

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**RİSKLİ GEBELERDE SİTOMEGALOVİRÜS
İNFEKSİYONLARININ SEROLOJİK VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. GONCA EVCİL

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Sevin KIRDAR

AYDIN-2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**RİSKLİ GEBELERDE SİTOMEGALOVİRÜS
İNFEKSİYONLARININ SEROLOJİK VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. GONCA EVCİL

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Sevin KIRDAR

AYDIN-2009

Bu çalışma ADÜ Fon Saymanlığı tarafından TPF-06001 sayı ile desteklenmiştir

TEŞEKKÜR

Mikrobiyoloji alanında yetişmemde katkıda bulunan, uzmanlık eğitimim boyunca sundukları bilimsel, verimli ve destekleyici ortam için başta Anabilim Dalı Başkanı'mız Prof. Dr. Neriman AYDIN'a, tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar olan süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan, tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, değerli danışman hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Sevin KIRDAR'a, çalışma sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, değerli hocalarım Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN, Yrd. Doç. Dr. Mete EYİĞÖR, Yrd. Doç. Dr. Berna GÜLTEKİN, Yrd. Doç. Dr. Murat TELLİ ve Prof. Dr. Sema ERTUĞ ile Doç. Dr. Hatice ERTABAKLAR'a teşekkür ederim. Ayrıca tez örneklerimin sağlanmasında emeği geçen, Adnan Menderes Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı çalışanlarına, özellikle öğretim üyesi Doç. Dr. Ali Rıza Odabaşı'na teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yetişmemde emeği geçen Uzm. Dr. Cavide SARI'ya, tez çalışmalarım süresince benden her konuda ilgi ve desteğini esirgemeyen birlikte çalıştığım Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nın tüm çalışanlarına, özellikle değerli arkadaşlarım Uzm. Dr. Vesile YAZICI'ya teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bu zor çalışmanın her aşamasında maddi ve manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan değerli eşime, anneme, babama ve oğluma sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TABLO DİZİNİ	II
KISALTMALAR	III
BÖLÜM I	
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	
Sitomegalovirüs	3
Tarihçe	3
Sitomegalovirüsün yapısı	4
Fiziksel ve kimyasal etkenlere duyarlılığı	6
Virüsün üremesi (replikasyon)	7
Patogenez	8
Klinik bulgular	12
<i>Konjenital CMV enfeksiyonu</i>	13
<i>Perinatal enfeksiyon</i>	14
<i>Postnatal enfeksiyon</i>	15
Epidemiyoloji	16
Tanı	18
<i>Örneklerin direkt incelenmesi</i>	19
<i>Histopatolojik inceleme</i>	20
<i>İmmünfloresan testi</i>	20
<i>Antijenemi testi</i>	20
<i>Elektron mikroskobu</i>	22
<i>Moleküler yöntemler</i>	22
<i>Hücre kültür yöntemleri</i>	24
<i>Konvansiyonel hücre kültürü</i>	24
<i>Hızlı hücre kültürü</i>	25
Serolojik yöntemler	26
<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	26
<i>İmmünglobulin G avidite testi</i>	28
<i>Lateks aglütinasyon (LA) testi</i>	29
<i>Kompleman fiksasyon (KF) testi</i>	30
<i>Antikompleman immünfloresan (AKIF) testi</i>	30
<i>İmmünfloresan antikor testi (IFA)</i>	30
<i>Radyoimmün assay testi (RIA)</i>	30
<i>Genotiplendirme</i>	30
Tedavi	31
Korunma	33
BÖLÜM II	
GEREÇ-YÖNTEM	35
Çalışma grubu	35
Sitomegalovirüs IgG ve IgM antikorlarının ELISA yöntemiyle araştırılması	35
Sitomegalovirüs IgM ELISA testinin yapılışı	35
Sitomegalovirüs IgG ELISA testinin yapılışı	36

Sitomegalovirüs IgG Avidite testi	37
Sitomegalovirüs IgG avidite testinin yapılışı	37
Sitomegalovirüs DNA tespiti için kullanılan PZR yöntemi	38
Ekstraksiyon aşaması	38
Amplifikasyon aşaması	39
Verilerin yorumlanması	40
İstatistiksel analiz	40
BÖLÜM III	
BULGULAR	41
Çalışma grubu	41
BÖLÜM IV	
TARTIŞMA	46
SONUÇ	55
ÖZET	56
İNGİLİZCE ÖZET	58
KAYNAKLAR	60
Ek-1	76

TABLO DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo I. Herpes virüs ailesi	4
Tablo II. Doğurganlık yaşındaki kadınlarda CMV antikor prevalansı	17
Tablo III CMV IgG absorbans değer tablosu	41
Tablo IV CMV IgM absorbans değer tablosu	42
Tablo V. Sitomegalovirüs IgG seropozitif gebelerin yaşlara göre dağılımı	43
Tablo VI Gebe sayısının gebelik haftalarına göre dağılımı	44
Tablo VII. Gebe örneklerindeki serolojik ve PZR yöntemlerinin sonuçları	44
Tablo VIII Amniyon sıvı örneklerinde Real Time PZR çalışma verileri.	45
Şekil I Gebelerin CMV infeksiyonları açısından taramaları ve izlemleri	29

KISALTMALAR

CMV	: Sitomegalovirüs
DNA	: Deoksiribonükleik asit
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome: Kazanılmış immün yetmezlik sendromu
ORF	: Open Reading Frame: Açık okuma alanı
HSV	: Herpes simplex virus
VZV	: Varicella zoster virus
EBV	: Epstein barr virus
RNA	: Ribonükleik asit
IE	Immediate early
mRNA	: Messenger ribonükleik asit
MHC	: Major histocompatibility complex
CTL	: Cytotoxic T lymphocyte: Sitotoksik T lenfosit
NK	: Natural killer (Doğal öldürücü)
IF	: İnterferon
gB	: Glikoprotein B
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
PMNL	: Polimorf nüveli lökositler
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
kD	: kilodalton
EDTA	: Etilendaimintetraasetik asit
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
bDNA	: Branched DNA: Dallanmış DNA
NASBA	: Nucleic acid sequenced based amplification
NaOH	: Sodyum hidroksit
HCl	: Hidroklorik asit
EMEM	: Eagle minimal essential medium
CPE	: Cytopatic effect: Sitopatik etki
IFA	: İmmun floresan antikor
ACIF	: Anticomplement immunfloresans
CF	: Complement fixation
LA	: Latex agglütination
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
PFU	: Plaque forming unit: Plak oluşturma birimi
IgG	: Immunoglobulin G
IgM	: Immunoglobulin M
RIA	: Radioimmünassay
RF	: Romatoid faktör
GCV	: Gansiklovir
CMVIG	: Cytomegalovirus Immünoglobulin
TMB	: Tetrametilbenzidin
dNTP	: Deoxyribonucleotide triphosphate
AI	: Avidity index

GİRİŞ VE AMAÇ

Sitomegalovirüs (CMV), herpes virüs ailesinden *Betaherpesvirinae* alt ailesinin bir üyesi olup çift iplikli bir deoksiribonükleik asit (DNA) virüsüdür. İmmün sistemi normal olan konaklarda hiç belirti vermeyen CMV enfeksiyonu, acquired immune deficiency syndrome: kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS) ve transplant hastaları gibi immün sistemi bozulmuş olan bireylerde ve intrauterin dönemde ciddi sorunlara neden olmaktadır. Primer CMV enfeksiyonu immün sistemi sağlam kişilerde genellikle hafif ve semptomsuz seyretmektedir. Ancak, virüs immün sistem tarafından tam olarak uzaklaştırılmamakta ve enfekte hücrelerin bir bölümünde latent enfeksiyon oluşturmaktadır (1). Diğer insan herpes virüslerinde olduğu gibi, serumda antikörlerin varlığına rağmen, periyodik viral yayılım ve reaktivasyon dönemleri görülmektedir (2).

Tüm dünyada yaygın olarak görülen CMV, her yaştan, ırktan ve sosyoekonomik durumdaki insanları enfekte edebilen bir virüstür (1). Seroprevalans oranları gelişmiş ülkelerde %40-60 iken gelişmekte olan ülkelerde %90-100 dolaylarındadır (3).

İnsan sitomegalovirusu (HCMV), Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve bazı Avrupa ülkelerinde viral intrauterin enfeksiyonların en sık nedenidir (4,5). Canlı doğan infantların %0.3-2'sini etkilemektedir (6,7). Anneden bebeğe enfeksiyonun geçiş oranı, gebeliğin bütün trimesterlerinde benzer oranlara sahiptir. Ancak primer maternal enfeksiyonun geçirildiği gebelik yaşı ile fetal enfeksiyonun sonuçları arasındaki ilişki hakkında bilinenler kısıtlıdır (8). Bazı yayınlarda gebeliğin ilk 16 haftasında oluşan enfeksiyonun fetüste oluşturabileceği hasarın daha fazla olduğu bildirilmektedir (6,9).

Sitomegalovirus ile enfekte kişilerin %90'ı asemptomatik iken, ancak %10'u klinik belirti vermektedir (7,10-12). Semptomatik yenidoğanda ölüm oranı %20-30 iken, hayatta kalanların çoğunda mental retardasyon, intrauterin gelişme geriliği, koryoretinit, mikrosefali, nörosensöriyal işitme kaybı, mikroftalmi, intrakranial kalsifikasyon, hepatomegali, sarılık, trombositopeni, karaciğer fonksiyon bozukluğu gibi birçok anomalilere rastlanmaktadır (7,11-13). Asemptomatik bebeklerin %7-15'de yaşamlarının ileriki dönemlerinde, genellikle çocukluk çağında işitme kaybı, görme bozuklukları, öğrenme güçlükleri ve mental retardasyon gibi sekeller gelişebilmektedir (14,15).

Gebeliğin özellikle ilk trimesterinde geçirilen primer CMV enfeksiyonu bebekte ağır konjenital enfeksiyon bulguları ve anomalilerine neden olmaktadır. Gebelik öncesi geçirilen primer CMV enfeksiyonu gebelik döneminde reaktivasyon şeklinde görülebilmekte

veya seropozitif anneler gebelik döneminde yeni bir CMV kökeni ile ekzojen yoldan infekte (reinfeksiyon) olabilmektedir (1,14,16). Gebeliği sırasında rekürren CMV infeksiyonu olan anneden bebeğe vertikal geçiş oranı %0.2-2.2 iken, primer CMV infeksiyonu olan annede bu oran %20-50'ye çıkmaktadır (6). Diğer bir deyişle annenin konsepsiyon öncesi virüse karşı immunitesi, infeksiyon riskini %90 oranında azaltmaktadır (9). Sitomegalovirüs infeksiyonunun görülme sıklığını azaltmak için tek seçenek, hijyen için alınan önlemler ve aşı uygulaması ile infeksiyondan korunma gibi görünmektedir (1).

Konjenital CMV infeksiyonunun prenatal tanısı, gebe kontrolü ve riskli yenidoğan takibi için stratejilerin planlanması açısından önemlidir. Gebelikte CMV infeksiyonlarının tanısı genellikle serolojik yöntemlerle yapılmaktadır. Günümüzde CMV infeksiyon tanısında virüsün varlığının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve hücre kültür yöntemleri ile gösterilmesi önerilmektedir.

Gebelerdeki primer ve rekürren CMV infeksiyonları, anne ve bebeğinde ciddi sonuçlara neden olabileceğinden iyi tanımlanması ve buna göre korunma ve tedavi şekillerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada, riskli gebeliklerinden dolayı amniyosentez yapılan gebelerin, kan ve amniyon sıvı örneklerini, serolojik ve moleküler yöntemlerle inceleyerek, sitomegalovirüs IgG ve IgM antikorlarının seropozitiflik oranlarını belirlemek ve konjenital CMV infeksiyonu varlığını tespit etmek amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Sitomegalovirüs

Tarihçe

Sitomegalovirus, ilk kez Ribbert tarafından 19. yy. son yarısında bir bebeğin böbreklerinde inklüzyon taşıyan geniş, “protozoon benzeri” hücreler olarak tanımlanmıştır (17,18). Aynı yıllarda Jesionek ve Kiolemenoglou tarafından büyümüş, baykuş gözü görünümünde, intranükleer inklüzyon cisimciği içeren sitomegalik hücrenin tanımı yapılmıştır (2). O tarihlerde bu infeksiyonların bir protozoon nedeniyle oluştuğu ya da sifilizin bir formu olduğu, tükürük bezlerinin başlıca patolojik bölge olduğu düşünülmekte idi (17,18). Goodpasture ve Talbot 1921 yılında patoloji örneklerinde sitomegalik inklüzyon hücre benzerliğine, 1925’te von Glahn ve Pappenheimer herpetik infeksiyonların görüldüğü bireylerdeki lezyonlarda intranükleer inklüzyon cisimciklerinin varlığına dikkat çekmişlerdir. 1950’li yıllarda virus hücre kültüründe izole edilerek “ cytomegalovirus” (Rowe, 1956; Smith, 1956; Weller ve ark. 1957) olarak adlandırılmıştır (17,18).

Virüs ile ilişkili klinik belirti ve bulgular; hepatosplenomegali, trombositopeni, sarılık, intraserebral kalsifikasyon, koryoretinit ve gelişme geriliği olmakla birlikte yaptığı infeksiyon, 1962’de Weller ve Hanshaw tarafından “sitomegalik inklüzyon hastalığı” olarak adlandırılmıştır. İnfeksiyon önceden nadir olarak saptanmaktayken, günümüzde tanı yöntemlerinin gelişmesi ile birlikte daha yaygın olarak belirlenebilmektedir (18,19).

Sitomegalovirusun “posttransfüzyon sendromu”na neden olduğu 1966’da gösterilmiş, aynı zamanda lökosit transfüzyonu ile bulaşıp hastalık yapabileceği ise 1980 yılında bildirilmiştir (3). Sitomegalovirüsün immun yetmezlikli hastalarda en önemli patojen olduğu 1970 ve 1980’li yıllarda ortaya çıkmıştır. Canlı CMV aşısının ilk klinik denemesinin sonuçları 1976’da yayımlanmıştır. Gansiklovir (GCV) CMV infeksiyon tedavisi için ilk antiviral ilaç olarak 1989’da lisans almıştır (17).

Virüsün Yapısı

Sitomegalovirus, herpes virüs ailesi içinde yer alan çift sarmallı bir DNA virüsüdür (17,20,21). Herpes virüs ailesi Tablo. I'de gösterilmiştir.

Tablo I. Herpes virüs ailesi (22).

Alfa-herpesvirinae	Beta-herpesvirinae	Gama-herpesvirinae
Herpes simpleks virüs tip 1 (HSV-1) Human herpes virus 1: HHV-1	İnsan cytomegalovirüsü (HCMV) Human herpes virus 5: HHV-5	Ebstein-Barr virüs Human herpes virus 4: HHV-4
Herpes simpleks virüs tip 2 (HSV-2) Human herpes virus 2: HHV-2	Human herpes virus 6: HHV-6	Human herpesvirus 8: HHV-8
Varicella-zoster virüs (VZV-HSV-3) Human herpes virus 3: HHV-3	Human herpes virus 7: HHV-7	
Herpes B virüs		

Sitomegalovirüs, betaherpesvirüs grubundan olup insan herpes virüs tip 5 olarak da isimlendirilmekte, herpesvirüs ailesi içinde en büyük genoma sahip olmakla birlikte elektron mikroskopisi ile diğer herpesvirüslerden morfolojik olarak ayırt edilememektedir (23). Diğer tüm herpesvirüsler gibi latent kalma ve reaktive olma özelliğine sahiptir. Birçok hücreyi *in vivo* olarak infekte etmekle birlikte, *in vitro* olarak en iyi çoğalabildiği hücre insan fibroblastlardır. Diğer herpesvirüslerinden farklı olarak bu hücrelerde, hem intrasitoplazmik ve hem de intranükleer inklüzyon cisimcikleri oluşturmaktadır (20,24-26).

Sitomegalovirüsün boyutları, 120-200 nm olup herpesviruslar içindeki en büyük virüstür (2,3,25). Çift sarmallı, lineer DNA içeren genomu, bu genomu çevreleyen 162 kapsomerden oluşan ikozahedral simetride bir kapsidi, en dış tabakada da lipid ve glikoproteinden oluşmuş bir zarf yapısına sahiptir. Kapsid ile zarf tabakası arasında tegument ya da matriks denilen, çoğunlukla fosfoproteinlerden oluşmuş bir yapı bulunmaktadır (2,10,17,26,27).

Sitomegalovirüsün kapsid içeriğinde yedi protein bulunmakta bunlar, major kapsid proteini (MCP; UL86), minör kapsid proteini (mCP; UL85), minör kapsid binding protein (mC-BP; UL46) ve smallest kapsid protein (SCP; UL48/49) olarak adlandırılmakta,

ayrıca üç adet “asemblin” protein içermektedirler (28-30). “Asemblin” proteinler virüsün konak hücreden olgunlaşmasında rol almaktadırlar (26).

Sitomegalovirüs yapısında bulunan tegüment en az 25 protein içermekte, birçoğu fosforile edilmektedir. Bu proteinler, viryon formasyonu, virüs transportu, immunomodülasyon ve transaktivasyon ile ilgilidir (31-34). Bu proteinlerden “upper matrix protein” denen pp71 (*ppUL82*), diğer bir protein olan *pUL69* ile birlikte CMV’nin “major immediate-early enhancer-promoter” (MIEP)’inin aktivasyonunda görevlidir. Hücre kültüründe *ppUL32* ve *ppUL9*, virüsün üremesi için önemlidir (32). Temel fosfoprotein olan pp150, *UL32* geni, alt matriks proteini pp65 ise *UL83* geni tarafından kodlanmaktadır. Bunlar viral replikasyon sırasında bol miktarda ekprese edilmekte, pp65 immunomodülasyonda önemli rol almaktadır (28,32). Diğer önemli tegüment proteinleri, pp28 (*ppUL99*), pp212 (dev tegüment proteini, *ppUL48*) ve *ppUL65* tarafından kodlanan pp67 proteindir (28).

Virüsün zarf yapısı iki önemli glikoprotein içermekte, biri *UL55* tarafından kodlanan gB (glikoprotein B) kompleksi, diğerleri sırasıyla *UL75*, *UL115* ve *UL74* tarafından kodlanan gH (glikoprotein H) , gL (glikoprotein L), gO (glikoprotein O)’nun oluşturduğu kompleks olup, bu proteinlerin virüsün hücreye girişinde önemli etkileri olduğu sanılmaktadır (28,29). Nötralizan antikorların en önemli hedefi durumunda olan gB proteini CMV aşısı için aday bir antijen özelliği taşımaktadır (35).

İnsan sitomegalovirüs DNA yapısı daha çok AD 169 suşunda çalışılmıştır (27). Virüsün antijenik özellikleri birbirine çok benzeyen C87, Colburn, T27 suşları da bulunmaktadır (20).

Sitomegalovirüs genomunun büyüklüğü 230 kilobaz olup (23), 230 protein kodlayacak açık okuma alanına (ORF) sahip olduğu gösterilmiştir. Bu proteinlerin birçoğu tanımlanamamış ve fonksiyonları halen bilinmemektedir. (3,36). Viral DNA, 25-35 tanesi yapısal olmak üzere 75 proteini kodlayabilmektedir. Diğer herpesvirüslerden daha fazla sayıda ve ters dizilimli (inverted), uzun-tekrarlayan diziler (yaklaşık 700-900 bp’lik) içermektedir. Açık okuma alanlarından bazıları tüm herpesvirüslerde benzer iken, bazıları Herpes Simpleks virüs tip-1 (HSV-1), Varicella Zoster virüs (VZV) ve Epstein Barr virüs (EBV) ile benzer bulunmuş olup, 46 ORF ise CMV için korunmuş bölgelerdir (2). Virüs, kökenleri genomik heterojenite gösteren tek bir genotipten oluşmaktadır. Buna göre, bireyler birden fazla kökenle enfekte olabilmektedir (1). İmmün yetmezlikli hastalardan elde edilen gB izolatlarındaki genetik farklılık patojeniteyi etkileyebilmektedir (36). Aksine konjenital

infeksiyonlu bebeklerden elde edilen gB genotipleri ile hastalığın ortaya çıkabileceği ya da ciddiyeti arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (36-38).

Sitomegalovirüs genomu, diğer insan herpes virüsleri gibi DNA polimerazı ve kendi replikasyonu için ihtiyaç duyduğu tüm gen paketini kodlamaktadır. Viral DNA polimeraz, antiviral ilaçlar için hedeftir. Sitomegalovirüs DNA polimeraz, *UL54* olarak adlandırılan bir ORF tarafından kodlanır (3). *UL44*, DNA polimerazın oluşumunu arttıran önemli ve yardımcı bir proteindir. *UL54* ve *UL44* proteinleri infekte hücrelerde komplet DNA polimerazın fonksiyonel kompleksini oluştururlar (3,39). *UL97*'nin ürünü olan fosfotransferaz enzimi, GCV'yi fosforile ederek gansiklovir monofosfata çevirmekte ve DNA replikasyon ürünü olarak aktif hale getirmektedir (3,40). *UL97* proteini DNA replikasyonu ile ilgili diğer proteinleri fosforile etmektedir (3).

Sitomegalovirüs infekte ettiği hücrelerde üç ayrı viral partikül oluşturur. Bunlar;

1-Tipik viryonlar

2-İnfeksiyöz olmayan “dense partiküller”; Kapsid ya da DNA içeriği olmayan, bol miktarda tegument proteini pp65 ve viral glikoproteinleri içeren zarf yapılarından oluşmuştur. Hücre sitoplazmasında bol miktarda bulunmaktadır.

3-DNA yapısı içermeyen, kapsid ve zarf taşıyan infeksiyöz olmayan partiküller (2,10,29,41). Bu partiküller içerdikleri kapsid yapısı nedeniyle elektron mikroskopunda, orta kısımda dens bir bölge görülmekte ve morfolojik olarak infeksiyöz viryonlarla karıştırılabilmektedir (2). Bu üç formun miktarı hücre kültüründeki pasaj sayısına ve viral suşa bağlıdır (10,29).

Fiziksel ve kimyasal etkenlere duyarlılık

Sitomegalovirüs fiziksel ve kimyasal koşullara oldukça duyarlı bir virüstür. Isı ile 56°C'de 30 dakikada, 37°C'de bir saatte, %20'lik eter solusyonunda ve pH 5'in altındaki asit ortamlarda 2 saatte, ultraviyole ışınları ile beş dakikada kolaylıkla inaktive olmaktadır (2,27,42). Virüs, %10'luk sodyum hipoklorid solusyonuna duyarlılık göstermektedir (42). Sitomegalovirüs ile infekte hücrelerin etkilenmeden saklanabilmeleri için genellikle %20 serum ve %10 dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiş “Eagle” besiyeri kullanılmaktadır. Distile su süspansiyonlarında saklandığında ise infektivitesini korumaktadır (27).

Virus donma ve çözülmeye duyarlıdır. İnfektivite +4°C'de 48 saat korunmaktadır. Örneğin dondurularak saklanması gerekli ise eşit hacimde 0.4 molar sükröz-fosfat eklenmesi

viral infektivitenin korunmasında yardımcı olabilmektedir. Tüm dondurulmuş örnekler -60 ya da -80°C’de ya da sıvı nitrojende saklanabilmektedir. Virüsün infektivitesinin -20°C’de tam olarak kaybolabileceği bildirilmektedir (24).

Virüsün Üremesi (Replikasyon)

İnsan sitomegalovirüsünün hücre kültüründe çoğalabildiği hücreler sınırlıdır, bu hücreler arasında en sık kullanılan insan deri ya da akciğer fibroblast hücreleridir ayrıca endotelial, epitelial, düz kas hücreleri ve lökositler gibi diğer hücre tiplerinde de çoğalabilmektedir (2,27,29,43,44). Virüs, immunitesi sağlam kişilerde primer infeksiyonun viremik fazında, immun yetmezlikli kişilerde ise primer ve rekürren infeksiyonda, periferik kan polimorfonükleer lökositlerinde (PNL) ve monositlerinde bulunmaktadır (21,45).

Viral replikasyon, lökositlerde, en erken gen ürünlerinin ekspresyonundan ileriye gidememektedirler (22,46). Ağır CMV infeksiyonu olan immun yetmezlikli kişilerde, virüs dolaşımdaki serbest endotelial hücrelerde görülebilmektedir (22,47).

Herpes simpleks virüsün aksine, CMV konak hücre işleyişini durdurmamakta ya da hızlı hücre ölümüne neden olmamaktadır, bunun yerine konak hücre ribonükleik asit (RNA), DNA ve protein sentezini stimüle etmektedir (36).

Sitomegalovirüsün DNA replikasyonu, kapsid formasyonu ve viral DNA paketlenmesi hücre çekirdeğinde meydana gelmektedir. Replikasyonda ilk aşama, virüsün zarf glikoproteinleri ile konak hücre yüzeyine reseptör aracılığı ile tutunup, hücre içine girmesi ile başlamaktadır. Sitomegalovirus için hücre reseptörleri kesin olarak bilinmemektedir (29). Diğer herpes virüslerde olduğu gibi heparan sülfat, virus-konak hücre ilişkisinin ilk aşamasında rol almaktadır. Virüsün hücre yüzeyine tutunmasında beta-2 mikroglobulin molekülü, hücre yüzeyi reseptörleri ile viral glikoproteinler arasında köprü oluşturmakta rol almaktadır (2). Bununla birlikte son yıllarda “epidermal growth” faktörün CMV için bir reseptör görevi gördüğü düşünülmektedir (48). Hücreye tutunmayı, virus zarfı ve hücre zarının füzyonu ile gerçekleşen penetrasyon takip etmektedir (2,29). Kapsidin açığa çıkmasını takiben DNA çekirdek zarı porlarından çekirdeğe ulaşmaktadır (36). Çekirdekte, konak hücre RNA polimeraz II enzimi kullanılarak DNA’nın transkripsiyonu gerçekleşmektedir (2).

Sitomegalovirüs genomunun, ORF’lerinin ardı sıra ekspresyonu ile çok erken, erken ve geç proteinlerin sentezi meydana gelmektedir. Virüsün replikasyonu nispeten yavaş

olup yaklaşık 48-72 saat sürmekte, ilk aşamada en erken (IE) gen ürünleri sentezlenmektedir. Bu gen ürünleri enfeksiyonun geç dönemine kadar eksprese olmaktadır ve aynı zamanda gen ekspresyonunun transaktivatörüdürler. Bunların viral ve hücrel gen ekspresyonunu kontrol etmede önemli rolleri bulunmaktadır (2, 28). En erken dönem proteinleri sentezlendikten hemen sonra sitoplazmada kümelenmektedirler. Bu dönemde erken ve geç döneme ait mRNA'lar gözlenebilmesine karşın translasyonları hemen olmamaktadır (2). En erken gen ürünlerinin transkripsiyonu ile erken gen ürünleri, yani DNA replikasyon proteinleri ve yapısal proteinler sentezlenmektedir. Geç dönem gen ürünleri ise öncelikle yapısal proteinlerdir ve viryonun oluşmasında görev almaktadır (49). Bunlardan nükleokapsid proteinleri çekirdekte toplanmakta ve viral DNA kapsid içine yerleşmektedir. Viral DNA'yı içine alan nükleokapsidler çekirdek zarından zarflarını alarak perinükleer sisternalara tomurcuklanmakta ve sitoplazmik veziküller içinde hücre zarına taşınıp, ekzositoz ile salınmaktadır (2,29,50).

Patogenez

Sitomegalovirus tükürük, idrar, kan, anne sütü ve genital sekresyonlar gibi enfekte vücut sıvılarının mukozal teması yoluyla vücuda girmektedir. Virüs ayrıca kan ürünleri ya da solid organ transplantasyonu ile de bulaşabilmektedir (36,42).

Sitomegalovirüs enfeksiyonun doğal seyri karmaşıktır. Enfeksiyon primer ya da rekürren enfeksiyon şeklinde seyretmektedir (17). Normal konaklarda ilk enfeksiyondan sonra immunité gelişmesine rağmen, CMV latent duruma geçmektedir (1,29). Virüs ile ilk karşılaşma sonucu gelişen primer enfeksiyonun yanı sıra latent enfeksiyonun reaktivasyonu ya da yeni bir CMV kökeni ile reenfeksiyon ortaya çıkabilmektedir. Sitomegalovirüs ile enfeksiyonlar, latent ve bulaştırıcı olmayan (konağın immun sisteminin normal olduğu ve virüsü çevreye bulaştırmaması ile karakterize), bulaştırıcı ve asemptomatik (konağın normal olduğu ancak aktif bir şekilde virüs bulaştırması ile karakterize) ya da semptomatik (konağın hasta olduğu ve virüs replikasyonunun devam etmesi nedeniyle çevreye virüs bulaştırdığı) enfeksiyon şekillerinde olabilmektedir (17).

Sağlıklı bireylerde sitomegalovirüse bağlı primer enfeksiyon genellikle klinik olarak sessiz seyretmekte (19), sadece %1'inde hastalık oluşmaktadır. Primer CMV enfeksiyonunun klinik ve laboratuvar bulguları, temastan 3-8 hafta sonra ortaya çıkmaktadır (36). Primer enfeksiyonun yaklaşık %10'u kırıklık, inatçı ateş, kas ağrıları ve servikal

lenfadenopati daha az sıklıkla pnömoni ve hepatit belirtileri gösteren “mononükleoz benzeri sendrom” şeklinde semptomlar vermektedir. Sitomegalovirus enfeksiyonu konak immün sistemi tarafından sınırlamakta ancak virüs atılımı uzun yıllar devam etmekte ve virüs yaşam boyu vücutta kalmaktadır (1,29).

Sitomegalovirüse bağlı rekürren enfeksiyon. ya endojen virüsün reaktif olması ile ya da eksojen yoldan kazanılan yeni bir virüs kökeni ile oluşabilmektedir. Bu tür enfeksiyonda konak immünitesi varlığında tek ya da birçok bölgeden virüsün aralıklı atılımı olmaktadır. Endojen ya da eksojen virüs kaynağının ayrımı, virüs izolatlarının moleküler analizi ile yapılabilmektedir (1,29). Moleküler çalışmalar reaktivasyonun reenfeksiyondan daha sık geliştiğini göstermektedir (1).

İnfeksiyon başlangıcından sonra viremi birkaç hafta veya ay sürmekte, bu süre içinde düşük düzey viral gen ekspresyonu ile karakterize, virüsün başlıca granülositlerde izole edilebildiği sessiz enfeksiyon oluşmaktadır (36). Sitomegalovirüsün antijen sunan hücrelerde yerleştiği ve buradan reaktif olup enfeksiyon yaptığı gösterilmiştir (36,52-54). Bu hücreler, virüsün, endotelial hücreler, tükürük bezleri, solid organ dokuları, idrar yolu epiteli ve özellikle uterus endotel doku hücrelerine geçişinde rol oynamaktadır (36).

Sitomegalovirüs enfeksiyonuna karşı konağın immün yanıtı enfeksiyonun sınırlandırılmasında oldukça önemlidir (17). Birçok bireyde immün yanıtın semptomatik hastalıktan korunmada önemli rolü olduğu, ancak normal konakta yeni CMV kökenlerinden koruyamadığı düşünülmektedir. Özgül immün yanıtın sıvısal ve hücreli bileşenleri ve doğal immün yanıt bu korumada çok önemlidir (29,36). İmmün yetmezlikli hastalarda yapılan çalışmalarda fonksiyonel sitotoksik efektörlerin (MHC-I, CD8+ T hücreleri ve nonspesifik doğal öldürücü hücreler) semptomatik CMV enfeksiyonundan korunmada önemli rolleri oldukları anlaşılmış fakat bu efektör hücrelerin göreceli katılımı ve viral proteinlerin hedefleri hala tamamen aydınlatılamamıştır (36,55).

Primer CMV enfeksiyonundan sonra uzun süreli olarak hücreli ve humoral immün yanıt gelişmekte, hücreli immün yanıt CMV enfeksiyonunu kontrol etmede daha önemli bir rol oynamaktadır (17,29,49). Hücreli immün yanıt virüsün zarf ve iç kapsid proteinlerine karşı gelişebilmektedir. Sitomegalovirüse özgül sitotoksik T lenfositleri (CTL)'nin çoğu virüsün pp65 denilen fosfoproteinlerine karşı oluşmaktadır (49). Sağlıklı taşıyıcılarda yapılan çalışmalarda, pp65'e özgül CTL'ler belirli bir seviyenin üzerinde

bulunmuştur. Sağlıklı kişilerde de CMV reaktivasyonu olabilmekte ancak hızla gelişen immün yanıtla kontrol altına alınabilmektedir (49,56).

Sitomegalovirüsün infekte ettiği konak hücrede oluşan hücresel immün yanıtta ilk olarak, özgül olmayan doğal öldürücü hücreler (natural killer hücreleri; NK) ve interferon (IF) üretimi görülürken daha geç dönemde CMV spesifik CTL görülmektedir (17,29). Spesifik sitotoksik T hücre yanıtı, CMV infeksiyonunun düzelmesinde gerekli olmakla birlikte, bu hücrelerin supresyonu, infeksiyonun reaktivasyonuna ve yayılmasına neden olmaktadır. İnfeksiyon rekürrensinden korunmada NK ve CTL hücrelerinin aldığı rol önemlidir (10,57). Ayrıca gB'ye karşı oluşan lenfosit cevabı ve CD8+, CD4+ sitolitik yanıtı, infeksiyonun sınırlandırılmasında rol almaktadır. İmmatür ya da yetersiz hücresel immün yanıtı olan kişiler, immün yanıtı normal olan kişilere göre CMV infeksiyonuna daha yatkındır (17). Hümorale immünite, CMV infeksiyonundan korunmada yeterli olmayıp infeksiyonla ilişkili ciddi semptomların azaltılmasında etkilidir (17,44).

Hümorale immunitenin, CMV infeksiyonundan korunmadaki önemi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Örneğin; gB, gM:gN ve gH:gL zarf glikoproteinlerine karşı oluşan nötralizan antikorlar CMV ile infekte kişilerin serumlarında saptanmaktadır (29). *In vitro* olarak gB'nin antijenik ve işlevsel yapısıyla ilgili yapılan çalışmalar, antikorların, virusun hücreye girişini ve hücreden hücreye geçişini engellediğini göstermiştir (17). Nötralizan antikorların iyileşmekte olan normal konak serumlarında fazla bulunması, virusun yayılımını engellemekte olduğunu akla getirmektedir (17,49). Transplant hastaları ve gebelerde, zarf glikoproteini gH bölgesine karşı oluşan nötralizan antikorlar viral yayılımın hafif olmasını sağlamaktadır (17). Yeni çalışmalar, gebelere CMV spesifik hiperimmün globulin uygulamasının konjenital CMV infeksiyonu ve hastalığı riskini anlamlı oranda azalttığını göstermiştir (44,58). Ayrıca CMV'ye karşı annenin antikor yanıtı düşük aviditeli ve zayıf nötralizan aktiviteye sahip olduğunda anneden bebeğe viral geçiş riski artmaktadır (44,59).

Sitomegalovirüs proteinleri ile konak doku uygunluk antijenleri arasındaki moleküler benzerlik bazı organlarda doku hasarına neden olmaktadır. Virüsün bizzat kendisinin bir immunsupresif ajan gibi rol oynayacağı ve ayrıca, immün yetmezlikli hastalarda ve mononükleozlu kişilerde proliferatif T hücre cevabını baskılayabileceği bildirilmektedir (17).

Sitomegalovirüs, T lenfositlerin hipoaktivasyonuna yol açması ile diğer fırsatçı patojenlerin süper infeksiyonlarına neden olmaktadır. Sitomegalovirüs ve *Pneumocystis jirovecii*, ağır interstisyel pnömonili immun yetmezlikli hastalarda genellikle birlikte bulunmaktadır. Virüs aynı zamanda insan immun yetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus: HIV) infeksiyonunu aktive etmekte ve bir kofaktör gibi rol oynamaktadır (25).

Intrauterin CMV geçiş mekanizması: Virüs uterin dokulara kan ya da genital yoldan, asendan infeksiyon yolu ile ulaşmaktadır (36). Konjenital CMV infeksiyonu annenin primer infeksiyonundan sonra gelişen viremiyi takiben, plasental infeksiyon ve hematojen yayılım sonucunda görülmektedir (21,45). Virüsün viremik fazda yayılımı lökositlerle olmaktadır. Viremi (DNA ya da IEmRNA belirlenmesiyle), gebelerde ya da gebe olmayan immunitesi sağlam bireylerde primer infeksiyonu takiben birkaç ay saptanabilmektedir (21,45,60).

Sitomegalovirüsle infekte makrofajlar ve endotelial hücreler virüsü fetüse plasental dolaşım ile geçirmektedir (19,21,36,54). Primer infeksiyonu takiben virüsün fetüse muhtemel geçiş mekanizmaları: (i) infeksiyöz virüsü taşıyan maternal lökositler uterin endotelial hücreleri infekte etmekte, infeksiyonu bitişik sitotrofoblast hücrelerine, daha sonra hematojen yayılım ile villöz kor fibroblastlarına ve fetal kapiller hücrelerine yayılmaktadır, (ii) infekte lökositler sinsityotrofoblast tabakasındaki yarıklar sayesinde doğrudan fetal endotel hücrelerine ulaşmaktadır, (iii) spesifik antikorlarla kaplanan virüs transsitozis ile sinsityotrofoblast tabakasını geçebilmektedir (21,61).

Gebelikte geçirilen CMV infeksiyonunun önemi, gebeliğin hangi döneminde geçirildiği ile ilişkilidir. Özellikle primer CMV infeksiyonu konsepsiyondan önce ya da konsepsiyona yakın zamanda edinilmiş ise fetüse geçiş riski oldukça düşüktür (19,21). Viral atılım erken gebelikte baskılanmakta iken gebeliğin ilerlemesiyle artmaktadır (62,63). Gebeliğin ilk iki trimesterinde edinilen infeksiyon benzer oranlara sahip olmakla birlikte üçüncü trimesterde alınan infeksiyonun fetüse geçiş riski en yüksek seviyeye çıkmaktadır. Gebeliğin ilk iki trimesterinde korunma mekanizmaları gebeliğin geç dönemlerine oranla daha etkindir. Plasenta infeksiyonu, fetal infeksiyon olsa da olmasa da gelişmektedir. Plasenta fetüsün infeksiyondan korunmasında hem bir bariyer görevi görmekte hem de infeksiyonun fetüse geçişinde en önemli bölge olmaktadır (19,21).

Sitomegalovirüs infeksiyonunda konjenital ya da perinatal dönemde infekte olan çocuklarda özgül lenfo-proliferatif cevap bozukluğu diğer hastalara göre daha sık

görülmektedir (64,65). Çeşitli araştırmalarda, asemptomatik konjenital CMV enfeksiyonu olan bebeklerde, semptomatik enfeksiyonu olan bebeklere oranla aktive doğal öldürücü (NK) ve sitotoksik T lenfosit (CD8+) hücrelerinin sayısının ve etkinliğinin artmış olduğu gösterilmiştir (55,65). Bazı çalışmalarda, konjenital CMV enfeksiyonlu bebeklerde, CMV'ye karşı T hücrelerinde sitokin üretiminde bozukluk olduğu gösterilirken (65,66), bu görüşü desteklemeyen çalışmalar da mevcuttur (65,67). Bunun sonucu olarak, konjenital enfeksiyonlu bebeklerde, CMV ile enfekte erişkinlere ya da daha büyük çocuklara oranla, CMV'ye özgül T hücre yanıtının daha fazla baskılandığı bildirilmektedir (65).

Konjenital CMV enfeksiyonu, annenin primer enfeksiyonu ya da rekürren enfeksiyon sırasında gelişmektedir (25,54). Gebelikte oluşan primer enfeksiyonun fetal enfeksiyon ile sonuçlanma olasılığı %30-50 iken, rekürren enfeksiyonda bu oran %2'ye düşmektedir (54). Gebelik öncesi dönemde CMV yönünden bağışıklığı olan ve konjenital CMV enfeksiyonlu bebek doğuran annelerin, bu enfeksiyonu yeni CMV kökenleri ile edindikleri, virusun zarf glikoproteinlerine karşı geliştirdiği özgül antikorların gösterilmesiyle kanıtlanmıştır (65). Annedeki primer enfeksiyonda antiviral immün yanıt virüsün fetüse geçiş anında başlarken, rekürren enfeksiyonda geçiş, hem hücresel hem humoral immün yanıt varlığında gerçekleşmektedir (19,45). Viremi, sadece primer enfeksiyonda kuraldır. İmmün yetmezliği olan hastalarda viremi mevcut iken, immunitesi sağlam konakların rekürren enfeksiyonunda saptanamamaktadır(19,68).

Klinik Bulgular

İmmün sistemi sağlam konaklarda primer CMV enfeksiyonunun büyük çoğunluğu belirtisiz seyretmektedir. Primer enfeksiyonlu gebe kadınların %5'inden daha az bir oranında semptomlar görülmekte iken, daha az oranda da mononükleoz sendromu gelişmektedir. Bu yüzden primer CMV enfeksiyonu, genellikle sadece kliniğe dayandırılarak tanımlanamamaktadır. Gebelerdeki CMV mononükleozunda ateş, servikal adenopati, boğaz iltihabı, hepatosplenomegali, ve ciltte döküntüler gibi major klinik bulguların yanında yorgunluk, başağrısı, miyalji gibi minör klinik bulguların da enfeksiyon başlangıcının kesin olarak belirlenmesi açısından dikkatlice sorgulanması gerekmektedir (20).

Gebelerde primer CMV enfeksiyonunun zamanını bilmek üç nedenden dolayı önemlidir. Birincisi, prognozla ilgili olup, enfeksiyonun konsepsiyondan önce alınması, gebelik sırasında alınmasından daha düşük fetal hasar riskine sahiptir. İkincisi, prenatal

tanıyla ilgili olup yanlış negatif sonuçları azaltmak için infeksiyonun başlangıcını saptamak önemlidir. Günümüzde en duyarlı tekniklerin kullanılmasına karşın halen yanlış negatif sonuçlar rapor edilebilmektedir. Üçüncüsü ise, gebeliğin erken döneminde geçirilen primer infeksiyon konjenital hastalık oluşturma olasılığını arttırmakta olmasındır (19,69).

Konjenital CMV infeksiyonu

Semptomatik konjenital CMV infeksiyonu: İntrauterin dönemde CMV ile infekte olan bebeklerin yaklaşık %10'u doğumda bulgu vermekte iken doğumda asemptomatik olan bebeklerin yaklaşık %10-15'i doğumdan sonraki ileri dönemlerde semptomatik hale gelmektedirler (8,51,65,70).

Semptomatik konjenital CMV infeksiyonuna "sitomegalik inklüzyon hastalığı" (cytomegalic inclusion disease, CID) denmektedir. İntrauterin büyüme geriliği, sarılık, hepatosplenomegali, hematolojik bozukluklar (trombositopeni) ve peteşi, purpura gibi bazı kütanöz belirtilerle seyretmektedir (51,65). Gebeliğin ilk iki trimesterinde etkilenen bebeklerde sık olarak ortaya çıkabilen merkezi sinir sistemi tutulumu belirtileri; mikrosefali, işitme kaybı, ensefalit, inme, apne ya da fokal nörolojik semptomlardır. Bebeklerin yarısında işitme kaybı, %10-20'sinde koryoretinit izlenmektedir (17,41). İlk trimesterde primer maternal infeksiyon nedeniyle konjenital CMV infeksiyonlu bebeklerin yaklaşık %20-30'unda santral sinir sistemi tutulumu gözlenmektedir. Sonraki trimesterlerde bu oran düşmektedir (71). İşitme kaybı ve koryoretinit diğer organ tutulumu olmadan da tek başına görülebilmekte ve yaşamın ilk yıllarında ilerleyici seyretmektedir (16).

Bazen ciddi trombositopenik purpura, hepatit, pnömoni ve myokardit kronikleşmekte ve hayatı tehdit etmektedir. Konjenital malformasyonlar; erkeklerde inguinal herni, brakial ark anomalileri, anoftalmi, diş minesini defektleri, diafragmatik evantrasyon, serebellar hipoplazi şeklinde gelişmektedir. Bununla birlikte bu semptomlar sporadik olup rastgele oluşmaktadır. Bu yüzden CMV'nin normal organogeneze zarar verme gibi teratojenitesi olduğuna dair bir kanıt bulunmamaktadır (17,41,70). Konjenital CMV infeksiyonu aynı zamanda prematurite (% 6 ile % 35 arası) gibi gelişimsel anomalilere de neden olabilmektedir (65).

Sitomegalovirüs infeksiyonunun oluşturduğu hasar, vakaların %20'sinde (tüm konjenital infeksiyonların %1'i) çok ciddi seyretmekte ve ölüme neden olmaktadır (17,41). Semptomatik konjenital CMV infeksiyonu olan bebeklerde ölüm oranı, doğumu izleyen ilk

hafta içerisinde %6-12 arasında değişmekle birlikte yaşamın ilk bir yılı içerisinde %30'lara kadar yükselmektedir (65). Merkezi sinir sistemi tutulumunun duyu bozukluğu, öğrenme güçlüğü, minör motor inkoordinasyon ve emosyonel bozukluk gibi ılımlı formları daha büyük çocuklarda görülmektedir (17,41).

Asemptomatik konjenital CMV enfeksiyonu: Konjenital CMV enfeksiyonlu bebeklerin %85-90'ı doğumda belirti göstermemektedir Asemptomatik konjenital enfeksiyon, gebelik sırasında primer ya da sekonder enfeksiyon geçiren annelerden doğan bebeklerde görülmektedir. Yaşamın ilk iki-üç haftasında idrar ya da tükürkten virüs saptanmakta olup, virüsün idrarla atılımı yıllar boyu devam etmektedir. Asemptomatik konjenital enfeksiyonla doğan çocukların %10-15'inden fazlasında ilerleyici, tek veya çift taraflı işitme kaybı gelişmektedir. İşitme kaybı yaşamın ilk üç ayından sonra saptanmaktadır (17,41). Bu çocukların %5'inde mikrosefali ve nöromusküler defektler, %2'sinde koryoretinit gelişebilmektedir. Asemptomatik konjenital CMV enfeksiyonlu çocuklarda viral yükün belirlenmesinin, işitme kaybının olup olmayacağını tahmin etmede yararlı olabileceği bildirilmiştir (70). Altı ile dokuz yaşlarında sıklıkla işitme kaybı, minimal beyin harabiyeti, koryoretinit ve okul adaptasyon güçlüğü gibi bulgular görülebileceğinden asemptomatik bebeklerin ileri yaş grubuna kadar izlenmesi gerekmektedir (16).

Perinatal enfeksiyon: Sitomegalovirüs, genital sekresyon, anne kanının aspirasyonu, anne sütü ile bulaşabilmektedir. Perinatal enfeksiyon genellikle asemptomatik olarak seyretmektedir (16,23,51). Bu dönemde bulaşan enfeksiyonun klinik bulguları arasında, hepatosplenomegali, lenfadenopati, hepatit, hemolitik anemi, pnömoni bulunmakta, nörolojik sekel ya da işitme kaybı görülmemektedir (16,23).

Perinatal dönemde enfekte olmuş bebeklerin büyük bir kısmında, virüsün vücuttan atılımı aylarca sürmesine karşın akut semptom gelişmemektedir. Bu bebeklerde idrar ile CMV'nin atılımı konjenital enfeksiyonlu yenidoğanlara göre anlamlı olarak daha düşüktür (41). Maternal antikörlerin varlığına rağmen normal zamanında doğan bebekler CMV ile enfekte doğabilmektedir. Enfeksiyon serviks yoluyla geçmektedir. Yaşamın ilk iki ayında CMV ile enfekte olmuş bebeklerde gelişimsel bozukluk oluşabilmektedir (24). preterm bebeklerde yaşamın ilk üç ayında gelişen pnömoninin nedeni olarak CMV, sık olarak saptanmaktadır (41).

Postnatal infeksiyon

Normal konak: Çocuk ve yetişkinlerde postnatal CMV infeksiyonu genellikle belirtisiz seyretmektedir. Bununla birlikte hastaların %10'da klinik bulgular oluşabilmektedir (16). Yüksek ateş, halsizlik, servikal adenopati ile seyreden, heterofil antikor negatif mononükleoz benzeri tablo gelişebilmektedir. Epstein-Barr virüs mononükleozundan farklı olarak tonsillofarenjit ve splenomegali görülmemektedir (16,51). Konjenital infeksiyona zıt olarak işitme kaybı nadirdir. Postnatal infeksiyon çocuklarda otoimmün bozukluk ve Tip-1 Diabetes Mellitus ile de ilişkili bulunmuştur. Gastrointestinal sistem tutulumu, pnömoni, myokardit, perikardit, hemolitik anemi, trombositopeni, artrit, "Guillan-Barre Sendromu" ve meningoensefalit gibi diğer komplikasyonlar nadir olarak görülmektedir (17,41). Son yıllarda CMV'nin, ateroskleroz (16,51), posttransplantal vasküler skleroz ve malignensilerin patogenezinde bir kofaktör gibi rol aldığı düşünülmektedir (51).

İmmün yetmezlikli hastalar: İmmün yetmezlikli hastalarda, normal konaklara göre sistemik hastalık, organ hasarı ve mortalite daha sık görülmektedir (17). Solid organ transplantasyonu yapılan hastalarda CMV infeksiyonu; seronegatif alıcıya CMV pozitif kan ya da organ nakli yapıldığında (primer infeksiyon) ya da CMV pozitif alıcıda immunsupresif tedavi nedeniyle latent infeksiyonun aktivasyonu (reaktivasyon) şeklinde gelişmektedir (16). Transplantasyondan sonra en önemli risk faktörü, viral replikasyonun sınırlanamaması nedeniyle gelişen primer CMV infeksiyonudur. Seropozitif alıcılarda gelişen sekonder CMV infeksiyonu asemptomatik ya da hafif seyretmektedir. Seronegatif alıcılar, seropozitif organ nakli yapıldığında en büyük risk grubunu oluşturmaktadır (16,72). Virüs reaktivasyonuna neden olan etkenler, kullanılan immunsupresif ajanlar (16) ve alıcıda gelişen doku reddi (graft versus host) reaksiyonudur (16,73). Hastalık başlangıçta transplante edilen organda lokalize kalırken daha sonra sistemik olarak yayılarak pnömoni, enterit, hepatit, retinit ve santral sinir sistemi tutulumuna neden olmaktadır (16).

Sitomegalovirüs infeksiyon insidansı, akciğer ve kalp-akciğer alıcılarında %50-80, pankreas ve böbrek-pankreas alıcılarında %50, böbrek, karaciğer ve kalp alıcılarında %8-35'dir (28).

Sitomegalovirüs infeksiyonu AIDS hastalarında kolit, ensefalit, pnömoni veya dört-altı ay içinde körlükle sonuçlanan ilerleyici retinite neden olabilmektedir. Kanser kemoterapisi ve immunsupresif tedavi alan immün yetmezlikli hastalar da CMV infeksiyonu açısından ciddi risk altındadırlar (17).

Epidemiyoloji

Sitomegalovirus tüm dünyada yaygın olarak bulunabilen ve her yaştan insanları infekte edebilen bir virüstür (28). Genel populasyonda seroprevalans, sosyoekonomik duruma, hastanın yaşına ve ülkelere göre farklılık göstermekte ve %40-100 arasında değişmektedir (3,74). Gelişmekte olan ülkelere virüsle karşılaşma, genellikle yaşamın erken dönemlerinde olmakta ve seroprevalans %100'e yaklaşmaktadır. Gelişmiş ülkelere ise orta üst sosyoekonomik seviyedeki genç yetişkinlerde %50'nin altındadır. Bu durum, gebelik öncesi seronegatif olan kadınların gebeliklerinde primer CMV enfeksiyonu geçirmesi ve konjenital enfeksiyonlu bebek doğurma risklerinin yüksek olması açısından önemli görünmektedir (51).

Seroprevalans çalışmalarında; enfeksiyonun erken çocukluk döneminde ve cinsel aktivitenin artmasına paralel olarak reproduktif dönemde pik yaptığı bildirilmektedir. Ancak ülkemizde yapılan bir çalışmada; yurtdışı verilerinden farklı olarak enfeksiyonun yedi yaşında pik yaptığı, enfeksiyonun sıklığında cinsel aktivite artışına paralel bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Aynı çalışmada toplumda ve fertil dönemdeki kadınlarda seroprevalans oranları sırası ile; %93.6 ve %97.4 olarak bildirilmiştir (42).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde her yıl, tüm yenidoğanların %1'i CMV ile infekte doğmaktadır (17,25,70). ABD ve İngiltere'de seropozitiflik oranı %20'nin altında iken Afrika ve Asya'da okul öncesi çocuk yaş grubundakilerin çoğu seropozitifdir (75,76). Konjenital enfeksiyonlu bebek doğurma oranı, genç yaşta bebek doğuranlarda, çok eşli olanlarda ve siyah ırkta artmaktadır (75,77). İsrail'de doğurgan yaş grubundaki kadınlarda CMV seroprevalansı yaklaşık %85'tir (75). Ülkemizde de seroprevalans oranları yüksek bulunmaktadır (78-80). Tablo II'de bazı ülkelereki doğurganlık yaşındaki kadınlarda CMV IgG antikor prevalans oranları gösterilmiştir (29).

Tablo II. Doğurganlık yaşındaki kadınlarda CMV antikör prevalansı

Ülkeler	CMV-IgG (+) (%)
Kore	96
Türkiye	99
ABD	54-77
Japonya	95
Brezilya	67
Finlandiya	71
İtalya	77
Fransa	52
Benin (Afrika)	97

Virüsün bulaşma şekilleri; plasenta yolu, cinsel ilişki, kan transfüzyonu, solid organ ve kemik iliği transplantasyonu ve virüsü yayan kişi ile yakın temastır. Asemptomatik hastalar virüsün ana kaynağını oluşturmaktadır. Semptomatik ve asemptomatik bireylerde virüsün idrar, oral ve genital salgular ile salınması, CMV'nin toplumda yaygın olarak görülmesine neden olmaktadır. Bu yolla CMV salınımı sürekli veya tekrarlayan şekillerde görülmektedir (25,70,75).

Epidemiyolojik açıdan CMV infeksiyonlarının bulaşmasının iki önemli dönemi vardır. Birincisi prenatal dönemde annenin viremisi varsa transplasental olarak, perinatal dönemde bebeğin serviksten geçişi esnasında, postnatal; emzirme döneminde süt ile ve bebeğin, diğer bebekler ve kişilerle yakın temasta olması sonucu gerçekleşmektedir. İkinci dönem ise daha ileri yaşlarda özellikle puberte sonrası dönemdir (25). İlk şekilde geçen infeksiyon tipi, normal term bebeklerde genellikle iyi seyirli iken düşük doğum ağırlıklı preterm bebeklerde ciddi seyredebilmektedir (17,51,70,81).

Yenidoğan döneminde infekte olmayan bebekler okul öncesi dönemde aile içi ve kreşlerde virüsü yayan diğer çocuklardan temas yoluyla infekte olabilmekte, bu horizontal geçişle virüs diğer temas halindeki kişilere de yayılabilmektedir (17,51,70,81). Amerika

Birleşik Devletleri'nde kreşe giden çocuklarda CMV infeksiyonunun yıllık görülme oranı %10-20 iken, bu oran gitmeyenlerde %2-5'tir (15).

Adölesan ve yetişkin dönemindeki seksüel aktivite CMV geçişi için bir risk faktörü gibi görünmektedir (51,70). Tükrük, servikal sekresyon ve semen yoluyla virüs bulaşmakta, primer ya da rekürren infeksiyon meydana gelmektedir (51,75,76).

Virüs hastanelerde kan ürünleri transfüzyonu, kemik iliği ve solid organ transplantasyonları ile de bulaşabilmektedir. Bu nedenle vericilerin CMV açısından taranması hastalık riskini azaltabilmektedir (17). Kan transfüzyonlarında granülositten fakir ya da soğutularak korunmuş kan kullanılması, seronegatif vericiden transfüzyon yapılması ile kan yoluyla bulaş riski azaltılabilmektedir. Ancak seroprevalansın yüksek olduğu toplumlarda, CMV içermeyen kan ürünlerinin verilmesi gibi bir ayırımı gidilmesine gerek olmadığı da bildirilmektedir (42). Sağlık çalışanlarında, çok sayıda tıbbi girişim yapmalarına rağmen, hastalardan geçiş konusunda bir kanıt bulunmamaktadır (17).

Tanı

Sitomegalovirüs infeksiyonunun tanısı klinik ve laboratuvar bulgularla birlikte konulmaktadır. Laboratuvar tanıda kullanılan CMV spesifik testler şöyle sıralanmaktadır (3,16,27);

- 1) Örneklerin direkt incelenmesi
 - a. Histoloji ve eksfoliyatif sitoloji
 - b. İmmünfloresan testi
 - c. Antijenemi testi
 - d. Elektron mikroskopisi incelemesi
 - e. Moleküler amplifikasyon
- 2) Kültür yöntemleri
 - a. Klasik hücre kültürü
 - b. Hızlı hücre kültürü
- 3) Serolojik yöntemler
 - a. Enzim işaretli immunosorban (ELISA) testi
 - b. Lateks aglütinasyon (LA)
 - c. Kompleman fiksasyon (KF)
 - d. Antikomplementer immunfloresan (AKİF)

- e. İmmünofloresan assay (IFA)
- f. Radyoimmunoassay (RIA)

Sitomegalovirüs çeşitli vücut sıvılarından izole edilebilmektedir. Bunlar arasında tam kan, idrar, solunum sistemi sekresyonları (tükürük, boğaz yıkama suyu, bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısı), anne sütü, beyin omurilik sıvısı (BOS), amniyon sıvısı bulunmaktadır (24). İmmün yetmezliği olan kişilerde, lökosit kültürlerinin kullanılması, özellikle semptomatik CMV enfeksiyonunun tanımlanmasında yararlı olmaktadır (20,24). Doku biyopsi örnekleri ve otopsi doku örnekleri virus izolasyonu için kullanılabilir. Çocuklarda CMV spesifik antikörlerinin belirlenmesinde, tükürük örneği invaziv bir girişim gerektirmemesi nedeniyle tercih edilmektedir (24).

Tüm doku örnekleri toplandıktan hemen sonra uygun viral taşıma besiyerine konularak en kısa sürede laboratuvara ulaştırılması gerekmektedir (2,24). Transport zamanı uzayacak olursa örnek en fazla 48 saat +4°C’de bekletilebilir. Örneği dondurmak gerekiyorsa eşit hacimde 0.4M sukroz-fosfat solüsyonu eklenmesi viral aktiviteyi korumaya yardımcı olmaktadır. Tüm donmuş örnekler -60 ya da -80°C’de ya da sıvı nitrojende saklanabilir. Virüs infektivitesini -20 °C’de tamamen kaybedebilmektedir (24).

Örneklerin direkt incelenmesi

Histopatolojik inceleme: Akciğer ya da diğer biopsi örneklerinin Wright, Giemsa, Hemotoksilen-eozin, Papanicolaou boyaları ile histolojik olarak incelenmesi enfeksiyonunun organ tutulumunu göstermek için kullanılmaktadır (24). Diğer herpes virüsler de olduğu gibi boyanmış örneklerde tipik inklüzyon cisimcikleri görülebilmektedir. Sitomegalovirüs ile enfekte herhangi bir dokuda bulunduğu hücreyi genişleten bazofilik intranükleer inklüzyonlarla karakterize, sitomegalik hücreler (baykuş gözü=owl’s eye) dokularda görülebilmektedir (24,82). Bu tipik patolojik bulgu beyin, karaciğer, plasenta gibi enfekte olmuş birçok dokuda da saptanabilmektedir (62,75).

Sitomegalovirüs enfeksiyonunda histopatolojik tanının duyarlılığı virüs izolasyonundan daha az olmasına karşın duyarlılık, virüs antijenlerini saptamak için kullanılan immunohistokimyasal boyalar ve viral nükleik asitleri saptamak için kullanılan in-situ hibridizasyon ile bir miktar artırılabilir. Virüs morfolojik değişiklik yapmadan da dokuları enfekte edebileceği için böyle bir durumda CMV enfeksiyonu olasılığı dışlanmamalıdır. Sitomegalovirüs enfeksiyonu tanısında histopatolojinin özgüllüğü yüksektir.

Bu yöntem ile alınan sonuçlar daha çok yenidoğan infeksiyonlarında değerli olmakla birlikte, virolojik ve serolojik yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir (24,27).

İdrar, tükürük, anne sütü, servikal sekresyonlar ve CMV ile infekte dokulardan hazırlanan sürme (değdirme) preparatlarda eksfoliyatif sitolojik testler (EST) kullanılarak inklüzyon içeren infekte hücreler gösterilebilmektedir. Bu yöntemin özgüllüğü yüksek, duyarlılığı düşüktür. Yalancı negatif sonuçlarla sıklıkla karşılaşılmaktadır (24,27). Virüs izolasyon yöntemlerinin uygulanamadığı durumlarda EST tanıda en yararlı yöntemdir (24).

İmmünfloresan testi (IFA): İndirekt IFA CMV antikorlarının kalitatif ve kantitatif olarak saptanmasında hızlı ve basit olma avantajları bulunmakla birlikte, floresan mikroskop ile değerlendirildiğinden deneyimli personel gerektirmektedir. Spesifik antikor-antijen kompleksleri, fluorescein isothicyanate ile konjuge antikor ve floresan mikroskobu kullanılarak saptanmaktadır (24).

Antijenemi testi: Antijenemi testi, özellikle solid organ ve kemik iliği transplant alıcılarının yanısıra AIDS'li hastalarda CMV viremisini belirlemek amacıyla günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu test ciddi CMV infeksiyonlarının erken tanısında kullanılan duyarlı, özgül ve hızlı bir testtir. Test, lökosit çekirdeğindeki matriks fosfoproteininin (pp65), monoklonal antikorlar kullanılarak immunositokimyasal yöntemle gösterilmesi temeline dayanmaktadır (2,20,24,83). Virüsle infekte hücrelerin sitoplazmasında biriken, bulaşıcılık özelliği olmayan cisimciklerin önemli bir bölümü pp65 proteininden oluşmaktadır. Virüs konağı infekte ettiğinde olgun CMV pp65 proteini viryon ile taşınmakta, viral proteinler sentez edilmeden önce konağın bağışıklık sistemince tanınmaktadır (49). Bu testin kullanımı ile semptomların başlamasından 7-14 gün önce virüsün kendisi ve viral yük belirlenebilmekte, asemptomatik infeksiyon ile CMV hastalığı ayırt edilebilmektedir. Ayrıca antiviral tedavinin etkisi izlenebilmektedir. Merkezi sinir sistemi tutulumu olan AIDS hastalarının BOS lökositlerinde CMV saptanabilmektedir. İmmün yetmezlikli hastaların endotel hücrelerinde pp65 proteininin bulunabilmesi nedeniyle, bazı araştırmacılar tarafından bu proteinin organ tutulumu ve ilerlemiş hastalıkla ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Antijenemi testi sonuçları viral DNA miktarı veya moleküler amplifikasyon test sonuçları ile oldukça uyumludur (24,26,83).

Antijenemi testinde, kanın dekstranla çöktürülmesi yöntemi (24,84) ile lökositler ayrılabilir. Son zamanlarda direkt eritrosit lizis yöntemi ile tam kandan lökositlerin ayrılması yöntemi tanımlanmıştır (24,85). Bu yöntem testin daha kısa sürmesine ve daha fazla

örnekle çalışılmasına izin vermektedir. Direkt eritrosit lizis yöntemi için heparin, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), sitratlı kan örnekleri kullanılmaktadır (24,84). Örnekler, +4°C'de saklanmalı, testin duyarlılığı için 6-8 saat içinde çalışılmalıdır (24,83,84,86). Pozitif örneklerde antijen düzeylerinde 24 saatten sonra düşme saptanmaktadır (24,26). Sedimentasyonu takiben eritrositler amonyum kloridle hidrolize edilmekte, granüositler hemositometre ile sayıldıktan sonra bilinen sayıdaki hücreler sitosantrifüje tabi tutulmaktadır. Bu hücreler, formaldehit veya paraformaldehitte tespit edildikten sonra, iyonik olmayan deterjan Nonidet P-40 ile permeabilizasyon yapıp CMV pp65'e karşı uygun monoklonal antikörlerle boyanmaktadır. Bu işlemi, zıt boya ile sulandırılan floresan izosiyanat ile işaretlenmiş sekonder antikor ile inkübasyon izlemektedir (24).

İmmünofloresan boyama, immunperoksidazla işaretleme yönteminden daha duyarlı olduğu için tercih edilebilmektedir. Seçilen immun boyama yöntemine göre floresan ya da ışık mikroskopunda 200-400 büyütme ile preparatlar incelenmekte ve pp65 pozitif hücreler sayılmaktadır. İnfekte hücre çekirdeklerinde homojen elma yeşili floresans görülmesi ile Pozitif sonuç değerlendirmesi yapılmaktadır (24). Sonuçlar, genellikle antijen pozitif hücrelerin, değerlendirilen tüm lökositlerin toplam sayısına oranı şeklinde ifade edilmektedir. Sitomegalovirüs infeksiyonu ya da hastalığının izleminde, antiviral tedavinin süresi ve ilaç direncini belirlemede antijeneminin kantitatif düzeyinin bilinmesi önemli olmaktadır (24,83).

Antijenemi testi, CMV hastalığının asemptomatik infeksiyondan ayrılmasında yardımcı bir testtir. Antijen pozitif hücreler, semptomatik infeksiyonda, asemptomatik infeksiyondan daha fazla sayıda görülmektedir (24,87). Yüksek düzeyde antijenemi saptanan solid organ alıcılarında semptomatik CMV infeksiyonu gelişme riski fazladır. Viral yük özellikle kalp ve karaciğer alıcılarında, böbrek alıcılarından daha yüksektir (83,84). Ağır immun yetmezliği olan hastalarda antijen pozitif hücrelerin az sayıda olması bile anlamlıdır (24).

Antijenemi testi klasik ve hızlı hücre kültürleri ile karşılaştırıldığında, daha duyarlı ve daha özgül olup, erken tanıda daha kısa sürede sonuç vermektedir (16,20,24,26). Ayrıca ciddi CMV hastalığı için riskli hastaların izleminde de kullanılabilir. Bu testin dezavantajları; zaman alıcı oluşu, işlemi başlatmak için çok sayıda örnek ve deneyimli personel gerektirmesidir (20,24,26).

Çok sayıda örnek gelen laboratuvarlarda antijenemi testinde otomasyon sağlamak ve testin subjektivitesini ortadan kaldırmak için flow-sitometri uygulanmaktadır. Solid organ,

kök hücre ve kemik iliği örneklerinden elde edilen lökositlerde flow-sitometri ile pp65 antijenine karşı oluşan antikolar, diğer CMV antijenleri ile karşılaştırıldığında daha fazla sayıda infekte lökositleri belirleyebilmektedir (83). Flow-sitometri ile yapılan pp65 antijenemi testi ile elde edilen sonuçlar, shell-vial yöntemine göre kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve mikroskopi ile daha uyumlu bulunmuştur (83,88). Bu nedenle flow-sitometri ile yapılan pp65 antijenemi testinin CMV hastalığının belirlenmesinde ve izlenmesinde kullanılabileceği önerilmektedir (83).

Elektron mikroskopik (EM) inceleme: Elektron mikroskobisi ile incelemede, infekte bebeklerden alınan idrar, tükürük gibi vücut sekresyonları ve doku örnekleri kullanılmaktadır. Virüsün titresini 10^4 PFU/ml'den az olduğunda yöntemin duyarlılığı azalmaktadır. Kısa sürede sonuç alınması, uzun süre saklanmış örneklerde de çalışılabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Duyarlılığı %95 bulunmakla birlikte, diğer herpes virüslerle karıştırılabilmektedir (24,89).

Moleküler Yöntemler: Moleküler yöntemlerden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), CMV enfeksiyonlarının tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır (24,90). Bu yöntem ile hastalardan alınan çeşitli örneklerde virusa ait DNA ve mRNA çoğaltılmaktadır (24,91,92). Klinik tanıda en yaygın olarak kullanılan PZR temelli yaklaşımlardan biri iki amplifikasyon aşamasından oluşan nested yöntemi, diğeri prob hibridizasyon temelli yöntemdir. İkinci yöntem standardize olması, daha kolay uygulanması ve daha az oranda kontaminasyon riski taşıması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir (93).

Polimeraz zincir reaksiyonu yönteminde, hedef bölge olarak CMV'nin IE antijen geni, major IE antijen geni, gB ve gH, Eco RI D fragmanı, Hind III X fragmanı, pp65, pp67 ve major kapsid protein gen fragmanları kullanılmaktadır (24,91,92). Polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin duyarlılığı, en erken ve geç CMV genlerinin her ikisinin amplifikasyonu ile ya da tek gen fragmanına nested PZR uygulanarak artırılmıştır (24). Polimeraz zincir reaksiyonu yönteminde, yalancı pozitif sonuçların yanısıra, örneklerin yetersiz nükleik asit içermesi ya da bazı örneklerde inhibitörlerin bulunmasından kaynaklanan yalancı negatif sonuçlarla da karşılaşılabilir (17).

Polimeraz zincir reaksiyonu, organ transplant alıcılarının, AIDS'li hastaların ve konjenital enfeksiyonlu infantların çeşitli klinik örneklerine uygulanabilmektedir. Bu yöntem, aktif hastalığı tanımlamada ya da latent enfeksiyondan ayırt etmede kullanılmaktadır (24). Ayrıca immün yetmezlikli hastaların izlenmesinde ve antiviral tedavi etkinliğini

değerlendirmede de kullanılmaktadır (68,94). Sitomegalovirüs infeksiyonunda vireminin gösterilmesi önemlidir, virüsün DNA'sı, periferik kan lökositlerinde, plazma ve serumda kolayca tespit edilebilmektedir (84,94). Sitomegalovirüs infeksiyon bulgusu olmayan vakalarda CMV DNA kanda saptanabilmesinin yanısıra ve tedavi gören hastaların kanında haftalar hatta aylar boyunca belirlenebilmektedir (24).

Sitomegalovirüs infeksiyonu tanısında ve tedavinin izlenmesinde kalitatif yerine kantitatif PZR yapılması gerekliliği nedeniyle kanda CMV DNA seviyelerini izlemek için, kantitatif ve semikantitatif moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında hedef ve dallanmış zincir DNA ve "hibrid capture" yöntemleri gibi sinyal amplifikasyon yöntemlerini kapsayan konvansiyonel ve "real time"(RT) kantitatif PZR yöntemleri bulunmaktadır. "Hibrid capture" yönteminde periferik kandaki PMNL'den elde edilen DNA denatüre edildikten sonra, CMV RNA probu ile DNA-RNA hibridleri oluşturulmakta ve bu hibridlere karşı antikorla kaplı tüplere aktararak yakalama işlemi yapılmaktadır. Kemilüminatör kullanılarak okutma sonrasında sonuçlar pq/mL olarak verilmektedir (20,24). Hızlı hücre kültürleri, konvansiyonel hücre kültürleri ve antijenemi testi ile karşılaştırma çalışmalarında "hibrid capture" yönteminin uyum oranları %83-%86 olarak bildirilmektedir (24,83,95,96). Dallanmış DNA (branched DNA, bDNA) yönteminde; BOS, serum, periferik kandaki PMNL'lerde bulunan CMV'a ait DNA kantitatif olarak ölçülebilmektedir. Bu yöntem, bDNA molekülleri örnekteki DNA molekülleri ile birleşip, multimerlerinin sinyal üretmesi ve bu sinyallerin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Kemilüminatör kullanılarak okutma sonrasında sonuçlar mEq/mL olarak verilmektedir. Bu yöntemin duyarlılığı %95, özgüllüğü %94 olarak bildirilmiştir (20).

Kantitatif testlerin kullanımına alternatif olarak; yalnızca aktif infeksiyon sırasında eksprese edilen spesifik CMV mRNA transkriptlerinin revers transkriptaz PZR yöntemleri kullanılarak kalitatif amplifikasyonunu ile, semptomatik infeksiyon gelişebilecek yüksek riskli hastaların belirlenmesi mümkün olabilmektedir. Ayrıca ticari olarak nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon testleri geliştirilmiştir. Bu yöntem mRNA'yı hedeflediği için diğer moleküler yöntemlerden farklıdır, tek zincirli RNA spesifik diziliminin direkt izotermal amplifikasyonuna olanak tanımaktadır. Bu yöntem sadece viral replikasyon sırasında pozitif sonuç vermektedir (83). Bu testle lökositlerde ve BOS örneklerinde geç pp67 mRNA ve CMV en erken antijeni değerlendirilebilmektedir. Sitomegalovirüs mRNA'yı saptamak için

kullanılan testler diğer yöntemlere göre daha az duyarlı olmasına karşın CMV infeksiyonu tanısı için yüksek özgüllüğe sahiptir (24).

Hücre kültür yöntemleri

Klasik hücre kültürü, önceki yıllarda CMV infeksiyonlarının tanısında altın standart kabul edilmesine karşın, virüsün ürettiği hücrelerin kısıtlı olması ve replikasyonunun yavaş olması, erken tanıda bu yöntemi yetersiz kılmaktadır. Ayrıca özel ekipman ve altyapı gerektiren bu yöntemin duyarlılığı da göreceli olarak daha düşüktür. Viral kültürlerin pozitif olması, CMV hastalığı gelişme riski ile daima ilişkili olmadığı bildirilmektedir (97,98). Günümüzde moleküler virolojik teknikler, hızla gelişmeleri ve tanı alanında oldukça yaygın kullanımları nedenleri ile kültür yöntemlerinin yerini almıştır(98).

Kültür yöntemleri, immunitesi baskılanmış kişilerde CMV hastalığı tanısında tek başına kullanışlı olmamaktadır. Ancak yenidoğanların tükürük ya da idrarından CMV izolasyonu konjenital CMV infeksiyonu tanısında halen kullanılmaktadır. (83).

Konvansiyonel hücre kültürü: İnsan fibroblastları CMV'yi üretmek için en iyi ortamlardır. Fibroblast kültürleri, insan embriyonik akciğer dokusundan veya sünet derisinden hazırlanarak elde edilmektedir. İnsan fetal akciğer hücrelerinin seri pasajlarından hazırlanmış WI-38, MRC-5, IMR-90 gibi diploid hücre kültürleri de kullanılabilir (24,29,83). Diploid fibroblast hücre kültürleri, hücre jenerasyonları arttıkça CMV infeksiyonuna daha az duyarlı hale gelebileceğinden az sayıda pasajlanarak kullanılmalıdır. Ticari olarak hazır hücre kültürleri mevcuttur (24). Sitomegalovirüs bazı insan epitel hücrelerinde de çoğalabilmektedir ancak bu hücrelerde üremesi sınırlıdır (24,41). Virüs insan dışı hücrelerde de infeksiyon yapabilmekte ancak sadece erken gen ürünlerinin ekspresyonu ile karakterize verimsiz bir replikasyon gerçekleşmektedir. (24).

Kültür yöntemleri ile virüs, idrar, kan, boğaz çalkantı suyu ve tükürük gibi birçok örnekten izole edilebilmektedir (24,83). Sitomegalovirüs infeksiyonu tanısında sık olarak kullanılan örneklerden biri idrar örnekleridir. Hücre kültürlerinde toksisiteyi azaltmak için idrar örneklerinin pH 7'de 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl ile muamelesi tavsiye edilmektedir. Periferik kan lökositlerini toplamak için "Ficoll-Hypaque" ya da "sodium metrizoate" ile dekstran 500 (PMN; Robbins Scientific, Sunnyvale, Calif.) karışımı kullanılmaktadır (24).

Hasta örnekleri, içerisinde %2 fetal sığır serumu içeren "Eagle minimal essential medium (EMEM)" besiyeri olan fibroblast hücrelerinin bulunduğu iki tüpe 0.2 ml

eklenmektedir (24,99). Örnek bulunan tüplerdeki besiyeri 24 saat sonra değiştirilir, daha sonra haftada bir ve kültürün pH'ı farklılaştığında değiştirilir. Hücreler %0.25 tripsin-%0.1 EDTA eklenerek bir dakika 37°C'de inkübe edilip, hücreler kaldırılıp %2 fetal sığır serumlu EMEM eklenen yeni tüplere inokule edilir (24).

Kültürde tanı, virüsün üremesi sırasında meydana getirdiği sitopatik etkinin (CPE) görülmesi ile konmaktadır (100,101). Sitopatik etki oluşup oluşmadığını kontrol etmek için tüpler ilk beş günde her gün, sonra en az dört hafta boyunca haftada iki kez incelenir. Sitopatik etkinin görülme zamanı klinik örneklerdeki virüs miktarı ile ilişkilidir. Kültürdeki sitopatik değişiklikler, genellikle ilk haftada gelişmekte ve hücreler geniş, yuvarlak, refraktil şeklinde görülmektedir (24).

Adenovirus, Varicella Zoster virüsü de hücre kültüründe CMV gibi CPE oluşturabilmektedir(24).

Hızlı hücre kültürü: Konvansiyonel hücre kültürü zaman alıcı olduğundan son yıllarda daha kısa sürede sonuç veren yöntemlerden “shell-vial” hızlı hücre kültürü yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem düşük hızda santrifüjden sonra, hücre kültüründe virüsün çoğaltılması ve CPE gelişmeden önce CMV replikasyonunun erken döneminde oluşan viral antijenlerin saptanması temeline dayanmaktadır (2,19,24,102). Bu yöntemle örneklerde virüs titresi düşük olsa bile kolayca çoğaltılabilmekte ve 24 saat içinde saptanabilmektedir (19,24). Yapılan bir çalışmada “shell-vial” yönteminin CMV belirlemede duyarlılığının %84,6, klasik hücre kültürünün ise %69,2 oranında olduğu bulunmuştur (83,103).

“Shell-vial” yönteminde MRC-5 (insan fetal akciğer fibroblast) hücreleri, 12 mm çaplı lamel içeren özel şişelerde tek tabaka halinde üretilerek, üzerine 0.2 ml örnek inokule edilir (24). Tek tabaka hücrelerin önceden dexamethasone, dimethyl sulfoxide ya da bunlarla birlikte Ca⁺⁺ ile muamele edilmesi hücrelerin CMV'ye karşı duyarlılığını arttırabilmektedir (24,104). Kanda “shell-vial” yöntemi kullanılmadan önce sonikasyonla lökositlerin parçalanması CMV saptamanın duyarlılığı arttırmaktadır (24). İnokulasyondan sonra şişeler 25°C'de 700 g'de 40 dakika santrifüj edilir ve %2 fetal sığır serumu ve antibiyotik içeren EMEM'den 2 ml eklenir. Kültürler 37°C'de 16-24 saat inkübe edilir, asetonla tespit edilir ve boyanır (24,99). İnkübasyon zamanı her laboratuvara göre değişiklik göstermektedir. Boyamada Evans mavisi zıt boya olarak kullanılmaktadır. Sitomegalovirüs pozitif hücreler kırmızı sitoplazma içinde elma yeşili floresan göstermektedir (24).

Shell-vial yönteminde MRC-5 hücrelerinin yanı sıra mink akciğer (ML) hücreleri de kullanılabilir. Bu hücrelerin avantajı; duyarlılığın azalmadan uzun süre pasajlanabilmesi, CMV pozitif hücre sayısının artmasına ve toksisitede azalmaya neden olmasıdır (24).

Shell-vial yöntemi konvansiyonel virüs izolasyonunun güçlü bir tamamlayıcısıdır. Hızlı, duyarlı ve spesifik bir yöntemdir (101).

Serolojik yöntemler

Anti CMV antikorlarını saptamak için IFA, ACIF, CF, LA, RIA ve ELISA gibi birçok serolojik yöntem bulunmaktadır. Enzim işaretli immunsorbant yöntemi hızlı, duyarlı ve özgül olmasıyla IgM ve IgG'yi tek başına saptamada diğer testlerin yerini fazlasıyla almıştır. (83).

İmmünitesi sağlam kişilerde eski ve yeni CMV enfeksiyonunun serolojik olarak tespiti, virüse spesifik IgM ve IgG antikorlarının saptanmasına dayanmaktadır (10,102). IgG antikorlarının saptanması CMV ile önceden karşılaşıldığını ve latent virus varlığını göstermekte iken farklı bir suşla süperenfeksiyon veya latent virus reaktivasyonundan korunulduğunu göstermemektedir. Bu yüzden CMV IgG testinin klinik kullanımdaki yararı tamamen sınırlıdır. Özellikle gebe kadınlarda primer enfeksiyonda gelişen serokonversiyonu göstermede yararlıdır (10,26,41). Primer enfeksiyon, ardı ardına yapılan iki serolojik test arasındaki sürede IgG antikorlarının negatif iken pozitifleşmesiyle (serokonversiyon) anlaşılmaktadır. Spesifik IgM cevabı, yeni bir primer enfeksiyonun göstermekle birlikte güvenilir olmayıp ek testlerle doğrulanmalıdır. Sitomegalovirüs IgM testinde yalancı negatif ve yalancı pozitif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (19).

“Enzyme-linked Immunosorbent Assay” (ELISA): Bu yöntem duyarlı, özgül ve hızlı bir test olması yanı sıra bazı dezavantajları bulunmaktadır. Ticari ELISA kitlerinde kullanılan antijenler, hücre kültüründen (embriyonik insan fibroblast kültürlerinden ekstrakte edilen kompleks CMV viryonu kullanılarak) elde edilen viral lizatlardan hazırlanmaktadır. Bu antijenler hücre proteinleriyle kontamine olması nedeniyle testin duyarlılığını ve özgüllüğünü etkilemektedir. Son zamanlarda viryon ekstraktları yerine sentetik peptidler ve rekombinan proteinlerin kullanılması testin standardizasyonu sağlamakta, duyarlılık ve özgüllüğü de artırmaktadır (83,102).

Sitomegalovirüs IgM antikoruna ile etkileşen antijenler, yapısal olan pp150, pp65 ve pp38 (*pUL32*, *pUL83* ve *pUL80a*) ve yapısal olmayan pp52 ve pp130 (*pUL44* ve *pUL57*) proteinleridir. Primer CMV enfeksiyonunda özellikle pp130 proteininin dominant IgM antijeni olması nedeniyle tanıda diğer proteinlerden duyarlılık ve özgüllük açısından daha değerli olduğu belirtilmektedir. Rekombinan proteinlerin kullanıldığı ELISA yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü %98.6 olarak bildirilmektedir (19).

IgM indirekt ELISA'nın yerini, solid fazda IgM antikorların selektif bağlanmasını temel alan IgM capture ELISA almıştır. Bu yöntemde serum örneklerindeki IgM'i bağlamak için anti-human IgM antikoruna ile kaplı solid faz kullanılmakta, bağlanmayan IgG antikorları ve immunkompleksler yıkama ile uzaklaştırılmaktadır (24). Capture ELISA'da IgM-RF'nin solid fazda anti-IgM bağlayıcı bölgeler için viral IgM ile yarışmaya girmesi hatalı sonuçlara neden olmaktadır. Yanlış pozitif sonuçlara sadece RF'nin varlığı değil aynı zamanda beraberinde IgG-antinükleer antikorların bulunması da neden olmaktadır. Capture ELISA'da yanlış pozitif sonuçların engellenmesi için, IgG fraksiyonu yerine spesifik antikorun işaretli F(ab')₂ fragmanı kullanılmaktadır (19). Yanlış pozitif sonuçlar, hasta serumunda otoantikorların varlığı ya da diğer herpesvirüslerle ortak proteinlerin çapraz reaksiyonu nedeniyle oluşabilmektedir (83,102).

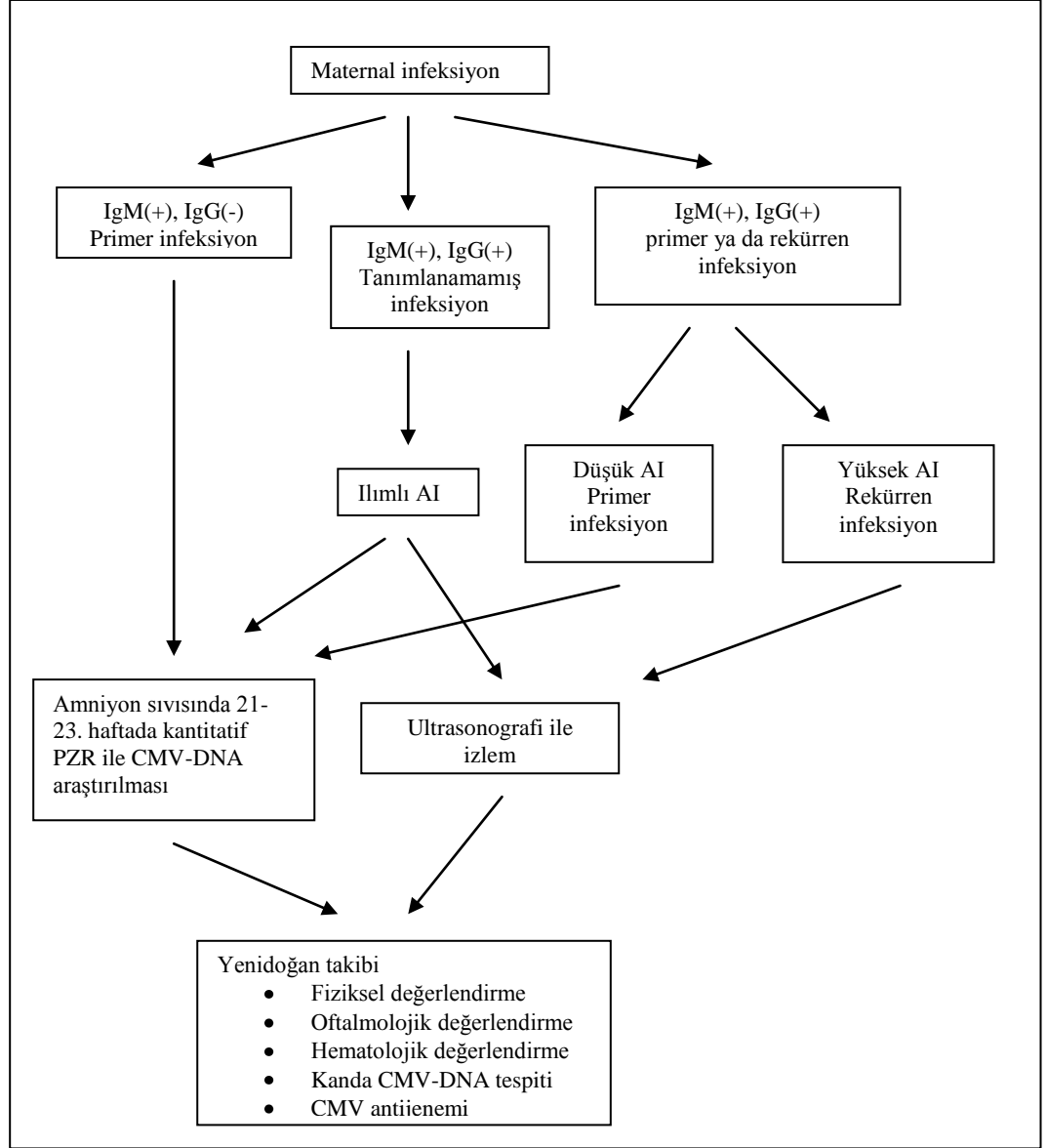
Pozitif IgM sonuçlarının değerlendirilmesi: İmmünglobulin M antikor cevabı immunitesi normal ya da baskılanmış bireylerde primer enfeksiyonu göstermektedir. İmmün yetmezlikli bireylerde rekürren enfeksiyonu da gösterebilmektedir. Gebelerde IgM pozitifliği, primer enfeksiyonun akut ve konvelesan dönemi yanı sıra IgM persistansı gibi farklı klinik durumları da gösterebilmektedir. İmmünglobulin M seviyeleri enfeksiyon başlangıcından sonraki ilk bir-üç ayda en yüksek değere ulaşmakta (akut ya da erken dönem) daha sonra giderek azalmaktadır (konvelesan ya da geç dönem). Bazı çalışmalarda bir yıldan uzun sürede pozitif kaldığı gösterilmiştir (19,105,106).

Yenidoğanda serumda IgM'in saptanması, IgM plasentayı geçemediğinden, konjenital CMV enfeksiyonu açısından tanısal değer taşımaktadır. Ancak bazı yenidoğanlarda immün sistemin immatür olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Daha büyük çocuklarda ve yetişkinlerde IgM antikorları primer enfeksiyonu takiben iki yıla kadar kanda saptanabilmekte veya reaktive CMV enfeksiyonunda belirlenebilmektedir. Epstein-Barr virus ve Parvovirüs B19 ile enfeksiyonlarına bağlı heterotipik IgM yanıtı sırasında IgM'in yanlış pozitif sonuçlanmasına neden olabilmektedir (83,106).

İmmüoglobulin G avidite testi: İmmüoglobulin G avidite testi, CMV infeksiyonunun primer olup olmadığını ayırt etmek için yapılan serolojik bir testtir (106).

Avidite indeksi, üre gibi denatüre edici ajanlarla işleme giren antijenin IgG'ye bağlanma oranını göstermektedir. Yüksek IgM seviyesi ve düşük avidite indeksi primer CMV infeksiyonun yeni (üç aydan daha kısa sürede) geçirilen bir infeksiyon olduğunu göstermektedir (19). Gebeliğin ilk trimestrında %65 üzerinde bulunan avidite indeksi, son üç aydan daha önce geçirilmiş infeksiyonun göstergesi olarak düşünülmelidir. Düşük avidite indeksine (\leq %50) sahip gebelerde konjenital CMV infeksiyon riski bulunmaktadır (19). Avidite testinin duyarlılığı infekte fetüs/yenidoğanda %100 olup, gebeliğin 16-18. haftasından önce yapıldığında infekte fetüse sahip tüm gebeler belirlenebilmektedir. Gebeliğin 20. haftasından sonra yapılan testte, duyarlılık oldukça (%62.5) düşmektedir (19,106). Kuşkuğu avidite sonuçlarında testin iki hafta sonra CMV IgG testi ile birlikte tekrarlanması sonuçların daha doğru yorumlanması sağlanmaktadır. (14,107).

Ayrıca maternal CMV infeksiyonu şüphesinde izlenebilecek tanı yöntemleri Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil I. Gebelerin CMV infeksiyonları açısından taramaları ve izlemleri (80).

Lateks aglütinasyon testi: Lateks aglütinasyon testi, basit ve hızlı bir test olup, özellikle kan donörlerinin immun durumlarının belirlenmesinde yardımcıdır. Viral antijenlerle kaplı bir lateks partikül süspansiyonu test serumu ile karıştırılır ve çevrilerek kısa süre inkübe edilir. Spesifik antikor varlığında oluşan aglütinasyon gözle görülebilmektedir. Ancak IgG ve IgM antikorları arasında ayırım yapılamaması ve sonuçların subjektif olması gibi dezavantajları bulunmaktadır (24,83). Son zamanlarda geliştirilen, eritrositlerin kullanıldığı lateks aglütinasyon testi yanlış pozitif sonuçların azaltılması yönünden ümit vermektedir (108).

Kompleman fiksasyon (KF) testi: Kompleman fiksasyon testi, antikor titrelerindeki artışın saptanması için uygun bir yöntem olmakla birlikte yalancı sonuçlar ile nadiren karşılaşmaktadır (24,100). Bu test için antijen seçimi, önemli olup glisin ile kaplı antijenlerle yapılan CF testi en duyarlı testtir. Bu yöntemin, örneklerin %10'unda görülen antikomplementer aktivite gibi dezavantajının varlığı nedeniyle rutin tanısal amaçlı testlerde yerine, ELISA ve LA testi önerilmektedir (3,24).

İmmünfloresan antikor (IFA) testi: Bu testte lama tespit edilen virüsle infekte hücreler test serumu dilüsyonları ile inkübe edilir. Spesifik antijen antikor kompleksleri florescein izotiyosiyanat ile konjuge antikor ve floresan mikroskobu kullanılarak saptanmaktadır. Antikompleman immünfloresan testine göre daha hızlı sonuç veren bir test olmakla birlikte, uygulaması daha zordur. Fibroblastların CMV enfeksiyonu, virüs ve virüs dışı IgG antikorlarını bağlayan sitoplazmik Fc reseptörlerinin sayısını arttırması nedeniyle özgül olmayan sitoplazmik floresan oluşturmaktadır (3,24).

Antikompleman immünfloresan (AKİF) testi: Bu yöntem indirekt IFA yöntemi ile benzerdir, farklı olarak, serum önce endojen kompleman aktivitesini uzaklaştırmak için ısı ile inaktive edildikten sonra lamlardaki virüsle infekte hücrelerle inkübe edilmektedir. CF yöntemine göre daha kısa sürede sonuç vermektedir. Günlük çalışılan örnek sayısının az olması, zaman alıcı olması, floresan mikroskoba ihtiyaç duyulması ve deneyimli personel gerektirmesi gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır (24).

Radyoimmün assay (RIA) testi: Bu yöntem, konjenital CMV enfeksiyonunu belirlemede, viral izolasyonla karşılaştırıldığında %90 oranında uyum göstermektedir. Pahalı bir yöntem olması, radyoaktif maddelerin kullanılması, kullanılan problemlerin raf ömürlerinin kısa olması ve hazır ticari kitlerin mevcut olmaması kullanımını sınırlamaktadır (109).

Genotiplendirme: Sitomegalovirüs genomunda çeşitli değişken bölgeler kodlanmaktadır (109,110). İnsanlarda CMV'nin genetik olarak farklı birçok kökeni dolaşmaktadır. İmmün yetmezlikli bireylerde enfeksiyonun virulansı, patojenitesi, seyri ve şiddeti CMV kökenleri arasındaki çeşitliliğe bağlanmaktadır. Son çalışmalarda, birden çok gB genotipini barındıran CMV enfeksiyonunun, hastalığın ciddiyeti ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir(110). Sitomegalovirüs gen ürünlerinin polimorfizmini saptamak için çalışmalar, zarf glikoproteinleri gibi, nötralizan antikorların ana hedefi olan yüzey proteinlerine odaklanmıştır (111).

Sitomegalovirüs genomu çoğunluğu *gB*, *gH*, *gN* (111) 'den oluşan sayısız glikoprotein kodlaması nedeniyle bu genler CMV genotiplendirilmesinde kullanılmaktadır. En sık kullanılan *gB* glikoproteinidir. Dört adet major *gB* (*gB1-gB4*) genotipi bulunmaktadır (110).

Tedavi

Antiviral ilaçlar: Antiviral ilaçlar, CMV enfeksiyonunun profilaktik ve pre-emptif tedavisinde kullanılmaktadır (112,113).

Sitomegalovirüs enfeksiyonlarının tedavisinde mevcut tedavi seçenekleri sınırlıdır. Etkili antiviral ajanlar ganciclovir (GCV), valganciclovir, cidofovir, foskarnet ve fomivirsen olarak bilinmektedir (10,36). Bu ilaçlar birçok hastada klinik düzelme sağlamakla birlikte oral yoldan kötü emilimleri, düşük etki gücünde olmaları, zamanla oluşan direnç gelişimi, doza bağımlı yan etkileri bulunması ve hospitalizasyona ihtiyaç duyulması gibi bazı dezavantajları mevcuttur (10,112). Gansiklovir, viral DNA polimeraz (*UL54*)'ın kompetitif inhibitörüdür. Damar içi yolla uygulanmaktadır. Oral formlarının immun yetmezlikli hastalarda profilaksi için etkili olduğu görülmüştür (10,26). Doz kısıtlayıcı yan etkisi olan nötropenidir ve *UL97*, *UL54* gen mutasyonlarından dolayı GCV'ye dirençli kökenler mevcuttur (10,19,42,114). Semptomatik konjenital CMV hastalığı tedavisinde GCV hakkında az sayıda olguda denenmesine karşın klinik olarak yararlı olduğu ileri sürülmektedir. Oral ve intravenöz GCV profilaksi rejiminin kemik iliği ve solid organ transplant alıcılarında ve AIDS hastalarında CMV enfeksiyonunun oluşumunu azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Kemik iliği ve solid organ transplant alıcılarında veya gereksiz yere profilaktik tedaviden kaçınmak için intravenöz GCV ile pre-emptif tedavi, CMV enfeksiyonunun şiddetini ve insidansını azaltmada başarılı bulunmuştur. Gansiklovirin oral emiliminin düşük olması, ilaca dirençli virusun ortaya çıkma potansiyelini arttırabileceğinden, oral emilimi daha iyi olan valgansiklovir alternatif seçenek olarak umut verici görünmektedir (26). Gansiklovirin L-valil esterisi olan valgansiklovir, hızla GCV'ye dönüşmektedir. Valgansiklovirin emilimi fazladır ve bunun sonucunda oral biyoarlanımı artmıştır (24,112). Diğer bir nükleozid analogu Cidofovir, CMV DNA polimerazın kompetitif inhibitörüdür. Gansiklovir ve cidofovir, aynı hedefi (*UL54*) kullandıkları için aralarında çapraz direnç gelişebilmektedir. Cidofovir, gansiklovir dirençli kökenlerin çoğuna karşı etkili bulunmuştur (10,42). Yarı ömrünün uzun olması nedeniyle haftalık injeksiyonlar şeklinde uygulanmaktadır. Nefrotoksik yan etkileri, doz

ayarlaması ve rehidratasyon ile en aza indirilebilmektedir. Cidofovir CMV retiniti tedavisinde kullanılmaktadır (26).

Foskarnet pirofosfat analogudur ve CMV DNA polimerazın aktivitesini reversibl ve nonkompetitif olarak engellemektedir. Gansiklovire direnç ve ciddi yan etkiler durumunda gansiklovire alternatif olarak intravenöz yoldan uygulanmaktadır. Uzun süre uygulandığında CMV DNA polimeraz geninde (*UL54*) mutasyon sonucu direnç gelişebilmektedir (10,26,42,112). Tedavide kullanılan foskarnetin nefrotoksik yan etkileri nedeniyle klinik kullanımda uygulaması sınırlıdır (10,19,26).

Benzimidazol analogu olan 1263W94, *invitro* şartlarda yüksek etki gücüne sahip olması, oral biyoyararlanımının iyi olması, yan etkilere nadiren neden olması gibi birçok avantaja sahiptir (10,26).

Formivirsen CMV replikasyonunu inhibe eden bir “antisense” oligonükleotiddir. Sitomegalovirus retinitinde vitreus içine lokal olarak uygulanmaktadır (26).

Sitomegalovirüs immunoglobulin (CMVIG): Sitomegalovirüs hastalığından korunmada ve tedavisinde kullanılmaktadır. Profilaktik CMVIG uygulamasının kemik iliği ve solid organ transplant alıcılarında ölümleri ve hastalık insidansını azalttığı bildirilmektedir (26). Yenidoğanlarda, immunoglobulin tedavisi, tam olarak değerlendirilmemiştir fakat posttransfüzyonal kazanılmış enfeksiyonlu yenidoğanlarda etkili olabildiği gösterilmiştir (114,115).

Antiviral tedavinin ana hedefi virüsün fetusa geçişini önlemek amacıyla primer CMV enfeksiyonlu gebeleri tedavi etmektir. Bu konuda gelecekte en iyi yaklaşımın antiviral ilaçlar ile hiperimmun globulin kombinasyonu olduğu ifade edilmektedir. Ancak, konjenital CMV hastalığı geniş bir spektruma sahip olması, hastalığın doğal kaynağının değişkenliği nedeniyle bu hedefi gerçekleştirmek bir hayli zor görünmektedir (19).

Prenatal tedavi: Fetüsün ultrasonografi ya da amniyon sıvısında yapılan testlerde etkilendiği belirlenirse gebeliğin sonlandırılması önerilebilmektedir. Son zamanlardaki çalışmalarda CMV ile infekte fetüse sahip gebelere oral GCV uygulanması önerilmektedir (114). Gebeliğin erken döneminde verilen gansiklovirin teratojenik etkisinin olduğunu bildiren çalışmalar olduğu gibi (13), teratojenik etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (114,116,117). Gebelikte immunoglobulin tedavisinin immunomodülatör etki ile viral yükü ve plasental inflamasyonu azaltma gibi birçok mekanizmalarla etkili olduğu düşünülmektedir (114).

Postnatal tedavi: Semptomatik konjenital CMV enfeksiyonlu yenidoğanlarda GCV tedavisinin yararının sınırlı olduğu bildirilmekle birlikte yeni çalışmalarda konjenital CMV enfeksiyonlu yenidoğanda kullanılabileceği gösterilmiştir (75, 114,118).

Korunma

Konjenital CMV enfeksiyonu için yüksek riskli olan kadınların belirlenmesi ve eğitilmesi, enfeksiyonun önlenmesinde en önemli adımlardan biri gibi görülmektedir. Gündüz bakım evlerinde çalışan, immün yetmezlikli hastaların tedavisiyle görevli ve hemşireler gibi yüksek riskli ortamlarda çalışan kadınların gebeliğin erken döneminde veya konsepsiyondan önce antikor pozitifliği ya da negatifliğinin bilinmesi önemlidir. Primer enfeksiyon açısından risk taşıyan seronegatif kadınların hijyen kurallarına uyması riski azaltabilmektedir. El yıkama, ocuk oyuncaklarının, mutfak malzemelerinin ve evre yüzeylerinin iyi temizlenmesi ve çocukların tükrük ve idrarıyla temastan kaçınmak korunma önlemlerinin başında gelmektedir (119). Hijyen kurallarının uygulanması gibi temel önlemleri dikkate almadan kreş gibi CMV açısından riskli yerlerde CMV enfeksiyonunun yüksek insidansını azaltmak mümkün görünmemektedir. Ayrıca güvenilir cinsel korunma yöntemlerini uygulamak, çok eşli cinsel olarak aktif insanlar arasında enfeksiyon insidansını azaltmada yararlı olabilecektir (26). Kan transfüzyonu yolu ile CMV geçişini azaltmak için seronegatif vericiler seçilmelidir. Seronegatif vericilerin latent virüs taşıyabilmeleri nedeniyle, transfüzyondan önce CMV'yi uzaklaştıran lökosit filtrelerinin kullanılması yararlı olabilmektedir (10,26,51).

Gebelik planlayan, immünoglobulin M antikorunu pozitif ve/veya idrarla virus atılımı olan primer enfeksiyonlu kadınların gebelik için altı ay beklemeleri uygun görünmektedir. Sitomegalovirüs antikor durumu bilinmeyen tüm kadınlara serolojik tarama, hamilelik planlamadan önce veya hamilelik başlangıcında gerçekleştirilmelidir. Kadın seronegatif ise hamilelik sırasında testler tekrarlanmalıdır (75). Diğer bir korunma yöntemi, kuşkulu seronegatif kadınların hamilelikten önce aşılanmasıdır (10,26,119).

Konjenital CMV enfeksiyonunu önlemek için geliştirilen aşının hedefi, çocuklarda santral sinir sistemi hasarını en aza indirmektir. Aşının indüklediği immunitenin intrauterin enfeksiyonu 40 kat, enfeksiyonun neden olduğu SSS hasarını ise 25-30 kat azalttığı bildirilmektedir. Bununla birlikte canlı virüs aşıları klinik kullanım için onay almamıştır. Etkili ve güvenilir bir aşı elde etmek için canlı virus aşısı, rekombinan canlı aşı, canarypox-

CMV rekombinantları, subunit gB aşısı ile gB ve pp65 proteinlerini kodlayan DNA aşıları üzerinde çalışılmalar devam etmektedir (10).

GEREÇ-YÖNTEM

Çalışma Grubu

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na Mart 2006 ve Aralık 2008 tarihleri arasında rutin gebelik kontrolü nedeniyle başvurmuş, riskli gebelik tanısıyla izlenen 17-21 gebelik haftalarında olan 100 gebe çalışmaya alınmıştır.

Bu gebelere, riskli gebelik ve amniyosentez konusunda bilgilendirilip onayları alındıktan sonra, genetik tarama için amniyosentez uygulanmış ve alınan amniyon sıvısından en az 2 ml ve gebelerden eş zamanlı alınan en az 5 ml kan örnekleri mümkün olan en kısa sürede Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarı'na ulaştırılmıştır. Amniyon sıvı örnekleri çalışılncaya kadar -80°C'de, kan örneklerinin santrifüj sonrası ayrılan serumları ise -20°C'de bekletilmiştir.

CMV enfeksiyonunun prenatal tanısı için çalışmaya katılan gebelerin kan örneklerinde CMV IgM ve CMV IgG antikorları, CMV IgM μ -capture ve IgG ELISA (Meddens Diagnostics BV, Netherland) testi ile "Triturus® Multi-format Carrousel (İspanya)" mikroELISA cihazı kullanılarak, CMV IgG avidite testi ise, CMV IgG avidite ELISA testi (Radim SpA, Pomezia-Roma-İtalya) ile Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Seroloji Laboratuvarı'nda çalışılmıştır. Kan ve amniyon sıvı örneklerinde CMV-DNA, Real-Time PZR yöntemi ise İzmir Tepecik Göğüs Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda "RoboGene Human Cytomegalovirus (HCMV) Quantification Kit" (RoboGene® AJ Roboscreen GmbH, Germany) ile "ABI PRISM 7000"(Applied Biosystems, USA) cihazında araştırılmıştır.

Sitomegalovirüs IgG ve IgM antikorlarının ELISA yöntemiyle araştırılması

Sitomegalovirüs IgM ELISA testinin yapılışı:

Serum örnekleri ve tüm reaktifler testten önce oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek, oda ısısına getirilmiştir.

1. Plaklardaki kuyucuklar A1-B1: pozitif kontrol, C1-D1: negatif kontrol, E1-F1-G1-H1: cut-off kontrol olarak seçilmiştir.

2. Hasta serumları, 10 μ l hasta serumu ve 1.0 ml dilüsyon buffer olacak şekilde karıştırılıp, sulandırılmıştır.

3. Pozitif kontrol, negatif kontrol, cut-off kontrol ve sulandırılmış hasta serumları anti-human IgM kaplı kuyucuklara 100'er µl dağıtılmıştır.
4. Mikroplaklara nemli ortamda 37°C'de 60 dakika inkübasyon uygulanmıştır.
5. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklar yıkama solusyonu ile beş kez yıkanmıştır.
6. Bütün kuyucuklara 100 µl CMV-PO konjugat konmuş ve mikroplaklara nemli ortamda 37°C'de 60 dakika inkübasyon uygulanmıştır.
7. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklar yıkama solusyonu ile beş kez yıkanmıştır.
8. Bütün kuyucuklara 100 µl tetrametilbenzidin (TMB) substrat solusyonundan dağıtılıp karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon uygulanmıştır.
9. İnkübasyon süresi bitince bütün kuyucuklara 100 µl "stop solusyon" eklenmiştir.
10. Örneklerin optik dansite değerleri spektrofotometre ile 450 nm dalga boyunda okunmuştur.

Serum örnekleri veya kontrollerden birinin absorbans değerinin cut-off kontrolün absorbans değerine bölünmesi ile elde edilen Capture Index (CI) değerine göre sonuçlar yorumlanmış, $CI \geq 1.10$ ise örnekler pozitif, $0.90-1.10$ ise şüpheli, <0.90 ise negatif kabul edilmiştir.

Sitomegalovirüs IgG ELISA testinin yapılışı:

Serum örnekleri ve tüm reaktifler testten önce oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek oda ısısına gelmeleri sağlanmıştır.

1. ELISA plaklarındaki kuyucuklar A1-B1: kalibratör 300 Arbitrary Ünite (AU)/ml, C1-D1: kalibratör 100 AU/ml, E1-F1: kalibratör 10 AU/ml, G1-H1: kalibratör 0 AU/ml olarak seçilmiştir.
2. Hasta serumları, 10 µl hasta serumu ve 1.0 ml dilüsyon buffer olacak şekilde karıştırılıp, sulandırılmıştır.
3. Kalibratörler ve hasta serumları kuyucuklara 100 µl olarak dağıtılmıştır.
4. Mikroplaklara nemli ortamda 37°C'de 60 dakika inkübasyon uygulanmıştır.
5. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklar yıkama solusyonu ile beş kez yıkanmıştır.
6. Bütün kuyucuklara 100 µl anti-IgG-PO konjugat konmuş ve mikroplaklara nemli ortamda 37°C'de 60 dakika inkübasyon uygulanmıştır.
7. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklar yıkama solusyonu ile beş kez yıkanmıştır.

8. Bütün kuyucuklara 100 µl tetrametilbenzidin (TMB) substrat solusyonundan dağıtılıp direkt ışıktaki ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon uygulanmıştır.

9. Inkübasyon süresi bütün kuyucuklara 100 µl “stop solüsyon” eklenmiştir.

10. Örneklerin optik dansite değerleri spektrofotometre ile 450 nm dalga boyunda okunmuştur. Testin doğru çalışıp çalışmadığını belirlemek için aşağıdaki kriterler göz önüne alınmıştır.

Kalibratör 0 AU/ml: $OD_{10\text{ AU/ml}} < 0.7$ katı

Kalibratör 10 AU/ml: $0.150 < OD < 0.550$

Kalibratör 100 AU/ml: $OD_{100\text{ AU/ml}} / OD_{10\text{ AU/ml}} = 2.5-5.0$

Kalibratör 300 AU/ml: $OD_{300\text{ AU/ml}} / OD_{10\text{ AU/ml}} = 4.5-7.0$

Konsantrasyon ≥ 15 AU/ml ise örnekler pozitif, 10-15 AU/ml ise şüpheli, <10 AU/ml ise negatif kabul edilmiştir.

Sitomegalovirüs IgG Avidite testi

Bu çalışmada ticari CMV IgG avidite ELISA testi (Radim SpA, Pomezia-Roma-İtalya) kullanılmıştır. Örnekler, üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Sitomegalovirus antijeni kaplı katı fazın yer aldığı kuyucuklara serumlar dağıtılmıştır. İlk inkübasyondan sonra yıkama sonrasında üre içeren tampon solusyonu eklenmiştir. Üre içeren reaktif daha önceden oluşan antijen-antikor bağlanmasının ayrılmasına neden olmaktadır. Bu ayrılmanın derecesi, antikorun avidite gücüne bağlıdır. Ayrılmadan sonra zemindeki antijene bağlı antikorların aviditesi, “horseradish peroksidaz” (HRPO) işaretli anti insan IgG konjugatı, daha sonra TMB kromojen substratı eklenerek oluşan renk değişikliğinin, 450 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmesiyle belirlenmiştir.

Sitomegalovirüs IgG avidite testinin yapılışı

1. Test kitinin içerisinde bulunan tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildikten sonra “blank”, düşük avidite kontrolü, yüksek avidite kontrolü ve örnekler çift olarak 100'er µl pipetlenmiştir.

2. Mikroplaklara 37°C'de 60 dakika inkübasyon uygulanmıştır

3. Inkübasyon sonunda tüm kuyucuklar yıkama solusyonu ile dört kez yıkanmıştır.

4. Çift çalışılan kuyucuklardan birincilerine örnek sulandırıcısı, ikincilere ise üre içeren tampondan eklenmiş ve 37°C'de 30 dakika inkübasyon uygulanmıştır.

5. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklar yıkama solusyonu ile dört kez yıkanmıştır.

6. Mikroplaklara enzim konjugatından 100'er µl pipetlenmiş ve 37°C'de 30 dakika inkübasyon uygulanmıştır

7. Kuyucukların yıkanmasından sonra TMB'den 100'er µl dağıtılmış ve 37°C'de 10 dakika inkübasyon uygulanmıştır.

8. Reaksiyon "stop solüsyon" ile durdurulmuş, oluşan renk değişikliği 450 nm boyunda spektrofotometre ile ölçülmüştür.

Avidite indeksi (AI), üreli solusyonun optik dansitesinin, örneğin optik dansitesine oranlanması ile elde edilmiştir. Bu test prosedürüne göre %45 avidite üzeri "yüksek", %35-45 arası "kuşkuğu avidite" ve %35'in altı "düşük" avidite olarak değerlendirilmiştir.

Sitomegalovirüs DNA tespiti için kullanılan "real-time" PZR yöntemi

Bu çalışmada, örneklerden elde edilen DNA örneklerinde CMV genomunun immediate early (IE) antijeni geninin *in vitro* olarak kantitasyonu için tasarlanmış "RoboGene Human Cytomegalovirus (HCMV) Quantification Kit" (RoboGene®AJ Roboscreen GmbH., Germany)'i kullanılmıştır. "immediate early (IE)" antijeni geninin çoğaltılması için spesifik primer çifti kullanılmıştır. Kullanılan PZR testinin lineer aralığı 10^3 ile 10^8 kopya/ml arasındadır.

CMV-DNA tespiti için kullanılan PZR yöntemi ekstraksiyon, amplifikasyon ve verilerin yorumlanması olmak üzere üç aşamada çalışılmıştır.

Ekstraksiyon aşaması

1. Ekstraksiyon tüpüne 200 µl lizis solusyonu konmuş üzerine 200 µl örnek ve 25 µl Proteinaz K eklenmiştir. Karışım 10 saniye vortekslenip 50°C'de 15 dakika sürekli çalkalanarak inkübasyon uygulanmıştır.

2. Üzerine 400 µl "binding solusyon" eklenerek 10 saniye çalkalanmıştır.

3. Hazırlanan karışım, içerisinde spin filtre bulunan 2 ml'lik "receiver" tüpe aktararak, 12.000 rpm'de bir dakika santrifüjlenmiştir.

4. "Receiver" tüp atılıp "spin" filtre yeni bir 2 ml'lik "receiver" tüpe aktarılmıştır.

5. “Spin” filtre içine 500 µl yıkama solusyonu eklenmiş, 10.000 X g (12.000 rpm)’de bir dakika santrifüjlenmiştir. “Receiver” tüp atılıp, “spin” filtre yeni bir 2 ml’lik receiver tüpe yerleştirilmiştir.

6. Yıkama solusyonundan 650 µl eklenerek 12.000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenmiştir, “spin” filtre yeni bir 2 ml’lik “receiver” tüpe alınmıştır.

7. 12.000 rpm hızda 2 dakika santrifüjlendikten sonra “receiver” tüp atılmıştır.

8. Elüsyon tüpüne aktarılan spin filtre içine 30 µl önceden 50°C’de ısıtılmış elüsyon tamponu eklenmiş, oda ısısında 2 dakika inkübe edilmiştir. 8.000 rpm’de bir dakika santrifüjlenmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. “Spin” filtre atılıp, elüsyon tüpü çalkalanmıştır. Viral DNA ürünü çalışılincaya kadar +4°C’de, hemen çalışılmayacaksa -20°C’de ya da -80°C’de bekletilmiştir.

Amplifikasyon aşaması

Ekstraksiyon aşaması sonrası elde edilen CMV-DNA’sının çoğaltılmasında “RoboGene Human Cytomegalovirus (HCMV) Quantification” Kiti “ABI PRISM® 7000” cihazı ile çalışılmıştır. Bu cihazda yapılan çoğaltma işleminin basamakları aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1) Liyofilize HCMV/IC reaktif karışımına 200 µl steril distile su eklenerek 37°C’de 20 dakika inkübe edilerek kısa süre çalkalanmıştır.

2) Standartlara içeren kuyucuklar ile örnek kuyucukları cihazdaki ayrılan yerlere yerleştirilmiştir.

3) Kontrol ve örnek sayısı kadar örnek başına 6.7 µl steril distile su, 2.5 µl 10x PZR tampon, 2.5 µl 10x pasif referans boya solusyonu, 3 µl MgCl₂, 0.3 µl Taq DNA polimeraz ve 5 µl 5x reaksiyon karışımı (dNTP, primer ve probdan oluşan) içeren HCMV/IC karışımı hazırlanıp 200’er µl kontrol ve örnekleri içeren kuyucuklara 20’şer µl dağıtılmıştır.

4) Steril distile su istenilen kontrol ve negatif kontrol tüplerine ve DNA örnek tüplerine 5’er µl dağıtılmıştır. Tüpler optik bant ile kapatılarak 1000 rpm.’de bir dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Standartlar tüp başına 10⁶, 10⁵, 10⁴, 2.5X10³, 10³, 2.5X10², 5X10¹, 10 DNA bulunacak şekilde dağıtılmıştır.

5) Kuyucuklar PZR cihazındaki bloğa yerleştirildikten sonra, standartlar, negatif kontrol ve örnekler cihazın ekranında işaretlenip, detektör boyalar ve pasif boya işaretlenmiştir.

“RoboGene Human Cytomegalovirus (HCMV) Quantification Kit”i ısı-döngü protokolü 95°C de 10 dakika ilk denatürasyondan sonra 95°C de 30 sn, 59°C de 1.5 dakika olacak şekilde 40 döngüden oluşmuştur. “ABI PRISM 7000” cihazında ısı-döngü programı seçilmiş ve girilmiştir. Örnekler standartlar ve negatif kontroller tanımlandıktan sonra kullanılacak filtre çiftleri seçilerek doğru protokol ve plak eşleşmesi yapılarak kaydedilmiş ve cihaz çalıştırılmıştır. Örnekler, standartlar ve kontroller ile birlikte internal kontroller aynı anda çalışılmıştır.

Verilerin yorumlanması

Isı döngü programı sona erdikten sonra cihaz, “baseline” döngüleri ve eşik değeri otomatik olarak hesaplamaktadır. “Baseline” döngüler her bir örnek, standartlar, negatif kontrol ve internal kontrol için ayrı ayrı belirlenmiştir. Eşik değeri, tüm örneklerin “baseline” döngülerinin üzerindeki standart sapmasının 10 katı olarak hesaplanmış ve standart eğri mümkün olan en yüksek korelasyon katsayısına sahip olacak şekilde ayarlanmıştır. Standart eğri, tanımlanmış standartlardan elde edilen verilerle oluşturulmuştur. Firma tarafından verilen kabul kriterlerine uyup uymadığına bakılarak test sonuçları değerlendirilmiştir. CMV viral yük değerleri kopya/ml olarak belirlenmiştir.

İstatistiksel Analiz

Yaş ortalamalarının ve seroprevalans oranının belirlenmesinde SPSS 14.0 paket programı kullanılmıştır. Sitomegalovirüs IgM pozitif saptanan hastada, amniyon sıvısında CMV-DNA belirlenemediğinden duyarlılık ve özgüllük oranları değerlendirilememiştir.

BULGULAR

Çalışma grubu

Yaşları 20-42 arasında değişen (yaş ortalaması 33.45±6.11) 100 gebe çalışmaya dahil edilmiştir. Gebelerin hemen hepsi ikinci trimesterde olup bu çalışmada genetik tarama için alınan amniyon sıvıları kullanılmıştır.

Gebelerin %27'si nullipar %73'ü multipar olup, %5'inde önceki gebeliklerinde anomalili bebek doğurma, %17'sinde düşük ve %2'sinde inutero ölüm öyküsü belirlenmiştir.

Gebelerin, serumlarına uygulanan ELISA yönteminin absorbans değerlerini gösteren şekiller aşağıda Şekil 2 ve 3'te gösterilmektedir. Sitomegalovirüs IgM sonuçları serum örnekleri veya kontrollerden birinin absorbans değerinin "cut-off" kontrolün absorbans değerine bölünmesi ile elde edilen "Capture Index (CI)" değerine göre yorumlanmış ve gebe serumlarında herhangi bir ara değere rastlanmamıştır. Sitomegalovirüs IgG sonuçları da yorumlanmış ve herhangi bir ara değere rastlanmamıştır. Çalışmada CMV IgG ve CMV IgM tespiti için kullanılan ELISA testinin absorbans değer tabloları Tablo III ve IV'de sunulmaktadır.

Tablo III: CMV IgG absorbans değer tablosu

ABSORBANS DEĞER TABLOSU

Seri #1687, Plate #2

CMVigG
Filtre 1 : 450 (nm) , Filtre 2 : 620 (nm)

CMVigG		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	S 5	S 13	S 21	S 29	S 37	S 45	S 53	S 61				
		5	13	21	29	37	45	53	61				
B	C2	S 7	S 15	S 23	S 31	S 39	S 47	S 55	S 63				
		7	15	23	31	39	47	55	63				
C	C3	S 6	S 14	S 22	S 30	S 38	S 46	S 54	S 62				
		6	14	22	30	38	46	54	62				
D	C4	S 8	S 16	S 24	S 32	S 40	S 48	S 56	S 64				
		8	16	24	32	40	48	56	64				
E	S 1	S 9	S 17	S 25	S 33	S 41	S 49	S 57	S 65				
		9	17	25	33	41	49	57	65				
F	S 3	S 11	S 19	S 27	S 35	S 43	S 51	S 59	S 67				
		11	19	27	35	43	51	59	67				
G	S 2	S 10	S 18	S 26	S 34	S 42	S 50	S 58	S 66				
		10	18	26	34	42	50	58	66				
H	S 4	S 12	S 20	S 28	S 36	S 44	S 52	S 60	S 68				
		12	20	28	36	44	52	60	68				

(*) Okuyucunun çalışma aralığı dışında (> 3 OD).

(#) Değer kullanıcı tarafından değiştirilmiştir.

(x)= Kuyucuk iptal edildi.

Tablo IV: CMV IgM absorbans değer tablosu

ABSORBANS DEĞER TABLOSU
Seri #1687, Plate #1
 CMV IgM
 Filtre 1 : 450 (nm) , Filtre 2 : 620 (nm)

CMV IgM		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CO1	S 6 6	S 13 13	S 21 21	S 29 29	S 37 37	S 45 45	S 53 53	S 61 61				
		0.160	0.193	0.284	0.137	0.193	0.109	0.188	0.116	0.164			
B	CO2	S 7 7	S 15 15	S 23 23	S 31 31	S 39 39	S 47 47	S 55 55	S 63 63				
		0.448	0.204	0.126	0.218	0.247	0.130	0.209	0.113	0.242			
C	CO3	S 8 8	S 16 16	S 24 24	S 32 32	S 40 40	S 48 48	S 56 56	S 64 64				
		0.426	0.234	0.226	0.162	0.167	0.104	0.235	0.135	0.158			
D	S 1	S 9 9	S 17 17	S 25 25	S 33 33	S 41 41	S 49 49	S 57 57	S 65 65				
		2.403	0.226	0.138	0.221	0.240	0.161	0.177	0.126	0.177			
E	S 2	S 10 10	S 18 18	S 26 26	S 34 34	S 42 42	S 50 50	S 58 58	S 66 66				
		0.161	0.231	0.105	0.152	0.110	0.159	0.256	0.123	0.209			
F	S 3	S 11 11	S 19 19	S 27 27	S 35 35	S 43 43	S 51 51	S 59 59	S 67 67				
		0.196	0.171	0.156	0.185	0.114	0.150	0.105	0.230	0.311			
G	S 4	S 12 12	S 20 20	S 28 28	S 36 36	S 44 44	S 52 52	S 60 60	S 68 68				
		0.210	0.176	0.140	0.153	0.302	0.207	0.284	0.127	0.208			
H	S 5	S 13 13	S 21 21	S 29 29	S 37 37	S 45 45	S 53 53	S 61 61	S 69 69				
		0.280	0.199	0.224	0.241	0.175	0.170	0.131	0.141	0.261			

[*] Okuyucunun çalışma aralığı dışında (> 3 OD).
 [†] Değer kullanıcı tarafından değiştirilmiştir.
 (x) = Kuyucu iptal edildi.

Sitomegalovirüs antikorları değerlendirilerek üç gruba ayrılan gebelerde gruplardaki oranlar; CMV IgM-, IgG- olan birinci grupta beş (%5), CMV IgM-, IgG+ olan ikinci grupta 94 (%94) ve CMV IgM+, IgG+ olan üçüncü grupta bir (%1) gebe olarak bulunmuştur. Sitomegalovirüs IgM antikor pozitif bulunan gebenin ELISA testinde optik dansite değeri (O.D) 1.33 index, CMV IgG O.D değeri ise 218 AU/ml olarak bulunmuştur.

Sitomegalovirüs IgG seropozitif gebelerin yaşlara göre dağılımı tablo V'de sunulmaktadır.

Tablo V. Sitomegalovirüs IgG seropozitif gebelerin yaşlara göre dağılımı

<i>Yaş aralığı</i>	CMV IgG (+)	
	sayı	%
20-25 (n=12)	11	91.6
26-30 (n=19)	19	100
31-35 (n=26)	26	100
36-40 (n= 34)	31	91.1
41-45 (n= 9)	8	88.8
Toplam (n=100)	95	95

Bu çalışmada konjenital CMV infeksiyonunun prenatal tanısı için gebelerden 20. gebelik haftasında alınan amniyon sıvı örneklerinden bir tanesinde Real-Time PZR yöntemiyle CMV DNA'sı (216 kopya/mL) belirlenmiştir. Cobas Amplicor CMV Monitor Sistem (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ile de sonuç doğrulanmış ve sonuç 192 kopya/ml olarak bulunmuştur. Bu gebede CMV IgM negatif, CMV IgG antikoruna ise pozitif bulunmuştur. Bu gebenin bebeğinden alınan kan örneğinde ise CMV IgM negatif, CMV IgG pozitif olarak belirlenmiştir. Annenin ve bebeğin serumlarına IgG avidite testi uygulanarak AI sırasıyla %57, %61 bulunmuştur. Sitomegalovirüs IgM ve IgG pozitifliği saptanan diğer bir hastada AI %69 bulunmuştur.

Amniyon sıvılarının alındığı gebelik haftalarının, gebe sayısına göre dağılımı Tablo VI'da sunulmaktadır.

Tablo VI: Gebe sayısının gebelik haftalarına göre dağılımı

Gebelik Haftası	sayı	%
17	35	35
18	22	22
19	15	15
20	20	20
21	8	8
Toplam	100	100

Gebe örneklerindeki serolojik ve PZR yöntemlerinin sonuçları tablo VII'de sunulmaktadır.

Tablo VII. Gebe örneklerindeki serolojik ve PZR yöntemlerinin sonuçları

Örnek	Test	Negatif		<i>Pozitif</i>	
		Sayı	%	Sayı	%
Anne Kanı	Anti CMV-IgG*	5	5	95	95
	Anti CMV-IgM*	100	100	-	-
	Anti CMV-IgG*	-	-	1	1
	Anti CMV-IgM*	-	-	-	-
	PZR	100	100	-	-
Amniyon Sıvısı	PZR	99	99	1	1

*ELISA yöntemi ile

Amniyon sıvı örneklerinde Real Time PZR çalışma verileri Tablo VIII'de gösterilmektedir.

Tablo VIII. Amniyon sıvı örneklerinde Real Time PZR çalışma verileri.

Örnek Numarası	Test	Standartlar ve Örnekler	Ct*	Miktar Kopya/ml
	CMV	Standart 1	17.07	200.000.000
	CMV	Standart 2	20.35	20.000.000
	CMV	Standart 3	23.46	2.000.000
	CMV	Standart 4	25.89	500.000
	CMV	Standart 5	26.84	200.000
	CMV	Standart 6	28.64	50.000
	CMV	Standart 7	31.56	10.000
	CMV	Standart 8	33.36	2000
1	CMV IPC-DNA	A.F**	Undet.*** 37.17	Undet. Undet.
2	CMV IPC-DNA	A.F	Undet. 35.37	Undet. Undet.
3	CMV IPC-DNA	A.F	Undet. 37.57	Undet. Undet.
4	CMV IPC-DNA	A.F	Undet. 37.73	Undet. Undet.
5	CMV IPC-DNA	A.F	Undet. 37.27	Undet. Undet.
6	CMV IPC-DNA	A.F	Undet. 37.26	Undet. Undet.
7	CMV IPC-DNA	A.F	Undet. 36.98	Undet. Undet.
8	CMV IPC-DNA	A.F	Undet. 38.29	Undet. Undet.
9	CMV IPC-DNA	A.F	Undet. 38.09	Undet. Undet.
10	CMV IPC-DNA	A.F	Undet. 37.22	Undet. Undet.
11	CMV IPC-DNA	A.F	Undet. 37.88	Undet. Undet.
12	CMV IPC-DNA	A.F	Undet. 38.13	Undet. Undet.
13	CMV IPC-DNA	A.F	35.86 37.05	216 Undet.
14	CMV IPC-DNA	A.F	Undet. 36.42	Undet. Undet.
15	CMV IPC-DNA	A.F	Undet. 37.17	Undet. Undet.

IPC-DNA: internal kontrol

* siklus zamanı

** amniyon sıvısı

*** Saptanamayan

TARTIŞMA

Sitomegalovirüs infeksiyonları, en sık görülen konjenital infeksiyonlardan olup tüm dünyada özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak görülmektedir (21,93,119-122). Sitomegalovirus, bağışıklık sistemi normal olan bireylerde nadiren semptomatik infeksiyon oluşturmaya karşılık, immunsupresif bireylerde, özellikle transplant alıcılarında ve intrauterin infeksiyon sonrası yenidoğanda, önemli mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır (29,123,124).

Gebelikte CMV infeksiyonu primer ve rekürren infeksiyon olarak görülebilmektedir. Çalışmalarla seropozitif kadınların %10-30'unda gebelik sırasında reaktivasyon gelişebileceği, reaktivasyon gelişenlerin %10'unda da fetal infeksiyon oluşabileceği bildirilmiştir. Ancak bu olgularda fetal hasarın nadir olduğu bildirilmiştir. Seronegatif kadınlarda ise gebelik sırasında primer infeksiyon riskinin daha düşük (%1-2) olmasına karşın, bu vakalarda fetal infeksiyon riskinin daha yüksek (%20-50) olduğu gösterilmiştir (125).

Sitomegalovirus infeksiyonunun görülme sıklığı sosyoekonomik durumlara göre değişmektedir. Değişik ülkelerde yapılan çalışmalarla doğurgan yaş grubundaki kadınlar arasında CMV antikor prevalansının sosyoekonomik düzeyi düşük ülkelerde, gelişmiş ülkelere oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir (11,80,126). Amerika Birleşik Devletleri'nde orta sınıf toplumlarda seropozitivite oranı %50-60 iken, sosyoekonomik düzeyi daha düşük toplumlarda %70-80 oranındadır. Avrupa'da gebelerin yaklaşık %45'i gebelik başlangıcında seropozitifler (127).

Ülkemizde ise seropozitiflik oranları %80 ile %100 arasında değişmekte olup bu oranlar diğer gelişmekte olan ülkelerin sonuçları ile uyumluluk göstermektedir (79,80,128,129-132). Ankara'da yapılan iki ayrı çalışmada, CMV IgG pozitifliği %95.4 (133) ve %99 (132) olarak bulunmuştur. Malatya ilinde Bulut ve ark.(130)'ları 1995-1999 yılları arasında 828'i gebe ve 4042 doğurgan yaştaki kadınları inceledikleri çalışmalarında, gebelerin %0.6'sında CMV IgM, %78'inde CMV IgG, %10'da CMV IgM+IgG pozitifliği saptamışlardır. Doğurganlık çağındaki kadınlarda bu oranlar sırasıyla %1.7, %80.6 ve %1.8 olarak bulunmuştur. Yine Tekerekoğlu ve ark. (120), 2003'de yaptıkları çalışmalarında doğurganlık çağındaki 593 kadında CMV IgM ve CMV IgG için sırasıyla %0.4 ve %94 oranında pozitiflik saptamışlardır. Afyon'da Altındış ve ark. (79), 2002 yılında inceledikleri

540 gebenin 455 (%84.3)'inde CMV-IgG, 28 (%5.2)'inde CMV IgG ve beraberinde IgM pozitifliği bulunmuşlardır. Yine Afyon'da Yılmaz ve ark. (78)'nin 2004 yılında yaptıkları çalışmada 244 gebede CMV seropozitifliğini %92.6 olarak bulunmuşlardır. Samsun'daki gebelerde CMV IgG pozitifliği %98.8 (129), Antalya'da %98.5 (80), İzmir'de %98.2 (134) olarak bildirilmiştir.

Bu çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen 100 gebenin serumlarında CMV IgG ve CMV IgM antikorları belirlenerek bu antikor sonuçlarına göre üç gruba ayrılmıştır. Buna göre CMV IgM-, IgG- olan birinci grupta beş (%5), ikinci grupta CMV IgM-, IgG+ olan 94 (%94), üçüncü grupta CMV IgM+, IgG+ olan bir gebe saptanmıştır. Ayrıca 2008 yılında yapılan 2005-2007 yıllarını kapsayan 15-49 yaş kadın grubundaki 1269 kadında seropozitiflik oranı %92.8 (yayınlanmamış bilgi) bulunmuştur. Bu bulgular doğurganlık yaşlarındaki kadınlardan büyük bir bölümünün, hayatlarının herhangi bir döneminde CMV ile karşılaştıklarını göstermekte olup, ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Yüksek CMV IgG varlığı, gebelerde CMV taramasının yararlı olacağını düşündürmektedir. Özkan ve ark. (131)'nin çalışmalarında, seropozitivite oranının yaşla birlikte arttığı bildirilmiş olmasına karşın, çalışmamızda bu oranın yaşla birlikte artmadığı belirlenmiştir. Buna rağmen CMV IgG pozitiflik oranının doğurganlığın etkin olduğu 20-35 yaşlarda en yüksek seviyelerde olduğu (Tablo III) görülmüştür. En düşük seropozitiflik oranı, 41-45 yaş arasındaki gebelerde saptanması, çalışmada, bu gruptaki gebelerin az sayıda olmasına bağlanmıştır.

Sitomegalovirus primer infeksiyonunun tanısında en sık kullanılan yöntemler arasında, serolojik testlerden CMV IgM ve CMV IgG antikor testleri bulunmaktadır (19). Gebelik öncesi seronegatif kadınlarda, gebelik sırasında CMV-IgG serokonversiyonu gelişmesi primer infeksiyonun göstergesidir (29,106). Çoğu zaman ilk olarak CMV IgM ve IgG pozitifliği ile karşılaşılmakta ve annenin önceki CMV immunité durumu bilinmemektedir. Bununla birlikte CMV IgM'in pozitif bulunması da her zaman primer infeksiyonu göstermemekte, yalancı pozitif sonuçlar da görülebilmektedir (6,106,135). Primer infeksiyonda CMV IgM, infeksiyonun başlangıcından itibaren yükselmekte, bir ile üç ay yüksek ya da orta düzeylerde saptanabilmekte, daha sonra azalarak kaybolmaktadır. Ancak bazı olgularda sekiz ay bazen bir yıldan daha uzun sürelerde pozitiflik devam edebilmektedir (105,122). Ayrıca CMV IgM pozitifliği, rekürren CMV infeksiyonunda ya da CMV infeksiyonu dışındaki bazı infeksiyonların seyrinde de görülebilmektedir (106). Kullanılan

farklı test teknikleri ya da farklı firma kitleri ile de farklı CMV IgM sonuçları alınabilmektedir (106,122,128). Bu gibi nedenlerden dolayı CMV-IgM test pozitifliğinin saptanması halinde doğrulayıcı testler uygulanmalıdır (11,29,106). İmmunoblot testi serumdaki IgM antikorlarını doğrulama amacıyla kullanılabilen testlerden biri olup, duyarlılığı ve özgüllüğü %100'dür (106).

Son zamanlarda indirekt ELISA ve capture ELISA yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. İndirekt ELISA tam kandan çalışıldığında CMV IgM antikor tespitinde yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlar alınabilmektedir. Bu yanlış pozitif reaksiyonlar, serumun spesifik CMV IgG varlığında olağandışı yüksek düzeyde romatoid faktör (RF) içermesi nedeniyle meydana gelmektedir. Romatoid faktör, genellikle IgM sınıfında bir immunglobulindir ve IgG ile reaksiyona girmekte ve bazı romatizmal hastalıklar, vaskülit ve CMV gibi bazı viral infeksiyonlarda üretilmektedir. IgM yapısındaki RF, CMV spesifik IgG içerebilen IgG ile kompleks oluşturmaktadır. Bu nedenle IgM ölçümünde RF uzaklaştırılmalıdır. Diğer taraftan IgM'in yanlış negatif olarak sonuçlanması ise yüksek düzeydeki IgG antikorlarının yarışmalı inhibisyon yaparak, CMV antijenine IgM bağlanmasını engellemesiyle meydana gelmektedir. IgG ve IgM antikorlarının test yapılmadan önce ayrılması yanlış negatif ve pozitif sonuçların ortaya çıkma sıklığını azaltabilmektedir (19,24). Bu engelleyici faktörlerin ortadan kaldırılması için bazı yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında jel filtrasyon, affinite kromatografisi, selektif olarak IgM'in solid faza absorpsiyonu, hiperimmün IgG kullanılarak IgG'yi ayırma yöntemi, stafilkokal protein A veya Grup G streptokoklardan hazırlanan rekombinan protein G kullanılarak IgG'yi uzaklaştırma yöntemleri yer almaktadır (24). Bu çalışmada hatalı sonuçların çıkmasını önlemek amacıyla "capture ELISA" yöntemi kullanılmıştır.

Primer CMV infeksiyonunu, rekürren infeksiyondan ayırt etmede, CMV IgG avidite testi uygulanmaktadır (29,136). Sitomegalovirüs IgG avidite testi, gebelerde primer infeksiyonu doğrulamada güvenilir bir yöntemdir (106,136,137). Revello ve ark. üç aydan önceki dönemde primer infeksiyon durumunda avidite indeksini %21, eski veya geçirilmiş infeksiyonda ise %78 bulmuşlardır (138). Gebelerde ve transplant alıcılarında yapılan bir çalışmada (139), primer CMV infeksiyonu geçirenlerin %88.6'ında düşük avidite saptanırken, rekürren olguların hiçbirinde düşük avidite bulunmamıştır. Bodeus ve ark. (126), gebeliğin ilk trimesterinde düşük aviditeli gebelerin %16.7'sinde fetüse geçiş olduğunu, oysa ikinci ve

üçüncü trimesterde düşük aviditeye sahip kadınların %40'nın infeksiyonu bebeğe geçirdiği saptamışlardır.

Altuğlu ve ark. (140) CMV IgG ve IgM birlikte olumlu bulunan olgularda avidite testi uygulamışlar, 39 örneğın yedisinde (%23,3) avidite indeksini %40'ın altında ve en az iki ELISA sistemi ile CMV IgM olumlu olan 22 örnekten altısında (%27,2) avidite indeksini düşük belirlemişlerdir. Sitomegalovirüs IgM'in tek ELISA yöntemi ile olumlu olduğu ya da sınırda olumlu bulunan 17 olgunun birinde (%5,9) avidite indeksini düşük olarak saptamışlardır. Yücel ve ark. (122) 68 gebenin kan örneklerinde CMV spesifik antikor ve avidite testlerini uyguladıkları çalışmalarında, CMV IgM pozitifliğini, uyguladıkları iki farklı (MEIA ve ELISA) yöntemle %33.3 bulmuşlar, bunların %8.8'inde AI oranını düşük olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmalarda yazarlar, CMV IgG ve IgM ELISA testleri ile birlikte, avidite testlerinin yapılmasının, primer CMV infeksiyonu tanısında yararlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, CMV IgM+, IgG+ olan grupta bir (%1) gebe belirlenmiştir. Bu gebenin primer ya da rekürren CMV infeksiyonu ayırımı için avidite testi yapılmış ve AI %69 olarak bulunmuş, infeksiyonun rekürren infeksiyon olduğu düşünülmüştür. Diğer gebelerde ise tek başına IgM pozitifliğine rastlanmamıştır. Amniyon sıvısında CMV DNA tespit edilen, ancak CMV IgG antikor pozitif, CMV IgM antikor ise negatif olan bir gebeye de avidite testi uygulanmıştır ve AI %57 olarak belirlenmiştir. Avidite indeksi için kullanılan test, üretici firmanın önerilerine göre değerlendirildiğinde, sonuçlar yüksek aviditeli olarak yorumlanmıştır. Bu gebenin bebeğine doğar doğmaz ulaşamadığı için kan örneği ancak altı ay sonra alınabilmiş ve avidite testi uygulanmıştır. Bebeğin AI %61 olarak bulunmuştur. Her iki gebenin CMV infeksiyonlarını daha önce geçirdikleri ve bebeğe ise antikorların annesinden geçtiğine karar verilmiştir.

Avidite testlerinde değerlendirme “düşük”, “kuşkulu” ve “yüksek” avidite indeksi şeklinde yapılmaktadır. Düşük avidite, akut ya da yeni bir infeksiyonu gösterirken, yüksek avidite saptanması, geçirilmiş infeksiyon için iyi bir gösterge olmaktadır. Birçok çalışmada düşük ve yüksek avidite sonuçlarının yanı sıra kuşkulu sonuçlarda bildirilmektedir. (80,141) Kuşkulu sonuçlarda, avidite testinin iki hafta sonra CMV IgG testi ile birlikte tekrarlanması sonuçların daha doğru yorumlanmasını sağlayabilmektedir (14,122). Kuşkulu avidite indeks sonuçlarının, avidite maturasyonunun gecikmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Düşük avidite durumunda, bazı araştırmacılar tarafından, önerilen tanı algoritmalarında olduğu gibi,

amniyon sıvısında PZR ile CMV DNA'nın araştırılmaktadır. (80). Kuşkulu avidite sonuçlarında tekrara rağmen aynı sonuçlar alınmıyorsa bu bireylere amniyon sıvısında CMV DNA'nın PZR ile belirlenmesi önerilebilir.

Prenatal tanı için diğer bir yöntem amniyon sıvısında kültür ve/veya PZR testi ile CMV-DNA'nın gösterilmesidir (106,142). Her iki yöntem fetüsün infekte olup olmadığını tespit edebilmekte iken, infeksiyonun fetal sonuçları için viral yükün kantitatif tayini gerekmektedir (142). Konjenital CMV infeksiyonunda virüs, infekte lökositlerle plasental bariyeri geçerek fetal dolaşıma ulaşmakta ve fetal dokularda özellikle böbreklerde çoğalarak idrar yolu ile amniyon sıvısına atılmaktadır. Bu nedenle prenatal tanıda amniyon sıvısı ve fetal kan en uygun örneklerdir (142,143). Amniyon sıvısında virüs izolasyonu için kullanılan klasik ya da hızlı hücre kültür yöntemleri fetal infeksiyonu tanımlamada %100 özgüllükte iken (7,93,144-146), düşük duyarlılık göstermektedir (93,147,152). Kültür negatif örneklerde PZR ile CMV DNA'sı %7-50 arasında belirlenebilmektedir (93,145,147).

Birçok çalışmada CMV'nin prenatal tanısında, amniyon sıvısında PZR ve hücre kültür yöntemleri tek başlarına ya da birlikte uygulanabilmektedir. Grangeot-Keros ve ark.(11)' larının çalışmasında gebeliği sırasında serokonversiyon gösteren onyediyi gebeye amniyosentez yapılmış ve dördünde (%23.5)'ünde hem kültür hem de PZR ile CMV tespit etmişlerdir. Ziyaeyan ve ark. (121)'nin çalışmalarında, 92 gebenin ve bebeklerinin %98'de CMV-IgG ve bu gebelerin %5.4'ünde CMV IgM pozitifliği tespit edilmiştir. Bu Ig M pozitifliği saptanan annelerin bebeklerinde CMV IgM pozitifliği saptanmazken CMV-IgG pozitifliği olan annelerin bebeklerinde %3.3 oranında IgM pozitifliği belirlenmiştir. Pozitif IgM tespit edilen anne ve bebeklerin serumlarında CMV-DNA saptanmış, serumlarında DNA tespit edilen fetüslerin annelerinin amniyon sıvılarında da CMV-DNA tespit edilmiştir.

Sitomegalovirüsün prenatal tanısında amniyon sıvısında PZR ile hücre kültür yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda duyarlılık PZR yönteminde daha yüksek bulunmaktadır. Lazzarotto ve ark. (147), 82 gebede amniyon sıvılarında uyguladıkları PZR yönteminde duyarlılığı %100, kültür yönteminin duyarlılığını %50, her iki yöntemin özgüllüklerini %100 oranında bildirmişlerdir. Revello ve ark. (148).da benzer şekilde amniyon sıvısında CMV-DNA belirlenmesinde PZR yönteminin duyarlılığını (%76.9) kültürden (%69.2) daha yüksek, özgüllüklerini ise aynı (%100) bulmuşlardır. Gouarin ve arkadaşları (149)'nin çalışmalarında, serokonversiyon gösteren 152 gebenin 95'inin amniyon sıvısına prenatal tanı için kültür ve PZR uygulanmış, 94'ünde kültür ve PZR ile CMV tespit

edilirken bir vakada PZR pozitif iken kültür negatif sonuç vermiştir. Prenatal tanı için amniyon sıvısında her iki yöntemin duyarlılığı %72.4 olarak bulunurken, özgüllükleri kültür için %98.4, PZR için %96.9, yöntemlerin PPD'leri sırasıyla, %95.6 ve %91.3 olarak bulunmuştur.

Hücre kültür yöntemi ile PZR yöntemlerinin birlikte kullanıldığı çalışmalarda duyarlılık oranının, tek başına kullanılmalarına oranla daha da yükseldiği bildirilmektedir. Antsaklis ve ark. (150) hücre kültür ve PZR yöntemlerinin birlikte kullandıkları çalışmalarında duyarlılığı %85,7 olarak bulmuşlardır. Lipitz ve ark. (151)'ları, primer infeksiyonlu 50 gebenin amniyon sıvılarında, viral izolasyon ve PZR yöntemini uyguladıkları çalışmalarında, her iki yöntemin birlikte intrauterin CMV infeksiyonu tanısında yaklaşık %94 kesinlik sağladığı tespit edilmiştir. Nigro ve ark. (152) ise, 117 gebeden alınan amniyon sıvılarında kültür ve PZR yöntemleri ile CMV araştırdıkları çalışmalarında, primer infeksiyonlu gebelerde %52'sinde PZR ile, %36'sında kültür ile CMV izolasyonu tespit edilmiştir. Rekürren infeksiyonlu gebelerin %22'sinde PZR ile, %4'ünde kültür ile pozitiflik saptanmıştır.

Amniosentez sırasındaki gebelik yaşı prenatal tanının duyarlılığını etkilemektedir (153). Amniyon sıvısı örnekleme için amniosentez, gebeliğin 21-22. haftalarında yapılması önerilmektedir (106). Gebeliğin 21. haftasından önce alınan amniyon sıvısından yapılan prenatal tanı duyarlılık %30 iken, 21. haftadan sonra duyarlılık %71-100'e ulaşmaktadır (150). Gebelik yaşının 21 haftadan küçük olması ve maternal infeksiyon ile örnekleme zamanı arasında altı-dokuz haftadan daha az süre geçmesi gibi nedenlerle PZR duyarlılığı düşmektedir. Ayrıca kullanılan PZR protokolü de duyarlılığı etkilemektedir (154). Sitomegalovirus DNA'sının kalitatif PZR yerine kantitatif olarak saptanması, fetüsdeki CMV riskini belirlemede yararlı olmaktadır. Kalitatif PZR yöntemlerinde duyarlılık %71-%100 arasında değişmekte ve yalancı negatif sonuçlar alınabilmektedir (146,154).

Bu çalışmada seropozitif gebelerden birinde amniyon sıvısı örneğinde CMV DNA (216 kopya/mL) belirlenmiştir. Bu pozitif örnek, (düşük seviyede viral yükün bulunması nedeniyle), en düşük saptama limiti 400 kopya/ml olan farklı bir PZR testi Cobas Amplicor CMV test sistemi (Roche Diagnostic Systems, Mannheim, Germany) ile tekrar çalışılmış ve örnekteki viral yük benzer miktarlarda (192 kopya/ml) bulunmuştur. Bu gebedeki viral yükün düşük bulunma nedeni olarak, CMV infeksiyonunu gebeliğinden önce ya da gebelik

başlangıcında geçirmiş olabileceği düşünülmektedir. Çalışma grubumuzda bu hasta dışında amniyon sıvılarında ve serum örneklerinin hiçbirinde CMV DNA pozitifliği bulunmamıştır.

Yalancı negatif sonuçları önlemek için amniyosentezin gebeliğin 21. haftasından sonra yapılmasının daha uygun olduğu belirtilmektedir (155). Çalışma grubundaki gebelerin büyük bir kısmında amniyosentez uygulama zamanı, gebeliğin 21.haftadan önce olması nedeniyle, infeksiyon, gerçekten daha düşük oranda tespit edilmiş olabilir.

Kalitatif PZR, virüsün varlığını ya da yokluğunu gösterirken, kantitatif PZR, örnekteki viral yükün ölçümüne olanak sağlamaktadır (155). Kantitatif PZR ile amniyon sıvısında mililitrede en az 10^3 virüs genomunun bulunması fetüsün %100 infekte olduğunu, en az 10^5 viral genomun varlığı ise fetüste semptomatik infeksiyonun varlığını düşündürmektedir (156,157).

Gouarin ve ark. (155)'ları kültür ve kalitatif PZR ile pozitif bulunan primer infeksiyonlu 30 gebenin amniyon sıvısında CMV viral yükünü real-time PZR yöntemi ile belirledikleri. çalışmalarında, kalitatif PZR'nin iyi bir yöntem olduğunu, ancak infekte fetüslerin semptomatik ya da asemptomatik ayrımı için kantitatif PZR'in kullanılmasının uygun olacağını bildirmişlerdir. Revello ve ark. (158)'ları konjenital infeksiyonlu fetüslerin annelerinden alınan amniyon sıvı örneklerinde kantitatif PZR yöntemi ile semptomatik fetüslerde CMV DNA düzeyinin asemptomatik fetüslere oranla daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. İki araştırmacı grubu benzer şekilde kantitatif PZR testiyle saptanan viral yükün, semptomlu ve semptomsuz fetüslerin ayrımındaki önemini vurgulamışlardır.

Bu çalışmada fetal anomaliye neden olabilecek CMV infeksiyonunu belirlemede, viral yükü saptamak amacıyla real-time PZR yöntemi kullanılmış ve CMV DNA viral yükü düşük bulunmuştur. Bu gebenin takiplerinde USG ile herhangi bir anomaliye rastlanmamış olması, postnatal dönemde bebekte klinik bulgu olmayışı ve viral yükün infeksiyon için düşük bulunması nedenleri ile bebeğin büyük olasılıkla infekte olamayacağını düşündürmektedir. Ancak ileri yaşlarda CMV infeksiyonuna bağlı sekel görülebilme olasılığı açısından aile bilgilendirilmiş ve takip için Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniği'ne yönlendirilmişlerdir.

Amniyon sıvısında ve fetal kanda CMV'nin varlığının PZR ve kültür yöntemleri ile gösterilmesinin yanı sıra fetüs kanında CMV IgM antikorlarının serolojik olarak saptanması da tanı da değer taşımaktadır. Konjenital CMV infeksiyonunda yenidoğanlarda IgM oranı %50-90 arasında değişmektedir. Ancak negatif sonuçlar yüksek oranda belirlenmektedir. Bunun olası nedenlerinden biri fetüsün immun sisteminin immatür olması

nedeniyle IgM düzeyi tespit edilemeyecek kadar düşük olabilmektedir (89,143). Bu nedenlerle fetal kan örneği, prenatal tanıda tek başına değersiz olabilmektedir (7,89).

Sitomegalovirus prenatal tanısında amniyon sıvısı ile koryonik villus, kord kanı, ve servikovajinal smear örneklerinin birlikte değerlendirildiği birçok çalışma bulunmaktadır (159). Biri ve ark. (93)'ları servikovajinal smear ve amniyon sıvısı örneklerinde real-time PZR yöntemi kullanarak CMV prenatal tanısına yönelik çalışmalarında, 135 servikovajinal smear örneğinin ikisinde (%1.5), 71 amniyon sıvısı örneğinin birinde (%1.4) CMV-DNA belirlemişlerdir. Enders ve ark. (154) fetal kandan CMV-DNA ve CMV-IgM antikoları ya da amniyon sıvısı ve fetal kan örneklerinin her ikisinde CMV-DNA ya da CMV-IgM antikoları testlerinin duyarlılığı %100 olarak bulunmuştur.

Yakın zamana kadar yapılan çalışmalar özellikle seronegatif gebelerde görülen primer CMV enfeksiyonunu tespit etmeye yöneliktir (135,160). Son çalışmalarda ise gebelerdeki rekürren CMV enfeksiyonlarının da primer CMV enfeksiyonu kadar ciddi sonuçlar doğurabileceğine dikkat çekilmektedir (160,161). Konjenital CMV enfeksiyonlu bebeklerin %60'ı, gebelik öncesi seropozitifliği olan annedeki rekürren maternal enfeksiyona bağlı olarak, virüsün transplasental geçişiyle enfekte olabileceği bildirilmektedir (75,160). Bu sebeple ülkemiz gibi rekürren enfeksiyon geçirme riskinin daha sık olduğu gelişmekte olan ülkelerde, rekürren CMV enfeksiyonlarının primer enfeksiyona göre daha fazla riskli olabileceği söylenebilir (160).

Konjenital CMV enfeksiyonun riskleri ile ilgili doğru veriler, seroprevalansın yüksek olduğu ülkemiz gibi toplumlarda, gelecekte yapılacak prospektif, çok iyi planlanmış, geniş kapsamlı epidemiyolojik çalışmalarla sağlanabilir. Ayrıca toplumun ve sağlık çalışanlarının, rekürren maternal CMV enfeksiyonlarının da primer kadar risk taşıdıkları ve gebeliklerin planlı ve takip altında gerçekleştirilmesi konularında bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Toplum ve sağlık çalışanları, CMV enfeksiyonu bulaş yolları ve hijyenik tedbirler yönünden bilgilendirilmelidir (160).

Sitomegalovirus gebelikte geçirildiğinde fetal hasar oluşturabilmektedir. Çalışma grubumuzdaki gebelerin %5'inde CMV'ye karşı koruyucu antikorun olmadığı gözlenmektedir. Sitomegalovirüs açısından gebelik öncesi enfeksiyon durumunun belirlenmesinin önemi ortaya çıkmaktadır.

Sonuç olarak gerçekleştirilecek planlı gebelikler ve alınacak koruyucu önlemlerle birlikte uygulanacak düzenli antenatal, intrapartum, postpartum tarama ve takip programları

ile saptanacak konjenital CMV enfeksiyonu vakalarının erken tedavileri, uzun süreli takip ve izolasyonları ile bu hastalığa bağlı gelişen ve giderek artan mortalite ve morbidite oranları azaltılabilir. Asemptomatik konjenital CMV enfeksiyonu vakalarını saptamak, bunlarda ortaya çıkabilecek ilerleyici nörodejeneratif bozuklukları önlemek amacıyla gebelere Ig tedavisi vermek ve riskli gebelerin izole edilip alınacak hijyenik tedbirlerle gebelere ve çocuklara bulaşı önlemek amacıyla neonatal tarama programları uygulanabilir. Ayrıca, riskli gebelerde moleküler testler için amniyosentez, 21. haftadan önce uygulandığında da negatif sonuç alınabileceği akılda tutulmalıdır.

SONUÇ

Bu çalışmada, sitomegalovirüs IgG ve IgM antikorlarının gebelerdeki seropozitiflik oranları, yaş gruplarına göre dağılımı, annedeki CMV enfeksiyonunun varlığı ve amniyon sıvısına geçip geçmediği araştırılmıştır. Çalışmamızda Mart 2006 ve Aralık 2008 tarihleri arasında riskli gebelik nedeniyle amniyosentez yapılan ve kan örneklerinin Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda incelendiği 100 gebe kadının kan ve amniyon sıvı örneklerinde, CMV enfeksiyonunun varlığını tespit etmek amacıyla kullanılan CMV-IgM ve IgG antikor ELISA testleri, IgG avidite testi ve CMV DNA real time PZR yöntemi sonucunda;

1. Sitomegalovirüs IgG antikorları 100 gebenin 95'inde (%95) tespit edilmiştir. Bu sonucun, ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde yapılan çalışmalarla uyumluluk gösterdiği, seropozitiflik oranının yüksek olduğu belirlenmiştir. Diğer bir deyişle primer CMV enfeksiyon riski düşük bulunmuştur.

2. Anti CMV IgM antikor cevabı ise bir (%1) gebede pozitif olarak bulunurken, aynı gebenin CMV IgG antikoru da pozitif olarak belirlenmiştir. Bu gebenin serum örneğine avidite testi yapılmış ve AI'i %69 olarak belirlenmiş ve enfeksiyonun rekürren enfeksiyon olduğu kanısına varılmıştır. Sadece CMV IgM ya da IgG ile birlikte CMV IgM pozitifliği belirlenen gebelerde avidite testi yapılması gerektiği, böylece primer ve rekürren enfeksiyon ayrımı yapılabileceği düşünülmüştür.

3. Kan örneklerinin hiçbirinde real-time PZR yöntemi ile CMV DNA saptanmazken, CMV IgG seropozitifliği belirlenen bir gebenin amniyon sıvı örneğinde CMV DNA tespit edilmiş fetal enfeksiyon oranı %1 olarak bulunmuştur.

4. Amniyon sıvısında CMV DNA saptanan gebe ile bu gebenin bebeğinin kan örneklerinde IgG avidite testi çalışılmış ve hepsinde AI %57 ve %61 olarak bulunmuştur. Bu sonuçların da rekürren CMV enfeksiyonunu gösterdiği kanaatine varılmıştır.

Sonuçta tüm gebelerin, gebelikleri saptandığında CMV enfeksiyonu yönünden serolojik olarak taranması, ayrıca IgM pozitifleşmesi ya da serokonversiyon durumunu belirlemek için taramanın tekrarlanması gerektiği düşünülmektedir. İnfeksiyonu düşündürecek sonuçlarla karşılaşıldığında primer ve rekürren enfeksiyon ayrımı için avidite testi gibi kolay uygulanabilen bir doğrulama testinin yapılabileceği, avidite indeksinin düşük çıktığı durumlarda primer enfeksiyon olarak değerlendirilip, amniyon sıvı örneğinin CMV DNA ve viral yük açısından PZR yöntemi ile incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

ÖZET

Amaç ve Hipotez: Sitomegalovirüs viral intrauterin infeksiyonların en sık sebebidir. Gebelerdeki primer ve rekürren CMV infeksiyonları, anne ve bebeğinde ciddi sonuçlara neden olabileceğinden iyi tanımlanması ve buna göre korunma ve tedavi şekillerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada riskli gebelerde sitomegalovirüs IgG ve IgM antikorlarının seropozitiflik oranlarını belirlemek ve amniyon sıvısında CMV-DNA varlığını tespit etmek amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışma Mart 2006-Aralık 2008 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır. Çeşitli obstetrik nedenlerden dolayı amniyosentez yapılan 100 gebenin kan ve amniyon sıvı örnekleri incelenmiştir. Kan örneklerinde CMV IgG ve IgM antikorlarının varlığı CMV IgM μ -capture ve IgG ELISA (Meddens Diagnostics BV) testi ile, avidite indeksi, CMV IgG avidite ELISA (Radim SpA, Pomezia-Roma-İtalya) testi ile araştırılmıştır. Gebeler CMV IgM antikor varlığına göre seropozitif ya da seronegatif ve avidite indeksine göre primer ya da rekürren infeksiyon olarak gruplandırılmıştır. Kan ve amniyon sıvı örneklerinde CMV DNA varlığı “RoboGene Human Cytomegalovirus (HCMV) Quantification Kit” (RoboGene®AJ Roboscreen GmbH, Germany) ile “ABI PRISM 7000”(Applied Biosystems, USA) cihazında real-time PZR yöntemi ile araştırılmıştır.

Bulgular: Gebelerde seropozitiflik oranı %95, seronegatiflik oranı ise %5 olarak bulunmuştur. Fetal infeksiyon oranı %1 oranında saptanmıştır. Bir gebenin amniyon sıvı örneğinde PZR yöntemi ile CMV DNA tespit edilmiş, bu gebenin ve bebeğinin ve ayrıca CMV IgM pozitifliği olan diğer gebenin kan örneklerine yapılan CMV IgG avidite testinde, avidite indeksleri yüksek bulunmuştur. Kan örneklerinin hiçbirinde CMV DNA tespit edilememiştir.

Sonuç: Bölgemizde seropozitiflik oranının yüksek olması nedeniyle fetal infeksiyon oranı düşük bulunmuştur. Gebelikte serokonversiyon geliştiğinde ya da CMV IgM antikor pozitifliği saptandığında, gebelerin CMV açısından serolojik yönden taranmalı ve sonuçlar avidite testi ile desteklenmelidir. Akut infeksiyon durumunda, 21-22 gebelik haftasında amniyon sıvısından yapılacak CMV PZR testi ve/veya kültür uygulanabilir. Sonuç olarak riskli gebeler CMV infeksiyonu yönünden taranmalıdır. Riskli gebeliklerde 21-22.

haftadan önce alınan amniyon sıvısında CMV DNA'nın negatif saptanabileceği akılda tutulmalıdır.

Yazışma Adresi: Dr. Gonca EVCİL
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tel: (+90) (256) 444 12 56 / 517
E-posta: goncaevcil@mynet.com

INVESTIGATING WITH SEROLOGICAL AND MOLECULAR METHODS OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN RISKY PREGNANT WOMEN

SUMMARY

Aim and Hypothesis: Cytomegalovirus (CMV) is the most commonly encountered cause of viral intrauterine infections. As primary and recurrent CMV infections in pregnancy can lead to severe conditions in both the mother and the fetus it should be described properly in order to take precautions and treat these infections. In this study, we aimed to determine the ratio of CMV seroconversion and the presence of CMV DNA in amniotic fluids from risky pregnant women in Aydın region.

Method: During the period between March 2006 to December 2008 in Laboratory of Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Adnan Menderes University Faculty of Medicine, CMV-specific IgG and IgM were determined by ELISA (Meddens Diagnostics BV) in 100 pregnant women who were performed amniocentesis for a variety of obstetric indications at 17 to 21 weeks of gestation. Avidity index was studied by ELISA (Radim SpA, Pomezia-Roma-İtalya). The pregnant women were classified as seropositive or not according to the presence of CMV-specific IgG and IgM and a primary or a recurrent CMV infection according to avidity index of anti-CMV IgG. CMV DNA was investigated in the amniotic fluid and blood samples by real-time (RT) polymerase chain reaction (PCR) assay.

Results: The rate of seropositivity was found as 95 % and seronegativity as 5 % in pregnant women and the fetal infection rate was found 1 %. The only a pregnant women was positive for CMV DNA by RT PCR and high avidity index. The infant whom mother determined CMV DNA in her amniotic fluid showed high avidity index. The another pregnant woman was found CMV IgM positive and also high avidity index but not detected CMV DNA in her amniotic fluid. CMV DNA was not found in any of the blood samples.

Conclusion: We concluded that the fetal CMV infection rate is very low due to high maternal seropositivity in our region. During the pregnancy, serological screening of

CMV in mother should be supported with avidity test whwn seroconversion ocured or CMV IgM antibody positivity determined. In acute infections cases, CMV quantitative PCR and/or cell culture assays can be applied to amniotic fluid in the 21-22th weeks of pregnancy. As a result, the pregnant women had risk factors should be screened in terms of CMV infection.

Key words: CMV, seropositivity, amniotic fluid, real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Correspondence Author: Dr. Gonca EVCİL

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tel: (+90) (256) 444 12 56 / 517
E-posta: goncaevcil@mynet.com

KAYNAKLAR

1. Gaytant MA, Steegers E, Semmekrot BA, Merkus H, Galama J. Congenital cytomegalovirus infection: Review of the epidemiology and outcome. *Obstet Gynecol Surv* 2002; 57(4): 245-55.
2. Bilgiç A, Özacar T. İnsan Sitomegalovirusu. Ustaçelebi Ş (Ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 835-41.
3. Crumpacker CS, Wadhwa S. Cytomegalovirus. In: Mandell GM, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practise of Infectious Diseases*, 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elseiver Churchil Livingstone, 2005; 1786-1801.
4. Tookey PA, Ades AE, Peckham CS. Cytomegalovirus prevalence in pregnant women: the influence of parity. *Archives of disease in childhood* 1992; 67: 779-783.
5. Daiminger A, Bäder U, Enders G. Pre- and periconceptional primary cytomegalovirus infection: risk of vertical transmission and congenital disease. *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2005; 112: 166-172.
6. Lazzarotto T, Gabrielli L, Lanari M, Guerra B, Bellucci T, Sassi M. Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Hum Immunol* 2004; 65: 410-5.
7. Hohlfeld P, Vial Y, Maillard-Brignon C, Vaudaux B, Fawer CL. Cytomegalovirus fetal infection: Prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol* 1991; 78: 615-8.
8. Gindes L, Teperberg-Oikawa M, Sherman D, Pardo J, Rahav G. Congenital cytomegalovirus infection following primary maternal infection in the third trimester. *BJOG* 2008; 115: 830-5.
9. Lazzarotto T, Varani S, Gabrielli L, Spezzacatena P, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Intervirology* 1999a; 42: 390-7.
10. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. *The Human Cytomegalovirus. Pharmacology & Therapeutics*, 2003; 98:269-97.

11. Keros LG, Simon B, Audibert F, Vial M. Should we routinely screen for cytomegalovirus antibody during pregnancy? *Intervirology* 1998; 41: 158-162.
12. Chen MH, Chen PC, Jeng SF, Hsieh CJ, Su FC, Liao HF, Su YN, Lin SJ, Hsieh WS. High perinatal seroprevalans of cytomegalovirus in northern Taiwan. *Journal of Pediatrics and Child Health* 2008; 44: 166-9.
13. Biron KK. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Research* 2006; 71: 154–163.
14. Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* 1999; 104: 55–60.
15. Murph JR, Souza IE, Dawson JD, Benson P, Petheram ST, Pfab D, Gregg A, O’Neill ME, Zimmerman B, Bale JF. Epidemiology of cytomegalovirus infection: maternal risk factors and molecular analysis of cytomegalovirus strains. *Am J Epidemiol* 1998; 147(10): 940-7.
16. Tezer H, Seçmeer G. Sitomegalovirüs (CMV) infeksiyonları. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2007; 38: 1-7.
17. Demmler GJ. Cytomegalovirus. In: Gershon AA, Hotez PJ, Ketz SL (eds). *Krugman’s Infections Diseases of Children*, 11th ed. Philadelphia, Mosby, 2004: 47-65.
18. Ho M. The history of cytomegalovirus and its disease. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197: 65-73.
19. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn Infant. *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 15(4): 680- 715.
20. Tanrıverdi S, Yılmazel U. Sitomegalovirüs infeksiyonları. 1992; 12: 120-7.
21. Revello MG, Gerna G. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2004; 29: 71–83.
22. Straus SE. Intraduction to Herpesviridae. In: Mandell GM, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practise of Infectious Diseases*, 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elseiver Churchil Livingstone; 2005; 1756-62.
23. Gandhi MK, Khanna R. human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation and emerging treatments. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 725–38.

36. Jones CA. Congenital cytomegalovirus infection. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2003; 33: 65-93.
37. Bale JF, Murph JR, Demmler GJ, Dawson J, Miller JE, Petheram SJ. Intrauterine cytomegalovirus infection and glycoprotein B genotypes. *J Infect Dis* 2000; 182: 933-6.
38. Trincado DE, Scott GM, White PA, Hunt C, Rasmussen L, Rawlinson WD. Human cytomegalovirus strains associated with congenital and perinatal infections. *J Med Virol* 2000; 61: 481-7.
39. Loregian A, Rigatti R, Murphy M, Schievano E, Palu G, Marsden HS. Inhibition of human cytomegalovirus DNA polymerase by C-Terminal peptides from the UL54 subunit. *Journal of Virology* 2003; 77(15): 8336-44.
40. Chou S, Meichsner CL. A nine-codon deletion mutation in the cytomegalovirus UL97 phosphotransferase gene confers resistance to ganciclovir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; 44(1): 183-5.
41. Griffiths PD. Cytomegalovirus. Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD, Schoub BD (eds). *Principles and Practise of Clinical Virology*, 5th ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2004: 86-122.
42. Çolak D, Mutlu D. Herpesviruslar. Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S (ed.ler). *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*, Ankara: Güneş Kitabevi, 2004; 114-144.
43. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw ASH, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *Journal of General Virology* 1995; 76: 741-750.
44. Hassan J, Connell J. Translational mini-review series on infectious disease: Congenital cytomegalovirus infection: 50 years on. *Clinical and Experimental Immunology* 2007; 149: 205-10.
45. Revello MG, Zavattoni M, Sarasini A, Percivalle E, Simoncini L, Gerna G. Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: Prognostic implications for pregnancy. *The Journal of Infectious Diseases* 1998; 177: 1170-5.
46. Gerna G, Percivalle E, Baldanti F, Sozzani S, Lanzarini P, Genini E, Lilleri D, Revello MG. Human cytomegalovirus replicates abortively in polymorphonuclear leukocytes after

- transfer from infected endothelial cells via transient microfusion events. *J Virol* 2000; 74: 5629–38.
47. Percivalle E, Revello MG, Vago L, Morini F, Gerna G. Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infection with organ involvement. *J Clin Invest* 1993; 92: 663–70.
 48. Wang, X, Huong SM., Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* 2003; 424: 456-61.
 49. Arpacı E, Beşışık SK. Hematopoetik kök hücre nakli ve sitomegalovirüs enfeksiyonu: Değişen klinik, tanı ve tedavi. *İst Tıp Fak Derg* 2007; 70(2): 51-55.
 50. Mettenleiter TC. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* 2002; 76(4): 1537-47.
 51. Schleiss MR. Persistent and recurring viral infections: The human herpesviruses. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2009; 39: 7-23.
 52. Hahn G, Jores R, Mocarski ES. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 3937-42.
 53. Söderberg-Nauclér C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997; 91: 119-126.
 54. Collinet P, Subtil D, Debarge VH, Kacet N, Dewilde A, Puech F. Routine CMV screening during pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2004; 114: 3–11.
 55. Gehrz RC, Rutzick SR. Cytomegalovirus (CMV)-specific lysis of CMV-infected target cells can be mediated by both NK-like and virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Clin. exp. Immunol* 1985; 61: 80-89.
 56. Özdemir E, St. John S, Gillespie G, Rowland-Jones S, Champlin RE, Molldrem JJ, Komanduri KV. Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8 T cells. *Blood* 2002; 100(10): 3690-97.
 57. Hengel H, Brune W, Koszinowski UH. Immune evasion by cytomegalovirus-survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol* 1998; 6: 190–197.
 58. Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 2005; 353: 1350–62.

59. Schleiss MR, Bernstein DI, Passo M, Parker S, Meric C, Verdier F, Newkirk MM. Lack of induction of autoantibody responses following immunization with cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) in healthy CMV sero-negative subjects. *Vaccine* 2004; 23: 687–92.
60. Zanghellini F, Boppana SB, Emery VC, Griffiths PD, Pass RF: Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. *J Infect Dis* 1999; 180: 702-707.
61. Fisher S, Genbacev O, Maidji E, Pereira L. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J Virol* 2000; 74: 6808–20.
62. Kumazaki K, Ozono K, Yahara T, Wada Y, Suehara N, Takeuchi M, Nakayama M. Detection of cytomegalovirus DNA in human placentas. *Journal of Medical Virology* 2002; 68: 363–69.
63. Shen CY, Chang SF, Yen MS, NG HT, Huang ES, Wu CW. Cytomegalovirus excretion in pregnant and nonpregnant women. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31: 1635-36.
64. Gehrz RC, Linner KM, Christianson WR, Ohm AE, Balfour HH. Cytomegalovirus infection in infancy: virological and immunological studies. *Clin Exp Immunol* 1982; 47: 27-33.
65. Dalgıç N. Konjenital sitomegalovirus enfeksiyonu. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2007; 33(1): 33-39.
66. Starr SE, Tolpin MD, Friedman HM, Paucker K, Plotkin SA. Impaired cellular immunity to cytomegalovirus in congenitally infected children and their mothers. *J Infect Dis* 1979; 140: 500-5.
67. Ahlfors K, Ivarsson SA, Harris S. Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in the literature. *Scand J Infect Dis* 1999; 31: 443-57.
68. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 2000; 355: 2032-6.
69. Mulongo KN, Lamy ME, van Lierde M. Requirements for diagnosis of prenatal cytomegalovirus infection by amniotic fluid culture. *Clin. Diagn. Virol.* 1995; 4: 231–8.
70. Ross SA, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus infection: Outcome and diagnosis. *Semin Pediatr Infect Dis* 2004; 16:44-49.

71. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Stagno S; Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcome. *Journal of Clin Virol*, 2006; 35:216-220.
72. Schnitzler MA, Lowell JA, Hardinger KL, Boxerman SB, Bailey TC, Brennan DC. The association of cytomegalovirus sero-pairing with outcomes and costs following cadaveric renal transplantation prior to the introduction of oral ganciclovir CMV prophylaxis. *American Journal of Transplantation* 2003; 3: 445-51.
73. Osarogiagbon RU, Defor TE, Weisdorf MA, Erice A, Weisdorf DJ. CMV antigenemia following bone marrow transplantation: Risk factors and outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6:280-8.
74. Koruk ST, Gürsoy B, Çalışır B, Çelik Y, Tavşan Ö, Ural O. Sağlıklı erişkinde ciddi seyirli CMV enfeksiyonu. *Klinik Dergisi* 2007; 20(3): 95-96.
75. Ornoy A, Diav-Citrin O. Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reproductive Toxicology* 2006; 21: 399-409.
76. Hanshaw JB. Cytomegalovirus infection. *Pediatr Rev* 1995; 16: 43-48.
77. Preece PM, Tookey P, Ades A, Peckham CS. Congenital cytomegalovirus infection: predisposing maternal factors. *Journal of Epidemiology and Community Health* 1986; 40: 205-9.
78. Yılmaz M, Altındış M, Cevrioğlu S, Fenkeci V, Aktepe O, Sırthan E. Afyon bölgesinde yaşayan gebe kadınlarda Toksoplazma, Sitomegalovirus, Rubella, Hepatit B, Hepatit C seropozitiflik oranları. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2004; 5: 49-53.
79. Altındış M, Tanır HM. Gebe kadınlarda *Toxoplasma gondii* ve Sitomegalovirus antikorları sıklığı. *Genel Tıp Dergisi* 2002; 12(1): 9-13
80. Satılmış A, Gura A, Ongun H, Mendilcioglu İ, Çolak D, Oygür N. CMV seroconversion in pregnant and the incidence of congenital CMV infection. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2007; 49: 30-36.
81. Fowler KB, Pass RF. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: Exposure to young children and recent onset of sexual activity. *Pediatrics* 2006; 118: 286-292.
82. Mattes FM, McLaughlin JE, Emery VC, Clark DA, Griffiths PD. Histopathological detection of owl's eye inclusions is still specific for cytomegalovirus in the era of human herpesviruses 6 and 7. *J Clin Pathol* 2000; 53: 612-4.

83. Yan SS, Fedorko DP. Recent advances in laboratory diagnosis of human cytomegalovirus infection. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2002; 2: 155-167.
84. Boeckh M, Boivin G; Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 533-54.
85. Ho SKN, Lo CY, Cheng IKP, Chan TM. Rapid cytomegalovirus pp65 antigenemia assay by direct erythrocyte lysis and immunofluorescence staining. *J Clin Microbiol* 1998; 36(3): 638-40.
86. Schafer P, Tenschert W, Gutensohn K, Laufs R. Minimal effect of delayed sample processing on results of quantitative PCR for cytomegalovirus DNA in leukocytes compared to results of an antigenemia assay. *J Clin Microbiol* 1997; 35(3): 741-4.
87. Gerna G, Zavatonni M, Percivalle E, Grossi P, Torsellini M, Revello MG. Rising levels of human cytomegalovirus (HCMV) antigenemia during initial antiviral treatment of solid organ transplant recipients with primary HCMV infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36(4): 1113-16.
88. Pourier-Toulemonde AS, Milpied N, Cantarovich D, Morcet JF, Billaudel S, Imbert-Marcille BM: Cinical relevance of direct quantification of pp65 antigenemia using flow cytometry in solid organ and stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000; 38(9): 3143-9.
89. Küçükcan A, Amniyosentez yapılan gebe kadınlarda konjenital cytomegalovirus (CMV) enfeksiyonunun prenatal tanısı. Uzmanlık Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Bölümü, 2001.
90. Miller MJ, Bovey S, Pado K, Bruckner DA, Wagar EA. Application of PCR to multiple specimen types for diagnosis of cytomegalovirus infection: Comparison with cell culture and shell vial assay. *J Clin Microbiol* 1994; 32(1): 5-10.
91. Bale JF, O'Neil ME, Fowler SS, Murph JR. Analysis of acquired human cytomegalovirus infections by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31(9): 2433-8.
92. Fox JC, Griffiths PD, Emery VC. Quantification of human cytomegalovirus DNA using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* 1992; 73: 2405-8.
93. Biri A, Bozdayı G, Çiftçi B, Doğan B, Yüce A, Rota S, Himmetoğlu Ö. CMV by RT-PCR in prenatal diagnosis the detection of CMV in amniotic fluid and cervicovaginal smear samples by Real-Time PCR assay in prenatal diagnosis. *Arch Gynecol Obstet* 2006; 273: 261-6.

94. Yerly S, Perrin L, Van Delden C, Schaffer S, Thamm S, Wunderli W, Kaiser L. Cytomegalovirus quantification in plasma by an automated real-time PCR assay. *Journal of Clinical Virology* 2007; 38: 298–303.
95. Caliendo AM, St. George K, Kao SY, Allega J, Tan BH, LaFontaine R, Bui L, Rinaldo CR. Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: Clinical utility of the prototype AMPLICOR CMV MONITOR test in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000; 38(6): 2122-7.
96. Mazzulli T, Drew LW, Yen-Lieberman B, Jekic-McMullen D, Kohn DJ, Isada C, Moussa G, Chua R, Walmsley S. Multicenter comparison of the digene hybrid capture CMV DNA assay (Version 2.0), the pp65 antigenemia assay, and cell culture for detection of cytomegalovirus viremia. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4): 958-963.
97. Ljungman P, Griffith P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 2002; 34: 1094-1097.
98. Us T. CMV infeksiyonlarının laboratuvar tanısına güncel yaklaşım. Ağaçfidan A, Erturan Z. (ed.ler). XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre özet kitabı, Antalya: 2008; 144-8.
99. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J Clin Microbiol* 1984; 19(6): 917-19.
100. Ehrnst A. The clinical relevance of different laboratory tests in CMV diagnosis. *Scand J Infect Dis Suppl* 1996; 100: 64-71.
101. Gleaves CA, Smits TF, Shuster EA, Pearson GR. Comparison of standard tube and shell vial culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985; 21(2): 217–21.
102. Grangeot-Keros L, Cointe D. Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection. *J Clin Virol* 2001; 21: 213-221.
103. Paya CV, Wold AD, Smith TF. Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell cultures. *J Clin Microbiol* 1987; 25(5): 755-7.
104. Scott GM, Ratnamohan VM, Rawlinson WD. Improving permissiveness of human cytomegalovirus in cell culture. *Arch Virol* 2000; 145: 2431–8.

105. Revello MG, Percivalle E, Zannino M, Rossi V, Gerna G. Development and evaluation of a capture ELISA for IgM antibody to the human cytomegalovirus major DNA binding protein. *J Virol Methods* 1991; 35: 315-329.
106. Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP; New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2008; 41:192-7.
107. Yücel A, Buyrukçu BA, Bozdayı G, Rota S. Gebe kadınlarda CMV IgG avidite ve CMV IgM sonuçlarının karşılaştırılması. *Gazi Tıp Dergisi* 2006; 17: 34-38.
108. Landini MP. New approaches and perspectives in cytomegalovirus diagnosis. *Prog Med Virol* 1993; 40: 157-177.
109. Stagno S, Tinker MK, Elrod C, Fuccillo DA, Cloud G, O'Beirne AJ. Immunoglobulin M antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay in the diagnosis of cytomegalovirus infections in pregnant women and newborn infants. *J Clin Microbiol* 1985; 21(6): 930-5.
110. Dar L. Identifying human cytomegalovirus genotypes & defining their clinical significance. *Indian J Med Res* 2007; 126: 99-100.
111. Pignatelli S, Monte PD, Rossini G, Lazzarotto T, Gatto MR, Landini MP. Intrauterine cytomegalovirus infection and glycoprotein N (gN) genotypes. *J Clin Virol* 2003; 28: 38-43.
112. Mercorelli B, Sinigalia E, Loregian A, Palu G. Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev. Med. Virol.* 2008; 18: 177–210.
113. Snyderman DR. The case for cytomegalovirus prophylaxis in solid organ transplantation. *Rev Med Virol* 2006; 16: 289–295.
114. Adler SP, Nigro G, Pereira L. Recent advances in the prevention and treatment of congenital cytomegalovirus infections. *Semin Perinatol* 2007; 31:10-18.
115. Adler SP, Chandrika T, Lawrence L, et al: Cytomegalovirus infections in neonates acquired by blood transfusions. *Pediatr Infect Dis* 1983; 2:114-118.
116. Miller BW, Howard TK, Goss JA, et al: Renal transplantation one week after conception. *Transplantation* 1995; 60: 1353-4.
117. Pescovitz MD. Absence of teratogenicity of oral ganciclovir used during early pregnancy in a liver transplant recipient. *Transplantation* 1999; 67: 758-9.
118. Kimberlin DW, Lin CY, Sanchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, Jacobs RF, Vaudry W, Pass RF, Kell JM, Soong SJ, Whitley RJ. Effect of ganciclovir therapy on

- hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: A randomized, controlled trial. *J Pediatr* 2003; 143: 16-25.
- 119.** Brown HL, Abernathy MP. Cytomegalovirus infection. *Semin Perinatol* 1998; 22(4): 260-6.
- 120.** Tekerekoğlu MS, Çizmeçi Z, Özerol Hİ, Durmaz R. doğurancılık çağındaki kadınlarda rubella ve sitomegalovirüs antikorlarının araştırılması. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2003; 10(3): 129-131.
- 121.** Ziyaeyan M, Alborzi A, Abbasian A, Kalani M, Moravej A, Nasiri J, Amiri A, Hashemi N, Sefiddashti F. Detection of HCMV DNA in plecenta, amniotic fluid and fetuses of seropositive women by nested PCR. *Eur J Pediatr* 2007; 166: 723-726.
- 122.** Yücel A, Buyrukçu BA, Bozdayı G, Rota S. Gebe kadınlarda CMV IgG avidite ve CMV IgM sonuçlarının karşılaştırılması. *Gazi Tıp Dergisi* 2006; 17: 34-38.
- 123.** Gökahmetoğlu S, İnci M, Özbal Y, Çetin M, Güneş T. Sitomegalovirus hastalığının tanısında antijenemi ve CMV-DNA hibrit yakalama testlerinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 2003; 17(4): 385-388.
- 124.** Ho SKN, Li FK, Lai KN, Chan TM. Comparison of the CMV Brite Turbo Assay and the digene hybrid capture CMV-DNA (version 2.0) assay for quantitation of cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000; 38(10): 3743-5.
- 125.** Daley AJ, Gilbert GL. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *J Paediatr Child Health* 2001; 37: 589–591.
- 126.** Bodéus M, Hubinont C, Goubau P. Increased risk of cytomegalovirus transmission in utero during late gestation. *Obstet. Gynecol* 1999; 93: 658–660.
- 127.** Azam AZ, Vial Y, Fawer CL, Zufferey J, Hohlfeld P. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 443-448.
- 128.** Lazzarotto T, Brojanac S, Maine GT, Landini MP. Search for cytomegalovirus-specific immunoglobulin M: comparison between a new western blot, conventional western blot, and nine commercially available assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4(4): 483–6.
- 129.** Uyar Y, Balcı A, Cabar C, Çağlar A. İlk trimestır dönemindeki gebelerde toksoplazma, rubella ve CMV antikorlarının değerlendirilmesi. XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 2003; 367.

130. Bulut Y, Tekerekoğlu MS, Otlu B, Durmaz B, Özerol Hİ. Malatya’da doğurganlık yaşındaki kadınlarda sitomegalovirüs seropozitifliği. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2001; 8(4): 209-211.
131. Özkan S, Maral I, Bumin MA. Gölbaşı’nda birinci basamak sağlık hizmetlerinde çalısan ebe, hemşire ve doktorlarda Toxoplazma, Rubella, Sitomegalovirus, Herpes Simplex ve Human Immunodeficiency Virus seroprevalansı. T Klin Jineköl Obst 2002; 12: 258-261.
132. Hızel S, Parker S, Önde U. Seroprevalence of cytomegalovirus infection among children and females in Ankara, Turkey, 1995. *Pediatr Int* 1999; 41(5): 506-9.
133. Çakıcı C, Aka N, Yorulmaz Ş, Acar N, Gökmen B. Gebelerde rutin olarak toksoplazma, rubella ve sitomegalovirüs taraması yapılmalı mıdır? T Klin Jineköl Obst 1995; 8: 20-22.
134. Akıncı P, Altuğlu İ, Sertöz R, Zeytinoğlu A. İzmir’deki gebelerde rubella ve sitomegalovirüs infeksiyonu seroprevalansı. *İnfeksiyon Dergisi* 2007; 21 (4): 183-186.
135. Munro SC, Hall B, Whybin LR, Leader L, Robertson P, Maine GT, Rawlinson WD. Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. *J Clin Microbiol* 2005; 43(9): 4713–18.
136. Eggers M, Bäder U, Enders G. Combination of microneutralization and avidity assays: Improved diagnosis of recent primary human cytomegalovirus infection in single serum sample of second trimester pregnancy. *J Med Virol* 2000; 60: 324–330.
137. Mac’ e M, Sissoeff L, Rudent A, Grangeot-Keros L. A serological testing algorithm for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *Prenat Diagn* 2004; 24: 861–3.
138. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and implications of human cytomegalovirus infection in pregnancy. *Fet. Matern. Med. Rev.* 1999a; 11: 117–134.
139. Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, Abate DA, Varani S, Landini MP. Avidity of Immunoglobulin G Directed against Human Cytomegalovirus during Primary and Secondary Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Subjects *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1997; 4(4): 469-73
140. Altuğlu İ, Zeytinoğlu A, Karvan T, Özacar T, Bilgiç A. CMV IgM olumlu olgularda CMV IgG avidite testinin değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyöl Cem Derg* 2003; 33: 71-73.
141. Karaşahin ÖÖ. Hamile kadınlarda “Toxoplasma, Cytomegalovirus ve Rubella IgG avidite” test sonuçlarının değerlendirilmesi. *Uzmanlık Tezi, Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji, 2003.*

142. Landini MP, Lazzarotto T. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: Light and shade. *Herpes* 1999; 6(2): 45-49.
143. Jones RN, Neale ML, Beattie B, Westmoreland D, Fox JD. Development and application of a PCR based method including an internal control for diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1): 1-6.
144. Avidor B, efrat G, Weinberg M, Kra-oz Z, Satinger J, Mitrani-Rosenbaum S, Yaron Y, Shulman L, Tepperberg-Oikawa M, Wolf D, Berger SA, Lipitz S, Mendelson E, Giladi M. Insight into the intrinsic sensitivity of the PCR assay used to detect CMV infection in amniotic fluid specimens. *J Clin Virol* 2004; 29: 260–270.
145. Liesnard C, Donner C, Brancart F, Gosselin F, Delforge ML, Rodesch F. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet Gynecol* 2000; 95(6): 881–8.
146. Bodéus M, Hubinont C, Bernard P, Bouckaert A, Thomas K, Goubau P. Prenatal diagnosis of human cytomegalovirus by culture and polymerase chain reaction: 98 pregnancies leading to congenital infection. *Prenat Diagn* 1999b; 19: 314-317.
147. Lazzarotto T, Guerra B, Spezzacatena P *et al.* Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36(12): 3540–44.
148. Revello MG, Baldanti F, Furione M, Sarasini A, Percivalle E, Zavattoni M, Gerna G. Polymerase chain reaction for prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 1995; 47: 462–6.
149. Gouarin S, Palmer P, Cointe D, Rogez S, Vabret A, Rozenberg F, Denis F, Freymuth F, Lebon P, Grangeot-Keros L. Congenital HCMV infection: a collaborative and comparative study of virus detection in amniotic fluid by culture and by PCR. *Journal of Clinical Virology* 2001; 21: 47–55.
150. Antsaklis AJ, Daskalakis GJ, Mesogitis SA, Koutra PT, Michalas SS. Prenatal diagnosis of fetal primary cytomegalovirus infection. *BJOG* 2000; 107(1): 84-88.
151. Lipitz S, Achiron R, Zalel Y, Mendelson E, Tepperberg M, Gamzu R. Outcome of pregnancies with vertical transmission of primary cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 428-433.
152. Nigro G, Mazzocco M, Anceschi MM, La Torre R, Antonelli G, Cosmi EV. Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection after primary or recurrent maternal infection. *Obstet Gynecol* 1999; 94(6): 909-914.

153. Lipitz S, Yagel S, Shalev E, Achiron R, Mashiach S, Schiff E. Prenatal diagnosis of fetal primary cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol* 1997; 89(5): 763–7.
154. Enders G, Bäder U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn* 2001; 21: 362-377.
155. Gouarin S, Gault E, Vabret A, Cointe D, Rozenberg F, Grangeot-Keros L. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5):1767–72.
156. Lazzarotto T, Varani S, Guerra B, Nicolosi A, Lanari M, Landini MP. Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of Pediatrics* 2000; 137: 90-95.
157. Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, Lanari M, Bovicelli L, Nicolosi A, Landini MP. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(2): 476-482.
158. Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Baldanti F, Gerna G. Quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid of mothers of congenitally infected fetuses. *J Clin Microbiol* 1999b; 37(10): 3350-3352.
159. Wen LZ, Xing W, Liu LQ, Ao LM, Chen SH, Zeng WJ. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 2002; 79: 111-116.
160. Eker İ, Sarıcı SÜ, Kul M, Balamtekin N, Tunç T, Özcan O. Rekürren maternal CMV enfeksiyonları ne kadar masum? Sitomegalik inklüzyon hastalığı olan bir yenidoğanın sunumu. *Gülhane Tıp Dergisi* 2008; 50: 34-38.
161. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterin transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 2001; 344: 1366-71.

