

Riskli Hastaların Periferik Kan Örneklerinde Sitomegalovirus Varlığının “Shell Vial” Hücre Kültürü, Antijenemi Testi ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Araştırılması

Investigation of Cytomegalovirus Positivity in the Peripheral Blood Samples of Risky Patients by Shell-Vial Cell Culture, Antigenemia Test and Real-Time Polymerase Chain Reaction

Selma GÖKAHMETOĞLU¹, Gülhan YAĞMUR², Fatma MUTLU SARIGÜZEL³, Esma DENİZ⁴

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

¹ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kayseri, Turkey.

² Kayseri Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Kayseri.

² Kayseri Gynecology, Obstetric and Pediatric Diseases Hospital, Kayseri, Turkey

³ Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kayseri.

³ Kayseri Training and Research Hospital, Kayseri, Turkey.

⁴ Nuh Naci Yazgan Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Kayseri.

⁴ Nuh Naci Yazgan Chest Diseases Hospital, Kayseri, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 07.09.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 10.01.2011

ÖZET

Sitomegalovirus (CMV), immün sistemi normal kişilerde genellikle belirtisiz enfeksiyonlara yol açarken, konjenital enfeksiyonu olan yenidoğanlarda ve immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi morbidite ve mortalite nedeni olmaktadır. CMV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında, hücre kültüründe izolasyon, pp65 antijenemi testi, serolojik ve moleküler yöntemler uygulanmaktadır. Bu çalışmada, CMV hastalığı için risk grubunda olan hastalardan alınan kan örneklerinde antijenemi testi, “shell vial” hücre kültürü ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemleriyle CMV varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, CMV hastalığı ön tanısıyla viroloji laboratuvarımıza gönderilen 91 hastaya (33 kadın, 58 erkek) ait 141 periferik kan örneği dahil edilmiştir. Hastaların beşi yenidoğan olup, erişkin hastaların (yaş aralığı 17-79 yıl) 81’i kemik iliği, dördü böbrek, biri karaciğer transplant alıcısıdır. Örneklerden CMV izolasyonu için “shell vial” hücre kültürü yöntemi (Vircell, İspanya); kan lökositlerinde pp65 antijen varlığının tespiti için indirekt immüno Floresans yöntemi (CINAKit Argene, Biosoft, Fransa) ve plazma örneklerinde CMV DNA saptanması için RT-PCR (CMV QNP 2.0; Fluorion, Iontek, Türkiye) yöntemi

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Selma Gökahmetoğlu, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 533 353 3105, **E-posta (E-mail):** selmagk@gmail.com

kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 141 örneğin 72 (%51)'sinde "shell vial" hücre kültürü yöntemiyle, 82 (%58.2)'sinde antijenemi testiyle, 49 (%34.8)'unda ise RT-PCR ile pozitif sonuç alınmıştır. Hücre kültürü yöntemi altın standart kabul edildiğinde, antijenemi testinin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %81.9 ve %66.6; RT-PCR yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü ise sırasıyla %43 ve %73.9 olarak bulunmuştur. Hücre kültürü ve antijenemi yöntemleriyle pozitif bulunduğu halde RT-PCR ile CMV DNA'sı saptanmayan 15 olgudan rastgele seçilen üçüne ait örneklerle DNA dizi analizi (ABI Prism 310 Genetic Analyzer; Perkin Elmer, ABD) uygulanmıştır. Dizi analizi sonuçlarına göre, bu üç örnekte CMV DNA'nın pozitif olduğu, ancak CMV QNP 2.0 kitinde hedef alınan prob (gB) bölgesinde mutasyonların bulunduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, CMV hastalığının hayati önem taşıdığı hastalarda, viremi ve viral yükün tespit edilmesi amacıyla antijenemi ve PCR yöntemlerinin kullanılabileceği; ancak CMV *gB* genini hedef alan PCR çalışmalarında beklenmeyen negatif sonuçlar elde edildiğinde mutasyon varlığının akıldan tutulması ve gereğinde dizi analizi yapılmasının yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Sitomegalovirus; CMV; shell vial yöntemi; antijenemi testi; PCR; DNA dizi analizi.*

ABSTRACT

Cytomegalovirus (CMV) infections in immunocompromised patients and congenital infections in infants have high morbidity and mortality while it may lead to asymptomatic infections in immunocompetent subjects. Serological tests, culture methods, antigenemia tests and molecular methods are applied in the diagnosis of CMV infection. The aim of this study was to investigate the presence of CMV in peripheral blood samples of patients who were at risk for CMV disease by shell vial cell culture, antigenemia test and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) methods. A total of 141 blood specimens obtained from 91 patients (33 female, 58 male) with suspected CMV disease were included to the study. Five of the patients were newborns and the others aged between 17-79 years old were bone marrow (n= 81), kidney (n= 4) and liver (n= 1) transplantation patients. Shell vial (Vircell, Spain) cell culture method was applied for CMV isolation from the samples, while the detection of pp65 antigen in blood leukocytes was investigated by indirect immunofluorescence method (CINAKit Argene, Biosoft, France). The presence of CMV DNA in plasma samples was detected by RT-PCR (CMV QNP 2.0 kit; Fluorion, Iontek, Turkey) method. CMV was found positive in 72 (51%) of 141 samples by shell vial, 82 (58.2%) by antigenemia test and 49 (34.8%) by RT-PCR. Considering cell culture as the gold standard, the sensitivity and specificity of antigenemia test were calculated as 81.9% and 66.6%, respectively; and for PCR those rates were 43% and 73.9%, respectively. In addition DNA sequencing (ABI Prism 310 Genetic Analyzer; Perkin Elmer, USA) was performed for the samples of randomly selected three patients out of 15, who were yielded positive results with cell culture and antigenemia tests but negative CMV DNA by RT-PCR. In this analysis CMV DNA was found positive in three of the samples that were found negative by RT-PCR in spite of CMV isolation and positive antigenemia. DNA sequencing of those samples revealed multiple mutations in the probe binding region (gB) of CMV QNP 2.0 kit. It was concluded that for the detection of CMV viremia and viral load in patients under risk for CMV disease, antigenemia and PCR based methods could be applied, however, negative results obtained by PCR targeting CMV *gB* gene, should remind the possible presence of mutations in the related site and the results should be confirmed by sequence analysis.

Key words: *Cytomegalovirus; CMV; shell vial method; antigenemia test; PCR; DNA sequencing.*

GİRİŞ

Herpesviridae ailesinde sınıflandırılan sitomegalovirus (CMV), tüm dünyada yaygın olarak görülen ve genellikle asemptomatik enfeksiyonlara neden olan bir DNA virusudur. Buna kar-

şın CMV enfeksiyonları, gebe kadınlarda, intrauterin enfeksiyon sonrası yenidoğanlarda ve immün sistemi baskılanmış hastalarda (böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan, kanserli ve AIDS’li hastalar) yüksek morbidite ve mortalite nedenidir¹.

CMV enfeksiyonlarının tanısında; serolojik testler, kültür yöntemleri, antijenemi testi ve nükleik asit saptama yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak immün sistemi baskılanmış hastalarda antikor yanıtının eksik ya da bozuk olması, serolojik yöntemlerin geçerliliğini sınırlandırmaktadır. Konvansiyonel hücre kültürü ile CMV’nin izolasyonu ise zahmetli ve zaman alıcıdır. Buna karşın “shell vial” sistemi, kısa zamanda sonuç veren hızlı bir hücre kültürü yöntemidir. Vireminin ve viral yükün tespitinde en güvenilir yöntemlerin, kanda CMV pp65 antijenemi testi ve moleküler yöntemlerle CMV DNA saptanması olduğu bildirilmektedir². Son yıllarda yaygın uygulama alanı bulan gerçek zamanlı (real-time) polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yönteminin, CMV DNA’nın araştırılmasında diğer moleküler yöntemlere kıyasla daha duyarlı olduğu da rapor edilmektedir^{3,4}.

Bu çalışmada, CMV hastalığı için risk grubunda olan hastalardan alınan kan örneklerinde antijenemi testi, “shell vial” hücre kültürü ve RT-PCR yöntemleriyle CMV varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar ve Örnekler

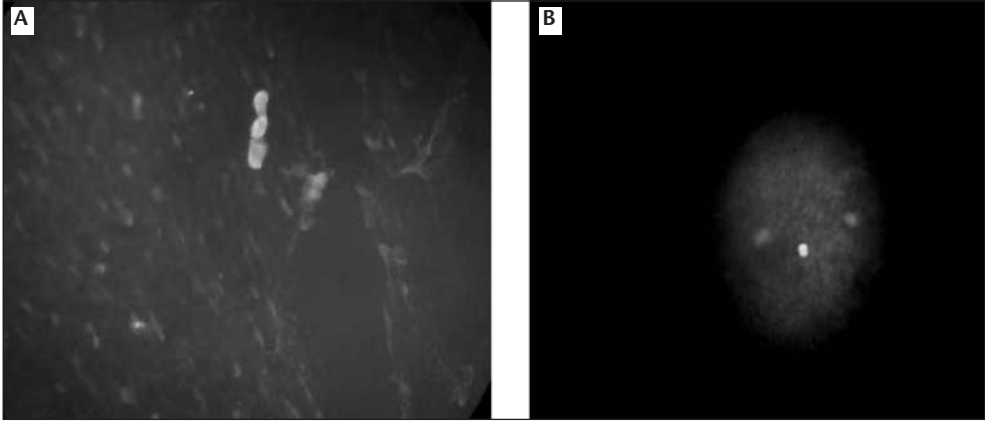
Çalışmaya, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarına CMV hastalığı ön tanısıyla gönderilen 91 hastaya (33 kadın, 58 erkek) ait 141 kan örneği dahil edildi. Hastaların beşi yenidoğan olup, erişkin hastaların (yaş aralığı 17-79 yıl) 81’i kemik iliği, dördü böbrek, biri karaciğer transplant alıcısı idi. Transplantasyon yapılan hastalardan alınan örnekler transplantasyon sonrası 1-3 ay dönemine aitti. Antijenemi ve “shell vial” yöntemleri, kan örneklerinden elde edilen lökositlerde gerçekleştirilirken, CMV DNA plazma örneklerinde araştırıldı.

CMV Antijenemi Testi

Lökositlerde CMV’ye özgül pp65 (matriks proteini) antijen varlığı, indirekt immüno floresan yöntemiyle (CINAKit, Argene-Biosoft, Fransa) kit prosedürüne uygun olarak araştırıldı. Bu amaçla kan örnekleri eritrosit lizis ile işleme alındı ve elde edilen lökositler yaklaşık 2×10^5 hücre/spot olacak şekilde sitosantrifüj kullanılarak lama yapıştırıldı. Formaldehid fiksasyonu ve membran permeabilizasyonu uygulandıktan sonra hücreler anti-CMV pp65 monoklonal antikoru ile 30 dakika 37°C’de inkübe edildi. Fosfat tamponu ile yıkama işleminden sonra floresan izotiyosiyonat ile işaretli anti-fare IgM + IgG F(ab’)₂ ile 30 dakika 37°C’de inkübe edildi. Preparatlar x400 büyütme ile floresan mikroskopunda incelenerek parlak yeşil renkte nükleer olarak boyanmış polimorf çekirdekli lökositler sayıldı. Tüm alanda ≥ 1 yeşil floresan veren hücrelerin görüldüğü örnekler pozitif olarak değerlendirildi (Resim 1).

CMV RT-PCR

Bu amaçla, CMV glikoprotein B (gB)’yi hedef alan CMV QNP 2.0 kiti (Fluorion, İtalya, Türkiye) kullanıldı. Plazma örneklerinden DNA izolasyonu, QIAmp MinElute (Qi-



Resim 1. (A) "Shell vial" hücre kültürü ve (B) CMV antijenemi testi ile alınan pozitif sonuçlar.

agen, Almanya) kiti ile üreticinin önerilerine uygun olarak yapıldı. 15.25 µl amplifikasyon karışımına 0.25 µl internal kontrol eklendi ve karışım üzerine 10 µl DNA konuldu. Amplifikasyon işlemi Icyler (BIO-RAD, ABD) cihazında gerçekleştirildi. RT-PCR yönteminin dinamik aralığı 5×10^3 - 10^6 kopya/ml idi.

Shell Vial Hücre Kültüründe İzolasyon

CMV izolasyonu için kan örneklerindeki lökositler dekstranla ayrıştırıldı⁵. Virus izolasyonu için lamellerde MRC-5 hücre kültürü üretilmiş olan "shell vial" tüpleri (Vircell, İspanya) kullanıldı. En fazla 15 gün saklanabilen "shell vial"ler, çalışma gününe kadar 37°C'de muhafaza edildi. Ekim yapılacağı zaman "shell vial"deki idame besiyeri dökülerek önceden hazırlanmış hasta örneklerinden 200 µl eklendi ve 700 g'de 45 dakika santirifüj edildi. 37°C'de bir saat inkübasyondan sonra inokulum dökülerek, tüplere 1 ml %2 fetal sıgır serumu içeren RPMI 1640 besiyerinden eklendi ve 24 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi. Inkübasyon sonunda tüplerdeki besiyeri döküldü ve metanol eklenerek 10 dakika tesbit işlemi yapıldı. Daha sonra tüplerin içindeki lameller çıkarılarak lama yapıştırıldı ve hücreler CMV'ye özgül floresanla işaretli antikorlar kullanılarak immünfloresan yöntemle (Vircell, İspanya) test prosedürüne uygun olarak boyandı (Resim 1).

DNA Dizi Analizi

Antijenemi ve "shell vial" hücre kültürü yöntemleriyle pozitif sonuç alındığı halde CMV DNA'sı negatif bulunan örneklerden üçüne, İstanbul'da bulunan İontek Laboratuvarında ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazında (Perkin Elmer, ABD) DNA dizi analizi (hedef bölge: gB) yapıldı.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 141 örneğin 72 (%51)'sinde "shell vial" hücre kültürü yöntemiyle, 82 (%58.2)'sinde antijenemi testiyle, 49 (%34.8)'unda ise RT-PCR ile pozitif sonuç alınmıştır (Tablo I).

Tablo 1. “Shell Vial” Hücre Kültürü, CMV Antijenemi Testi ve RT-PCR Yöntemleri ile Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması

		Hücre kültürü					Hücre kültürü		
		Pozitif	Negatif	Toplam			Pozitif	Negatif	Toplam
Antijenemi	Pozitif	59	23	82	RT-PCR	Pozitif	31	18	49
	Negatif	13	46	59		Negatif	41	51	92
Toplam		72	69	141	Toplam		72	69	141

CMV: Sitomegalovirus, RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.

“Shell vial” hücre kültürü yöntemi altın standart kabul edilerek, antijenemi ve PCR yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüğü hesaplanmış; buna göre antijenemi testinin duyarlılığı %81.9, özgüllüğü %66.6; RT-PCR yönteminin duyarlılığı %43, özgüllüğü %73.9 olarak bulunmuştur.

Çalışmada, her üç testin eş zamanlı pozitifliği, 27 hastadan elde edilen 28 örnekte; her üç testin aynı anda negatifliği ise 31 hastadan elde edilen 35 örnekte saptanmıştır. Tüm testler ile pozitif bulunan hastalardan birinin yenidoğan, diğerlerinin ise kemik iliği transplant alıcısı olduğu belirlenmiştir.

Takipler esnasında test pozitifliklerinde değişmelerin olduğu gözlenmiştir. Hücre kültürü ve antijenemi testleri ile pozitif bulunan ancak CMV DNA’sı negatif olan 20 hastadan beşinin test takipleri sırasında bir veya birkaç kez CMV DNA pozitifliğinin mevcut olduğu izlenmiştir. Buna karşın hücre kültürü ve antijenemi testi pozitif olduğu halde takipler esnasında RT-PCR ile hiçbir zaman pozitif sonuç vermeyen 15 hastanın rastgele seçilen üçüne ait örneklerle CMV DNA dizi analizi uygulanmıştır. Dizi analizi sonuçlarına göre, bu üç örnekte CMV DNA’nın pozitif olduğu, ancak CMV QNP 2.0 kitinde kullanılan prob (gB) bölgesinde mutasyonların bulunduğu saptanmıştır (Şekil 1).

TARTIŞMA

CMV hastalığı açısından risk altında olan hastalarda virusun erken dönemde saptanması, ölüm ve ciddi komplikasyonların önlenmesi ve etkili antiviral tedaviye başlanması için gereklidir⁶⁻⁸. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan yöntemler CMV antijenemi testi, CMV PCR ve hızlı kültür yöntemleridir. Yapılan çalışmalarda, hastanın gansiklovir tedavisi aldığı durumlarda CMV’nin kültürde üretilmemesine rağmen antijenemi testi ile

X17403 (81283) CCTCTATGTGGGAGATTCATCACATC- AACAAGTTTGCTCAATGCTA- CAGTTCCTACAGCCGC			
313.....	GCCACAG.....G.....T.....		
340.....	CACAG.....G.....		
350.....	CCACAG.....G.....		

Şekil 1. CMV DNA dizi analizi uygulanan hasta örneklerinde (No: 313, 340, 350) gB bölgesinde saptanan mutasyonlar (Gen Bankası dizileri ile karşılaştırma sonunda elde edilmiştir).

pozitif sonucun alınabildiği bildirilmektedir⁹. Buna karşın vireminin düşük olduğu durumlarda da CMV antijenemi testi ile negatif sonuç alınırken, CMV DNA'nın gösterildiği çalışmalar mevcuttur¹⁰. Konjenital CMV enfeksiyonu olan yenidoğanlarda veya transplantasyondan sonra lökopenik olan olgularda CMV antijenemi testi negatif sonuç verebilir. Bu durumda CMV DNA'nın PCR ile çalışılması önerilmektedir¹¹.

Transplantasyon yapılan hastalarda CMV antijenemi ve CMV DNA testlerinin birlikte çalışıldığı birçok çalışma mevcuttur^{4,12-16}. Aitken ve arkadaşları¹², 52 renal transplant alıcısında hibrid yakalama (HC) testi, "shell vial" yöntemi ve PCR bazlı amplicor CMV monitor testi ile CMV'yi araştırmışlardır. Aynı çalışmada, CMV hastalığı gelişen 14 hastanın hepsinde HC ve amplicor CMV monitor testi pozitif olarak bulunurken, "shell vial" yöntemiyle sadece 10 hastada pozitiflik bulunmuştur. Buna göre araştırmacılar, CMV hastalığının tespiti için amplicor CMV ve HC testlerinin, "shell vial" yöntemine üstün olduğunu ifade etmişlerdir¹². Transplantasyon yapılmış ve insan immünyetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte kişilerin dahil edildiği başka bir çalışmada, CMV tespitinde HC yöntemi, antijenemi testi, "shell vial" ve konvansiyonel tüp kültürü yöntemi kullanılmış ve yöntemlerin duyarlılıkları sırasıyla %95, %94, %43 ve %46 olarak bulunmuştur¹³. Alice ve arkadaşları⁴ solid organ transplantasyonu yapılan hastaları içeren çalışmalarında, CMV'nin saptanmasında antijenemi ve PCR yöntemleri arasında iyi bir korelasyon bulmuşlardır. Piparinen ve arkadaşları¹⁴ da, renal transplant alıcılarına ait 342 kan örneğinde CMV pozitiflik oranlarını, PCR ile %35, antijenemi testiyle %40 ve "shell vial" yöntemiyle %17 olarak belirlemişlerdir. Bu oranlar, kemik iliği transplant alıcılarına ait 415 kan örneği ile yapılan diğer bir çalışmada, RT-PCR için %22, antijenemi testiyle ise %9 olarak bildirilmektedir¹⁵. Griscelli ve arkadaşları¹⁶, 16 kemik iliği transplant alıcısından elde ettikleri 197 örnekte RT-PCR ve CMV antijenemi testi ile yaptıkları çalışmada, PCR pozitif buldukları örneklerin %51.5 (66/128)'inde antijenemi testini negatif bulmuşlardır.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, immünyetmezliği olan hastalarda antijenemi ve HC yöntemleriyle CMV araştırılmış ve 56 kan örneğinin 11 (%19.6)'inde her iki testle pozitif sonuç bulunmuştur¹⁷. Aynı çalışmada antijenemi testi pozitif olan dokuz kan örneğinde CMV DNA saptanamamıştır¹⁷. Özkan ve arkadaşlarının¹⁸ çalışmasında, toplam 13 örnekten dokuzunda antijenemi ve CMV DNA testleri uyumlu bulunmuş; dört örnekte ise antijenemi testinin negatif, CMV DNA testinin pozitif olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise, CMV hastalığı tanısı alan hastalarda antijenemi, lökosit DNA ve plazma DNA testi sonuçları arasında orta derecede korelasyon saptanmıştır¹⁹.

Sunulan bu çalışmada, 86'sı transplant alıcısı, beşi yenidoğan olmak üzere 91 hastaya ait toplam 141 örneğin %58.2'sinde CMV pp65 antijenemi testi, %51'inde "shell vial" hücre kültürü ve %34.8'inde CMV RT-PCR yöntemi ile pozitif sonuç alınmıştır (Tablo I). Hücre kültürü yöntemi referans olarak alındığında; antijenemi testinin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %81.9 ve %66.6, RT-PCR yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü ise sırasıyla %43 ve %73.9 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar irdelendiğinde, antijenemi ve hücre kültürü yöntemlerinin sonuçları diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuş; ancak hedef bölgesi gB olan RT-PCR yönteminin duyarlılığının oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Bu

durumun, klinik CMV suşlarının gB bölgesindeki olası mutasyonlardan kaynaklanabileceği düşünülmüş ve bunu araştırmak amacıyla, antijenemi ve kültür yöntemleriyle pozitif bulunan ancak CMV DNA'sı negatif olan 15 örneğin -ekonomik olanaksızlıklar nedeniyle- üçüne DNA dizi analizi uygulanmıştır. Dizi analizi sonucunda örneklerin hepsinde, RT-PCR kitinde kullanılan prob bağlanma bölgesinde mutasyon olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). Nitekim bazı çalışmalarda, gB bölgesini hedef alan PCR kitleri ile CMV DNA saptanmasında, prob bağlanma bölgesindeki mutasyonlara bağlı olarak yalnızca negatif sonuçlar alınabileceği vurgulanmaktadır^{20,21}. Nye ve arkadaşları²¹, CMV gB geninin hedef bölge olduğu RT-PCR kiti ile yaptıkları çalışmada, viral genomun prob bağlanma bölgesinde mutasyon varlığını saptamışlar ve bu durumun yöntem için bir komplikasyon yaratacağını belirtmişlerdir.

Sonuç olarak çalışmamızda, CMV hastalığının büyük öneme sahip olduğu hasta gruplarında, viremi ve viral yükün tespit edilmesi amacıyla antijenemi ve PCR yöntemlerinin kullanılabileceği; ancak CMV gB genini hedef alan PCR çalışmalarında beklenmeyen negatif sonuçlar elde edildiğinde mutasyon varlığının akıldaki tutulması ve gereğinde dizi analizi yapılmasının yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Crumpacker CS, Wadhwa S. Cytomegalovirus, pp: 1787-89. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. Hodinka RL. Human cytomegalovirus, pp: 1549-63. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, ASM Press, Washington DC.
3. Piiparinen H, Höckerstedt K, Grönhagen-Riska C, Lautenschlager I. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and Taqman assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. J Clin Virol 2004; 30(3): 258-66.
4. Alice T, Enrietto M, Pittaluga F, et al. Quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time polymerase chain reaction in peripheral blood specimens of patients with solid organ transplants: comparison with end-point PCR and pp65 antigen test. J Med Virol 2006; 78(7): 915-22.
5. Reina J, Saurina J, Fernandez Baca V, Blanco I, Munar M. An increase in the number of polymorphonuclear leukocytes inoculated on shell-vial culture increases the sensitivity of this assay in detection of cytomegalovirus in the blood of immunocompromised patients. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 31(3): 425-8.
6. Britt WJ, Alford CA. Cytomegalovirus, pp: 2493-523. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds), Fields Virology. 1996, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
7. Çolak D, Ögünç D. Sitomegalovirus enfeksiyonlarında tanı yöntemleri. FLORA 1999; 4(2): 82-9.
8. Sayiner A. Cytomegalovirus enfeksiyonu tanısında serolojik testler. I. Ulusal CMV Sempozyumu Tanı ve Tedavi Yaklaşımları: Sorunlar ve Çözümleri. 30 Kasım-02 Aralık 2001, Antalya. Sempozyum Kitabı, s: 33-9.
9. Niubo J, Perez JL, Martínez-Lacasa JT, et al. Association of quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. Diagn Microbiol Infect Dis 1996; 24(1): 19-24.
10. Weinberg A, Hodges TN, Cai G, Zamoja MR. Comparison of PCR, antigenemia assay, and rapid blood culture for detection and prevention of cytomegalovirus disease after lung transplantation. J Clin Microbiol 2000; 38(2): 768-72.
11. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. Clin Microbiol Rev 1998; 11(3): 533-54.

12. Aitken C, Barrett-Muir W, Millar C, et al. Use of molecular assay in diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease following renal transplantation. *J Clin Microbiol* 1999; 37(9): 2804-7.
13. Mazzulli T, Drew LW, Yen-Lieberman B, et al. Multicenter comparison of the digene hybrid capture CMV DNA assay (version 2.0), the pp65 antigenemia assay, and cell culture for detection of cytomegalovirus viremia. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4): 958-63.
14. Piiparinen H, Helantera I, Lappalainen M, et al. Quantitative PCR in the diagnosis of CMV infection and in the monitoring of viral load during the antiviral treatment in renal transplant patients. *J Med Virol* 2005; 76(3): 367-72.
15. Ghaffari HS, Obeidi N, Dehghan M, Alimoghaddam K, Gharehbaghian A, Ghavamzadeh A. Monitoring of cytomegalovirus reactivation in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. *Pathol Oncol Res* 2008; 14(4): 399-409.
16. Griscelli F, Barrois M, Chauvin S, et al. Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(12): 4362-9.
17. Çolak D, Ögünç D, Tuncer D, Mutlu G. CMV saptanmasında CMV antijenemi ve hybrid capture CMV DNA hibridizasyon testlerinin karşılaştırılması. 8. Türk Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. 6-10 Ekim 1997, Antalya. Kongre Kitabı, Poster no: D-35.
18. Özkan E, Önal D, Çiftçi S, Beşışık SK, Yılmaz G, Badur S. Cytomegalovirus pp65 antijenemi testi ile pozitiflik saptanan allogenik kök hücre nakilli hastalardaki sonuçların 'murex hybrid capture CMV DNA assay' ile karşılaştırılması. 9. Türk Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. 3-8 Ekim 1999, Antalya. Kongre Kitabı, T 015.
19. Zeytinoğlu A, Erensoy S, Göksel S, Töz H, Yapar N, Bilgiç A. Sitomegalovirüs hastalığında antijenemi testi ile kantitatif DNA testinin karşılaştırılması. *FLORA* 2002; 7(4): 241-5.
20. Gökahmetoğlu S, Deniz E. Comparison of real-time, and qualitative polymerase chain reaction assays in detection of cytomegalovirus DNA in clinical specimens. *Saudi Med J* 2007; 28(11): 1658-61.
21. Nye MB, Leman AR, Meyer ME, Menegus MA, Rothberg PG. Sequence diversity in the glycoprotein B gene complicates real-time PCR assays for detection and quantification of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 2005; 43(10): 4968-71.