



**T.C.**  
**ERCİYES ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HEMATOLOJİ KLİNİKLERİNDE TAKİP EDİLEN  
HASTALARDAN ELDE EDİLEN *CYTOMEGALOVIRUS*  
(CMV) SUŞLARINDA ANTİVİRAL İLAÇ DİRENCİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Şerife ÇEVİK**

**KAYSERİ 2020**



**T.C.  
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HEMATOLOJİ KLİNİKLERİNDE TAKİP EDİLEN  
HASTALARDAN ELDE EDİLEN *CYTOMEGALOVIRUS*  
(CMV) SUŞLARINDA ANTİVİRAL İLAÇ DİRENCİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Şerife ÇEVİK**

**Danışman**

**Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından TTU-2018-8376 no'lu proje ile desteklenmiştir.**

**KAYSERİ 2020**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçlanmasında çok büyük desteğini gördüğüm değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Selma Gökahmetoğlu'na teşekkür ederim. Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, eğitimimde çok büyük emeği geçen hocalarım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hüseyin Kılıç'a, Prof. Dr. A. Nedret Koç'a, Prof. Dr. M. Altay Atalay'a ve diğer çok kıymetli Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Asistanlık sürem boyunca keyifle çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve tüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim. Genom ve kök hücre merkezinden Mustafa Akkuş'a çalışmamdaki desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

TTU-2018-8376 no'lu bu tez projesini maddi olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca desteğini esirgemeyen, bugünlere gelmemde büyük emeğe sahip olan canım anneme, babama ve kardeşlerime teşekkürü borç bilip şükranlarımı sunarım.

Asistanlık sürem boyunca yanımda olan sevgili eşim Harun Çevik'e ve canım oğlum Ali Berk Çevik'e teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	xi
İÇİNDEKİLER .....	ii
KISALTMALAR ve SİMGELER .....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	viii
1.GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. <i>CYTOMEGALOVIRUS</i> .....	3
2.1.1.Tarihçe .....	3
2.1.2. Sınıflandırma .....	4
2.1.3. Virüsün Genel Özellikleri.....	4
2.1.3.1. CMV'nin Replikasyonu.....	5
2.1.3.2. Fiziksel ve Kimyasal Ajanlara Direnç.....	7
2.1.4. Epidemiyoloji .....	7
2.1.5. Patogenez ve İmmünite .....	9
2.1.6. Klinik Bulgular .....	11
2.1.6.1. Normal konakta CMV enfeksiyonları .....	11
2.1.6.2. Konjenital CMV enfeksiyonları .....	12
2.1.6.3. İmmün yetmezliği olan konaklarda CMV enfeksiyonu..	12
2.1.7. CMV'nin Laboratuvar Tanısı .....	14
2.1.7.1. Direkt İnceleme .....	14
2.1.7.1.1. Histopatolojik İnceleme .....	14

2.1.7.1.2. Antijenemi Testi.....	14
2.1.7.1.3. Moleküler Amplifikasyon.....	15
2.1.7.2. Virüs İzolasyonu .....	18
2.1.7.3. Serolojik Testler.....	19
2.1.7.3.1. ELISA (Enzyme Linked ImmonoSorbent Assay) .....	20
2.1.7.3.2. IFA (Immunofluorescence Assays) .....	20
2.1.7.3.3. Anti CMV IgM Antikor Ölçümleri.....	21
2.1.7.3.4. CMV IgG Avidite Testi .....	22
2.1.7.3.5 Diğer Testler .....	22
2.1.8. Tedavi .....	22
2.1.9. Antiviral Duyarlılık Testi .....	26
2.1.9.1. Fenotipik Testler .....	27
2.1.9.2. Genotipik testler.....	27
2.1.9.2.1. Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi..	28
2.1.9.2.2. Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi .....	29
2.1.9.2.3. Shotgun yöntemi .....	30
2.1.9.2.4. Pirodizileme yöntemi .....	30
2.1.9.2.5. Ligasyon yoluyla dizileme yöntemi.....	30
2.1.9.2.6. Yeni nesil dizileme .....	30
2.1.10. CMV'de Gansiklovir Direnci .....	31
2.1.11. Korunma .....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	38
3.1. HASTALAR VE ÖRNEKLER .....	38

3.2. CMV SUŞLARINDA GANSİKLOVİR DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI .....	38
3.2.1. Otomatize Cihazla DNA İzolasyonu .....	39
3.2.2. CMV DNA amplifikasyonu .....	40
3.2.3. PCR Ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi .....	42
3.2.3. Dizi Analizi .....	44
4. BULGULAR .....	47
4.1. Hastaların Özellikleri .....	47
4.2. CMV Antiviral Direnç Saptanan Hastaların Özellikleri .....	49
4.3. Varyant Sekans Bulunan Hastaların Özellikleri .....	61
4.4. CMV Suşunda Mutasyon Saptanmayan Hastaların Özellikleri .....	64
5. TARTIŞMA .....	65
6. SONUÇLAR .....	72
7. KAYNAKLAR .....	73

## KISALTMALAR ve SİMGELER

AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
AKİT	: Allojenik kemik iliği transplantasyonu
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
AML	: Akut myeloid lösemi
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
Bp	: Baz pair
°C	: Santigrad derece
CDV	: Sidofovir
CMV	: Cytomegalovirus
CPE	: Sitopatik etki
ddNTP	: Dideoksiribonükleozid trifosfat
Dk	: Dakika
DNA	: Deksiribonükleozit trifosfat
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
EIA	: Enzyme Immunoassay
ELISA	: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ETA	: Endotrakeal aspirat
FDA	: Food and Drug Administration
FOS	: Foskarnet
Gb	: Glikoprotein B
GCV	: Gansiklovir
gH	: Glikoprotein H
GVHD	: Graft Versus Host Disease
HHV-1	: <i>Herpes simpleks</i> virüsü 1
HHV-2	: <i>Herpes simpleks</i> virüsü 2
HHV-3	: <i>Varisella-zoster</i> virüsü
HHV-4	: <i>Epstein-Barr</i> virüsü
HHV-5	: İnsan Herpesvirüsü 5
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HKİT	: Haploidentik kemik iliği transplantasyonu

IFA	: Immunofluorescence Assays
IgG	: İmmünglobulin G
IgM	: İmmünglobulin M
IU	: International unit
İY	:İmmün Yetmezlik
kDa	: Kilodalton
KİT	: Kemik iliği transplantasyonu
LİPA	: Line prob assay
ml	: mililitre
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NHL	: Non-Hodgkin Lenfoma
OKİT	: Otolog kemik iliği transplantasyonu
ORF	: Açık okuma bölgesi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pmol	: pikomol
PRA	: Plak redüksiyon assay
Rpm	: Rotation per minute
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizm Analizi
TBE	: Tris-borik asit-EDTA
UL	: Unique Long
US	: Unique short
VASV	: Valasiklovir
VGCV	:Valgansiklovir
µl	: Mikrolitre



## TABLULAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Antiviral ilaç direncine yol açan UL97 ve UL54 mutasyonları.....	35
<b>Tablo 2.</b> PCR primerleri .....	40
<b>Tablo 3.</b> CMV ilaç direnci tayininde PCR reaksiyon kompozisyonu .....	41
<b>Tablo 4.</b> CMV ilaç direnci tayininde PCR protokolü.....	41
<b>Tablo 5:</b> CMV ilaç direnci tayininde saflaştırma işlemi protokolü.....	44
<b>Tablo 6:</b> CMV ilaç direnci tayininde sekans PCR kompozisyonu.....	45
<b>Tablo 7.</b> CMV ilaç direnci tayininde sekans PCR protokolü .....	45
<b>Tablo 8.</b> Hastaların transplant tipleri ve erişkin ve çocuk hasta dağılımı .....	47
<b>Tablo 9.</b> CMV antiviral direnç saptanan hastaların özellikleri.....	49
<b>Tablo 10.</b> CMV suşunda varyant sekans saptanan hastaların özellikleri .....	62
<b>Tablo 11.</b> CMV UL54 ve UL97 gen bölgelerinde ilk defa bu çalışmada saptanan varyant sekanslar .....	63
<b>Tablo 12.</b> CMV suşunda mutasyon saptanmayan hastaların özellikleri.....	64

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. CMV'nin morfolojik yapısı .....	4
Şekil 2. CMV DNA genomunun yapısal komponentlerinin haritası .....	5
Şekil 3. CMV'de kullanılan antiviral ilaçların etki mekanizması .....	26
Şekil 4. GCV direncine yol açan CMV UL97 geninde sıklıkla görülen mutasyon bölgeleri .....	33
Şekil 5. Antivirallere dirence yol açan CMV UL54 geninde sıklıkla görülen mutasyon bölgeleri .....	34
Şekil 6. UL97 geni genetik polimorfizm haritası .....	36
Şekil 7. UL97 gen bölgesi PCR ürünlerinin jel görüntüsü .....	43
Şekil 8. UL54 gen bölgesi 1. bölge PCR ürünlerinin jel görüntüsü .....	43
Şekil 9. UL54 gen bölgesi 2. bölge PCR ürünlerinin jel görüntüsü .....	44
Şekil 10. UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar.....	51
Şekil 11. 1. hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar .....	51
Şekil 12. UL54 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar.....	53
Şekil 13. UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar.....	53
Şekil 14. 2. Hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar .....	54
Şekil 15. UL54 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar.....	55
Şekil 16. 3. hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar .....	55
Şekil 17. UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar.....	57
Şekil 18. 4. hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar .....	57
Şekil 19. UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyon.....	59
Şekil 20. 5. hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar .....	59
Şekil 21. UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar.....	60
Şekil 22. 6. hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar .....	61

## ÖZET

### HEMATOLOJİ KLİNİKLERİNDE TAKİP EDİLEN HASTALARDAN ELDE EDİLEN *CYTOMEGALOVIRUS* (CMV) SUŞLARINDA ANTİVİRAL İLAÇ DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

**Amaç:** CMV enfeksiyonları immün sistemi normal olan kişilerde çoğunlukla asemptomatik geçirilirken; transplant alıcıları gibi immün yetmezlikli hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bu çalışmada; kemik iliği transplantasyonu (KİT) ünitesi ve hematoloji kliniklerinde takip edilen hastalardan elde edilen CMV suşlarında antiviral ilaç direncinin araştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya Erciyes Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Hematoloji ve KİT ünitesi bölümlerinde takip edilen 48 hastaya ait 51 kan örneği dahil edildi. Hastaların 21'i çocuk, 27'si ise erişkin hastaydı. CMV DNA viral yükü 1000 IU/ml ve üzeri olan hastalar çalışmaya dahil edildi. CMV suşlarında antiviral ilaç direncinin belirlenmesinde UL97 gen bölgesi için 835bp'lik; UL54 gen bölgesinde ise 979 bp'lik ve 904 bp'lik bölgelere Sanger dizi analizi yöntemi uygulandı. Sekans işlemi ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezinde gerçekleştirildi. Dizilerin değerlendirme işlemi web sitesinden yararlanıldı ([www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/Hkestler/hcmv/](http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/Hkestler/hcmv/)).

**Bulgular:** Çalışmaya dahil edilen 48 hastanın 6 (%12.5)'sında antiviral direnç mutasyonu bulundu. Antiviral direnç bulunan tüm hastalar KİT alıcısı idi. Çalışmaya dahil edilen 48 hastanın 42'si KİT alıcısı olup 6 (%14.2)'sında antiviral direnç bulundu. Bu 6 hastanın 3'ü çocuk ve 3'ü erişkin hasta idi. Çalışmada pediatri KİT alıcısı olan toplam 18 hastanın 3 (%16.6)'ünde; erişkin KİT alıcısı olan toplam 24 hastanın 3 (%12.5)'ünde antiviral direnç bulundu. Tek başına UL97 gen bölgesinde 4 hastada antiviral direnç mutasyonu saptandı. İki hastada E596G mutasyonu, iki hastada ise sırasıyla C603W ve A591V mutasyonu bulundu. Ayrıca bir hastada UL97 gen bölgesinde M460I ve C592G mutasyonları ve eş zamanlı olarak UL54 gen bölgesinde

F412L mutasyonu tespit edildi. Bir hastada ise UL97 gen bölgesinde mutasyon olmadan tek başına UL54 gen bölgesinde L957F mutasyonu bulundu. Çalışmaya dahil edilen 27 hastada literatürde bildirilen ve fenotipik testlerle ilaçlara duyarlı olduğu belirlenen 11 varyant sekans (UL54'te V355A, V450A, ins885S, S897L, D898N, G474R, V927M, C961R ve K947E; UL97'de D605E ve A427V mutasyonu) saptandı. Ayrıca daha önceki yayınlarda bildirilmeyen çok sayıda varyant sekans bulundu.

**Sonuç:** Sonuç olarak hastalardan elde edilen CMV şuşlarının %12.5'inde antiviral ilaç direnci saptandı. Bu oranın daha önceki çalışmalara kıyasla yüksek olduğu dikkati çekmektedir. Antiviral direnç tayini, hastaların takibinde önemli olup; tedavinin planlanmasında klinisyeni yönlendirecektir. Ayrıca saptanan varyant sekansların antiviral ilaç direncindeki rolünün belirlenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** CMV, gansiklovir, antiviral direnç, dizi analizi

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF ANTIVIRAL DRUG RESISTANCE IN *CYTOMEGALOVIRUS* (CMV) STRAINS OBTAINED FROM PATIENTS FOLLOWED UP IN HEMATOLOGY CLINICS

**Aim:** CMV infections are mostly asymptomatic in individuals with normal immune system; it is an important cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients such as transplant recipients. In this study it is aimed to investigate the antiviral drug resistance in CMV strains obtained from patients followed up in bone marrow transplantation (BMT) unit and hematology clinics.

**Materials and Methods:** Fifty one blood samples obtained from 48 patients who were monitored in Department Hematology and BMT unit in Erciyes University Health Practice and Research Center were included in the study. Twenty one of patients were children and 27 were adults. Patients with CMV DNA viral load 1000 IU / ml and above were included in the study. Sanger sequence analysis method was applied for determination of antiviral drug resistance in CMV strains, 835bp for the UL97 gene region; 979 bp and 904 bp regions for the UL54 gene region. Sequencing was performed on the ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) at Erciyes University Genome and Stem Cell Center. The website was used for the evaluation of the sequences ([www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/Hkestler/hcmv/](http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/Hkestler/hcmv/)).

**Results:** Antiviral resistance mutation was found in 6 (12.5 %) of 48 patients included in the study. All patients with antiviral resistance were BMT recipients. Of the 48 patients included in the study, 42 were BMT recipients and 6 (14.2%) had antiviral resistance. Of these 6 patients, 3 were children and 3 were adult patients. In this study, antiviral resistance was found in 3 (16.6%) of 18 pediatric BMT recipients; 3 (12.5%) of 24 adult BMT recipients. Antiviral resistance mutation was detected in 4 patients in the UL97 gene region alone. E596G mutation was found in two patients and C603W and A591V mutation in two patients, respectively. In addition, M460I and C592G mutations in the UL97 gene region and F412L mutation in the UL54 gene region were detected in one patient. In one patient, L957F mutation was found in the UL54 gene region alone without mutation in the UL97 gene region. Eleven variant sequences

(V355A, V450A, ins885S, S897L, D898N, G474R, V927M, C961R and K947E in UL54; D605E and A427V mutation in UL97) were identified in 27 patients included in the study, which were reported in the literature to be susceptible to drugs by phenotypic testing. In addition, a large number of variant sequences that have not been reported in the literature were found.

**Conclusion:** In conclusion, antiviral drug resistance was found in 12.5% of CMV strains obtained from patients. This ratio is high compared to previous studies. Determination of antiviral resistance is important in following up the patients and guiding the clinician in planning the treatment. In addition, further studies are needed to determine the role of variant sequences in antiviral drug resistance.

**Key words:** CMV, ganciclovir, antiviral resistance, sequence analysis

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

*Cytomegalovirus* (CMV) *Herpesvirales* takımında, *Herpesviridae* familyasının *betaherpesvirinae* alt ailesinde yer alır. CMV yaklaşık 200 nm çapında, kübik simetrlili, zarflı, lineer çift iplikli bir DNA virüsüdür. Enfeksiyonları tüm dünyada yaygın olarak her yaş grubunda görülür ve bağışıklık sistemi sağlam olan kişilerde çoğunlukla asemptomatiktir (1).

CMV, son yıllarda bağışık yetmezliği olan hastalarda neden olduğu ağır enfeksiyonlar nedeniyle önem kazanan ve bu hastalarda en sık rastlanan fırsatçı patojenlerden biridir. Bu tip hastalarda yaygın enfeksiyon ve komplikasyonların görülme olasılığı daha fazladır. Organ nakli alıcılarında CMV enfeksiyonunun sıklığı ve şiddeti; transplantın tipine, bağışlanan organın kaynağına, alıcının immün durumuna ve immünsüpresif tedavinin süresine bağlı olarak değişmektedir. CMV enfeksiyonu, özellikle pnömoni ile ilişkili olduğunda, hematopoetik kök hücre transplantasyonundan sonra önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (1, 2).

CMV enfeksiyonlarını önlemek ve gelişen CMV hastalıklarını tedavi etmek için etkili antiviral ilaçlar bulunmaktadır. Gansiklovir, valgansiklovir, valasiklovir, sidofovir ve foskarnet; profilaksi, preemtif tedavi ve transplant alıcılarında CMV hastalığı tedavisi gibi çeşitli durumlarda kullanılmaktadır. Gansiklovir (GCV) CMV'ye bağlı enfeksiyonlarda morbidite ve mortaliteyi belirgin şekilde azaltmaktadır ve tedavide ilk seçenektir (1, 3).

CMV'nin antiviral ajanlara duyarlılığını test etmek için birçok fenotipik ve genotipik test bulunmaktadır. Fenotipik testler arasında plak redüksiyon testi (PRA), DNA hibridizasyonu ve boya tutulumu testi gibi yöntemler yer alır. Genotipik testler ise dizi analizi, pirosekanslama, *in vitro* ters hibridizasyon, line prob assay (LiPA) ve tek nükleotid polimorfizm analizidir (SNP). CMV antiviral duyarlılık testinde altın standart yöntem PRA'dır. Ancak fenotipik testlerin zorlukları nedeniyle genotipik testler daha çok tercih edilmektedir. GCV direnci, ilacın hücre içi fosforilasyonunu sağlayan UL97

protein kinaz geninde veya UL54 DNA polimeraz geninde mutasyona bağlı olarak görülmektedir. UL97'deki mutasyonlar GCV direnci ile ilişkili ve UL54'teki mutasyonlar ise GCV, foskarnet ve sidofovir direnci ile ilişkilidir (4, 5, 6).

Bu çalışmada; kemik iliği transplantasyon (KİT) nitesi ve hematoloji kliniklerinde takip edilen hastalardan elde edilen CMV suşlarında antiviral ilaç direncinin UL97 ve UL54 gen bölgelerinde DNA dizi analizi yöntemiyle araştırılması amaçlandı.





## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. CYTOMEGALOVIRUS

#### 2.1.1.Tarihçe

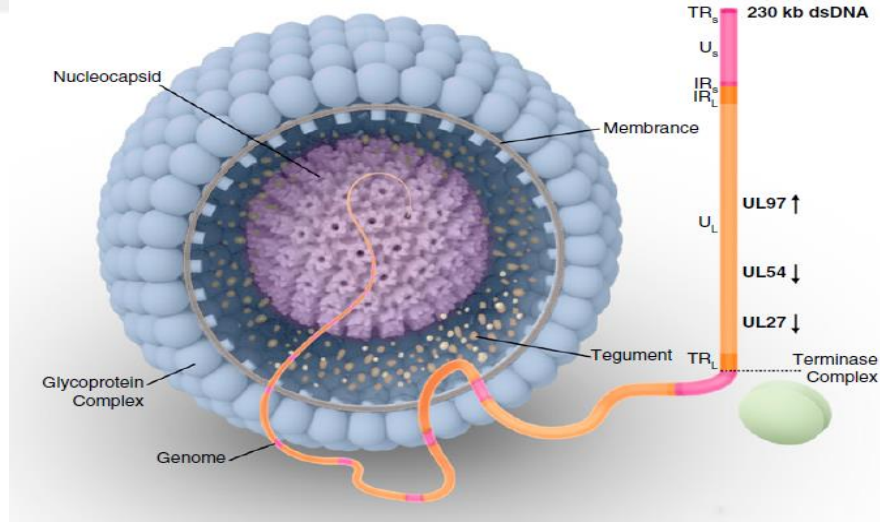
CMV enfeksiyonlarının tipik intranükleer inklüzyonları Alman bilim adamları tarafından 1881 yılında fark edilmiş ve protozoa olduğu düşünülmüştür. Bu büyük hücrelerin çekirdeklerinin, berrak halo ile çevrelenmiş bir “merkezi nükleer cisim” içerdiği görülmüştür. Lowenstein, Ribbert’in laboratuvarında çalışırken 30 infantın dördünün parotis bezinde benzer hücreler görmüştür. Bunlar, intranükleer inklüzyonları olan tipik sitomegalik hücrelerin ilk tanımlarıdır. Von Glahn ve Pappenheimer; Lipschuetz’in, herpes zoster ve herpes genitalis ile enfekte olmuş insanlardaki lezyonlarda intranükleer inklüzyon içeren hücre keşfettiğini belirtmişlerdir. Bu intranükleer inklüzyonları olan hücrelerin, şimdi *Herpesviridae* olarak bilinen bir grup virüsle ilişkili olabileceğinin ilk göstergesiydi. Farber ve Wolbach, çeşitli nedenlerden dolayı ölüm sonrası incelenen 183 çocuğun 26’sının tükürük bezlerinde bu tür inklüzyon taşıyan hücreleri bulmuşlardır. Bu, CMV enfeksiyonunun oldukça sık olduğu gerçeğini düşündürmüştür. CMV 1956’da ilk olarak Smith tarafından farede izole edilmiştir. Daha sonra Smith, Rowe ve Weller liderliğinde birbirinden bağımsız üç farklı araştırma grubu HCMV’ü ilk kez tükürük bezinden izole ederek göstermişlerdir. İlk izole edildiği doku nedeniyle ‘salivary gland virus’ ya da sitomegalik inklüzyon virüs olarak isimlendirilmesini takiben bu isim 1960 yılında yerini ‘*cytomegalovirus*’a bırakmıştır (3, 7, 8).

### 2.1.2. Sınıflandırma

'International Committee on Taxonomy of Viruses' tarafından İnsan Herpesvirüsü 5 (HHV-5) olarak tanımlanan CMV; *Herpesviridae* ailesinin bir üyesidir. *Herpesviridae* ailesinin içinde *herpes simplex* virüsü 1 (HHV-1) ve 2 (HHV-2), *varisella-zoster* virüsü (HHV-3), *Epstein-Barr* virüsü (HHV-4) ve insan herpesvirüsleri 6, 7 ve 8 yer alır. CMV; *Herpesvirales* takımında, *Herpesviridae* familyasının *Betaherpesvirinae* alt ailesinde sınıflandırılır. Virüsün adı, virüs tarafından enfekte edilen hücrelerin büyümesinden (*cyto*:hücre, *mega*:büyük) kaynaklanmaktadır (1, 3, 9).

### 2.1.3. Virüsün Genel Özellikleri

CMV, insan herpesvirüs genomlarının en büyüğüne sahiptir. CMV partikülü 120-200 nm çapa sahiptir ve 220-240 kb doğrusal çift iplikli DNA genomu içeren bir kor, 162 kapsomer içeren ikozahedral kapsid, amorf tegument ve onları çevreleyen fosfolipid açısından zengin zarftan oluşmaktadır (1, 3). CMV'nin morfolojik yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.

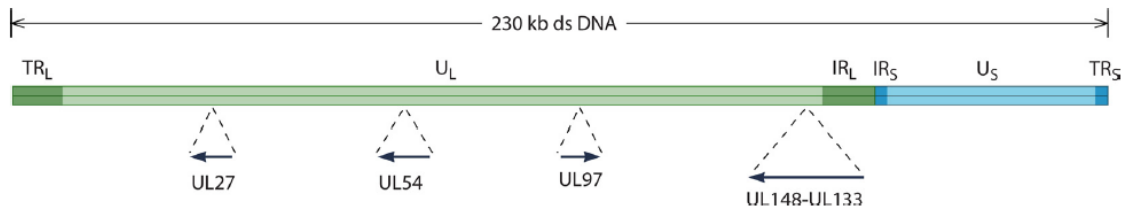


Şekil 1. CMV'nin morfolojik yapısı

Kapsid majör ve minör olmak üzere iki ana yapı proteini içerir. Majör kapsid proteini (pUL86) yapısal olup, minör kapsid proteini (pUL46) DNA ile birleşir. Ayrıca pUL80,

kapsidle ilgili bir 'assembly' proteini olup, assemblin adını alır. Assemblin virüsün hücreden olgunlaşmasında rol oynar. Zarf en az 6 adet glikoprotein içerir. Bu glikoproteinlerden en önemlileri gB (glikoprotein B) ve gH (glikoprotein H)'dir. gB (gpUL55) virüsün hücreden hücreye geçişinde ve füzyonda, gH ise virüsün konak hücreye adezyonunda önemlidir. Tegüment kısmında matriks proteinleri yer alır. Matriks proteinlerinin fonksiyonları henüz tam anlaşılamamış olmakla beraber; pp65 (ppUL83) protein kinazların yaptığı fosforilasyonun ana hedefidir ve antijenemi testinde saptanan proteindir; 'lower matriks proteini' olarak da bilinir ve sitotoksik T lenfositler için en önemli hedefdir. pp65 proteini, immün sistemi baskılanmış hastalarda CMV viremi sırasında lökositlerde ve endotelial hücrelerde saptanır. Diğer bir fosfoprotein ise 'upper matriks protein' olarak adlandırılan tegüment proteini ppUL82 (pp71) çok kuvvetli bir transaktivatördür. Fosfoprotein UL32 (p150), ppUL44 (p52), ppUL80 (p38) ve ppUL57 (p130) immünojenik olup, serolojik tanıda yarar sağlar (1, 3).

CMV genomu, yapısal ve düzenleyici proteinler ile konakçının bağışıklık sistemini modüle eden proteinleri kodlayan, 200'den fazla açık okuma bölgesinden (open reading frame: ORF) oluşur (1). CMV genomu, ters tekrar dizileri ile sınırlanmış UL (Unique Long) ve US (Unique Short) olarak adlandırılan iki bölgeden oluşur. ORF'ler buldukları bölge (UL veya US) ve sayısal sıra ile adlandırılır (4). CMV DNA genomunun yapısal komponentlerinin haritası Şekil 2'de görülmektedir.



Şekil 2. CMV DNA genomunun yapısal komponentlerinin haritası (4).

### 2.1.3.1. CMV'nin Replikasyonu

Viral replikasyon, konakçı hücrenin çekirdeğinde meydana gelir ve en erken, erken ve geç gen sınıflarının ifadesini içerir (1, 3, 9). CMV replikasyonu diğer herpesvirüsler ile ortak özellik taşır. Viral DNA'nın kapsid içine yerleşmesi hücre çekirdeğinde

gerçekleşir. Viral zarf ise konak hücre çekirdek zarından kazanılır. Prodüktif enfeksiyon değişik derecelerde hücre harabiyetine neden olur. Latent enfeksiyonda ise hücre harabiyeti yoktur, viral genom sirküler yapıdadır ve viral antijenlerin bir kısmı eksprese edilir (1, 10).

CMV replikasyonunda ilk aşama virüsün zarf glikoproteinleriyle hücre yüzeyine tutunması ve penetrasyonudur. CMV, hücrenin birçok reseptörünü kullanarak tutunur ve adsorbe olur. İlk tutunma ve adsorbsiyonda, heparan sülfat ve gH zarf proteini ile hücrede bulunan 92 kilodalton (kDa) reseptörü arasındaki ilişki önemli rol oynar. Virüsün hücreye alınması, viral zarf ile hücre membranı arasındaki direkt füzyon olayı ile meydana gelir. Füzyon, bütün *Herpesviridae* ailesi üyelerinde korunmuş olan bazı glikoproteinler tarafından yönetilmektedir. Füzyon süreci tamamlandıktan sonra sitoplazmada serbest kalan nükleokapsid, tübülün mikrotübül ağı üzerinden nükleer pora taşınır. Nükleusa girer girmez lineer formdaki viral genom sirküler hale gelir ve transkripsiyon başlar. Transkripsiyon üç ana fazda gerçekleşir. İlk olarak düzenleyici tegument proteinleri tarafından 'en erken' veya ' $\alpha$ ' genlerinin transkripsiyonu başlatılır. Bu fazda sentezlenen proteinler esas olarak transkripsiyon aktivatörleri olarak fonksiyon görürler. Sitoplazmada sentezlendikten sonra nükleusa taşınan bu proteinler bir yandan 'erken' ve 'geç' genlerin transkripsiyonunu stimüle ederken, bir yandan da 'en erken' genlerin transkripsiyonunu baskırlar. Transkripsiyonun ikinci aşamasında, birçoğu viral DNA replikasyonunda ve protein fosforilasyonunda önemli olan enzimleri (DNA polimeraz gibi) kodlayan 'erken' veya ' $\beta$ ' genler ve en son aşamasında da çoğunluğu viriyonun yapısal proteinleri (zarf glikoproteinleri ve nükleokapsid proteinleri) olarak görev yapan proteinleri kodlayan 'geç' veya ' $\gamma$ ' genler transkripsiyona uğrar. Hücrenin enfeksiyonundan 4-9 saat sonra, erken genlerin ekspresyonu maksimum düzeye ulaşır. Geç genlerin ekspresyonları ise viral DNA sentezi başladıktan sonra maksimum düzeye ulaşır. Viral DNA replikasyonu, replikasyon siklusunun kritik bir aşaması olup erken fazda sentezlenen DNA polimerazın kontrolü altındadır. Viral genomlar, 'rolling circle' mekanizması ile sentezlenirler. Bu replikasyon mekanizması sonucu konkatemerik DNA'lar ortaya çıkar. Sentezlenen viral genomların kapsidle çevrelenmesi ve nükleokapsidlerin oluşumu sırasında belirli bazı enzimler konkatemerik DNA'nın hedef sekanslarına bağlanıp onu, her bir kapsid içine bir viral genomun girmesini sağlayacak

şekilde bölerler. Kapsid proteinleri sitoplazmada sentezlenip otokatalitik bir mekanizma ile bir araya toplandıkları nükleusa taşınırlar. Nükleusta kapsid, viral genom ile bir araya toplanır. DNA'yı içine alan nükleokapsidler çekirdek zarından zarflarını alarak perinükleer sisternalardan tomurcuklanır ve sitoplazmik veziküller içinde hücre zarına taşınır, ekzositozla salınırlar (3, 11, 12).

Replikasyon yaklaşık 48-72 saat sürer. En erken gen ürünlerinin ekspresyonu hızlı olmasına rağmen, erken ve geç gen ürünlerinin ekspresyonu ise 24-36 saat sonra başlar ve 72-96 saat sonra en yüksek düzeye ulaşır. CMV replikasyonu gerçekleşen hücreler; farklılaşmış insan hücreleri, deri ve akciğer fibroblastları, aktive olarak makrofajlara farklılaşmış monositlerdir (1, 12).

#### **2.1.3.2. Fiziksel ve Kimyasal Ajanlara Direnç**

CMV düşük pH, lipid çözücüler, antikoagülanlar ve ısı gibi fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı çok dayanıklı değildir. CMV %20'lik eter solüsyonunda 2 saatte, 56°C'de 30 dakikada ve UV ışığında 5 dakikada inaktive olur. CMV'nin 37°C'de yarı ömrü 60 dakikadır. CMV sodyum hipokloridin %10'luk solüsyonuna duyarlıdır. CMV vücut dışında yaşamaya dayanıklı değildir. Viral titre dondurup çözme ile düşmektedir. Sıvı nitrojen tankında güvenle saklanabilir. Diğer herpesvirüslere kıyasla -20 °C'a dayanıklılığı daha azdır; -70 °C'da saklanması gerekmektedir (1).

#### **2.1.4. Epidemiyoloji**

CMV, dünya çapında bir dağılıma sahiptir ve mevsimsel ya da epidemik özellik olmadan, her yaşta insanı enfekte eder. CMV seroprevalansı yaşla birlikte artar ve oranı %40-100 arasında değişir. Prevelans, toplumların gelişmişlik düzeyleri ile ilişkili olarak farklılık göstermektedir. Avrupa, Avustralya, Kuzey Amerika ülkelerinde seroprevalans düşük, Afrika ve Güneydoğu Asya, Güney Amerika ve Hindistan'da ise okul öncesi dönemde çocukların %90'dan fazlası seropozitifdir (1, 3).

Virüs hayatın erken dönemlerinde edinilir ve prevalansı kalabalık yaşam koşullarına sahip düşük sosyoekonomik gruplar arasında en yüksektir. CMV vertikal ve horizontal olarak bulaşabilir. CMV enfeksiyonları doğumdan önce (konjenital), doğum sırasında (perinatal) ve hayatın ileri yıllarında (postnatal) kazanılanlar olarak sınıflandırılabilir. Enfeksiyonların çoğu virüsü saçan kişilerle yakın kişisel temasla kazanılır. CMV;

tükürük, idrar, anne sütü, gözyaşı, dışkı, vajinal ve servikal sekresyonlar, kan ve semen dahil olmak üzere birçok vücut sıvısında tespit edildiği için; bulaşma çeşitli yollarla olabilir. Konjenital veya edinsel CMV enfeksiyonundan sonra virüsün uzun süre saçılması virüs yayılımına katkıda bulunur; virüs, primer enfeksiyonu takiben haftalar, aylar veya hatta yıllar boyunca vücuttan atılabilir (1).

Gebelerde primer veya tekrarlayan enfeksiyonu takiben transplasental enfeksiyon ortaya çıkabilir, ancak CMV'nin fetusa bulaşma riski ve semptomatik fetal enfeksiyon oranı primer maternal enfeksiyonda çok daha yüksektir. Gebeliğin ilk 12-16 haftası arasında enfeksiyon ortaya çıkarsa, fetal hasar insidansı en yüksektir. Anne, hastalığı ateş ve nonspesifik semptomlarla hafif geçirebilir, çoğu gebede klinik belirgin değildir. Yenidoğanlar doğum anında virüsle temas ederek doğum sırasında da enfeksiyona yakalanabilirler. Kadınların yaklaşık %10'u doğum anında ya da doğuma yakın dönemde genital bölgede CMV taşımaktadırlar ve yeni doğanların yaklaşık %50'sine virüs bulaşmaktadır. Bu bebeklerde 3-12 haftalıkken virüsün salınımı başlar ama genellikle asemptomatik olarak kalırlar. CMV'nin anneden infanta anne sütüyle bulaşması çok yaygındır; düşük doğum ağırlıklı preterm infantlar, hastalık gelişimi açısından en büyük riske sahiptirler. Gündüz bakım merkezlerine giden ve yeni yürümeye başlayan çocukların %20-70'i, 1-2 yıl içinde CMV enfeksiyonu geçirirler. Enfeksiyon genellikle asemptomatiktir. Ancak çocuklar virüsü ebeveynlerine ve diğer bakıcılarına bulaştırabilirler ve bu sırada anne hamile ise bu enfeksiyon fetüs için bir risk oluşturur. Sağlık çalışanları ve gündüz bakım merkezlerinin çalışanları mesleki maruziyet riski altındadır. Adolesanlarda ve erişkinlerde, CMV'nin cinsel yolla bulaşma meydana gelebilir ve bu bulaş CMV yayılımında önemli bir yoldur. Diğer herpesvirüs enfeksiyonlarına benzer şekilde, primer CMV enfeksiyonu, persistan veya latent enfeksiyon ile sonlanır. Virüs çeşitli dokular, endotel hücreleri ve lökositlerde latent olarak kalabilir. Bu nedenle CMV, kan ürünlerinin transfüzyonu veya transplantasyon sırasında doku ve hematopoetik kök hücrelerine maruziyet ile bulaşabilir. Farklı uyaranlara, özellikle immünoşüpresyona yanıt olarak virüs reaktivasyonu olabilir (1).

Solid organ ve kemik iliği/kök hücre transplantasyonlarından sonra görülen fırsatçı enfeksiyonların birinci sıklıkta nedeni, CMV'dir. Transplantasyondan sonra primer CMV enfeksiyonuna bağlı CMV hastalığı gelişme riski %40-60 civarındadır. En riskli

durum alıcının seronegatif, vericinin seropozitif olmasıdır. Proflaktik antiviral tedavi yapılmadığında, allojenik KİT alıcılarının yaklaşık %50'sinde aktif enfeksiyon, %20-25'inde de CMV hastalığı gelişir. CMV enfeksiyonu ve hastalığı gelişme riski, otolog transplantasyon sonrasında en düşüktür (3).

### **2.1.5. Patogenez ve İmmünite**

CMV, çeşitli dokuların tutulduğu yaygın bir enfeksiyona yol açar. Virüs, tükürük bezi, fibroblastlar ve duktal epitel hücrelerini enfekte eder. Tükürük bezi tutulumu genellikle kronik olup bebek ve çocuklarda sıktır; yaşla birlikte azalır. CMV, litik bir virüstür ve sitomegalik hücrelerle karakterize sitopatik etkiye neden olur. Enfekte hücreler ve nükleuslarında belirgin genişleme olur. Sitoplazmanın genişlemesi ise daha azdır. Perinükleer sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri ve intranükleer inklüzyonlar görülür. Çok çekirdekli dev hücreler oluşur. Çekirdekte oluşan inklüzyonlar bu virüse özgü bir görünüm oluşturur. Etrafı boşlukla çevrelenmiş çok sayıda inklüzyon cisimciğinin oluşturduğu bu görünüm tipik nişan tahtası ya da baykuş gözüne benzetilir ve 'owl eye' inklüzyon cisimcikleri olarak adlandırılır (3).

CMV, lökosit ve kemik iliği hücrelerinde latent enfeksiyona neden olur ve kan transfüzyonu ve organ transplantı ile ilişkili enfeksiyonlardan sorumludur. CMV enfeksiyonunda en önemli nokta latent virüs reaktivasyonudur. Kritik olarak önemli olan bu fonksiyonun, yaklaşık 24 saat süren üç ayrı aşaması vardır: bunlar henüz ifade edilmemiş genleri düzenleyen proteinlerin üretildiği ve bu süreçte kritik nokta olan erken faz, viral DNA polimeraz ve diğer proteinlerin sentezi ile sonuçlanan erken faz ve ana yapısal proteinlerin sentezlendiği ve tamamlanan virüsün toplandığı ve salındığı geç fazdır (13).

Normal konaklarda 4-8 haftalık inkübasyon döneminden sonra CMV mononükleoz tablosu oluşabilir. Ancak normal konaklarda CMV enfeksiyonlarının çoğu subkliniklidir. Primer CMV enfeksiyonunda hücrel immünite baskılanır ve aylar sonra normale döner. Normal konakta primer CMV enfeksiyonunu takiben virüs latent olarak kalır. CMV vücutta çok çeşitli bölgelerde latentlik gösterebilir. Latentlik mekanizması ve bölgeleri tam olarak anlaşılamamıştır. Virüsün monosit/makrofaj, lenfositler, nötrofil lökositler, böbrek epitel hücreleri, vasküler endotel hücreleri ve tükürük bezlerinde

latent kaldığı düşünölmektedir. CMV hastalığının patogeneğinde; virüsün hücreye bağımlı yapısı, sistemik kan dolaşımı ile tüm vücuda yayılması ve monositotropik karakterde olması önemlidir. Normal konakta primer CMV enfeksiyonunu takiben uzun süreli immünite gelişerek viral persistansı kontrol eder. Geçirilmiş enfeksiyonun en iyi göstergesi humoral immüniteyken, CMV' ye karşı en önemli konak savunması hücre sel yanıtıdır (3, 14).

Primer CMV enfeksiyonu immün yetmezliği olan konaklarda normal konaklara göre daha ağır seyreder. Solid organ ve KİT alıcıları, kemoterapi alan kanser hastaları ve AİDS'li hastalar, CMV hastalığı açısından en yüksek riske sahiptir. CMV enfeksiyonu; herhangi bir semptom olmaksızın hasta örneklerinde virüsün izole edilmesi, viral antijenlerin, viral DNA'nın veya anlamlı antikor yanıtının saptanmasıdır. CMV sendromu; genellikle ateş, iştahsızlık, halsizlikle başlar, bazen 3-4 hafta süren ateş tek bulgu olabilir. Myalji, artralji ve artrit gelişebilir, lenfadenopati ve splenomegali nadirdir. Hematolojik olarak lökopeni ve trombositopeni vardır. CMV sendromu kendiliğinden iyileşir veya ardından organ tutulumuna bağılı lokalize enfeksiyonlar ve bunlara ait klinik bulgular belirir (3, 14). CMV hastalığı ise, CMV enfeksiyonu gelişmiş bireylerde görölen semptomatik tablodur; pnömoni, hepatit, kolit, retinit ve meningoensefalit gibi hastalıklar ortaya çıkar. Transplantasyon sonrası CMV hastalığı gelişiminde en önemli risk faktörü primer CMV enfeksiyonudur; CMV seropozitif vericiden CMV seronegatif alıcıya organ nakli sonrası sonrasında gelişir. CMV seropozitif alıcılarda gelişen reaktivasyon ya da reenfeksiyon şeklindeki sekonder enfeksiyonlar, immünolojik belleğin yardımıyla viral replikasyonun sınırlanabilmesi nedeniyle genellikle asemptomatik ya da hafif seyreder. Bununla birlikte immün yetmezlik derecesine ve kullanılan tedavi rejimine (siklosporin, takrolimus, kortikosteroidler, vb.) bağılı olarak CMV hastalığı gelişebilir. İmmün yetmezliği olan seropozitif olgularda latent virüsün reaktive olması aktif CMV enfeksiyonu olarak tanımlanır ve en kritik basamaktır. CMV seronegatif alıcılarda gelişen primer CMV enfeksiyonu ise, immünolojik belleğin yokluğu ve viral replikasyonun sınırlanamaması nedeniyle sıklıkla şiddetli hastalık tablolarına yol açar (14). Transplantasyon sonrası CMV hastalığı sıklıkla ilk 3 ayda göröür. CMV reaktive olduktan sonra, dolaşımdaki lökosit özellikle granülositlerde, klinik ortaya çıkmadan önce saptanır ve enfekte



lökositlerle vücudun çeşitli organlarına taşınır. Virüsün kanda yayılımı hem primer hem de reaktivasyon patogeneğinde önemlidir (3).

CMV'ye karşı bağışıklık hem hücresel hem de humoral bağışıklığı kapsamaktadır.

**CMV'ye karşı humoral bağışıklık:** Virüs zarfının dış kısmı glikoproteinlerine karşı koruyucu antikorlar glikoprotein B ve glikoprotein H'e karşıdır. Bu proteinlere karşı antikorlar virüsü nötralize eder (14).

**CMV'ye karşı hücresel bağışıklık:** Konağın enfeksiyonu kontrol altına almasında humoral bağışıklıktan daha önemlidir. Çeşitli gen ürünlerine karşı gelişebilir ancak çoğu virüsün pp65 diye anılan fosfoproteinine karşıdır. Lenfosit ve monositlerde metabolik bozukluğa yol açarak, bu hücrelerin sitokin üretimini ve sitokin yanıtını azaltır. Antijene özgül sitotoksik T lenfosit fonksiyonlarını baskılayarak, T lenfosit alt gruplarını etkiler ve CD4+/CD8+ hücre oranının tersine dönmesine neden olur (3, 14, 15). Human immunodeficiency virus (HIV) enfeksiyonunda hem latent CMV reaktivasyonu hem de farklı CMV suşlarıyla reaktivasyon görülebilir ve ileri evrelerde aktif CMV enfeksiyonu çok sıktır. CMV'nin CCR5 benzeri bir  $\beta$  kemokin reseptörü (US28) kodladığı ve bu reseptörün HIV'in hücrelere girişinde kofaktör olarak rol oynadığı bildirilmektedir. Edinilmiş bağışık eksikliği sendromu (AIDS)'li olguların otopsilerinde sıklıkla tüm organlarda CMV saptanır. CMV'ye bağlı morbidite CD4+ T hücre sayısındaki süpresyonla ilişkilidir (14).

### **2.1.6. Klinik Bulgular**

CMV enfeksiyonları yaygındır. Genellikle sağlıklı çocuklarda ve yetişkinlerde asemptomatiktir. Ancak, yenidoğanlardaki ve bağışıklık sistemi baskılanmış konakçılarda hastalığın sıklığı ve spektrumu, bu virüsü önemli bir insan patojeni yapar (1).

#### **2.1.6.1. Normal konakta CMV enfeksiyonları**

CMV enfeksiyonu olan bağışıklık sistemi sağlam çocuklar ve yetişkinlerin büyük çoğunluğu asemptomatiktir. Genç erişkinlerde görülen semptomlar, *Epstein-Barr* virüsünün neden olduğu enfeksiyöz mononükleoz sendromunu taklit edebilir. Uzun süreli ateş (2-3 hafta boyunca devam eder), halsizlik, atipik bir lenfositoz ve hafif

hepatit görülür. Heterofil antikor testi negatiftir. CMV ile ilişkili enfeksiyöz mononükleozda eksüdatif farenjit sıklıkla yoktur, lenfadenopati ve splenomegali ise daha az görülür. Kolit, hepatit, ensefalit, pnömoni ve anterior üveit gibi hastalıklar da bağışıklık sistemi sağlam olan konakçıda nadirdir (1, 3).

#### **2.1.6.2. Konjenital CMV enfeksiyonları**

CMV enfeksiyonu yenidoğan bebeklerin %0.2-2.5'inde saptanmıştır ve en sık rastlanan konjenital enfeksiyon sebebidir. Konjenital enfeksiyonu olan infantların yaklaşık %10-15'inde intrauterin büyüme geriliği, sarılık, hepatosplenomegali, peteşi, trombositopenik purpura, miyokardit, pnömoni, merkezi sinir sistemi anormallikleri, sağırılık ve koryoretinit gibi semptomlar görülür. Konjenital enfeksiyonu olan asemptomatik bebeklerde bile, ilerleyen zamanlarda sensorinöral işitme kaybı, görme bozukluğu veya psikomotor ve / veya santral sinir sistemi tutulumu gelişebileceği bilinmektedir (16).

Term ve preterm bebeklerde perinatal veya postnatal CMV enfeksiyonu; doğum sırasında vajinal sekresyonlara maruziyet, doğumdan sonra anne sütünün alınması ve kan transfüzyonu sonucu ortaya çıkabilir. Doğum sırasında kazanılan CMV enfeksiyonlarında diffüz visseral tutulum ve SSS hastalığı gelişmesi beklenmez (14). Yüksek riskli preterm yenidoğanlarda önemli morbidite ve mortalite nedeni olarak; hepatosplenomegali, nötropeni, trombositopeni, atipik lenfositoz, hemolitik anemi, pnömoni ve nekrotizan enterokolit görüldüğü bildirilmiştir. Gelişmiş ülkelerde konjenital CMV enfeksiyonlarının büyük bir kısmı primer maternal enfeksiyona bağlıdır. Yapılan son çalışmalar, primer veya maternal reinfeksiyonu takiben gelişen özellikle işitme kaybı gibi sekel oranlarının benzer olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, annede önceden var olan enfeksiyon ve CMV antikorunun gelişimi, bebekte önemli enfeksiyon riskini ortadan kaldırmayabilir (1).

#### **2.1.6.3. İmmün yetmezliği olan konaklarda CMV enfeksiyonu**

CMV enfeksiyonları, AIDS hastaları, kanser hastaları (özellikle lösemi ve lenfoma olan kemoterapi alan hastalar) ve solid organ ve hematopoetik kök hücre transplant alıcıları gibi, konjenital veya edinilmiş hücrel immün yetmezliği olanlarda sık görülmektedir. Bu hastalarda CMV enfeksiyonu primer veya latent virüs reaktivasyonu sonucunda oluşabilir. Semptomlar primer enfeksiyondan sonra daha şiddetli olma eğilimindedir,

ancak ciddi immün yetmezliği olan bir konakçıda reenfeksiyon da ciddi hastalığa neden olabilir. Aktif enfeksiyon genellikle transplantasyondan 1-4 ay sonra, immünsüpresyonun en yoğun olduğu zamanda veya HIV ile enfekte kişiler için CD4+ lenfosit sayıları 50-100 hücre/μl'nin altına düştüğünde ortaya çıkar. Transplantasyon sonrası profilaksi veya preemtif tedavi için antiviral ilaçların yaygın kullanımı geç başlangıçlı CMV hastalığının (transplantasyon sonrası >90 gün) ortaya çıkmasına neden olmuştur. Organ nakil alıcılarında CMV enfeksiyonunun sıklığı ve şiddeti değişkendir, transplantın tipine, bağışlanan organın kaynağına, alıcının immün durumuna ve immünsüpresif terapinin süresine bağlıdır. Bu hastalarda majör semptomlar genellikle ateş, halsizlik, uyuşukluk, miyalji veya artralji, lökopeni, trombositopeni ve hepatiti içeren nonspesifik “viral sendrom” şeklindedir. Spesifik organ hasarı, akciğer veya kalp-akciğer nakli alıcılarında pnömoni; kalp nakli sonrası miyokardit, retinit veya hızlandırılmış vasküler hasar ve ateroskleroz gelişimi; karaciğer ve pankreas nakli alıcılarında hepatit ve pankreatit ve her birinde ayrıca gastrointestinal hastalık görülebilmektedir. Bakteriyel ve fungal süperenfeksiyonlar gibi çeşitli komplikasyonlar sonucunda ölüm meydana gelebilir (1).

CMV enfeksiyonu, özellikle pnömoni ile ilişkili olduğunda, hematopoetik kök hücre transplantasyonundan sonra önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Pnömoni, özgül olmayan bulgularla birlikte tipik olarak kuru, nonproduktif öksürük ile karakterizedir. Akciğer grafisinde bilateral interstisyel patern görülür, unilateral lobar ve nodüler infiltrasyonlar olabilir (1, 14).

HIV ile enfekte hastalarda görülen CMV; ateş, retinit, ensefalit, poliradikülomiyelopati ve özofajit, gastrit ve ülseratif kolit gibi gastrointestinal enfeksiyonların önemli bir nedenidir. AIDS'li olgularda en sık CMV retiniti izlenmektedir. Retinal hücrelerde kalınlaşma ve ilerleyici retinal harabiyet sonucunda 4-6 ay sonucunda körlük gelişir. Ancak AIDS hastalarında aktif antiretroviral tedavinin başlanmasıyla, şiddetli CMV hastalığı önemli ölçüde azalmıştır (1,14).

## **2.1.7. CMV'nin Laboratuvar Tanısı**

### **2.1.7.1. Direkt İnceleme**

#### **2.1.7.1.1. Histopatolojik İnceleme**

CMV ile enfekte biyopsi veya otopsi materyalinin rutin kesitlerinde; bazofilik intranükleer inklüzyonları olan karakteristik büyük hücreler (sitomegalik hücreler) ve nadiren eozinofilik sitoplazmik inklüzyonlar, Wright-Giemsa, hematoksilen-eozin veya Papanicolaou ile boyamadan sonra görülebilir. Nükleer inklüzyon 'baykuş gözü' görünümüne sahiptir; çünkü sınırı belirgin bir kromatin içerir ve bu kromatinin etrafını çevreleyen açık alan nükleer membrana kadar uzanır. Histopatolojik testlerde karakteristik sitolojik değişikliklerin varlığı, CMV enfeksiyonunu düşündürmektedir ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemlerden daha az duyarlı olmakla birlikte, çoğu durumda aktif hastalık ile ilişkilidir. Genel olarak, CMV hastalığının histopatolojik tanısı zaman alıcı ve zahmetlidir. CMV antijenlerini saptamak için immünohistokimyasal boyama kullanılarak ya da CMV nükleik asitlerinin saptanması için *in situ* hibridizasyon yapılarak histopatolojik incelemenin duyarlılığı artırılabilir. CMV morfolojik değişiklikler yapmadan dokuları enfekte edebildiği için tipik sitomegalik hücrelerin bulunmaması CMV enfeksiyonu olasılığını dışlamaz; ek virolojik veya serolojik doğrulama yapılması önerilmektedir (1).

#### **2.1.7.1.2. Antijenemi Testi**

CMV antijenemi testi, CMV enfeksiyonunun erken teşhisi için duyarlı, özgül ve hızlı bir yöntemdir. Solid organ ve hematopoetik kök hücre transplant alıcıları, HIV ile enfekte hastalar ve immünomodülatör ilaçlar ile tedavi edilen hastalar gibi ciddi CMV hastalığı için yüksek riskli hastaların rutin olarak izlenmesi için kullanılabilir. Testin gerçekleştirilmesi nispeten basittir ve periferal kan lökositlerinin çekirdeğinde 65 kDa alt-matriks fosfoproteininin (pp65) immünohistokimyasal tespitine dayanan semikantitatif testtir. Bu test kullanılarak CMV, semptomların başlangıcından önce tespit edilebilir (1).

Pp65 proteini, bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların kanında dolaşan endotel hücrelerinde de bulunmuştur ve bazı araştırmacılar bu hücrelerin enfeksiyonunun organ tutulumu ve daha ileri hastalık ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Antijenemi testinin sonuçları, CMV DNA'nın tam kan, lökositler veya plazmada moleküler amplifikasyon testlerinde saptanması ile iyi korelasyon gösterir. Antijenemi testinin başlıca avantajları, kandan CMV'nin saptanması için konvansiyonel tüp veya shell vial hücre kültürlerinden daha duyarlı olması, testin 2-4 saat içinde tamamlanıp aynı gün sonuçlandırılması ve prosedürün viral yükün kantitatif ölçümü için kolaylıkla modifiye edilebilmesidir. Testin dezavantajları, özellikle fazla sayıda örnek olduğunda zaman alıcı ve zahmetli oluşu ve immünohistokimyasal teknikler konusunda deneyimli personel gerektirmesidir (1). Özellikle kemik iliği ve kök hücre transplantasyonlarının erken döneminde görülen nötropeni döneminde antijenemi testinin duyarlılığı azalmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için antijenemi testinde kullanılan kan miktarı arttırılabilir ve/veya tek bir preparat hazırlanabilir. Bu durumda viral genomun PCR gibi amplifikasyon teknikleri ile gösterilmesi daha yararlı olmaktadır (17).

#### **2.1.7.1.3. Moleküler Amplifikasyon**

Yıllar içinde moleküler amplifikasyon testleri, CMV enfeksiyonlarının tanı ve izleminde antijenemi testi ve diğer moleküler olmayan testlerin yerini almıştır. PCR; CMV DNA ve mRNA'ların saptanması için en çok tercih edilen ve yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemdir. Amplifikasyon; çok erken antijen (UL122-123 lokusu), majör çok erken antijen (UL122-123 lokusu), DNA polimeraz (UL54), glikoprotein B (UL55) ve H (UL75), pp65 (UL83), pp67 (UL65), US17, HXFL4, EcoRI D fragmanı, HindIII X fragmanı, pp150 tegument proteini (UL32), glikoprotein B ile majör çok erken antijen arasındaki bağlantı ve majör kapsid proteini (UL86) gen bölgelerinden çeşitli primer çiftleri ile gerçekleştirilebilmektedir (1).

Literatürde, CMV PCR için en yaygın hedefler arasında gB, en erken antijen, majör en erken antijen, US17, pp65 ve polimeraz genleri yer alır. Tüm primerler CMV DNA'yı amplifiye etmede eşit derecede duyarlı değildir. Bazı çalışmalarda en erken ve geç gen bölgelerinin ikisi de amplifiye edilerek veya tek gen bölgesinde nested primerler kullanılarak duyarlılık artırılmıştır. PCR; transplant alıcıları, AIDS hastaları ve konjenital enfeksiyonu olan bebeklerden alınan çeşitli klinik örneklerde CMV DNA

tespiti için başarıyla kullanılmaktadır. Ayrıca, immün sistemi baskılanmış hastaların izlemi ve antiviral ilaçların terapötik etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır (2,18).

CMV tanısında kullanılan PCR testinin aktif hastalık ile asemptomatik enfeksiyon veya latentlik arasında ayırım yapıp yapamayacağı ile ilgili endişe duyulmaktadır. Virüsün, CMV DNA ve CMV antijenlerinin aktif hastalığı olmayan bazı hastalarda da tespit edilebilmesi nedeniyle laboratuvar bulgularının yorumlanmasında sıkıntılar yaşanmaktadır. Ancak; CMV viremisi, CMV hastalığının en iyi prediktörü olarak kabul edilmektedir. CMV DNA; tam kan, saflaştırılmış periferik kan lökositleri, plazma ve serumda PCR ile başarıyla tespit edilmektedir (1, 2, 18).

PCR'ın duyarlılığı oldukça yüksektir. Ancak, CMV DNA'nın bu örneklerdeki kalitatif tespiti, semptomatik hastalığı öngörmeye ve immün sistemi baskılanmış hastalarda antiviral tedavinin başarısını izlemeye sınırlı değere sahiptir. CMV DNA, hastalığın yokluğunda PCR ile kanda saptanabilir ve semptomatik hastaların başarılı tedavisinden haftalar veya aylar sonra pozitif bulunmaya devam edebilir (1).

Transplantasyon alıcılarında aktif CMV enfeksiyonunun erken dönemde saptanarak preemtif tedavi ile viral yükün düşürülmesi CMV hastalığı gelişme riskini azaltmakta, hatta önlemektedir. Bu amaçla transplantasyondan sonraki dönemde hastalar CMV antijenemi testi veya CMV'ye ait nükleik asitleri saptamaya yönelik moleküler testlerle monitörize edilmektedir (19).

Ensefalit veya poliradikülomyeliti olan hastaların boyun omurilik sıvısı (BOS) örneklerinde, konjenital CMV enfeksiyonu tanısında idrar, doku, amniyon sıvısı veya kanda, CMV retiniti olan hastalarda aköz veya vitröz hümör örneklerinde ve CMV verici-pozitif, alıcı-negatif transplant hastaları gibi ciddi enfeksiyon riski yüksek olan hastaların kanında CMV'nin saptanması; kalitatif PCR'ın yararlı olduğu klinik durumlardır. Böylece, antiviral tedavi enfeksiyon seyrine göre erken başlanabilmektedir. Ayrıca, kanda kalitatif PCR'ın negatif sonucu, sistemik CMV hastalığını dışlamak için yüksek negatif prediktif değere sahiptir. Kalitatif PCR, ayrıca lokalize invaziv doku hastalığı olan immün yetmezlikli hastaların doku örneklerinde kullanılabilir. Negatif PCR sonuçları invaziv CMV doku enfeksiyonunun

olmadığını düşündürürken, pozitif sonuçlar anlamlı olmayabilir; klinik ve histopatolojik bulgular ile kandaki CMV viremisinin saptanması ile korele olmalıdır. Bu durumda, *in situ* hibridizasyon veya immünohistokimyasal boyama yardımcı olabilir. Antijenemi testine benzer şekilde, CMV hastalığının immün sistemi baskılanmış konaklarda öngörülmesi ve teşhis edilmesi için kandaki CMV DNA seviyesinin ölçülmesi gereklidir (20, 21).

Hedef ve sinyal amplifikasyon yöntemlerini içeren çok sayıda kantitatif ve semikantitatif moleküler test geliştirilmiştir. Genel olarak, moleküler yöntemler; antijenemi testi ile elde edilenlerle karşılaştırılabilir kantitatif sonuçlar sağlar, CMV enfeksiyonunu tespit etmek için kültürden daha duyarlıdır ve klinik semptomlar başlamadan önce CMV'yi tespit edebilirler. Aktif CMV hastalığına sahip olan transplant alıcıları ve AIDS hastalarının CMV DNA seviyelerinin daha yüksek olduğu ve CMV DNA kopya sayısındaki hızlı artışın semptomların ve tedavi sırasındaki ilaç başarısızlığının varlığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. CMV, PCR ile antijenemi testinden daha erken saptanabilir ve antijenemi testi negatif olduktan sonra da PCR pozitif olmaya devam edebilir. Ancak, antijenemi testinde düşük sayıda pozitif hücreli olan hastalar için negatif PCR sonuçları da bildirilmiştir. Antijenemi testinde olduğu gibi, semptomatik hastalığı öngörmek ve preemtif tedavi başlamak için mutlak CMV DNA seviyeleri veya eşik değerleri belirlenmemiştir (1).

CMV enfeksiyonu olan hastaların BOS, amniyon sıvısı, doku ve idrarda CMV DNA düzeylerini belirlemek için kantitatif PCR yöntemleri tanımlanmıştır, ancak bu örneklerden CMV DNA'nın kantitatif olarak değerlendirilmesinin klinik uygunluğu için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (5, 22, 23).

Konjenital CMV enfeksiyonunda prognoz, yenidoğanın idrarındaki CMV miktarı ile doğrudan ilişkili olabileceği gösterilmiştir. AIDS hastalarının BOS'unda CMV DNA kantitasyonu, merkezi sinir sistemi bozukluklarının nedeni olarak, HIV veya diğer fırsatçı patojenlerin doğrudan etkilerinden ziyade CMV'ye bağlanmasına yardımcı olmaktadır. Genel olarak CMV DNA'nın saptanması ve ölçümü için gerçek zamanlı PCR testleri duyarlı, özgül, tekrarlanabilir testlerdir ve sonuçları bildirmek için gerekli zamanı önemli ölçüde azaltırlar. PCR testleri için daha az numune hacmi gerekir ve çok sayıda örnek verimli bir şekilde çalışılabilir, düşük lökosit sayısı olan nötropenik

hastalarda da çalışılabilmektedir. İlk uluslararası CMV standardı, 2010 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından geliştirilmiş olup piyasaya sunulmuştur ve ticari CMV DNA kitleri bu standarda göre kalibre edilmektedir (1, 24, 25).

Yakın zamanlarda geliştirilen dijital PCR, standartlara gerek duymadan doğrudan CMV DNA ölçümü ve viral yükün doğru ölçümünü kolaylaştırmak için bir kalibrasyon eğrisi kullanılması avantajına sahiptir. Moleküler yöntemler, CMV hastalığının hızlı bir şekilde teşhisini sağlamak, hastalık ve nüks riski taşıyan hastaları belirlemek, hastalığın ilerleyişini değerlendirmek, preemtif tedavinin başlatılmasını yönlendirmek, tedaviye yanıtı izlemek, viral direnç ve tedavi başarısızlığını tahmin etmek için kullanılan oldukça önemli testlerdir (1).

#### **2.1.7.2. Virüs İzolasyonu**

CMV tanısında hücre kültürü altın standart olarak kabul edilir ve CMV'nin replikasyonunu en iyi şekilde destekleyen insan fibroblastları kullanılır. Kabul edilebilir fibroblast kültürleri; insan embriyonik dokularından veya sünnet derilerinden hazırlanmaktadır. CMV izolasyonunda kullanılan WI-38, MRC-5 veya IMR-90 gibi fibroblast hücre kültürleri bulunmaktadır. Klinik örneklerde CMV'nin saptanması için konvansiyonel hücre kültürleri ve shell vial yöntemi kullanılmaktadır. CMV tanısında hücre kültürlerinin kullanımı, daha verimli olan kültür bazlı olmayan saptama metodlarının kullanım kolaylığı nedeniyle azalmıştır. Hücre kültüründe çoğu örnek sitopatik etkinin (CPE) görülebilmesi için en az 4 hafta boyunca incelenir (lökosit örnekleri için 6 hafta) (1).

Konvansiyonel hücre kültüründe CMV izolatları, karakteristik CPE ve konak hücre dağılımı temelinde tanımlanır. CPE'nin görülme zamanı ve dağılımı numunelerde bulunan virüs miktarına bağlıdır. Konjenital enfeksiyonlu yenidoğanın idrarıyla inokule edilen kültürlerde, CPE 24 saat içinde gelişebilir ve idrardaki virüs titresi çok yüksekse monolayerin çoğunu kapsayacak şekilde hızla ilerleyebilir. Daha yaygın olarak, genişlemiş ve yuvarlak hücrelerden oluşan CPE odakları, ilk hafta boyunca ortaya çıkar ve CPE'nin çevre hücrelere ilerlemesi yavaştır. Yaşlı bireylerin idrar veya solunum örneği kültürlerinde, CPE genellikle 2 hafta içinde ortaya çıkar. Lökosit kültürleri 3-6 hafta sonrasına kadar pozitif hale gelmeyebilir. CPE'nin klinik örneklerin hücre



kültürlerinde geç ortaya çıkması, virüsün hücre dışı sıvıya sınırlı bir şekilde salınmasından kaynaklanmaktadır. *Adenovirüs* ve *varicella-zoster* virüs gibi virüsler CMV'ninkinden ayırt edilemeyen CPE yapabilir, bu nedenle şüpheli CMV izolatları, monoklonal veya poliklonal antikolar kullanılan bir immünofloresan testi ile doğrulanırlar. Enfekte hücrelerin tipik nükleer floresansının görünümü, CMV'nin varlığını gösterir. Şüpheli izolatların doğrulanması için PCR veya diğer moleküler amplifikasyon yöntemleri de kullanılabilir (1).

Shell vial hücre kültürü, klinik örneklerde CMV'nin saptanması için hızlı kültür yöntemi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve çoğu laboratuvarında konvansiyonel hücre kültürünün yerini almıştır. Teknik, santrifüjleme işleminden sonra virüsün hücre kültürlerinde çoğaltılmasına dayanır ve CPE gelişmeden önce, CMV replikasyonunda erken dönemde üretilen viral antijenleri tespit eder. Örneklerde mevcut olan düşük virüs titreleri bile kolayca çoğaltılabilir ve 24 saat içinde tespit edilir. CMV erken antijenlerinin tespiti için monoklonal antikolar ticari olarak temin edilip kullanılabilir. Pozitif hücrelerde, kırmızı bir sitoplazmik zemine karşı sarı-elma yeşili floresan veren nükleuslar tespit edilir. Çok erken antijenin boyanması, mat sarıdan yeşile; benekler ise parlak sarıdan yeşile floresan verir. Viral inklüzyonlar (baykuş gözü) çekirdekte görülebilir. Shell vial hücre kültürünün önemli özellikleri hızlı, özgül ve duyarlı olmasıdır. Ancak uzman teknik personel gerektirir ve optimum performans için örneklerin ve reaktiflerin kalitesine dikkat edilmesi gerekir (1).

### **2.1.7.3. Serolojik Testler**

CMV IgM veya IgG antikolarının tespiti için duyarlık ve özgüllükleri yüksek çeşitli testler kullanılabilir. Hangi testin yapılacağına karar verirken, test edilecek örnek sayısı, hasta popülasyonu, ekipman ihtiyacı, çalışma süresi, uygulama kolaylığı ve maliyet gibi faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Seçilen yöntem, laboratuvarların ihtiyaçlarına göre değişmektedir. İndirek floresan antikor testleri, küçük kapasiteli olan laboratuvarlar için daha düşük maliyetli ve pratikken, Enzim Immunoassay (EIA) testleri yüksek sayıda numune kapasitesi olan laboratuvarlar için daha uygun olabilir. Serolojik tanıda, immün kompetan kişilerde CMV IgM antikolarının varlığı veya iki farklı serumda CMV IgG titresinde 4 kat artışın saptanması, akut enfeksiyon göstergesidir (3, 14). Ancak, immün yetmezlikli olgulardaki akut CMV

enfeksiyonlarının tanısında CMV IgM tayininin değeri yoktur, testin duyarlılığı düşüktür (26). Bu tip hastalarda akut enfeksiyon sırasında CMV IgM bazen saptanamamakta, bazen de akut dönem geçtikten sonra uzun süre pozitif kalmaktadır. Ayrıca CMV reaktivasyonu sırasında da pozitifleşmekte, dolayısıyla primer enfeksiyonun ayırt edilmesinde yardımcı olamamaktadır. CMV IgG tayini, doğurganlık çağındaki kadınların ve transplant alıcılarının primer enfeksiyona duyarlı olup olmadıklarının anlaşılmasında, epidemiyolojik çalışmalarda, serokonversiyonun takibinde ve avidite testlerinde gereklidir (14).

#### **2.1.7.3.1. ELISA (Enzyme Linked ImmonoSorbent Assay)**

Yıllar geçtikçe CMV antikor tayininde kullanılan diğer geleneksel yöntemlerin yerini ELISA almıştır. ELISA testinin avantajları hızlı, duyarlı ve özgül olmasıdır. Çok sayıda örnek nispeten düşük bir maliyetle ve günlük olarak çalışılabilir. CMV IgG tayininde immün yakalama prensibi ile çalışan ve rekombinant antijenler (p150, p38, p52, p130) içeren ELISA kitlerinin kullanılması duyarlılığı artırmaktadır (1).

#### **2.1.7.3.2. IFA (Immunofluorescence Assays)**

İndirekt IFA ve antikompleman IFA, CMV antikorlarını tespit etmek için yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. İndirek IFA'da; lama sabitlenmiş olan virüsle enfekte hücrelerle, hasta serum dilüsyonları inkübe edilir. Spesifik antikor-antijen kompleksleri izotiyosiyanat ile işaretli anti-human antikorunu kullanılarak floresan mikroskop ile tespit edilir. Antikompleman IFA ise indirek IFA'ya benzer; ancak farklı olarak hasta serumu ilk önce endojen kompleman aktivitesini gidermek için ısıtılarak etkisiz hale getirilir ve daha sonra lam üzerine eklenir. Eksojen kompleman eklenir ve oluşmuş olan spesifik antijen-antikor kompleksine bağlanır. Daha sonra floresan işaretli antikompleman antikorunu eklenir ve komplemanın C3 bileşenine bağlanır ve hazırlanan lam floresan mikroskopunda değerlendirilir. Kullanışlı ve ucuz bir yöntem olan IFA'nın, CMV antikorlarının kalitatif ve kantitatif tespitinde hızlı ve basit bir test olması avantajlarıdır. IFA sisteminin en büyük dezavantajları, preparatları incelemek için floresan mikroskop ve karanlık odaya ihtiyaç duyması; test sonuçlarını okumak ve yorumlamak için ise eğitilmiş bir çalışana ihtiyaç olmasıdır (1).

### 2.1.7.3.3. Anti CMV IgM Antikor Ölçümleri

CMV IgM antikorlarını ölçmek için ELİSA ve IFA kitleri mevcuttur ve yenidoğanlarda CMV enfeksiyonunun tanısında en faydalı olan test IgM antikor ölçümüdür. Yalancı pozitif ve yalancı negatif reaksiyonların varlığı bu testlerin bir eksikliğidir. Yalancı pozitif reaksiyonlar; çok yüksek düzeyde romatoid faktörle birlikte serumda spesifik Anti CMV IgG varlığında oluşur. Romatoid faktör genellikle IgM sınıfında olan ve IgG ile reaksiyona giren bir immünoglobulindir. Romatoid faktör bazı romatolojik hastalıklar, vaskülit ve CMV enfeksiyonu dahil bazı viral hastalıklarda üretilir. IgM romatoid faktörü, CMV'ye özgü IgG'yi de içerebilen IgG ile bir kompleks oluşturur. Daha sonra bu kompleks CMV antijenine bağlanır ve IgM'yi tespit etmek için tasarlanan bir test yanlış pozitif sonuç verebilir. Yanlış-negatif reaksiyonlar, yüksek seviyelerde spesifik IgG antikorları IgM'nin CMV antijenine bağlanmasını kompetitif şekilde engellediğinde oluşur. Bu nedenle hem yanlış pozitif hem de yanlış negatif IgM test sonuçlarının görülme sıklığını azaltmak için testten önce IgM ve IgG fraksiyonlarının ayrılması tavsiye edilmektedir. Serumdan romatoid faktör ve IgG moleküllerinin uzaklaştırılması için hızlı ve basit yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar, IgM'nin katı bir faza seçici olarak emilmesi ve hiperimmün antihuman IgG antikoruna, stafilokokal protein A'dan veya G grubu streptokoklardan elde edilen rekombinant protein G kullanılarak IgG'nin uzaklaştırılmasını içerir (1).

Yakın zamanlarda, ters yakalama solid-faz IgM testleri, yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçları önlemek için alternatif bir yaklaşım olarak kullanılmıştır. Bu yöntem, serum numunesinden IgM'yi yakalamak için anti-insan IgM antikoruna ile kaplanmış katı bir faz kullanır. Daha sonra IgG antikoruna ve immün kompleksler yıkanarak uzaklaştırılır. Bağlı IgM antikoruna daha sonra spesifik CMV antijenine maruz bırakılır ve bir enzimle işaretli ikinci antikor ve substrat eklenir (1, 27, 28). Her ne kadar CMV'ye özgü IgM'nin tespiti yakın zamanda geçirilen veya aktif enfeksiyonun belirlenmesinde faydalı olsa da sonuçlar dikkatli yorumlanmalıdır. IgM plasentayı geçemediğinden, enfekte bir yenidoğanın tek bir serum numunesinden elde edilen pozitif sonuç tanısaldır. Bununla birlikte, yenidoğanda IgM üretiminde eksiklik veya gecikme olabilir. Konjenital CMV enfeksiyonu olan yenidoğanların ancak %20-70'inde CMV IgM pozitif bulunmuştur (1, 29, 30). CMV'ye özgü IgM antikorunun yenidoğan dönemi

dışında test edilmesi genellikle tavsiye edilmez, çünkü IgM antikorunu hem primer hem de reaktif CMV enfeksiyonlarında görülebilir ve primer enfeksiyondan sonra uzun süre pozitif kalabilir. Bu durum, özellikle hamile kadınlar veya bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar için test sonuçlarının yorumlanmasını zorlaştırır. Yenidoğanlar gibi, bağışıklığı baskılanmış bireylerde IgM üretiminde gecikme olabilir veya önemli miktarda IgM antikorunu oluşturamayabilirler. Ayrıca *Epstein-Barr* virüsünün neden olduğu enfeksiyöz mononükleozlu hastalar heterotipik IgM üretebilir ve bu da yanlış pozitif CMV IgM test sonuçlarına neden olabilmektedir (1).

#### **2.1.7.3.4. CMV IgG Avidite Testi**

CMV'ye özgü IgG avidite ölçümleri; hamilelik sırasında CMV enfeksiyonundan şüphelenilen kadınlarda ve solid organ nakli alıcılarında primer enfeksiyonun primer olmayan enfeksiyonlardan ayrılmasında faydalı bulunmuştur. Primer enfeksiyondan sonraki ilk haftalarda CMV'ye özgü düşük aviditeli IgG üretilirken, geçirilmiş ya da primer olmayan enfeksiyonlarda daha yüksek aviditeli IgG antikorunu üretilir (1). CMV IgM pozitif kadınlarda düşük aviditeli CMV spesifik IgG antikorlarının bulunması, mevcut primer CMV enfeksiyonu tanısını desteklediği ve fetal enfeksiyonla ilişkisi konusunda prognostik değeri olduğu bildirilmektedir (31).

#### **2.1.7.3.5 Diğer Testler**

İndirekt hemaglutinasyon antikor, nötralizasyon testi ve kompleman fiksasyon gibi yöntemler, CMV antikorlarını ölçmek için kullanılan diğer serolojik testlerdir (1).

#### **2.1.8. Tedavi**

Gansiklovir, valgansiklovir, foskarnet, sidofovir ve fomivirsen gibi antiviral ilaçlar, immünyetmezlikli hastalarda, özellikle AIDS hastalarındaki CMV retinitinin tedavisi için Food and Drug Administration (FDA) onayı almıştır. Gansiklovir, valgansiklovir, valasiklovir, sidofovir ve foskarnet profilaksi, preemtif tedavi ve transplant alıcılarında CMV hastalığı tedavisi gibi çeşitli şekillerde kullanılmaktadır. İmmün sistemi normal erişkinlerde CMV enfeksiyonlarını tedavi etmek için antiviral ilaçların kullanımı nadiren endikedir (1).

**Gansiklovir:** 2'-deoksiguanozin analogu olan gansiklovir CMV DNA polimeraz için substrat görevi görür. Substrat görevi görmeden önce, gansiklovir aktif trifosfat şekline dönüşmelidir. Aktivasyon, gansiklovir-monofosfat fosforilasyonunu katalize eden CMV UL97 kinaz ile başlatılır. Sonraki bifosforilasyon ve trifosforilasyon konak kinazlarıyla yapılarak gansiklovir trifosfata dönüştürülür. Gansiklovir-trifosfatın DNA zincir uzamasına katılması, CMV DNA sentezini sonlandırır (32). CMV ile enfekte hücrelerde gansiklovir trifosfatın hücre içinde yarılanma ömrü 16.5 saat iken, bu süre asiklovir trifosfat için 2.5 saattir, ancak gansiklovir trifosfat hücre içinde asiklovir trifosfata göre 10 kat daha fazla konsantrasyonda bulunmaktadır. Bu sayede, CMV DNA polimeraz üzerine etkisi asiklovirden daha az olmasına rağmen, yüksek konsantrasyonu ve uzun yarılanma ömrü sayesinde, gansiklovir CMV replikasyon inhibisyonunda asiklovirden daha etkilidir (3). CMV tedavisinde onaylanan ilk antiviral ilaç olan gansiklovir, transplantasyon sonrası CMV'nin önlenmesi ve tedavisi için ilk basamak ilaçtır. Oral (valgansiklovir) ve parenteral (intravenöz ve intraoküler) formları mevcuttur; valgansiklovir %60 oranında biyoyararlanıma sahiptir. Bir valil ester ön ilacı olan valgansiklovir, hızlı bir şekilde emilerek; bağırsak ve hepatik esteraz yoluyla gansiklovire metabolize edilir. Pik plazma konsantrasyonuna 1-3 saatte ulaşır. Gansiklovir, glomerüler filtrasyon ve aktif tübüler sekresyon ile atılır; böbrek fonksiyonları bozuk olan hastalarda doz ayarı gereklidir. Gansiklovirin en sık görülen yan etkisi, öncelikle nötropeni olmak üzere kemik iliği süpresyonudur. Hastalarda döküntü, kaşıntı, ishal, bulantı, kusma ve serum kreatinin ve karaciğer enzimlerinde artış gözlenmiştir. Nörotoksisite oluşabilmektedir (33).

**Foskarnet:** Foskarnetin klinik kullanımı yüksek oranda nefrotoksik olması ve elektrolit bozukluklarına yol açması nedeniyle sınırlıdır. Nefrotoksik etkisi, foskarnet kristallerinin glomerüler kılcal lümen içinde birikmesinden kaynaklanır. Miyelosupresyon, mukozal ülserasyonlar, hipokalsemi, hipomagnezemi ve hipofosfatemisi gibi elektrolit bozuklukları yaygın olarak görülür. Bu nedenle, gansiklovire dirençli hastalar ve tedaviye yanıt alınamayan hastalarda önerilen ikinci basamak ilaç olarak kabul edilen foskarnet, esas olarak AIDS'li hastalarda CMV retinitisi tedavisindeki etkinliğine bağlı olarak onaylanmıştır. Yalnızca parenteral formda bulunur, metabolize edilmez ve plazma yarılanma ömrü 3.3-6.8 saattir. Pirofosfat

analoğu olan foskarnet, CMV DNA polimerazın pirofosfat bağlanma bölgesine bağlanarak inhibe eder ve uzayan DNA zincirine bir baz eklendiğinde meydana gelen pirofosfat değişimine müdahale ederek CMV DNA sentezini sonlandırır (32, 33).

**Sidofovir:** Sidofovir, sentetik asiklik deoksisitidin monofosfat analoğudur. Nefrotoksisite riski nedeniyle, sidofovir genellikle tedaviye yanıt alınamayan ve gansiklovire dirençli transplant alıcıları için kullanılmaktadır. CMV ve diğer herpes virüsleri dahil birçok DNA virüsüne karşı geniş etki spektrumuna sahiptir. Yalnızca parenteral (intravenöz) formu mevcuttur, ancak oral formu olan brinsidofovir klinik deneme aşamasındadır. Sidofovir'in plazma yarılanma ömrü 2.4-3.2 saattir, ancak hücre içi yarılanma ömrünün uzun (> 24 saat) olması uygulama sıklığını düşürmektedir (her 1-2 haftada bir). Sidofovir, glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyon ile elimine edilir. Sidofovir, etkisini CMV DNA polimerazı kompetitif olarak inhibe ederek gösterir ve antiviral aktivite gösterebilmesi için fosforile olması gereklidir. Hüresel kinazlar tarafından CMV DNA polimerazın bir substratı ile rekabet eden sidofovir-trifosfata fosforile edilir. Sidofovirin uzayan DNA zincirine eklenmesi, viral DNA sentezinin erken sonlanmasına neden olur (32, 33).

**Letermovir:** Yakın zamanda allojenik kök hücre nakli alıcılarında CMV profilaksisinde kullanım için onay almıştır. Solid organ transplantasyonu alıcılarında CMV'nin önlenmesi, asemptomatik CMV enfeksiyonu ve CMV hastalığının tedavisi için ise henüz onay almamıştır. Letermovirin oral ve intravenöz formları mevcuttur. Letermovir, CMV DNA terminaz kompleksini (UL51, UL56 ve UL89 tarafından kodlanır) inhibe ederek etkisini gösterir. Letermovir CMV için oldukça spesifiktir, diğer herpes virüslere karşı etkinliği yoktur. En yaygın yan etkileri bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı, periferik dem, öksürük ve halsizliktir. Letermovirin miyelotoksisite veya nefrotoksisite ile ilişkisi bulunmamıştır (32, 33, 34). *In vitro* alışmalar ile CMV terminaz kompleksinin UL56 geninde 229-369 kodonları arası ve nadiren UL89 ve UL51 genlerini içeren letermovir direnç mutasyon haritası belirlenmiştir. Deneysel alışmalar, letermovirin direnç için düşük genetik bariyere sahip olduğunu göstermektedir. UL56 geninde yüksek dereceli direnç mutasyonları *in vitro* ortamda kolayca seçilmektedir. Letermovir direncine sebep olan UL56 mutasyonlarının en sık 231-369 kodonları arasında görüldüğü bildirilmektedir (32, 34).

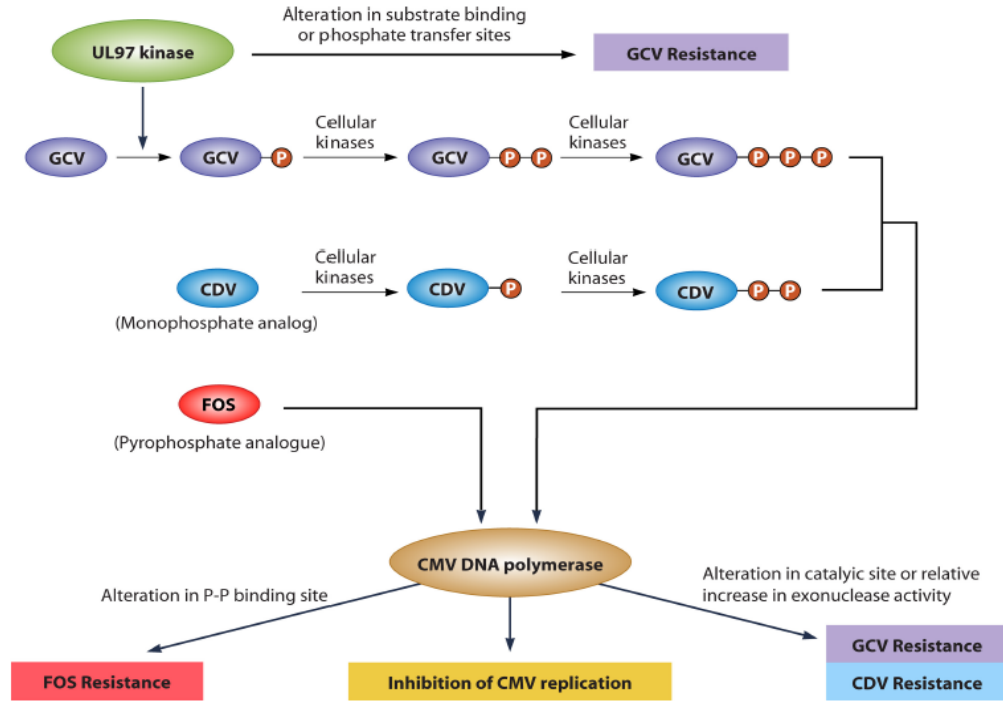
**Maribavir:** Maribavir, CMV'nin önlenmesi ve tedavisi için klinik denemelerden geçen oral olarak kullanılabilen bir benzimidazol ribozittir (33, 35). Maribavir, gansiklovir, foskarnet veya sidofovire dirençli CMV suşlarına karşı *in vitro* olarak aktiftir. Maribavir, UL97 aracılı fosforilasyon üzerinden; CMV DNA sentezi, viral gen ekspresyonu ve viral kapsid çıkışını önleyerek etki gösterir (36). Maribavir, Faz 1 çalışmalarında 2400 mg/gün'e kadar iyi bir güvenlik profili göstermiştir (37). CMV profilaksisi için maribavirin faz 2 doz artırma çalışmasında; (günde iki kez 400 mg'a kadar) allojenik KİT (AKİT) alıcılarında maribavir güvenli ve etkili bulunmuştur (38). Maribavir (günde iki kez  $\geq 400$  mg dozunda), KİT ve solid organ transplantasyonu alıcılarındaki dirençli CMV tedavisinde etkili; tedavi seçenekleri sınırlı olan ve allogreft reddi, fırsatçı enfeksiyon ve mortalite riski olan hastalar için ümit verici bir tedavidir (36).

**Valasiklovir:** Asiklovirin L-valil esteridir. Valasiklovir bir ön ilaçtır. Oral yolla alındıktan sonra, ince bağırsakta valin hidrolaz enzimi aracılığı ile asiklovire dönüşür (39). Böbrek transplant alıcılarında CMV hastalığının önlenmesi, oral ve genital herpes tedavisi, herpes zoster ve KİT alıcılarında HSV reaktivasyonunun önlenmesinde kullanılmaktadır (40).

**Fomivirsen:** Virüs replikasyonunu ve virüsün konak hücreye adsorbsiyonunu baskılar. Diğer tedavilerin yanıt vermediği veya kontrendike olduğu CMV retinitinde intravitreal tedavi olarak önerilmektedir (40).

**Brinsidofovir:** Araştırma amaçlı oral olarak bulunabilen bir lipid formülasyonu olan brinsidofovir'in nefrotoksisite etkisinin az olduğu ve klinik denemelerden geçtiği bildirilmektedir (32).

CMV tedavisinde onaylanan ilaçların etki mekanizması ve anabolizması Şekil 3'te gösterilmektedir.



Şekil 3. CMV’de kullanılan antiviral ilaçların etki mekanizması (4)

### 2.1.9. Antiviral Duyarlılık Testi

Antiviral ilaç tedavisine yanıtızsızlık farklı nedenlerle ortaya çıkabilmektedir. En yaygın neden, tedavi edilen virüsün, verilen ilaçlara dirençli olmasıdır. Antiviral duyarlılık testi dirençli popülasyonları belirleyip tedaviye rehberlik etmektedir. Antiviral ilaç direnci, ilacın viral replikasyonu inhibe etme etkisindeki düşüş olarak ifade edilebilir. Klinik olarak ilaç direnci, aktif tedaviye rağmen enfeksiyonlu hastada dolaşımdaki virüs miktarlarında bir değişiklik olmaması veya artış olması ile gösterilebilir. Duyarlılık, ilaç/virüs kombinasyonlarının fenotipik aktivitesini değerlendiren *in vitro* testlerle ölçülebilir. Virüs antiviral duyarlılığı etkileyen herhangi bir mutasyon barındırmasa bile hastaya ait fizyolojik faktörler ve ilaç etkileşimi gibi nedenlerle tedaviye cevapsızlık ortaya çıkabilir. İlaç tedavisi gören bireyler, çeşitli nedenlerden dolayı öngörülen antiviral rejimine uymayabilirler. Antiviral ilaçla tedaviye etkili cevap vermeme durumunun, gerçek antiviral dirençten, yani hastanın virüsündeki genetik değişikliklerden kaynaklandığını ayırt etmek önemlidir. Belirli bir antiviral ilaca klinik direnç, viral direnç olarak yanlış yorumlanabilir. Bu durumun fark edilmemesi, daha



yüksek test maliyetleri ile daha yüksek morbidite/mortaliteye yol açabilir ve daha fazla toksik ilacın uygunsuz kullanımına neden olabilir. Genel olarak, klinik durumu kötüleşen hastalarda sürekli veya artan viral yük, ortaya çıkan ilaç direncinin varlığı için güvenilir bir göstergedir (6).

Antiviral ilaç duyarlılık testi fenotipik veya genotipik yöntemlerle yapılabilmektedir. Test verilerinin yorumlanması, kombinasyon tedavisi alan kişiler için daha karmaşık olabilmektedir (6).

#### **2.1.9.1. Fenotipik Testler**

CMV antiviral duyarlılık testinde altın standart yöntem, plak redüksiyon testidir (PRA). PRA, antiviral ilacın önceden belirlenmiş ilaç konsantrasyonunda viral plakların üretimini inhibe etmesi esasına dayanır. Bu testte farklı ilaç konsantrasyonları altında viral inokulum inkübe edilerek plak oluşumunu %50 engellemek için gereken konsantrasyon belirlenir (IC50). Teknik standardize edilmemiştir ve sonuçlar, viral inokulum, hücre kültürünün durumu ve plakların sayılmasındaki doğruluk gibi teknik faktörlere bağlı olarak aynı izolat için laboratuvaradan laboratuvara değişir. Bu yöntem özellikle herpes virüsleri için kullanışlıdır. PRA gibi bir fenotipik yöntemin kullanımı, herpes virüsleri arasında antiviral dirence yol açıp açmadığı literatürde bildirilmemiş olan mutasyonların antiviral dirence etkisinin belirlenmesi için önerilmektedir (6, 41).

Diğer fenotipik testler; ‘yield reduction assay’, DNA hibridizasyon testi ve boya tutulum testi gibi yöntemlerdir (4).

#### **2.1.9.2. Genotipik testler**

Antiviral duyarlılık testi için kullanılan genotipik testler, dizi analizi, pirosekanslama, *in vitro* ters hibridizasyon, line prob assay (LiPA), real time PCR ve tek nükleotid polimorfizm analizidir (SNP). Genel olarak, bu testlerin maliyeti düşük olup, fenotipik testlerden daha hızlı sonuç vermektedir. Sekans analizi, antiviral direnç ile bağlantılı mutasyonları tespit etmek için daha sık kullanılmaktadır. Ayrıca antiviral dirençle ilgili yeni mutasyonları belirleme yeteneğine de sahiptir. Sanger dizileme, minör popülasyonun %20-25’in altında olması durumunda karışık virüs popülasyonundaki minör varyantı algılamaz (6).

CMV antiviral ilaç direnci mutasyonlarını taramak için şu anda FDA onaylı kit bulunmamaktadır. Sanger dizileme, gansiklovir ve diğer ilaç direnci ile bağlantılı CMV izolatlarındaki mutasyonları taramak için kullanılmaktadır. CMV'nin doğrudan kan, BOS ve kültür izolatlarından sekanslanması ilaç direncinin belirlenmesinde başarılı bulunmuştur. Genotipik testler, fenotipik testlerden çok daha hızlı sonuçlanır ve minimum viral yükü 1000 kopya/ml olan hasta numunelerinde, CMV antiviral ilaç direnci belirlenmesinde tercih edilir (6, 42, 43, 44).

CMV'de antiviral ilaç direnci UL97 (fosfotransferaz) ve UL54 (DNA polimeraz) gen bölgesindeki mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir. Gansiklovir direnci ile ilişkili mutasyonlar UL54 geni ve UL97 fosfotransferaz aktivitesine bağlı korunmuş alanları kapsayan bölge sekanslanarak belirlenebilir. Antiviral duyarlılıkla ilişkili yeni keşfedilen mutasyonlar, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda (örneğin transplant alıcıları) bildirilmektedir (45, 46). UL97 mutasyonlarının gansiklovir direnci; UL54 mutasyonlarının ise gansiklovir, foskarnet ve sidofovir direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir (6).

Genotipik analizlerde gözlenen mutasyonlar, fenotipik dirençten sorumlu olmayabileceği için genotipik antiviral direnç testinden elde edilen CMV dizisi verileri dikkatli yorumlanmalıdır. Örneğin, UL97'de tanımlanan çok sayıda kodon değişikliği antiviral ilaç direnci ile ilişkili değildir. Eğer literatürde desteklenmiyorsa veya klinikte ilaç etkinliği sağlanamadıysa, rekombinant fenotipleme ile tanımlanan mutasyonlar doğrulanmalıdır (4, 6, 47).

DNA dizi analizinde kullanılan yöntemler; Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi, Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi, Pirosekans yöntemi, Ligasyon yöntemi, Shotgun yöntemi ve Yeni nesil dizilemedir (48).

#### **2.1.9.2.1. Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi**

Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği bir yöntemdir. Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır. Yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. Bu yöntem için tek iplikli kalıp DNA, dNTP (deoksiribonükleozid trifosfat), ddNTP (dideoksiribonükleozid trifosfat), DNA

polimeraz ve primere ihtiyaç vardır. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin yanı sıra deoksiribozun 3'OH taşımayan ddNTP'leri de substrat olarak kullanmasına dayanır. Oluşan ürünlerin ayrıştırılabilmesi için yüksek rezolüsyonlu denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi kullanılır (48, 49).

Teknik olarak dizi analizi 3 basamaktan oluşur.

- a) PCR
- b) dizileme reaksiyonu
- c) jel elektroforezi ve bilgisayarda değerlendirme

PCR'da denatürasyon, bağlanma ve uzama basamakları ile hedef DNA çoğaltılır. Dizileme reaksiyonu için gerekenler: DNA kalıbı, Taq DNA polimeraz, primer, dNTP, ddNTP'dir. Dizileme reaksiyonu PCR gibi üç ana basamakta ve 30-40 döngüde gerçekleşir. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Reaksiyon sonunda deoksिनükleotidlerle uzamış ve ddNTP'lerle sonlanmış diziler elde edilir. Sonlandırıcı özellikteki bazı floresan boyalarla işaretlenebilir. Elde edilen DNA dizilerine jel elektroforezi uygulanabileceği gibi otomatik dizi analizi cihazlarınca okuma yapılabilir. Jel elektroforezinde DNA parçaları elektriksel alanda uzunluklarına göre sıralanır ve DNA dizisi jelden okunur. Poliakrilamid jeller yüksek ayırım gücüne sahiptir. Poliakrilamid jeller uygun süre ve uygun voltajda tek bir nükleotid farkını bile ayırabilir. DNA dizi analizi reaksiyonu sonucu elde edilen fragmentler jel üzerinde gümüş boyama, radyoaktif veya floresan boyalarla işaretlenerek tespit edilebilir. Otomatik DNA dizi analizi cihazlarının gelişmesi ile poliakrilamid jellerin yerini polikarbon bileşikler olan polimerler almıştır (50).

#### **2.1.9.2.2. Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi**

Allan Maxam ve Walter Gilbert'in geliştirdiği bir yöntemdir. Prensipli hidrazin, dimetil sülfat ya da formik asitin DNA'da bulunan bazıları özgül olarak değiştirmesine ve daha sonra eklenen piperidinin değişikliğe uğramış nükleotidlerinin bulunduğu noktalardan zinciri kırmasına dayanır. Kırılma sonucunda DNA parçaları elde edilir. Jel

elektroforezinde büyüklüklerine göre ayrılır ve otoradyografi uygulanarak bantlar görülebilir (48).

#### **2.1.9.2.3. Shotgun yöntemi**

Shotgun dizileme metodu uzun DNA parçalarını dizilemek için kullanılır. Bu metodta büyük boyutlardaki genomik DNA veya bakteri yapay kromozomları fiziksel olarak, rastgele küçük (300-800 bp) boyutlara parçalanır. Bu DNA parçacıkları, uçlarına eklenen adaptörlerden DNA yakalama boncukları tarafından tutularak bir DNA kütüphanesi oluşturulur. Daha sonra her bir boncuk tarafından yakalanan DNA parçacığı ayrı ayrı dizilenir ve okunan bütün parçalar biyoinformatik yazılımlarla birleştirilir (51).

#### **2.1.9.2.4. Pirodizileme yöntemi**

Sentez yoluyla dizileme prensibine dayanır. Pirodizileme yüksek işlem hacmi ve düşük maliyeti sayesinde geleneksel Sanger dizilemenin yerini almıştır. Pirodizilemenin temeli DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesan bir enzim aracılığıyla tespitine dayanmaktadır (52).

#### **2.1.9.2.5. Ligasyon yoluyla dizileme yöntemi**

Bu yöntemde diğerlerinden farklı olarak DNA polimeraz yerine DNA ligaz enzimi kullanılır. Floresan işaretli oligonükleotid problemleri kullanılır, problemler kalıp DNA'ya hibridize olur ve primerle ligasyona girer. Floresan deteksiyonundan sonra oligonükleotid problemlerin işaretli 5' fosfat ucu kesilerek yeni bir ligasyon siklusuna geçilir. Ligasyon, deteksiyon ve ayrılma siklusları tekrarlanarak DNA dizisi belirlenir (53).

#### **2.1.9.2.6. Yeni nesil dizileme**

Yeni nesil DNA dizileme sistemleriyle yüksek doğrulukla, ultra hızlı olarak, dizileme yapılabilmektedir. Örneğin 4.6 Mb'lık *Escherichia coli* genomu tek bir okuma ile tamamlanabilmektedir.

Yeni nesil DNA dizileme teknolojisi hayal bile edilemeyecek kadar çok bilgi ve yeni yaklaşımlar sağlar. Fakat bu kadar çok bilginin depolanması, analizi ve değerlendirmesinde büyük güçlükler vardır. Yeni nesil DNA dizileme teknolojisinin

başarılı bir şekilde kullanılması için gelişmiş biyoinformatik analiz araçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca çok sayıda kısa okuma elde edilmesi de önemli bir problemdir (51).

#### **2.1.10. CMV’de Gansiklovir Direnci**

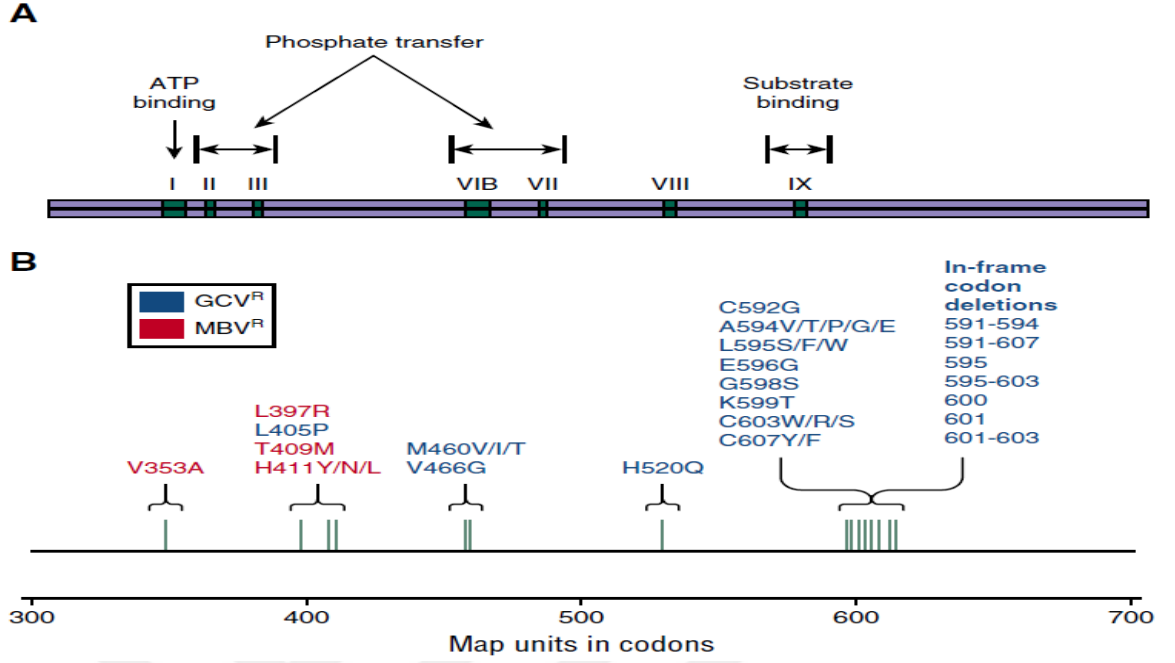
CMV ilaç direnci için en önemli risk faktörlerinden biri genellikle birkaç ay veya daha uzun süreli antiviral ilaç kullanımıyla birlikte uzun süreli viral replikasyondur (54). CMV ilaç direnci için en belirgin risk grubu, CMV seropozitif verici ve CMV seronegatif alıcıdır (D+/R-). Nakledilen organ ve immünosüpresyon rejimine bağlı olarak, CMV hastalığı için tedavi edilen D+/R- transplant alıcıları arasında ilaç direncinin görülme sıklığının genellikle %5-10 aralığında olduğu ve akciğer nakli alıcılarında daha yüksek oranda görüldüğü bildirilmektedir (4, 55, 56). Haploidentik veya allojenik kök hücre nakli alıcıları ve konjenital CMV enfeksiyonu olan hastalar ilaç direnci riskinin arttığı gruplardandır (57, 58, 59). Antiviral tedavi varlığında devam eden CMV replikasyonunun ilaç direnci gelişimi için oluşturduğu risk, viral replikasyon seviyesi ve ilaca maruz kalma süresi ile orantılı olarak artmaktadır. CMV DNA polimeraz inhibitörleriyle ilgili çalışmalar, ilaç direncinin tipik olarak aylar süren antiviral ilaç kullanımından sonra meydana geldiğini göstermektedir, direnç gelişim zamanı ve görülme sıklığı yeni tedavilerde değişim gösterebilir (4, 44, 56).

CMV’de antiviral ilaç direnci UL97 (fosfotransferaz) ve UL54 (DNA polimeraz) gen bölgesindeki mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir (45, 46). UL97 mutasyonlarının gansiklovir direnci; UL54 mutasyonlarının ise gansiklovir, foskarnet ve sidofovir direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir (6).

UL97 kinaz, çeşitli hücrel ve viral proteinlerin serin ve treonin kalıntılarını fosforile eder ve CMV replikasyonu için gereklidir. UL97 kinaz ayrıca antiviral aktivite için gerekli olan GCV'nin başlangıç fosforilasyonunu etkiler ve bu fosforilasyonu bozan UL97 mutasyonları öncelikli GCV direnç mekanizmasıdır (55). CMV hastalığında standart ilk tedavi olan GCV, UL97 kinaz tarafından monofosforile edilir ve daha sonra enfekte olmuş hücrelerde aktif trifosfat formuna dönüştürülmektedir (54).

CMV ilaç direnci tayininde genotipik direnç testi, fenotipik testlere göre daha çok tercih edilmektedir. Rekombinant fenotipleme ile belirlenmiş direnç mutasyonlarının kapsamlı veri tabanı klinik uygulama rehberleri için temel oluşturmaktadır (60). Plazma viral yüklerinin değişmemesi veya artması veya birkaç hafta boyunca uygulanan uygun dozda antiviral tedaviden sonra CMV hastalığının ortaya çıkması durumunda ilaç direncinden şüphelenilebilir. İmmün yetmezliği olan pediatri hastalarında direnç geliştiği bildirilmesine rağmen antiviral tedavinin ilk 6 haftasında direnç gelişimi olağan değildir (4).

GCV dirençli CMV suşlarının %90'ından fazlasında UL97 mutasyonları bulunmaktadır. Biyolojik kinaz fonksiyonu göreceli olarak korunurken GCV fosforilasyonun bozulduğu tahmin edilmektedir. GCV dirençli CMV izolatlarında UL97 mutasyonları çoğunlukla 460, 520 ve 590–607 kodonlarında lokalizedir ve en yaygın yedi mutasyon M460V/I, H520Q, C592G, A594V, L595S ve C603W'dir (54, 55). Bu UL97 mutasyonları (M460V/I, H520Q, A594V, L595S ve C603W) GCV direncinde (EC50) 7-10 kat artış oluştururken, C592G mutasyonu 3 kat artış oluşturur (55). UL97 gen bölgesindeki 590-607 kodonları arasındaki bir veya daha fazla kodonun çerçeve içi delesyonunu da içeren mutasyonlar, çeşitli seviyelerde GCV direnci oluşturabilir (4, 55). Ayrıca, 591-603 pozisyonlarındaki üç ya da daha fazla kodonun çerçeve içi delesyonu gansiklovir direncinde en az sekiz kat artışa neden olurken, bir veya iki kodon delesyonunun gansiklovir direncinde 4-10 kat artışa neden olduğu gösterilmiştir (32, 61). GCV direncine yol açan CMV UL97 geninde sıklıkla görülen mutasyon bölgeleri Şekil 4'te gösterilmiştir.

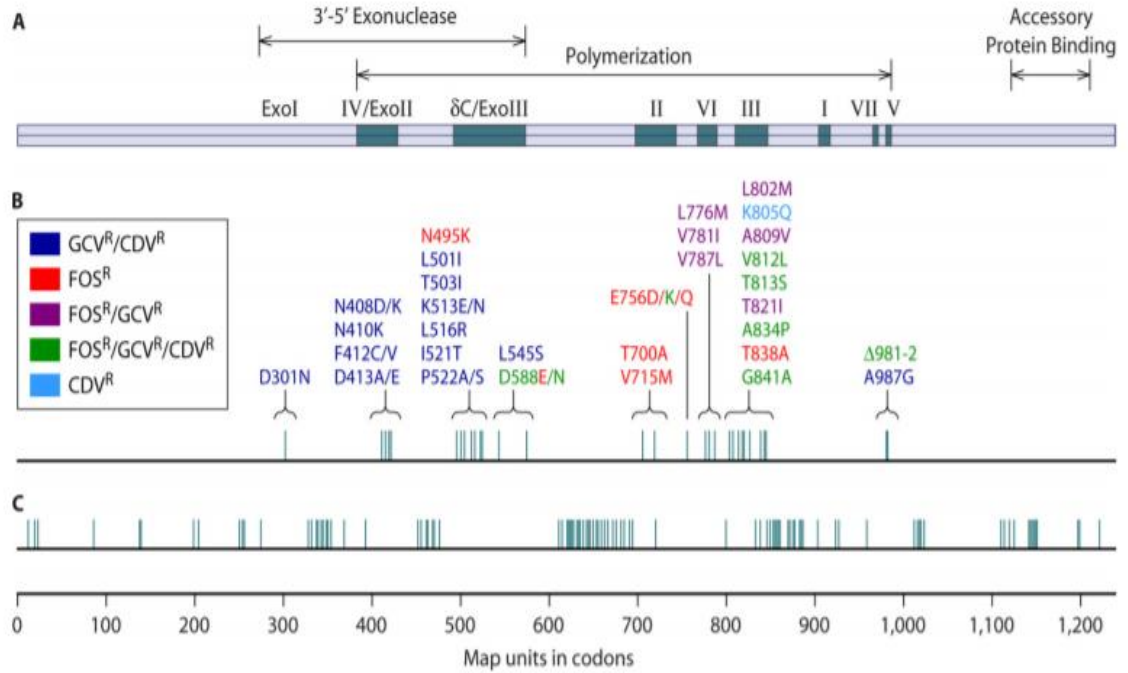


**Şekil 4.** GCV direncine yol açan CMV UL97 geninde sıklıkla görülen mutasyon bölgeleri (4)

GCV'e uzun süre maruziyetten sonra, UL54 DNA polimeraz genindeki mutasyonlar seçilebilir ve genellikle önceden var olan UL97 mutasyonlarına eklenir. UL54 mutasyonları genellikle düşük seviyede dirence yol açarak ilaç direncine katkıda bulunmaktadır. Nadiren, UL54 genindeki mutasyon GCV direncinin ilk belirtici olabilmektedir. GCV'ye dirençli UL54 mutasyonlarında diğer ilaçlara çapraz direnç gelişebilir. GCV ve CDV direncine yol açan mutasyonlar, UL54 geninde 301, 408-413, 501-545 (eksonükleaz bölgeleri) kodonlarında ve 978-988 (bölge V) kodonlarında özellikle A987G mutasyonu rapor edilmiştir (54,55).

CMV UL54 genindeki FOS dirençli mutasyonlar geniş bir aralıkta dağılım gösterir; fakat çoğu zaman korunmuş gen bölgeleri II (700 ve 715 kodonlar), III (802 ve 809 kodonlar) ve VI (kodon 781) ve ayrıca bazı korunmamış lokuslarda (kodon 756) yer almaktadır. Çoğu FOS direnç mutasyonu EC50 değerlerinde 2-5 kat artışa neden olmaktadır. FOS direnç mutasyonları düşük dereceli GCV ± CDV çapraz direnci yapabilir. Bazı UL54 mutasyonları (A834P veya 981-982 Del) her üç ilaca (GCV, CDV ve FOS) önemli düzeyde direnç kazandırabilir. Bazı CMV UL54 mutasyonları ise, özellikle 578-845 kodon aralığındaki mutasyonlar, yavaş üreme fenotipi ile

ilişkilendirilmiştir. Dizi polimorfizmlerinin oldukça geniş veritabanına rağmen, ilaç direnci ile ilgisi olmayan ve rekombinant fenotipleme ile karakterizasyon gerektiren birçok UL54 sekans varyantı bulunmaktadır (4,54). Antivirallere dirence yol açan UL54 polimeraz geninde sıklıkla görülen mutasyon bölgeleri Şekil 5’te gösterilmiştir.



**Şekil 5.** Antivirallere dirence yol açan CMV UL54 geninde sıklıkla görülen mutasyon bölgeleri (4)

UL97 mutasyonlarından F342S, V356G, L405P, D456N, M460V/L/I/T, C480R, N510S, C518Y, H520Q, P521L, A590T, A591V/D, C592G/F, A594V/E/G/T/P, L595S/F/W/T, E596G/D, N597I, G598S/V, K599T/M/E, C603W/R/S/Y, A606D, C607Y/F, I610T, A613V, M615V, E655K, V665I, del 355, del 590-593, del 591-594, del 590-603, del 591-607, del 600, del 601-603 ve del 617 mutasyonlarının gansiklovir direncine yol açtığı gösterilmiştir (4, 6, 41, 55, 58, 61-75).

UL54 mutasyonlarından D301N, N408D/K/S, N410K, F412C/L/S/V, D413A/E/N, P488R, K500N, L501I/F, T503I, A505V, K513E/N/R, L516R, I521T, P522A/S, del524, V526L, C539G/R, L545S/W, S676G, G678S, I722V, I726T/V, Y751H, A987G (4, 6, 55, 62, 63, 65, 67, 71, 73, 75) mutasyonlarının gansiklovir ve sidofovir direncine; N495K, S585A, D588E, F595I, T700A, V715M, E756D/Q, T838A, M844S, V946L (4,



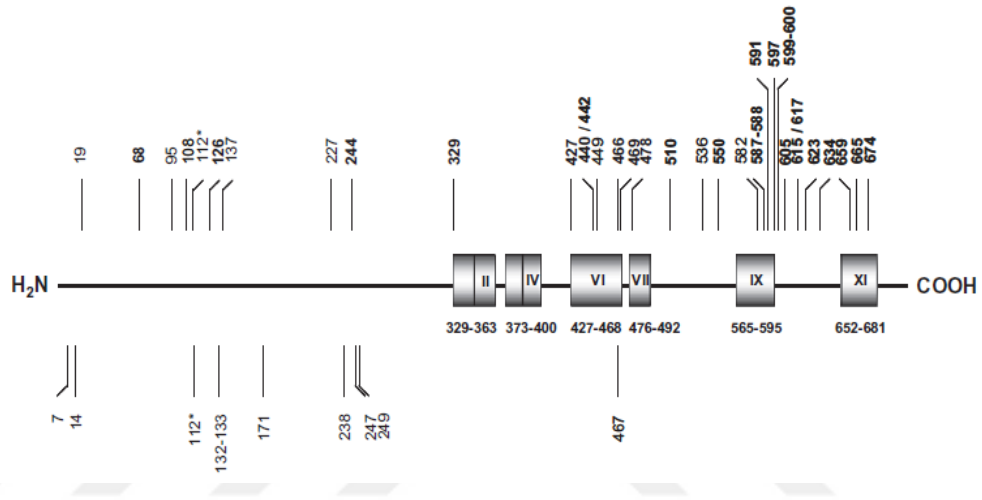
55, 58, 62, 63, 67, 75) mutasyonlarının foskarnet direncine; D515E/Y/R, T552N, Q578L, L776M, V781I, V787A/L, L802M, A809V, G841S (4, 6, 55, 62, 63, 67, 71, 75) mutasyonlarının gansiklovir ve foskarnet direncine; D542E, K805Q (4, 63, 75) mutasyonlarının sidofovir direncine; Q578H, D588N, E756K, L773V, V812L, T813S, T821I, A834P, G841A, M844V, del 981-982 (4, 6, 41, 55, 62, 75) mutasyonlarının gansiklovir, sidofovir ve foskarnet direncine; L802V, P829S, L862F, L957F (55, 75) mutasyonlarının gansiklovir direncine yol açtığı gösterilmiştir. İlaç direncine neden olduğu bildirilen UL97 ve UL54 mutasyonları Tablo 1’de gösterilmiştir (4, 6, 41, 62-75).

**Tablo 1.** Antiviral ilaç direncine yol açan UL97 ve UL54 mutasyonları

UL97		UL54		UL97		UL54	
Mutasyon	İlaç	Mutasyon	İlaç	Mutasyon	İlaç	Mutasyon	İlaç
F342S	G	G598S/V	G	D301N	C, G	G678S	C, G
V356G	G	K599T/M	G	N408D/K/S	C, G	T700A	F
L405P	G	C603W/R/S/Y	G	N410K	C, G	V715M	F
D456N	G	A606D	G	F412C/L/S/V	C, G	I726V/V	C, G
M460V/L/I/T	G	C607Y/F	G	D413A/E/N	C, G	Y751H	C, G
V466G	G	I610T	G	P488R	C, G	E756D/K/Q	F
C480R	G	A613V	G	N495K	F	L773V	C, F, G
N510S	G	M615V	G	K500N	C, G	L776M	F, G
C518Y	G	V665I	G	L501I/F	C, G	V781I/L	F, G
H520Q	G	Del 355	G	T503I	C, G	V787A/L	F, G
P521L	G	Del 590-593	G	A505V	C, G	L802M	F, G
A590T	G	Del 591-594	G	K513N/E/R	C, G	L802V	G
A591V/D	G	Del 591-607	G	D515E/Y/R	G, F	K805Q	C
C592G/F	G	Del 600	G	L516R	C, G	A809V	F, G
A594V/E/G/T/P	G	Del 601-603	G	I521T	C, G	V812L	C, F, G
L595S/F/W/T	G	Del 617	G	P522A/S	C, G	T813S	C, F, G
E596G	G			Del 524	C, G	T821I	F, G
N597I	G			V526L	C, G	P829S	G
				C539G/R	C, G	A834P	C, F, G
				D542E	C	T838A	F
				L545S/W	C, G	G841A	C, F, G
				T552N	G, F	G841S	F, G
				Q578H	C, F, G	M844S	F
				S585A	F	M844V	C, F, G
				D588E	F	L862F	G
				D588N	C, F, G	V946L	F
				F595I	F	L957F	G
				S676G	C, G	Del 981-982	C, F, G
						A987G	C, G

C; Sidofovir, G; Gansiklovir, F; Foskarnet

UL97 gen bölgesinde bulunan ve gansiklovir duyarlı olduğu literatürde bildirilen mutasyonlar Q19E, N68D, T95S, S108N, R112C, L126Q, R1377C, E227D, I244V, D329H, A427V, Q449K, V466M, H469Y, A478V, N510S, M550I, A582V/T, H587Y, A588V, A591V, N597D, K599R, L600I, D605E, M615V, Y617H, G623S, L634Q, T659I, V665I ve A674T'dir (4, 64, 70, 74, 76, 77). UL97 geni genetik polimorfizm haritası Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. UL97 geni genetik polimorfizm haritası (78)

UL54 gen bölgesinde bulunan ve çalışmalarda antivirallere duyarlı olduğu bildirilen varyant sekanslar D515G, P522L, A692S, G971D, A15T, S24L, S32P, V95E, H142Y, G143Y, I341T, N345S, G347D, V355A, S464F, A626V, P628L, G629S, A631G, S633F, M640R, S655L, S663N, F669L, S676G, G678S, N685S, A688V, T691A, A693T, S695T, Q697H, L737M, V759M, Q868R, D870H, V873L, G874R, A885S/T, P887S, L890F, T892I, S897L, N898D, E899K, V927M, V953A, A1012V, L1020I, T1108A, N1116H, A1122T, G1133S, S1146N, N1147S, R1149T, P1153S ve A1154P'dir (4, 79-82).

### 2.1.11. Korunma

CMV ile asemptomatik atılım yaygındır. Standart önlemler ve kişisel hijyenik uygulamalar (örneğin, dikkatli el yıkama) bulaşma olasılığını azaltmaya yardımcı

olabilir. Alkol, deterjanlar ve klor içeren dezenfektanlar virüsü etkisiz hale getirmede etkilidir. CMV hastalığının önlenmesi için şu anda lisanslı bir aşı bulunmamaktadır (1).



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarında ve Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezinde (Genkök) yapıldı. Bu çalışmada DNA dizi analizi işlemi Genkök Merkezinde gerçekleştirildi.

#### **3.1. HASTALAR VE ÖRNEKLER**

Erciyes Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Hematoloji ve KİT ünitesi bölümlerinde 27.09.2017-19.09.2019 tarihleri arasında takip edilen 48 hastaya ait 51 kan örneği çalışmaya alındı. Hastaların 21'i çocuk, 27'si ise erişkin hasta idi. CMV DNA viral yükü 1000 IU/ml ve üzeri olan ve inatçı viremisi olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Plazma örneklerinde CMV DNA tayini 'real time' PCR yöntemi (QIASymphony Qiagen, Almanya) ile çalışıldı.

#### **3.2. CMV SUŞLARINDA GANSİKLOVİR DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

CMV suşlarında GCV direnci UL97 ve UL54 gen bölgesinde, Sanger dizi analizi yöntemi ile ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında çalışıldı.

Çalışma 8 kısımda tamamlandı.

1. DNA izolasyonu
2. PCR işlemi
3. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi
4. PCR ürünlerinin temizlenmesi

5. Sekans PCR
6. Sekans PCR ürünlerinin temizlenmesi
7. Örneklerin cihaza yüklenmesi
8. Gen bölgeleri dizileri değerlendirilerek antiviral direncin belirlenmesi

### **3.2.1. Otomatize Cihazla DNA İzolasyonu**

Bütün örnekler EZ1 Advanced cihazı (Qiagen-Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde EZ1 Virüs 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 sıraya elüsyon tüpleri (1.5 ml) yerleştirildi.
2. İkinci sıraya filtreli uç içeren 'tip holder' yerleştirildi.
3. Buffer AVE'den 56 µl ve carrier RNA'dan 4 µl içeren toplam 60 µl karışım hazırlandı ve üçüncü sıraya yerleştirildi.
4. Dördüncü sıraya örnek tüpleri yerleştirildi ve her örnekten 400 µl eklendi.
5. Reaktif kartuşlar, kartuş raflarına yerleştirildi. Sıcak bloklara 2 ml'lik tüpler yerleştirildi.
6. Cihaz çalıştırıldı ve izolasyon işlemi başlatıldı.

7. İzolasyon işleminden sonra 1. sıradaki elüsyon tüplerinde 90 µl'lik DNA izolatı elde edildi.

### 3.2.2. CMV DNA amplifikasyonu

CMV suşunun UL97 ve UL54 gen bölgelerinde bilinen GCV direncine yol açan mutasyonları belirlemek için 'National Center for Biotechnology Information' NCBI veri tabanından CMV Towne suşu (FJ616285) gen dizileri alınarak ilgili bölgeleri çoğaltmak için gerekli primerler Primer 3 plus programı aracılığıyla tasarlandı. CMV genomunda UL97 ve UL54 bölgelerinde belirlenen bölgeyi PCR ile çoğaltmak için kullanılan primerler Tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** PCR primerleri

Hedef Bölge	Primer	Primer Baz Dizisi (5'- 3')	Amplikon büyüklüğü
UL97	Sense	5' GTGCTCACGGTCTGGATGT 3'	835 bp
UL97	Antisense	5' ACATCTTGGCCTCCACAAAG 3'	835 bp
UL54 1. Bölge	Sense	5' TGGTGYTCCGTGAATCGTTA 3'	979 bp
UL54 1. Bölge	Antisense	5' GGATCTGCTGTCCGTCAAAG 3'	979 bp
UL54 2. Bölge	Sense	5' GCYCACAACCTCTGCTACTC 3'	904 bp
UL54 2. Bölge	Antisense	5' GCACRCCGTAYTTCTTRACT 3'	904 bp

UL54 gen bölgesi iki PCR reaksiyonuyla, UL97 gen bölgesi ise bir PCR reaksiyonuyla çoğaltıldı. UL97 gen bölgesi için 835 bp'lik, UL54 gen bölgesi için ise 979 bp'lik ve 904 bp'lik iki bölge çoğaltıldı. PCR işlemi için Platinum *Tag* DNA polimeraz (Invitrogen, ABD) kiti ve Labcycler (SensoQuest, Almanya) cihazı kullanıldı. Reaksiyon karışımları PCR kabini içerisinde, soğuk bloklar kullanılarak hazırlandı. PCR reaksiyon içeriği Tablo 3'te gösterilmiştir.

Yapılan tüm PCR işlemlerinde Tablo 3'te gösterilen miktarlar kullanıldı. Platinum *Tag* DNA polimeraz (Invitrogen, ABD) kiti içerisinde; Platinum Taq DNA polimeraz, KB Extender, MgCl<sub>2</sub> ve 10X PCR buffer (Mg içermez) bulunmaktadır. Her bir örnek için 22 µl olarak hazırlanan karışım ependorf tüplerine dağıtıldı. Daha sonra DNA

izolatlarından 3 µl tüplere eklendi. Tüplerin kapakları kapatıldı ve amplifikasyon işlemi Labcycler (SensoQuest, Almanya) cihazında Tablo 4'te belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

**Tablo 3.** CMV ilaç direnci tayininde PCR reaksiyon içeriği

<b>Karışım</b>		<b>Miktar (µl)</b>
10xPCR buffer		2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>		0,75
dNTP		0,5
Taq polimeraz		0,25
Primerler (10 pmol /µL)	CMV- primer F	0,5
	CMV- primer R	0,5
Nükleaz içermeyen steril dH <sub>2</sub> O		17
DNA		3
<b>Toplam reaksiyon hacmi</b>		<b>25 µl</b>

**Tablo 4.** CMV ilaç direnci tayininde PCR protokolü

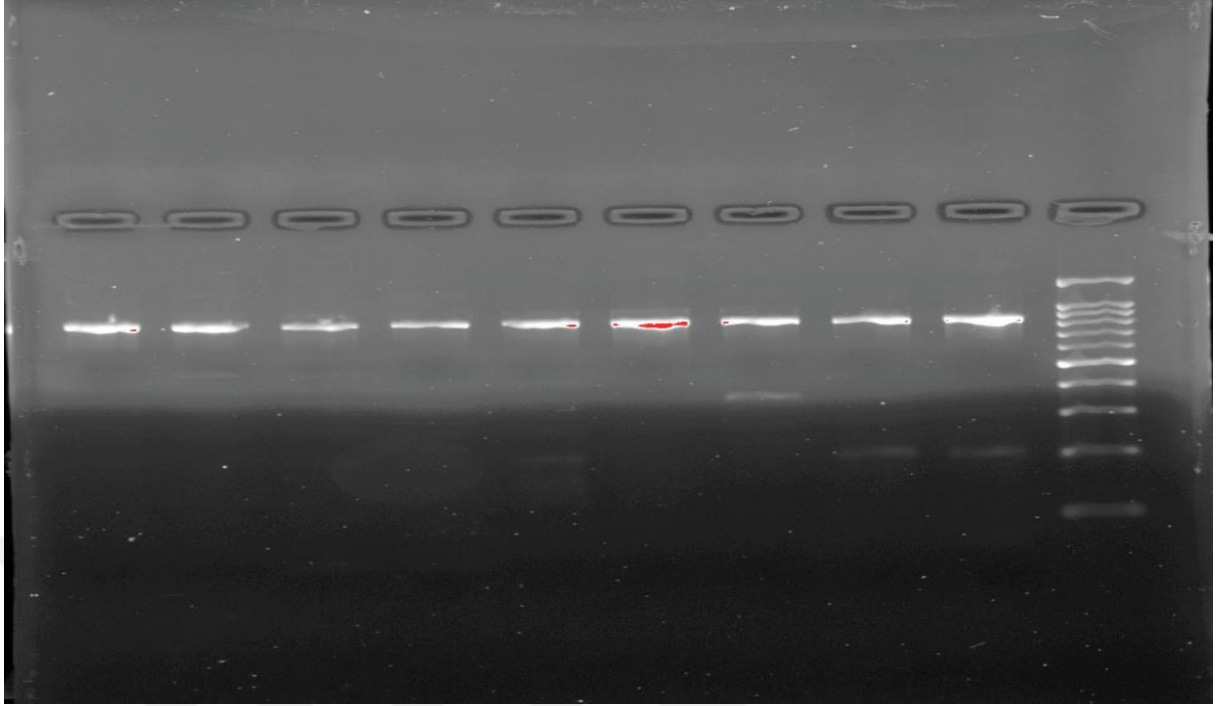
<b>PCR Basamağı</b>	<b>UL97 Protokolü</b>	<b>UL54 1.Bölge Protokolü</b>	<b>UL54 2.Bölge Protokolü</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
<b>Başlangıç Denatürasyonu</b>	95°C 15 dakika	95°C 15 dakika	95°C 15 dakika	1
<b>Denatürasyon</b>	94°C 30 saniye	94°C 35 saniye	94°C 35 saniye	45
<b>Bağlanma</b>	61°C 30 saniye	60°C 45 saniye	57°C 45 saniye	
<b>Uzama</b>	72°C 30 saniye	72°C 45 saniye	72°C 45 saniye	
<b>Son Uzama</b>	72°C 10 dakika	72°C 5 dakika	72°C 5 dakika	1
<b>Bekleme</b>	4 °C ∞	4 °C ∞	4 °C ∞	1

### 3.2.3. PCR Ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi

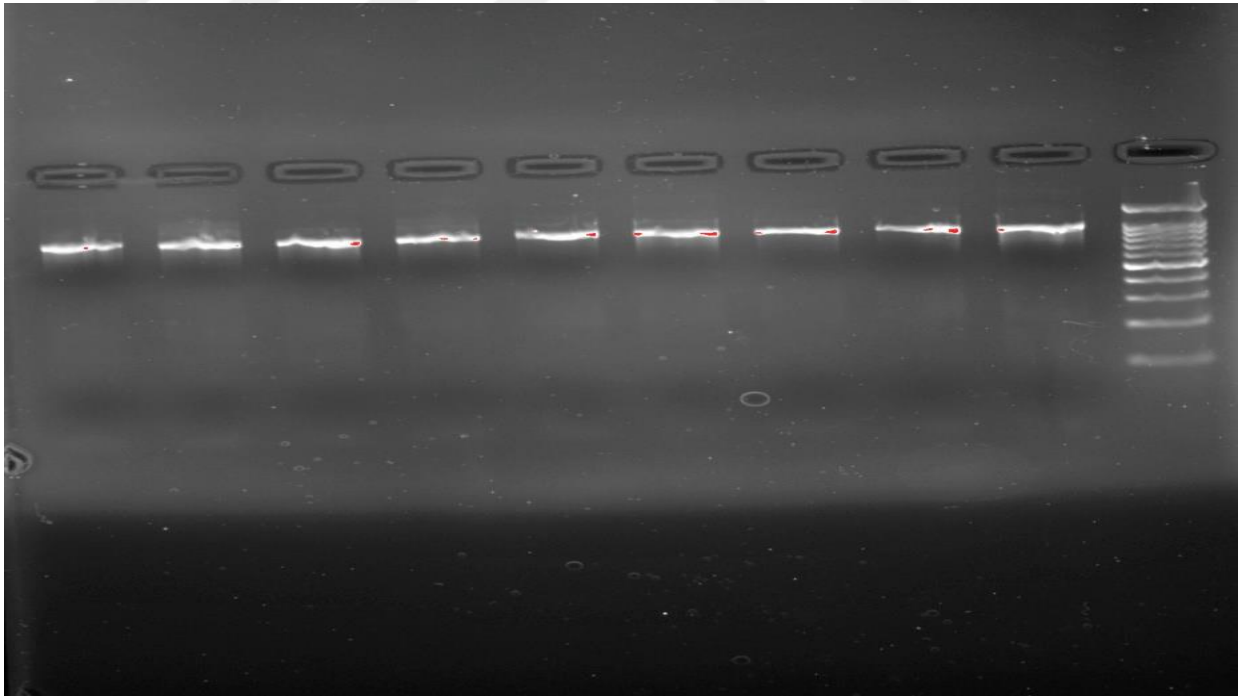
1. Agaroz jel elektroforezi için %2'lik jel hazırlandı. Bu amaçla 1 g agaroz (Sigma, ABD) tartılıp 50 mL 1× Tris-borik asit-EDTA (TBE) tamponu (89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA, pH 8.3) içinde mikrodalga fırında ısıtılarak tamamen erimesi sağlandı.
2. Agarın 55°C'ye kadar soğuması beklendikten sonra, içine etidyum bromür solüsyonundan 3 µL eklenerek karışması sağlandı.
3. Akışkan haldeki sıcak jel, taraklı tepsiye dökülerek katılaşması beklendi.
4. Katılaştıktan sonra yatay elektroforez tankına (Thermo Scientific, ABD) tepsi ile yerleştirildi. Jelin üzerini kaplayacak şekilde 1× TBE tamponu döküldü ve jelin içindeki tarak çıkarıldı.
5. Moleküler ağırlık belirleyicisi olarak ilk kuyucuğa 3µL 100bp DNA Ladder (GeneDirex, ABD) yüklendi.
6. PCR ürünlerinden 5 µL alınıp, 3 µL DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific, ABD) ile karıştırılıp geri kalan kuyucuklara yüklendi.
7. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra güç kaynağının elektrotları tanka bağlandı ve 150 V lineer elektrik akımında 40 dakika boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirildi.
8. Elektroforez işleminden sonra, jel görüntüleme cihazında (ChemiDoc MP, Biorad, ABD) incelendi.

Şekil 7'da UL97 gen bölgesi, Şekil 8'de UL54 1. gen bölgesi ve Şekil 9'de UL54 2. gen bölgesi ve PCR ürünlerinin jel görüntüleme cihazından elde edilen görüntüleri yer almaktadır.

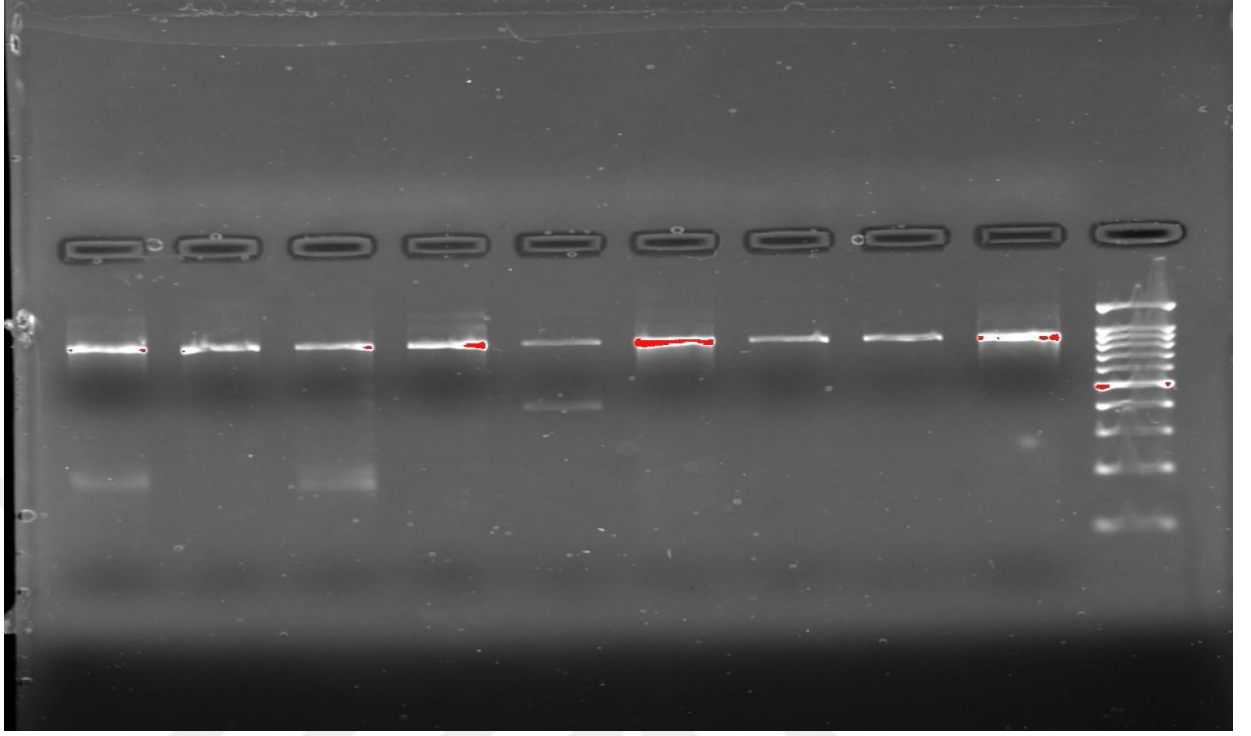




**Şekil 7.** UL97 gen bölgesi PCR ürünlerinin jel görüntüsü



**Şekil 8.** UL54 gen bölgesi 1. bölge PCR ürünlerinin jel görüntüsü



Şekil 9. UL54 gen bölgesi 2. bölge PCR ürünlerinin jel görüntüsü

### 3.2.3. Dizi Analizi

#### PCR ürünlerinin saflaştırması

- 1) 2 µl ExoSAP-IT® (Affymetrix, ABD) reaktifi üzerine 5 µl PCR ürünü eklendi.
- 2) Saflaştırma işlemi Labcycler (SensoQuest, Almanya) cihazında Tablo 5'te görüldüğü şekilde gerçekleştirildi.

**Tablo 5:** CMV ilaç direnci tayininde saflaştırma işlemi protokolü

15°C	15 dakika
85°C	15 dakika
4 °C	∞

#### Sekans PCR

- 1) Saflaştırılmış PCR ürünleri 5 µl dH<sub>2</sub>O ile dilüe edildi.

- 2) Saflaştırılmış PCR ürünlerinin sekans PCR reaksiyonunda BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ABD) kullanıldı. Kullanılan reaktiflerin hacimleri Tablo 6’da gösterilmiştir.

**Tablo 6:** CMV ilaç direnci tayininde sekans PCR içeriği

<b>Komponent</b>	<b>Volüm (µL)</b>
Buffer	2 µl
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	2 µl
Nükleaz içermeyen steril dH <sub>2</sub> O	2 µl
Primer (1 pmol/µL)	2 µl
DNA	2 µl
Toplam	10 µl

- 3) Sekans PCR işlemi için Tablo 6’da belirtildiği şekilde her hasta örneği için 8 µl karışım hazırlandı. ‘Septa plate’ kuyucuklarına dağıtıldı. Kuyucuklara her hasta için 2 µl örnek eklenerek 10 kere pipetleme yapıldı.
- 4) Hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 7’de tarif edilen koşullarda GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD) cihazında amplifiye edildi.

**Tablo 7.** CMV ilaç direnci tayininde sekans PCR protokolü

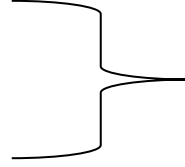
<b>Basamak</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü sayısı</b>
Başlangıç denatürasyonu	96	1 dakika	1
Denatürasyon	96	10 saniye	35
Bağlanma	50	10 saniye	
Uzama	60	4 dakika	
Bekleme	4	∞	1

## Sekans PCR sonrası saflaştırma

1. Her hasta için kuyucuklara;

'Sam tm solution' 45 µl

X terminatör 10 µl



eklendi, karıştırıcıda 2100 rpm'da 30 dk çalkalandı.

2. Plate 1000 rcf'de 2 dk santrifüj edildi.

3. Saflaştırılmış örnekler, kapiller sistemli otomatik dizi analizi cihazı olan ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında sekanslandı.

Literatürde bildirilen CMV GCV direnç mutasyonlarının sıklıkla bulunduğu UL97 protein kinaz genindeki 420-664 kodonlarını ve UL54 DNA polimeraz 1. bölge 262-573 ve UL54 2. bölge 735-1021 kodonlarını kapsayan DNA dizileri değerlendirildi. Dizileri değerlendirmek için sekans verilerinin hızlı bir şekilde yorumlanmasını sağlayan, hastanın CMV UL97 veya UL54 dizilerinin yüklendiği ve daha sonra vahşi tip sekansa sahip ilaca duyarlı HCMV suşuyla (TB40-BAC4) karşılaştırıldığı online mutasyon analiz sistemi kullanıldı ([www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/Hkestler/hcmv/](http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/Hkestler/hcmv/)).

Bu sitede tespit edilen mutasyonların belirlenmesi; yayınlanan tüm UL97 ve UL54 mutasyonlarını ve bunlara karşılık gelen *in vitro* fenotipleri içeren ve mutasyonları değerlendirilen, düzenli olarak güncellenen bir veri tabanına bağlanması yoluyla olmaktadır. Daha sonra UL54 / UL97 vahşi tip sekansını ve verilen UL54 / UL97 nükleotid sekansını hizalamak için BLASTX (versiyon: NCBI BLAST 2.2.18) programı kullanılmaktadır. Mutasyon lokasyonlarına ve mutasyona uğramış amino asitlere göre, sistem mutasyonları HCMV mutasyon veritabanı ile karşılaştırarak ve verilen HCMV sekansında hangi tip mutasyonların olduğunu rapor etmektedir (83).

## 4. BULGULAR

Çalışmaya CMV DNA viral yükü  $10^3$  IU/ml ve üzerinde olan veya antiviral tedavisi sırasında inatçı viremi olan 48 hastaya ait 51 kan örneği dahil edildi.

### 4.1. Hastaların Özellikleri

Hastaların 21'i çocuk, 27'si erişkin hasta idi. Hastaların 29'u (%60.4) erkek, 19'u (%39.6) kadındı. Çalışmaya dahil edilen 48 hastanın 42'si KİT alıcısı ve 6'sı hematoloji poliklinik/servislerinde takip edilen (transplantasyon yapılmamış) hastalardı. KİT alıcılarının 26'sına allojenik kemik iliği transplantasyonu (AKİT), 5'ine otolog kemik iliği transplantasyonu (OKİT), 11'ine haploidentik kemik iliği transplantasyonu (HKİT) yapılmıştı. AKİT yapılan 26 hastanın 6'sı çocuk hasta idi. Haploidentik KİT yapılan 11 hastanın 10'u çocuk hasta idi. OKİT yapılan 5 hastanın 2'si çocuk hasta idi. KİT alıcısı hastaların transplant tipleri ve çocuk ve erişkin hasta dağılımları Tablo 8'de gösterilmiştir.

**Tablo 8.** Hastaların transplant tipleri ve erişkin ve çocuk hasta dağılımı

	AKİT	OKİT	HKİT	Toplam
Çocuk	6	2	10	18
Erişkin	20	3	1	24
Toplam	26	5	11	42

KİT yapılan hastaların alt hastalıkları akut lenfoblastik lösemi (ALL) (n=8); akut miyeloid lösemi (AML) (n=15); multiple myelom (n=1); hodgkin lenfoma (n=3);

myelodisplastik sendrom (n=2); kombine immün yetmezlik (n=6); nöroblastom (n=1); aplastik anemi (n=2); B hücreli lenfoma (n=1); orak hücreli anemi (n=1); Ewing sarkom (n=1); Wiskott Aldrich sendromu (n=1) idi. Kit yapılmamış 6 hasta ise rabdoid tümör (n=1); talasemi (n=1); T hücreli lenfoma (n=1); B hücreli lenfoma (n=1); non-hodgkin lenfoma (n=1) ve kombine immün yetmezlik (n=1) tanısı almışlardı.

Hastaların ve donörlerin serumlarında ELİSA yöntemi ile anti CMV IgG ve anti CMV IgM varlığı araştırılmıştı ve sonuçlar hasta dosyalarından elde edildi. Tüm hastaların ve donörlerin anti CMV IgM sonuçları negatifti. AKİT yapılan 26 hastanın 24'ünde anti CMV IgG D+/R+ (verici/alıcı), birinde anti CMV IgG D+/R- ve birinde D-/R+ idi. HKİT yapılan 11 hastanın tamamında anti CMV IgG D+/R+ idi. OKİT yapılan 5 hasta ve hematoloji polikliniklerinde takip edilen 6 hastanın anti CMV IgG'leri pozitif olarak bulundu. Hastalarda CMV DNA takibi transplantasyon öncesi ve sonrasında haftalık olarak yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 48 hastanın 6 (%12.5)'sında antiviral direnç mutasyonu bulundu. Antiviral direnç saptanmayan 3 hasta örneğinin aylar sonra gelen örneklerinde de mutasyon saptanmadı. İki hastanın UL97 gen bölgesi ve beş hastanın UL54 2. gen bölgesi sekans sonuçları diziler karışık olduğu için değerlendirilemedi. Çalışmaya dahil edilen 48 hastanın 42'si KİT alıcısı olup 6 (%14.2)'sında antiviral direnç bulundu. Bu 6 hastanın 3'ü çocuk ve 3'ü erişkin hasta idi. Çalışmada pediatri KİT alıcısı olan toplam 18 hastanın 3 (%16.6)'ünde; erişkin KİT alıcısı olan toplam 24 hastanın 3(%12.5)'ünde antiviral direnç bulundu. Bu 6 hastanın 4'ünde sadece UL97 gen bölgesinde antiviral direnç mutasyonu saptandı. İki hastada E596G mutasyonu; iki hastada ise sırasıyla C603W ve A591V mutasyonu bulundu. Ayrıca bir hastada UL97 gen bölgesinde M460I ve C592G mutasyonları ve eş zamanlı olarak UL54 gen bölgesinde F412L mutasyonu tespit edildi. Bir hastada ise UL97 gen bölgesinde mutasyon olmadan tek başına UL54 gen bölgesinde L957F mutasyonu bulundu.

## 4.2. CMV Antiviral Direnç Saptanan Hastaların Özellikleri

Antiviral direnç saptanan hastaların özellikleri Tablo 9’da gösterilmiştir.

**Tablo 9.** CMV antiviral direnç saptanan hastaların özellikleri

Hastalar		1	2	3	4	5	6
Mutasyonlar	UL97	E596G	M460I C592G		C603W	A591V	E596G
	UL54		F412L	L957F			
Yaş/cinsiyet		10/K	6/K	24/K	2/E	52/E	21/E
Alt hastalık		AML	AML	ALL	Wiskott Aldrich sendromu	AML	ALL
Transplant tipi		HKİT	HKİT	AKİT	HKİT	AKİT	AKİT
KİT sonrası direnç bulunan gün		125.gün	343.gün	61. gün	28. gün	301. gün	696. gün
CMV serolojisi		R+/D+	R+/D+	R+/D+	R+/D+	R+/D+	R+/D+
CMV PCR (IU/ml)		15000	49500	42700	11800	2224000	105000
CMV Hastalığı		-	CMV retinitisi	-	-	CMV koliti	-
Klinik		İshal, nöbet, ateş	Görme bozukluğu, ateş, ishal, cilt GVHD	Hemattüri	Ateş, solunum yetmezliği	GVHD, hemato-kezya, pnömoni	Burun kanaması
Antiviral Tedavi		GCV FOS	GCV FOS CDV	CDV VASV	GCV FOS	GCV	GCV FOS CDV
Hastanın Durumu		Ex	Ex	Yaşıyor	Ex	Ex	Yaşıyor

HKİT: Haploidentik kemik iliği transplantasyonu, AKİT: Allojenik kemik iliği transplantasyonu

GCV: Gansiklovir, FOS: Foskarnet, CDV: Sidofovir, VASV: Valasiklovir, GVHD: Graft Versus Host Hastalığı

### 1. hasta

AML tanısıyla takipli anti CMV IgG (+) olan 10 yaşındaki kadın hastaya anti CMV IgG (+) donörden haploidentik KİT yapılmıştı. KİT öncesi dönemde CMV DNA pozitifliği nedeniyle GCV tedavisine başlanmış. Takibinde ishali olan hastanın dışkısında

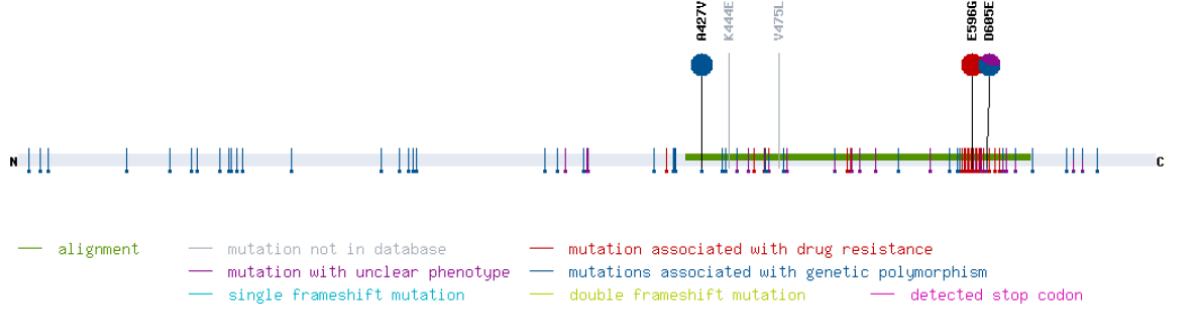
*Entamoeba histolytica* antijeni pozitif bulunmuş. KİT'in 12. gününde ateşi olan hastanın tedavisine amikasin eklenmiş. KİT'in 22. gününde GCV kullanan hastanın CMV viral yükü 1900 IU/ml olması üzerine tedavisine FOS eklenmiş, FOS tedavisi bir hafta sonra kesilmiş. Ateş yüksekliği olan, galaktomannan antijeni: 0.56 ng/ml ve toraks tomografi sonucunda mantar nodülü görülen hastanın tedavisine vorikonazol eklenmiş. Şikayetleri gerileyen ve uygun tedavileri verildikten sonra taburcu edilen hastanın AKİT'ten 3 ay sonra nöbet geçirme nedeniyle başvurması üzerine, tekrar yatışı yapılmış. Çekilen beyin MR görüntülemesinde sağ frontalde kitle izlenmiş ve lenfoproliferatif tutulum olarak düşünülmüş. Hastanın gönderilen BOS'unda CMV DNA saptanmamış ve BOS bakteriyolojik kültüründe üreme olmamış. Şikayetleri gerileyen ve genel durumu iyi olan hasta taburcu edilmiş. Bir ay sonra nöbet geçirme nedeniyle tekrar başvurmuş. Çekilen MR görüntülemesinde öncekine göre kitlede büyüme görülen hastaya beyin biyopsisi yapılmış. Alınan beyin biyopsisinin patoloji sonucu 'EBV ile ilişkili B hücreli lenfoproliferatif hastalık, monomorfik tip, Diffüz büyük hücreli lenfoma?' olarak bulunmuş. Hastanın beyin dokusunda CMV DNA 11000 IU/ml ve EBV DNA >10000000 kopya/ml bulunmuş. Rituksimab tedavisi başlanmıştır. Kanda CMV DNA düzeyi 6700 IU/ml imiş. GCV tedavisi başlanmıştır. 10 gün sonra gönderilen BOS EBV DNA sonucu <316 kopya/ml bulunmuş. Daha sonra şikayetleri gerileyen hastaya uygun tedavileri verilip taburcu edilmiş.

KİT'ten 5 ay sonra ikinci kez KİT hazırlığı için Pediatri Hematoloji servisine yatırılan hasta genel durum bozukluğu ve nöbet geçirmesi nedeniyle yoğun bakıma devredilmiş. Elektrolit bozuklukları olan ve septik şok tanısıyla izlenen hasta kardiyak arrest olarak transplantasyonun 136. gününde kaybedilmiştir.

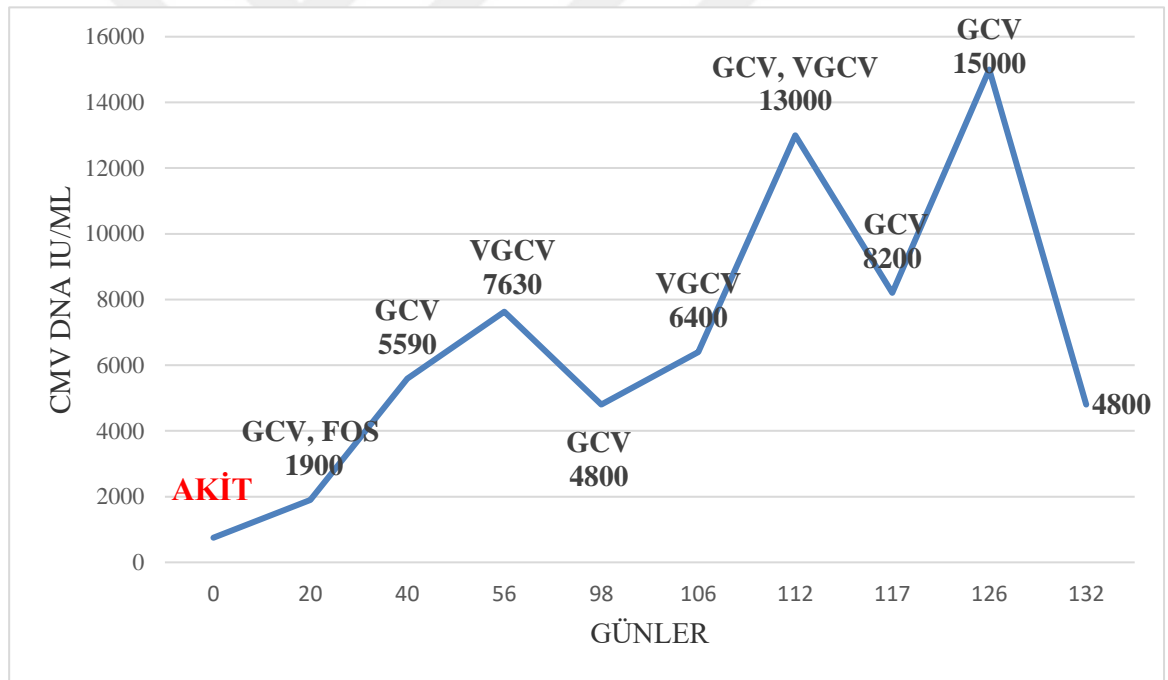
Transplantasyonun 125. günündeki kan örneğinde CMV antiviral direnç araştırıldı ve CMV DNA 15000 IU/ml idi. Hastadan izole edilen CMV suşunda UL97 gen bölgesinde GCV direncine yol açan E596G mutasyonu bulundu. UL54 gen bölgesinde ise antiviral direnç mutasyonu bulunmadı. Ayrıca UL54 gen bölgesinde V355A varyant sekansı, UL97'de ise D605E, A427V, K444E ve V475L varyant sekansları bulundu. Literatür incelendiğinde K444E ve V475L varyant sekanslarının ilk kez bu çalışmada tespit edildiği görülmüştür. UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar Şekil 10'da gösterilmektedir.



Hasta bu dönemde 74 gün GCV ve 7 gün FOS kullanmıştı. Hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar Şekil 11’de gösterilmektedir.



Şekil 10. UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar



Şekil 11. 1. hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar

## 2.hasta

AML tanısıyla takipli anti CMV IgG (+) olan hastaya anti CMV IgG (+) donörden haploidentik KİT yapılmış ve 17. gününde CMV viral yükü 6080 IU/ml olması üzerine

FOS tedavisi başlanmış ve bir hafta sonra kesilmiş. KİT'in 30. gününde CMV viral yükü 32000 IU/ml olan hastaya GCV başlanmış. Ateş ve nötropeni olan hastaya ampirik olarak amikasin ve piperasilin/tazobaktam tedavileri başlanmış. Ateşi devam eden hastanın piperasilin/tazobaktam tedavisi kesilip meropenem başlanmış. Hastaya 20.04.2017'de 2. kez KİT yapılmış ve takibinde genel durumu iyi olan hasta VGCV ile taburcu edilmiş.

İlk yapılan KİT'in 194. gününde CMV DNA 87000 IU/ml olan hastaya GCV ve FOS başlanmış. Kan kültüründe gram pozitif kok görülen ve ateşi olan hastanın tedavisine vankomisin eklenmiş. Daha sonra GCV kesilip, FOS ile devam edilmiş. Cilt döküntüsü olan hastadan alınan biyopsi sonucu cilt GVHD bulunmuş. Takibinde CMV DNA 26550 IU/ml olması üzerine GCV eklenmiş. CMV DNA düzeyi düşme eğiliminde olan hasta VGCV ile taburcu edilmiş.

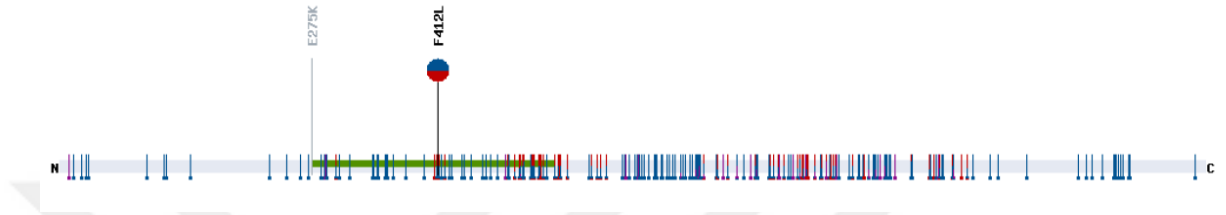
Poliklinik kontrolünde CMV viral yükü 25.800 IU/ml olan hasta tekrar servise yatırılarak GCV ve FOS başlanmış. Görme bozukluğu olan hasta göz hastalıklarına konsülte edilmiş. Hastada CMV retiniti ve lösemik infiltrasyon düşünülmüş. İshali olan hastadan gönderilen dışkıında norovirüs RNA pozitif bulunmuş. Daha sonra FOS temininde sıkıntı olması üzerine kesilmiş ve GCV tedavisi ile devam edilmiş. Hastaya bu dönemde 27 gün FOS ve 54 gün GCV verilmiş.

Galaktomannan antijeni pozitif olan ve toraks tomografi sonucu mantar enfeksiyonu ile uyumlu olan hastaya vorikonazol başlanmış. Elektrolit bozuklukları olan hastaya uygun tedaviler verilmiş. CMV viral yükü 77.000 IU/ml olan hastaya bir gün CDV bir gün FOS tedavisi verilmesi planlanmış. Ancak kreatinin değerinin 1.87 mg/dl olması üzerine aldığı ilaçlar böbrek yetmezliği dozuna düşürülmüş ve CDV ve FOS kesilmiş. CMV'ye bağlı böbrek tutulumu açısından gönderilen idrar CMV PCR sonucu negatif bulunmuş. Takibinde solunum arresti ve pulmoner ödem gelişen hasta kardiyak arrest olarak KİT'in 350. gününde kaybedilmiş.

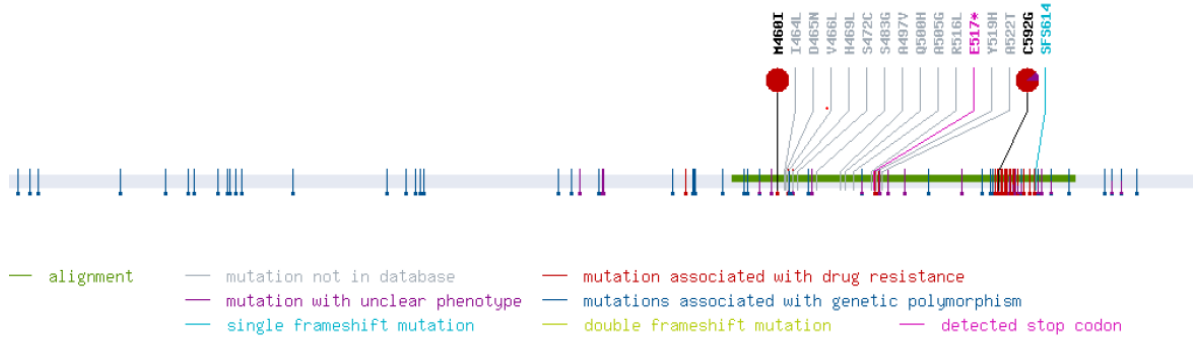
İlk transplantasyonun 343. günündeki kan örneğinde CMV antiviral direnç araştırıldı ve CMV DNA 49500 IU/ml idi. Hastadan izole edilen CMV suşunda UL97 gen bölgesinde M460I ve C592G mutasyonu; UL54 gen bölgesinde F412L mutasyonu bulundu.

Hastada UL54 ve UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar sırayla Şekil 12 ve 13'te gösterilmektedir.

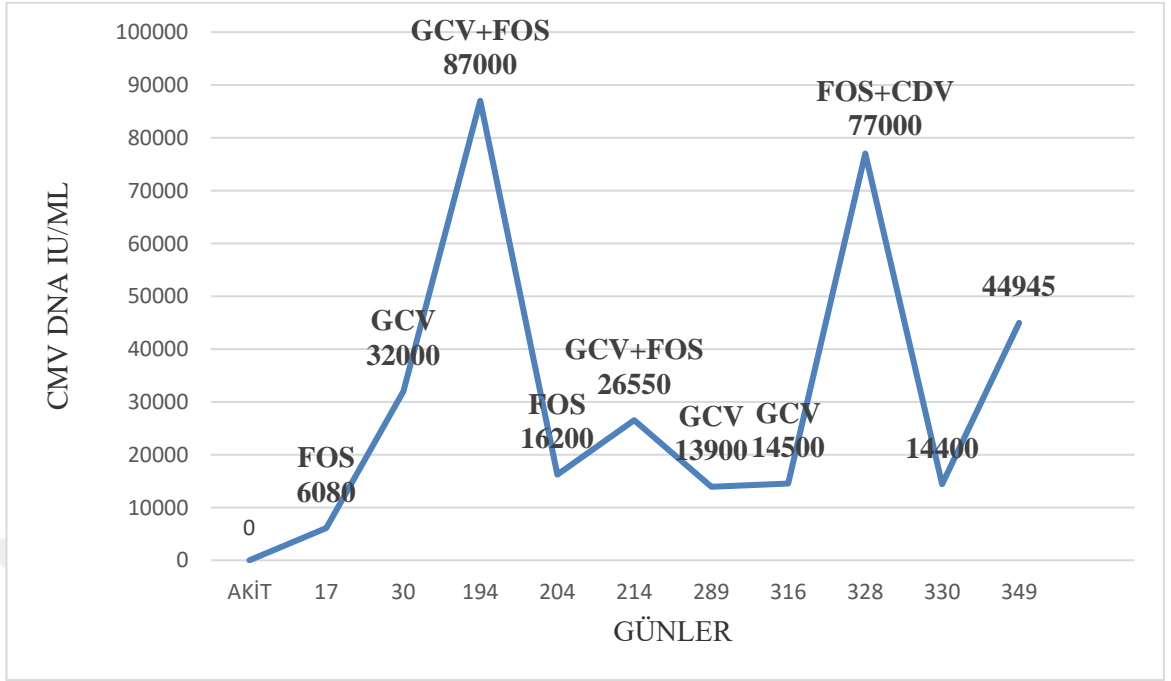
Hasta toplamda 93 gün GCV, 61 gün FOS ve 6 gün CDV tedavisi almıştı. Hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar Şekil 14'te gösterilmektedir.



Şekil 12. UL54 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar



Şekil 13. UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar



**Şekil 14. 2.** Hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar

### 3.Hasta

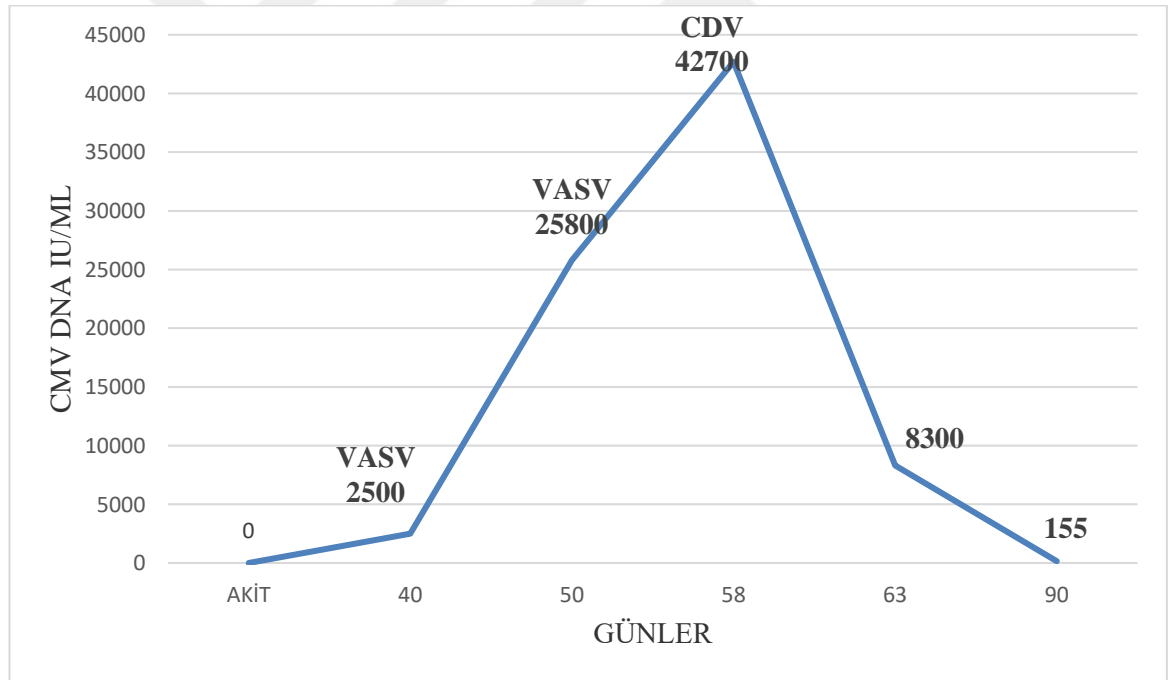
ALL tanısıyla AKİT yapılan hastaya transplantasyonun 3. gününde ateşi olması üzerine ampirik olarak amikasin ve piperasilin/tazobaktam tedavisi başlanmış. Takibinde cilt GVHD gelişen hastaya steroid verilmiş. Genel durumu iyi olan hasta valasiklovir profilaksisi ile taburcu edilmiş. KİT'ten 2 ay sonra hemorajik sistit gelişen hastada idrarda BK DNA sonucu  $1.91 \times 10^8$  kopya/ml bulunmuş ve CDV başlanmış. Aynı zamanda CMV DNA pozitif olan hastaya VASV tedavisi başlanmış. CDV tedavisi sonrası CMV viral yükünde düşüş izlenmiş. Genel durumu iyi olan hasta taburcu edilmiş. Hastanın takipleri hematoloji polikliniğinde halen devam etmektedir.

Transplantasyonun 61. günündeki kan örneğinde CMV antiviral direnç araştırıldı ve CMV DNA sonucu 42700 IU/ml idi. Hastadan izole edilen CMV suşunda UL54 gen bölgesinde L957F mutasyonu bulundu. UL97 gen bölgesinde ise antiviral direnç mutasyonu bulunmadı. UL54 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar Şekil 15'te gösterilmektedir. Ayrıca UL54 gen bölgesinde V927M, C961R ve T885M varyant sekansları bulundu. Literatür incelendiğinde T885M varyant sekansının ilk kez bu çalışmada tespit edildiği görülmüştür.

Hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar Şekil 16'da gösterilmektedir.



Şekil 15. UL54 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar



Şekil 16. 3. hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar

#### 4.hasta

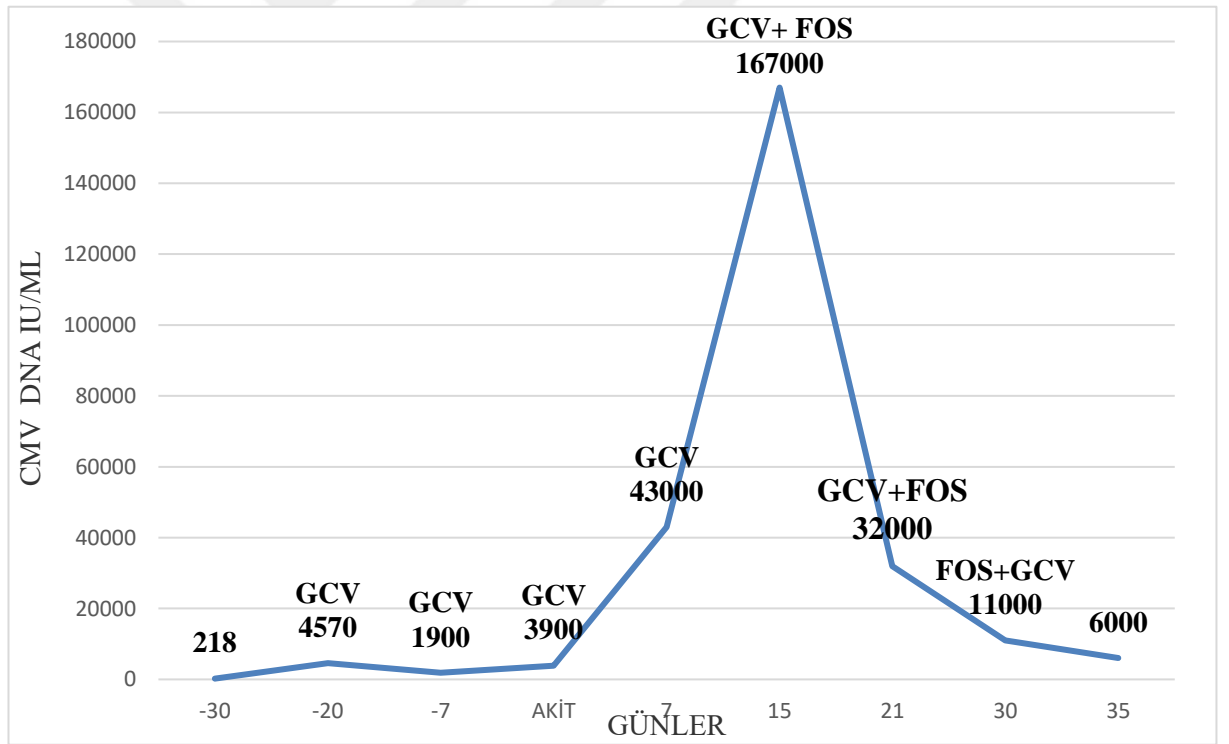
Wiskott Aldrich sendromu tanısı ile takipli 2 yaşında erkek hasta, dış merkezde CMV enfeksiyonu nedeniyle GCV ve FOS tedavileri almış. Transplantasyon için merkezimize sevk edilen anti CMV IgG (+) hastaya, anti CMV IgG (+) donörden HKİT yapılmış. Hastaneye geldiğinde ateş, solunum sıkıntısı ve dış merkezde bakılan CMV DNA değeri pozitif olan hastaya GCV, FOS, vankomisin ve meropenem tedavileri başlanmış. CMV DNA 153 IU/ml olan hastanın FOS'u 3 gün sonra kesilmiş. Sık kateter enfeksiyonu geçirme öyküsü olan hastanın gönderilen kateter kültüründe *Acinetobacter baumannii* üremesi olması üzerine tedaviye kolistin eklenmiş. Larinks ödemi olan hastaya trakeostomi açılmış. Saturasyonu düşen hasta entübe edilerek yoğun bakıma yatırılmış. AKİT'ten bir hafta sonra CMV viral yükü 43000 IU/ml olan hastanın tedavisine FOS (25.02.2019- 20.03.2019) eklenmiş. Sık sık trombositopeni gelişen hasta gerektiğinde trombosit süspansiyonu ile desteklenmiş. Ateşi olan hastanın gönderilen kan ve endotrakeal aspirat (ETA) kültüründe *Candida parapsilosis* üremesi nedeniyle tedavisine vorikonazol eklenmiş. Ancak antifungal duyarlılık sonucunda vorikonazol dirençli olması üzerine tedavisi amfoterisin B ile değiştirilmiş. Hipertansiyon, hipernatremi ve hipokalemi gibi birçok ek problemi olan hastaya uygun tedaviler verilmiş. Tedavi altında iken solunum yetmezliği gelişen hasta kardiyak arrest olmuş ve transplantasyonun 33. gününde kaybedilmiş.

Transplantasyonun 28. günündeki kan örneğinde CMV antiviral direnç araştırıldı ve CMV DNA 11800 IU/ml idi. Hastadan izole edilen CMV suşunda UL97 gen bölgesinde C603W mutasyonu bulundu. UL54 gen bölgesinde ise antiviral direnç mutasyonu bulunmadı. Ayrıca UL54 gen bölgesinde S897L ve D898N; UL97 gen bölgesinde ise D605E ve L622Q varyant sekansları bulundu. Literatür incelendiğinde L622Q mutasyonunun ilk kez bu çalışmada tespit edildiği görülmüştür. UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar Şekil 17'de gösterilmektedir.

Hasta bu dönemde 73 gün GCV ve 23 gün FOS tedavisi almıştı. Hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar Şekil 18'de gösterilmektedir.



Şekil 17. UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar



Şekil 18. 4. hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar

## 5.hasta

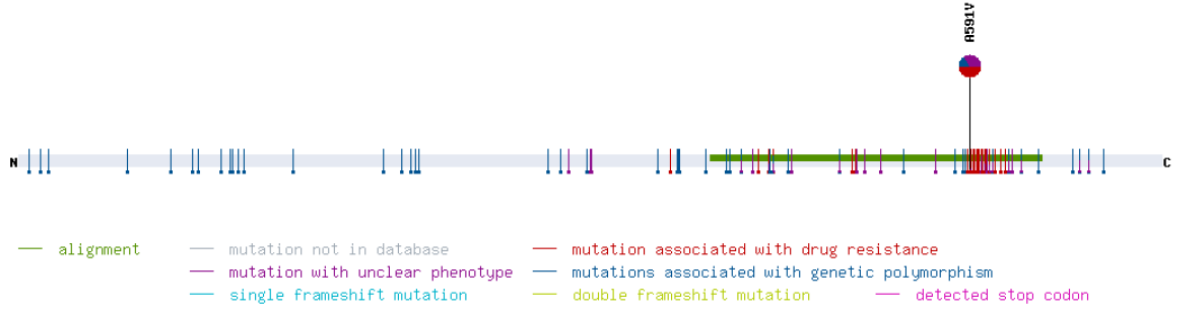
AML tanısıyla dış merkezde AKİT yapılan anti CMV IgG (+) olan 52 yaşında hastaya, merkezimizde 2.kez anti CMV IgG (+) donörden haploidentik KİT yapılmış. Hastanın 2. transplantasyondan 7 ay sonra ateş ve nötropeni nedeniyle yatışı yapılmış ve ampirik olarak piperasilin/tazobaktam başlanmıştır. İshali olan hastanın dışkı kültüründe *Campylobacter spp.* üremesi olması üzerine azitromisin tedavisi başlanmıştır. Ateşi olan hastaya çekilen batın tomografi sonucu kolit ile uyumlu gelmiş ve ayrıca safra kesesinde taş olduğu raporlanmıştır. CMV DNA sonucu 1380 IU/ml olan hastaya GCV başlanmıştır. Hematokezyası olan hastaya kolonoskopi yapılmıştır. Kolonoskopide alınan biyopsi sonucu CMV koliti ile uyumlu gelmiştir. Daha sonra CMV DNA 480 IU/ml olan hasta, CMV DNA sonucu iki kez negatif gelene kadar VGCV kullanması önerilerek taburcu edilmiştir.

Taburcu edildikten 2 ay sonra halsizlik ve ateş şikayetleri olan hastanın CMV DNA sonucu 1356000 IU/ml olması üzerine GCV başlanarak hastaneye yatırılmış. Takibinde *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi düşünülerek trimetoprim/sulfametoksazol başlanmıştır. Çekilen toraks tomografi sonucu akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) ve alveolar hemoraji ile uyumlu gelmiş ve CMV pnömonisi ekarte edilememiştir. Saturasyonu düşük olan ve takipnesi olan hasta entübe edilmiştir. Kardiyak arrest olan hasta 2. KİT'in 324. gününde kaybedilmiştir.

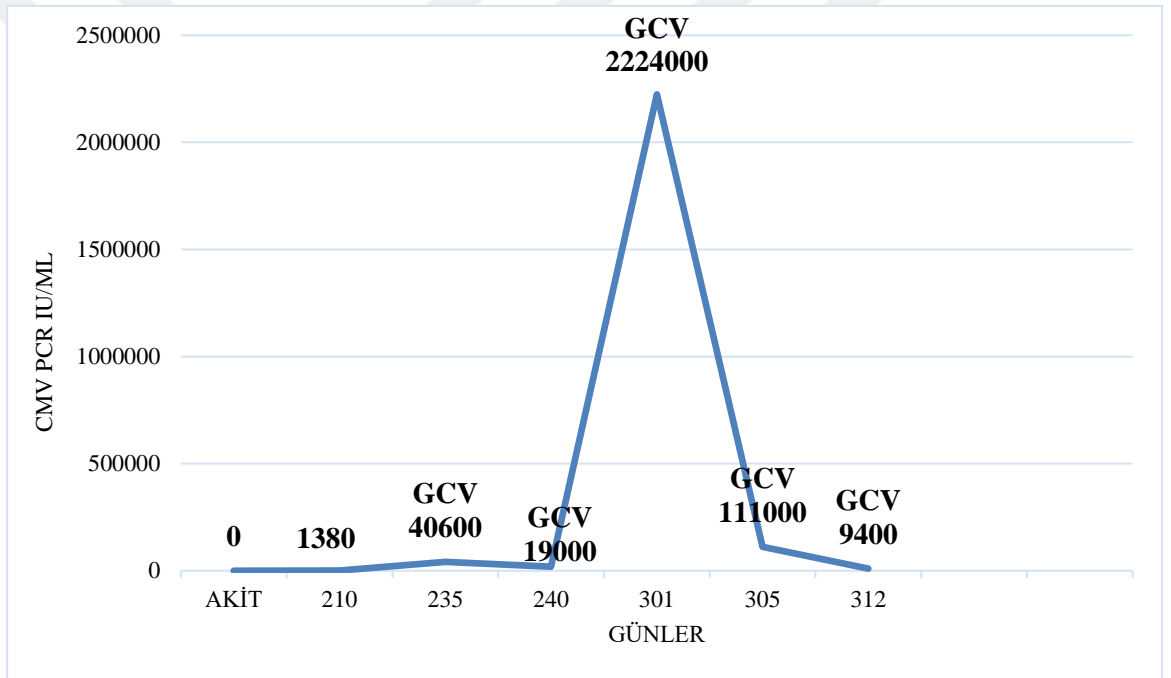
CMV antiviral direnç araştırılan kan örneği transplantasyonun 301. günündeki kan örneğiydi ve CMV DNA 2224000 IU/ml idi. Hastadan izole edilen CMV suşunda UL97 gen bölgesinde A591V mutasyonu bulundu. UL54 gen bölgesinde ise antiviral direnç mutasyonu bulunmadı. UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyon Şekil 19'da gösterilmektedir.

Hasta bu dönemde 53 gün GCV kullanmıştı. Hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar Şekil 20'de gösterilmektedir.





**Şekil 19.** UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyon



**Şekil 20.** 5. hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar

## 6. Hasta

ALL tanısıyla takip edilen anti CMV IgG pozitif olan 21 yaşında erkek hastaya anti CMV IgG pozitif donörden AKİT yapılmış. AKİT öncesi dönemde testiste şişlik olan hastaya çekilen testis MR görüntülemesinde lösemik infiltrasyon düşünülmüş. Aynı zamanda yüzünde ve sağ tarafında uyuşma olan hastanın çekilen beyin MR sonucunda patoloji saptanmamış. Hastanın BOS sitolojisi ise lösemik infiltrasyonla uyumlu

bulunmuş. KİT'ten dört ay sonra ishal şikayeti olan hastaya kolonoskopi yapılmış. Biyopsi sonucu GVHD olarak rapor edilmiş.

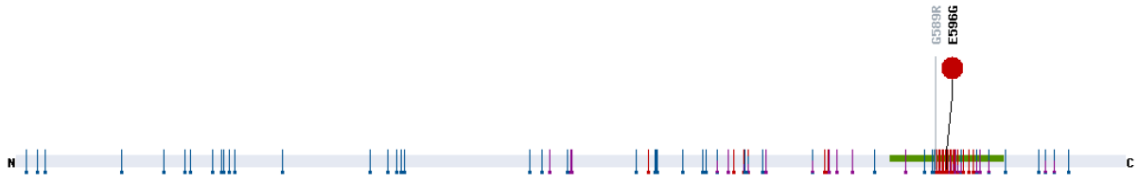
KİT'den 7 ay sonra CMV DNA sonucu 18500 IU/ml olan hasta GCV tedavisi başlanarak servise yatırılmış. Ateşi olan hastaya çekilen toraks tomografi sonucu mantar enfeksiyonu ile uyumlu bulunmuş ve hastaya vorikonazol başlanmış. CMV DNA sonucu negatifleşen ve genel durumu düzelen hasta taburcu edilmiş.

AKİT'ten 2 yıl sonra valgansiklovir kullanırken CMV DNA sonucu 54000IU/ml olan hasta servise yatırılarak GCV tedavisi başlanmış. Bir hafta sonra CMV DNA sonucu 209000 IU/ml gelen hastanın tedavisine CDV eklenmiş. İki hafta sonra GCV tedavisi kesilerek valgansiklovir ve iki haftada bir CDV almak üzere taburcu edilmiş.

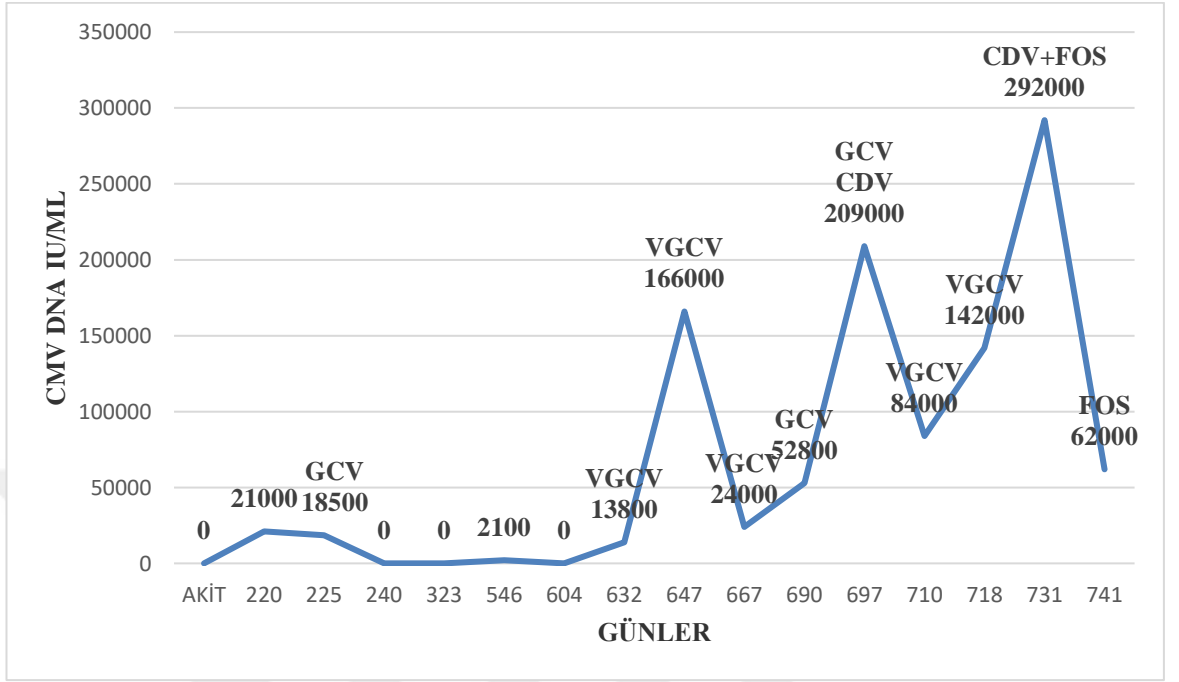
Bir ay sonra burun kanaması şikayetiyle hastaneye başvurmuş. Hastanın trombosit değeri 32000/mm<sup>3</sup> olarak bulunmuş. CMV DNA sonucu 162480 IU/ml olan hasta servise yatırılmış ve CDV+FOS tedavisi başlanmış ve 10 gün sonra CDV tedavisi kesilmiş. FOS tedavisi ise devam etmektedir. Hastanın tedavi ve takibi hematoloji servisinde halen devam etmektedir.

Transplantasyonun 696. günündeki kan örneğinde CMV antiviral direnç araştırıldı ve CMV DNA sonucu 105000 IU/ml idi. Hastadan izole edilen CMV suşunda UL97 gen bölgesinde E596G mutasyonu bulundu. UL54 gen bölgesinde birinci bölgede antiviral direnç mutasyonu bulunmadı. UL54 gen bölgesi 2. bölge ise PCR ile çoğaltılamadığı için değerlendirilemedi. UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar Şekil 21'de gösterilmektedir.

Hasta bu dönem 26 gün GCV kullanmıştı. Hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar Şekil 22'de gösterilmektedir.



**Şekil 21.** UL97 gen bölgesinin sekanslanması sonucunda bulunan mutasyonlar



**Şekil 22.** 6. hastanın günlere göre CMV DNA düzeyleri ve aldığı antiviral ilaçlar

#### 4.3. Varyant Sekans Bulunan Hastaların Özellikleri

Bu çalışmada 27 hastada literatürde bildirilen ve fenotipik testlerle ilaçlara duyarlı olduğu belirlenen 11 varyant sekans (UL54'te V355A, V450A, ins885S, S897L, D898N, G474R, V927M, C961R ve K947E; UL97'de D605E ve A427V mutasyonu) saptandı (67, 74, 75, 97). Ayrıca daha önceki yayınlarda bildirilmeyen çok sayıda varyant sekans bulundu. Varyant sekans bulunan hastaların özellikleri Tablo 10'da ve ilk defa bu çalışmada bulunan varyant sekanslar Tablo 11'de gösterilmiştir. Varyant sekans saptanan 2 hastanın UL97 gen bölgesi ve 2 hastanın UL54 2. gen bölgesi sekans sonuçları karışık olduğu için değerlendirilemedi.

**Tablo 10.** CMV suşunda varyant sekans saptanan hastaların özellikleri

Hasta No/ Varyant Sekans	CMV PCR (IU/ml)	Trans. Tipi Yaş/cins	Alt Hastalık	CMV Serolojisi (D/R)	Antiviral Tedavi	Hastanın Durumu	
7.S897L D898N	C450W	30700	AKİT 30/E	AML	D+/R+	GCV	Yaşıyor
8.S897L D898N D378E	A442D	1516000	HKİT 1/K	Kombine İY	D+/R+	FOS	Yaşıyor
9. -	C450G	138200	OKİT 6/E	Nöroblastom	+	GCV	Yaşıyor
10.S897L D898N	D605E L397P	45900	HKİT 11/E	AML	D+/R+	GCV	Yaşıyor
11.S897L D898N A457V	-	1658000	AKİT 3/E	Kombine İY	D+/R+	FOS CDV	Ex
12.P287L	C450G S483G	52600	HKİT 14/K	AML	D+/R+	GCV	Yaşıyor
13.G874R S897L D898N	-	144000	HKİT 3/K	AML	D+/R+	CDV	Ex
14.A336V E882K	-	16450	- 1/E	Talasemi	+	GCV	Yaşıyor
15. S897L G371R	-	40800	AKİT 8/K	Aplastik Anemi	D+/R+	GCV CDV	Yaşıyor
16.S897L D898N S290N A457V	-	248000	OKİT 68/E	Multipl Myelom	+	GCV	Ex
17.S897L S956Y	-	26360	AKİT 61/E	ALL	D+/R+	GCV	Ex
18.S897L	A427T	27440	AKİT 45/K	AML	D+/R+	-	Ex
19.V355A	D605E	463000	AKİT 58/E	AML	D+/R+	GCV	Ex
20. -	A427T	16300	OKİT 29/K	B Hücreli Lenfoma	+	-	Yaşıyor
21.S897L D898N	T409P T438S S472G	105000	- 63/K	T Hücreli Lenfoma	+	VGCV	Yaşıyor
22. -	V408D	130800	AKİT 31/E	AML	D+/R+	GCV CDV	Ex
23. S897L D898N Q868L R1006S	-	793000	AKİT 0/E	Kombine İY	D+/R+	FOS CDV	Ex
24.S897L D898N	-	35000	HKİT 5/E	Kombine İY	D+/R+	GCV	Ex

25.S897L D898N K978M	L595V	240000	AKİT 28/E	Hodgkin Lenfoma	D+/R+	GCV	Yaşıyor
26.K947E	-	220000	OKİT 59/E	Hodgkin Lenfoma	D+/R+	VGCV	Yaşıyor
27.S897L D898N M827I	V408G A427T H411R	125000	AKİT 35/K	ALL	D+/R+	VGCV	Yaşıyor
28.V355A A816V E846Q G967C	A435G V452G D605E	25300	AKİT 27/E	ALL	D+/R+	GCV	Ex
29.Q807H	-	97320	AKİT 69/E	MDS	D+/R+	-	Yaşıyor
30.L545M	A522T	27000	AKİT 49/K	AML	D+/R+	GCV	Yaşıyor
31.L776D L777G N885S	Q614H	14600	HKİT 19/K	Orak Hücreli Anemi	D+/R+	-	Ex
32.ins885S D898N F942I	-	37000	AKİT 48/K	AML	D+/R+	GCV	Ex
33.V355A	-	115000	HKİT 20/E	AML	D+/R+	-	Yaşıyor
34.V355A	Değerlen- dirilemedi	13580	- 2/K	Rabdoid Tümör	+	-	Yaşıyor
35.S897L	D535N	6869	AKİT 43/K	ALL	D+/R+	GCV	Yaşıyor
36.ins 885S D898N	A427T	12000	AKİT 4/E	Aplastik Anemi	D+/R-	FOS	Yaşıyor
37.Q266R	-	16000	- 19/E	NHL	+	GCV	Yaşıyor
38. S281P	-	5500	AKİT 20/E	AML	D-/R+	-	Yaşıyor
39.ins 885 D898N	Çoğaltıla- madı	66300	OKİT 7/K	Ewing Sarkom	+	-	Yaşıyor
40. W780G	-	127000	AKİT 54/K	ALL	D+/R+	VGCV	Yaşıyor

İY; İmmün yetmezlik, NHL; Non-Hodgkin Lenfoma

**Tablo 11.** CMV UL54 ve UL97 gen bölgelerinde ilk defa bu çalışmada saptanan varyant sekanslar

UL97		UL54	
C450W/G	V408D	D378E	Q266R
L397P	L595V	A457V	S281P
A442D	V408G	P287L	Q807H
V475L	A435G	A336V	T885M
K444E	A522T	G371R	S856Y
S472G	Q614H	S290N	K978M
S483G	D535N	L545M	M827I
A427T	H411R	Q868L	L776D
T409P	V452G	A816V	F942I
T438S	L622Q	E882K	G967C
		R1006S	E846Q
		N885S	L777G

#### 4.4. CMV Suşunda Mutasyon Saptanmayan Hastaların Özellikleri

Çalışmada, CMV DNA dizi analizinde GCV direnci ve varyant sekans 8 hastada saptanmadı. Mutasyon saptanmayan hastalardan 2 hastada UL54 gen bölgesi ikinci bölge sekans sonuçları değerlendirilemedi. CMV suşunda mutasyon saptanmayan hastaların özellikleri Tablo 12’de gösterilmiştir.

**Tablo 12.** CMV suşunda mutasyon saptanmayan hastaların özellikleri

Hasta No	CMV PCR (IU/ml)	Trans. Tipi Yaş/cins	Alt Hastalık	CMV Serolojisi (D/R)	Antiviral Tedavi	Hastanın Durumu
41.	10100	AKİT 8/E	Kombine İY	D+/R+	FOS	Yaşıyor
42.	1287000	AKİT 40/E	MDS	D+/R+	GCV	Yaşıyor
43.	19000	AKİT 55/E	AML	D+/R+	GCV	Yaşıyor
44.	2028000	AKİT 28/K	Hodgkin Lenfoma	D+/R+	VGCV	Yaşıyor
45.	19880	HKİT 0/E	Kombine İY	D+/R+	GCV	Yaşıyor
46.	33290	- 71/E	B Hücreli Lenfoma	+	GCV	Yaşıyor
47.	32300	AKİT 10/E	ALL	D+/R+	GCV CDV	Ex
48.	5530000	- 0/E	Kombine İY	+	-	Ex

İY; İmmün yetmezlik

## 5.TARTIŞMA

CMV, son yıllarda bağışık yetmezliği olan hastalarda neden olduğu ağır enfeksiyonlar nedeniyle önem kazanan ve bu hastalarda en sık rastlanan fırsatçı patojenlerden biridir (1). CMV enfeksiyonu olan immün yetmezlikli hastaların sistemik tedavisinde GCV ilk basamak ilaçtır. CDV ve FOS çoğunlukla GCV tedavisi başarısızlığı veya ciddi yan etkilerin olması durumunda kullanılır. Temel olarak tedavi başarısızlığı, antiviral tedavi altında seçilen ilaca dirençli CMV türlerine bağlıdır. Vakaların %94'ünde GCV direnci UL97 genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (84).

Şiddetli immünsüpresyon ve uzun süreli tedavi; UL97 mutasyonlarına ek olarak UL54 mutasyonlarının seçimine yol açabilir, bu da GCV direncinin artmasına veya CDV ve/veya FOS'e çapraz dirence neden olur. Nadiren, UL54 genindeki mutasyon GCV direncinin ilk belirteci olabilmektedir (54, 55, 85).

CMV enfeksiyonlarında birkaç hafta uygun dozda verilen antiviral tedaviden sonra viral yük sabit kalır veya artarsa veya CMV hastalığı gelişirse ilaç direncinden şüphelenilebilir. Antiviral tedavinin ilk 6 haftasında direnç gelişimi olağan değildir ancak immün yetmezliği olan pediatri hastalarında direnç geliştiği bildirilmektedir. Hastanın bağışıklık durumuna bağlı olarak, sonuçlar asemptomatik enfeksiyondan yaşamı tehdit eden hastalıklara kadar değişebilir (4).

KİT alıcılarında CMV antiviral ilaç direnci %1.7-5.1 arasında değişmektedir (86). Vejrazkova ve ark. (87) erişkin KİT alıcısı 101 hasta ile yaptıkları çalışmada 3 (%2.9) hastada UL97 geninde ilaç direncine yol açan mutasyon bulmuşlardır. Bizim yaptığımız çalışmada erişkin KİT alıcısı olan toplam 24 hastanın 3 (%12.5)'ünde antiviral direnç bulundu.

İran’da renal transplant alıcılarında yapılan bir çalışmada; GCV tedavi öyküsü olan 112 hastanın 3 (%2.6)’ünde UL97 geninde GCV direnci tespit edilmiştir (5).

Pediatric hastalarında antiviral dirençli CMV enfeksiyonlarının epidemiyolojisi hakkında bilgiler ise sınırlıdır. Kore’de 49 pediatrik KİT alıcısında yapılan bir çalışmada antiviral direnç mutasyonu UL97 geninde %4.1 (2/49) ve UL54 geninde %2.0 (1/49) oranında saptanmıştır (58). Kim ve ark. (88) pediatri KİT alıcılarında %10 (4/39) oranında direnç saptamışlardır. Çalışmamızda pediatri KİT alıcılarında %16.6 (3/18) oranında antiviral direnç saptanmıştır.

GCV direnç mutasyonları genellikle ilk olarak UL97 kinaz geninde gelişir. GCV direnci olan vakaların %80’inde UL97 mutasyonlarından biri (M460V/I, H520Q, C592G, A594V, L595S ve C603W) bulunmaktadır. Bu UL97 mutasyonları (M460V/I, H520Q, A594V, L595S ve C603W) GCV direncinde (EC50) 7-10 kat artış oluştururken C592G mutasyonu 3 kat artış oluşturur (54, 55, 61).

Bu çalışmada 48 hastadan 6 (%12.5)’sında antiviral direnç mutasyonu bulundu. Dört hastada sadece UL97 gen bölgesinde antiviral direnç mutasyonu saptandı. İki hastada E596G mutasyonu, iki hastada ise sırasıyla C603W ve A591V mutasyonu bulundu. Ayrıca bir hastada UL97 gen bölgesinde M460I ve C592G mutasyonları ve eş zamanlı olarak UL54 gen bölgesinde F412L mutasyonu tespit edildi. Bir hastada ise UL97 gen bölgesinde mutasyon olmadan tek başına UL54 gen bölgesinde L957F mutasyonu bulundu.

Foulonge ve ark. (89) 214 immünsüprese hasta ile yaptıkları çalışmada; 8 (%3.7) hastaya ait olan 9 izolatta UL97 mutasyonlarından (M460V, A594V, A594T, L595S ve C603W) birini veya daha fazlasını tespit etmişlerdir. Ayrıca iki izolatta ek olarak UL54 geninde P522S mutasyonu saptamışlardır.

Hamprecht ve ark. (90) CMV retinitisi ve fatal CMV ensefaliti gelişen hematopoetik kök hücre nakli alıcısında; transplantasyonun 164. ve GCV tedavisinin ise 101. gününde GCV direnci (UL97 mutasyonları M460V, L595S ve C603W) gelişen bir olgu sunmuşlardır.



Ülkemizde Zeytinoğlu ve ark. (91) renal transplant alıcısında transplantasyon sonrası 193. günde A594V mutasyonu ve ayrıca KİT alıcısı bir çocuk hastada transplantasyondan 10 ay sonra C603W mutasyonu bulunan iki olgu sunmuşlardır.

Bu çalışmada 48 hastanın birinde UL97 gen bölgesinde C603W mutasyonu bulundu. Wiskott Aldrich sendromu tanısı olan 2 yaşında erkek hasta, dış merkezde CMV enfeksiyonu nedeniyle GCV ve FOS tedavileri almış. Transplantasyon için merkezimize sevk edilen anti CMV IgG (+) hastaya, anti CMV IgG (+) donörden AKİT yapılmış. Transplantasyonun 28. günündeki kan örneğinde CMV antiviral direnç araştırıldı ve CMV DNA sonucu 11800 IU/ml idi. Hasta bu dönemde 73 gün GCV ve 23 gün FOS kullanmıştı. Hasta transplantasyonun 33. gününde kaybedilmiş. Hastadan izole edilen CMV suşunda UL97 gen bölgesinde GCV direncine yol açan C603W mutasyonu bulundu. UL54 gen bölgesinde ise antiviral direnç mutasyonu bulunmadı. Bu hastanın UL97 gen bölgesindeki mutasyonla uyumlu olarak GCV tedavisi ile viral yükte düşüş olmazken, FOS tedavisi sonrası viral yükte düşüş izlenmiştir. Ayrıca UL54 gen bölgesinde S897L ve D898N; UL97 gen bölgesinde ise D605E ve L622Q varyant sekansları bulundu. Literatür incelendiğinde L622Q mutasyonunun ilk kez bu çalışmada tespit edildiği görülmüştür.

İran'da böbrek transplant alıcısı ve KİT alıcısı toplam 87 hastada UL97 geninde A594V, H520Q, M460V, C592G, M460I, C603W, L595S, E596G ve Del 594 mutasyonları saptanmıştır (92).

Bu çalışmada 48 hastanın ikisinde UL97 gen bölgesinde GCV direncine yol açan E596G mutasyonu tespit edildi. İlk hasta AML hastası olup; anti CMV IgG (+) olan hastaya anti CMV IgG (+) donörden haploidentik KİT yapılmıştı. Transplantasyonun 125. günündeki kan örneğinde CMV antiviral direnç araştırıldı ve CMV DNA 15000 IU/ml idi. Hasta bu dönemde 74 gün GCV ve 7 gün FOS tedavisi almıştır (Şekil 11). Hasta KİT'in 136. gününde kaybedilmiştir. UL54 gen bölgesinde antiviral dirence yol açan mutasyon bulunmadı. CMV suşunun UL54 gen bölgesinde V355A varyant sekansı, UL97'de ise D605E, A427V, K444E ve V475L varyant sekansları bulundu. Literatür incelendiğinde K444E ve V475L varyant sekanslarının ilk kez bu çalışmada tespit edildiği görülmüştür.

Çalışmada E596G mutasyonu bulunan ikinci hasta ALL tanısıyla takip edilmekteydi. Anti CMV IgG (+) olan 21 yaşında erkek hastaya anti CMV (+) donörden AKİT yapılmış. Transplantasyonun 696. günündeki kan örneğinde CMV antiviral direnç araştırıldı ve CMV DNA sonucu 105000 IU/ml idi. Hastadan izole edilen CMV suşunda UL97 gen bölgesinde E596G mutasyonu bulundu. UL54 gen bölgesinde birinci bölgede antiviral direnç mutasyonu bulunmadı. UL54 gen bölgesi 2. bölge ise dizi karışık olduğu için değerlendirilemedi. Hasta bu dönem 26 gün GCV tedavisi almıştı. Hastanın halen hematoloji servisinde tedavi ve takibi devam ediyor.

Fransa'da valasiklovir profilaksisi alan 24 böbrek transplant alıcısı ile yapılan bir çalışmada, bir hastada transplantasyon sonrası 131. günde UL97 geninde M460I mutasyonu bulunmuştur (93).

Chou ve ark. (94) valgansiklovir profilaksisi alan D+/R- böbrek transplant hastalarında gansiklovir direncine yol açan mutasyonları fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlemişlerdir. Aynı çalışmada genotipik yöntemlerle UL97 ve UL54 gen bölgelerinde antiviral direnç çalışılmış olup; 72 hastanın 6 (%8.3)'sında antiviral ilaç direnç mutasyonu saptanmıştır. Hastaların 5 (%6.9)'inde UL97 gen bölgesinde (2 hastada M460V, 2 hastada C592G ve 1 hastada C603W) mutasyon bulunmuştur. Bir hastada ise UL97 geninde mutasyon tespit edilmemiş ancak UL54 gen bölgesinde P522S mutasyonu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda UL54 gen bölgesinde F412V/S mutasyonlarının GCV/CDV direncine yol açtığı bildirilmiştir (4). ABD'de 2011 yılında rekombinant virüsler kullanarak yapılan bir çalışmada ise ilk olarak UL54 gen bölgesinde F412L/C mutasyonunun GCV ve CDV direncine yol açtığı gösterilmiştir (95).

Chou ve ark. (58) 49 KİT alıcısı hastadan 2'sinde UL97 geninde M460V ve C592G mutasyonu; M460V mutasyonu olan hastada ayrıca UL54 geninde T700A mutasyonu bulunmuşlardır.

Bu çalışmada 48 hastanın birinde UL97 gen bölgesinde GCV direncine yol açan C592G ve M460I mutasyonu ve ayrıca aynı hastada eş zamanlı olarak UL54 gen bölgesinde GCV/CDV direncine sebep olan F412L mutasyonu bulundu. AML tanısıyla takip edilen anti CMV IgG (+) olan hastaya anti CMV IgG (+) donörden haploidentik KİT

yapılmıştı. Transplantasyonun 343. günündeki CMV DNA viral yükü 49500 IU/ml olan kan örneğinde CMV antiviral direnç araştırıldı. Bu kan örneği alındığında hasta toplamda 93 gün GCV, 61 gün FOS ve 6 gün CDV tedavisi almıştı. Bölgemizde daha önce yapılan bir çalışmada bu hasta dahil edilmiş olup CMV suşunda KİT'in 226. gününde C592G mutasyonu bulunmuştu ve bu çalışmada UL54 gen bölgesi çalışılmamıştı (103). Bu durum zaman içerisinde UL97 gen bölgesine M460I mutasyonunun eklendiğini göstermektedir. Pediatrik KİT alıcılarında yapılan bir çalışmada AKİT sonrası 54. günde C603W mutasyonu bulunan hastada AKİT sonrası 149. günde bu mutasyona ek olarak A594V mutasyonunun eklendiğini bildirilmiştir (96).

Bazı UL97 mutasyonları (C592G ve A591V) EC50 değerinde düşük seviyeli artışa yol açarlar (61). Chou ve ark. (61) düşük dereceli GCV direnci için iyi bilinen bir mutasyon olan C592G'ye benzer olarak A591V için EC50 değerini 3.8 bulmuştur. Başka bir çalışmada ise A591V mutasyonunun UL54 mutasyonu ile beraber görüldüğünde EC50 değerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (66). UL54 polimeraz mutasyonları UL97 mutasyonları ile birleştirildiğinde yüksek seviyeli (15 kat, genellikle 20 kat) GCV direncine yol açmaktadır (61). Bu durum CMV antiviral direnci araştırılmasında UL97 ve U54 gen bölgelerinin her ikisinin de çalışılmasının gerekli olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada AML tanısıyla AKİT yapılmış olan anti CMV IgG (+) olan 52 yaşındaki hastaya, 2.kez anti CMV IgG (+) donörden AKİT yapılmıştı. AKİT'in 301. günündeki kan örneğinde CMV antiviral direnç araştırıldı. Hasta bu dönemde 53 gün GCV tedavisi almıştı ve kan örneğinde CMV DNA 2224000 IU/ml olarak bulundu. Hastadan izole edilen CMV suşunda UL97 gen bölgesinde GCV direncine yol açan A591V mutasyonu bulundu. UL54 gen bölgesinde ise antiviral direnç mutasyonu bulunmadı. Hasta KİT'in 324. gününde ex olmuştur.

Campos ve ark. (86) 2010-2014 yılları arasında AKİT alıcıları ile yaptıkları çalışmada; UL97 gen bölgesinde iki hastada A594V ve üç hastada sırasıyla C592G, L595W ve C603W mutasyonlarını bulmuşlardır. Ayrıca UL97 geninde GCV direncine yol açan mutasyon olmadan iki hastada sırasıyla UL54 geninde P522S ve L957F mutasyonları tespit edilmiştir ve bu çalışma literatürde L957F'nin klinik örnekten izole edildiği ilk çalışmadır.

CMV suşunun UL54 gen bölgesindeki L957F mutasyonunun sadece düşük düzey GCV direncine yol açtığı bilinmektedir (55, 97, 98). Yalnızca GCV'ye direnç kazandıran birkaç UL54 mutasyonundan biri olan L957F mutasyonu, direnç mutasyonlarının çoğunun aksine, korunmuş bölgelerin dışında yer almaktadır (97, 98). GCV'e uzun süre maruziyetten sonra, UL54 DNA polimeraz genindeki mutasyonlar seçilebilir ve genellikle önceden var olan UL97 mutasyonlarına eklenir. UL54 mutasyonları genellikle düşük seviyede dirence yol açarak ilaç direncine katkıda bulunmaktadır. Nadiren, UL54 genindeki mutasyon GCV direncinin ilk belirteci olabilmektedir (54,55).

Benzer olarak bu çalışmada da 48 hastanın birinde UL97'de mutasyon olmadan tek başına UL54'te L957F mutasyonu tespit edildi. Hastaya CMV viral yükününün yüksek olduğu dönemde idrarda BK DNA düzeyi  $1.91 \times 10^8$  kopya/ml olması üzerine sidofovir tedavisi başlanmıştır. Hastanın bu tedavi sonrası CMV DNA düzeyinde düşüş izlenmiştir. Bölgemizde daha önce yapılan bir çalışmada bir hastada UL97'de mutasyon olmadan tek başına UL54 geninde L802M mutasyonu bulunmuştur (85).

Ülkemizde CMV antiviral direnç ile ilgili çalışmalar az sayıdadır. Sarınoğlu ve ark. (99) yapmış olduğu çalışmada; 22 hematopoetik kök hücre transplantasyonu yapılan hastaların 5 (%22,7)'inde klinik dirençle ilişkili CMV UL97 gen mutasyonu bulmuşlardır. Arslan ve ark. (100) KİT alıcısında CMV ensefaliti gelişen bir olguda, UL97 geninde M460V mutasyonu saptamışlardır. Zeytinoğlu ve ark. (101) kalp nakli sonrası CMV enfeksiyonu nedeniyle GCV başlanan olguda, tedavi sırasında UL97 geninde C607F mutasyonu geliştiğini göstermişlerdir. Başka bir çalışmada böbrek transplantasyonu sonrası CMV enfeksiyonu gelişen olguda, transplantasyon sonrası 5. ayda UL97 geninde A594V mutasyonu geliştiği bildirilmektedir (102).

Bölgemizde yapılan bir çalışmada 30 hastanın ikisinde antiviral direnç bulunmuştur. Bu hastaların birinde CMV UL97 gen bölgesinde M460V mutasyonu; diğerinde ise UL97 gen bölgesinde mutasyon olmadan UL54 gen bölgesinde L802M mutasyonu saptanmıştır (85). Bölgemizde yapılan başka bir çalışmada ise CMV enfeksiyonu olan 49 hastanın birinde UL97 geninde C592G mutasyonu bulunmuştur (103).

Bu çalışmada 27 hastada literatürde bildirilen ve fenotipik testlerle ilaçlara duyarlı olduğu belirlenen 11 varyant sekans (UL54'te V355A, V450A, ins885S, S897L,

D898N, G474R, V927M, C961R ve K947E; UL97'de D605E ve A427V mutasyonu) saptandı (70, 77, 79, 104). Ayrıca daha önceki yayınlarda bildirilmeyen çok sayıda varyant sekans tespit edildi. Direnç araştırmaları sonucunda saptanan her genetik mutasyon, klinik dirence yol açmayabilir. Herhangi bir mutasyonun antiviral dirence yol açıp açmadığının belirlenmesinde, referans yöntem olarak fenotipik testler önerilmektedir.



## 6.SONUÇLAR

Sonuç olarak bu çalışmada 48 hastanın 6 (%12.5)'sında antiviral direnç mutasyonu bulundu. Pediatri KİT alıcılarında %16.6 (3/18), erişkin KİT alıcılarında %12.5 (3/24) oranında antiviral direnç saptandı. Bu oranın transplant hastalarında yapılan daha önceki çalışmalara kıyasla yüksek olduğu dikkati çekmektedir. Çalışmaya genellikle tedavi alan ve tedaviye rağmen viral yükü düşmeyen veya artan hastaların dahil edilmiş olması, literatüre kıyasla yüksek orandaki direncin nedeni olabilir.

Çalışmada dört hastada tek başına UL97 gen bölgesinde antiviral direnç mutasyonu bulundu. İki hastada E596G mutasyonu; iki hastada ise sırasıyla C603W ve A591V mutasyonu; ayrıca bir hastada UL97 gen bölgesinde M460I ve C592G mutasyonları ve UL54 gen bölgesinde eş zamanlı olarak F412L mutasyonu; bir hastada ise UL97 gen bölgesinde mutasyon olmadan tek başına UL54 gen bölgesinde L957F mutasyonu bulundu. Çalışmada UL97 ve UL54 gen bölgelerinde mutasyon saptanmış olması, CMV antiviral ilaç direnç çalışmalarında her iki gen bölgesinin de çalışılması gerektiğini göstermektedir.

Antiviral direnç tayini, hastaların takibinde önemli olup; tedavinin planlanmasında klinisyeni yönlendirecektir. Hastaların takibinde klinisyen ve laboratuvar iş birliği oldukça önemlidir.

Bu çalışmada daha önceki yayınlarda bildirilmeyen çok sayıda varyant sekans saptanmıştır. Saptanan varyant sekansların ilaç direncindeki rolünün belirlenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

## 7. KAYNAKLAR

1. Hodinka RL. Human Cytomegalovirüs, In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Landry ML, Funke G, Richter SS, Warnock DW (Eds), Manual of Clinical Microbiology (11th ed), Vol 2, ASM press, Washington D.C, 2016;1718-1736
2. Özsürekci Y, Öncel EK, Ceyhan M. Sitomegalovirusun neden olduğu enfeksiyonlarda tanısal yaklaşımlar ve sorunlar. *Cocuk Sagligi ve Hastaliklari Dergisi* 2016;59:182-187
3. Us T. Cytomegalovirüs (HHV5) Topçu A.W, Söyletir G, Doğanay M. (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi kitabında. Nobel Tıp Kitapevleri, 2017;Cilt 2,1485-1492.
4. Lurain NS, Chou S. Antiviral Drug Resistance of Human Cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2010;23(4):689-712.
5. Aslani HR, Ziaie S, Salamzadeh J, et al. Incidence of Ganciclovir Resistance in CMV-positive Renal Transplant Recipients and its Association with UL97 Gene Mutations. *Iran J Pharm Res* 2017;16(2):805-810
6. HUANG DD, BANKOWSKI MJ. Susceptibility Test Methods: Viruses, In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Landry ML, Funke G, Richter SS, Warnock DW (Eds), Manual of Clinical Microbiology (11th ed), Vol 2, ASM press, Washington D.C, 2016;1913-1932
7. HO M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical microbiology and immunology* 2008;197(2):65-73.
8. Riley HD. Jr. History of the Cytomegalovirüse. *South Med J* 1997;90(2):184-90

9. Santos CA. Cytomegalovirus and Other  $\beta$ -Herpesviruses. *Semin Nephrol* 2016;36(5):351-361
10. Mocarsky ES. Cytomegalovirüs and their replication, In: *Fields Virology* Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds), Lippincott-Roven Publishers, Philadelphia, 1996: 2447-92
11. Hasdemir UM. Herpes Virüsler, Topçu A.W, Söyletir G, Doğanay M. (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi kitabında. Nobel Tıp Kitapevleri* 2017; Cilt 2,1459-1466.
12. Jean Beltran PM, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert review of proteomics* 2014;11(6):697-711.
13. Rubin RH. The pathogenesis and clinical management of cytomegalovirus infection in the organ transplant recipient: the end of the 'silo hypothesis'. *Current opinion in infectious diseases* 2007;20(4):399-407.
14. Çolak D, Mutlu D. Herpes grubu viruslar. Us AD, Ergünay K (eds). *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji Kitabında. Bilimsel tıp Yayınevi, Ankara, 2012; s.528-540*
15. Arpacı E, Beşışık SK. Hematopoetik kök hücre nakli ve sitomegalovirüs enfeksiyonu: Değişen klinik tanı ve tedavi. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi* 2007;70(2):51-55.
16. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26:86–101.
17. Zeytinoğlu A, Erensoy S, Göksel S ve ark. Sitomegalovirüs hastalığında antijenemi testi ile kantitatif DNA testinin karşılaştırılması. *FLORA* 2002 7(4), 241-5.
18. Theiler RN, Caliendo AM, Pargman S, et al. Umbilical cord blood screening for cytomegalovirus DNA by quantitative PCR. *J Clin Virol* 2006;37: 313–316
19. Çolak D. Cytomegalovirüs Enfeksiyonlarını Tanısında Nükleik Asit Testlerinin Kullanımı. *Moleküler Tanı Dergisi* 2007;3(1):87-89
20. Baldanti F, Lillieri D, Gerna G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *J Clin Virol* 2008;41:237–241



21. Gerna G, Lilleri D. Monitoring transplant patients for human cytomegalovirus: diagnostic update. *HERPES* 2006;13:4–11
22. Gerna G, Furione M, Baldanti F, et al. Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2709–2717.
23. Bestetti A, Pierotti C, Terreni M, et al. Comparison of three nucleic acid amplification assays of cerebrospinal fluid for diagnosis of cytomegalovirus encephalitis. *J Clin Microbiol* 2001;39:1148–1151
24. Hirsch HH, Lautenschlager I, Pinsky BA, et al. An international multicenter Performance analysis of cytomegalovirusload tests. *Clin Infect Dis* 2013;56:367–373.
25. Razonable RR, Asberg A, Rollag H, et al. Virologic suppression measured by a cytomegalovirus (CMV) DNA test calibrated to the World Health Organization international standard is predictive of CMVdisease resolution in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2013; 56:1546–1553.
26. Çolak D, Öğünç D. Sitomegalovirüs infeksiyonlarında tanı yöntemleri. *Flora* 1999;4(2):82- 89.
27. Landini MP, Lazzarotto T, Maine GT, et al. Recombinant mono- and polyantigens to detect cytomegalovirus-specific immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1995;33:2535–2542.
28. Vornhagen R, Plachter B, Hinderer W, et al. Early serodiagnosis of acute human Cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens. *J Clin Microbiol* 1994;32:981–986.
29. Tanimura K, Yamada H. Potential biomarkers for predicting congenital cytomegalovirus infection. *International journal of molecular sciences* 2018; 19(12), 3760.
30. Bilavsky E, Watad S, Levy I, et al. Positive IgM in congenital CMV infection. *Clinical pediatrics* 2017; 56(4), 371-375.
31. Grangeot-Keros L, Mayaux MJ, Lebon P, et al. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *Journal of Infectious Diseases* 1997;175(4), 944-946.

32. RAZONABLE RR. Drug-resistant cytomegalovirus: clinical implications of specific mutations. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2018;23(4):388-394.
33. Meesing A, Razonable RR. New developments in the management of cytomegalovirus infection after transplantation. *Drugs* 2018;78(11):1085-1103.
34. Chou S, Satterwhite LE, Ercolani RJ. New locus of drug resistance in the human cytomegalovirus UL56 gene revealed by in vitro exposure to letermovir and ganciclovir. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2018;62(9): e00922-18.
35. Wang LH, Peck RW, Yin Y, et al. Phase I safety and pharmacokinetic trials of 1263W94, a novel oral anti-human cytomegalovirus agent, in healthy and human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(4):1334-42.
36. Papanicolaou GA, Silveira FP, Langston AA, et al. (2018). Maribavir for refractory or resistant cytomegalovirus infections in hematopoietic-cell or solid-organ transplant recipients: a randomized, dose-ranging, double-blind, phase 2 study. *Clinical Infectious Diseases* 2019;68(8):1255-1264.
37. Lalezari JP, Aberg JA, Wang LH, et al. Phase I dose escalation trial evaluating the pharmacokinetics, anti-human cytomegalovirus (HCMV) activity, and safety of 1263W94 in human immunodeficiency virus-infected men with asymptomatic HCMV shedding. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2969-76.
38. Winston DJ, Young JA, Pullarkat V, et al. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant recipients: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Blood* 2008; 111:5403-10.
39. Aktaş F. Antiviral ajanlar. Topçu A.W, Söyletir G, Doğanay M. (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi kitabında*. Nobel Tıp Kitapevleri, 2008; Cilt 2, s.399-424.
40. Sayın A. Antiviral ajanlar. Us AD, Ergünay K (eds). *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji kitabında*. Bilimsel Tıp Yayınevi, 2012, s.635-655
41. Chou S. Antiviral drug resistance in human cytomegalovirus. *Transplant infectious disease* 1999; 1(2), 105-114

42. Boivin G, Chou S, Quirk MR, Erice A, Jordan MC. Detection of ganciclovir resistance mutations quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in leukocytes of patients with fatal disseminated CMV disease. *J Infect Dis* 1996; 173:523–528.
43. Wolf DG, Smith IL, Lee DJ et al. Mutations in human Cytomegalovirus UL97 gene confer clinical resistance to ganciclovir and can be detected directly in patient plasma. *J Clin Invest* 1995; 95:257–263.
44. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. Transplantation Society International CMV Consensus Group. 2013. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013; 96:333–360.
45. Hantz S, Michel D, Fillet AM, et al. Early selection of a new UL97 mutant with a severe defect of ganciclovir phosphorylation after valaciclovir prophylaxis and short-term ganciclovir therapy in a renal transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1580–1583.
46. Iwasenko JM, Scott GM, Naing Z, Glanville AR, Rawlinson WD. Diversity of antiviral-resistant human cytomegalovirus in heart and lung transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2011;13:145–153.
47. Erice A, Gil-Roda C, Pérez JL, et al. Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *J Infect Dis* 1997;175:1087–1092.
48. Klug SW. Cummings WR. *Concept of Genetics*. Prentice Hall, New Jersey, 2000; 745
49. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977; 74: 5463-7
50. Gökahmetoğlu S. DNA dizi analizi. *Klinik Mikrobiyolojide Pyrosekans Uygulama Kursu*. Ankara 2010, s. 67-78.
51. Üstek D, Abacı N, Sırma S, Çakiris A. Yeni Nesil DNA Dizileme. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü* 2011; 1:11-8
52. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA in honey bee colony collapse disorder. *Science* 2007; 318(5848):283-7

53. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods* 2008; 5 (1): 16-8
54. SHAFER RW, CHOU S. Mechanisms of Resistance to Antiviral Agents, In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Landry ML, Funke G, Richter SS, Warnock DW (Eds), *Manual of Clinical Microbiology* (11th ed), Vol 2, ASM press, Washington D.C, 2016;1894-1912
55. Hakki M, Chou S. The biology of cytomegalovirus drug resistance. *Current opinion in infectious diseases* 2011;24(6), 605.
56. Chou S. Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients. *Current opinion in infectious diseases* 2015; 28(4), 293.
57. Shmueli E, Or R, Shapira MY et al. High rate of cytomegalovirus drug resistance among patients receiving preemptive antiviral treatment after haploidentical stem cell transplantation. *J Infect Dis* 2014; 209:557–561.
58. Choi SH, Hwang JY, Park KS et al. The impact of drug-resistant cytomegalovirus in pediatric allogeneic hematopoietic cell transplant recipients: a prospective monitoring of UL97 and UL54 gene mutations. *Transpl Infect Dis* 2014;16(6), 919-929.
59. Choi KY, Sharon B, Balfour HH Jr, et al. Emergence of antiviral resistance during oral valganciclovir treatment of an infant with congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *J Clin Virol* 2013; 57:356–360.
60. Kotton CN, Kumar, D, Caliendo AM, et al. The third international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation *Transplantation* 2018;102(6), 900-931.
61. Chou S, Ercolani RJ, Vanarsdall AL. Differentiated levels of ganciclovir resistance conferred by mutations at codons 591 to 603 of the Cytomegalovirus UL97 kinase gene. *J Clin Microbiol* 2017; 55:2098–2104
62. Erice A. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:286–297.
63. Kleiboeker S, Nutt J, Schindel B, Dannehl J, Hester, J. Cytomegalovirus antiviral resistance: characterization of results from clinical specimens. *Transplant Infectious Disease* 2014;16(4), 561-567.

64. Chou S. Recombinant phenotyping of cytomegalovirus UL97 kinase sequence variants for ganciclovir resistance. *Antimicrob. Agents Chemother* 2010; 54:2371–2378
65. Boutolleau D, Deback C, Bressollette-Bodin C, et al. Resistance pattern of cytomegalovirus (CMV) after oral valganciclovir therapy in transplant recipients at high-risk for CMV infection. *Antiviral Res* 2008; 81:174–179.
66. Chou S, Waldemer RH, Senters AE, et al. Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir. *J. Infect. Dis* 2002; 185:162–169
67. Lurain NS, Bhorade SM, Pursell KJ, et al. Analysis and characterization of antiviral drug-resistant cytomegalovirus isolates from solid organ transplant recipients. *J. Infect. Dis* 2002; 186:760–768
68. Schreiber A, Harter G, Schubert A, et al. Antiviral treatment of cytomegalovirus infection and resistant strains. *Expert Opin. Pharmacother* 2009; 10:191–209.
69. Boivin G, Gilbert C, Gaudreau A, et al. Rate of emergence of cytomegalovirus (CMV) mutations in leukocytes of patients with acquired immunodeficiency syndrome who are receiving valganciclovir as induction and maintenance therapy for CMV retinitis. *J. Infect. Dis* 2001; 184:1598–1602.
70. Chou S, Van Wechel LC, Lichy HM, Marousek GI. Phenotyping of cytomegalovirus drug resistance mutations by using recombinant viruses incorporating a reporter gene. *Antimicrob. Agents Chemother* 2005; 49:2710–2715
71. Jabs DA, Martin BK, Forman MS, et al. Longitudinal observations on mutations conferring ganciclovir resistance in patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis: The Cytomegalovirus and Viral Resistance Study Group Report Number 8. *Am. J. Ophthalmol* 2001; 132:700–710
72. Limaye AP, Corey L, Koelle DM, Davis CL, Boeckh M. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *Lancet* 2000; 356:645–649.
73. Marfori JE, Exner MM, Marousek GI, Chou S, Drew WL. Development of new cytomegalovirus UL97 and DNA polymerase mutations conferring drug

- resistance after valganciclovir therapy in allogeneic stem cell recipients. *J. Clin. Virol* 2007; 38:120–125.
74. Martin M, Goyette N, Ives J, Boivin G. Incidence and characterization of cytomegalovirus resistance mutations among pediatric solid organ transplant patients who received valganciclovir prophylaxis. *J. Clin. Virol* 2010; 47:321–324.
  75. Campos AB, Ribeiro J, Boutolleau D, Sousa H. Human cytomegalovirus antiviral drug resistance in hematopoietic stem cell transplantation: current state of the art. *Reviews in medical virology* 2016;26(3), 161-182.
  76. 73-Lurain NS, Weinberg A, Crumpacker CS, Chou S. Sequencing of cytomegalovirus UL97 gene for genotypic antiviral resistance testing. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2001; 45(10), 2775-2780.
  77. Martin M, Gilbert C, Covington E, Boivin G. Characterization of human cytomegalovirus (HCMV) UL97 mutations found in a valganciclovir/oral ganciclovir prophylactic trial by use of a bacterial artificial chromosome containing the HCMV genome. *The Journal of infectious diseases* 2006; 194(5), 579-583.
  78. Boutolleau D, Burrel S, Agut H. Genotypic characterization of human cytomegalovirus UL97 phosphotransferase natural polymorphism in the era of ganciclovir and maribavir 2011; *Antiviral research* 91(1), 32-35.
  79. Chou S, Lurain NS, Weinberg A et al. Interstrain variation in the human cytomegalovirus DNA polymerase sequence and its effect on genotypic diagnosis of antiviral drug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1999;43(6), 1500-1502.
  80. Chou S, Marousek G, Li S, Weinberg A. Contrasting drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase mutations at the same exonuclease locus. *Journal of Clinical Virology* 2008;43(1), 107-109.
  81. Chou S, Lurain NS, Thompson KD, Miner RC, Drew WL. Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus. *The Journal of infectious diseases* 2003;188(1), 32-39.
  82. Fillet AM, Auray L, Alain S, et al. Natural polymorphism of cytomegalovirus DNA polymerase lies in two nonconserved regions located between domains

- delta-C and II and between domains III and I. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004;48(5), 1865-1868.
83. Chevillotte M, von Einem J, Meier BM, et al. A new tool linking human cytomegalovirus drug resistance mutations to resistance phenotypes. *Antiviral research* 2010; 85(2): 318-327
  84. Fischer L, Sampaio KL, Jahn G, Hamprecht K, Göhring K. Identification of newly detected, drug-related HCMV UL97-and UL54-mutations using a modified plaque reduction assay. *Journal of Clinical Virology* 2015;69, 150-155.
  85. Delice S, Gökahmetoğlu S, Kaynar L, Karakükçü M. “Gansiklovir Tedavisi Alan İmmün Yetmezlikli Hastalarda, CMV UL54 ve UL97 Gen Bölgelerinde Gansiklovir Direncinin Araştırılması”. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(3): 393-402
  86. Campos AB, Ribeiro J, Vaz CP, et al. Genotypic resistance of cytomegalovirus to antivirals in hematopoietic stem cell transplant recipients from Portugal: A retrospective study. *Antiviral research* 2017;138, 86-92.
  87. Vejrazkova E, Pliskova L, Hubacek P, et al. Clinical and genotypic CMV drug resistance in HSCT recipients: a single center epidemiological and clinical data. *Bone marrow transplantation* 2019;54(1), 146.
  88. Kim YJ, Boeckh M, Cook L, et al. Cytomegalovirus infection and ganciclovir resistance caused by UL97 mutations in pediatric transplant recipients. *Transplant Infectious Disease* 2012 14(6), 611-617.
  89. Foulongne V, Turriere C, Diafouka F, et al. Ganciclovir resistance mutations in UL97 and UL54 genes of Human cytomegalovirus isolates resistant to ganciclovir. *Acta virologica* 2004;48(1), 51-55.
  90. Hamprecht K, Eckle T, Prix L, et al. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation: pitfalls of phenotypic diagnosis by in vitro selection of an UL97 mutant strain. *The Journal of infectious diseases* 2003; 187(1), 139-143.
  91. Zeytinoglu A, Turhan A, Keskinoglu A ve ark. The first two ganciclovir resistant cytomegalovirus isolates from kidney and pediatric stem cell transplant recipients in Turkey. *Journal of Immunology and Clinical Microbiology* 2016; 1(3), 53-57.

92. Keyvani H, Saroukalaei ST, Mohseni AH. Assessment of the human cytomegalovirus UL97 gene for identification of resistance to ganciclovir in iranian immunosuppressed patients. *Jundishapur journal of microbiology* 2016; 9(5).
93. Alain S, Hantz S, Scieux C, et al. Detection of ganciclovir resistance after valganciclovir-prophylaxis in renal transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *Journal of medical virology* 2004;73(4), 566-573.
94. Chou S, Marousek G, Boivin G, et al. Recombinant phenotyping of cytomegalovirus sequence variants detected after 200 or 100 days of valganciclovir prophylaxis. *Transplantation*, 2010; 90(12), 1409-1413.
95. Chou S. Phenotypic diversity of cytomegalovirus DNA polymerase gene variants observed after antiviral therapy. *Journal of Clinical Virology* 2011; 50(4), 287-291.
96. Eckle T, Prix L, Jahn G, et al. Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes 2000; *Blood*, 96(9), 3286-3289.
97. Gilbert C, Boivin G. New reporter cell line to evaluate the sequential emergence of multiple human cytomegalovirus mutations during in vitro drug exposure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005;49(12), 4860-4866.
98. Gilbert C, Azzi A, Goyette N, Lin SX, Boivin G. Recombinant phenotyping of cytomegalovirus UL54 mutations that emerged during cell passages in the presence of either ganciclovir or foscarnet. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011;55(9), 4019-4027.)
99. Can Sarınoğlu R, Çolak D, Küpesiz OA, ve ark. CMV İzolatlarında Gansiklovir Direncinin Fenotipik Ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması. 2. Ulusal viroloji günleri, Mart 2018.
100. Arslan F, Tabak F, Avşar E, ve ark. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus encephalitis in a hematopoietic stem cell transplant recipient. *Journal of neurovirology* 2010;16(2), 174-178.
101. Zeytinoğlu A, Büke AÇ, Turhan A, ve ark. Tedavi sırasında gelişen gansiklovir direnci, olgu sunumu. 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Kasım 2013.



102. Keskinoglu A, Turhan A, Dinçel N, ve ark. Gansiklovir direnci saptanan bir renal transplant olgusu. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kasım 2012.
103. Çoşkun A, Gökahmetoğlu S, Midilli K, ve ark. İmmün Yetmezlikli Hastalardan Elde Edilen CMV Suşlarının Genotiplerinin Belirlenmesi ve Gansiklovir Direncinin Araştırılması. 2. Ulusal viroloji günleri. Mart 2018.
104. Weinberg A, Jabs DA, Chou S, et al. Cytomegalovirus Retinitis and Viral Resistance Study Group and the Adult AIDS Clinical Trials Group Cytomegalovirus Laboratories. Mutations conferring foscarnet resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis. *The Journal of infectious diseases* 2003; 187(5), 777-784.

**T.C.**  
**ERCİYES ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA**

.....'a ait “.....” adlı uzmanlık tezi, jürimiz tarafından .....Bilim Dalı'nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih : ..... / ... / 2020

İmza

Başkan : .....

Üye : .....

Üye : .....