

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

III. TRİMESTER HAMİLELERDE SERVİKAL SİTOMEGALOVİRUS
ATILIM SIKLIĞININ İMMUN FLORESAN DESTEKLİ HÜCRE
KÜLTÜRÜ VE PCR YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. Demet CANYILMAZ

Trabzon , 1998

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

III. TRİMESTER HAMİLELERDE SERVİKAL SİTOMEGALOVİRUS
ATILIM SIKLIĞININ İMMUN FLORESAN DESTEKLİ HÜCRE
KÜLTÜRÜ VE PCR YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. Demet CANYILMAZ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Murat ERTÜRK

Y. Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA (Ünal)



Trabzon , 1998

İhtisasım ve tezim süresince
her zaman desteğini bulduğum
sevgili anneme
her zaman yanımda olan
sevgili oğlum Ataol'a
ve yanımda olamayan
sevgili eşime

**KONJENİTAL CMV ENFEKSİYONLU BEBEĞİ
OLANBİR ANNENİN
İNTERNETTEN ALINAN MEKTUBU**

("http://www.cmv.org/ > International CMV Group) :

"My daughter, Jasmine, has congenital CMV. They didn't pick it up, however, until at that time was dismal. She had no use of the left side of her body. However, with a dedicated foster mum and acoupational / physical therapy, she has been making steady gains ever since. She come into our lives when she was 7 - 1/2 months old and had just learned to sit up at that time. She is now 15 months old and is using each side of her body equally, crawls, eats and gets into everything like a typical baby would. We expect that she will be walking by the end of summer or early fall. Her hearing checks out ok and so does her vision. This is one little girl who has beaten the dismal prognosis and now has only a "mild" disability, which is mostly confined to her gross motor skills delay."

(Kızım Jasmine konjenital CMV hastalıklıdır. O neşesizlenene kadar farkına varamadılar. Kızım vücudunun sol yanını kullanamamaktaydı. Ancak kendini ona adanmış bakıcı annesi ve kapsamlı bir fizik tedavi ile o zamandan beri sürekli gelişme kaydetmektedir. Kızım hayatımıza 7,5 aylıkken girdiğinde sadece oturmayı öğrenmişti. O şimdi 15 aylıktır ve vücudunun her iki yönünü de eşit kullanabiliyor, sürtünüyor, yiyor, bir bebeğin yapabileceği her şeyi yapabiliyor. Biz onun yaz sonunda veya sonbaharın başlangıcında yürüyeceğini bekliyoruz. İşitme kontrolleri normal, görme yeteneği de normaldir. Bu kötü prognozu yenen küçük bir kızdır ve şu anda hafif sakatlığı vardır. Bu sakatlıklar çoğunlukla göze batacak motor yeteneklerinin gecikmesi ile sınırlıdır)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	I
ÖNSÖZ	II
KISALTMALAR	III
1- GİRİŞ	1
2- GENEL BİLGİLER	2
2.1. İnsan Sitomegalovirusunun (HCMV) Genel Özellikleri	2
2.1.1. Sınıflandırması	2
2.1.2. Yapısı	2
2.1.3. Replikasyonu	3
2.1.4. Kültürü	4
2.1.5. Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Duyarlılığı	4
2.1.6. Tarihçesi	5
2.1.7. Vücutta Bulunduğu Yerler	5
2.1.8. Patolojisi ve İmmunolojisi	6
2.2. Epidemiyoloji ve Korunma	7
2.3. Kliniği	14
2.3.1. Yenidoğan ve Çocuklarda	14
2.3.2. CMV Mononukleozisi ve Erişkinlerdeki Klinik	16
2.3.3. İmmun Sistemi Baskılanmışlarda ve AIDS'li kişilerde klinik	16
2.3.4. CMV ve Gebelik	17

2.4. Tanısı	21
2.5. Proflaksi	
2.5.1. Pasif İmmünizasyon	28
2.5.2. Aktif İmmünizasyon	28
2.6. Tedavi	29
3- MATERYAL VE METOD	
3.1.Laboratuvar çalışmasında kullanılan malzeme ve kimyasallar	30
3.2.Solüsyonların hazırlanması	31
3.3.Fibroblast hücre kültürünün hazırlanması	33
3.4.Klinik örneklerin alınışı, laboratuvara iletilmesi ve hücre ekimi	34
3.5. Örnek ekimi yapılan hücre kültürlerinin immunfloresan yöntemle boyanması	38
3.6. CMV DNA ekstraksiyonu ve PCR	38
4- BULGULAR	
4.1.İnsan Fibroblast Hücre Kültürünün Hazırlanması ve CMV ile Enfekte Edilmesi	40
4.2.DEAFF Testi ile Değerlendirilmesi	40
4.3.Servikal Sürüntü Örneklerinde CMV DNA Ekstraksiyonu ve PCR	42
4.4.Servikal Sekresyon Örneklerinde CMV	44
5- TARTIŞMA	47
6- SONUÇLAR VE ÖNERİLER	54
7- ÖZET	56
8- İNGİLİZCE ÖZET	57
9- KAYNAKLAR	58

ÖNSÖZ

Bu çalışmada ve uzmanlık eğitimim sırasında her türlü yardımını ve desteğini gördüğüm, birlikte çalışmaktan ve tanımış olmaktan gurur duyduğum tez danışmanım, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Murat Ertürk'e içtenlikle teşekkür ederim.

Tanımış ve birlikte çalışmış olmaktan gurur duyduğum ve her zaman yanımda bulduğum, tez çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. A. O. Kılıç ve Yrd. Doç. Dr. F.Aydın'a içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışma örneklerini topladığım Trabzon Kadın ve Çocuk Hastanesi (Doğumevi) Başhekimi Dr. Mustafa Şirin'e, poliklinikte anlayışlarını gördüğüm bütün Kadın-Doğum uzmanı meslektaşlarıma, gebe polikliniği ve diğer ünitelerde çalışan doktor ve hemşire arkadaşlara teşekkür ederim.

Hematoloji laboratuvarında immun floresan mikroskop kullanımı ve fotoğraf çekimlerinde yardımlarını gördüğüm Dr. Yavuz Tekelioğlu'na teşekkür ederim.

İstatistiki değerlendirmeler konusundaki yardımlarından dolayı Yrd. Doç.Dr. Gamze Çan'a teşekkür ederim.

Ayrıca sevgilerini ve yardımlarını gördüğüm başta Dr.Meral Cihanyurdu olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

DemetCANYILMAZ

Trabzon, 1998

KISALTMALAR

HCMV	İnsan sitomegalovirusu
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
MM	Maintenance Media
GM	Growth Media
TC 199	Doku Kültür Vasatı
IF	İmmun Floresan
gp	Glikoprotein
DMSO	Dimetilsülfoksit
CPE	Sitopatik Etki
EDTA	Ethylene-diamine tetra acetic acid
DEAFF	Detection of Early Antigen by Fluorescence Foci Assay
SVKY	Shell Vial Kültür Yöntemi
kDa	Kilo Dalton
pp	Fosfoprotein
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu

1- GİRİŞ

Herpes virus ailesinin bir üyesi olan insan sitomegalovirusu (HCMV) intrauterin kazanılan enfeksiyonların en sık nedenidir (1). Enfeksiyon hayatın hangi döneminde kazanılırsa kazanılsın primer enfeksiyondan sonra latent kalmakta, zaman zaman reaktivasyonlar veya reenfeksiyonlar görülebilmektedir. Hamileliğin özellikle ilk trimesterinde geçirilen primer enfeksiyonların % 30 ile 40'ında virus fetusa geçmekte ve bebekler sitomegalik inklüzyon hastalıklı (CID) doğmaktadır. CID'li doğanların % 20'si ölmekte, % 10-20'si semptomatik, kalanlarda ise geç nörolojik komplikasyonlar gelişmektedir (1, 2). İmmun sistemi sağlam kişilerde enfeksiyon genellikle asemptomatik geçirilmekte, herhangi bir şekilde immün sistemi baskılanmışlarda ise ciddi klinik bozulmalara neden olmaktadır. Nedeni tam olarak ortaya konamamakla birlikte hamilelik boyunca servikal CMV oranı ilerleyici bir şekilde artış göstermektedir (3). HCMV, AIDS virusunun patogeneğinde bir kofaktördür ve AIDS'li hastalarda görülen en yaygın fırsatçı enfeksiyon etkenidir.

Bu çalışma ile hamileliğin ilerleyen aylarında servikal sekresyonda giderek artan oranda bulunan HCMV sıklığının araştırılması planlanmıştır. Bu amaçla, III.trimester hamilelerden alınan servikal sekresyon örnekleri diploid hücre kültürüne ekilmiş, HCMV spesifik monoklonal antikor kullanılarak erken oluşan antijenlerin tesbitine yarayan Detection of Early Antigen by Fluorescence Foci Assay (DEAFF) kullanılmıştır. Ayrıca, örneklerdeki viral DNA'nın amplifikasyonu esasına dayanan PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile kalitatif olarak virus taraması uygulanmıştır. DEAFF ve PCR ile servikal sekresyon örneğinde CMV varlığının araştırılması Türkiye'de ilk defa yapılmaktadır. Bu nedenle, Trabzon ili itibarı ile ortaya çıkacak olan bu sonuçların Türk ve uluslararası tıp literatürü için yararlı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca elde edilecek viral izolatlarla viral kültür koleksiyonu oluşturularak CMV'nin bölgemizde seyreden suşları hakkında daha ayrıntılı çalışmalara imkan tanınmış olacaktır.

2 - GENEL BİLGİLER

2.1. İnsan Sitomegalovirusunun genel özellikleri

2.1.1. Sınıflandırma

Herpesviridae familyasının β altfamilyası (lenfotropik grup) üyesi; insan herpes virus tip 5; insan sitomegalovirusu (Human cytomegalovirus= HCMV) olarak bilinir (4).

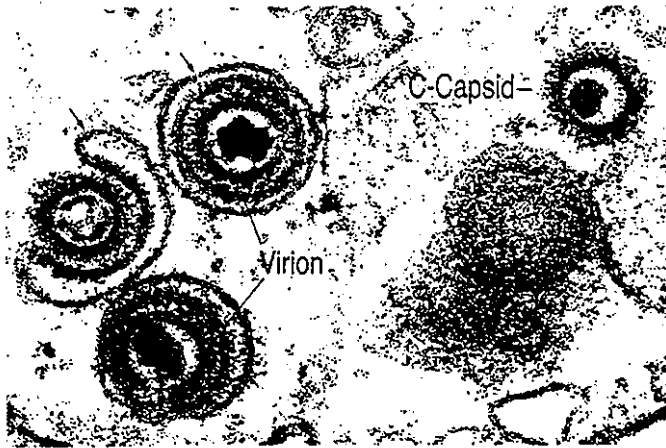
CMV'nin serotipleri tanımlanmamıştır; ancak değişik izolatların DNA dizileri karşılaştırıldığında suş benzerlikleri ve farklılıkları gösterilmiştir (5).

2.1.2. Yapısı

CMV; Herpesvirus ailesinin karakteristik yapısal özelliklerine sahip, zarflı bir DNA virusudur. 162 kapsomerden oluşan kapsidi ikozahedral yapıda olup, 100 nm çapındadır. Zarflı partikülün büyüklüğü ise 180-250 nm'dir. Çift iplikli (zincirli) CMV DNA'sı 230 kb büyüklüğünde, 3.2×10^7 dalton ağırlığındadır ve 100'ün üzerinde proteini kodlama yeteneğindedir (5). Tek segmentli genomu çıplak nükleik asit enfektivitesine sahip ve virion içi enzimleri olmayan bir virustur (4, 6, 7).

Elektron mikroskopik görünümü dışı doğru çıkıntılar içeren zarf ve elektro dens kor yapı itibarıyla tipik bir herpes virusa benzer (Şekil 1). Kapsidi oluşturan kapsomerler 15 nm çapında, 20 nm uzunluğundadır ve 3 nm çapında bir kanala sahiptir. Kapsomerlerden dışarı doğru radyal uzantılar vardır. Kapsomerler arası bağlantıların bunlarla olduğuna inanılmaktadır.

Nükleik asidi çevreleyen kapsid ve zarf arasında tegument tabaka vardır. Virusun yapısını oluşturan bu üç tabaka virusa ait spesifik protein veya glikoproteinleri (gp) içerir.



Şekil 1. CMV'nin Elektron Mikroskopik Görünümü

Kapsid Proteinleri:

- Major kapsid proteini (MCP : UL86 ürünü): Kapsid protein kütesinin % 90'ını oluşturur.
- Minor kapsid proteini (MCP: UL85 ürünü): Herpes simplex (HSV) viral protein 23'ü kodlayan HSV UL18'in pozisyonel homoloğu olarak tanımlanmıştır.
- Minor kapsid bağlayan protein (MCP- BP: UL46 ürünü)
- En küçük kapsid proteini (SCP: UL48, 49 ürünü): Fonksiyonu bilinmiyor.

Tegüment Proteinleri :

- Virion protein kütesinin % 40'ını oluşturur.
- Yüksek molekül ağırlıklı protein (HMWP: UL48 ürünü)
 - Yüksek molekül ağırlıklı proteini bağlayan protein (HMWP-bp : UL47 ürünü)
 - Temel fosfoprotein (BPP: UL32 ürünü= pp150): CMV virionunun immunojenik proteinlerinden biridir. Virion ile ilgili kinaz aktivitesi için primer fosfat yakalayıcısıdır.
 - Üst matriks proteini (UM : UL82 ürünü = pp 71)
 - Alt matriks proteini (LM : UL83 ürünü = pp 65).

Zarf Proteinleri :

Virion glikoproteinlerinin (gp) çoğu zarf yapısında bulunur; 8 adet gp tanımlanmıştır. Bunlardan 3'ü (CMV gB, gBN, gBC) HSV gp B ile homologdur. Ayrıca, bir diğer glikoprotein olan gH HSV gpH'nin CMV deki homoloğu olarak bilinir. HSV de olduğu gibi hem gB hem de gH virusun hücreye girişi ile ilişkili, esansiyel proteinlerdir. Zarf proteinleri ayrıca konak hücre β_2 -mikroglobulini, CD55, CD59 ve annexin II ile de ilişkilidir.

CMV virionunun ayrıca poliaminler (spermin, spermidin gibi), fosfolipidler (fosfatidil kolin, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin ve fosfatidilinozitol) yanında bir takım enzimleri (protein kinaz, DNase, DNA polimeraz, topoizomeraz, fosfataz gibi) içerdiği bilinmektedir (6)

2.1.3. Replikasyonu

Konak hücreye peplomer yapıdaki glikoprotein (ler) ile tutunarak hücre içerisine giren virionun kapsid yapısı çekirdek membranına bağlanır ve viral DNA'yı içeriye bırakır. Çekirdek içerisinde semikonservatif olarak replike olur. Replikasyon öncesi DNA moleküllerinin her iki ipliği de mRNA için kalıp görevi görür. Replikasyon hücre nükleusunda gerçekleşir. Çift iplikli CMV DNA'sı hücre nükleusuna girdikten sonra uç kısımlarından ekzonükleotid parçalanma neticesi çembersel hale gelip baş ve kuyruk birleşmesi ile konkatamerler oluşturur. Olgunlaşma sırasında DNA molekülleri konkatamerlerden kesilerek ayrılır (7).

CMV kendi timidin kinaz veya DNA polimerazını kodlamaz. Replikasyon sırasında virusun defektif formları oluşabilir. "Dense body" diye adlandırılan bu formlar nükleik asit hariç tüm viral yapıları içerir (8).

CMV'nin replikatif döngüsü en erken (IE), erken (E) veya geç (L) diye üç faza ayrılır. Her fazda farklı proteinler üretilir ve oluşturulma sıralarına göre en erken ve erken proteinlerin genellikle trans acting-gen indükleyici görevleri vardır. Olgun virion yapısına sokulmazlar. Geç dönemde oluşturulan proteinlerin hemen hepsi yapısal proteinlerdir. Biyosentez basamağının her üç döneminde oluşturulan proteinlere karşı hazırlanan monoklonal antikoları kullanarak virus ile enfekte hücre kültürlerinde bu proteinler gösterilebilmekte; özellikle en erken dönemde oluşan proteinlere özgül olanları ile viral enfeksiyonunun 24-48 saat içerisinde saptanması mümkündür (5).

2.1.4. Kültürü (üretimi)

CMV ile enfekte dokuların histolojik ve immunohistokimyasal incelemesi yapıldığında, epitelyal ve fibroblast hücreler başta olmak üzere, düz kas, makrofaj, lökosit, sinir hücreleri, vasküler endotel hücreleri gibi birçok hücrenin virusla enfekte olabildiği gösterilmiştir (9). Buna mukabil, in vitro şartlarada virus üretimi fibroblast hücre kültürlerinde daha başarılı olmaktadır (4, 10). Bu amaçla kullanılan hücre kültürü insan embriyonu akciğer ve deri fibroblast hücre kültürleridir. CMV enfekte hücrelerde geç ürer ve tek tabakalı hücre kültürlerinin hepsinin enfekte olması bazen haftalarca sürer. Enfeksiyon hücreden hücreye geçiş ile olur ve ortamda çok az serbest virus bulunur; büyük bir bölümü hücre içindedir (10). Karakteristik sitopatik etkisi (CPE) olan, şişmiş, yuvarlak ve ışığı kıran ve paralel seyirli hücrelerin biraraya gelmesinden (sinsisya) oluşan lokal bölgeleri 1-4 haftada oluşturur (11).

Kültürde virus replikasyonu uzun sürede gerçekleştiğinden enfeksiyonu başlatılmak için 10^4 virusa ihtiyaç olduğu; CPE'nin 10^4 virus varlığında 5-6 haftada, 10^6 virusa 5-6 günde görüldüğü belirlenmiştir(4).

Virus üretimi amacıyla değişik fibroblast hücre kültürleri (MRC-5, WI-38, IMR-90, flow 2000) hazırlanmıştır ve ticari olarak piyasadan temin edilebilmektedir.

2.1.5. Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Duyarlılığı

Lipid zarfı dolayısıyla eter ile inaktive olabilen CMV ultraviyole (UV) ışığında 5 dak, 56°C 'de 30 dak ve pH 5'in altında kolayca parçalanır. Buzdolabında bir hafta enfektivitesini korurken, -90°C ve %30 sorbitol içeren solüsyonlarda uzun süre canlı kalır. Sulandırma sıvılarına % 5-10 serum eklenmesi virusu 37°C 'de stabilize eder, fakat 4°C 'de etmez. Donma ve çözölmeye dayanıksızdır. Virus enfekte hücre içerisinde ve % 10 dimetilsülfoksit (DMSO) bulunan besiyeri ortamında sıvı azot tankında saklandığında enfektivitesini kaybetmez (12).

2.1.6. Tarihçesi

Hem konjenital hem de kazanılmış enfeksiyon yapabilme yeteneği CMV'ye olan ilgiyi gün geçtikçe artırmaktadır. Adını, yaptığı sitolojik değişikliklerden (hücre büyümesi = sitomegali) alan bu etkenin bir virus olabileceği ilk kez Ribbert adlı bir araştırmacı tarafından 1881'de ortaya konmuştur. İlk insan CMV suşu 1956'da Smith ve arkadaşları tarafından tükürük bezinden, yine 1956 yılında Rowe ve arkadaşları adenoid kültürden ve 1957'de Weller ve arkadaşları karaciğer biopsisinden izole etmişlerdir. Hastalardan alınan materyal ile enfekte edilen fibroblast hücre kültürlerinde saptanan CPE'ye dayanarak tanımlama yapılmış; Weller 1960 yılında ilk kez tükürük bezi virusu veya sitomegalik inklüzyon hastalığı virusu yerine sitomegalovirus terimini kullanmışlardır (13).

Klemak ve Kaarianinen ilk kez normal sağlıklı kişilerde kan transfüzyonu ile ilişkili CMV enfeksiyonunu ve hastalığını tanımlayarak kan ve lökosit transfüzyonundan sonra CMV mononükleozisi olabileceğini gösterdiler (11). Minder 1953'de elektronmikroskop yöntemle enfekte hücrelerin nükleus ve sitoplazmasında yaklaşık 100 nm çapında virus benzeri partiküleri tanımladı. Allen ve Riley 1958'de CID'de röntgen bulgularını tanımladı.

Doku kültürlerinde virus izolasyonu ve daha sonra birçok test için antijenlerin geliştirilmesinden sonra Weller-Hanshaw ve Medearis CMV'nin fetusta çok çeşitli oküloserebral ve ektranöral anormalliklere yol açabilen önemli patojenlerden biri olduğunu belirttiler. 1970 ve 1980'lerde ve günümüze kadar CMV'nin moleküler biyolojisi bir çok yönü ile aydınlatılmaya başlandı (13).

2.1.7. CMV'nin Vücutta Bulunduğu Yerler

CMV'nin semptom vermeden kan, tükürük, idrar, servikal sekresyon, beyin omurilik sıvısı, gaita, gözyaşı gibi sekresyonlar, bronkoalveolar lavaj, çeşitli doku ve organ biyopsilerinde (canlı veya otopsi sırasında alınan) bulunabilmektedir. Yeni doğan, çocuk ve erişkin dönemlerindeki asemptomatik bulunabildiği sekresyonlar tablo I'de gösterilmektedir (4, 11).

Tablo 1. CMV'nin Değişik Sekresyonlardaki Asemptomatik Atılım Sıklığı (%)

Kaynak	Yenidoğan	Çocuk	Erişkin
İdrar	0.5 - 2.5	10 - 29	0 - 2
Oral sekresyon	0.5 - 2.5	10 - 29	0 - 2
Servikal sekresyon	-	-	10 - 28
Semen	-	-	5 - 10
Anne sütü	-	-	13 - 27

2.1.8. CMV Patolojisi ve İmmünolojisi

CMV enfeksiyonlarında sitoplazmik ve intranükleer inklüzyon cisimleri içeren multinükleer dev hücreler özellikle karaciğer, akciğer, beyin, pankreas ve böbreklerde bulunur. Beyinde özellikle subependimal ve periventriküler bölgelerde kalsifikasyonlarla giden nekroz alanları ve glial hücre proliferasyonu vardır. Deri ve seröz membranlarda peteşiler ve geniş nekrozlar meydana gelir (14). İyileşme döneminde dokunun özelliğine göre normal yapı oluşabilir (15).

CMV enfeksiyonlarında hem humoral hem de hücrel immünite önemlidir. İmmünkompetan kişilerde klinik hastalık, çoğunlukla primer enfeksiyon ile ilişkilidir. Yüksek antikor seviyesine rağmen semen veya servikal sekresyonda viral ekskresyon subklinik seyredir. Primer enfeksiyon sırasında monositlerin CMV enfeksiyonu, bu fagositlerin disfonksiyonuna yol açar (16).

CMV enfeksiyonlarının iyileşmesinde hücrel immünite (spesifik sitotoksik T lenfositler, nonspesifik doğal öldürücü hücreler ve antikor bağımlı hücrel sitotoksik aktivite) daha önemlidir. Bu lenfosit gruplarında fonksiyon bozukluğu yapan hastalıklar, ilaçlar (AIDS, yüksek doz steroid vs) daha ağır ve uzamış CMV enfeksiyonuna neden olur. Ayrıca akut CMV enfeksiyonunun kendisinin de immünyüpresif etkisi vardır (17). Belli durumlarda IgM ve IgG yapısındaki spesifik antikorlar hastalığın seyrini etkilemektedir. Örneğin maternal antikorlar konjenital enfeksiyonu engellemese de şiddetini önemli ölçüde azaltmaktadır (18). Hamileliğin farklı dönemlerinde CMV atılım oranının da farklı olabilmesinin nedeni hücrel yönetimli bağışık cevabın geçici olarak baskılanması ve meydana gelen hormonal değişikliklere bağlanmaktadır (5).

Primer enfeksiyon ve reaktivasyon enfeksiyonlarında virusun kanla yayılabilmesi önemli bir faktördür. Aktif enfeksiyon sırasında kanda CMV'nin bulunması ve kanla diğer organ ve dokulara yayılabilmesi (örneğin, akciğer, mide, böbrek vs) immün sistemi baskılanmış hastaların çoğunda meydana gelir. Özellikle kemik iliği transplantı enfeksiyonun hastalığa doğru ilerlemesinde önemli bir risk faktörüdür (19). Solid organ alıcıları ve HIV ile enfekte hastalar için viremi, hastalık gelişiminde daha az etkilidir (20, 21, 22, 23). Kanda CMV DNA aranması için geliştirilen PCR veya antijenemi assay gibi daha sensitif teknikler sayesinde CMV hastalıklı hastaların hemen hemen tamamında virus gösterilebilmiştir. Bu tetkiklerin yüksek sensitivitesi sonucu asemptomatik enfeksiyonlu hastalığa ilerlemeyecek kişilerin çoğunda da virusu bulunmuşlardır (24). Gerçi hastalıklı olanların asemptomatik olanlardan daha yüksek viral yüke sahip oldukları da ortaya konmuştur (24).

CMV DNA'sı aktif enfeksiyon sırasında lökositlerin farklı fraksiyonlarında (mononükleer ve polimorfonükleer) gösterilmiştir: DNA'nın büyük bir kısmı polimorfonükleer lökositler içinde saptandığından, bu hücreler aktif replikasyonda (akut enfeksiyonda) primer olarak enfekte hücre tipi olarak sorumlu tutulmuştur (25). CMV hücre ile ilişkili bir virus olmasına rağmen plazma veya serumda da bulunabilir (26, 27, 28). Plazmadaki hücre dışı virus genellikle hücre dışına salınımdan ziyade CMV ile enfekte hücrelerin (polimorfonükleer lökositler, endotelial hücreler) parçalanmasından kaynak alır. Kemik iliği transplantasyonundan sonra da absolut nötropenili hastalarda CMV DNA bulunabildiğinden hücre dışı CMV DNA'nın önemli bir kaynağı olarak endotelial hücreler gösterilmektedir (24). CMV enfekte endotel hücreleri hem HIV-enfekte hastalar hem de transplant alıcılarda aktif enfeksiyon sırasında periferel kanda bulunmuştur (29).

2.2. Epidemiyolojisi ve Korunma

Sitomegalovirus; diğer herpesviruslar - Herpes Simplex Viruslar (HSV 1 ve 2), Varicella zoster virus (VZV), Epstein Barr Virus (EBV), Human Herpes Virus (HHV)-6, 7 ve 8 - gibi latent enfeksiyona yol açar. Bunun için virus ile hayatının bir döneminde ilk kez karşılaşmış enfekte olan kişi hayatı boyunca enfekte kabul edilir. Diğer herpesvirusları vücutta oldukça sınırlı bölgelerde latent kalırken CMV birçok organ ve dokularda latent enfeksiyon tesis edip, asemptomatik olarak zaman zaman ortama salınabilmektedir.

Genellikle virus bulunduran tükürük veya idrar ile kontamine materyallerin paylaşılması ile kişiden kişiye bulaşır. Enfeksiyon erken yaşlarda kazanılır: küçük çocuklar arasında eşyaların ortak kullanımı veya genel olarak tükürük alış verişini sağlayan her türlü aktivite virusun toplum içerisinde gerçekleşen başlıca bulaş yolu olarak kabul edilir. Bunların dışında önemli yayılım yolları olarak; a) transplasental; b) perinatal (kontamine doğum kanalı, anne sütü); c) kan transfüzyonu; d) doku ve organ transplantasyonu ve e) seksüel yolun önemli olduğu bilinmektedir.

CMV'ye karşı oluşan antikörlerin çeşitli yöntemlerle bakılarak gösterilmesiyle seroprevalansın dünyanın değişik bölgelerinde % 40-100 arasında değiştiği görülmektedir (30, 31). Dünyadaki ve ülkemizdeki seroprevalans bildirimleri sırası ile Tablo 2 (30) ve Tablo 3 (31)'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Dünyanın Çeşitli Bölgelerinde Erişkin CMV Seroprevalansı (Ho M, 1990)

Bölge	CMV-Antikor (KF testi) %
Fransa (Lyon)	40
Almanya (Freiburg)	42
İsviçre	45
Albany	45
Melbourne	54
Houston	79
Buenos Aires	81
Hong Kong	94
Japonya	96
Monaco	98
Manila ve Uganda	100

Tablo 3 : Türkiye'deki CMV Seroprevalansı (Köksal ve ark. 1994)

	Yıl	%
Alaçam ve arkadaşları	1978	90.3
Ustaçelebi ve arkadaşları	1986	80.8
Özerk ve arkadaşları	1989	72
Cengiz ve arkadaşları	1990	55
Köksal ve arkadaşları	1993	78.8

Seropozitiflik popülasyonların sosyoekonomik durumları ile bağlantı göstermekte ve gelişmişlik seviyesi düştükçe artmaktadır. Avrupa, Avustralya ve Kuzey Amerika'da düşük prevalansla seyrederken, Afrika ve Güneydoğu Asya'da seropozitiflik yüksektir (30).

Sitomegalovirus enfeksiyonları yeni doğan-erken çocukluk ve seksüel aktivite dönemleri olmak üzere 2 dönemde pik yapar (32).

I.Pik: Enfeksiyonu kazanım oranının % 36-56 arasında değiştiği bu dönemde belli başlı bulaş yolları şunlardır:

- Doğum sırasında kontamine uterin-serviks
- Anne sütü veya banka sütü
- Yenidoğan odasından diğer çocuklara geçiş
- Kreşlerden
- Aile içi geçiş
- Enfekte çocukların respiratuar sistem ve idrarları ile virüsü yıllarca taşımaya meyilli olmaları.

2.Pik: Fazla seksüel aktivite gösteren kadınlarda ve cinsel ilişki ile geçen hastalıklar polikliniğine başvuran kadınlarda servikal CMV sıklıkla izole edilmiştir (33).. Yine erken yaşta ilişkide bulunanlarda ve beyaz ırktan olmayanlarda seropozitiflik oranı yüksek bulunmuştur. Ayrıca homoseksüellerde % 94, heteroseksüellerde % 54 oranında bulunmuştur. HIV ile enfekte homoseksüellerden % 42, HIV ile enfekte olmayan homoseksüellerden % 35 oranında virus izole edilmiştir (33). Heteroseksüel geçiş seks partnerlerinde izole edilen CMV suşlarının DNA restriksiyon enzim analizleri ile kanıtlanmıştır (30). CMV enfeksiyonun en sık kazanıldığı dönemler Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4 . CMV Klasik Epidemiyolojisi ve Yaş Gruplarına Göre Seropozitiflik

Sosyoekonomik durum	Enfeksiyon zamanı	Pozitif Antikor			
		0.5-3	4-14	15-30	> 30
Düşük	Erken	20-60	70	90	90
Yüksek	Geç	10-20	30	40-55	55
Geçiş	yakın	Anne Çocuk	-	Seksüel aktivite	-

Sitomegalovirus enfeksiyonları için risk grupları

- a) Hamile kadınlar
- b) Yenidoğan ve çocuklar
- c) Yenidoğan ve çocuklar ile çalışan seronegatif kişiler
- d) İmmün yetmezlikli kişiler ve bunlarla çalışan hastane personeli
- e) Kan transfüzyon alıcıları'dır.

a) *Hamile Kadınlar:* Gelişmiş ülkelerde kadınların % 40-50 si virüsle hayatlarının bir döneminde karşılaşmışlardır; geri kalanlar ise primer CMV enfeksiyonuna hassas seronegatif grubu oluşturmaktadır. Nitekim bunlar arasında hamilelik sırasında % 1-3 oranında serokonversiyon görülmektedir (34). Hamileliğinde primer CMV enfeksiyonu geçiren kadınların % 42'si, rekürrent enfeksiyon geçiren kadınların da % 0.5'den azı CMV'yi fetusa geçirirler (34, 35). Gebelik yaşının küçük olması ve düşük sosyoekonomik durum ile konjenital CMV enfeksiyon olasılığı artar (36). Öteyandan gelişmekte olan ülkelerde doğurganlık çağındaki kadınların çoğu bağışıklıdır; bu nedenle konjenital CMV enfeksiyon insidansı düşüktür (15). Hamilelerde serviksten CMV atılımı primer enfeksiyondan ziyade latent virusun reaktivasyonu sonucudur. Asemptomatik atılım gösteren bu hamileler incelendiğinde çoğu CMV antikoru yönünden pozitif bulunmuştur (34). Hamilelerde asemptomatik servikal virus atılımı Tablo 5 (34)' de görülmektedir.

Tablo 5. Hamilelerde Asemptomatik Servikal CMV Atılımı (Trimesterlere göre)

Kaynak	I.trimestr (%)	II.trimestr (%)	III.trimestr (%)	Tüm gebelik boyunca (%)
Numazaki ve ark	0/30 (0)	6/62 (9.7)	17/61 (27.9)	23/153 (15)
Montgomery ve ark	1/43 (2)	6/83 (7.2)	6/49 (12.2)	13/175 (7.4)
Stagno ve ark.	3/183 (1.6)	22/359 (6.1)	42/371 (11.3)	63/659 (9.6)
Toplam enfeksiyon/ Toplam test	4/256 (1.6)	34/504 (6.7)	65/481 (13.5)	99/987 (10)

Seronegatif kadınların hamile kalmaları durumunda spesifik olarak CMV enfeksiyonuna karşı profilaktik tedavi yöntemlerinin bulunmaması nedeniyle korunma yöntemi genelde kişisel hijyen esaslarından ibarettir. Bunlar sırasıyla:

- Hamilelik boyunca iyi el yıkamaya dikkat etmeli; tükürük, idrar gibi sekresyonlarla temastan kaçınmalıdır.

- Hamilelik sırasında geçirilen heterofil negatif mononükleozis CMV olarak kabul edilmeli ve gebe enfeksiyonun geçişi konusunda bilgilendirilmelidir.
- İntrauterin enfekte semptomlu infantlar için doğum öncesi veya anında sezeryan endikasyonu yoktur.
- Rutin serolojik test konjenital CMV enfeksiyon riskini azaltmayacağından önerilmiyor (34).
- Primer enfeksiyonda < % 5 ağır konjenital enfeksiyon görüleceği anlatılmalı ve karar aileye bırakılmalıdır (15).
- Kondom, CMV'nin seksüel geçişini önlemek için önerilmektedir (16).
- Hamile olmamakla birlikte hamileliği düşünenler lökosit transfüzyonu almışlarsa en az 2 ay hamile kalmamalıdır (37).

b) Yenidoğan ve Çocuklar: İntrauterin enfeksiyon insidansı tüm canlı doğumlar için % 0.4-2.5'dir. Enfekte infantların % 5-10'u doğumda semptomatiktir. Semptomatik olanların % 20'si doğumda ölmekte, yaşayanların % 90'ında major sekeller gelişmektedir.

Enfekte infantların % 90'ı doğumda asemptomatiktir. Primer maternal enfeksiyon sonucu konjenital enfeksiyonu olanların semptomatik olma olasılığı daha yüksektir. Bu grup neonatlar içinde hastalığın sıklığı % 19'dur. Seropozitif annelerin bebekleri vertikal olarak enfekte olduğu zaman enfeksiyon genellikle semptomatik konjenital hastalıkla sonuçlanmaz (34). Mamafih, annenin yeterli nötralizan antikor bulundurmasına rağmen intrauterin enfeksiyon tümüyle önlenememekte; fakat anneden fetusa humoral immunitenin pasif geçişine bağlı olarak hastalık riski oldukça azalmaktadır (14, 18, 34).

Annede latent virusun reaktivasyonu veya III.trimesterde giderek artan servikal virus atılımı sonucu infantların çoğu yaşamın ilk yılında enfekte olmaktadır. Eğer anne serviksten CMV ekstrete ediyorsa infantların enfekte olma riskinin % 40- 57 olduğu bildirilmektedir; termde infantlar genellikle asemptomatiktir (34). Postnatal olarak enfekte prematüre infantlar ise genellikle semptomatiktir, ki bu CMV'ye karşı maternal antikorların transplasental olarak kazanılmasının daha erken kaybından olabilir. Perinatal periyotta CMV'nin kazanılmasında en sık yol anne sütüdür. Seropozitif annelerin % 14 - 44'ünün sütünden virus atılmaktadır. Sütünde virus bulunduran annelerin bebeklerini enfekte etme oranları % 58 olarak bulunmuştur, ki bu oran servikslerinden virus atan annelerin bebeklerini enfekte etme oranları ile aynıdır.

Nasokomiyal, nonparenteral yolla da virus geçişi olabilmektedir. Semptomatik konjenital enfeksiyonlu infantlar hayatlarının ilk birkaç ayında virus atarlar (34). Bütün bu nedenlerden dolayı perinatal veya erken postnatal kazanılan CMV enfeksiyonu prenatal kazanılan enfeksiyondan 10 kat daha fazladır (32). Postnatal enfeksiyonlu çocuklar konjenital enfeksiyonlu çocuklardan daha az virus atarlar.

Bir yaşından sonra semptomatik konjenital, asemptomatik konjenital enfeksiyon ve perinatal enfeksiyonlarda çocuklar idrarları ile eşit düzeyde virus atarlar.

Perinatal bulaş riskine karşı korunmada öneriler:

- Sağlıklı, term infantlarda nadiren hastalığa yol açtığı için anne sütü kısıtlanmalıdır.
- Potansiyel olarak banka sütleri ile CMV geçişi fazla olduğu için bu gibi durumlarda yarar-zarar her bir birey için ayrı ayrı gözden geçirilmelidir.
- CMV ekskrete eden çocukların okuldan uzaklaştırılması gerekmez.
- Asemptomatik olarak CMV ekskrete edenleri saptamak için tarama programları gereksiz ve pratik bulunmamaktadır.
- CMV ekskrete ettiğine inanılan veya bilinen çocuk ve infantları spesifik korumak gereksizdir. Korunmak için özel oda, eldiven, maske gerekmez.

c) *Yenidoğan ve çocuklarla çalışan kişiler:* Çocuk odalarında çalışan hemşirelerin CMV'ye yakalanma oranı % 3.3 iken, bu oran çalışmayan hemşireler için % 2.3'tür.

Korunmak için öneriler:

- Hastanelerde ve diğer yerlerde çalışan hamile olan veya olmayan kadınlar CMV'den korunmak için hijyen pratiği ve epidemiyoloji hakkında bilgilendirilmelidir.
- Rutin serolojik taramalara gerek yoktur.
- İnfant ve çocuklarla çalışan hamile olmayan hassas kadınlar rutin olarak CMV'ye maruz kalma riskinden dolayı diğer alanlara gönderilmemelidir (34).

d) *İmmun sistemi baskılanmış hastalar:* Organ transplantasyonu yapılmış hastalar, immunosupresif alanlar, maligniteli olanlar ve kemoterapi alanlar bu gruba dahildir. Transplant alıcıları % 62 - 100 oranında primer veya sekonder CMV enfeksiyonuna sahiptirler. Farklı transplant gruplarında CMV enfeksiyon ve hastalık oranları Tablo - 6 (30)'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Transplantasyon Tipi ile CMV Enfeksiyonu ve Hastalığı Arasındaki İlişki

Transplant tipi	Enfeksiyonlu hasta/ total hasta (%)	Semptomatik hastalığı olanlar		CMV-pnömonili hastalar	
		Enfekte olanların (%)	Totalin (%)	Enfekte olanların (%)	Totalin (%)
Böbrek	79/131 (60)	13	8	4	2
Karaciğer	55/93 (59)	49	29	5	3
Kalp	44/48 (92)	27	25	9	8
Kalp-Akciğer	22/31 (71)	55	39	45	32

Transplantasyondan sonra latent CMV reaktif olabilir veya yeni bir CMV suşu ile reenfeksiyon olabilir. Seronegatif alıcıların CMV enfeksiyonu seropozitif donörden aktarılan organ aracılığı ile kazanılmaktadır.

Transplant alıcılarında primer enfeksiyon, sekonder ve reaktivasyondan daha ciddi seyreder. Yalnız ciddi sekonder enfeksiyonlar böbrek alıcıları ve antilenfosit immunglobulin verilen kemik iliği alıcılarında görülür (30). Transplantasyonlu hastalar arasında CMV antikör titresi yüksek olanlarda mortalite daha düşük bulunmuştur. Bu da iyileşmede immünolojik fonksiyonun önemini gösterir. Renal transplantasyon alıcılarında CMV enfeksiyonu genellikle asemptomatiktir. Kalp-transplant alıcılarında % 73 - 100 oranında posttransplantasyon CMV enfeksiyonu gelişir (34). Fakat primer CMV enfeksiyonu kalp rejeksiyonu ile ilişkili bulunmamıştır (38).

Malignensili hastalık grubunda, özellikle hematolojik malignensisi olanlarda, enfeksiyon insidansı daha yüksek bulunmuştur (34). AIDS'li hastalarda Kaposi sarcoma ve ciddi fırsatçı enfeksiyonlar gelişir. CMV insidansı bu grupta % 89 bulunmuştur (30).

Korunmak için öneriler:

- CMV'nin olası ekzojen kaynaklarından hastalar uzak tutulmalıdır.
- Mümkünse seronegatif alıcılara seronegatif donörlerden kan veya organ transplantı yapılmalıdır.
- Bu grup hastalar ile çalışanlara hijyen önerilmelidir. Hizmet, rutin devam etmelidir. Maske, eldiven, özel oda gerekmez (34).

e) Kan transfüzyon alıcıları: Prematüre yeni doğanlar CMV ile enfekte olmayan erişkinlerden 10 kat daha fazla hassastır. Enfeksiyon sıklığından daha önemlisi % 40 fatalite hastalığın en önemli yanıdır. Kan transfüzyonu için diğer riskli gruplar (seronegatif gebeler, seronegatif prematüreler, seronegatif organ alıcıları, seronegatif onkoloji hastaları ve immun yetmezlikli kişiler) korunmalıdır (39).

Transfüzyonda ünite başına risk % 11 iken, bugün bu oran % 0.4'ün altındadır (30). CMV yönünden taranmamış kan alan yenidoğanlarda % 3.2 iken, taranmış kan alanlarda enfeksiyon oranı % 0.79'dur (2).

Korunmak için öneriler:

- Hücresel kan ürünlerine ihtiyaç duyan bir alıcıya serolojik durumu belirleninceye kadar seronegatif kan ürünleri verilmelidir. Bu şekilde transfüzyonla geçen CMV enfeksiyonu % 96, hastalık ise % 99 önlenmektedir.
- Serum fizyolojik ile yıkanmış eritrosit, dondurulmuş degliserolize eritrosit kullanılarak posttransfüzyon CMV enfeksiyonu önenebilir. Bu şekildeki uygulama renal dializ hastalarında güvenli bulunmuştur (34, 40).
- Lökosit filtrelerinden geçirilmiş kan kullanımı, enfeksiyon riskini azaltmaktadır. Lökosit sayısının 10^7 'nin altında olan kan ile CMV'nin bulaşmadığı kabul edilir (34, 41).
- Kan donörlerinde CMV-Ig M bakılması özellikle prematüre ve yenidoğan dönemi CMV enfeksiyonunu önlemede veya riski azaltmada etkili görülmüştür (41).
- Lökositler ile minimal kontamine veya hiç lökosit bulundurmeyen kan komponentleri, taze donmuş plazma, cryopresipitat, faktör konsantreleri ile CMV geçişi dikkate alınmamaktadır (42).

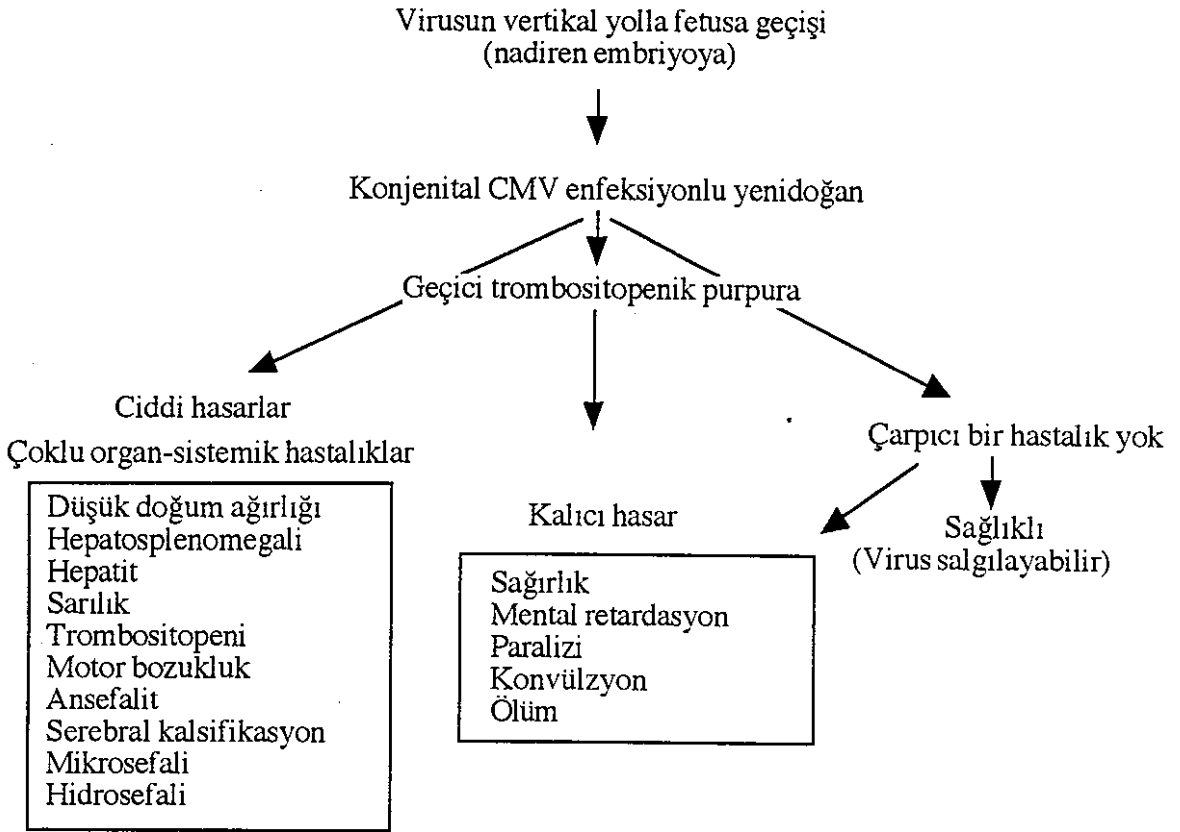
2.3. Klinik

İnkubasyon süresi 4-12 hafta olan CMV enfeksiyonunun kliniği 4 ayrı grupta incelenebilir:

- a) Yenidoğan ve çocuklarda klinik
- b) Erişkinlerde klinik ve CMV mononükleozisi
- c) İmmun sistemi baskılanmışlarda ve AIDS'li hastalarda klinik
- d) Gebelik ve CMV

2.3.1. Yenidoğan ve Çocuklarda Klinik

İntrauterin yolla enfekte olan bebeklerin yaklaşık % 5-10'u doğumda semptomatiktir; sitomegalik inklüzyon hastalığı (CID) olarak adlandırılır ve sarılık, hepatosplenomegali, peteşi tarzında döküntü ve multiple organ tutulumu ile karakterizedir (32, 34). Şekil 2' de özetlendiği gibi ayrıca mikroftalmi, motor bozukluklar, korioretinitis ve serebral kalsifikasyonlar görülebilir. Sinir sistemi, iç kulak (sensorinöral işitme kaybı) ve gözün koroid tabakasının tutulumu konjenital enfeksiyon için karakteristiktir (4, 5, 32, 43). Klinik olarak doğumda veya doğumdan hemen sonra letarji, solunum sıkıntısı ve konvülsyonlar görülür. Bebek birkaç gün içerisinde ölebilir.



Şekil 2. İntrauterin CMV Enfeksiyonunun Muhtemel Sonuçları

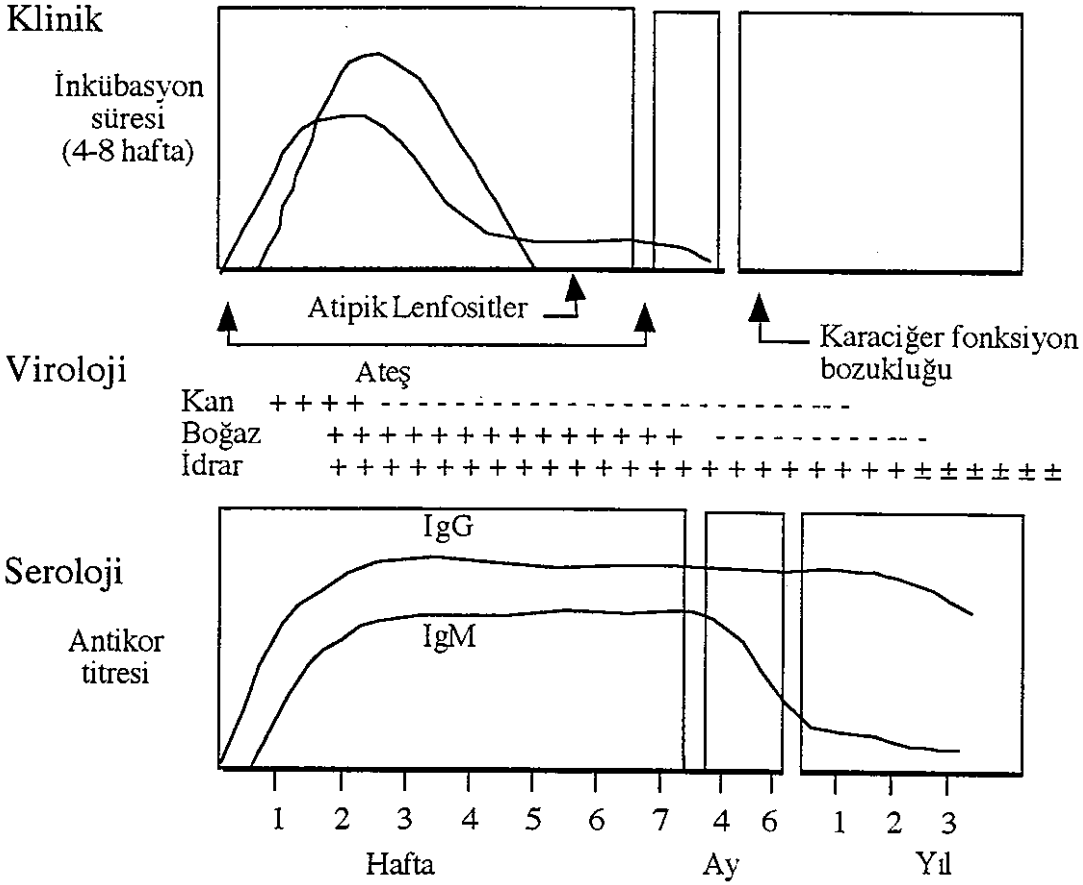
Postnatal CMV enfeksiyonunda nadiren diffüz visseral ve santral sinir sistemi tutulumu saptanır. Semptomatik olgular mononükleozisi anımsatır. Eğer postnatal enfeksiyon, transfüzyon yolu ile alınmışsa ağır bir hastalık tablosu gelişebilir (11). Özellikle prematüre ve 1500 gramın altındaki bebeklerde; hepatosplenomegali, sarılık, peteşi, trombositopeni, lenfositoz, hemolitik anemi görülme sıklığı % 40 olup perinatal enfeksiyonda patolojik göz tutulumu tanımlanmamıştır.(43).

İntrauterin veya perinatal enfeksiyonlar tamamen asemptomatik de seyredebilir; fakat sonraki dönemlerde % 13 - 15 oranında işitme kaybı ve öğrenme bozuklukları ortaya çıkabilmektedir (11, 35). İşitme kaybının erken dönemde saptanması zeka geriliğine katkısından dolayı önemlidir ve odyolojik takip gerekir (15, 44). İntrauterin HCMV enfeksiyonunun patogenezi bakıldığında, fetusta gelişen hasarlar geri dönüşümsüzdür; postnatal terapiden fayda görmesi olası değildir.

2.3.2. CMV Mononükleozisi ve Erişkinlerdeki Klinik

Heterofil negatif mononükleozis vakalarının % 20 - 50'sinden sorumludur; EBV mononükleozisinden heterofil antikor testinin negatif oluşu ile ayrılır (10). Yüksek ateş, LAP

ve lenfositoz durumu vardır. Heterofil aglütinin testinin negatif olduğu tüm mononükleozis olgularında ve açıklanamayan ateş olgularında CMV enfeksiyonundan şüphelenilmelidir. CMV mononükleozisinde en sık karşılaşılan enfeksiyon kaynağı kandır. Açık kalp ameliyatı geçirenlerde ve fazla miktarda transfüzyon yapılan kişilerde 3 - 6 hafta içinde mononükleozis benzeri bir tablo gelişebilir (11). Sağlıklı kişilerde genel olarak CMV enfeksiyonuna bağlı komplikasyonlar nadirdir (45) (Şekil 3).



Şekil 3. CMV'nin Klinik Görünümü .

2.3.3. İmmun Sistemi Baskılanmışlarda ve AIDS'li Kişilerde Klinik

Enfeksiyonlar bu grupta da çoğunlukla asemptomatik seyreder. En sık karşılaşılan durum sağlıklı kişilerdekenden ayırdedilemeyen ateşli bir mononükleozis tablosudur. Ancak özellikle hücrel immün sistemin baskılandığı durumlarda latent virusun reaktivasyonu sonucu ciddi organ tutulumları (korioretinit, ansefalit, colitis, ösofajit, adrenalit, miyeloradikülopati) görülebilir (11, 46, 47).

Renal transplant alıcılarının % 38 - 96'sı aktif CMV hastalığı geçirmektedir. Transplantasyondan sonraki 7 ay içinde herhangi bir bölgede virusun gösterilmesi veya

CMV'ye karşı oluşan KF-antikor titresindeki 4 kat veya daha fazla artış tanıyı koydurur. Renal transplant alıcılarında açıklanamayan ateşin en sık nedeni olarak CMV bulunmuştur (34). Bu hastaların % 42'sinde pnömoni saptanmıştır (30). Semptomatik olanların % 30'unda ciddi hastalık veya ölüm meydana gelmektedir. Kemik iliği ve böbrek nakli yapılan seronegatif kişilere CMV spesifik immunglobülin verilmesi enfeksiyonu önlemez; fakat hastalık gelişimini azaltabilir (40).

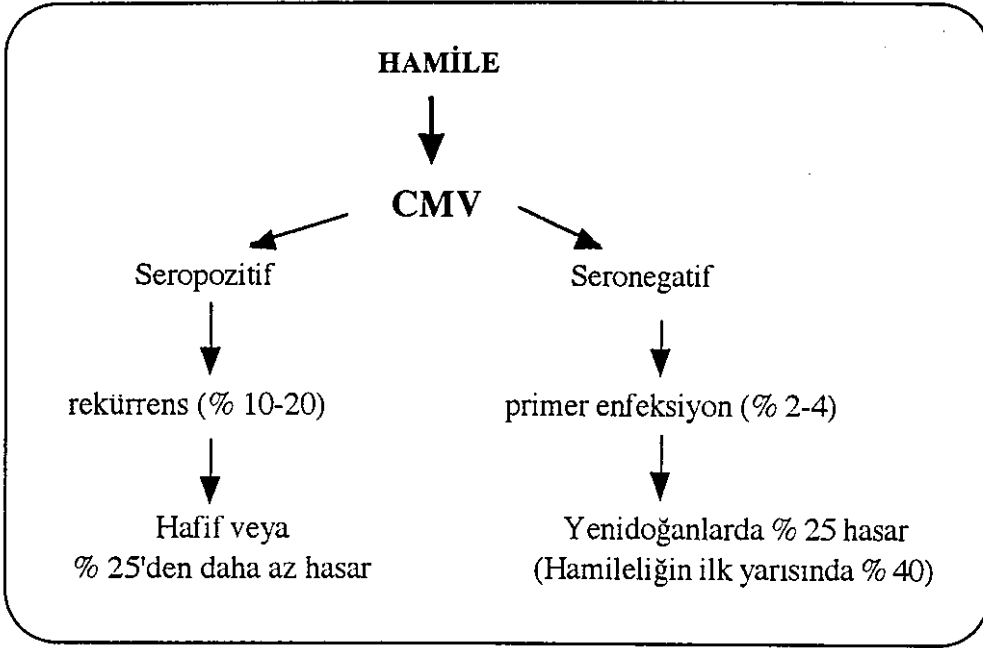
Kemik iliği alıcılarında da morbidite ve mortalitenin en sık nedenidir. Alıcıların % 45'i transplantasyondan sonra CMV ekskrete eder. Bunların % 77'si reaktif, % 23'ü primer enfeksiyondur. Bu grupta en sık komplikasyon % 10 - 50 oranında görülen CMV pnömonisidir. Bunların da % 50 - 80'i fatal sonuçlanmaktadır. CMV pnömonisinde mortalite bazı serilerde % 100'dür (30).

AIDS'li homoseksüel erkeklerin hemen hemen % 100'ü seropozitifdir. Bunlarda en sık görülen klinik manifestasyon korioretinittir. Sistemik olmasa da oküler manifestasyonlar viremi ile ilgilidir. Oküler ağrının yokluğu karakteristiktir. Ayrıca bu grup hastalarda kolit (% 10), gastrit, ösofajit, hepatit, merkezi sinir sistemi tutulumu (diğer gruplara göre en sık) görülebilir. AIDS'de pulmoner patojen olarak CMV'nin rolü açık değildir. Pnömonide bronkoalveolar lavajda sıklıkla virus bulunabilir. Respiratuvar sekresyonlarda CMV hala bulunmasına rağmen, *Pneumocystis carinii* tedavisi ile iyi bir klinik cevap alınabilir (2).

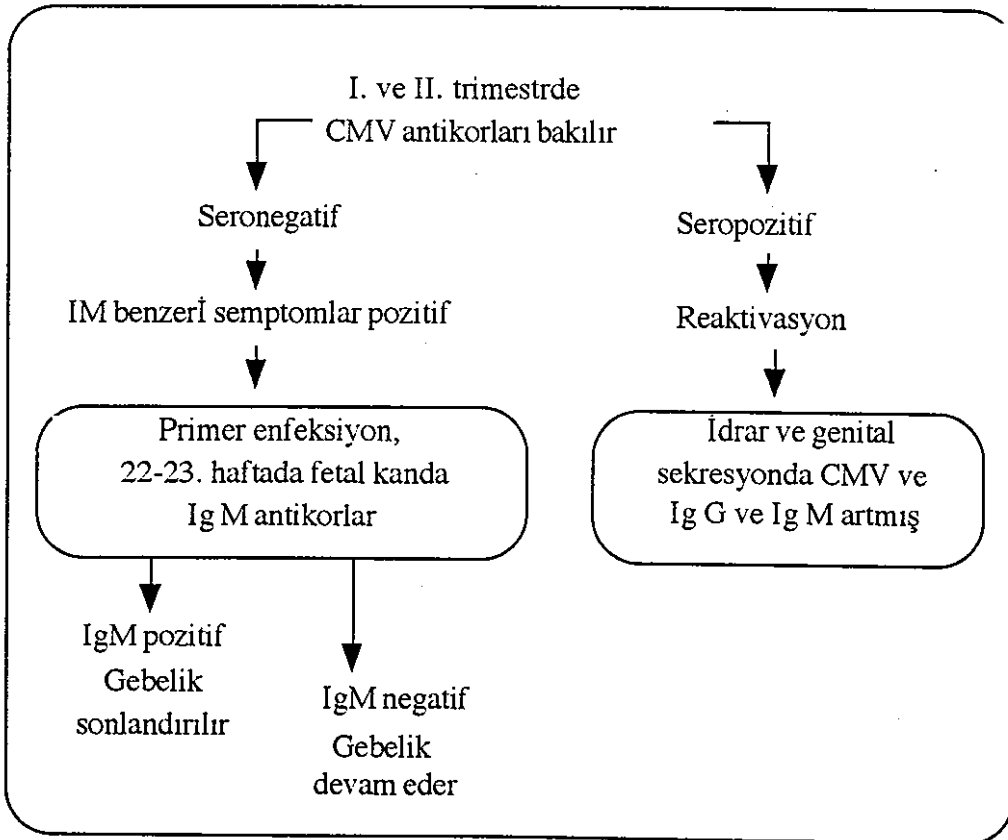
HIV ile enfekte hastalarda immunsupresyonun daha hızlı ilerlemesinde CMV ile HIV'ın koenfeksiyonu söz konusudur. İmmunosupresyon üzerine sinerjik etkilidirler. Yine bazı çalışmalarda erken CMV proteininin (IE-protein) HIV transkripsiyonunu aktive ettiği gösterilmiştir (48).

2.3.4. CMV ve Gebelik

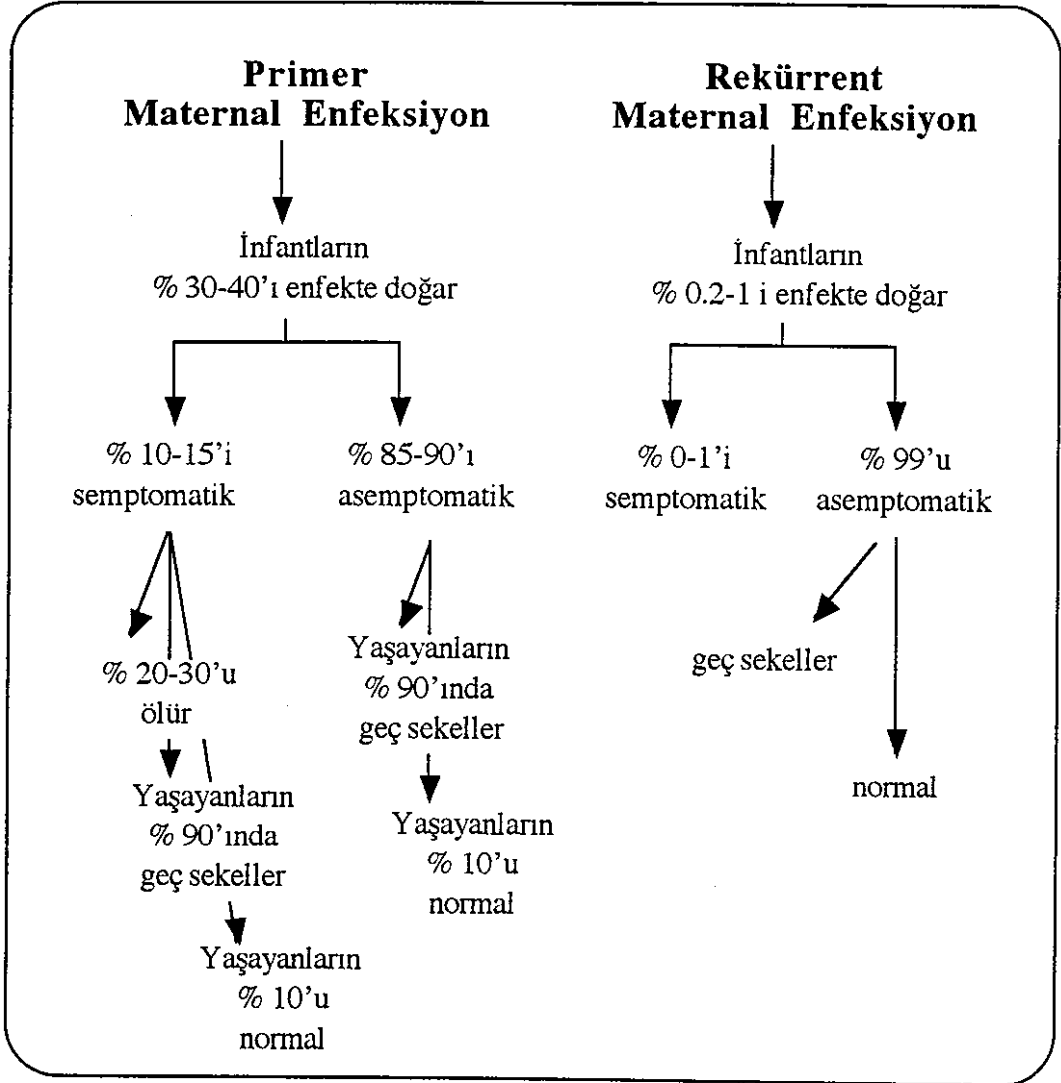
CMV, en sık konjenital ve perinatal edinilmiş enfeksiyon nedenidir. Gebelikteki enfeksiyonların çoğu reaktivasyon sonucu gelişen tekrarlayan enfeksiyonlardır ve gebelik latent CMV enfeksiyonunun reaktivasyonunu kolaylaştırmaktadır. Özellikle gebeliğin son trimestrinde servikal CMV atılımı artmaktadır (15). CMV'nin perinatal ve intrauterin geçişine karşı maternal immunité tam koruma sağlamasa da yenidoğan ve fetusta virusun virulansını azaltmada büyük bir rol oynar (49). İmmunité latent CMV'ye karşı etkisizdir. Fakat virusun hücre dışına çıkışına da engel olur (15). Geç hamilelik döneminde latent CMV'nin reaktivasyonu maternal hücresel immunitenin geçici depresyonuna bağlanmaktadır (34). Konjenital CMV enfeksiyonu primer (% 30-40) veya tekrarlayan enfeksiyon (%3-6) sırasında virusun transplasental yolla alınmasıyla olmaktadır (15). Hamileler için intrauterin enfeksiyon seyri, prognoz ve sonuçları sırasıyla Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6'daki gibi özetlenebilir (8, 14, 32).



Şekil 4. Hamilelerde İntrauterin CMV Enfeksiyonunun Muhtemel Seyri



Şekil 5. Gebelikte CMV Enfeksiyonu ve Prognoz



Şekil 6. Maternal-Konjenital Enfeksiyonlar Arasındaki İlişki ve Sonuçları

CMV enfeksiyonu yavaş geliştiği için teratojen etki fazladır. Ancak bunun direkt etkiyle mi yoksa endotelial ve vasküler hasar sonucu dolaylı olarak mı geliştiği tartışmalıdır. CMV'ye bağlı konjenital anomali ve geç sekellerle etkilenen organlarda hücre azalmasına bağlı rölatif hipoplazi ve normal yapının bozulması görülmektedir (15). Hamilelikte fetusa CMV geçişinin patogenezi bilinmese de konjenital enfeksiyonlar sıklıkla plasental enfeksiyon ve korionik villitis ile birlikte (35).

Hamileliğin ilk trimestrinde oluşan düşüklerde sıklıkla CMV izole edildiğinden, CMV rekürrent spontan abortus etkenleri arasında sayılabilmektedir (37).

Fötal Enfeksiyonların Saptanması:

Gebelikte primer enfeksiyon saptanırsa veya ultrasonografi (USG) ile gelişme geriliği, hidrops ve beraberinde serebral anormallik saptanırsa fötal enfeksiyon araştırılmalıdır. USG'de periventriküler ekojenik odaklar (15), ventrikülomegali (50), bazal ganglionda ekojenik damarlar (15) görülebilir. USG'de ilk bulgular II.trimestr sonlarından itibaren saptanabilir. USG yanında kordosentezle alınan fötal kanda izolasyon ve serolojik analizyapılabilir. Fötal kanda CMV spesifik Ig M antikoru saptanamayabilir (51, 52, 53).

Amniyosentezle alınan amniyon mayiinde virus varlığı aranabilir. CMV DNA'sı amniyotik mayii, fötal kan, plasental doku veya korion villus örneklerinde gösterilebilmesi nedeniyle ilk trimestrden itibaren fötal enfeksiyonlar tanınabilir (52).

Hamilelikte HCMV Patogenez ve İmmunolojisi:

CMV ile ilk kez karşılaşan kişilerde viremi ile karakterize primer enfeksiyon meydana gelir; genellikle asemptomatik seyredir. Bir süre sonra virus çeşitli hücrelerde (lökosit, sinir hücreleri, etkilenen organlarda vasküler endotel hücreleri) latent hale geçer (54). Bu devrede hastanın kanında CMV'ye karşı oluşturulan antikoru vardır. Ancak bunlar hücre içindeki viruslar üzerinde etkili olmaz; sadece virusun hücre dışına çıkıp, yayılmasını önlerler. CMV ile karşılaşan hemen herkeste bu şekilde latent virus enfeksiyonu gelişir. İmmun sistemin çeşitli nedenlerle zayıfladığı durumlarda latent virus reaktif olabilir. Reaktivasyonla ortaya çıkan bu enfeksiyonların da çoğu asemptomatiktir. Ancak immün sistemi belirgin derecede baskılanmış kişilerde gerek primer gerekse reaktif enfeksiyonlar ağır seyredir.

Genel olarak gebeliklerinde primer enfeksiyon geçiren annelerin bebeklerinin semptomatik konjenital enfeksiyon riski çok fazladır. Oysa reaktivasyona bağlı konjenital enfeksiyonlar genellikle asemptomatik seyredir (36). Rubella enfeksiyonlarında maternal antikoru prenatal enfeksiyondan korunmayı sağlarken CMV enfeksiyonunda sağlamaz (55). Geçirilmiş CMV enfeksiyonlu kadınların kanındaki CMV antikoru fetusa enfeksiyonun bulaşmasına engel olmasa da enfeksiyonun genellikle asemptomatik seyretmesine neden olmaktadır. Latent CMV enfeksiyonu ile nonspesifik ve spesifik (hücresele-humoral) immün sistem uyarılmaktadır. Enfeksiyonun kazanılma dönemine göre tam veya gecikmiş ve azalmış bir immün cevap gelişmektedir (14). Virusa ait patogenez ve immün cevap arasındaki ilişki şu şekilde özetlenebilir (Tablo 7).

	Postnatal	Prenatal	Perinatal	Erken postnatal	İatrojenik
Kaynak	Salya, genital sekresyon, gözyaşı, idrar	Semen, maternal viremi, asendan genital enf.	Servikal sekresyon	Anne sütü, tükürük	Kan ürünleri
Enfeksiyon	VİREMİ				
İmmun cevap					
Nonspesifik	İnterferon +	(+)	(+)	+	(+)
Hücre sel	T-B hücre etkileşimi +	(+)	(+)	+	(+)
Humoral	Ig M (Ig E) ++	(+) / +	(+)	+	+
	Ig G ++	(+) / +	+	+	+
Klinik durum					
Semptomatik	Ateşli hastalık (% 25)	Konjenital CMV (% 5)	-	-	-
	EMN'ye benzer (% 10)	Hafif semptom % 5-10	% 10	% 5	% 15
	Ansefalit, hepatit, myokardit (% 5)	Hastalıklı %90 ve enfekte % 5-15 gebelerde geç sekeller	-	-	-
Asemptomatik	% 60	% 85 - 90	% 90	> % 95	85
Bağışıklık	Virusun lökositlerde kalıcılığı				
	Aralıklı virus atılımı		Uzun süre virus atılımı		
Antikorlarının kalıcılığı					

(+) : Gecikmiş ve azalmış

Tablo 7. Primer CMV Enfeksiyonunun Patogenezi ve İmmun Cevap

2.4. CMV Enfeksiyonlarının Tanısı

CMV enfeksiyonlarının hızlı ve özgül tanısı aşağıdaki durumlar dolayısı ile önemlidir:

- Konvansiyonel hücre kültür yöntemlerinin zaman alması
- AIDS hastalarının recurrent hatta primer enfeksiyonlarında, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ve konjenital enfeksiyonlarında serolojik cevabın eksikliği,
- Günümüzde etkin antiviral ajanların varlığı,

d) CMV enfeksiyonlarının görünümünün transplant reddinin klinik görünümüne benzemesi (56, 57)

Bütün bu faktörler CMV'ye spesifik monoklonal antikorları ve DNA sekanslarını kullanan etkin ve hızlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesini teşvik etmiştir (58).

Kişiler virusu idrar, semen veya servikal sekresyon ile yıllarca ekskrete edebildiğinden CMV hastalığının tanısını kanıtlamak zordur. Bu bölgelerde saptanan pozitif kültür sonucu, hastanın o andaki semptomlarının CMV'ye bağlı olduğunu göstermez. Ancak kandan virus izolasyonu aktif hastalığı gösterir. Fakat hastalar viremik dönemde bile asemptomatik olabilirler.

Tanı Yöntemleri:

- a) Tipik CMV virionlarının elektron mikroskop (EM) ile aranması,
- b) Tipik CMV sitopatolojisinin sitolojik ve histolojik aranması
- c) Dokuda CMV antijeninin aranması,
- d) Dokuda CMV genomunun aranması,
- e) Seroloji,
- f) Virus izolasyonu,

a- Elektron Mikroskopu : İdrarda CMV'yi bulmak için kullanılmış ve viral kültür kadar sensitif olmadığı anlaşılmıştır. Günümüzde tanı amacıyla nadiren kullanılmaktadır.

b- Sitoloji / Histoloji : Mikroskopik tamda 25 - 35 mm büyüklüğünde geniş, santral ve bazofilik intranukleer inklüzyon içeren hücreler görülür. Bu inklüzyonlar nükleer membrandan bir halo ile ayrıldığından baykuş gözü (owl's eye) diye adlandırılırlar. En iyi Papanicolau veya hematoxylen eosin boyama ile görülürler. Enfekte hücrelerdeki intrasitoplazmik inklüzyonlar en iyi giemsa ile görülürler. Erken görülen bu inklüzyonlar CMV enfeksiyonunun ölçümünde sensitif değildir (örneğin idrar için). Kültüre göre 1/3 - 1/4 oranında sensitiftir. Düşük sensitivitesinden dolayı tanı yöntemi kültür olanağı yoksa kullanılmalıdır (59).

c- Dokuda CMV antijeninin aranması : Son zamanlarda kandan CMV'nin izolasyonuna alternatif olarak lökositlerde viral antijenin gösterilmesi önem kazanmıştır (60). Özellikle transplant hastaları ve AIDS hastalarında hızlı tanı yöntemi olarak önerilen deneyin duyarlılık ve özgüllüğü % 90'ın üzerindedir (61, 62, 63, 64). Viremi için duyarlılığın % 50 - 78 olduğu bildirilmektedir (63).

Deneyin temeli başta PNL olmak üzere lökositlerde alt matriks fosfoproteininin (pp65) monoklonal antikorlarla tesbitine dayanır (65, 66) ve antijenemi assay olarak adlandırılır (67, 68).

Sonuçları değerlendirirken düşük seviyedeki antijeneminin asemptomatik enfeksiyonla, şiddetli antijeneminin semptomatik enfeksiyonla ilişkili olduğuna karar verilir (63, 69, 70). Antijeneminin kantitatif takibi, hastalığın gidişini değerlendirmede, antiviral tedavinin süresini ve ilaç direncini belirlemede kullanılabilir (62, 63). Antijeniemi testi genellikle hastalığın başlangıcından önce pozitifleşir. Bunun için yüksek risk grubu hastaların korunması veya ön tedavi altına alınması; tedaviye cevap ve relapsları izleyebilmek için kullanılan virus izolasyon yöntemlerine göre sensitivitesi % 100 olan bir test olduğu bildirilmektedir (37).

Bu yöntemin CMV enfeksiyonu yönünden risk altında olan transplantasyon hastalarının prospektif olarak izlenmelerinde shell vial kültür yönteminden (SVKY) daha duyarlı olduğu ve bu amaçla kullanımının yaygınlaştığı bildirilmektedir (60).

Viral antijenler bronkoalveolar lavaj (BAL), idrar, biopsi gibi diğer örneklerde de gösterilebilmektedir (72). Fakat BAL'da virus varlığının gösterilmesi hastalığın kesin göstergesi değildir. Viremi ve hastaların diğer verileri ile birlikte değerlendirilmelidir (60).

d- Dokuda CMV Genomunun Aranması (Nükleik Asit Hibridizasyonu ve PCR): İn situ hibridizasyon; doku - invaziv hastalığın tanısında önemli bir tekniktir ve duyarlılığı histolojik yöntemlerden fazladır. Ancak pozitif sonuçların dikkatli yorumlanması gerekir. Lökositlerden hazırlanan sitospin preparatlarında kullanılan in situ hibridizasyon yönteminin duyarlılığının PCR ile karşılaştırılabilir olduğu bildirilmektedir. Sonuçların kantitatif olarak değerlendirilebilmesi, hastalığın şiddeti ve antiviral tedavinin etkinliğini takip etmekte kullanılabilir. Deneyin immunositokimyasal boyama ile birarada yapılabilmesi, aynı hücrede viral antijenleri ve nükleik asitlerin tesbit edilmesi avantajını sağlamaktadır.

PCR ile viral genomun saptanması: CMV PCR'ında çok çeşitli örnekler yanında, konjenital enfeksiyonun prenatal tanısı için amniyotik sıvı örneği de kullanılabilir (60). Duyarlılığı ve özgüllüğü çok yüksektir (73). Dissemine enfeksiyon göstergesi viremi olduğu için özellikle PCR ile kanda viral genomu saptamanın, CMV hastalığını teşhis etmede duyarlılık ve özgüllüğü önem kazanmaktadır. Yanlış negatif sonuçlar genomun oldukça korunmuş bölgesinden seçilen tek primer çiftinin kullanılmasıyla önlenebileceği gibi, tek PCR'da çok sayıda primer çiftlerinin kullanılmasıyla da önlenilmektedir (68). Çalışmalarda genellikle en erken oluşan antijen ve bazen de buna ilaveten geç antijeni kodlayan gen bölgesinden seçilen primer çiftleri kullanılmaktadır (74, 75).

PCR'da lökositlerin kullanılmasının latent enfeksiyonu da tesbit edebileceği düşünülmesine karşılık, seropozitif sağlıklı kişilerde yapılan çalışmalar bu görüşü doğrulamamaktadır (62). Muhtemelen dissemine enfeksiyon hücre lizisi ile viral DNA'nın veya tüm virusun plazmaya salınmasına yol açmaktadır (60). Bu durumda PCR ile serum

veya plazmadaki viral DNA'yı saptamak, hem dissemine enfeksiyonu göstermek, hem de latent enfeksiyona bağlı yanlış pozitif sonuçları önlemek açısından önemli olabilir (62).

Dissemine hastalığı teşhisdeki özgüllüğü arttırmak için revers transkriptaz-PCR (RT-PCR) tekniği ile viral replikasyonun göstergesi olan mRNA'nın özellikle geç antijen kinetiğinden dolayı tesbit edilmesinin uygun olabileceği bildirilmektedir (73, 76, 77).

Prodüktif enfeksiyona özgü olmayan PCR özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda aktif enfeksiyon riskini belirleyip, erken antiviral tedaviyi sağlamada, hastalığın gidişini, ilaç etkinliğini ve direncini izlemede önemli bir tanı yöntemi olarak önerilmektedir (73, 74).

PCR, klinik olarak önemli hastalık için prediktif değeri muhtemelen en düşük olan yöntemdir (60). Pozitif PCR sonucunun klinik öneminin değerlendirilmesi oldukça zordur ve bir çok verinin göz önüne alınmasını gerektirmektedir (76). Ayrıca CMV PCR'ının rutin kullanıma dahil edilebilmesi için en başta latent virus DNA'sının amplifikasyonunun ekarte edilmesi gerekmektedir (62, 78). Latent enfeksiyondan aktifini ayırdedebilmek için akut enfeksiyon sırasında eksprese edilen CMV'ye spesifik RNA transkriptlerinin amplifikasyon yöntemleri kullanılabilir(78).

e- Seroloji : Bu tanı yöntemi virus varlığının yalnızca indirekt kanıttır ve CMV enfeksiyonu gelişmesi açısından risk altındaki çoğu hastada immunolojik bozukluklar geliştiğinden problemler yaratır. Gerçi diğer tanı testlerinden daha ucuzdur. Daha az zaman, ekipman gerektirir ve tamamen otomatize olmuştur (79). Enfeksiyonun başında veya öncesinde serum antikorları negatif olan kişide serum antikorlarının gelişmesine serokonversiyon denir. Serolojik testlerin kullanımındaki amaçlar, kişinin primer enfeksiyona karşı duyarlılığını saptamak ve kan organ alıcı-vericileri taramaktır (58).

Teorik olarak CMV spesifik Ig M antikorları yalnızca primer enfeksiyon sırasında gelişir. Fakat CMV enfeksiyonunun reaktivasyonunda yeniden görülebilir. IgM antikorları 6-9 aylık dönemden sonra kaybolur. Pek sık olmasa da immun sistemi sağlam kişilerde akut primer enfeksiyondan şüphelenilirse özellikle hastalığın bir hafta veya daha uzun süre sonrasında sık olmasa da bu antikorlar bulunmayabilir. İmmun sistemi bozuk olanlarda bu hastalık sırasında veya tedavi aldığı sırada IgM cevabı bozulabilir ve Ig M titresi aktif enfeksiyon sırasında yanlış negatif görülebilir. Teorik olarak CMV spesifik Ig M konjenital CMV enfeksiyonlu infantları tanımlamak için kullanılır. Ne yazık ki bu test ne sensitif ne de spesifiktir (59). Bu nedenle bu test virolojik açıdan yaşamın ilk 2-3 haftasında veya doğumda idrar kültürü yapılması kadar kullanılmaz.

Primer, geçirilmiş ve sekonder CMV enfeksiyonu iyi dökümente edilmiş hamile kadınlarda CMV-Avidite Index(Aİ) çalışılmış; geçirilmiş ve sekonder enfeksiyonda IgG-Aİ'nin % 60'ın üzerinde, primer enfeksiyonlu hamilelerde % 50'nin altında bulunmuştur.

AI'nin % 65'in üzerinde olması primer olmayan bir CMV enfeksiyonuna işaret ettiği bildirilmektedir (80).

Serumda CMV antikorlarının varlığı kompleman fiksasyon (KF), lateks aglütinasyon (LA), radioimmünassay (RIA) ve immun floresan antikor (IFA) gibi çeşitli metodlarla gösterilebilir(81). Bu testlerin çoğunun pratik olmaması, duyarlı, özgül ve kolay olan enzim linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemini cazip hale getirmiştir (60).

KF Deneyi: Sağlıklı kişilerde antikor titrelerinin dalgalanmalar göstermesi, böylece serokonversiyonun gerçek primer enfeksiyonu göstermemesi ve % 25 gibi yanlış negatif sonuçlar vermesi nedeniyle kullanılmamaktadır (58). Western blot tekniği ile matriks fosfoproteininin (pp65/66 kDa) komplemanı fikse eden antijenin en önemli kısmını oluşturduğu gösterilmiştir (82).

IFA: CMV enfekte ettiği hücrelerin yüzeyinde IgG'nin nonspesifik bağlanmasına neden olan Fc reseptörünü indüklediği için % 32 oranında yanlış pozitif sonuçlar vermektedir (15). Çünkü antiserumlar nonspesifik olarak bu reseptörlere bağlanabilir, stoplazmik ve perinükleer floresans yaratır. Bu durum testin yorumlanmasında problem yaratır(8). Geliştirilmiş şekli olan antikompleman immunfloresans (ACIF) testinde deneye floresan işaretli antikompleman antikorlarının eklenmesi ile yanlış pozitiflik oranı % 1.7'ye indirilmiştir.

LA: Aynı anda birçok serum antikorlarını test edebilen bir yöntemdir.

RIA: Yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Fakat kullanılan malzemelerin pahalılığı ve deneyin radyoaktif probalar gerektirmesi nedeniyle rutin kullanılmamaktadır.

ELISA: Duyarlılığı en yüksek olan testtir. Bu teste hücre kültüründen elde edilen iyi tanımlanmamış antikorlar kullanılmamaktadır. Bu antijenler hücresel proteinler içermektedir. Ayrıca belli şartlar altında hücre kültüründe biriken dense-body proteini pp65 gibi bazı virus bileşenlerinin fazla miktarda temsil edilmesi ELISA'nın duyarlılık ve özgüllüğünü etkileyebilmektedir. Üstelik major kapsid proteini gibi diğer herpesvirusların proteinleri ile önemli benzerlik gösteren proteinlerin varlığı ELISA'da çapraz reaksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca hepatit-B virusu (HBV) ile de çapraz reaksiyon sık görülmektedir.

Son yıllarda rekombinant ELISA tekniği üzerinde yoğun çalışmalar yapılmakta, biyoteknoloji ve peptid kimyası yolu ile elde edilebilen, tanı için en uygun olabilecek rekombinant antijenler ve bunların uygun kombinasyonları belirlenmeye çalışılmaktadır (60).

Enfeksiyon sırasında humoral immun cevap analizi sonuçları, UL 32'nin kodladığı pp150'nin (fosforik tegüment proteini, oldukça immunojenik) seropozitif serumların yaklaşık % 100'ü tarafından tanındığını ve özellikle IgG ile yüksek seviyede reaktif olduğunu ortaya koymuştur (83).

pp150, pp65 ve yapısal olmayan p52 (DNA'ya bağlanan protein) en iyi IgM bağlayan antijenlerdir ve IgM serolojisinde ümit vadetmektedirler. Özellikle pp52'nin akut CMV enfeksiyonunun monitorize etmek için çok iyi bir marker olduğu bildirilmektedir (84).

Primer enfeksiyonun, sekonder enfeksiyondan ayrılması şimdiye kadar anlatılan serolojik yöntemlerle mümkün değildir. Bu ayırım en iyi şekilde seronegatif kişide IgM cevabının gösterilmesiyle yapılabilmektedir. İki tip enfeksiyonun ayırımında kullanılabilecek diğer testler, primer enfeksiyonda aşırı miktarda üretilen sitolitik IgM salınımının ⁵¹Cr ile tayini ve primer enfeksiyonun işareti olarak düşünülen membran proteini (MP) 60'a karşı IgM reaktivitesinin saptanması testleridir. Sekonder enfeksiyonda serum pek çok viral polipeptid ile reaksiyona girerken, primer enfeksiyonda başlıca pp65 ile reaksiyona girmektedir. Böylece yapısal proteinlere karşı antikor profillerini çıkarmak ayırımda diğer bir yaklaşımdır (60).

Çoğu durumda aktif CMV enfeksiyonu, inaktif enfeksiyondan protein spesifik immun reaksiyonların yoğunluğu ile ayrılabilir. İnaktif CMV enfeksiyonlu kişilerin serumlarının yoğunluğu 66, 59, 56, 50 veya 26 KDa'lık proteinlerle reaksiyona girerken, aktif enfeksiyonlu hastaların serumları bunlara ek olarak 79, 70, 43, 38, 30 veya 23 KDa'lık proteinlerle reaksiyona girmektedir (83).

f- Virus İzolasyonu : Produktif enfeksiyonun en özgül tanısı virusun hücre kültür yöntemi ile izolasyonudur (61). Çeşitli klinik örneklerin (idrara, kan, tükürük, servikal sekresyon, anne sütü vs.) kültürü yapılabilmektedir. CMV oldukça labil bir virus olduğu için örnekler en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılmalı ve hücre kültürüne ekilmelidir (60). CMV yalnızca insan fibroblast diploid hücre kültürlerinde üreyebilir. Bunun için değişik laboratuvarların ürettiği hücreler (MRC-5, WI-38, MA-184, FLOW-2000 vs.) ticari olarak piyasada satılmaktadır (59). Bunlar arasında en sık kullanılan hücreler MRC-5 hücreleridir (60). İnokülasyondan sonra tanı, virusun büyümesi sırasında meydana getirdiği CPE'nin görülmesi ile konmaktadır. Bu etki inoküle edilen virus miktarına göre 1 - 6 hafta (ortalama 10 gün) sonra meydana gelmektedir.

Son yıllarda hücre kültür yöntemine dayalı, hızlı bir tanı yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem shell vial kültür yöntemi (SVKY) olarak adlandırılmaktadır. Konvansiyonel kültür yöntemine göre tercih edilen bu yöntemde hücreler küçük şişeler içine yerleştirilen yuvarlak, 12-13 mm çapında, lameller üzerinde hazırlanmakta ve örnekler bu sistemde santrifüj edilmektedir. Santrifüjden 24 - 48 saat sonra yapılan monoklonal antikorların kullanıldığı immun floresan boyama ile virusun en erken antijen (IE) ve erken antijen (E)'leri tesbit edilerek tanı konmaktadır.

Yöntemin duyarlılığını etkileyen faktörler; örnek tipi, örnekteki virus konsantrasyonu; kullanılan shell vial sayısı, örneğin hücre tabakasına toksik etkisi,

kullanılan monoklonal antikolar, inkübasyon süresi, kullanılan hücrelerin yaşı ve tipidir (74). SVKY konvansiyonel hücre kültüründen hızlı olduğu kadar, aynı zamanda daha da sensitiftir (kan hariç) (59). Özellikle idrar için seçkin bir yöntem olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (60). Lökositlerin hücre tabakasına toksik etkisi daha fazla olduğu için vireminin tanısında SVKY'nin duyarlılığı konvansiyonel yöntemle göre çok azdır. Özellikle bu örnek için SVKY ve konvansiyonel yöntemin birarada kullanılması uygundur (69). BAL için de SVKY'nin duyarlılığı oldukça yüksektir.

Son yıllarda SVKY özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda vireminin hızlı tanısı ve kantitatif takibinde ve konjenital enfeksiyonun standart tanısı olan kültür yöntemi ile virüriyi saptamada tercih edilen yöntemlerden birisidir (62, 85).

Tanı - Özet

Bu testler spesifik CMV klinik tanısı için şu şekilde kullanılırlar:

1- Konjenital Enfeksiyon :

- a) Doğumda 1 - 2 hafta içinde virus kültür pozitifliği postnatal ve perinatal enfeksiyonlu infantlardan ayırdetmede önemlidir.
- b) İdrarın sitolojik incelemesi : Kültürden daha az sensitif, fakat karakteristik inklüzyon görüldüğünde diagnostiktir.
- c) Antikor negatif anneler bebeğe enfeksiyonu geçirmediğinden, IgG antikollarının yokluğu esas olarak konjenital enfeksiyon tanısını elimine eder.
- d) CMV-spesifik IgM antikoları tanıyı destekleyebilir, fakat yanlış pozitif ve negatif sonuçlar çıkabilir.

2- Perinatal Enfeksiyon: Doğumda kültür negatif, 4 haftanın üzerinde pozitifleşenlerde düşünülür. Konjenital enfeksiyondaki b ve d maddeleri hakkındaki yorum, perinatal enfeksiyonlar için de geçerlidir. Seronegatif infantlar ekzojen CMV almış olabilirler (kan transfüzyonu vs ile)

3- İmmun sistemi sağlam olanlarda:

- a) Serokonversiyon ve CMV spesifik IgM antikollarının varlığı, primer enfeksiyonun en iyi göstergesidir.
- b) İdrar kültür pozitifliği CMV enfeksiyonu tanısını destekler. Fakat aylar, yıllarca idrarla atılabildiğinden enfeksiyon varlığını uzaktan yansıtabilir. Pozitif kan kültürü bu hastalarda yine de tanı koydurucudur.
- c) İdrarın sitolojik çalışması primer enfeksiyona rağmen negatif olabilir.

4 - İmmun sistemi bozuk olanlarda :

- a) Doku hastalığında DNA / RNA veya viral antijenlerin gösterilmesi (akciğer, kolon vs.), CMV enfeksiyonunun varlığını kanıtlar (diğ er patojenlerin yokluğ unda).
- b) Serokonversiyon diagnostiktür. Fakat nadiren meydana gelir. Özellikle AIDS'li hastalarda % 95'in üzerinde HIV enfeksiyonundan önce CMV seropozitifliğı vardır.
- c) CMV sp Ig M antikorları özellikle virus reaktivasyonu sırasında bu grup hastalarda bulunmayabilir veya önemli klinik enfeksiyon olmasa bile Ig M sıklıkla bulunabilir (59).

Genel olarak aktif CMV enfeksiyon tanısı aşağıdaki kriterlerden bir veya daha fazlası varsa koyulabilir:

- a)- Bir veya daha fazla kültür pozitifliğı
- b)- Seronegatif olduğu bilinen kişide serokonversiyon
- c)- CMV IgM pozitifliğı, IgG antikorlarında 4 kat veya daha fazla artışı, CMV enfeksiyonu ile uyumlu klinik hastalık (ateş, lökopeni, organomegali, vs) tablosundan ikisinin birlikte pozitifliğı (57).

2.5. Profilaksi

2.5.1. Pasif immunizasyon

Kemik iliğı ve böbrek nakli yapılan CMV seronegatif kişilere immunglobulin verilerek yapılan çalışma, bu tür pasif immunizasyonun CMV enfeksiyonunu önlemede yetersiz kaldığını, ancak CMV'ye bağılı hastalık gelişimini azaltabildiğini göstermiştir (11). CMV'nin yüzey glikoproteinlerinin major epitoplarına karşı monoklonal antikor havuzu klinik olarak yarar sağlayabilir ve hastalığın önlenmesinde etkili olabilir (86).

2.5.2. Aktif İmmunizasyon

Sitomegalovirus enfeksiyonu sonrasında gelişen aktif immunit e, reaktivasyon veya reenfeksiyon durumlarında CMV'ye bağılı ciddi komplikasyon gelişimini önler. CMV'ye bağılı en ağır klinik tablolar immunitenin olmadığı durumlarda (hamile kadınlar, transplant alıcıları, primer enfeksiyon vs.) ortaya çıkar. Bu durumda aktif immunizasyon durumunda CMV seronegatif hamile kadınlar ve transplant alıcıları hedef alınmalıdır. Canlı CMV aşılıarı üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Ancak henüz CMV enfeksiyonunu ve buna bağılı hastalık gelişimini etkin bir şekilde önleyecek aşı bulunamamıştır (11). Hayvanlar üzerinde aşı çalışmaları devam etmektedir (87).

Moleküler DNA klonlama ve monoklonal antikor üretilmesiyle spesifik olarak virusun glikoproteinleri yapılabilir ve subünitlerle immunizasyon mümkün olabilir (86).

Yine insan fibroblast hücre kültürleri de seri pasajlar yapılarak canlı, virülansı azaltılmış aşı suşlarına alternatif olarak zarf glikoprotein B'den oluşan, genetik olarak klonlanmış aşilar murine -CMV ile muamele edilmiş farelerde en azından kısmi koruyuculuk sağlamıştır (88).

2.6. Tedavi

Tedavide kullanılan 2 önemli antiviral ajan Ganciclovir ve Foscarnet'tir.

Ganciclovir : HSV üzerine etkili asiklovir'in bir nükleotid analogudur. CMV DNA polimerazı inhibe ederek viral replikasyonu durdurmaktadır (16). İn vitro HSV ve CMV üzerine aciclovir'den 10-100 kat daha etkilidir. AIDS'li hastalarda CMV retinitinin tedavisinde, transplant alıcılarında CMV proflaksisinde kullanılır. Tedavinin başlangıcından 1 - 4 hafta sonra cevap görülür. Tedavi kesildikten 2-5 hafta sonra tüm hastalarda klinik ve virolojik relaps görülür. Bunun için yaşam boyu idame tedavisi verilmesi gerekir; fakat yan etkisi olan lökopeni nedeniyle tedavi kesilir. Ayrıca ganciclovire dirençli suşlar da ayrı bir problemdir (48). Ganciclovir tedavisinin KI transplantlılarda CMV pnömonisine bağlı mortaliteyi azaltmadığı, fakat hiperimmunglobulin ile birlikte verildiğinde CMV pnömonisine bağlı mortaliteyi oldukça azalttığı görülmüştür (16). Transplant alıcılarında proflaktik ganciclovir kullanımı mortalite oranını % 75'den % 25'e indirmiştir. Ganciclovir proflaksisinin en önemli yan etkisi lökopenidir ve özellikle primer CMV enfeksiyonunun proflaksisinde etkinliği tam değildir.

Foscarnet : Herpes virusların viral-DNA polimerazlarını ve Human immundeficiency virus'un (HIV) reverse transcriptasını inhibe eden bir pirofosfattır. CMV retinitinde etkinliği ganciclovir ile aynıdır (11, 48). Nefrotoksisite, elektrolit dengesinde bozulma, konvülzyon, bulantı gibi yan etkiler dolayısıyla tolerans, ganciclovire göre daha güçtür (11).

Ganciclovir ve foscarnet'in hayvan çalışmalarında embriyotoksik ve teratojenik olduğu gösterilmiş; gebelikte kullanımı hakkında bilgi yoktur (15).

3 - MATERYAL VE METOD

3.1. Laboratuvar Çalışmasında Kullanılan Malzeme ve Kimyasallar.

Çalışma Örnekleri :

Çalışmanın planlanması aşamasında K.T.Ü Tıp Fakültesi Tıpta Uzmanlık Tez Bildirim Formu hazırlanması şartlarının öngördüğü; çalışmanın tanımlanması, klinik örneklerin nereden ve nasıl temin edileceği, çalışmanın hangi şartlarda ve nerede gerçekleştirileceği belgelenecek Tıp Fakültesi Etik Kuruluna başvuru yapıldı. Yapılan incelemeden sonra çalışmanın etik kurallara uygun olduğu onayı alındı. Buna göre; hücre kültürü çalışmalarında kullanılan servikal sekresyon örnekleri Aralık 1997-Mayıs 1998 tarihleri arasında Trabzon Doğumevi Gebe Polikliniği'ne başvuran yaşları 18 ile 39 arasında değişen, gebeliğinin III.Trimesterinde olan 158 kadından Uzman Doktor gözetiminde alındı.

Cihaz ve gereçler:

- CO₂ Etiv (Nuare, TM)
- Soğutmalı santrifüj (Heraeus Sepatech/Megafuge),
- Termocycler (Techne/Progene),
- Inverted Microscope (SOIF),
- Mikrosantrifüj (Biofuge13/Heraeus Sepatech),
- Laminar flow cabinet (Powtect/class II),
- Flurescence Microscobe (Olympus),
- Elektroforez tank (Fisher Biotech),
- UV-İlluminator (UVP),
- Fotoğraf Makinesi (Fisher Biotech),
- Otoklav,
- T25 Hücre Kültür Flaskları (Greiner)
- Coverslips (BDH)
- Bijoux (Sterilin)(shell vial şişesi)
- Swablar (Rayon)

- Vortex (IKA-Labortechnic),
- -20 °C ve -70 °C derin dondurucu,
- Sıvı azot tankı,
- disposable filtreler
- plastik pastör pipeti,
- 5, 20, 50 ve 500 ml'lik vidalı kapaklı cam şişeler,
- T-25 doku kültür flaskı (Greiner/ Labortechnic),
- Cultiplast swab, ince uçlu penset, bistüri,
- 15 ml'lik santrifüj tüpleri,

Kimyasallar

- Tripsin (Sigma T4799)
- NaHCO₃ (%7.5 solüsyon, Biological Industries, 03.040.1B)
- L-glutamin
- NaOH (Merck)
- Dimetilsülfoksit (Sigma D8779)
- EDTA (Sigma E5134)
- PBS (Dulbecco's A, Oxoid)
- Aseton, Phenol (Sigma), Chloroform (Sigma), Isoamiloalcohol - (Sigma), K-Acetate (Sigma),
- Agaroz (Sigma), Proteinaz K (Sigma), SDS (Sigma),
- dNTP, Primerler, MgCl₂, Taq Polimerase, 10X buffer (Promega),

Solüsyonlar:

- M199 (Seromed)
- NEAA (X100)
- Na-Bikarbonat (% 7.5)
- Fetal Calf Serumu (Sigma ve Biological Industries)
- Deiyonize-distile su (Easypure UV/UF)
- Sükroz fosfat solüsyonu

3.2. Solüsyonların Hazırlanması

Tripsin:

Steril PBS (Kalsiyum ve Magnezyum içermeyen fosfat tampon tuz)(100 ml.) içinde 250 mg tripsin çözüldü. 0.1 g EDTA (Ethylene-Diamine-tetra-acetic acid/Sigma) 10 ml deiyonize suda çözüldü. 0.45 µm. lik filtreden geçirildi. Hazırlanan 100 ml'lik tripsine 9.6 ml EDTA ilave edildi ve karıştırıldı. Daha sonra 1 ml'lik steril eppendorflara taksim edilerek -20 °C'de saklandı. Kullanılacağı zaman 1 ml tripsin 15 ml PBS ile karıştırılıp 37 °C'de ısıtılarak kullanıldı.

PBS (fosfat tampon solüsyonu) Hazırlanışı:

Phosphate buffered saline (Dulbeco'A') tabletlerinden 100 ml deiyonize su için 1 adet olmak üzere şişelere kondu. Çalkalanarak çözdürüldü. İstenilen hacimlerde şişelere bölündü. 1 atmosfer basınçta, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Soğutuldu. Oda ısısında saklandı.

Trypan Blue Hazırlanışı:

Elli mg trypan blue (tripan mavisi) tartıldı. Elli ml PBS içerisine konarak çözüldü. Oda ısısında saklandı.

Antibiyotik Kokteyli (Antibiyotik karışımı) Hazırlanması:

Vancomycin	500 mg
Gentamycin	1440 mg
Nystatin (10 000 U/ml)	250 ml
Deiyonize su	64 ml

100 ml hazırlandı. Eppendorflara birer mililitre taksim edildi ve -20 °C'de saklandı. Son konsantrasyonları; vancomycin 50µg/ml, gentamycin 144 µg/ml, nystatin 25 U/ml, olacak şekilde hücre kültürü için kullanılan büyüme vasatı (GM) ve idame vasat (MM)'ları içine karıştırıldı.

Viral Transport Medium (VTM):

Deiyonize su	100 ml
TC 199 (X1)	10 ml
NaHCO ₃ (% 4.4)	2.5 ml
Antibiyotik kokteyli	1 ml
Isı ile inaktif	
Fötal calf serum (FCS)	2 ml

Hazırlanan solüsyon 0.45 µm'lik filtrede steril şişe içine süzülür. İkişer ml olarak vidalı kapaklı 5 ml'lik şişelere bölündü. 4 °C'de saklandı.

Hücre Kültür Vasatının Hazırlanışı:

Steril deiyonize su	430 ml
TC 199 (X10) (L- glutaminli)	10 ml
NaHCO ₃ (% 7.5)	14 ml
NEAA (x100)	5 ml

İdame vasatı olarak kullanılacağı zaman % 2, büyüme vasatı olarak kullanılacağı zaman % 5 oranında FCS eklendi. Ayrıca vancomycin 50µg/ml, gentamycin 144 µg/ml ve nystatin 25 U/ml olacak şekilde antimikrobiale maddeler vasatlara karıştırıldı (89).

Yükleme Tamponu (loading buffer)

%20 Ficoll 400

0.1 M Na₂EDTA, pH 8.0

% 1.0 SDS

% 0.25 (w/v) bromphenol blue

% 0.25 (w/v) Xylene cyanole

3.3. Fibroblast Hücre Kültürünün Hazırlaması

KTÜ Tıp Fakültesi ameliyathanesinde Haziran-1996'da isteğe bağlı olarak yapılan bir sünnetten elde edilen sünnet derisi (preputium) , içinde 20 ml PBS bulunan şişeye alındı ve hemen viroloji laboratuvarına getirildi. Doku şişeden çıkarılarak steril bir petri içine alındı. Makroskopik kan giderilinceye kadar 5-10 kez yıkandı. Petriye dokuyu islatacak kadar PBS kondu. Doku; steril sivri uçlu doku makasıyla 1-2 mm³ büyüklükte olacak şekilde kesildi. Petri hafif yan yatırılarak doku parçacıkları üste çekildi; altında biriken kanlı PBS pastör pipeti ile çekildi ve atıldı. Kalan hücreler 15 ml PBS ile sulandırılarak santrifüj tüpüne toplandı ve 500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu devirde çökmeyen eritrositleri içeren üstteki sıvı atıldı. Sediment, beher içine alındı. İçine küçük bir bar (karıştırıcı mıknatıs) atıldı. Üzerine 15 ml FCS içermeyen TC199 ve 4 ml % 0.25'lik Tripsin solüsyonundan kondu. Alttan ısıtmadan 37 °C'lik etüvde 30 dakika (kapağı hafif açılarak) karıştırıcı üzerinde bırakıldı. Süre sonunda şişe dışarı alındı ve 2-3 dakika oda ısısında büyük parçaların dibe çökmesi için beklendi. Üzerindeki sıvı santrifüj tüpüne alındıktan sonra 2 kez 1500 rpm/5 dakika/oda ısısında FCS'li kültür vasatı ile yıkandı. Süpernatant atıldı. Sediment 10 ml % 20 FCS içeren growth media içinde süspanse edildi.

Pipetleme hareketi ile flaska aktarılmaya hazır hale gelen hücre süspanسیونundan 0.1 ml alındı, 0.9 ml trypan blue ile karıştırıldı ve hücre sayımı yapıldı. Canlı hücreler (açık renkli, içi boş, parlak röfle verenler) sayıldı. Toplam hücre (3.10⁵/ml) miktarı TC25 doku kültür flaskına boşaltıldı. 37 °C lik CO₂'li etüve ağzı hafif aralanarak, üreyen hücrelerin pasajının yapılabileceği süre kadar (7-8 gün) beklendi. İlk üremeleri sağlanan bu sünnet derisi fibroblast hücreleri HFC diye adlandırıldı.

Hücre Kültür Pasajının Yapılışı:

Pasaj hazırlığı olarak tripsin, PBS ve Büyüme Vasatı 37 °C'de ısıtıldı. Hücreleri içeren flaskın içindeki vasat döküldü; hücreler 10 ml PBS ile 2 kez yıkandı. PBS uzaklaştırıldı. Tripsinden 2 ml flask içine kondu. Flaskın ağzı kapatılarak invert mikroskopta

incelendi. Hücrelerin birbirinden ve flask yüzeyinden ayrılmaya başladığı anda flastaki tripsin solüsyonunun yaklaşık yarısı döküldü. Yüzeyi ıslatacak kadar tripsin kalan flask tripsin aktivitesini arttırmak amacıyla 37 °C' etüve kondu; 2 - 3 dakika sonra çıkarıldı. Flastın kenarı sert zemine vurularak tek tabaka (monolayer) halindeki hücreler tamamen zeminden kaldırıldı.

Flask içine 4 ml GM konarak plastik pastör pipeti ile pipetaj yapıldı. İkişer ml olarak flastlara hücreler bölüştürüldü. Üzerlerine 8 ml BV eklendi. 37 °C / CO₂'li etüve kaldırıldı. İlerleyen pasajlarda BV içine konan FCS giderek azaltıldı ve hücrelerin tam uyum sağladığı 8.pasajdan sonra normal düzeyine indirildi. Pasaj numarası 8'den itibaren itibaren hücreler her pasajda yeterli stoğun tutulması için dondurulmaya başlandı.

Hücrelerin Dondurulması:

Flastan tripsinizasyon sonucu elde edilen hücreler 10 ml PBS içinde çözdürüldü. Santrifüj tüpüne aktarıldı. Oda ısısında 1400 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Santrifüj aletinden yavaşça çıkarılan tüp üzerindeki süpernatant atıldı. Tüpe yavaşça elle vurularak sediment çözdürülmeye çalışıldı. Dimetil sülfoksit (%10 FCS'li) BM 1/10 oranında ve toplam hacim 1 ml olacak şekilde sediment üzerine kondu. Pipete edilerek dondurucu mediumda süspansiyon haline getirilen hücreler küçük vida kapaklı hücre dondurma tüpleri (cryo vial) içine alındı. Ağzı sıkıca kapatıldı. Kapak kenarları parafilm ile sarıldı. Üzerine hücrenin adı, pasaj numarası ve tarih yazılarak -70 °C kondu ve 24 saat sonunda sıvı azot tankına kaldırıldı.

Donmuş Hücrelerin Çözdürülmesi:

Sıvı azot tankından çıkarılan vial hızla avuç içinde çözdürüldü. Cryo vialdeki hücre süspansiyonu pastör pipeti ile alınarak yeni bir flaska yavaşça boşaltıldı. Üzerine % 8-9 ml GM eklendi ve CO₂'li etüve kondu.

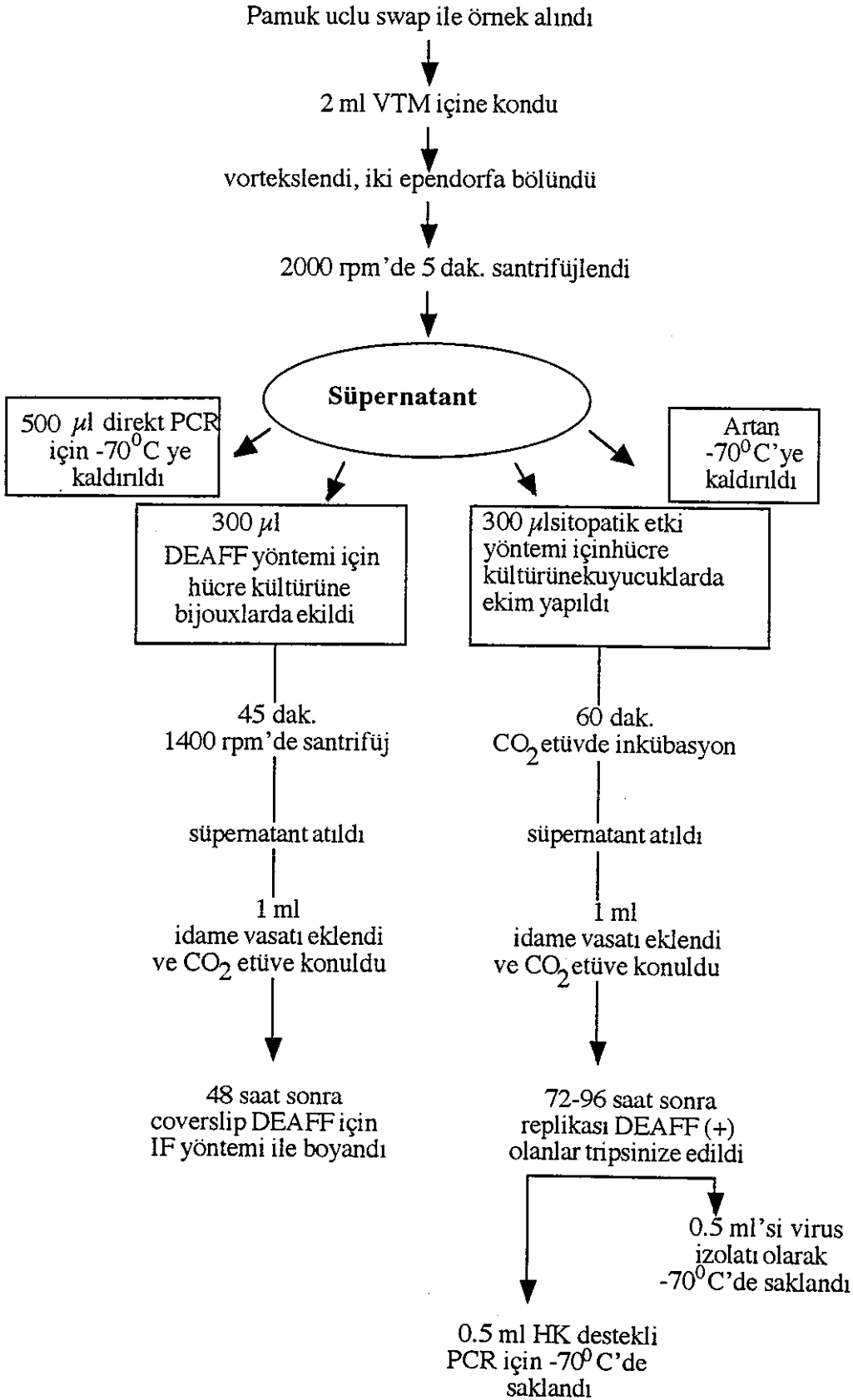
3.4. Klinik Örneklerinin Alınışı, Laboratuvara İletilmesi ve Hücre Ekimi

Uzman doktor tarafından hastalara yapılacak işlem hakkında bir bilgi verildi ve jinekolojik masaya alındı. Şekil 7 de gösterildiği gibi daha önceden planlanan yonteme göre servikal örnek alınıp işleme tabi tutuldu. Bunun için; önce perine temizliği yapıldıktan sonra antiseptik solüsyon içinde bekleyen spekulum kağıt havlu ile kurulandı ve hastaya uygulandı. Pamuk uçlu eküvyon çubuğu (Cultiplast swab) serviks ağzından 1-2 cm içeriye sokuldu, 5-10 saniye serviks içinde çevrilerek swab ucunun ıslanması sağlandı. Çıkarılan swab içinde 2 ml VTM bulunan ve 4 °C'den henüz çıkarılan şişe içine ucu kırılarak kondu. Tekrar 4 °C'ye kaldırıldı. Bütün örnekler toplanıncaya kadar geçen 6-7 saat boyunca örnekler 4 °C'de

bekletildi. Toplanan örnekler buzlukta bekletilen buz kalıpları üzerine alınarak laboratuvarına getirildi ve ekim yapılana kadar +4 ° C de bekletildi.

PBS ve idame vasatı 37 ° C'ye ısınmak üzere kondu. Kültür flaskı ve bijoux (kültür şişeleri)'lardaki hücreler incelendi. Sağlıklı (canlı, konfluent, kontamine olmayan) görünenler belirlendi. Örnekler buzdolabından çıkarıldı. Vortekslendi. 2'şer eppendorfa bölündü. 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, birinde 500 µl olmak üzere (PCR için) steril iki eppendorfa aktarıldı. Etüvde ekim için ayrılan plate ve bijouxlar çıkarıldı. Üzerindeki vasatlar atıldı. Kuyucuklar ve bijouxlar PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldı. Örneklerden 300'er µl pleyt ve bijouxlara ekildi (90).

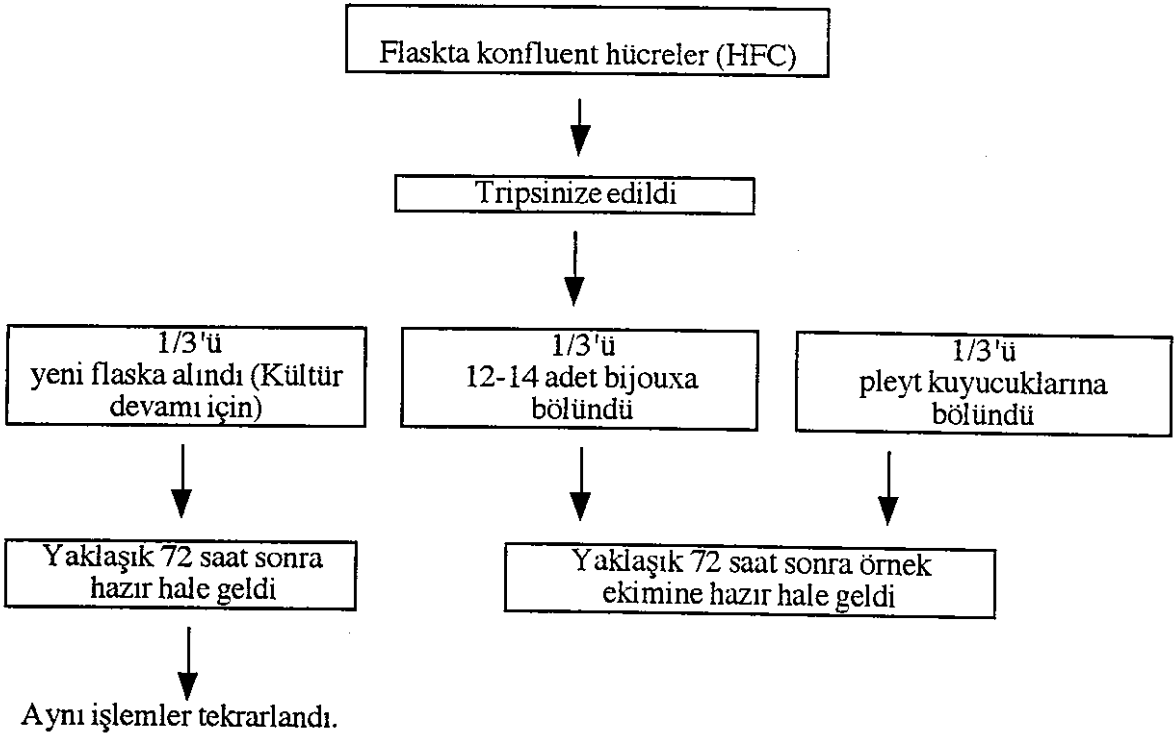
Artan hasta örnekleri -70 ° C'ye kaldırıldı. Bijouxlar 1400 rpm/45 dak. oda ısısında santrifüj edildi. Plate adsorbsiyon için 1 saat CO₂'li etüvde bekletildi. Santrifüj ve adsorbsiyon sonunda kuyucuklarda örnekler toplandı ve atıldı. Üzerlerine 1birer ml idame vasatı eklendi. 37 ° C de CO₂'li etüve ağızları aralanarak kaldırıldı. Bijouxlar içindeki cover slipler 48 saat sonra immunfloresan yöntemi ile boyandı (91). Değerlendirmesi aynı gün veya ertesi gün yapılan örneklerden pozitif olanların platedeki kuyucukları tripsinize edildi ve 0.5 ml'si viral izolat olarak, 0.5 ml'si hücre kültür destekli PCR için -70 ° C'ye kaldırıldı.



Şekil 7. Servikal Sekresyon Örneğinin Alınışı ve İşlenişi

Standart ve Shell Vial Kültür Yöntemi (SVKY) İçin Hücre Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Fibroblast hücresi olarak daha önce hazırlanan ve 25. pasaja getirilen hücreler kullanıldı (92). Sıvı nitrojende saklanan 9. pasajdaki HFC çözülürülerek flaska aktarılarak canlandırıldı. Flaskın tüm yüzeyini doldurduğunda 24 kuyucuklu hücre kültür pleyti ve dibinde 12 mm çapında yuvarlak lamel (coverslip) bulunan shell vial kültür şişelerine (bijoux) pasajı yapıldı. Daha sonra 24 kuyucuklu plate ve bijouxlardan hazır olan hücreler 1-2 gün içerisinde kullanılmayacaksa içindeki büyüme vasatı idame vasatı (% 2 FCS içeren) ile değiştirildi. Bunun için ortamlardaki vasat alındı. Pleyt ve bijouxlar PBS ile yıkandı. Üzerlerine 1 ml MM kondu. Bijoux ve platelerin kapakları hafif aralık olarak CO₂'li etüve kondu (93). Şekil 8'de çalışma için gerekli kültür ortamlarının idamesi gösterilmektedir.



Şekil 8. Çalışma İçin Gerekli Kültür Ortamlarının İdamesi

3.5. Örnek Ekimi Yapılan Hücre Kültürlerinin İmmun Floresan Yöntemle Boyanması

DEAFF (Detection of Early Antigen by Fluorescence Foci) Testi CMV'nin enfekte ettiği hücrelerde ilk saatle itibariyle sentezlemeye başladığı en erken (IE) antijenlerden birinin buna spesifik (IE 72) monoklonal antikorla reaksiyonu; bu bağlanmanın gerçekleştiğini göstermek için de floresansla işaretli fare antikorunun kullanılarak antijenin in situ saptanması esasına dayanır (7).

Bu amaçla "CMV immunofluorecence Assay, Pre-cpe culture-identification" kiti kullanıldı. Kit içeriği:

- CMV IE protein spesifik monoklonal antikor
- Floresans izotiyosiyanat (FITC) ile işaretli anti fare IgG
- Normal fare antikor
- PBS
- Tween 20 / sodium azid
- Mounting sıvısı (Tris-tamponlu gliserin, floresan arttırıcı madde ve % 0.1 sodium azid).

IF Boyamasının yapılışı:

Bijoux içindeki idame vasatı uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkandı. İnce uçlu penset ile coverslipler dikkatlice (ters dönmeyecek, hücreler üstte kalacak şekilde) çıkarıldı ve lam üzerine kondu, numaralandırıldı. Etüvde kurutuldu; sonra üzerine -20° C'de bekleyen soğuk aseton 3-4 damla kondu; 4° C'de 10 dakika bekletildi. Oda ısısına getirilen CMV spesifik monoklonal antikordan 1 damla cover slip üzerine damlatıldı (7). Hafif nemli ortamda 37° C'de 30 dakika bekletildi. Çıkarıldıktan sonra 3 kere PBS/tween 20 solüsyonu ile yıkandı. Etrafı kurulandı. Üzerine oda ısısına getirilen FITC ile işaretli anti-fare IgG'den 1 damla kondu. Aynı şekilde 37° C'de 30 dakika bekletildi. Tekrar 3 kere PBS/tween 20 ile yıkandı. Etrafı kurulandı. Üzerine 1 damla kaplama sıvısından (mounting sıvı) damlatıldı ve IF mikroskopta incelendi.

3.6. CMV DNA Ekstraksiyonu ve PCR

Hasta örneklerinin küçük bir bölümü (15 hasta) laboratuvara getirildiği gün çalışıldı. Kalan örnekler daha sonra -70° C'den çıkarılarak çalışıldı. CMV DNA ekstraksiyonu için, daha önce DEAFF testi ile tanısı konan bir CMV izolatımızın DNA'sını agaroz jel elektroforezi ile görüntüleyebildiğimiz PCR protokolü kullanıldı (94). Bu prosedüre göre; PCR için -70° C'de saklanan örnekler çıkarıldı ve çözündürüldü. Üzerlerine $25 \mu\text{l}$ SDS (% 10), $10 \mu\text{l}$ proteinase K (1 mg/ml) ve $5 \mu\text{l}$ EDTA (0.5 M) kondu. 65° C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

Ertesi gün eşit hacimde phenol-chloroform kondu, 3-5 dakika yavaşça alt üst edildikten sonra 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz protein tabakasına dokunulmadan dikkatlice toplandı, yeni eppendorflara kondu. Üzerine eşit hacimde chloroform-isoamilalkol ilave edildi ve 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant iki hacim %96 lık soğuk etanol ile karıştırılarak DNA'nın presipitasyonu sağlandı. Santrifüj edilerek çöktürülen DNA 65 °C de kurutuldu. Eppendorflar üzerine 20 µl distile su konarak DNA'lar çözüldü. Amplifikasyon için hazırlanan bu kalıp DNA (template)'dan 10 µl alınarak 40 µl master mix içeren PCR eppendorfuna katıldı. Thermocycler'de amplifiye edilerek CMV ürün elde edildi (94). PCR programı; 94 °C de 3 dak. başlangıç denatürasyonunu takiben 60°C de 1 dak. bağlanma (annealing), 94°C de 30 sn. denatürasyon olmak üzere toplam 60 siklus'dan oluşturulmuştur.

Master Mix Hazırlanışı (20 örnek için)

10 X buffer	100 µl	
25 mM MgCl ₂	60 µl	
dNTP	40 µl	
Primer I	10 µl	5'CCT AGT GTG GAT GAC CTA CGG GCC A3'
Primer II	10 µl	5'CAG ACA CAG TGT CCT CCC GCT CCT C3'
Distile su	576 µl	
Taq polimeraz	<u>4 µl</u>	

PCR eppendorflarına 40 µl olarak bölündü ve -20 °C'de saklandı.

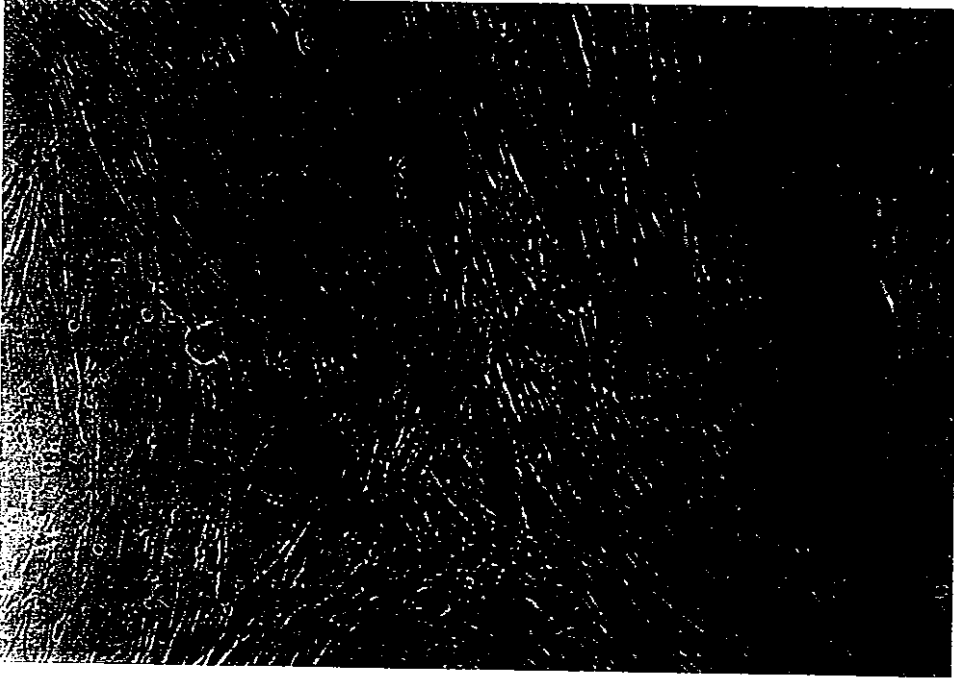
Amplifikasyon sonucu elde edilen ürünler 13000 rpm de 5-6 saniye santrifüj edildi. Çıkarıldıktan sonra herbir üründen 20 µl alındı. Bir küçük damla yükleme tamponu (loading buffer) ile karıştırılarak % 2'lik agaroz jelde hazırlanan kuyucuklara kondu. Örnekler 65 volt akımda 30 dakika yürütülerek elektroforez uygulandı. Kontrol olarak daha önce CMV izolatının PCR'ından elde edilen CMV ürün kullanıldı. Elektroforez tankından çıkarılan jel UV-iluminatörde görüntülenerek fotoğrafı çekildi

4 - BULGULAR

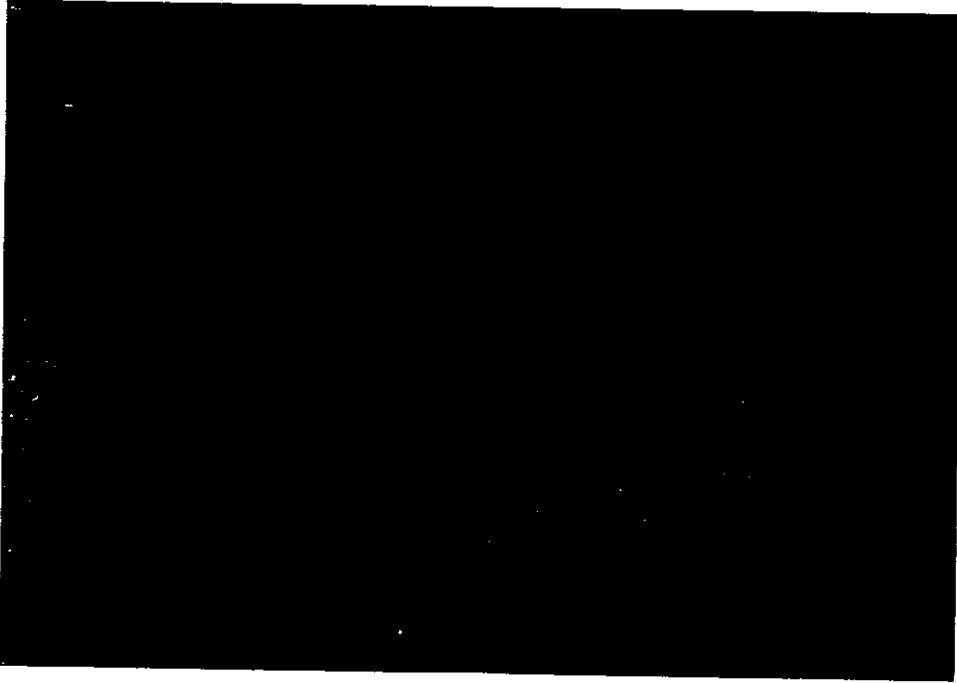
4.1. İnsan Fibroblast Hücre Kültürü (HFC) Hazırlanması ve CMV ile Enfekte Edilmesi

Sağlıklı bir çocuğun sünet derisi kullanılarak diploid karakterde primer fibroblast hücre kültürünün hazırlanması materyal ve metod 3.3. de belirtildiği gibi yapıldı. T25 flask içerisine aktarılan tripsinle ayrıştırılmış derinin dermis ve epidermis tabakası kökenli tüm hücrelerin M199 içeren ortamda in vitro kültürü başlangıçta fibroblast, epitelyal hücreler başta olmak üzere keratinosit benzeri hücreler, melanosit ve azımsanmayacak düzeyde dendritik hücrelerce zengindi. Zaman içerisinde daha çok bir birine paralel olarak üreyen, iğ tarzında ince uzun hücreler görünümündeki fibroblastların sahaya hakim olduğu; 25 cm²'lik yüzeyin ilerleyen günlerde % 70-80 oranında bu hücrelerce doldurulduğu görüldü. Yedi-10 gün içerisinde daha çok fibroblastların hakim olduğu monolayer tabaka tripsinize edilip toplam hücre sayısı büyüme vasatı içerisinde iki T25 flaska bölündüğünde (pasajı yapıldığında) fibroblastların yeniden bölünerek çoğaldıkları, 3-4 gün içerisinde sahayı tamamen kapladıkları (% 100 confluency) görüldü (Şekil 9).

Human foreskin cells (HFC) olarak adlandırılan bu hücreler CMV ile enfekte edildi. Beşinci günden sonra iğ tarzında paralel olarak seyreden fibroblastlar arasında yuvarlaklaşmış ve küme oluşturmuş (sitopatik etki) enfekte fibroblastlar görülmeye başlandı. Dokuzuncu günden sonra sitopatik etki artmış olarak izlendi (Şekil 10). CMV ile enfekte edilmesi halinde karakteristik sitopatik etki oluşumunu destekleyen bu fibroblast hücreler daha sonra shell viallerde hazırlanarak DEAFF testi için kullanılabilceğine karar verildi.



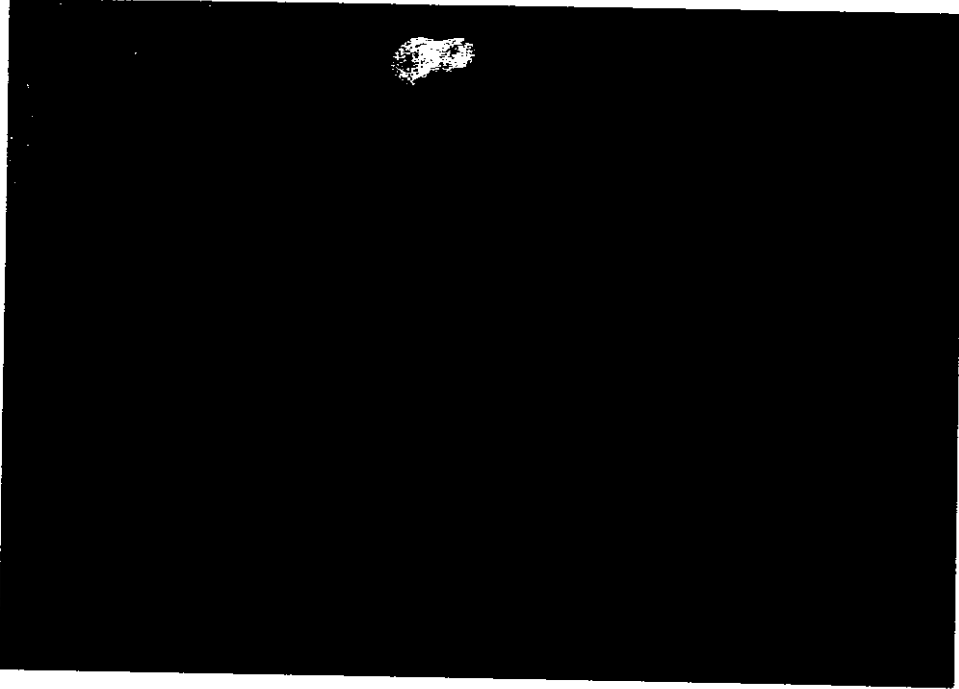
Şekil. 9. Normal insan fibroblast hücreleri



Şekil 10. CMV ile enfekte edilmiş ve CPE gelişmiş fibroblast hücreleri

4.2. DEAFF Testi ve Değerlendirilmesi

Klinik örnekler shell vial veya plastik kuyucuklara yerleştirilen yuvarlak lameller üzerindeki fibroblast hücrelere ekildikten sonra materyal ve metod 3.5 de belirtildiği CMV IE antijeninin varlığını ortaya koymak için indirekt immunfloresann yöntemle boyandı. Mikroskopik incelemede (10x20) tamamen intranükleer yerleşimli canlı, yeşil floresan görüntü pozitiflik olarak değerlendirildi (Şekil 11).



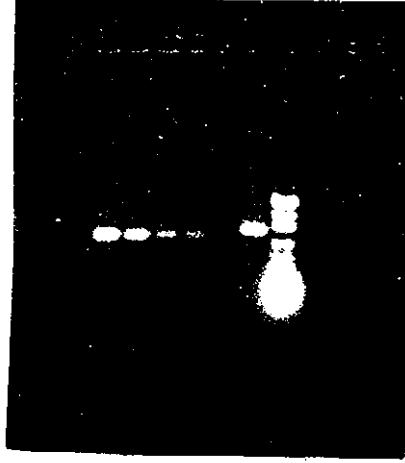
Şekil 11. DEAFF testi ile CMV IE protein pozitif hücre görüntümü

Bir cover slip üzerindeki bu yeşillikler her pozitif hasta için sayıldı. Enfekte hücre skoru, dolayısıyla her servikal örneğin mililitresinde kaç virüs partikülü içerdiği belirlendi. Bunun için; bir coverslip üzerinde 19 anlamlı yeşillik sayılmışsa, ekim için örneğin 300 ml'sinin kullanıldığı gözöntüne alınarak servikal sürüntünün yaklaşık $19 \times 3.3 = 65/\text{ml}$ virus içerdiği hesaplandı.

4.3. Servikal Sürüntü Örneklerinden CMV DNA Ekstraksiyonu ve PCR

Daha önce laboratuvarımızda klinik bir örnekten izole edilen ve hücre kültüründe çoğaltılıp saklanan CMV izolatının (tr1) titresinin plak yöntemiyle 1.5×10^3 /ml olduğu bulundu. İçerisinde 750, 375, 150 ve 75 virus bulunduran dilüsyonları yapıldıktan sonra viral DNA ekstraksiyonu yapıldı. Virus içermeyen preparatın kontrol olarak kullanıldığı bu işlemlerde CMV IE gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak amplifikasyon (bkz. 3.5) gerçekleştirildi. Test kontrolü olarak Hepatitis B virus DNA ürününün birlikte kullanıldığı çalışmada 259 bp'lik beklenen amplifikasyon ürünü agaroz jelde görüntülendi (Şekil 10). Buna göre PCR yönteminin hassasiyetinin 75 virus partikülünün altında olduğu görüldü.

1 2 3 4 5 6 7



Şekil 10. CMV PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi. Kuyucuklar soldan sağa doğru: 1-CMV izolat-stok (750 virus); 2- Stok CMV'nin 1/2 dilüsyonu (375 virus); 3- Stok CMV'nin 1/5 dilüsyonu (150 virus); 4- Stok CMV'nin 1/10 dilüsyonu (75 virus); 5- Negatif Kontrol; 6- HBV Ürün (259 bp); 7- Moleküler ağırlık standardı

4.4. Servikal Sekresyon Örneklerinde CMV

Yaşları 18 ile 39 arasında değişen III. trimester 158 hamile kadının servikal sekresyon örnekleri insan fibroblast hücre kültürlerine ekilerek DEAFF yöntemi ile CMV yönünden incelendi. 158 servikal sürüntü örneğinin 17 sinde (%10.75) CMV bulundu. Bütün pozitif hastalar dahil olmak üzere çalışılan 100 servikal örneğin hepsi PCR ile negatif olarak bulundu (Tablo 8).

Tablo 8. III. Trimester Hamilelerde DEAFF Yöntemi ve PCR ile Bulunan Servikal CMV Atılım Sıklıkları

Test yöntemi	Pozitif		Negatif	
	n	%	n	%
DEAFF (n=158)	17	10.75	141	89.25
PCR (n=100)	0	0	100	100

İmmunfloresan değerlendirme sırasında pozitif bulunan bütün örneklerde enfekte hücre skoru sayıldı ve örneklerdeki virus yoğunluğu hesaplandı. Alınan servikal örneğin CMV titresinin 4-2500/ml arasında değiştiği belirlendi.

Tablo 8 de özetlendiği gibi DEAFF testi sonucuna göre CMV pozitif ve negatif bulunan hastalar yaş grupları , meslek ve eğitim düzeyleri gibi demografik özellikleri yönünden karşılaştırmalı olarak incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

Tablo 9. Servikal CMV Varlığının Yaşlara Göre Dağılımı

Yaş aralığı	Pozitif (n=17)		Negatif (n=141)	
	n	%	n	%
≤19	-	-	4	2.83
20 - 29	15	88.23	94	66.66
30 - 39	2	11.17	43	30.49
Toplam	17	100	141	100

(P= 0.1850)

Ayrıca CMV pozitif ve negatif bulunan hastalar gebelik haftası ve gebelik sayısı yönünden karşılaştırıldığında gruplar arasında CMV pozitifliği yönünden istatistiksel yönden anlamlı bir farkın olmadığı görüldü (Tablo10, 11).

Tablo - 10: Servikal CMV Varlığının Gebelik Haftası ile İlişkisi

Gebelik haftası	Pozitif (n=17)		Negatif (n=141)	
	n	%	n	%
≤37	4	23.52	24	17.03
40 ± 2	13	76.48	117	82.97
Toplam	17	100	141	100

(P= 0.5063)

Tablo 11. Servikal CMV Varlığının Gebelik Sayısı ile İlişkisi

Gebelik Sayısı	Pozitif (n=17)		Negatif (n=141)	
	n	%	n	%
≤ 3	14	82.35	115	81.56
> 3	3	17.65	25	18.44
Toplam	17	100	141	100

(P=1.0000)

Servikal CMV pozitif ve negatif bulunan hastalar arasında spontan abortus öyküsü yönünden anlamlı bir fark (P=0.00027) olduğu görüldü (Tablo 12).

Tablo 12. Servikal CMV Varlığı veya Yokluğu ile Spontan Abortus İlişkisi

Spontan abortus öyküsü	Pozitif (n=17)		Negatif (n=141)	
	n	%	n	%
Hiç olmayan	12	70.1	126	89.4
1 kez	1	5.9	12	8.5
2 kez	4	23.5	3	2.1
Toplam	17	100	141	100

(P=0.0027)

Hastalar arasında 36 haftalık iken kontrole gelen bir hamilenin servikal CMV yönünden pozitif olduğu bulundu. Bu hasta miadında tekrar kontrole geldiğinde son 24 saat içinde bebeğin hareketlerini hissetmediğini söyledi. Yapılan USG'ik muayenesinde bebeğin intrauterin ölü olduğu anlaşıldı.

Pozitif bulunan gebelerden biri ikiz gebeliğe sahipti: 7 aylık muayeneye geldiğinde CMV pozitif bulunan bir hasta miadında geldiğinde (örnek tekrarı) negatif olarak bulundu. Bu hamile klinikte izlenebildi; alınan süt, bebeğinden alınan tükürük ve idrar örnekleri CMV yönünden araştırıldı ve negatif olarak bulundu.

5 - TARTIŞMA

CMV'nin klinik örneklerde varlığının gösterilmesi yöntemi olarak örneklerin insan kökenli diploid fibroblast hücrelerine ekimi ve uzun süreli takibi klasik bir virus izolasyon yöntemi olarak kullanılagelmiştir. Virusun diğer sitopatik etki oluşturan virüslere göre mikroskopik olarak hücrelerde oluşturduğu hücresel hasar özellikle düşük titrede inokülasyon durumunda- bir hafta içerisinde ortaya çıkmaktadır. Negatif sonucun elde edilmesi için en az 30 gün süre ile hücrelerin mikroskopik takibi; hatta kesin negatifliğin rapor edilmesi için bu süre sonunda kör pasajlarla kültürün bir hafta daha devam ettirilmesi gerekir.

1980'li yıllarda Mayo Kliniği (USA) çalışanları konvansiyonel kültür yöntemi ile kültürlerin, ekimi takip eden 24-48 saat içerisinde floresan işaretli virus proteinlerine spesifik antikolar kullanılarak incelenmesi yöntemini karşılaştırmışlar; floresanla işaretli antikor yardımıyla sitopatik etki görülmezden çok önce kültürlerin CMV içerip içermediklerinin hızlı bir şekilde anlaşılabilceğini ve sonuçların konvansiyonel kültürle mükemmel bir uyum gösterdiğini bildirdiler (59).

Gleaves ve arkadaşları 1985'te yaptıkları çalışmada bunun yalnızca hızlı bir metod olmadığını, aynı zamanda konvansiyonel kültürden daha da sensitif olduğunu bildirdiler (59, 91). Ayrıca, Paya ve arkadaşları değişik klinik örneklerde konvansiyonel kültür ve SVKY ile CMV aramışlar ve tüp kültürde daha fazla hücre bulunmasına rağmen SVKY'ni konvansiyonel kültürden daha sensitif ve hızlı olduğunu göstermişlerdir (95).

Gleaves ve arkadaşları 1985'te yaptıkları bir çalışmada santrifüjle hızlandırılmış inokülasyon yöntemini kullanarak hücre kültür sensitivitesinin % 35'den % 100'e çıkarılabileceğini; ayrıca tanı için gereken ortalama 9 günlük sürenin 16 saate kadar indirilebileceğini göstermişlerdir (91). Konvansiyonel kültürde CPE oluşuncaya kadar toksik etki gösterebilen idrarın SVKY yönteminde kullanılması halinde pek toksik olmadığını da gösterilmesi ayrı bir avantaj olarak ileri sürülmüştür (91).

Miller ve arkadaşlarının 1994'de SVKY sensitivitesi ile ilgili çalışmalar sonucunda örnek türü, örnek başına çalışılan vial sayısı, kullanılan monoklonal antikor türü, boyama zamanı, hücre tipi, yaşı ve benzeri gibi faktörlere dikkat edildiğinde, kan örneği için

sensitivitenin % 50'den %75'e, diğer örnekler için %75'den %100'e çıktığını göstermişlerdir (74).

Mac Arens ve arkadaşlarının SVKY'nin optimizasyonu ile ilgili yaptıkları bir çalışmada çeşitli örnekleri kullanmışlar; konvansiyonel kültür ile karşılaştırdıkları SVKY'i %100 sensitif ve spesifik bulmuşlardır (93). Benzer çalışmalar Ashley ve arkadaşları , Paya ve arkadaşları , Thiele ve arkadaşları tarafından yapılmış, özellikle sensitiviteyi etkileyen faktörler araştırılmıştır(93).

Mac Arens ve arkadaşları IE antijenine spesifik monoklonal antikolar kullanarak 2 farklı saatte elde ettikleri sonuçları karşılaştırmışlardır (93). Buna göre IE proteinlerinin varlığının gösterilmesi esasına göre 16. saatte % 7.5 pozitiflik bulurken, 40. saatte % 9.6 (% 28'lik artış) pozitiflik bulunmuştur. Çalışmamızda IF destekli SVKY yöntemini uygularken kültürler 48. saatte boyama işlemine tabi tutuldu. Hernekadar örnek başına ikili shell vial uygulamasının CMV saptanmasında % 10'luk artış sağladığı bildirilmişse de (93) bu düşük artış oranının getireceği maliyet artışı (monoklonal antikor boyama kiti) nedeniyle çalışmamızda örnek başına bir SVK kullanıldı.

Primer diploid hücre kültürlerinin in vitro şartlarda sürekli çoğaltılabilmesi 30-40 pasaja kadar mümkündür. Pasaj sayısı ilerledikçe hücrelerin genel olarak virusla enfekte edilebilme yeteneği azalır. Özellikle CMV için pasaj sayısı düşük olan fibroblastların tercih edilmesi gerektiği bildirilmiştir. Ayrıca, cover slip üzerindeki hücelere yüzeyi %80-90 oranında kapladıktan 1 gün sonra ekim yapıldığında maksimum etkinin elde edileceği bildirilmiştir (93).

SVKY ile ilgili çalışmalarda sıklıkla kullanılan hücreler MRC5 (human fetal lung fibroblast) hücreleri (91, 93, 96, 97) ile human foreskin (insan sünnnet derisi fibroblast) (37, 92, 98, 99, 100) hücreleridir. Ticari olarak temin edilmesi mümkün bu hücre türleri bir çok laboratuvar tarafından kullanılmaktadır. Ancak temin edilen hücrelerin ileri pasajlarda kullanılmasına imkan tanımayacak bir pasaj sayısı ile sunulması ve bunun getirdiği maliyet çok fazla olmaktadır. Bu nedenle çoğu laboratuvarların kullandığı insan embriyonu deri örneklerinden veya çocuk sünnnet derilerinden laboratuvarda hazırlanan primer fibroblast hücre kültürlerini hazırlayarak çalışmamızda kullandık. Böylece CMV üretilmesinde genellikle kullanılan, son pasajlarında gönderildiği için sınırlı sayıda pasajı yapılabilen ve ancak ticari olarak yurtdışından sağlanabilen hücre zorunluluğunu ortadan kaldırmış olduk. Sıvı nitrojen şartlarında hücre dondurma tekniğininde uygulanması ile primer eksplant veya monolayer kültürlerden elde edilen erken pasajdaki hücreleri saklama mümkün olmuş; istendiğine düşük pasaj nolu hücre ihtiyacında stok hücreler canlandırılarak kullanılmıştır. Bu şekilde bir hücre bankası oluşturmakla arzu eden diğer laboratuvarlara her an hücre transferi yapabilmenin imkanı da yaratılmış oldu.

Balcarek ve arkadaşlarının konjenital CMV tanısına yönelik yaptıkları bir çalışmada konvansiyonel kültür ve SVKY kullanılmış; yeni doğanların tükrük örneklerinde CMV izolasyonu için DEAFF yönteminin sensitivitesi % 96.8, konvansiyonel kültür sensitivitesini % 87.1 olarak bulunmuştur (100). Konvansiyonel kültür yönteminin sonuç verme açısından uzun süre gerektirmesi ve pahalı olması nedeniyle SVKY'nin konjenital CMV enfeksiyonun tanısında virus izolasyonu için kullanılabilir daha uygun bir yöntem olduğuna karar vermişlerdir (100). Mac Arens ve arkadaşları da (93) CMV aranmasında konvansiyonel kültür ile çalışmanın daha kapsamlı bir iş olduğuna karar vermişler ve rutin klinik viroloji laboratuvarında SVKY'ini kullanmışlardır.

SVKY'nin hassasiyeti santrifüje de bağlıdır. Örneklerin monolayer hücre tabakası üzerinde santrifüjü sırasında içeriğin hücrelerle temasının 4 kat arttığı bildirilmiştir(99). Ancak toksisiteyi de arttıran bu uygulama bazı laboratuvarlar tarafından presantrifüj uygulamasıyla ortadan kaldırılmıştır (59).

Konvansiyonel kültür yöntemi ile pozitif sitopatik etki bazen çok uzun sürede ortaya çıkmaktadır. Bu süre içerisinde hücrelerin idame vasatının 3-4 günde bir değiştirilmesi zorunluluğu ve buna rağmen hücrelerde yaşlanma belirtilerinin görülmesi gibi dezavantajları başta olmak üzere birçok çalışmada tercih edildiği gibi konvansiyonel kültürden daha sensitif ve hızlı olduğu kanıtlanan SVKY çalışmamızın yöntemi olarak seçildi. Çalışmamızda da servikal örnekler 2500 rpm/5 dakika santrifüj edilerek işleme tabi tutuldular.

Klinik örneklerde CMV aranması ve başka yöntemlerle karşılaştırma amacıyla PCR yöntemi 1990'lı yıllardan sonra birçok çalışmada kullanılmıştır.

Warren ve arkadaşlarının 1992'de konjenital ve perinatal CMV enfeksiyonlu yeni doğanların tükrük örneklerinde yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada; konvansiyonel kültür referans alındığında PCR'ın sensitivitesi %89, spesifitesi %95.8; DEAFF'in sensitivitesi %90.6, spesifitesi %97.7 olarak bulunmuştur (92). Konjenital CMV enfeksiyonlarının erken saptanması, arkadan gelmesi beklenen işitme kaybı, gelişme geriliği, motor anormallikler gibi durumlarda tedavi yöntemlerinin erkenden uygulanabilmesi açısından çok önemlidir. CMV enfeksiyonuna bağlı olarak tutulan santral sinir sistemini düzeltmek veya hasarı önlemek için antiviral terapideki yeni gelişmeleri kullanabilmesi, yeni doğanların taramasından sonra öncelik alacaktır. Bunun için yeni doğan taramasında kullanılacak yöntem hızlı, doğru ve otomatize olmalıdır. Fakat Warren ve arkadaşları tarafından uygulanan konvansiyonel kültür, SVKY ve PCR yöntemlerinin hiçbirisi yeni doğanların taraması için uygun bulunmamıştır (92).

Smith ve arkadaşlarının (99) kan donörlerinde yaptıkları bir çalışmada SVKY ile PCR yöntemleri karşılaştırılmış; kan vericilerinin hiçbirinde hücre kültür pozitifliğine rastlanılmadığı, PCR ile % 8 oranında pozitiflik bulunduğu bildirilmiştir. Kan donörleri için PCR efektif ve güvenilir bir yöntem olarak görülmüştür; fakat rutin taramalarda tanı amacıyla

kullanılabilmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmıştır. Eğer tek bir monoklonal antikor kullanılıyorsa suşların küçük bir kısmı yakalanabilmiş, monoklonal antikor karışımı kullanılıyorsa daha yüksek sensitivite gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca uzun süreli kültürden de yüksek sensitiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir (99).

Demmler ve arkadaşları PCR ile yeni doğanların idrarında CMV atılımının sıklığını belirlemek için 44 enfekte yeni doğanı taramışlar ve 41'inde PCR ile (IE protein ve late protein antijen genlerini birlikte kullanarak) pozitif bulmuşlardır. ³²P ile işaretli oligonükleotid propların kullanıldığı dot-blot hibridizasyon yöntemi ile de 44'ünü pozitif bulmuşlar. Hücre kültürü ile negatif buldukları örneklerin hiçbirinin PCR ile pozitif olduğu gösterilmemiştir (101).

Wunderli ve arkadaşları transplantlı hastaların lökositleri ile yaptıkları bir çalışmada enfeksiyon şüpheli 17 olgunun 10'unda SVKY ile CMV pozitifliği saptamışlardır (96). Bu 17 olgunun 11'inde IE antijenlerinin direkt aranmasıyla pozitiflik IgM yanıtı veya klinik semptomlardan 11 gün önce saptanmıştır. Bu çalışma ile ayrıca lökositlerde CMV aranmasının, gelişecek viremi hakkında en erken sürede bilgi verebileceğine ve lökositlerde CMV taranmasında başarı ile kullanılabilceği gösterilmiştir (96).

Nelson ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmada (98) konjenital CMV enfeksiyonlu infantların hepsinin kanında PCR (% 5 PAGE ve likid hibridizasyon) yöntemi ile CMV DNA'sı saptanmıştır. Asemptomatik konjenital CMV enfeksiyonlu infantların % 50'sinde, 32 kontrol vakasının hiçbirinde virus DNA'sının belirlenemediği bildirilmiş; konjenital CMV enfeksiyonunun taranmasında PCR'ın hızlı, sensitif ve spesifik olduğu ileri sürülmüştür (98).

Atabay ve arkadaşlarının kısıtlı sayıda donörde yaptıkları bir çalışmada hiç CMV pozitifliği bulunmamış; sonuçlarının Steiner'in verilerine uygunluk göstermediğini, Gerna ve Zippetto'nun kan donörlerinde yaptıkları - aktif enfeksiyon yoksa amplifikasyonun olmadığını gösteren- çalışma ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir (102).

Smith ve arkadaşlarının kan donörlerinde CMV aranması ile ilgili yaptıkları çalışmada SVKY ve PCR yöntemleri karşılaştırılmış; asemptomatik bireylerde CMV atılımının SVKY ile gösterilemediği bildirilmiştir. CMV taramasında, CMV enfeksiyonunu monitorize etmede PCR'ı daha sensitif ve hızlı bir teknik olarak göstermişlerdir (99).

Klinik örneklerde mevcut mikroorganizma genlerinin amplifikasyonunda karşılaşılan önemli sorunlardan biri örneklerde bulunabilecek PCR inhibitörleridir. Demmler ve arkadaşlarının yeni doğan idrarında CMV aranması ile ilgili çalışmalarında, SVKY için kullanılan bütün örneklerin PCR'da da kullanılabilceği ileri sürülmüş; konvansiyonel kültüre göre sensitivite % 97.6, spesifite % 100 bulunmuştur (74). Aynı çalışmada idrarda bulunabilecek üre, hemoglobin, heparin, mukus ve fosfatların PCR'ı inhibe edebildiği; örneğin, PCR testi öncesinde ortama 50 mM üre ilave edildiğinde amplifikasyonun

gerçekleşmediği-inhibe edebildiği- gösterilmiştir. Bu nedenle normal şartlarda 300 mM civarında üre içeren idrar örneklerinde CMV DNA amplifikasyonu yapmadan önce idrarın filtre edilerek üreden arındırılması gerektiği önerilmiştir (74).

Warren ve arkadaşlarının konjenital ve perinatal CMV enfeksiyonlu çocukların tükürüklerinde PCR yöntemini kullanarak CMV DNA'sı taraması yaptıkları bir çalışmada tükürükte bulunan mycoplasma ve diğer mikroorganizmaların doku kültüründe CMV'nin izole edilmesini etkilediğini bildirmişlerdir (92). Yine tükürükte bulunan enzimlerin PCR'da kullanılan polimerazın fonksiyonunu engelleyebileceği veya mikroorganizmalar tarafından üretilen nükleazların hedef DNA sekansını değiştirip, amplifikasyonu değiştirebileceği vurgulanmıştır (92).

Toye ve arkadaşlarının 1998'de C. trachomatis testi için toplanmış genital ve idrar örneklerinin işlenmesi, saklaması ve dilüsyonlarının PCR üzerine etkisi üzerine yaptıkları bir çalışmada örnek içerisindeki bazı maddelerin amplifikasyonu inhibe edebildikleri bildirilmiştir (103). Buna göre, idrar örneklerinin -70°C 'de bekletmenin PCR üzerine pek etkili olmadığı; phenol-chloroform ekstraksiyonu, 4°C 'de bekletme ve dilüsyonsuz yapılan test tekrarı, 4°C 'de dilüsyonlu bekletme gibi uygulamaların PCR inhibitörlerinin etkisini azalttığını gözlemlemişlerdir (103).

Çalışmamızda III.trimestr hamilelerde servikal CMV atılım sıklığını IF destekli SVKY yöntemini (DEAFF) kullanarak % 10.75 olarak bulduk. PCR ile çalışılan DEAFF pozitif örneklerin hepsi dahil olmak üzere toplam 100 örnekte amplifikasyon ürünlerinin % 2'lik agaroz jel elektroforezle belirlenmesi yöntemiyle ise hiç pozitiflik saptanamadı. SVKY sonuçlarına göre hasta popülasyonumuzda pozitif ve negatif bulunanlar arasında yaş, meslek ve eğitim gibi demografik özellikler, gebelik haftası, gebelik sayısı gibi durumlar yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Vajinal akıntı bulgusunun varlığı istatistiksel yönden anlamlı bulunmasa da servikal CMV pozitif hastalarda vajinal akıntının daha az olduğu görüldü. Spontan abortus öyküsü yönünden ise pozitif ve negatif gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi. Servikal CMV pozitif grupta spontan abortus öykü sıklığı daha fazla idi.

Çalışmamızın sonuçlarını karşılaştırabileceğimiz hasta grubu, ve çalışma yöntemine (IF destekli SVKY ve PCR) benzer başka bir çalışmaya literatürde rastlanmadı. Çalışma grubumuza benzer ancak konvansiyonel kültür ile yapılan çalışmalar arasında Stagno ve arkadaşlarının III.trimestr hamilelerde yaptığı çalışmada servikal CMV atılım sıklığı % 11.3 olduğu, Montgomery ve arkadaşlarının ise atılım sıklığını % 12 olarak bildirdikleri görülmektedir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçları ile çok yakındır (3). Diğer taraftan Numazaki ve arkadaşlarının konvansiyonel kültür yöntemi ile yaptıkları bir diğer çalışmada III.trimestrde servikal CMV atılım sıklığı % 27.8 bulunmuştur. Bu bizim sonuçlarımıza göre çok yüksektir (3).

Stagno ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ilerleyen yaşın ve multiparitenin virus ekspresyonunu belirgin olarak azalttığını bulmuşlar. Bizim çalışmamızda bu özellik yönünden fark yoktu (3).

Raynolds ve arkadaşlarının yaptıkları benzer bir çalışmada III. trimestr hamilelerde servikal CMV oranı konvansiyonel kültür yöntemi ile % 13.4 olarak bulunmuştur (104). Bu çalışmada enfeksiyonun yaş ve hamilelik sayısı ile ilişkisi bulunmamıştır.

Çalışma örneklerinde 17 pozitif örnek dahil olmak üzere toplam 100 örnek PCR yöntemi ile CMV varlığı yönünden araştırıldı. Amplifikasyon sonucu elde edilen ürünler Etidyum Bromür ile boyandı. % 2'lik agaroz jel elektroforeze tabi tutularak UV ilüminatörde incelendi. Sonuçta DEAFF testi pozitif çıkan örnekler dahil hiçbirinin PCR'nda pozitif bant izlenmedi. Oysa bu protokolü kullanarak çalışma öncesi hazırlık safhasında bir servikal CMV klinik izolatını PCR ile kolayca saptayabilmiş; titresi 1500 virus pfu/ml olan bu izolat ve dilüsyonlarının aynı PCR protokolü ile incelenmesinde PCR'ın hassasiyetini-kültür vasatı ile yapılan dilüsyonlarda- 3-4 virus, aynı virusun DEAFF testi negatif çıkan servikal sekresyon örnekleri ile yapılan sulandırılmalarında ise hassasiyet biraz düşmekle birlikte 7 - 8 virus içeren dilüsyonlarda PCR pozitifliği gösterilebilmişti (105).

Hamilelerde servikal sekresyon örneklerinin veya herhangi bir grubun servikal sekresyon örneklerinin PCR ile CMV yönünden araştırılması ile ilgili olarak literatür de yalnızca bir çalışmaya rastlandı. Bu çalışmada; hibridizasyona esaslı bir yöntemle (Southern Blot Hibridizasyon) Shen ve arkadaşları III.trimestr hamilelerde servikal CMV atılım sıklığını % 35.2 olarak bildirmektedirler (78).

Çalışmamızda kullandığımız PCR protokolünün hassasiyeti hücre kültüründe çoğaltılarak sitopatik etki ve DEAFF yöntemi ile karakterize edilmiş CMV izolatımız (CMV-tr1) ile değerlendirildiğinde, yukarıda değinildiği gibi, örnek içerisinde 3-4 adet virüsü saptayabilecek kadar yüksektir. DEAFF testi pozitif örneklerin PCR'ında ise hiç pozitifliğin saptanamaması ilk olarak servikal sıvı içerisinde PCR reaksiyonunu inhibe eden faktörlerin bulunabileceğini düşündürmektedir. Bunu doğrulamak için CMV-tr dilüsyonları DEAFF testi negatif olan servikal sürüntü solüsyonu ile yapılmış; bu örnekler PCR uygulandığında agaroz jelde görüntülenebilen ürün miktarının minimum 7-8 adet virüsle sağlanabileceği belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre her ne kadar servikal sıvı bileşenlerinin kısmi bir PCR reaksiyon inhibisyon özelliğinden söz edilebilirse de, DEAFF testi ile içerisinde 2500 adet virus bulunduğu belirlenen örneklerin PCR'ında negatifliğin elde edilmemesi beklenirdi. Diğer taraftan servikal sürüntü örneklerinde PCR negatifliğinin nedeni olarak örnek içerisinde bulunan bakterilerden açığa çıkan nükleazların DNA'ya zarar vermiş olabileceği düşünülebilir.

Agaroz jel (%2) yöntemi amplifikasyon ürünlerini göstermede yetersiz kalmış olabilir. Bunun için elde edilen amplifikasyon ürünlerine literatürde tarif edildiği gibi (94)

nonradioaktif dot blot hibridizasyon uyguladık (sonuçlar gösterilmemiştir). DEAFF testi sonucuna göre pozitif bulunan 16 rneęi içeren toplam 56 örnek bu yöntemle çalışıldığında örneklerin 7'sinde pozitiflik belirlendi. Bunlardan 4' DEAFF pozitif, 3' DEAFF negatif idi. Bu sonuçlara göre PCR amplifikasyon ürünlerini kullanarak hibridizasyonla gösterilebilen en azından 4 pozitif örneğin gel yöntemi ile belirlenememesi gel sisteminin yetersizliğinin bir kanıtı olabilir. Bu nedenle hızlı bir tanı yöntemi olarak kan, tükrük, idrar gibi materyallerde kullanılabilen PCR'ın servikal sekresyonlarda CMV identifikasyonu için kullanılması halinde daha dikkatli olunması, en azından negatif sonuçlara daha iyi ve güvenilir kalitatif veya kantitatif ölçüm sistemi geliştirilenceye kadar kuşku ile bakılması gerekmektedir.

6- SONUÇLAR ve ÖNERİLER

SONUÇLAR

1- III. trimestr hamilelerde servikal CMV atılım sıklığı SVKY-DEAFF yöntemi ile % 10.75 olarak bulunmuştur. Böyle bir grupta CMV varlığının SVKY-DEAFF yöntemi ile araştırılması Türkiye'de ve dünyada (Türk ve yabancı literatürden araştırabildiğimiz kadarıyla) ilk kez yapılmış olmaktadır. Bu nedenle Trabzon ili itibarıyla ortaya çıkan sonuçların Türk ve uluslararası tıp literatürü için yararlı olacağı düşünülmektedir.

2- Laboratuvarımızda insan sünet derisinden elde edilen fibroblast hücreleri çalışmada kullanılmış; böylece yurt dışından ve üstelik ileri (son kullanımına yakın) pasajlarda yüksek maliyetle temin edilen hücre kullanımı zorunluluğu ortadan kaldırılmıştır.

3- Uygulanan SVKY-DEAFF yöntemine göre pozitif ve negatif bulunan hastalar arasında yaş grupları, meslek ve eğitim gibi demografik özellikler yönünden istatistiki olarak bir fark bulunmamıştır.

4- Pozitif ve negatif bulunan hastalar arasında gebelik sayısı ve gebelik haftası yönünden istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

5- Servikal CMV pozitif ve negatif bulunan hastalar arasında spontan abortus öyküsü yönünden anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. Pozitif bulunan hastalarda spontan abortus öyküsünün daha sık bulunmuştur.

6- Servikal sekresyon örneklerine uygulanan PCR yöntemi sonucu elde edilen ürünler agaroz jel sisteminde görüntülenememiştir.

ÖNERİLER

1- Normal şartlarda CMV serviksten ve semenle (özellikle homoseksüellerde) asemptomatik olarak atılabilir; boğaz, idrar ve kanda bulunması ise genellikle anormal bir bulgudur. Akut enfeksiyon geçirip iyileşenler de bir süre daha virusu bu bölgelerde taşıyabilir. Konjenital ve perinatal enfeksiyonlu çocuklar, transplantasyonlu immunsupressif tedavisi altında olan hastalar, HIV ile enfekte veya AIDS'li kişiler yıllarca virusu taşıyabilir. Bunun için hangi hastada virus izole edilmesi gerektiği dikkatli klinik yorumu gerektirir; hastalığın tanısı için diğer klinik parametreler göz önünde bulundurulmalıdır.

2- Hamilelikte geçirilen primer CMV enfeksiyonu fetusa % 50 oranında geçmekte ve bunların % 10-20'si ağır klinikle doğmaktadır. Doğumda normal görünenlerde ileriki yıllarda nörolojik sekeller gelişmektedir. Hamileliğinde primer CMV enfeksiyonu geçirenlerde 22-23. haftalarda kordosentez-amniosentez yapılmalıdır. Serolojik olarak veya viral kültür sonuçları açısından pozitiflik saptanırsa gebelik sonlandırılmalıdır. Diğer taraftan, rekürrent enfeksiyonlarda gebelik sonlandırılmaz; ultrasonografik olarak hasta sıkı takibe alınır, gerekirse amniosentez-kordosentez yapılmalıdır. Viral kültür veya PCR ile pozitiflik saptanırsa gebelik sonlandırılmalıdır.

3- Alınan servikal örneklerle uygulanan PCR ve görüntüleme yöntemleri standardize edilememiştir. PCR ve hibridizasyona dayalı yöntemler için ileri çalışmalar gerektiğine karar verilmiştir.

7- ÖZET

Bu çalışmanın temel amacı hamilelerde shell vial kültür ve PCR yöntemlerini kullanarak servikal CMV atılım sıklığını belirlemektir. İnsan sünnet derisi kullanılarak hazırlanan shell vial kültür, enfekte hücrelerin floresan işaretli en erken oluşan antijene karşı geliştirilmiş monoklonal antikolar ile boyanması diye bilinen DEAFF (detection of early antijen by florescent foci assay) testi ile desteklenmiştir.

III. trimester hamilelerde servikal CMV atılım sıklığı DEAFF testi ile % 10.75 olarak bulundu. PCR ile aynı örneklerde hiç pozitiflik saptanmadı.

Virus ekskrete eden ve etmeyen hamilelerde yaş, eğitim, meslek, hamilelik haftası, hamilelik sayısı yönünden istatistiki olarak bir fark yoktu. Bununla birlikte spontan abortus öyküsü, virus ekskrete edenlerde etmeyenlere göre belirgin olarak yüksekti.

Bu çalışmada kullanılan virus arama sistemi ile ilgili olarak en iyi ve güvenilir sonuç shell vial kültür ve DEAFF yöntemi ile alınmıştır. Servikal örneklerde PCR'in etkinliği sürpriz olarak negatif bulunmuş olup yöntemin bu örneklerde kullanılabilmesi için gözden geçirilmesine ihtiyaç vardır.

8- SUMMARY

SCREENING OF CERVICAL CYTOMEGALOVIRUS SHEDDING RATE IN III.PREGNANT WOMEN USING IMMUN FLUORESCENCE SUPPORTED CELL CULTURE AND POLIMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUES

The main aim of this study was to identify the rate of cervical cytomegalovirus shedding in pregnant women using two sensitive techniques namely the shell vial assay and the polymerase chain reaction. The shell vial assay carried out using human fore skin cell culture system was supported further with special staining of infected cells specifically with a fluorescent labelled monoclonal antibody directed against an immediate early antigen, known as DEAFF (detection of early antigen by florescent foci assay). The cervical samples were obtained appropriately from pregnant women attending to Maternity Hospital in Trabzon.

Overall results using DEAFF showed that the rate of cervical CMV shedding among pregnant women at their third trimester was 10.75 %, while DNA amplification test, the PCR, somehow identified no positive result in the same samples.

No statistically significant differences were observed when the total number of virus excretors and non-excretor negative individuals were compared for age, education, profession, week of pregnancy and number of pregnancy. However, the rate of spontaneous miscarriage was significantly higher among virus excretors as compared to non-excretors.

With respect to the virus detection system used in this study, while an excellent response and confidence was experienced in conducting shell vial culture and DEAFF, the performance of PCR in cervical samples was surprisingly negative suggesting that further refinement in the test system should be considered for future experiments.

9-KAYNAKLAR

- 1 - Lynch L, Daffos F, Emanuel D, Giovangrandi Y, Meisel R, Forestier F, Cathomas G, Berkowitz R: Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol.* Vol 165 (3): 714 - 718, 1991.
- 2 - Saltzman RL and Jordan MC: Cytomegalovirus infections. *Current Opinion in Infectious Diseases.* 2: 262 - 266, 1989.
- 3 - Stagno S, Reynolds D, Fuccillo D, Smith R, Tiller M: Cervical cytomegalovirus excretion in early pregnant and nonpregnant women: suppression in early gestation. *The Journal of Infectious Diseases.* 131 (5): 522 - 527, 1975.
- 4 - Akan E : Genel ve Özel Viroloji. Üçüncü Baskı. Saray Medikal Yayıncılık, Kanyılmaz Matbaası, İzmir, 1994, s.229 - 238.
- 5 - Nelson TC and Demmler JG : Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus and newborn infant. *infections in perinatology.* Vol 24 (1) : 151 - 160, 1997.
- 6 - Gibson W : Structure and assembly of the virion. *Intervirology,* 39 : 389 - 400, 1996.
- 7 - McClintock TJ, Traker S, Mosher M, Jones D, Forman M, Charache P, Wright K, Keiser J, Taub F : Comparison of in situ hybridization and monoclonal antibodies for early detection of cytomegalovirus in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology.* 1554 - 1559, 1989.
- 8 - Raynor BD : Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Seminars in Perinatology.* 17 (6) : 394 - 402, 1993.

- 9 - Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw A : Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *Journal of General Virology*. 76 : 741 - 750, 1995.
- 10 - Broks F, Butel J, Ornston L, Jawetz E, Melnick J, Adelberg E : *Medical Microbiology*. Yirminci Baskı. Appleton and Lange. Printed in the United States of America. 1995, pp.370 - 374.
- 11 - Mandell G, Bennett J, Dolin R, Eds: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fourth Edition, Churchill Livingstone, 1995, pp.1352 - 1363.
- 12 - Serter D : *Virüs, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları*. Nobel Tıp Kitabevleri, İzmir, 1997, s.141 - 145.
- 13 - Riley DH, : *History of cytomegalovirus*. *South Med J*. 90 (2) : 184 - 190, 1997.
- 14 - Kanra G, Yurdakök M, Çakır S : *Sitomegalovirüs enfeksiyonu*. *Katkı Pediatri Dergisi*. 9 (4) : 341 - 350, 1988.
- 15 - Özeren M, Ulusoy M, Üçüncü M : *Sitomegalovirus enfeksiyonu ve gebelik*. *Klinik Bilimler, Kadın Doğum Dergisi*. 2 (4) : 76 - 79, 1996.
- 16 - Drew L : *Herpesviruses*. *Sherris Medical Microbiology*. Third Edition. Ryan K, Ed. Appleton-Lange Norwalk, Connecticut, 1994, pp.512 - 514.
- 17 - Rook HA : *Interactions of cytomegalovirus with the human immune system*. *Reviews of Infectious Diseases*. 10 (supplement 3) : 460 - 467, 1988.
- 18 - Fowler BK, Stagno S, Pass R, Britt W, Boll T, Alford C : *The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status*. *The New England Journal of Medicine*. 326 (10) : 663 - 667, 1992.
- 19 - Meyers J, Ljungman P, Fisher DL : *Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation importance of cytomegalovirus viremia*. *The Journal of Infectious Disease*. 162 : 373 - 380, 1990.

- 20 - Gerard L, Leport C, Flandre P, Houhou N, Salmon-Ceron D, Pepin J, Mandet C : Cytomegalovirus viremia and the CD4⁺ lymphocyte count as predictors of CMV disease in patients infected with human immunodeficiency virus. *clinical infectious diseases*. 24 : 836 - 40, 1997.
- 21 - Falagas M, Snyderman D, Ruthazer R, Werner G, Griffith J : Surveillance cultures of blood, urine and throat specimens are not valuable for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *clinical infectious diseases*. 24 : 824 - 9, 1997.
- 22 - Rasmussen L, Zipeto D, Wolitz R, Dowling A, Efron B, Merigan T : Risk for retinitis in patients with AIDS can be assessed by quantitation of threshold levels of cytomegalovirus DNA Burden in Blood. *The Journal of Infectious Diseases*. 176 : 1146 - 55, 1997.
- 23 - Zurlo J, Orleill D, Polis M, Manischewitz J, Jarchoan R : Lack of clinical utility of cytomegalovirus blood and urine cultures in patients with HIV infection. *Annals of Internal Medicine*. 118 (1) : 12 - 17, 1993.
- 24 - Boeckh M, Gooley T, Reusser P, Buckner D, Bowden R : Failure of high-dose acyclovir to prevent cytomegalovirus disease after autologous marrow transplantation. *The Journal of Infectious Diseases*. 172 : 939 - 43, 1995.
- 25 - Boeckh M and Boivin G : Quantitation of cytomegalovirus : methodologic aspects and clinical applications. *clinical microbiology reviews*. 533 - 554, 1998.
- 26 - Aspin M, Gallez-Hawkins G, Guigni T, Tegtmeier B : Comparison of plasma PCR and bronchoalveolar lavage fluid culture for detection of cytomegalovirus infection in adult bone marrow transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2266 - 2269, 1994.
- 27 - Brytting M, Xu W, Wahren B, Sundquist V : Cytomegalovirus DNA detection in sera from patients with active cytomegalovirus infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 1937 - 1941, 1992.
- 28 - Gerna G, Furione M, Baldanti F, Sarasini A : Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2709 - 2717, 1994.

- 29 - Salzberger B, Myerson D, Boeckh M : Circulating cytomegalovirus (CMV) - infected endothelial cells in marrow transplant patients with CMV disease and CMV infection. *The Journal of Infectious Disease*. 176 : 778 - 81, 1997.
- 30- Ho M : Epidemiology of cytomegalovirus infection. *Reviews of Infectious Diseases*. 12 (7) : 701 - 710, 1990.
- 31 - Köksal İ, Aynacı M, Kardeş B, Aydemir V : Doğu Karadeniz Bölgesi'nde erişkin yaş grubunda toxoplazma, kızamıkçık ve sitomegalovirus seropozitiflik oranları. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 28 : 58 - 66, 1994.
- 32 - Doerr WH : Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Journal of Virological Methods*. 127 - 132, 1987.
- 33 - Collier A, Meyers J, Corey L, Murphy V, Roberts P, Handsfield H : Cytomegalovirus infection in homosexual men. *The American Journal of Medicine*. 82 : 593 - 601, 1987.
- 34 - Onorato I, Morens D, Mortone W, Stansfield S : Epidemiology of cytomegalovirus infections : recommendations for prevention and control. *Reviews of Infectious Diseases*. 7 (4) : 479 - 496, 1985.
- 35 - Hemmings GD, Kılanı R, Nykiforuk C, Preiksaitis J, Guilbert J : Permissive cytomegalovirus infection of primary villous term and first trimester trophoblasts. *Journal of Virology*. 4970 - 4979, 1998.
- 36 - Fowler K, Stagno S, Pass R : Maternal age and congenital cytomegalovirus infection : Screening of Two Diverse Newborn Populations. *The Journal of Infectious Diseases*. 168 : 552 - 6, 1993.
- 37 - Radcliffe J, Hart C, Francis W, Johnson P : Immunity to cytomegalovirus in women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*. 12 : 103 - 105, 1986.
- 38 - Pollard BR, Arvin MA, Gamberg P, Rand K, Gallagher J, Merigan T : Specific cell-mediated immunity and infections with herpes viruses in cardiac transplant recipients. *The American Journal of Medicine*. 73 : 679 - 687, 1982.

- 39 - Mistik R : Kan transfüzyonu ile bulaşan diğer viruslar. Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kursu (II), Kurs Kitabı. F Özhan Matbaacılık, Bursa, 1998, s.82.
- 40 - Dündar İ : İnfeksiyöz tarama testlerinin irdelenmesi. Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kursu I, Kurs Kitabı. Birinci Baskı, Çukurova Üniversitesi Basımevi, Adana, 1997, s.188.
- 41 - Çetinkaya Y, Akova M : Cytomegalovirus enfeksiyonu. İlişin G, Biberöđlu K, Ünal S, Akalın S, Süleymanlar G (Derl.). Temel İç Hastalıkları, Güneş itabevi, Ankara, 1996, s.2320 - 2327
- 42-Eisenfeld H, Lamberson H, Dock N.Prevention of transfusion transmitted CMV Infection.Transfusion.32(3), 1992
- 43 - Stagna S : Cytomegalovirus. Nelson W, Berman R, Kliegman R, Arvin A (Eds). Nelson Textbook of Pediatrics. Fifteenth Edition, Saunders Company, 1996, pp.895 - 901.
- 44 - Boppana S, Pass R, Britl W : Virus - spesifik antibody responses in mothers and their newborn infants with asymptomatic congenital cytomegalovirus infections. The Journal of Infectious Diseases. 167 : 72 - 77, 1993.
- 45 - Murray PR, Kobayashi GS, Ifaller MA, Rosenthal KS : Medical Microbiology. Farrell R (Ed). Second Edition, Mosby Year Book Inc., London, 1994, pp.589 - 592.
- 46- Drew L : Nonpulmonary manifestations of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. clinical microbiological reviews. 5 (2) : 204 - 210, 1992.
- 47 - Drew L : Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. The Journal of Infectious Diseases. 158 (2) : 449 - 455, 1988.
- 48- Boyd FR : Basic Medical Microbiology. Fifth Edition. Little, Brown and Company, America, 1995, pp.411 - 413.
- 49 - Alford C, Hayes K, Britt W : Primary Cytomegalovirus infection in pregnancy: comparison of antibody responses to virus-encoded proteins between women with and without intrauterin infection. The Journal of Infectious Diseases. 158 (5) : 917 - 923, 1988.

- 50 - Achiron R, P=inhas-Hamiel O, Lipitz S, Heiman Z, Reichman B, Mashiachi : Prenatal ultrasonographic diagnosis of fetal cerebral ventriculitis associated with asymptomatic maternal cytomegalovirus infection. *Prenatal Diagnosis*. 14 : 523 - 526, 1994.
- 51 - Lynch L, Daffos F, Emanuel D, Giovangrandi Y, Meisel R, Forestier F, Cathomas G : Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol*, 165 : 714 - 8, 1991.
- 52 - Hogge AW, Buffone G, Hogge J : Prenatal diagnosis of cytomegalovirus (CMV) Infection: A Preliminary Report. *Prenatal Diagnosis*. 13 : 131 - 136, 1993.
- 53 - Lamy M, Mulongo K, Gadisseux JF, Lyon G, Gaudy V, Lierde M : Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol*. 166 : 91 - 4, 1992.
- 54 - Waldman W, Knight D, Huang E, Sedmak D : Bidirectional transmission of infectious cytomegalovirus between monocytes and vascular endothelial cells: An in vitro Model. *The Journal of Infectious Diseases*. 171 : 263 - 72, 1995.
- 55 - Enders G : TORCH ve Gebelik. Prenatal tanı ve tedavi. Perspektif Yayın, İstanbul, 1992, s.250 - 4.
- 56 - Siber G, Thompson C, Fleisher G : Cytomegalovirus antigenemia assay: identification of the viral antigen as the lower matrix protein pp65. *The Journal of Infectious Diseases*. 166: 683 - 4, 1992.
- 57 - Marsano L, Perrillo R, Flye W, Hanto D, Spitzer E, Thomas RJ, Murray P, Windus D : Comparison of culture and serology for the diagnosis of cytomegalovirus infection in kidney and liver transplant recipients. *The Journal of Infectious Diseases*. 161 : 454 - 461, 1990.
- 58 - Chou S : Newer Methods for diagnosis of cytomegalovirus infection. *Reviews of Infectious Diseases*. 12 (7) : 727 - 736, 1990.
- 59 - Drew L : Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Reviews of Infectious Diseases*. 10 (3) : 468 - 474, 1988.

- 60 - Barlas N : Cytomegalovirus (CMV) infeksiyonlarının laboratuvar tanısı. Bozkaya E, Yılmaz G, Bodur S (Derl). Klinik Viroloji ve Viral İnfeksiyonların Laboratuvar Tanısı. Birinci Baskı, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No: 27, İstanbul, 1996, s.81 - 89.
- 61 - Erice A, Holm M, Gill P, Henry S, Dirksez C, Dunn D : Cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay in more sensitive than shell vial cultures for rapid detection of CMV in polymorphonuclear blood leukocytes. *Journal of Clinical Microbiology*. 30 (11) : 2822 - 2825, 1992.
- 62 - Storch G, Buller R, Bailey T, Ettinger N, Langlois T : Comparison of PCR and pp65 antigenemia assay with quantitative shell vial culture for detection of cytomegalovirus in blood leukocytes from solid-organ transplant recipients. *Journal of Infectious Diseases*. 32 (4) : 997 - 1003, 1994.
- 63 - Gondo H, Minematsu T, Harada M, Akashi K, Hayashi S : Cytomegalovirus (CMV) Antigenemia for rapid diagnosis and monitoring of CMV -associated disease after bone marrow transplantation. *british journal of haematology*. 86 : 130 - 137, 1994.
- 64 - Koskinen P, Hiemimes M, Mattila S, Häyry P, Lautenschlager I : The correlation between symptomatic CMV infection and CMV antigenemia in heart allograft recipients. *Transplantation*. 55 (3) : 547 - 551, 1993.
- 65 - Gerna G, Revello M, Percivalle E, Morini F : Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp 65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia. *Journal of Clinical Microbiology*. 30 (5) : 1232 - 1237, 1992.
- 66 - Boeckh M, Bowden R, Goodrich I, Pettiner M, Meyers I : Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blod leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood*. 80 (5) : 1358 - 1364, 1992.
- 67 - Halwachs G, Zach R, Poggitsch H, Holzer H, Tiran H, Iberer F, Wasler A : A Rapid immunocytochemical assay for CMV detection in peripheral blood of organ-transplanted patients in clinical practice. *Transplantation*. 56 (2) : 338 - 342, 1993.

- 68 - The T, Ploeg M, Berg PA, Vlioger MA, Giessen M, Son W : Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes - A review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation*. 54 (2) : 193 - 198, 1992.
- 69 - Landry M, Ferguson D : Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease. *Journal of Clinical Diseases*. 31 (11) : 2851 - 2856, 1993.
- 70- Boeckh M, Woogerd P, Steven-Ayers T, Ray G, Bowden R : Factors influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia. *Journal of Clinical Microbiology*. 32 (3) : 832 - 834, 1994.
- 71- The H, VanDen Berg A, Harmsen M, VanDer Bij W, Van Son W : The Cytomegalovirus antigenemia assay: A plea for standardization. *Scand J Infect Dis Supp*. 99 : 25 - 29, 1995.
- 72- Buffone G, Schimbor C, Demmler GJ, Wilson D, Darlington G : Detection of cytomegalovirus in urine by nonisotopic DNA hybridization. *The Journal of Infectious Diseases*. 154 (1) : 163 - 166, 1986.
- 73- Randhawa P, Manez R, Frye B, Ehrlich G : Circulating immediate-early mRNA in patients with cytomegalovirus infections after solid organ transplantation. *The Journal of Infectious Diseases*. 170 : 1264 - 7, 1994.
- 74 - Miller M, Bovey S, Pado K, Bruckner D, Wagar E : Application of PCR to multiple specimen for diagnosis of cytomegalovirus infection: comparison with cell culture and shell vial assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 32 (1) : 5 - 10, 1994.
- 75 - Xu W, Sundovist V, Brytting M, Linde A : Diagnosis of cytomegalovirus infections using polymerase chain reaction, virus isolation and serology. *Scand J Infect Dis*. 25 : 311 - 316, 1993.
- 76 - Brainard J, Greenson J, Vesly C, Tesi R, Papp A : Detection of cytomegalovirus in liver transplant biopsies. *Transplantation*. 57 (12) : 1753 - 1757, 1994.
- 77 - Gozlez J, Salord J, Chouaid C, Duvivier C, Picard O : Human cytomegalovirus (HCMV) late-mRNA detection in peripheral blood of AIDS patients: diagnostic value for

- HCMV disease compared with those of viral culture and HCMV DNA detection. *Journal of Clinical Microbiology*. 31 (7) : 1943 - 45, 1993.
- 78- Shen C, Chang S, Yen M, NG H, Huang E, Wu C : Cytomegalovirus excretion in pregnant and nonpregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*. 31 (6) : 1635 - 1636, 1993.
- 79 - Landini M, Mach M : Searching for antibodies specific for human cytomegalovirus: Is it diagnostically useful? When and how.? *Scand J Infect Dis. Supp 99* : 18 - 23, 1995.
- 80 - Grangeot-Keros L, Mayaux M, Lebon P, Freymuth F, Eugene G, Stricker R, Dussaix E: Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *The Journal of Infectious Diseases*. 175 : 944 - 6, 1997.
- 81 - Hoclinka R, Friedman H : Human cytomegalovirus. Balows A, Hausler W, Hermann K, Isenberg H, Shadomy H (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Edition. American Society for Microbiology, Washington, 1991, pp.829 - 835.
- 82 - Weber B, Braun W, Cinati J, Doerr WH : Humoral immun response to human cytomegalovirus infection : diagnostic potential of immunoglobulin class and IgG subclass antibody response to human cytomegalovirus early and late antigens. *Clin Investig*. 71 : 270 - 6, 1993.
- 83 - Ripalti A, Ruaz Q, Boccuni M, Campanini F, Bergamini G, Landini PM : Construction of polypeptide fusion antigens of human cytomegalovirus ppUL32: reactivity with human antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*. 32 (2) : 358 - 363, 1994.
- 84 - Vornhagen R, Plachter B, Hinderer W, Hauw The T, Zanten J, Matter L : Early serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens. *Journal of Clinical Microbiology*. 32 (4) : 981 - 986, 1994.
- 85 - Buller R, Bailey T, Ettinger N, Keener M, Langlois T, Miller P, Storch G : Use of a modified shell vial technique to quantitative cytomegalovirus viremia in a population of solid-organ trasplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*. 30 (10) : 2620 - 2624, 1992.

- 86- Merigan T, Resta S : Cytomegalovirus: Where have we Been and where are we going? Reviews of Infectious Diseases. 12 (Suppl 7) : 693 - 700, 1990.
- 87 - Britt W, Fay J, Seals J, Kensil C : Formulation of an immunogenic human cytomegalovirus vaccine: Responses in mice. The Journal of Infectious Diseases. 171 : 18 - 25, 1995.
- 88 - White D, Fenner F : Medical Virology. Fourth Edition. Academic Press, California, 1994, pp.334 - 347.
- 89- Ertürk M. Ph.D.Thesis. University of Sheffield,1991.
- 90 - Collier A, Handsfield HH, Ashley R, Roberts P, DeRouen T, Meyers J, Corey L : Cervical but not urinary excretion of cytomegalovirus is related to sexual activity and contraceptive practices in sexually active women. The Journal of Infectious Diseases. 171 : 33 - 8, 1995.
- 91 - Gleaves C, Smith T, Shuster E, Pearson G : Comparison of standart tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology. 21 (2) : 217 - 221, 1985.
- 92- Warren W, Balcarek K, Smith R, Pass R : Comparison of rapid methods of detection of cytomegalovirus in saliva with wirus isolation in tissue culture. Journal of Clinical Microbiology. 30 (4) : 786 - 789, 1992.
- 93- Arens M, Owen J, Hagerty C, Reed C, Storch G : Optimizing recovery of cytomegalovirus in the shell vial culture procedure. Diag Microbiol Infect Dis. 14 : 125 - 130, 1991.
- 94- Espy JM, Smith T : PCR Detection of CMV DNA sequences in clinical specimens. Persing D, Smith T, Tenover F, White T (Eds). Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications. Mayo Foundation, Rochester, 1993, pp.350 - 355.
- 95 - Paya C, Wold A, Smith T : Detection of cytomegalovirus in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell culture. Journal of Clinical Microbiology. 25 (5) : 755 - 757, 1987.

- 96- Wunderlı W, Kagi M, Grüter E, Auracher J : Detection of cytomegalovirus in peripheral leukocytes by different methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 27 (8) : 1916 - 1917, 1989.
- 97 - George K, Rinaldo RC : Effects of enhancing agents on detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 32 (8) : 2024 - 2027, 1994.
- 98 - Nelson C, Istaş A, Wilkerson M, Demmler G : PCR Detection of cytomegalovirus DNA in serum as a diagnostic test for congenital cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 33 (12) : 3317 - 3318, 1995.
- 99 - Smith LK, Kulski KJ, Cobain T, Dunstar AR : Detection of cytomegalovirus in blood donors by the polymerase chain reaction. *Transfusion*. 33 (6) : 497 - 502, 1993.
- 100- Balcarek K, Warren W, Smith R, Lyon M, Pass R : Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection by detection of virus in saliva. *The Journal of Infectious Diseases*. 167 : 1433 - 6, 1993.
- 101 - Demmler G, Buffome G, Schimbor C, May R : Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *The Journal of Infectious Diseases*. 158 (6) : 1177 - 1184, 1988.
- 102 - Atabey N, Açıkbaş İ, Sakızlı M : Sitomegalovirus DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu ile Gösterilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 30 : 79 - 85, 1996.
- 103 - Toye B, Woods W, Bobrowska M, Ramotar K : Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for chlamydia trachomatis testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (8) : 2356 - 2358, 1998.
- 104 - Reynolds D, Stagno S, Tiller M, Alford C : Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *The New England Journal of Medicine*. 289 (1) : 1 - 5, 1973.
- 105 - Canyılmaz D, Cihanyurdu M, Kılıç AO, Ertürk M : Servikal sekresyon örneğinden izole edilen ilk sitomegalovirus (CMV) izolatımız. XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongre Kitabı, Çatı Grafik reklamcılık Ltd Şti, İstanbul. S.170.