



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
ANKARA BİLKENT ŞEHİR HASTANESİ**

**SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ KLİNİĞİ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
CYTOMEGALOVIRUS (CMV) SUŞLARINDA  
ANTİVİRAL İLAÇ DİRENCİ ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Pınar Gün**

**(TIPTA UZMANLIK TEZİ)**

**ANKARA/2023**





**T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ**  
**ANKARA BİL KENT ŞEHİR HASTANESİ**  
**SAğLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ KLİNİğİ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN**  
**CYTOMEGALOVIRUS (CMV) SUŞLARINDA**  
**ANTİVİRAL İLAÇ DİRENCİ ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Pınar Gün**

**Tez DanıŐmanı: Doç. Dr. Sibel Aydoğan**  
**(TIPTA UZMANLIK TEZİ)**

**ANKARA/2023**

## TEŞEKKÜR

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Dalı'nda aldığım uzmanlık eğitimi süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her türlü sorunumda tavsiyelerine başvurduğum, eğitim ve idari sorumlumuz Prof. Dr. Bedia Dinç'e,

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar desteğini esirgemeyen, akademik bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım Doç. Dr. Sibel Aydoğan'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca üzerimde emeği olan tüm hocalarıma, uzman abilerime ve ablalarıma, tüm mikrobiyoloji laboratuvar çalışma arkadaşlarıma,

Ankara'da bana aile olan, birlikte çalışmayı keyifli hale getiren değerli asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca sonsuz sevgilerini sürekli yanımda hissettiğim, her şartta daimi destek sunarak hayatı bana kolaylaştıran, oluşturdukları bilinçle yaşamıma yön vermemi sağlayan canım aileme; annem Ayla Gün'e, babam Tekin Gün'e ve ağabeyim Çağlar Gün'e sonsuz teşekkürler.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
KISALTMALAR .....	iv
TABLO LİSTESİ .....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT .....	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. CYTOMEGALOVIRUS .....	3
2.1.1.Tarihçe .....	3
2.1.2.Sınıflandırma .....	4
2.1.3. Virüsün Genel Özellikleri.....	4
2.1.3.1. Virüsün yapısı .....	4
2.1.3.2.Replikasyon.....	7
2.1.3.3.Fiziksel ve kimyasal ajanlara direnç .....	8
2.1.4.Epidemiyoloji ve Bulaş.....	8
2.1.5.Patogenez ve İmmünite.....	10
2.1.6.Klinik Bulgular .....	12
2.1.6.1.Sağlıklı konakta CMV enfeksiyonu .....	13
2.1.6.2.İmmün yetmezliği olan konakta CMV enfeksiyonu .....	13
2.1.6.3. Konjenital CMV enfeksiyonu .....	14
2.1.7.CMV Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı .....	14
2.1.7.1.Histopatolojik inceleme .....	14
2.1.7.2.Elektron mikroskopik inceleme .....	15
2.1.7.3.Virüs izolasyonu .....	15
2.1.7.4.Antijenemi testi .....	16
2.1.7.5.Serolojik yöntemler .....	17
2.1.7.6. CMV hücre aracılı immünite testleri.....	20
2.1.7.7.Moleküler yöntemler .....	22

2.1.8.Tedavi .....	24
2.1.8.1.Gansiklovir:.....	24
2.1.8.2.Adaptif T hücre terapisi .....	26
2.1.9.CMV’de Antiviral İlaç Direnci.....	27
2.1.10.Antiviral Duyarlılık Testleri .....	31
2.1.10.1.Fenotipik testler.....	31
2.1.10.2.Genotipik testler .....	32
2.1.11.Korunma .....	34
<b>3.GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>35</b>
3.1.HASTALAR VE ÖRNEKLER .....	35
3.1.1.Plazma Örneklerinde CMV DNA Tayini .....	35
3.1.1.1.DNA izolasyonu:.....	35
3.1.1.2.CMV DNA tayini.....	36
3.1.2.CMV Suşlarında İlaç Direnci Araştırılması.....	39
3.2.ÇALIŞMA ONAYI .....	42
<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>43</b>
4.1.HASTALARIN ÖZELLİKLERİ.....	43
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>53</b>
<b>6.SONUÇLAR .....</b>	<b>61</b>
<b>7.KAYNAKLAR .....</b>	<b>62</b>
<b>8.EKLER.....</b>	<b>70</b>

## KISALTMALAR

AIDS: Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromu  
AKİT: Allojenik kemik iliği transplantasyonu  
ALL: Akut lenfoblastik lösemi  
AML: Akut myeloid lösemi  
ACV: Asiklovir  
BAL: Bronkoalveolar lavaj  
BOS: Beyin omurilik sıvısı  
Bp: Baz pair  
°C: Santigrad derece  
CDV: Sidofovir  
CMV: Cytomegalovirus  
CPE: Sitopatik etki  
CTL: Sitotoksik T lenfosit  
DBS: Dried blood spot  
ddNTP: Dideoksiribonükleozid trifosfat  
DFA: Direkt floresan antikor  
Dk: Dakika  
DNA: Deksiribonükleik asit  
dNTP: Deoksiribonükleozid trifosfat  
EBV: Epstein-Barr virüsü  
EIA: Enzim İmmünassay  
ELISA: Enzyme Linked İmmunoSorbent Assay  
ETA: Endotrakeal aspirat  
FDA: Food and Drug Administration  
FOS: Foskarnet  
Gb: Glikoprotein B  
GCV: Gansiklovir  
gH: Glikoprotein H  
gL: Glikoprotein L  
gM: Glikoprotein M

gN: Glikoprotein N  
GVHD: Graft Versus Host Hastalığı  
HCMV: İnsan Sitomegalovirüsü  
HL: Hodgkin lenfoma  
HSV-1: Herpes Simpleks Virüsü 1  
HSV-2: Herpes Simpleks Virüsü 2  
HHV-4: Epstein-Barr virüsü  
HHV-5: İnsan Herpesvirüsü 5  
HIV: Human Immunodeficiency Virus  
IC-50: %  
ICS:İntraselüler sitokin boyama  
IFA: Immunofluorescence Assays  
IFN- $\gamma$ : İnterferon gama  
IgG: İmmünglobulin G  
IL-2: İnterlökin 2  
IgM: İmmünglobulin M  
IGRA: İnterferon gama salınım testi  
IU: International unit  
IV: İntravenöz  
KİT: Kemik iliği transplantasyonu  
KLL: Kronik lenfositik lösemi  
KML: Kronik miyeloid lösemi  
LiPA: Line prob assay  
LTV: Letermovir  
MBV: Maribavir  
MCP: Major kapsid proteini  
MDS: Miyelodisplastik sendrom  
ml: mililitre  
MM: Multiple miyelom  
MnCBP: Minör kapsid binding proteini  
MnCP: Minör kapsid proteini  
NAT: Nükleik asit testi

NHL: Non-Hodgkin Lenfoma  
NGS: Yeni nesil dizileme  
OKİT: Otolog kemik iliği transplantasyonu  
ORF: Açık okuma bölgesi  
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
QNAT: Kantitatif nükleik asit testi  
RL: Repeat long  
PMNL: Polimorfonükleer lökosit  
PRA: Plak redüksiyon testi  
RFLP: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi  
RS: Repeat short  
RT-PCR: Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu  
SCP: Smallest kapsid proteini  
SNP: Tek Nükleotid Polimorfizm Analizi  
SOT: Solid organ transplantasyonu  
TNF- $\alpha$ : Tümör nekroz faktör alfa  
UL: Unique Long  
US: Unique short  
VASV: Valasiklovir  
VGCV:Valgansiklovir  
VZV: Varicella Zoster virüsü  
 $\mu$ l: Mikrolitre

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Herpesviridae ailesi.....	4
Tablo 2. CMV enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antiviral ajanlar .....	25
Tablo 3. Aminoasit sembolleri ve nükleotid kodonları.....	30
Tablo 4. UL97 ve UL54 bölgesinde görülen ilaç direncine neden olduğu bilinen mutasyonlar ve tek nükleotid polimorfizmleri.....	30
Tablo 5. CMV DNA saptamak için gerekli reaksiyon içeriği ve PCR protokolü.....	38
Tablo 6. CMV ilaç direnci tayininde kullanılan PCR reaksiyon içeriği .....	40
Tablo 7. CMV ilaç direnci tayininde gerekli reaksiyon içeriği ve PCR protokolü....	41
Tablo 8. PCR reaksiyonunun yorumlanması .....	42
Tablo 9. KİT yapılan hastalara ait veriler .....	46
Tablo 10. KİT yapılmayan hastalara ait veriler .....	48

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. CMV'nin morfolojik yapısı .....	5
Şekil 2. CMV DNA genomunun yapısal komponentlerinin haritası .....	6
Şekil 3. Hematoksilen-eozin boyamada tipik baykuş gözü intranükleer inklüzyon (ok ile gösterilmiştir) ve sitoplazmik inklüzyonlar .....	15
Şekil 4. Rotor-Gene cihazında kantitatif CMV-DNA (real-time PCR) sonuçlarının değerlendirilmesi.....	39
Şekil 5. CFX96 Touch Real-Time PCR cihazında sonuçların yorumlanması .....	42
Şekil 6. Çalışmaya alınan hastaların cinsiyet dağılımı .....	43
Şekil 7. Çalışmaya alınan hastaların alt hastalıkları.....	44
Şekil 8. Real-time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi .....	49
Şekil 9. CMV UL97-UL54 genleri mutasyon analizi (Real-time PCR) sonuçlarının değerlendirilmesi-A987G vahşi tip ve L802M vahşi tip pozitif hasta.....	50
Şekil 10. CMV UL97-UL54 genleri mutasyon analizi (Real-time PCR) sonuçlarının değerlendirilmesi, a)P522S, T700A vahşi tip pozitif hasta, b)L595S, C603W vahşi tip pozitif hasta.....	51
Şekil 11. CMV UL97 (H520Q ve A594V) genleri mutasyon analizi (Real-time PCR) sonuçlarının değerlendirilmesi- H520Q ve A594V vahşi tip/mutant tip negatif.....	52

## ÖZET

### KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN CYTOMEGALOVİRUS (CMV) SUŞLARINDA ANTİVİRAL İLAÇ DİRENCİ ARAŞTIRILMASI

**Amaç:** Cytomegalovirus (CMV) enfeksiyonu sağlıklı kişilerde genellikle asemptomatik seyrederken, immün sistemi henüz gelişmemiş ya da baskılanmış kişilerde ciddi hastalıklara neden olabilir. Bu çalışmada hematoloji ve kemik iliği transplantasyon (KİT) servislerinde takip edilen hastalardan izole edilen CMV suşlarında antiviral ilaç direnciyle ilişkilendirilen mutasyonların araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Erişkin Hematoloji ve KİT servislerinde takip edilen, CMV viral yükü 1000 IU/ml ve üzeri olan hastalardan daha önce CMV tedavisi almış 34 kişi hasta grubu olarak, CMV tedavisi almamış 10 kişi de kontrol grubu olarak, toplam 44 hasta dahil edildi. Hastalardan real-time PCR yöntemiyle ilaç direnci araştırması yapıldı. Bunun için CMV UL97-UL54 Genleri Mutasyon Saptama Kiti (RUO) (Bioeksen, Türkiye) kullanıldı. UL 97 bölgesinde dört mutasyon (H520Q, A594V, C603W, L595S), UL54 bölgesinde dört mutasyon (A987G, L802M, P522S, T700A) olmak üzere toplam sekiz mutasyon değerlendirildi. Çalışma, Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

**Bulgular:** Yapılan analiz sonunda çalışmaya dahil edilen 44 hastada, C603W, L595S, A987G, L802M, P522S, T700A vahşi tip suş pozitif bulundu, hiçbir hastada mutant tip suş saptanmadı. H520Q ve A594V değerlendirmesinde; çalışmaya dahil edilen hastaların hiçbirinde mutant suş saptanmazken vahşi tip suş varlığı da gösterilemedi. Olası sorunları dışlamak için test tekrar çalışıldı. İkinci çalışmada da bütün örnekler, vahşi tip dahil, H520Q ve A594V mutasyonları açısından negatif olarak belirlenince, H520Q ve A594V mutasyonları değerlendirme dışı bırakıldı.

**Sonuç:** Sonuç olarak çalışmaya dahil edilen hiçbir hastada araştırılan mutasyonlar saptanmadı. Antiviral ilaç direncinin saptanması, tedavi yönetiminde klinisyene yol

gösterici olabilir. Bu çalışma hastanemizde CMV ilaç direncinin rutin olarak çalışılabilmesine yönelik bir ön çalışmadır. Çalışmamızın devamında kullanılan kitin eksikliğinin giderilmesi ve dizi analizi ile doğrulamanın gerçekleştirilmesi yönünde planlama yapılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** CMV, gansiklovir, PCR, antiviral direnç

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF ANTIVIRAL DRUG RESISTANCE IN CYTOMEGALOVIRUS (CMV) STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES

**Objective:** While Cytomegalovirus (CMV) infection usually progresses asymptotically in healthy individuals, it can cause serious diseases in people whose immune system has not yet developed or is suppressed. In this study, it was aimed to investigate the mutations associated with antiviral drug resistance in CMV strains isolated from patients followed up in hematology and bone marrow transplantation (KIT) services.

**Materials and Methods:** The study included 44 patients from the adult hematology and BMT services at Ankara Bilkent City Hospital. Patients with CMV viral load of 1000 IU/ml or higher were divided into two groups: a group of 34 people who had previously received CMV treatment (patient group) and a control group of 10 people who had not received treatment. Drug resistance analysis was performed using real-time PCR assay, using the CMV UL97-UL54 Gene Mutation Detection Kit (RUO) (Bioeksan, Turkey). Eight mutations were evaluated, four in the UL97 region (H520Q, A594V, C603W, L595S) and four in the UL54 region (A987G, L802M, P522S, T700A). The study was conducted at Ankara Bilkent City Hospital Molecular Microbiology Laboratory.

**Results:** Analysis revealed no mutant strains and all of the wild-type strains were positive for C603W, L595S, A987G, L802M, P522S and T700A. In the assessment of H520Q and A594V, neither mutant nor wild-type strains were found in any patients. To eliminate potential issues, the test was rerun for confirmation. In the second run, all samples, including wild-type, were negative for H520Q and A594V mutations, leading to the exclusion of these mutations from the evaluation.

**Conclusion:** As a result, no mutations were detected in any of the patients included. The identification of antiviral drug resistance can guide clinicians in the management of treatment. This study serves as a preliminary investigation toward routine

assessment of CMV drug resistance at our hospital. Future plans include addressing kit limitations and performing confirmation through sequence analysis.

**Keywords:** CMV, ganciclovir, PCR, antiviral resistance

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Cytomegalovirus (CMV), *Herpesvirales* takımı, *Herpesviridae* ailesinin *Betaherpesvirinae* alt ailesinde yer almaktadır. CMV yaklaşık 200 nm çapında, ikosahedral kapsidi olan, zarflı ve lineer çift iplikli bir DNA virüsüdür (1). Enfeksiyonları yaygın olarak tüm dünyada ve her yaş grubunda görülür (2).

Bağışıklığı yeterli sağlıklı konakçıda, primer CMV enfeksiyonu genellikle asemptomatiktir; ancak spesifik olmayan ateşli bir hastalık veya mononükleoz benzeri bir sendrom olarak da ortaya çıkabilir. Bağışıklığı baskılanmış bireylerde, CMV enfeksiyonu ciddi hastalığa neden olabilir. Solid organ ve kök hücre nakli alıcıları ve kemoterapi gören kanser hastaları gibi immünsupresif tedaviler uygulanan hastalarda ve Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromu (AIDS) olan hastalarda, CMV enfeksiyonu önemli bir klinik endişe kaynağıdır. Bu nedenle, baskılanmış veya gelişmemiş immün sisteme sahip bireyler, primer CMV enfeksiyonu, reenfeksiyon veya latent virüsün reaktivasyonu yoluyla ciddi hastalığa yatkındır. Özellikle transplant alıcılarında, CMV pnömonisi yüksek mortalite riski oluşturmaktadır (2, 3).

CMV enfeksiyonlarında profilaksi, preemtif tedavi ve transplant alıcılarında gelişen CMV hastalığının tedavisinde antiviral ilaç olarak gansiklovir, valgansiklovir, valasiklovir, foskarnet, sidofovir ve letermovir kullanılmaktadır. Gansiklovir şiddetli veya yaşamı tehdit eden CMV hastalığı için önerilen başlangıç tedavisi ajanıdır (4).

CMV'nin antiviral ajanlara karşı duyarlılığını test etmek için çeşitli fenotipik ve genotipik testler kullanılmaktadır. Antiviral ilaç direncinin saptanması için standart fenotipik yöntem, plak redüksiyon testidir (PRA). DNA hibridizasyon testi ve flow sitometri ile CMV erken antijeninin saptanması da diğer fenotipik yöntemler arasındadır. İlaç duyarlılığını tespit etmek için sıklıkla genotipik testlere başvurulur. Dizi analizi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), pirosekanslama, in-vitro ters hibridizasyon, line prob assay (LiPA) ve tek nükleotid polimorfizm (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) analizi genotipik direnç tespit yöntemlerindedir. Fenotipik testlerle karşılaştırıldığında genotipik testler, klinik karar verme sürecine rehberlik edebilecek hızlı bir ölçüm sağlar; ancak seçilen hedef dışındaki mutasyonları saptayamaz. Gansiklovir direncinden ilacın hücre içi fosforilasyonunu sağlayan UL97 protein kinaz geni ve CMV DNA polimerazı kodlayan UL54 genindeki mutasyonlar

sorumludur. UL54 mutasyonu genellikle uzun süreli tedaviden sonra, önceden var olan UL97 mutasyonlarına eklenir ve ilaç direnci seviyesini birkaç kat artırır. UL54 mutasyonları gansiklovir, sidefovir, foskarnet direnci ile ilişkili bulunmuştur (4-7).

Bu çalışmada; kemik iliği transplantasyon (KİT) ünitesi ve hematoloji kliniklerinde takip edilen hastalardan izole edilen CMV suşlarında antiviral ilaç direnciyle ilişkilendirilen UL97 ve UL54 gen mutasyonlarının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. CYTOMEGALOVIRUS

#### 2.1.1.Tarihçe

Alman bilim adamı Hugo Ribbert 1881 yılında, ölü doğmuş bir fetüsün böbrek kesitlerinde ve çocukların parotis bezinde, yorumlayamadığı büyük hücreler gördüğünü yazmıştır. Ardından, Jesionek ve Kiolemenoglu da benzer hücreleri sekiz aylık bir fetüsün akciğerlerinde, böbreklerinde ve karaciğerinde görmüş ve bu hücreleri "protozoon benzeri" hücreler olarak raporlamıştır. Bu büyük hücrelerin çekirdeklerinde, şeffaf halo ile çevrili "merkezi nükleer cisim" görülmüştür. Ribbert'in laboratuvarında çalışan Löwenstein 1907 yılında, incelediği 30 infanttan dördünün parotis bezinde bu tür hücreleri göstermiştir. Bunlar, intranükleer inklüzyonlara sahip tipik sitomegalik hücrelerin ilk tanımlarıdır. Von Glahn ve Pappenheimer, 1925 yılında herpes genitalis ve herpes zoster ile enfekte olmuş insanların lezyonlarında, intranükleer inklüzyon içeren hücrelerin varlığına dikkat çekmiştir. Bu tür anormal hücrelerin virüsler tarafından üretildiğini düşünmüşler ve bunların protozoonlar ile akraba olduklarından şüphe duymuşlardır. Bu durum, intranükleer inklüzyonlara sahip hücrelerin, günümüzde *Herpesviridae* olarak bilinen virüslerle ilişkili olabileceğinin ilk göstergesi olmuştur. Farber ve Wolbach, çeşitli nedenlerle öldükten sonra incelenen 183 çocuktan 26'sının tükürük bezlerinde bu tür inklüzyon taşıyan hücreleri göstermiştir. Bu durum, CMV enfeksiyonunun oldukça sık olduğunun kanıtı olmuştur. Araştırmacılar böbrek tübüler epitel hücrelerini vakalardaki ortak etkilenen bölge olarak saptamıştır. Bu durumda, idrar çökeltilerinde hücrelerin gösterilmesiyle hastalığın yaşam sırasında da teşhis edilebileceğini öne sürmüşlerdir. Virüs, birbirinden bağımsız üç farklı grup tarafından 1956 yılında, ilk kez hücre kültürlerinden izole edilmiştir (Rowe ve ark., 1956; Smith, 1956; Craig ve ark., 1957) ve 'tükürük bezi virüsü' veya 'sitomegalik inklüzyon hastalığı virüsü' olarak adlandırmıştır. Sonrasında Weller ve arkadaşları tarafından "Sitomegalovirüs" (CMV)

terimi önerilmiştir (Weller ve ark., 1960). Günümüzde virüs, İnsan Herpesvirus Tip 5 olarak adlandırılmıştır (8-11).

### 2.1.2.Sınıflandırma

Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi tarafından son literatürde İnsan Herpes Virüsü 5 (HHV-5) olarak adlandırılan İnsan Sitomegalovirüsü (HCMV), *Herpesviridae* ailesi, *Betaherpesvirinae* alt ailesi, Cytomegalovirus cinsine aittir. Virüsün adı, enfekte hücrenin büyümesine (cyto:hücre, megali:büyüme) neden olması ve karakteristik inklüzyon cisimcikleri oluşturması gerçeğinden türetilmiştir (1, 12, 13). Herpesvirüs ailesi üyeleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

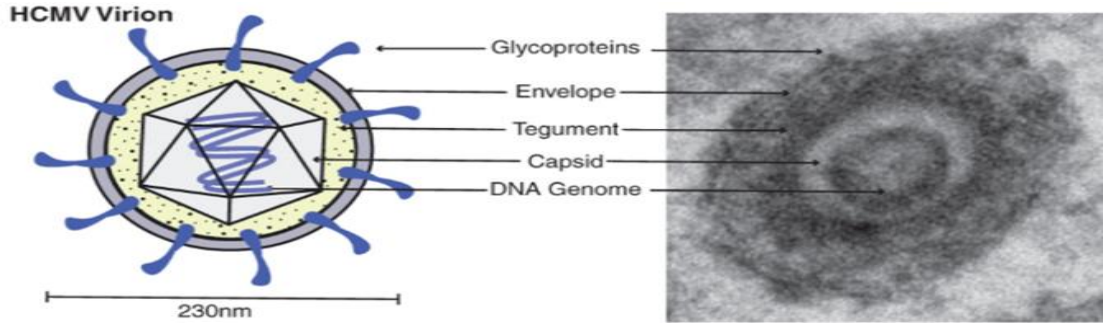
**Tablo 1.**Herpesviridae ailesi (13)

Alt aile	Taksonomik ad	Tür adı
<i>Alfa Herpesvirinae</i>	HHV-1	Herpes Simplex Virus 1(HSV-1)
	HHV-2	Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2)
	HHV-3	Varicella Zoster Virus (VZV)
<i>Beta Herpesvirinae</i>	HHV-5	Human Cytomegalovirus (HCMV)
	HHV-6	Human Herpes Virus 6 varyant A/B
	HHV-7	Human Herpes Virus 7
<i>Gama Herpesvirinae</i>	HHV-4	Epstein Barr Virus (EBV)
	HHV-8	Kaposi’s Sarcoma Associated Herpesvirus (KSHV)

### 2.1.3. Virüsün Genel Özellikleri

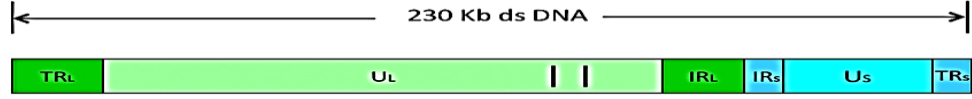
**2.1.3.1. Virüsün yapısı:** CMV herpesvirüs ailesinin tipik özelliklerini taşır. Tam virion partikülü 120-200 nm boyutları ile aile içindeki en büyük virüstür. Elektron mikroskopik incelemede diğer herpesvirüslerden yapısal olarak ayırt edilemeyen virionları, yüksek oranda defektif viral partiküller ve viral DNA ve kapsitten yoksun enfektif olmayan "dense body" olarak adlandırılan küresel partiküller içerir. Karakteristik olarak dense body, virionlardan daha büyüktür ve protein bileşimleri bakımından virionlardan daha heterojendir. CMV, 220-240 kb doğrusal çift sarmallı DNA, genomu çevreleyen ikozahedral simetrik kapsid (100–110 nm çap, 162

kapsomer), kapsid ile zarf arasında amorf bir tegument veya matriks ve en dış tabakada da lipid zardan oluşmaktadır (Şekil 1). Tegument çoğunlukla fosfoproteinlerden oluşur. Viral zarf, nükleer zarın iç yüzeyinden tomurcuklanan toplanmış nükleokapsidler olarak oluşturulur, lipoproteinler ve yapısal proteinler içerir ve bunlardan bazıları glikozile edilmiştir. Glikoprotein B (gB) ve glikoprotein H (gH) gibi glikoproteinler, adlarını aldıkları Herpes Simplex Virüs (HSV) zar proteinleriyle genetik homolojidedir (11-15).



**Şekil 1.**CMV'nin morfolojik yapısı (15 numaralı kaynaktan alınmıştır)

CMV genomu, konağın bağışıklık sistemini modüle etme işlevi gören proteinler ile yapısal ve düzenleyici proteinleri kodlayan 200'den fazla açık okuma bölgesinden (Open Reading Frame: ORF) oluşur. Bu proteinlerin çoğunun işlevi henüz tam olarak belirlenememiştir (13). Diğer herpesvirüslerle karşılaştırıldığında en fazla glikoproteini CMV genomu kodlar. Virionu oluşturan viral proteinler; %50 tegument proteinleri, %30 kapsid proteinleri, %13 zarf proteinleri ve %7 tanımlanmamış proteinler olarak dağılım gösterir. Bu proteinler arasında virionun en bol proteinini 'lower matriks proteini' olarak da adlandırılan pp65 (UL83) tegument proteindir. Pp65 sitotoksik T lenfositler (CTL) için en önemli hedefidir. Viral genom, her ikisi de tekrar dizileri (repeat long:RL ve repeat short:RS) ile sınırlanmış olan kısa (unique short:US) ve uzun (unique long:UL) olarak iki bölgeye ayrılmıştır. Her iki bölge de ters çevrilebilir, bu şekilde CMV eşit miktarda dört izomer oluşturma yeteneği gösterir (11-13). CMV DNA genomunun yapısal komponentleri Şekil 2'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.**CMV DNA genomunun yapısal komponentlerinin haritası (16 numaralı kaynaktan alınmıştır)

Enfeksiyöz virionun olgun kapsidi virüs tarafından kodlanan beş protein içerir. Bu proteinler viral kapsidin ikozahedral yapısındaki penton, hekson ve tripleksleri oluşturur. Bunlar; major kapsid proteini (MCP; UL86 tarafından kodlanır), minör kapsid proteini (MnCP; UL85 tarafından kodlanır), minör kapsid binding proteini (MnCBP; UL46 tarafından kodlanır), *smallest* kapsid proteini (SCP; UL48.5 tarafından kodlanır) ve portal proteini (UL104 tarafından kodlanır) olarak adlandırılmaktadır. UL80.5 tarafından kodlanan bir protein olan *assemblin*, DNA paketlenmesi sırasında olgun kapsitten temizlenir (11, 15, 17).

Tegüment tabakası, zarf ile kapsid arasında bulunur ve virionun bileşimi ve organizasyonu açısından en az tanımlanan bölgedir. Tegüment, replikasyon döngüsünde kritik işlevleri yerine getiren birçok protein içerir ve konağın enfeksiyona yanıtının modifikasyonunda önemli rol oynar. Virüs tarafından kodlanan toplam protein sayısının %50'sinden fazlası tegümentte bulunur; ancak sadece küçük bir kısmı virionun yapısal bütünlüğüne doğrudan katkıda bulunur. Tegüment proteinlerinin çoğu CMV genom replikasyonuna, enfektif progenitörlerin sitoplazmada montajına ve konak organizmanın bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesine katkıda bulunur. Çoğu tegüment proteini fosforile edilmiştir (15). Bazı tegüment proteinlerinden ppUL32, pp150 ve pp28 sitoplazmada ifade edilirken, ppUL69 çekirdekte ifade edilir. PpUL53 ve ppUL83 (pp65) ise erken enfeksiyon sırasında çekirdekte ifade edilir ve daha sonra geç enfeksiyon sırasında sitoplazmaya taşınır. Pp150 nükleokapsidin stabilize edilmesinde ve virion montaj bölgelerine taşınmasında işlev görür. Diğer birkaç tegüment proteini; viral gen ifadesinde (pp71), replikasyonda (pp28), öncü kapsidlerin çekirdekten çıkmasında (ppUL31) ve hücrel yanıtların modifikasyonunda (ppUL69) rol oynar (11, 15).

CMV zarfı, temel herpesvirüs glikoproteinlerinin ortak proteinlerini ve sırasıyla UL55, UL75, UL115, UL100, UL73 tarafından kodlanan glikoprotein B (gB), glikoprotein H (gH), glikoprotein L (gL), glikoprotein M (gM) ve glikoprotein N

(gN)'yi içerir. Bu glikoproteinlerin bir kısmı kompleksler halinde bulunur. Glikoproteinler virionun bağlanması, füzyonu ve hedef hücreye penetrasyonuna katkıda bulunurlar. Glikoprotein M dışında çoğu temel zarf glikoproteini hedef hücreye bağlanma, füzyon ve penetrasyon ile ilgiliyken, gM'nin ise montaj ve virionların ve bulaşıcı olmayan viral parçacıkların salınması ile ilişkili olduğu iddia edilmiştir. Temelde gB ve gH glikoproteinlerinin sarmal bölgeleri, virüsün konak hücreye kaynaşmasında rol oynar; gM ve gN, büyük ölçüde heparin bağlama faktörleridir ve virüsün bağlanmasında rol alırken, gH ve gL virionun sitoplazmaya taşınmasında görev alır (11, 15).

**2.1.3.2.Replikasyon:** CMV, herpesvirüslerin tipik replikasyon döngüsünü sergiler. Uzun bir replikatif döngüye sahiptir ve hücre kültüründe yavaş üreme gösterir. Viral proteinlerin sentezine yol açan transkripsiyonel olaylar, fibroblastlar gibi duyarlı hücrelerle sınırlıdır, klinik suşlar ayrıca endotel hücrelerinde de üretilebilir (18).

Viral replikasyon, konakçı hücrenin çekirdeğinde meydana gelir ve en erken ( $\alpha$ ), erken ( $\beta$ ) ve geç ( $\gamma$ ) gen sınıflarının ekspresyonunu içerir. Virüsün konak hücrelere girişi, gB'nin heparin sülfat ile etkileşimiyle başlar, ardından viral zarın hücre zarıyla füzyonu ve nükleokapsid ve tegüment proteinlerinin sitoplazmaya girmesine izin veren bir dizi etkileşim gerçekleşir. Nükleokapsid, mikrotübüller boyunca çekirdeğe doğru hareket eder. Tegüment fosfoproteinlerinin bazıları çekirdeğe taşınırken bir kısmı sitoplazmada kalır. Virüs partikülünün tegüment proteinleri,  $\alpha$  genleri için transaktivatör olarak işlev görürler. Viral DNA, nükleokapsitten çekirdeğe taşınır, çekirdeğe girer girmez lineer formdaki viral genom sirküler hale gelir ve transkripsiyon başlar. Sırasıyla  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$  gen ifadesi gerçekleşir. Enfekte hücrede ilk en erken (IE/  $\alpha$ ) gen proteinleri ortaya çıkar. Bu proteinler çoğunlukla transaktivatör olarak işlev görürler ve CMV gen ifadesini başlatma, hücre döngüsünün ilerlemesi ve apoptoz dahil olmak üzere bir dizi konak hücre işlevini etkilerler. İE proteinleri (özellikle fosfoprotein pp65), hücre kültürlerinde enfeksiyonun erken belirteçleri olarak kullanılabilir. Bunları erken (E/  $\beta$ ) gen proteinleri izler; bu proteinler viral DNA replikasyon faktörleri ve onarıcı enzimlerin yanı sıra bağışıklıktan kaçınmada rol oynayan proteinleri de içerir. Viral DNA replikasyonu, enfekte hücrelerin

çekirdeğinde enfeksiyondan yaklaşık 16 saat sonra meydana gelir. Geç (L/γ) proteinlerin transkripsiyonu ise enfeksiyondan sonra, 24 saatten daha uzun sürede meydana gelir. Geç proteinler, virionun morfogenezine katkıda bulunurlar, viral kapsid proteinleri ve glikoproteinleri üretirler. Yeni sentezlenen genomlar viral kapsidlere paketlenir. Çekirdek zarından zarflarını alan nükleokapsidler, perinükleer sisternalardan tomurcuklanır, sitoplazmik veziküller içinde hücre zarına taşınır, vezikül hücre zarıyla birleşir ve ardından ekzositozla salınırlar. Tegüment proteinini pp150 (ppUL32), virüsün hücreden son çıkışı için gereklidir ve bu proteinin yokluğunda viral DNA sitoplazmada birikir ve virüsün hücreden hücreye yayılımı engellenir (12, 13, 15, 18, 19).

**2.1.3.3.Fiziksel ve kimyasal ajanlara direnç:** Tüm herpesvirüsler gibi, CMV de düşük pH'a, lipid çözücü maddelere ve ısıya duyarlıdır. CMV'nin yarı ömrü 37 °C'de 60 dakikadır, 56°C'de 30 dakikada, %20'lik ultraviyole ışınları ve eter solüsyonunda 5 dakikada aktivitesini kaybeder. Enfektivitesi %10'luk sodyum hipoklorid solüsyonunda belirgin şekilde düşer. Diğer herpesvirüslere kıyasla -20 °C'de nispeten daha dayanıksızdır. Enfektivitesini koruyabilmesi için en az -70 °C'de saklanmalıdır (12, 14, 20).

#### **2.1.4.Epidemiyoloji ve Bulaş**

CMV, dünya çapında yaygın bir dağılım gösterir ve mevsimsel özellik taşımaz. Enfeksiyonları her yaş grubunda görülür. Hastalığın seroprevalansı yaşa, coğrafi konuma, etnik ve sosyoekonomik yapıya göre %30-%100 arasında değişmektedir. Gelişmiş ülkelerdeki erişkinlerin yaklaşık %60'ı, gelişmekte olan ülkelerde ise %100'e yakını seropozitifdir. Enfeksiyonlar, genellikle kaynak açısından fakir ülkelerde, çocukluk döneminde kazanılır. Gelişmiş ülkelerdeki popülasyonlar genellikle daha düşük seroprevalans oranları gösterir ve enfeksiyonlar genellikle ergenlik ve erişkinlik dönemlerinde edinilir. CMV seropozitifliği 3-6 yaş arasındaki çocuklarda yaklaşık olarak %20-%30 arasındadır (11).

CMV, vertikal ve horizontal olarak bulaşabilir. Enfeksiyonlar doğum öncesi (prenatal), doğum sırasında (perinatal) veya hayatın ileri dönemlerinde (postnatal) edinilen enfeksiyonlar olarak sınıflandırılır. Kan, tükürük, idrar, gözyaşı, dışkı, semen,

servikovajinal sekresyonlar, anne sütü gibi pek çok vücut sıvısında bulunduğu için kan transfüzyonu, solid organ veya kemik iliği transplantasyonu, cinsel yol, emzirme ve virüsü yayan kişilerle yakın temas gibi çeşitli yollarla bulaşabilmektedir (13). Gebelik döneminde geçirilen enfeksiyonlarda, fetus transplasental olarak enfekte olur. CMV primer enfeksiyondan sonra hayat boyu vücutta latent kalır. Reaktivasyon veya reenfeksiyonla viral saçılım yapabilir. Konjenital veya edinsel CMV enfeksiyonu sonrası virüsün uzun süre atılması, virüsün yayılmasına katkı sağlar. Virüs primer enfeksiyondan sonra haftalar, aylar hatta yıllar boyunca atılabilir. Bulaşma yollarının yaygınlığı sebebiyle CMV seropozitivite oranları her toplumda yaşla birlikte artış göstermektedir (13, 21).

CMV enfeksiyonu solid organ transplantasyonu (SOT) yapılan kişilerde hastalık ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir (21). CMV, allogrefti istila etme eğilimindedir. Solid organ nakli sırasında, genellikle seropozitif donörlerden (yaklaşık %78) seronegatif alıcılara (D+/R-) CMV bulaşı meydana gelir. İmmünespresif ilaç tedavisi altındaki seropozitif alıcıların da yaklaşık %40'ında latent CMV reaktivasyonu olur ve seropozitif donörlerden enfekte olabilirler. Herhangi bir koruma tedavisi almayan hastalarda transplantasyon sonrası ilk üç ayda CMV hastalığı görülürken, profilaksi alan hastalarda ise profilaksi bitiminde hastalık görülmektedir. Kemik iliği transplantasyonu (KİT) alıcılarında ise CMV seropozitifliği risk oluşturmaktadır. Neredeyse tüm viremi vakaları seropozitif alıcılar arasında meydana gelirken, CMV'nin donörden alıcıya bulaşı nadir durumlarda görülür. Ayrıca alıcılar, aktif olarak virüsü yayan bir kişi ile temas yoluyla da primer enfeksiyon geliştirebilirler. CMV hastalığı, KİT alıcılarında transplantasyon sonrası ilk 100 gün içinde önemli hastalık ve mortalite nedenidir (21, 22).

İntrauterin enfeksiyon riski sıklıkla primer maternal enfeksiyon durumunda yüksek olsa da primer olmayan maternal enfeksiyon (reaktivasyon veya reenfeksiyon) sırasında da bulaş olasılığı bulunmaktadır. Gebeliğin başlangıcında seropozitif olmayan kadınların %2'sinde doğum anına kadar serokonversiyon görülür. Bu kadınlarda CMV için başlıca bulaş kaynağı, özellikle tükürük ve idrarlarında yüksek miktarda CMV saçan küçük çocuklardır. Kreşe giden çocuklar ya da bebeklerin %20-%70'i bir-iki yıllık dönemde CMV enfeksiyonu geçirir. Enfeksiyon genellikle asemptomatik olsa da çocuklar virüsü ebeveynlerine ve bakıcılarına bulaştırabilir. Bu

durum hamile kadınlarda intrauterin enfeksiyon için risk oluşturabilir. Gebelik sırasında primer enfeksiyon geçiren kadınların %32'sinde intrauterin enfeksiyon oluşur. İntrauterin enfeksiyonun neden olduğu ciddi hastalık riski yaklaşık %20'dir. Yenidoğanlara doğum sırasında doğum kanalından da virüs bulaşı olabilir. Gebelerin yaklaşık %10'u doğum sırasında genital kanaldan CMV sağlar ve yenidoğanların yaklaşık %50'si enfekte olur. Konjenital CMV enfeksiyonu sıklığı toplumun epidemiyolojik özellikleri ile bağlantılıdır. Seroprevalansı yüksek toplumlarda, konjenital CMV enfeksiyonu daha yüksek orana sahiptir. CMV seropozitif gebelerde de fetusa intrauterin CMV bulaşı olabilir. Semptomatik konjenital CMV enfeksiyonunun prognozu ve şiddeti bakımından, primer ve primer olmayan maternal CMV enfeksiyonları arasında belirgin bir fark saptanmamıştır. Konjenital CMV enfeksiyonu prevalansı, maternal seroprevalansın yüksek olduğu gelişmekte olan ülkelerde %1-%5 arasında iken, maternal seroprevalansın daha düşük olduğu endüstrilemiş ülkelerde %0.6-%0.7 arasındadır.

CMV'nin etkilediği başka bir hasta grubu da çeşitli nedenlerle yoğun bakım ünitelerinde yatan bireylerdir. Seropozitif hastaların yaklaşık üçte biri CMV reaktivasyonu yaşar. Bu tür hastaların ventilasyona ihtiyaç duyma olasılıkları daha yüksektir, yoğun bakımda daha uzun süre kalma eğilimindedirler ve mortaliteye daha yatkındırlar. Duyarlı sağlık çalışanları ve kreş çalışanları da mesleki maruziyet riski altındadır. CMV'nin ergenlerde ve erişkinlerde cinsel yolla bulaşması da mümkündür (13, 21, 22).

#### **2.1.5. Patogenez ve İmmünite**

CMV enfeksiyonu insanlarda, virüsle enfekte olmuş vücut sıvılarına maruziyet ile virüsün doğal bağışıklık engellerini aşıp çoğalmayı sürdürdüğü noktada başlar. Aynı zamanda plasenta aracılığıyla anneden fetusa vertikal yolla bulaşarak konjenital patolojilere de neden olabilir. Primer enfeksiyon genellikle virüsün mukozal epiteli enfekte etmesiyle başlar. Primer enfeksiyonu takiben virüs, birçok vücut sıvısında saptanır. Konakçının yaşına bağlı olarak, özellikle konjenital enfeksiyonlar durumunda, aylarca, hatta yıllarca virüs atılımı olabilir. Glandüler ve mukozal dokuların epitelyal hücreleri, düz kas hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, hepatositler, dendritik hücreler ve vasküler endotel hücreleri dahil olmak üzere geniş bir hücre grubunu enfekte edebilir. Herpesvirüs ailesinin diğer üyelerinde olduğu gibi

enfeksiyon, primer enfeksiyondan sonra, etkili bir hücrel bağışıklık yanıtı ile çözüle de virüs kemik iliği monosit öncüllerinde latent olarak kalabilir. Bu durum organ ve doku nakli sırasında virüsün taşınması için risk oluşturur (11, 14).

CMV litik bir virüstür ve hücrelerde sitopatik etkiye neden olur. Enfekte hücrede hacimli bir intranükleer inklüzyon cisimciği ve bir veya daha fazla "baykuş gözü" şeklinde intrasitoplazmik inklüzyon cisimciği oluşturması virüsün karakteristik özelliğidir. Bu inklüzyonlar, yeni oluşan virüs ve lizozom kümelerinden oluşur. Bu tür cisimlerin oluşması genellikle hücrel hacmin artmasına yol açar, bu da sitomegali olarak adlandırılan fenomeni ortaya çıkarır (14).

CMV enfeksiyonunun patogenezi ve latentlik mekanizmasına ilişkin oldukça az bilgi bulunmaktadır. Humoral immünite CMV'ye karşı geçirilmiş enfeksiyonun en iyi göstergesidir; ancak konak savunmasındaki en önemli rol hücrel immünedir. Zarf glikoproteinleri gB ve gH'ye yönelik nötralize edici antikorların korumaya katkısı vardır. CMV seropozitif immüsuprese organ nakli alıcılarında hastalığın şiddetinin CMV seronegatif alıcılara göre daha düşük seyretmesi humoral bağışıklığın koruyucu etkisini desteklemektedir. Ayrıca, organ nakli sonrası CMV hastalığının önlenmesi veya tedavisi için yaygın olarak pasif CMV immünglobulini kullanılır. NK hücrelerinin, erken CMV replikasyonunu kontrol etmede önemli olduğu gösterilmiştir. Hücrel immün yanıtın ana bileşenini CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri oluşturur. IFN- $\alpha/\beta$  ve IFN- $\gamma$  IE gen ifadesini düzenleyerek CMV replikasyonunu sinerjik bir şekilde azaltır. Birçok viral protein bu hücreler tarafından tanınmasına rağmen, IE1 ve pp65'e karşı oluşan CD8<sup>+</sup> T lenfositlerinin esas korumayı sağladığı gösterilmiştir (11, 23).

Enfeksiyonun bir dizi özelliği vücutta latent kalmasına neden olur. Virüs son derece yavaş çoğalır ve hücreden hücreye füzyonla yayılır ve antikor nötralizasyonundan kaçınır. Bir dizi CMV proteini, konak immün yanıtını modüle eder. Birkaç viral protein, akut enfeksiyon sırasında çoklu mekanizmalarla viral antijenlerin MHC sınıf I hücrelere sunumunu engeller, böylece enfekte olmuş hücreleri bir dereceye kadar CTL'ler tarafından tanınmaktan ve parçalanmaktan korur. MHC sınıf I proteinlerinin ağır zinciri ile homoloji sergileyen bir CMV proteini olan UL18,  $\beta$ 2-mikroglobulin ile etkileşime girebilir, böylece sadece T hücre tarafından tanınmasına müdahale etmekle kalmaz, aynı zamanda serbest virionu kaplar ve antikordan korur. Ayrıca, CMV diğer herpesvirüslerde olduğu gibi, Fc reseptörünün

fonksiyonel özelliklerine sahip bir protein kodlar ve bu protein, enfekte olmuş hücrenin plazma zarını, immün sistem hücrelerinin saldırısına karşı korur. Bu durum enfeksiyonun immün temizliğini geciktirerek miyeloid öncü hücrelerin enfekte olmasına ve virüsün bu hücrelerde latent kalmasına neden olmaktadır. CMV enfeksiyonu bağışıklığı baskılayabilir ve bu durum bakteriyel veya fungal ajanlarla sekonder enfeksiyona yatkınlık oluşturabilir (23).

### **2.1.6.Klinik Bulgular**

Bağışıklık sistemleri normal çalışan bireylerde, primer CMV enfeksiyonu genellikle asemptomatik olur, ancak ömür boyu latent bir enfeksiyon oluşturmadan önce kendini sınırlayan ateşli bir hastalık veya mononükleoz benzeri bir sendrom olarak da ortaya çıkabilir (24). Primer enfeksiyon, CMV spesifik IgM üretimine yol açar ve daha sonra IgG antikoru üretilir. CMV enfeksiyonunun klinik ilerleyişi, konağın immün sistemine göre şekillenir. İmmünkompetan konaklarda yaşam boyunca aralıklı olarak meydana gelen CMV reaktivasyonu, viral replikasyonun etkili kontrolünü sağlayan immünolojik belleği tetikler. Öte yandan, HIV enfeksiyonu, SOT alıcıları veya KİT alıcıları gibi immün sistemi zayıf olan konaklarda CMV'ye spesifik CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin kaybı, kontrolsüz viral replikasyona neden olabilir ve sonuç olarak klinik hastalığa yol açabilir (2).

Transplant alıcıları arasında CMV ile ilişkilendirilen sonuçların raporlanmasını standartlaştırmak amacıyla, CMV enfeksiyonu ve hastalık kategorilerini tanımlamak için güncellenmiş tanımlar yayımlanmıştır (24). Bu tanımlar:

CMV enfeksiyonu: CMV'ye özgü semptom veya bulgular olmaksızın vücut sıvısı veya doku örneğinde virüs izolasyonu, viral antijenlerin veya nükleik asidin tespiti,

CMV hastalığı: CMV'ye özgü semptom ve bulgularla birlikte CMV enfeksiyonunun kanıtının olması durumudur. CMV hastalığı, CMV sendromu ve hedef organ hastalığı olmak üzere iki grupta sınıflandırılabilir:

-CMV sendromu: Bağışıklık sistemi zayıflamış konakta ateş, halsizlik, lökopeni/nötropeni veya karaciğer enzimlerinin yükselmesini içeren belirtiler kombinasyonu ile kanda CMV saptanmasıdır.

-CMV hedef organ hastalığı: CMV hastalığı tutulumu olan organla uyumlu semptomlarla birlikte tutulumu olan dokuda virüsün gösterilmesidir (21, 24, 25).

**2.1.6.1.Sağlıklı konakta CMV enfeksiyonu:** CMV sağlıklı kişilerde çoğunlukla asemptomatik seyreder. Semptomatik olduğunda *Epstein-Barr Virüs* (EBV)'ün neden olduğu mononükleoz benzeri bir sendromla sonuçlanır ve uzun süreli ateş (iki-üç hafta boyunca), halsizlik, atipik lenfositoz ve hafif hepatit bulgularıyla seyreder. CMV mononükleozu vakalarının sadece %30'unda döküntü ortaya çıkar. EBV'ye kıyasla lenfadenopati ve splenomegali daha az görülür. Tonsillit, farenjit sık değildir. Heterofil antikor testi negatiftir. (13, 14).

**2.1.6.2.İmmün yetmezliği olan konakta CMV enfeksiyonu:** CMV, AIDS hastaları ve nakil alıcıları gibi immünsuprese hastalarda önde gelen fırsatçı patojenlerden biridir. HIV kaynaklı CD4<sup>+</sup> T hücre kaybı ve işlev bozukluğunun, CMV replikasyonuna yol açtığı ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Her iki virüsle enfekte olan bireylerde yüksek düzeyde CD8<sup>+</sup> T hücresi ve düşük CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T hücresi oranı saptanırken, yalnızca HIV veya CMV ile enfekte olan hastalarda bu tür değişiklikler saptanmamıştır. Aktif enfeksiyon CD4<sup>+</sup> T lenfosit sayısının 50-100 hücre/μl'nin altına düştüğü zaman meydana gelir. AIDS hastalarında CMV hastalığının yaygın belirtileri, retinit (vakaların %85'inde), özofajit ve kolittir. Retinal hücrelerin kalınlaşması ve ilerleyici retinal harabiyet nedeniyle dört-altı ay içinde körlük gelişir (14, 26).

Nakil hastaları, CMV profilaksisi olmadan, kişisel risk faktörlerine, nakil işlemi türüne, donör ve alıcı arasındaki immünolojik uyuma ve uygulanan immünsupresif ilaçlara bağlı olarak hastadan hastaya değişebilen şiddette bir dizi klinik belirti sergileyebilir. KİT uygulanan hastalarda, non-otolog KİT hastalarının yaklaşık %30–%70'i ve otolog kemik iliği transplantasyonu (OKİT) hastalarının %5'i CMV hastalığı geliştirir. Virüs genellikle, nakilden yaklaşık dört-sekiz hafta sonra kan veya vücut salgılarında tespit edilir. Bu nedenle CMV hastalığı nakilden sonraki ilk üç ay içinde ortaya çıkar (erken başlangıçlı CMV hastalığı). Daha düşük bir oranda hasta nakilden sonraki ilk üç aydan sonra CMV hastalığı geliştirir (geç başlangıçlı CMV hastalığı) (3, 14).

Allojenik kemik iliği transplantasyonu (AKİT) alıcılarında, CMV pnömonisi yüksek risk oluşturmaktadır. İnsidansı yaklaşık olarak %10-%30 arasındadır. Sıklıkla antiviral ilaçlar ve yardımcı tedavilerle agresif tedaviye rağmen ölüme yol açabilir (2, 14).

Virüsün immün sistemi modüle etme yeteneğinden kaynaklanan bazı dolaylı etkileri vardır. Bu etkiler, bakteriyel ve fungal enfeksiyonların sıklığında artış, kardiyovasküler hastalık riskinin artması, SOT alıcılarında allogreft reddinin artması, KİT alıcılarında graft-versus-host hastalığının (GVHD) artması ve genel mortalitenin artması olarak sıralanabilir (14).

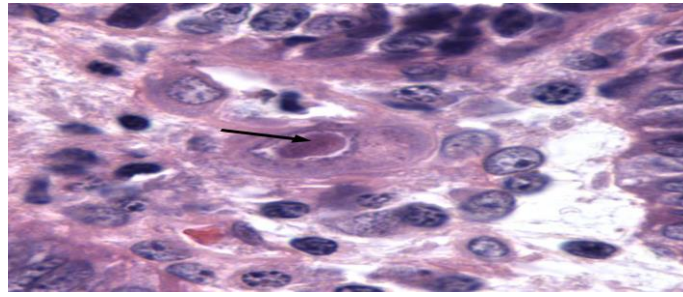
**2.1.6.3. Konjenital CMV enfeksiyonu:** CMV, doğumsal anomalilere en sık sebep olan enfeksiyöz ajandır. Doğumda klinik olarak saptanan, CMV ile enfekte bebeklerin yarısı hayat boyu sürecek olan ağır bozukluklara adaydır. Primer ve primer olmayan maternal CMV enfeksiyonuna bağlı insidans yaklaşık %0.4-%0.8'dir (14, 21).

CMV ile enfekte olan çoğu bebek semptomsuz olsa da doğumda veya sonradan sağlık sorunları geliştirebilir veya prenatal ölümle sonuçlanabilir. Doğumda klinik olarak en önemli belirtiler; mikrosefali, hepatosplenomegali, retinit, intrauterin büyüme geriliği, nöbetler, döküntü ve sarılıktır. Konjenital enfeksiyonu olan asemptomatik bebeklerde bile ilerleyen zamanlarda işitme kaybı, görme kaybı ve nöbet, psikomotor ve / veya santral sinir sistemi tutulumu gelişebileceği bilinmektedir. (14). Annede önceden var olan enfeksiyon veya CMV antikorunun olması, bebekte önemli enfeksiyon gelişimi riskini ortadan kaldırmayabilir (13).

### **2.1.7.CMV Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı**

**2.1.7.1.Histopatolojik inceleme:** Histolojik değişiklikleri değerlendirmek ve karakteristik hücresel inklüzyonları içeren sitomegalik hücrelerin varlığını göstermek için biyopsi ve otopsi materyali örneklerinden histopatolojik incelemeler yapılmaktadır. CMV enfeksiyonu için en ayırıcı mikroskopik özellik “baykuş gözü” olarak tanımlanan geniş, merkezi ve bazofilik intranükleer inklüzyon içeren hücrelerdir (Şekil 3). Bu inklüzyonlar en iyi hematoksilen-eozin ve Papanicolaou boyaları ile görünmektedir. CMV ile enfekte olmuş hücrelerde küçük intrasitoplazmik

inklüzyonlar da görülebilir ve bunlar en iyi Wright-Giemsa boyaları ile gösterilmektedir. Histopatolojik testlerde karakteristik sitomorfolojik değişikliklerin varlığı CMV enfeksiyonunu düşündürür ve duyarlılığı örneğin türüne bakılmaksızın ne kadar düşük de olsa aktif hastalıkla ilişkilidir. CMV, morfolojik değişiklikler oluşturmadan da dokuları enfekte edebilir, bu nedenle tipik sitomegalik hücrelerin görülmemesi CMV enfeksiyonunu dışlamaz, enfeksiyonun serolojik ve virolojik ek testlerle doğrulanması gerekmektedir. Histopatolojik testlerin duyarlılığı, immünohistokimyasal boyama veya in-situ hibridizasyon kullanılarak artırılabilir (1, 2, 13)



**Şekil 3.**Hematoksilen-eozin boyamada tipik baykuş gözü intranükleer inklüzyon (ok ile gösterilmiştir) ve sitoplazmik inklüzyonlar (2 numaralı kaynaktan alınmıştır)

**2.1.7.2.Elektron mikroskopik inceleme:** CMV'yi dokuda tespit etmek için elektron mikroskopik inceleme kullanılabilir, ancak diğer herpesvirüslerle örtüşen özellikleri nedeniyle özgüllüğü yüksek değildir. Elektron mikroskopunda "dens body"ler ve olgun CMV parçacıkları tespit edilebilir. İdrarda CMV'yi tanımlamak için de kullanılmaktadır ve konjenital enfeksiyona sahip süt çocuklarında duyarlılığı %25-%95 oranlarında değişmektedir. Viral enfektivite titresi  $10^4$  /ml altına inince duyarlılık %95'e kadar inmektedir. Bu da tekniğin kullanımını kısıtlayan en önemli unsurdur. Bu yüzden klinik viroloji laboratuvarlarında yaygın kullanılmamaktadır (27, 28).

**2.1.7.3.Virüs izolasyonu:** CMV tespitinde altın standart yöntem olarak da kabul edilen hücre kültürü yönteminde sıklıkla CMV'nin büyümesini en iyi destekleyen insan fibroblast hücreleri kullanılır. Fibroblast kültürleri, sünet derisinden veya insan embriyonik dokularından hazırlanmaktadır. Klinik örneklerde CMV'nin tespiti için kullanılan kültür sistemleri arasında konvansiyonel hücre

kültürleri ve shell vial yöntemi bulunur (13). Konvansiyonel yöntemde klinik örnekler insan fibroblast hücrelerine inoküle edilir ve 2-21 gün kadar inkübe edilir ve gözlemlenir. İnkübasyonun ardından sitopatik etki (CPE) varlığına bakılır; bu etkiler büyük ve yuvarlak enfekte hücreler ve sitoplazmik "buzlu cam" görünümlü inklüzyonları içerir. CPE gözlemlendikten sonra, viral izolatın kimliği, belirli antiserumların kullanıldığı immünfloresan test ile doğrulanır. Hücre kültürü testleri, CMV hastalığının yüksek oranda tahmin edilmesini sağlar. Özellikle bir monoklonal anti-CMV antikor reaktif kullanılıyorsa özgüllüğü yüksektir. Viral kültürün duyarlılığının düşük olması başlıca dezavantajıdır. CMV'nin insan fibroblast hücrelerinde yavaş büyümesi de kültürün başka bir kısıtlamasıdır. Geleneksel kültür tekniklerinde, CPE'nin gözlenmesi en az bir hafta sürer, bu süre dört haftaya kadar uzayabilir. Yavaş sonuçlanma süresi ve düşük duyarlılık (çok özgül olsa bile) hızlı klinik ilerlemeye sahip olabilen bir viral hastalık için, teşhis ve terapötik karar verme süreçlerinde geleneksel kültürün klinik kullanımını sınırlar (2).

Shell vial hücre kültürü, CMV'nin klinik örneklerden tespiti için hızlı bir kültür yöntemidir. Düşük hızda santrifüjleme ve virüsün hücre kültüründe çoğaltılması ve CMV replikasyonunun erken döneminde, CPE gelişmeden önce oluşan viral antijenlerin monoklonal antikorlar kullanılarak immünfloresan ile tespit edilmesi prensibine dayanmaktadır. Shell vial testi geleneksel kültürlerden daha duyarlıdır, ancak kültür tabanlı sistemler antijenemi ve moleküler testlerle kıyaslandığında, shell vial da dahil, genellikle nispeten düşük duyarlılığa sahiptir. Sürecin yoğun, sonuç verme süresinin uzun ve duyarlılığın düşük olması viral kültürün modern klinik uygulamada kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle, viral kültür artık CMV enfeksiyonunun laboratuvar teşhisi için ilk tercih edilen yöntem olarak önerilmemektedir ve yerini, hızlı, daha duyarlı, nicel ve gerçek zamanlı testlere bırakmaktadır (2, 29).

**2.1.7.4. Antijenemi testi:** Antijenemi testi CMV replikasyonunun erken fazında polimorfonükleer lökositlerde (PMNL) eksprese olan, geç bir yapısal protein olan virüsün alt matriks proteinini (pp65), floresanla işaretli monoklonal antikorlar kullanılarak saptayan, direkt floresan antikor (DFA) prensibine dayanan bir testtir. Sonuçlar kantitatif olarak, pozitif hücre sayısının toplam lökosit sayısına oranı

şeklinde verilir. Dört beş saat içinde sonuç alınabilmesi ile avantajlı bir yöntemdir. Antijen pozitif kan hücreleri, aktif enfeksiyonun serolojik bulguları oluşmadan önce, 1-3 hafta içinde, ortalama olarak dokuz günde görülmektedir. Bu nedenle CMV pp65 antijenemi testi aktif enfeksiyonu göstermede CMV IgM'den daha duyarlıdır (1, 26). Antijen pozitif hücrelerin miktarının belirlenmesi, CMV enfeksiyonunun şiddetinin bir göstergesidir. Bu nedenle klinisyenlere CMV risk sınıflandırmasında (yüksek pozitif hücre sayısı klinik hastalığın ilerleme riskini gösterir) ve antiviral tedavi yanıtının izleminde yardımcı olur. Transplant hastalarında hastalık riskini belirlemek, AIDS'li hastalarda akut CMV enfeksiyonunu teşhis etmek ve antiviral tedaviye yanıtı izlemek için pp65 antijenemi testi kullanılır. Çalışmalarda pp65 antijenemi testinin, shell vial ve konvansiyonel hücre kültürü sistemlerinden çok daha duyarlı olduğu, moleküler yöntemlerle ise benzer duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir. Testin başlıca sınırlamaları, laboratuvarlar arasında standardizasyon eksikliği, subjektif olması ve testin yapılabilmesi için yeterli sayıda PMNL hücrelerine gereksinim olmasıdır. Özellikle miyeloablatif ve sitotoksik kemoterapi uygulanan KİT alıcıları gibi lökopenik hastalarda, PMNL sayısı yeterli olmayabilir. Ayrıca, test virüsle ilişkilendirilmiş hücreleri tespit ettiği için biyolojik sıvılardaki serbest virüsü tespit edemez. Örneklerin toplandıktan sonra 6-8 saat gibi kısa bir sürede işlenmesi gerekliliği bir diğer kısıtlamadır (2).

**2.1.7.5.Serolojik yöntemler:** CMV için serolojik testlerin klinik kullanımının iki ana nedeni, birincil enfeksiyona karşı duyarlılığın belirlenmesi ve latent CMV'nin bulaşma potansiyelinin saptanmasıdır. Serokonversiyon birincil CMV enfeksiyonunu teşhis etmenin güvenilir bir yoludur ancak genellikle yakın izlem altında olan nakil alıcıları gibi hastalar için pratik bir seçenektir. Geleneksel yöntemler seropozitiviteyi tespit edebilme özellikleri dolayısıyla oldukça değerli olsa da CMV antikor ölçümü doğru, hızlı ve etkin olma konusunda tüm gereksinimleri karşılamamaktadır. İmmünfloresan assay (IFA), enzyeme linked immonosorbent assay (ELISA), radioimmünoassay, indirekt hemagglütinasyon ve lateks agglütinasyon testleri serolojik tanıda kullanılabilir (28, 30).

Akut veya geçirilmiş enfeksiyonu tespit etmek için kullanılan serolojik testler, hastalık sırasında farklı zaman dilimlerindeki antikor titrelerindeki değişikliklere bağlı olarak

anti-CMV IgM ve anti-CMV IgG varlığını ölçme mantığına dayanmaktadır (28). Klinik olarak, CMV IgM'nin varlığı veya iki farklı serumda CMV IgG titresinde dört kat artışın saptanması, akut veya yeni CMV enfeksiyonunun belirteçidir. Umbilikal kordon kanında CMV IgM tespiti, akut intrauterin CMV enfeksiyonunu düşündürür. CMV IgM'nin varlığı her zaman akut primer enfeksiyonun belirtisi olmayabilir; çünkü bazı durumlarda yanlış pozitif sonuçlar oluşabilir. CMV IgG avidite testi kullanılarak bu durum ayırt edilebilir. Ayrıca, IgM bazı bireylerde aylarca persiste olabilir ve CMV reaktivasyonu sırasında da üretilebilir (2).

CMV IgM ve IgG testleri, immün yetmezlikli bireylerde CMV enfeksiyonunun gerçek zamanlı teşhisi için önerilmez. Bu hastalarda, CMV IgM bazen akut dönem sonrası uzun süre pozitif kalıp bazen de saptanamamaktadır. Bu durum yanlış pozitif veya negatif sonuçlara neden olmakta ve primer enfeksiyonun tanısında ayırt edici olamamaktadır. Özellikle transplant alıcıları olmak üzere immün yetmezlikli bireylerde, CMV serolojisi sıklıkla transplantasyon sonrası gelişebilecek enfeksiyon riskinin belirlenmesinde kullanılır. Bunun için transplantasyon öncesi alıcıların ve donörlerin önceki CMV maruziyeti değerlendirilerek transplantasyon sonrası primer veya reaktif CMV enfeksiyon riski gösterilebilir (2). Doğurganlık çağındaki kadınların primer enfeksiyona duyarlı olup olmadıklarının anlaşılması için de serum antikor tespiti yapılmaktadır (13).

a. ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay): Yıllar içinde CMV'ye karşı antikorları tespit etmek için diğer geleneksel yöntemlerin yerine ELISA geçmiştir. Antikor tayininde immün yakalama prensibiyle çalışan ve rekombinant antijenler içeren ELISA kitlerinin kullanılması duyarlılığı artırmıştır. Hızlı, duyarlı, özgül olması ve nispeten düşük maliyetle günlük olarak birden fazla numune çalışılması temel avantajlarıdır (13).

b. IFA (Immunofluorescence Assays): Antikompleman ve indirekt IFA'lar, CMV antikorlarını tespit etmek için yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. İndirekt IFA'da, hasta serumunun seyreltilmiş hali, bir cam mikroskop slaytına sabitlenmiş virüsle enfekte hücrelerle inkübe edilir. Özel antikor-antijen kompleksleri, floresan izotiyosiyanat ile konjuge edilmiş bir anti-insan antikor kullanılarak floresan mikroskop aracılığı ile tespit edilir. Antikompleman immünfloresan yöntemi, indirekt IFA'ya benzer; ancak test serumu önce endojen kompleman aktivitesini uzaklaştırmak

için ısı ile inaktive edilir, ardından cam slaytlarda virüsle enfekte hücrelerle inkübe edilir. Sonrasında ekzojen kompleman kaynağı eklenir ve özel antijen-antikor kompleksi tarafından bağlanır. Ardından floresan işaretli antikompleman antikoru eklenir; bu, komplemanın C3 bileşenine bağlanır ve slaytlar floresan mikroskop kullanılarak okunur. Antikompleman IFA, indirekt IFA'dan daha yüksek floresan sinyali amplifiye eder, bu da düşük miktarlardaki antikoları veya düşük aviditeli antikoları tespit etmeye olanak tanır. IFA'lar, CMV antikorlarının kalitatif ve kantitatif olarak hızlı ve basit bir şekilde tespitine olanak sağlayan kullanışlı ve ekonomik yöntemlerdir. IFA sistemlerinin başlıca dezavantajları, floresans mikroskop ve slaytları incelemek için bir karanlık odaya ihtiyaç duyulması ve test sonuçlarını okuma ve yorumlamada kapsamlı eğitim gerektirmesidir (13).

c. Anti CMV IgM antikor ölçümleri: Yenidoğanda CMV enfeksiyonlarının tanısında en yararlı test olan CMV IgM tayini için çeşitli ELISA ve IFA kitleri mevcuttur. Yalancı negatif ve yalancı pozitif reaksiyonlar oluşması testin dezavantajlarından biridir. CMV enfeksiyonu dahil bazı viral hastalıklar, romatolojik hastalıklar, vaskülit varlığında üretilen IgM sınıfından bir immünglobulin olan romatoid faktör ve spesifik anti-CMV IgG'nin birlikte bulunması durumunda yanlış pozitif sonuçlar meydana gelebilmektedir. Yanlış negatif reaksiyonlar, yüksek düzeyde olan spesifik IgG antikorlarının, IgM'nin CMV antijenine bağlanmasını rekabetçi bir şekilde engellemesi durumunda ortaya çıkar. Bu nedenle, yanlış pozitif ve yanlış negatif IgM test sonuçlarının insidansını azaltmak için test yapmadan önce IgM ve IgG fraksiyonlarının ayrılması önerilir. Bunun için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar, IgM'nin bir katı faz üzerine seçici olarak absorbe edilmesi ve IgG'nin antihuman IgG'ye karşı hiperimmün antikor, stafilokok protein A veya grup G streptokoklardan elde edilen rekombinant protein G'nin kullanılarak uzaklaştırılması şeklinde çalışır. Serum ön işleme yöntemleri artık kolayca bulunabilir durumdadır ve ticari olarak mevcut IFA ve EIA kitlerinin prosedürlerine dahil edilmiştir, bu da IgM testlerini daha güvenli hale getirmiştir. Yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçları önlemenin alternatif bir yaklaşımı olarak ters yakalama katı faz IgM testleri kullanılmıştır. Bu yöntem, bir serum örneğinden IgM'yi yakalamak için insan IgM antikoru ile kaplanmış bir katı faz kullanır, ardından rekabetçi IgG antikoru ve immün kompleksler yıkama ile uzaklaştırılır. Bağlanmış IgM antikoru daha sonra spesifik CMV antijenine maruz

bırakılır ve bir enzime bağılı ikinci antikor ve substrat eklenir. Antijenik substrat kaynağı olarak rekombinant olarak elde edilen CMV proteinlerinin kullanılması IgM testlerinin performansını büyük ölçüde artırmıştır. CMV özgül IgM tespitinin, yakın veya aktif enfeksiyonun belirlenmesinde faydalı olabileceği; ancak sonuçların dikkatli bir şekilde yorumlanması gerektiği unutulmamalıdır. IgM plasentayı geçmediği için, enfekte bir bebekten alınan tek bir serum örneğinden elde edilen pozitif sonuç tanısallı niteliktedir. Bununla birlikte, bebekte IgM üretiminin olmaması veya gecikmesi söz konusu olabilir. Yenidoğan döneminden sonra CMV özgül IgM antikorunun varlığını test etmek genellikle önerilmez, çünkü IgM antikoru hem primer hem de reaktif CMV enfeksiyonlarında görülebilir ve primer enfeksiyondan sonra uzun süre saptanabilir. Bu durum, özellikle gebeler veya immün yetmezliği olan hastalarda test sonuçlarının yorumunu zorlaştırabilir ve aktif enfeksiyonun tanısına katkı sağlamayabilir. Yenidoğanlar gibi immün sistemi henüz gelişmemiş bireylerde de IgM üretiminde gecikme olabilir veya anlamlı bir IgM antikor yanıtı oluşmayabilir. EBV'ye bağılı enfeksiyöz mononükleoz hastalarında gelişen heterotipik IgM yanıtları da yanlış pozitif CMV IgM test sonuçlarına neden olabilmektedir (13).

d. CMV IgG avidite testi: CMV spesifik IgG avidite ölçümü, gebelik sırasında CMV şüphesi olan kadınlarda ve SOT alıcılarında gelişen primer enfeksiyonları diğer enfeksiyonlardan ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. CMV spesifik düşük aviditeye sahip IgG, primer enfeksiyonu takip eden ilk haftalarda üretilirken, geçirilmiş veya primer olmayan enfeksiyonlarda, giderek daha yüksek aviditeye sahip IgG antikorları üretilir. CMV IgM pozitif olan gebelerin sadece %10'undan azı konjenital CMV enfeksiyonu olan bebek doğurur. Anne serumunda CMV spesifik IgM tespiti fetüse virüsün geçişini öngörmez. CMV IgM pozitif gebelerde düşük aviditeye sahip CMV spesifik IgG antikorlarının saptanmasının, fetal enfeksiyon açısından prognostik değer taşıyabileceği öne sürülmüştür. SOT alıcılarında ise yüksek aviditeye sahip CMV spesifik IgG antikorlarının gelişimindeki gecikmenin, uzamış antijenemi ve kötü prognozla korele olduğu gösterilmiştir. Ticari ve ticari olmayan CMV spesifik IgG avidite testleri mevcuttur (13).

**2.1.7.6. CMV hücre aracılı immünite testleri:** CMV hücre aracılı immünite testleri, CMV spesifik T hücrelerinin değerlendirilmesine, CMV enfeksiyon riskinin

önceden tespitine ve antiviral tedavi stratejilerinin belirlenmesine yardımcı olabilir. Bu testler çoğunlukla, sitokinlerin (tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin (IL)-2, interferon gama (IFN- $\gamma$ ) vb.) dolaylı olarak ölçülmesi veya CMV spesifik T hücrelerinin sayısının doğrudan ölçülmesi prensibine dayanır (31). Henüz FDA onayları olmasa da bu amaçlarla kullanılan çeşitli ticari testler mevcuttur.

a. CMV IFN- $\gamma$  salınım testleri (IGRA): IFN- $\gamma$  salınım testleri CMV antijenlerine karşı hücrel immün yanıtı ölçen in vitro testlerdir. Bu testlerde; daha önceden CMV antijenleriyle uyarılmış bellek T hücreleri bu antijenlere tekrar maruz kaldığında, antijeni tanıyan hücrelerden salınan IFN- $\gamma$  yanıtı ölçülür. Günümüzde ELISA temelli ve ELISPOT temelli kullanılan ticari testler mevcuttur. ELISA temelli test (QuantiFERON-CMV (CMV-QF) vb.) geniş bir CMV alt tip grubu hedefler; çeşitli CMV proteinlerinden elde edilmiş 23 peptit içerir (31). Bu peptit epitopları pp65, pp50, IE-1, IE-2 ve glikoprotein B antijenlerini içerir. Tam kan, CMV peptitleri ile 18-24 saat boyunca inkübe edilir ve ardından süpernatant toplanır ve IFN- $\gamma$  düzeyi ELISA temelli test ile ölçülür. IFN- $\gamma$  salınım testlerinin esas kısıtlayıcılığı, HLA sınıf I CMV epitoplarının bazı bireylerin epitopu tanıma ve yanıtlama yeteneğini yansıtmayabileceğidir. Test yalnızca CMV spesifik CD8<sup>+</sup> T hücresi yanıtını ölçer; ancak CMV spesifik CD4<sup>+</sup> T hücreleri, CMV enfeksiyonunu kontrol edebilen hafıza CD8<sup>+</sup> T hücreleri havuzunun oluşturulmasında önem taşır (26).

Çok sayıda çalışmada, transplantasyon sonrası CMV hastalığı riskini belirlemek için bağışıklık fonksiyon testleri değerlendirilmiştir. Bir çalışmada, CMV spesifik hücrel bağışıklık, Quantiferon-CMV testi ile değerlendirildiğinde, CD8<sup>+</sup> T hücreleri tarafından IFN- $\gamma$  salgılayan transplant hastaları arasında CMV hastalığının insidansının daha düşük olduğu bulunmuştur. Bazı vakalarda, bağışıklık yanıtının başlangıçta ve zaman içinde değerlendirilmesi, profilaksi sonrası CMV hastalığı geliştirme riskini tahmin etmek için de kullanışlı olabilir. Benzer gözlemler KİT alıcılarında da rapor edilmiştir (2).

ELISpot temelli testte, CMV antijen uyarısına yanıt olarak hem CD4<sup>+</sup> hem de CD8<sup>+</sup> T hücreleri tarafından üretilen IFN- $\gamma$  üretimi ölçülür. Periferik kan mononükleer hücreleri gibi hedef hücre sayısına göre spot oluşturan birimlerin sayımı ile değerlendirilir. IE-1 ve pp65 antijenleri kullanılır. ELISpot testleri ELISA tabanlı testlere göre daha duyarlıdır ve nicel spot sonuçlar üretir. ELISpot testinin bir

sınırlaması CD4 ve CD8 T hücreleri arasındaki farkı ayırt edememesidir. Ayrıca, birçok laboratuvar kendi yöntemlerini kullandığı için standardizasyon eksikliği bulunmaktadır (26).

b. İntraselüler sitokin boyama (ICS) ve flow sitometri: Aynı anda birden fazla hücre yüzey molekülünü ve sitokinleri gerçek zamanlı olarak ölçmesi ve CMV spesifik CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin nicel olarak belirlenmesi ile üstünlük taşıyan bir yöntem olabilir. Tam kan veya PMNL'ler CMV peptitleri ile uyarılır, ardından hücreler IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve IL-2 gibi sitokinler üretirler. İntraselüler sitokinler floresan kaplı antikolar ile boyanır ve tespit edilir. ICS, CD4 ve CD8 T hücre yanıtlarını ayrı ayrı analiz edebilen tek testtir. Testler arasında standardizasyon eksikliği, kaynak yoğunluğu, maliyet fazlalığı ve uzman yorumu gerekliliği testin dezavantajlarından. Ayrıca, ICS testini destekleyen yalnızca birkaç çalışma mevcuttur ve klinik laboratuvarlarda geniş ölçüde kullanılmamaktadır (26).

**2.1.7.7.Moleküler yöntemler:** Nükleik asit testleri (NAT), CMV hastalığı gelişme riski olan hastaların takibinde, aktif CMV hastalığının tanısında ve tedaviye yanıtın izlenmesinde kullanılmaktadır. En sık kullanılan moleküler yöntem polimeraz zincir reaksiyonudur (21). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), CMV DNA'yı veya mRNA'yı tespit etmek için tercih edilen ve yaygın olarak kullanılan bir moleküler yöntemdir. Amplifikasyon için sıklıkla glikoprotein B (UL55), çok erken antijen (UL122-UL123), major çok erken antijen (UL122-UL123) ve US17, pp65 (UL83) ve DNA polimeraz (UL54) hedef bölgelerinden kullanılan primer çiftleri kullanılmakla beraber, glikoprotein H (UL75), pp67 (UL65), HXFL4, EcoRI D fragmanı, HindIII X fragmanı, pp150 tuzak protein (UL32), glikoprotein B ile majör en erken antijen arasındaki bağlantı ve büyük kapsid proteini (UL86) bölgeleri de kullanılabilir. Tüm primerlerin amplifikasyon verimliliği aynı değildir. Birkaç çalışmada, tek bir gen bölgesinden tasarlanmış primerler kullanılarak veya hem en erken hem de geç gen genomik bölgeleri çoğaltılarak testin duyarlılığının artırıldığı gösterilmiştir (13). Amplifikasyon testleri transplant alıcıları, AIDS'li hastalar ve konjenital enfeksiyonlu bebekler de dahil olmak üzere, klinik örneklerden CMV DNA'yı tespit etmede kullanılmaktadır. Ayrıca immünsuprese hastaların izlenmesi ve antiviral ilaçların tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi için de kullanılmaktadır (2, 13).

CMV DNA ölçümü için kalitatif ve kantitatif testler mevcuttur (29). Kalitatif CMV DNA testleri, CMV enfeksiyonunun teşhisi için son derece duyarlıdır, ancak özgüllüğü ve pozitif prediktif değeri kantitatif testlere göre düşüktür. Kalitatif CMV DNA testleri, latent DNA'yı aktif viral replikasyondan güvenilir bir şekilde ayırt edemez, aktif enfeksiyonun şiddetini sınıflandıramaz ve antiviral tedavinin başarısını izlemede sınırlı etkinliğe sahiptir. CMV DNA testlerinin klinik faydasını ve özgüllüğünü artırmak için kantitatif nükleik asit testleri (QNAT) geliştirilmiştir. QNAT'ın duyarlılığı yüksektir, hızlı sonuç verir, otomatize edilebilir ve antijenemi testine tercih edilebilir. Hastalık ve enfeksiyonun şiddetini (viral yük) viral replikasyon derecesi ile ilişkilendirmeye olanak sağlar. Yüksek düzeyde viral yük değerleri veya viral yükte yükselen bir eğilim aktif CMV enfeksiyonunu gösterirken; düşük düzeydeki viral yük latent viral DNA veya subklinik enfeksiyonu gösterebilir (2, 21, 26).

CMV'nin birçok çekirdekli hücrede latent kalması nedeniyle, aktif hastalık ile asemptomatik enfeksiyon veya latentliği ayırt edip edemeyeceği PCR ile ilgili temel endişe olmuştur (2, 13). Latent CMV DNA'yı tespit edememe endişesi, viral RNA hedeflerini saptayan testlerin geliştirilmesine yol açmıştır. RNA ara ürünleri genellikle CMV replikasyonu sırasında üretilir ve CMV genomu ile gen ekspresyonu arasındaki biyolojik bağlantıyı sağlar, bu nedenle tespitleri daha spesifik ve aktif CMV enfeksiyonunun bir göstergesi olarak kabul edilir. Ters-transkriptaz PCR (RT-PCR), kanda ve diğer klinik örneklerde viral mRNA transkriptlerini seçici olarak tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir; ancak RNA molekülleri kolayca parçalanır ve yanlış negatif sonuçlara yol açabilir. Bu nedenle, CMV RNA testinin duyarlılığı, CMV DNA nükleik asit testlerine göre daha düşüktür. Ayrıca henüz ticari olarak kullanılabilir CMV RNA testi bulunmamaktadır (2, 3).

PCR tam kan, lökosit, plazma, doku biyopsi örnekleri veya vücut sıvılarından [(idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS), bronkoalveolar lavaj (BAL)] çalışılabilir. KİT ve SOT alıcılarında CMV pnömonisi tanısını koymak zordur. CMV QNAT, CMV pnömonisini teşhis etmede özellikle transbronşiyal biyopsi yapmak riskli olacaksa daha az invazif bir araç olarak tercih edilebilir (26, 29).

CMV QNAT'ın en büyük sınırlaması, çeşitli klinik uygulamalara rehberlik edecek iyi belirlenmiş viral yük eşiklerinin bulunmamasıdır. Bu durum, laboratuvarında geliştirilen ve ticari olarak temin edilebilen çeşitli CMV QNAT'ları arasındaki standardizasyon

eksikliğinden kaynaklanmaktadır (32). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Ekim 2010'da CMV nükleik asit testleri için uluslararası bir standart geliştirmiştir. Ticari testlerin kalibrasyonu bu standarda göre yapılmaktadır. Kalibrasyon için DSÖ uluslararası standardının uygulanması, farklı testler arasındaki viral yük değerlerinin uyum derecesini önemli ölçüde artırmış ve sonuçların IU/mL birimi olarak raporlanmasına olanak sağlamış olsa da henüz beklenen standardizasyon sağlanamamıştır. Bu yüzden aynı örnekten farklı QNAT kitleri ile saptanan CMV DNA miktarı farklı olabilmektedir (21, 26).

Yeni geliştirilen dijital polimeraz zincir reaksiyonu, CMV DNA ölçümlerinin değişkenliğini azaltma potansiyeline sahiptir; ancak henüz geniş ölçüde kullanılmamaktadır. Hastaların hastane ziyaretine veya standart venöz kan alma işlemine gerek kalmayacak yeni stratejiler denenmektedir. Kurutulmuş kanda [dried blood spot (DBS)] PCR ile CMV araştırılması, daha önce konjenital CMV teşhisi için incelenmiş bir yöntem olup parmaktan alınan kan örneği kullanılarak CMV viral yükünü değerlendirmektedir. DBS testi, şu anda geç CMV hastalığı riski taşıyan KİT alıcılarında mobil cihaz destekli CMV izlemi için çok merkezli randomize kontrollü bir çalışmada değerlendirilmektedir (26).

### **2.1.8.Tedavi**

Nakil hastalarında CMV enfeksiyonu gelişimini önlemek için profilaksi, preemtif tedavi ve hibrid yaklaşım seçenekleri ile tedavi mevcuttur. Profilakside nakil sonrası tüm hastalara 3-6 ay süreyle antiviral ilaç verilmekte, böylece CMV'nin her türlü replikasyonu önlenmektedir. Preemtif tedavide ise, CMV hastalığı gelişecek hastalar önceden belirlenerek bu hastalara viral yük negatifleşinceye kadar antiviral tedavi uygulanmaktadır. Bu amaçla kullanılan temel ilaçlar; gansiklovir (GCV), valgansiklovir (VGCV) ve valasiklovir (VASV) profilakside; GCV, VGCV, foskarnet (FOS) ve sidofovir (CDV) gelişen CMV hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (21). Letermovir'in (LTV) CMV seropozitif AKİT alıcıları için profilaktik amaçlı kullanımı onaylanmıştır. (33, 34)

**2.1.8.1.Gansiklovir:** CMV enfeksiyonunun ve hastalığının birinci basamak antiviral tedavisi olan gansiklovir, 1989'da intravenöz (IV) kullanım için FDA

tarafından onaylanmıştır. Gansiklovir 2'deoksiguanozin nükleozid analogudur. Hem viral hem de hücrel enzimlere bağlı çok basamaklı bir süreçle CMV sentezini inhibe eder. CMV'nin UL97 geni, GCV'yi GCV-monofosfat'a fosforile eden bir viral fosfotransferaz (pUL97) kodlar, ardından konak hücrel kinazları iki ardışık fosforilasyon gerçekleştirir ve GCV trifosfat oluşur. Bu bileşik UL54 tarafından kodlanan viral DNA polimerazın deoksiguanozin trifosfat için rekabetçi bir inhibitörüdür. GCV'nin SOT, KİT ve AIDS hastalarında CMV retinitisi, gastrointestinal hastalık ve daha az derecede pnömoniye azalttığı gösterilmiştir. Terapötik etkinliğine rağmen, GCV kullanımı hematolojik yan etkileri (nötropeni ve trombositopeni) ve intravenöz tedavi gerekliliği nedeniyle sınırlı olabilir. Gansiklovirin (GCV) düşük oral biyoyararlanımı (%10'dan az) valgansiklovir (VGCV) adı verilen ve oral uygulama sonrası karaciğerden ve bağırsak duvarından hızla metabolize olan bir L-valil ester ön ilacının geliştirilmesini sağlamıştır. VGCV'nin olumsuz etkileri GCV ile benzerdir, ancak VGCV'nin biyoyararlanımı daha yüksektir (%60). Bu nedenle, VGCV nakil alıcıları arasında profilaksi ve preemptif tedavide yaygın olarak kullanılır (16, 35). CMV tedavisinde kullanılan diğer antiviral ilaçlar Tablo 2'de gösterilmektedir.

**Tablo 2.** CMV enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antiviral ajanlar (33, 34, 36-39)

İlaç	Mekanizma	Uygulama yolu	Terapötik endikasyon	Yan etki
Gansiklovir/ Valgansiklovir (GCV/VGCV)	Sentetik 2'deoksiguanozin nükleozid analogu, CMV (UL97) ve konak kinazları tarafından üç fosforilasyon adımından geçer, CMV DNA polimeraz (UL54) inhibisyonu ile viral genoma dGTP katılımını yarışmalı olarak inhibe eder.	GCV- intravenöz VGCV-oral	HSV, VZV, CMV tedavisi	Sitopeni (lökopeni ve nötropeni), diyare, nefrotoksisite
Foskarnet (FOS)	Pirofosfat analogu, CMV DNA polimerazın yarışmalı olmayan inhibisyonu (UL54) CMV DNA zincir uzamasını durdurur.	İntravenöz	CMV, HSV, VZV tedavisi	Nefrotoksisite, elektrolit bozukluğu, gastrointestinal semptomlar, santral sinir sistemi etkileri

(Tablo 2 devamı)

İlaç	Mekanizma	Uygulama yolu	Terapötik endikasyon	Yan etki
Sidofovir (CDV)	CMV DNA polimerazında viral genoma dCTP'nin dahil edilmesini yarışmalı olarak inhibe eder	İntravenöz	CMV, HSV, VZV tedavisi	Nefrotoksisite, nütropeni, oküler toksisite
Brinsidofovir	Sidofovirin lipid konjugatı, viral DNA polimeraz inhibisyonu-geliştirme aşamasında	Oral	CMV, HSV, VZV tedavisi	Gastrointestinal yan etkiler
Maribavir (MBV)	Benzimidazol ribozid, CMV (UL97) protein kinazın inhibisyonu, protein fosforilasyonunun önlenmesi, viral kapsidasyon ve viral partiküllerin konakçı hücreden nükleer çıkışının bozulması	Oral	CMV tedavisi	Disguzi, gastrointestinal yan etkiler
Letermovir (LTV)	Viral terminaz kompleks inhibisyonu (UL 56, UL 89 ve UL51), CMV replikasyonunun DNA'nın olgunlaşma ve bir kapside paketlenme aşamasında inhibisyonu	İntravenöz ve oral	CMV profilaksisi-AKİT alıcıları için	Gastrointestinal yan etkiler, periferik ödem
Valasiklovir (VASV)	Asiklovirin L-valin esteri olan ön ilaç	Oral	CMV profilaksisi HSV, VZV tedavisi	Nöropsikiyatrik sorunlar
Filosiklovir	Asiklik nükleozid analogu- CMV UL54 DNA polimerazını ve CMV UL97 kinazını inhibe eden çift etkili bir mekanizma-geliştirme aşamasında	Oral	HHV6, Adenovirüs CMV tedavisi	Lökopeni, nütropeni
Fomiversen	Antisens oligonükleotit, CMV'nin erken proteinlerini kodlayan mRNA dizilerine komplementer olacak şekilde tasarlanmış	İntravitreal	CMV retiniti tedavisi	Oküler inflamasyon, göz içi basıncında artma

**2.1.8.2.Adaptif T hücre terapisi:** Hücresel bağışıklık, CMV enfeksiyonunun kontrolü için esastır. Bu nedenle CMV spesifik CTL'lerin kullanımı yeni tedavi yöntemi olarak geliştirilmektedir. CMV spesifik T hücreleri oluşturmanın çeşitli yolları vardır. Örneğin; CMV spesifik hücrelerin, viral peptitler, protein, lizat veya antijen sunan hücrelerce uyarılması ile oluşturulabilir. Daha sonra CMV spesifik T hücreleri in vitro veya doğrudan alıcıya enjekte edilerek çoğaltılabilir, böylece vücut

içinde fizyolojik bir ortamda çoğalması sağlanır. Adaptif CMV spesifik T hücre terapisinin, dirençli ve refrakter CMV enfeksiyonunun kontrolünde faydalı olabileceği öne sürülmektedir (31).

### **2.1.9.CMV'de Antiviral İlaç Direnci**

Tam doz standart antiviral tedavi sonrası CMV viral yükünde sürekli artış veya hastalıkta ilerleme gözlenen durumlarda CMV antiviral ilaç direncinden şüphelenilmelidir. Refrakter CMV enfeksiyonu, uygun dozla tedaviye rağmen iki hafta boyunca yükselen CMV viral yükü; dirençli CMV enfeksiyonu ise genotipik ilaç direnci mutasyonlarının tanımlandığı refrakter viremi olarak tanımlanır. Transplant alıcılarında CMV ilaç direnci için en önemli risk grubu, CMV seronegatif alıcılara CMV seropozitif donörlerden nakil durumlarıdır. Yüksek immünsupresyon yapılan hastalarda (özellikle akciğer nakillerinde), profilaksi dozunun düşük olması (doz veya kötü absorpsiyonla) ve çok yüksek viral yüklerin tedavisi sırasında direnç gelişebilir. Ayrıca hem donörlerde hem de alıcılarda çeşitli genetik ve immün faktörlerin CMV'yi kontrol edemediği ve direnç oranlarının daha yüksek olmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Direnç gelişme riski taşıyan diğer gruplar arasında AKİT alıcıları ve konjenital CMV enfeksiyonu bulunmaktadır. CMV antiviral ilaç direnci, özellikle transplant alıcılarında, %5 ila %12 insidansa sahip, göz ardı edilen bir sorundur (40-43).

Antiviral ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlar UL97, UL54 ve UL56 genlerinin bazı bölgelerinde bulunur ve genellikle UL97 440-670, UL54 300-1000 ve UL56 229-369 kodon aralıklarında meydana gelen aminoasit değişimlerini kapsar (7). Aminoasit sembolleri ve nükleotid kodonları Tablo 2'de gösterilmiştir. Tedavide ilk sırada kullanılan ilaçlar olan VGCV/GCV'ye direnç, GCV'nin başlangıç fosforilasyonunda rol alan UL97'deki mutasyonlardan kaynaklanır. Maribavir direnç mutasyonları öncelikle UL 97'de bulunur. UL27'de bazı kompensatuvar mutasyonlar görülebilirken, az sayıda UL97 mutasyonu MBV-GCV çapraz direnci oluşturmaktadır. UL54'teki mutasyonlar FOS ve CDV'ye dirence neden olur ve uzun süreli GCV tedavisinden sonra da ortaya çıkabilir, bu da GCV'ye yüksek düzeyde direnç ve FOS veya CDV'ye çapraz dirence neden olabilir. LTV direnç mutasyonları çoğunlukla UL56 terminaz alt biriminde ve nadiren UL89 ve UL51 bölgelerinde tanımlanmıştır (43). UL97 kinaz,

viral ve hücrel proteinlerin serin ve treonin kalıntılarını fosforile eder, replikasyon için gereklidir ve olgun virionun bir bileşenidir. UL97 aynı zamanda GCV'nin antiviral aktivitesi için gerekli olan üç fosforilasyon aşamasından ilkinin gerçekleştirir. Bu gendeki mutasyonlar GCV direnci ile ilişkilidir (44). Genotipik olarak teşhis edilen GCV dirençli vakaların %80'den fazlasını UL97 genindeki mutasyonlar oluşturmaktadır. Gansiklovir'e direnç oluşturan en yaygın UL97 mutasyonları kodon 460, 520 ve 590-607'de yoğunlaşmıştır. Sık görülen mutasyonlardan bazıları M460V/I, H520Q, C592G, A594V, L595S ve C603W'dur. Bu mutasyonlar, genellikle GCV'nin potensinde (EC50) 5-15 kat artış sağlayarak orta dereceli GCV direncine neden olur. C592G mutasyonunun dirençte üç kat artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada 591-603. pozisyonlardaki üç veya daha fazla kodonun delesyonunun en az sekiz kat GCV direnci artışına neden olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyonlar, GCV'nin antiviral etkinliği için gereken fosforilasyonu azaltırken, biyolojik olarak önemli olan UL97 kinaz işlevini korur (6, 7, 45).

Erken klinik denemelerden geçen alternatif bir guanozin nükleozit analogu olan filsiklovire, GCV'ye maruziyetten sonra bazı UL97 mutantlarının (özellikle M460I ve H520Q), in vitro çalışmalarda çapraz direnç oluşturduğu gösterilmiştir. L595S mutasyonunda filsiklovire duyarlılık devam ederken, A594V'de düşük dereceli çapraz direnç gözlenmiştir (7).

Maribavir, GCV'ye dirençli CMV enfeksiyonlarını tedavi etmede faydalı olabilir. Ancak farklı etki mekanizmaları olsa da nadiren iki ilaç arasında çapraz direnç gelişebilir. UL27 genindeki mutasyonlar, maribavir'e etkinliğin azalması ile ilişkilendirilmiştir; ancak bu durum maribavir direncine neden olmak yerine viral protein kinazın kaybına karşı bir tepki sonucu olabilir (46).

GCV, CDV veya FOS, UL54 DNA polimerazı hedef alır. Son iki ilacın antiviral aktivitesi UL97 kinaza bağlı değildir. Viral DNA polimeraz (UL54) üzerindeki mutasyonlar, klinik uygulamada çok daha nadir görülür ve bu ilaçların herhangi birine veya tümüne direnç kazandırabilir, ancak en yaygın çapraz direnç GCV-CDV, ardından GCV-FOS ve GCV-CDV-FOS ilaç direncidir. GCV-CDV'ye direnç oluşturan mutasyonlar ekzonükleaz bölgelerinde (301, 408-413,501-545) ve bölge V'de (978-988) bulunurken, FOS direnci ile ilişkili olanlar geniş bir yelpazede yer alır; ancak genellikle bölge II (700 ve 715 kodonlar) ve III (802 ve 809 kodonlar) arasında

yoğunlaşır. Foskarnet direnç mutasyonlarının çoğu EC50'yi üç beş kat artırır. Bölge III içinde veya yakınındaki bazı mutasyonlar düşük derecede GCV çapraz direnci ile FOS'a direnç geliştirirken, A834P ve 981-982 del gibi bazı mutasyonlar GCV, FOS ve CDV'ye orta derecede direnç oluşumundan sorumludur. UL97 mutasyonlarının aksine, dirençli izolatların büyük çoğunluğunu kapsayan kısa bir mutasyon listesi yoktur. Bu nedenle polimeraz bölgesindeki genotipik direnç testleri, genellikle 300-1000 kodon aralığını kapsayan daha geniş bir bölge dizilemesi gerektirir. Bu gen içinde türler arası dizi polimorfizmleri göreceli olarak yaygındır, bu da onları gerçek direnç mutasyonlarından ayırmayı daha karmaşık hale getirir (7, 44-46).

Klinik olarak gözlemlenen çoğu UL54 mutasyonu UL97 mutasyonu ile bir arada bulunur. Genellikle uzun süreli tedavinin ardından mevcut UL97 mutasyonlarına eklenir ve ilaç direncini birkaç kat artırır. UL97 mutasyonu olmayan nakil alıcısında GCV'ye direnç oluşturduğu bildirilen 524. kodonda delesyon (del524) rapor edilmiştir (6, 7). UL97 ve UL54 bölgesinde görülen ilaç direncine neden olduğu bilinen mutasyonlar ve tek nükleotid polimorfizmleri Tablo 4'te gösterilmiştir.

Letermovir direnci genellikle LTV bağlanması için kritik olan terminaz kompleksinin bir bileşeni olan pUL56'yi kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanır. PUL56 mutasyonları genellikle 229-369'u kodlayan belirli bir ORF içinde görülür ve değişken düzeylerde LTV direnci geliştirir. UL56 kodon 325'te yapılan değişiklikler mutlak LTV direncine neden olur. İn vitro verilerde, UL89 ve UL51'deki izole mutasyonların düşük düzeyde direnç sağladığı, ancak bir arada bulunduğu genel LTV direnci üzerinde artan bir etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir. İn vitro çalışmalarda, LTV'nin FOS ve GCV gibi diğer CMV ajanları ile karşılaştırıldığında düşük genetik direnç bariyerine sahip olduğu gösterilmiştir. İn vitro LTV'ye dirençle ilişkilendirilen mutasyonlar nispeten kolay ve hızlı bir şekilde ortaya çıkar. LTV'ye direnç geliştirme özelliği, ilacın uzun süreli kullanımının önemli bir kısıtlaması olabilir, ancak GCV ile sinerjizm ilacın olumlu bir özelliğidir (33, 36).

**Tablo 3.** Aminoasit sembolleri ve nükleotid kodonları

Aminoasit	Üç Harfli Sembol	Tek Harfli Sembol	Kodon
Alanin	Ala	A	GCT, GCC, GCA, GCG
Arjinin	Arg	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Asparajin	Asn	N	AAT, AAC
Aspartik asit	Asp	D	GAT, GAC
Sistein	Cys	C	TGT, TGC
Glutamin	Gln	Q	CAA, CAG
Glutamik asit	Glu	E	GAA, GAG
Glisin	Gly	G	GGT, GGC, GGA, GGG
Histidin	His	H	CAT, CAC
İzolösin	Ile	I	ATT, ATC, ATA
Lösin	Leu	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Lizin	Lys	K	AAA, AAG
Metiyonin	Met	M	ATG
Fenilalanin	Phe	F	TTT, TTC
Prolin	Pro	P	CCT, CCC, CCA, CCG
Serin	Ser	S	AGT, AGC, TCT, TCC, TCA, TCG
Treonin	Thr	T	ACT, ACC, ACA, ACG
Triptofan	Trp	W	TGG
Tirozin	Tyr	Y	TAT, TAC
Valin	Val	V	GTT, GTC, GTA, GTG
Stop			TAA, TAG, TGA

**Tablo 4.** UL97 ve UL54 bölgesinde görülen ilaç direncine neden olduğu bilinen mutasyonlar ve tek nükleotid polimorfizmleri (7, 44, 45, 47-60)

UL97				UL54					
Mutasyon	İlaç	Mutasyon	İlaç	Mutasyon	İlaç	Mutasyon	İlaç	Mutasyon	İlaç
F342Y	G	595 del	G	524del	G	P488R	G, C	V781I	G, F
K359E/Q/N	G	591-607 del	G	P829S*	G	N408D/K/S	G, C	L802M	G, F
E362D	G	595-603 del	G	L957F	G	N410K	G, C	T821I	G, F
L405P	G	593 del	G	N495K	F	F412C/I/S/V*	G, C	E951D*	G, F
M460V/I/T/L	G	597 del	G	T552N*	F	D413E/A/N/	G, C	Q578L	G, F
V466G/M	G	600 del	G	L565V	F	Y*		L776M	G, F
A505T	G	601 del	G	S585A*	F	K488R*	G, C	V787A/L	G, F
C518Y	G	601-603 del	G	D588E	F	K500N	G, C	A809V	G, F
H520Q	G	L348V	M	F595I	F	L501I/F	G, C	M844V*	G, F
P521L	G	F342Y/S*	G, M	T700A	F	T503I	G, C	E989D	G, F
A591D/V	G	V356G*	G, M	V715A/M	F	A505V	G, C	K493N	G, F, C
C592G	G	D456N*	G, M	E756D/Q/G	F	K513E/N/R/T	G, C	D588N	G, F, C
A594V/T/E/G/P	G	V466G	G, M	Q783R*	F	D515Y	G, C	H600L	G, F, C
/S		C480F/R*	G, M	V798A*	F	L516P/W/R*	G, C	L773V	G, F, C
L595S/F/W/T	G	V466G*	G, M	T813S	F	I521T	G, C	V812I	G, F, C
E596G/Y	G	P521L	G, M	T838A	F	P522A/S	G, C	A834P	G, F, C
G598S/V	G	Y617del*	G, M	M844T*	F	C524del	G, C	A928T	G, F, C

(Tablo 4 devamı)

UL97				UL54					
Mutasyon	İlaç	Mutasyon	İlaç	Mutasyon	İlaç	Mutasyon	İlaç	Mutasyon	İlaç
K599E/M	G			V9461*	F	V526L	G, C	L862F*	G, F, C
C603W/R/S	G			A987V	F	C539G/R*	G, C	Q578H	G, F, C
C607Y/F/S	G			S695T	F	A543P*	G, C	Q589H	G, F, C
I610T	G			P497S	C	L545S/W	G, C	E756K	G, F, C
C518Y	G			A543V	C	I726T/V	G, C	V787E	G, F, C
A613V	G			D542E*	C	V823A	G, C	T813S	G, F, C
590 del	G			K805Q	C	V781L	G, C	G841A/S	G, F, C
591-594 del	G			D301N	G, C	A987G	G, C	981-982del	G, F, C
				E303D*/G*	G, C	S290R*	G, F		
						D588N	G, F		

\*Şüpheli mutasyon, G: Gansiklovir, F: Foskarnet, C: Sidefovir, M: Maribavir

### 2.1.10. Antiviral Duyarlılık Testleri

Antiviral ilaçlara duyarlılığın azalması olarak tanımlanan antiviral direnci, in vitro testlerle ölçülmesi mümkündür. Uzun süreli tedavi sırasında (ortalama 5 ay) viral yükün arttığı, yeniden yükseldiği veya sürekli yüksek olduğu durumlarda ilaç direncinin tespiti; antiviral direnç mekanizmalarının belirlenmesi, klinik uygulamada ilaç direnciyle ilişkilendirilen CMV mutantlarının sıklığının tespiti, tedavi başarısını öngörme, diğer antiviral ajanlara karşı çapraz direncin tanımlanması, en uygun alternatif tedavinin uygulanması ve yeni antiviral ajanların değerlendirilmesinde fayda sağlar. CMV'nin antiviral ajanlara duyarlılığını test etmek için çeşitli fenotipik ve genotipik testler tanımlanmıştır (13, 61).

**2.1.10.1. Fenotipik testler:** Antiviral ilaç direncinin tespiti için standart fenotipik yöntem, PRA'dır. Bu yöntem, yeterli enfektivite elde etmek için uzun bir virüs üretim sürecini gerektirir. Antiviral ilacın farklı konsantrasyonları ile hazırlanmış viral inokulum inkübe edilerek plak oluşumunu %50 azaltan ilaç konsantrasyonu, yani %50 inhibitör konsantrasyonu (IC50) belirlenir. Fenotipik testler CMV'nin herhangi bir antiviral ilaca karşı duyarlılığını doğrudan ölçme avantajı sağlar, viral replikasyonu inhibe etmek için gereken ilaç konsantrasyonu hakkında bilgi verir. Bu yöntem, klinik izolatların yavaş büyümesi ve değerlendirmenin nesnel olmaması gibi nedenlerle gerçek zamanlı tedavi kararları için sınırlı değere sahiptir. Diğer fenotipik testler arasında, flow sitometri, DNA hibridizasyonu, boya tutulum (DU) testi, "yield" redüksiyon testi bulunur. Bu testler için de başlangıçta CMV inokulumu üretmek için

haftalarca hücre kültürü gerekir. Bu nedenle, fenotipik testler genellikle hastaların klinik yönetimi için rehberlik sunabilecek kullanışlı testler değildir (2, 13, 61).

**2.1.10.2.Genotipik testler:** Viral nükleik asit testleri ile antiviral ilaç direncine neden olan spesifik mutasyonlar araştırılabilir. Fenotipik testlere göre daha ucuz, daha kısa sürede sonuç veren testlerdir; ancak genotipik analizlerin temel sorunu, direnç mutasyonlarının, fenotipik analizle doğrulama olmadan dizi polimorfizmlerinden ayırt edilememesidir (44, 61). Viral yükün 1000-2000 kopya veya IU/mL'nin üzerinde olduğu örneklerin çalışılması önerilir; çünkü mutant dizilerin tespit hassasiyeti viral yük bu seviyelerin altına düştükçe azalır. Genellikle plazma veya tam kan örneklerinden çalışılır. CMV'nin sistemik dolaşımın dışında lokal viral replikasyonu göz önüne alındığında, zaman zaman direnç mutasyonlarının evrimi bazı dokularda farklılık gösterebilir. Tedavi sırasında ilerleyen CMV hastalığı varsa ve plazma veya kan örneklerinde mutasyon tespit edilmezse, doku biyopsi örnekleri veya vücut sıvılarında (göz, beyin omurilik sıvısı vb.) test önerilmektedir (7).

Antiviral direncin genotipik yöntemlerle tespitinde DNA dizi analizi, real-time PCR ve restriksiyon endonükleaz analizi yöntemleri kullanılmaktadır (62).

a. Real-time PCR: Doğrulanmış ilaç direnci mutasyonlarını tanımlamak için erime eğrisi analizini içeren real-time PCR yöntemi kullanılabilir. Her mutasyona özgü hibridizasyon probu, farklı floresan boya ile etiketlenir. Mutasyonların erime eğrisinde yaptığı değişiklikler PCR amplifikasyonunu takiben analiz edilir. Hücre kültürü olmadan çok düşük sayıda DNA kopyalarının amplifiye edilebilmesi, karışık virüs popülasyonlarının yarı kantitatif olarak analiz edilebilmesi, farklı işaretli boya kullanılarak aynı anda çoklu mutasyonların tespit edilebilmesi testin önemli avantajlarından biridir. Bilinen mutasyonların yakınındaki polimorfizmlerin erime eğrisini etkileyebilmesi ve mutasyona özel problemlerin gerekliliği, ayrıca testin ATT/ATA gibi aynı kodonda meydana gelen farklı nokta mutasyonlarını ayırt edememesi ise dezavantajları olarak gösterilebilir (44).

b. DNA dizileme yöntemleri: DNA dizileme yöntemlerinden birinci nesil dizileme olarak da adlandırılan geleneksel dizileme yöntemleri, Maxam-Gilbert'in

kesme-yoluyla dizileme yöntemi ve Sanger sentez yoluyla dizileme yöntemidir (62). Dizileme yöntemleri ucuz, hızlı, hassas ve kolay uygulanabilir olmalıdır. Birinci nesil dizilemenin bu talepleri karşılayamaması, yeni testlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Sanger dizilemeden sonra, yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing: NGS) teknolojileri geliştirilmiştir. Bu sistemlerde DNA polimerizasyonu veya ligasyon yoluyla baz eklenmesinden sonra, eklenen bu yeni bazın tespiti kemilüminesans sinyal oluşturma, floresan sinyal oluşturma ya da pH değişiminin algılanması ile gerçekleştirilmektedir. Bu cihazlarda oluşturulan hedef nükleik asitten üretilen amplikonlardan, yeni bir havuz oluşturularak tek tek dizileme işlemi yapılmaktadır. Bu tespit milyonlarca veri üretimi ile aynı anda gerçekleştirildiğinden, bu sistemler 'masif paralel dizileme cihazları' olarak adlandırılmaktadır. Bu cihazlar daha sonra tek molekülü saptayabilen ve bu nedenle ön amplifikasyon veya kalıp hazırlama işleminin ardından ikinci klonal amplifikasyona ihtiyaç duymayan üçüncü kuşak cihazlara dönüşmüşlerdir. Hızlı dizileme ve basit örnek hazırlığı sayesinde sahada kullanımı mümkün hale gelmiştir (63, 64).

Maxam-Gilbert metodu: Maxam ve Gilbert tarafından bulunan kimyasal bozunmaya dayalı bir yöntemdir. Dimetil sülfat, hidrazin, sodyum klorür ve formik asit gibi kimyasallar kullanılarak DNA'daki bazların metilasyonu ve yapısının değişmesi sağlanır. Daha sonra ortama eklenen sıcak piperidin, metillenmiş DNA zincirini kırar. Elde edilen DNA parçaları jel elektroforezinde büyüklüklerine göre ayrılır, otoradyografi uygulanarak bantlar görülür. Maxam-Gilbert yöntemi, yüksek toksisiteye sahip fosfat izotopu ve kesme kimyasalının kullanılması, 500 baz çiftinden daha uzun dizilerin analizindeki zorluklar ve kesilme sırasındaki hatalar gibi çeşitli dezavantajlar nedeniyle laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmamaktadır (63).

Sanger-Coulson'un zincir sonlandırma yöntemi: Zincir sonlandırmaya dayalı Sanger yöntemi genom sekansının belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde bir ucu hep aynı noktadan başlamak üzere değişik boylarda DNA parçaları elde edilir. Yöntemin esası ayrı tüplerde A, T, G, C nükleotidlerinden sadece birisi ile sonlanan parçalar elde edilmesine dayanır. Bu amaçla hazırlanan her tüpe PCR için gerekli primer, Taq polimeraz enzimi, deoksiniükleotid trifosfatlar (dNTP), kalıp DNA ve dideoksiniükleotid trifosfatlar (ddNTP) konur. Sonlandırıcı özellikteki bazlar floresan boyalarla işaretlenir. Deoksiribozun 3' ucundan fosfodiester bağı yapacak olan

üçüncü karbondaki oksijenin çıkarılmasıyla elde edilen ddNTP'lerin kullanımı, sentezi farklı baz konumlarında durdurur ve floresan ışığa yapan farklı uzunluktaki DNA zincirlerinin oluşmasını sağlar. Elde edilen DNA dizilerine jel elektroforezi uygulanabilir ya da otomatik dizi analizi cihazlarında okuma yapılarak DNA dizisi saptanabilir (65-67).

**Shotgun yöntemi:** Uzun DNA parçalarını dizilemek için kullanılan bir yöntemdir. Tek seferde dizi analizi yapılamayacak uzunlukta olan DNA'lar önce küçük parçalara bölünür, sonra elde edilen her parça ayrı ayrı dizilenir. Bu diziler biyoinformatik analizlerle bir araya getirilerek uzun DNA parçasına ait dizi elde edilir (65).

**Pirodizileme metodu:** Pirodizileme, düşük maliyeti ve yüksek işlem hacmi nedeniyle geleneksel Sanger dizilemenin yerine geçmiştir. Sentez yoluyla dizileme prensibine dayalı bir yöntemdir. Pirodizilemenin temeli, DNA sentezi sırasında oluşan pirifosfatların kemulüminesan bir enzim aracılığıyla tespit edilmesine dayanmaktadır (65).

**Ligasyon yoluyla dizileme:** Floresan işaretli oligonükleotid problemleri kullanılan bu yöntemde; problemler kalıp DNA'ya hibridize olur, primerle ligasyona girer. Floresan tespitinden sonra oligonükleotid problemlerin işaretleri, 5'fosfat ucu kesilerek yeni bir ligasyon döngüsüne geçilir. Ligasyon, saptama ve ayrılma döngüleri tekrarlanarak DNA dizisi belirlenir. Bu yöntemin diğer yöntemlerden farkı DNA ligaz enziminin kullanılmasıdır (65).

### **2.1.11.Korunma**

Standart önlemler ve hijyen prosedürlerine uymak bulaşma olasılığını azaltabilir. Günümüzde CMV enfeksiyonlarını önlemek için geliştirilmiş lisanslı bir aşı bulunmamaktadır; ancak birçok aşı adayını için klinik denemeler yürütülmektedir (46).

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

#### 3.1.HASTALAR VE ÖRNEKLER

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi erişkin hematoloji ve kemik iliği transplantasyon (KİT) kliniklerinde 17.10.2022-15.11.2023 tarihleri arasında takip edilen, 18-80 yaş aralığında, cinsiyet fark etmeksizin, hasta grubu olarak CMV viral yükü 1000 IU/ml ve üzeri olan hastalardan daha önce CMV tedavisi almış olan 34 hasta ve kontrol grubu olarak daha önce CMV tedavisi almamış 10 hasta olacak şekilde, toplam 44 hasta çalışmaya dahil edildi. Laboratuvara gönderilen hasta örneklerinden öncelikle rutin tanı için kullanılan CMV DNA PCR testi çalışılarak CMV DNA tayini yapıldı. CMV DNA PCR çalışmasından kalan DNA izolatları ve kan örneklerinin santrifüj sonrası ayrılan plazma örnekleri mutasyon analizine kadar -80°C’de saklandı.

#### 3.1.1.Plazma Örneklerinde CMV DNA Tayini

**3.1.1.1.DNA izolasyonu:** Bütün örnekler QIASymphony SP otomatik nükleik asit ekstraksiyon cihazı (Qiagen-Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde QIASymphony® DSP Virus/Patojen Kiti (Qiagen-Almanya) prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Cihazın çalışma prensibi manyetik partikül teknolojisine dayanır ve bu şekilde biyolojik numunelerden nükleik asitlerin otomatik izolasyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilmiş olur. Numune lizis, bağlama, manyetik ayırma, yıkama, manyetik ayırma, elüsyon basamaklarından geçerek işlenir ve nükleik asit izolatu elde edilir.

Kit içeriği

- 1.Reaktif kartuşu
- 2.Enzim askısı
- 3.Delme kapağı
- 4.AVE tampon solüsyonu

5.Taşıyıcı RNA

6.Reuse Seal Set

Sarf malzemeler

1.Filtreli uç, 200 µl ve 1500 µl

2.8’li Rod Kılıfları

3.8 kuyulu örnek hazırlık kartuşu

DNA izolasyon prosedürü

1.Reaktif kartuşu reaktifler ve sarf malzemeleri çekmecesine yüklenmeden önce manyetik partikül teknesi tamamen tekrar süspansiyon haline getirilmek için 3 dk vorteks (Biosan, Letonya) cihazında karıştırıldı, daha sonra tekrar kartuş rafına oturtuldu.

2. Reaktif kartuşu ve enzim askısı reaktif kartuş tutucusuna yerleştirildi.

3.Delme kapağı reaktif kartuşuna yerleştirildi.

4.Enzim tüplerinin kapakları ve manyetik partikül kapağı açıldı, reaktif kartuş tutucusu, cihazdaki reaktifler ve sarf malzemeleri bölümünde ilgili bölüme yüklendi.

5. Örnek hazırlık kartuşları, 8’li rod kılıfları ve tek kullanımlık filtre uçları reaktifler ve sarf malzemeleri çekmecesinde ilgili bölümlere yüklendi.

6.Atık çekmecesine boş atık kutusu yerleştirildi.

7.Elüsyon askısı elüat çekmecesine yüklendi.

9.Envanter taraması yapıldı.

10.Örnek tüp barkotları okutuldu ve örnek çekmecesine yüklendi.

11.Her hasta için 132,5 µl buffer AVE ve 6,25 µl carrier RNA karışımı hazırlandı.

12.Karışıma her hasta için 11,25 µl internal kontrol eklendi.

13.Karışımları içeren tüpler bir tüp taşıyıcıya yerleştirildi. Tüp taşıyıcı örnek çekmecesinde yuva A içine yerleştirildi.

13.Cihaz çalıştırıldı ve izolasyon işlemi başlatıldı.

14.İzolasyon işlemi sonucunda her hasta için 200 µl EDTA’lı plazma örneğinden 60 µl elüsyon hacmi elde edildi.

**3.1.1.2.CMV DNA tayini:** QIASymphony SP/AS (Qiagen-Almanya) cihazında, Artus CMV RG PCR Kit (Qiagen-Almanya) prosedürleri uygulanarak otomatik test kurulumu gerçekleştirdi. DNA izolatı bir ısı döngü cihazına (Rotor-

Gene Q MDx, Qiagen, Almanya) yüklendi. Real-time PCR yöntemi ile CMV DNA tayini yapıldı.

Kit içeriği

- 1.CMV RG Master
- 2.CMV Mg-Sol
- 3.CMV QS 1 (1 x 10<sup>4</sup> kopya/μl)
- 4.CMV QS 2 (1 x 10<sup>3</sup> kopya/μl)
- 5.CMV QS 3 (1 x 10<sup>2</sup> kopya/μl)
- 6.CMV QS 4 (1 x 10 kopya/μl)
- 7.CMV RG IC (internal kontrol)
- 8.Su (PCR sınıfı)

Reaksiyon karışımı hazırlama aşaması: Çalışmaya başlamadan önce tüm test bileşenlerinin oda sıcaklığında (15–25°C) çözünmesi sağlandı, daha sonra vortekslenerek karıştırıldı ve en az üç saniye 6800 x g hızında santrifüjlendi. Test için şu adımlar izlendi:

- 1.Nükleik asit ekstraksiyon aşamasını takiben dörtlü şerit PCR tüpleri (0.1 ml) cihazdaki elüat çekmecesinde ilgili bölümüne yüklendi.
- 2.Tek kullanımlık filtreli pipet uçları cihazdaki ilgili bölüme yüklendi.
- 3.Hasta sayısına göre uygun hacimde master karışımı hazırlandı ve cihazdaki ilgili konumuna yüklendi.
- 4.Envanter taraması yapıldı ve çalışma başlatıldı.

İşlem sonunda her bir PCR tüpü, PCR miksinden 30 μl, elüsyon yapılmış örnek DNA'sından 20 μl içermektedir. Ayrıca 2 μl standart içeren dört ayrı standart tüpü elde edildi.

Termal döngü aşaması: Rotor-Gene Q MDx (Qiagen, Almanya) ısı döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Her PCR reaksiyonunda dört kantitasyon standardı ve en az bir negatif kontrol kullanıldı. Test için şu adımlar izlendi:

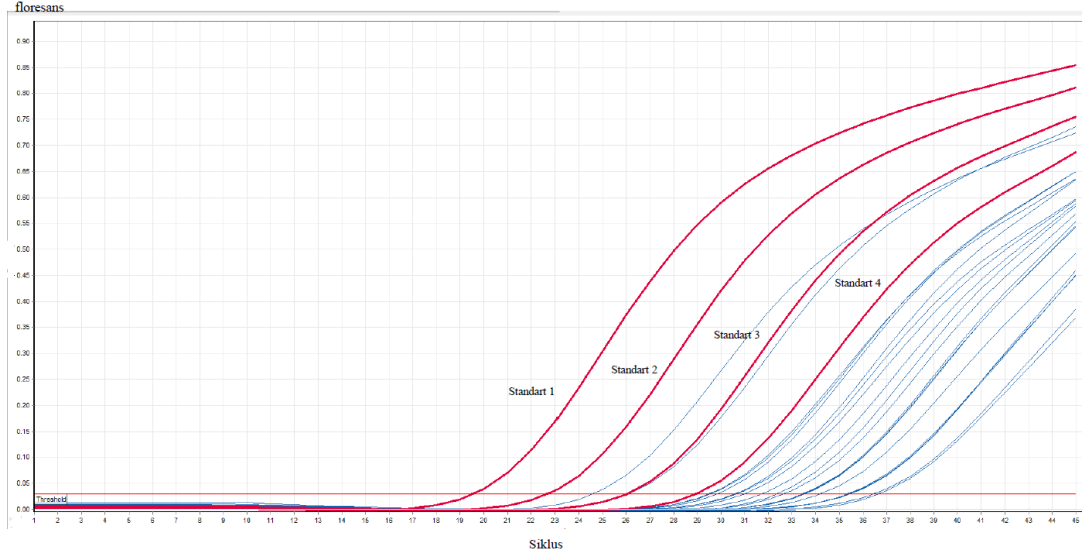
- 1.Reaksiyon tüpleri kapatıldı ve cihazdaki yükleme bloğuna yerleştirildi. Tüpler yerleştirilirken içerisinde presipitat oluşumu olmamasına dikkat edildi.
- 2.Rotorun üstüne kilitleme halkası yerleştirildi.

3. CMV DNA'sını saptamak için uygun ısı döngü profili oluşturuldu ve çalışma başlatıldı. CMV DNA saptamak için gerekli reaksiyon içeriği ve PCR protokolü Tablo 5'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.** CMV DNA saptamak için gerekli reaksiyon içeriği ve PCR protokolü

Reaksiyon Kurulumu		Rotor-Gene Q MDx RT-PCR Program			
Reaktif	Miktar	Basamak	Döngü No.	Sıcaklık	Süre
CMV RG Master Mix	25 µL	<b>Enzim aktivasyonu</b>	1 döngü	95 °C	10 dk.
		<b>Denatürasyon</b>	45 döngü	95 °C	15 sn.
MgCl <sub>2</sub>	5 µL	<b>Bağlanma ve Uzama</b>	(10 döngü 1 °C→touchdown)	65 °C	30 sn.
Nükleik Asit/NTC/PC	20 µL	<b>Saptama (Okuma)</b>		72 °C	20 sn.
Toplam Reaksiyon Hacmi	50 µL				

Sonuçların yorumlanması: Sonuçlar Rotor-Gene Q yazılım versiyon 2.3.4. yazılımı ile değerlendirildi. Floresan boyalar (FAM-cycling green, HEX-cycling yellow) amplikonların analizinde prob olarak kullanıldı. FAM kanalından CMV DNA için, HEX kanalından ise internal kontrol için spesifik sinyaller saptanmaktadır. Standart eğri, standartların içerdiği CMV DNA miktarına ve eşik döngüsüne göre oluşturulmakta ve örnek kantitasyonu bu şekilde sağlanmaktadır. Kullanılan kitte HEX kanalı eşik döngüsü <45, FAM kanalı eşik döngüsü <45 olarak belirtilmiştir. Kitin lineer saptama aralığı 79,4-1x100000000 kopya/ml baz alınarak DNA kopya sayıları IU/ml ölçü birimi olarak raporlandı (1 kopya/ml=1.64 IU/ml). İlaç direnci araştırılması için 1000 IU/ml ve üzeri olan örnekler tespit edilip ayrıldı. Kantitatif CMV-DNA sonuçlarının değerlendirilmesi Şekil 4'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.** Rotor-Gene cihazında kantitatif CMV-DNA (real-time PCR)

sonuçlarının değerlendirilmesi

### 3.1.2. CMV Suşlarında İlaç Direnci Araştırılması

CMV suşlarında mutasyon analizi yapılmadan önce, toplanan plazma örneklerinden Bio-Speedy Hızlı Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak Zymio EXM3000(Çin) cihazında DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Kit içeriği

1. Ekstraksiyon kartuşu
2. Manyetik çubuk kılıfı
3. Proteinaz K
4. STL-B

DNA izolasyon prosedürü

1. Ekstraksiyon kartuşları kartuş standına yerleştirildi.
2. Kartuşların bir numaralı kuyularına 15 µL Proteinaz K pipetlendi.
3. Daha sonra üzerine 200 µL plazma örneği pipetlendi.
4. Kartuş standı cihaza yerleştirildi.
5. Manyetik çubuk kılıfları cihazda ilgili bölüme yerleştirildi.
6. Cihaz çalıştırıldı.

İşlem sonucu kartuşun altı numaralı kuyusunda 80-100 µL izolat elde edildi.

Mutasyon Analizi: İlaç direnci araştırılması Real-time PCR yöntemiyle CMV UL97-UL54 Genleri Mutasyon Saptama Kiti (RUO) (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak

CFX96 Touch Real-Time PCR (BIO-RAD-USA) cihazında gerçekleştirildi. Test kitinin içeriği ve test edilen mutasyonlar Tablo 6’da gösterilmiştir.

**Tablo 6.**CMV ilaç direnci tayininde kullanılan PCR reaksiyon içeriği

Bileşen	Kullanım Amacı
2X qPCR Mix	qPCR testi için optimize edilmiş kullanıma hazır karışım
A987G-L802M Wild	Spesifik nükleik asit amplifikasyonu ve tespiti <b>FAM:</b> CMV UL54 Gene A987G Wild Type <b>HEX:</b> Human (IC-Internal Control) <b>ROX:</b> CMV UL54 Gene L802M Wild Type
A987G-L802M Mut	<b>FAM:</b> CMV UL54 Gene A987G Mutant <b>HEX:</b> Human (IC-Internal Control) <b>ROX:</b> CMV UL54 Gene L802M Mutant
P522S-T700A Wild	<b>FAM:</b> CMV UL54 Gene P522S Wild Type <b>ROX:</b> CMV UL54 Gene T700A Wild Type
P522S-T700A Mut	<b>FAM:</b> CMV UL54 Gene P522S Mutant <b>ROX:</b> CMV UL54 Gene T700A Mutant
H520Q-A594V Wild	<b>FAM:</b> CMV H520Q Wild Type <b>ROX:</b> CMV A594V Wild Type
H520Q-A594V Mut	<b>FAM :</b> CMV H520Q Mutant <b>ROX :</b> CMV A594V Mutant
C603W-L595S Wild	<b>FAM:</b> CMV C603W Wild Type <b>ROX:</b> CMV L595S Wild Type
C603W-L595S Mut	<b>FAM:</b> CMV C603W Mutant <b>ROX:</b> CMV L595S Mutant
NTC	Negatif Kontrol
PC-ALW / PC-ALM / PC-PTW PC-PTM / PC-HAW / PC-HAM PC-CLW / PC-CLM	Pozitif Kontrol (PC)

QPCR: Real-time PCR

#### PCR test kurulumu

- 1.PCR kabini içerisinde reaksiyon karışımları hazırlandı.
- 2.Her örnek için 0,2 ml’lik sekizli şerit beyaz PCR tüpleri kullanılarak her bir kuyucuğa 5 µL qPCR mix ve 2.5 µL oligo mix karışımı pipetlendi.

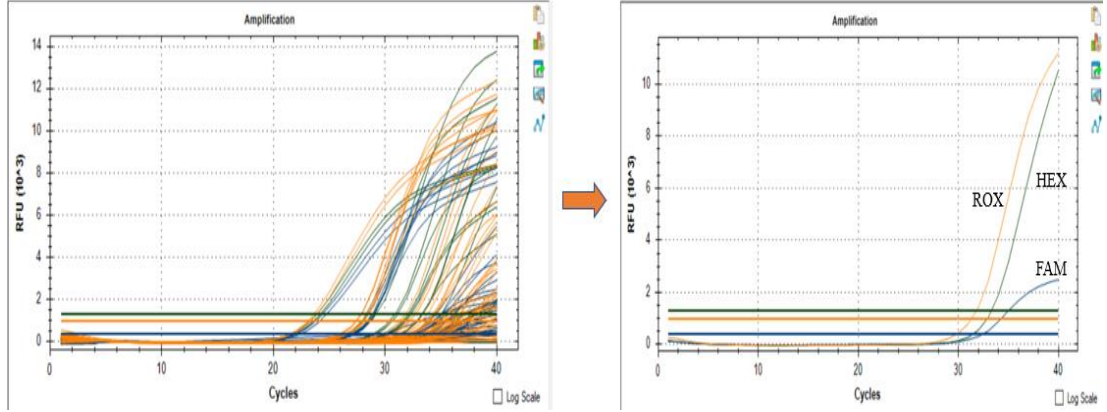
3. Daha sonra her kuyucuğa 2.5 µL DNA örneği eklendi.
4. Tüpler şerit kapak ile kapatılarak spin santrifüj cihazında (Frontier, Ohaus, ABD) bir dakika süreyle santrifüjlendi.
5. Kuyucuklar CFX96 Touch Real-Time PCR (BIO-RAD-Amerika Birleşik Devletleri) cihazındaki bloğa yerleştirildi.
6. Reaksiyon için uygun ısı döngü profili oluşturuldu ve çalışma başlatıldı.

Amplifikasyon işlemi Tablo 7’de belirtilen ısı-döngü protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

**Tablo 7.** CMV ilaç direnci tayininde gerekli reaksiyon içeriği ve PCR protokolü

Reaksiyon Kurulumu		qPCR Program			
		<i>CFX96 Touch™/CFX96™ Dx/CFX Opus 96™/CFX Opus 96™ Dx (Bio-Rad) ve Magnetic Induction Cycler (Mic) (Bio Molecular System- BMS)</i>			
Reaktif	Miktar	Basamak	Döngü No.	Sıcaklık	Süre
2X qPCR Mix	5 µL	<b>Enzim aktivasyonu</b>	1 döngü	52 °C	3 dk.
		<b>Pre-İnkübasyon</b>	1 döngü	95 °C	10 sn.
Oligo Mix	2.5 µL	<b>Denatürasyon</b>	40 döngü	95 °C	1 sn.
Nükleik Asit/NTC/PC	2.5 µL	<b>Bağlanma ve Uzama</b>		60 °C	10 sn.
<b>Toplam Reaksiyon Hacmi</b>	<b>10 µL</b>	<b>Saptama (Okuma)</b>		(FAM-Green)/(HEX-Yellow)/(ROX-Orange)	

PCR testi ile; UL 97 bölgesinden dört mutasyon (H520Q, A594V, C603W, L595S), UL54 bölgesinden dört mutasyon (A987G, L802M, P522S, T700A) olmak üzere toplam sekiz adet mutasyon varlığı değerlendirildi. Amplikonların analizinde prob olarak floresan boyalar (FAM, HEX, ROX) kullanıldı. FAM ve ROX kanalından vahşi tip ve/veya mutant tip CMV’ye ait spesifik sinyaller, HEX kanalından ise internal kontrol için spesifik sinyaller saptanmaktadır. Kullanılan kitle HEX kanalı eşik döngüsü ≤40, FAM ve ROX kanalı eşik döngüsü ≤40 olarak belirtilmiştir (Şekil 5). Sonuçların yorumlanması Tablo 8’de belirtildiği şekilde yapıldı.



**Şekil 5.** CFX96 Touch Real-Time PCR cihazında sonuçların yorumlanması

**Tablo 8.** PCR reaksiyonunun yorumlanması

Hedef	İnternal Kontrol (IC)	Sonuç Yorumlama	Eylem
Sadece vahşi tip pozitif (+)	Pozitif (+) veya negatif (-)	Sonuçlar geçerli, hedef tespit edildi.	Vahşi tip pozitif olarak raporlanır.
Sadece mutasyon pozitif (+)	Pozitif (+) veya negatif (-)	Sonuçlar geçerli, hedef tespit edildi.	Mutant pozitif olarak raporlanır
Hem vahşi tip hem mutasyon pozitif (+)	Pozitif (+) veya negatif (-)	Sonuçlar geçerli, hedef tespit edildi.	Hedeflerin Cq değerleri kontrol edilir, daha düşük olan değer pozitif olarak raporlanır
Negatif (-)	Pozitif (+)	Sonuçlar geçerli, hedef tespit edilmedi.	Negatif olarak raporlanır

### 3.2.ÇALIŞMA ONAYI

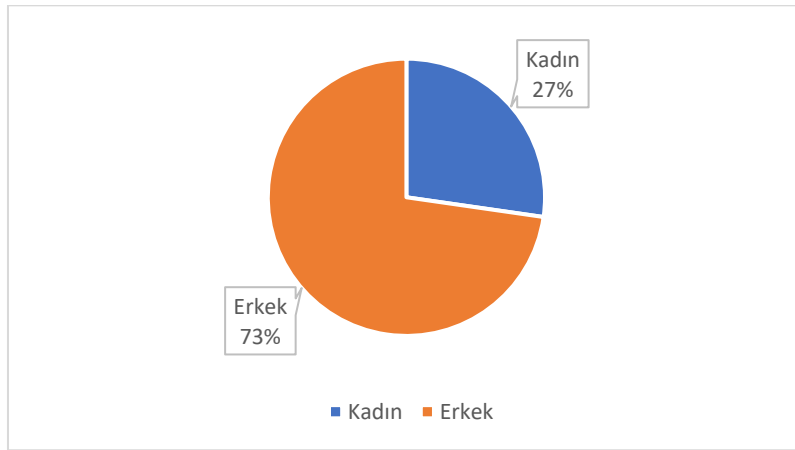
Çalışmamız T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi Dekanlığı Tez İnceleme ve Değerlendirme Akademik Kurulu tarafından 13.10.2022 tarih ve E-86241737-100-174782 sayılı kararı ile tez onayı ve T.C. Sağlık Bakanlığı İl Sağlık Müdürlüğü Ankara Bilkent Şehir Hastanesi 2 Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı tarafından E2-22-2576 protokol numaralı etik kurul onayı almıştır.

## 4.BULGULAR

Çalışmaya, hasta grubu olarak CMV viral yükü 1000 IU/ml ve üzeri olan hastalardan daha önce CMV tedavisi almış olan 34 hasta ve kontrol grubu olarak daha önce CMV tedavisi almamış 10 hasta olacak şekilde, toplam 44 hasta çalışmaya dahil edildi.

### 4.1.HASTALARIN ÖZELLİKLERİ

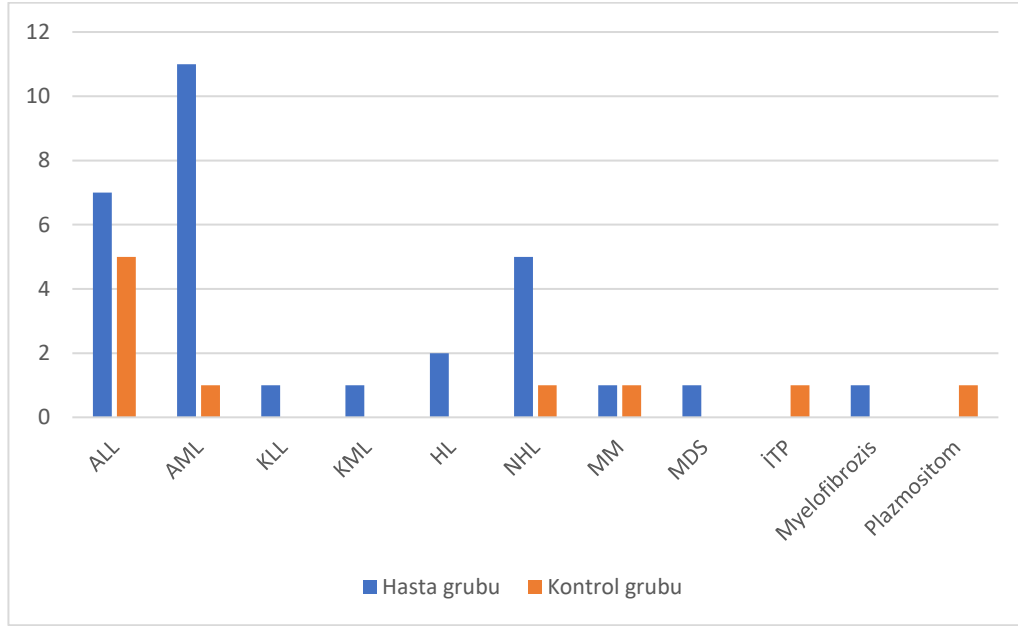
Çalışmaya dahil edilen hastaların 12'si (%27) kadın, 32'si (%73) erkek olup, yaşları 19-78 (yaş ortalaması 43,75) arasında değişmektedir (Şekil 6).



Şekil 6. Çalışmaya alınan hastaların cinsiyet dağılımı

Çalışmaya dahil edilen 44 hastanın 25'i KİT alıcısı, 19'u ise hematoloji poliklinik ve servislerinde takip edilen hastalardı. Hasta grubundaki (CMV tedavisi almış) hastaların 24'ü KİT alıcısı, 10'u ise hematoloji poliklinik ve servislerinde takip edilmekte olan hastalardan oluşmaktadır. KİT alıcılarının 22'sine AKİT, ikisine farklı zamanlarda, OKİT ve AKİT yapıldı. Kontrol grubu hastalarının (CMV tedavisi almamış) sekizi hematoloji poliklinik ve servislerinde takipli olup KİT yapılmayan hastalardan oluşmaktadır. Bir hastaya AKİT yapıldı, bir hastanın da KİT planı mevcut olup tedavisine dış merkezde devam edilmek üzere yönlendirildi. Hasta grubundaki hastaların alt hastalıkları akut lenfoblastik lösemi (ALL) (n=11); akut miyeloid lösemi (AML) (n= 11); kronik miyeloid lösemi (KML) (n=1); kronik lenfositik lösemi (KLL) (n=1); multiple myelom (MM) (n=1); hodgkin lenfoma (HL) (n=2); non hodgkin

lenfoma (NHL) (n=5); miyelofibrozis (n=1); miyelodisplastik sendrom (MDS) (n=1) idi. Kontrol grubundaki hastaların alt hastalıkları ALL (n=5); AML (n=1); MM (n=1); NHL (n=1); plazmositom (n=1); immün trombositopenik purpura (n=1) idi (Şekil 7).



**Şekil 7.** Çalışmaya alınan hastaların alt hastalıkları

Donörlerin ve hastaların serumlarında ELISA yöntemi ile anti CMV IgG ve anti CMV IgM varlığı araştırıldı. Sonuçlar hastane laboratuvar sistemi üzerinden ve hasta dosyalarından elde edildi. Hasta ve donörlerin hepsinin anti CMV IgM sonucu negatifti. AKİT yapılan 22 hastadan 21'inde anti CMV IgG D+/R+, bir hastada ise D-/R+ idi. OKİT yapılan hastaların tamamı ve hematoloji poliklinik ve servislerinde takipli KİT yapılmamış hastaların tamamının anti CMV IgG'si pozitif idi.

Hastaların CMV DNA düzeyleri takibi transplantasyon öncesi ve sonrasında haftalık olarak yapıldı. CMV hastalığına bağlı risk faktörleri göz önünde bulundurularak antiviral tedavi planlandı. Bu faktörler arasında, yaş, cinsiyet, ek hastalıklar, transplantasyon tipi, hazırlık rejimi ve GVHD yer almaktadır. Hasta grubundaki hastaların altısı, yalnızca IV GCV tedavisi aldı, 28 hastada ise başlangıçta IV GCV tedavisinin ardından oral VGCV ile tedaviye geçildi. Hastaların toplam tedavi süreleri 30-60 gün arasında değişmektedir. Bir hastada GCV/VGCV kullanırken viral yük artmaya devam etti ve tedavisi FOS ile değiştirildi. Bir hastanın tedavisine, BK

virüs pozitifliği nedeniyle CDV de eklendi. Kontrol grubundaki hastaların hiçbirini CMV tedavisi almamış hastalardır ve GCV kullanım öyküleri mevcut değildir. Ancak kontrol grubundan bir hasta hariç hastaların tamamını herpesvirus enfeksiyonları için asiklovir (ACV) profilaksisi altındadır.

KİT hastalarında GVHD profilaksisi için siklosporin kullanıldı. Hasta özelliklerine göre diğer immüsupresan ajanlar da tedaviye eklendi.

Bu çalışmada iki hastada CMV koliti ve gastroenteriti olmak üzere CMV hastalığı gelişti. CMV hastalığı gelişen hastalardan birinin tedavisi, GCV yanıtız olması nedeniyle FOS ile değiştirildi ve 45 gün FOS kullanıldı (Tablo 5-H22). Tedavi yanıtının ardından ilaç kesildi. CMV enfeksiyonu veya hastalığı ile takip edilmiş olan hasta grubundaki 34 hastadan 5'i, kontrol grubundaki 10 hastadan ise ikisi öldü.

Antiviral direnç testi çalışılan hastaların özellikleri Tablo 9 ve Tablo 10'da gösterilmiştir.

**Tablo 9.** KİT yapılan hastalara ait veriler

Hasta No	Transplantasyon Tipi Yaş, Cinsiyet	Alt Hastalık	CMV PCR (IU/ml)	İlk CMV Enfeksiyonu (Transplantasyon Sonrası)	CMV Seroloji (D/R)	Antiviral Tedavi	Klinik Bulgu/ Semptom/Hastalık	Durum
H1	AKİT, 42/E	KLL	8660	55 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Adenoviral keratit KCFT yükseklik, GVHD	Exitus.
H2	AKİT, 58/K	ALL	18572	20 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu	Yaşiyor
H3	AKİT, 23/E	AML	21386	14 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Nötropenik ateş, mukozit, ishal	Yaşiyor
H4	AKİT,36/E	ALL	9295	32 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Nötropenik ateş trombositopeni, Splenik enfarkt	Yaşiyor
H5	AKİT, 54/K	ALL	22374	37 gün	D+/R+	GCV	PCP pnömonisi GVHD	Yaşiyor
H6	AKİT, 44/E	AML	4143	56 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Mukozit, kronik SAK,	Yaşiyor
H7	AKİT,43/K	AML	5818	35 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Dizüri	Yaşiyor
H8	AKİT, 39/E	AML	234749	40 gün	D+/R+	GCV, VGCV	GİS+ cilt GVHD İshal, döküntü	Yaşiyor
H9	AKİT, 22/E	ALL	1534	120 gün	D-/R+	GCV, VGCV	GİS ve cilt GVHD	Yaşiyor
H10	AKİT, 47/E	AML	10908	2,5 yıl	D+/R+	GCV, VGCV	Kronik cilt GVHD, pnömoni,	Yaşiyor
H11	AKİT, 52/K	AML	6059	30 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Hematüri,eritemli cilt lezyonu	Yaşiyor
H12	AKİT, 27/K	AML	1966	28 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Aktif şikayeti yok	Yaşiyor
H13	AKİT, 50/E	AML	107320	90 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Cilt, göz GVHD, diyare	Yaşiyor
H14	AKİT, 56/E	AML	180653	36 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Ateş,ishal	Yaşiyor

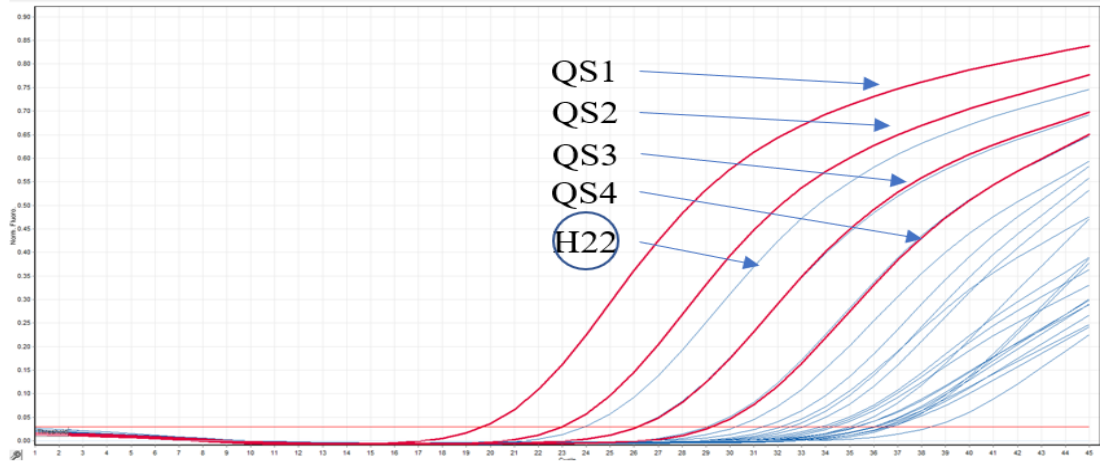
(Tablo 9 devamı)

Hasta No	Transplantasyon Tipi Yaş, Cinsiyet	Alt Hastalık	CMV PCR (IU/ml)	İlk CMV Enfeksiyonu (Transplantasyon Sonrası)	CMV Seroloji (D/R)	Antiviral Tedavi	Klinik Bulgu/ Semptom/Hastalık	Durum
H15	AKİT, 52/K	Myelofibrozis	14596	130 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Ateş, ishal, öksürük	Yaşiyor
H16	AKİT, 35/E	ALL	3463	12 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Hematüri Kan kültürü +	Yaşiyor
H17	AKİT, 36/K	ALL	20141	30 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Aktif şikayeti yok	Yaşiyor
H18	AKİT, OKİT, 33/E	HL	20324	10 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Ateş, BFT yüksekliği	Yaşiyor
H19	AKİT, OKİT, 26/E	HL	40241	45 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Nötropenik ateş, cilt GVHD,	Yaşiyor
H20	AKİT, 50/E	KML	11444	60 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Hematüri, subfebril ateş, göz GVHD	Yaşiyor
H21	AKİT, 36/K	MDS	6954	1 yıl	D+/R+	GCV, VGCV, CDV	İshal, döküntü, hematüri, BK virüs +	Yaşiyor
H22	AKİT, 35/E	ALL	361845	32 gün	D+/R+	GCV, VGCV, FOS	Cilt ve GİS GVHD, CMV koliti, gastroenteriti	Yaşiyor
H23	AKİT, 40/K	AML	39654	30 gün	D+/R+	GCV, VGCV	Ateş, kan kültürü +	Yaşiyor
H24	AKİT, 46/E	AML	8147	29 gün	D+/R+	GCV	Aktif şikayeti yok	Exitus.
H25	AKİT, 50/E	AML	7265	14 gün	D+/R+	ACV (P)	Cilt GVHD	Yaşiyor

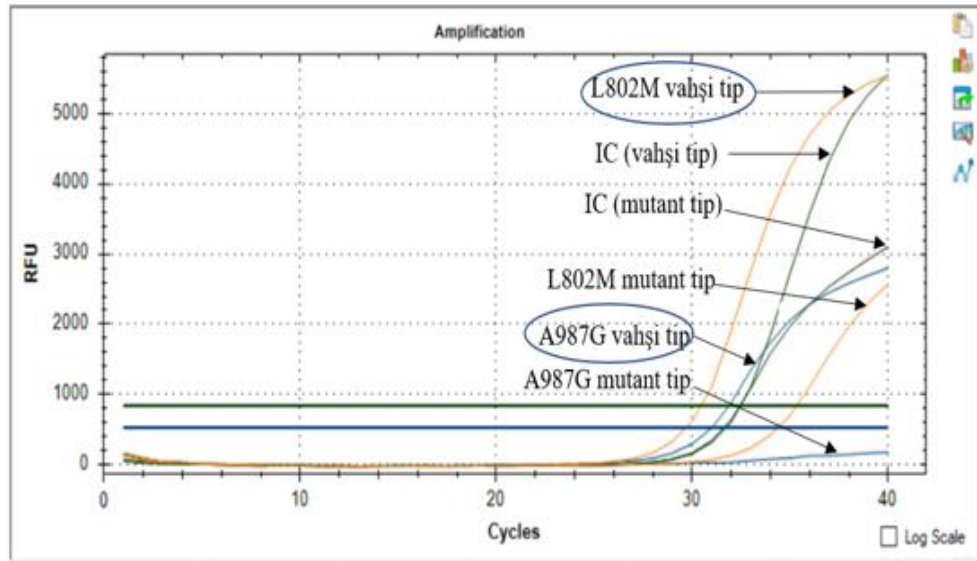
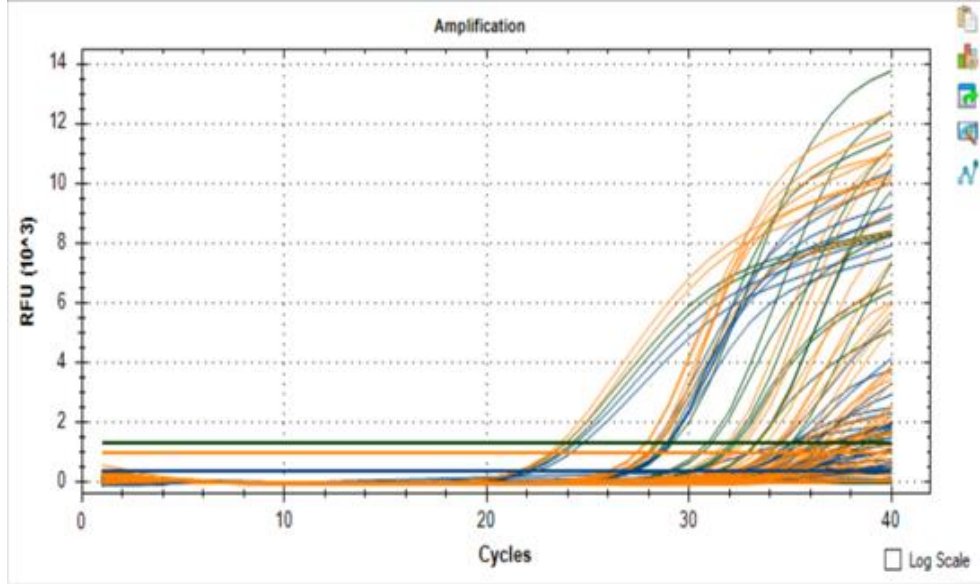
**Tablo 10.** KİT yapılmayan hastalara ait veriler

Hasta No	Alt Hastalık Yaş/Cinsiyet	CMV PCR (IU/ml)	CMV Seroloji (anti CMV Ig G)	Antiviral Tedavi	Klinik Bulgu/Semptom/ Hastalık	Durum
H26	NHL, 78/E	4721	Pozitif	GCV, VGCV	Ateş, diyare	Exitus
H27	NHL, 34/E	12986	Pozitif	GCV, VGCV	Ateş, perikardiyal, plevral efüzyon	Yaşiyor
H28	ALL, 34/E	20125	Pozitif	GCV	Papilödem, ateş, cilt lezyonu	Yaşiyor
H29	NHL, 75/K	9134	Pozitif	GCV	Ateş, disfaji	Yaşiyor
H30	ALL, 54/E	8990	Pozitif	GCV, VGCV	Nötropenik ateş, miyokardit, mukozit	Yaşiyor
H31	NHL, 21/E	14662	Pozitif	GCV	Ateş, pnömosepsis	Yaşiyor
H32	MM, 75/K	180653	Pozitif	GCV, VGCV	Karın ağrısı, diyare	Yaşiyor
H33	NHL, 34/E	12986	Pozitif	GCV, VGCV	Paroksizmal AF Cilt lezyonu	Exitus.
H34	ALL, 35/E	218699	Pozitif	GCV, VGCV	Ateş, kan kültürü +	Yaşiyor
H35	ALL, 35/E	64083	Pozitif	GCV	Ateş, osteomyelit	Exitus
H36	ALL, 34/K	2201	Pozitif	ACV -Proflaksi(P)	Nötropenik ateş, diyare	Yaşiyor
H37	ALL, 30/E	3881	Pozitif	ACV (P)	Aktif şikayeti yok	Yaşiyor
H38	ALL, 44/E	4467	Pozitif	ACV (P)	Ateş, diyare, boğaz ağrısı, splenik enfarkt	Yaşiyor
H39	Plazmositom, 57/E	1279	Pozitif	ACV (P)	İntraventricüler hidrosefali,	Exitus
H40	ALL, 63/K	3479	Pozitif	ACV (P)	Mukozit, papilödem	Yaşiyor
H41	NHL+AIDS, 50/E	1942	Pozitif	ACV (P)	Aktif şikayeti yok	Yaşiyor
H42	İTP,	5852	Pozitif	-	Vücutta ekimoz	Yaşiyor
H43	ALL, 19/K	2005	Pozitif	ACV(P)	Aktif şikayeti yok	Yaşiyor
H44	MM, 67/E	1846	Pozitif	ACV (P)	Aktif şikayeti yok	Yaşiyor

Çalışma için öncelikle real-time PCR ile CMV DNA tayini yapıldı. Daha sonra viral yükü 1000 IU/ml ve üzeri olan hastaların CMV UL97 ve UL54 bölgelerinden real-time PCR yöntemi ile mutasyon analizi yapıldı. Real-time PCR reaksiyonuyla CMV DNA tayini Şekil 8’de gösterilmiştir. Çalışma, araştırma amaçlı tasarlanmış olan ve ilk defa bizim çalışmamızda kullanılan CMV UL97-UL54 Genleri Mutasyon Saptama Kiti (RUO) ile gerçekleştirildi. PCR reaksiyonuyla UL97 ve UL54 bölgelerinde sık görülen sekiz adet mutasyon varlığının araştırılması planlandı. Bakılan bu mutasyonlar UL 97 bölgesinde, H520Q, A594V, C603W, L595S; UL54 bölgesinde, A987G, L802M, P522S, T700A’yi içermektedir. Yapılan analiz sonunda çalışmaya dahil edilen 44 hastada, C603W, L595S, A987G, L802M, P522S, T700A vahşi tip suş pozitif bulundu, hastaların hiçbirinde mutant tip suş saptanmadı. Real-time PCR yöntemiyle mutasyon analizi verileri, örnek hastalar üzerinden Şekil 9 ve Şekil 10’da gösterilmiştir. H520Q ve A594V değerlendirmesinde; çalışmaya dahil edilen 44 hastada mutant suş saptanmazken, vahşi tip suş varlığı da gösterilemedi. Örnek ve çalışma kaynaklı sorunları dışlamak için plazma örneklerinden tekrar DNA izolasyonu yapıldı ve test tekrar çalışıldı. İkinci çalışmada da bütün örnekler, vahşi tip dahil, H520Q ve A594V mutasyonları açısından negatif olarak belirlendi (Şekil 11)

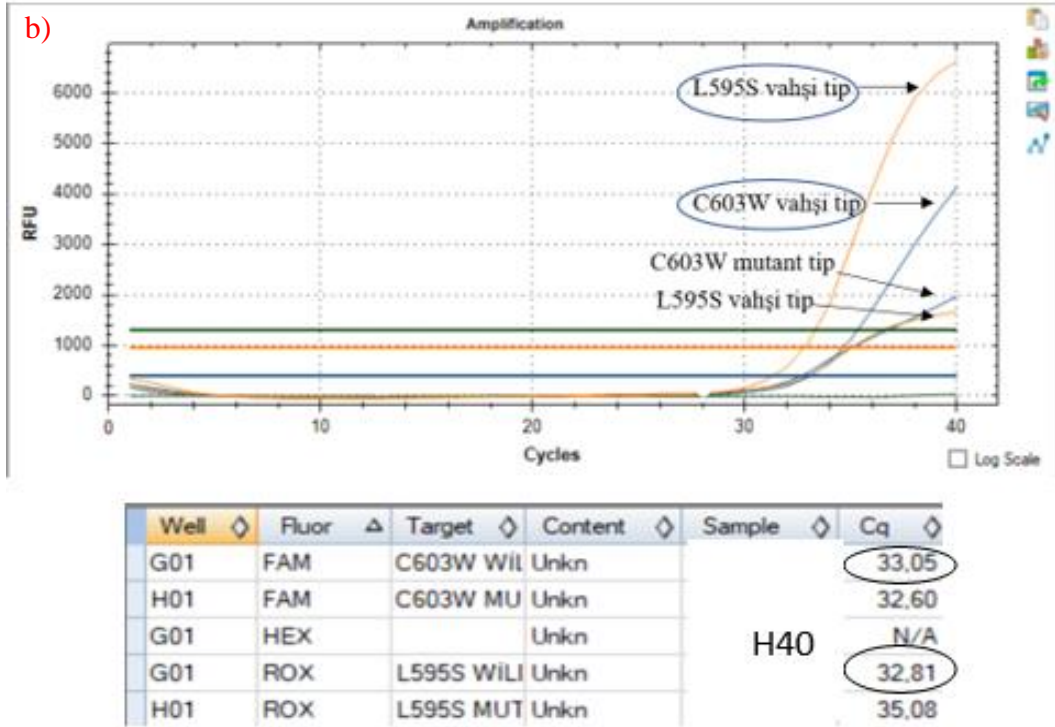
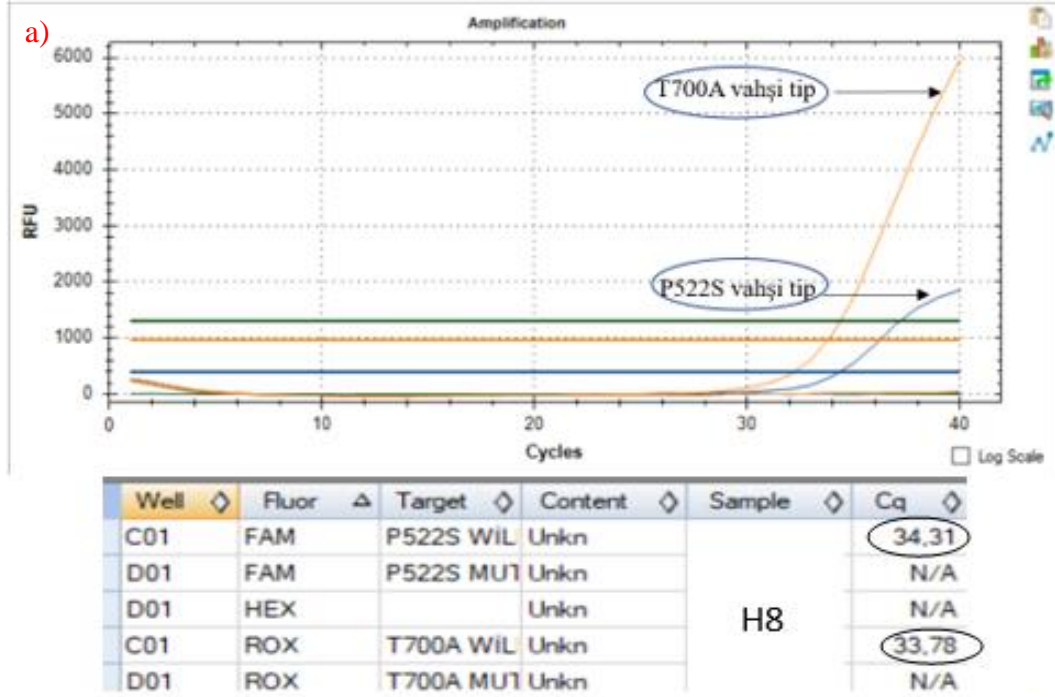


**Şekil 8.** Real-time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi (Hasta no:22)

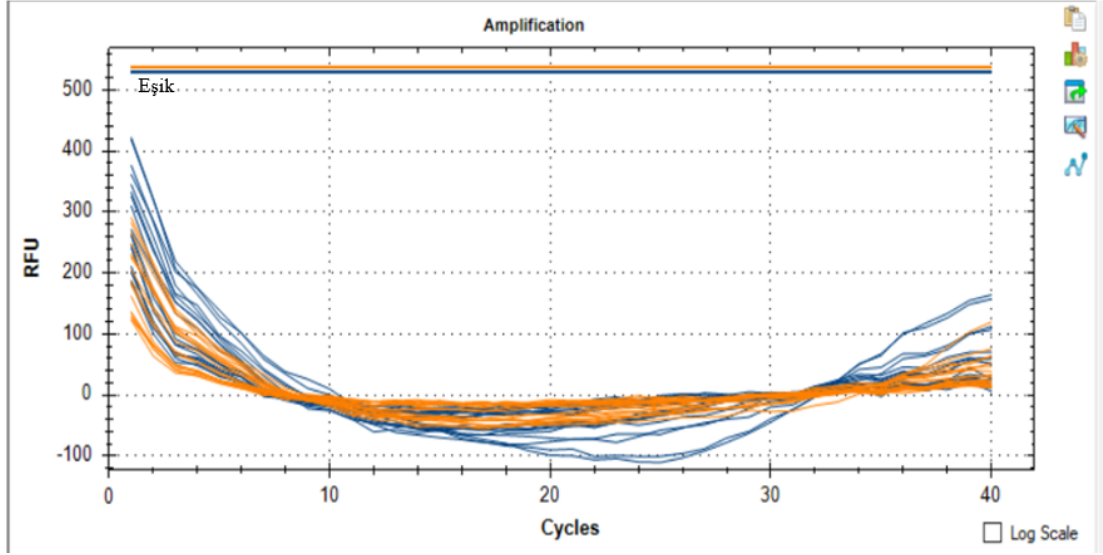


Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A01	FAM	A987G WIL	Unkn	H34	31.01
B01	FAM	A987G MU	Unkn		N/A
A01	HEX	IC	Unkn		32.45
B01	HEX	IC	Unkn		32.43
A01	ROX	L802M WIL	Unkn		29.70
B01	ROX	L802M MU	Unkn		34.39

Şekil 9. CMV UL97-UL54 genleri mutasyon analizi (Real-time PCR) sonuçlarının değerlendirilmesi-A987G vahşi tip ve L802M vahşi tip pozitif hasta (Hasta no:34)



Şekil 10. CMV UL97-UL54 genleri mutasyon analizi (Real-time PCR) sonuçlarının değerlendirilmesi, a) Hasta no:8- P522S, T700A vahşi tip pozitif hasta, b) Hasta no:40- L595S, C603W vahşi tip pozitif hasta



**Şekil 11.** CMV UL97 (H520Q ve A594V) genleri mutasyon analizi (Real-time PCR) sonuçlarının değerlendirilmesi- H520Q ve A594V vahşi tip/mutant tip negatif

## 5. TARTIŞMA

CMV, özellikle KİT veya SOT alıcıları gibi bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi komplikasyonlara neden olan dünya çapında yaygın bir fırsatçı patojendir. Bu hastalarda, yüksek morbidite ve mortalite oranlarının yanı sıra uzun vadede greft kaybı riskinin artmasından da sorumludur (68). CMV enfeksiyonunda GCV ilk tedavi seçeneğidir. FOS veya CDV daha çok GCV yanıtı olmayan olgularda kullanılan ajanlardır (31).

İlaç direnci bir veya daha fazla antiviral ilaca duyarlılığı azaltan viral genetik değişiklik olarak tanımlanmaktadır ve iki haftalık uygun dozda antiviral tedavi uygulanmasına rağmen viral yükte artış devam ediyorsa şüphelenilmelidir (68). Uzun süreli antiviral ilaca maruz kalma, yoğun immünsupresif tedavi ve optimalin altındaki terapötik doz, ilaç direnci için bilinen risk faktörleridir (69). Antiviral tedavi gören hastalarda ilaç direnci görülme sıklığının %2-%8 civarında olduğu tahmin edilmektedir ve direnç genellikle tedaviden iki üç ay sonra ortaya çıkmaktadır (70). Yang ve arkadaşları CMV viremi olan 112 hastayı inceledikleri çalışmalarında, üç hastada tedaviden 83-150 gün sonra antiviral ilaç direnci saptamışlardır (71). CMV retiniti tanısı ile izlenen AIDS hastalarından oluşan bir kohort çalışmasında, üç aydan daha uzun süre devam eden GCV tedavisinin ardından dirençli virüs insidansında önemli bir artış gözlenmiştir (72). Bizim çalışmamızda, hasta grubundaki 34 hasta, en az bir ay süreyle CMV tedavisi almıştır.

GCV direnç mutasyonları başlangıçta çoğunlukla UL97 geninin 460, 520 ve 590-607 kodonlarında ortaya çıkmaktadır. Tüm GCV dirençli klinik izolatların %90'ından fazlasında UL97 genindeki mutasyonlar bulunmaktadır (73). GCV'yi başlangıç tedavisi olarak alan hastalardan elde edilen dirençli izolatların yaklaşık %80'inde, UL97 bölgesinde; M460V/I, H520Q, C592G, A594V, L595S ve C603W nokta mutasyonlarından biri görülmektedir (44, 73). Bu mutasyonlar, biyolojik olarak önemli UL97 kinaz fonksiyonunu korurken, antiviral aktivite için gerekli olan GCV fosforilasyonunu azaltırlar ve ilaç duyarlılığında 5-15 kat azalmaya neden olurlar. Bu bölgedeki diğer iki mutasyon, A591V ve C592G, GCV duyarlılığında en az üç kat azalmaya yol açar (41). Ayrıca, Chou ve arkadaşları çalışmalarında, 591-603 pozisyonlarındaki üç veya daha fazla kodonun çerçeve içi delesyonunun GCV

direncinde en az sekiz kat artış sağladığını, bir veya iki kodon silinmesinin 4-10 kat artış sağladığını göstermişlerdir (49). Komatsu ve arkadaşları yapmış oldukları kapsamlı bir incelemede, L405P, M460I/T, V466G, C518Y, A594E/G/T/P, L595F/W, E596G, K599T, C603R, C607Y amino asit değişimlerinin GCV duyarlılığında en az iki kat azalma sağladığını bildirmişlerdir (74).

UL54 genindeki mutasyonlar sıklıkla UL97 mutasyonlarıyla birlikte görülür, nadiren tek başına ilk genetik değişiklik olarak ortaya çıkarlar. CMV DNA polimeraz ortak antiviral hedef olduğundan, örtüşen direnç yolları GCV, CDV ve FOS arasında çapraz direnç sağlayabilir (6). Nispeten küçük bir genomik bölgede kümelenen UL97 direnç mutasyonlarının aksine, bilinen UL54 direnç mutasyonlarının çoğunluğu, çok daha geniş bir alana yayılmıştır (75). UL54 del524 delesyonunun, eş zamanlı UL97 mutasyonu olmaksızın transplant alıcısında GCV direnci oluşturduğu rapor edilmiştir (76). Recio ve arkadaşlarının transplant alıcılarında yaptığı bir çalışmada, üç hastada UL97 bölgesinde mutasyon olmaksızın yalnızca UL54 bölgesinde antiviral direnç mutasyonu tespit edilmiştir. Bu durumu, UL97'deki bazı antiviral direnç mutasyonlarının, tedavi FOS veya CDV'ye değiştirildikten sonra vahşi tipe dönmüş olabileceği şeklinde yorumlamışlardır (68). Iwasenko ve arkadaşları X'e bağlı şiddetli kombine immün yetmezliği olan bir KİT alıcısında, GCV dirençli UL97 mutasyonunun (L595S) kaybolmasından bir yıl sonra FOS direnci gösteren, ancak GCV'ye duyarlı bir UL54 direnç mutasyonu (T700A) saptamışlardır (77).

Hantz ve arkadaşları yaptıkları, UL97 ve UL54 bölgelerinin dizi analizini içeren iki yıllık bir kohort çalışmasında; dirençten şüphelendikleri 37 (%10,7) hastadan 18'inde (%5,2) virolojik direnç bulmuşlardır. Vakaların çoğunda tek başına UL97 mutasyonu mevcut olup, dört hastada hem UL97 hem de UL54 bölgesinde çoklu ilaç direnci ile ilişkili mutasyonlar gösterilmiştir (78).

Keyvani ve arkadaşlarının 48 KİT ve 39 böbrek nakli hastasında Sanger dizi analizi yöntemi ile UL97 bölgesini inceledikleri çalışmalarında; A594V (%26,4), H520Q (%18,39), M460V (%13,8), E596G (%1,1), del 594 (%1,1), C592G (%10,3), M460I (%9,2) ve C603W (%6,9), L595S'de (%2,3) mutasyonlarını bulmuşlardır (79).

Nogueira ve arkadaşları CMV viremi tespit edilen 19 SOT alıcısıyla yaptıkları DNA dizi analizinde, dokuz (%47,4) hastada UL97 bölgesinde; L595S

(%55,6), A594V (%11,1), A595F/A594V (%11,1) ve L595S/A594V (%22,2) mutasyonları bulmuşlardır. Hiçbir hastada M460V mutasyonu saptamamışlardır (80).

SantAnna ve arkadaşlarının Sanger dizi analizi yöntemi ile 66 böbrek transplant alıcısı üzerinde yaptıkları antiviral direnç analizinde, 15 hastada mutasyon saptamışlardır. UL97 bölgesinde, 13 hastada; M460I (1), M460V (1), S472N+C495W (1), C603W (1), L595S (2), H520Q (1), N461K (1), D465R (1), A594P (1), D605E (1), del 598-601 (1), UL54 bölgesinde ise iki hastada tek başına A614S mutasyonunu göstermişlerdir. (81).

Choi ve arkadaşlarının 49 AKİT alıcısını dahil ederek UL97 ve UL54 bölgelerini Sanger dizi analizi ile inceledikleri bir çalışmada, iki hastada M460V ve C592G mutasyonlarını saptamışlar, ayrıca hastaların birinde FOS direnci oluşturduğu bilinen, UL54 bölgesinde T700A mutasyonu bulmuşlardır (82).

Baldanti ve arkadaşları yaptıkları UL97 bölgesinin Sanger dizi analizinde, anti CMV Ig G D+/R- olan akciğer nakli yapılan bir hastada GCV tedavisi sonrası A594V mutasyonu saptamışlar, tekrarlayan reaktivasyonlar nedeniyle GCV ve FOS kullanılan hastada, bir yıl sonunda tekrar dizileme yapılmış ve GCV ve CDV direncine neden olan UL97 (H520Q) ve UL54'te (P522S) yeni mutasyonlar göstermişlerdir (83).

Çalışmamızda incelenen mutasyonlar UL 97 bölgesinde, H520Q, A594V, C603W, L595S; UL54 bölgesinde, A987G, L802M, P522S, T700A'yi içermektedir. Yapılan analiz sonunda çalışmaya dahil edilen hastaların tümünde, C603W, L595S, A987G, L802M, P522S, T700A analizinde vahşi tip suş pozitif bulundu, hastaların hiçbirinde mutant tip suş saptanmadı. H520Q ve A594V değerlendirmesinde; hastaların hiçbirinde mutant suş saptanmazken, vahşi tip suş varlığı da gösterilemedi. Olası örnek ve çalışma kaynaklı sorunları dışlamak için plazma örneklerinden tekrar DNA izolasyonu yapılarak test tekrarlandı. İkinci çalışmada da vahşi tip dahil olmak üzere, bütün örneklerde H520Q ve A594V negatif olarak saptandı. Çalışmamızda bakılması planlanan H520Q ve A594V mutasyonları testte yaşanan bu sorundan dolayı değerlendirme dışı bırakıldı. Bu mutasyonların değerlendirme dışı bırakılmasıyla UL97 bölgesinde iki mutasyon, UL54 bölgesinde ise dört mutasyon değerlendirilmiş oldu. CMV'de antiviral ilaç direncinin öncelikle UL97 bölgesinde ortaya çıkan mutasyonlar nedeniyle geliştiği bilindiğinden, UL97 bölgesinden daha fazla mutasyonun analiz edilmesi daha yararlı olacaktır.

H520Q ve A594V mutasyonları ilacın EC50'sinde üç-beş kat artış gösteren yaygın görülen mutasyonlardandır. Guiu ve arkadaşları 14 AKİT alıcısında Sanger dizi analizi yöntemiyle GCV direnci araştırdıkları çalışmalarında, iki hastada A594V ve bir hastada H520Q mutasyonu saptamışlardır (84).

CMV reaktivasyonu için en belirgin riskli grubu, seronegatif donörlerden greft alan CMV seropozitif alıcılardan oluşmaktadır (85). Bu duruma muhtemelen, ablasyon sonrası işlevsel CMV spesifik T hücre yanıtının gecikmiş rekonstitüsüyonu neden olmaktadır (86). Bizim çalışmamızdaki anti CMV IgG profilleri; bir hastanın D-/R+, diğer tüm hastaların D+/R+ şeklindeydi ve hastaların hiçbirinde direnç ilişkili mutasyon saptanmadı.

Gansiklovir tedavisinden sonra SOT alıcılarının %5-%12'sinde direnç ortaya çıktığı rapor edilmiştir. KİT' yapılan hastalarda direnç prevalansı SOT alıcılarına göre daha düşük olup %1-%5 arasındadır (4). Shmueli ve arkadaşları 561 KİT hastası ile antiviral ilaç direnç oranlarını inceledikleri beş yıllık bir çalışmada, ilaç direncinin, profilaktik tedavi alan haploidentik alıcılarda %14,5 oran ile en yüksek prevalansa sahip olduğunu göstermişlerdir (87). Kim ve arkadaşları çalışmalarında, alıcı seropozitif CD34 + seçilmiş KİT hastalarının %9'unda nakil sonrası ilk yılda dirençli CMV enfeksiyonu geliştiğini ve bu direnç gelişen hastaların %58'inde CMV hedef organ hastalığı mevcut olup, %42'sinin CMV enfeksiyonundan öldüğünü saptamışlardır (88). Önceden GCV tedavisi alan KİT hastalarında %7,7'lik bir direnç oranı gözlemlenmiştir (89). Çalışmamıza dahil edilen hastaların 25'i KİT alıcısı olup, 23 hastaya AKİT, iki hastaya ise farklı zamanlarda AKİT ve OKİT yapılmıştı. KİT yapılan 25 hastanın ikisi, KİT yapılmayan 19 hastanın dördü kaybedilmiştir. Hayatını kaybeden hastalar, primer hastalıklarına bağlı immünsupresif tedavi görmekteydi. Hastalarda tedavi sırasında çoklu organ yetmezliği ve kan dolaşımı enfeksiyonu gelişmiş olup mortalitelerinin bu duruma bağlı olduğu düşünülmektedir.

Antiviral direnç gelişiminin daha çok yüksek viral yüklerde meydana geldiği gösterilmiştir (89, 90). Guiu ve arkadaşları erişkin KİT alıcılarında antiviral direnci araştırdıkları çalışmalarında, çok düşük viral yüke sahip bir hastada direnç geliştiğini görmüşlerdir. Hastanın viral yükü hiçbir zaman 1000 kopya/mL'yi geçmemiştir. Bu durum erişkin AKİT hastalarında direnç gelişiminin düşük viral yüklerde de (<1000 kopya/ml) meydana gelebileceğini göstermektedir (84). Sohrabi ve arkadaşları 58

böbrek nakil alıcısında yaptıkları çalışmalarında, hastaları GCV tedavisinin dördüncü ayında viral yük açısından test etmişlerdir. Çalışma sonucunda, yüksek viral yük ve semptomların devamına rağmen, direnç mutasyonunun ortaya çıkması ve yüksek viral yük arasında doğrudan ilişki bulamamışlardır. (91). Bizim çalışmamızda seçtiğimiz hastaların viral yükleri 1279 IU/mL-361845 IU/mL arasında değişmekteydi.

Türkiye’de GCV direncini araştırmaya yönelik literatürde bildirilen beş çalışma mevcuttur (5, 92-95). Çalışmaların hepsinde direnç araştırılması DNA dizi analizi yöntemi ile yapılmıştır. Çalışmaların üçünde sadece UL97 gen bölgesi, ikisinde ise UL97 ve UL54 gen bölgesi birlikte incelenmiştir. Arslan ve arkadaşları, CMV ensefaliti gelişen KİT alıcısı olan bir hastada UL97 gen bölgesinde M460V mutasyonu bildirmişlerdir (92). Delice ve arkadaşları, 25’i KİT alıcısı olan 30 hastayla gerçekleştirdikleri çalışmalarında, bir hastada UL97 gen bölgesinde M460V ve bir hastada ise UL54 gen bölgesinde L802M mutasyonu saptamışlardır (5). Zeytinoğlu ve arkadaşları çalışmalarında; bir böbrek nakil alıcısında A594V ve bir pediatrik KİT alıcısında C603W mutasyonu saptamışlardır (93). Bu iki vaka da Türkiye’de böbrek ve pediatrik nakil alıcılarında bildirilen ilk GCV dirençli izolatlar olma özelliği taşımaktadır. Coşkun ve arkadaşları immün yetmezliği olan 29 erişkin, 20 çocuk hasta ile yaptıkları çalışmalarında, UL97 gen bölgesinde; AKİT alıcısı bir çocuk hastada C592G, AKİT yapılan bir erişkin hastada M460I, lenfoma tanısıyla takip edilen bir erişkin hastada ise C607S mutasyonu bildirmişlerdir (94). Sarınoğlu ve arkadaşları 30 (24 pediatrik, altı erişkin) hastayla yaptıkları çalışmalarında, KİT alıcısı olan beş pediatrik hastada C603W, H520Q, M460V, A594T ve C592G direnç mutasyonlarını saptamışlardır ve bu mutasyonları fenotipik yöntemlerle doğrulamışlardır (95). Türkiye’de yapılan bu çalışmalar ışığında, bizim çalışmamızda literatürde sıkça da görülen M460V/I, C592G, A594T mutasyonlarının bakılmamış olmasının, PCR tabanlı test sistemimizin daha çok genin mutasyon analizine olanak sağlayacak şekilde geliştirilmesi gerektiği şeklinde yorumlanabilir.

Keyvani ve arkadaşları KİT ve SOT hastaları üzerinde yaptıkları UL97 bölgesinin Sanger dizi analizinde; erken (GCV başlatılmadan önce) ve geç (altı aylık GCV tedavisinden sonra) evrede 87 hasta örneğini değerlendirmiş, yalnızca bir tanesinde (%1,14) erken fazda A594V nokta mutasyonu meydana geldiği tespit etmişlerdir (79).

Aslani ve arkadaşları 144 seropozitif SOT hastası ile yaptıkları DNA dizi analizinde, CMV viremi olan, anti CMV tedavisi almamış üç hastada D605E mutasyonu saptamışlardır. Bu mutasyonun bir varyant sekans olduğu kabul edilse de gelecekte GCV direnci oluşturabileceğini belirten yayınlar da mevcuttur (96).

Biz de çalışmamızda bir kontrol grubu (n=10) oluşturarak CMV viremi olan, daha önce hiç CMV tedavisi almamış, GCV naif hastalarda GCV direncine neden olabilecek mutasyon varlığını araştırdık. Çalışmamızda kontrol grubunda dirençle ilişkili herhangi bir mutasyon saptanmadı.

KİT sürecinde herpesvirüs (HSV, VZV, CMV) enfeksiyonları için antiviral profilaksi uygulanması belirli durumlarda ölüm riskini azaltabilir. Yapılan bir çalışmada hastalara antiviral profilaksi uygulanmasının, AKİT'in post-engrafman aşamasında mortaliteyi azalttığı, pre-engrafman aşamasında ve kemoterapi sırasında sadece virüsle ilişkili morbiditeyi azalttığı, genel sağkalıma etkisinin olmadığı gösterilmiştir. HSV enfeksiyonları için pre-post engraftman döneminde sıklıkla kullanılan ajan ACV'dir. CMV enfeksiyonları profilaksisinde de yüksek doz ACV, VASV uygulanmasının yeri vardır (97). Asiklovir, çeşitli DNA virüslerine karşı antiviral aktiviteye sahip bir guanozin analogudur. Antiviral etkinliğini, bir dizi fosforilasyon aşamasından sonra viral DNA'ya dahil olup zincir sonlanmasına neden olarak gösterir. HSV ve VZV enfeksiyonları tedavisinde onaylı kullanılan bu ilaç CMV'de sınırlı etkinliğe sahiptir (74, 84). Zayıf in vitro anti-CMV potansiyeli olması, bir viral DNA polimeraz inhibitörü olarak aktivasyonu için gereken, ilacın ilk fosforilasyonu için viral olarak kodlanmış timidin kinaz enziminin eksikliğine atfedilmiş, ancak daha sonra ACV'nin bir dereceye kadar CMV UL97 fosfokinazlarınca fosforile edildiği gösterilmiştir. ACV profilaksisinin, transplant sonrası ilk 100 gün içinde CMV enfeksiyonu ve hastalığı geliştirme riskini azalttığı ve hayatta kalma şansını arttırdığı gösterilmiştir; ancak uzun süreli tedaviler ve bu ilaca yüksek maruziyetin, tedavi başladıktan birkaç hafta sonra GCV'ye direnç gelişimi üzerinde bazı düzenleyici etkilere sahip olabileceği öne sürülmüştür (98). Erice ve arkadaşları 1998 yılında ACV profilaksisi sonrasında aktif CMV enfeksiyonu gelişen KİT alıcılarında, GCV dirençli CMV'nin ilk raporunu sunmuşlardır (99). Bununla birlikte, Drew ve arkadaşları HIV ile enfekte hastalar üzerinde yaptıkları çalışmalarında, uzun süreli ACV maruziyetinin GCV'ye direnç gelişimine neden

olmadığı sonucuna varmışlardır (72). Bizim çalışmamızda, kontrol grubu hastalarında, GCV kullanım öyküsü olmamasına rağmen bir hasta hariç hepsine herpesvirüs enfeksiyonları için ACV profilaksisi uygulanmaktaydı.

CMV'de antiviral ilaç direnci araştırılmasında çeşitli fenotipik ve genotipik yöntemler mevcuttur. İlaç direnci tespitinde "altın standart" yöntem olan plak redüksiyon testi (PRA), klinik izolatin artan antiviral ilaç konsantrasyonlarıyla birlikte hücre kültüründe çoğaltılması prensibine dayanır. İlgili gen bölgesinin PCR veya dizileme yoluyla amplifikasyonu gibi genotipik yöntemler, hızlı ve gerçekleştirilmesi kolay olduğundan teşhiste tercih edilen yöntemlerdir, ancak bu yöntemlerle, dirençle ilişkili mutasyonlar ve polimorfizmler arasında ayırım yapmak mümkün değildir. Yeni tespit edilen mutasyonların fenotipini tanımak için fenotipik yöntemler ile karakterizasyon esastır. Fischer ve arkadaşları üç KİT hastasında ortaya çıkan daha önce bilinmeyen üç UL97 mutasyonunu (E596D/Y ve I610T) ve bir UL54 mutasyonunu (D515E) direnç açısından PRA ile fenotipik olarak karakterize etmişlerdir. UL97 I610T ve E596Y mutasyonları ve UL54 D515E mutasyonu GCV dirençliyen, E596D mutasyonu ilaca duyarlı bulunmuştur (100). Antiviral direncin genotipik yöntemlerle tespitinde DNA dizi analizi, real-time PCR ve restriksiyon endonükleaz analizi yöntemleri kullanılmaktadır. CMV ilaç direnci taramasında daha önce real-time PCR, hibridizasyon probu kullanarak tespit veya erime eğrisi analizi gibi çeşitli PCR tasarım platformları kullanılmıştır (90, 101-103). Gohring ve arkadaşları A594V, L595S ve C603W, C607Y UL97 mutasyonlarının eş zamanlı ve yarı kantitatif tespiti için hibridizasyon probu kullanarak gerçekleştirdikleri real-time PCR analizini, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ve dizi analizi ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, PCR'ın GCV direnci ile ilişkilendirilen belirli UL97 nokta mutasyonlarını çok hızlı ve duyarlı bir şekilde tespit ettiği sonucuna varmışlardır. Ek olarak, bu yöntem, bir arada var olan vahşi tip ve mutant suşların farklı oranlarının yarı kantitatif tespitini mümkün kılmıştır (104). Liu ve arkadaşları floresans boyalar kullanarak gerçekleştirdikleri PCR metoduyla direnç taramasında, M460V ve M460I mutasyonlarını RFLP ile kıyaslayan bir çalışma yapmışlardır. Real-time PCR yöntemi,  $10^7$  kopya/ml DNA içindeki %20'den az sıklıkta bulunan mutant DNA'nın tespit edilebilmesine olanak tanımıştır. Bu yaklaşım, direnç varlığını tespit etmek için RFLP kadar duyarlı olmayabilir, ancak yüksek verimlilik ve otomasyon

açısından avantajlar sunmaktadır (105). Chen ve arkadaşları ise UL97 genindeki H520Q ve C603W mutasyonlarını tanımlamak için yüksek çözünürlüklü erime analizi (HRML) kullanarak prob temelli bir PCR testini deneysel ortamda çalışmışlardır ve testin mutant CMV DNA'sını tespit etmede hassas ve güvenilir olduğunu ve GCV dirençli CMV suşlarının tespiti için klinik ortamlarda test edilebileceğini göstermişlerdir. (103). Bu yöntemlerin ana avantajı, %10-%20'den fazla mutant aleli tespit etme sınırlaması olan geleneksel Sanger dizilemesinin aksine, çok küçük miktarlardaki virüs varyantlarının tespit edilebilmelerine olanak sağlayan yüksek duyarlılığa sahip olmalarıdır (102). CMV antiviral ilaç direnci için in vitro tanı amaçlı kullanılan bir PCR kiti piyasada bulunmamaktadır. Biz de çalışmamızda araştırma amaçlı geliştirilmiş olan real-time PCR tabanlı bir kit ile CMV UL97 ve UL54 bölgelerinde seçilmiş belli mutasyonları analiz ederek antiviral ilaç direnci taraması yaptık. Çalışmada prob olarak floresan boyalar kullanıldı. Çalışmada örneklerin işleme alınmasından sonuç verinceye kadar geçen süre birkaç saati aşmamıştır. Dolayısıyla pratik bir şekilde çalışarak aynı gün içinde sonuç verebiliyor olmamız, çalışmamızın diğer antiviral direnç tayini yöntemlerine göre en büyük avantajıdır. Ayrıca PCR yöntemi ile direnç tayini diğer yöntemlere göre daha maliyet etkindir ve deneyimli personel ihtiyacı da daha azdır. Direnç mutasyonlarının büyük bir kısmının seçilmiş belli bölgelerde meydana geliyor olması, PCR tabanlı yöntemlerin diğer yöntemlere ihtiyaç duyulmadan direnç taramasında kullanımının elverişli olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda bakılan C603W, L595S, A987G, L802M, P522S, T700A mutasyonlarında vahşi tip suş pozitif bulundu, hiçbir hastada mutant tip suş saptanmadı. Hiçbir hastada mutasyon saptamamış olmamız PCR ile belli seçilmiş bölgelerden mutasyon analizi yapmamız nedeniyle olabilir. Bu durumda, seçili bölgeler dışında başka mutasyonların olma ihtimali vardır ancak CMV tedavisi verilen bir hasta dışında hastalarımızda GCV ve VGCV' e karşı tedavi cevabı da mevcuttur. Dolayısıyla bu durum, PCR reaksiyonuyla direnç saptanmamış olmasından ziyade, hastalarımızda ilaç direncine neden olabilecek bir mutasyon gelişmemiş olma ihtimalini de düşündürmektedir.

## 6.SONUÇLAR

Sonuç olarak 34 kişilik hasta grubu, 10 kişilik kontrol grubunu içeren toplam 44 hasta ile yapılan bu çalışmada, CMV UL97 ve UL54 bölgelerinden spesifik mutasyonlar real-time PCR yöntemi ile çalışıldı ve hiçbir hastada direnç mutasyonu saptanmadı. PCR testi ile çok düşük sayıda DNA kopyalarının amplifiye edilebilmesi, karışık virüs popülasyonlarının yarı kantitatif olarak analiz edilebilmesi, farklı işaretli boyalarla aynı anda çoklu mutasyonların tespit edilebilmesi, diğer direnç analizi yöntemlerine göre hızlı, pratik ve maliyet etkin oluşu testin önemli avantajlarından. Ülkemizde yapılmış diğer CMV antiviral ilaç direnci araştırmaları dizi analizi yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız real-time-PCR yöntemiyle CMV antiviral ilaç direnci araştırılan Türkiye'deki ilk çalışmadır, ayrıca literatürde de bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar, deneysel çalışmaların ötesine gidememiştir. Çalışmamızda, hastalarda mutasyon saptamamış olmamız seçilmiş belli nokta mutasyonlarını analiz etmemiz nedeniyle olabilir; bu durumda seçili bölgeler dışında mutasyonlar olma ihtimali de mevcuttur. Bu nedenle PCR tabanlı tanı testinin daha fazla mutasyon saptayacak şekilde geliştirilmesi gerektiği, klinik direnç düşünülen, inatçı viremişi olan, tedavi yanıtı olmayan hastalarda daha ileri incelemeler yapılmasının yararlı olacağı sonucuna varıldı. Antiviral ilaç direncinin saptanması, hasta takibinde ve tedavi planlamasında klinisyene yol gösterici olacak, olası mortalite ve morbiditelerin erken dönemde önüne geçilmesini sağlayacaktır.

Bu çalışma, hastanemizde CMV ilaç direncinin rutin olarak çalışılabilmesine yönelik bir ön çalışmadır. Çalışmamızın devamında öncelikle kullanılan kitin eksikliğinin giderilmesi ve dizi analizi ile doğrulamanın gerçekleştirilmesi yönünde çalışma planlanmıştır.

## 7.KAYNAKLAR

1. Haaheim LR, Pattison JR, Whitley RJ. A practical guide to clinical virology: John Wiley & Sons; 2002.
2. Dioverti MV, Razonable RR. Cytomegalovirus. *Microbiology Spectrum*. 2016;4(4):10.1128/microbiolspec.dmh2-0022-2015.
3. Fulkerson HL, Nogalski MT, Collins-McMillen D, Yurochko AD. Overview of Human Cytomegalovirus Pathogenesis. *Methods Mol Biol*. 2021;2244:1-18.
4. Kotton CN. Cytomegalovirus in Solid Organ Transplant Recipients: Prevention, Diagnosis, and Treatment. *Emerging Transplant Infections: Clinical Challenges and Implications*. 2021:547-71.
5. Delice S, Gökahmetoğlu S, Kaynar L, Karakükcü M. Gansiklovir tedavisi alan immün yetmezlikli hastalarda, CMV UL54 ve UL97 gen bölgelerinde gansiklorflvir direncinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2015;49(3):393-402.
6. Razonable RR. Drug-resistant cytomegalovirus: clinical implications of specific mutations. *Curr Opin Organ Transplant*. 2018;23(4):388-94.
7. Chou S. Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. *Antiviral Res*. 2020;176:104711.
8. Martí-Carreras J, Maes P. Human cytomegalovirus genomics and transcriptomics through the lens of next-generation sequencing: revision and future challenges. *Virus Genes*. 2019;55(2):138-64.
9. Riley HD, Jr. History of the cytomegalovirus. *South Med J*. 1997;90(2):184-90.
10. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol*. 2008;197(2):65-73.
11. Sanghavi SK, Rowe DT, Rinaldo CR. Cytomegalovirus, Varicella-Zoster Virus, and Epstein-Barr Virus. *Clinical virology manual*. 2009:454-93.
12. Schottstedt V, Blümel J, Burger R, Drosten C, Gröner A, Gürtler L, et al. Human Cytomegalovirus (HCMV) - Revised. *Transfus Med Hemother*. 2010;37(6):365-75.
13. Hodinka RL. Human cytomegalovirus. *Manual of clinical microbiology*. 2015:1718-37.
14. Gugliesi F, Coscia A, Griffante G, Galitska G, Pasquero S, Albano C, Biolatti M. Where do we Stand after Decades of Studying Human Cytomegalovirus? *Microorganisms*. 2020;8(5).
15. Howley PM, Knipe DM, Cohen JL, Damania BA. *Fields Virology: DNA Viruses*: Wolters Kluwer Health; 2021.
16. Campos AB, Ribeiro J, Boutolleau D, Sousa H. Human cytomegalovirus antiviral drug resistance in hematopoietic stem cell transplantation: current state of the art. *Rev Med Virol*. 2016;26(3):161-82.

17. Muller C, Alain S, Baumert TF, Ligat G, Hantz S. Structures and Divergent Mechanisms in Capsid Maturation and Stabilization Following Genome Packaging of Human Cytomegalovirus and Herpesviruses. *Life (Basel)*. 2021;11(2).
18. Burny W, Liesnard C, Donner C, Marchant A. Epidemiology, pathogenesis and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2004;2(6):881-94.
19. Tyl MD, Betsinger CN, Cristea IM. Virus-host protein interactions as footprints of human cytomegalovirus replication. *Curr Opin Virol*. 2022;52:135-47.
20. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi: Nobel Tıp; 2002.
21. Şencan İ, Taşbakan M, Çağ Y. Sitomegalovirüs Tanı, Tedavi Uzlaşısı Raporu. EKMUD; 2020.
22. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol*. 2015;235(2):288-97.
23. Burrell CJ, Howard CR, Murphy FA. Fenner and White's medical virology: Academic Press; 2016.
24. Danziger-Isakov LA, Sharma T. 17 - Cytomegalovirus. In: Steinbach WJ, Green MD, Michaels MG, Danziger-Isakov LA, Fisher BT, editors. *Pediatric Transplant and Oncology Infectious Diseases*. Philadelphia: Elsevier; 2021. p. 118-25.e3.
25. DAYAN S. ENFEKSİYON HASTALIKLARI TANI VE TEDAVİ EL KİTABI. 2022.
26. Lee H, Oh EJ. Laboratory diagnostic testing for cytomegalovirus infection in solid organ transplant patients. *Korean J Transplant*. 2022;36(1):15-28.
27. Drebber U, Hardt A, Dienes HP, Odenthal M. Zytomegalievirus. *Der Pathologe*. 2011;32(5):418-27.
28. Özsürekci Y, Öncel EK, Ceyhan M. Sitomegalovirusun neden olduğu enfeksiyonlarda tanısal yaklaşımlar ve sorunlar. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 2016;59:182-7.
29. Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets*. 2011;11(5):466-74.
30. Jahan M. Laboratory Diagnosis of CMV Infection: A Review. *Bangladesh Journal of Medical Microbiology*. 2012;4.
31. Cui J, Zhao K, Sun Y, Wen R, Zhang X, Li X, Long B. Diagnosis and treatment for the early stage of cytomegalovirus infection during hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol*. 2022;13:971156.
32. Razonable RR, Inoue N, Pinninti SG, Boppana SB, Lazzarotto T, Gabrielli L, et al. Clinical Diagnostic Testing for Human Cytomegalovirus Infections. *J Infect Dis*. 2020;221(Suppl 1):S74-s85.
33. Saullo JL, Miller RA. Cytomegalovirus Therapy: Role of Letermovir in Prophylaxis and Treatment in Transplant Recipients. *Annu Rev Med*. 2023;74:89-105.
34. Maffini E, Giaccone L, Festuccia M, Brunello L, Busca A, Bruno B. Treatment of CMV infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol*. 2016;9(6):585-96.

35. Zhou X, Jin N, Chen B. Human cytomegalovirus infection: A considerable issue following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Oncol Lett.* 2021;21(4):318.
36. Majewska A, Mlynarczyk-Bonikowska B. 40 Years after the Registration of Acyclovir: Do We Need New Anti-Herpetic Drugs? *Int J Mol Sci.* 2022;23(7).
37. Reischig T, Kacer M. The efficacy and cost-effectiveness of valganciclovir in cytomegalovirus prevention in solid organ transplantation. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 2014;14(6):771-9.
38. Acosta E, Bowlin T, Brooks J, Chiang L, Hussein I, Kimberlin D, et al. Advances in the Development of Therapeutics for Cytomegalovirus Infections. *J Infect Dis.* 2020;221(Suppl 1):S32-s44.
39. Port AD, Orlin A, Kiss S, Patel S, D'Amico DJ, Gupta MP. Cytomegalovirus Retinitis: A Review. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2017;33(4):224-34.
40. Kotton CN. Updates on antiviral drugs for cytomegalovirus prevention and treatment. *Curr Opin Organ Transplant.* 2019;24(4):469-75.
41. Chou S. Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis.* 2015;28(4):293-9.
42. Jakharia N, Howard D, Riedel DJ. CMV Infection in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Prevention and Treatment Strategies. *Curr Treat Options Infect Dis.* 2021;13(3):123-40.
43. Santos Bravo M, Plault N, Sánchez-Palomino S, Rodríguez C, Navarro Gabriel M, Mosquera MM, et al. Genotypic and Phenotypic Study of Antiviral Resistance Mutations in Refractory Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis.* 2022;226(9):1528-36.
44. Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(4):689-712.
45. Strasfeld L, Chou S. Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. *Infect Dis Clin North Am.* 2010;24(2):413-37.
46. Hume J, Sweeney EL, Lowry K, Fraser C, Clark JE, Whiley DM, Irwin AD. Cytomegalovirus in children undergoing haematopoietic stem cell transplantation: a diagnostic and therapeutic approach to antiviral resistance. *Front Pediatr.* 2023;11:1180392.
47. Chou S, Wu J, Song K, Bo T. Novel UL97 drug resistance mutations identified at baseline in a clinical trial of maribavir for resistant or refractory cytomegalovirus infection. *Antiviral Res.* 2019;172:104616.
48. Chou S, Song K, Wu J, Bo T, Crumpacker C. Drug Resistance Mutations and Associated Phenotypes Detected in Clinical Trials of Maribavir for Treatment of Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis.* 2022;226(4):576-84.
49. Chou S, Ercolani RJ, Vanarsdall AL. Differentiated Levels of Ganciclovir Resistance Conferred by Mutations at Codons 591 to 603 of the Cytomegalovirus UL97 Kinase Gene. *J Clin Microbiol.* 2017;55(7):2098-104.

50. Leung PYM, Tran T, Testro A, Paizis K, Kwong J, Whitlam JB. Ganciclovir-resistant post-transplant cytomegalovirus infection due to combined deletion mutation at codons 595-596 of the UL97 gene. *Transpl Infect Dis.* 2019;21(6):e13168.
51. Santos Bravo M, Plault N, Sánchez Palomino S, Mosquera Gutierrez MM, Fernández Avilés F, Suarez Lledo M, et al. Phenotype and Genotype Study of Novel C480F Maribavir-Ganciclovir Cross-Resistance Mutation Detected in Hematopoietic Stem Cell and Solid Organ Transplant Recipients. *J Infect Dis.* 2021;224(6):1024-8.
52. Park KR, Kim YE, Shamim A, Gong S, Choi SH, Kim KK, et al. Analysis of Novel Drug-Resistant Human Cytomegalovirus DNA Polymerase Mutations Reveals the Role of a DNA-Binding Loop in Phosphonoformic Acid Resistance. *Front Microbiol.* 2022;13:771978.
53. Göhring K, Hamprecht K, Jahn G. Antiviral Drug- and Multidrug Resistance in Cytomegalovirus Infected SCT Patients. *Comput Struct Biotechnol J.* 2015;13:153-9.
54. Hakki M. Moving Past Ganciclovir and Foscarnet: Advances in CMV Therapy. *Curr Hematol Malig Rep.* 2020;15(2):90-102.
55. Drouot E, Piret J, Lebel MH, Boivin G. Characterization of multiple cytomegalovirus drug resistance mutations detected in a hematopoietic stem cell transplant recipient by recombinant phenotyping. *J Clin Microbiol.* 2014;52(11):4043-6.
56. Yong MK, Shigle TL, Kim YJ, Carpenter PA, Chemaly RF, Papanicolaou GA. American Society for Transplantation and Cellular Therapy Series: #4 - Cytomegalovirus treatment and management of resistant or refractory infections after hematopoietic cell transplantation. *Transplant Cell Ther.* 2021;27(12):957-67.
57. Guermouche H, Burrel S, Mercier-Darty M, Kofman T, Rogier O, Pawlotsky JM, et al. Characterization of the dynamics of human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs by ultra-deep sequencing. *Antiviral Res.* 2020;173:104647.
58. Van Leer Buter CC, de Voogd DWK, Blokzijl H, de Joode AAE, Berger SP, Verschuuren EAM, Niesters HGM. Antiviral-resistant cytomegalovirus infections in solid organ transplantation in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(8):2370-6.
59. Houldcroft CJ, Bryant JM, Depledge DP, Margetts BK, Simmonds J, Nicolaou S, et al. Detection of Low Frequency Multi-Drug Resistance and Novel Putative Maribavir Resistance in Immunocompromised Pediatric Patients with Cytomegalovirus. *Front Microbiol.* 2016;7:1317.
60. Benzi F, Vanni I, Cassina G, Ugolotti E, Di Marco E, Cirillo C, et al. Detection of ganciclovir resistance mutations by pyrosequencing in HCMV-infected pediatric patients. *J Clin Virol.* 2012;54(1):48-55.
61. Sönmez E. Antiviral Direnç Monitorizasyonu ve Klinik Yararı. 2001.
62. Verma M, Kulshrestha S, Puri A. Genome Sequencing. *Methods Mol Biol.* 2017;1525:3-33.
63. Eren K, Taktakoğlu N, Pirim I. DNA Sequencing Methods: From Past to Present. *Eurasian J Med.* 2022;54(Suppl1):47-56.
64. Kuşkuçcu MA. Virolojide Yeni Teknikler ve Hızlı Moleküler Testler ve Teknikler 2016.

65. Üstek D, ABACI N, SIRMA S, Çakiris A. Yeni nesil DNA dizileme. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi. 2011;1(1):11-8.
66. Valencia C, Husami A, Qian Y, Zhang K. Sanger Sequencing Principles, History, and Landmarks. 2013. p. 3-11.
67. Alp A. Mutasyon Saptama Yöntemleri. Temel Moleküler Tanı Yöntemleri Kursu; Ankara2008. p. 123-7.
68. Recio V, González I, Tarragó D. Cytomegalovirus drug resistance mutations in transplant recipients with suspected resistance. *Virology Journal*. 2023;20(1):153.
69. Fisher CE, Knudsen JL, Lease ED, Jerome KR, Rakita RM, Boeckh M, Limaye AP. Risk factors and outcomes of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(1):57-63.
70. Emery V, Zuckerman M, Jackson G, Aitken C, Osman H, Pagliuca A, et al. Management of cytomegalovirus infection in haemopoietic stem cell transplantation. *British journal of haematology*. 2013;162(1):25-39.
71. Yang S-L, Lin T-W, Lin H-C, Wang H-Y, Chang P-Y, Wang P-N, et al. Molecular Epidemiology of Cytomegalovirus UL97 and UL54 variants in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2021;54(5):971-8.
72. Drew W, Anderson R, Lang W, Miner R, Davis G, Lalezari J. Failure of high-dose oral acyclovir to suppress CMV viraemia or induce ganciclovir-resistant CMV in HIV antibody positive patients. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 1995;8(3):289-91.
73. Göhring K, Wolf D, Bethge W, Mikeler E, Faul C, Vogel W, et al. Dynamics of coexisting HCMV-UL97 and UL54 drug-resistance associated mutations in patients after haematopoietic cell transplantation. *Journal of Clinical Virology*. 2013;57(1):43-9.
74. Komatsu TE, Pikiş A, Naeger LK, Harrington PR. Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: a comprehensive review of putative resistance pathways. *Antiviral research*. 2014;101:12-25.
75. H James S, N Prichard M. The genetic basis of human cytomegalovirus resistance and current trends in antiviral resistance analysis. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*. 2011;11(5):504-13.
76. Green CB, O'Riordan A, Griffiths P, Haque T. A deletion at CMV UL54 codon 524 without co-existing resistance-associated mutation at UL97 confers resistance to ganciclovir: a case report. *Journal of Clinical Virology*. 2016;80:24-6.
77. Iwasenko JM, Scott GM, Ziegler JB, Rawlinson WD. Emergence and persistence of multiple antiviral-resistant CMV strains in a highly immunocompromised child. *Journal of clinical virology*. 2007;40(2):152-5.
78. Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazeron M-C, Garrigue I, Merville P, Mengelle C, et al. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(12):2628-40.

79. Keyvani H, Saroukalaei ST, Mohseni AH. Assessment of the human cytomegalovirus UL97 gene for identification of resistance to ganciclovir in Iranian immunosuppressed patients. *Jundishapur journal of microbiology*. 2016;9(5).
80. Nogueira E, Ozaki KS, Tomiyama H, Granato CF, Camara NO, e Silva AP. The emergence of cytomegalovirus resistance to ganciclovir therapy in kidney transplant recipients. *International immunopharmacology*. 2006;6(13-14):2031-7.
81. Sant'Anna CdC, Migone SRdC, Rocha CAMd, Mello Júnior FAR, Seabra AD, Pontes TB, et al. Research for Cytomegalovirus Mutations Associated With Resistance to Antivirals in Kidney Transplant Receptors. *Cell Transplantation*. 2023;32:09636897231195245.
82. Choi SH, Hwang JY, Park KS, Kim Y, Lee S, Yoo K, et al. The impact of drug-resistant cytomegalovirus in pediatric allogeneic hematopoietic cell transplant recipients: a prospective monitoring of UL 97 and UL 54 gene mutations. *Transplant Infectious Disease*. 2014;16(6):919-29.
83. Baldanti F, Lilleri D, Campanini G, Comolli G, Ridolfo AL, Rusconi S, Gerna G. Human cytomegalovirus double resistance in a donor-positive/recipient-negative lung transplant patient with an impaired CD4-mediated specific immune response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;53(3):536-9.
84. Guiu A, López-Aladid R, Cardeñoso L, Mosquera MM, de la Cámara R, Marcos MA. Study of cytomegalovirus resistance in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Medicina Clínica (English Edition)*. 2020;154(11):433-9.
85. Allaw F, Haddad SF, Zakhour J, Kanj SS. Management of cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Int J Antimicrob Agents*. 2023;62(2):106860.
86. Zhou W, Longmate J, Lacey SF, Palmer JM, Gallez-Hawkins G, Thao L, et al. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood*. 2009;113(25):6465-76.
87. Shmueli E, Or R, Shapira MY, Resnick IB, Caplan O, Bdolah-Abram T, Wolf DG. High rate of cytomegalovirus drug resistance among patients receiving preemptive antiviral treatment after haploidentical stem cell transplantation. *The Journal of infectious diseases*. 2014;209(4):557-61.
88. Kim SJ, Huang Y-T, Foldi J, Lee YJ, Maloy M, Giralt SA, et al. Cytomegalovirus resistance in CD34+-selected hematopoietic cell transplant recipients. *Transplant Infectious Disease*. 2018;20(3):e12881.
89. Allice T, Busca A, Locatelli F, Falda M, Pittaluga F, Ghisetti V. Valganciclovir as pre-emptive therapy for cytomegalovirus infection post-allogeneic stem cell transplantation: implications for the emergence of drug-resistant cytomegalovirus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;63(3):600-8.
90. Castor J, Cook L, Corey L, Jerome KR. Rapid detection directly from patient serum samples of human cytomegalovirus UL97 mutations conferring ganciclovir resistance. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(8):2681-3.

91. Sohrabi M, Behzadian F, Javad Hosseini SM, Lashini H. Molecular Analysis of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus in Renal Transplant Recipients with High Viral Load. *Archives of Iranian Medicine (AIM)*. 2016;19(10).
92. Arslan F, Tabak F, Avşar E, Midilli K, Mert A, Ozaras R, et al. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus encephalitis in a hematopoietic stem cell transplant recipient. *Journal of neurovirology*. 2010;16:174-8.
93. TURHAN A. The first two ganciclovir resistant cytomegalovirus isolates from kidney and pediatric stem cell transplant recipients in Turkey. *Journal of Immunology and Clinical Microbiology*. 2016;1(3):53-7.
94. Coşkun A, Gökahmetoğlu S, Çevik Ş, Karakükcü M, Kaynar L, Midilli K, et al. İmmün yetmezlikli hastalardan elde edilen sitomegalovirüs izolatlarındaki gansiklovir direncinin araştırılması. 2020.
95. Sarınoğlu R, Çolak D, Küpesiz O, Kuşkuç M, Yalçın K, SAĞLIK İ, et al. Investigation of Ganciclovir Resistance in Cytomegalovirus Isolates by Phenotypic and Genotypic Methods Sitomegalovirüs İzolatlarında Gansiklovir Direncinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2023;57(3).
96. Aslani HR, Ziaie S, Salamzadeh J, Zaheri S, Samadian F, Mastoor-Tehrani S. Incidence of Ganciclovir Resistance in CMV-positive Renal Transplant Recipients and its Association with UL97 Gene Mutations. *Iran J Pharm Res*. 2017;16(2):805-10.
97. Yahav D, Gafter-Gvili A, Muchtar E, Skalsky K, Kariv G, Yeshurun M, et al. Antiviral prophylaxis in haematological patients: systematic review and meta-analysis. *European journal of cancer*. 2009;45(18):3131-48.
98. Talarico CL, Burnette TC, Miller WH, Smith SL, Davis MG, Stanat SC, et al. Acyclovir is phosphorylated by the human cytomegalovirus UL97 protein. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(8):1941-6.
99. Erice A, Borrell N, Li W, Miller WJ, Balfour Jr HH. Ganciclovir susceptibilities and analysis of UL97 region in cytomegalovirus (CMV) isolates from bone marrow recipients with CMV disease after antiviral prophylaxis. *Journal of Infectious Diseases*. 1998;178(2):531-4.
100. Fischer L, Sampaio KL, Jahn G, Hamprecht K, Göhring K. Identification of newly detected, drug-related HCMV UL97- and UL54-mutations using a modified plaque reduction assay. *Journal of Clinical Virology*. 2015;69:150-5.
101. Göhring K, Mikeler E, Jahn G, Hamprecht K. Rapid simultaneous detection by real-time PCR of cytomegalovirus UL97 mutations in codons 460 and 520 conferring ganciclovir resistance. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(12):4541-4.
102. Volfova P, Lengerova M, Lochmanova J, Dvorakova D, Ricna D, Palackova M, et al. Detecting human cytomegalovirus drug resistant mutations and monitoring the emergence of resistant strains using real-time PCR. *Journal of Clinical Virology*. 2014;61(2):270-4.

103. Chen XF, Li TR, Yang H, Shao Y, Zhang J, Zhang W, et al. detection of two drug-resistance mutants of the cytomegalovirus by high-resolution melting analysis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2016;30(4):319-25.
104. Göhring K, Mikeler E, Jahn G, Rohde F, Hamprecht K. Rapid semiquantitative real-time PCR for the detection of human cytomegalovirus UL97 mutations conferring ganciclovir resistance. SAGE Publications Sage UK: London, England; 2008.
105. Liu J-b, Zhang Z. Development of SYBR Green I-based real-time PCR assay for detection of drug resistance mutations in cytomegalovirus. *Journal of virological methods*. 2008;149(1):129-35.

## 8.EKLER

EK 1



T.C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ  
Ankara Şehir Hastanesi  
2 Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : E.Kurul-E2-22-2576 No'lu çalışma

Ankara Şehir Hastanesi Tıbbi Biyokimya Kliniği'nde yapılması planlanan; Doç. Dr. Sibel Aydoğan'ın sorumlu araştırmacı olduğu "Klinik Örneklerden İzole Edilen Cytomegalovirus (CMV) Suşlarında Antiviral İlaç Direnci Araştırılması" konulu çalışma incelenmiş olup, Etik açıdan oy birliği ile uygun görülmüştür.

12/10/2022

Prof. Dr. Fuat Emre Canpotat  
2 Nolu Etik Kurul Başkanı

Etik Kurul Sekreterliği Üniversiteler Mah. Bilkent Cad. No:1 Çankaya/Ankara İrtibat; 2nolu Etik Kurul: B.Özkan  
K.Çetindağ  
Tel: 0 (312) 552 66 00 Dahili:721197-721198

EK 2

Evrak Tarih ve Sayısı: 17.10.2022-174782



T.C.  
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
Gülhane Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : E-86241737-100--174782  
Konu : Tez İnceleme ve Değerlendirme  
Akademik Kurulu Kararları

DAĞITIM YERLERİNE

Gülhane Tıp Fakültesi Tez İnceleme ve Değerlendirme Akademik Kurulu 13.10.2022 tarihinde saat 14:00'da Gülhane Tıp Fakültesi Dekan Yardımcısı Doç.Dr.Özhan ÖZDEMİR başkanlığında üyelerin uzaktan dijital ortamda online katılımı ile toplanmıştır.

Toplantıda, Dekanlığımızla afiliye olan SUAM'larda görevli 85 (seksen beş) uzmanlık öğrencisine ait tez incelenerek değerlendirilmiş olup; tezlerle ilgili Ek'teki kararların alınmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim

Prof. Dr. Mehmet Ali GÜLÇELİK  
Dekan

Ek:Kurul Kararı

**Dağıtım:**

Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanlığına  
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı  
Başkanlığına  
Hava ve Uzay Hekimliği Anabilim Dalı  
Başkanlığına  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı  
Başkanlığına  
Kardiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığına  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığına  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığına  
Ankara Atatürk Sanatoryum Sağlık Uygulama ve  
Araştırma Merkezi Müdürlüğüne  
Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Sağlık  
Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğüne  
Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji  
Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : \*BSE56PLTY0\* Pin Kodu : 82082

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys>

Adres: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Yerleşkesi Emrah Mah. 0618

Etlik/Keçiören/ANKARA

Telefon: 0 312 304 61 73 Faks: 0 312 304 61 90

Web: <http://sbu.edu.tr>

Keş Adresi: [sbu@hs01.kep.tr](mailto:sbu@hs01.kep.tr)

Bilgi için: Levent YILDIRIM

Unvanı: Uzman

