddur. Çok sayıda laboratuvar-tasarımı ve az sayıda ticari kalitatif test bulunmaktadır ve aktif CMV enfeksiyonunun tanısında PCR'nin duyarlılığı ve özgüllüğü değerlendirilmiştir (35, 36, 37, 38, 39, 40). Amplifikasyon; çok-erken antijen I, majör çok-erken antijen, glikoprotein B ve H, EcoRI D fragmanı, HindIII X fragmanı, pp65, pp67, ve majör kapsid proteini gen bölgelerinden çok çeşitli primer çiftleri ile yapılmaktadır. Pek çok çalışmada; çok-erken ve geç CMV genlerinin birlikte çoğaltılması veya tek bir gen fragmanını çoğaltmak için nested primerlerin kullanılması testin duyarlılığını artırmıştır. Her iki gen fragmanının birlikte kullanılması ile çok çeşitli klinik izolat saptanabilmiştir; bu durum suşlar arasındaki farklılıkların PCR ile CMV tanısında kısıtlayıcı bir faktör olmadığını göstermektedir. PCR; organ transplant alıcılarında, AİDS hastalarında ve konjenital enfeksiyonu olan infantlarda çeşitli klinik örneklerde CMV DNA saptanmasında başarı ile kullanılmıştır. PCR, immün yetmezliği olan hastaların devamlı sürveyansında ve antiviral ilaçların terapötik etkilerinin değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır (28). CMV tanısında PCR kullanımında; testin aktif hastalıkla asemptomatik enfeksiyonu veya latentlik durumunu ayırt edip edemeyeceği ile ilgili kaygılar bulunmaktadır. CMV viremisi CMV hastalığının en iyi göstergesi olarak kabul edilmektedir ve CMV DNA; tam kan, saflaştırılmış periferal kan lökositleri, plazma ve serumda PCR ile başarılı bir şekilde saptanmaktadır (38, 41). Bununla birlikte PCR yüksek derecede duyarlıdır ve bu örneklerde CMV DNA'nın kalitatif olarak saptanması immün yetmezliği olan hastalarda semptomatik hastalığı öngörmede ve antiviral tedavi başarısını mönitörize etmede sınırlı değere sahiptir. CMV DNA hastalık yokken ve semptomatik hastalığı olanlarda başarılı tedaviden haftalar veya aylar sonra PCR ile kanda saptanabilmektedir. Şu anda, kalitatif PCR ile alınan sonuçların klinik önemi açık değildir, ancak bazı durumlarda bu metod kullanılabilir. Bu durumlar, sık rastlanmayan CMV enfeksiyon formlarının tanısıdır. Bunlar; ensefaliti veya poliradikülomiyeliti olan hastaların BOS'larında; konjenital CMV enfeksiyonunun tanısında idrar, doku, amniyon sıvısı veya fetal kanda; CMV retiniti olan hastaların aköz veya vitröz hümör örneklerinde; CMV donor pozitif/alıcı negatif

transplant hastaları gibi ciddi enfeksiyon açısından yüksek riskli olan hastaların kanlarında CMV saptanmasıdır. Ayrıca, kanda kalitatif PCR ile negatif sonuç, sistemik CMV hastalığını dışlamada yüksek negatif prediktif değere sahiptir (42).

CMV hastalığını öngörme ve tanı koymada; antijenemi testi ile benzer olarak, CMV DNA'nın kandaki düzeyinin ölçülmesi gereklidir (30,44). Bunun sonucunda çok sayıda kantitatif ve semikantitatif moleküler test geliştirilmiştir ve günümüzde çok çeşitli ticari kit elde edilebilmektedir. Bunlar; konvansiyonel PCR ve kantitatif gerçek zamanlı PCR gibi hedef ve sinyal amplifikasyon metotları; dallanmış zincir DNA teknolojisi ve solüsyon hibridizasyon antikor yakalama testidir (45, 46). Her bir testin performansı antijenemi testi ve kültür yöntemi ile ve aynı zamanda birbirleri ile karşılaştırılmıştır (46-54). Sonuç olarak; bu moleküler testler antijenemi testi sonuçları ile karsılaştırılabilir sonuçlar sağlamaktadırlar. CMV enfeksiyonunu saptamada kültürden daha duyarlıdırlar ve klinik semptomların başlamasından önce CMV'yi saptayabilirler. Aktif CMV enfeksiyonu olan transplant alıcılarının ve AIDS'li hastaların daha yüksek CMV DNA düzeylerine sahip oldukları gösterilmiştir. CMV DNA kopya sayısındaki hızlı artış semptom varlığı ve tedavi sırasında ilaç başarısızlığı ile ilişkilidir (55). Rasmussen ve ark. (56) semptomatik CMV retiniti gelişme riski olan HIV ile enfekte hastaların belirlenmesinde periferal kan lökositlerinde CMV DNA kantitasyonunun kullanılabileceğini belirlemişlerdir. CMV hastalığı olan immün yetmezlikli hastaların hastalığı olmayanlara göre plazma ya da lökositte daha fazla CMV DNA bulunduğu; ancak CMV DNA düzeyinin lökositlerde plazmadakinden daha yüksek olduğu da bildirilmiştir (57). Plazmada CMV kantitasyonu bu nedenle daha az duyarlı olabilir buna rağmen pozitif sonuç aktif hastalıkla daha iyi uyumludur. Konjenital CMV enfeksiyonu prognozunun, direkt olarak idrardaki CMV miktarı ile ilişkili olabileceği enfekte bir yeni doğanda gösterilmiştir. AIDS'li hastalarda BOS'ta CMV DNA'nın kantite edilmesi; Santral Sinir Sistemin'deki hastalıkların HlV'in direkt etkilerinden veya fırsatçı patojenlerden ziyade CMV'ye bağlı olduğunun gösterilmesinde anlamlıdır (9).

Kantitatif testlerin kullanımına bir alternatif olarak; yalnızca aktif enfeksiyon sırasında eksprese edilen spesifik CMV mRNA transkriptlerinin revers transkriptaz PCR yöntemleri kullanılarak kalitatif amplifikasyonu ile, semptomatik hastalık gelişmesi açısından büyük risk altında olan hastaların belirlenmesi mümkün olabilmektedir (58-61). Nükleik asit sekans temelli amplifikasyon yöntemini içeren

ticari testler geliştirilmiştir, kan lökositlerinde ve BOS örneklerinde CMV çok-erken ve geç pp67 mRNA ekspresyonunun monitörize edilmesinin tanısal değeri gözden geçirilmiştir CMV mRNA saptayan testler genellikle diğer metodlardan daha az duyarlıdırlar, CMV hastalığının tanısında yüksek spesifiteye sahiptirler. Bununla birlikte moleküler metodlar; mevcut hastalığın hızlı tanısında, hastalık gelişme riski olan hastaların belirlenmesinde, hastalığın gidişatını ve relaps riskini belirlemede, preemptif tedaviyi yönlendirmede, tedaviye yanıtı monitörize etmede ve viral direnç ve tedavi başarısızlığını öngörmede kullanılmakta olan analitik yöntemlere çok değerli katkılarda bulunmaktadır (62-65).

d. Diğer Direkt Saptama Metotları

CMV'nin, dokulardan, bronkoalveoler yıkama örneklerinden, kan lokositlerinden, servikal sekresyonlardan ve idrar sedimentinden direkt olarak saptanmasında; elektron nıikroskopisi, eksfoliyatif sitoloji ve moleküler dot blot ve in situ hibridizasyon teknikleri de kullanılmaktadır. Viral proteinlere karşı antiserum içeren enzim linked immünassay (ELİSA) ve dot immunoperoksidaz yöntemi, klinik örneklerden CMV antijenlerinin saptanmasında kullanılan diğer yöntemlerdir. Bu metodların duyarlılıkları düşüktür ve klinik laboratuarların çoğunda rutin olarak kullanılmazlar (9).

2.1.8.2.Virüs İzolasyonu

a. Hücre Kültürleri

CMV'nin üremesini en iyi olarak insan fibroblastları desteklemektedir ve bu nedenle tanısal amaçla kullanılırlar. Kabul edilebilir fibroblast kültürleri içinde;insan embriyonik dokularından ya da sünnet derisinden ve W1-38, MRC-5, IMR-90 gibi insan diploid fetal akciğer hücrelerinin seri pasajlarından hazırlananlar bulunmaktadır. Diploid fibroblast hücreler; hücre jenerasyonları arttıkça CMV enfeksiyonuna daha az duyarlı hale gelebilecekleri için, az sayıda pasajlanarak kullanılmalıdırlar. Bu fibroblast hücre dizilerinin çoğu ticari olarak bulunabilmektedir. CMV belirli insan epitelyal hücrelerini enfekte edip replike olabilir, ancak bu hücrelerde üremesi sınırlıdır (9).

b. Konvansiyonel Tüp Kültüründe Virüs İzolasyonu

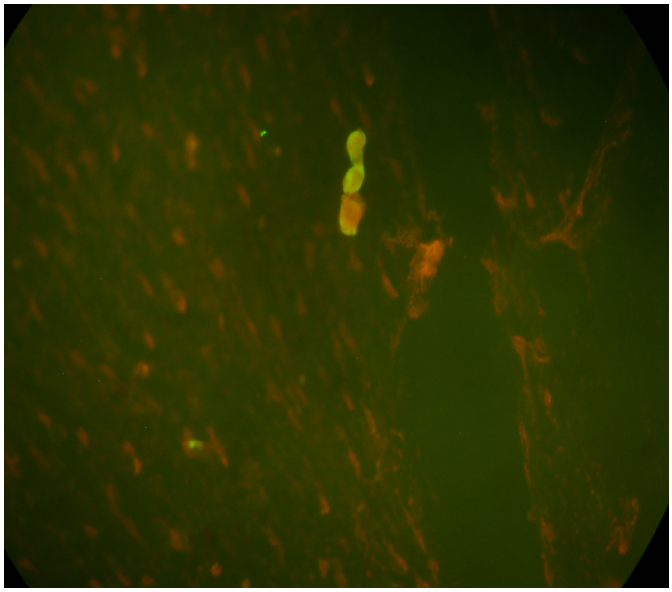
Tüpler sitopatik etki (CPE) açısından ilk beş gün her gün, daha sonra haftada iki kez olmak üzere örneklerin çoğunda en az dört hafta (lökosit örnekleri için 6 hafta)

incelenir. Kontrol ve inokülasyon yapılmamış kültürler, klinik örnek inoküle edilenlerle aynı şekilde hazırlanır ve değerlendirilir. CPE'nin görünme zamanı ve boyutu örnekte varolan virüs miktarına bağlıdır. Konjenital olarak enfekte bir yenidoğanın idrar örneğinden ekim yapıldığında eğer idrardaki virüs titresi çok yüksek ise CPE 24 saat içinde gelişebilir ve hızla hücrelerin çoğunu içerecek şekilde ilerler. Büyük, yuvarlaklaşmış ve refraktil hücrelerden oluşan CPE odakları, sıklıkla ilk hafta içinde görülür ve CPE'nin çevre hücrelere yayılımı daha yavaş olur (Şekil 3). Daha yaşlı kişilerin idrar veya respiratuvar örneklerinin inoküle edildiği kültürlerde CPE sıklıkla iki hafta İçinde görülür. Lökosit kültürleri 3-6 hafta sonrasına kadar pozitifleşmeyebilir, klinik örneklerin inoküle edildiği kültürlerde CPE'nin yavaş gelişimi, en azından bir kısmında virüsün hücre dışı sıvıya sınırlı salınması nedeniyledir. Laboratuvara adapte edilmiş suşlar da dahil olmak üzere, seri olarak pasajlanmış CMV suşlarında hücre dışı sıvıya daha fazla miktarda virüs salınır ve CPE daha hızlı gelişir. Bazı laboratuvarlarda CMV izolatları yalnızca konak hücre dağılımı ve CPE karakteristikleri temeline göre tanımlanmaktadır. Bununla birlikte; adenovirüs ve Varicella- Zoster Virüs gibi virüsler nadir olarak CMV'ninkinden ayırt edilemeyen CPE oluşturmaktadırlar. Bu nedenle şüpheli CMV izolatlan en iyi olarak çeşitli ticari kaynaklardan sağlanabilen monoklonal veya poliklonal antikorlar içeren immünofluresan assay (İFA) ile doğrulanırlar. Enfekte hücrede tipik nükleer floresan görünümü CMV varlığına işaret eder. Şüpheli izolatlann doğrulanmasında PCR veya diğer moleküler amplifikasyon metotları da kullanılabilir (9).

c. Shell Vial Yöntemi ile Hızlı Çoğaltma

Gleaves ve ark. (66) tarafından tanımlanan shell vial yöntemi ile hızlı çoğaltma klinik örneklerde CMV saptanmasında hızlı kültür metodu olarak çok yaygın kullanılmaktadır. Bu teknik düşük hızda santrifüj sonrası virüsün hücre kültüründe çoğaltılması temeline dayanmaktadır ve CPE oluşmadan önce, CMV replikasyonunun erken döneminde oluşan viral antijenler saptanır. Bu yöntemde örneklerde bulunan düşük titrelerdeki virüs bile kolayca çoğaltılır 24 saat içinde saptanır. Monoklonal antikorlar ticari olarak bulunmaktadır ve CMV'nin erken antijenlerinin saptanmasında kullanılmaktadırlar. CMV'ye karşı hazırlanmış, ticari olarak bulunan DNA probları ile in situ hibridizasyon da kullanılabilir. Pozitif hücreler kırmızı sitoplazmik zemine karşı, elma yeşili floresan veren nükleuslar içerirler. Çok-erken antijen; açık yeşil benekleri olan elma yeşili floresan boyanma

şeklinde görülür (şekil 3). Nükleuslarda viral inklüzyonlar (baykuş gözü) görülebilir. Shell vial yöntemi ile hızlı çoğaltma, konvansiyonel virüs izolasyonun güçlü bir tamamlayıcısıdır. Hızlı, duyarlı ve özgül olmak gibi önemli özellikleri vardır. Bununla birlikte, optimum performans için; becerikli teknik personel ile örnek, hücre ve reagen kalitesine dikkat edilmesi gerekmektedir.



Şekil 3. Shell vial kültür ve İFA boyama sonrası enfekte MRC-5 hücrelerinde CMV erken antijenlerin nükleusta gösterilmesi (Prof.Dr. S.Gökahmetoğlu'nun arşivinden).

2.1.8.3. Serolojik Testler

CMV antikorlarının saptanması için yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip çok sayıda test bulunmaktadır (67). Hangi testin uygulanacağına karar verirken; çalışılacak örnek sayısı, hasta popülasyonu, fiyat, çalışma süresi, gerekli ekipman ve uygulama kolaylığı gibi faktörler değerlendirilmelidir. Metod, her laboratuvarın gereksinimlerine göre seçilir. Küçük kapasiteli laboratuvarlar için indirekt floresan antikor (IFA) ya da pasif lateks aglütinasyon testleri daha etkin-verimli ve pratik olabilirken, ELISA testleri daha yüksek örnek kapasiteli laboratuvarlar için uygun olabilir. Genel olarak, CMV spesifik IgM saptanması ya da pozitif serokonversiyonun gösterilmesi belirli klinik durumlarda primer CMV enfeksiyonlarının tanısında kullanılabilir ve bu testlerle kan örneklerinin, organ

verici ve alıcılarının taranması; ağır CMV hastalığı yönünden yüksek riskli hastalara latent CMV geçişinin önlenmesinde önemlidir (9).

a. ELISA

Uzun zamandır, CMV antikorlarının saptanmasında, ELISA yöntemi diğer geleneksel yöntemlerin büyük çoğunluğunun yerini almıştır. ELISA'nın başlıca avantajları hızlı, duyarlı ve özgül olmasıdır (68- 70). Ek olarak, nispeten düşük fiyata her gün çok sayıda örnek çalışılabilmektedir. CMV IgG'yi saptayan kitler çok sayıda ticari kaynaktan sağlanabilmektedir.

b. IFA

CMV antikorlarının saptanmasında indirekt ve antikompleman İFA sıklıkla kullanılan metodlardır (71, 72). İndirekt IFA'da cam mikroskop lamına fiske edilmiş virüsle enfekte hücreler test serumu dilüsyonları ile inkübe edilir. Spesifik antikor-antijen kompleksleri fluorescein isothicyanate ile konjuge antikor ve floresan mikroskobu kullanılarak saptanır. Antikompleman immünüfloresan, indirek İFA ile benzerdir. Farklılık olarak, serum önce endojen kompleman aktivitesini uzaklaştırmak için ısı ile inaktive edilir ve sonra cam slaytlar üzerindeki virüsle enfekle hücrelerle inkübe edilir. Kompleman eklenir ve bu kompleman oluşmuş, olan spesifik antijen-antikor kompleksleri ile bağlanır. Daha sonra floresanla işaretli antikompleman antikor ilave edilir; bu komplemanın C3 komponentine bağlanır ve slaytlar floresan mikroskopta değerlendirilir. İFA yöntemleri kullanışlı ve pahalı olmayan metodlardır, CMV antikorlarının kalitatif ve kantitatif olarak saptanmasında hızlı ve basit olma avantajları bulunmaktadır. İFA sistemlerinin başlıca dezavantajları slaytların incelenmesi için karanlık oda ve floresan mikroskop ile test sonuçlarının okunup değerlendirilmesi için büyük deneyim gerektirmeleridir (9).

c. Pasif Lateks Aglütinasyon Testi

İnsan serum ve plazmasındaki CMV antikorlarını saptamada pasif lateks aglütinasyon testi basit, hızlı ve pahalı olmayan bir yöntemdir (68, 69,73,74). Viral antijenlerle kaplı bir lateks partikül süspansiyonu test serumu ile karıştırılır ve çevrilerek kısa bir süre için inkübe edilir. CMV spesifik antikor varlığında antijenle

kaplı partiküller kümelenir ve aglütinasyon oluşturur ve aglütinasyon çıplak gözle görülebilir. Bu prosedür IgG ve IgM antikorlarını birlikte saptar fakat iki immünglobülin sınıfını ayıramamaktadır. Test 10-15 dakika içerinde tamamlanabilir ve yoğun yıkama, uzun inkübasyon süresi veya pahalı ekipman gerektirmez. Başlıca dezavantajları; aglütinasyon paternlerinin fark edilmesinin zorluğu ve okumanın subjektifliğidir.

d. CMV IgM Antikor Ölçümleri

CMV IgM antikorlarının ölçümünde halen kullanılan metotlar içinde İFA ve EIA bulunmaktadır. Kullanılan prosedürler IgG antikorlarının saptanmasında kullanılanlarla temel olarak aynıdır, ancak uygun belirteçlerle işaretlenmiş anti-human IgM antikorları kullanılır. CMV IgM testlerinin fark edilen bir eksikliği yalancı pozitif ve yalancı negatif reaksiyonların varlığıdır. Yalancı pozitif reaksiyonlar; serumda spesifik CMV IgG varlığı ile birlikte beklenilmeyen derecede yüksek düzeyde romatoid faktör varsa oluşur. Romatoid faktör genellikle IgM sınıfı bir immünoglobulindir, IgG ile reaksiyona girer. Bazı romatolojik, vasküler ve CMV enfeksiyonunu da içeren viral hastalıklar sırasında üretilir. IgM romatoid faktör, CMV spesifik IgG'yi de içerebilen IgG ile kompleks oluşturur. Bu viral olmayan IgM'yi taşıyan CMV IgG, CMV antijeni ile bağlanır, bu durumda, IgM'yi saptamak için tasarlanan bir test yalancı pozitif sonuç verecektir. Yalancı negatif reaksiyonlar; eğer yüksek düzeyde spesifik IgG antikorları CMV antijenine bağlanmada IgM ile yarışarak onları bloke ederse, meydana gelir. Bu nedenle, hem yalancı pozitif, hem de yalancı negatif IgM test sonuçlarının insidansını azaltmak için testten önce IgM ve IgG fraksiyonlarının ayrılması önemle önerilmektedir (9).

Önleyici etkileri olan romatoid faktör ve IgG moleküllerini serumdan uzaklaştırmada basit ve hızlı metotlar geliştirilmiştir. Bunlar; jel filtrasyonu, afinite kromatografisi, IgM antikorlarının katı bir faza seçici absorbsiyonu ve hiperimmün anti-human IgG, stafilokokkal protein A veya grup C streptokoklardan elde edilen rekombinan protein G kullanılarak IgG'nin uzaklaştırılmasıdır. Mevcut veya aktif enfeksiyonun saptanmasında CMV spesifik IgM tayininin önemi olmasına rağmen sonuçlar dikkatle değerlendirilmelidir. IgM plasentayı geçemediği için enfekte bir yeni doğandan alınan tek bir serum örneğinde pozitif sonuç tanı koydurucudıır. Bununla birlikte, yenidoğanda IgM üretiminde eksiklik veya gecikme olabilir. CMV spesifik IgM antikorlarının varlığının test edilmesi yenidoğan döneminden sonra genellikle

önerilmez. Çünkü IgM antikorları hem primer ve hem de reaktive olmuş CMV enfeksiyonlarında görülebilmektedir ve primer enfeksiyondan sonra uzun bir dönem kalıcı olabilmektedirler. Bu durum özellikle gebe kadınlar veya immün yetmezlikli hastalar için test sonuçlarının değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır ve mevcut veya aktif enfeksiyon göstergesi olmayabilir. Yenidoğanlarla benzer olarak, immün yetmezlikli kişilerde de IgM üretiminde gecikme olabilir veya yeterli düzeyde IgM antikor yanıtı oluşmayabilir. Son olarak, Epstein-Barr virüsün neden olduğu enfeksiyöz mononükleozlu hastalarda heterotipik IgM yanıtı oluşarak yalancı pozitif CMV IgM test sonuçlarına neden olabilir (9).

e. IgG Avidite Testi

Düşük aviditeli CMV spesifik IgG'ler primcr enfeksiyonu takiben ilk haftalar-aylar boyunca üretilir, halbuki geçirilmiş veya primer olmayan enfeksiyonlarda yüksek aviditeli IgG antikorları oluşur.

Son zamanlarda CMV IgM pozitif gebe kadınlarda düşük aviditeli CMV spesifik IgG antikorlarının bulunmasının mevcut primer CMV enfeksiyonu tanısını desteklediği ve fetal enfeksiyonla ilişkisi konusunda prognostik değeri olduğu bildirilmiştir (75, 76). Solid organ transplant alıcılarında da uzamış antijenemi ve kötü prognozla birlikle yüksek aviditeli CMV spesifik IgG antikorlarının gelişiminde gecikme gösterilmiştir (77). CMV spesifik IgG aviditesinin ölçümü konvansiyonel EIA protokolleri ile, bir modifikasyon yapılarak, başarılmıştır. Antijenle kaplı kuyulara hasta serumu eklenmesinin ardından ve konjuge sekonder antikor eklenmesinden önce, bağlanmanın gücünü veya aviditesini saptamak için, antijen kaynağına bağlı tüm CMV spesifik IgG'ler üre gibi denatüre edici bir ajanla muamele edilir. Test bittiğinde üre ile muamele basamağının varlığı ve yokluğundaki sonuçlar karşılaştırılarak, avidite düzeyleri antijene bağlı IgG yüzdesi olarak gösterilirler (9).

f. Diğer Serolojik Testler

CMV antikorlarının ölçümünde kullanılan diğer serolojik testler kompleman fiksasyonu, immünoderans hemaglütinasyonu, indirek hemaglütinasyon ve nötralizasyon testidir. Bu metotlar halen yalnızca sınırlı sayıdaki tanı laboratu varlarında uygulanmaktadır; prosedürlerden bazılarının duyarsız olma, kötü standardizasyon, yoğun iş gücü gerektirme ve zaman alma gibi dezavantajları bulunmaktadır (9).

g. CMV Genotiplerinin Araştırılması ve DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi DNA örneğindeki nükleotidlerin tam dizisinin belirlendiği bir yöntemdir.

DNA Dizi Analizinde günümüzde birbirinden farklı yöntemler kullanılmaktadır.

1- Maxam ve Gilbert' in kimyasal kırılma yöntemi,

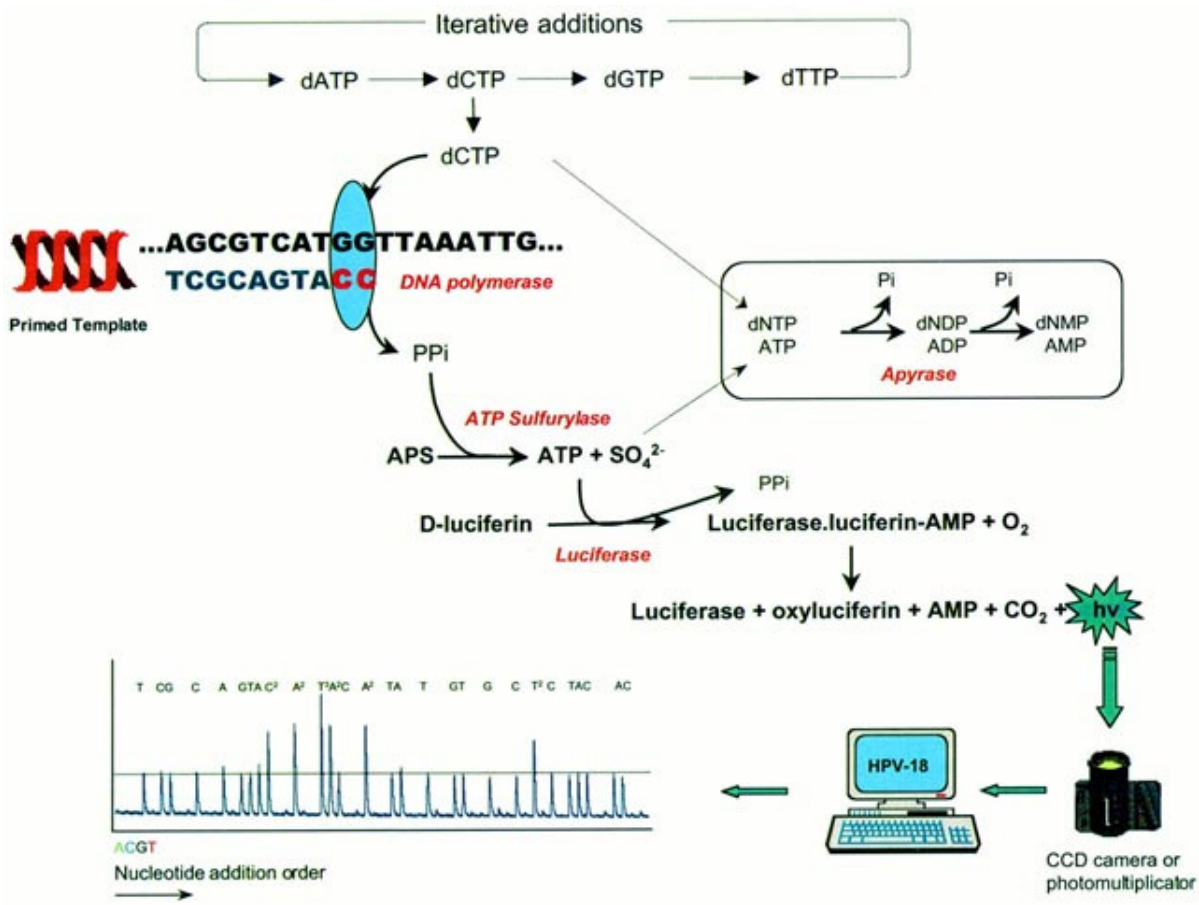
2- Sanger-Coulson' un zincir sonlanma yöntemi,

3-Shotgun yöntemi,

4-Pyrosekans (pyrosequencing) yöntemi (78).

DNA, dört çeşit deoksinükleotid trifosfatla sentezlenir. Her bir nükleotid 3′ -OH ucundan bir sonraki nükleotide bağlanır. Dideoksi metoduyla sentetik oligonükleotid sentezinde 3′ -OH molekülü kritik rol oynar. Sentez sırasında zincire bir dideoksinükleotid eklenmesi zincir uzamasını sonlandırır. Çünkü 3. karbon atomundaki 3′ -OH molekülünün oksijen atomu bulundurmaması zincirin uzamasına izin vermez. Bu nedenle metod aynı zamanda zincir sonlandırma (chain termination method) olarak da adlandırılır. Zincir uzaması esnasında normal nükleotidler sırayla eklenir; fakat DNA polimeraz normal deoxynükleotid yerine dideoxy nükleotid (renkli olarak gösterilen) eklediği zaman zincirin uzaması sonlanır. Bu eklenme rastgele olduğu için değişik uzunluklarda milyonlarca fragment oluşur. Bu fragmentler aynı zamanda sonlandıkları noktada kendilerine özgü flouresan boya da taşımaktadırlar. Reaksiyon sonrasında elektrokinetik enjeksiyon sistemiyle çalışan cihazlarda fragmentler, kısadan uzuna doğru ayrılırlar. Bu ayrım kapiller denilen ince borucukların içerisinde o kadar hassas yapılır ki, birer nukleotid uzunluk farkıyla birbirlerini izlerler. Sonlandırıldıkları noktada dideoxynükleotid taşıdıkları için her bir fragment dört çeşit dideoxynükleotidten birine ait flouresan boyada bulundurmaktadır. Kapillerde bulunan küçük cam pencerenin önünden geçerken cihazın lazer sistemi flouresan boyaları uyararak her birinin kendine özgü dalga

boyunda ışıma yapmasını sağlar.Yine cihaza entegre bir kamera sistemiyle bu ışımalar kaydedilir ,sıraya konup değişik bilgisayar değerlendirmeleri ve filtrasyon işlemlerinden geçirildikten sonra DNA dizi bilgisi (sequence) elde edilir (78).



Şekil 4. Pyrosekans yöntemi

(

http://www.nature.com/labinvest/journal/v81/n5/fig_tab/3780276f1.htm

l)

Sanger metodunda tek bir örneğin dizi analizini yapmak için dört paralel dizi analizi reaksiyonu kullanılmakta, elektroforez aşamasını içermekte ve oldukça uzun bir sürede tamamlanabilmektedir. Sanger metodunun bahsedilen çeşitli dezavantajlarını ortadan

kaldıracak yeni teknikler geliştirme çalışmalarına başlanmış ve 1986 yılında Pal Nyre″n tarafından 'Pyrosekans' tekniği geliştirilmiştir. Pyrosekans sentez yaparak dizi analizi yapma prensibine dayanır. Pyrosekans DNA sentezi esnasında açığa çıkan pirofosfatların saptanması esasına dayanan bir gerçek-zamanlı kantitatif dizi analizi tekniğidir. İşlem PCR ürünlerinin tek sarmal DNA (ssDNA) ya dönüşmesi ile baslar. Bir tek sarmal DNA pyrosekans işleminde kalıp olarak kullanılmak üzere izole edilir, her bir primer çifti genellikle biotin ile 5' ucundan işaretlenir (78).

Pyrosekans aşamaları;

1. Aşama

Sekans primeri PCR ile çoğaltılmış olan bir ssDNA kalıbı ile hibridize edilir. Enzim olarak DNA polimeraz, ATP sülfürilaz, lusiferaz ve apiraz, substrat olarak da adenozin 5' fosfosülfat (APS) ve lusiferin ile inkübe edilir

2.Aşama

4-deoksribonükleotid trifosfat'lardan (dNTP) ilki reaksiyona ilave edilir. Eğer dNTP kalıp DNA'daki baza komplementer ise ortamda bulunan DNA polimeraz, bu dNTP'nin DNA sarmalına eklenmesini katalize eder. Yani karışımda bulunan dNTP lerden DNA sarmalındaki ilk nükleotidin komplementeridir, bağlayıcı enzim olan DNA polimeraz yardımı ile DNA sarmalına 3' ucundan bağlanır.

Polimeraz aracılığı ile dNTP DNA kalıbına bağlanırken dNTP üzerindeki 2 adet fosfat açığa çıkar ve 2 fosfatlı bir yapı olan pirofosfat (PPi) ortama geçmiş olur .Her bir nükleotid eklenmesi ile bir pirofosfat (PPi) serbest kalır. Böylece, eklenen olan nükleotid miktarı ile serbest pirofosfat'ın (PPi) miktarı orantılıdır.

3. Aşama

Adenosine 5' fosfosülfat (APS) varlığında ATP sulfurylase PPi'yi ATP'ye çevirir. ATP nin ortamda bulunması ile lusiferin, lusiferaz enzimi aracılığı ile oksilusiferin e

dönüşür. Oksilusiferin ise görünür bir ışın yayar. Oluşan bu ışın miktarı ATP miktarı ile orantılıdır. Lusiferaz ile katalize edilmiş reaksiyon sonucu oluşan ışın CCD kamera ile tespit edilir ve bir seri tepecik şeklinde kaydedilir, buna Pyrogram adı verilir. Yani, ışın Pyrogram'da bir yükseklik veya tepecik şeklinde görülür. Her bir tepeciğin yüksekliği (ışık sinyali) eklenmiş olan nükleotid sayısı ile orantılıdır.

4.Aşama

Nükleotid parçalayan bir enzim olan apiraz (apyrase) devamlı olarak ATP'yi ve bağlanmamış olan dNTP'leri parçalar. Dolayısı ile ışık oluşumu kesilir ve reaksiyon solüsyonu yenilenmiş olur. Diğer bir deyişle ortamda yeni reaksiyon oluşturacak dNTP ve ATP kalmamış olur ve bu şekilde ortam ikinci nükleotidin ilave edilmesine hazırlanmış olur. Bu teknoloji ile bir DNA parçacığının 100 nükleotidi kantitatif bir şekilde okunmuş olur.

5. Aşama

Doğal dATP yerine deoksiadenozin alfa-tio trifosfat (dATPaS) kullanılmaktadır. Çünkü dATPaS , DNA polimeraz tarafından en verimli şekilde kullanılmakta ancak lusiferaz enzimi tarafından tanınmamaktadır. İşlem devam ettikçe komplementer DNA sarmalı yapılır ve nükleotid dizisi Pyrogram'daki sinyal tepeciklerinden saptanır (78).

2.1.9. Tedavi ve Antiviral Duyarlılık Testi

CMV enfeksiyonlarının tedavisinde önceleri α-interferon, transfer faktör, asiklovir, vidarabin ve hiperimmünglobülinlerle çalışmalar yapılmış ancak başarılı sonuçlar alınamamıştır. Son yıllarda CMV tedavisinde lisans alan gansiklovir, sidofovir ve foskarnet gibi antiviral ajanlar vardır (6-8).

Gansiklovir: bir guanin nükleozid analoğu ve asiklovir homoloğudur. İnsanlardaki CMV hastalığının tedavisinde etkili olarak gösterilen ilk antiviral ajandır. Tüm herpes virüslerde inhibisyon yapar. Antiviral aktivite için spesifik bir viral enzim tarafından fosforilasyona ihtiyaç duyar. CMV'ün UL97 geninin fosfotransferaz üretimi gansikloviri, gansiklovir monofosfata dönüştürür. Monofosfat, selüler enzimler yoluyla trifosfata fosforile edilir. Gansiklovir trifosfat CMV DNA polimeraz enziminin potent bir inhibitörüdür. Gansiklovir trifosfatın CMV ile enfekte olmuş hücrelerde yarılanma ömrü 16.5 saat, asiklovir trifosfatın 2,5 saattir.

Fakat gansiklovir trifosfatın konsantrasyonu asiklovirden 10 kat fazladır. Bu sebeple CMV replikasyonunun inhibisyonunda asiklovirden daha etkilidir (6,15,79).

Ölümcül seyreden ve özellikle KİT alıcılarında sık görülen CMV pnömonisinin sağaltımında ve yine bu grup alıcıların diğer CMV hastalıklarında gansiklovir ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir (7,8). CMV hastalığı olan AIDS'li olgularda gansiklovir ile tedavi organ alıcılarındaki kadar başarılı değildir. Çünkü bu grup hastalarda virüsü temizleyebilecek yeterli immün fonksiyonlar yoktur (6,7). En önemli yan etkileri; lökopeni, trombositopeni, rnyelotoksisite, spermatogenez bozukluğudur (6,79). CMV'de gansiklovire direnç, ilacın hücre içi fosforilasyonunu sağlayan UL97 protein kinaz geninde değişiklik veya nokta mutasyonu sonucu viral DNA polimeraz enziminde değişikliğe bağlıdır. CMV'de gansiklovire direnç oranı % 7-10 arasında değişmektedir (6,79).

Foskarnet: CMV'ye ve diğer herpes virusların DNA polimerazına direk olarak bağlanabilen bir pirofosfat analoğudur. Herpes virüslerin (HSV, CMV, VZV, EBV, HHV-6) DNA polimerazını, HlV'ün revers transkriptaz enzimini ve influenza A'nın RNA polimerazını inhibe eder. Aktive olması için virüse spesifik timidin kinaz gerekmez. Bu nedenle asiklovire dirençli HSV'lere etkilidir (11,79). Foskarnet günümüzde özellikle AİDS 'lilerde görülen CMV retinitlerinin ve gansiklovire dirençli CMV infeksiyonlarının tedavisinde bir alternatif olarak önerilmektedir (6,8,11,15,79). AİDS olgularındaki CMV retinitinde foskarnet ile daha iyi sonuçlar alınmasının sebebi, ilacın aynı zamanda antiretroviral aktivitesi olmasına bağlı olabilir (6,7). En önemli yan etkileri: nefrotoksisite ve metabolik toksisitedir (15,79).

Sidofovir: CMV'e karşı önemli in vitro antiviral aktiviteye sahip bir sitozin nükleotid analoğudur. Bir viral enzim tarafından fosforilasyona ihtiyaç duymaz. Viral DNA polimerazın aktif inhibitörü olan sidofovir trifosfata sellüler enzimler tarafından dönüştürülür. Sidofovir trifosfat hücre içinde uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir ve sadece haftada bir kez verilir. Gansiklovir veya foskarnet tedavisine yanıt vermeyen CMV retinitli hastaların tedavisinde sidofovir önerilmektedir(15,79). Sağlıklı kişilerde CMV enfeksiyonunda antiviral tedavi önerilmemektedir. Konjenital enfeksiyonda ise antiviral tedavi klinik olarak etkisiz olsa bile virüs salgılanmasını azaltması açısından yararlı olabilir. Transplantasyon yapılan hastaların CMV enfeksiyonu profilaksisinde ve gelişen CMV hastalıklarının tedavisinde gansiklovir en sık kullanılan antiviral ajandır (7,15,79).

Antiviral Profilaksi: Kemik iliği ve böbrek transplant alıcılarında profilaktik olarak antiviral ilaçlar kullanılmaktadır. Asiklovir in vitro olarak CMV'e etkili olmamasına karşın profilakside kullanılmış, ve başarılı bulunmuştur. Fakat başarı birlikte kullanılan hiperimmünoglobüline de bağlı olabilir. Bu nedenle asiklovir rutin profilakside önerilmemektedir. Buna karşın gansiklovir profilaksisi, kemik iliği, karaciğer, kalp ve akciğer transplant alıcılarındaki enfeksiyon insidansını belirgin olarak düşürmektedir. Transplantasyon sonrası ilk birkaç ay gansiklovir kullanılması yararlı bulunmuştur. Foskarnet ise renal toksisitesi nedeni ile profilakside sınırlı olgularda kullanılabilmektedir ve gansiklovir direnci halinde tedavi seçeneği olarak saklanmaktadır (6,7). Premptif tedavi yaklaşımında gansiklovir tedavisi, duyarlı laboratuar testleri ile CMV enfeksiyonu tanısı olan hastalara uygulanmaktadır. İmmün yetmezlikli hastalarda; özellikle CMV retiniti için uzun süre gansiklovir tedavisi alan AIDS'li hastalarda, CMV'nin gansiklovire direnç geliştirdiği bildirilmiştir. Gansiklovire dirençli klinik izolatlar ayrıca; kemik iliği ve solid organ transplant alıcılarından ve kronik lenfositik lösemili bir hastadan da elde edilmiştir. Gansiklovire dirençli CMV enfeksiyonlarında foskarnet alternatif tedavi olmasına rağmen; tek başına veya gansiklovir direnci ile birlikte kombine olarak foskarnet dirençli klinik CMV izolatları bildirilmiştir. CMV'de gansiklovire direnç mekanizmaları; ilaç fosforilasyonunda eksikliğe neden olan UL97 fosfotransferaz geninin katalitik bölgesindeki mutasyonlan ve UL54 viral DNA polimeraz geninde meydana gelen mutasyonları içermektedir. Son değişiklik ayrıca foskarnete direnç gelişiminden de sorumludurlar (80). UL54 geninde mutasyonları olan, gansiklovire dirençli CMV izolatları genel olarak sidofovire karşı da çapraz-dirençlidir ve gansiklovir, foskarnet ve sidofovire dirençli örnekler de bildirilmiştir. Antiviral ilaç direncinin ortaya çıkması *in vitro* antiviral duyarlılık testlerinin kesin olarak gerekliliğini göstermiştir. Antiviral direnç mekanizmalarının tanımlanmasında, klinik uygulamada hangi ilaca karşı CMV mutantlarının ortaya çıkma sıklığının belirlenmesinde, tedavi başarısızlığının öngörülmesinde ve diğer antiviral ajanlara karşı çapraz direncin tanımlanmasında, en uygun alternatif tedavinin belirlenmesinde ve yeni antiviral ajanlar değerlendirileceği zaman, ilaç direncinin laboratuvar tarafından doğrulanması gereklidir. CMV'nin antiviral ajanlara duyarlılığını test etmek için birçok fenotipik ve genotipik test tanımlanmıştır (81,82). Fenotipik testler çeşitli konsantrasyonlarda antiviral ilaç içeren hücre kültürlerinde CMV'nin üreme yeteneğini ölçer ve bu testler için genellikle test başlamadan önce, virüsün hücre

kültüründe pasajı ve izolasyonu gereklidir. Virüs replikasyonuna karşı antiviral ajanın aktivitesi; viral plak oluşumunun inhibisyonu ya da virüs tarafından oluşturulan CPE'nin (viral antijen yapımında, enzim aktivitelerinde ya da toplam virüs miktarında azalma ve viral nükleik asit sentezinde gerileme) de içinde olduğu birçok yöntemden biri ile ölçülür. Her bir yöntemde sonuçlar, virüs üremesinin %50'sini inhibe eden ilaç konsantrasyonu olarak ifade edilir.

Genotipik testler gansiklovir ve/veya foskarnet direnci ile ilişkili CMV UL97 fosfotransferaz geni ve UL54 DNA polimeraz genindeki mutasyonlar saptanmaktadır (83,84). Genotipik testlerde normal olarak spesifik viral genleri amplifiye etmek ve amplifiye ürünlerin direkt sekansını yapmak için PCR kullanılmaktadır. Bazı testler seçilmiş mutasyonları saptamak için spesifik problar veya verilen viral ilaca karşı viral dirençle ilişkisi olduğu bilinen viral genomdaki değişiklikleri saptamak için amplifiye ürünlerin restriksiyon endonükleaz analizi yöntemini kullanırlar.

Fenotipik testler herhangi bir antiviral ilaca karşı CMV duyarlılığını direkt ölçen testler olarak belirli avantajlar sunmaktadırlar ve viral replikasyonu inhibe etmek için gerekli olan ilaç konsantrasyonu ile ilgili bilgi vermektedirler. Bununla birlikte; CMV için yapılan fenotipik testler kullanışsız, yoğun iş gücü gerektiren pahalı testlerdir ve uzun sürede sonuç verirler. Genotipik testler çok sayıda CMV örneğinin hızlı ve etkin biçimde analizini sağlarlar ve fenotipik testlerden daha kısa sürede ilaç direncinin varlığını saptarlar. Günümüzdeki genotipik testler, bununla birlikte, sadece bilinen ilaç direnci mutasyonlarını saptamaktadırlar ve ilaçla ilgili olmayan mutasyonların varlığı sonuçları karıştırabilmektedir. Fenotipik testler, antiviral dirence yol açan yeni mutasyonları olan virüsleri tanımlamak için hala gereklidirler. Fenotipik ve genotipik testlerin baştan sona karmaşık olmaları nedeni ile bu yöntemlerden herhangi biri klinik laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmamaktadır (9).

2.1.10. Korunma

Aktif bağışıklama (Aşılar): CMV aşıları içinde en eski olanları canlı attenüe virüs aşılarıdır. Glikoprotein aşıları, CMV geni eksprese eden canarypox rekombinantları, DNA plazmid aşılan gibi pek çok yeni aday aşılar gündemdedir (85).

Canlı attenüe aşıların en iyi bilineni Towne aşısıdır. Towne aşısı insan fibroblastlarında pasajlanarak elde edilen CMV aşısıdır. Yapılan denemelerde bu

aşıya karşı hücresel ve sıvısal yanıt elde edilmesine rağmen CMV ile enfeksiyona karşı koruyucu olmadığı görülmüştür (6,7,85).

Glikoprotein aşıları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. gB proteinini içeren aşı, hücresel ve nötralizan antikor yanıtına neden olmaktadır (6,7).

Canarypox virüsü ile hazırlanan rekombinant aşılarda pp65 matriks antijeni ve yapısal olmayan en erken antijen kullanılmıştır. Bu antijenlerle yapılan çalışmalar antikor ve CTL yanıtının uyarılabildiğini göstermiştir (6,11,85).

DNA plazmid aşılarından ilk deneneni pp65'i kodlayan plazmid aşısıdır. Aşının etkinliği ve özellikle güvenilirliği ile ilgili çalışmalara gereksinim vardır (85).

Pasif bağışıklama (CMV Hiperimmünglobulin): Pasif immünoprofilaksi ile özellikle transplantasyonda risk grubunu oluşturan vericinin seropozitif, alıcının seronegatif olduğu grupta olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu grupta gelişen CMV enfeksiyonu engellenememekte fakat asıl sorunu oluşturan CMV hastalığı insidansı azalmaktadır. Allojenik kemik iliği transplantasyonu (AKİT) yapılan olgularda pasif immünoprofilaksinin immünomodülatör etkisi ile GVHH'nı engellediği ileri sürülmüştür (7,8, 86).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarında yapıldı.

3.1. HASTALAR VE ÖRNEKLER

Ocak 2009 ile Temmuz 2010 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerinin poliklinik ve servislerinde takip edilen hastalara ait örneklerden CMV DNA'sı pozitif bulunanlar çalışmaya alındı. Çalışmaya 53 farklı hastadan elde edilen toplam 74 örnek dahil edildi. Örnekler plazma, nazotrakeal aspirat (NTA), bronkoalveoler lavaj (BAL) idi. Hastaların tanıları ve tedavi prosedürleri hasta dosyalarından temin edildi.

3.2. CMV GENOTİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI

CMV genotiplerinin araştırılması pyrosekans yöntemi ile (Pyromark Qiagen-Almanya) yapıldı.

CMV-F ve CMV-R2 ile elde edilen PCR ürünü uzunluğu: 182 bp

Referans suşlar:

gB1 – C330 (Genbank id: M60930)

gB2 – C336 (Genbank id: M60931)

gB3 – C326 (Genbank id: M60928)

gB4 – C128 (Genbank id: M60924)

Çalışma 5 kısımda tamamlandı.

1. Örneklerden DNA izolasyonu otomatize sistem (EZ1 Advanced Qiagen-Almanya) ile yapıldı.
2. Biotin işaretli primerler kullanılarak PCR yöntemi ile hedef bölge çoğaltıldı.
3. PCR ürünleri ile Streptavidin Sepharose bilyelerini birleştirilip saflaştırma işlemi (QIAGEN PyroMark^{TM} Q24) yapıldı. Saflaştırılan örnekler denatüre edildi. Elde edilen tek sarmal DNA ile sekans primerinin bağlanma işlemi gerçekleştirildi.
4. Pyrosekans ile dizi analizi yapıldı.
5. Tablo 3'de belirtilen diziler baz alınarak CMV genotiplendirme yapıldı.

3.2.1.Otomatize Cihazla DNA İzolasyonu

Bütün örnekler EZ1 Advanced cihazı (Qiagen-Almanya) kullanılarak üretici firmanın ön gördüğü EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen-Almanya) test kiti prosedürüne uygun olarak çalışıldı.

Kit içeriği:

Reaktif kartuşları

Tek kullanımlık "tip holders"

Tek kullanımlık filtreli uçlar

Örnek tüpleri (2 ml)

Elüsyon tüpleri(1.5ml

Carrier RNA

Buffer AVE

DNA izolasyon prosedürü:

1. Birinci diziye Elüsyon tüpleri (1.5ml) yerleştirildi.
2. İkinci diziye Fitreli uç içeren tip holder yerleştirildi.
3. Buffer AVE'den 49 µl internal kontroldan 7.2 µl ve carrier RNA'dan 3.8 µl içeren toplam 60 µl karışım hazırlandı ve üçüncü diziye yerleştirildi.
4. Dördüncü diziye örnek tüpleri yerleştirildi ve her örnekten 400µl eklendi. Plazma ve BAL örneklerinden direkt 400 µl örnek alınırken NTA örnekleri %0,9 NaCl içine N- acetilsistein ilave edilmiş NAC Buffer ile pipetaj işleminden sonra 400µl alındı.
5. Reaktif kartujlar, kartuj raflarına yerleştirildi. Sıcak bloklara 2 ml'lik tüpler yerleştirildi.
6. Cihaz çalıştırıldı ve izolasyon işlemi başladı.
7. İzolasyon işleminden sonra 1. dizideki elüsyon tüplerinde 60 µl'lik DNA izolatı elde edildi. İzole edilen DNA'lar çalışma gününe kadar -20°C'de en fazla iki gün saklandı.

3.2.2. CMV DNA amplifikasyonu

PCR ile CMV'nin gB proteinde 182 bp bölge çoğaltıldı.

CMV DNA amplifikasyon işlemi için hazırlanan karışım Tablo 1'de gösterildi.

Tablo 1. PCR reaksiyon kompozisyonu

Karışım	**Toplam µl**
Master mix(10XTaq buffer,MgCl2,dNTP,Taq polimeraz)	12.5 µl
CMV-primer 1	1 µl
CMV- primer 2	1 µl
H2O	5.5 µl
TOPLAM	**20 µl**

Her bir örnek için 20 µl hazırlanan karışım ependorf tüplerine dağıtıldı. Daha sonra DNA izolatlarından 5µl tüplere eklendi. Pozitif ve negatif kontrollerden de 5'er µl tüplere eklendi. Negatif kontrol için deiyonize su kullanıldı.Tüplerin üzerleri sıkıca kapatıldı ve amplifikasyon işlemi ABI (Applied Biosystems 2720 Thermalcycler, Amerika) cihazında gerçekleşti. Amplifikasyon işlemi tablo 2' de belirtildiği şekilde gerçekleşti.

Tablo 2. PCR protokolü

Aktivasyon basamağı	95°C	15 dakika
3 aşamalı döngü:		
Denatürasyon	94°C	30 saniye
Bağlanma	55°C	30 saniye
Uzama	72°C	30 saniye
Döngü sayısı: 45		
Son uzama	72°C	10 dakika
	4 °C	∞

3.2.3. PCR Ürünlerinin Streptavidin Sepharose Bilyelerine Yapıştırılması, Saflaştırılması Ve Sekans Primerinin Tek Sarmal DNA'ya Bağlanması:

Prosedür:

1. Streptavidin Sepharose bilyelerini içeren şişeyi nazik bir şekilde çalkalayarak homojen bir solüsyon elde edildi.
2. Streptavidin Sepharose bilye karışımı hazırlandı. Karışım miktarı bir örnek için Streptavidin Sepharose bilyelerden 2 µl , Binding Buffer 40 µl, Ultrapure H_2O 28 µl olmak üzere toplam 70 µl idi.
3. PCR plağındaki kuyucuklara 70µl karışım eklendi. Karışım üzerine 10'ar µl PCR ürününden pipetlendi.
4. PCR plaklarının kapağı sızdırma olmayacak şekilde kapatıldı.

5. Plak birkaç kere ters-yüz edildikten sonra çalkalayıcıya koyuldu ve oda sıcaklığında 1400 rpm'de 5-10 dakika çalkalandı.
6. El ünitesi PCR plağının dikkatlice üstüne getirilerek tüplerin içine daldırıldı ve 15 saniye kadar tutarak bilyeler yakalattırıldı. Sepharose bilyeler çok çabuk çöktüğünden PCR plağının çalkalanması bittikten sonraki 1 dakika içerisinde bu işlemi yapmaya dikkat edildi. Eğer 1 dakikadan daha fazla geçmişse, bilyeleri yakalamadan önce plak 1 dakika kadar çalkalayıcıda tuttuldu.
7. El ünitesi %70 etanol kabına daldırılarak 5 saniye bekletildi.
8. El ünitesi "Denaturation Solution" içeren kaba daldırarak 5 saniye bekletildi. Böylelikle çift sarmal DNA ürünleri tek sarmal haline geldi.
9. El ünitesi yıkama solüsyonu içeren kaba daldırılarak 10 saniye bekletildi.
10. El ünitesi dikey biçimde 90°'yi geçkin bir açıyla 5 saniye tutularak filtreli problardan sıvının uzaklaştırılması sağlandı.
11. Q24 plağındaki her bir kuyucuğa 2.5µl sekans primeri ve 22.5µl "anneling buffer" pipetlendi ve Q24 plağı vakum çalışma alanındaki ilgili yere bırakıldı.
12. El ünitesini Q24 plağı üzerine getirip orda tutuldu ve ünitenin üstündeki vakum anahtarı ve vakum pompasının düğmesi kapatıldı.
13. El ünitesinin problarını Q24 plak kuyucuklarına daldırıp hafifçe sallayarak bilyeler sekans primerini içeren buffer'a bırakıldı.
14. El ünitesi su içeren kaba daldırılarak 10 saniye çalkalandı.
15. El ünitesi su içeren diğer kaba daldırılarak vakum pompası ve ünitenin vakum anahtarını açıldı. Bu şekilde kaptaki 70 ml su çektirildi.
16. El ünitesi dikey biçimde 90°'yi geçkin bir açıyla 5 saniye tutularak filtreli problardan sıvının uzaklaştırılması sağlandı.
17. El ünitesinin vakum anahtarının ve vakum pompasının düğmesi kapatıldı ve el ünitesi yerine yerleştirildi.

18. Q24 plağı önceden 80°C'ye getirilmiş plak taşıyıcısı üzerine yerleştirilip 80°C'de 2 dakika tutuldu. Bu aşamada sekans primeri ile tek sarmal PCR ürününün bağlanması gerçekleşti.
19. Q24 plağı plak taşıyıcısı üzerinden kaldırıldı ve oda sıcaklığında en az 5 dakika bekletildi.

3.2.4. Dizi analizi:

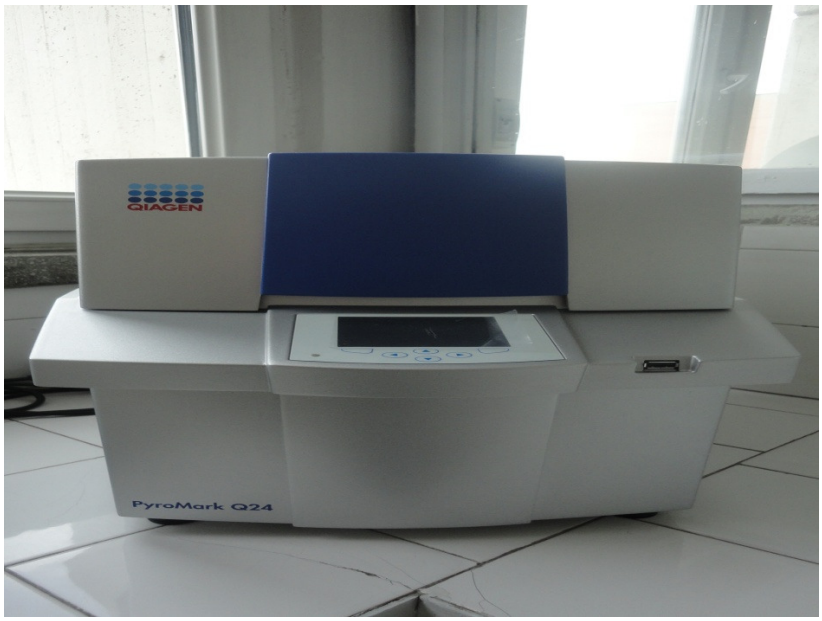
Bilgisayarda çalışma dosyaları hazırlandı.

Çalışma Dosyalarının Hazırlanması Prosedürü:

1. CMV genotiplendirme pyrosekans kitinin ilk kullanımında, çalışma dosyalarının hazırlanması gereklidir. Sonraki kullanımlarda ilk kullanımda hazırlanmış olan çalışma dosyaları kullanıldı.
2. Pyromark Q24 software araç çubuğunda "New SQA Assay" 'i seçildi ve

"Dispensation order" kısmına aşağıdaki DNA dizilimi yazıldı. **"ATCAGCATCAGTCGTTGATCATCTACTGCAGTAGTAGCA"**

3.Bilgisayara çalışma dosyası kaydedildi.



Şekil 5. Pyromark Q24 Cihazı

3.2.5.Pyromark Cihazının Çalıştırılması

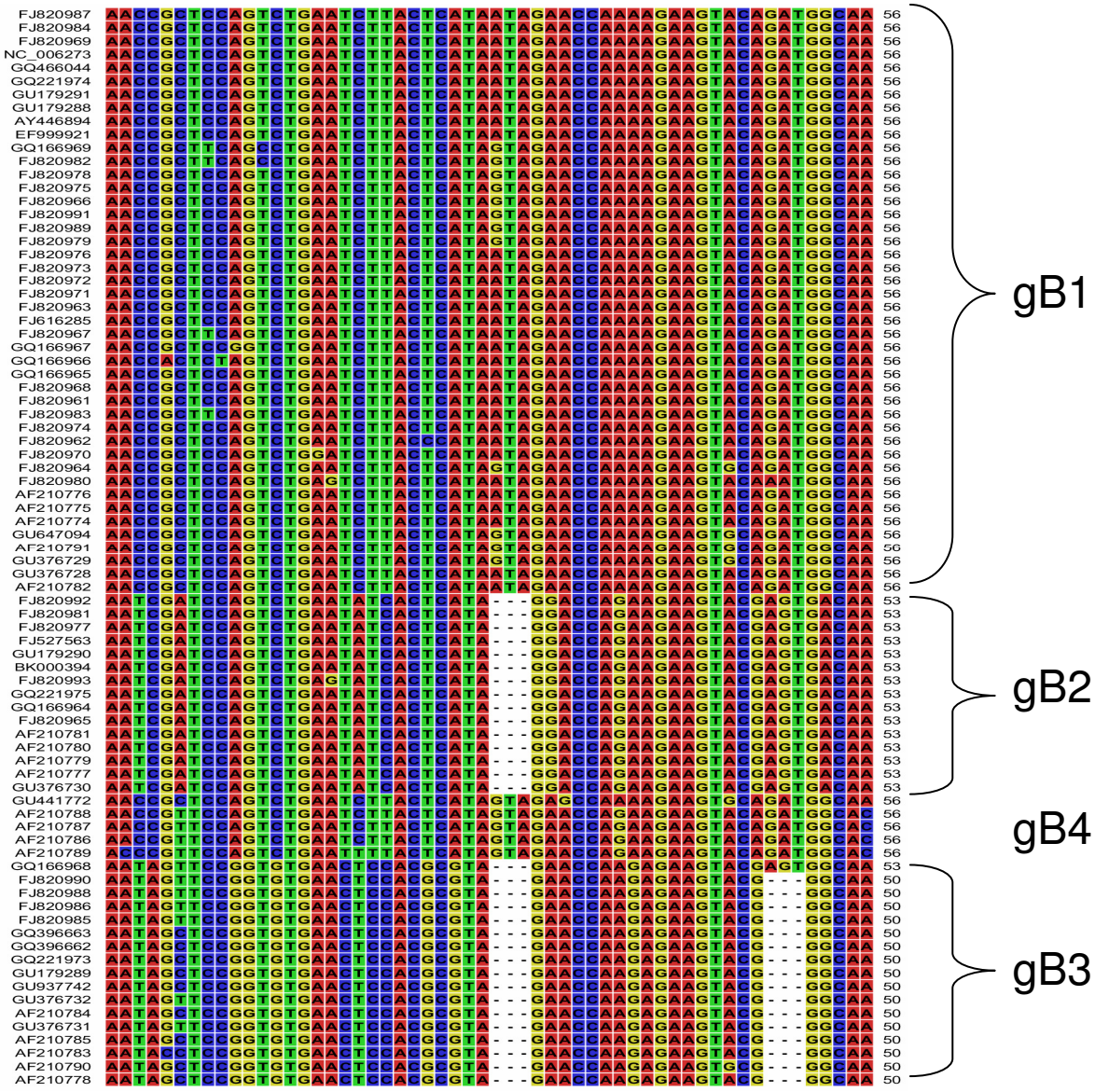
1. Nükleotidler enzim ve substrat oda ısında bekletildi.
2. Hazırlanan çalışma dosyasındaki protokole uygun olarak "Pre Run Information Report"da yazan miktarlardaki nükleotidler, enzim ve substrat kartuşa yerleştirildi.
3. Kartuş makineye yerleştirildi.
4. Plak tutacağı açıldı, Q24 plağı bloğa yerleştirip plak tutacağı tekrar kapatıldı ve çalışma programı başlatıldı.
5. Çalışma programı yaklaşık 18 dakika sürdü. Çalışma bittikten sonra cihaz kapatıldı.
6. Plak tutacağı açılarak Q24 plağı bloktan çıkarıldı.

3.2.6.Genotiplerin belirlenmesi

Prosedür:

1) Çalışma dosyasını analiz etmek için sağ üst köşedeki "Analyze" bölümünden "Analyze all wells" veya "Analyze selected wells" kısmı seçildi.
2) Analiz raporu oluşturmak için software menüsünden "Reports" bölümünden "SQA Full Report"u seçildi ve örneklerin pyrogramları ekranda gözlendi.
3) Örneklerin pyrogramları ve DNA dizileri tablo 3'de belirtilen şablonla karşılaştırılarak CMV genotipleri belirlendi.

Tablo3: CMV Sekans Tablosu



4. BULGULAR

Hastalar CMV PCR pozitifliği saptananlar arasından rastgele seçildi. Çalışmaya 53 hastadan elde edilen 74 örnek dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen örneklerin 48'i plasma, 4'ü BAL biri NTA idi. Her hastanın bir veya birden fazla klinik örneği çalışmaya alındı. Hastaların %84'ünü erişkin hasta, %16'sını pediatrik yaş grubu oluşturmaktadır. Klinik örneklerdeki CMV DNA varlığı gerçek zamanlı PCR yöntemi ile (Qiagen-Almanya) araştırıldı. Gerçek zamanlı PCR yönteminin ölçüm aralığı 150-15.000.000 kopya/ml ve hasasiyeti 36 kopya/ml idi. Örneklerin CMV viral yükleri < 150 kopya/ml ile $9,22x10^5$ kopya/ml arasında idi.

Çalışmaya dahil edilen klinik örneklerin servis ve polikliniklere göre dağılımı Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Hastaların klinik servislere ve örneklere göre dağılımı (n:53)

	Plasma	**BAL**	**NTA**
KİT (Kemik İliği Transplantasyon Merkezi)	29	1	
Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi	1		
Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	1		1
Pediatri Hematoloji- Onkoloji Servisi	2	1	
Genel Cerrahi Servisi	2		
Pediatri Süt Çocuğu Servisi	3		
Pediatri Gastroenteroloji Polikliniği	1		
Yenidoğan Polikliniği	1		
Hematoloji- Onkoloji Servisi	6	1	
Büyük Acil Polikliniği		1	
Pediatri İntaniye Servisi	1		
Pediatrik Nöroloji Servisi	1		
TOPLAM	**48**	**4**	**1**

Hastaların 12'si allogenik kemik iliği tranplantasyon alıcısı (AKİT), 2'si otolog kemik iliği transplant alıcısı (OKİT) biri karaciğer transplantasyon alıcısı biri ise renal transplantasyon alıcısı idi (Tablo.5).

Tablo 5. Hastaların özellikleri (n:53)

Yaş dağılımı	SAYI	%	0-10	10-20	20-40	40-60	60-80	AKİT	OKİT	KC TRANS.	* RENAL TRANS.	DİĞER HASTALIKLAR
Erkek	34	64	6	3	13	7	5	10	2	1	1	20
Kadın	19	36	3	0	8	6	2	2				17
Toplam	53	100	9	3	21	13	7	12	2	1	1	37
%	100	100	%16	%6	%40	%25	%13	%23	%4	%2	%2	%69

*Renal transplantasyonlu hasta HIV pozitif idi.

AKİT grubu hastaların tanıları; Kronik Myeloid Lösemili (KML) 2 hasta, , Akut Myeloid Lösemili (AML) 3 hasta , Akut Lenfoblastik Lösemili (ALL) 3 hasta ,T Cell Lenfoma , Akut Myelofibrozis, Myelodisplastik Anemi ve Diffüz Büyük Hücreli Lenfoma (DBBL) olmak üzere birer hastadan oluşmaktadır. OKİT'lerin 2'sinide Multibl Myeloma (MM) oluşturmaktadır. Diğer hastalıklar dediğimiz grubun tanılarını da ; Kronik Myeloid Lösemi (KML) , Akut Myeloid Lösemi (AML), Diffüz Büyük Hücreli Lenfoma (DBBL), Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL),Multibl Myeloma (MM), Kronik Lenfoblastık Lösemi (KLL), T Cell Lenfoma,BurkitLenfoma,Non-HodginLenfoma (NHL), Myelodisplastik anemi, Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY), Akut Böbrek Yetmezliği (ABY), Akut Bifenotipik Lösemi,Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı(KOAH)+ Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY),KOAH+Akc.MantarHastalığı,Ülseratif Kolit,Akciğer Karsinomu (Multibl metastaz), Epilepsi, MideKarsinomu, Meme Karsinomu, Nazofarenks Karsinomu, CMV Hepatiti oluşturmaktadır (Tablo 5).

Çalışmaya dahil edilen 53 hastanın 25' inde gB1 (%47), 6 'sında gB2 (%11), 10' unda gB3 (%19), 2'sinde gB4 (%4) ve 10' unda miks genotip bulundu (%19) (Tablo 6).

Tablo 6. Hastalarda CMV Genotip Dağılımı (n:53)

Genotip	**Sayı**	**%**
gB1	25	47
gB2	6	11
gB3	10	19
gB4	2	4
Miks	10	19
Toplam	53	100

Elliüç hastadan alınan 74 klinik örneğin 33'ünde gB1 (%45), 7'sinde gB2 (%9), 14'ünde gB3 (%19), 2'sinde gB4 (%4), 18'inde miks genotip bulundu (%24) (Tablo 7).

Tablo 7. Klinik örneklerde CMV genotip dağılımı (n:74)

Genotip	**Plazma**	**NTA**	**BAL**	**%**
gB1	32		1	45
gB2	7			9
gB3	12	1	1	19
gB4	1		1	3
Miks	16		2	24
Toplam	**74**			**100**

Hastaların 7'sinde ilk gelen örneklerde tek tip genotip bulunurken sonradan gelen örneklerde miks genotip bulundu. Üç hasta gB1 iken sonradan çalışılan örnekleri gB1+gB3, bir hastanın genotipi gB2 iken sonradan gelen örnekleri gB2+gB3 ve yine bir hastanın genotipi gB2 iken sonraki genotipi gB1+gB2 olarak saptandı. İlk gelen örneği gB4 olan 1 hastada daha sonradan gB2+gB4 miks genotipine rastlandı. gB3 bulunan bir diğer hastanın çalışılan daha sonraki örneklerinde gB1+gB3 bulundu. Bu 7 hastayla birlikte toplam 17 hastada miks genotip saptandı.

Tablo 8. CMV miks genotip saptanan hastalar (n:17)

Miks Genotip	**Sayı**	**%**
gB1+gB3	10	59
gB2+gB3	3	17
gB1+gB2	2	12
gB1+gB4	1	6
gB2+gB4	1	6
Toplam	**17**	**100**

Çalışmaya dahil edilen 53 hastanın 16 (%31)'sına transplantasyon yapılmıştı. Transplant alıcılarının 12'si AKİT, 2'si OKİT , biri karaciğer ve diğeride böbrek transplant alıcısı idi. Transplantasyon yapılan hastalardan CMV genotip dağılımı Tablo 9'da gösterilmektedir.

Tablo 9. CMV genotiplerin transplant hastalara göre dağılımı (n:16)

Genotip	AKİT	OKİT	KC TRANS.	RENAL TRANS.
gB1	5	-		1
gB2	2	-		
gB1+gB3	-	1		
gB1+gB2	1	-		
gB1+gB4	1	-		
gB1/ gB1+gB3*	1	1	1	
gB2/ gB1+gB2*	1	-		
gB3/ gB1+gB3*	1	-		
Toplam	12	2	1	1

***İlk gelen örneğinde tek tip genotip bulunurken diğer gelen örneğinde miks genotip saptandı.**

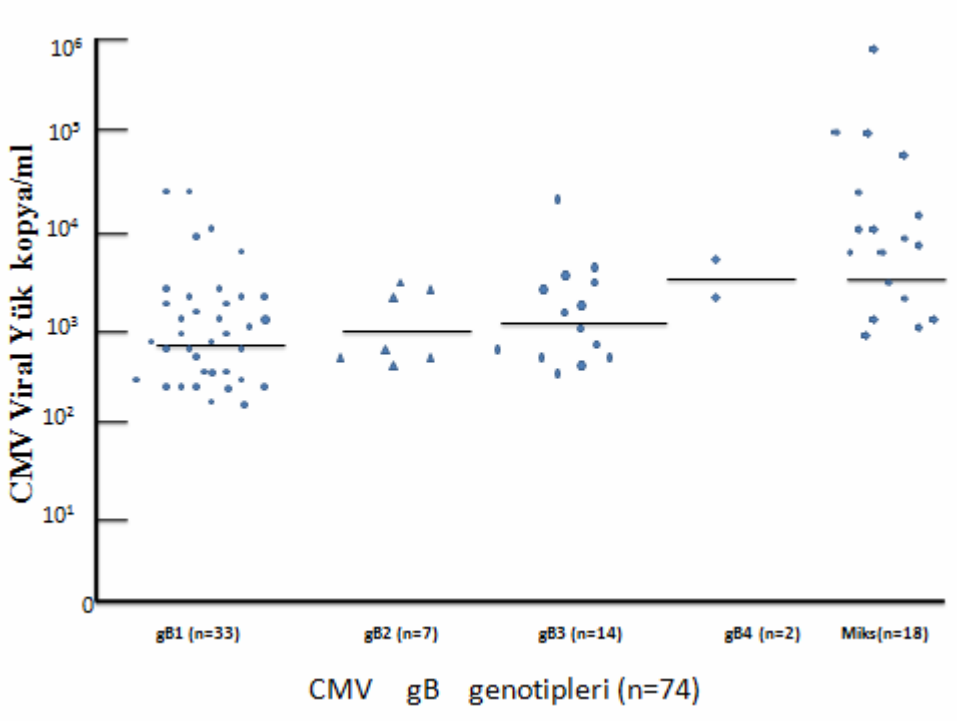
Çalışmaya dahil edilen hastalardan 11'inin öldüğü epikriz raporlarından belirlendi. Bu 11 hastanın 5 tanesi gB3, 2 tanesi gB1, biri gB2, 2 'si gB1+gB3 , biride gB4/gB2+gB4 olarak tespit edilmiştir. Hastaların klinik tanıları CMV genotipleri dağılımı Tablo 10'da gösterilmektedir.

Tablo 10. Hastaların klinik tanıları ve CMV genotip dağılımı

Hastalıklar	Sayı	gB1	gB2	gB3	gB4	Miks*
Kronik Myeloid Lösemi (KML)	5	2	1			3
Akut Myeloid Lösemi (AML)	8	4		2		3
Diffüz Büyük Hücreli Lenfoma (DBBL)	5	1	1	1	1	1
Akut Lenfoblastik Lösemi(ALL)	4	2	1	1		1
Multibl Myeloma(MM)	6	2	1	1		3
Kronik Lenfoblastık Lösemi(KLL)	1			1		
T Cell Lenfoma	1		1			1
Burkit Lenfoma	1	1				
Non-Hodgin Lenfoma(NHL)	2	1	1			
Akut Myelofibrozis	1	1				
Otoimmun Trombositopeni	1			1		
Akut Bifenotipik Lösemi	1	1				
Myelodisplastik Anemı	1			1		
Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY)	1			1		
Akut Böbrek Yetmezliği (ABY)	1	1				
Akut Bifenotipik Lösemi	1	1				
Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı(KOAH)+ Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY)	1				1	
KOAH+Akc.Mantar Enfeksiyonu	1					1
Ülseratif Kolit	1	1				
Akciğer Karsinomu(Multibl metastaz)	1					1
Epilepsi	4	3		1		
Mide Karsinomu	1	1				
Meme Karsinomu	1					1
Nazofarenks Karsinomu	1	1				1
Karaciğer Yetmezliği + Karaciğer Transplantasyonu	1	1				1
HIV+KronikBöbrekYetmezliği+RenalTransplantasyonu	1	1				
CMV Hepatiti	1	1				
TOPLAM	**53**	**25**	**6**	**10**	**2**	**17**

*Miks genotip saptanan örneklerin bazılarında ilk gelen örneğinde tek tip genotip bulunurken diğer gelen örneğinde miks genotip saptandı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların CMV viral yükleri ve CMV genotip dağılımı şekil 6'da gösterilmektedir. CMV miks genotip saptanan örneklerin viral yüklerinin 10^3-10^5 kopya/ml arasında olduğu gözlenirken, tek tip genotip saptananların örneklerde viral yüklerin 10^2-10^3 kopya/ml arasında yoğunlaştığı gözlendi.



Şekil 6. CMV gB genotip gruplarının viral yük dağılımı

5. TARTIŞMA

CMV, bağışıklık sistemi normal bireylerde genellikle belirtisiz enfeksiyonlara yol açarken, solid organ ve kemik iliği nakli yapılanlar ve AIDS'li olgular gibi immun yetmezliği olanlarda intrauterin enfeksiyon sonrası yenidoğanda önemli morbidite ve mortaliteye neden olan bir etkendir (15,87,88). CMV'nin erken saptanması, ölüm ve ciddi komplikasyonların önlenmesi ve etkili antiviral tedaviye başlanması için gereklidir (6,87). CMV enfeksiyonu tanısında serolojik testler, kültür yöntemleri, CMV antijenemi testi ve nükleik asit saptama yöntemleri uygulanmaktadır (9,87)

Doğada bulunmakta olan CMV suşlarında bugüne kadar dört farklı gB genotipi (gBl-4) tarif edilmiştir (5). Bununla birlikte yapılan çalışmalarda gB 5.-6.-7. genotipinin olduğu gösterilmiştir (6). Glikoprotein B dışında gH (UL75) , gN(UL73) , gM(UL100) , UL4 ,UL144 ve "short tandem repeats" (STR) ile de genotipleme çalışmaları yapılmıştır (7,8,16-19). CMV genotiplerinin belirlenmesi için DNA dizi analizi (sekanslama), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) "single-strand conformation polymorphism" analizi (SSCPA), "heteroduplex motility" analizi (HMA) ve multiplex PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemleri uygulanmaktadır (78).

Bazı araştırmacılar genotip ve virülans tropizm ile ilişki arayan çalışmaları değerlendirdiklerinde, CMV gibi kompleks bir virüste patogenezi açıklamak için sadece bir varyant genin sorumlu olmasının gerçekçi olmadığı sonucuna varmışlardır. Çoklu gen varyantları ve diğer bazı faktörlerin birlikteliklerinin daha detaylı olarak araştırılması gerektiği belirtilmektedir (19,22).

CMV gB'nin hücre tropizmi ve virülansla ilişkisini gösteren çalışmalar 1991 yılından beri vardır (90,91). Çalışmaların bazılarında genotiplerin hücre doku ve organ tropizmi ile ilişkisi olduğunu belirtirken bazılarında ise ilişkisi olmadığı belirtilmektedir. Bir çalışmada CMV enfeksiyonunda T hücrelerinin gB2 ve gB3 genotipleri ile enfekte oldukları gösterilmiştir (92-95).

Glikoprotein B genotiplerinin değişik klinik tablolarla ilişkisinin olduğunu veya olmadığını gösteren araştırmalar bulunmaktadır (26,89,96-99). Dieamant ve ark.(100) gB2 genotipinin CMV enfeksiyonunun reaktivasyonu ile ilişkisi olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar miks genotipli hastaların CMV hastalığının semptomlarını göstermediğini belirtmişlerdir.

Fries ve ark. (101) KİT alıcılarında CMV hastalığının gB1 ile enfekte olgularda diğer genotiplerle enfekte olgulara kıyasla daha selim seyirli olduğunu bildirmişlerdir. Aynı merkezde yapılan başka bir çalışmada KİT alıcılarında genotip 3 ve 4 enfeksiyonunun myelosüprese olgularda mortalite ile ilişkisi gösterilmiştir (102). Bazı araştırmacılar renal transplantasyon alıcılarında CMV hastalığı/enfeksiyonu ve akut rejeksiyon ile genotipler arasında bir ilişki bulamamışlardır (99,103,104). Diger çalışmalarda ise KİT alıcılarında ve HIV enfekte grupta CMV gB genotip 2 ve 3 daha virülan bulunmuş ve transplantasyon alıcılarında genotip 4'e daha az rastlanmıştır (26,89,101,105). Değişik ülkelerde konjenital CMV enfeksiyonu ile ilgili gB genotip çalışmalarında genotip 1 dominant olarak saptanmıştır (26,89,106-108).

Roubalova K. ve ark.(109) CMV genotiplerini araştırdığı bir çalışmada 53 AKİT hastasında CMV gB1, gB2, gB3, ve gB4 genotiplerinin sırasıyla %30, %17, %26 ve %4 oranında bulunduğunu ve bir hastada atipik gB genotip tespit edildiğini bildirdiler. Kemik iliği nakli yapılan 281 hastada CMV genotiplerinin araştırıldığı başka bir çalışmada araştırmacılar gB1'i % 48.4, gB2'yi % 16.4, gB3'ü % 24.6 , gB4'ü % 8.2 ve miks genotipi %2.5 oranında bulmuşlardır (102). Woo ve ark.(26) 33 kemik iliği transplant alıcısında CMV genotiplerini araştırdıkları çalışmada 8'inde gB1 (%25), 14'ünde gB2 (%42), 6'sında gB3 (%18), 2'sinde gB4 (%6) ve 3 hastada miks genotip (%9) bulmuşlardır. Başka bir çalışmada KİT alıcıları, lösemi ve lenfoma hastalarından elde edilen 97 CMV izolatında gB1 genotipini %28.9, gB2'yi % 19.6 , gB3'ü %23 ve gB4'ü %2 oranında bulunduğu belirtilmektedir. Aynı çalışmada %25.8 oranında miks genotip bulunmuştur (110). Dieamant ve

ark.(100) CMV genotiplerini araştırdıkları çalışmada 5 KİT alıcısının birinde gB1, birinde gB2 , 3'ünde miks genotip saptamışlardır.

Çolak ve ark. (111) ülkemizde farklı hasta gruplarında CMV genotiplerini RFLP yöntemi ile araştırmışlar ve kök hücre transplantasyonu yapılanlarda gB1 genotipini %33, gB2'yi %50, gB3'ü %17; konjenital CMV enfeksiyonu olanlarda ise gB1'i %75 , gB2'yi %25 oranında bulmuşlardır. İncelenen örneklerin hiç birinde gB4 saptanmamıştır.

Bu çalışmada CMV genotipleri araştırılan 53 hastanın 14'ü KİT alıcısı idi. KİT alıcılarının 12'si AKİT 2'si OKİT idi. AKİT hastalarının 5'inde gB1 (%42) , 2'sinde gB2 (%16) 5'inde miks genotip (%42) bulundu. Miks genotip bulunan hastaların 3' ünde ilk gelen örneğinde tek tip genotip bulunurken diğer gelen örneğinde miks genotip saptandı. OKİT hastalarının birinde gB1 +gB3 ; diğerinde ise ilk örneğinde gB1, sonraki örneğinde gB1 +gB3 bulundu. KİT alıcılarında CMV genotiplerinin araştırıldığı çalışmalar değerlendirildiğinde gB1 genotipinin diğerlerine kıyasla daha sık görüldüğü olduğu anlaşılmaktadır. Çalışmamızda gB1 genotipi yüksek oranda bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda KİT hastalarında miks genotiplerin görülme oranının oldukça yüksek olduğu göze çarpmaktadır. Bu durum Dieamant ve ark. yaptığı çalışma ile uyumludur (100).

Roubalova K. ve ark.(109) AKİT hastalarında CMV genotiplendirmesi yaptıkları çalışmada gB1 genotipi bulunan hastaların CMV viral yüklerinin düşük olduğunu belirtmektedirler. Çalışmamızda CMV gB1 genotipi bulunan KİT hastaların çoğunda CMV viral yükünün düşük olduğu gözlendi.

Torok-Storb ve ark. (102) kemik iliği nakli yapılan 281 hastada yaptığı çalışmada ALL'li 26 (%9),AML'li 52 (%18), KML'li 51 (%17) ,NHL'li 17 (%7) ,MDS'li 7 (%3,3),MM'li 2 (%0,7) ,meme kanserli 2 (%0,7) ve diğer hematolojik-onkolojik hastalıklar tanısını alan 26 (%9,3) hastada gB1 veya gB2 genotipini bulmuşlardı. Aynı çalışmada ALL 'li 13 (%5), AML'li 31 (%13) , KML'li 25 (%9) , NHL'li 6 (%2,6), MM'li 3 (%1) ve diğer hemotolojik ve onkolojik hastalık tanısı alan 13 hastada (%6) gB3 veya gB4 genotipini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda hematolojik-onkolojik hastagruplarında gB3 vegB4 genotipine kıyasla gB1 veya gB2 genotipinin fazla olduğu belirlendi ve sadece 2 hastada gB4 genotipi bulundu. Genotip görülme sıklıkları arasındaki farklılıklar CMV genotiplerinin coğrafik dağılımdaki varyasyonlardan kaynaklanabileceği kanaatine varıldı.

Sarcinella ve ark.(112) karaciğer transplant alıcılarında CMV genotiplerini araştırdıkları çalışmada 15'inde gB1 (%25.9), 16'sında gB2 (%27.6), 21'inde gB3 (%36,2), 2'sinde gB4 (%3.4) ve 4 hastada miks genotip (%6.9) bulmuşlardır. Sarcinella ve ark. karaciğer transplant alıcılarında rejeksiyon ile gB genotipleri arasında ilişki bulamamışlardır. Ancak karaciğer transplantasyonun gB1 ile enfeksiyonun greft rejeksiyonu arasında ilişki olduğunu belirten çalışmada mevcuttur (113). Çalışmamızda karaciğer transplantasyonlu bir hastanın ilk gelen örneğinde CMV genotipi gB1 iken daha sonraki örneğinde gB1+gB3 bulunmuştur.

Zhou ve ark. (114) CMV enfeksiyonu saptanan 50 solid organ transplantasyon alıcısında gB1 19/50 (38%) , gB2 9/50 (18%) , gB3 12/50 (24%) , gB4 2/50 (4%) ve miks genotip %16 olarak bulmuşlardır. Solid organ transplantasyon hastalarında CMV genotiplerinin araştırıldığı çalışmalarda gB1 ve gB3 yaygın bulunurken, gB4 ve miks enfeksiyon görülme oranının az olduğu belirtilmektedir (114,115). Karaciğer transplant hastalarından alınan örneklere dayanan bir çalışmada örneklerin %87'si (53/61) sadece tek tip gB genotipi içeriyordu. Örneklerin geri kalan %13'ü iki genotip içeriyordu.(116).

Transplant hastaları ve AIDS hastaları ile yapılan bir çalışmada örnekler farklı dokulardan alındığında farklı gB genotiplerinin görüldüğü belirtilmektedir (117). Çalışmamızda ise AML'li AKİT yapılan hastada ilk çalışılan plazma örneğinde gB3 bulunurken daha sonra gelen BAL örneğinde gB1+gB3 bulundu.

Dieamant ve ark. (100) böbrek transplant alıcısının 8'inde gB1, 4 hastada gB2, 2 hastada gB1+gB2 , 1 hastada gB1+ gB4 bulmuşlardır.

Carraro ve Granato (118) yapmış oldukları çalışmada; renal transplant hastalarının reenfeksiyonun aynı gB ile değil farklı gB genotipleri ile olduğunu göstermişlerdir. gB2 40% , gB1 30% , gB3 25% ve gB4 5% oranında bulmuşlardır.

Çolak ve ark. (112) ülkemizde farklı hasta gruplarında CMV genotiplerini belirledikleri çalışmada; solid organ transplantasyon yapılanlarda gB1'i %36, gB2'yi %21, gB3'ü %43 oranında bulmuşlardır. Çalışmamızda da karaciğer tranplant alıcısında gB1/gB1+gB3 genotipi bulunurken böbrek transplant alıcısında ise gB1 bulundu.

Shepp ve ark.(120) HIV enfekte olgularda retinit ile genotip 2 arasında bir ilişkiden yola çıkarak bu genotipin retinopatik özelliğinin çalışılması gerektiğini

düşünmüşlerdir. Cinsel ilişki sonucu HIV ile enfekte olan eşcinsel erkeklerde genotip 2'nin sık olduğu gösterilmiştir. Buna bağlı olarak retinit ile genotip 2 arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde bu verinin dikkate alınması gerektiğini bildiren araştırmacılar olmuştur (56,89,93,121,122). CMV retiniti olgularında oküler sıvıda yapılan çalışmalar da genotip 2 ile retinit arasındaki ilişkiyi desteklememektedir (96,97). Rasmussen ve ark. (117) yine HIV infekte olgularda farklı dokulardan alınan örneklerde farklı genotipler saptamışlardır. Aynı çalışmada $CD4^+$ hücre sayisi < 100 /mm3 olanlarda, semende, genotip 4 daha sık saptanmıştır (117). Koenfeksiyonlar HIV enfekte olgularda daha sık görülmektedir (122,123). Sheep ve ark.(120),AİDS'li hastalarda gB 2 genotipi kaynaklı vireminin, diğer genotiplerden kaynaklanan viremi olgularına oranla retinit ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Ancak bu bulgu, AİDS hastalarında CMV varlığında ve yokluğunda retinitit durumunu inceleyen ikinci bir çalışma ile desteklenmemiştir(113). Çalışmamızda 53 hastanın birinin tanısı HIV idi. Aynı zamanda KBY nedeniyle böbrek transplantasyonu yapılan hastanın genotiplendirmesi gB1 olarak saptandı. Chandler ve ark.(123) zührevi hastalıklar kliniğine başvuran her 8 kadından 4'ünün CMV'nin yeni bir türü ile enfekte olduğunu rapor etmişlerdir. Bale ve ark.(17) gündüz bakım merkezlerine başvuran 37 çocuğun seri örneklerini incelemişler ve %19'unda birden fazla CMV türü ile enfeksiyon bulgusuna rastlamışlardır. Çalışmamızda % 24 oranında miks genotip bulundu. Miks genotip bulunan 17 hastanın 7 'sinde ilk örneğinde tek tip genotip bulunurken sonra gelen örneğinde miks genotip saptandı. Bu durumun farklı genotipteki CMV ile reenfeksiyon olabileceği kanatine varıldı.

Novak ve ark. (116) yaptıkları çalışmada, gN genotiplerini saptamak için RFLP ve çoğaltılmış gN ürünün klonlanmasının ardından dizi analizi yapmışlardır. Aynı araştırmacılar klonlama metodunun eklenmesinin bir örnekte bulunan farklı genomik varyantları ayırmadaki tecrübeyi geliştirmiş olduğu kanaatine varmışlardır. Ayrıca araştırmacılar çalışılan popülasyon ve örneklerin coğrafik orijini gibi ilave faktörler, çalışmalarının daha önceden yayınlanan çalışmalar arasındaki farklılığı açıklayabileceğini belirtmektedir.CMV gB genotiplerinin RFLP ile tanımlanması, "restriction" fragment band paterninin açıkça görülebilmesine bağlıdır ve bu yüzden test edilen örneklerdeki DNA miktarı önemlidir. Bir örnekte mevcut olan çoklu gB genomik varyantları kolaylıkla görülemeyebilir çünkü jel elektroforezi üzerindeki fragmanların yoğunluğu tip-spesifik DNA'nın miktarına ve oranına dayanır. Ayrıca,

üst-üste gelme ve bazende bant boyutundaki dakika farklılıklarından dolayı kesin genotip identifikasyonu için gerekli olan tüm bantların uygun bir şekilde tanımlanması zor olabilir. Yüksek-konsantrasyonlu agaroz jel elektroforezinde bile "restriction" bölgesi tek bir nükleotid değişikliğinden etkilenebilir , bu doğru genotipi tanımlamayı zorlaştırır. Öte yandan, "restriction" bölgesindeki böyle bir değişikliğin genotip tayinini etkilemesi olası değildir, çünkü genotiplerin gruplanması çoklu nükleotid değişikliklerine dayanır. Klonlama ve sekans analiz yöntemleri gB genotip sayısını belirlemede en doğru yöntemlerdir, çünkü örnekte bulunan tip-spesifik DNA'nın rölatif miktarı tarafından sınırlandırılmaz. Diğer taraftan, klonlama ve sekans analizi yöntemlerinin, bir örnekteki çoklu türleri saptamada eksiklikleri vardır. Bunlar örneklerdeki CMV DNA'sını çoğaltmak için kullanılan PCR'ın duyarlılık ve özgüllüğü ile ilişkilendirilebilir (116).

CMV genotip ile ilgili çalışmalarda ençok RFLP ve dizi analizi yöntemleri uygulandığı görülmektedir. Görzer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Ultra-deep pyrosekans (UDPS) yöntemini uygulamışlardır (124). Literatür araştırıldığında yaptığımız çalışmanın pyrosekans yöntemi ile pyromark sistemde yapılan ilk çalışma olduğu belirlendi.

Torok ve ark.(102) yaptıkları çalışmada meme kanserli 2 hastanın genotipini gB1 ve gB2 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda ; nazofarenks karsinomlu hasta önce tek tip genotip gB1 daha sonra gB1+gB3 ,meme karsinomlu hasta gB1+gB3, akciğer karsinomlu gB1+gB3,mide karsinomlu hastada ise gB1 tespit edildi. Çalışmamızda 37 lösemi ve lenfoma hastasının 15'inde (%40) gB1 saptanması, 4 epilepsi hastasının 3'ünde gB1 görülmesi , ülseratif kolitli bir hastanın genotiplendirmesinin gB1 olması, 4 karsinomlu hastanın birinin gB1, diğer 3 'nün miks genotip içinde gB1'in bulunması nedeni ile; bu hastalıklarla CMV genotip gB1 arasında bir ilişki olup olmadığının belirlenmesinin daha fazla sayıda çalışma ile desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmaya dahil edilen hastaların 17'sinde elde edilen 18 örnekte miks genotip saptandı ve hastalardan 11'nin öldüğü epikriz raporlarından belirlendi. Onbir ölen hastanın 4'ünde miks genotip saptanmıştır. Bundan dolayı miks genotip saptanan hastaların prognozunun kötü seyredebileceği kanaatine varıldı. Çalışmalarda bir hastadan farklı zamanlarda alınan klinik örneklerde CMV genotip analizinin yapılmasının miks genotip bulunma oranını artırdığı belirtilmektedir(113). Bu

çalışmada 53 hastada elde edilen 74 klinik örnekte CMV genotipleri araştırıldı ve %24 oranında miks genotip bulundu. Ayrıca bir hastada birden fazla CMV genotip analizinin yapılmasının miks genotip bulunma oranını artıracağı kanatine varıldı.

Değişik ülkelerde farklı olgularda CMV ile ilgili görülen genotip farklılıkları ve bunların doku/ hücre tropizmi, virülans, ciddi seyreden hastalıklarla ilişkileri birçok araştırmacı tarafından ele alınmasına rağmen, çalışmaların daha büyük gruplarda ve kontrollü çalışmalarla yapılması henüz netleşmeyen konulara yardımcı olacaktır. Bu konunun aydınlatılması aşılama, korunma ve antiviral profilaksi politikaları açısından da yararlı olacaktır.

6. SONUÇLAR

Sonuç olarak çalışmaya dahil edilen hastalarda en sık CMV genotip gB1 bulundu. CMV gB1'den sonra en sık görülen genotip miks genotip idi. Hematoloji-onkoloji hastalarının %46'sında gB1 saptanması , epilepsi hastalarının %75'inde gB1 saptanması ,karsinomlu hastalarda saptanan tek tip genotip ve miks genotiplerinde gB1 bulunması, nedeni ile bu hastalıklarla CMV genotip gB1 arasında ilişki olup olmadığının ileri çalışmalarla belirlenmesi gerektiği kanatine varıldı.CMV genotiplerinin belirlenmesi hastanın klinik gidişatı hakkında bilgi verebilir. Özellikle miks genotip saptanan hastaların prognozlarının daha kötü olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bir hastada birden fazla CMV genotip analizinin yapılmasının miks genotip bulunma oranını artıracağı kanatine varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. St. George K, Rowe DT, Rinaldo CR. Cytomegalovirüs, varicella-zoster virüs and Epstein-Barr virüs . In : Specter S, Hodinka RL, Young SA,(eds) Cinical Virology Manual , 3rd ed. Washington , ASM Press,2000 ; 410-49.

2. Stinski MF . Cytomegalovirus and its replication.In : Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Hirsh MS, Melnick JL , Monath TP , Roizman B.(eds) Virology 3rd ed, New York, Raven Press , 1990; 1959-80.

3. Bale JF ,Petheram SJ ,Robertson M , Murph JR , Demmler G . Human cytomegalovirus a sequence and UL144variability in strains from infected children.J. Med. Virol. 2001:65; 90-6.

4. Trincado DE, Scott GM, White PA, Hunt C, Rasmussen L, Rawlinson WD. Human cytomegalovirus strains associated with congenital and perinatal infections. J. Med. Virol. 2000; 61 : 481-7.

5. Chou SW, Dennison KM. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralizationrelated epitopes. J. Infect. Dis. 1991: 163; 1229-34.

6. Britt WJ, Alford CA. Cytomegalovirus.In:Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields Virology, Lippincott-Raven Publishers,Philadelphia 1996; 2493-2523

7. Bilgiç A .Özacar T. İnsan Sitomegalovirus. Kitabında: Ustaçelebi Ş (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.Güneş Kitabevi,Ankara 1999; 835-843.

8. Günhan C. Cytomegalovirus enfeksiyonları. Kitabında: Topçu AW, Söyletir G,Doğanay M.(eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2002, Cilt 2 , 1191-1197

9. Hodinka RL. Human Cytomegalovirus In:Murray PR , Baron EJ , Pfaller MA Tenover FC, Yolken RH, (eds). Manual of Clinical Mikrobiyology (9th ed). American Society for Mikrobiyology, Washington D.C: 2007; 1549-1563.

10. Ustaçelebi Ş.CMV ‘un Özellikleri ve epidemiyolojisi.1.Ulusal CMV Sempozyumu Tanı ve Tedavi Yaklaşımları: Sorunlar ve Çözümleri kitabında.Antalya 2001; 9-18.

11. Serter D.Cytomegalovirusu (İnsan Herpes Virusu 5).Virus,Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları kitabında.Nobel Tıp Kitapevleri 1997,s141-145.

12. Mocarsky ES.Cytomegaloviruses and their replication.In:Fields BN ,Knipe DM,Howley PM (eds).Fields Virology ,Lippincott-Roven Publishers, Philadelphia 1996 ; 2447-92.

13. O'Connor, S-, C. Taylor, L. A. Campbell, S. Epstein ve P. Libby. 2001. Potential infectious etiologies of aterosclerosis: a multifactorial perspective.Emerg. Infect. Dis. 7:780-788.

14. Razonable, R. R. ve V. C. Emery. 2004. Management ol CMV infection and disease in transplant patients. Herpes. 11:77-86.

15. Crumpacker CS.Cytomegalovirus.In:Mandel GL,Bennet JE,Dolin R,(eds) Principles and Practise of Infectious Dieseaes (5th ed).Churcill Livingstone,New York 2000 ; 1586-99.

16. St.George K, Howe DT, Rinaldo CR. Cytomegalovirus, varicella-zoster virus and Epstein-Barr virus. Ed: Specter S, Hodinka RL, Young SA, Cinical Virology Manual, 3. baski, Washington, ASM Press,2000 ; 410-49.

17. Shanley JD Cytomegolovirus, pp239-259. Sexually transmitted diseases (Lawrence R.et al.Ed) 1st Ed.Akademic Press, San Diego 2000.

18. Walker A, Petheram SJ, Ballard L, Murph JR, Demmler GJ, Bale JF. Characterization of human Cytomegalovirus strains by analysis of short tandem repeat polymorphisms. J Clin Microbiol 2001: 39; 2219-26.

19. Pignatelli S, Dal Monte P, Landini MP. gpUL73 (gN) genomic variants of human Cytomegalovirus isolates are clustered into four'distinct genotypes. J Gen Virol 2001: 82; 2777-84.

20. Chou SW. Differentiation of cytomegalovirus strains by restriction analysis of DNA sequences amplified from clinical specimens. J Infect Dis 1990: 162; 738-42.

21. Trincado DE, Scott GM, White PA, Hunt C, Rasmussen L, Rawlinson WD. Human Cytomegalovirus strains associated with congenital and perinatal infections. J Med Virol 2000: 61; 481-7.

22. Cha T, Tom,E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski E, Spaete RR. Human Cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains.J Virol 1996: 70; 78-83.

23. Arista S, De Grazia S, Giammanco GM, Di Carlo P, lanuitto E. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in inununocompotent, immunocompromised, and congenitally infected Italian populations. Arch Virol 2003: 148; 547-54.

24. Fries BC, Chou S, Boeckh M, Torok-Storb B. Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. J Infect Dis 1994: 69; 769-74.

25. Hebart H, Greif M, Krause H, Kanz L, Jahn G, Muller CA, Einsele H. Interstrain variation of immediate early DNA sequences and glycoprotein B genotypes in cytomegalovirus clinical isolates.MedMicrobiol Immunolgy 1997: 186; 135-8.

26. Woo PC, Lo CY, Lo SK. Siau H, Peiris JS. Wong SS, Luk WK, Chan TM, Lira WW, Yuen KY. Distinct genotypes distributions of cytomegaiovirus (CMV) envelope glycoprotein in bone marrow and renal transplant recipients with CMV disease. Clin Diagn Lab Immunol 1997: 4; 515-518.

27. The, T. H., W. van der Berg, A. P. van den Berg, M. van der Giessen, J. Weits, H. G. Sprenger ve W. J. van Son. 1990. Cytomegalovirus antigenemia Rev. Infect Dis 12(Suppl. 7):S737-S744.

28. The, T. H.,M. van der Ploeg, A. F. van den Berg, A. M. Vlieger, M. van derGiessen ve W. J. Van Son. 1992. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocyles a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. Transplantation 54:193-198.

29. Van der Bij, W., J. Schirm, R. Torensma, W. J. van Son, A. M. Tegzess ve T. H. The. 1988. Comparison between viremia and antgenemia for detection of cytomegalovirus in blood. J. Clin. Microbiol. 26:2531-2535.

30. Boeckh, M. ve G. Boivin. 1998. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. Clin. Microbiol. Rev. 11:533-554.

31. Landry, M. L. ve D. Ferguson. 1993. Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease. J. Clin. Microbiol. 31:2851-2856.

32. Revello, M. G., E. Percivalle, A. Sarasını, E Baldanti, M. Furione ve G. Gema. 1994. Diagnosis of human cytomegalovirus infection of the nervous system by pp65 detection ıı polymorphonuclear leukocytes of cere-brospinal fluid from AİDS patients. J. Infect. Dis. 170:1275-1279.

33. Salzberger, B., D. Myerson ve M. Boeckh. 1997. Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in marrow transplant patients with CMV disease and CMV infection. J. Infcct. Dis. 176:778-781.

34. Van den Berg, A. P., A. M. Tegzess, A. Scholten-Sampson, J. Schirm, M. van der Giessen, T. H. The ve W. J. van Son. 1992. Monitoring antigenemia is useful in guiding treatment of severe cytomegalovirus disease after organ transplantation. Transplatation Int. 5:101-107

35. Hsia, K., D., H., Spector, J.Lawrie and S.A.Spector. 1989. Enzymatic amplification of human cytomegalovirus sequences by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27:1802-1809.

36. Long, C. M., L. Drew, R. Miner, D. Jekic-McMullen, C. Impraim ve S. Y. Kao. 1998. Detection of cytomegalovirus in plasma and cerebrospinal fluid specimens from human immunodeficiency virüs-infected patients by the AMPLICOR CMV test. J. Clin. Microbiol. 36:2434-2438.

37. Olive, D. M., M. Simsek ve S. Al-Mufti. 1989. Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 27:1238-1242.

38. Shibata, D., W J. Martüı, M. D. Appelman, D. M. Causey, J. M. Leedom ve N. Arnheim. 1988. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients with human immunodeficiency virüs. J. Infect. Dis. 158:1185-1192.

39. Solano, C., I. Munoz, A. Gutierrez, A. Farga, E Prosper, J. Garcia-Conde, D. Navarro ve C. Gimeno. 2001. Oualitative plasma PCR assay (AMPILICOR CMV Test) versus pp65 antigenemia assay for monitoring cytomegalovirus viremia and guiding preemptive ganciclovir therapy in allogeneic stem cell transplantation. J. Clin. Microbiol. 39:3938-3941.

40. Wolf, D. G. ve S. A. Spector. 1992. Diagnosıs of human cytomegaİovirus central nervous syslem disease in AİDS patients by DNA iimplîficarion from cerebrospinal fluid. J.Infect. Dis,. 166:1412-1415.

41. Spector, S. A., R. Merrill, D. Wolf ve W. M. Dankner. 1992. Detection of human cytomegalovirus in plasma of AIDS patients during acute visceral disease by DNA amplificalion. J. Clin. Microbiol 30:2359-2365.

42. Bitsch, A., H. Kirchner, R. Dennin, J. Hoyer, L. Fricke, J. Steinhoff, K. Sack ve G. Bein. 1993. Long persistence of CMV DNA in the blood of renal transplant patients after recovery from CMV infection. Transplantation 56:108-113.

43. Stanier, P., D. L. Taylor, A. D. Kitchen, N. Wales, Y. Tryhorn ve A. S. Tyms. 1989. Persistence of cytomegalovirus in mononuclear cells in peripheral blood from blood donors. Br. Med. J. 299: 897-898.

44. Hodinka, R. L. 1998. The clinical utility of viral quantitation using molecular methods. Clin. Diagn. Virol. 10:25-47.51.Hsia, K., D. H. Spector, J. Lawrie ve S. A. Spector. 1989. Enzymatic amplification of human cytomegalovirus sequences by polymerase chain reaction. J. Clin, Microbiol. 27:1802-1809.

45. Mazzulli, T., L. W. Drew, B. Yen-Lieberman, D. Jekic McMullen, D. J. Kohn, C. Isada, G. Moussa, R. Chua ve S. Walmsley. 1999. Multicenter comparison of the digene; hybrid capture CMV DNA assay (version 2,0), the pp65 antigenemia assay, and celi culture for detection of cytomegalovirus viremia. J. Clin. Microbiol. 37: 958-963.

46. Schirm, J., A. Kooistra, W. J. van Son, W. van der Bij, E. Verschuuren, H. G. Sprenger, P. C. Limburg ve T. H. The. 1999. Comparison of the Murex Hybrid Capture CMV DNA (v2.0) assay and the pp65 CMV antigenemia test for the' detection and quantitation of CMV in blood samples from immunocompromised patients. J. Clin. Virol. 14:153-165.

47. Bestetti, A., C Pierotti, M. Terreni, A. Zappa, L. Vago, A. Lazzarin ve P. Cinque. 2001. Comparison of three nuckleic acid amplification assays of cerebrospinal fluid for diagnosis of cytomegalovirus encephalitis. J. Clin. Microbiol. 39:1148-1151.

48. Blank, B. S., P. L. Meenhorst, J. W. Mulder, G. J. Weverling, H. Putter, W. Pauw, W. C. van Dijk, P. Smits, S. Lie-A-Ling, P. Reiss ve J. M. Lange. 2000. Value of different assays for detection of human cytomegalovirus (HCMV) in predicting the development of HCMV disease in human immunodeficiency virus-infected patients. J. Clin. Microbiol. 38:563-569.

49. Boivin, G., R. Belanger, R. Delage, C. Beliveau, C. Demers, N. Goyette ve J. Roy. 2000. Quantitative analysis of cytomegalovirus (CMV) viremia using the pp65 antigenemia assay and the COBAS AMPLICOR CMV MONİTÖR PCR Test after blood and marrow allogeneic transplantation. J. Clin. Microbiol. 38:4356-4360.

50. Pellegrin, L, I. Garrigue, D. Ekouevi, L. Couzi, P. Merville, P. Merel, G. Chene, M. H. Schrive, P. Trimoulet, M. E. Lafon ve H. Fleury. 2000. New molecular assays to predict occurrence of cytomegalovirus disease in renal transplant recipents. J. Infecl. Dis. 182:36-42.

51. Razonable, R. R., R. A. Brown, M. J. Espy, A. Rivero, W. Kremers, J. Wilson, C. Groettum, T. F. Smith ve C. V. Paya. 2001. Comparative quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in solid organ transplant recipients with CMV infection by using two high-throughput automated systems. J. Clin. Microbiol. 39:4472-4476.

52. Sia, I. G-, J. A. Wilson, M. J. Espy, C. V. Paya ve T. E. Smith. 2000. Evaluation of the COBAS AMPLICOR CMV MONITÖR test for detection of viral DNA in specimens taken from patients after liver transplantation. J. Clin. Microbiol. 38:600-606.

53. Long, C Y., L. E. Cuevas, H. Williams ve A. Bakran. 2000. Comparison of two commercial methods for measurement of cytomegalovirus load in blood samples after renal transplantation. J. Clin. Microbiol. 38:1209-1213.

54. Wattanamano, P., J. L. Clayton, J. J. Kopicko, P. Kissinger, S. Elliot, C. Jarrott, S. Rangan ve M. A. Beilke. 2000. Comparison of three assays for cytomegalovirus detection in AIDS patients at risk for retinitis. J. Clin. Microbiol. 38:727-732.

55. Zipeto, D., F. Baldanti, D. Zeila, M. Furione, A. Caviechini, G. Milanesi ve G. Gerna. 1993. Quantification of human cytomogalovinıs DNA in peripheral b!ood polymorphonuclear leukocytes of immunocom-promised patients by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 44:45-56.

56. Rasmussen, L., S. Morris, D. Zipeto, J. Fessel, R. Wolitz, A. Dowling ve T. C. Merigan. 1995. Quantitation of human cytomegalovirus DNA from peripheral blood cells of human immunodeficiency virus-infected patients could predict cytomegalovirus retinitis. J. Infect. Dis. 171:177-182.

57. Zipeto, D, S. Morris, C. Hong, A. Dowling, r. Wolitz, T. C. Merigan ve L. Rasmussen. 1995. Human cytomegalovirus (CMV) DNA in plasma reflects quantity of CMV DNA present in leukocytes. J. Clin. Microbiol 33:2607-2611.

58. Bitsch, A., H. Kirchner, R. Dupke ve G. Bein. 1992. Cytomegalovirus transcripts in peripheral blood leukocytes of actively infected transplant patients detected by reverse transcription-polymerase chain reaction. J.Infect. Dis. 167:740-743.

59. Gozlan, J., |J-M. Saloed, C. Chouaid, C. Duvivier, O. Picard, M.-C. Meyohas ve J.-C Petit. 1993. Human cytomegalovirus (HCMV) late-mRNA detection in periph-eral blood of AIDS patients: diagnostic value for HCMV disease compared with those of viral culture and HCMV DNA detection. J. Clin. Microbiol. 31:1943-1945.

60. Lam, K. M., N. Oldenburg, M. A. Khan, V. Gaylore, G. W. Mikhail, P. D. Strouhal J. M. Middeldorp. N. Banner ve M. Yacoub. 1998. Significance of reverse transcription polymerase chain rcaction in the detection of human cytomegalovirus gene transcripts in thoracic organ transplant recipients. J. Heart Lung Transplant. 17:555-565.

61. Nelson, P. N., B. K. Rawal, Y. S. Boriskin, K. E. Mathers, R. L. Powles, H. M. Steel, Y. S. Tryhorn, P. D. Butcher ve J. C. Booth. 1996. A polymerase chain reaction to detect a spliced late transcript of human cytomegalovirus in the blood of bone marrow transplant recipients. J. Viral. Methods 56:139-148.

62. Blok, M. J., V. J. Goossens, S. J. V. Vanherle, B. Top, N. Tacken, J. M. Middeldorp, M. H. L. Christiaans, J. P. Van Hooff ve C. A. Bruggeman. 1998. Diagnostic value of monitoring human cytomegalovirus late pp67 mRNA expres- sion in renal-allograft recipients by nucleic acid sequence- based amplification, J. Clin. Mkrobiol. 36:1341-1346.

63. Blok, M. J., L Lautenschlager, V. J. Goossens, J. M. Middeldorp, C. Vink, K. Hockerstedt ve C. A. Bruggeman. 2000. Dİagnostic implications of human cytomegalovirus immediate early-1 and pp67 mRNA detection in whole-blood samples from liver transplant patients using nucleic acid sequence -based amplification. J/. Clin. Microbiol. 38:4485-4491.

64. Greijer, A. E., E. A. M. Verschuuren, M. C Harmsen, C. A. J. Dekkers, H. M. A. Adriaanse, T. H. The ve J. M. Middeldorp. 2001. Direct quantification of human cytomegalovirus İmmediate-early and latle mRNA levels in blood of lung transplant recipients by competitive nucleic acîd sequence-based amplification. J. Clin. Microbiol. 39:251-259.

65. Zhang, F. S. Tetali, X. P. Wang, M. H. Kaplan, F. V. Cromnıe ve C. C. Ginocchio. 2000. Detection of human cytomegalovirus pp67 late gene transcript sincere brospînal fluid of human immunodenciency virüs type 1-infected patients by nucleic acid sequence-based amplification. J. Clin. Mkrobiol. 38:1920-1925.

66. Gleaves, C. A., T. F. Smith, E. A. Shuster ve G. R. Pearson. 1984. Rapid detection of cytomegalovirus in MKC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen .J. Clin. Microbiol. 19:917-919.

67. Hodinka, R. L. 1999. Serological tests in clinical virology, p. 195-211. in E. H. Lennette and T. R Smith (ed.), Laboralory Diagnosis of Viral Infections, 3rd ed. Marcel Dekker, New York, N.Y.

68. Mayo, D. R., T. Brennan, S. P. Sirpenski ve C. Seymour.1985. C'ytomegalovirus antibody detection by three commercially available assays and complement fixation. Diag. Microbiol Infect. Dis. 3:455-459.

69. McHugh, T. M., C. H. Casavant, J. C. Wilber ve D. P. Stites. 1985. Comparison of six methods tor the detection of antibody to cytomegalovirus.J. Clin. Microbiol. 722:1014-1019.

70. Phipps, P. H., L. Gregoire, E. Rossier ve E. Perry, 1983. Comparison of five methods of cytomegalovirus antibody screening of blood donors.J. Clin. Microbiol 18:1296-1300.

71. Kettering, J. D., N. J. Schmidt, D. Gallo ve E. H. Lennette. 1977. Anti-complement immunofluorescence test for antibodies to human cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 6:627-632.

72. Rao, N., D. T. Waruszewski, J. A. Armstrong, R. W. Atchison ve M. Ho. 1977. Evaluation of. anti- complementary immunofluorescence test in cylomegalovirus infection. J. Clin. Microbiol. 6:633-638.

73. Beckwith, D. G., D. C. Halstead, K. Alpaugh, A. Schweder, D. A, Blount-Fronefield ve K. Toth. 1985. Comparison of a latex agglutination test with five other methods for determining the presence of antibody against cytomegalovirus.J.Clin. Microbiol. 21:328-331.

74. Hursh, D. A,, A. D. Abbot, R. Sun, J. P. Iltis, D. H. Rice ve C. A. Gleaves. 1989. Evaluation of a latex particle agglutination assay for the detection of cytomegalovirus antibody in patient serum. J. Clin. Microbiol. 27:2878-2879.

75. Grangeot-Keros, L-, M. J. Mayaux, P. Lebon, R Freymuth, G. Eugene,. R. Stricker ve E. Dussaix. 1997. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. J. Inject. Dis. 175:944-946.

76. Lazzarotto, T-, P. Spezzacatena, P. Pradelli, D. A. Abate, S. Varani ve M. P. Landini.1997.Avidity of immunoglobulinG directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4: 469-473.

77. Lazzarotto, T., S. Varani, P. Spezzacalena, P. Pradelli, L. Potena, A. Lombardi, V. Ghisetti, L. Gabrielli, D. A. Abate, C. Magelli ve M. P. Landini. 1998. Delayed acquisition of high-avidity anti-cytomegalovirus antibody is correlated with prolonged antigenemia in solid organ transplant recipients. J. Infect. Dis. 178:1145-1149.

78. Rota S. Pyrosequencing (Pyrosekanslama) ve prensipleri ' Klinik Mikrobiyolojide Pyrosekans Uygulama Kursu' kitabında s.79-90, Ankara, 2010.

79. Aktaş F. Antiviral ilaçlar .Topçu AW ,Söyletir G,Doğanay M.(eds).İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi kitabında .Nobel Tıp Kitabevleri 2002,Cilt 1s 282-285

80. Erice ,A. 1999.Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs .Clin.Microbiol.Rev.12:286-297

81. Lurain, N. S. ve K. D. Thompson. 1997. Current methods for antiviral susceptibiliry testing. Clin. Microbiol. Newsl. 19:41-48.

82. Swierkosz, E. M. ve R. L. Hodinka. 1999. Antiviral agents and susceplibility testing, p. 1624-1639. in E R, Murray ,J. Baron, M. A. Railer, F. C Tenover ve R. H. Yoken (ed.), Manual of Clinical Microbiol, 7th ed. ASM Press, Washington, D.C.

83. Smith, I. L., J. M. Cherrington, R. E. Jiles, M. D. Fuller, W. R. Freeman ve S. A. Spector. 1997. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in ooth the UL97 and DNA polymerase genes. J. Infect. Dis. 176:69-77.

84. Baldanti, E, A, Sarasini, E. Silini, M. Barbi, A. Lazzarin, K. K. Biron ve C. Gerna. 1995. Four dually resistant human cytomegalovirus strains from AIDS patients: single mutations in UL97 and UL54 open reading frames are responsible for ganciclovir- and foscarnet-spesific resistance, respectively. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 99:103-104.

85. Velipaşaoğlu S.CMV infeksiyonlarından korunmada aktif bağışıklama .I.Ulusal CMV Simpozyumu Tanı ve Tedavi Yaklaşımları: Sorunlar ve Çözümleri Kitabında, Antalya 2001 ; 84-87

86. Gale RP, Winston D.Intravenous imunoglobulin in bone marrow transplantation Cancer 1991 ; 68:1451-1453

87. Çolak D.,Öğünç D.Sitomegalovirüs enfeksiyonlarında tanı yöntemleri .Flora1999; 4(2) :82-89

88. Sayıner A. Cytomegalovirus infeksiyonu tanısında serolojik testler.I.Ulusal CMV Simpozyumu Tanı ve Tedavi Yaklaşımları: Sorunlar ve Çözümleri Kitabında.Antalya 2001 ; 33-39

89. Arista S, De Grazia S, Giammanco GM, Di Carlo P, lanuitto E. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in inununocompotent, immunocompromised, and congenitally infected Italian populations. Arch Virol 2003: 148; 547-54.

90. McCarthy M, Resnick L, Taub F, Stewart RV, Dix RD. Infection of human neuronal cell aggregate cultures with a clinical isolate of cytomegalovirus. J Neuropathology & Experimental Neurology 1991: 50; 441-50.

91. Pulliam L. Cytomegalovirus preferentially infects a inonocyte derived macrophage/ microglial cell in human brain cultures: neuropathology differs between strains. J Neuropathology & Experimental Neurology 1991: 50; 443-40.

92. Binder T, Siegert W, Kruse A, Oettle H. Wilbom F, Peng R, Timm H, Neuhaus P, Schmidt CA. Identification of human cytomegalovirus variants by analysis of single strand conformation polymorphism and DNA sequencing of the envelope glycoprotein B gene region-distribution frequency in liver transplant recipients. J Viral Methods 1999: 78;153-62.

93. Gilbert C, Handfield J, Toma E, Lalonde R, Bergeron MG, Boivin G. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in blood of AIDS patients: lack of association with either the viral DNA load in leucocytes or pre-cence of retinitis. J Med Virol 1999: 59; 98103.

94. Verbraak FD, Bruinenberg M, van den Horn GJ, Meenken C, van der Lelij A, Hoyng CB, Kijlstra A, Peek R. Cytomegalovirus (CMV) strain differences between the eye and blood in AIDS patients with CMV retinitis. AIDS 1998: 12; 713-8.

95. Meyer- Koning U, Vogelberg C, Bongarts A, Kampa D, Delbruck R, Wolff-Vorbeck G, Kirste G, Haberland M, Hufert FT, von Lear D. Glycoprotein B genotype correlates with cell tropism invivo of human, cytomegalovirus infection. J Med Virol 1998: 55; 75-81.

96. Chern KH, Chandler DB, Martin DF, Kuppermann BD, Wolitz RA, Margolis TP. Glycoprotein B subtyping of cytomegalovirus (CMV) in the vitreus of patients with AIDS and CMV retinitis. J Infect Dis 1998: 178; 1149-53.

97. Peek R, Verbraak FD, Bruinenberg M, van der Lelij A, van den Horn GJ. Kijlstra A. Cytomegalovirus glycoprotein B genotyping in ocular fluids and blood of AIDS patients with CMV retinitis. Investing Opthalmol Vis Sci 1998: 39; 1183-7.

98. Bongarts A, von Lear D, Vogelberg C, Ebert K, van Lunzen J, Gareg J, Vaith P, Hufert FT, Haller O, Meyer-Koning U. Glycoprotein B genotypes of human cytomegalovirus distribution,in HIV- infected patients. Scand J Infect Dis 1996: 28; 447-9.

99. Vogelberg C, Meyer-Koning U, Hufert FT, Kirste G, von Lear D. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in renal transplant recipients. J Med Virol 1996: 50; 31-4.

100. Dieamant, Débora de Campos; Bonon, Sandra Helena Alves; Prates, Liliane Cury; Belangelo, Vera Maria Santoro; Pontes, Erika R; Costa, Sandra Cecília Botelho. Active human Cytomegalovirus infection and Glycoprotein B genotypes in Brazilian pediatric renal or hematopoietic stem cell transplantation patients Braz.J. Microbiol;41(1):50-58, Jan.-Mar. 2010. tab.

101. Fries BC, Chou S, Boeckh M, Torok-Storb B. Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. J Infect Dis 1994: 169; 769-74.

102. Torok-Storb B, Boeckh M, Hoy C, Leisenring W, Myerson D, Gooley T. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosupression after marrow transplantation. Blood 1997: 90; 2097-102.

103. Pacsa AS, Essa S, Voevodin A, El-Shazly A, Kazak H, Nampoory MEN, Johnny KV, Said T, Al-Nakib. Correlation between CMV genotypes, multiple infections with herpes viruses (HHV-6,7) and development of CMV disease in kidney transplant recipients in Kuveyt. Immunol Med Microbiol 2003: 35; 125-30.

104. Aquino VH, Figueiredo LT. High prevalance of renal transplant recipients infected with one than one cytomegalovirus glycoprotein B genotype. J Med Virol 2000: 61; 138-42

105. Hebart H, Greif M, Krause H, Kanz L, Jahn G, Muller CA, Einsele H. Interstrain variation of immediate early DNA sequences and glycoprotein B genotypes in cytomegalovirus clinical isolates. Med Microbiol Immunol 1997: 186; 135-8.

106. Trincado DE, Scott GM, White PA, Hunt C, Rasmussen L, Rawlinson WD. Human Cytomegalovirus strains associated with congenital and perinatal infections. J Med Virol 2000: 61; 481-7.

107. Bale JF, Murph JR, Demmler GJ, Dawson J, Miller JE, Petheram SJ. Intrauterine cytomegalovirus infection and glycoprotein B genotypes. J Infect Dis 2000: 182; 933-6.

108. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Primache V, Dido P, Guidotti P, Corbetta C, Melotti D. CMV gB genotypes and outcome of vertical transmission: study on a dried blood spots of congenitally infected babies. J Clin Virol 2001: 21; 75-9.

109. Roubalová K, Strunecký O, Zufanová S, Procházka B, Vitek A. Genotyping of viral glycoprotein B (gB) in hematopoietic stem cell transplant recipients with active cytomegalovirus infection: analysis of the impact of gB genotypes on the patients' outcome. Epidemiol Mikrobiol Imunol. 2010 Apr;59(2):92-9.

110. Coaquette A, Bourgeois A, Dirand C, Varin A, Chen W, Herbein G: Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2004, 39:155-161.

111. Çolak, D., A. Özkul, D. Öğünç, G. Öngüt, M. Gültekin, ''Cytomegalovirus glikoprotein B genotiplerinin farklı hasta gruplarında dağılımı'', KLİMİK XI.

Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre kitabı s.371, İstanbul, 2003.

112. Sarcinella L, Mazulli T, Wiley B, Humar A. Cytomegalovirus glycoprotein B genotype does not correlate with outcomes in liver transplant patients. J Clin Virol 2002: 24; 99-105.

113. Rosen HR. Corless CL, Rabkin J, Chou SW. Association of cytomegalovirus genotype with graft rejection after liver transplantation. Transplantation 1998: 66; 1627-31.

114. Zhou, L.; Fan, J.; Zheng, S.S.; Ma, W.H. (2007). Genetic variation withinthe glycoprotein B and H genes of human cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. Transpl Infect Dis. Mar; 9(1): 73-7.

115. Chou, S.; Dennison, K.M. (1991). Analysis of Interstrain Variation Cytomegalovirus Glycoprotein B Sequences Encoding Neutralization-Related Epitopes *J. Infect. Dis.*; 163:1229-234.

116. Novak Z, Ross SA, Patro RK, Pati SK, Kumbla RA, Brice S, Boppana SB. Cytomegalovirus strain diversity in seropositive women. J Clin Microbiol. 2008 Mar;46(3):882-6. Epub 2008 Jan 23.

117. Rasmuusen L, Hong C, Zipeto D, Morris S, Sherman D, Chou S,, Miner R, Drew WL Wolitz R, Dowling A, War-ford A, Merigan TC. Cytomegalovirus_ gB genotype distribution differs in human immunodeficiency virus-infectedpatients and immunocompromised allograft recipients. J Infect Dis 1997: 175; 179-84.

118. Carraro, E.; Granato, C.F. (2003). Single human cytomegalovirus gB genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. *JMedVirol.* Jun;70(2):240-3

119. Shepp, D. H., M. E. Match, A. B. Ashraf, S. M. Lipson, C. Millan, and R.Pergolizzi. 1996. Cytomegalovirus glycoprotein B groups associated with retinitis in AIDS. J. Infect. Dis. 174:184–187.

120. Drew WL, Chou S, Miner RC, Mohr BA, Busch MP, van der Horst CM, Asmuth DM, Kalish LA. Cytomegalovirus glycoprotein B groups in human immunodeficiency virus- infected patients with incident retinitis. J Infect Dis 2002: 186; 114-7.

121. Fidouh-Houhou N, Duval X, Bissuel F, Bourbonneux V, Flandre P, Ecobichon JL, Jordan MC, Vilde JL, Brun-Vezinet F, Leport C. Salivary cytomegalovirus (CMV) shedding, glycoprotein B genotype distribution, and CMV disease in human immunodeficiency virus-seropositive patients. Clin Infect Dis 2001: 33; 1406-11.

122. Baldanti P, Sarasini A, Purione M, Gatti M, Comolli G, Revello MG, Gerna *G.* Coinfection of the immunocompromised but not the immunocompetent host by multiple human cytomegalovirus strains. Arch Virol 1998: 143; 1701-9.

123. Chandler, S. H., H.H.Handsfield, and J.K.McDougall.1987,Isolation of multible strains of cytomegalovirus from women attending a clinic for sexually transmitted diseases. J .Infect.Dis 155:655-660

124. Irene Görzer, Christian Guelly, Slave Trajanoski and Elisabeth Puchhammer-Stöckl Deep sequencing reveals highly complex dynamics of human cytomegalovirus genotypes in transplant patients over time. j virol 84 2010;(14):7195-203

T. C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Aytekin Kılınç'a ait **"Klinik Örneklerden İzole Edilen *Sitomegalovirüs (CMV)* Suşlarının Genotiplerinin Araştırılması"** adlı çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih :

Başkan ....Prof. Dr. A. Necdet UÇ.....İmza

Üye.....Prof. Dr. Hüseyin Kılıç.....İmza

Üye.....Prof. Dr. Selçuk YAZAR.....İmza

Üye.....Prof. Dr. Selma Gökahmetoğlu.....İmza

Üye.....Doç. Dr. Duygu Perçin.....İmza