

283930

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BÖBREK TRANSPLANTASYONU ÖNCE VE SONRASI
VE NORMAL KİŞİLERDE SİTOMEGALOVİRUS ANTİKOR DÜZEYLERİNİN
KOMPLEMAN BİRLEŞMESİ VE ELİSA YÖNTEMLERİ İLE
SAPTANMASI VE KIYASLANMASI**

Mikrobiyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

CİRUS JEDARİ SEİFİ

ANKARA — 1986

bb

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BÖBREK TRANSPLANTASYONU ÖNCE VE SONRASI
VE NORMAL KİŞİLERDE SİTOMEGALOVİRUS ANTİKOR DÜZEYLERİNİN
KOMPLEMAN BİRLEŞMESİ VE ELISA YÖNTEMLERİ İLE
SAPTANMASI VE KİYASLANMASI

MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

CİRUS JEDARİ SEİFİ

Rehber Öğretim Üyesi : Doç. Dr. ŞEMSETTİN USTAÇELEBİ

ANKARA -- 1986

İ Ç İ N D E K İ L E R

Sayfa No.

Giriş	1
Genel Bilgiler	3
Gereç ve Yöntem	21
Bulgular	33
Tartışma	47
Özet	55
Kaynaklar	56

I. G İ R İ Ő

Sitomegalovirus (CMV) genellikle asemptomatik enfeksiyonla konağa girip latent enfeksiyon oluşturan en önemli etkenlerden birisidir. Doğadaki en yaygın viruslardan birisi olan CMV, erişkin yaşdaki toplum üyelerinin büyük bir kısmının seropozitifliğini sağlar. Ancak bireylerde sitomegalovirusuna karşı humoral cevap varlığına rağmen, virusun reaktivasyonu ve hatta viremi yapması söz konusudur (1).

Latent virus enfeksiyonları bazı fizyolojik ve kimyasal etkenlerle aktivasyon kazanmaktadırlar. Hamilelik döneminde değişen fizyolojik şartlar CMV aktivasyonuna neden olabilirler. Ayrıca bazı antimetabolit ilağların kullanılması ve immunosüpresif tedavi CMV'yi aktive eden en önemli etkenler arasında yer alırlar. Özellikle reaktive olan CMV primer enfeksiyondaki gibi klinik bir semptomu neden olmadan antikor titresinde belirgin bir artışa neden olabilir (2).

Böbrek transplantasyonu günümüzde çeşitli ülkelerde yaygın olarak yapılan bir uygulamadır. Ülkemizde de son yıllarda böbrek transplantasyonu yapılan kişi adedi artmaktadır. Özellikle genetik yapı benzerliğinin önemle göze alındığı transplantasyonlarda dahi, atılım reaksiyonunu önlemek üzere operasyon sonrası immunosüpresif tedavinin kullanılması kaçınılmazdır. Bu işlem ise transplantasyona alınan hastalarda CMV aktivasyonuna neden olmakta ve bu aktivasyon atılım reaksiyonlarında rol oynayabilecek derecede komplikasyonlar yaratmaktadır (3,4).

CMV enfeksiyonlarında laboratuvar tanısının teşhisde tartışılmaz

derecede önemi büyüktür. Virus izolasyonu ve serum antikorlarının gösterilmesinin aktif enfeksiyon sırasında virusun idrardan atılması nedeniyle idrarda sitomegalik inklüzyon hücrelerinin gösterilmesi sıklıkla tanıya yardımcı olabilir (1,2).

Sunulan çalışmada böbrek transplantasyonundan önce ve sonra alınan serum örneklerinde CMV antikorlarının varlığı ve immunosupresyona bağlı olarak antikor cevabının artışının saptanması planlanmıştır. Bu gayeye yönelik olarak Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Organ Nakli ve Yanık Tedavi Vakfı hastanesinde böbrek transplantasyonu yapılmakta olan kişilerde operasyon öncesi ve operasyon sonrası sağlanan serum örneklerinde Kompleman Birleşmesi Deneyi (K.B.D.) ve Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA) yöntemleri ile antikor düzeyleri saptanmıştır.

Ayrıca bu hastalarda antikor saptanması yönünden K.B.D. ve ELISA yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri kıyaslanmıştır. Bunlara ilaveten yine aynı hastalardan operasyon öncesi ve sonrası alınan idrar örneklerinde sitomegalik inklüzyon hücreleri araştırılmış ve antikor düzeyleriyle uyumlulukları gözlenmiştir.

I I . G E N E L B İ L G İ L E R

CMV enfeksiyonları toplumlarda en sık görülen viral enfeksiyonlar arasında yer alır. Herpes virus ailesinin B-alt grubunda yer alan CMV ler genellikle asemptomatik enfeksiyonla konağa girerler. Latent enfeksiyon şeklinde konakta hayat boyu kalabilen CMV, reaktivasyon ile tekrar asemptomatik veya ağır patoloji ile seyreden klinik hastalığa neden olabilir.

CMV *in vitro* ve *in vivo* olarak türe özgüllük gösteren bir virustur, özellikle salgı bezlerine olan afinitesi nedeniyle bu virusa "tükrük bezi virusu" adı da verilir. CMV'nin hücre enfeksiyonu çekirdek içi inklüzyonlar ve büyümüş hücre görünümü ile karakterizedir ki virus ismini bu özelliğinden almaktadır (1).

Virusun genel özellikleri :

Morfolojik olarak insan CMV'si diğer Herpes viruslardan ayırdedilemez. CMV genomu 56-76 nm arasında değişen uzunlukta linear yapıda bir DNA dır (5,6). DNA'nın iki türü vardır; büyük olanın molekül ağırlığı 150×10^6 dalton, küçük olanın ise 100×10^6 daltondur (5). Viral kapsid ikozahedral yapıdadır ve 162 kapsomere sahiptir. Kapsidin çevresinde bir veya daha fazla sayıda lipid içeren oval membranlar vardır. Zarflı virionların boyutları 180-250 nm arasında değişmektedir (7,8).

Viral DNA'nın yoğunluğu 1.716 g/ml dir ve Guanin, Sitozin % 57 oranındadır (9). Genetik bilgiler yaklaşık 150×10^6 molekül ağırlığı olan DNA tarafından kodlanmaktadır (10).

Bir diğ er viral yapı yoğun cisimciktir ve olgun viriondekine benzer. Çift zar ile çevrilmiş, homojen, elektron dens, sferik yapı içerir. Bu cisimcik sitoplazmik vakuollerde bulunur ve membranı buradan alır, çapı 250-500 nm arasında değ işir.

PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) ile yapılan analizler, molekül ağırlıkları 11.000 ile 290.000 arasında değ işen 33 CMV polipeptidi olduğunu göstermiştir. Bu yapısal proteinlerin 23'ü saptanmıştır (11-14). Ayrıca bu polipeptidlerin en az 8 tanesi glikoproteindir ve zarf içinde yer almıştır (14-16).

CMV, % 20 lik eterde 2 saatte, 5 den düşük pH larda 56°C de 30 dakikada veya U.V. ışığında 5 dakikada (17) tamamen inaktive olur.

Solüsyona % 5-10 oranında serum ilavesi virusu 37°C de stabilize eder. +4°C de etmez (18). Enfektivite en iyi distile su veya sodyum bikarbonatsız ortam içinde virus süspansiyonu yapıldığında her derecede saklanabilir, +4°C de inaktivasyon suş değ işkenliğine bağlıdır.

CMV, dondurma ve çözmeye veya -20°C, -50°C lerde stabilize edilmeden saklanmaya dayanıksızdır. Hücre içermeyen virusun enfektivitesi en iyi sodyum bikarbonatsız solüsyonda, % 35 sorbitol varlığında -90°C de saklandığında korunabilir (19).

Virus ile enfekte hücre süspansiyonu % 10-20 serum içeren MEM vasatında ve % 10 DMSO (Dimethylsulfoxide) varlığında sıvı nitrojen içinde (-190°C) saklanabilir ve enfektivite kaybı çok azdır. CMV'nın permisif hücrelerde üremesi bütün DNA inhibitörleriyle, Rifampisin (20), fosfonoasetik asit (21) ve interferon (22) ile inhibe edilir.

CMV tarafından oluşturulan prenatal ve postnatal enfeksiyonlar ve bulaşma yolları :

İnsan CMV'ları kişinin immun durumuna oldukça bağlı bir enfeksiyona neden olur, ve immun sistem için büyük bir önem taşır. Diğer Herpes viruslar gibi akut enfeksiyondan sonra CMV latent döneme girer ve bu dönem hücrel immun mekanizmalar tarafından kontrol edilir (2).

CMV'nın doğal yollarla bulaşması tam olarak bilinmemektedir. Genellikle CMV enfeksiyonları virüsün saptanması ile gösterilir, özellikle çocuklarda asemptomatiktir (23).

İyatrojenik CMV enfeksiyonunda kan en önemli bulaşma yoludur. Ancak CMV enfeksiyonunun kan ile bulaştığına dair birçok kanıt olmasına rağmen virusun normal kan vericilerinde saptanması tesadüfi olmaktadır (24,25). Bunun aksine immun sistemi baskılanmış kişilerde, konjenital enfeksiyonlarda, ve aktif enfeksiyon sırasında viremi oldukça sıktır.

CMV'nın cinsel yolla bulaşması ile ilgili birçok kanıt vardır (26, 27). Rahibeler ve hayat kadınları arasında yapılan karşılaştırmalı çalışmada CMV antikorları hayat kadınlarında daha yüksek oranda bulunmuştur (28). Ancak hayat kadınları ile normal kadınlar arasında seropozitiflik yönünden önemli bir fark bulunamamıştır. Bu sonuçlar yetişkinlerdeki enfeksiyonda oral yolun cinsel yoldan daha önemli olduğunu düşündürmektedir.

Kalp ameliyatı geçiren ve fazla miktarda kan transfüzyonu alan hastalarda postperfüzyon sendromu ortaya çıkmaktadır. Yapılan bir çalışmada (29), transfüzyon yapılan hastaların % 35 inde CMV antikorları oluşmuş, CMV seronegatif olanların % 59'unda seropozitifliğe dönüş saptanmış ve seronegatiflerin % 25 inde postperfüzyon sendromu ortaya çıkmıştır.

Prince ve ark. (30)'nın yaptığı bir çalışmada transfüzyon yapılan hastaların % 20 sinde CMV'ye karşı antikor cevabı saptanmıştır. Serokonversiyon riski verilen kan miktarının hacmine bağlı olduğu ortaya konmuştur.

CMV'nin transplasental geçişi hamileliğin her trimestrinde diğer bir bulaş yoludur. Konjenital olarak enfekte olan çocukların çoğu klinik veya serolojik anomaliler göstermez ve asemptomatik olarak virüsü salgırlar (31,32).

Pediyatri hemşireleri ve diğer hastane personeli CMV enfeksiyonuna yakalanma riski altındadırlar. Bununla ilgili bir çalışmada pediyatri hemşirelerin bir yıl içerisinde % 4.1-7.7 oranlarında serokonversiyon gösterdiklerini bulmuşlardır (33).

Konjenital enfeksiyon :

Konjenital CMV enfeksiyonları, özellikle mental retardasyon ve sağırılık nedeni olduğu için ayrı bir öneme sahiptir. Elimizdeki çalışmalar A.B.D. ve İngiltere'deki yenidoğanların % 0.5-1 oranında uterus içinde enfekte olduklarını göstermektedir (34). Bu çocukların % 10-15'inde mikrosefaliden sonraki, hayatta oluşan spazmlar kadar değişik derecelerde mental retardasyon ortaya çıkmaktadır (35). Bazı çocuklarda oluşan zararlar ise okul döneminde saptanmaktadır (36), ayrıca enfekte çocukların 1/3-1/2 sinde duyma sinirlerinin kaybı görülmektedir (37).

Intrauterin geçiş ile ilgili olaylar dizisi açık değildir, plasentaya ve dolayısıyla fetüse yayılımın kan yolu ile olduğu kabul edilmektedir. Annenin genital yollarındaki lokal reaktivasyon veya re-enfeksiyonda geçiş için düşünülen muhtemel bir yoldur.

Doğum anında enfekte maternal genital salgılar ile temas sonucu

anneden çocuğa geçiş řu an için tamamen ortaya konmuştur (38). Enfeksiyon ayrıca virus içeren sütün alınması ile yenidoğanlarda veya küçük çocuklarda sekonder olarak kazanılabilir (38). Ancak anne sütünle (39) veya terapötik amaçlı kan transfüzyonları (40) ile geçiş daha azdır.

Deforest'in çalışmalarına göre çocuklukta görülen interstisiyel pnömoninin % 40'ından CMV sorumludur (41). Neonatal olarak CMV ile enfekte olmuş çocuklarda yapılan çalışmada hastalığın oluşma riski % 33, pnömoninin oluşma riski % 14 bulunmuştur (42).

A.B.D.'de 1 yılda doğan çocukların 30-35 bin kadarı (canlı doğumların % 1'i) konjenital enfeksiyona sahiptir (42,43). Bunların % 5 inde tipik yaygın sitomegalik inklüzyon hastalığı, % 5 inde atipik tutulum ve % 90'ında subklinik fakat kronik enfeksiyon saptanmaktadır. Çoklu organ tutulumu olabilmesine karşın sitomegalik inklüzyon hastalığında retikülo-endotelial ve merkezi sinir sistemi tutulma olasılığı büyüktür (44). Belirtilerin sıklığı ise şöyledir :

Peteşi (% 80), hepatosplenomegali (% 75), sarılık (% 65), mikrosefali (% 50) ve korioretinit (% 12) (45). Ayrıca intrauterin büyüme geriliği (% 40), prematürite (% 35) ve inguinal hernia (% 25) önemli prenatal bozukluklardır.

Laboratuvar sonuçları ise önem derecesine göre şöyle sıralanabilir :

Kord serumunda CMV'ye özgül IgM de artış (> 20 mg/dl), atipik lenfositoz (> % 5), yüksek SGOT (> 80 μ U/ml), trombositopeni (\leq 100.000 trombosit/ mm^3), konjuge hiperbilirubinemi (indirekt serum bilirubin > 2 mg/dl) (45).

Bu laboratuvar anomalileri vakaların % 50-90 ında saptanır. Mortalite

oranı % 30 dan fazladır. Letal hastalığı olanlarda, pnömoni ile birlikte solunum yetmezliği yanısıra, ciddi karaciğer hastalığı, kanama ekstrauterin büyüme geriliği ve sekonder bakteriyel enfeksiyonlar ortaya çıkar. Enfeksiyon in-utero hayatta başladığında bebeğin santral sinir sisteminde atipik bulgular saptanır.

Bazen de yenidoğanların erken dönemlerinde tanımlanamayacak kadar minimal belirtilerle seyreder. Fakat hayatın ileri dönemlerinde önemli merkezi sinir sistemi harabiyeti belirlenir (44).

Perinatal enfeksiyonlar :

Perinatal enfeksiyonlar, doğum sırasında maternal genital yollarda bulunan virus ile karşılaşma sonunda, enfekte süt emilmesi ile, çoklu kan transfüzyonları ile ve bakıcılardan bulaşma ile kazanılır (46). Enfeksiyonun perinatal olarak kazanıldığıının belirlenmesi için öncelikle konjenital enfeksiyonun olasılığı ortadan kaldırılmalıdır. Bu da doğumdan sonraki ilk birkaç haftada virus salgılanmasının olmadığıının gösterilmesi ile sağlanır. İnkübasyon periodunun uzun olmasından dolayı (4-12 hafta) hamileliğin çok geç dönemlerinde kazanılan enfeksiyonun perinatal, natal ve transfüzyonla kazanılan enfeksiyonlardan ayırılması çok zordur.

Süt ile bulaşma en çok doğumdan sonraki 2-4 aylar arasında olur. Bu dönemde sütte virus reaktivasyonu artmıştır (46). Sonuçta natal enfeksiyonları ve süt ile kazanılan enfeksiyonları kapsayan perinatal enfeksiyonlar genellikle subkliniktir.

Bu enfeksiyonların çoğu maternal virusun reaktivasyonu sonucunda oluşur ve bebeklerde değişik düzeylerde maternal antikolar vardır (42,47). Bu enfeksiyonlar nadiren pnömoniye de yol açarlar.

Transfüzyonla kazanılan CMV enfeksiyonu, nakledilen kan miktarı ve donörün serolojik durumu ile ilişkilidir (48). Ancak bebeklerin az miktar kan transfüzyonu ile enfeksiyonu almaları daha kolaydır. Seronegatif bebekler CMV enfeksiyonunu kan transfüzyonu ile daha çabuk kazanırlar ve seropozitif bebeklerden daha sıklıkla hastalık oluşur.

Transfüzyonla kazanılan enfeksiyonun spektrumu oldukça değişiktir ve özellikleri sitomegalik inklüzyon hastalığına benzer; ateş, sarılık, hepatosplenomegali, anemi, trombositopeni, atipik lenfositlerde artış ile lenfositoz görülebilir. Diğer bir belirti de şok benzeri septik görünümün ortaya çıkmasıdır (49).

Solunum bozukluğu ile beraber pnömoni de sıklıkla görülür. Dolayısıyla CMV enfeksiyonunun klinik tanısı ancak hastalığın geç safhalarında mümkün olabilmektedir. Bakteriel sepsis, pnömoni, altta yatan hastalık ve diğer hastalıklar klinik tanıyı zorlaştırdığından laboratuvar testlerine gerek duyulmaktadır.

CMV, 1-6 aylık ve genellikle 3 aydan küçük bebeklerde pnömoniden sorumlu tutulmaktadır (50,51). Pnömonili 104 bebek üzerinde yapılan çalışmada % 20 sinden CMV izole edilmiştir. Bunların 12 sinde tek patojen olarak ve 8 inde diğer organizmalarla birlikte olduğu saptanmıştır. 97 kontrolün yalnız % 3'ü enfekte bulunmuştur. Bu enfeksiyonların çoğunun doğum sırasında kazanıldığı düşünülmüş fakat konjenital veya postnatal enfeksiyonla tam olarak elimine edilememiştir. CMV'ye bağlı pnömoni bütün yıl boyunca olabilir, fakat, kışın görülen diğer solunum viruslarının aksine, ilkbaharda daha sık görülür.

CMV'ye bağlı pnömoninin seyri 1 hafta, 3 ay (ortalama 25 gün) arasında değişmektedir. Solunum güçlüğü, röntgende alt solunum yollarında

yaygın obstrüksiyon, bronşiyal duvarda kalınlaşma, düzensiz pulmoner belirtiler ve atelektazi saptanır.

Klinik bulgular arasında takipnea, apnea, öksürük, interkostal retraksiyonlar, koriza ve nazal konjesyon yer alır. Hastaların çoğu ateşsizdir. Bazı hastalar için oksijen ve ventilasyon tedavisi gerekebilir.

Laboratuvar bulguları arasında hiperkapnia, yüksek immunoglobulin düzeyleri (özellikle IgM), lökositoz ve eozinofili sayılabilir. Bazı hastalarda da iyileşmeyi takiben 1 yıl sonra alt solunum hastalığı tekrarlanabilir.

CMV pnömonisinin diğer ateşsiz obstrüktif pnömonilerden ayırılması mümkün değildir (50). Benzer hastalığa neden olan etkenler ise C. trachomatis, P. carinii, RSV, P. influenza, Influenza, Adeno ve enteroviruslardır.

CMV ile birlikte diğer ajanların da neden olduğu kombine bir enfeksiyon olabileceği akılda tutulmalı ve özgül etioloji laboratuvar tanısı ile belirlenmelidir.

Postnatal enfeksiyonlar :

Klemola ve arkadaşları, 15-66 yaşları arasında geçirilen primer CMV enfeksiyonunun spontan enfeksiyöz mononukleozis sendromu ile sonuçlanabileceğini bildirmişlerdir. Ancak tipik vakalar bebek ve küçük çocuklarda bildirilmektedir. CMV'nun reaktivasyonu veya reenfeksiyonu, primer enfeksiyondan daha az, nadiren mononukleozis ile sonuçlanır (52). Klasik olarak hastalık yorgunluk, miyalji, düzensiz ateş, karaciğer fonksiyonlarında bozukluk ve lenfadenopati olmaksızın atipik lenfositlerde artış ile karakterizedir.

CMV'ye bağlı mononükleozis (post-perfüzyon mononükleozis) son zamanlarda kan transfüzyonu alan kişilerde görülebilir. Hastalık primer enfeksiyon sonucu olabildiği gibi latent enfeksiyonunun reaktivasyonu sonucu da oluşabilir. Hastalığın ateşli semptomları immun sistemi baskılanmış hastalarda örneğin; lösemili çocuklarda, fazla miktarlarda kan veya plazma alanlarda ortaya çıkar. Günümüzde E.B.V. gibi CMV de transfüzyon sonrası ateşli sendromlardan sorumlu olan etken olarak gözönüne alınmalıdır.

EBV mononükleozisindeki gibi heterofil antikor veya diğer nonspesifik serolojik testlerde reaktivite saptanmaz. CMV vakalarının % 8 inde enfeksiyöz mononükleozise neden olur ve % 25-50 sinde heterofil antikor negatiftir.

CMV mononükleozisinde semptomlar genellikle hafiftir ve hastaların görünümü iyidir (52). Çok az sayıda vakada hastalık ciddi seyreder ve belirtiler ağırlaşır. Ateş düzensizdir ve 37.7-40.5°C arasında değişir ve birkaç gün ile 6 hafta (ortalama 3 hafta) arasında devam eder.

Mononükleozisteki tipik kan değişmeleri; lenfositoz > 5000 hücre/mm³, atipik lenfositlerde artış (% 10-15 oranında) ateşten 1-2 hafta sonra bile görülmeyebilir. Lökositoz hastalığın geç döneminde en yüksek düzeye ulaşır. Beyaz küre sayısı 10.000-20.000 hücre/mm³ arasındadır. İyileşme olduktan sonra lenfositoz aylarca ve yıllarca devam edebilir. Fakat klasik atipik lenfositler (Downey hücreleri) hasta iyileştikten hemen sonra kaybolur, ancak anormal, büyük lenfositler uzun süre kalabilirler.

CMV mononükleozisinde karaciğer enzimlerinde bozukluk ile seyreden subklinik hepatit de çok görülür (% 90 dan fazla) (52).

Karaciğer enzimlerinde genellikle az miktarda yükselme vardır (SGOT <100 IU) ve bilirübin 2.0 mg/dl'nin altındadır. Dolayısıyla sarılık pek sık

görülmez. Karaciğer enzimlerindeki bozukluk 4-6 hafta devam eder, fakat daha uzun da sürebilir.

Karaciğer biyopsilerinden CMV üretilmiştir ve mikroskopik olarak tipik hücre inklüzyonları görülmüştür.

CMV Epidemiyolojisi :

Sitomegalovirus geniş bir coğrafik dağılıma sahip olup, dünyanın değişik ülkelerinden izole edilmiştir. Ayrıca yapılan seroepidemiolojik çalışmalar ise bu virusların çeşitli bölgelerde de yaygın olarak dağılımını göstermektedir.

CMV enfeksiyonlarının insidansı sosyoekonomik düzeyle yakından ilişkilidir (53). Gelişmiş ülkelerde kişilerin hemen hepsi gençlik dönemine kadar enfeksiyonu kazanırlar, ancak sosyal düzeyi düşük gruplarda enfeksiyon oranı daha yüksektir (54). Amerika Birleşik Devletleri'nde düşük ekonomik durumu olan annelerin çocuklarının % 2 sinde fetal enfeksiyon olmaktadır (55). Gelir düzeyi orta ya da yüksek gruplarda, çocuklardaki bu oran belirgin olarak düşmektedir (56).

Ortalama olarak gelişmiş ülkelerde yenidoğan popülasyonunun % 1 inde konjenital CMV enfeksiyonu olmaktadır. Bu ülkelerde düşük sosyo-ekonomik düzeydekilerde yenidoğan dönemde enfeksiyonun alınması % 10'a kadar yüksektir (38).

Yapılan çalışmalar orta düzeydeki ailelerin 6 aylık çocuklarında aktif enfeksiyonun Japonya'da % 60 ve Finlandiya'da % 34 oranında olduğunu göstermiştir (57).

Erken çocukluk döneminden sonra enfeksiyon oranları gittikçe artmaktadır. A.B.D. de yaşam standartlarına bağlı olarak yetişkin popülasyonun % 50-90'ında CMV'ye karşı antikorlar vardır (53).

Çalışan kadın popülasyonlarında idrarda ve genital salgılarda, virus salgılanması ile saptanan aktif enfeksiyonun % 2-20 arasında bir sıklıkta görüldüğü gösterilmiştir (38). Yetişkin erkekler arasında ise bu oran tam olarak belirlenememiştir. Erkeklerde yapılan çalışmalar üriner salgılanma oranlarının % 3 den daha az olduğu söylenmektedir (54,58).

Yetişkin kadınlar arasında virusun salgılanması primer enfeksiyondan ziyade, tekrarlayan enfeksiyona bağlıdır (38).

Dünya Sağlık Teşkilatı tarafından yapılan bir çalışmada (59) yetişkin kan vericilerinde yaygın olarak CMV'ye karşı antikolar saptanmıştır.

Batı Avrupa ve Amerika'da yetişkinlerin % 40-50 sinde, Afrika, Greenland ve Asya'da % 100 ünde CMV antikolarının varlığı bildirilmiştir. İzole edilmiş popülasyonlarda CMV ile yüksek oranda karşılaşma olduğu gösterilmiştir.

Amerikan toplumunda genç erişkinlerde antikoların olmayışı oldukça ilgi çekmektedir (60). Yapılan birçok çalışma Amerikan toplumunda 60 yaşın üzerindeki bireylerin % 70 inde seropozitifliğin olduğunu göstermiştir. Batı toplumlarında ise enfeksiyon hayat boyu kazanılmakta ve yaşlı bireylerin hemen hepsi seropozitif bulunmaktadır. Aksine Asya ve Afrika toplumlarında gençlik döneminde, enfeksiyon sıklıkla görülmektedir. Batıda yaşayan zenci popülasyonu için de aynı kural geçerlidir (61). Yetişkin kadınlar, yetişkin erkeklerden daha yüksek sıklıkta seropozitifler.

Yurdumuzda daha önce CMV, antikolarının gebelik dönemindeki durumu araştırılmış ve 46 hamile kadında yapılan çalışmada % 91 oranında seropozitiflik bulunmuştur (62).

Ayrıca toplumumuzun çeşitli yaş gruplarından sağlanan 692 serum

örneğinde K.B.D. yöntemiyle araştırılan CMV antikorları 0-5 yaş grubunda % 68 ve artan yaş gruplarında ise % 80-96 arasında farklı seropozitiflikler bulunmuştur (63).

Danimarka Aarhus Üniversitesi Mikrobiyoloji Bölümünde toplanan 12 böbrek transplantlı hastanın immunosupresif tedavi sırasındaki antikor titreleri saptanmış ve 6 hastada (% 50) 4 ay içerisinde CMV aktif enfeksiyonu, Nt, K.B.D. ve IHA testleriyle gösterilmiştir (64).

Ayrıca son zamanlarda pratiğe yansıyan ELISA yöntemi hamile kadınlardaki CMV antikorlarının insidansını göstermek için kullanılmış ve çalışılan 123 serum örneğinde seropozitifliğin % 87.5 olduğu gösterilmiştir (65).

Yurdumuzda yapılan çalışmalar hernekadar sınır bölgeleri ve az sayıda serum örneğini içine almaktaysa da erişkin yaşta toplumun % 90 civarında CMV antikorları içerdikleri açıktır. Bu sonuçlar ise sosyo-ekonomik durumu benzer ülkelerde elde edilen sonuçlara seroepidemiolojik yönünden benzerlik göstermektedir.

Patogenez :

CMV'nin neden olduğu enfeksiyonların patogenezini tam olarak açıklanmamıştır. Genellikle enfeksiyon iki farklı mekanizma ile oluşur. Enfeksiyon virusun primer eksojen olarak kazanılması sonucu olabildiği gibi konak dokularında latent olarak bulunan virusun reaktivasyonu sonucu da ortaya çıkabilir.

Annenin primer enfeksiyonu (genellikle asemptomatiktir) sırasında birinci veya ikinci trimesterde virusun transplasental olarak geçişi ile ciddi intrauterin enfeksiyonlar oluşabilir.

Primer enfeksiyonun diğer şekilleri ise CMV mononükleozisi (spontan olarak veya kan transfüzyonunu takiben), çocuklarda CMV hepatiti, Guillan-Barre sendromu, nadiren meningoensefalitdir.

Immun yetmezliği olan ve organ aktarımı yapılmış immunosüpresif ilaç alan kişilerde görülen şiddetli, yaygın CMV enfeksiyonları, hem primer olarak kazanılmış virusa, hem de latent CMV enfeksiyonunun reaktivasyonuna bağlı olabilir. Genellikle virusla daha önce karşılaşmamış (seronegatif) kişilerde gelişen enfeksiyonlar daha şiddetli ve tehlikeli olabilir.

CMV enfeksiyonlarının histopatolojisinde, geniş inklüzyon içeren hücreler konağın immun sisteminin durumuna göre değişen miktarlarda mononükleer hücre infiltrasyonu ile çevrelenmiştir. Özellikle yenidoğanın santoral sinir sistemindeki lezyonlarda kalsifikasyon olabilir. Her organda lezyon olabilsen de daha çok tutulan ajanlar akciğer, karaciğer, beyin, göz, böbrekler ve G.İ.S. kanalıdır.

Enfeksiyonun düzelmesinde rol alan konak savunma faktörleri bilinmemektedir. Yüksek titrede antikörlerin varlığına rağmen virusun tükrükten ve idrardan uzun süre salınması en önemli savunma mekanizmasının, hücresel immünite olduğunu düşündürmektedir. Viral latensinin yeri insanda deneysel olarak gösterilmemiştir. Latent virusun normal kan vericilerinin lökositlerinde araştırılması başarısız olmuştur. Benzer şekilde transplantasyon öncesi renal allograftlarda virus gösterilememiştir (1).

CMV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı :

Genellikle CMV enfeksiyonlarının laboratuvar teşhisi, diğer virus enfeksiyonlarında olduğu gibi iki temele dayanmaktadır, bunlar etkenin duyarlı hücre sistemine ekimiyle izolasyonu ve bu etkene karşı oluşan antikörlerin serolojik testlerle ölçülmesidir.

Virus izolasyonu :

CMV'nin homolog epitelyal hücrelerde/^{üremesi} sınırlıdır, ancak virus homolog fibroblast hücre kültürlerinde izole edilebilir (66-68). Tanısal çalışmalar için fibroblast dokunun orijini, embriyonik deri, kas, akciğer, testis ve miyometriyum gibi çeşitli dokular olabilir.

Ticari olarak da seriler halinde diploid embriyonik fibroblast hücreleri (WI₃₈ gibi) sağlanabilir. Ancak sınırlı pasaj süresi olan bu hücrelerin ömrü kısa olduğu için ideal değildir.

Sağlanabilen en uygun doku kaynağı yenidoğanın derisidir. Tanı amacıyla bu hücreler 10-15 inci pasaja kadar kullanılır, ancak duyarlılık ve hücre ömrü bu pasajlardan sonra azalır.

Serolojik testler :

CMV enfeksiyonlarının laboratuvar teşhisinde değişik serolojik yöntemler kullanılır. Bunlardan Kompleman Birleşmesi Deneyi (69-71), Nötralizasyon (72), İndirekt Floresan Antikor Tekniği (73), Membran IFA (74), Erken Floresan antijeni (75,76), İndirekt Hemaglutinasyon (77), İmmun Adherens Hemaglutinasyon (78), RIA (79), CIEF (80), Lateks aglutinasyon (90), ELISA (90) ve presipitasyon teknikleri (81) sayılabilir.

Tanısal ve epidemiyolojik çalışmalarda K.B.D.'nin yaygın olarak kullanılmasına rağmen yeterli duyarlılıkta olduğuna dair fikir birliği yoktur. Önemli olan partiküler kompleman birleşmesi antijeninin kullanılmasıdır. Yapılan ilk çalışmalarda konvelesan serumlarda, kompleman birleşmesi antikorlarının saptanamaması, yeterli bir kompleman birleşmesi aktivitesi göstermeyen suşlardan antijen hazırlanmasına veya hücrelerin dondurulup çözümlenmesi ile antijen hazırlanmasına bağlı olabilir.

Rowe tarafından izole edilen AD₁₆₉ suşu kompleman birleşmesi antijeni için standard suş olarak tanımlanmıştır. En duyarlı CMV antijeni glisin ile ekstrakte edilen antijendir (G.E antijeni). Yapılan bir çalışmada insan serumlarında, doğal ve G.E antijenleri kullanılarak karşılaştırmalı bir çalışma yapılmış ve G.E antijeninin çok daha duyarlı olduğu bulunmuştur.

Nötralizasyon :

Nt testleri, virus preparasyonundaki enfeksiyöz olmayan/enfeksiyöz virion oranının yüksek olması ve virusun ısıya duyarlılığı nedeniyle kolayca uygulanamamaktadır. Ayrıca inokulumdaki enfeksiyöz virus miktarı ve suşların antijenik heterojenitesi de bazı zorluklara neden olmaktadır. Dolayısıyla Nt antikör titreleri düşük bulunmakta ve diğer testlerde pozitif sonuç alınırken bu testte antikör saptanamamaktadır.

Plummer ve arkadaşları (69) yaygın olarak kullanmak üzere plak redaksiyon Nt testi geliştirmişlerdir. Bu testin dezavantajı uzun süreye gerek duyulmasıdır, daha kısa sürede uygulanabilen teknikler ise Floresan Fokus inhibisyon (69) ve kırmızı plak oluşumu (82) testleridir.

İndirekt Floresan Antikör tekniği :

Hanshaw (73), IgM için IFA testini tanımlamışlardır ve konjenital ve kazanılmış enfeksiyon tanısında uygulanabilirliğini göstermişlerdir. Ancak daha sonra aynı araştırmacılar pozitif IFA-IgM'in Varicella-Zoster veya E.B.V. enfeksiyonları sonucu da saptanabileceğini belirtmişlerdir.

IFA-IgG testi de uygulanması kolay bir testtir, fakat yalnızca çekirdek içi inklüzyonların floresansının değerlendirilmesi gerekir. CMV ile enfekte hücrelerde IgG moleküllerine karşı Fc reseptörü taşıyan sitoplazmik inklüzyonların olduğu için bu önlemin alınması gereklidir. Bu reseptörle,

IgG ye non-spesifik olarak bağlanırlar ve CMV antikoru içermeyen serum ile yalancı pozitif floresans verirler (83).

Membran IFA :

The ve arkadaşları (74) membran floresan testini geliştirmek üzere fikse edilmemiş CMV ile enfekte hücreleri kullanmışlardır. Bu araştırmacılar anti membran antikorlarının fikse edilmiş enfekte hücrelere karşı oluşan IFA-IgM antikorları ile ilişkisi olduğunu saptamışlardır, hatta fikse edilmemiş hücre membranlarında boyanan antikorların IgM sınıfından olduğunu göstermişlerdir. Özgül olmayan boyanmanın önlenmesi için serumlar enfekte olmayan fibroblastlar ile absorbe edilmelidir.

Erken Floresan Antijeni :

Diğer viruslar gibi CMV de viral N.A sentezinden önce bazı antijenler (erken antijenler) oluşturur. Bu antijenler N.A sentezi olmadığı zamanlarda da oluşurlar. Bu antijenlere karşı oluşan antikorlar, CMV DNA sentezini inhibe eden sitozin arabinosid varlığında enfekte hücreler üzerinde floresan ile boyanarak gösterilebilirler (76).

The ve arkadaşları (75), sadece son zamanlarda enfeksiyonu olan kişilerde erken antijenlere karşı antikor saptadıklarını bildirmişlerdir. Eskiden geçirmiş enfeksiyonlarda ise seronegatif sonuç alınmıştır.

İndirekt Hemaglütinasyon :

Birçok farklı virusun antijenleri tannik asitle muamele edilmiş eritrositlere bağlanmakta ve antikor içeren serum ile aglütine olmaktadır. IHA antikor titreleri, genellikle IFA titrelerine paraleldir, çünkü her iki testte de virusun yüzey komponentleri belirlenmektedir.

Fucillo ve arkadaşları (77), IHA ile hem IgM ve hem IgG antikorlarının saptanabildiğini bildirmişlerdir. IHA-IgG antikorlarının belirlenmemesi veya eksikliği duyarlılığın ölçülmesinde kullanılır.

Presipitasyon :

Furukawa ve Junk (81), 5 suş kullanarak CMV den presipitin antijenleri hazırlamışlardır. Ayrıca bu araştırmacılar çözünür antijenleri partikül halindeki presipitin antijenlerini ayırmış ve her iki tip antijenin de pozitif serumlarla benzer olarak reaksiyon verdiğini bulmuşlardır.

Presipitin testleri kompleman birleşmesi testinden biraz daha az duyarlıdır, fakat son zamanlarda geçirilmiş enfeksiyon ile ilişkilidir.

Fortunato (80) tarafından tanımlanan CIEF tekniği, IFA-IgM antikorları ile % 95 uyumluluk göstermiştir, fakat akut olarak enfekte olmayan kişilerde genellikle negatiftir. Ayrıca RF (Romatoid Faktör) da yalancı pozitifliğe neden olur.

İmmun Adherens Hemaglütinasyon :

Komplemana bağlı IA yöntemi Dienstag (78) tarafından CMV antikorlarının saptanmasında kullanılmıştır. Uygulanması kolay bir testtir ve IFA ile uyumlu sonuç vermektedir, fakat saptanan titreler diğer testlere kıyasla 2-8 kere daha yüksektir.

RIA :

Knes (79), CMV'ye karşı hem IgM hem de IgG antikorlarının saptanmasında RIA tekniğini tanımlamışlardır. Mikrotitre pleyt çukurlarının yüzeylerine antijen bağlanır, viral antikorlar I^{125} ile işaretli anti insan IgG veya anti insan IgM'ın özgül bağlanmasının ölçülmesiyle saptanır. Romatoid

faktör glüteraldehid içinde çözülmüş IgG eklenerek uzaklaştırılmalıdır.

ELISA :

ELISA testi son yıllarda CMV serolojisinde birçok teşhis laboratuvarı tarafından kullanılan serolojik yöntemdir. Testin esası CMV antijeni ile kaplı katı yüzeye mevcut antikorların tutunması ve bu antikorların varlığının enzim ile işaretli anti-globulin kullanılarak belirlenmesidir. Bu yöntemle hem IgG hem de IgM antikorları saptamak mümkündür. Yöntem RIA dan daha hassas olmasına rağmen aynı özgüllüğe sahiptir ve uygulamada çok daha pratik bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (90).

I I I . G E R E Ç v e Y Ö N T E M

Hücre Kültürleri :

Sitomegalovirus (CMV AD₁₆₉ suşu), orijinal olarak Glasgow Üniversitesi Viroloji Enstitüsünden sağlandı ve HeLa veya WI₃₈ (insan embriyonik akciğer fibroblast) hücre kültürlerinde üretildi.

WI₃₈ hücre kültürleri orijinal olarak Flow lab Irvine, Scotland'dan sağlandı. Ayrıca deneylerde kullanılan insan akciğer fibroblast hücrelerin bir kısmı ise Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri, Kadın Doğum Servisi, Ameliyathane Bölümünde, steril şartlarda, alınan "2-3" aylık enfekte olmayan fetüslerden, kendi laboratuvarımızda standard yöntemlere göre hazırlandı (84).

Elde edilen hücrelerin üretilmesi için % 10 Fetal dana serumu (FCS), "mililitrede 100 ünite penisilin, 100 µgr Streptomisin içeren" Eagle Minimal Essential vasatı (MEM) kullanıldı. Hücreler 200 cc lik özel hücre kültürü şişelerinde (Jena-Glass) üretildi. Hücreler 4-5 günde tek tabaka olduktan sonra, 1'den 2'ye pasaj edilerek çoğaltıldı. Hücreler hergün mikroskopik olarak gözlemlendi ve gerektiğinde vasat değiştirildi veya % 8.4 lük NaHCO₃ ile nötral pH'ya ayarlandı.

Hücre Kültürlerinde Kullanılan Vasatlar ve Solüsyonlar :

Üretim vasatı : Hücre kültürlerinde kullanılan, MEM vasatı, Batı Almanya'daki (Flow) Laboratuvarlarından sağlandı. 9.526 gr toz halindeki vasat tartılıp iyonsuz suda çözüldükten sonra % 1 oranında glutamin çözeltisi eklendi ve 1 litreye tamamlandı. Seits filtrelerinden süzülerek steril edildi.

Hücrelerin üretilmesi için % 10 oranında FCS ve mililitrede 100 ünite penisilin, 100 mikrogram streptomisin olacak şekilde SP eklenerek kullanıldı.

Föetal Dana Serum (FCS) :

Difco Laboratuvarları, Detroit, Michigan'dan ticari olarak sağlanan Liyofilize FCS, 100 ml steril iyonsuz suda çözülerek kullanıldı. Çözüldükten sonra kullanılıncaya kadar +4°C de saklandı.

Streptomisin-Penisilin Solüsyonu (SP) :

1 milyon ünite Kristalize penisilin ve 1 gr. streptomisin'in 100 ml steril iyonsuz su içerisinde çözülerek hazırlandı ve kullanılıncaya kadar -25°C de küçük hacimlerde ayrılarak saklandı.

Sodyum Bikarbonat (NaHCO₃) Çözeltisi :

Hücre kültürlerinde kullanılan bu solüsyon, 100 ml iyonsuz suda 8.4 gr NaHCO₃ ün çözülmesiyle hazırlandı ve 15 dak. otoklavda steril edilerek +4°C de saklandı.

Tripsin Çözeltisi :

Hücre kültürlerinin pasajı sırasında kullanılan bu solüsyon aşağıdaki formüle göre hazırlandı.

NaCl	4.00 gr
KCl	0.10 gr
NaHPO ₄	0.575 gr
(veya Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	0.720 gr
KH ₂ PO ₄	0.10 gr
Tripsin	2.50 gr

Bu maddeler 500 ml iyonsuz suda eritildi ve 0.5 ml fenol red eklene-
rek % 7.8 lik NaHCO_3 ile pH ayarlandı. Bir gece $+4^\circ\text{C}$ de bekletildikten sonra
5 ml SP eklendi ve Seitz filtrelerinden süzülerek steril edildi. 100'er ml
olmak üzere şişelere bölündü ve kullanılıncaya kadar -25°C de saklandı.

Versene :

Hücre kültürlerinin pasajı sırasında kullanılan bu solüsyon aşağıda-
ki formüle göre hazırlandı :

NaCl	4.00 gr
KCl	0.10 gr
Na_2HPO_4	0.575 gr
KH_2PO_4	0.10 gr
Versene (EDTA)	0.10 gr

(EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid disodyum tuzu)

Bu maddeler 500 ml iyonsuz suda eritilerek, otoklavda 15 dak. steril
edildi ve $+4^\circ\text{C}$ de saklandı.

Virusun Üretilmesi ve Antijenin Hazırlanması :

CMV'nin üretilmesi için kullanılan HeLa hücreleri, şişelerde tek
tabaka (Monolayer) haline geldikten sonra vasatları boşaltıldı ve stok
virustan 0.1 ml konu (Kontroller hariç). Adsorbsiyon için 1.5 saat 37°C
lik etüvde inkübe edildi. Daha sonra % 2 lik fotal dana serumu (FCS) ve SP
içeren vasatları kontrollerde dahil olmak üzere şişelere konu. Şişeler
tekrar 37°C lik etüve kaldırıldı ve sitopatik etki (CPE) gözlenene kadar
(9-12) gün etüvde bekletildi.

Gerektiğinde pH ları sodyum bikarbonat ile nötral pH'ya ayarlandı.
Hücre kültürlerinde % 90-100 CPE (11-13 günde) görüldüğü zaman enfekte hü-
reler vasat içinde dökülerek 600 xg de 15 dakika santrifüj edildi ve üst
sıvı atıldı (85,86).

Enfekte hücre paketi orijinal kültür hacminin % 5 inde 0.1 M Glycine Buffered Saline (pH 9.5) içinde yeniden süspanse edildi (85,87,88).

Bu karışım 37°C de 6 saat karıştırılarak bekletildi ve daha sonra bu süspanسیون 600 xg de 20 dakika santrifüj edilerek saflaştırıldı. Kompleman birleşmesi antijeni içeren süpernatant sıvı 0.5 ml lik hacimlere bölünerek -70°C de saklandı.

Bu şekilde hazırlanan CMV, kompleman birleşmesi antijeni kullanılmadan önce "CHESS BOARD" yöntemi ile titresini saptandı.

Ayrıca CMV ile enfekte olmayan fibroblast hücrelerinden de benzer şekilde kontrol antijeni hazırlandı.

Deneylerde Kullanılan Solüsyonlar :

Veronal Buffer (VB) : Bu solüsyon içerdiği Ca^{++} ve Mg^{++} iyonları nedeniyle kompleman birleşmesi deneyinde, komplemanın yüksek serum sulandırım- larında bile tam olarak fikse edilmesini sağlamak amacıyla dilüent olarak kullanıldı ve aşağıdaki formüle göre hazırlandı :

VB (Veronal Buffer pH: 7.2) :

NaCl	8.5 gr
5.5 diethylbarbituric Acid	0.575 gr
Na 5.5 diethylbarbiturate	0.2 gr
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1.65 gr
$CaCl_2$	0.28 gr

Hazırlanışı :

- 1- 50 ml sıcak iyonsuz suda barbitüric asid eritildi.
- 2- Diğer maddeler eklendi ve iyonsuz su ile 200 ml ye tamamlandı.
- 3- Otoklavda 20 dakika 120°C de steril edildi, sonra +4°C de saklandı.
- 4- Kullanıldığı zaman iyonsuz su ile 1/5 lik sulandırım yapıldı ve pH'sı 7.2'ye ayarlandı (84).

Hemolitik serum :

Koyun eritrositlerine karşı tavşandan elde edilen anti koyun eritrositleri antikorlarını içeren hemolitik serum, Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsünden sağlandı.

Eritrositler :

Kompleman Birleşmesi Deneyinde (K.B.D.) kullanılan koyun eritrositleri, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Bölümünden sağlandı. Alsever solüsyonunda saklanan koyun kanı, kullanılacağı zaman VB ile 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek 3 kez yıkandı ve üst sıvı tamamen berrak olduğunda paket eritrositler deneyde kullanıldı.

Hemolitik sistem :

Paket koyun eritrositlerinin VB içerisinde hazırlanan % 4 lük süspansiyonu ile yine VB ile 1/100 oranında sulandırılmış hemolitik serumun eşit hacimlerde karıştırılmasıyla hazırlandı. 15 dakika 37°C de ya da 20 dakika oda ısısında bekletilerek duyarlılaştırıldıktan sonra deneyde kullanıldı.

Kompleman :

Kompleman için erkek kobayın kalp kanı alınarak serumu ayrıldı. Küçük miktarlarda (0.2 ml) tüplere bölünerek -25°C de saklandı ve titre edildikten sonra uygun sulandırımında kullanıldı.

Mikroteknik Gereçleri :

Kompleman titrasyonunda, kompleman birleşmesi deneyinde ve "CHESS BOARD" yönteminde kullanılan mikroteknik gereçleri şunlardır :

1. Mikrodilüter (Loop) : 0.025 ml sıvı tutma yeteneğinde olan bir alettir.
2. Damlalık pipeti : Mikroteknikte kullanılan ve 0.025 ml damla verme yeteneğinde olan özel pipetlerdir.
3. Test kağıtları (go-no-go) : Loopları kontrol etmede kullanılan ve üzerinde bulunan daireler tam 0.025 ml sıvı emme yeteneğinde olan, özel emici kağıtlardır.
4. U tabanlı pleytler : Tabanları U şeklindeki (8x12) adet çukur içeren bu sistemde kullanılan polisteren yapısındaki özel pleytlerdir.
5. Test okuma aynası : Deneylerin değerlendirilmesinde kullanılan iç bükey (Konkav) aynadır.

Kompleman titrasyonu :

Hemolitik aktivitenin ölçülmesine dayanan kompleman titrasyonu aşağıda anlatılan şekilde yapıldı.

1. U tabanlı mikropleyitin çalışılacak bütün çukurlarına 0.025 ml VB damlatıldı.
2. Test edilecek komplemandan loop ile 0.025 ml alınarak ilk çukura kondu ve seri dilüsyonu yapıldı (Kontrol hariç).
3. Bütün çukurlara tekrar 0.50 ml VB damlatıldı.
4. Daha sonra bütün çukurlara 0.025 ml hemolitik sistem damlatıldı.
5. Hemolitik sistemin kontrol çukuruna ise 0.075 VB ve 0.025 ml hemolitik sistem damlatıldı.
6. Mikropleyt 37⁰C de, 30 dakika karıştırmak suretiyle 1 saat beklendi. Daha sonra +4⁰C ye kaldırılarak tam çökme sağlandıktan sonra sonuçlar değerlendirildi.

Değerlendirme :

% 50 hemoliz ve % 50 çökmenin saptandığı kompleman sulandırımı 1 kompleman ünitesi olarak kabul edildi (Hemolitik Doz₅₀ = HD₅₀).

Esas kompleman birleşmesi deneyinde ise 4 ünit kompleman sulandırımı kullanıldı.

Hasta serumları :

Hasta serumları, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi ve Organ Nakli Yanık ve Tedavi Vakfı Hastanelerinde böbrek transplantasyonu yapılmadan önce ve yapıldıktan sonra değişik zamanlarda hastalardan elde edildi. Serumlar kullanılıncaya kadar -25°C de saklandı.

Pozitif ve negatif kontrol serumları :

Deneylerde kullanılan bütün anti serumlar, Whittaker M.A. Bioproduct Lab. Maryland A.B.D.'den sağlandı.

CMV antijeninin titrasyonu (CHESS BOARD) yöntemi :

İnsan embriyonik akciğer (HeLM) hücre kültürlerinde hazırlanan CMV antijenlerinin standard antiserum kullanarak titreleri saptandı. Bu işlem aşağıda verilen şekilde uygulandı (84) :

- 7 adet serolojik tüp alınarak her birine 0.50 ml VB kondu, ilk tüpe 0.50 ml antijen konularak her dilüsyonda pipet değiştirmek suretiyle diğer tüplere ayrı ayrı sulandırılmaları yapıldı. Böylece sulandırılmalar 1/2, 1/4 ... 1/64 şekilde hazırlanmış oldu.
- Aynı işlemler 7 adet serolojik tüpte standard antiserum için de uygulandı. Böylece antiserumun da 1/2, 1/4 ... 1/64 sulandırılmaları VB içerisinde hazırlanmış oldu.
- U tabanlı pleytin çalışılacak çukurlarına, antijenin en yüksek

sulandırımından başlayarak, yukarıdan aşağıya doğru karşılık gelen çukurlara 0.025 ml antijen sulandırımları damlatıldı. Bu şekilde en düşük sulandırmaya kadar devam edildi. Antiserum sulandırımları da aynı yöntemle fakat horizontal olarak (soldan sağa doğru) karşılık gelen çukurlara her sulandırmadan 0.025 ml olarak damlatıldı.

- Antijen kontrol çukuruna 0.025 ml VB ve 0.025 ml antijen sulandırımı; antiserum kontrol çukurlarına ise 0.025 ml VB ve 0.025 ml antiserum sulandırımı damlatıldı.
- Daha sonra kontroller dahil çalışılan bütün çukurlara 0.025 ml kompleman sulandırımı (4 HD₅₀) damlatıldı. Kompleman için 4, 2 ve 1 ünite olmak üzere 3 ayrı kontrol çukuru hazırlandı :
- 4 ünite kompleman çukuru 0.050 ml VB ve 0.025 ml 4 ünite kompleman içermekteydi. 2 ünite kompleman kontrol çukuruna 0.025 ml VB ve 0.025 ml 4 ünite kompleman sulandırımı konulduktan sonra loop ile karıştırılarak 1 ünite için ayrılan ve 0.025 ml VB içeren kontrol çukuruna dilüsyon yapıldı. Sonra 2 ve 1 ünite kompleman kontrol çukurlarına 0.050 ml VB damlatıldı.

Bu işlemlerin sonunda pleyt iyice karıştırılıp +4°C de bir gece bekletildi. Ertesi gün % 4 lük koyun eritrositleri süspansiyonu ile 1/100 oranında sulandırılmış hemolitik serumdan eşit miktarlarda karıştırılıp, 10-15 dakika 37°C lik su banyosunda bekletildikten sonra bütün çukurlara 0.025 ml damlatıldı.

Hemolitik sistem kontrol çukuru ise 0.075 ml VB ve 0.025 ml hemolitik sistem konularak hazırlandı.

Mikropleyt iyice karıştırıldıktan sonra 37°C de 30 dakika, 10'ar dakikada bir karıştırılarak, 30 dakika ise karıştırılmadan olmak üzere 1 saat bekletildi. Daha sonra pleyt +4°C ye kaldırılarak eritrositlerin tam çökmesi sağlandıktan sonra sonuçlar değerlendirildi.

Değerlendirme :

Optimal antijen ile antiserum konsantrasyonunun karşılaştığı ve komplemanı bağladığı titreler değerlendirmede dikkate alındı. % 50 çökme ve % 50 hemolizin olduğu en yüksek antijen ve antiserum sulandırımı sap-
tanarak, esas kompleman birleşmesi deneyinde 2 ünite antijen kullanıldı.

Kompleman Birleşmesi Deneyi (ESAS DENEY) :

Bu deneyde, hastalardan böbrek transplantasyonu yapılmadan önce ve yaklaşık olarak transplantasyon yapıldıktan sonraki 3 ay içerisinde alınan çift serum örneklerinde K.B.D. standard yöntemlere göre yapıldı (84,89).

Kullanılan materyaller ;

- Veronal Buffer (pH: 7.2)
- 4 ünite kompleman sulandırımı
- 2 ünite antijen
- İnaktive hasta ve kontrol serumlar
- Hemolitik sistem.

Deneyin Yapılışı :

- Test edilecek her serum için ayrılan bir sıra mikropleyt çukuruna 0.025 ml VB damlatıldı.
- Her hasta serumu örneğinden Loop ile 0.025 ml alınarak ilk çukurlara kondu ve karıştırılarak diğer çukurlara seri dilüsyonları yapıldı.
- Serumların 1/2 sulandırımını içeren ilk çukurlara 0.025 ml VB, diğer sulandırım çukurlarına ise 0.025 ml antijen damlatıldı.

Böylece antijen içermeyen ilk çukurlar, hasta serumu kontrolu olarak değerlendirildi. Ayrıca antijen kontrol çukuruna 0.025 ml VB ve 0.025 ml antijen konuldu.

- Kontroller dahil tüm çukurlara 4 ünite kompleman sulandırımından 0.025 ml damlatıldı. 4, 2 ve 1 ünite kompleman içinde 3 kontrol çukuru hazırlandı :

- 4 ünite kompleman kontrolü : 0.025 ml 4 Ü kompleman + 0.050 ml VB
- 2 ünite " " : 0.025 ml VB + 0.025 ml 4 Ü kompleman
+ 0.050 ml VB
- 1 ünite " " : 0.025 ml VB + 2 ünite kompleman
sulandırımı + 0.050 ml VB

- Mikropleyt karıştırıldıktan sonra +4°C de 1 gece bekletildi. Ertesi gün kontroller dahil tüm çukurlara 0.025 ml hemolitik sistem damlatıldı. Hemolitik sistem kontrol çukuru ise 0.075 ml VB ve 0.025 ml hemolitik sistem içermekteydi.

Mikropleyt 37°C de 30 dakika karıştırılarak, 30 dakika karıştırılmadan toplam 1 saat inkübe edildikten sonra +4°C ye kaldırılarak eritrositlerin çökmesi sağlandı ve sonuçlar değerlendirildi.

Değerlendirme :

Antijen, antikor (hasta serumu) ve komplemanın 4 ve 2 ünite kontrollerinde tam hemoliz, hemolitik sistem kontrolünde tam çökme ve 1 ünite kompleman kontrolünde % 50 çökme, % 50 hemoliz sağlandığında değerlendirme doğru olarak gerçekleştirildi.

Özgül antikor içermesi dolayısıyla antijeni ve komplemanı tam olarak bağlayan ve hemoliz vermeyen test serumu sulandırılmaları pozitif olarak kabul edildi.

Hemoliz vermeyen en yüksek serum sulandırımı, o serumun kompleman birleşmesi antikor titresi olarak değerlendirildi.

Enzim immunoassay yöntemiyle CMV antikorların saptanması :

ELISA yöntemi böbrek transplantasyonlu hastalarda, CMV enfeksiyonlarına karşı oluşan antikorların saptanması için diğer bir yöntem olarak kullanıldı. ELISA yönteminde kullanılan solusyonlar (ABBOTT) A.B.D.'den sağlandı.

Bu sistem aşağıdaki gereç ve solüsyonları iğermektedir :

- 1- CMV antijeni ile kaplanmış bonucuklar
- 2- Pozitif serum kontrolü
- 3- Negatif " "
- 4- Hasta serumları için özel sulandırma sıvısı
- 5- Enzimle (peroxidase) işaretli anti insan globulini
- 6- OPD (o-phenylenediamine-2HCl) tabletleri
- 7- OPD tabletleri için sitrat fosfat tamponu (% 0.02 hidrojen peroksit) iğermektedir
- 8- H_2SO_4 solusyonu (1 N H_2SO_4).

CMV-ELISA testinin uygulanması :

A) Birinci inkübasyon :

1. Özel reaksiyon pleytlerinin ilk 3 çukuruna 200 µl negatif kontrol ve iki çukuruna da 200 µl pozitif kontrol serum konuldu.
2. Her hasta serumu örneği için birer çukur kullanılarak 10 µl hacimde ilave edildi.
3. Kontroller hariç bütün hasta serumlarının üzerine 200 µl özel sulandırım tamponu kondu.
4. Çalışılan bütün çukurların içine birer CMV antijeni kaplanmış boncuk konularak 40°C de bir saat inkübe edildi.
5. Sürenin sonunda bütün çukurlar distile su ile 3 kez yıkandı.

B) İkinci inkübasyon :

6. Çalışılan bütün çukurlara 200 µl Enzim konjugat ilave edildi ve tekrar 40°C de 30 dakika inkübe edildi.
7. Sürenin sonunda bütün çukurlar 3 kez distile su ile yıkandı ve boncuklar özel tüplere geçirildi.
8. Çalışılan serum sayısına göre OPD tabletleri OPD sulandırım sıvı içerisinde eritilerek hazırlandı :

Test sayısı	Tablet	Sulandırım sıvısı
13	1 adet	5 ml
28	2 "	10 ml
43	3 "	15 ml
58	4 "	20 ml
73	5 "	25 ml
88	6 "	30 ml
103	7 "	35 ml

9. Bu şekilde hazırlanan OPD solüsyonu 300 µl olarak her tüpe eklendi ve 30 dakika oda derecesinde bekletildi. Bu kademede 2 adet boş tüpe de 300 µl bu sıvıdan kondu ve blank tüpü olarak kullanıldı.
10. Sürenin sonunda bütün tüplere 1 ml 1 N H₂SO₄ konularak 492.600 dalga boyunda özel spektrofotometrede (Spectrophotometer) okundu.

İdrar örneklerinde inklüzyon içeren sitomegalik hücrelerin araştırılması :

Hastalardan transplantasyondan önce ve sonra alınan idrar örnekleri 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atılarak çökelek temiz lam üzerine yayıldı ve kurutuldu.

Preparatın üzerine metil alkol konularak tesbit edildi. Daha sonra preparat 15-20 dakika Giemsa ile boyanarak çeşme suyu ile yıkandı. Preparatlar kurduktan sonra mikroskopta immersiyon objektifi ile incelendi.

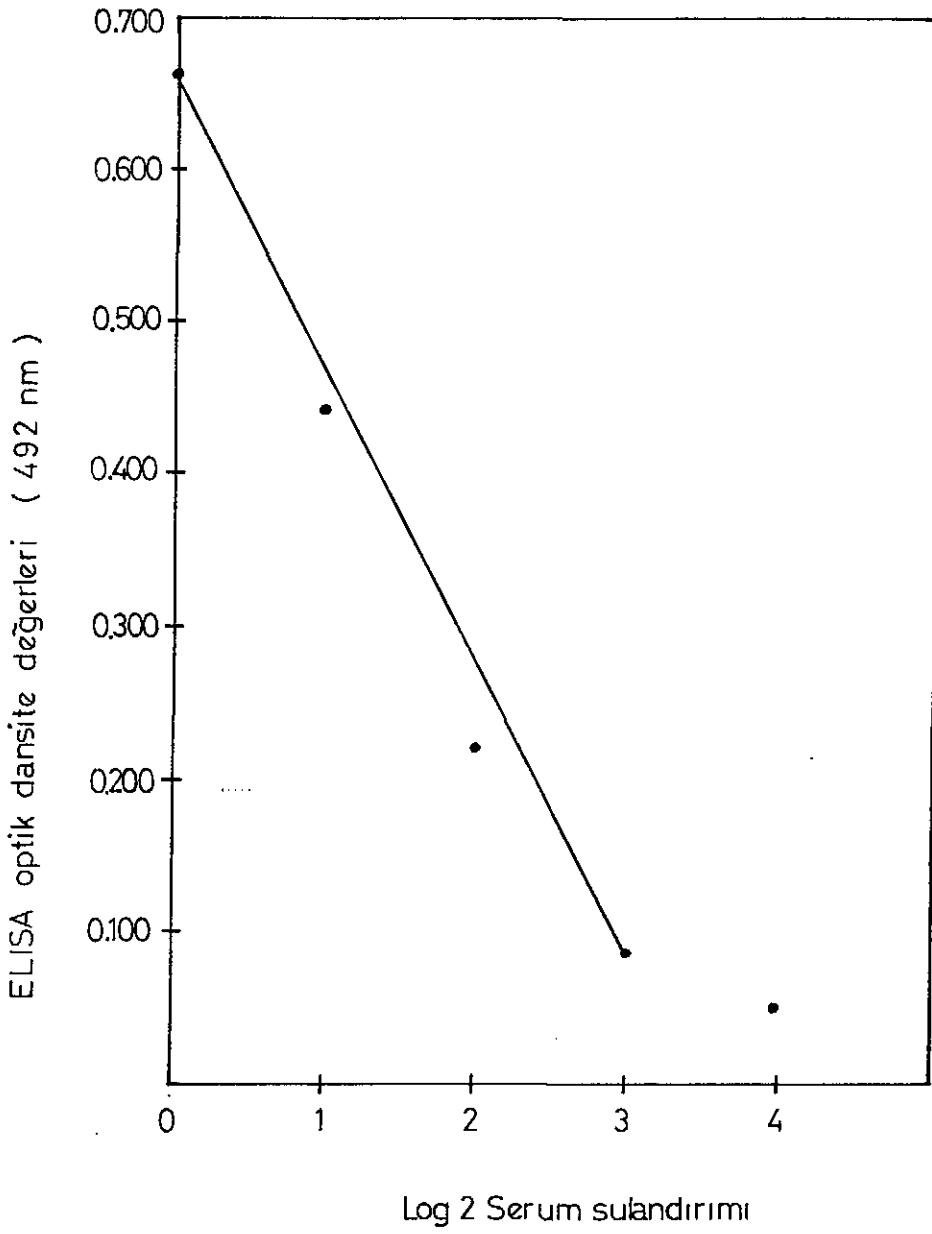
I V . B U L G U L A R

Sitomegalovirus antikor titresi, pozitif serum sulandırımının ELISA optik dansite değerlerinin saptanması :

ELISA yönteminde pozitif serum değerinin farklı sulandırım- larla ver- diği değerleri ve testin kontrolünü yapmak gayesiyle, kompleman birleşmesi titresi 1/32 olarak saptanan CMV immun serumun seri sulandırımları yapıla- rak ELISA yöntemi uygulandı. Bunun için ELISA sulandırım sıvısını 200 µl serum ilave edilerek 1/2, 1/4, 1/16 ve 1/32 seri sulandırım- lar hazırlandı ve bu sulandırım- larla ELISA yöntemi çalışıldı. Seri sulandırım- lar- da elde edilen optik dansite değerleri Şekil I de karşılaştırılmıştır. Görüldüğü şekilde artan sulandırım- lar ile birlikte optik dansite değerlerinde uyum- lu bir azalma saptanmaktadır.

Saf serum 0.663 optik dansite değeri ile pozitif reaksiyon verirken 1/8 sulandırım 0.097 olarak saptanan optik dansite ile 0.102 olan "cut off" değerinin altına düşmektedir, bu da serum antikor titresi ile uyumlu olarak ELISA'nın pozitiflik verdiğini vurgulamaktadır.

ŞEKİL I : Sitomegalovirus antikor titresi pozitif serum sulandırım-
larının ELISA optik dansite değeri ile kıyaslanması :

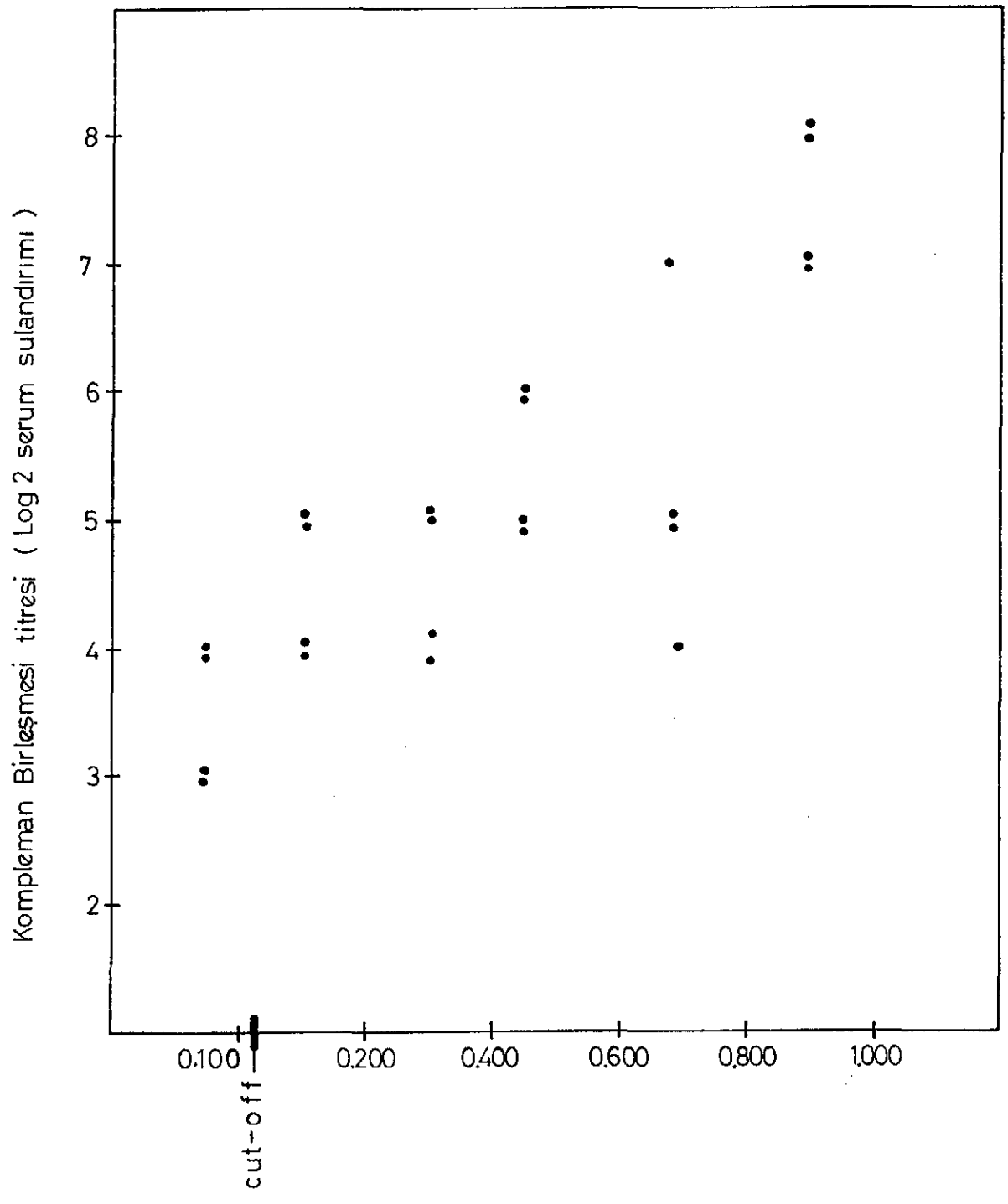


Kompleman Birleşmesi testi ile CMV antikorları pozitif saptanan serum örneklerinin ELISA değerleri ile kıyaslanması :

CMV antikorlarının saptanmasında ELISA ve kompleman birleşmesi testlerinin uyumluluk gösterip göstermediğini saptamak amacıyla farklı ELISA optik dansite değerleri gösteren 24 serum örneğinin kompleman birleşmesi testi ile antikor titreleri tayin edilmiştir. "cut off" ın altında, cut off ile 0.200 optik dansite, 0.200-0.400, 0.400-0.600, 0.600-0.800, 0.800-1.000 arasında optik dansiteler veren 4'er serum örneklerinin kompleman birleşmesi titreleri tayin edilmiş ve sonuçlar Şekil II de verilmiştir.

Şekil II de de görüldüğü gibi ELISA deneyinde negatif olarak kaydedilen ve "cut-off" değerinin altında bulunan 4 serum örneğinden 2'si 1/8, 2'si ise 1/16 titrelerde kompleman birleşmesi antikorlar yönünden pozitif reaksiyon vermişlerdir. Diğer serumlar her iki testte de pozitif sonuçlar vermiştir. Ayrıca kompleman birleşmesi testinde negatif sonuç veren 4 serum örneği ELISA testinde de "cut-off"un altında değer vermiştir. Bu sonuçlara göre ELISA deneyi ile kompleman birleşmesi arasındaki uyumluluk % 84.4 oranındadır.

ŞEKİL II : ELISA Sitomegalovirus total antikoru pozitif serumların optik dansitelerinin Kompleman birleşmesi titreleri ile kıyaslanması :



Test edilen serumların ELISA optik dansite değerleri ortalaması (492nm)

Böbrek transplantasyonu yapılan bireylerde transplantasyon öncesi, transplantasyondan sonraki 2. ve 3. aylarda alınan serum örneklerinde CMV antikörlerinin kompleman birleşmesi ve ELISA testleri ile araştırılması :

Böbrek transplantasyonlu hastalarda CMV aktivasyonunu ve buna bağlı olarak CMV'a özgül antikörlerin artışını saptamak amacıyla bu bireylerden transplantasyon öncesi serum örnekleri toplandı. Ayrıca yaş ve cinsiyetleri bu çalışma grubuna uyan kontrollerden, böbrek taşı ve hemodiyalizli hastalardan serum örnekleri toplanarak kontrol grubuna dahil edildiler.

Transplantasyon öncesi bireylerden toplanan serumlardan ve diğer kontrol gruplarının CMV antikör düzeyleri ELISA yöntemi ile saptanmış ve sonuçlar Tablo I de verilmiştir. Tablo I de de görüldüğü gibi serum adedi kısıtlı olmasına rağmen 23 sağlıklı kontrol grubu serumunun ELISA optik dansite değer ortalamaları, 35 transplantasyon öncesi bireylerden toplanan serum örneklerinin ortalamalarına yakınlık göstermektedir.

Seropozitiflik oranı sağlıklı kontrol grubunda % 82.7 ve transplantasyon yapılan bireylerde ise % 94.3 dür. Hemodiyalizli hastalarda 37 serum örneğinin CMV ELISA optik dansite değer ortalamaları 0.563 olarak kaydedilmiş ve optik dansiteleri 0.495 olan böbrek taşı hastalar gibi seropozitiflik oranı % 100 bulunmuştur.

TABLO I: Kontrol gurubu olarak alınan sağlıklı, böbrek taşlı, hemo-diyalizli bireylerin ve transplantasyon öncesi hasta serumlarının sitomegalovirus antikor düzeylerinin ELISA yöntemi ile elde edilen sonuçları:

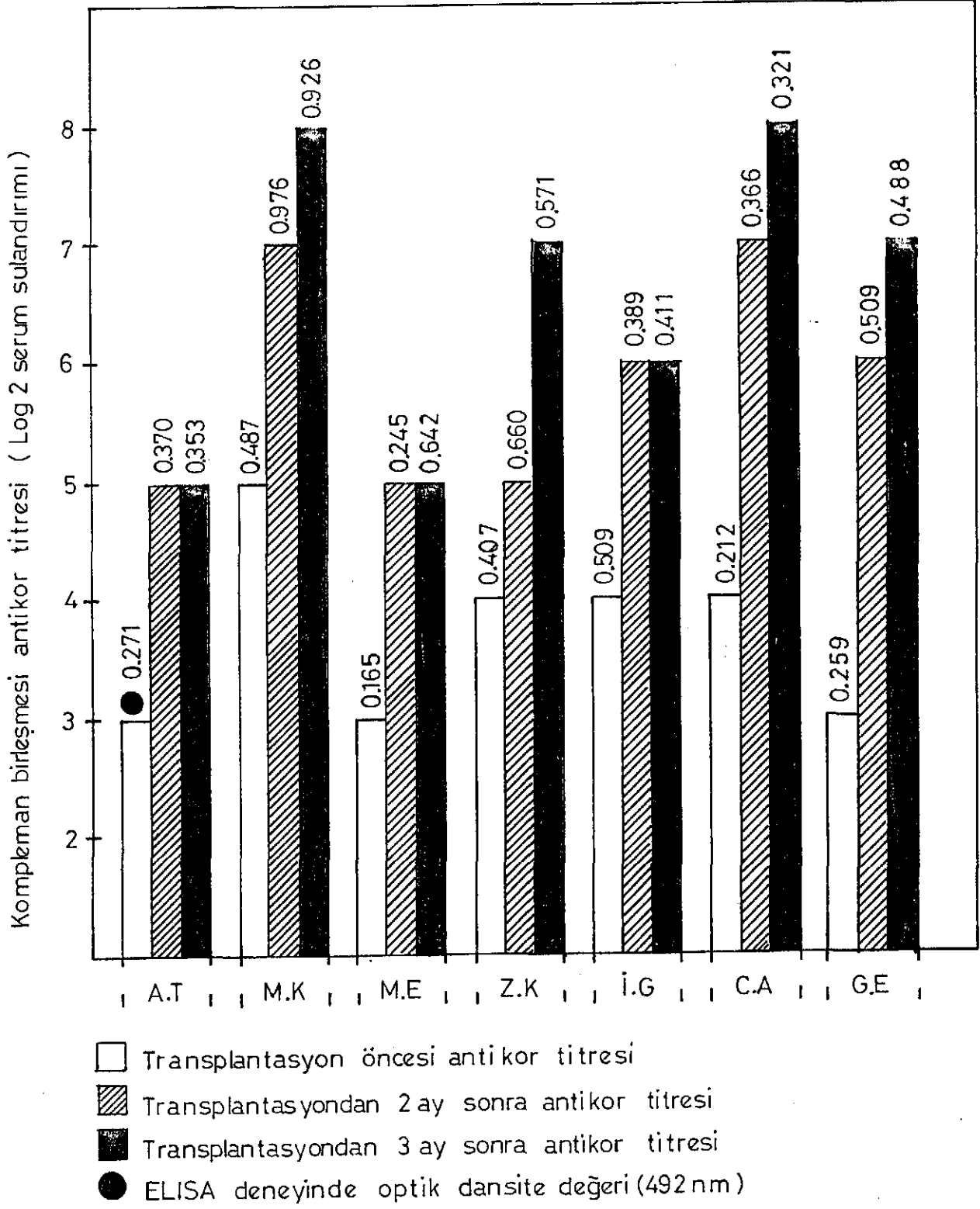
Hasta ve Kontrol gurupları	çalışılan serum sayısı	ELISA optik dansite değerleri ortalaması (492 nm)	Seronegatif %	Seropozitif %
Sağlıklı Kontrol gurubu	23	0,261	17,3	82,7
Böbrek taşlı hastalar	13	0,495	–	100
Hemodiyalize giren hastalar	37	0,563	–	100
Transplantasyon ncesi bireyler	35	0,300	57	94,3

Böbrek transplantasyonu yapılan hastaların 20'sinden transplantasyon sonrası 2. ve 3. aylarda serum örnekleri alınmıştır. Bu serumların CMV antikor düzeyleri kompleman Birleşmesi ve ELISA testleri ile saptanarak serokonversiyon gösteren örneklerin sonuçları Tablo II de verilmiştir.

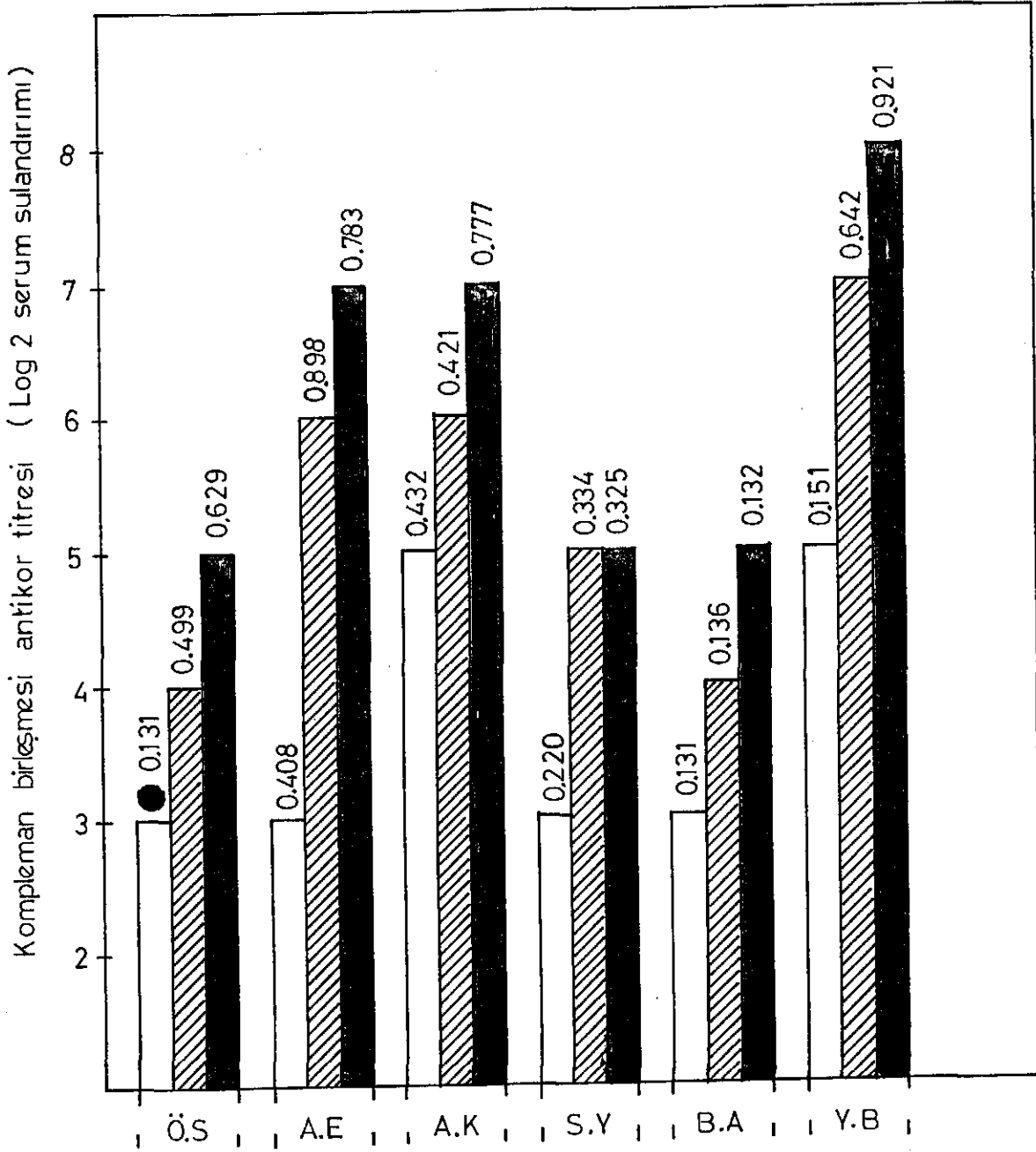
Transplantasyon sonrası 2. ve 3. aylarda çift serum örneği toplanan 20 hastanın 13'ünde serokonversiyon kompleman Birleşmesi testi ile saptanmıştır. Böylece transplantasyon öncesi ve transplantasyon sonrası toplanan 3 serum örneği ile alınan sonuçlarda elde edilen serokonversiyon oranı % 65 dir. Tablo II de de görüldüğü gibi transplantasyon öncesi ve transplantasyondan sonraki serumlar arasındaki titre artışı farkı 4 misli olarak esas alınmıştır. Serokonversiyon gösteren serumlardaki ELISA testinde elde edilen optik dansite değerlerine dikkat edildiğinde transplantasyon öncesi ve sonrası serumlar arasında optik dansite farkı saptanmakla beraber artış oranının optik dansite yönünden kompleman birleşmesi testi kadar uyumluluk göstermediği dikkati çekmektedir.

Serokonversiyon göstermeyen 3'lü serumlarının Kompleman Birleşmesi ve ELISA testleri sonuçları Tablo III de verilmiştir. Görüldüğü gibi bazı serumlarda transplantasyon sonrası 2 misli artışlar elde edilmesine rağmen serokonversiyon kriteri dışında kalmaktadır.

TABLO II : Sitomegalovirus antikorü yönünden serokonversiyon saptanan transplantasyon hastalarının transplantasyon öncesi transplantasyondan sonraki 2.ve 3. ay alınan serum örneklerindeki Kompleman birleşmesi ve ELISA testleri antikor düzeyleri :



TABLO II: Devami



- Transplantasyon öncesi antikor titresi
- ▨ Transplantasyondan 2 ay sonra antikor titresi
- Transplantasyondan 3 ay sonra antikor titresi
- ELISA deneyinde optik dansite değeri (492 nm)

TABLO III: Serokonversiyon göstermeyen böbrek transplantlı hastaların transplantasyon öncesi transplantasyondan sonra 2.ve 3. aylarda alınan serum örneklerinde saptanan sitomegalovirus kompleman birleşmesi ve ELISA antikor düzeyleri :

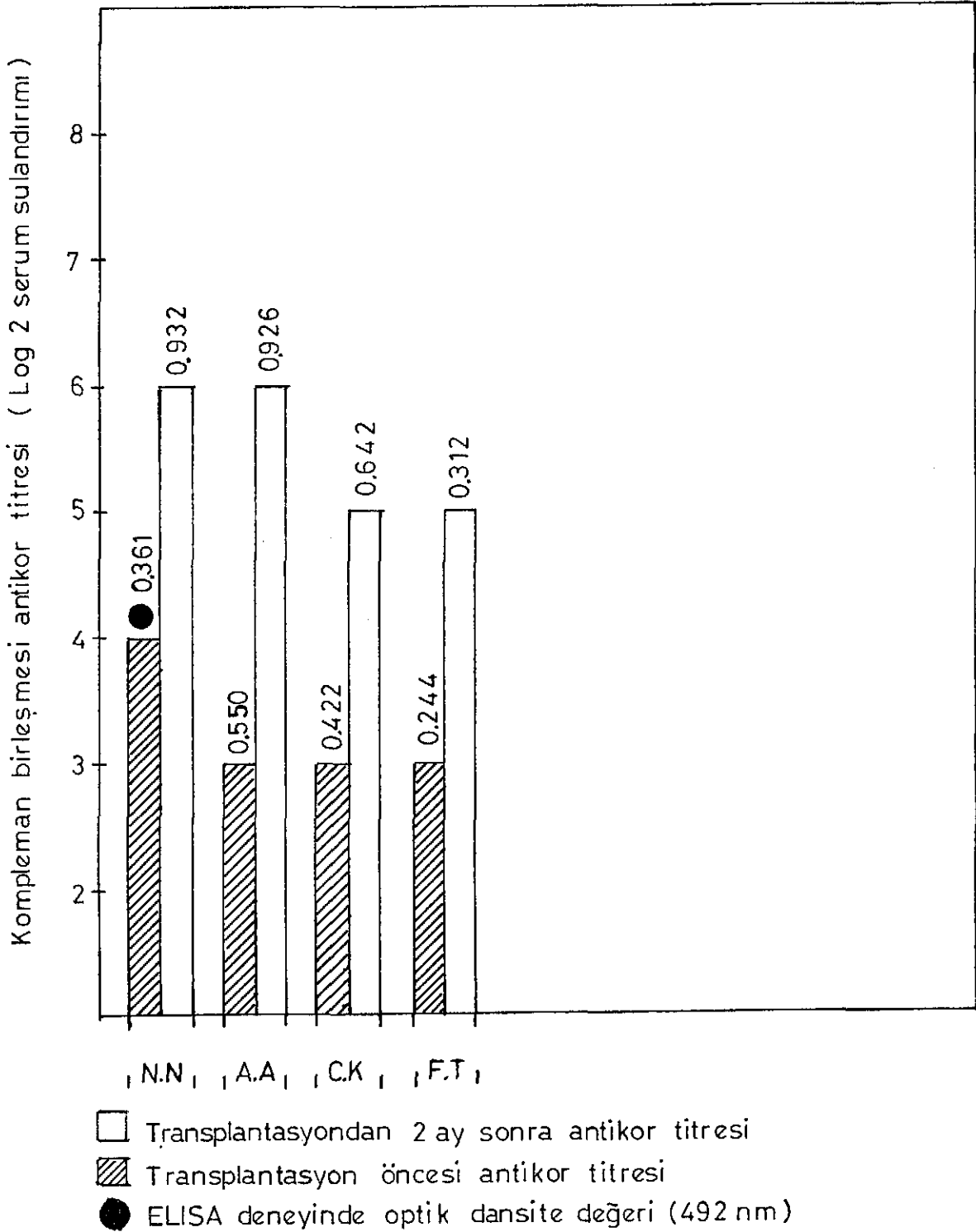
Hasta	Transplantasyon öncesi (2ay)		Transplantasyon sonrası (2ay)		Transplantasyon sonrası (3ay)	
	KB titresi	ELISA O.D	KB titresi	ELISA O.D	KB titresi	ELISA O.D
A B	1 / 32	0.485	1 / 16	0.293	1 / 32	0.299
A D	1 / 4	0.122	1 / 8	0.109	1 / 8	0.283
A K	1 / 16	0.279	1 / 16	0.161	1 / 32	0.376
C B	1 / 8	0.146	1 / 16	0.365	1 / 16	0.459
A K	1 / 16	0.208	1 / 32	0.371	1 / 32	0.495
R S	1 / 8	0.152	1 / 16	0.180	1 / 16	0.240
A P	1 / 16	0.407	1 / 16	0.556	1 / 16	0.454

Böbrek transplantasyonu yapılan bireylerde transplantasyon öncesi ve transplantasyondan sonraki 2. ayda alınan serum örneklerinde CMV antikorlarını Kompleman Birleşmesi ve ELISA testleri ile araştırılması :

Transplantasyona alınan ve takip edilen 35 hastadan 15'i sadece 2. ayda kontrole geldiği için serum örnekleri alınabilmiş ancak daha sonraki örnekler temin edilememiştir. Bu nedenle çalışmanın bu kısmında 15 hasta ayrı olarak sınıflandırılmıştır. CMV antikoru yönünden incelenen bu 15 hastanın transplantasyon öncesi ve transplantasyondan sonraki 2. ayda alınan serum örnekleri yalnız 4 hastada serokonversiyonun saptanmasına olanak vermiştir. Tablo IV de de görüldüğü gibi transplantasyon önce ve sonrası kompleman birleşmesi antikorlarında 4 kat ve daha fazla artış saptanan bu 4 serumda aynı zamanda ELISA optik dansite artışları da saptanmıştır. Ancak bu grup serumların 11'inde Kompleman Birleşmesi testi ile serokonversiyon saptanmamıştır. Serokonversiyon saptanmayan 11 serumun Kompleman Birleşmesi titreleri ve ELISA optik dansiteleri Tablo V de gösterilmiştir.

Bu gruptaki hastalarda 2 ay içerisinde 15 hastanın 4 ünde serokonversiyon saptanması transplantasyondan sonraki ikinci ayda % 26 oranında CMV aktivasyonu ifade etmektedir. Ancak genelde çalışılan 35 serum göz önüne alındığında aktive olan ve serokonversiyon olarak saptanan olgu adedi 17 dir. Bu sonuçta çalışılan 35 serumun % 48.57 sinde CMV aktivasyonunu ifade etmektedir.

TABLO IV : Sitomegalovirus antikorü yönüнден serokonversiyon saptanan transplantasyon hastalarının transplantasyon öncesi ve transplantasyondan sonraki 2.ayda alınan serum örneklerindeki Kompleman birleşmesi, ELISA testleri antikor düzeyleri :



TABLO V: Serokonversiyon göstermeyen böbrek transplantasyon hastalarının transplantasyon öncesi ve transplantasyondan sonraki 2. aylarda alınan serum örneklerinde saptanan CMV Kompleman birleşmesi, ELISA antikor düzeyleri :

Hasta	Transplantasyon öncesi		Transplantasyon sonrası (2ay)	
	K B titresi	ELISA O.D	K B titresi	ELISA O.D
H.K	1/16	0.693	1/32	0.723
C.V	1/8	0.058	1/8	0.223
K.A	1/4	0.167	1/4	0.077
H.B	1/32	0.384	1/32	0.949
K.M	1/4	0.020	1/4	0.070
E.A	1/16	0.239	1/16	0.292
B.K	1/4	0.143	1/4	0.211
M.G	1/8	0.402	1/8	0.394
A.K	1/4	0.347	1/8	0.480
M.Y	1/16	0.460	1/16	0.634
M.Y	1/8	0.429	1/16	0.589

Böbrek transplantasyonuna alınan hastalardan toplanan transplantasyon öncesi ve transplantasyon sonrası idrar örneklerinde CMV inklüzyon cisimciğinin araştırılması :

Primer CMV enfeksiyonunda veya CMV'un latent durumdan belirli nedenlerle aktive olduğu olgularda idrardan virusun salgılandığı, buna bağlı olarak idrarda CMV ile enfekte hücrelerin virusa özgül intranükleer genellikle bazofilik, tipik inklüzyonların, olguların belirli bir yüzdesinde saptanması yalnızca teşhise yardımcı bir kriter olarak kabul edilmektedir. Bu noktadan hareket ederek transplantasyon hastalarında transplantasyondan önce ve transplantasyondan sonraki ikinci ve üçüncü aylarda idrar örnekleri toplanmış ve inklüzyon cisimciği yönünden incelenmiştir.

Transplantasyon öncesi toplanan 35 idrarın yalnızca 4'ünde inklüzyon cisimciği toplanmıştır ki bu da tüm olguların % 11.42'sini oluşturmaktadır.

Ancak transplantasyondan sonra özellikle immunosupresyona bağlı olabilecek aktivasyon sonucunda 35 hastanın 12'sinde inklüzyon cisimciği pozitifleşmiştir. Bu sonuçta 2 ay içerisinde % 34.28'e ulaşan bir seropozitifliği ifade etmektedir. Inklüzyon cisimciği pozitifleşen hastaların hemen hepsinde serokonversiyon saptanmıştır. Transplantasyondan sonraki 3. ayda kontrole gelen 20 hastadan idrar örneği toplanabilmiş ve bunların 8'inde inklüzyon cisimciği pozitif olarak bulunmuştur. Bu sonuçta takip edilen hastaların 3. ayda % 40 oranında sitomegalik inklüzyon cisimciği pozitifliğini ifade etmektedir.

V . T A R T I Ş M A

Herpes grubu viruslar son yıllarda iki önemli ana özellikleri yönünden geniş araştırma konularına model sistem olarak alınmaktadırlar. Bu iki özellik, grup üyelerinin latent enfeksiyon yapma yetenekleri ve onkogenik potansiyelleridir. Herpes grubu üyelerinden özellikle HSV-1, CMV ve EBV konağa asemptomatik primer enfeksiyon ile girmekte ve latent kalabilmektedir. Pratikte aktivasyonu çeşitli etkenlerle uyarılabilen en önemli Herpes grubu viruslar HSV-1 ve CMV'dir (1).

Çalışma konumuzu oluşturan CMV genellikle asemptomatik olarak konağa girdikten sonra özellikle salgı bezlerine olan affinitesi nedeniyle bu hücrelerde çoğalmakta ve büyük bir olasılıkla yine aynı hücrelerde latent halde kalabilmektedir. Latent enfeksiyonları aktive eden, en önemli faktörler arasında yer alan konağın immun baskılanmasıdır. Bu nedenle CMV'un aktivasyonu genellikle immun sistem baskılanmasının meydana geldiği doğal veya gerekli olduğu durumlarda ortaya çıkmaktadır. Bu durumlardan doğal baskılanmaya HTLV-III enfeksiyonu verilebilir. HTLV-III enfekte hastalarda T hücre depresyonuna bağlı olarak yaygın CMV enfeksiyonu konakta pnömoni oluşturmakta ve bu fırsatçı enfeksiyon ölüm insidansında rol oynamaktadır. Immun baskılanmanın gerekli olduğu en önemli durum doku atılım reaksiyonunu önlemek amacıyla transplantasyon yapılan hastalarda uygulanan immun supresyondur. Özellikle bu uygulamanın böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda önemi büyüktür. Genellikle CMV latent enfeksiyonunun böbrek transplantasyonlu hastalarda aktivasyonu böbrek atılımı ile son bulmaktadır. Bu nedenle transplantasyondan sonra hastaların, transplantasyon sonrası CMV aktivasyonu klinik ve laboratuvar bulguları ile takip edilmesi

gerekmektedir. Bu konuda en fazla pratikte uygulanan hastada serokonversiyonun gösterilmesi ve CMV'un ekskresyonu vücut sıvılarında saptanmasıdır. CMV antikorlarının gösterilmesi için geçmişte ve günümüzde klasik ve yeni geliştirilmiş duyarlılıkları farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında pasif hemaglutinasyon, kompleman birleşmesi testi, lateks aglutinasyon, neutralizasyon ve ELISA gibi testler sayılabilir. Duyarlılıkları farklı olmasına rağmen bütün yöntemlerin antikor düzeylerini başarıyla gösterdikleri literatürde yer almaktadır.

ELISA günümüzde spesifik antikorların saptanması için birçok gelişmiş laboratuvar tarafından en sık kullanılan yöntemdir. Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalar, ELISA ve diğer testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü yönünden tartışılmış ancak serokonversiyonun değeri yönünde kıyaslanmamıştır.

Çalışmamızın ana temasını oluşturan konu, CMV enfeksiyonunun immun baskılanma ile beraber aktive olma olasılığının yüksek olduğu böbrek transplantasyonlu hastalardır. Bu nedenle hastaların transplantasyonu yapılmadan, önceden saptanması ve takibe alınması gerekmektedir. Yurdumuzda ancak doku uygunluk antijenlerinin belirlenmesiyle ve mevcut olanaklarla kısıtlı sayıda da olsa böbrek transplantasyonları başarı ile uygulanmaktadır. Hastaların takip güçlüğü ve yapılan transplantasyon sayısının belirli olması çalışmamıza alınan hasta adedini kısıtlayan en önemli faktörler arasındadır. Buna rağmen yapılan çalışmanın Türkiye'de ilk defa uygulanması bize dış ülkelerde yapılan çalışmalarla sonuçlarımızı ilk defa kıyaslama olanağını tanımaktadır.

Çalışmada yer alan hastalarda transplantasyon öncesi ve transplantasyondan sonraki 2. ve 3. ayda toplanan serum örneklerinde antikor düzeylerinin ölçülmesi CMV enfeksiyonu aktivasyonunun saptanması için en önemli kriter olarak ele alınmış ancak 20 hastada transplantasyon öncesi ve transplantasyon sonrası 2. ve 3. aylarda serum örnekleri toplanabilmiştir.

Çalışmaya alınması planlanan diğer 15 hastadan ise ancak transplantasyon öncesi ve transplantasyon sonrası ikinci ayda 2 serum örneği toplanabilmiştir. Ayrıca 11 hasta transplantasyon öncesi takip edilmiş fakat değişik nedenlerle transplantasyon yapılamadığı için çalışmaya dahil edilememiştir.

ELISA testi total antikor düzeyini ölçmek için çeşitli laboratuvarlar tarafından uygulanmaktadır. Total antikor saptaması ELISA deneyinde optik dansite ile ifade edilmektedir ki "cut-off" değeri olarak belirlenen sınır optik dansitenin altında kalan serumlar, seronegatif, üzerindeki ise seropozitif veya reaktif olarak değerlendirilmektedir. Cut-off değerinin üzerinde olan optik dansite değerleri antikor konsantrasyonu ile yükselmesi beklenir, bu nedenle testin uygulanmasındaki özgülülüğü ve duyarlılığı saptamak gayesiyle pozitif değeri yüksek olan standart serum örneğinin sulandırımalarının O.D. değerlerinin saptanması bu beklentinin doğrulanması yönünden önem taşımaktadır. Gerçekten Şekil I de ifade edildiği gibi yüksek pozitif serum sulandırımları ve bunların optik dansiteleri arasında doğru orantılı bir ilişki mevcuttur.

ELISA testi değerlerinin gerçekliğini doğrulamak üzere CMV serolojisinde kullanılan diğer bir testle kıyaslanması gerekmektedir. Bunun için klasik serolojide sık kullanılan ve duyarlılığı diğer klasik testlerden üstün olan kompleman birleşmesi testi çalışmamızda kıyaslamaya alınmıştır.

Çalışmamıza farklı optik dansite değerleri elde edilen serumların Kompleman Birleşmesi titrelerinin saptanması dahil edilmiştir. Şekil II de görüldüğü gibi optik dansite değerinin altındaki seronegatif serum örnekleri ve "cut-off" değerinin üzerindeki farklı optik dansite değeri içeren serumlar Kompleman Birleşmesi testi ile titre tayinine alınmıştır. Elde edilen sonuçlar ELISA testindeki optik dansite artışı ile Kompleman Birleşmesi testindeki titre artışı arasındaki uyumluluğu pratik uygulama yönünden bir

defa daha kanıtlamıştır. Ancak Şekil II de de görüldüğü gibi ELISA testinde negatif olarak kaydedilen ve "cut-off" değerinin altında bulunan 4. serum örneği kompleman birleşmesi antikorları yönünden pozitif reaksiyon vermişlerdir.

Bu deneye alınan serum adedi sınırlı olmasına rağmen ELISA ile Kompleman Birleşmesi arasındaki uyumluluğu %84.4 olduğu saptanmaktadır.

Bizim elde ettiğimiz sonuçlar ayrıca McHugh ve ark. tarafından elde edilen sonuçlara uymaktadır (90). Araştırmacılar Kompleman Birleşmesi ve ELISA yöntemlerini kıyasladıklarında test edilen 32 serumdan 5 tanesinde Kompleman Birleşmesi testi sonuçlarını pozitif bulmalarına rağmen ABBOTT ELISA testinde sonuçlar negatif olarak kaydedilmektedir. Bu sonuçta Kompleman Birleşmesi ve ELISA testleri arasında % 85.4 oranında bir uyum olduğunu göstermektedir ki bizim bulgularımızla bu çalışma arasında da uyumluluk mevcuttur. Elde ettiğimiz bu sonuçlardan sonra transplantasyon öncesi ve transplantasyon sonrası serumlarımız önce ELISA testi ile daha sonra Kompleman Birleşmesi testi ile CMV'ye karşı oluşan antikorlar yönünden incelenmiş ve serokonversiyonu olan hastalar saptanmıştır.

Wiellard ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmada kompleman birleşmesi ve ELISA IgG testleri CMV antikorlarını saptamak gayesiyle kıyaslanmış ve çalışılan 23 serumdan 4'ü Kompleman Birleşmesi testinde pozitif sonuç verdiği halde ELISA testinde negatif sonuç vermiştir. Bu çalışmadaki uyumluluk oranı da % 82.7 dir (91).

Mevcut çalışmada transplantasyona giren bireylere yaş ortalamaları ve seks yönünden uyumlu 3 kontrol grubu alınmıştır. 35 transplantasyon öncesi hasta serumunun CMV-ELISA titreleri 23 sağlıklı kontrol grubu serumları, 13 böbrek taşı hasta serumları ve 37 Hemodiyalize girmekte olan hasta serumları ile kıyaslanmıştır (Tablo I).

Transplantasyon öncesi bireylerden toplanan serumlarda seropozitiflik yüzdesi (% 94.3), sağlıklı kontrol grubunda ise (% 82.7) dir. Bu gruplarda testlerde serum adedi az olmasına rağmen yüzdeler toplumumuzdaki seropozitifliğe yakın değerler vermiştir (62).

Ancak böbrek taşı hasta kontrolünde ve Hemodiyalize giren hastalarda seropozitiflik oranı % 100 olarak bulunmuştur. Böbrek taşı hastalarda serum adedinin 13 olması gerçek seropozitiflik oranını vermemiş olabilir, ancak hemodiyalize giren hastalarda CMV enfeksiyonu sık görüldüğünden % 100 seropozitiflik normal karşılanabilir. Nitekim ELİSA'ya alınan serumların optik dansite ortalamaları alındığında en yüksek ELİSA optik dansite değer ortalaması 0.563 olarak hemodiyalize giren hastalarda bulunmuştur (Tablo I). Buna karşın transplantasyon öncesi hasta serumlarının ELİSA optik dansite değer ortalaması (0.300) sağlıklı kontrol grubunun ortalamasına (0.261) yakın bir uyumluluk göstermektedir (Tablo I).

Çalışmamıza 46 hastanın alınması planlanmış olmakla beraber 11 hastaya çeşitli nedenlerle transplantasyon yapılamamış ve çalışmaya alınan hasta adedi 35 olarak belirlenmiştir. Bu hastaların hepsinden transplantasyon öncesi serum numunesi toplanmış ve ancak 20 tanesinden transplantasyondan sonraki 2. ve 3. aylarda çift serum örneği, 15'inden ise 2. ayda tek serum örneği toplanmıştır. Transplantasyondan sonra çift serum örneği toplanan 20 hastanın 13'ünde serokonversiyon kriterine uyan 4 misli antikor artışı kompleman birleşmesi testi ile saptanmış (Tablo II), ancak 7'sinde saptanamamıştır (Tablo III). Serokonversiyonunun saptanmasında Kompleman Birleşmesi deneyine ilaveten ELİSA testi de uygulanmıştır. CMV-ELİSA testi total antikorları saptamakta ve Kompleman Birleşmesi testinde de total antikorlar reaksiyona girmektedir.

Tablo II de serokonversiyon gösteren serumların verdikleri ELİSA

optik dansiteleri bloklar üzerine kaydedilmiştir. Görüldüğü gibi kompleman Birleşmesi titresine tam uyumlu artış göstermemekle beraber optik dansite değerlerinde de transplantasyon öncesi ve transplantasyon sonrası serumlar arasında yükselen optik dansiteler saptanmıştır. Ancak yükselme oranları optik dansite yönünden serumlar arasında uyumluluk göstermediği için CMV antikoru serokonversiyonunun gösterilmesi için Kompleman Birleşmesi testinin yorum yönünden ELISA testinden daha geçerli olduğu sonucuna varılmaktadır. Serokonversiyon göstermeyen böbrek transplantlı hastaların transplantasyon öncesi, transplantasyondan sonra 2. ve 3. aylarda alınan serum örneklerinde saptanan CMV-ELISA ve Kompleman Birleşmesi antikor düzeyleri Tablo III de gösterilmiştir. Bu sonuçlar transplantasyon sonrası çift serum örneği toplanan 20 hastada CMV serokonversiyon oranı % 64.7 olduğunu göstermektedir.

Daha önce yapılan transplantlı hastalardaki CMV enfeksiyonuna ilişkin sonuçlar ile, bizim sonuçlarımız uygunluk göstermektedir. Ho ve ark. 32 hastada yaptıkları çalışmada transplantasyondan 6 aylık süre içerisinde 32 hastanın 21'inde (% 66) CMV enfeksiyonu serokonversiyonu saptamışlardır (92). Ayrıca Alaçam ve Anderson pasif H.A yöntemi ile 12 hastanın 6'sını (% 50) transplantasyondan sonra ilk 4 ay içerisinde CMV serokonversiyonunu gösterdiğini saptamışlardır (64). Genellikle seronegatif olan hastalarda primer CMV insidansı transplantasyondan sonra daha düşük oranda görülmektedir (93). Ancak bizim çalışma grubumuz gibi latent CMV enfeksiyonu olan, yani daha önceden seropozitif olan hastalarda CMV serokonversiyonunun görülme sıklığı literatürde de aynı oranda rapor edilmektedir (93,94).

Transplantasyondan sonra tek serumu alınan 15 hastanın 4'ünde serokonversiyon saptanmış olmakla beraber bu hastaların takibe gelmesi halinde oranın artması beklenirdi. Böylece transplantasyondan sonra tek serum

alınan bu hastalarda serokonversiyon oranı 2 ay içerisinde % 26.6 olarak saptanmıştır. Ancak deneye alınan 35 serumun ilk 2 ay içerisinde serokonversiyon oranı % 37.14 olarak saptanmıştır.

Transplantasyondan sonra 2. ayda tek serum örneği alınan hastalarda Kompleman Birleşmesi ve ELİSA sonuçları Tablo V de gösterilmiştir. Burada da görüldüğü gibi Kompleman Birleşmesi titreleri yanında ELİSA optik dancite değerlerinde de belirgin bir artış kaydedilmektedir. Tablo V de görüldüğü gibi 11 hasta ilk 2 ay içerisinde herhangi bir serokonversiyon göstermemiştir.

CMV aktivasyonunun özellikle böbrek transplantasyon hastalarında uygulanan immun supresyona bağlı olarak aktive olmasının saptanmasında serokonversiyon gösterilmesinin dışında virusun özellikle idrardan izolasyonu veya idrarda sitomegalik inklüzyon cisimciğinin gösterilmesi de yardımcı olmaktadır (92,95). Ancak CMV'un izolasyon zorluğu ve bazı hastaların enfeksiyonuna rağmen salgılanmanın az olması, izolasyon çalışmalarının aktif enfeksiyonun saptanmasında serokonversiyon kadar yardımcı olmadığı bilinmektedir (92). Aynı zamanda idrar sedimentindeki hücrelerde inklüzyon cisimciğinin bulunması her olguda saptanmamasına rağmen, saptandığında ancak tanıyı destekleyici bir önem taşımaktadır.

Çalışmamızda başlangıçta virus izolasyonu çalışması planlamasına rağmen aktif enfeksiyon kriteri alamayacağımızdan çalışmamıza dahil edilmemiştir. Bunun yanısıra her hastadan idrar örneği toplanmış ve idrarlar inklüzyon cisimciği yönünden incelenmişlerdir. 35 transplantasyon öncesi hastanın yalnız 4'ünde (% 11.4) inklüzyon cisimciği saptanırken, transplantasyondan sonraki 2. ay idrar örneklerinin 12 sinde (% 34.3) inklüzyon cisimciği pozitif bulunmuştur. Transplantasyondan sonra ancak 3 üncü idrarı toplanabilen 20 hastanın 8'inde (% 40.0) inklüzyon cisimciği sap-

lanmıştır. İnklüzyon cisimciklerinin saptanması serokonversiyon oranları ile tam bir uyumluluk göstermiştir.

Çalışmanın hedef aldığı transplantasyonlu hastalarda immun baskı lanmanın CMV aktivasyonuna neden olması deneysel olarak bir defa daha kanıtlanmıştır. Elde edilen sonuçlarımız literatürde mevcut diğer bilgilerle tam bir uyumluluk göstermektedir. Transplantasyon hastalarının daha uzun süre ile takip edilmesi ve daha fazla hastanın çalışmaya alınması gerçek değeri ortaya koymakta yardımcı olacaktır.

Çalışmanın özellikle ortaya koyduğu en önemli bulgulardan birisi de kompleman birleşmesi deneyinin bu hastalarda serokonversiyonu göstermek yönünden ELİSA ya karşı üstünlük taşımasıdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda da genellikle Kompleman Birleşmesi testi tercih edilen test olarak serokonversiyonu göstermekte kullanılmıştır (64,92,95).

ELİSA testi duyarlı bir test olmakla beraber diğer testler ile aynı özgüllüğü göstermektedir (91).

Ümidimiz Türkiye'de yapılan böbrek transplantasyonlarından sonra CMV aktivasyonunu göstermek üzere sunulan çalışmamız hastaların prognozunu takibinde ve tedavisinde yardımcı olacak yeni rutin testlerin gerekliliğini önemle vurgulayacaktır.

V I . Ö Z E T

Böbrek transplantasyonu sırasında alıcı hastalara uygulanan immüno-supresif tedaviye bağlı olarak gelişebilen sitomegalovirus enfeksiyonlarının tanısı, serolojik testlerle konulabilmektedir. Hacettepe Üniversitesi ve Organ Nakli ve Yanık Tedavi Vakfı Hastanesinden transplantasyon yapılan 35 hastadan transplantasyon öncesi ve transplantasyon sonrası 2. ve 3. aylarda serum örnekleri toplanarak sitomegalovirus aktivasyon oranını saptamak üzere CMV-ELİSA ve Kompleman Birleşmesi testleri uygulanmıştır.

20 hastadan alınan transplantasyon öncesi ve transplantasyon sonrası 2. ve 3. ay örneklerinin test sonuçları bu hastalarda % 65 oranında serokonversiyon oluştuğunu göstermiştir. Diğer 15 hastada transplantasyon öncesi ve transplantasyondan yalnız 2 ay sonra alınan tek serum örneğinin verdiği sonuçlar serokonversiyonun % 26 olduğunu göstermiştir. Böylece 35 hastanın transplantasyondan sonra çeşitli zamanlarda çalışılan serum örneklerinde ortalama % 48.7 oranında CMV aktivasyonu meydana geldiğini göstermektedir.

Çalışmada kullanılan CMV-ELİSA ve CMV-Kompleman Birleşmesi testlerinin duyarlılıkları ve serokonversiyonu göstermekteki özgüllükleri yönünden kıyaslanmışlardır. Çalışmada Kompleman Birleşmesi testinin transplantasyonlu hastalardaki serokonversiyonu göstermek yönünden daha özgül bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

V I . K A Y N A K L A R

1. Alfort C.A., Britt W.J. : Cytomegalovirus. In, *Virology*. eds. Fields BN, Knipe D.M, Chanock R.M, Melnick J.I, Roizman B, Shope R.E, Rawen Press, New York, pp: 629-652 (1985).
2. Evans A.S., Niederman J.C., Cytomegalovirus. In: Veans A.S, ed. *Viral Infections of Humans*. New York, Plenum Medical Book Company, pp: 167-186 (1982).
3. Fiala M., Payne J.E., Berne T.V., Moore T.C., Henle W., Montgomerie J.Z., Chatterjee S.N., and Guze L.B., *Epidemiology of cytomegalovirus infection after transplantation and immunosuppression*. *J. Infect. Dis.*, 132: 421-423 (1975).
4. Betts R.F., Freeman, R.B., Douglas R.G.Jr, Talley T.E. and Rundell B. : *Transmission of cytomegalovirus infection with renal allograft*. *Kidney Int.*, 8: 387-394 (1975).
5. Kilpatrick B.A., and Huang E.S. : *Structural organization of human cytomegalovirus DNA*. 3rd International Symposium on Oncogenesis and Herpesviruses, program and Abstracts, Cambridge, Mass., July 25-29, pp: 45-50 (1977).
6. Sarvo I. and Friedman A. : *Electron microscopy of human cytomegalovirus DNA*. *Arch. Virol.*, 50: 343-347 (1976).
7. Benyesh-Melnick M., Probstmeyer F., McCombs R., Brunschwig J.P. and Vonka V. : *Correlation between infectivity and physical virus particles in human cytomegalovirus*. *J. Bacteriol.*, 92: 1555-1561 (1966).
8. Wright H.T.Jr., Goodheart C.R., and Lielausis A. : *Human cytomegalovirus Morphology by negative staining*. *Virology*, 23: 419-424 (1964).

9. Plummer G., Goodherat G.C., Henson D., and Bowling C.P. : A comparative study of DNA density and behavior in tissue cultures of fourteen different herpesviruses. *Virology*, 39: 134-137 (1969).
10. Kilpatrick B.A., and Huang E.S. : Human sitomegalovirus genome : Partial denaturation map and organization of genome sequences. *J. Virol.*, 24: 261-276 (1977).
11. Fiat A.M., Honess R.W., Heiner D.C., Heint J.W.Jr., Murnane J., and Wallace R. : Cytomegalovirus proteins. 1. Polypeptides of virus and dense bodies. *J. Virol.*, 19: 243-254 (1976).
12. Kim K.S., Sapienza V.J., Carp R.I., and Moon H.M. : Analysis of structural polypeptides of purified human cytomegalovirus. *J. Virol.*, 20: 604-611 (1976).
13. Sarvo I. and Abady I. : The morpogenesis of human cytomegalovirus isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirus and dense bodies. *Virology*, 66: 464-473 (1975).
14. Stinsky M.F. : Human cytomegalovirus : glycoproteins associated with virions and dense bodies. *J. Virol.*, 19: 594-609 (1976).
15. Gupta P., St.Jeor S., and Rapp F. : Comparison of the polypeptides of several strains of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.*, 34: 447-454 (1977).
16. Stinski M.F. : Human cytomegalovirus : Glycoproteins associated with virions and dense bodies. *J. Virol.*, 19: 594-609 (1976).
17. Albrecht T. and Rapp F. : Malignant transformation of hamster embryo fibroblasts following exposure to ultraviolet-irradiated human cytomegalovirus. *Virology*, 55: 53-61 (1973).
18. Vonka V., and Benyesh-Melnick M. : Thermoinactivation of human cytomegalovirus. *J. Bacteriol.* 91: 221-226 (1966).

19. Vonka V. and Benyesh-Melnick M. : Interactions of human cytomegalovirus with human fibroblasts. *J. Bacteriol.*, 91: 213-220 (1966).
20. Furukawa T., Tanaka S., and Plotkin S.A. : Inhibition of human cytomegalovirus rifampin. *J. Gen. Virol.*, 28: 355-362 (1975).
21. Huang E.S. : Human cytomegalovirus. IV. Specific inhibition of virus induced DNA polymerase activity and viral DNA replication by phosphonoacetic acid. *J. Virol.*, 16: 1560-1565 (1975).
22. Postic D., and Doweing J.N. : Susceptibility of clinical isolates of cytomegalovirus to human interferon. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 11(4): 656-660 (1977).
23. Strangert K., Carlstrom G., Jeansson S., and Nord C.E. : Infections in preschool children in group day care. *Acta Paediatr. Scand.*, 65: 455-463 (1976).
24. Mirkovic R., Werch J., South M.A., and Benyesh-Melnick M. : Incidence of cytomegaloviremia in blood bank donors and in infants with congenital cytomegalic inclusion disease. *Infect. Immun.*, 3: 40-45 (1971).
25. Kane R.C., Rousseau W.E., Noble G.R., Tegtmeier G.E., Wulff H., Herndon B., Chin T.D.Y., and Bayer W.L. : Cytomegalovirus infection in a volunteer blood donor population. *Infect. Immun.*, 11: 719-723 (1975).
26. Jordan M.Ç., Rousseau W.E., Noble G.R., Steward J.A., and Chin T.D.Y. : Association of cervical cytomegalovirus with venereal disease. *N. Engl. J. Med.*, 288: 932-934 (1973).
27. Willmott F.F. : Cytomegalovirus in female patients attending a VD clinic. *Br. J. Vener. Dis.*, 51: 278-280 (1975).
28. Davis L.E., Stewart J.A. and Garvin S. : Cytomegalovirus infection. A seroepidemiologic comparison of nuns and women from a venereal disease clinic. *Am. J. Epidemiol.*, 102: 327-330 (1975).

29. Henle W., Henie G., Scriba M., Joyner C.R., Harrison F.S., von Essen R., Paloheimo J., and Klemola E. : Antibody responses to the Epstein-Barr virus and cytomegaloviruses after open heart and other surgery. *N. Engl. J. Med.*, 282: 1068-1074 (1970).
30. Prince A.M., Szumness W., Millian S., and David D.S. : A serologic study of cytomegalovirus infection following blood transfusion in tumor surgery. *J. Am. Med. Assoc.*, 211: 1341 (1971).
31. Kumar M.L., Nankervis G.A., and Gold E. : Inapparent congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.*, 288: 1370-1372 (1973).
32. Bluestone R., Goldberg L.S., Tucker S.M., and Stern H. : Serological studies in asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Arch. Dis. Child.*, 48: 738-740 (1973).
33. Yeager A.S. : Longitudinal, serological study of cytomegalovirus infections in nurses and in personnel without patient contact. *J. Clin. Microbiol.*, 2: 448-452 (1975).
34. Luby J.P., and Shasby D.M. : A sex difference in the prevalence of antibodies in cytomegalovirus. *J. Am. Med. Assoc.*, 222: 1290-1291 (1972).
35. Smith E.E., and Dixon A.St.J. : Infantile spasms and cytomegalovirus replication in WI-38 cells. II. An ultrastructural study of viral penetration. *J. Virol.*, 14: 945-956 (1976).
36. Hanshaw J.B., Scheiner A.P., Moxley A.W., Gaev L., Abel V., and Scheiner B. : School failure and deafness after "silent" congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.*, 295: 468-470 (1976).
37. Reynolds D.W., Stagno S., Stubbs K.G., Dahle A.J., Livingston M.M., Saxon S.S., and Alford C.A. : Inapparent congenital cytomegalovirus infection with elevated cord IgM levels. *N. Engl. J. Med.*, 290: 291-296 (1974).

38. Reynolds D.W., Stagno S., Stubbs, K.G., Dahie A.J., Livingston M.M., Saxon S.S. and Alford C.A. : Inapparent congenital cytomegalovirus infection with elevated cord IgM level. *N. Engl. J. Med.*, 290: 291-296 (1974).
39. Hayes K., Danks D.M. and Gibas H. : Cytomegalovirus in human milk. *N. Engl. J. Med.*, 297: 177-178 (1972).
40. Yeager A.S. : Transfusion-acquired cytomegalovirus infection in newborn infants. *Am. J. Dis. Child.*, 128: 478-483 (1974).
41. Deforest A., Huang N.N., Laraya-Cuasay L.R., Huff D.S. and Lischner H.W. : Cytomegalovirus (CMV) chronic interstitial pneumonitis in infancy. *Pediatr. Res.*, 8: 423 (1974).
42. Alford C.A., Stagno S., and Pass R.F. : Natural history of perinatal cytomegaloviral infection. In: *Perinat Infections. Excerpta Medica, Amsterdam*, pp. 125-147 (1980).
43. Alford C.A. Jr : Chronic congenital infections of man. *Yale J. Biol. Med.*, 55: 187-192 (1982).
44. Hanshaw J.B. : Congenital cytomegalovirus infection. A fifteen year perspective. *J. Infect. Dis.*, 123: 555-561 (1971).
45. Pass R.F., Stagno S., Myers G.J., and Alford C.A. : Outcome of symptomatic congenital CMV infection : Results of Long-term longitudinal follow-up. *Pediatrics*, 66: 758-762 (1980).
46. Dworsky M.E., Yow M., Stagno S., Pass R.F. and Alford C.A. : Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics*, 72: 295-299 (1983).
47. Granstrom M.L. : Perinatal Cytomegalovirus Infection in Man. In: *The Human Herpesviruses : An Interdisciplinary Perspective*, edited by A.J.Nahmias, W.Dowdle, and R.Schinazi. Elsevier, New York. pp: 607-608 (1980).

48. Yeager A.S., Grumet F.C., Hafleigh E.B., Arvin A.M., Bradley J.S. and Prober C.G. : Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J. Pediatr.*, 98: 281-287 (1981).
49. Ballard R.B., Drew W.L., Hufnagle K.G. and Riedel P.A. : Acquired cytomegalovirus infection in pre-term infants. *Am. J. Dis. Child.*, 133: 482-485 (1979).
50. Stagno S., Brasfield D.M., Brown M.B., Casell G.H., Pifer L.L., Whitley R.J. and Tiller R.E. : Infant pneumonitis associated with cytomegalovirus, chlamydia, Pneumocystis, and Ureaplasma - A prospective study. *Pediatrics*, 68: 322-329 (1981).
51. Whitley R.J., Brasfield D., Reynolds D.W., Stagno S., Tiller R.E. and Alford C.A. Jr : Protracted pneumonitis in young infants associated with perinatally acquired cytomegaloviral infection. *J. Pediatr.*, 89: 16-22 (1976).
52. Horwitz C.A., Henle W., and Henle G. : Diagnostic aspects of the cytomegalovirus mononucleosis syndrome in previously healthy persons. *Postgrad. Med.*, 66: 153-158 (1979).
53. Lang D.J. : The epidemiology of cytomegalovirus infections : interpretation of recent observations. In: *Infections of the Fetus and Newborn Infant*. Vol. 3, Krugman S. and Gershon A.A. (eds), Alan R Liss, New York, pp: 35-46 (1975).
54. Stern H., and Tucker S.M. : Prospective study of cytomegalovirus infection in pregnancy. *Br. Med. J.*, 2: 268-270 (1973).
55. Stagno S., Reynolds D.W., Huang E.S., Thames S., Smith R.J. and Alford C.A. : Congenital cytomegalovirus infection : Occurrence in an immune population. *N. Engl. J. Med.*, 296: 1254-1258 (1977).
56. Hanshaw J.E., Sheiner A.P., Moxley A.W., Gave L., and Abel V. : CNS Sequelae of Congenital Cytomegalovirus Infection. In: *Infections of the Fetus and Newborn Infants*. Vol. 3, Krugman S. and Gershon A.A. (eds.) Alan R Liss, New York, pp 47-54 (1975).

57. Leinikki P., Heinonen K., and Pattay O. : Incidence of cytomegalovirus infections in early childhood. *Scand. J. Infect. Dis.*, 4: 1-5 (1972).
58. Kane R.C., Rousseau W.E., Noble G.R., Tegtmeier G.E., Wupp H., Herndon H.B., Chint D.Y. and Bayer W.L. : Cytomegalovirus infection in a volunteer blood donor population. *Infect. Immun.*, 11: 719-723 (1975).
59. Krech U. : Complement fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull. Who.*, 49: 103-106 (1973).
60. Wenzel R.P., McCormick D.P., Davies J.A., Berling C. and Bean W.F. : Cytomegalovirus infection : A seroepidemiologic study of a recruit-population. *Am. J. Epidemiol.*, 97: 410-414 (1973).
61. Stagno S., Reynolds D., Tsiantos A., Fuccillo D.A., Smith R., Tiller M. and Alford C.A. : Cervical cytomegalovirus excretion in pregnant and nonpregnant women : suppression in early gestation. *J. Infect. Dis.*, 131: 522-527 (1975).
62. Kaynar V, Cengiz L. : Cytomegalovirus Kompleman Fikse eden antikorun gebelik dönemindeki durumu. *Türk. Virol. Der.*, 2: 13-18 (1980).
63. Alaçam R. : Toplumumuzda Cytomegalovirus kompleman birleşmesi antikor dağılımının araştırılması. *Mikrobiyol. Bült.*, 14: 47-52, (1980).
64. Alaçam R., Andersen H.K. : Böbrek transplantasyonlu kişilerde sitomegalovirus antikor titrelerinin değerlendirilmesi. *Türk. Virol. Der.*, 2: 7-11 (1980).
65. Ustaçelebi Ş., Köksal İ., Cantürk H., Jedari Seifi S., Ersöz D., Sellioğlu B. : Hamilelikte Torch etkenlerine karşı antikorların saptanması, *Mikrobiol. Bült.*, 20: 1-8 (1986).
66. Michelson-Fiske S., Arnoult J., and Febvre H. : Cytomegalovirus infection of human lung epithelial cells in vitro. *Intervirology*, 5: 354-363 (1975).

67. Vesterinen E., Leinikki P., and Saksela E. : Cytopathogenicity of cytomegalovirus to human ecto- and endocervical epithelial cells in vitro. *Acta Cytol.*, 19: 473-481 (1975).
68. Vonka V., Anisimov A.E. and Macek M. : Replication of cytomegalovirus in human epitheloid diploid cell line. *Arch. Virol.*, 52: 283-296 (1976).
69. Waner J.L., and Budnick J.E. : Three-day assay for human cytomegalovirus applicable to serum neutralization tests. *Appl. Microbiol.*, 25(1): 37-39 (1973).
70. Kim K.S., Moon H.M., Sapienza V.J. and Carp R.I. : Complement fixing antigen of human cytomegaloviruses. *J. Infect. Dis.*, 135: 281-288 (1977).
71. Waner J.L. : Partial characterization of a soluble antigen preparation from cells infected with human cytomegalovirus : Properties of anti-sera prepared to the antigen. *J. Immunol.*, 114:5, 1454-1457 (1975).
72. Graham B.J., Minamishima Y., Dreesman G.R., Haines H.G., and Benyesh-Melnick M. : Complement-requiring neutralizing antibodies in hyper-immune sera to human cytomegaloviruses. *J. Immunol.*, 107: 1618-1630 (1971).
73. Hanshaw J.B., Steinfeld H.J., and White C.J. : Fluorescent-antibody test for cytomegalovirus macroglobulin. *N. Engl. J. Med.*, 279: 566-570 (1968).
74. The T.H., and Lanhenhuysen M.M.A.C. : Antibodies against membran antigens of cytomegalovirus infected cells in sera of patients with a cytomegalovirus infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 11: 475-582 (1972).
75. The T.H., Klein G., and Langenhuysen M.M.A.C. : Antibody reactions to virus specific early antigens (EA) in patients with cytomegalovirus (CMV) infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 16(1): 1-12 (1974).

76. Furukawa T., Fioretti A., and Plotkin S.A. : Growth characteristics of cytomegalovirus in human fibroblasts with demonstration of protein synthesis early in viral replication. *J. Virol*, 11: 991-997 (1973).
77. Fuccillo D.A., Moder F.L., Traub R.G., Hensen S., and Sever J.L. : Microindirect hemagglutination test for cytomegalovirus. *Appl. Microbiol.*, 21: 104-107 (1971).
78. Dienstag J.L., Cline W.L., and Purcell R.H. : Detection of cytomegalovirus antibody by immune adherence hemagglutination. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 153: 543-548 (1976).
79. Knez V., Stewart J.A. and Ziegler D.W. : Cytomegalovirus specific IgM and IgG response in humans studied by radioimmunoassay. *J. Immunol.*, 117: 2006-2013 (1976).
80. Fortunato J., Goldschmidt B., Menonna J., Dowling P., and Cook S. : Rapid detection of antibodies to cytomegalovirus by counter immunoelectrophoresis. *J. Infect. Dis.*, 135: 432-437 (1977).
81. Furukawa T., Jensen F., Fioretti A., and Plotkin S.A. : Presipitin antibody in human cytomegalovirus infection. Abstracts of the annual meeting-1972 American Society for Microbiology (1972).
82. Schmidt N.J., Dennis J., and Lennette E.H. : Plaque reduction neutralization test for human cytomegalovirus based upon enhanced uptake of neutral red by virus-infected cells. *J. Clin. Microbiol.*, 4: 61-66 (1976).
83. Furukawa T., Hornberger E., Sakuma S., and Plotkin S.A. : Demonstration of immunoglobulin G receptors induced by human cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.*, 2: 332-336 (1975).
84. Grist N.R., Bell E.J., Follett E.A.C., Urquhart G.E.D., eds. a) Cell culture. pp. 60-80, b) Complement fixation tests. pp: 95-116, c) Reagents and methods. pp. 215-223, In: *Diagnostic Methods in Clinical Virology*. Blackwell Scientific Publication, 1979.

85. Cremer N.E., Schmidt N.J., Jensen F., Hoffman M., Oshiro L.S. and Lenneth E.H. : Complement-fixing antibody in human sera reactive with viral and soluble antigens of cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* 1: 262-267 (1975).
86. Waner J.L., Weller T.H., and Kevy S.V. : Patterns of cytomegaloviral complement-fixing antibody activity a longitudinal study of blood donors. *J. Infect. Dis.*, 127: 538-543 (1973).
87. Betts R.F., George S.D., Rundeh B.B., Fretman R.B., and Douglas R.G Jr: Comparative activity of immunofluorescent antibody and complement-fixing antibody in cytomegalovirus infection. *J. Clin. Microbiol.*, 4: 151-156 (1976).
88. Krech V.M., Jung M., and Sonnabend W.A. : Study of complement-fixing immunofluorescent, and neutralizing antibodies in human cytomegalovirus infections. *Z. Immunitaetsforsh Immunobiol.*, 141: 411-429 (1971).
89. Joseph J.M., *Viral and Rickettsial diagnostic procedures*, In: Frankel S, Reitman S, Sonnenwirth AC, eds. *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*, pp. 1595-1647, C.V. Mosby Company (1970).
90. McHuhg T.M., Casavant C.H., Wilber J.C. and Stites D.P. : Comparison of six methods for the detection of antibody to cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.*, 22: 1014-1019 (1985).
91. Wiellard F., Scherders J., Hooljmans A., Dagelincky C. : Development and preliminary evaluation of two ELISAs for detection of Anti-CMV IgG and IgM antibodies. *J. Virol. Methods*, 10: 363-369 (1985).
92. Monto Ho, Saktidej S., Dowling N.J., Leona A., Armstrong A. : The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.*, 293: 1109-1112 (1975).
93. Warrel M.J., Chinn L., Morris P.J., Tobin J.O.H. : The effects of viral infections on renal transplants and their recipients. *Q. J. Med.*, 194: 212-31 (1980).
94. Chatterjee S.N., Fiala M., Weiner J., Stewart J.A., Stacey B., Warner N. : Primary cytomegalovirus and opportunistic infection. *J.A.M.A.*, 240: 2446-9 (1978).

95. Luby J.P., Ware A.J., Hull A.R., Helderman J.H., Gailiunas P., Butler S., Atkins C. : Disease due to cytomegalovirus and its long-term consequences in renal transplant recipients. *Arch. Intern. Med.*, 143: 1126-1129 (1983).