

284547

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİALİZ GRUBU BÖBREK TRANSPLANT
HASTALARINDA SİTOMEGALOVİRUS ANTİKORLARININ
COUNTERİMMUNOELECTROPHORESİS YÖNTEMİ İLE
ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

H. CAHİT BAYDAR

ANKARA - 1986

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİALİZ GRUBU BÖBREK TRANSPLANT
HASTALARINDA SİTOMEGALOVİRUS ANTİKORLARININ
COUNTERİMMUNOELECTROPHORESİS YÖNTEMİ İLE
ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

REHBER ÖĞR. ÜYESİ : Doç.Dr. ŞÜKRÜYE AYTER

H.CAHİT BAYDAR

ANKARA – 1986

İ Ç İ N D E K İ L E R

GİRİŞ VE AMAÇ	1 - 3
GENEL BİLGİLER	4 - 15
- Sitomegalovirus ve Biyolojisi	4 - 7
- Sitomegalovirus Proteinleri (antijen- leri) ve Antikor Belirleme Yöntemleri..	7 - 9
- Sitomegalovirus Enfeksiyonları	9 - 11
- Counterimmuno-electrophoresis ve Uygula- ma Alanları	11 - 15
MATERYAL VE METOD	16 - 21
BULGULAR	22 - 29
TARTIŞMA	30 - 36
ÖZET	37
KAYNAKLAR	38 - 45

GİRİŞ VE AMAÇ

Enfeksiyon hastalıklarının tıp dünyasında önemli bir yeri olduğu açıktır. Teknolojinin gelişmesi ile paralel olarak, tıp ve biyoloji bilimleri alanında hemen hergün yeni gelişmeler ortaya çıkmakta, önemli ilerlemeler kaydedilmektedir. Dolayısıyla, günümüzde enfeksiyona bağlı ölümler geçmiş yıllara oranla, daha az görülmekte ve bilinen enfeksiyon hastalıklarının birçoğu kolaylıkla tedavi edilebilmektedir.

Viruslar önemli birçok enfeksiyonun etiyolojik ajanlarıdır. Oluşturdukları enfeksiyonların tanısı ve tedavisi, enfeksiyon yapabilen diğer ajanlara göre daha güçtür. Diğer taraftan viral kaynaklı birçok enfeksiyonda Herpes grubu viruslar önemli etkenlerdir¹. Bu grubun tüm üyeleri, diğer insan patojenik viruslarında ender bir durum olan latent kalma özelliğine sahiptirler. Latent virus bazı bireylerde tekrar aktive olarak ikincil (sekonder) veya tekrarlayan enfeksiyonlara sebep olabilir.

Herpes grubunun bir üyesi olan Sitomegalovirus (CMV) birincil (primer) bir enfeksiyondan sonra insan ve memeli türlerinin birçoğunda, grubun diğer üyeleri gibi latent olarak kalır. Normal bireylerde CMV'e bağlı bir enfeksiyon ender görülmesine rağmen, gecikmiş bir primer enfeksiyon durumunda hastalık hali kendini, ateş, anormal karaciğer fonksiyon testleri ve lenfositoz ile bir glandular ateş sendromu olarak gösterir. Diğer taraftan, periferik nevrit, miyokardit, korioretinit ve vaskulit gibi ciddi komplikasyonlar da oluşabilir¹. Ayrıca, seronegatif bireylere kan transfüzyonu, açık kalp ameliyatı ve transplantasyon ile geçen virus bu bireylerde veya alıcılarda aktif bir enfeksiyon başlatabilir. Sitomegalovirus'un onkojenik potansiyeli olduğu da bilinen bir durumdur.

Bilindiği gibi, enfeksiyon hastalıklarının her türünde laboratuvar verileri, hastalığın epidemiyoloji, etiyolojisi, hikayesi ve patojenitesinin anlaşılmasında önemli rol oynar. Diğer taraftan özellikle bakteriyel veya viral olduğu düşünülen enfeksiyonlarda laboratuvar verilerinin çabuk ve kesin olarak alınması, hekim tarafından hastanın tedavi yönünün belirlenmesinde de önemli etken olacaktır.

Muhtemel bir viral enfeksiyonda virus izolasyonu ve/veya tanısı için genellikle hücre kültürüne ekim yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem önemli miktarda madde ve araç gereksiniminin yanı sıra, sonuç alınması için de virus tipine bağlı olarak en az 24 saat kadar zaman gerektirir. Diğer taraftan, virus antikor veya antijeninin belirlenmesi için kompleman fiksasyon, aglütinasyon ve immünflorasan gibi diğer birkaç yöntem bulunmasına rağmen, bunların da kendilerine ve birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları vardır. Ayrıca, çabuk ve özgül bir viral tanı birçok bakımdan önemlidir; örneğin daha önce de belirtildiği gibi, böyle bir tanının erken ve özgül olması, hastanın terapi yönünü belirlemede etken olduğu kadar, hekime de yardımcı olarak diğer testlerin maliyet yükünü ve hasta üzerindeki toksik etkilerini de ortadan kaldıracaktır².

Sitomegalovirus idrar, nazofaringial salgılar, tükürük, anne sütü ve servikal salgılardan hücre kültürüne ekim yöntemi ile izole edilebilir. Aynı zamanda, beyin omurilik sıvısı ve serum gibi örneklerde de antijen ve antikor belirlenmesinde sitolojik mikroskop teknikleri, nötralizasyon, kompleman fiksasyon, hemagglütinasyon testleri ve presipitasyon gibi tekniklerden faydalanılabilir³. Bu tekniklerin çoğu antijen-antikor birleşmesi esasına dayanırlar ve genellikle zaman gerektirirler.

Çalışmamızda, birçok alanda kullanılmış ve kullanılmakta olan

Counterimmunoelectrophoresis yöntemi ile, özellikle dializ grubu böbrek transplant hastaları olmak üzere çeşitli grup hastalarda CMV antikorunu ve/veya antijenini belirlemek ve bir tanı kriteri olarak bu yöntemi öncelikle laboratuvarımızda daha sonra da hastanemizde sürekli ve geniş kapsamlı olarak uygulanabilir kılmak amaç edinilmiştir.

GENEL BİLGİLER

Sitomegalovirus ve Biyolojisi

Sitomegalovirus morfolojisi yönünden Herpes grubunun diğer virüslerine çok benzemesine rağmen onu diğerlerinden ayıran önemli bir özelliği oldukça büyük (yaklaşık 150×10^6 dalton) olan genomudur⁴. Çift iplikli doğrusal bir DNA olan nükleik asidi yaklaşık 230 kb'lık nükleotid çiftlerinden oluşmuştur ve çok sayıda proteini kodlayabilir. Bunlara ek olarak, kısıtlayıcı (restriction) enzimler ve elektroforetik teknikler ile yapılan çalışmalar Guanin ve Sitozin içeriğinin %56 civarında olduğunu göstermiştir⁵. Bütün bu özellikleri ile CMV genomu bilinen büyük virus genomlarından biridir.

Bu genom büyüklüğünün bir neticesi olarak, insan sitomegalovirus (HCMV) nükleik asidinin yapısal organizasyonu oldukça karışıktır. Self-annealing metodu ile denature DNA iplikçiklerinde yapılan bir çalışma sonucu olarak, DNA molekülünün ters tekrarlayan dizilere sahip olduğu bildirilmektedir⁵. Devam eden çalışmalar ile bu bulgular desteklenmekle kalmamış, aynı zamanda DNA molekülünün eşit miktarlarda dört izomerik yapıdan oluştuğu da kaydedilmiştir^{6,7}.

HCMV transkripsiyonu üç evrede incelenebilir⁴;

- 1- Acil Erken RNA Transkripsiyonu : RNA'nın cycloheximide gibi protein sentezini engelleyici ajanların varlığında yapılan transkripsiyonudur. Viral genomun yaklaşık %20'si bu evreyle ilgilidir.
- 2- Erken RNA Transkripsiyonu : RNA'nın viral DNA sentezi

başlangıcından önceki transkripsiyonudur. Transkripsiyon, phosphonoacetic-asit gibi viral DNA sentezini engelleyici ajanlar varlığında oluşur.

3- Geç RNA Transkripsiyonu : Bu evre viral DNA sentezinin başlamasından sonraki RNA transkripsiyonunu içerir.

Bu üç evre sonucu oluşan transkriptlerin çoğu polizomlara ulaşırken, bazılarının ise mRNA'ya dönüşmeyerek, erken evre süresince çekirdekte kaldığı hakkında kayıtlar bulunmaktadır⁸. Aynı durum, geç RNA transkripsiyonu sonucu oluşan transkriptler için de geçerlidir. Dolayısıyla transkriptlerin oluşmaları, sitoplazmaya geçişleri ve polizomlara ulaşmaları gibi çeşitli seviyelerde kontrolun olduğu görülmektedir.

Sitomegalovirus'un sıklıkla bahsedilen diğer bir özelliği, insan ve hayvanlardaki onkojenik potansiyelidir. Sitomegalovirus ile enfekte edilen insan hücreleri kültürde geçici de olsa, uzun süre "contact inhibition" olmaksızın üreyebilirler.

Albrecht ve Rapp⁹ çalışmalarında, ultraviyole ile inaktive edilmiş bir CMV türünün hamster embryo fibroblastlarında transformasyon oluşturduğunu ve transforme olan bu hücrelerin tekrar hamsterlere enjekte edildiklerinde onkojenik olduklarını gözlemişlerdir. Buna ek olarak, Kaposi sarkomu, kolon, prostat ve servikal kanserler gibi malign hastalıklarda CMV'un etiyolojik durumunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır^{10,11,12}. Özellikle Kaposi sarkomunda ve prostat kanserli hastalarda CMV'a karşı antikor oluşmakta, dolayısıyla hücrel immün cevap uyarılmaktadır.

İnsan Sitomegalovirus türüyle diğer Herpesviruslar ve hayvan CMV'u arasında çok az veya hemen hemen hiç homoloji bulunmamaktadır⁵. Diğer taraftan, HCMV türleri (Towne, Ken, Davis ve AD 169) arasında %80 homoloji görülmesine karşın hiçbirinin benzeri değildir¹³.

Viruslar sentetik veya hücre olmayan ortamlarda üretilemeyeceğinden hücre-virus ilişkilerini inceleme, virus izolasyonu ve virus antijeni hazırlanması gibi çeşitli amaçlar için en uygun teknik hücre kültürüne ekim yöntemidir. Sitomegalovirus üretmesi için en uygun hücre tipleri fibroblastlardır. Embryonik deri, kas ve akciğer gibi çeşitli dokulardan elde edilebilen fibroblastlar çoğu diagnostik işlemler için yeterli özelliklere sahiptirler. Ayrıca, embryonik fibroblastların diploid türlerini de ticari olarak temin etmek mümkündür.

Sitomegalovirus ile enfekte edilmiş hücrelerde türe bağlı olarak, enfeksiyondan yaklaşık altı saat sonra hücre genişlemesi ve/veya yuvarlaklaşması gözlenebilir. Bunu takiben 24 saat sonra bir inklüzyon cisimciği gelişir ve hücre genişlemesi daha belirgin hale gelir³. Daha sonra enfeksiyonu izleyen 48-72 saat içinde, sitoplazmada zaman zaman yoğun inklüzyonlar ve yine inklüzyon içeren çekirdekçik ile beraber çok çekirdekli hücreler gözlenebilir. Davis ve AD 169 türlerinin oluşturdukları sitopatik etki (CPE) rahatlıkla gözlenebilir şekilde farklıdır³. Davis türü, hücre yuvarlaklaşmasına sebep olarak çekirdek şeklinin bozulmasıyla, bir tek belirgin paranükleer inklüzyon cisimciği oluşturur. Öte yandan AD 169 ile enfekte edilmiş hücreler fibroblastik şekillerini korurlar. Nükleer morfoloji ise, az belirgin olan paranükleer inklüzyonların oluşması dışında büyük ölçüde aynı kalır.

Sitomegalovirus insanda ve in vitro olarak hücre kültürlerinde genellikle yavaş ürer¹⁴. İnsan fibroblast hücrelerinde, enfeksiyon potansiyeline sahip virusların maksimum sayıya ulaşmaları 15-20 günlük bir zaman gerektirebilir.

Çoklu taşınım (transmisyon), doku pleotropizmi ayrıca birçok insan ve memeli türlerindeki enfeksiyon potansiyeli ile beraber

dünya çapındaki dağılımı CMV'un diğer önemli biyolojik özellikleri olarak belirtilebilir¹⁴.

Sitomegalovirus Proteinleri (Antijenleri) ve Antikor Belirleme Yöntemleri

Sitomegalovirus proteinleri, virusun replikasyonunda veya olgunlaşmasında gerekli olduğu kadar viral enfeksiyonun kontrolü ve tanısında da önemli rol oynarlar¹⁵.

Sitomegalovirus üremesi için uygun olan veya olmayan hücrelere girebilir. Virus üremesi için elverişli olmayan bir hücreye girdiğinde, hücre enfeksiyondan etkilenmez. Buna karşın virus bu tür bir hücre içinde enfeksiyon potansiyeline sahip bir ajan olarak kalır. Diğer taraftan, uygun hücrelerde, erken ve geç genler kolaylıkla eksprese edileceğinden, enfeksiyon hücrenin ölümü ile sonlanır¹⁵.

Viral genlerin ekspresyonu önceden bahsedildiği gibi acil erken, erken ve geç'dir. Dolayısıyla, CMV proteinleri de bu üç grup adı altında incelenebilir.

Acil erken proteinleri, enfeksiyondan yaklaşık 60 dakika sonra oluşan ve muhtemelen sonraki viral genlerin ekspresyonunu kontrol eden düzenleyici viral proteinlerdir¹⁶. Molekül ağırlıkları 68×10^3 - 75×10^3 dalton arasında değişen bu dönem proteinlerinin en az üç veya dört ayrı polipeptid oldukları düşünülürken, bunların aynı proteinin translasyon sonrası modifikasyonları olabilecekleri de belirtilmektedir¹⁵. Bu proteinler çeşitli tekniklerin yanı sıra, hücre ekstraterlerinden immünpresipitasyon veya radyoaktif işaretleme (pulse-labelling) yöntemleriyle de belirlenebilirler¹⁵.

Viral DNA sentezinden önce ve acil erken proteinlerinin sentezinden sonraki evrede oluşan polipeptidler erken proteinler şeklinde tanımlanabilir. Enfeksiyondan 8-48 saat sonraki bu evreye ait özgül mRNA'ların translasyon ürünleri olan erken proteinlerin daha sonraki polipeptidlerin sentezinde önemli oldukları düşünülmektedir¹⁷. En az 16 proteinin bu evredeki polipeptidleri oluşturduğu ve bunların immünpresipitasyon yöntemi ile belirlenebildikleri kaydedilmiştir¹⁵.

Geç proteinler, viral DNA sentezinden sonra oluşan ve özellikle yapısal polipeptidlerdir¹⁵. Yapılan çalışmalarda bu proteinlerin sayısının en az 35 olduğu ve bunlardan yaklaşık 10 kadarının uygun immünpresipitasyon yöntemleri ile kolaylıkla belirlenebilecekleri gösterilmiştir^{18,19}. Virus türüne bağlı olarak geç viral proteinler maksimum sentez düzeylerine yaklaşık 48 saat sonra ulaşırlar.

Virus partiküllerinin zarlarında sekiz ayrı glikoprotein bulunur²⁰. Molekül ağırlıkları 12×10^3 - 145×10^3 dalton arasında değişen bu glikoproteinler, jel filtrasyonu veya elektroforezi ile belirlenebilirler.

Enfeksiyondan birkaç gün sonra protein sentezi hemen hemen sabit bir hıza ulaşır. Sonuçta, sentezlenen proteinlerin %50-60 kadarı virusa geri kalan kısmı ise konakçıya aittir¹⁵.

Sitomegalovirus, idrar, tükürük, anne sütü, servikal salgılardan, otopsi veya biyopsi materyalleri gibi örneklerden uygun hücre kültürüne ekim yöntemi ile izole edilebilir³. Aynı zamanda virusa karşı oluşan antikörleri belirlemek amacıyla çeşitli serolojik tanı yöntemleri kullanılabilir. Bu yöntemler içinde kompleman fiksasyon, nötralizasyon, indirekt hemaglutinasyon ve immünflorasan gibi metodlar oldukça yaygın olarak

kullanılmaktadır³. Ayrıca, immünpresipitasyon ve immünelektroforez gibi diğer immünolojik yöntemler de bulunmaktadır^{21,22}.

Sitomegalovirus Enfeksiyonları

Herpesvirus ailesi içinde bir grup oluşturan Sitomegaloviruslar insan ve çeşitli diğer memelilerdeki yaygın dağılımları ile bilinirler. Bu virusların in vitro/in vivo enfeksiyonları türe özgüdür ve inklüzyonlar içeren, fazlaca genişlemiş hücrelerin (sitomegalik) oluşması ile sonuçlanır³.

Hasta çocukların tükürük bezlerinden sık sık sitomegalik hücrelerin belirlenmesinden dolayı, CMV için önceleri, "Tükürük bezi virusu" terimi kullanılmıştır²³. Ayrıca bebeklerdeki HCMV enfeksiyonu da zaman zaman "Sitomegalik Inklüzyon Hastalığı" olarak isimlendirilmektedir.

İnsan popülasyonunun önemli bir kısmında CMV enfeksiyonu olağan olmasına karşın hastalık görülme sıklığı düşüktür. Toplumda antikor yaygınlığı %40-100 arasındadır ve genellikle en yüksek düzeye az gelişmiş bölgelerde ulaşır²⁴.

Sitotoksik ilaç uygulaması, organ transplantasyonu, hemodializ, neoplasm ve hamilelik gibi durumlarda reaktivasyonun oluşabileceği belirtilmektedir²⁵. Sitomegalovirus'a karşı seropozitiflik, genel anlamda bağışıklığı belirlemez, çünkü seropozitif bireyler sadece virusu bulaştırmakla kalmayıp kendileri de bir reaktivasyon sonucu klinik açıdan hasta olabilirler.

İntrauterin yaşam CMV enfeksiyonunun olduğu en erken yaşttır. Ayrıca anne sütü, kan, servikal salgılar ve semen gibi vücut sıvıları da virusu bulaştırabilir. Sitomegalovirus mental retardasyon, körlük ve sağırılık gibi konjenital anomalile-

rin en önemli viral etkenidir²⁶.

Perfüzyon sonrası sendromunun açıklanması ile başlayarak, çeşitli durumlarda CMV'un kan ve kan ürünleri yolu ile taşınımı gösterilmiştir^{27,28}. Premature yeni doğanlar arasında transfüzyon ile edinilmiş CMV enfeksiyonu, seropozitif vericilerden kan alan ve CMV'a karşı antikoru bulunmayan (seronegatif) çocukların enfeksiyonu ile hemen hemen aynıdır. Dolayısıyla, seronegatif alıcılar için seronegatif bireylerin kanının kullanılması transfüzyon ile edinilen enfeksiyonu engellemede etkili olacağı belirtilmiştir²⁹.

Konjenital olarak etkilenen çocukların veya bebeklerin %25'inden daha azında semptomlar oluşur²³. Bu semptomlar, sarılık, karaciğer-dalak büyümesi, mikrosefali, korioretinit, serebral kalsifikasyon ve peteşi olarak belirtilmiştir.

Seronegatif renal transplant hastalarda CMV enfeksiyon olasılığının seropozitif alıcılardan sağlanan böbrek aracılığı ile artacağı, hatta büyük oranda buna bağlı olduğu belirtilmiştir³⁰. Benzer şekilde diğer transplant ve kanser hastaları gibi immün baskı (immünsupresyon) altındaki hastalarda CMV ciddi sorunlar çıkarabilir. Örneğin, antitimosit globulin ve ek olarak siklosporin içeren sitotoksik ilaçlar alan transplant hastalarda ölümcül CMV enfeksiyonları oluşabilir.

Primer bir CMV enfeksiyonu, sekonder olandan daha semptomatiktir²³. Ateş haricinde bu semptomlar; lökopeni, atipik lenfositler, lenfositoz, karaciğer-dalak büyümesi, miyalji ve pnömoni olarak belirtilebilir. Bunlara ilaveten, yine bu grup hastaların gastrointestinal sistemlerinde sık sık ülserasyonlar ve hepatit görülebilmektedir.

Yetişkinlerde CMV'un oluşturduğu mononükleoz, Epstein-barr virusunun oluşturduğundan pek ayırt edilemez³¹. Bu hastalık kendini, ateş, lenfositoz, lenfoadenopati, splenomegali ve karaciğer fonksiyonlarının bozulması şeklinde gösterir. Sitomegalovirusun oluşturduğu muhtemel diğer komplikasyonlar interstitial pnömonit, hepatit, Guillan-Barre sendromu, meningoensefalit, trombositopeni ve hemolitik anemi şeklinde meydana gelebilir²³.

Counterimmuno-electrophoresis ve Uygulama Alanları

Birçok elektroforetik sistemler, yöntemler ve cihazlar yüklü bir molekül veya parçacığın elektriksel bir alanda hareketini esas alır³². Nükleik asitler, nükleotidler, peptidler, aminoasitler ve proteinler gibi önemli biyolojik moleküller iyonize gruplar içerdiklerinden, bir sıvı içinde anyon veya katyon şeklinde davranırlar.

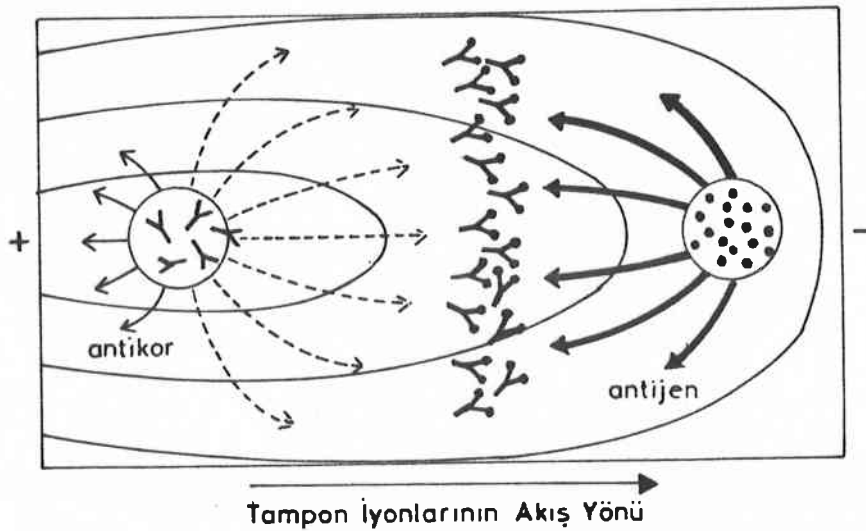
Counterimmuno-electrophoresis (CIEP), Ouchterlony³³ tarafından açıklanan jel immündefüzyon metodunun elektrik akımı ile modifiye edilmiş şekli olan bir elektroforez yöntemidir. Ouchterlony, özgül antijen ve antikörlerin jel içinde karşılaştıkları yerde veya alanda bir çökelti (presipitasyon) oluşturacakları gerçeğinden hareket ederek kendi adı ile bilinen yöntemi geliştirmiştir.

Agar ve agaroz gibi jellerde, özellikle sülfat ve pirüvat gibi anyonik moleküller jel matriksine kovalan olarak bağlıdır ve dolayısıyla, elektriksel bir alanda hareket edemezler. Diğer taraftan, sistemde elektriksel denge sağlanması gerektiğinden, tampon içindeki katyonlar bağlı buldukları su molekülleri ile beraber jel içindeki anyonik moleküllere yönlendirilerek lokalize iyon artışına sebep olurlar^{34,35}. Sonuçta, tampon için-

deki suyun elektroforez boyunca, jel içinden katoda doğru hareketi meydana gelir. Suyun bu hareketine "Electroendosmotic Flow" (EF) adı verilir³⁵. Bu olay CIEP'in prensibini oluşturur.

Birçok antijenin negatif yüklü olmasına karşın, antikorlar genellikle yüksek molekül ağırlıklı ve amfoterik özelliklere sahip proteinler olduğundan kullanılan tamponun pH değerine bağlı olarak anyon veya katyon şeklinde davranırlar^{35,36}. İmmüoglobulinler, özellikle IgG, pH değeri 8.2-8.6 arasındaki tamponlarda yüksüzdürler. Dolayısıyla, jel içinde açılmış kuyucuklara karşılıklı olarak konulduklarında, antijen net elektroforetik hareketliliğinden, antikor ise EF'un etkisiyle birbirlerine doğru hareket edeceklerdir. Antijen ve antikor birbirleri için özgül iseler, karşılaştıkları bölgede görünebilir, opak presipitasyon bantları oluşturacaklardır^{34,35,36,37}. Bu olay şekil 1'de şematik olarak gösterilmiştir.

Counterimmuno-electrophoresis'de, elektriksel akım ve EF, antijen ve antikorun difüzyon ile her yöne dağılmasını engellediğinden presipitasyon bantları jel immüdifüzyon yöntemine oranla çok daha kısa sürede (30-90 dakika) oluşur³⁴.



Şekil 1. CIEP'in şematik olarak gösterimi.

Jel çeşidi, tampon konsantrasyonu, sıcaklık, pH, akım gibi fiziksel ve kimyasal faktörler iyonların veya moleküllerin CIEP esnasındaki hareketini etkilerler^{34,36}. Dolayısıyla bu faktörlerin kontrolü veya optimizasyonu CIEP'nin kritik noktasıdır.

Jel kaynağı olarak yüksek EF özelliklerine sahip, agar ve agaroz gibi maddeler kullanılabileceği gibi, konsantrasyonları %0.8-1 arasında değişen daha düşük EF'a sahip agaroz kullanılmasının sonuç üzerinde olumlu etkisi olduğu belirtilmektedir³⁵. Bunlara ilaveten, selluloz asetat ve noble agar gibi maddeler ile CIEP uygulanması ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır^{38,39}.

Amaca göre değişmesine rağmen, CIEP'de genellikle barbital tamponlar (pH:8.2-8.6) kullanılmaktadır. Ayrıca, elektroforez boyunca oluşan ısıyı azalttığı ve hareketliliği artırdığından düşük iyonik kuvvetli (ionic strenght) tamponlar tercih edilmektedir. Jel ve elektroforez tanklarındaki tampon iyonik kuvvetinin aynı veya farklı olmasına göre sistem "kesintisiz" yada "kesintili" adını alır⁴⁰. Tampon, her iki elektroforez tankı arasında akım geçişini ve elektroforez işlemi boyunca pH'nın sabit tutulmasını sağlar.

Counterimmuno-electrophoresis uygulamaları genellikle sabit akım ile yapılır³⁵. Jel elektroforezi için kullanılan herhangi bir elektroforez cihazı modifiye edilerek kullanılabileceği gibi özellikle CIEP için geliştirilmiş olan basit ve ucuz cihazlar da ticari olarak temin edilebilir.

Günümüzde CIEP olarak bilinen yöntem, orijinal olarak ilk defa I'electrosyneresis adı altında Bussard⁴¹ tarafından uygulanmıştır. Uzun süre kullanılmama fırsatı bulamayan yöntem daha sonra 1970 yılında, ilk olarak klinikte Gocke ve Howe⁴² tarafından hepatit B antijenini belirlemek için kullanılmıştır. Bu

çalışmadan sonra, yöntem özellikle bakteriyoloji, viroloji ve parazitoloji olmak üzere çok çeşitli alanlarda uygulanma fırsatı bulmuştur. Bu bakımdan çok geniş bir literatüre sahip olan CIEP'in bazı uygulama alanlarına örnekler tablo 1'de gösterilmiştir.

Genel olarak CIEP şeklinde isimlendirilen yöntem, electroprecipitation, Immuno-electrophoresis, Counter-electrophoresis ve Countercurrent-electrophoresis olarak da anılır.

UYGULAMA ALANI	TAMPON/JEL/pH	KAYNAK
<u>Viroloji</u>		
Avustralya antijeni belirlenmesi	Veronal/Agaroz/8.2	42
CMV antikoru blr.	Barbital/Agaroz/7.9	43
Varicella-Zoster enfeksiyonu tanısında	Barbital/Agaroz/8.6	44
<u>Bakteriyoloji ve Parazitoloji</u>		
Pnömoni tanısında	Veronal/Agaroz/8.6	45
Boğmaca tanısında	Barbital-Asetat/Agaroz/8.6	46
Stafilokok antikoru belirlenmesinde	Barbital/Noble Agar/8.6	47
Coccidioidomycosis serolojik testinde	Barbiton/Agaroz/8.6	48
<u>Çeşitli</u>		
Akut miyokard enfarksiyonunda, serum myoglobin belirlenmesinde	Veronal/Agaroz-Dextran/8.6	49
Serum prostatikasitfosfataz ölçümünde	Fosfat/Agaroz/6.5	50

Tablo 1. Counterimmuno-electrophoresis uygulama alanlarına bazı örnekler.

MATERYAL VE METOD

Hasta Serumları

Dializ dönemindeki böbrek hastalarında CMV enfeksiyonlarının yaygın ve dolayısıyla antikör titrelerinin yüksek olduğu belirtilmektedir^{51,52}. Bu nedenle, çalışmamızda dializ grubu böbrek hastalarının serumları kullanılmıştır.

Serum örnekleri H.Ü. Hastanesi dializ ünitesinden ve ayrıca, Türkiye Organ Nakli ve Yanık Tedavi Vakfı'ndan temin edilmiştir. Örneklerin beş ay süresince ve periyodik aralıklarla toplanılmasına çalışılmıştır. Kan alınan günlerde her hastadan, dializ aygıtına bağlantı öncesi (giriş) ve bağlantı sonrası (çıkış) olmak üzere iki örnek alınması için özen gösterilmiş ve alınan kan örnekleri 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumlarının ayrılması yapılmıştır. Serumlar kullanılıncaya kadar -50°C 'de saklanmıştır. Ayrıca, H.Ü. Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarından sağlanan serumlar ise kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Tampon ve Solusyonlar

Barbital Tampon pH:8.6 (jel tamponu)

$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ (Barbital)	3.20 gm
$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{NaO}_3$ (Sodyum barbital)	7.30 gm
NaCl	2.50 gm
Distile su	1.000 ml

Barbital-Asetat Tampon pH:8.0 (elektroforez tankları için)

$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sodyum asetat)	1.44 gm
$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{NaO}_3$ (Sodyum barbital)	5.72 gm
$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ (Barbital)	2.28 gm
NaCl	5.85 gm
Distile su	1.000 ml

Fosfat Tamponlu Tuz Solusyonu (PBS) pH:7.4

NaCl	8.00 gm
KCl	0.20 gm
KH_2PO_4	0.12 gm
Na_2HPO_4	0.91 gm
Distile su	1.000 ml

Veronal Tampon-Tuz Stok Solusyonu (VBS) pH:7.4

NaCl	41.50 gm
$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{NaO}_3$	5.10 gm
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.51 gm
CaCl_2	0.11 gm
1N HCl	17.3 ml
Distile su	1.000 ml

Fizyolojik Tuz Solusyonu (%0.9)

NaCl	9.0 gm
Distile su	1.000 ml

Hücre Kültürü ve Virus Ekimi

Laboratuvarımızda CMV antijeni hazırlamak amacıyla hücre kültürüne virus ekim yöntemi uygulanmıştır.

Primer embryonik akciğer fibroblast hücre kültürü, H.Ü Kadın Doğum Ünitesi'nden sağlanan düşük materyalinden (fötus) oluşturuldu.

Hücreler, önce 25 cm²'lik polystrene kültür kaplarında (Corning New York, USA), sonra da 75 cm²'lik kaplarda (Falcon, California USA) üretildiler. Hücreler için besi ortamı olarak, pH:7.4 olan %10 fötal dana serumlu (ilk pasajlarda %20) ve 100 ü/ml penisilin, 100 mcg/ml streptomisin içeren MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Flow Labs. England) kullanıldı. Üreme yoğunluklarına göre hücrelerin pasajları yapıldı ve besi ortamı asitleştikçe tazelenildi. Bu şartlar korunarak hücrelerin 7. pasaja kadar üremeleri sağlandı.

Fibroblastların 7. pasajından sonra, 75 cm²'lik kap içinde virus ekimi yapıldı. Steril şartlarda, pastör pipeti ile hücrelerin üzerindeki besi ortamı atıldıktan sonra laboratuvarımızdaki stok CMV solusyonundan 0.2 ml alınarak hücre kabının içine aktarıldı. Hücreler, 1/2 saat 37°C'de bekletildikten sonra kap içine %2 serumlu besi ortamı (MEM) eklendi ve tekrar 37°C'ye konuldu. Hücreler, 37°C'de CPE gözleninceye kadar ve gerektiğinde besi ortamları tazelenerek bekletildi.

Antijen Hazırlanması

Virus ekiminden sonra hücreler, CPE'i gözlemek için hergün muntazam olarak, inverted mikroskop altında incelendiler. Daha sonra, fibroblastlarda yaklaşık %80 CPE gözlendiğinde, antijen

hazırlamak için kullanıldı.

Hücreler, üzerlerindeki besi ortamı atıldıktan sonra, iki kez steril PBS solusyonu ile yıkandı. Daha sonra, rubber-police- man ile hücrelerin kültür kabı yüzeyinden kaldırılmaları sağlandı. Hücre kültür kabına (75 cm²) 10 ml steril VBS konuldu ve meydana gelen bu hücre süspansüyonu santrifüj tüpüne (steril) aktarılarak, 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra oluşan supernatan, pastör pipeti yardımıyla atıldı ve tüp içine 2 ml VBS konuldu. Bu şekilde meydana gelen hücre süspansüyonu üç kez -50°C ve 37°C'de dondurulup tekrar çözüldü. Üçüncü ve son çözüm işleminden sonra, tüp içindeki süspansüyon 800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu sefer, supernatan, antijen olarak kullanılmak üzere, pipet ile alınarak 5 ml'lik steril bir şişeye konuldu. Şişe kullanılıncaya kadar saklanmak üzere -50°C'ye bırakıldı. Hazırlanan bu antijenin ikili dilusyonları (1/2, 1/4, ..1/16) yapılarak, CMV antikoru pozitif olduğu bilinen bir serum yardımıyla, checkerboard sistemi kullanılarak titrasyonu yapıldı. Ayrıca, antijenin TCID (tissue culture infectious dose) titrasyonunu belirlemek amacıyla, antijenin 10⁻¹, 10⁻², ... 10⁻⁸ şeklinde yapılan her dilusyonu için üç adet olmak üzere 30 tüp içinde (üç tüp kontrol olarak) fibroblast hücre kültürü hazırlandı. Antijenin yukarıdaki dilusyonları ile tüplere ekim yapıldı. Daha sonra, bu tüpler CPE gözleninceye kadar ve gerektiğinde besi ortamları değiştirilerek 37°C'de bekletildiler.

Antijenin negatif kontrolü olarak kullanılması amacıyla, bir başka hücre kültür kabındaki akciğer fibroblast hücreleri de, antijen hazırlama yöntemi için uygulanan işlemlerden, virus ekimi yapılmadan, geçirildiler.

Çalışmamızda ayrıca, Oslo Halk Sağlığı Enstitüsü'nden Dr. Svein Nordbo tarafından bu araştırma için gönderilen CMV

kompleman fiksasyon antijeni de kullanılmıştır. Bu antijenin titrasyonu yine checkerboard sistemi uygulanarak yapıldı.

Counterimmuno-electrophoresis Yöntemi

Çalışmamızda, orijinal olarak hepatit B antijeni belirlenmesi için geliştirilmiş bir CIEP cihazı (Hyland, Travenol Labs. Inc. USA) kullanılmıştır. Cihazın, tampon tankları, orijinal jel kapları, süngerleri (sponge) ve kapiller tüp gibi yan aksesuarları bulunmaktadır.

Jel hazırlama amacıyla, Agar (Agar purum, Behringwerke A.G W. Germany) ve iki ayrı Agaroz (Sigma, USA., Gibco, USA) çeşidi kullanılmıştır.

Araştırılan kriterlerden birisi de tampon pH'sı olduğundan başlangıçta, üç ayrı pH'da (8.2, 8.4, 8.6) barbitol tampon hazırlandı. Tamponların pH'sını ayarlamak için %10 NaOH (w/v) veya 0.1N HCl (v/v) kullanılmıştır. Her ayrı pH derecesinde hazırlanan tamponlar ile üç ayrı madde (Agar + 2Agaroz) kullanılarak, çeşitli konsantrasyonlarda (%1 - %0.75) jeller hazırlanmıştır.

Çalışmamızın ilk dönemindeki araştırmalar özellikle, jel çeşidi, tampon cinsi, tampon sulandırma oranı, tampon pH'sı, jel konsantrasyonu ve elektroforez boyunca kullanılacak olan elektrik akımı gibi kriterler üzerinde olmuştur. Bir başka ifadeyle, bu kriterlerin optimizasyonu ve laboratuvarımız şartlarına uygulanması araştırılmıştır. Bunlara ek olarak, elektroforez süresi, jel üzerinde karşılıklı olarak açılan kuyucukların birbirlerine olan uzaklıkları ve jel derinliği de üzerinde ayrıca çalışılan kriterler olmuştur. Dolayısıyla, deneyler her seferinde bu kriterlerden birisinin değişen değerleri ile

yapılmıştır. Bu nedenle burada CIEP yöntemi genel olarak ele alınacaktır.

Jel hazırlamak üzere, çeşitli oranlarda (1:1 - 1:3) distile su ile sulandırılan tampon, agar veya agaroz (%1 - %0.75) ile kaynayınca kadar ısıtıldıktan sonra dökülecek duruma gelinceye kadar (45°C) bekletildi. Daha sonra, bu solusyon önceden temizlenmiş, kuru plâstik kaplara veya cam bir satıh (13X8 cm) üzerine düz bir yüzeyde, yayılmak suretiyle döküldü. Solusyon donduktan veya jel oluştuktan sonra bu kaplar nemli ortamda ve 4°C'de kullanılıncaya kadar saklandı. Bu şekilde hazırlanan jel plâkaları en az 24 saat bekletildikten sonra kullanıldı. Saklanma süresi 72 saati aşan jel plâkaları ile deney yapılmamıştır.

Deney aşamasına gelindiğinde, jel plâkası 4°C'den çıkarılarak laboratuvarımızda hazırlanan plastik bir kalıp ile üzerinde karşılıklı olarak ve istenilen uzaklıkta kuyucuklar açıldı. Daha sonra, her iki elektroforez tankına da eşit hacimde (35 ml) tampon solusyonu konuldu. Sonradan, mikropipet veya kapiller tüp yardımıyla, anod (+) tarafındaki kuyucuklara antikor kaynağı olarak kullanılan hasta serumu ve katod (-) tarafındaki kuyucuklara da antijen, taşırmadan (yaklaşık 10 mcl), konuldu. Jel plâkası CIEP cihazına yerleştirildikten sonra, istenilen akım şiddeti (mA) ve süre tespit edilerek elektroforez işlemine geçildi. Kuyucuklar arasında presipitasyon bantları gözleninceye kadar işleme devam edildi.

Optimal değerleri saptamak amacıyla, deneylerde 30, 40 ve 50mA şiddetinde elektrik akımı ve 90 dakikaya kadar olan elektroforez süreleri kullanılmıştır. Daha sonra, üzerinde çalışılan bütün kriterlerin optimal değerleri belirlenerek, hasta serumlarında CMV antikor taraması yapılmıştır.

BULGULAR

Araştırma amacına uygun olarak iki aşamada yapılan deneyler ile gerçekleştirildi. Counterimmuno-electrophoresis yöntemine ait kriterlerin optimizasyonu ve laboratuvarımıza adaptasyonu ile ilgili deneyler ilk aşamadaki çalışmaları oluşturmuştur. Daha sonra, ilk dönemdeki verilere göre çalışmanın ikinci kısmına geçilmiş ve dializ grubu böbrek hastalarından alınan serumlarda CMV antikor araştırması yapılmıştır. Ayrıca, H.Ü. Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ASO ve CRP gibi tetkikler için başvuran kişilerden alınan serumlar da kontrol grubu olarak değerlendirilmiş ve bu serumlarda da, aynı yöntemle, CMV antikoru araştırılmıştır.

Çalışmamızın ilk deneyleri CIEP'in önemli kriterlerinden olan tampon pH'sı, tampon sulandırımı, jel çeşidi, jel konsantrasyonu, jel derinliği, kuyucukların birbirlerine olan uzaklığı, elektroforez süresince kullanılacak olan akım değeri ve elektroforez süresi gibi değişkenlerin optimizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla yapılmıştır. Bu aşamadaki ilk çalışmalarda, antikor kaynağı olarak polyvalan anti-insan serumu (Behringwerke A.G. Marburg, W.Germany) dolayısıyla, antijen olarak insan serumu kullanılmıştır.

Çeşitli pH derecelerinde (8.2, 8.4, 8.6) hazırlanan barbital tamponlar ile agar ve agaroz kullanılarak jel plakaları (her pH derecesi için ayrı ayrı olarak) hazırlandı. Dolayısıyla, bu deneylerde tampon pH'sı, jel çeşidi, akım şiddeti ve elektroforez süresi gibi kriterlerin band oluşumu üzerindeki etkileri denendi. Bu aşamadaki deneylerde, elektroforez tanklarında jel hazırlamak için kullanılan tampon, aynı oranda sulandırılarak (1:1) kullanılmıştır.

Tablo 2'de jel ve tampon pH'sının değişik değerleri kullanılarak elde edilen sonuçlar görölmektedir. Bu dönemde optimal sonuçlar pH:8.6'daki barbital tampon ile hazırlanmış agaroz (%1 w/v) jelleri ile alınmıştır (Tablo 3, Şekil 2).

Barbital Tampon (1:1)		Band Oluşumu (dakika)	Bandın	
			Yeri	Yoğunluğu
Agaroz 1 (%1 w/v)	pH:8.2	35	Anodal	Az
	pH:8.4	30	"	Orta
	pH:8.6	25	"	Orta
Agaroz 2 (%1 w/v)	pH:8.2	20	Anodal	Orta
	pH:8.4	20	"	Çok
	pH:8.6	15	"	Çok
Agar (%1 w/v)	pH:8.2	-	-	-
	pH:8.4	70	Anodal	Orta
	pH:8.6	60	"	Orta

Tablo 2. Jel hazırlamada kullanılan ortam çeşitlerinin değişik pH derecelerinde band oluşumu üzerindeki etkisi. I:30 mA, t:90 dakika. (Agaroz 1:Gibco, USA, Agaroz 2:Sigma, USA)

		Band oluşumu (dakika)				Bandın	
		15	25	35	60	Yeri	Yoğunluğu
		pH:8.6 Barbital Tampon (1:1)	Agar (%1 w/v)	-	-	-	+
Agaroz1(")	-		-	+	+	"	Orta
Agaroz2(")	+		+	+	+	"	Çok

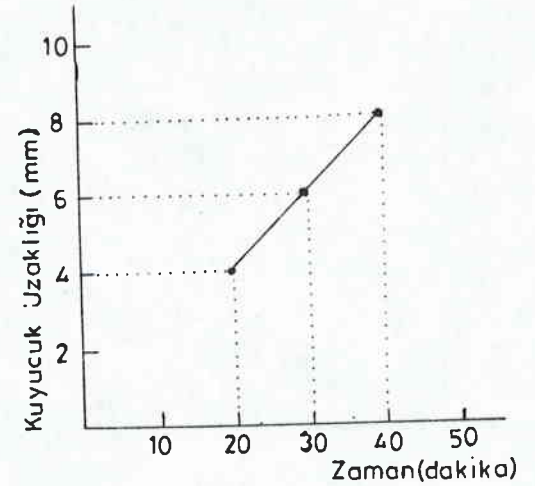
Tablo 3. Aynı pH ve konsantrasyondaki barbital tampon ile hazırlanan çeşitli jellerin band oluşumu üzerindeki etkisi. I:30 mA, t:60 dakika.



Şekil 2. Barbital tampon (pH:8.6) ve agaroz (%1 w/v) kullanarak elde edilen bandlar. I:30 mA, t:60 dakika. (Fotograf,elektroforez işleminden dört saat sonra çekilebilmiştir)

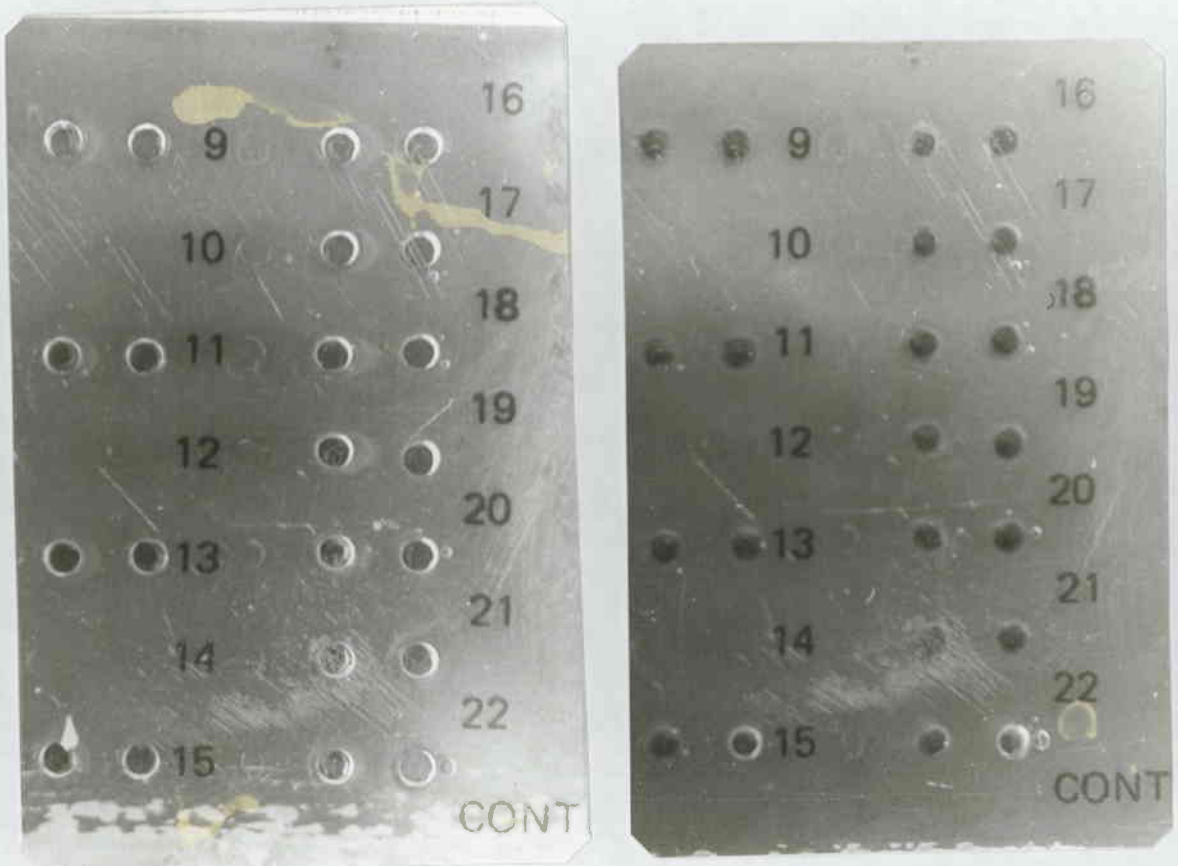
Bir diğ er önemli kriter olan kuyucuklar arasındaki uzaklığın optimal değerini belirlemek amacıyla aynı jel plâkası üzerinde, birbirine farklı uzaklıklarda kuyucuklar açılarak deneyler yapıldı. Bu deneylerde uygun uzaklığın 4 mm olduğu gözlemlendi (Tablo 4). Ayrıca, kuyucuklar arasındaki uzaklık sabit olduğunda, 60 dakikadan fazla olan elektroforez sürelerinde band yoğunluğunda herhangi bir değışikliğ in olmadığı gözlemlendi.

dak mm	10	20	30	40	50	60
2	-	-	-	-	-	-
4	-	+	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+
8	-	-	-	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-



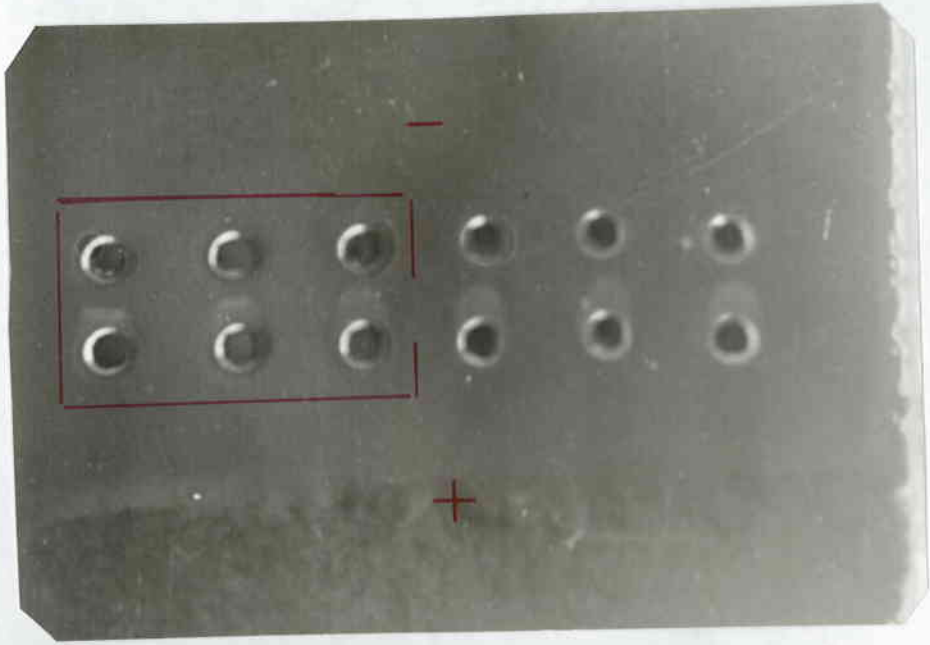
Tablo 4. Kuyucuklar arasındaki uzaklığın farklı değerlerine göre band oluşumu sürelerinin değışimi.

Özgül olmayan (non-specific) reaksiyonlar için, jeller elektroforez işleminden sonra 30 dakika fizyolojik tuz solusyonu (%0.9) içinde bekletilerek tekrar gözlemlendiler. Bu çeşit reaksiyonların belirlenmesinde tuz solusyonunun olumlu etkisi görüldü (Şekil 3).



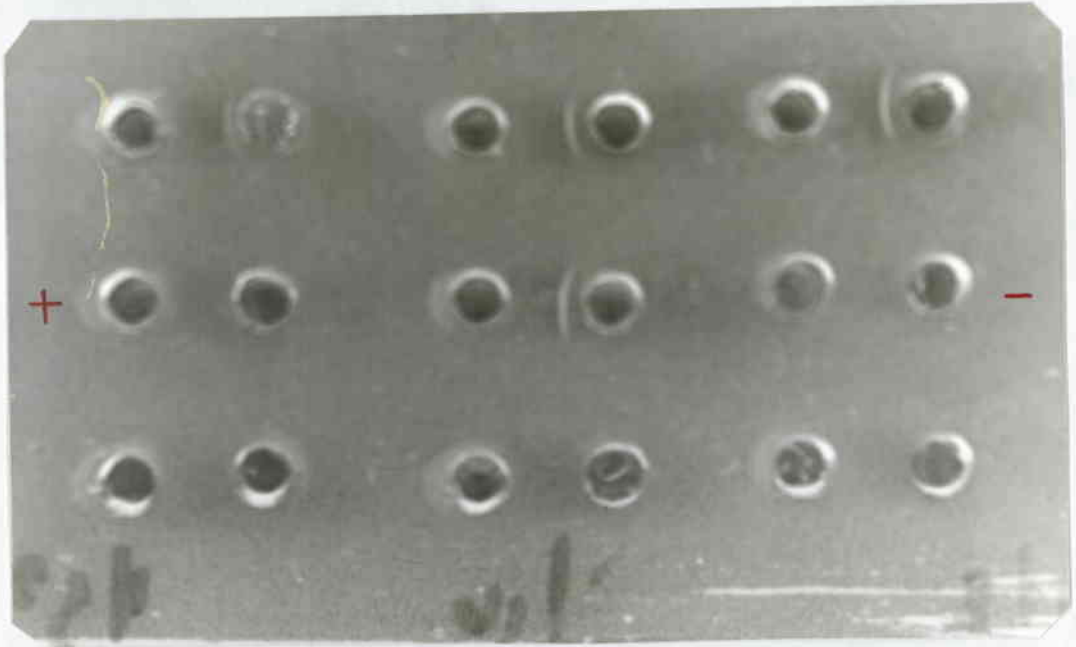
a) b)
 Şekil 3. Jel plâkalarında oluşabilecek olan özgül olmayan reaksiyonların belirlenmesinde fizyolojik tuz solusyonunun etkisi, a) elektroforez işleminden sonra, tuz solusyonunda bekletilmeden önce gözlenen jel plâkası, b) fizyolojik tuz solusyonunda 30 dakika bekletilen jel plâkasının görünümü.

Araştırmanın ikinci aşamasına pH:8.6 barbital tampon (1:1), agaroz (%1 w/v) ve 30 mA'lık akım şiddeti gibi CIEP değerleri alınarak geçildi ve CMV antijenleri kullanılarak deneylere devam edildi. Laboratuvarımızda hazırlanan CMV antijeninin ikili dilusyonlar ile yapılan titresi 1:4 olarak bulundu. Aynı şekilde, Dr. Svein Nordbo tarafından gönderilen CMV antijenin titresi ise 1:16 olarak bulundu. Ayrıca, antijenin hücre kültür tüpleri ile son dilusyon yöntemi kullanılarak yapılan titrasyonunda $10^{-4.2}$ TCID₅₀/0.1 değeri belirlendi. Bu dönemdeki ilk deneylerden sonra 1:2 oranındaki tampon sulandırımının ve ayrıca %0.75'lik agaroz konsantrasyonunun, CMV antijenleri ile optimal sonuçlar verdiği gözlenerek deneylere tampon ve agaroz'un bu konsantrasyonları ile devam edildi. Şekil 4'de bu durumda elde edilen bandlar görülmektedir.



Şekil 4. Sitomegalovirus antijeni (1:16) ile barbital tampon(1:2) pH:8.6 ve agaroz (%0.75 w/v) kullanılarak hazırlanmış jellerde elde edilen bandlar. I:30 mA, t:30 dakika.

Daha sonra yapılan deneylerde ise elektroforez tanklarında farklı pH'da tampon kullanılmasının duyarlılık açısından olumlu sonuçları gözlenmiş ve sonraki çalışmalar da elektroforez tanklarında pH:8.0 barbital-asetat tamponu (1:2) kullanılmıştır (Şekil 5). Daha sonra yapılan antikor taramalarında kullanılan CIEP değerleri Tablo 5'de görülmektedir. Bu değerler kullanılarak taranan 69 adet hasta serumunun 29'u pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 6).



Şekil 5. Kesintisiz (discontinuous) sistem ile CMV antijeni kullanılarak elde edilen bandlar. I:30 mA, t:30 dak.

Jel Tamponu	Barbital, pH:8.6, 1:2
Elektroforez Tamponu	Barbital-asetat, pH:8.0, 1:2
Jel Çeşidi	Agaroz, %0.75
Akım Şiddeti	30 mA
Süre	30 dakika

Tablo 5. Çalışmalar sonundaki gözlemlere dayanarak elde edilen ve CMV antikoru belirlenmesinde uygulanan CIEP değerleri.

	Antijen dilusyonu	Serum dilusyonu	Pozitif serum	Negatif serum
Dializ grubu hasta serumları	1:16	1:1	29	19
	1:4	1:1	8	13
Toplam			37	32
Yüzde			%53.6	%46
Kontrol serumları	1:16	1:1	12	13
Yüzde			%48	%52

Tablo 6. Dializ grubu renal transplant hasta serumları ve kontrol grubu serumlarda taranan CMV antikör sonuçları.

TARTIŞMA

Viral enfeksiyonların etiyojisi, patojenitesi ve hikayesinin anlaşılması büyük oranda, viral izolasyon ve serolojik teknikler ile sağlanan laboratuvar verilerine dayalıdır. Bu teknikler yoluyla alınan veriler, etiyojik ajanların belirlenmesinden hasta tedavisine kadar geniş bir alanda yarar sağlarlar.

Genellikle hücre kültürüne ekim metodu ile yapılan virus izolasyonu halen geçerliliğini sürdüren özgül bir tanı yöntemidir. Bu yöntem ile pozitif bir sonuç tek bir virion ile elde edilebilir. Bunun yanısıra, işlemin yalnızca virus üremesine yönelik olması nedeniyle yöntem oldukça özgüldür. Bununla beraber, virus izolasyonunun çeşitli dezavantajları da bulunmaktadır². Örneğin, izolasyon yöntemi genellikle yavaştır ve ekonomik değildir. Ayrıca, teknik deneyim ve alışkanlık gerektirmesinin yanısıra virus türüne uygun hücre ve kültür sistemlerine ihtiyaç gösterir. Bütün bunlara ek olarak bazı virus türlerinin (gastroenterit ve rotaviruslar gibi) izole edilememesi hücre kültürüne ekim yöntemi ile virus izolasyonu tekniğinin ayrı bir dezavantajıdır.

Bir viral enfeksiyonun laboratuvar tanısı virusa veya virus proteinlerine karşı oluşan immün cevabın belirlenmesiyle de yapılabilir. Bir başka ifadeyle, etiyojik viral ajana karşı hastalık öncesi ve sonrası (akut ve konvelasan) dönemlerde alınan serum örneklerinde antikor varlığı ve titresinin belirlenmesi söz konusudur. Birçok virus türü, primer bir enfeksiyondan sonra belirlenebilir seviyede özgül antikor üretimini

uyarabilir. Ayrıca, herhangi bir reaktivasyon durumunda yüksek antikor titreleri oluşturabilir. Dolayısıyla, hastalık süresince veya hastalık öncesi ve sonrası oluşan antikorların belirlenmesi diagnostik açıdan önemlidir⁵³.

Sitomegalovirus enfeksiyonları çok çeşitli klinik semptomlar gösterebileceği gibi belirtisiz de olabilir²³. Birçok konjenital enfeksiyonun en önemli sebebi CMV olduğu gibi aynı zamanda da kan transfüzyonu, böbrek ve kemik iliği nakilleri sonrası oluşabilen enfeksiyonların da önemli etkenidir^{52,54,55}. Transfüzyon veya transplant grubu verici ve alıcılarındaki CMV antikor düzeyi, riskli hasta gruplarının (transplant alıcıları gibi) tedavisinde önemli bir faktördür⁵⁶.

Sitomegalovirus antikorunun varlığı hastalık halini göstermese de, önceden edinilmiş bir enfeksiyonu belirleyen işarettir. Klinik teşhisin konulmasında CMV antikorlarının belirlenmesi ve sayısal dökümü için kullanılan serolojik yöntemler önemli yardımcılardır⁵⁷. Sitomegalovirus antikorlarının belirlenmesi için çeşitli serolojik yöntemler kullanılabilir. Kompleman fiksasyon metodu oldukça yaygın kullanılan serolojik tekniklerden biridir. Bununla beraber, metodun kendine özgü çeşitli dezavantajları vardır⁵⁸. Bunların arasında, bazı antikorların komplemana bağlanamaması ve bazı serumların antikomplemanter aktivite göstermesi önemli olanlarıdır. Ayrıca, zaman alıcı olması da yöntemin diğer bir olumsuz yönüdür. Öte yandan, sitomegalovirus antikorlarının belirlenmesinde indirekt immünflorasan ve indirekt peroksidaz antikor metodları da kullanılmasına rağmen bunlarında özgül olmayan (non-specific) sitoplazmik boyanma gibi sorunları vardır⁵⁸. Buna bağlı olarak sonuçların okunması sırasında güçlükler ortaya çıkmaktadır. Diğer taraftan, CMV antikoru belirlenmesinde kullanılan radioimmünassay indirekt hemagglütinasyon ve immün-enzimatik metodların maliyet-

leri genellikle yüksektir ve teknik deneyim gerektirirler. Bütün bunlardan anlaşılabilirliği gibi, özellikle yaygın olarak kullanılabilirliği açısından, herhangi bir serolojik teknikte aranan özellikler ekonomik, özgül, duyarlı, çabuk ve kolay uygulanabilir olmasıdır.

Yukarıdaki tekniklere oranla, counterimmuno-electrophoresis yöntemi de kolayca uygulanabilir, çabuk, özgül ve ekonomik bir elektroimmüdifüzyon tekniğidir⁵⁹. Yöntem özellikle antikor belirlenmesi amacıyla çok çeşitli alanlarda (Tablo 1) uygulanmıştır. Bu özelliklerinden dolayı, çalışmamızda CIEP yöntemi seçilmiş ve amacımıza uygun olarak modifiye edilmeye çalışılmıştır.

Literatürün CIEP'in çeşitli uygulamaları yönünden çok zengin olmasına karşın CMV antikoru belirlenmesine ilişkin az miktarda yayın bulunmaktadır. Bu çalışmaların hemen hemen tümünde, yöntemin değişkenleri (pH, jel, akım vb.) ve teknik detaylar üzerinde durulmamış, özellikle çeşitli grup hastalarda bu yöntem kullanılarak CMV antikor düzeyi araştırılmıştır^{21,43,60,61,62}.

Araştırmamızda, oluşan bandların şekli, yoğunluğu, yeri veya kısaca, yüksek duyarlılık üzerinde özellikle durulmuş ve CMV antikorlarının çabuk belirlenebilmesi amacıyla yöntemin laboratuvarımız şartlarına uyarlanmasına çalışılmıştır.

Bulgulardan da anlaşılacağı (Tablo 2, Tablo 3) gibi, CIEP sırasında band oluşumunu etkileyen önemli faktörler aşağıdaki şekilde belirtilebilir; a) jel ortamının çeşidi, konsantrasyonu ve jel derinliği,
b) jel hazırlanmasında ve elektroforez tanklarında kullanılan tampon pH'sı ve sulandırımı,

c) elektroforez süresi ve bu süre boyunca kullanılan akım şiddeti.

Bu faktörlerden herhangi birinin değişkenliği presipitasyon bandlarının oluşumunu etkileyebilmektedir. Dolayısıyla, ön çalışmalar ve araştırmanın ilk dönemindeki deneyler optimal çalışma koşullarını belirlemek amacıyla yapıldı. Bu dönemde optimal sonuçlar, barbital tampon (pH:8.6) ile hazırlanmış agaroz (%1) kullanılarak elde edildi (Şekil 2). Çalışmamızda, agaroz kullanarak aldığımız sonuçlar, agar'a oranla daha tatminkârdır. Ayrıca, pH:8.6'da barbital tampon ile hazırlanan jellerde, hasta serumu hareketinin daha hızlı olduğu gözlenmesine rağmen bandların anod (+) tarafında oluşmaları (Tablo 3) dikkati çeken bir nokta olmuştur. Daha sonradan, hasta serumlarının antijen konulmadan önce 10 dakika elektroforez edilmesiyle bandların iki kuyucuğun ortasındaki bölgede oluşması sağlanmıştır. Bu durum sonuçların doğru olarak okunabilmesi açısından önemlidir. Öte yandan, 2 mm'den daha ince jellerde band oluşumu, zorlukla gözlenebilen bir iki örnek dışında, olmamış ve dolayısıyla hazırlanan jellerin en az 2mm derinlikte olmasına dikkat edilmiştir. Benzer şekilde, literatürde ince ve %1'den yüksek konsantrasyonda hazırlanan jellerde band elde etmenin güçlüğü belirtilmektedir^{34,36}. Daha sonra, CMV antijenleri kullanılarak yapılan deneylerde, jel konsantrasyonu %1'den %0.75'e düşürülmüş dolayısıyla jelin pore genişliği artırılarak daha keskin bandlar elde edilebilmiştir (Şekil 4).

Diğer taraftan, önceleri 1:1 oranında sulandırılarak jel hazırlamada ve elektroforez tanklarında kullanılan tamponun (barbital, pH:8.6) konsantrasyonu azaltılarak 1:2 oranında kullanılmıştır. Çok konsantre tamponların, elektroforez sırasında, anti-kor ve antijen hareketliliğini negatif yönde etkilediği belirtilmiş ve az konsantre tamponlarda EF'un yüksek olması nedeni-

le sonuç üzerinde olumlu etki yapabileceği söylenmiştir^{34,35}. Çalışmamızın son aşamasında kesintili (discontinuous) sistem denenmiştir. Bu amaçla, elektroforez tanklarında barbital-asetat pH:8.0 tampon kullanılmıştır. Bu sistem ile yapılan deneylerde daha duyarlı sonuçlar elde edilebilmiştir (Şekil 5).

Counterimmunoelectrophoresis'de yüksek akım şiddeti iyonize moleküllerin hareketliliğini artırdığı halde ısınmayı ve dolayısıyla buharlaşmayı da artırdığından tercih edilmemektedir^{34,35,37}. Çalışmalarımızda, 40 ve 50 mA'lik akım şiddetlerinde ısıya bağlı olarak buharlaşma ve jel buruşmaları gözlenmiştir. Dolayısıyla, ilk deneylerden sonra 40 ve 50 mA'lik değerler kullanılmamış, çalışmalara 30 mA'lik akım şiddeti ile devam edilmiştir. Diğer taraftan, 45-60 dakikadan fazla elektroforez sürelerinin, kuyucuklar arasındaki uzaklık sabit olduğu takdirde, oluşan bandlar üzerinde herhangi bir etkisi görülmediğinden 30 dakikalık süre optimal kabul edilmiştir (Tablo 4).

Bu gözlemler esas alınarak, CIEP işleminde etkileyici faktörlerin laboratuvarımızdaki değerlendirilmesi yapılmış ve bu faktörlerin antikor taraması sırasında kullanılan sabit değerleri belirlenmiştir (Tablo 5). Laboratuvarımızda CIEP yönteminin rahatlıkla uygulanmasını sağlayan bu optimal değerler kullanılarak, 69 adet dializ grubu hasta serumunda CMV antikor taraması yapılmıştır. Bu serumlardan 37'si (%53.6) pozitif olarak değerlendirilmiştir. Buna karşın, aynı yöntem uygulanarak taranan toplam 25 adet kontrol serumunun 12'si (%48) CMV antikor açısından pozitif olarak bulunmuştur (Tablo 6). Özgül olmayan (non-specific) veya yanlış pozitif olabilecek şüpheli örnekler, fizyolojik tuz solusyonu (%0.9) içinde 30 dakika bekletilerek tekrar gözlenmiştir. Bu durumdaki örnekler üzerinde fizyolojik tuz solusyonunun etkisi oldukça önemlidir (Şekil 3). Bunun yanısıra bütün antikor taramalarında negatif kontroller kullanılmıştır.

Literatürde, renal transplant veya dializ hasta gruplarında CMV antikör titresinin hayli yaygın ve yüksek (%60-90) olduğu belirtilmektedir^{30,51,52,55,56,63,64}. Çalışmamızda, elde edilen %53.6 değerindeki pozitif oran, literatür ile karşılaştırıldığında, düşük görülebilir. Çalışmaya dahil edilen örneklerin az oluşu ve laboratuvarımızda hazırlanan antijenin yeteri kadar konsantre olmayışı bu düşük orana sebep olabilir. Ayrıca, aynı hasta serumları ile değişik yöntemler kullanılarak yapılacak daha ileri bir çalışma, sonuç üzerinde tam değerlendirme yapılmasına yardımcı olacaktır. Counterimmuno-electrophoresis yönteminde, antikora oranla daha fazla ve konsantre antijen kullanılması sonucunda olumlu etki yaptığı belirtilmektedir^{34,35,43,65}. Dolayısıyla, ileride farklı yöntemler ile hazırlanmış konsantre ve fazla miktarda antijen kullanılarak yapılacak çalışmalarda daha kesin değerlendirmeler yapılabilir. Bununla beraber, düşük konsantrasyonda antijen kullanılması, yüksek antikör titresine sahip bireylerin çabuk olarak belirlenmesinde bir avantaj sağlayabilir. Diğer taraftan, kontrol serumlarında belirlenen %48'lik pozitif oran normal kabul edilebileceği gibi, bu serumlarda bulunabilecek romatoid faktörün oran üzerinde yapabileceği etkiyi de göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Kontrol serumlarının, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Bakteri-yoloji Laboratuvarı'na ASO ve CRP gibi tetkikler için başvuran bireylerden alınması bu olasılığı düşündürmektedir. Nitekim, bazı insan serumlarında bulunabilecek romatoid faktörün çeşitli testlerde yanlış pozitif sonuçlar oluşturabileceği belirtilmektedir^{58,60,66}.

Literatürdeki CMV serolojisi ile ilgili daha yeni yöntemler CIEP ile karşılaştırıldığında, düşük duyarlılık (sensitivity) CIEP'in en önemli dezavantajı olarak görülmektedir⁶⁷⁻⁷¹. Buna karşın, diğer yöntemlere oranla kolay uygulanabilir, çabuk ve ekonomik oluşu en önemli avantajlarıdır. Ayrıca yöntem, antijen

ve antikor taramalarında, özellikle çok sayıda örneğin çalışılması gerektiğinde, yararlıdır. Bunlara ek olarak, jel plâkası, üzerinde önceden kuyucuklar açılmış olarak saklandığında yöntem ön çalışmasız olarak hemen ve kolayca uygulanabilmektedir. Viral enfeksiyon hastalıklarında antikorların ve viral antijenlerin belirlenmesi önemlidir. Ayrıca, hastalığın tedavisi açısından hayatsal önem taşır. Dolayısıyla, enfeksiyonun başlangıcından itibaren etiyolojik ajanın hemen belirlenerek tedavi yolunun oluşturulması için çabuk ve özgül tanı yöntemlerinin kullanılmasındaki gereklilik açıktır.

Çalışmamızdaki değerlendirmelere göre, önemli ölçüde enfeksiyon potansiyeline sahip CMV'un oluşturduğu hastalıklarda bir tanı kriteri olarak CIEP yönteminden yararlanılmasının olumlu sonuçları olacağı inancındayız.

ÖZET

Herpesvirus grubunun önemli bir üyesi olan sitomegalovirus, insan ve diğer memelilerin birçoğunda oluşturduğu yaygın enfeksiyonları ile bilinir. Özellikle renal transplant hastalarında nakil sonrası enfeksiyonların önemli etkenidir. Verici bireylerdeki sitomegalovirus antikor varlığı ve titresinin, nakil sonrası seronegatif bireylerde oluşan enfeksiyonlar ile orantılı olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, transplantasyon vakalarında nakil öncesi, seropozitif vericilerin çabuk ve özgül olarak belirlenebilmesi için gerekli yöntemlere olan ihtiyaç her gün artmaktadır.

Çalışmamızda da, oldukça yaygın uygulama alanı olan counter-immunoelectrophoresis yönteminin bir tanı kriteri olarak kullanılmasını sağlamak amacıyla dializ grubu renal transplant hasta serumlarında sitomegalovirus antikor araştırması yapılmıştır. Toplam 69 hasta serumunun 37'sinde (%53.6) sitomegalovirus antikor pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonunda yöntemin, çabuk, özgül, ekonomik ve kolay uygulanabilir olmasının yanı sıra tampon, pH, jel çeşidi ve akım şiddeti gibi değişkenlere önemli ölçüde bağımlı olduğu gözlenmiştir. Amaca uygun olarak, bu değişkenlerin optimal değerleri belirlendiğinde, yöntem kolaylıkla uygulanabilmektedir.

Bizim çalışmamızdaki değerlendirmelere göre, bir tanı kriteri olarak antikor belirlenmesinde ve teknik olarak diğer bilimsel çalışmalarda, counterimmunoelectrophoresis yönteminden yararlanılmasının uygun olacağı görüşüne varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Timbury, M.C., Edmond, E. Herpesviruses. 1979, J Clin Pathol, 32:859-881.
2. Richman, D.D., Cleveland, P.H., Redfield, D.C., Oxman, M.N., et al. Rapid viral diagnosis. 1984, J Infec Dis, Vol 149, 3:298-310.
3. Reynolds, D.W., Stagno, S., Alford, A.C. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. 1979, s:399-439, In: Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. American public health association, Inc.
4. Geelen, J.L.M.C., Walig, C., Wertheim, P., et al. Human cytomegalovirus DNA, I. Molecular weight and infectivity. 1978, J Virol, 26:813-816.
5. Kilpatrick, B.A., Huang, E.S. Human cytomegalovirus genome: partial denaturation map and organization of genome sequences. 1977, J Virol, 24:261-276.
6. Westrate, M.W., Geelen, J.L., Noordaaj, V. Human cytomegalovirus DNA, physical maps for the restriction endonucleases Bgl II, Hind III and Xba I. 1980, J Gen Virol, 49:1-21.
7. De Marchi, J.M. Human cytomegalovirus DNA: restriction enzyme cleavage maps and map locations for immediate-early, early and late RNAs. 1981, Virology, 114:23-38.
8. De Marchi, J. M. Post-transcriptional control of human cytomegalovirus gene expression. 1983, Virology, 124:390-402.
9. Albrect, T., Rapp, F. Malignant transformation of hamster embryo fibroblasts following exposure to UV-irradiated human cytomegalovirus. 1973, Virology, 55:53-61.

10. Laychock, A.M., Geder, L., Sanford, E.J., Rapp, F. Immune response of prostatic cancer patients to cytomegalovirus-infected and transformed human cells. 1978, *Cancer*, 42:1766.
11. Giraldo, G., Beth, E., Henle, W., et al. Antibody patterns to herpesviruses in Kaposi's sarcoma II. Serological association of American Kaposi's sarcoma with cytomegalovirus. 1978, *Int J Cancer*, 22:126.
12. Melnick, J.L., Lewis, R., Wimberly, I., et al. Association of cytomegalovirus infection with cervical cancer: isolation of cytomegalovirus from cell cultures derived from cervical biopsy. 1978, *Intervirology*, 10:115.
13. Huang, E.S., Kilpatrick, B.A., Huang, Y.T., Pagano, J.S. Detection of human cytomegalovirus and analysis of strain variation. 1976, *Yale J Biol Med*, 49:29-43.
14. Joseph, S.P. Perspective on cytomegalovirus. 1984, s:9-13, In: *Birth defects; original article series*, Vol 20, Number 1, March of Dimes Birth Defects Foundation.
15. Stinski, M.F. The proteins of human cytomegalovirus. 1984, s:49-62, In: *Birth defects; original article series*, Vol 20, Number 1, March of Dimes Birth Defects Foundation.
16. Sweet, G.H., Bryant, S.A., Tegtmeier, G.E., et al. Early and late antigens of human cytomegalovirus: electroimmunodiffusion assay of numbers, relationships and reactivities with donor sera. 1985, *J Med Virol*, 15:137-148.
17. Stinski, M.F. Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus induced polypeptides. 1978, *J Virol*, 26(3):686-701.
18. Stinski, M.F. Synthesis of proteins and glycoproteins in cells infected with human cytomegalovirus. 1977, *J Virol*, 23:754-767.

19. Pereira, L., Höffman, M., Cremer, N. Electrophoretic analysis of polypeptides immune precipitated from cytomegalovirus-infected cell extracts by human sera. 1982, *Infect Immun*, 36(3):933-942.
20. Pereira, L., Hoffman, M., Gallo, D., Cremer, N. Monoclonal antibodies to human cytomegalovirus: Three surface membrane proteins with unique immunological and electrophoretic properties specify cross-reactive determinants. 1982, *Infect Immun*, 36:924-932.
21. Fioretti, A., Pollini, C. Use of gel precipitin test in the diagnosis of cytomegalovirus infections. 1978, *Acta Virologica* 22:66-69.
22. Sweet, G.H., Tegtmeier, G.E., Bayer, W.L. Antigens of human cytomegalovirus. Electroimmundiffusion assay and comparison among strains. 1979, *J Gen Virol*, 43:707-712.
23. Krech, U., Jung, M., Jung, F. Cytomegalovirus infections of man. 1971, s:5-32, S. Karger A.G. London, New York, Sydney.
24. Toby, L.S. Cytomegalovirus and blood transfusion. 1985, *Plas Ther Transfus Technol*, 6:69-79.
25. Betts, R.F. Syndromes of cytomegalovirus infection. 1980, *Adv Intern Med*, 26:447-465.
26. Whitley, R.J., Alford, C.A. Chronic intrauterine and perinatal infections. s:541-604, 1979, In: *Antiviral agents and viral diseases of man*. Raven Press, New York.
27. Prince, A.M., Szmuness, W., Millian, S.J., David, D.S. A serologic study of cytomegalovirus infections associated with blood transfusions. 1971, *N Engl J Med*, 284:1125-1131.
28. Hersman, J., Meyers, J.P., Thomas, E.D., Buckner, C.D., et al. The effect of granulocyte transfusions on the incidence of

- cytomegalovirus infection after allogeneic marrow transplantation. 1982, *Ann Intern Med*, 96:149-152.
29. Yeager, A. S., Grummet, F.C., Hafleigh, E.B., Arvin, A.M., et al. Prevention of transfusion acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. 1981, *J Pediatr*, 98:281-287.
 30. Ho, M., Swansinkul, S., Dowling, J.N., Youngblood, L.A., et al. The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. 1975, *N Engl J Med*, 293:1109-1112.
 31. Klemola, F., Von Essen, R., Wager, O., Haltia, K., et al. Cytomegalovirus mononucleosis in previously healthy individuals. 1969, *Ann Intern Med*, 71:11-19.
 32. Williams, B.L., Wilson, K. (Eds). A biologist's guide to principles and techniques of practical biochemistry. 1981, s:127-135, Arnold Publishers, Ltd.
 33. Ouchterlony, O. Diffusion-in-gel in immunological analysis. 1958, *Prog Allergy*, 5:1-5.
 34. Edwards, E.A. Counterimmunoelectrophoresis and double immunodiffusion. 1979, s:19-37, In: *Rapid diagnosis in infectious diseases*. CRC Press, Inc.
 35. Wadström, T. Immunoelectrophoresis or counterimmunoelectrophoresis. 1983, *Scand J Immunol*, Vol 17, Suppl 10:97-102.
 36. Tilton, R.C. Counterimmunoelectrophoresis in biology and medicine. 1978, s:347-365, In: *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. CRC Press, Inc.
 37. Moody, G.J. Methodology and applications of counterimmunoelectrophoresis in microbiology. 1976, *Lab Pract*, 25:575-580.
 38. Cohn, J., Kahan, M. Countercurrentimmunoelectrophoresis on cellulose acetate. 1976, *J Immunol Meth*, 11:303.

39. Kelkar, S.S., Niphadkar, K. B. Agarose and counterimmuno-electrophoresis. 1974, Lancet, 1:1394.
40. Rytel, M.W. Counterimmuno-electrophoresis in diagnosis of infectious diseases. 1974, Hosp Pract, 10:75-82.
41. Bussard, A. Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans un gel: l'électrosynérèse. 1959, Biochim Biophys Acta, 34:258-260.
42. Gocke, D.J., Howe, C. Rapid detection of Australia antigen by counterimmuno-electrophoresis. 1970, J Immunol, Vol 104, 4:1031-1032.
43. Tegtmeier, G.E., Sweet, G.H., Bayer, W.L. Detection of antibodies to cytomegalovirus by an improved counterimmuno-electrophoretic procedure. 1982, J Med Virol, 10:17-24.
44. Frey, H.M., Steinberg, S.P., Gershon, A.A. Rapid diagnosis of varicella-zoster virus infections by counterimmuno-electrophoresis. 1981, J Infect Dis, Vol 143, 2:274-280.
45. El-Refaie, M., Dulake, C. Counter-current immuno-electrophoresis for the diagnosis of pneumococcal chest infection. 1975, J Clin Pathol, 28:801-806.
46. Boreland, P.C., Gillespie, S.H. Counterimmuno-electrophoresis in the diagnosis of whooping cough. 1984, J Clin Pathol, 37:950-951.
47. Sheagren, J.N., Menes, B.L., Han, D.P., et al. Technical aspects of the staphylococcus aureus teichoic acid antibody assay: gel diffusion and counterimmuno-electrophoretic assays, antigen preparation, antigen selection, concentration effects and cross reactions with other organisms. 1981, J Clin Microbiol, 13(2):293-300.

48. Graham, A.R., Ryan, K.J. Counterimmunoelectrophoresis employing coccidioidin in serologic testing for coccidioidomycosis. 1980, *Am J Clin Pathol*, 73:574-577.
49. Hiramori, K., Sumiyoshi, T., Motegi, S., et al. Rapid, sensitive detection of myoglobinemia by improved counterimmunoelectrophoresis in cases of acute myocardial infarction. 1978, *Am Heart Journ*, 96(2):187-190.
50. Gupta, M.K., Rajaraman, S., Gupta, S.K., et al. Immunochemical measurement of serum prostatic acid phosphatase (PAP) Clinical evaluation of radioimmunoassay and counterimmunoelectrophoresis. 1981, *Am J Clin Pathol*, 76:430-436.
51. Tolkoff-Rubin, N.E., Rubin, R.H., Keller, E.E., et al. Cytomegalovirus infection in dialysis patients and personnel. 1978, *Ann Intern Med*, 89(1):625-628.
52. Rytel, M.W., Balay, J. Cytomegalovirus infection and immunity in renal allograft recipients: assessment of the competence of humoral immunity. 1976, *Infect Immun*, Vol 13, 6:1633-1637.
53. Hawkes, R.A. General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections. 1979, s:3-32, In: *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. American Public Health Association, Inc.
54. Nankervis, G.A. Cytomegalovirus infections in the blood recipient. 1976, *Yale J Biol Med*, 49:13-15.
55. Pagano, J.S. Infection with cytomegalovirus in bone marrow transplantation. Report of a workshop. 1975, *J Infect Dis*, 132:114-120.
56. Luby, J., Ware, A.A., Hull, J., et al. Disease due to cytomegalovirus and its long-term consequences in renal transplant recipients. 1983, *Arch Intern Med*, 143:1126-1129.

57. Stagno, S., Pass, R.F., Reynolds, D.W., Alford, C.A. Diagnosis of cytomegalovirus infections. 1980, s:363-373. In: The human herpesviruses. An interdisciplinary perspective. Elsevier Science Publishing, Inc. New York.
58. Sarov, I. Current problems in human cytomegalovirus diagnosis. 1983, *Isr J Med Sci*, 19:910-912.
59. Horadniceanu, F., Michelson, S. Assessment of human cytomegalovirus antibody detection techniques. 1980, *Arch Virol*, 64:287-301.
60. Fortunato, J., Goldschmidt, B., Menonna, J., et al. Rapid detection of antibodies to cytomegalovirus by counterimmunoelectrophoresis. 1977, *J Infect Dis*, 135(3):432-437.
61. Niebojewski, R.A., Aguilar-Torres, F., Rytel, M.W. Application of counterimmunoelectrophoresis in rapid detection of cytomegalovirus antibodies. 1977, *Am J Clin Pathol*, 68:343-346.
62. Smith, T.F. Detection of antibodies to cytomegalovirus by counterimmunoelectrophoresis. 1978, *Am J Clin Pathol*, 69(4):472.
63. Jia-qi, Z., Tian, L., Rabin, B. Cytomegalovirus and epstein-barr virus infection in renal transplant recipients. 1985, *Chin Med Journ*, 98(4):202-205.
64. Walker, D.P., Longson, M., Mallick, N.P., et al. A prospective study of cytomegalovirus and herpes simplex virus disease in renal transplant recipients. 1982, *J Clin Pathol*, 35:1190-1193.
65. Tsotsos, A.S.A. Identification and typing of viruses and detection of antiviral antibodies by counterimmunoelectrophoresis. 1974, *Pathol Microbiol*, 41:297-310.

66. Salonen, E.M., Vaheri, A., Suni, J., et al. Rheumatoid factor in acute viral infections: interference with determination of IgG, IgA antibodies in an enzyme immunoassay. 1980, *J Infect Dis*, 142(2):250-255.
67. Brand, J.A., Kettering, J.D., Lewis, J.E. Immunity to human cytomegalovirus measured and compared by complement fixation, indirect fluorescent-antibody, indirect hemagglutination and enzyme-linked immunosorbent assays. 1984, *J Clin Microbiol*, 19(2):147-152.
68. Mc Hugh, T.M., Casavant, C.H., Wilber, J.C., et al. Comparison of six methods for the detection of antibody to cytomegalovirus. 1985, *J Clin Microbiol*, 22(6):1014-1019.
69. Adler, S.P., Mc Vay, M., Biro, V.G., et al. Detection of cytomegalovirus antibody with latex agglutination. 1985, *J Clin Microbiol*, 22(1):68-70.
70. Zerbini, M., Plazzi, M., Musiani, M. Rapid neutralization assay for human cytomegalovirus antibody. 1985, *J Clin Microbiol*, 21(6):969-971.
71. Booth, J.C., Hannington, G., Baker, T.M.F., et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, radioimmunoassay, complement fixation, anticomplement immunofluorescence and passive haemagglutination techniques for detection cytomegalovirus IgG antibody. 1982, *J Clin Pathol*, 35:1345-1348.

