

**T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU**

**Kemik İliği Transplantasyonu Yapılan Hastalarda Sitomegalovirus Enfeksiyonunun Saptanmasında
Farklı Moleküler Yöntemlerin Karşılaştırılması**

**Prof. Dr. T. Murat Özsan
Proje No: 20030809112
25/04/2003
25/01/2004
Rapor Tarihi: 25.02.2004**

**Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - 2003**

RAPOR FORMATI

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

II. Amaç ve Kapsam

III. Materyal ve Yöntem

IV. Analiz ve Bulgular

V. Sonuç ve Öneriler

VI. Kaynaklar

VII. Ekler

- a) Mali Bilanço ve Açıklamaları
- b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar (BAP Demirbaş numaraları dahil)
- c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)
- d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar)
- e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler

NOT :Verilen kesin rapor 2 nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, kesin rapor Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD veya disket ile verilecektir.

I.Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri:

Kemik İliği Transplantasyonu Yapılan Hastalarda Sitomegalovirus Enfeksiyonunun Saptanmasında Farklı Moleküler Yöntemlerin Karşılaştırılması

ÖZET

KİT sürecinin bir parçası olan ilaç ve ışın uygulamaları bağışıklığın baskılanmasına neden olmaktadır. Bundan dolayı sağlıklı bir bireyde belirtisiz ya da çok hafif enfeksiyona neden olabilen etkenler, bağışıklığı baskılanmış olan bu hastalarda ciddi ve ölümcül enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Bu hastaların sayısının KİT ve diğer nedenlerle her geçen gün artmasıyla enfeksiyonlarla savaşımın önemi de giderek artmaktadır.

KİT sonrasında karşılaşılabilecek enfeksiyonlar arasında HCMV enfeksiyonu, sıklığı nedeniyle özel önem taşımaktadır. KİT alıcılarında nakil sonrasında özellikle ilk yüz gün içinde HCMV enfeksiyonu sık olarak görülmektedir. HCMV'nin bu hastalarda yol açtığı pnömoninin mortalite oranı da yüksektir.

KİT yapılan tüm hastalara profilaktik olarak antiviral ilaç verilmesi maliyet-etki oranı açısından uygun olmadığı gibi, antiviral ilaçların ciddi yan etkilere sahip olması nedeniyle de sakıncalıdır. Bundan dolayı, klinik belirtilerin ortaya çıkmadığı erken dönemlerde enfeksiyonun saptanabilmesini sağlayacak daha duyarlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesi, uygun hastaya doğru zamanda antiviral tedavinin başlanmasını sağlaması bakımından önemlidir. Daha güvenilir ve hastalık gelişimi konusunda uyarıcı testlere olan gereksinim nedeniyle araştırmacılar doğrudan virüs mRNA'sını saptamaya yönelmişler ve mRNA transkripsiyonu yapan aktif virüsü, latent olandan ayırt etmeye çalışmışlardır.

Çalışmamızda, kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda HCMV' nin tanısında rutin amaçla kullanılan Hybrid Capture ile viral mRNA transkriptini saptayan böylece yalnızca aktif virüsü gösterdiği ileri sürülen RT-PCR yöntemlerini karşılaştırmak ve hasta grubumuzda HCMV enfeksiyonu ve klinik bulgu gösteren

HCMV hastalığı oranlarını ortaya koyarak, epidemiyolojik verilere katkıda bulunmayı amaçladık. RT-PCR yönteminde hedef bölge olarak bir geç gen transkribi olan UL21.5 mRNA' sını seçtik.

Bu amaçla Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı KİT ünitesinde Ocak 2003-Eylül 2004 tarihleri arasında KİT yapılan 35 hastaya ait 178 kan örneği incelendi. Hastaların 12'sinde (%34,3) Hybrid Capture testiyle en az bir kan örneğinde HCMV enfeksiyonu saptandı. Periferik kandan KİT uygulanan HCMV pozitif hastalarda ortalama pozitifleşme süresi 121,8 gün, kemik iliğinden KİT uygulanan 5 hastada ise 45,6 gün olarak bulundu. Bu değerler arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p= 0,05$). HCMV enfeksiyonu saptanan 12 hastanın 2 tanesinde (% 16,6) içinde HCMV hastalığı tanısı konuldu. Tüm olgular içinde HCMV hastalık sıklığı ise %5,71 olarak bulundu. RT-PCR yöntemiyle 4 hastaya ait toplam 5 örnekte mRNA varlığı saptandı. Hybrid Capture testini altın standart olarak kabul ettiğimizde RT-PCR'in duyarlılığı % 33, özgünlüğü % 100, yanlış negatifliği % 67, yanlış pozitifliği % 0, PPD' i % 100 , NPD' i % 74 ve doğru sınıflamasını (accuracy) % 77 olarak bulundu. Kök hücresi kemik iliği kaynaklı olan hastalarda enfeksiyon oranı periferik kan kökenli olanlara göre daha yüksek bulunmakla birlikte bu durum anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). Ayrıca hastalarının ortalama pik değerleri açısından GVHD gelişen ve gelişmeyen HCMV enfeksiyonlu hastaların arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). HCMV'nin ortalama ortaya çıkış süresi arasında GVHD gelişen ve gelişmeyen hastalar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Buna ek olarak HCMV enfeksiyonu varlığında GVHD' nin daha yüksek oranda geliştiği saptanmakla birlikte, bu oranlar arasında da anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

ANAHTAR SÖZCÜKLER: İnsan Sitomegalovirüsü, Hybrid Capture, RT-PCR , Allojenik kemik iliği transplantasyonu, mRNA,

Comparison of different laboratory methods for the detection of cytomegalovirus infection in bone marrow transplant patients

SUMMARY

Chemotherapy and radiotherapy which are parts of the bone marrow transplantation(BMT) procedure, are known to cause immunosuppression. In this patient population opportunistic infectious agents may cause severe or lethal infections while making asymptomatic or mild infections in the normal host. Among the post transplant infections, HCMV has a special importance with its high prevalence. HCMV infection is highly seen in BMT recipients especially in the first 100 days. The mortality rate of HCMV pneumonia in this patient group is also high.

To start antiviral therapy to all BMT recipients is not suitable for cost/effective ratio and adverse effects of these antivirals. So, developing more sensitive diagnostic methods which are able to detect the virus in earlier periods of infection, before the onset of clinical disease, would provide starting the therapy to the right patient in the right time. Many researches have been oriented to the detection of viral mRNA for the need of developing more secure and disease specific tests differentiating active and latent viruses.

In our study, we aimed to compare RT-PCR targeting a replication specific mRNA with Hybrid Capture Test and to contribute to epidemiological data by evaluating the HCMV infection and disease rates. The target of RT-PCR was UL21.5, a late HCMV gene transcript.

We evaluated 178 blood samples of 35 allogeneic BMT recipients who are transplanted in Ankara University Medical Faculty, Hematology Department, BMT Unit. HCMV infection was detected in 12 (%34,3) patients. The mean HCMV detection day post transplantation was 121.8 days among peripheral stem cell recipients and 45.6 days among bone marrow recipients. The differences were found

significant ($p=0.05$). Among HCMV infected patients, two patients had HCMV disease(%16,6). We found mRNA in 5 samples of 4 patients by RT-PCR.

We have found the sensitivity, specificity, wrong negativity, wrong positivity, PPD, NPD and accuracy of RT-PCR were; %33, %100, %67, %0, %100, %74 and %77 respectively. The infection rate of bone marrow recipients was higher than peripheral stem cell recipients but the values were not significant ($p>0,05$).The difference between the mean peak values of HCMV infected GVHD (+) and (-) patients were not significant. The difference of mean HCMV detection time between GVHD (+) and (-) group were not significant.

II. Amaç ve Kapsam

Geçtiğimiz yüzyılda sağlık alanında büyük atılımlar görülmüş, bilim ve teknolojiyle birlikte gelişen tıp uygulamaları ile ortalama insan ömrü uzamış, yaşam kalitesi artmış, çaresiz kabul edilen hastalıklara çareler bulunmuştur. Ne var ki bu yeni tedavi yöntemleri tıbbın karşısına yepyeni sorunlar çıkarmıştır (Stearns, 1993).

Organ ve doku nakilleri geçtiğimiz yüzyılda uygulanmaya başlanan yeni tedavi yöntemlerinden olup, çeşitli hasta gruplarında ölüm oranının ve morbiditenin azalmasına katkıda bulunmuştur. Bununla birlikte nakil sürecinin bir parçası olan kemoterapi ve radyoterapi bağışıklığın baskılanması gibi yeni bir sorunu gündeme getirmiştir (Stearns,1993; Boriskin ve ark., 2002).

Sağlıklı bir bireyde belirtisiz ya da çok hafif enfeksiyona neden olabilen etkenler, organ ya da doku nakli nedeniyle bağışıklığı baskılanmış olan hasta gruplarında ciddi ve ölümcül enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Bağışıklığı baskılanmış bireylerin sayısının nakil ve kemoterapi, kanser vb. nedenlerle her geçen gün artmasıyla enfeksiyonlarla savaşımın önemi de giderek artmaktadır (Stearns, 1993; Landolfo, 2003).

Kemik iliği transplantasyonu (KİT) da uygulanan kemoterapi ve ışın tedavisine bağlı olarak bağışıklığın baskılandığı ve bu nedenle fırsatçı enfeksiyonların sık olarak

görüldüğü bir tedavi yöntemidir. KİT sonrasında karşılaşılabilecek infeksiyonlar arasında insan sitomegalovirüs (HCMV) infeksiyonu, sıklığı nedeniyle özel önem taşımaktadır (Apperley ve Goldman, 1988). Seropozitif ya da vericisi seropozitif kendisi seronegatif olan KİT alıcılarında nakil sonrasında özellikle ilk yüz gün içinde % 32-70 oranında HCMV infeksiyonu görülmektedir. İnfeksiyon gelişen hastaların da % 30-40'nda interstisyel pnömoni meydana gelmektedir. HCMV'nin bu hastalarda yol açtığı pnömoninin mortalite oranı ise % 50-95 arasındadır (Einsele ve ark., 2000).

KİT yapılan tüm hastalara profilaktik olarak antiviral ilaç verilmesi maliyet-etki oranı açısından uygun olmadığı gibi antiviral ilaçların ciddi yan etkilere sahip olması nedeniyle de sakıncalıdır (Einsele ve ark., 2000; Meyers ve ark., 1990). Bundan dolayı klinik belirtilerin ortaya çıkmadığı erken dönemlerde infeksiyonun saptanabilmesini sağlayacak daha duyarlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesi uygun hastaya doğru zamanda antiviral tedavinin başlanmasını sağlayacağı için önemlidir (Singh ve ark., 2001; Kanda ve ark., 1998; Gerna ve ark., 1999).

Virüsün varlığının gösterilmesi, hücre kültürü yöntemlerinin yavaşlığı ve zahmetli oluşu nedeniyle, sıklıkla hücre yüzeyindeki viral antijenlerin saptanmasına dayanan antijenemi testi ve virüs DNA'sının gösterilmesine dayanan Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR) ve hibridizasyon yöntemleriyle yapılmaktadır. PCR yönteminin geliştirilmesiyle virüsün nicel (kantitatif) olarak gösterilmesi sağlanmış, bu durum da teste üstünlük kazandırmıştır. Buna karşın aktif virüsün yanında latent virüs DNA'sı da PCR ile pozitif olarak yorumlanacağı için bu yöntemin bazı sakıncaları bulunmaktadır. Viremik hastaların önemli bir grubunda HCMV hastalığı gelişmemesi nedeniyle, yüksek duyarlılığa sahip bu yöntemlerin hiçbiri tam olarak güvenilir değildir (Gerna ve ark., 1999; Mocarski ve ark., 2001).

Daha güvenilir ve hastalık gelişimi konusunda uyarıcı testlere olan gereksinim nedeniyle araştırmacılar doğrudan virüs mRNA'sını saptamaya yönelmişlerdir. Böylece mRNA transkripsiyonu yapan aktif virüs, latent olandan ayırt edilmeye çalışılmıştır (Boriskin ve ark., 2002).

Bizim çalışmamızın amacı, KİT yapılan hastalarda önemli bir mortalite nedeni olan HCMV' nin tanısında rutin amaçla kullanılan Hybrid Capture yöntemi ile viral mRNA transkriptini saptayan, böylece yalnızca aktif virüsü gösterdiği ileri sürülen revers transkriptaz PCR (RT-PCR) yöntemlerini karşılaştırmak ve hasta grubumuzda; HCMV enfeksiyonu ve klinik bulgu gösteren HCMV hastalığı oranlarını ortaya koyarak, epidemiyolojik verilere katkıda bulunmaktır.

III. Materyal ve Yöntem

3.1.Hastalar ve Kan Örneklerinin Alınması

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı KİT Ünitesinde Ocak 2003-Eylül 2003 tarihleri arasında KİT yapılan 35 adet hastaya ait 178 kan örneği incelendi. Çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulunca onaylandı ve her hastadan bilgilendirilmiş onay alındı.

Tüm hastalardan kan örnekleri periyodik olarak etilendiamintetraasetikasit (EDTA) 'lı iki tüpe beşer ml. olmak üzere alındı. Tüplerden birisi 'Hybrid Capture' testi, diğeri ise RT-PCR için kullanıldı.

Kan örnekleri KİT ünitesinde alındıktan sonra, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirilerek hem Hybrid Capture hem de RT-PCR için aynı gün içerisinde işleme başlandı.

3.2.Hybrid Capture yöntemiyle CMV DNA'sının saptanması

Bu test kemoluminosans (bir kimyasal tepkime sonucu ışığın ortaya çıkması) saptamaya dayanan bir nükleik asit hibridizasyon yöntemidir ve üretici firmanın yönergesi doğrultusunda uygulanmıştır (Digene Manual, 2002):

1. Örneğin Hazırlanması: Kan örneği gelir gelmez, 15 ml. steril plastik santrifüj tüpüne 10 ml % 10'luk 4°C'deki liziz tamponu konuldu, üzerine 3,5 ml EDTA'lı tam kan eklendi, karıştırıldı ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildi
2. Lizat 1000 x g de 15 dk çevrildi. Süpernatant ters çevirip döküldü. Tüpte kalan damlalar dipteki katı katmana dokunmadan steril pastör pipetiyle alındı

3. Hücre çökeltisine 1,5 ml % 10'luk lizis tamponu eklendi. Pipetleme yapılarak çözelti haline getirildi. Hibridleme tüpüne aktarılıp 10 dk beklenildi .
4. 1000 x g de 10 dk santrifüj edilip sıvı döküldü. Tüpte kalan damlalar 200 µl'lik pipetle alındı.
5. Beyaz hücre çökeltisi vortekslendi ve daha sonra çalışmak üzere -20°C' lik derin dondurucuya konuldu. Çalışma yapılacağı gün örnekler derin dondurucudan çıkarılarak oda sıcaklığına getirildi.
6. Denaturasyon: 75µl Sample diluent ve 50 µl denaturasyon reagent'ı yalnızca örnek tüplerine konuldu ve vortekslendi.
7. Negatif ve pozitif kontrol, Standard 1, 2, 3' den 100 µl kendi tüplerinin dibine konuldu,. Standard ve kontrollere 50'şer µl denaturation reagent eklenildi.
8. Örnekler ve standartlar 1100 rpm de 5 ± 2 dk çalkalayıcıya konuldu .Standart ve kontrollerin koyu mor, örneklerin mor-yeşilimsi renk aldığı görüldü
9. Materyaller 25 ± 5 dk. süreyle $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de su banyosunda bekletildi.
10. Su banyosundan örnekler alınıp, yeni tüplere aktarıldı
11. Örnekler yeniden 25 ± 5 dk. süreyle su banyosuna konuldu.
12. Hibridleme: Her tüpe 50 µl prob karışımını tüpün tam dibine gelecek şekilde konuldu. 1100 rpm ± 100 'de 3 ± 2 dk süreyle çalkalandı. Kontroller ve örneklerin sarıya döndüğü görüldü.
13. Materyal Çalkalayıcıdan alınıp, su banyosunda 120 ± 5 dk süreyle bekletildi
14. Yakalama: Su banyosundan tüpler alınıp 5 dakika soğuması için bekletildi. Hibridleme tüplerindeki sıvılar, kendi numarasındaki yakalama tüplerine aktarıldı. Üstleri parafilmle kapatılıp 1100 rpm'de 60 ± 5 dk süreyle çalkalandı.
15. Yakalama tüpleri ters çevrildi, sallanıp kurutma kağıdı üzerinde diplerine 2-3 kez vuruldu.
16. Hibridleri Saptama: Her tüpe Detection Reagent 1'den 250 µl konuldu. Parafilmle kapatılıp tüpler ileri geri çapraz sağa sola sallandı. Oda sıcaklığında 30 ± 3 dk bekletildi.
17. Yıkama: Tüpler ters çevrilip sallandı. Yıkama tamponu, her tüpe taşacak şekilde konuldu. Sonra tüp içeriği lavaboya dökülerek sallandı. Bu işlem 5 kez yinelendi.
18. Tüpler kurutma kağıdının üstünde ters çevrilip 5 dk. bekletildi.

19. Her tüpe okunma sırasına göre 250 µl detection reagent 2 konuldu. Parafilmle kapatılıp, 30±3 dk süreyle oda sıcaklığında bekletildi.

20. Okuma: Tüpler nemli gazlı bezle ıslatılarak luminometrede okutuldu.

Testin Değerlendirilmesi ise şu şekilde yapıldı:

Pozitif Cut off değeri negatif kontrollerin RLU (Relative Light Unit, Göreceli Işık Birimi) değerlerinin ortalamasının 2 katı olarak alındı.

Işıma değeri (RLU) \geq Pozitif cut off değeri olan örnekler, pozitif olarak değerlendirildi. RLU değeri, pozitif cut off değerinden küçük olup pozitif cut off değerinin % 75'inden büyük eşit olan örnekler, şüpheli pozitif olarak değerlendirildi ve bu durumda aynı hastaya ait başka bir kan örneği ile ertesi hafta test yineleni.

RLU değeri, pozitif cut off değerinin % 75' inin altında olan örneklerin, testin saptama sınırının altında CMV DNA'sı içerdiği ya da hiç içermediği kabul edildi ve negatif olarak değerlendirildi.

Testteki toplam CMV DNA sayısı, testte bildirilen pg / ml değeri X 2410 formülüne göre hesaplandı. Kullanılan kan hacmi 3,5 ml olduğu için CMV konsantrasyonu; testteki toplam CMV DNA sayısı / 3,5 formülüne göre, ml' de değer olarak hesaplandı.

3.3.RT-PCR yöntemi:

3.3.1.Mononükleer hücrelerin elde edilmesi

Mononükleer hücrelerin elde edilmesi için Histopaque 1119 (Sigma) kullanıldı.

İşlem aşağıda belirtilen protokole göre yapıldı (Nelson ve ark., 1996).

a. EDTA'lı 5 ml kadar kan gelir gelmez 5 ml fizyolojik tuzlu su (FTS) ile karıştırıldı.

b. 15 ml'lik plastik santrifüj tüpüne 3 ml Hitopaque 1119 konuldu.

- c. Karışım 3 ml Histopaque 1119 solusyonu üzerine plastik pastör pipeti ya da enjektörle yavaşça döküldü. İki çözelti arasında keskin sınır olmasına dikkat edildi.
- d. Karışım 2300 rpm'de 30 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi ve frensiz olarak durduruldu.
- e. Üstteki mononükleer hücre katmanı alındı 10 ml FTS ile karıştırılarak 10 dk 400 x g' de çevrildi. Süpernatant döküldükten sonra alttaki çökelti kısmı 500 µl. FTS ile çözelti haline getirildi.

3.3.2. RNA izolasyonu

Elde edilen mononükleer hücrelerden RNA izolasyonu kan hücrelerinden RNA izolasyonu özelliğine sahip kit (QIAMP Blood Mini Kit-Quiagen) kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntem üretici firmanın yönergesine göre uygulandı (QIAamp RNA Blood Mini Handbook,2002). Özetle;

1. Elde edilmiş olan çözültide mononükleer hücreler Thoma lamında sayılarak 1×10^7 ' den az sayıda hücre olması için gerekirse FTS ile sulandırma yapıldı.
2. Çözelti 400 x g'de +4°C' de santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
3. Hücre çökeltisinin üzerine 600 µl liziz tamponu konuldu, vortekslenildi.
4. Lizat homojenizasyon kolonuna konularak 8000 rpm'de 2 dk çevrildi, kolon atıldı.
5. Homojenize edilen lizatin üzerine 600 µl %70 alkol eklendi, ardından silika-jel içeren kolona aktarıldı.
6. 8000 g' de 15 sn çevrildi, alttaki filtrat döküldü
7. Kolonun üzerine 700 µl RW1 tuz çözeltisi eklendi, 15 sn 8000 x g' de santrifüj edildi.
8. Filtrat atıldı, alkol içeren RPE tamponundan 500 µl eklendi, 8000 x g'de 15 sn çevrildi.
9. 500 µl RPE tamponu eklendi, 20000 x g' de 3 dk çevrildi.
10. Kolon santrifüj tüpüne aktarıldı, 30 µl RNase içermeyen su kolonun üzerine konuldu.
11. 8000 x g' de 1 dk. santrifüj edildi.

12. Tüpe geçen RNA çözeltisi -80°C ' de saklandı.

Bu yöntem RNA'nın silika jel yapısında bir zara bağlanmasını temel alır. İşlem sırasında hücreler lizisle parçalanır, ortamdaki RNase' lar denatüre edilerek etkisizleştirilir ve diğer moleküllerle birlikte RNA'nın açığa çıkması sağlanır. Daha sonra ortama etanol eklenerek RNA'nın bağlanma özelliği artırılır. Elde edilen çözelti spin kolona yüklenerek RNA'nın santrifüj sonrası ortamdaki tüp içindeki silika-jel yapısındaki membrana bağlanması sağlanır. Kontaminan maddeler yıkama yoluyla membrandan uzaklaştırılır. Toplam RNA 30 μl RNase içermeyen suda çözülerek -80°C 'de saklanır.

3.3.3.RNA'nın cDNA'ya çevrimi

Elde edilen RNA, ters transkriptaz enzimi kullanılarak DNA'ya çevrilmiştir. Bu amaçla ters transkriptaz enzimi ve tampon çözeltisi içeren laboratuvar kiti (Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit-Fermentas) kullanılmış ve yöntem üretici firmanın yönergesi doğrultusunda yapılmıştır (Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit Manual, Fermentas, 2000). Özetle;

1. RNA çözeltisi -80°C 'den alınarak buz üzerine konuldu
2. Spektrofotometrede ölçüm yapılarak 0,1-5 μg RNA içerecek hacimde çözelti alındı
3. Üzerine 1 μl random hexamer primeri ve toplam hacmi 12 μl ' ye tamamlayacak kadar distile su eklendi.
4. Çözelti karıştırıldı ve 70°C 'de 5 dk bekletilerek buza konuldu, soğuduktan sonra santrifüj edildi.
5. Buz üzerinde konularak sırasıyla, 4 μl 5X tepkime tamponu, 1 μl ribonükleaz inhibitörü, 2 μl dNTP karışımı eklendi
6. Karışım santrifüj edilerek 25°C ' de 5 dk bekletildi
7. 1 μl revers transkriptaz eklenerek 25°C 'de 10 dk ardından 42°C ' de 60 dk ve 70°C ' de 10 dk bekletilip, buza konuldu.
8. Elde edilen cDNA -20°C ' de saklandı.

Bu yöntemde random heksamer primerleri ile RNA dizisi üzerindeki özgün olmayan noktalardan cDNA sentezi başlatılarak tüm RNA'nın kalıp olarak kullanılması sağlanmıştır.

3.3.4. cDNA varlığının doğrulanması

Revers Transkripsiyon basamağından sonra elde edilen örneklerdeki cDNA varlığı önceden tanımlandığı biçimde gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz primerleri kullanılarak PCR ile doğrulandı (Mizuno ve ark., 2001). Bu basamakta kullanılan primer dizileri şu şekildeydi:

a. 5'- TTCCCGTTCAGCTCAGGATGACCTTGCCC-3' ve

b. 5'- AAGGCTGAGAACGAAGCTTGTCATCAAT-3'.

Reaksiyon 10 mM Tris HCl, 50mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ ve 0,5 U Taq polimeraz (Fermentas) varlığında gerçekleştirildi.

Termal döngü koşulları şu şekildeydi: 94°C'de 5 dk, 26 döngü boyunca 94°C 30 sn, 55°C 30 sn, 72°C 60 sn ve sonra 72°C 10 dk.

Elde edilen PCR ürünü Thermal Cycler'dan çıkarılarak (Techne) 3.7. basamakta tanımlandığı gibi agaroz jelde yürütülerek, 500 bp'lik ampikon varlığına bakıldı.

3.3.5.Nested PCR

PCR'in özgünlüğünü artırmak için geliştirilmiş olan bu yöntemde, aynı bölge için iki çift primer kullanılır. İlk primer çiftinin çoğalttığı ürüne ikinci reaksiyonda diğer primer çifti bağlanarak daha kısa bir PCR ürünü oluşturur. Böylece ilk reaksiyonda yanlışlıkla çoğaltılan bölgenin ikinci reaksiyonda elenmesi sağlanır.

Bu çalışmada nested PCR için kullanılan hedef, CMV'nin geç genlerinden birisine ait bir bölgedir. Bu bölge virüs genomunun UL parçasının 27080. bazından başlar

27277. bazına dek uzanır. Bu gen bölgesi hücre içindeki koşullarda transkribe olduktan sonra 83 bp uzunluğunda bulunan intron dilimlenme (splicing) işlemi ile transkriptten çıkarılır. Bu işlemden geçtikten sonra oluşan transkript işlevsel halini almıştır. İşte bu genin dilimlenmemiş uzunluğu 258 bp iken, dilimlenmiş kesilmiş kısmı 175 bp uzunluğundadır. Burada dilimlenmemiş ve dilimlenmiş bölgeyi ayırt edecek şekilde geliştirilen dış ve iç primer dizileri kullanılarak nested PCR daha önce bildirildiği biçimde uygulandı (Nelson ve ark. 1996). Buna göre primer dizileri :

SLG1: 5'-CTATGGATCTTGAGCTTACT-3'

SLG2: 5'-TCGCTGCCATCTCCGTCTGT-3'

SLG3:5'-GTGACCTTGACGGTGGCTTT-3'

SLG4 5'-CGTCATACTCCCCGGAGTAA-3' şeklindeydi.

50 µl tepkime hacminde gerçekleşen her iki PCR aşamasının da döngü koşulları şu şekilde yapıldı: 94⁰C 1 dk, 55⁰C 2 dk, 72⁰C 3 dk' lık 30 döngü ardından 72⁰C 7 dk' lık son uzatma aşaması. Termal döngüler 10 mM Tris HCl, 50mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ ve 0,5 U Taq polimeraz (Fermentas) varlığında gerçekleştirildi. İlk aşamanın PCR ürününden 1 µl ikinci aşamanın tepkime karışımına eklendi. Her örnek iki kez çalışmaya alındı.

3.7.Elektroforez

%2'lik agaroz jel hazırlandı. Jelin katı hal almasını takiben elektroforez tankına (Blue Marine 100, Boehringer Ingelheim Bioproducts) yerleştirildi ve elde edilen kuyucuklara 15 µl DNA, yükleme tamponuyla (6 X agarose gel loading dye, Amresco) karıştırılarak yerleştirildi. 200V'da 10 dakika boyunca PCR ürünleri jel boyunca elektroforez tankında yürütüldü. Karşılaştırma amacıyla moleküler ağırlık belirleyicisi (Fermentas Gene RulerTM 50bp DNA ladder) kullanıldı. Üreticinin yönergesi doğrultusunda hazırlanan moleküler ağırlık belirleyici çözeltisi jele yüklendi (Fermentas Gene RulerTM 50bp DNA ladder Manual, 2000). Elektroforez sonrası markırın oluşturduğu bantlar sırasıyla şu bp'leri göstermekteydi: 50-100-150-200-250-300-400-500-600-700-800-900-1031. Bunun dışında steril su negatif

kontrol olarak kullanıldı. Jelin boyanması üretici firmanın tanımladığı biçimde gerçekleştirildi (SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain, Roche, 1999). Ardından jel tanktan alınarak, Tris Borat EDTA (TBE) tamponu içinde 10.000 kat sulandırılmış olan SYBR green I boyası (Roche) jeli kaplayacak kadar jelin üstüne döküldü ve alüminyum folyoyle karanlık ortam sağlanarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu şekilde boyanan jel 254 nm.'lik UV transluminator cihazında (Vilber Lourmet) incelendi. Hedef bölgeye ait RNA varlığı 175 bp uzunluğuna denk gelen noktada bir bant olarak görüldü.

IV. Analiz ve Bulgular

Hastaların Özellikleri:

Çalışmaya yaşları 19 ile 47 arasında (yaş ortalaması 35), 18'i kadın, 17'si erkek olmak üzere toplam 35 allojenik KİT hastası alındı. Bu hastaların kök hücre kaynağı 23'ünde (% 65,7) periferik kan, 12'sinde (% 34,3) ise kemik iliği idi. Kan kökenli kök hücre alan hastaların 12'si kadın (% 52,2) 11'i (% 47,8) erkekti.

Hastaların tanıları ise şu şekildeydi: akut myeloblastik lösemi (AML, n:17), kronik myelositer lösemi (KML, n:9), myelodisplastik sendrom (MDS, n:2), Hodgkin hastalığı (HH, n:3), non-Hodgkin lenfoma (NHL, n:1), renal hücreli karsinom (RCC, n:1), multiple myelom (MM, n:1), meme kanseri (n:1) idi. AML'li hastalar % 48,6 ile en büyük grubu oluşturmaktaydı. Bu grubun ardından % 25,7 ile KML grubu gelmekteydi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1:KİT hastalarının tanıları

Hastalık	Hasta sayısı(n=35), (%)
AML	17 (% 48,6)
KML	9 (% 25,7)
MDS	2 (% 5,7)
HH	3 (% 8,5)
NHL	1 (% 2,8)

RCC	1 (% 2,8)
MM	1 (% 2,8)
Meme Kanseri	1 (% 2,8)

Hastaların tümünde nakil öncesi CMV IgG pozitif ve IgM negatif idi. Vericilerin ise hepsinde IgM negatif, yalnızca bir hastanınki dışında IgG pozitif idi.

Hastaların 8'i (% 22,9) çalışma sırasında öldü. Bu hastaların 6 'sı CMV negatif 2'si ise CMV pozitif hastalar olup, tümünün kök hücre kaynağı periferik kandı. İki hastanın ölüm nedeni CMV pnömonisi iken, diğer ölüm nedenleri; GVHD, sepsis, trombotik trombositopenik purpura ve primer hastalığın rekürensi idi.

Digene Hybrid Capture Testi Sonuçları:

35 hastaya ait 178 kan örneği çalışıldı. Allojenik KİT hastalarına ait örneklerin 113'ü kan kökenli , 65'i ise kemik iliği kökenli transplant hastalarına aitti.

35 hastanın 12'sinde (% 34,3) Hybrid Capture testiyle en az bir kan örneğinde CMV enfeksiyonu saptandı. Pozitif örnek sayısı her bir enfeksiyonlu hasta için 1 ile 5 arasında değişti

Nakil türüne göre bakıldığında 23 periferik kan nakilli hastanın 7'sinde (% 30,4) ve 12 kemik iliği kökenli nakil hastasının 5'inde (% 41,7) CMV enfeksiyonu saptandı. Kemik iliği kaynaklı kök hücre alan hastalarda enfeksiyon oranı daha yüksek bulunmakla birlikte bu durum Fisher's Exact Test ile anlamlı bulunmadı ($p > 0,005$). (Tablo 4.2.a).

Tablo 4.2.a: Kök hücre kökenine göre CMV enfeksiyonu sıklığı

	Periferik Kan	Kemik İliği	Toplam
CMV	7 (% 30,4)	5 (% 41,7)	12

infeksiyonu (+)			
CMV infeksiyonu (-)	16 (% 69,6)	7(% 58,3)	23
Toplam	23	12	35

CMV infeksiyonu saptanmayan 23 hastanın 8'inde en az bir örnekte şüpheli pozitiflik saptandı. Genel olarak baktığımızda 152 negatif, 26 şüpheli pozitif ve 26 pozitif örnek olduğu görüldü. CMV infeksiyonu saptanan hastalar preemptive gansiklovir tedavisi aldılar.

Toplam 12 CMV infeksiyonlu hastada, ilk pozitif değerlerin transplantasyon sonrası ortalama 90 günde ortaya çıktığı saptandı (en erken 15 en geç 220 gün). 12 hastanın beşinde 100. günden sonra, ikisinde 30. günden önce CMV infeksiyonunun ortaya çıktığı görüldü. Bu iki hastanın da nakil dokusu kemik iliği idi.

İlk CMV pozitifliğinin nakil sonrası çıkış süresinin kan ve kemik iliği kökenli allojenik KİT' de fark edip etmediğinin incelenmesi sonucunda, kandan allojenik ilik alan 7 hastada ortalama pozitifleşme süresi 121,8 gün (en az 32 en çok 220 gün), kemik iliğinden doku alan 5 hastada ise ortalama 45,6 gün (en az 15 en çok 120 gün) olarak saptandı. Bu değerler Mann-Whitney U testi ile değerlendirildiğinde anlamlı fark olduğu görüldü (p=0,05).

Virüs titreleri tüm hastalar için 0 ile 830 pg /ml arasında değişmekteydi. CMV infeksiyonlu hastalarda pik virüs titresi 15-830 pg /ml arasındaydı ve ortalamaları 263,5 pg /ml bulundu.

Nakil kaynağı ile virüs yükü pik değerleri incelendiğinde, ortalama pik değerleri kan kökenli 7 hastada 305,5 pg/ml, kemik iliği kökenli 5 hastada ise 204 pg/ml olarak

bulundu. Mann-Whitney U testi ile bu değerler arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$),(Tablo 4.2.b).

Tablo 4.2.b: Nakil dokusu tipine göre pozitifleşme günleri ve virüs pik değerleri arasındaki farklar

	Periferik Kan	Kemik İliği
Ort pozitifleşme süresi (gün)	121,8	45,6
Ort virüs yükü pikleri (pg/ml)	305,5	204

CMV infeksiyonlu GVHD gelişen 8 hastanın ortalama pik değeri 369,12 pg/ml iken, GVHD bulunmayan 4 hastanın pik değeri ise ortalama 52,25 pg/ml bulundu. Bununla birlikte bu fark Mann-Whitney U testi ile anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

CMV'nin ortalama ortaya çıkış süresi GVHD (+) hastalarda 76,8 gün iken, GVHD (-)' lerde 116,5 gün idi. Bu oran farkları da Mann-Whitney U testi ile anlamlı bulunmadı ($p>0,05$),(Tablo 4.2.c).

Tablo 4.2.c: GVHD varlığında ve yokluğunda virüs pozitiflik süresi ve pik değeri farkları

	GVHD(+)	GVHD(-)
Ort pozitifleşme süresi (gün)	76,8	116,5
Ort virüs yükü pikleri (pg/ml)	369,12	52,25

CMV infeksiyonu saptanan 12 hasta içinde CMV hastalığı tanısı konulanlar 2 idi (% 16,6). Tüm olgular içinde CMV hastalık sıklığı ise % 5,71 olarak bulundu. CMV hastalığı tanısı alan 5 ve 7 numaralı 2 hastada da pnömoni tanısı konuldu ve bu hastalar çalışma sırasında kaybedildi. GVHD tanısı da alan 7 numaralı hastada gastroenterit ve ateş bulguları da bulunmaktaydı. Bu hasta GVHD nedeniyle kaybedildi. Beş numaralı hasta ise GVHD ve CMV pnömonisi nedeniyle öldü.

Beş numaralı hastanın ilk pozitif değeri 53 pg/ml, ardışık haftalardaki sonuçları ise sırasıyla 228 ve 1550 pg/ml idi. Sonraki haftada hastanın virüs titresi şüpheli pozitif

oldu ve ertesi hafta sıfıra indi. Bu hasta ise pnömoni ve akut GVHD tanısını aldı ve nakil sonrası 3. ayda kaybedildi.

Yedi numaralı hastanın pozitif değerleri ise 168,162, 697, 54 pg/ml olarak bulunmuş, ertesi hafta şüpheli pozitif sonuç alınmış ve sonraki hafta negatif sonuç elde edilmiştir. Bu hasta klinik olarak pnömoni, ateş ve gastroenterit bulgularını göstermiş, akut GVHD tanısını almış ve nakil sonrası 4. ayda kaybedilmiştir.

On iki CMV pozitif hastanın onu ise klinik olarak CMV hastalığı bulgusu göstermemiştir.

Vericisi CMV seronegatif olan tek hastanın alınan 9 kan örneğinin ikisinde şüpheli pozitif sonuç bulunması dışında herhangi bir laboratuvar ya da klinik bulguya rastlanılmamıştır.

Toplam 35 hastanın 18'i (% 52,9) akut GVHD tanısı aldı. CMV enfeksiyonu gösteren 12 hastanın 8'inde (% 66,7) ve CMV enfeksiyonu bulunmayan 23 hastanın ise 10'unda (% 43,4) akut GVHD gelişti. CMV enfeksiyonu varlığında GVHD' nin daha yüksek oranda geliştiği saptanmakla birlikte bu oranlar arasında Pearson testiyle anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,005$), (Tablo 4.2.d).

Tablo 4.2.d: Akut GVHD gelişimi ile CMV arasındaki ilişki

	akut GVHD(+)	akut GVHD(-)	Toplam
CMV (+)	8 (%66,7)	4 (%33,3)	12
CMV(-)	10 (%43,4)	13 (%56,6)	23
Toplam	18(%52,9)	17(% 47,1)	35

Revers transkriptaz PCR sonuçları

RT-PCR yöntemiyle 35 hastaya ait toplam 178 kan örneği incelendi. Sonuçta 4 hastaya ait toplam 5 örnekte mRNA varlığı saptandı

Bu örneklerin biri dışında (8 no'lu hasta) hepsinde aynı anda Hybrid Capture testinde de pozitiflik saptandı. Negatif olan örnek ise bir sonraki hafta Hybrid Capture testi ile pozitifleşti (29 pg/ml).

Aynı örnekte hem RT-PCR hem de Hybrid Capture ile pozitiflik saptanan 3 hasta 1,5 ve 9 numaralı hastalardı. İki pozitif örneğin elde edildiği 5 numaralı hasta aynı zamanda CMV hastalığı kliniği göstermekteydi. Bu örneklerin saptandığı günkü CMV DNA düzeyleri ise 228 ve 1550 pg/ml idi Pozitif bulunan diğer iki hasta herhangi bir klinik bulgu göstermediler. Bu hastaların örneklerinin viral yükü Hybrid Capture ile sırasıyla 383 ve 830 pg/ml bulundu. (Tablo 4.3.a).

Tablo 4.3.a: CMV enfeksiyonlu hastaların özellikleri

Hastalar	CMVpik değeri	CMV hastalığı	Ölüm	akutGVHD	RT-PCR(+)	Hybrid Capture
1	42	-	-	-	+	+
2	383	-	-	+	-	+
3	149	-	-	+	-	+
4	18	-	-	-	-	+
5	830	+	+	+	+	+
6	20	-	-	-	-	+
7	697	+	+	+	-	+
8	29	-	-	+	+	+
9	830	-	-	+	+	+
10	121	-	-	-	-	+
11	28	-	-	-	-	+
12	15	-	-	+	-	+

Hybrid Capture testini altın standart olarak kabul ettiğimizde RT-PCR'in duyarlılığını % 33, özgünlüğünü % 100, yanlış negatifliğini % 67, yanlış pozitifliğini % 0, PPD' ni % 100 , NPD' ni % 74 ve doğru sınıflamasını (accuracy) % 77 olarak bulduk (Tablo 4.3.b).

Tablo 4.3.b: RT-PCR'in istatistik değerlendirilmesi

Duyarlık	%33
Özgünlük	%100
Yanlış Negatiflik	%67
Yanlış Pozitiflik	%0
PPD	%100
NPD	%74
Doğru Sınıflama(accuracy)	%77

V. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda KİT uygulanan hastalarda HCMV infeksiyonu oranları değerlendirilmiş ve Hybrid Capture yöntemi ile RT-PCR yöntemi tanıda kullanılabilirlik açısından karşılaştırılmıştır. Allojenik 35 KİT hastasına ait 178 kan örneğinin (113'ü kan, 65'i ise kemik iliği kökenli transplant hastalarına ait) çalışılması ile elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Otuz beş hastanın 12'sinde (%34,3) Hybrid Capture testiyle en az bir kan örneğinde HCMV infeksiyonu saptanmıştır. Pozitif örnek sayısı her bir infeksiyonlu hasta için 1 ile 5 arasında değişmektedir.
2. Genel olarak baktığımızda 152 negatif, 26 şüpheli pozitif ve 26 pozitif örnek olduğu görülmektedir.
3. Periferik kan nakilli 23 hastanın 7'sinde (% 30,4) ve 12 kemik iliği kökenli nakil hastasının 5'inde (% 41,7) HCMV infeksiyonu saptanmıştır. Kemik iliği kaynaklı kök hücre alan hastalarda infeksiyon oranı daha yüksek bulunmakla birlikte bu durum Fisher's Exact Test ile anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

4. Toplam 12 HCMV infeksiyonlu hastada, ilk pozitif değerlerin transplantasyon sonrası ortalama 90 günde ortaya çıktığı saptanmıştır (en erken 15 en geç 220 gün).

5. Kandan allojenik ilik alan 7 hastada ortalama pozitifleşme süresi 121,8 gün (en az 32 en çok 220 gün), kemik iliğinden doku alan 5 hastada ise 45,6 gün (en az 15 en çok 120 gün) olarak saptanmıştır. Bu değerler Mann-Whitney U testi ile değerlendirildiğinde anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p=0,05$).

6. Virüs titreleri tüm hastalar için 0 ile 830 pg/ml arasında değişmektedir. HCMV infeksiyonlu hastalarda pik virüs titresi 15-830 pg/ml arasındaydı ve ortalamaları 263,5 pg/ml bulunmuştur.

7. Nakil kaynağı ile virüs yükü pik değerleri incelendiğinde, kan kökenli 7 hastada 305,5 pg/ml, kemik iliğı kökenli 5 hastada ise ortalama pik değerleri 204 pg/ml olarak bulunmuştur. Mann-Whitney U testi ile bu değerler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p> 0,05$).

8. HCMV infeksiyonu saptanan 12 hastanın 2 tanesinde (%16,6) HCMV hastalığı tanısı konulmuştur. Tüm olgular içinde HCMV hastalık sıklığı ise %5,71 olarak bulunmuştur.

9. Toplam 35 hastanın 18'i (% 52,9) akut GVHD tanısı almıştır. HCMV infeksiyonu gösteren 12 hastanın 8'inde (% 66,7) ve HCMV infeksiyonu bulunmayan 23 hastanın ise 10'unda (% 43,4) akut GVHD gelişmiştir. HCMV infeksiyonu varlığında GVHD'nin daha yüksek oranda geliştiğı saptanmakla birlikte bu oranlar arasında Pearson testiyle anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p> 0,05$).

10. RT-PCR yöntemiyle 35 hastaya ait toplam 178 kan örneğı incelenmiş ve 4 hastaya ait toplam 5 örnekte mRNA varlığı saptanmıştır.

11. Hibrid Capture testini altın standart kabul ettiğimizde, RT-PCR'in duyarlılığı % 33, özgünlüğü % 100, yanlış negatifliği % 67, yanlış pozitifliği % 0, PPD % 100 , NPD % 74 ve doğru sınıflaması (accuracy) % 77 bulunmuştur.

Sonuç olarak, çalışmamızda kullandığımız UL21.5 gen transkribi yüksek özgünlüğü ve PPD'i ile kullanıma girebilecek bir test adayıdır. Ancak duyarlılığının düşük olması bu testi sınırlamaktadır. Testin yönteminin geliştirilmesi, nicel sonuç verebilecek hale getirilmesi, ayrıca başta geç gen transkriptleri olmak üzere değişik gen transkriplerinin denenmesinin sürdürülmesi, bu testin daha kullanışlı hale gelmesini sağlayabilecektir. Dolayısıyla, bu konuda yeni çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

VI. Kaynaklar

Anderson KC, Weinstein HJ. Transfusion-associated graft-versus-host disease. N Engl J Med 1990; 323: 315-321.

Apperley JF ve Goldman JM. Cytomegalovirus: biology, clinical features and methods for diagnosis of bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1988; 3: 253-264.

Baughan A.S, Worsley A.M, McCarthy DM. Haematological reconstitution and severity of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation for chronic granulocytic leukaemia: the influence of previous splenectomy. Br J Haematol 1984; 56: 445-454.

Betts RF. The relationship of epidemiology and treatment factors to infection and allograft survival in renal transplantation. In:Plotkin SA,Michelson S, Pagano JS,Rapp F ,eds.CMV: pathogenesis and prevention of human infection.New York:Alan R.Liss 1984;87-99.

Bitsch A, Kirchner H, Dupke R, Bein G. Cytomegalovirus transcripts in peripheral blood leukocytes of actively infected transplant patients detected by reverse-transcription-polymerase chain reaction. J. Infect. Dis 1993; 167:740-743

Blok MJ, Goossens VJ, Vanherle SJV, Top B, Tacken N, Middeldorp JM, Christiaans MH L, van Hooff JP, Bruggeman CA. Diagnostic value of monitoring human cytomegalovirus late pp67 mRNA expression in renal-allograft recipients by nucleic acid sequence-based amplification. J Clin. Microbiol 1998; 36: 1341-1346

Boivin G, Handfield J, Toma E, Murray G, Lallonde R, Tevere VJ, Sun R, Bergeron MG. Evaluation of the Amplicor cytomegalovirus test with specimen from human immunodeficiency virus-infected subjects. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2509–2512.

Booy FP, Newcomb WW, Trus BL, Brown JC, Baker TS, Steven AC. Liquid Crystalline phage like packing of encapsulated DNA in herpes simplex virus. *Cell* 1991; 64: 1007-10015.

Boriskin YS, Fuller K, Powles RL, Vipond IB, Rice PS, Booth JC, Caul EO, Butcher PD. Early detection of cytomegalovirus infection in bone marrow transplant patients by reverse transcription-PCR for CMV spliced late gene UL21.5: a two site evaluation. *J Clin Virol* 2002; 24: 13–23.

Bowden RA, Mori M, Dobbs S, Hackman R, Kopecky K, Crawford S. Mononuclear cell reconstitution in the lung after marrow transplantation. Lack of influence of cytomegalovirus pneumonia, irradiation, and GVHD. *Transplantation* 1993; 55: 557-561

Bresnahan WA, Shenk T. A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science* 2000; 288: 2373–2376.

Britt WJ, Charles AA. Cytomegalovirus In: Fields Virology. Ed:Fields BN,Knipe DM, Howley PM, 3rd Edition. Lippicott-Raven Publishers Philadelphia.1996: 2493-2512

Britt WJ. Betaherpesviruses: Cytomegalovirus, Human Herpesvirus 6 and 7. In: Topley&Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th Edition 2002: 39-343.

Britt, WJ, Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirolgy* 1996; 39: 401–412.

Bruno B, Boeckh M, Davis C. Adenovirus infections in patients undergoing bone marrow transplantation. *Blood* 1997; 90: 420.

Caliendo AM, St George K, Kao SY, Allegra J, Tan BH, Lafontaine R, Bui L, Rinaldo CR,. Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: clinical utility of the prototype Amplicor CMV Monitor test in transplant recipients. *J. Clin. Microbiol* 2000; 38: 2122–2127.

Cengiz AT, Kıyan M, Cengiz L, Aksoy MA, Uğurel MŞ, Kara F, Kılıç H. Steril-İnfertik kadınların serumunda CMV IgG ve IgM'nin ELİSA ile gösterilmesi. *İnfek Dergisi* 1993; 7: 239-241.

Cengiz AT, Kıyan M, Tibet M, Bingöl M, Tural T, Baloğlu E, Çapkan DÜ. Sağlıklı bireylerin serumlarında cytomegalovirus (CMV) IgG antikorlarının ELİSA ile araştırılması. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 1996;49: 27-29.

Chachoua A, Dietrich D, Krasinski K. Ganciclovir in the treatment of CMV

gastrointestinal disease with the AIDS. *Ann Intern Med* 1987;107:133-137.

Colberg-Poley AM, Santomenna LD, Harlow PP, Benfield PA, Tenney DJ. Human cytomegalovirus US3 and UL 36-38 immediate -early proteins regulate gene expression. *J Virology* 1992; 66: 95-105

Compton T, Nowlin M, Cooper NR. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 1993; 193: 834-841.

Cordonnier C, Escudier E, Nicholas JC, Fleury J, Deforfes L, Ingrand D, Bricout F, Bernaudin JF. Evaluation of three assays on alveolar lavage fluid in the diagnosis of cytomegalovirus pneumonitis after bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1987; 159: 495-500.

Cox F, WT Hughes. Cytomegaloviremia in children with acute lymphatic leukemia. *J. Pediatr* 1975; 87: 190-194

Çelebi H, Dalva K, Özsan M, Aksu G, Akan H, Koç H, Beksaç M. Demonstration of CMV antigenemia with monoclonal antibodies by flow cytometry or fluorescence microscope. *Turk J Haematol* 1999; 16: 138.

D'Agaro P, Andolina M, Burgnich P, Samar E, Campello C. Surveillance of cytomegalovirus infections in bone marrow transplant in Trieste: seven years' experience. *Haematologica* 2000; 85: 54-57

Delgado R, Lumbreras C, Alba C, Pedraza MA, Otero JR, Gómez R, Moreno E, Noriega AR, Paya CV. Low predictive value of PCR for diagnosing cytomegalovirus in liver transplant recipients. *J. Clin. Microbiol* 1992;30: 1876-1878.

Digene Manual. Digene Hybrid Capture System CMV DNA Assay (Version 2.0) in vitro test procedure, 2002 Digene Corp. Gaithersburg, MD 20878 USA June 2000 L0863 02/02

Eggers M, Bogner E, Agricola B, Kern HF, Radsak K. Inhibition of human cytomegalovirus maturation by brefeldin A. *A J Gen Virol* 1992; 73: 2679-2692

Einsele H, Hebart C, Kauffmann-Schneider C, Sinzger G, Jahn P, Bader T, Klingebiel K, Dietz J, Löffler C, Bokemeyer CA, Müller A, Kanz L. Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 757-763.

Emery VC. Prophylaxis for CMV should not now replace pre-emptive therapy in solid organ transplantation. *Rev Med Virol* 2001; 11: 83-86.

Fons MP, Graves K, Cavallo T, Pollard R, Albrecht T. Human cytomegaloviruses: development and progression of nuclear inclusions by primary

clinical isolates and laboratory –adapted strains. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986;181: 416-422

Fermentas Gene Ruler™ 50bp DNA ladder Manual, Lithuania, 2000.

Fortunato EA, Spector DH. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv Virus Res* 1999; 54:61–128.

Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Zavattoni M, Parea M, Battaglia M. Quantification of human cytomegalovirus viremia by using monoclonal antibodies to different viral proteins. *J. Clin. Microbiol* 1990; 28: 2681–2688

Gerna G, Zipeto D, Parea M, Revello MG, Silini E, Percivalle E, Zavattoni M, Grossi P, Milanesi G. Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia. *J. Infect. Dis.* 1991;161: 488–498.

Gerna F, Baldanti J.M, Middeldorp M, Furione D, Zavattoni D, Lilleri D, Revello MG, Clinical significance of expression of human cytomegalovirus pp67 late transcript in heart, lung and bone marrow transplant recipients as determined by nucleic acid sequence-based amplification. *J. Clin. Microbiol* 1999; 37: 902-911.

Gerna, G, Baldanti F, Lilleri D, Alessandrino E, Pagani A, Locatelli F, Middeldorp J, Revello MG. Human cytomegalovirus immediate-early mRNA detection by nucleic acid sequence-based amplification as a new parameter for preemptive therapy in bone marrow transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 1845–1853).

Gonczol E, Plotkin S. Development of a cytomegalovirus vaccine: lessons from recent clinical trials. *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1: 401–412

Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, DuMond C, Cays M, Ebeling DF, Buhles WC, DeArmond B, Meyers JD. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *New Engl J Med* 1991; 325: 1601–1607.

Goodrum FD, Jordan CT, High K, Shenk T. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: A model for latency 2002; 99:16255-16260

Gozlan J, Salord JM, Chouaïd C, Duvivier C, Picard O, Mejohas MC, Petit JC. Human cytomegalovirus (HCMV) late mRNA detection in peripheral blood of AIDS patients: diagnostic value for HCMV disease compared with those of viral culture and HCMV DNA detection. *J. Clin. Microbiol* 1993; 31: 1943-1945.

Gozlan J, Laporte JP, Lesage S, Labopin M, Najman A, Gorin NC, Petit JC. Monitoring of cytomegalovirus infection and disease in bone marrow recipients by reverse transcription-PCR and blood and urine culture. *J. Clin. Microbiol* 1996; 34: 2085-2088

Grangeot L - Cointe D .Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection *Journal of Clinical Virology*. 2001; 21: 213-221

Greijer AE, van de Crommert, Stevens JMG, Middeldorp JM. Molecular fine-specificity analysis of antibody response to human cytomegalovirus and design of novel synthetic-peptide-based serodiagnostic assays. *J. Clin. Microbiol* 1999; 37: 179–188.

Griffiths PD. Cytomegalovirus. In: Zuckerman, A.J., Banatvala, J.E. and Pattison, J.R., Editors, 2000. *Principles and Practice of Clinical Virology*, John Wiley and Sons, London, 2000: 79–116.

Halwachs G, Wilders-Truschniga M, Enzingerb G, Eiblc M, Linkeschc W, Dornbuschd H J, Santnere B I, Marthe E, Kesslerer H H. Cytomegalovirus diagnosis in renal and bone marrow transplant recipients: the impact of molecular assays. *Journal of Clinical Virology* 2001; 20: 49-57.

Hayward GS, Ambinder R, Ciufa D, Hayward SD, LaFemina RL. Structural organisation of human herpes virus DNA molecules. *J Invest Dermatol* 1984;83:29-41

Hebart H, Wuchter P, Loeffler J, Gscheidle B, Hamprecht K, Sinzger C, Jahn G, Dietz K, Kanz L, Einsele H. Evaluation of the Murex CMV DNA Hybrid Capture assay (version 2.0) for early diagnosis of cytomegalovirus infection in recipients of an allogeneic stem cell transplant 2001; 28: 213-218

Hudson JB, Misra V, Mosmann TR. Cytomegalovirus infectivity: analysis of the phenomenon of centrifugal enrichment of infectivity. *Virology* 1976; 72: 235–243.

Hughes W, Kuhn S, Chauadhary S. Successful chemoprophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *N Engl J Med* 1977; 297: 1419-1426.

Humar A, Gregson D, Caliendo AM. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 1305-1311.

Kanda S, Chiba T, Suzuki M, Kami Y, Yazaki Y, Hirai H. Time course analysis of semi-quantitative PCR and antigenaemia assay for prevention of cytomegalovirus disease after bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol* 1998; 100 : 222-225.

Kıyan M, Cengiz AT, Ölmez Ü. Aktif ve remisyon fazlarında bulunan sistemik lupus eritematozus'lu olguların serumlarında sitomaglovirus IgG ve IgM antikorlarının ELISA ile araştırılması. *İnfek Dergisi* 1994; 8: 21-24.

Koszinowski UH, Del Val M, Reddehase MJ. Cellular and molecular basis of the protective immun response to cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 154: 189-215.

Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther.* 2003; 983: 269-97

Landry M L, Ferguson D. Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 2851–2856.

Leach FS, Mocarski ES Regulation of cytomegalovirus late gene expression:differential use of three sites in the transcriptional activation of ICP36 gene expression. *J Virol* 1989; 63:1783-1791

Link H, Battmer K, Stumme C. Cytomegalovirus infection in leucocytes after bone marrow transplantation demonstrated by mRNA in situ hybridization. *Br J Haematol* 1993; 85: 573-577.

Link H, Arseniev L, Ljungman P. Cytomegalovirus infections after allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation (PBSCT) - a survey of the infectious disease working party of EBMT. *Blood* 1997; 90: 544

Machida U, Kami M, Fukui T, Kazuyama Y, Kinoshita M, Tanaka Y, Kanda Y, Ogawa S, Honda H, Chiba S, Mitani K, Muto Y, Osumi K, Kimura S, Hirai H. Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2536-2542.

Maeda Y, Teshima T, Yamada M, Shinagawa K, Nakao S, Ohno Y, Kojima K, Hara M, Nagafuji K, Hayashi S, Fukuda S, Sawada H, Matsue K, Takenaka K, Ishimaru F, Ikeda K, Niiya K, Harada. Monitoring of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation. *M.Br J Haematol* 1999; 105: 295-302.

Mandanas RA, Saez RA, Selby GB, Confer DL. Cytomegalovirus surveillance and prevention in allogeneic bone marrow transplantation: examination of a preemptive plan of ganciclovir therapy. *Am J Hematol* 1996; 51: 104-111.

Manteiga R, Martino R, Sureda A. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided preemptive treatment with ganciclovir after allogeneic stem transplantation: a single-

center experience. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 899-904.

Mazzulli T, Drew LW, Yen-Lieberman. Multicenter comparison of the digene hybrid capture CMV DNA assay (version 2.0), the pp65 antigenemia assay, and cell culture for detection of cytomegalovirus viremia. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 958-963.

Mazzulli T, Rubin RH, Ferraro MJ, D'Aquila RT, Doveikis SA, Smith BR, Hirsch MS. Cytomegalovirus antigenemia: clinical correlations in transplant, recipients and in persons with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 2824–2827

Mazzulli T, Wood S, Chua R, Walrnsley S. Evaluation of the Digene hybrid capture system for detection and quantitation of human cytomegalovirus viremia in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Clin. Microbiol* 1996; 34: 2959–2962.

McDonough SH, Spetor DH. Transcription in human fibroblasts permissively infected by human cytomegalovirus strain AD169. *Virology* 1983;125:31-46

McGavran MH ve Smith MG.Ultrastructural,cytochemical and microchemical observations on cytomegalovirus(salivary gland virus) infection of human cells in tissue culture .*Exp Mol Pathol* 1965; 4:1-10

Meyer T, Reischl U, Wolf H, Schuller C, Arndt R. Identification of active cytomegalovirus infection by analysis of immediate-early, early and late transcripts in peripheral blood cells of immunodeficient patients. *Mol Cell Probes* 1994; 8: 261–71.

Meyer-Konig U, Serr A, von Laer D, Kriste G, Wolff C, Haller O, Neumann-Haefelin G, Hufert FT. Human cytomegalovirus immediate early and late transcripts in peripheral blood leukocytes: diagnostic value in renal transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 1995; 171: 705–709.

Meyers JD, Fluornoy N, Thomas E.D. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation *J Infect Dis* 1986; 153: 478-488.

Meyers P, Ljungman L, Fisher LD. Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. *J. Infect. Dis.* 1990; 162: 373-380.

Miller WJ, McCullough J, Balfour HH, Haake RJ, Ramsay NK, Goldman A, Bowman R, Kersey J. Prevention of cytomegalovirus infection following bone marrow transplantation: a randomized trial of blood product screening. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7: 227–234.

Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, Sasaki H. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2001; 97: 1172-1179.

Mocarski ES. Cytomegalovirus biology and replication. In: Roizman B, Whitley R, Lopez C, eds. *The human herpesviruses*. New York: Raven 1993:173-226

Mocarski, ES, Courcelle CT. Cytomegalovirus and their replication. In: Knipe, D. and Howley, P., Editors, 2001. *Fields Virology*, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, 2629–2673.

Mullberg J, Hsu ML, Rauch CT, Gerhart MJ, Kaykasã A, Cosman D. The R27080 glycoprotein is abundantly secreted from human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *J Gen Virol* 1999; 80: 437–440,

Myerson D, Hackman RC, Meyers JD. Diagnosis of cytomegalovirus pneumonia by in situ hybridization. *J. Infect. Dis.* 1984; 150: 272–277.

Nelson PN, Kawal BK, Boriskin YS, Mathers KE, Powles RL, Steel HM, Tryhorn YS, Butcher PD, Booth J. A polymerase chain reaction to detect a spliced late transcript of human cytomegalovirus in the blood of bone marrow transplant recipients. *J Virol Methods* 1996; 56: 139-144

Nguyen Q, Champlin R, Giralt S, Rolston K, Raad I, Jacomson K, Ippoliti C, Hecht D, Tarrand J, Luna M, Whimbey E. Late cytomegalovirus pneumonia in adult allogeneic blood and marrow transplant recipients. *Clin. Infect. Dis* 1998; 28: 618-623.

Özsan M, Erbay B, Özkul A, Ertürk Şehsuvar, Karaarslan A, Ateş K. Böbrek Transplantasyonu yapılan hastalarda sitomegalovirus enfeksiyonunun serolojik ve klinik olarak takibi ve transplantasyon sonrası semptomatik enfeksiyon prevalansı. *Mikrobiyol Bült* 1999;33:127-134

Pass RF. Cytomegalovirus. In D. Knipe, P. Howley (Eds), *Fields Virology* 2675-2705. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins

Peggs KS, Wolfgang P, Kottaridis PD, McKeag N, Brink NS, Tedder RS, Goldstone AH, Linch DC, Mackinnon S. Extended routine polymerase chain reaction surveillance and pre-emptive antiviral therapy for cytomegalovirus after allogeneic transplantation. *British J Haem* 2000; 111: 782-790

Peterson PK, McGlave P, Ramsay NK, Rhame F, Cohen E, Perry GS 3rd, Goldman AI, Kersey J. A prospective study of infectious diseases following bone marrow transplantation: emergence of *Aspergillus* and Cytomegalovirus as the major causes of mortality. *Infect Control*. 1983; 4:81-89

QIAamp RNA Blood Mini Handbook, 01/ 1999, Quiagen, USA.

Radsak K, Brucher KH, Britt W, Shiou H, Schneider D, Kollert A, Nuclear

compartmentation of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology* 1990;177:515-522.

Rafael E. De la Gwen Stephens, Christopher Sherlock Diagnosis and treatment approaches of CMV infections in adult patients. *Journal of Clinical Virology* 2002;25:1-12

Rawlinson WD, Barrell BG. Spliced transcripts of human cytomegalovirus. *J Virol* 1993; 67:5502–13.

Reusser R. CMV infection and disease after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Trans* 1991;7: 52-56.

Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit Manual 2000-Fermentas Lot No 0820.

Rubin RH, Tolkoff-Rubin NE, Oliver D, Rota TR, Hamilton J, Betts RF, Pass RF, Hillis W, Szmunes W, Farrell ML. Multicenter seroepidemiologic study of the impact of cytomegalovirus infection on renal transplantation. *Transplantation* 1985; 40: 243–249.

Sakuma H, Hosoya M, Kanno H et al. Risk of cytomegalovirus infection after peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 49-53.

Sandin RL, Rodriguez ER, Rosenberg E, Porter-Jordan K, Caparas M, Nasim S, Rockis M, Keiser JF, Garrett CT. Comparison of sensitivity for human cytomegalovirus of the polymerase chain reaction, traditional tube culture and shell vial assay by sequential dilutions of infected cell lines. *J. Virol. Methods* 1991; 32: 181–191

Sarisky RT, Hayward GS, Evidence that the UL84 gene product of human cytomegalovirus is essential for promoting oriLyt dependent DNA replication and formation of replication compartments in cotransfection assays. *J Virol* 1996; 70: 7398-7413.

Schulenburg A, Watkins-Riedel T, Greinix HT, Rabitsch W, Loidolt H, Keil F, Mitterbauer M, Kalhs P. CMV monitoring after peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation by pp65 antigen and quantitative PCR. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 765-768.

Singer VL, Lawlor TE, Yue S. Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutat Res.* 1999; 439: 37-47

Singh A. Preemptive therapy versus universal prophylaxis with ganciclovir for cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32:

742-751.

Sinzger C, Jahn G, Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 1996; 39: 302–319.

Smith JD. Human CMV: demonstration of permissive epithelial cells and non-permissive fibroblastic cells in a survey of human cell lines. *J Virol* 1986 ; 60: 583-588

Spaete RR, GehrzRC, Landini MP. Human cytomegalovirus structural proteins. *J Gen Virol* 1994;75:3287-3308

Stasiak PC ve Mocarski ES .Transactivation of the cytomegalovirus ICP36 gene promoter requires the alfa gene product TRS1 in addition to IE1 and IE2. *J Virol*.1992;66:1050-1058

Stearns NM. Celebrating life: lessons learned from a bone marrow transplant reunion. *Cancer Pract.* 1993;1:42-48

Stinski MF. Molecular biology of cytomegaloviruses. In: Roizman B.eds *Herpesviruses*.New York:Plenum 1983:67-113

Storch GA, RS Bailey, NA Ettinger, T Langlois, M. Gaudreault-Keener and PL Welby , Comparison of PCR and pp65 antigenemia assay with quantitative shell vial culture of cytomegalovirus in blood leukocytes from solid organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 997–1003.

SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain.1999; Manual of Roche Molecular Biochemicals,Manheim Germany.

Theiler RN, Compton T, Characterization of the signal peptide processing and membrane association of human cytomegalovirus glycoprotein O. *J Biol Chem* 2001; 276:1234-1238

Thorner AR Diagnosis of Cytomegalovirus Disease in ImmunocompromisedPatients: A Review of the AIDS and Solid Organ Transplant Harvard Joint ID Conference,1998

Trenchel R, Ross S, Husing JI. Reduced risk of persisting cytomegalovirus pp65 antigenemia and cytomegalovirus interstitial pneumonia following allogeneic PBSCT. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 665-672.

Tüzün İ, toplumumuzda CMV yaygınlığı.Uzm Tezi 1991;Ege Üniv.

U. Meyer-Konig, A. Serr, D. von Laer, G. Kriste, C. Wolff, O. Haller, G. Neumann-

Haefelin and F.T. Hufert , Human cytomegalovirus immediate early and late transcripts in peripheral blood leukocytes: diagnostic value in renal transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 1995; 171: 705–709.

Vij R, Khoury H, Brown R, Goodnough LT, Devine SM, Blum W, Adkins D, DiPersio JF. Low-dose short-course intravenous ganciclovir as pre-emptive therapy for CMV viremia post allo-PBSC transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 32: 703-707.

Voisset C, Mandrand B, Paranhos-Baccala G. RNA amplification technique, NASBA, also amplifies homologous plasmid DNA in non-denaturing conditions. *BioTechniques* 2000; 29: 236–240.

W van der Bij, J Schirm, R Torensma, W van Son, A Tegzess and TH The , Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2531–2535.

Waner L, Weller TH, Kevy SV. Patterns of cytomegaloviral complement-fixing antibody activity: a longitudinal study of blood donors. *J. Infect. Dis.* 1973; 127: 538–543.

Weiner RS, Bortin MM, Gale RP, Glicron E, Kay HEN, Kolb HJ, Hartz AJ, Rim A. Interstitial pneumonitis after bone marrow transplantation; assesment of risk factors. *Ann Int Med* 1986; 104: 168-175

Weinberg A, Schissel D, Giller R. Molecular Methods for Cytomegalovirus Surveillance in Bone Marrow Transplant Recipients. *J Clin Mic* 2002; 40: 4203-4206.

Whimbey E, Champlin RE, Couch RB. Community respiratory virus infections among hospitalized adult bone marrow transplant recipients *Clin Infect Dis* 1996; 22: 778-782.

Wingard J, Mellitis ED, Sostrin MB. Interstitial pneumonitis after allogeneic bone marrow transplantation. Nine-year experience at a single institution *Medicine (Baltimore)* 1988; 67: 175-186.

Wingard JR. Infections in allogeneic bone marrow transplant recipients *Semin Oncol* 1993; 20: 80-87.

Winston DJ, Huang E, and Miller MJ. Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections associated with bone marrow transplantation *Ann Intern Med* 1985; 102: 16-20.

Winston DJ, Gale RP, Meyer DV. Infectious complications of human bone marrow transplantation *Medicine (Baltimore)* 1979; 58: 1-31.

Yanada M, Yamamoto K, Emi N, Naoe T, Suzuki R, Taji H, Iida H, Shimokawa T,

Kohno A, Mizuta S, Maruyama F, Wakita A, Kitaori K, Yano K, Hamaguchi M, Hamajima N, Morishima Y, Koder Y, Sao H, Morishita Y. Cytomegalovirus antigenemia and outcome of patients treated with pre-emptive ganciclovir: retrospective analysis of 241 consecutive patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2003; 32: 801-807.

Yen-Lieberman B. Diagnosis of Human Cytomegalovirus Disease. Clin Microbiol Newsletter 2000; 22: 105-109

Zaia JA. Viral infections associated with bone marrow transplantation Hematol Oncol Clin North Am 1990; 4: 603-623

VII. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Tarihi	100	200	300	400	500	600	Diğer	Toplam
	0	0	0	0	0	0	0	
16/06/2003	0	0	0	5,133,000,000	0	0	0	
01/07/2003	0	0	0	3,540,000,000	0	0	0	
01/08/2003	0	0	0	3,988,400,000	0	0	0	
19/11/2003	0	0	0	244,673,000	0	0	0	
11/12/2003	0	0	0	2,183,000,000	0	0	0	
Gider Top	0	0	0	15,089,073,000	0	0	0	15,089,073,000
Gelir Top	0	0	0	20,035,000,000	0	2,950,000,000	0	22,985,000,000
Kalan	0	0	0	4,945,927,000	0	2,950,000,000	0	7,895,927,000

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar (BAP Demirbaş numaraları dahil)

Proje kapsamında alınmış olan UV translüminatör cihazı moleküler tanı laboratuvarımızda bulunmakta olup, jelin cyber green boyasıyla boyanıp, DNA bantlarının görünür hale getirilmesinde kullanılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarımızda da cihaz aynı amaçla kullanılacaktır.

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)

d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar)

e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler

1.KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONUHASTALARINDA İNSAN
SİTOMEGALOVİRÜS İNFEKSİYONU TANISINDA FARKLI
MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ: Dr.Arif Suphi ÖRSAL

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. T Murat Özsan

ANKARA-2003

2. Çalışma verileri yayın amacıyla düzenlenmektedir.