

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**KARACİĞER TRANSPLANTASYONU YAPILAN
HASTALARIN BK VİRÜS YÖNÜNDEN İZLEMİ**

Dr. KÜBRA DEMİR ÖNDER

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2013

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**KARACİĞER TRANSPLANTASYONU YAPILAN
HASTALARIN BK VİRÜS YÖNÜNDEN İZLEMİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. KÜBRA DEMİR ÖNDER

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. VİLDAN AVKAN OĞUZ

Bu uzmanlık tezi DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2011.KB.SAG.014 sayı
ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER:

TABLO DİZİNİ.....	II
ŞEKİL DİZİNİ.....	III
RESİM DİZİNİ.....	IV
KISALTMALAR.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
ÖZET.....	1
SUMMARY	3
GİRİŞ VE AMAÇ	5
GENEL BİLGİLER.....	7
1) Polyomavirüslerin genel özellikleri.....	8
2) Tarihçe.....	8
3) BK Virüsün genel özellikleri.....	10
4) Diğer sık görülen Polyomavirüs; JCV	10
5) BKV ve JCV karşılaştırması	11
6) BKV Epidemiyolojisi	12
7) BKV' nin genom yapısı	13
8) Patogenez.....	15
9) Klinik bulgular.....	16
10) Tanı.....	18
11) Korunma ve tedavi	22
GEREÇ ve YÖNTEM.....	24
BULGULAR	47
TARTIŞMA.....	63
KAYNAKLAR.....	72
EK	78

TABLO DİZİNİ:

Tablo 1: JC ve BK virusun özellikleri	12
Tablo 2: Kullanılan primer ve problemler.....	28
Tablo 3: Master miks bileşenleri.....	41
Tablo 4: Light Cycler® Gerçek Zamanlı PZR çalışma protokolü.....	45
Tablo 5: Olguların demografik özellikleri	48
Tablo 6: Yöntemlere göre pozitiflik saptanan hasta ve örnek sayıları	51
Tablo 7: BKV DNA ve decoy pozitifliklerinin cinsiyete göre dağılımı	53
Tablo 8: Primer hastalık ve kan ve/veya idrar BKV DNA arasındaki ilişki	54
Tablo 9: Primer hastalık ve decoy ilişkisi	55
Tablo 10: Pozitif olguların donör tipine göre dağılımı.....	55
Tablo 11: BKV göstergelerinin pozitifliği ile komorbid hastalıklar arasındaki ilişki	56
Tablo 12: Kan ve/veya idrar BKV DNA ile WBC (% PNL, Monosit, Lenfosit) ilişkisi	58
Tablo 13: Kan ve/veya idrar BKV DNA ile Kreatin, AST, ALT ilişkisi.....	59
Tablo 14: Testlerin duyarlılık ve özgüllüğü	62

ŞEKİL DİZİNİ:

Şekil 1: Küçük t antijeni dizilerine dayanılarak oluşturulmuş filogenetik ağaç.....	9
Şekil 2: BK Virion yapısı	14
Şekil 3: BKV Genom yapısı	15
Şekil 4: PZR dinamikleri	22
Şekil 5: Kandaki BKV DNA pozitifliğini gösteren amplifikasyon eğrisi	50
Şekil 6: Pozitif olgu sayılarının vizitlere göre dağılım grafiği	61

RESİM DİZİNİ:

Resim 1: Filtreli pipet ucu ve otomatik pipetler	26
Resim 2: High Pure PCR Template Preparation ekstraksiyon kiti içeriği	34
Resim 3: Kullanılan tampon çözeltiler	35
Resim 4: Reaksiyon miksi hazırlanırken.....	36
Resim 5: A) filtreli tüp, B) kollektör tüp	37
Resim 6: Yıkama tamponu ile yıkama işlemi	38
Resim 7: Sınıf II biyogüvenlik kabini.....	39
Resim 8: Sınıf II biyogüvenlik kabini.....	40
Resim 9: Kapiller tüp.....	42
Resim 10: Kapakları kapalı kapiller tüpler	42
Resim 11: Lightcycler® 1.5	43
Resim 12: Lightcycler 1.5 kapiller taşıyıcı (carousel, atlıkarınca).....	44
Resim 13: Örnek tanımlama ve sıralama ekranı.....	46
Resim 14: İdrarda decoy hücreleri	52

KISALTMALAR

BKV	: BK Virüs
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
JCV	: John Cunningham Virüs
MuPyV	: Murine Polyomavirüs
MPyV	: Mouse Polyomavirüs
SV 40	: Simian Vacuolating Virüs 40
KIPyV	: Karolinska Institute Polyomavirüs
WUPyV	: Washington University Polyomavirüs
MCPyV	: Merkel Cell Polyomavirüs
MCV	: Merkel Cell Virüs
DNA	: Deoksiribonükleik asit
PML	: Progresif Multifokal Lökoensefalopati
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
VP	: Viral Protein
NCRR	: Non Coding Regulatory Region (Kodlama yapmayan düzenleyici bölgeler)
ELİSA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
PVBN	: Polyomavirüs Bağlantılı Nefropati
Hİ	: Hemaglutinasyon İnhibisyon
PCR	: Polymerase Chain Reaction
CT	: Critical Threshold (Kritik eşik değeri)
DNAaz	: Deoksiribonükleaz
RNAaz	: Ribonükleaz
ASA	: American Society of Anesthesiologists
FM	: Fizik muayene
PNL	: Polimorf Nüveli Lökosit
AST	: Aspartat aminotransferaz
ALT	: Alanin aminotransferaz
CMV	: Cytomeglovirus
NTC	: Negatif kontrol
IC	: Internal kontrol
CP	: Crossing point (kesişme noktası)
KOAH	: Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı
SVO	: Serabro-vasküler olay
WBC	: Wight blood cell (beyaz küre)
BKVN	: BK Virüs ilişkili nefropati
BDSOT	: Böbrek dışı solid organ transplantasyonu
KDİGO	: Kidney Disease ; Improving Global Outcomes
Hp	: High powered field

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca yanımda olup tecrübe ve bilgilerini bizlere aktaran hocalarım Sayın Prof. Dr. Ayşe Yüce, Sayın Prof. Dr. Nedim Çakır, Sayın Prof. Dr. Nur Yapar, Sayın Prof. Dr. Vildan Avkan Oğuz, Sayın Doç. Dr. Ziya Kuruüzüm, Sayın Yard. Doç. Dr. Sema Alp Çavuş, Uzm. Dr. Oya Özlem Eren Kutsoylu' ya;

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sülen Sarioğlu, Sayın Prof. Dr. Reyhan Uçku, Sayın Prof. Dr. Sedat Karademir, Sayın Doç. Dr. Tarkan Ünek, Dr. Aylin Bacakoğlu ve Ege Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine;

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım Uzm. Dr. Zeynep Karlıbaş, Dr. Yasemin Balbay Şahin, Dr. Gülhan Çallı Samsa, Dr. Vecihe Dursun, Dr. Hatice Köse, Dr. Hande Hazır, Dr. Madina Abdulayeva, Dr. Muammer Çelik ve Enfeksiyon Hastalıkları ve Kl. Mikrobiyoloji AD hemşire, sekreter ve personellerine;

Zorlu okul ve meslek hayatım boyunca benimle birlikte yorulan sevgili aileme, bu çalışmayı hazırlarken gösterdikleri büyük fedakarlık ve emekler için sevgili 'annelerim' Rahime Demir ve Necmiye Önder'e, tezimin konu seçiminden başlayarak her adımında yanımda olan sevgili eşim Dr. Arif Hakan Önder'e ve hayatıma girişi ile her şeyin daha kolay ve güzel olmasını sağlayan 'uğur böceğim' sevgili kızım Burçe' me;

Sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürler....

Dr. Kübra Demir ÖNDER

ÖZET

KARACİĞER TRANSPLANTASYONU YAPILAN HASTALARIN BK VİRÜS YÖNÜNDEN İZLEMİ

Dr. Kübra Demir Önder

Tez Danışmanı: Sayın Prof. Dr. Vildan Avkan Oğuz

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, 35340, Inciraltı / İZMİR

Amaç: BK Virüs (BKV)‘ ün böbrek transplantasyon ve kök hücre alıcılarındaki etkileri net olarak biliniyorken, böbrek dışı solid organ alıcılarındaki etkileri tartışmalı olduğundan karaciğer transplantasyonu yapılan hasta grubunda BKV’ yi araştırmayı planladık. Çalışmamızda temel olarak, karaciğer transplantasyonu yapılmış hasta grubunda, transplantasyon sonrası ilk 3 ayda toplanan kan ve idrar örneklerinde, üç farklı yöntemle BKV’ nin araştırılması ve karaciğer, böbrek fonksiyonları ve greft disfonksiyonu ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. İkincil amacımız ise bu hasta grubunda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile BKV DNA saptama testinin rutinde kullanımının önemini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: 01 Ocak 2011 -31 Aralık 2011 tarihleri arasında DEUTF Genel Cerrahi Anabilim Dalı karaciğer transplantasyon ünitesinde ardışık olarak karaciğer transplantasyonu yapılan, gönüllü ve 18 yaşından büyük hastalar çalışmaya alındı. Hastalar transplantasyon sonrası ilk 3 ay, 2 haftada bir değerlendirildi. Her değerlendirmede kan ve idrar örnekleri toplanarak PZR ile BKV DNA ve idrarda decoy hücreleri araştırıldı, klinik veriler kaydedildi.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 39 hastadan 5 (% 12.8)’ inde BK viremi, 11 (% 28.2)’inde BK virüsü ve 13 (%33.3)’ünde decoy hücreleri saptandı. BKV pozitif ve negatif grup arasında demografik veriler, böbrek-karaciğer fonksiyonları, greft sağ kalımı açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Kanda BKV DNA pozitifliği standart alındığında decoy hücresi incelemesi ve idrarda PZR ile BKV DNA

saptanmasının duyarlılığı her iki yöntem için de % 40 bulunurken, negatif prediktif değerleri decoy için % 88.4, idrarda BKV DNA PZR için % 89.2 olarak saptandı.

Tartışma: Karaciğer transplantasyon hastalarında idrarda BKV hangi yöntemle araştırılırsa araştırılsın testlerin negatifliği pozitifliğinden daha değerlidir. Bu testler BKV enfeksiyonlarının dışlanmasında rutinde kullanılabilir ancak pozitiflik saptandığında sonuçların kan BKV DNA PZR sonuçları ile izlenmesi gerekir. İstatistiksel anlamlı fark saptanamasa da, böbrek ve karaciğer fonksiyon testlerinde nedeni açıklanamayan bozulmalar saptandığında, BKV' nin dikkate alınması gereken bir etken olduğu düşünülmektedir. Bu hastalarda rejeksiyon gelişiminde BKV' nin rolünün değerlendirilebilmesi için prospektif daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Polyomavirüs, BK Virüs, BKV, PZR, Decoy, Karaciğer transplantasyonu

SUMMARY:

MONITORING OF BK VIRUS IN LIVER TRANSPLANT RECIPIENTS

Dr. Kübra Demir Önder

Dokuz Eylul University School of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Izmir, Turkey

Aim: The role of BK Virus (BKV) in renal and bone marrow transplant recipients has already been defined. Because of unclear situation of BKV in non renal solid organ transplant recipients, we planned to determine the incidence and effects of BKV in liver transplant recipients. Primarily, we aimed to study BKV by three different methods (including polymerase chain reaction (PCR) assays of plasma and urine and decoy cell screening) in first three month after transplantation and evaluate the relationship between BKV with hepatic-renal functions and graft failure in liver transplant recipients. The second aim of this study was defining the importance of BKV DNA PCR in routine practice.

Materials and Methods: From January 1 to December 31, 2011 at the Liver Transplantation Unit of General Surgery Department of our center, all liver transplant recipients (≥ 18 years) were enrolled in this prospective study. The patients were visited bi weekly in first three months post transplantation and urine and plasma samples were collected for detection of BKV DNA using a real time quantitative PCR assay and decoy cell screening. Clinical data were also collected.

Results: Thirty nine liver transplant recipients were enrolled in this single center prospective study. BK viremia was detected in 5 patients (12.8 %) and BK viruria was detected in 11 patients (28.2 %). Decoy cells were positive in 13 patients (33.3%). We did not observe any difference about demographic data, renal-hepatic functions and graft survival between with and without BKV groups. In our study, urine BKV DNA PCR and decoy cell screening assays have low sensitivity and low positive predictive value compared with the blood BKV DNA PCR. But negative predictive values were 89.2% and 88.4% respectively.

Conclusions: According to results of our study, negative results of these two tests are more important than positive results. These tests (urine BKV PCR and decoy cell screening) may be useful for routine practice, but positive results of the tests should be confirmed by blood BKV PCR. Based on the results of our study and similar studies, despite there is no statistical significance, BKV is a factor that should be consider in this group of patients, if there is renal and hepatic dysfunction due to unknown reasons. More prospective multicenter studies are needed to define the role of BKV at rejection in liver transplant population.

Keywords: Polyomavirus, BK Virus, BKV, PCR, Decoy, Liver transplantation

GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer transplantasyonu kronik ve geri dönüşümsüz karaciğer hastalıklarının tedavisinde hayat kurtarıcı bir yöntem haline gelmiştir. Dünyada ilk karaciğer transplantasyonu T. Starzl ve ekibi tarafından Denver, Colorado' da 1967 yılında yapılmıştır. Ülkemizde ise ilk karaciğer transplantasyonu 8 Aralık 1988 tarihinde Ankara'da Organ Nakli ve Yanık Tedavi Vakfı Hastanesi'nde M. Haberal ve arkadaşları tarafından yapılmış olup, bu tarihten itibaren ülkemizde karaciğer transplantasyon sayısı giderek artmıştır (1). Türkiye genelinde 2002 yılında 159 olan karaciğer transplantasyon sayısı 2011 yılında 904'e ulaşmıştır (2).

Organ alıcılarına greft reddinin önlenmesi amacı ile verilen immunsupresif tedavi rejeksiyon oranını azaltırken fırsatçı enfeksiyonların görülme sıklığını arttırmaktadır. Bu enfeksiyonlara bakteriyel, fungal ve viral pek çok etken neden olmaktadır. Özellikle viral etkenlerin, yaptıkları enfeksiyonlara ek olarak immunmodulator etkilerinin de varlığı greft hasarlanmasını daha da arttırmaktadır (3).

Bu viral etkenlerden biri de Polyomaviridae ailesinden insanlarda hastalığa yol açtığı kesin olarak bilinen BK Virüs (BKV)' dür. *Polyomavirus hominis 1* olarak da adlandırılan BKV ilk kez 1971 yılında böbrek transplantasyonlu bir hastanın idrarından Gardner tarafından izole edilmiştir (4, 5).

İmmunsupresif hasta grubunda önemi artan BKV son yıllarda sıkça araştırılmaktadır. Virüsün böbrek ve kök hücre alıcılarındaki etkileri artık net olarak tanımlanırken böbrek dışı solid organ alıcılarındaki etkileri açıklığa kavuşturulmuş değildir (6, 7, 8).

Pub Med veri tabanı ile yapmış olduğumuz araştırmada, konu ile ilgili yapılmış çalışmalarda, BKV' nin karaciğer transplantasyonu yapılmış hastalarda etkisinin net olarak ortaya konamadığı görülmüştür (9,10). Bu nedenle çalışmamızda BKV' yi, karaciğer transplantasyonu yapılan hasta grubunda araştırmayı planladık.

Diğer fırsatçı virüs enfeksiyonları gibi BK virus enfeksiyonları da genellikle transplantasyon sonrası ara dönem denen, immunsupresyonun en yoğun olduğu 1-6 aylarda (sıklıkla ilk 3 ay) görülmektedir (11).

Çalışmamızda temel olarak, karaciğer transplantasyonu yapılmış hasta grubunda, transplantasyon sonrası ilk 3 ayda toplanan kan ve idrar örneklerinde, üç

farklı yöntemle BKV' nin araştırılması ve karaciğer, böbrek fonksiyonları ve greft disfonksiyonu ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

İkincil amacımız ise, PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile BKV DNA saptama testinin bu hasta grubunda rutinde kullanımının önemini değerlendirmektir.

GENEL BİLGİLER

- 1) Polyomavirüslerin genel özellikleri**
- 2) Tarihçe**
- 3) BK virüsün genel özellikleri**
- 4) Diğer sık görülen insan polyomavirüsü; JCV**
- 5) BKV ve JCV karşılaştırması**
- 6) BKV epidemiyolojisi**
- 7) BKV genom yapısı**
- 8) Patogenez**
- 9) Klinik**
- 10) Tanı**
- 11) Korunma ve tedavi**

Kronik ve irreversible karaciğer hastalıklarının kurtarıcı tedavisi olan karaciğer transplantasyonu, cerrahi teknikteki gelişmeler ve farklı immunsupresif ilaçların kullanıma girmesiyle giderek artan sayıda uygulanmaktadır. Greft sağ kalımını etkileyen en önemli faktör, ameliyattan hemen sonra başlanan ve ömür boyu kullanılan immunsupresif tedavidir. Akut rejeksiyon riski ve immunsupresif tedavinin en önemli dezavantajlarından olan enfeksiyonlar transplantasyondan sonraki ilk üç ayda en fazladır. İmmunsupresyonda ilk kullanılan ve günümüzde de yaygın olarak verilen kortikosteroidlerin yanında kalsinörin inhibitörleri (takrolimus, siklosporin) ve mikofenolat mofetil gibi daha potent olan immunsupresiflerin kullanıma girmesiyle fırsatçı enfeksiyonların önemi giderek artmaktadır (1).

Transplantasyon sonrası hastaların çoğunda en az bir enfeksiyon gelişir. Çoğu erken dönem bakteriyel enfeksiyonlar olmakla birlikte viral enfeksiyonlar da azımsanmayacak düzeydedir. Gelişen enfeksiyonların % 20-40'ı viral enfeksiyonlardır. İnsan polyomavirüsleri de immunsupresif hastalarda enfeksiyona neden olmaları nedeni ile son zamanlarda sıklıkla üzerinde durulan bir konudur (1).

Polyomavirüslerin genel özellikleri

Polyomavirüsler tüm dünyada popülasyonun çoğunda bulunmakla birlikte immun sistemi sağlam kişilerde belirgin bir hastalığa neden olmazlar. Tüm erişkin popülasyonunun % 90'ı polyomavirüslerden biri olan BKV açısından seropozitifdir. BKV immunsupresif hastalarda aktive olarak nefropati, hemorajik sistit ve üreteral darlığa neden olur. BKV' nin neden olduğu nefropati böbrek transplantasyon alıcılarında greft kaybı nedenlerinden biri olması açısından önemlidir (12).

Polyomavirüs genusu Papovaviridae ailesi içinde sınıflandırılmaktadır. Çift zincirli sirküler super sarmal DNA içeren, zarfsız ve ikozahedral simetride virüslerdir (13). Doğada yaygın olarak bulunurlar. İnsanlar, maymunlar, kemirgenler, sıgırlar, tavşanlar ve kuşlar polyomavirüslerin doğal konaklarıdır. Bu virüsler oldukça tür spesifik olup bir tür diğer türleri kolay kolay enfekte etmez (13). Bu nedenle İnsan (JC Virüs, BK Virüs), maymun (Simian virüs 40) ve fare vs. polyomavirüsleri olarak gruplandırılabilirler (12).

Tarihçe:

Bilinen ilk polyomavirüs olan Murine K virüsü (MuPyV) 1952 yılında Kilham tarafından farelerde tanımlanmıştır (14). Ardından 1953 yılında Gross yeni doğan farelerde tümör oluşumuna neden olan "mouse polyomavirüs"ü (MPyV) izole etmiştir (15). Rhesus tipi maymunları enfekte eden Simian polyomavirüs (Simian vacuolating virus, SV 40) 1960 yılında tanımlanmıştır (16).

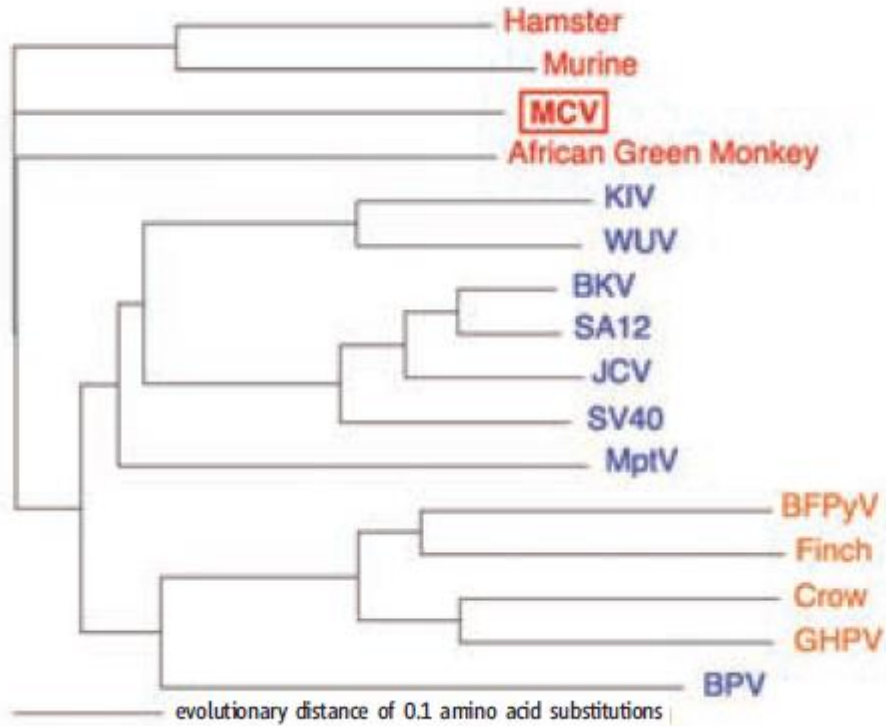
BK Virus (BKV), JC Virüs (JCV), WU, KI ve Merkel cell virüsleri *Polyomaviridae* ailesinin insanları enfekte ettiği bilinen üyeleridir. BKV ve JCV' nin insanlarda oluşturduğu hastalıklar yaklaşık 4 dekattır bilinmekte iken, yakın zamanda insanlardan izole edilmiş olan ve 'yeni polyomavirüsler' olarak da bilinen WU, KI ve Merkel cell virüslerinin etkileri netlik kazanmamıştır. İnsan polyomavirüslerinin

adlandırmasında ilk izolasyonun yapıldığı hastaların veya enstitülerin isimlerinin baş harfleri kullanılmıştır (12).

KI (Karolinska Institute) polyomavirüs (KIPyV) Allander tarafından, WU (Washington University) polyomavirüs (WUPyV) ise Gaynor tarafından solunum yolu enfeksiyonu olan hastaların solunum yolu sekresyonlarından sırasıyla 2007 yılında tanımlanmıştır (17,18).

İnsanlarda Merkel cell karsinom gelişimine neden olan Merkel cell polyomavirüs (MCPyV ya da MCV), Feng ve arkadaşları tarafından 2008 yılında izole edilmiştir. MCV ile birlikte bugüne kadar 8'i memelileri (bunlardan 5'i insanları) enfekte ettiği bilinen toplam 16 çeşit polyomavirüs türü tanımlanmıştır (19).

Şekil 1'de küçük t antijeni dizilerine dayanılarak oluşturulmuş filogenetik ağaç gösterilmiştir.



Şekil 1: Küçük t antijeni dizilerine dayanılarak oluşturulmuş filogenetik ağaç. SV 40 subgrubu mavi, MuPyV subgrubu kırmızı, avian polyomavirüs subgrubu turuncu ile gösterilmiştir (19).

BK Virüsün genel özellikleri :

BKV (*Polyomavirus hominis 1*) ilk olarak 1971' de böbrek transplantasyonu yapılan ve üreteral darlık gelişen bir hastanın idrarından Gardner ve arkadaşları tarafından izole edilmiş ve hastanın isminin baş harfleri kullanılarak adlandırılması yapılmıştır (4).

BKV Ortalama 40 nm çapında, $3-5 \times 10^6$ dalton molekül ağırlığında, çembersel çift iplikli hiper sarmal DNA içeren, çıplak, ikozahedral yapılı ve 72 kapsomerden oluşan bir virüstür. Isı ve formaline duyarlı, eter ve kloroforma dirençlidirler. Morfolojik olarak maymun Polyomavirüsü olan SV-40' a benzerlik göstermesine rağmen antijenik ilişki zayıftır. SV-40 virüsünün aksine BKV insan O grubu eritrositleri ve kobay eritrositlerini hemaglutine eder (20).

İnsan Polyomavirüsleri olarak bilinen JCV (*Polyomavirus hominis 2*) ve BKV dünyada yaygın olarak bulunan ve özellikle immun sistemi baskılanmış kişilerde reaktif olarak enfeksiyona neden olan latent virüslerdir.

Diğer sık görülen polyomavirüs; JCV :

JCV, 1971 yılında Padgett ve Walker tarafından progresif multifokal lökoensefalopati (PML) ile karakteristik beyin ak madde lezyonlarına sahip John Cunningham adında bir Hodgkin's lenfoma hastasının beyin dokusu otopsi örneklerinden üretilmiştir (21).

Nörotrop bir virüs olan JCV, periferik kan ve kemik iliği lenfositlerini enfekte ederek hematogen yolla beyine ulaşmaktadır. Ciddi immunsupresyon durumunda, virüsün oligodentrositlerde oluşturduğu litik enfeksiyon, demyelinizasyona yol açmakta ve progresif multifokal lökoensefalopati olarak tanımlanan santral sinir sistemi hastalığı gelişmektedir (22).

PML' de histopatolojik olarak beyin ak maddede fokal veya multifokal miyelin kaybına neden olan litik oligodentrosit enfeksiyonu mevcuttur. Genellikle motor bozukluklar, görme yetersizliği ve zihinsel kavrama yeteneği bozukluğu şeklinde üç temel semptomla karakterizedir. Bunlar hemiparezi, kortikal körlük, görme alanı bozukluğu ve ilerleyen demans olarak ortaya çıkar. PML' nin fırsatçı bir enfeksiyon olduğu düşünülmektedir. Daha çok Lenfoma ve lösemi gibi lenfoproliferatif hastalığı

olanlarda, immunsupresif tedavi alan solid organ alıcılarında ve AIDS hastalarında görülmektedir (5).

PML'de mortalite oranı yüksektir. Semptomlar ortaya çıktıktan sonra 3-9 ay içinde ölümle sonuçlanır (22).

Fizik muayene, nöroradyoloji bulguları, BOS' ta PZR ile JCV DNA' nın gösterilmesi ve beyin biyopsisi ile tanı konmaktadır. Fokal lezyonlardan yapılan biyopsinin duyarlılığı % 70-96, özgüllüğü % 100'dür. Beyin biyopsisinin riskleri nedeni ile tanıda sıklıkla, daha hızlı ve daha az invaziv bir yöntem olan BOS' ta PZR ile viral DNA' nın saptanması yöntemi kullanılmaktadır. Yöntemin duyarlılığı % 72-92, özgüllüğü % 92-100 olarak verilmiştir (12).

Bazı hastalarda PML kliniği olmamasına rağmen, BOS' ta viral DNA saptanabilmektedir. Bu durum JCV 'nin PML dışı enfeksiyonlar yapabilmesi veya BOS lenfositlerindeki latent virüsün saptanması şeklinde yorumlanabilir (22).

BKV ve JCV karşılaştırması:

DNA dizi analizleri BK ve JC virüslerinin DNA düzeyinde yaklaşık % 75, aminoasit düzeyinde % 68 homoloji olduğunu göstermiştir (23,5). Ancak birbirleri ile serolojik olarak çapraz reaksiyon vermezler. İnsanlar yaşamları boyunca bu virüslerden biriyle veya her ikisi ile birden, birbirinden bağımsız olarak karşılaşılır (20).

Bu iki virüs arasındaki en önemli genomik farklılıklar, düzenleyici bölgelerin kodlama yapmayan nükleotidlerinde yer almaktadır. Düzenleyici bölgelerin; transkripsiyon, genom replikasyonu, JCV için insan glial, tonsiller, stromal ve hematopoetik hücrelere, BKV için ise insan tonsili, pankreatik adacıklar, böbrek ve hematopoetik kök hücrelerine doku tropizminin düzenlenmesi dahil pek çok farklı fonksiyonu vardır. Düzenleyici bölgeler tekil veya tekrarlı diziler ve DNA dizi eklemeleri içerebilir. Bunların konaktaki replikasyon esnasında arttırıcı dizilerin delesyon veya duplikasyonundan kaynaklandığı düşünülür. Bu viral varyantlar, ürogenital organlar veya lenfoid dokudan vücudun akciğer, beyin ve beyin omurilik sıvısını kapsayan diğer bölgelerine yayılması ile ilişkilendirilmiştir (24,5).

JC ve BK virusun özellikleri Tablo 1' de verilmiştir.

Tablo 1: JC ve BK virusun özellikleri (Kaynak 20)

Özellik	JCV	BKV
Büyüklik	39-42.5 nm	43.6 nm (Kaynak 4)
Nükleik asit	Çift iplik, çembersel DNA	Çift iplik, çembersel DNA
Virion	Çıplak, ikozahedral	Çıplak, ikozahedral
Replikasyon yeri	Çekirdek	Çekirdek
Enfeksiyon yeri	Beyin	Üretra
Hemaglutinasyon	+	+
İnsan fetal glial hücrelerinde üreme	+	+
İnsan böbrek hücrelerinde üreme	-	+
Maymun böbrek hücrelerinde üreme	-	+
Beyinde onkojenite	Kuvvetli	Zayıf
Diğer dokularda onkojenite	Orta	Zayıf

BKV Epidemiyolojisi:

Polyomavirüsler dünya üzerinde oldukça yaygın olup bunlara karşı antikor pozitifliği %70-90 arasındadır. BKV çocukluk döneminde özellikle 3-4 yaşlarında kazanılmaktadır (20).

Birçok kişi yaşamları boyunca JCV ve BKV' ye karşı antikor titresi bulundurur. Bununla birlikte her iki virüse karşı olan kalıcı ve yüksek antikor düzeyleri yaygın değildir. Genelde erişkin popülasyonda ikisi birlikte seropozitif olmakla birlikte vücuda girişleri ve primer infeksiyonları birbirinden bağımsızdır (12).

Polyomavirüsler tür spesifik olduğundan, insan polyomavirüslerinin hayvan rezervuarı bulunmayıp insandan insana bulaştığı kabul edilmektedir. Bulaş yolu hala tam olarak bilinmemekle birlikte, bulaşın başlıca solunum yolu ve fekal-oral yol ile olduğu düşünülmektedir. Diğer muhtemel bulaş yolları ise transplasental geçiş, organ nakli ve idrar, kan ya da oral salgılarla maruziyettir (5).

Akut enfeksiyon sonrasında BKV ve JCV' nin özellikle böbrek tübüler epitelyal hücrelerde ve lenfoid sistem hücrelerinde latent olarak kaldığı düşünülmektedir. İmmüsupresyon durumunda aktif hale gelerek enfeksiyona neden olurlar (12).

Mikofenolat mofetil ve takrolimus gibi potent immunsupresiflerin transplant alıcılarında kullanıma girmesiyle BKV prevelansında artış olmuştur (25).

BKV' nin idrar ve kanda saptanması (virüri ve viremi) genellikle transplantasyon sonrası ilk 6 ay içinde görülmekte olup insidansı 1 yıldan sonra azalmaktadır (26). BK virüri sağlıklı asemptomatik bireylerde % 20' ye kadar görülebilir. İmmunsupresyon durumunda ise bu oran % 10-60' a çıkabilir (27). İmmunsupresyonun yoğunluğu ile bu oran da artar (28). Transplantasyon yapılan hastalarda immunsupresif ilaçların kullanılması ile birlikte vücutta latent olarak bulunan Polyomavirüsler reaktif olur. Böbrek transplantasyonu yapılan hastaların % 10-45' inde, kemik iliği transplantasyonu yapılan hastaların % 50' sinde transplantasyondan sonraki ilk 3 ay içinde idrardan BKV izole edilebilmektedir (20).

Hamile kadınların %3' ünde ve kanserli hastaların %10' unda JCV veya BKV virüsü ortaya çıkmaktadır ancak belirli bir klinik bulgu ile ilişkili değildir. Bu durum immün ya da hormonal sistem değişiklikleri sonucu virüsün reaktivasyonu ile açıklanmaktadır. Hamilelik sırasındaki virüs reaktivasyonu sonucu transplasental geçiş ve konjenital enfeksiyon ile ilgili kesin kanıtlar elde edilememiştir (29).

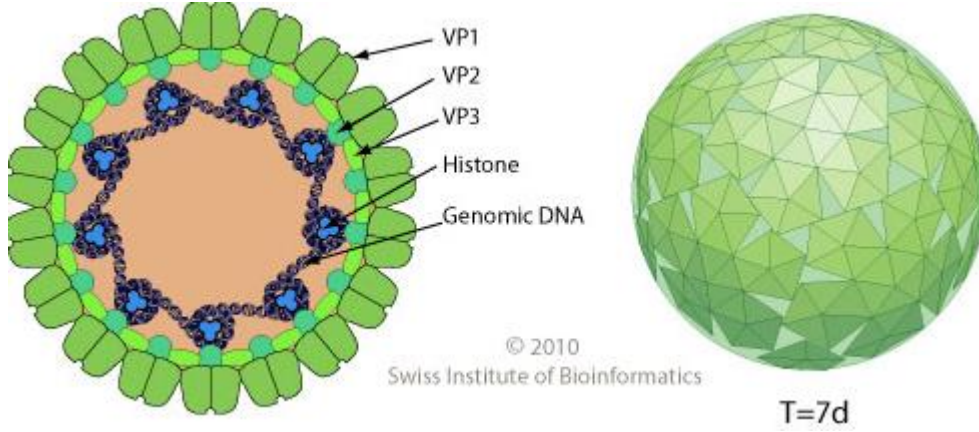
Genel popülasyonda JC virüsü BK virüsünden daha yaygınken, immunsuprese grupta BK virüsü daha yaygındır. Ayrıca bilinmeyen nedenlerle BK virüsü ortaya çıkması immunsupresyonun yoğunluğu ile doğru orantılı iken, JC virüsü değildir (30).

BK viremi ise hem sağlıklı hem de immunsuprese bireylerde genellikle çok nadir saptanır. Böbrek transplantasyonlu hastalarda plazmada BKV DNA pozitifliği saptanması BKV ilişkili nefropati gelişimine işaret eder (7,31).

BKV ilişkili üreteral darlık insidansı böbrek transplant alıcılarında %3' tür (32). Genel transplantasyon popülasyonunda ise % 0.5-6 oranında görülmektedir (33). Hemorajik sistit BKV ilişkili komplikasyonlardan en sık görüleni olup, kemik iliği transplantasyon alıcılarında %10-25 oranında görülmektedir (34).

BKV' nin genom yapısı:

BKV ikozahedral simetride, zarfsız, çift zincirli sirküler super sarmal DNA içeren bir virüstür (Şekil 2). Çapı yaklaşık olarak 40.5- 44 nm' dir. Yapısının % 88'ini protein ve %12'sini DNA oluşturur (13).



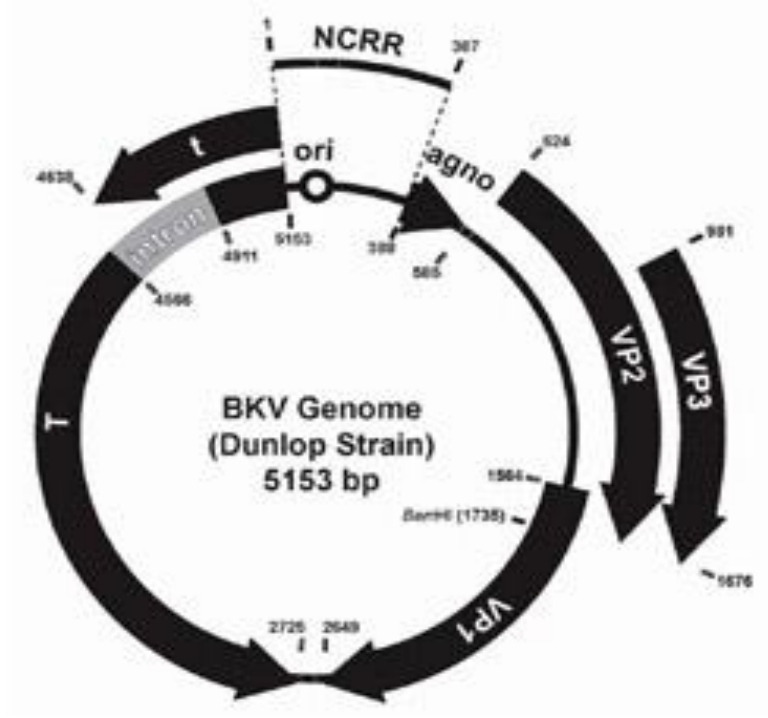
Şekil 2: BK Virion yapısı (35).

Viral genom erken kodlama bölgesi, geç kodlama bölgesi ve kodlama yapmayan düzenleyici bölge şeklinde 3 ayrı bölgeye dağılmış toplam 5000 baz çiftinden oluşmaktadır. Kodlama yapmayan düzenleyici bölgeler, hem erken hem de geç kodlama bölgelerinde kodlanan DNA'nın replikasyon ve transformasyonunu düzenleme görevi yapar (13).

Erken kodlama bölgesi, DNA replikasyonundan önce transkribe olur ve büyük tümör antijeni (T antijeni) ile küçük tümör antijenini (t antijenini) kodlar. Geç kodlama bölgesi DNA replikasyonundan sonra transkribe olur ve viral protein 1 (VP-1), VP-2, VP-3 ve agnoproteini kodlar (13). T antijenin polyomavirüs enfeksiyonu gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Polyomavirüsler tarafından sentezlenen erken proteinler, tümör antijenleri olarak bilinmektedir. Bunlardan 97.000 dalton molekül ağırlıklı "T" (büyük) antijen çekirdeğe, "MT" (orta) antijen membrana ve 17.000 dalton molekül ağırlıklı "t" (küçük) antijen stoplazma veya çekirdeğe bağlanmaktadır. T ve MT antijenlerinin viral replikasyonun yanı sıra transformasyondan da sorumlu oldukları düşünülmektedir. Geç proteinler ise virion partikülleri olan VP-1, VP-2 ve VP-3 tür. VP-1 virusun glikoprotein yapıdaki hücre reseptörüne tutunmasını sağlayan ve hemaglutinasyondan sorumlu dış proteindir. Enfeksiyon ve hemaglutinasyon anti-VP-1 antikorları ile inhibe edilmektedir (20).

Kapsidin dış kabuğu, içteki VP-2 ve VP-3'ün etrafına simetrik olarak dizilmiş beş VP-1 molekülü içeren 72 kapsomerden oluşmaktadır (5). VP-2 ve VP-3 ise viral genomla ilişkide olan iç proteinlerdir. Viral üniteler çekirdekte bir araya gelir ve hücreden otolizis ile olgunlaşır (20).



Şekil 3: BKV Genom yapısı. (*NCRR=non coding regulatory region) (36).

VP-2 ve VP-3'ün, VP-1'in stoplazmadan nükleusa taşınmasına ve virüslerin genomik nükleotidlerle birleşmesiyle virionun bir araya gelmesine yardımcı olduğuna inanılır (37).

Elektron mikroskopi çalışmaları, klonlanmış VP-1 moleküllerinin virüs benzeri parçacıklar oluşturmak için, boş Polyomavirüs kapsitlerinin ikozahedral yapısı ile kendiliğinden kümelendiğini göstermiştir (38). Bu şekilde oluşturulmuş virüs benzeri parçacıklar bazı çalışmalarda ELİSA antijenleri olarak kullanılmıştır (39,5). BKV genom yapısı Şekil 3' te gösterilmiştir.

Patogenez:

BKV' nin konağa girişinin solunum yolu ve/veya oral yol ile olduğu düşünülmektedir. BKV primer enfeksiyonu çocukluk çağında ve asemptomatik olarak geçer. Enfeksiyon sırasında viremi ile ürogenital sisteme giden virüs tubuler

epitel hücrelerinde latent döneme geçer. BKV patogenezi konağa ait özellikler, hedef organ hasarı ve immunsupresyon gibi faktörlere bağlıdır.

BKV için yüzey reseptörü alfa-2-3 bağlı bir sialik asittir ve BKV hücreye pinositoz (klathrine bağlı reseptör aracılı endositoz) ile girer, kapsidi soyulduktan sonra nükleik asitlerin çekirdeğe taşınmasıyla replikasyonu başlar (5).

Genellikle kollektör tüplerin epitel hücrelerini, renal kaliks ve renal pelvisin tubuler epitelini etkiler. Bazal membranda nekroz ve litik destrüksiyon yaparak tubuler sıvının interstisyel alana geçip, burada birikerek intersitisyel fibrozis ve tubuler atrofi yapmasına neden olur (12).

Primer enfeksiyon sırasında diğer viral enfeksiyonlarda olduğu gibi humoral immun yanıt ortaya çıkar. Akut dönemde Ig M ve Ig A antikorları oluşmaktadır. Yüksek antikor titreleri virüsün reaktivasyonunu ve idrarla salınımını önleyememektedir. Alıcının ileri yaşta ve yüksek anti BKV Ig G seviyelerine sahip olması transplantasyon sonrası BKV reaktivasyon riskini arttırmaktadır (40).

Klinik bulgular:

İnsan Polyomavirusleri ile oluşan primer enfeksiyon genellikle asemptomatik veya minimal semptomatik geçer. Primer enfeksiyonu geçiren çocuklarda nadiren ateş ve belirgin olmayan akut üst solunum yolu semptomları veya akut sistit şeklinde görülebilir. İmmun sistemi normal çocuk ve erişkinlerde primer enfeksiyon sırasında nadiren viremi veya virüri olabilmekle birlikte enfeksiyon sonrası seropozitif kişilerin idrarlarında virüs saptanamamaktadır. Akut enfeksiyon sonrasında JCV ve BKV' nin özellikle böbrekte ve lenfoid sistem hücrelerinde latent olarak kaldığı düşünülmektedir. Sağlıklı insanlarda enfeksiyon yaşam boyu semptomsuz olarak devam eder (5).

BKV kısmi veya mutlak hücre bağışıklık yetmezliği sırasında latent enfekte kişilerde yeniden aktif hale gelebilir. Semptomsuz virüriden, şiddetli ya da ölümcül bir hastalığa kadar değişik tablolara neden olabilir (5). Pnömoni, hepatit, retinit, meningoensefalit, hemorajik sistit, üretral darlık ve nefrit yapabilir (30).

BKV genitoüriner sistem hücrelerine tropizm gösterir. Kemik iliği ve solid organ transplantasyonu yapılanlarda (hemorajik veya hemorajik olmayan) sistit ve üretral darlığa neden olur. Ayrıca böbrek transplantasyonu yapılanlarda erken fark edilmezse polyomavirüs bağlantılı nefropatiye (PVBN) neden olabilir (5).

- Nefropati;

BK replikasyonu PVBN için başlıca risk faktörüdür. Bu nedenle BK replikasyonunun rutin taramalarla tespit edilmesi, hastalık riski taşıyan böbrek allogreft hastalarının izleminde önemlidir.

PVBN prevalansı merkezler arasında % 1-10 arasında değişir. Allogreft kaybı oranı % 10-80 aralığındadır (41,5). Çoğu vaka organ naklinden sonraki ilk 1 yıl içinde görülür. BK virüsü ortalama 4 haftada viremiye ve ortalama 12 hafta sonra da PVBN' ye dönüştüğünden nakilden sonra aralıklı olarak idrarın bu açıdan test edilmesi önerilmektedir (7,5).

BKV nefropatisi gelişiminde ileri yaş, erkek cinsiyet, diyabet varlığı ve beyaz ırk yüksek risk faktörleridir (41). BKV nefropatisinde greft rejeksiyonuna benzer semptomsuz, yavaş artış gösteren serum kreatinin düzeyleri vardır. Bazı hastalarda ateş ve hematüri ortaya çıkabilir (12).

BKV' nin fare ve hamsterlarda tümör oluşumunu indüklediği bilinmektedir (15). İnsan tümörleri ile ilişkisi ise aydınlatılabilmemiş değildir.

- Üreteral darlık;

Üreteral darlık gelişen böbrek transplantasyon hastalarında, transplante edilen böbreğin innervasyonu olmadığı için genelde ağrı ve rahatsızlık hissi olmaz. Bununla birlikte üriner obstruksiyon ortaya çıktığında buna bağlı kreatinin düzeylerinde yükselme görülür (12).

- Hemorajik sistit;

Kemik iliği transplantasyonu yapılanların yaklaşık %50'sinde BK virüsü gelişir. Bunların da %10-25'inde transplantasyondan 2 ay sonra hemorajik sistit ortaya çıkar. Klinik olarak dizüri, poliüri, suprapubik hassasiyet ve çeşitli derecelerde hematüriye neden olur (12,34).

Tanı:

Polyomavirüs enfeksiyonları genellikle belirtisiz veya hafif ve spesifik olmayan belirtilerle seyretmesi nedeni ile klinik tanı konulması mümkün olmamaktadır. İmmünespresif hastalarda tanı genellikle sitolojik inceleme, biyopsi ve/veya moleküler yöntemlerle konmaktadır.

- Hücre kültürleri:

Hücre kültürlerine virüs ekilmesi ile BKV izolasyonu mümkün ise de rutin tanıda pratik değildir. BKV primer tek katmanlı hücre kültürlerinde (insan embriyonik böbrek, pankreas adacığı, insan sünnet derisi hücrelerinde), insan diploid akciğer fibroblast, insan fetal beyin ve maymun böbrek hücre kültürlerinde üreyerek bu kültürlerdeki hücrelerin yuvarlaklaşıp küçülmesine, çekirdeklerinin büyümesine ve hücrelerin tabakadan koparak kültür sıvısına dökülmesine neden olurlar (20).

- Sitolojik inceleme;

BK virüsünün saptanmasında sıkça kullanılan bir yöntem de idrarın sitolojik incelemesidir. İdrar sedimentinden hazırlanan preparatların papanicalou, hemotoksilen-eozin veya giemsa ile boyanması ile enfekte hücreler, normalden büyük çekirdek yapıları ve çekirdek içi buzlu cam görünümü oluşturan tek, geniş, bazofilik inklüzyon cisimciklerinin varlığı ile tanınırlar. Hücrelerin bu görünümüne "kuş gözü" görünümü denir. Enfekte bu hücreler "decoy" hücreleri olarak adlandırılır. Üriner epitel hücrelerinde görülen bu değişiklikler malignite ve diğer viral (JCV, Adenovirüs) enfeksiyonlarda da olabildiğinden tanıda karışıklığa neden olabilir. Ayrıca BK virüsünde herhangi bir sitolojik değişiklik oluşmayabilir de (20,12).

Toplumdaki yüksek polyomavirüs seroprevalansı ve belirgin bir hastalığı olmayan kişilerin de idrarında BK virüsü tespit edilebilmesi, tanıda tek başına virüsün bir araç olarak kullanılmasını imkansız kılmaktadır. Ancak idrar BKV konsantrasyon ölçümleri hemorajik sistit hastalarının idrarında, semptomsuz hastalara kıyasla daha fazla viral yük olduğunu göstermiştir (5,12).

Böbrek transplantasyonunun ardından geçici virüsü olabildiği gösterildiğinden tek bir pozitif tarama sonucu çok az tanısal değere sahiptir. Düzenli aralıklarla ek taramalar veya 4 hafta içinde periferik kan veya idrardaki viral yük ölçümünün doğrulanması tavsiye edilir (41,5).

- Elektron mikroskopisi:

Elektron mikroskopisi ile virionların gösterilmesi pahalı ve pratik olmayan bir yöntemdir.

- Immunohistokimyasal ve Serolojik testler:

İdrarda direk floresan antikor yöntemi ile antijen saptanması mümkün olmakla birlikte rutin uygulama için pratik değildir. BKV antijenlerinin (VP-1 ve agnoprotein) tespitinde poliklonal serumlar denenmiştir. BKV large T antijenini tanıyan monoklonal antikorlar ise böbrek biyopsi örneklerinde virüs tespiti için kullanılmıştır (5). Polyomavirüs enfeksiyonlarında antikorların saptanmasında kullanılan temel serolojik yöntemler ELİSA ve Hemaglutinasyon İnhibisyon (Hİ) testidir. Bu yöntem kazanılmış bağışıklığı belirlemekte ve seroepidemiolojik çalışmalar için önerilmektedir. Ayrıca JCV veya BKV spesifik Ig M antikorlarının tespiti için enzim immunoassay testi kullanılabilir (5).

- Biyopsi:

İnvaziv bir yöntem olmasına rağmen greft disfonksiyonu veya reddi şüphesi varsa, nefropati tanısı için böbrek biyopsisi yapılmaktadır. PVBN mikroskopik tanısında renal tubuler epitelyum ve üretra dokusunun enfekte epitel hücrelerinde nükleus içinde bazofilik inklüzyonlar ve yer değiştirmiş kromatin gözlenmesi, tübüler nekroz, atrofi ve fibrozis saptanması önemlidir (5).

Bu histopatolojik değişiklikler medulla ve distal tubulden başlar, proksimal tubule ilerler. Fokal tutulum yapma özelliğinden dolayı böbrek biyopsisinin yalancı negatiflik oranı % 30' un üzerindedir (12).

- Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

Kan, idrar ve BOS gibi örneklerde polyomavirüs DNA tespiti için günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır.

PZR temeline dayanan kalitatif BKV DNA tespit testleri hemorajik sistitin tanısında kullanılırken; PVBN taraması için kantitatif testler kullanılmaktadır. Çünkü viral yük ne kadar fazla ise PVBN gelişme riski kadar yüksektir (30).

BKV ve JCV DNA' sı konvansiyonel ya da gerçek zamanlı (real time, RT) PZR testleri ile tespit edilebilmektedir. Polyomavirüsler için PZR testinin dizaynı, bunların genom dizilimindeki yüksek düzeydeki benzerlik yüzünden zordur. Genellikle konvansiyonel ya da RT PZR çalışmalarında T antijeni ve VP-1 genlerindeki

bölgeler hedef olarak kullanılmıştır çünkü bu bölgeler farklı polyomavirüsler arasında en fazla değişiklik gösteren bölgelerdir (5).

Konvansiyonel PZR' den sonra ürünler etidyum bromid içeren agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak belirlenebilir. Gerçek zamanlı PZR hem uygulama kolaylığı hem de konvansiyonel PZR' ye göre 10-100 kat daha hassas oluşu nedeni ile polyomavirüs DNA miktar tayininde seçilen bir yöntemdir. 96 gözlü pleyt ya da kapiller konfigürasyonlar kullanılarak gerçek zamanlı PZR uygulanabilir (42,5).

BKV için plazmada yüksek viral konsantrasyonlar yaygın değildir. İdrardaki viral yük sıklıkla ≥ 7 log düzeyine ulaşabilmekte ya da bu düzeyi geçmektedir (43). Bu nedenle kanda BKV pozitifliği saptanması idrardan daha nadirdir. BKV nefropatisi tanısında kanda BKV PZR' nin negatif prediktif değeri %100 iken, pozitif prediktif değeri % 50'dir (44). Nefropatiden farklı olarak, hemorajik sistit ve üreteral stenozda genellikle kanda BKV saptanmaz (12).

PZR yöntemi:

DNA ısı ile denatüre edilerek zincirler birbirinden ayrılmakta, kalıp DNA zincirinin karşısına gelecek oligonükleotid dizileri (primerler) bağlanmakta, DNA polimeraz enzimi ile her zincirin karşısında komplementer DNA sentezlenmekte ve böylece bir döngü tamamlanmaktadır. Isı döngüleri tekrarlandıkça DNA kopyaları (PZR ürünleri) çoğaltılmaktadır. Öncül olarak özgül oligonükleotitler kullanıldığı için PZR sonunda sadece araştırılan nükleik asitler saptanmaktadır. Çoğaltılan DNA dizileri jel elektroforezinde gösterilebildiği gibi, işaretli nükleik asit problemleri ile hibridizasyonla, duyarlılık ve özgüllük artırılır (45).

Bir PZR döngüsü temel olarak 3 ana basamaktan oluşmaktadır.

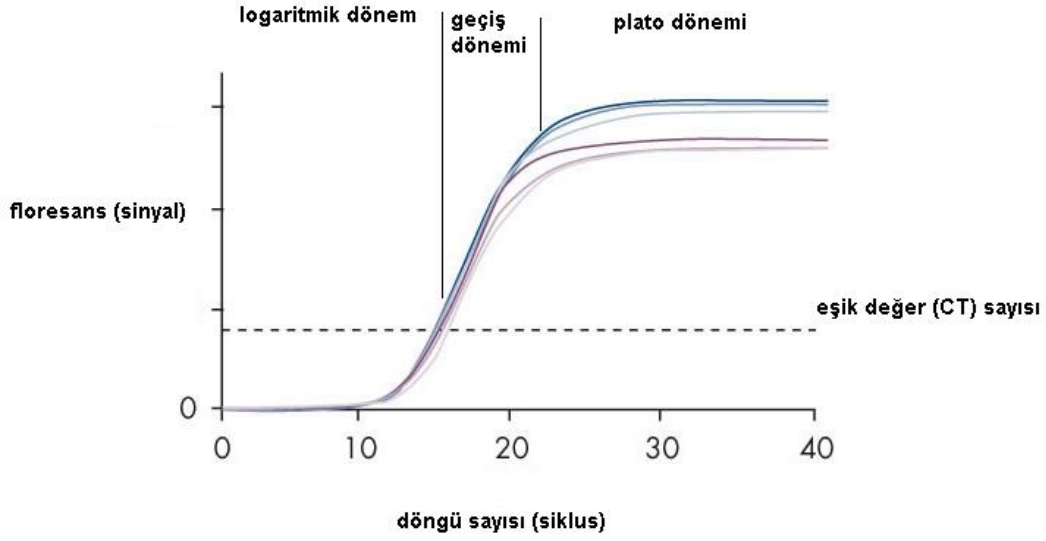
1. Denatürasyon; çift iplikli DNA'nın 90- 95°C sıcaklıkta açılıp tek iplikli DNA'ya dönüşmesi. Bağların yarısının açıldığı ısıya erime sıcaklığı (melting) denir.
2. Annealing: ortamın 40-60 °C ye soğutulmasıyla primerlerin tek iplikli DNA ya bağlanması
3. Elongasyon: Sıcaklığın 70-75 °C ye yükseltilmesiyle tek iplikli DNA kalıplarına bağlanmış olan primerlerden zincir uzamasının gerçekleştirilmesi (46).

PZR; her bir siklusu 94 °C de 20 saniyelik denatürasyon, 55 °C de 20 saniyelik bağlanma ve 72 °C de 30 saniyelik uzamayı içeren 30 siklusluk bir döngü programıdır.

RT PZR; hedef DNA'nın amplifikasyonu gerçekleşirken aynı anda çıkan ürünlerin prob ile saptanmasını sağlayan, bu basamakları aynı kapalı tüp içinde birleştiren PZR türüdür. Böylece ürünler hem işlem sırasında hem de işlem sonrasında görülebilmektedir. Bu şekilde duyarlılık artar, kontaminasyon azalır. Kantitatif testler için kantitasyon aralığı da genişlemektedir. Günümüzde ticari gerçek zamanlı PZR sistemleri geliştirilmiştir. Prob saptama formatları Taqman, molekuler beacon, lightcycler ve ampliflor teknikleridir (45).

Prob saptama formatları, temel olarak işaretleyici moleküllerden, PZR ürünleri oluşurken meydana gelen floresansın ölçümüne dayanır. Çalışmamızda kullanılan Lightcycler yönteminde işaretleyici molekül taşıyan iki komşu prob kullanılır. Bunlar hedefe bağlandıkları zaman birbirleriyle de temas eder ve floresans oluştururlar. Oluşan bu floresansın ölçümü ile nükleik asitler çoğalma işlemi sırasında bile saptanabilmektedir.

Klasik PZR ile tepkime sonunda biriken ürünler üzerinden hesapla miktar belirlenirken, gerçek zamanlı PZR sisteminde, araştırılan örnekte saptanabilecek düzeyde ürün biriktiği an (saptamanın olduğu ilk döngü; CT= critical threshold) belirlenerek hesap yapılır ve nükleik asit miktarı (viral yük) belirlenir. Hedef nükleik asit miktarı ne kadar yüksekse, saptama da o kadar erken olur. Her çalışmada örnek ve kontrollerden başka, içlerindeki nükleik asit miktarı belli olan standartlar da çalışılarak dış standart eğri oluşturulur. Bu standartların CT sayıları ile örneklerin CT sayıları karşılaştırılarak örnekteki nükleik asit miktarı hesaplanır (45). Şekil 4' te PZR dinamikleri gösterilmiştir.



Şekil 4: PZR dinamikleri (Erensoy S. PZR dinamikleri (45) şemasından uyarlanmıştır)

Korunma ve Tedavi:

Alfa İnterferon, sitarabin, prednizon, vidarabin, fludarabin, topoizomerez inhibitörler ve kamptotesin' in BKV aktivasyonu üzerine etkisi laboratuvar ortamında bilinmekle birlikte polyomavirüslere bağlı gelişen hastalığın tedavisinde bunların etkinliği netlik kazanmamıştır. Polyomavirüs enfeksiyonlarının tedavisinde etkinliği kanıtlanmış antiviral ajan henüz olmadığından ve enfeksiyonları sıklıkla asemptomatik seyrettiğinden tedaviye gerek duyulmaz. Bu nedenle immunsupresif hastalarda BKV enfeksiyonu saptanması halinde semptomatik tedavi ve immunsupresif ilaçların modülasyonu önerilmektedir (5).

BKV ye bağlı hemorajik sistitin semptomatik tedavisi bol hidrasyon, diüretik tedavi, mesane irrigasyonu ve gerekirse transfüzyon gibi yaklaşımları içerir. Şiddetli hematüriye bağlı pıhtı oluşursa kateterizasyon ve sistoskopi gerekebilir.

Son zamanlarda böbrek transplatasyon alıcılarında tavsiye edilen BKV testi algoritması PVTN gelişmeden, erken dönemde BKV tespitini amaçlamaktadır (41). Çünkü BK ilişkili nefropati %1-10 oranında kalıcı böbrek yetmezliğine neden olur (12).

İn vitro şartlarda anti viral etkiler gösteren ajanlar olan sitidin analoğu sidofovir ve leflunomidin düşük dozlarının PVBN ye karşı bir miktar etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. İmmunsupresyonun azaltılması akut red şüphesi olan hastalarda kontrendikedir ve sidofovir ile kombine edilen leflunomid bu hastalar için tek mümkün tedavi seçeneği olarak görölmektedir. Sidofovir aynı zamanda BKV tarafından oluşturulan hemorajik sistitin de tedavisinde kullanılabilir. Ancak JCV replikasyonu üzerine etkinliği gösterilememiştir (5).

Bulaşma yolları tam olarak bilinmediğinden ve yaygın olarak bulunduğundan Polyomavirüs enfeksiyonlarının kontrolü mümkün görünmemektedir (20).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma yerleri;

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, DEÜTF Genel Cerrahi Anabilim Dalı Karaciğer transplantasyon ünitesi, DEÜTF Patoloji Anabilim Dalı Sitoloji laboratuvarı ve GENMAR teşhis ürünleri AR-GE laboratuvarında yapıldı.

Hasta grubu;

01 Ocak 2011 -31 Aralık 2011 tarihleri arasında DEÜTF Genel Cerrahi Anabilim Dalı Karaciğer transplantasyon ünitesinde karaciğer transplantasyonu yapılmış olan, gönüllü ve 18 yaşından büyük hastalar çalışmaya dahil edildi.

Etik kurul onayı;

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 31.12.2010 tarihinde B.30.2.EGE.0.20.05.00/OY/54-40 sayı numarası ve 10-12/4 karar numarası ile etik kurul onayı alındı.

Aydınlatılmış onam;

Hastanemizde 01 Ocak 2011 tarihinden itibaren ardışık olarak karaciğer transplantasyonu yapılmış olan hastalar, operasyondan sonraki ilk iki hafta içinde görölerek araştırılması yapılacak olan BK virus (BKV) ve çalışma düzeni hakkında bilgilendirildi ve çalışmaya dahil edilmeden önce her hastaya aydınlatılmış onam formu okutularak imzalatıldı.

İstatistiksel analizler:

Çalışma verilerinin analizi SPSS for Windows version 16.0 ile yapıldı. Kantitatif veriler için Mann-Whitney U; kalitatif veriler için Fisher kesin testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

GEREKLİ MALZEMELER

Hasta örneklerinin toplanması ve depolanması aşamasında kullanılanlar;

- 10 cc hacimde steril plastik enjektör
- 10 cc hacimde vakumlu EDTA' lı tüp
- 100 cc hacimde steril idrar kabı
- 1.5 cc hacimde steril, şeffaf, DNAaz/ RNAaz dan arındırılmış eppendorf tüpü
- NF 815 santrifuj cihazı (Nüve)
- Derin dondurucu (-20 °C ile -40 °C derece aralığında) (Gold Master)

Decoy hücresi taraması için kullanılanlar;

- Hemotoksilen boyası (Harris, 109253)
- Lam
- Absolut alkol (Merck Millipore, 100983.2500)
- %96 lık alkol (Merck Millipore, 100971.2500)
- %80 lik alkol
- %70 lik alkol
- Ksilol solusyonu (Merck, 108661)
- Eozin boyası (Merck, 1009844)
- Otomatize preparat boyama sistemi (Leica Auto Stainer XL)

DNA izolasyonu (ekstraksiyon) için kullanılanlar;

- 1000 μ l' lik filtreli pipet ucu (Dateks)
- 100 μ l' lik filtreli pipet ucu (Dateks)
- 1.5 cc hacimde steril, şeffaf, DNAaz/ RNAaz dan arındırılmış eppendorf tüpü (Dateks)
- 15 cc hacimde, dereceli, steril falcon tüpü
- 1-10 ,10-100 ve 100-1000 μ l lik pipet ucu uyumlu otomatik pipet (Thermo scientific®)
- 1.5 cc hacimli eppendorfların ısıtılmasına uygun 70°C sıcaklığa ayarlanabilen 32 kuyucuklu termostat (enkubator) (P Selecta)



Resim 1: Filtreli pipet ucu ve otomatik pipetler

- 24 lük mikro santrifuj cihazı (Hermle)
- Absolut etanol (Merck)
- İzopropanol alkol (Merck)
- Nükleazdan arındırılmış steril su

- Viral nükleik asit izolasyon kiti (High Pure PCR Template Preparation Kit, Version 16.0, Kat.no.11 796 828 001: Roche Diagnostic)

Kit içeriği;

- Filtreli tüpler
- Toplayıcı (kollektor) tüpler
- İnhibitor uzaklaştırıcı tampon (inhibitor removal buffer; Guanidin HCl, Tris)
- Yıkama tamponu (washing buffer; NaCl, Tris-HCl)
- Bağlayıcı tampon (binding buffer; guanidin HCl, Tris-HCl, Tritanx-100)
- Elusyon tamponu (elution buffer; nukleazdan arındırılmış,2 kez damıtılmış)
- Proteinaz K (liyofilize toz flakon)

RT PZR basamağında kullanılanlar:

- 1-10 µl' lik pipet ucu (Dateks) ve uyumlu otomatik pipet (Thermoscientific)
- Sınıf II biyogüvenlik kabini (Hera)
- RT PZR Kiti (LightMix® BK/JC Polyomavirus deteksiyon kiti, Ver 110401,TIB MOLBIOL).

Kit içeriği;

- PZR grade su (nükleazdan arındırılmış, steril, damıtılmış su)
- Her biri 32 reaksiyonluk BKV deteksiyon kiti (kat.no.40-0203-32)
(Liyofilize primer, Fast start master hibridizasyon problemleri ve internal kontrol içeren 6 adet tüp)
- Kapiller (lightcycler centrifuge adapters 1909312)= kılcal cam tüpler
- 10¹'den -10⁶ kp/ml ye kadar BKV DNA içeren 6 adet liyofilize standart
- 1a (enzim, Taq polimeraz) (kat.no.12239272001)
- 1b (buffer, tampon)

- Magnezyum
- İşaretleyici molekül (Primer prob miks-PP mix)
- Standart DNA sırası için kapatıcı folyo şeridi

- LightCycler ® 480 II ve Light Cycler ® 1.5 PZR cihazı (Roche)

BKV'nin küçük t antijeninin 175 baz çiftlik bölgesinden hazırlanan primerler ve LightCycler Red 640 ile işaretli probalar ticari kit (LightMix® TIB MOLBIOL) içeriğinde mevcut olup Tablo 2' de gösterilmiştir.

Tablo 2: Kullanılan primer ve probalar (47).

Primer:	BK-For ACAgCAAAGCAggCAAg
Primer:	PV-Back ggTgCCAACCTATggAACAg
Probe 1:	Anchor FL TTTTgCCATgAAgAAATgTTTgCCAgTgATgA-FL
Probe 2:	BK LC 640-AAgCAACAgCAgATTCTCAACACTCAACA-PH
Lambda705:	705-CggATATTTTTgATCTgACCGAAgCg p

YÖNTEM

1) Hasta alımı:

Hastanemizde 01 Ocak 2011 tarihinden itibaren karaciğer transplantasyonu yapılmış olan, 18 yaşından büyük hastalar operasyondan sonraki ilk iki hafta içinde görülerek araştırılması yapılacak olan BK virus ve çalışma düzeni hakkında bilgilendirildi ve çalışmaya dahil edilmeden önce her hastaya aydınlatılmış onam formu okutularak imzalatıldı. Bu sırada hastaların demografik verileri kaydedildi, hastaya ulaşılacak telefon numarası alındı ve tarafımızca yapılacak vizitlerin randevu tarihleri bildirildi.

Transplantasyondan sonraki ilk aylarda taburcu olabilen hastalar karaciğer transplantasyon ekibince 1 ve/veya 2 haftalık aralıklarla karaciğer transplantasyon polikliniğinde izlenmektedir. Hastalar bu polikliniğe rutin kontrolleri için başvurduklarında, operasyon gününü takip eden ilk üç ay boyunca, 2 hafta aralıklarla toplam 6 kez olmak üzere tarafımızca da görüldü. Eğer hasta operasyon sonrası izlem süresince taburcu olamamışsa, yattığı serviste ziyaret edilerek kontrolleri yapıldı.

2) Veri toplanması:

Her vizitte hastaların genel durumları ve şikayetleri değerlendirildi, fizik muayeneleri yapıldı, kullanmakta olduğu ilaçlar ve yapılmışsa rutin tetkik sonuçları önceden hazırlanmış olan olgu rapor formlarına kaydedildi.

Kayıt edilen veriler şunlardır;

- ◆ Hastanın Adı-Soyadı
- ◆ Transplantasyon tarihi

Demografik veriler:

- ◆ Cinsiyet
- ◆ Yaş

- ◆ Hepatik yetmezliğe ve transplantasyona neden olan primer hastalık
- ◆ Donör tipi (kadavra, canlı)
- ◆ Komorbid hastalık (DM, HT, SVO, kalp yetmezliği, bağ dokusu hastalığı, KOAH vs.)
- ◆ Transplantasyon sonrası ilk yılda rejeksiyon durumu

Konağın grefte karşı gösterdiği immunolojik reaksiyonlar sonucu, klinik ve patolojik bir durum olarak tanımlanan hepatik allogreft rejeksiyonu gelişebilir. Her zaman histopatolojik rejeksiyona klinik bulgular eşlik etmeyebilir.

◦ Histopatolojik rejeksiyon:

- Portal bölgelerde ödem ve karışık hücre infiltrasyonu nedeni ile genişleme
- İmmunoblast, lenfosit, plazmosit, eozinofil ve makrofajdan zengin infiltrasyon olması
- Küçük interlobuler safra kanallarında hasar ve infiltrasyon olması
- Parankimde genellikle sızüzoidleri döşeyen hücrelerde infiltrasyon
- Az sayıda hepatositte balonlaşma ve eozinofilik dejenerasyon
- Kolestaz

Olması histopatolojik rejeksiyonu düşündürür.

◦ Klinik rejeksiyon:

Ateş, halsizlik, karın ağrısı, iştahsızlık, hepatosplenomegali, T tüpünden gelen safra miktarında azalma, karaciğer enzim aktivitesinde artış kriterlerinden bir veya daha fazlasının varlığı klinik rejeksiyonu düşündürür (48).

Her vizitte kaydedilecek veriler;

- ◆ Vizit tarihi
- ◆ Vizit sırasında hastanın hastanede yatış durumu
- ◆ Vizit sırasında fizik muayene (FM) bulguları;
 - Vizit sırasında hastanın genel durumu:
Genel durum belirlenirken ASA (American Society of Anesthesiologists) kriterleri temel alındı (49).
ASA 1-2 = Genel durum iyi; ASA 3 = Genel durum orta;
ASA 4-5-6 = Genel durum kötü
 - Vücut sıcaklığı (Civalı termometre ile, aksiler, °C)
 - Tansiyon arteriyel değeri (Brakial, manuel ölçüm, mmHg)
 - Varsa patolojik FM bulgusu
- ◆ Vizit sırasında kullandığı immunsupresif türü ve dozu
- ◆ Varsa şikayeti
- ◆ Laboratuvar verileri
 - Beyaz küre sayısı (x/mm³) (%PNL)
 - AST (Aspartat amino transferaz) değeri (U/l)
 - ALT (Alanin amino transferaz) değeri (U/l)
 - Kreatinin değeri (mg/dl)
- ◆ Vizit sırasında hastada enfeksiyon varlığı
 - Bakteriyel enfeksiyon (cerrahi alan, kan dolaşım, pulmoner, üriner)
 - Fungal enfeksiyon
 - CMV (Cytomegalovirus) enfeksiyonu
- ◆ Vizitteki BKV göstergeleri;
 - Kanda BKV DNA varlığı (pozitifse kopya/ml cinsinden değeri).

- İdrarda BKV DNA varlığı (pozitifse kopya/ml cinsinden değeri). Ardışık en az 2 vizitte BK virüsü devam ediyorsa persistan virüsü kabul edildi.
- İdrarda decoy hücresi varlığı.

3) Örnek toplanması ve saklanması:

Transplantasyon polikliniğinde rutin kontrol amaçlı istenen biyokimyasal ve hematolojik testler için kan vermeye gittiklerinde ayrıca 10 cc lik EDTA lı tüplere de kan alındı. İdrar örnekleri hastalara verilen steril idrar kaplarına hastaların kendilerinin normal üretral yol ile idrar vermeleri ile toplandı. Sondalı hastalardan ise tarafımızca sondadan idrar örneği alındı.

EDTA'lı tüp içine alınmış olan kan örnekleri 5000 devirde 5 dakika santrifuj edildi. Tüpün üst kısmında toplanan plazma DNAaz/RNAaz dan arındırılmış 1,5 ml hacimli steril eppendorflara alındı, eppendorf üzerine örneğin ait olduğu hastanın adı-soyadı, kaçınıcı viziti olduğu, örnek türü (kan/idrar) ve ziyaret tarihi bilgilerini içeren etiketler yapıştırıldı. Toplanan İdrar örneklerinin bir kısmı taze iken decoy hücresi araştırılması için DEUTF hastanesi Sitoloji Laboratuvarına götürüldü. Kalan idrar örnekleri DNAaz/RNAaz dan arındırılmış 1,5 ml hacimli steril eppendorflara alındı, etiketleri yapıştırıldı. İçinde hastalara ait kan ve idrar örnekleri bulunan bu eppendorflar RT PZR çalışılana kadar -20/-40 °C de saklandı.

4) Decoy hücresi araştırma protokolü;

Steril idrar kabına alınmış olan taze hasta idrarı 50 cc hacmindeki dereceli, steril, kapaklı, plastik tüpe aktarıldı ve 2000 devirde 5 dakika santrifuj edildi. Oluşan çökelti hacmi 0.2 cc den küçükse 800 devirde 5 dakika sitospin yapıldı, 0.2 cc den büyükse çökeltiden direk yayma yapıldı. Hemotoksilen Eozin yöntemi ile boyandı. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra preparatlar ışık mikroskopunda x20, x40, x60 büyütmelemlerde decoy hücresi varlığı araştırıldı.

Hemotoksilen Eozin otomatize boyama yöntemi:

Preparatlar hastanemiz sitoloji laboratuvarında sitolojik örnekler için rutin olarak yapılmakta olan Leica Auto Stainer XL otomatize boyama sistemi ile hizmet satın alınarak boyandı.

Hemotoksilen Eozin manuel boyama yöntemi;

- 1.Preparat %96 lık alkolle 30 saniye tespit edildi
- 2.%80 lik alkolle 30 saniye tespit edildi
- 3.%70 lik alkolle 30 saniye tespit edildi
- 4.Su ile yıkama yapıldı
- 5.Hemotoksilende 2 dakika bekletildi
6. Su ile yıkama yapıldı
- 7.Asit alkole 5 saniye süre ile batırılıp çıkarıldı
8. Su ile yıkama yapıldı
- 9.Amonyaklı suya batırılıp çıkarıldı
- 10.Eozinde 3 dakika süre ile bekletildi
11. Su ile yıkama yapıldı
- 12.%80 lik alkolde 30 saniye bekletildi
- 13.%90 lık alkolde 30 saniye bekletildi
- 14.%96 lık alkolde 30 saniye bekletildi
- 15.Absolut alkolden geçirildi
16. Absolut alkol+ksilen (%50+%50) karışımında 2-3 dakika bekletildi
- 17.Ksilolde 5-7 dakika süre ile bekletildi
- 18.Preparat ıslakken entellan, Kanada balzamu veya reçine ile kapatılarak mikroskopta incelemeye hazır hale geldi

5) BKV DNA izolasyon (ekstraksiyon) yöntemi;

- Toplanmış olan hasta kan ve idrar örnekleri toplanma sıralarına göre 30-40 lık gruplara ayrılarak DNA ekstraksiyon işlemine başlandı. High Pure PCR Template Preparation KİT Ver:16.0, Roche ® (Kat.no.11 796 828 001) hazır ticari ekstraksiyon kiti kullanıldı. (Resim 2). DNA ekstraksiyonu için spin kolon yöntemi uygulandı.



Resim 2: High Pure PCR Template Preparation ekstraksiyon kiti içeriği

- İzolasyon işlemine başlanmadan önce hasta örnekleri listelendi ve her bir örneğe sıra numarası verildi. Örnekleri temsil eden her bir numara sadece bir kez kullanıldı ve çalışma sonlanana kadar bu şekilde devam edildi.
- Kit içeriğinde 10^1 - 10^6 kopya/ml ye kadar BKV DNA içeren 6 adet hazır standart kontroller olmasına rağmen izolasyon uygulamasının doğruluğunu kontrol edebilmek amacı ile, rutinde klinik örneklerde BKV DNA PZR çalışan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarından izin alınarak, içinde farklı miktarlarda BKV DNA pozitif olduğu bilinen 2 adet kan ve iki adet idrar olmak üzere toplam dört adet hasta örneğine, kendi hasta örneklerimizle birlikte izolasyon yapıldı. Bu örnekler $1,9 \times 10^2$ kopya/ml BKV DNA içeren kan, $1,6 \times 10^3$ kopya/ml BKV DNA içeren kan, 1×10^6 kopya/ml BKV DNA içeren idrar ve $8,16 \times 10^2$ kopya/ml BKV DNA içeren idrar örnekleri idi. Bunlar izolasyonda kullanım kolaylığı olması açısından 200'er mikro litrelik hacimlere bölündü. Her bir izolasyon grubu ile birlikte bu örneklerin tamamı veya birkaçı da izole edilerek PZR sonucunda bu örneklerin beklenen sonuçları elde edilirse izolasyon basamağının doğruluğu kanıtlanmış oldu.

- İzolasyon işlemi öncesi çalışılacak olan hasta örnekleri -20-40°C'lik dondurucudan çıkarılarak oda ısısında eriyene dek bekletildi.
- Reaksiyon miksi hazırlanmadan önce, ticari kit içinde mevcut bulunan tampon çözeltiler üretici firmanın önerdiği üzere şu şekilde sulandırıldı;
 - İnhibitor uzaklaştırıcı tampon 20 ml (mililitre) absolut etanol ile
 - Yıkama tamponu 80 ml absolut etanol ile,
 - Proteinaz K enzimi ise 4.5 ml steril su ile sulandırıldı.
 - Bağlayıcı tampon ve elusyon tamponu ise hazır halde bulunduğundan sulandırılmadan kullanıldı.



Resim 3: Kullanılan tampon çözeltiler

- Reaksiyon miksinin hazırlanması:

Dereceli steril 15 ml lik falcona çalışılacak örnek sayısı x 200 mikrolitre hacminde bağlayıcı tampondan ve örnek sayısı x 40 mikrolitre hacminde Proteinaz K dan konularak birkaç kez pipet yardımıyla karıştırıldı.
- 200 er mikrolitre hasta örneği daha önce numaralandırılmış steril DNAaz/ RNAaz dan arındırılmış steril eppendorflara numara sırasına uygun şekilde konuldu.
- Çalışılacak örnek sayısı= **n** ise

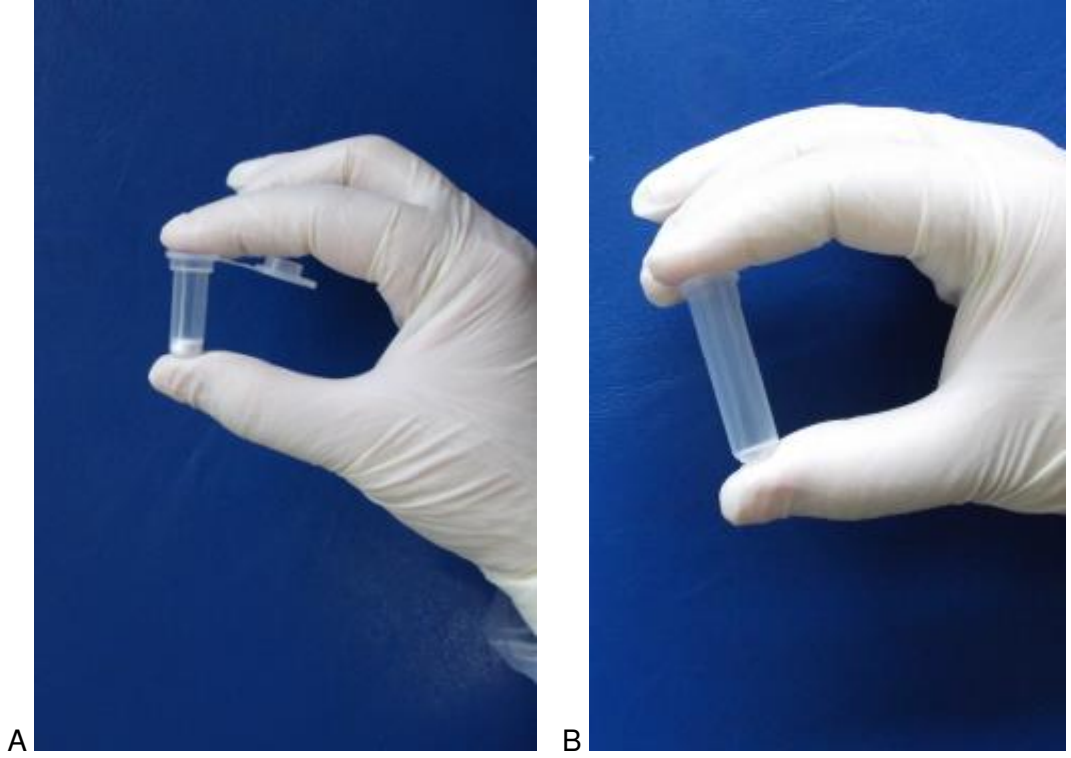
$$[n \times 200 \mu\text{l bağlayıcı tampon} + n \times 40 \mu\text{l proteinaz K}] / n = 240 \mu\text{l}$$

Bu örneklerin her biri üzerine hazırlanmış olan reaksiyon miksiinden 240' ar µl eklendi ve birkaç kez pipet ile karıştırıldı (Resim 4). Her bir eppendorftan sonra diğerine geçmeden pipet ucu değiştirildi.



Resim 4: Reaksiyon miksi hazırlanırken

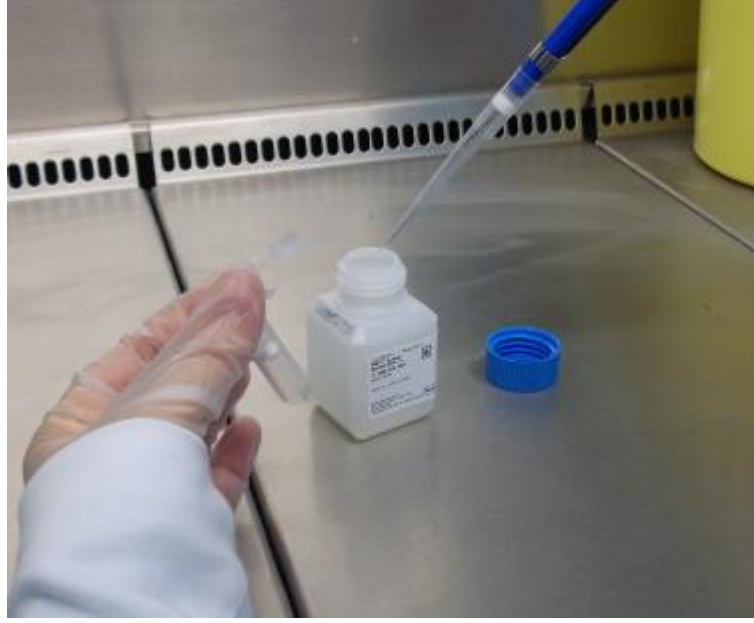
- Üzerlerine 240 mikrolitre reaksiyon miski konularak eppendorf içinde toplam 440 mikrolitre hacim elde edilmiş örnekler, kapakları kapatılarak önceden 70°C ye ısıtılmış enkubatorde 10 dakika bekletildi.
- Enkubatordan çıkarılan bu sıcak eppendorfların kapakları açılarak her birinin üzerine 100 er mikrolitre izopropanol konuldu ve pipet yardımıyla karıştırıldı
- Boş bir spora kollektor tüpler içine filtreli tüpler oturtularak hasta örnek numarasına uygun olarak numaralandırıldı (Resim 5).



Resim 5: A= filtreli tüp, B= kollektör tüp

- Üzerine izopropanol de eklenerek toplam 540 µl hacime ulaşan örnekler kendi numarasına uygun bu filtreli tüplere aktarıldı.
- Bu filtreli tüpler 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonucunda kollektor tüpler içlerinde biriken sıvı ile birlikte atıldı, filtreli tüpleri ise bunların içinden alınarak yeni boş kollektor tüpler içine konuldu ve bunların üzerine 500 er µl inhibitor uzaklaştırıcı tampon konuldu.
- Yeniden 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonucunda kollektor tüpler içlerinde biriken sıvı ile birlikte atıldı, filtreler yeniden boş kollektor tüpler içine alınarak üzerlerine 500 er µl yıkama tamponu eklenip 8000 devirde 1 dakika santrifuj edildi.

- Ardından yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi ve 8000 devirde 1 dakika santrifuj edildi. (Resim 6)



Resim 6: Yıkama tamponu ile yıkama işlemi

- Bu işlemden sonra filtrelerin kollektor tüpleri değiştirilerek bu defa 13000 devirde 10 saniye santrifuj edildi.
- Yıkama işlemleri sürerken sırası geldiğinde önceden hazır olması için, çalışılan örnek sayısı x200 mikrolitre hacminde elusyon tamponu birkaç adet steril eppendorf içinde enkubatore 70°C de ısıtılmaya bırakıldı
- 13000 devirde 10 saniye santrifuj edilen filtreler kollektor tüplerinden alınarak, hasta numarasına uygun numaralandırılmış boş,steril, DNA az/RNA az dan arındırılmış, kapaklı epandorflar içine oturtuldu. Altta kalan kollektor tüpler ise içlerindeki sıvı ile birlikte atıldı.
- Eppendorfa oturtulmuş filtrelerin her birinin üzerine 200 er mikrolitre sıcak haldeki elusyon tamponundan konulup kapakları kapatıldı.

- 8000 devirde 1 dakika santrifuj edildi.
- Bu aşamadan sonra sıcak elusyon tamponu yardımı ile filtre porlarından alttaki ependorflara viral DNA geçtiği için önceki basamakların tam tersine filtreler çöpe atılarak, kollektor eppendorflara toplanmış olan materyal (ekstraksiyon ürünü) saklandı ve daha sonra bunların PZR aşamasına geçildi.

6) PZR Yöntemi;

- Sınıf II biyogüvenlik kabininde çalışıldı. (Resim 7 ve 8)



Resim 7: Sınıf II biyogüvenlik kabini

- PZR basamağı için, içinde PZR grade su, her biri 32 reaksiyonluk deteksiyon kiti, kapiller (lightcycler centrifuge adapters 1909312), 10^1 - 10^6 kp/ml ye kadar BKV DNA içeren standartlar, 1a (enzim), 1b (buffer), magnezyum ve primer prob miks (pp miks) içeren gerçek zamanlı PZR kiti (LightMix® BK/JC Polyomavirus deteksiyon kiti, Ver 110401, TIB MOLBIOL) kullanıldı.

- Kit içinde mevcut bulunan enzim ve çözeltiler üretici firmanın önerdiği şekilde reaksiyon öncesi hazırlandı;
 - 1b den (tampon) 60 mikrolitre alınarak 1a ya (enzim) katıldı ve birkaç kez pipetaj yapıp karıştırılarak enzim kullanıma hazır hale getirildi
 - Deteksiyon kiti üretici firmanın önerdiği şekilde 66 mikrolitre PZR grade su (apirojen ampul suyu = DNAaz/RNAaz' dan arındırılmış su) ile sulandırıldı.
 - Kit içinde mevcut bulunan standart DNA' lar 10^1 kp/ml' likten 10^6 kp/ml' liğe doğru sıra ile açıldı. Üretici firmanın önerdiği şekilde her bir kuyucuğa 40 mikrolitre PZR grade su konularak sulandırıldı.



Resim 8: Sınıf II biyogüvenlik kabini

- Master miks hazırlanışı;

Master miks hazırlamak için; örnek sayısı başına 3.7 mikrolitre H₂O, 0.8 mikrolitre magnezyum, 2 mikrolitre pp miks (primer prob miks, işaretleyici

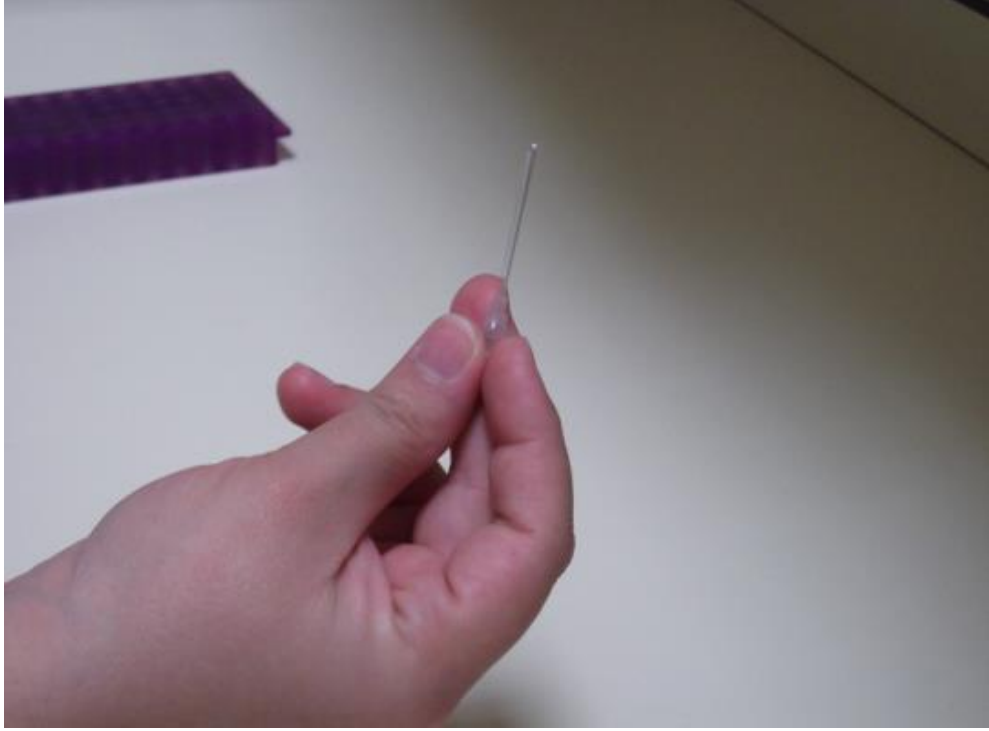
molekül) ve 1 mikrolitre enzim (b katılmış $a = a+b$) kullanıldı. (Toplam hacmi örnek başına 7.5 mikrolitre) Master miks bileşenleri Tablo 3' de gösterilmiştir.

Tablo 3: Master miks bileşenleri

Roche FastStart Master için bileşenler;	Tek reaksiyon
Su, PZR-grade	3.7 mikrolitre (μ l)
25 mM Mg^{2+} solusyonu	0.8 mikrolitre (μ l)
Reaksiyon miksi (Primer ve problemleri içeren reaktifler)	2 mikrolitre (μ l)
Enzim miksi (Roche FastStart: tüp 1a ve 1b birleşimi)	1 mikrolitre (μ l)
Total reaksiyon hacmi;	7.5 mikrolitre (μl)

- Kapiller altlığına oturtulan boş kapiller tüplerin her birinin içine 7.5 mikrolitre master miks konduktan sonra bunun üzerine izole edilmiş DNA örneklerinden 2.5'er mikrolitre konularak bir kapiller içinde toplam 10 mikrolitre reaksiyon hacmi elde edildi.

Resim 9'da kapiller tüp örneği gösterilmiştir.



Resim 9: Kapiller tüp

- Her bir hasta örneği eklendikten hemen sonra kapiller kapakları kontaminasyon olmaması için kapatıldı (Resim 10).



Resim 10: Kapakları kapalı kapiller tüpler

- Negatif kontrol olarak su kullanıldı. Pozitif örnekler açılmadan önce negatif kontrol hazırlanıp kapakları kapatıldı.
- Negatif kontrol ve hasta örneklerinden sonra (bunlar master miks ile birleştirilip kapakları kapatıldıktan sonra), önceden sulandırılan standartlardan da 2.5 mikrolitre alınarak içinde 7.5 mikrolitre master miks olan kapillerlere konuldu.
- Hasta örnekleri ve standartları içeren bu kapillerler 2000 devirde 10 saniye santrifuj edildikten sonra RT PZR sistemine (Light Cycler® 1.5, Roche) yüklendi (Resim 11 ve 12).



Resim 11: Lightcycler® 1.5



Resim 12: Lightcycler 1.5 kapiller taşıyıcı (carousel, atlıkarınca)

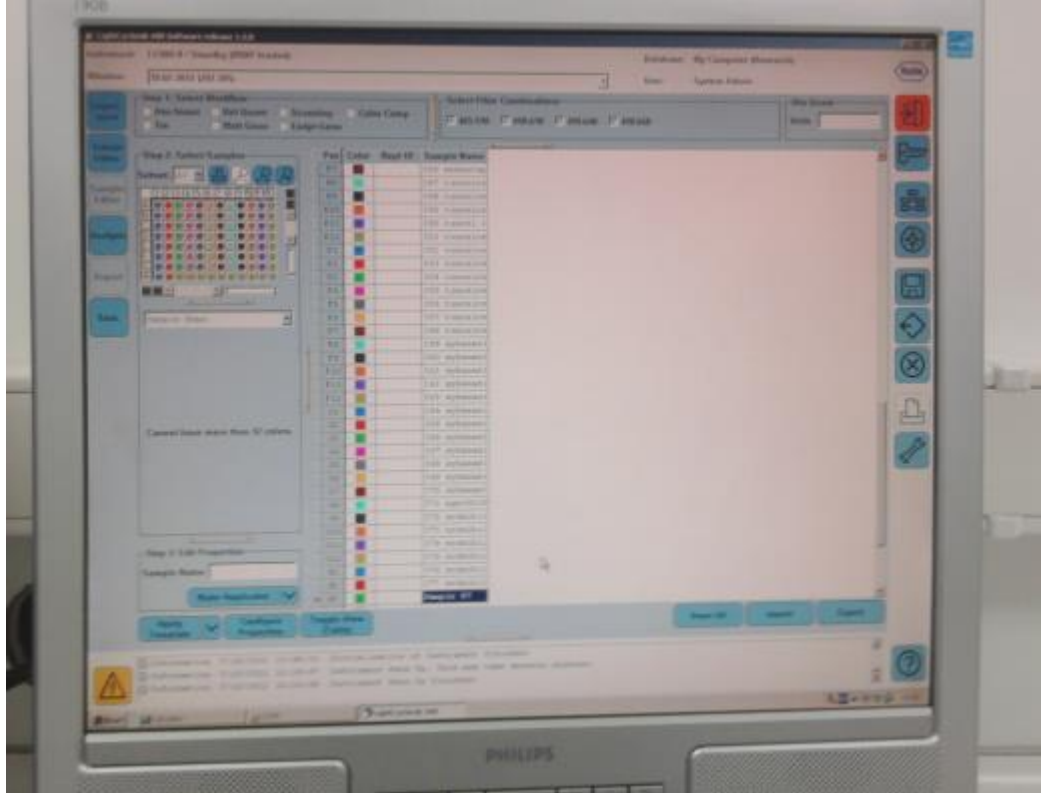
- Program çalışma protokolü (her bir PZR döngüsü) temel olarak 4 basamaktan oluşmaktadır;
 - 1.Denaturasyon: DNA sarmalının ayrılması ve enzim aktivasyonu, 95 C°'de 10 dk
 - 2.Çoğaltma (PZR): Hedef DNA' nın PZR amplifikasyonu
 - 3.Erime (Melting): Hedef DNA' dan elde edilen PZR ürünlerinin tanımlanmasında erime eğrisi analizi yapılır
 - 4.Soğutma (Cooling): Cihazın soğutulması

Tablo 4: Light Cycler® Gerçek Zamanlı PZR çalışma protokolü

Programı	Denaturasyon	Amplifikasyon			Melting			Cooling
Parametre								
Analiz modu	yok	Kuantifikasyon modu			Erime Eğrisi modu			Yok
Döngü	1	50			1			1
Segment	1	1	2	3	2	3	4	1
Hedef [°C]	95	95	62	72	95	40	85	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:05	00:00:15	00:00:20	00:00:30	00:00:00	00:00:30
Ramp.Rate [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Sec.Target [°C]	-	-	55	-	-	-	-	-
Step Size [°C]	-	-	0.5	-	-	-	-	-
Step Delay (Cycles)	-	-	1	-	-	-	-	-
Acquisition Mode	Yok	yok	tek	yok	yok	yok	sürekli	yok

- Data analizi gerçekleştirildi. İlk olarak miktar belirlemeye yönelik, çoğaltma sonuçlarının ve standart eğrinin değerlendirilmesi yapıldı. Reaksiyon sırasında işler durumda olan bilgisayar yazılımında BKV için uygun saptama kanalları seçildi. Polyomavirus BK dataları 498-640. kanalda kantitasyon modunda görüntülendi. Örnekler içinde (+) ve (-) kontroller seçilip otomatik olarak standart eğri oluşturuldu. Negatif kontrol (NTC) sinyal vermezken, internal kontrol (IC), standartlar ve pozitif örneklerin dataları deteksiyon kanalı olan 640 kanalında görüntülendi. 640 kanalında absolut kuantifikasyon software'i (bilgisayar programı) yardımı ile CT (Critical threshold, kritik eşik değer) ve CP (crossing point, kesişme noktası, amplifikasyon eğrisinin baseline geçme noktası) hesaplandı. Bu CT değerinden yararlanılarak kullanılan standart karşılaştırılıp pozitif örnek içindeki DNA'nın miktar tayini yapıldı. (Hastalara ait BKV DNA konsantrasyon miktarları standart eğrinin eğimi kullanılarak hesaplandı). BKV DNA pozitif olanlarda, (+) kontrollerle benzer floresan veren amplifikasyon eğrisi elde edildi. Bu eğrinin eşik floresan değerini geçtiği

döngü sayısı standart eğri tablosuna yerleştirildiğinde karşılık gelen logoritmik konsantrasyon değeri, örneğin içerdiği DNA miktarını verdi. Pozitif olan örnek sonuçları kopya/ml cinsinden kaydedildi. Resim 13' te yazılımın örnek tanımlama ve sıralama ekranı görülmektedir.



Resim 13: Örnek tanımlama ve sıralama ekranı

BULGULAR:

1) Olguların demografik özellikleri

2) Yöntemlere göre pozitiflik saptanan olgular ve örnekler

- a) Olguların cinsiyete göre dağılımı
- b) Olguların yaşa göre dağılımı
- c) Olguların primer hastalığa göre dağılımı
- d) Olguların donör tipine göre dağılımı
- e) Olguların komorbid hastalıklara göre dağılımı
- f) Olguların rejeksiyon durumuna göre dağılımı
- g) Vizitlere göre pozitif olguların laboratuvar sonuçları
- h) Pozitif olguların immunsupresif türü ile ilişkisi
- i) Pozitif olguların en sık semptom ve bulguları
- j) Eşlik eden enfeksiyonlar
- k) BKV DNA ve decoy pozitifliklerinin vizit gününe göre dağılımı
- l) Testlerin duyarlılık ve özgüllüğü

1) Olguların demografik özellikleri:

2011 yılında hastanemiz karaciğer transplantasyon ünitesinde 46 hastaya karaciğer transplantasyonu yapıldı. Bunlardan 5 tanesi 18 yaş altı çocuk hastalar (8-14 yaş arasında 2 erkek+ 3 kız) olup çalışmaya dahil edilmedi. 18 yaş üstü 41 hastadan 2'si çalışmaya dahil etme viziti yapılamadan kaybedildi. Çalışma kriterlerini karşılayan 39 hastadan 4'ü ilk vizit sonrası yaşamını yitirdi. Bir hasta 2. vizitinden sonra, bir hasta da 3.vizitinden sonra takibi bıraktı. Kalan 33 hasta ise üç ay boyunca tüm takiplerine gelerek 6 viziti tamamladı. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan her bir vizitte kan+idrar örneği alındı. Yapılan toplam vizit sayısı 207 olup ve bu vizitlerde toplam 414 adet hasta örneği (207 kan ve 207 idrar) toplandı. Demografik özellikler Tablo 5' te verilmiştir.

Tablo 5: Olguların demografik özellikleri

Cinsiyet n (%)	K: 9 (23.1) / E: 30 (76.9)
Ortalama Yaş (n=39)	49.8 ± 10.8 (22- 66 y)
Primer hastalıkların dağılımı n (%)	
• Hepatit B	16 (41.0)
• Hepatit B+D	8 (20.5)
• Hepatit C	5 (12.8)
• Kriptojenik	4 (10.3)
• Etilizm	2 (5.1)
• Pr. sklerozan kolanjit	1 (2.6)
• Toksik	1 (2.6)
• Diğer	2 (5.1)
Donör tipi n (%)	
• Kadavra	17 (43.5)
• Canlı	22 (56.4)
Komorbid hastalıkların dağılımı	
• Hipertansiyon	4 (23.5)
• Hipertansiyon+diyabet	4 (23.5)
• Diyabet	3 (17.6)
• KOAH	3 (17.6)
• Kalp yetmezliği	1 (5.8)
• HT+Diyabet+SVO	1 (5.8)
• Bağ dokusu hastalığı	1 (5.8)
Rejeksiyon durumu (n)	
• Yok	33
• Klinik rejeksiyon	1
• Histopatolojik rejeksiyon	2
• Klinik+ histopatolojik rejeksiyon	3
Retransplantasyon (n)	1

Primer hastalık:

Olguların karaciğer yetmezlik nedenleri değerlendirildiğinde 39 hastanın 16'sında karaciğer yetmezliğine neden olan Hepatit B nin en sık hastalık olduğu görüldü. Erkeklerde en sık primer hastalık Hepatit B iken (15 erkek hastada), kadın hasta sayısı az (n=9) olduğundan sayıca öne çıkan bir primer hastalık yoktu. Genel olarak 29 hastada karaciğer yetmezliğinin sebebi viral enfeksiyonlar iken 10 hastada enfeksiyon dışı nedenler idi (Tablo 5).

Donör tipi:

Kadavradan karaciğer transplantasyonu yapılan 17 hastanın 15'i erkek, 2'si kadın; canlıdan transplantasyon yapılanların ise 15'i erkek, 7'si kadın hastalar idi.

Komorbid hastalıklar:

39 hastanın 17 (% 43.6)' sinde komorbid hastalık mevcut olduğu görüldü. En sık komorbid hastalıklar hipertansiyon (9 hasta) ve diyabet (7 hasta) idi. Transplantasyon öncesi hiç bir hastada renal yetmezlik olmadığı görüldü.

Rejeksiyon durumu:

Hastaların transplantasyon sonrası ilk yıl içinde rejeksiyon durumları değerlendirildiğinde, 39 hastanın 6' sında rejeksiyon geliştiği görüldü. Rejeksiyon gelişen 6 hastanın tamamı erkek hastalardı (p=0,304).

Rejeksiyon gelişen 6 hastadan 2'si persistan virüri gösteren hastalardı (p=0,104). (Toplam persistan virürlü hasta sayısı= 4).

Retransplantasyon:

Bir erkek hastaya ilk transplantasyondan sonra hepatik arter trombozu nedeni ile retransplantasyon yapıldı.

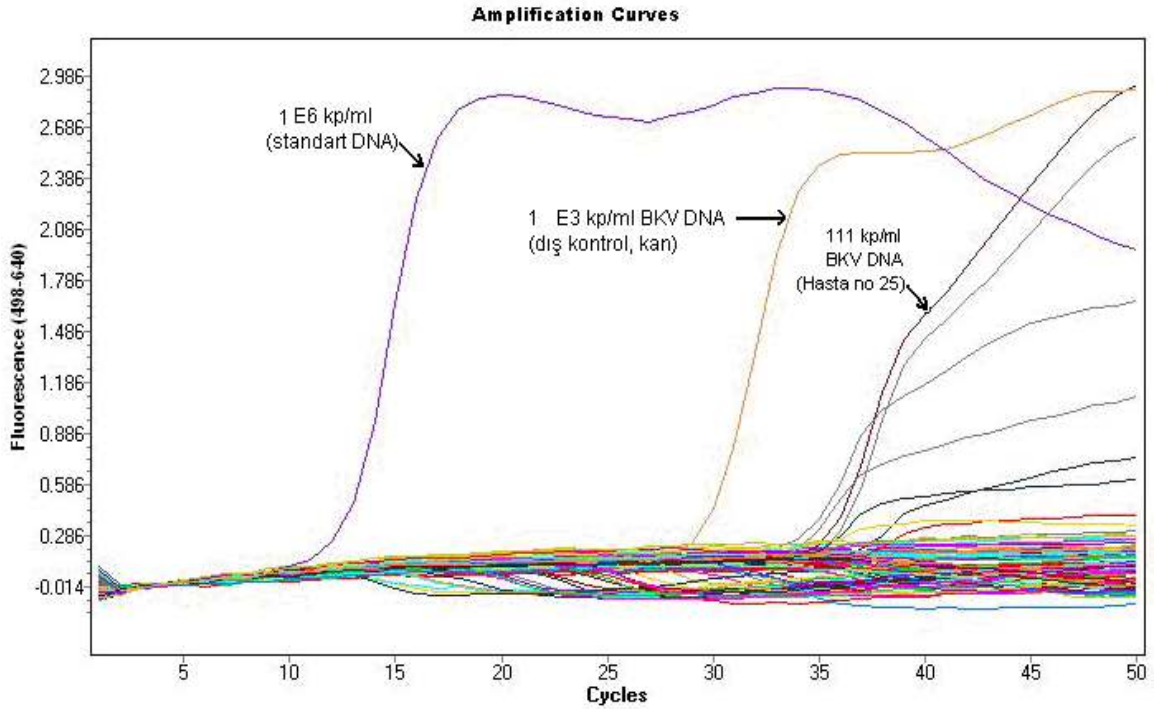
2) Yöntemlere göre pozitiflik saptanan olgular ve örnekler :

BKV göstergeleri pozitif olan hastaların çoğunda, tüm vizitleri boyunca, sadece bir parametre (Kan BKV DNA, idrar BKV DNA veya idrarda decoy testlerinden biri) pozitif olmakla birlikte 2 hastada farklı vizitlerde (farklı zamanlarda) hem kanda BKV DNA (+) hem de idrarda BKV DNA (+) saptandı. Başka iki hastada ise farklı vizitlerde hem kanda BKV DNA hem idrarda decoy hücresi pozitif saptandı. BKV göstergelerinden en az biri pozitif olan hastaların istatistiksel analizleri metin içinde verilmiş olup sonuçlara ait ayrıntılı tablo ekte verilmiştir .

- **Kan örneklerinde PZR ile BKV DNA pozitif saptananlar:**

39 hastanın 5'inde (% 12.8) en az bir kez olmak üzere, toplam 207 kan örneğinin 7'sinde (% 3.3) kanda gerçek zamanlı PZR ile BKV DNA pozitif saptandı.

Bu hastalardan birine ait kan örneğindeki BKV DNA pozitifliğini gösteren amplifikasyon eğrisi Şekil 5' te gösterilmiştir.



Şekil 5: Kandaki BKV DNA pozitifliğini gösteren amplifikasyon eğrisi. (E=10^X)

- **İdrar örneklerinde PZR ile BKV DNA pozitif saptananlar:**

39 hastanın 11'inde (% 28.2) en az bir kez olmak üzere, toplam 207 idrar örneğinin 23'ünde (% 11.1) idrarda gerçek zamanlı PZR ile BKV DNA pozitif saptandı. Persistan virüri gösteren 4 hasta olup içlerinden birinin (hasta no 33) bütün vizitlerinde idrarda farklı kopya sayılarında BKV DNA saptanmıştır. Bu hastanın sonuçları Ekteki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir.

- **İdrar örneklerinde decoy hücresi saptananlar:**

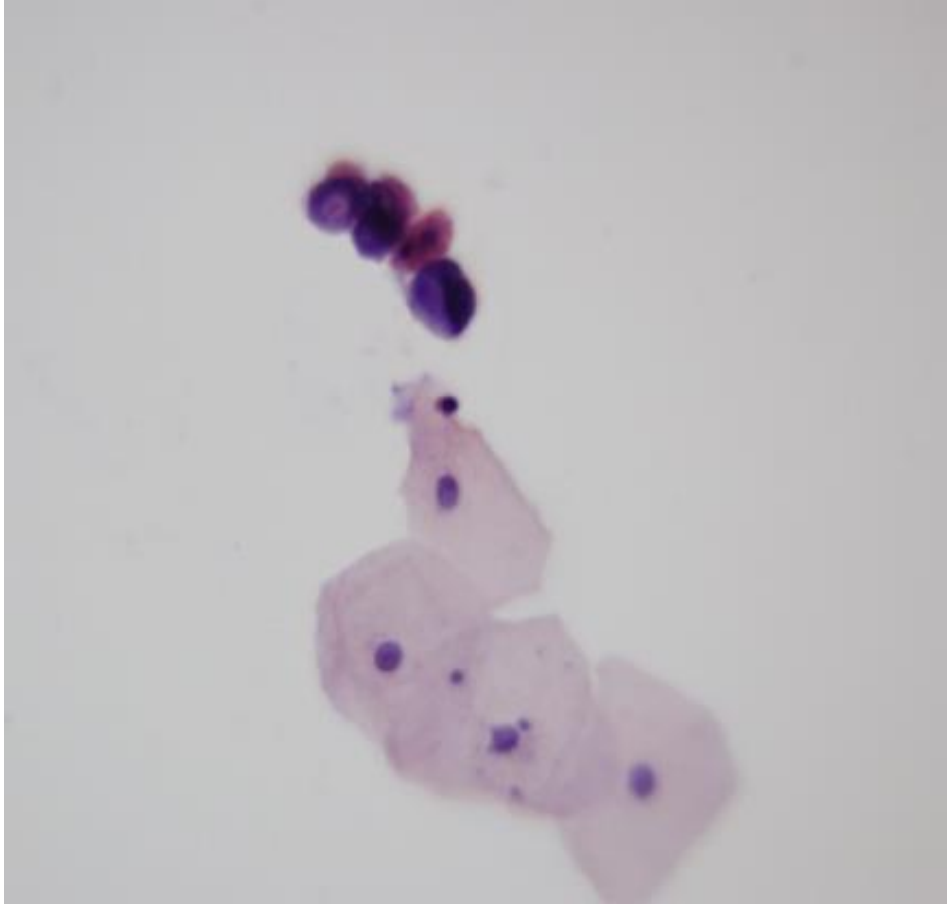
39 hastanın 13'ünde (%33.3) en az bir kez olmak üzere, 207 idrar örneğinin 26'sında (%12.5) , sitolojik inceleme ile idrarda decoy hücresi saptandı. İdrarda decoy hücreleri saptanan hastaya ait idrar mikroskopi görüntüleri Resim 14' te verilmiştir.

Her üç yöntem ile pozitiflik saptanan hasta ve örnek sayıları Tablo 6' da verilmiştir.

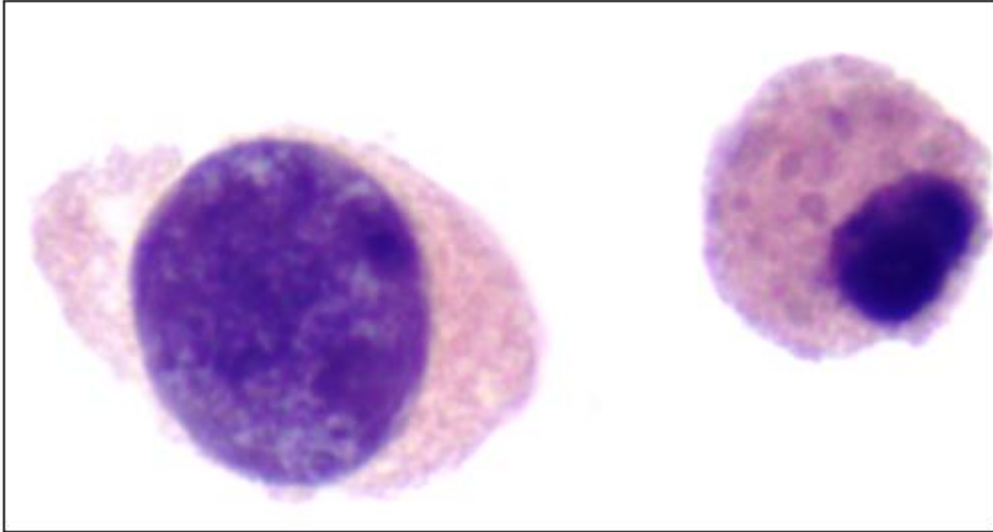
Tablo 6: Yöntemlere göre pozitiflik saptanan hasta ve örnek sayıları

Yöntem	Hasta sayısı n (%) n= 39	Örnek sayısı n (%) n= 207
İdrarda decoy	13 (33.3)	26 (12.5)
İdrarda PZR	11 (28.2)	23 (11.1)
Kanda PZR	5 (12.8)	7 (3.3)
Decoy+ idrar PZR	0 (0.0)	*
Decoy+ kan PZR	2 (5.1)	*
İdrar+ kan PZR	2 (5.1)	*
Decoy+ idrar PZR+ kan PZR	0 (0.0)	*

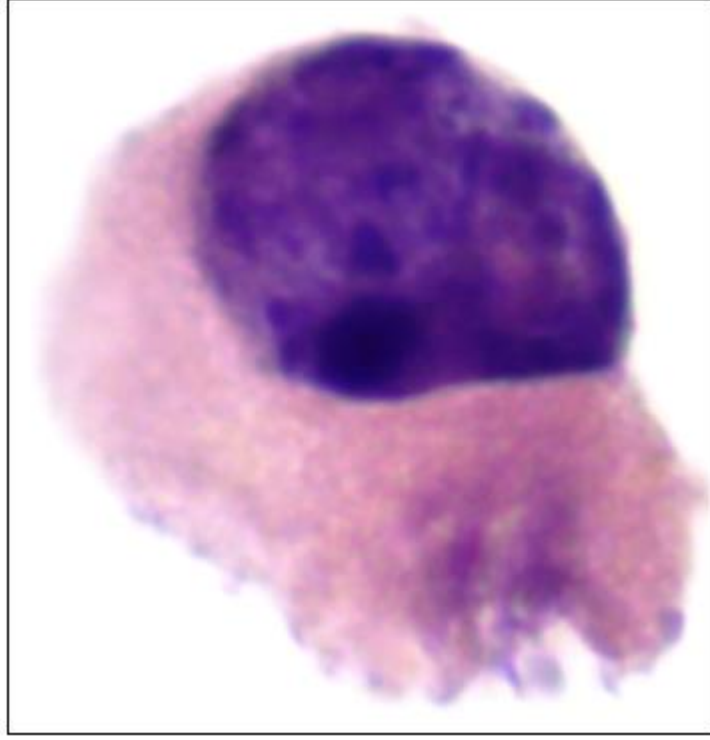
* Aynı hastaya ait farklı örneklerde (kan, idrar) çalışıldığı için örnek bazında sayı verilmemiştir.



Resim 14-A) Decoy hücreleri ve normal epitel hücreleri bir arada (x40 büyütme)



Resim 14-B) Decoy hücreleri (x100 büyütme)



Resim 14-C) Decoy hücresi (x100 büyütme)

a) Olguların cinsiyete göre değerlendirilmesi:

BKV DNA ve decoy pozitifliklerinin cinsiyete göre dağılımı Tablo 7' de gösterilmiştir.

Tablo 7: BKV DNA ve decoy pozitifliklerinin cinsiyete göre dağılımı

	Kanda BKV DNA (+)	İdrarda BKV DNA (+)	Decoy (+)
Erkek	5	7	12
Kadın	0	4	1
Toplam *	5	11	13

*2 hastada hem kan hem idrar BKV DNA (+). 2 hastada hem kan BKV DNA hem decoy (+).

30 erkek hastanın 10'unda (%33), 9 kadın hastanın 4'ünde (%44) herhangi bir vizitte kan ve/veya idrar BKV DNA pozitif idi ($p=0.696$). Decoy pozitif olan 13 hastanın 12'si erkek 1'i kadın idi ($p=0.225$).

b) Olguların yaşa göre değerlendirilmesi:

Kan ve/veya idrar BKV DNA negatif ve pozitif çıkan grupların yaş ortalamaları negatif grupta 49.7 ± 10.7 , pozitif grupta ise 50.1 ± 11.2 idi.

Decoy pozitif olguların yaş ortalaması negatif grupta 51.0 ± 10.1 , pozitif grupta ise 47.5 ± 12.0 idi.

c) Olguların transplantasyona neden olan primer hastalıklara göre değerlendirilmesi:

Transplantasyona neden olan primer hastalık ve BKV göstergeleri arasındaki ilişki Tablo 8 ve 9' da gösterilmiştir.

Tablo 8: Primer hastalık ve kan ve/veya idrar BKV DNA arasındaki ilişki

Primer hastalık	Kan ve/veya idrar BKV DNA (-) n (%)	Kan ve/veya idrar BKV DNA (+) n (%)	Toplam n(%)*	<i>p</i>
Non viral etiyoloji	5 (50.0)	5 (50.0)	10 (100.0)	0.446
Viral etiyoloji	20 (69.0)	9 (31.0)	29 (100.0)	
Toplam	25 (64.1)	14 (35.9)	39 (100.0)	

* Satır yüzdesi alınmıştır

Tablo 9: Primer hastalık ve decoy ilişkisi

Primer hastalık	DECOY (-) n (%)	DECOY (+) n (%)	Toplam n(%)*	<i>p</i>
Non viral etiyoloji	8 (80.0)	2 (20.0)	10 (100.0)	0.445
Viral etiyoloji	18 (62.1)	11 (37.9)	29 (100.0)	
Toplam	26 (66.7)	13 (33.3)	39 (100.0)	

* Satır yüzdesi alınmıştır

d) Olguların donör tipine göre değerlendirilmesi:

BKV DNA ve decoy pozitifliklerinin donör tipine göre dağılımı Tablo 10' da gösterilmiştir.

Tablo 10: Pozitif olguların donör tipine göre dağılımı

	Kan ve/veya idrar BKV DNA (+)	Decoy (+)
Kadavradan Tx n (%)	8 (57.1)	5 (38.5)
Canlıdan Tx n (%)	6 (42.9)	8 (61.5)
Toplam	14 (100.0)	13 (100.0)
<i>p</i>	0.313	0.740

e) Olguların komorbid hastalıklara göre değerlendirilmesi:

Kan ve/veya idrar BKV DNA pozitifliği ve decoy pozitifliği ile komorbid hastalıklar arasındaki ilişki Tablo 11' de gösterilmiştir.

Tablo 11: BKV göstergelerinin pozitifliği ile komorbid hastalıklar arasındaki ilişki

	Kan ve/veya idrar BKV (+)	Decoy (+)
Komorbid hastalık var n (%)	4 (28.6)	3 (23.1)
Komorbid hastalık yok n (%)	10 (71.4)	10 (76.9)
<i>p</i>	0.193	0.093

Diyabetin kan ve/veya idrar BKV DNA ile ilişkisi değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=1.00$).

Diyabet tanısı olan 7 hastanın hiç birinde idrarda decoy hücresi saptanmazken, idrarda decoy pozitifliği olan 13 hastanın ise hiç birinde diyabet tanısı olmadığı görüldü ($p=0.07$).

f) Olguların rejeksiyon durumuna göre değerlendirilmesi:

Altı tane rejeksiyon olgusunun 4'ünde kan ve/veya idrarda BKV DNA saptanmıştır ($p=0.163$). 13 tane decoy pozitif olgunun ise 2'sinde rejeksiyon mevcuttur. İstatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. ($p=1.000$)

g) Vizitlere göre pozitif olguların laboratuvar sonuçları:

Kan ve/veya idrar BKV DNA pozitifliklerinin o vizitteki laboratuvar sonuçları üzerine etkisi incelendi. Her bir ziyaret için kan ve/veya idrar BKV DNA pozitif olgular ile negatif olguların WBC, % PNL, % monosit, % lenfosit, kreatinin, AST, ALT ortalamaları karşılaştırıldı. Buna göre; iki grup arasında WBC, PNL, monosit ve lenfosit ortalamalarında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

Kreatin ve ALT ortalaması gruplar arasında farklılık göstermezken, 1.vizitte (15.gün) pozitif olguların AST ortalamasının negatif olguların AST ortalamasından

fazla olduğu ve istatistiksel olarak bu farkın anlamlı olduğu saptandı ($p=0.01$). 3.vizitte (45.gün) ise tam tersine negatif olguların AST ortalamasının pozitif olgulardan fazla olduğu görüldü, istatistiksel fark anlamlı saptandı ($p=0.006$).

Vizitlere göre kan ve/veya idrar BKV pozitif ve negatif grupların WBC, % PNL, % monosit, % lenfosit, kreatin, AST, ALT ortalamaları ve p değeri ayrıntılı olarak Tablo 12 ve 13' te verilmiştir.

Tablo 12: Kan ve/veya idrar BKV DNA ile WBC (% PNL, Monosit, Lenfosit) ilişkisi

VİZİT	Kan ve/veya idrar BKV DNA	WBC n / mm³	p	% PNL	p	% MONO	p	% LENFO	p
1	—	9293 ± 4482	0.8	82 ± 7	0.4	6±2	0.2	8±4	0.1
	+	10600±9326		85 ± 9		4±3		7±7	
2	—	9103 ± 4471	0.9	76 ±8	0.6	7±2	0.8	13 ±7	0.4
	+	7900 ±848		80±2		6±3		9 ±2	
3	—	8456 ± 3490	0.8	76±7	0.07	7±2	0.08	13 ± 6	0.2
	+	8725 ± 5368		83 ±3		5±1		9 ± 2	
4	—	7482 ±2948	0.05	71±11	0.8	9±5	0.6	16±7	0.7
	+	5120 ±1370		73±8		8±2		15±7	
5	—	7396±2587	0.05	74±9	0.7	7±3	0.8	16±7	0.5
	+	5250±2145		73±2		6±1		17±3	
6	—	6534±2473	0.9	69±9	0.9	7±3	0.1	19±7	0.9
	+	6871±3364		70±9		5±2		21±10	

Tablo 13: Kan ve/veya idrar BKV DNA ile Kreatin, AST, ALT ilişkisi

Vizit	Kan ve/veya İdrar BKV DNA	Kreatin	p	AST	p	ALT	p
1	—	0.8 ± 0.3	0.3	35 ± 38	0.01	84 ± 134	0.05
	+	1.0 ± 0.7		173 ± 166		334 ± 372	
2	—	0.8 ± 0.2	0.2	19 ± 8	0.8	43 ± 40	0.7
	+	0.6 ± 0.2		17 ± 1		29 ± 25	
3	—	0.9 ± 0.3	0.2	26 ± 35	0.006	49 ± 75	0.05
	+	0.7 ± 0.1		10 ± 1		14 ± 3	
4	—	0.9 ± 0.3	0.2	20 ± 14	0.5	35 ± 43	0.5
	+	0.7 ± 0.2		17 ± 8		30 ± 20	
5	—	0.9 ± 0.2	0.3	19 ± 12	0.7	24 ± 14	0.7
	+	0.8 ± 0.2		34 ± 33		45 ± 45	
6	—	0.9 ± 0.2	0.2	22 ± 14	0.1	31 ± 46	0.5
	+	0.8 ± 0.1		37 ± 33		37 ± 33	

h) Pozitif olguların immunsupresif türü ile ilişkisi:

İmmunsupresif ilacın türü ile kan ve/veya idrar BKV DNA ilişkisi analiz edildiğinde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. En sık kullanılan protokol mikofenolat mofetil+ siklosporin+ prednisolon idi.

i) Pozitif olguların en sık semptom ve bulguları:

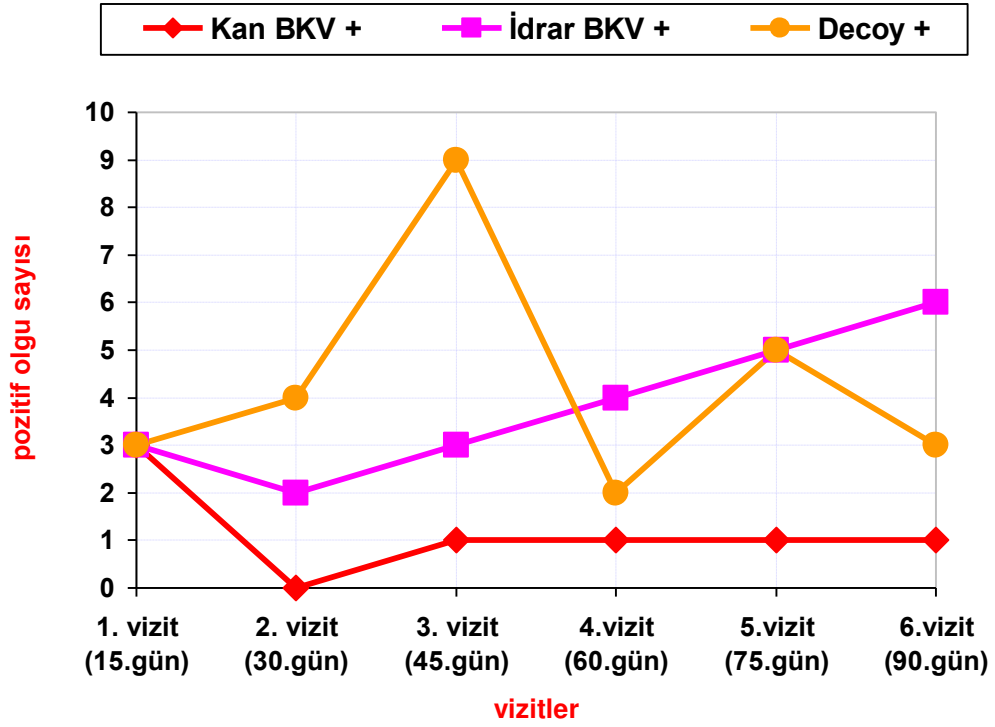
Kan ve/veya idrar BKV DNA pozitif olgulardaki en sık semptom ve fizik muayene bulgusu değerlendirildiğinde; her bir ziyaret için 2-7 arası BKV DNA pozitif olgu olup bunların 2-5' i asemptomatik ve 2-7' si normal fizik muayene bulgularına sahip idi. Geri kalanlarda ise spesifik olmayan, birbirinden farklı semptom ve muayene bulguları mevcuttu.

j) Eşlik eden enfeksiyonlar:

BKV pozitifliği saptanan ziyaretlerde eşlik eden belirgin bir enfeksiyon türü (bakteriyel, fungal, viral) yoktu. Taburculuk sonrası transplantasyon poliklinik kontrollerinde CMV (Cytomegalovirüs) rutin aralıklarla taranmayıp sadece hastanın CMV enfeksiyonu düşündürecek semptom ve bulgusu varsa test edildiği için, pozitif olguların CMV birlikteliği değerlendirilememiştir.

k) BKV DNA ve decoy pozitifliklerinin ziyaret zamanlarına göre dağılımı:

Kan BKV DNA, idrar BKV DNA ve decoy pozitif olgu sayılarının 15., 30., 45., 60., 75., 90. günde yapılan ziyaretlere göre dağılım grafiği Şekil 6' da verilmiştir.



Şekil 6: Pozitif olgu sayılarının vizitlere göre dağılım grafiği

I) Testlerin duyarlılık ve özgüllüğü :

Kanda BKV DNA pozitif olan 5 olgunun 2'sinde idrarda da BKV DNA pozitif ;
kanda BKV DNA negatif olan 20 olgunun 11'inde idrarda da BKV DNA negatif saptanmıştır.

Kanda BKV DNA pozitif saptanan 5 olgunun 2'sinde idrarda decoy hücresi saptanmış, kanda BKV DNA negatif olan 20 olgunun 9'unda idrarda decoy hücresi saptanmamıştır.

Testlerin duyarlılık ve özgüllüğü Tablo 14' de gösterilmiştir.

Tablo 14: Testlerin duyarlılık ve özgüllüğü

Test		Kan PZR			Duyarlılık	Özgüllük	Pozitif Prediktif Değer	Negatif Prediktif Değer
		+	-	T				
İdrar PZR	+	2	9	11	% 40	% 73.5	% 18.1	% 89.2
	-	3	25	28				
	T	5	34	39				
Decoy	+	2	11	13	% 40	% 67.6	% 15.3	% 88.4
	-	3	23	26				
	T	5	34	39				

TARTIŞMA

Polyomavirüsler tüm dünyada yaygın olarak bulunur ancak sağlıklı popülasyonda belirgin bir hastalığa neden olmazlar. BKV gerek seronegatif bir alıcıya seropozitif bir vericinin dokusu ile nakledilerek, gerekse önceden seropozitif alıcılarda immunsupresif ilaçların kullanımı ile reaktif olarak, immun sistemi baskılanmış hastalarda ciddi klinik tablolara neden olabilir (50).

Dünyada tüm erişkin popülasyonun % 90'ı polyomavirüslerden biri olan BKV açısından seropozitifdir (12). Ülkemizde ise 1123 sağlıklı kişinin dahil edildiği bir çalışmada, BKV seroprevalansı % 78.5 olarak saptanmıştır. Bu sonuç ülkemizde de BKV' nin yaygın olduğunu göstermektedir (51).

Bu virüs immunsupresif hastalarda aktive olarak nefropati, hemorajik sistit ve üreteral darlığa neden olur. BKV' nin neden olduğu nefropati (BKVN) böbrek transplantasyon alıcılarında greft kaybı nedenlerinden biri olması açısından önemlidir (12). BKV enfeksiyonu böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda % 1-10 oranında nefrit ve greft reddine neden olabilir (41). BKV ilişkili nefropati gelişen böbrek transplant alıcılarının % 15-45' inde greft kaybı bildirilmiştir (52,25).

BKV' nin böbrek dışı solid organ transplantasyonundaki (BD-SOT) yeri ise netleşmiş değildir. Bu nedenle çalışmamızı, karaciğer transplantasyonlu hastalarda BKV' yi üç ayrı yöntemle araştırarak hem bu hasta grubundaki sıklığını hem de klinik izlem yaparak pozitif olgulardaki seyrinin gözlemlenmesini amaçlayan, prospektif müdahalesiz gözlem çalışması olarak tasarladık.

Dünyada karaciğer transplantasyonu yapılan hasta grubunda bu virüsün rutin takipte yer alacak öneme sahip olduğunu belirten çalışmalar olduğu gibi (53), bu grupta öneminin düşük olduğunu belirten çalışmalar da (9,54) mevcut olup konu ile ilgili fikir birliği şu an için sağlanmış değildir. Ülkemizde ise Pubmed veri tabanında "BKV in Turkey, BK virus in Turkey, Polyomavirus in Turkey, BKV Turkish, BK Virus Turkish, Polyomavirus Turkish" anahtar kelimeleri kullanılarak ve Turkmedline veri tabanında "BKV, Polyomavirüs, karaciğer" anahtar kelimeleri kullanılarak yapılan tarama sonucunda BKV ile ilgili çalışmaların mevcut olduğu ancak karaciğer transplantasyon grubunda çalışma olmadığı görüldü. Ulaşabildiğimiz kaynaklara göre çalışmamız, ülkemizde karaciğer transplantasyon grubunda BKV araştırmaya yönelik ilk çalışmadır.

Transplantasyonu takip eden ilk aylar, immunsupresyonun en yoğun olduğu dönem olup, viral fırsatçı enfeksiyonlar bu dönemde en yoğundur. Yapılan benzer çalışmalarda BK vireminin % 78- 90'ı transplantasyon sonrası ilk 3 ayda olduğundan (10,53,55), çalışmamızda da transplantasyon sonrasındaki ilk 3 ay boyunca hastalar hem kan hem idrarda BKV yönünden izlenmiştir (kan ve idrar örneklerinde kantitatif RT PZR ile BKV DNA araştırılırken eş zamanlı olarak idrarda da decoy hücresi taranmıştır).

Çalışmamızda % 28.2 oranında BK virüsü saptadık. Karaciğer transplantasyon grubunda yapılmış benzer serilerde **Splendiani ve ark.** (56) % 6.2, **Munoz ve ark.** (55) % 7.8, **Marshall ve ark.** (57) % 8, **Doucette ve ark.** (10) % 12 ve **Loeches ve ark.** (53) % 21 oranında BK virüsü saptamış iken **Barton ve ark.** (58) ise hastalarından 8'i karaciğer transplantasyonlu olan çalışmalarında virüsü ve viremi saptamamıştır. Çalışmamızda ise virüsü oranı karaciğer transplantasyon grubunda saptanan virüsü ortalamalarından fazla (% 28.2) bulunmuştur.

Viremiyi ise 5 (% 12.8) hastada saptadık. Aynı hastada farklı vizitlerde hem viremi hem virüsü varlığı tespit ettik (5 hastadan 2'si) ancak bunların hiç birinde viremi saptanan vizitte aynı anda idrarda virüsü saptanmadı. **Mitterhofer ve arkadaşlarının** (59) karaciğer transplantasyon adaylarında yaptıkları ve virüsü + viremiyi aynı anda saptadıkları çalışmalarının yanında; virüsünün eşlik etmediği viremi veya viremisiz virüsü olan pek çok çalışma da mevcuttur (53,55,60,61,62,63). Bu durum BKV araştırılırken her iki örnekte (kan ve idrar) eş zamanlı PZR çalışması gerektiğini düşündürmektedir.

Solid organ transplant alıcılarında BK virüsü ve viremisinin değerlendirildiği pek çok çalışma mevcuttur. Örneğin; **Munoz ve ark.** (55) karaciğer, kalp ve böbrek transplantasyonu yapılan 156 hastayı aldıkları prospektif prevalans çalışmasında, multiplex nested PZR ile BKV, JCV ve SV 40 kantitatif olarak araştırılmıştır. Hasta örnekleri transplantasyon sonrası hastaların ortalama 1.5 yıl boyunca herhangi bir zamanda, herhangi bir nedenle hastaneye başvuruları sırasında, sadece bir defa toplanmış, düzenli takip yapılmamıştır. 64 karaciğer transplantasyon hastasının 5'inde (% 7.8) virüsü saptanırken, viremi saptanmamıştır. Böbrek ve kalp transplantasyonu yapılan hastaların ise 9'unda (6 böbrek, 3 kalp) viremi gösterilmiştir. Viremi genellikle böbrek transplantasyonunu takip eden 2. ayda (ortalama 52. gün) saptanmıştır. Böbrek transplantasyon alıcılarının tamamında, kalp transplantasyon alıcılarının ise birinde viremi saptanan dönemde böbrek

fonksiyonlarında bozulma olmuş ve 2 böbrek transplant alıcısında BKV' ye bağlı greft reddi gelişmiştir. Karaciğer transplantasyonu yapılan hastalarda ise BKV replikasyonu ile böbrek fonksiyonları arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır. **Doucette ve ark.** (10) 7 kalp, 25 karaciğer, 28 akciğer transplant alıcısında 3., 6. ve 9. aylarda toplanan kan ve idrar örneklerinden gerçek zamanlı PZR ile BKV DNA araştırdıkları çalışmada, 25 karaciğer transplantasyon hastasının 3 (%12)'ünde virüri tespit edilmiş ancak viremi saptanmamıştır. Toplamda 60 hastanın 9'unda saptanan virüsünün 7(% 77.7)'si transplantasyon sonrası 3.ayda saptanmıştır. **Hirsch ve ark.** (41) yaptıkları çalışmada ise, ileri yaş, erkek cinsiyet, diyabet varlığı ve beyaz ırk BKV' ye bağlı nefropati için risk faktörü olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise bu faktörler ile BKV pozitifliği arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır. Diyabet tanısı olan 7 hastamızın hiç birinde idrarda decoy hücresi saptanmazken, idrarda decoy pozitifliği olan 13 hastamızın ise hiç birinde diyabet tanısı olmadığı görüldü. Ulaşabildiğimiz kaynaklar içinde diyabet ve decoy hücresi ilişkisi ile ilgili yayına rastlanmamıştır.

Ülkemizde **Rota ve ark.** (64) tarafından yüksek risk grubundaki hastalarda yapılan BKV / JCV araştırmasında, çalışmamızda olduğu gibi High Pure PCR Template Preparation Kit ve Light Cycler ile gerçek zamanlı PZR çalışılmıştır. **Rota ve ark.**(64) toplam 115 hastaya ait 268 örnekte (62 kan, 206 idrar) BKV ve/veya JCV araştırdıkları çalışmalarında; farklı kliniklerden (çocuk nefroloji, böbrek transplantasyon ünitesi, erişkin nefroloji, kemik iliği transplantasyon ünitesi ve çocuk hastalıkları) gelen örnekler üzerinden retrospektif olarak değerlendirme yapmış ancak klinik izlem yapmamışlardır. Karaciğer transplantasyon hastaları ise çalışmaya dahil edilmemiştir. Örnek türü ayrımı ve BK/JC virüs ayrımı yapılmadan verilen toplu sonuçta, Polyomavirus DNA pozitifliği (BKV+JCV birlikte) %33.2 (89/268) olarak bildirilmiştir. Bu çalışma BKV' nin sık olarak görüldüğü bilinen nefroloji ve hematoloji kliniklerinden gelen örneklerde yapılmasına rağmen, kan örneklerinin sadece birinde (1/62; %1.6) BKV DNA pozitifliği saptanmıştır. İlginç olarak çalışmamızda, BKV sıklığı böbrek transplantasyonuna göre daha nadir beklenen karaciğer transplantasyon grubunda 207 kan örneğinin 7 (%3.3)'sinde BK viremi saptanmıştır. Bu çalışmada örneklerin %24.7 (22/89)'sinde BKV DNA $\geq 10^7$ kopya/ml ve tümünün idrar olduğu izlenmiştir. Çalışmamızda BKV DNA pozitiflikleri 10^1 - 10^3 kp/ml arası olup 10^4 kp/ml olan tek örnek mevcuttu ve bu da idrar örneğiydi. **Rota ve ark.nın** (64) çalışması renal transplantlı ve hematolojik maligniteli grupta olduğu için karaciğer transplantasyon grubuna oranla BKV' nin

daha yüksek kopya sayısında saptandığı düşünülebilir. Ancak **Loeches ve ark.’nin** (53) bizim çalışmamızda olduğu gibi sadece karaciğer transplantasyon grubunda yaptıkları çalışmalarında ise, kanda BKV yükü ortalama 10^5 kp/ml ve idrar BKV yükü 10^6 kp/ml gibi yüksek değerlerde bildirilmiştir.

Loeches ve arkadaşları (53) bu çalışmada prospektif olarak gerçek zamanlı PZR ile BKV izlemi yapmıştır. Çalışmaya 2 yıl süresince transplantasyon yapılan 62 hasta dahil edilmiştir. Hastalardan transplantasyon sonrası 1.hafta ve 1., 3., 6., 9., 12., 15., 17., 21., 24. aylarda idrar ve kan örnekleri toplanarak bunlarda BKV taranmıştır. Bu hastaların % 22.5’ u kadın ve tüm hastaların yaş ortalaması 51.4 olup çalışmamızdaki dağılımla uyumludur (çalışmamızda sırasıyla % 23.1 ve 49.8). Sonuçta **Loeches ve ark.** hastalarının % 21’ inde BK virüsü, % 18’ inde BK viremi olduğunu bildirirken, yaptığımız çalışmada hastaların % 28.2’ sinde virüsü, % 12.8’ inde viremi saptandı.

Loeches ve ark. (53) İspanya’da yaptıkları bu çalışmada hastaların % 38.7’ sinde primer neden hepatit C olarak saptanırken, çalışmamızda transplantasyona neden olan en sık primer hastalık % 41 oranında hepatit B’ dir. Her iki çalışmada da primer hastalıklar ve BKV’ nin istatistiksel anlamlı birlikteliği saptanmamıştır. Pankreas ve böbrek transplant alıcılarında yapılan başka bir çalışmada da primer hastalık türü ve decoy pozitifliği arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (66).

Özellikle böbrek transplantasyonunda uzamış soğuk iskemik süresi transplante böbrekte BKV nefritini kolaylaştırıcı bir faktör olarak kabul edilmektedir. Canlı donörden yapılan transplantasyonlarda BKV nefritinin daha az saptandığını gösteren çalışmalar bu görüşü desteklemektedir (66). Ancak çalışmamızda donör tipi ile BKV pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Benzer şekilde **Kroth ve arkadaşlarının** (65) pankreas-böbrek transplantasyon grubunda yaptıkları çalışmalarında da decoy pozitifliği ile donör tipi arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadığı bildirilmiştir.

Loeches ve ark.(53) rejeksiyon epizodundaki karaciğer transplantasyon hastalarında BK vireminin daha yaygın olduğunu göstermiştir. En az üç ay viremik seyreden bir karaciğer transplantasyon hastasında hem renal yetmezlik hem de karaciğer biyopsisinde viral enfeksiyonu destekleyen bulgular olan akut rejeksiyon geliştiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda 39 hastanın 6’sında rejeksiyon gelişmiş olup rejeksiyon gelişen hastaların 4’ünde kan ve/veya idrarda BKV pozitif idi. Bu 4 hastanın 2’sinde persistan virüsü vardı. (Persistan virüsü olan 4 hastanın 2’ sinde

rejeksiyon gelişti.) Bu bulgular karaciğer transplantasyon hastalarında rejeksiyon gelişiminde BKV' nin rolünün değerlendirilmesinde henüz yetersizdir.

Çalışmamızda hastalardan biri (hasta no 33) son virüri saptanan vizitten 3 ay sonra alınan biyopsi ile rejeksiyon tanısı aldı. Diğer hasta (hasta no 28) ise kanda BKV DNA pozitif saptanan vizitinden 4 gün sonra karaciğer fonksiyon bozukluğu nedeni ile alınan biyopside rejeksiyon tanısı aldı. Bu tanıdan 6 hafta sonraki vizitinde ise hastada BK virüri saptandı. Hastaya hepatik arter trombozuna bağlı rejeksiyon tanısı ile retransplantasyon yapıldı. Hepatik arter trombozu karaciğer transplantasyonu sonrası görülen mekanik komplikasyonlar arasında mortalite ve morbiditenin en önemli faktörüdür. Karaciğer transplantasyonu sonrası %3-9 oranında görülür. Erken dönemde (ilk dört hafta) ortaya çıkan hepatik arter trombozu; hastaya verilen taze donmuş plazma, trombosit süspansiyonu, K vitamini ve kriyopresipitata bağlı gelişen hiperkoagülabilitate veya cerrahi teknikteki hatalar nedeni ile olabilir (67). Literatürde ulaşabildiğimiz kaynaklar içinde BKV ve hepatik arter trombozu ilişkisine rastlanmadı. Bu sonuçlar BKV pozitifliğinin, rejeksiyon riski olan karaciğer transplantasyonlu hastalarda, rejeksiyonu kolaylaştırıcı faktörlerden biri olabileceğini düşündürdü.

Böbrek dışı solid organ transplant alıcılarında kronik böbrek yetmezliğinin nedeni genellikle kalsinörin inhibitör toksisitesi olup % 7-21 oranında görülür (55,68). Çalışmamızda BK viremi genelde bir hastada yalnızca bir veya birbirini takip etmeyen iki vizitte pozitif olup, viremi saptanan vizitlerde ve viremik hastaların sonraki takiplerinde böbrek fonksiyonlarında herhangi bir değişiklik saptanmadı. Ancak karaciğer transplantasyon alıcılarında yapılan bazı çalışmalarda, tek bir viremi epizodu ile böbrek fonksiyonları etkilenmediği halde, persistan BK viremi sonucunda böbrek yetmezliği geliştiği bildirilmiştir (53). Bu da persistan vireminin sadece böbrek transplantasyonunda değil, karaciğer transplantasyonu yapılan hastalarda da böbrek disfonksiyonuna neden olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda persistan viremi saptanmadığı için böbrek fonksiyonlarının normal olarak kaldığı düşünölmektedir.

Çalışmamızda toplam 11 virürlü (dördü Persistan virürlü) hasta olup bunların transplantasyon öncesi ve sonrası böbrek fonksiyonları normal düzeylerde saptandı.

Splendiani ve ark. (56) çalışmamızdaki sonuca benzer şekilde, virüri saptadıkları karaciğer transplantasyonlu hastalarda, serum kreatin ortalamasını normal (0.9 mg/dl) olarak saptamışlardır. Yine karaciğer transplantasyonlu çocuk hastalarda

yapılan bir BKV prevalans çalışmasında (69) BKV pozitif ve negatif grup arasında böbrek fonksiyonları açısından fark saptanmamıştır. **Saundh ve arkadaşları** (70), renal transplantasyon yapılan 30 hastayı izledikleri çalışmalarında, 8 hastada BK virurisi saptamışlar ve 12 ay sonra bunların sadece birinde biyopsi ile doğrulanan nefropati geliştiğini bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda nefropati gelişiminin yüksek düzey ($\geq 10^7$ kopya/ml) viruri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Amerikan Transplantasyon Derneği de, polyomavirus DNA'sının idrarda $\geq 10^7$ kopya/ml, plazmada ise $\geq 10^4$ kopya/ml olması halinde klinik olarak nefropatinin gelişebileceğini kabul etmektedir (71). Çalışmamızda saptanan BKV DNA 10^1 - 10^4 kp/ml arası olup, bu düşük kopya sayıları nedeni ile viruri ve viremi saptanan olgularda, izlenen süre içinde, nefropati gelişmediği düşünüldü. Bu hipotezi destekler şekilde pediatrik karaciğer transplantasyonu grubunda yapılan bir çalışmada, idrar BK viral yükü ortalama 10^2 kopya/ml olup bu hastalarda da böbrek fonksiyonlarında bozulma olmadığı bildirilmiştir (60).

Karaciğer transplantasyonu yapılmış olan hastalarda böbrek yetmezliği genellikle kalsinörin inhibitör toksisitesine bağlandığından ve bu grupta böbrek transplantasyon grubuna göre daha az oranda böbrek biyopsisine gidildiği için, böbrek fonksiyon bozukluğunun nedeninin (BKV? ilaç toksisitesi?) kesin olarak tanımlaması çoğu zaman yapılamamaktadır. Nadir çalışmalarda (53) karaciğer transplantasyonlu hastalarda BKV ilişkili nefropati (BKVN) gösterilebilmiştir. Bununla birlikte diğer böbrek dışı solid organ (kalp, akciğer, pankreas) transplantasyonu yapılmış hastalarda BKVN daha önce tanımlanmıştır (72-77). **Salama ve ark.** (9), 41 karaciğer transplantasyon hastasında kan ve idrarda BKV DNA PZR ve decoy hücresi taraması yaptıkları çalışmalarında karaciğer transplantasyon grubunda böbrek fonksiyonlarındaki bozulmanın Polyomavirüs ile ilişkili olmadığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda 1.vizitte (15.gün) BKV DNA pozitif olguların AST ortalamasının, negatif olguların AST ortalamasından fazla olduğu ($p=0.01$); 3.vizitte (45.gün) ise tam tersine negatif olguların AST ortalamasının pozitif olgulardan fazla olduğu görüldü ($p=0.006$). Rejeksiyon, iskemi, perfüzyon hasarı, oddi sfinkter bozukluğu ve anastomoz hattı ödemi gibi sorunlar nedeni ile transplantasyon sonrası ilk haftalarda AST değeri yüksek olabilir. Bu hastalarda transplantasyon sonrası kullanılan ilaçlar da AST değerinde yükselme veya düşmeye neden olabilir (Prof. Dr. Sedat Karademir, Kişisel görüşme, Mayıs 2013). Biliyer drenajın sağlanmasında kullanılan

teknik türü dahil pek çok farklı neden AST değerinde dalgalanmalara neden olabileceğinden çalışmamızdaki istatistiksel anlamlılığın tek başına BKV pozitifliğinden kaynaklanmadığı düşünüldü.

Hirsch ve arkadaşları (7) böbrek transplant alıcılarında BK viremi veya idrarda decoy hücrelerinin önemli bir kısmının, pulse steroid içeren anti rejeksiyon tedavi rejimi alan hastalarda saptandığını bildirmiştir. Başka bir çalışmada ise steroid kullanımı ve antitimosit globulin induksiyon terapisinin böbrek transplant alıcılarında BKV replikasyonu için bağımsız risk faktörü olduğu belirtilmiştir (78). Böbrek dışı solid organ transplantasyonunda BK virüriyi sitolojik olarak değerlendiren bir diğer çalışmada ise takrolimusun yüksek düzeylerinin BK virüri ile ilişkisi ortaya konmuştur (72). **Barton ve arkadaşlarının** (58) 8'i karaciğer transplantasyonu olan 34 hastalık böbrek dışı solid organ alıcılarında kronik renal yetmezlik nedenlerini incelediği çalışmada, BK virüri saptanan hastaların tamamının mikofenolat mofetil kullanması ve bu immunsupresifi almayan hastalarda hiç virüri olmaması dikkat çekicidir. **Brennan ve arkadaşları** (79) ise virüsünün mikofenolat mofetil - takrolimus alan hastalarda en fazla olduğunu bildirmişlerdir. **Loeches ve ark** (53), bizim sonuçlarımıza benzer şekilde immunsupresif türü ile BKV pozitifliği arasında istatistiksel anlamlılık saptamamıştır. Bu çalışmada en sık immunsupresif rejimi takrolimus+ mikofenolat mofetil+ kortikosteroid iken merkezimizde karaciğer transplantasyon grubunda en sık siklosporin+ mikofenolat mofetil+ kortikosteroid şeklinde idi. Bu sonuçlarda her bir çalışmanın, farklı bir immunsupresif türü ile BKV ilişkisi olduğunu bildirmiş olması, konu ile ilgili ortak bir görüş oluşmamasına neden olmaktadır. Yine transplantasyon alıcılarında immunsupresif ilaçların genellikle üçlü kombinasyonlar halinde hastalara verildiği düşünülürse tek bir ilaç türü üzerinden bu ilişkinin değerlendirilmesi mümkün görülmemektedir.

BK virüri veya viremi saptanan hastalarda genel olarak BKV enfeksiyonu düşündürecek şikayet veya fizik muayene bulgusu saptamadık. **Munoz ve arkadaşları** da (55) BK virüri saptadıkları karaciğer transplant alıcılarında, BKV enfeksiyonu ile ilişkilendirilebilecek herhangi bir semptom veya bulgu saptamadıklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda BKV pozitifliği saptanan vizitlerde, bu pozitifliğe eşlik eden belirgin bir enfeksiyon türü (bakteriyel, fungal, viral) olmadığı görüldü. **Barton ve ark.**(58) böbrek dışı solid organ transplantasyon grubunda yaptıkları çalışmalarında CMV (Cytomegalovirüs) varlığı ile BKV pozitifliğini ilişkili bulmuştur. Merkezimizde

taburculuk sonrası karaciğer transplantasyon poliklinik kontrollerinde, CMV rutin aralıklarla taranmayıp sadece hastanın CMV enfeksiyonu düşündürecek semptom ve bulgusu varsa test edildiği için, çalışmamızda pozitif olguların CMV birlikteliği değerlendirilememiştir.

Loeches ve ark. nın (53) sadece karaciğer transplantasyon hastalarında BKV taraması yaptıkları 62 hastalık çalışmalarında, viremi saptanan 11 hastanın 7'si transplantasyon sonrasındaki ilk ayda, 10'u ilk 3 ayda saptanmıştır. 1 yıldan sonra hiçbir hastada viremi saptanmamıştır. Çalışmamızda ise benzer şekilde viremi saptanan 5 hastadan 3'ü transplantasyon sonrası ilk ay içinde (15.gün vizitinde) saptanmıştır. Bu sonuçlar riskli hasta gruplarında BK vireminin özellikle transplantasyon sonrası ilk hafta ve aylarda taranması gerektiğini göstermektedir. BK virüsü ise primer BKV enfeksiyonunu takiben transplantasyondan sonraki 10 gün - 6 hafta arası ortaya çıkabilir. Transplantasyon öncesi BKV seropozitif olanlarda reaktivasyon ya da donörden gelen yeni BKV suşu ile reinfeksiyon durumunda ise virüsü 5 hafta - 17 ay arası ortaya çıkabilir ve haftalarca veya yıllarca persiste edebilir (80). Bu durum virüsünün daha uzun süre izlenmesi gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızda, BKV DNA araştırırken, çabuk sonuç vermesi, kontaminasyon ve JCV ile çapraz reaksiyon oranının en düşük olması, nested PZR' ye göre daha duyarlı olması (81) ve kantitatif olarak kopya sayısının tespit edebilmesi nedeni ile gerçek zamanlı kantitatif PZR kullanıldı. Üretici firma tarafından PZR kitinin duyarlılığı %97.2, özgüllüğü ise %100 olarak verilmekte idi. Gerek transplantasyon grubunda gerek kanser araştırmalarında BKV saptamak için pek çok çalışmada aynı nedenlerden dolayı gerçek zamanlı kantitatif PZR kullanılmıştır (10,47,53,64,81). Ayrıca KDIGO (Kidney Disease; Improving Global Outcomes) rehberi (82) Polyomavirüs bağlantılı nefropati (PVTN) izleminde PZR' yi BKV replikasyonunun sensitif ve spesifik bir markerı olarak göstermiştir.

Geniş nukleuslu ve buzlu cam şeklinde geniş bazofilik inklüzyonlara sahip epitelyal hücreler olan 'Decoy hücreleri' PZR' den daha basit ve ucuz bir tarama yöntemidir. Bir çalışmada idrarda >10 decoy/hpf (high powered field) saptanmasının BKVN için tanısal değere sahip olduğu bildirilmiştir (66). Bununla birlikte decoy hücrelerinin diğer virüs (JCV, SV 40, CMV, Adenovirüs) enfeksiyonlarında da ortaya çıkması (83), asemptomatik bireylerde idrarla atılabilmesi ve malignite varlığında idrarda saptanması (38) BKV nefriti tanısındaki değerini tartışılır kılmaktadır.

İdrarda Decoy hücrelerin varlığı böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda BKV enfeksiyonu tespiti için yararlı bir yöntem iken (7) böbrek dışı solid organ alıcılarında bu yöntemin duyarlılığı net bilinmemektedir. Çalışmamızda kan ve idrar örneklerinde gerçek zamanlı PZR ile BKV araştırılırken aynı zamanda idrarda decoy hücresi taraması yapılmıştır ancak decoy hücresi pozitiflikleri idrar BKV PZR sonuçları ile uyumlu bulunmamıştır.

Salama ve arkadaşlarının (9) sadece karaciğer transplantasyon hastalarının alındığı ve çalışmamıza benzer şekilde kan+idrarda PZR ile BKV DNA ve idrarda decoy taraması yapılan çalışmalarında da hastaların % 9.7' sinde decoy hücresi saptanırken bunların hiç birinde virüri saptanmamıştır. Daha duyarlı ve güvenilir sonuçlar veren PZR ile desteklenmeyen decoy pozitiflikleri ve negatiflikleri, decoy tarama testinin duyarlılığının düşük olduğunu (52) kanıtlamaktadır.

Klinik olarak Polyomavirus nefriti olmasa da asemptomatik bireylerin idrarında BKV atılabiliyor olması nedeniyle, hangi yöntemle (sitoloji, elektron mikroskopi, PZR) saptanırsa saptansın idrarda virüsünün BKV enfeksiyonundaki tanısal değeri BK viremiden düşüktür (84). Kanda BKV DNA saptanması BKVN tanısında daha değerlidir. **Nickeleit ve ark.** (31). yapmış oldukları çalışmada BKVN' li hastaların tamamında BK viremi saptarken, nefropati bulgusu olmayan gruptan sadece % 4.8'inde kanda BKV saptamışlardır. Ayrıca hastaların % 50'sinde klinik olarak nefropati bulgusu ortaya çıkmadan 16-33 hafta önce kanda PZR ile BKV DNA saptanmıştır. Kanda PZR ile BKV DNA saptanması diğer iki yönetime göre daha sensitif ve spesifik bir testtir (31). Kanda BKV PZR testinin sensitivitesi % 100, spesivitesi % 88 olarak verilmiştir (7). Çalışmamızda idrar BKV PZR ve decoy tarama testlerinin, kanda BKV PZR testine göre duyarlılığı ve pozitif prediktif değeri düşük iken, negatif prediktif değerleri sırasıyla % 89.2 ve % 88.4 olarak saptanmıştır. Bu da bu iki testin negatifliğinin BKV enfeksiyonun dışlanması önemli olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak; karaciğer transplantasyon hastalarında İdrarda BKV hangi yöntemle araştırılırsa araştırılsın testlerin negatifliği pozitifliğinden daha değerlidir. Bu testler BKV enfeksiyonlarının dışlanmasında rutinde kullanılabilir ancak pozitiflik saptandığında sonuçların kan BKV DNA PZR sonuçları ile izlenmesi gerekir. İstatistiksel anlamlı fark saptanamasa da, böbrek ve karaciğer fonksiyon testlerinde nedeni açıklanamayan bozulmalar saptandığında, BKV' nin dikkate alınması gereken bir etken olduğu düşünülmektedir. Bu hastalarda rejeksiyon gelişiminde BKV' nin rolünün değerlendirilebilmesi için prospektif daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR:

1. Abbasoğlu O. Karaciğer transplantasyonu. İç hastalıkları. Ed: İliçin, Biberoğlu, Süleymanlar, Ünal. 3.baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevi 2012; 1539-1548.
2. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2011 (http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/siy_2011.pdf) Erişim Tarihi:14.03.13
3. Günseren F. Transplantasyon Hastalarında Enfeksiyon Riski ve Sık Görülen Enfeksiyonlar. Enfeksiyon Hastalıklarında Tedavi Dizisi; Solid Organ Transplantasyonu Enfeksiyonlarının yönetimi, Ankara, Bilimsel Tıp 2010; 9-15
4. Gardner et al. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. Lancet 1971; i:1253-1257.
5. Major EO, Ryschkewitsch C. Human Polyomaviruses. Editors: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH. Manual of Clinical Microbiology.(Klinik Mikrobiyoloji) Çeviren: Parlak Ü. Cilt 2, 9.baskı, ASM Press, Washington DC 2007; 1612-1621
6. Nicleleit et al. Polyomavirus Infection of Renal Allograft Recipients: From Latent Infection to Manifest Disease. J Am Soc Nephrol 1999; 10: 1080–1089.
7. Hirsch HH et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal transplant recipients. N. Engl. J. Med. 2002; 347: 488-496.
8. Fioriti D et al. BKV infection and hemorrhagic cystitis after allogeneic bone marrow transplant. Int J Immunopathol Pharmacol. 2005; 2: 309-16.
9. Salama M et al. Decline in Native Kidney Function in Liver Transplant Recipients Is Not Associated with BK Virus Infection. Liver Transplantation 2008; 14: 1787-1792.
10. Doucette K et al. Prospective Monitoring of BK Polyomavirus Infection Early Posttransplantation in non renal Solid Organ Transplant Recipients. Transplantation. 2008; 85: 1733-1736
11. Fishman JA. Infection in solid organ transplant recipients. N Engl J Med 2007; 357:2601-14.
12. Tan CS, Koralnik IJ. JC, BK and other Polyomaviruses: progressive Multifocal leukoencephalopathy. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Volume 2. Churchill Livingstone Elsevier. 2010; 145: 2051-58.
13. Cole C, Conzen SD. Polyomaviridae: the viruses and their replication. Eds: Knipe DM, Howley PM. Virology 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins; Philadelphia: 2001; 2141-2174

14. Kilham L. Isolation in suckling mice of a virus from C3H mice harboring Bittner milk agent. Science 1952; 116(3015):391-2.
15. Gross L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. Proc Soc Exp Biol Med. 1953; 83(2):414-21
16. Sweet BH, Hilleman MR. The vacuolating virus S.V. 40. Proc Soc Exp Biol Med. 1960; 105:420-7
17. Allander T. et al. Identification of a third human polyomavirus. J Virol 2007; 81(8):4130-6.
18. Gaynor AM. et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. PLoS Pathog 2007; 3 (5):e64: 595-604
19. Feng H. et al. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell karsinoma. Science 2008; 319(5866):1096-100.
20. Us D. İnsan Polyomavirusları. Editör: Ustaçelebi Ş. Temel ve klinik mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 1999; 803-806
21. Padgett BL, Walker DL. Prevalence of anti-bodies in human sera against JC virüs, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. J. Infect. Dis. 1973; 127:467-470
22. Sayiner A. Merkezi Sinir Sisteminde Hastalık Oluşturan Viruslar ve İnfeksiyonları. Ed: Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Güneş kitabevi. Ankara 2004: 268- 269
23. Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT. Human Polyomavirus JC virus genome. J. Virol. 1984; 51: 458-469
24. Stoner GL. et al. BK virus regulatory region rearrangement in brain and cerebrospinal fluid from a leukemia patient with tubulointerstitial nephritis and meningoensefalitis. Am. J. Kidney Dis. 2002; 39: 1102-1112
25. Ramos E. et al. BK virus nephropathy diagnosis and treatment experience at the University of Maryland Renal Transplant Program. Clin Transpl. 2002;143-153
26. Koukoulaki M et al. Prospective monitoring of BK virus replication in renal transplant recipients. Transpl Infect Dis. 2009;11: 1-10
27. Knowles WA. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BKV and JCV. Adv Exp Med Biol. 2006; 577: 19-45.
28. Ahsan N, Shah KV. Polyomaviruses and Human Diseases. Adv Exp Med Biol. 2006; 577: 1-18

29. Andrews CA, Daniel RW, Shah KV. Serologic Studies of Papovaviruses in Pregnant Women and Renal Transplant Recipients. Eds: Sever and Madden. Polyomaviruses and Human Neurological Disease. Alan R Liss, New York 1983; 133-141
30. Boothpur R, Brennan DC. Human polyomaviruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. J Clin Virol. 2010; 47: 306-312
31. Nicleleit V. et al. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. N Engl J Med. 2000; 342:1309-15.
32. Coleman DV. et al. Human polyomavirus BK infection and ureteric stenosis in renal allograft recipients. Clin Pathol. 1978; 31: 338-347
33. Karam G. et al. Late ureteral stenosis following renal transplantation: risk factors and impact on patient and graft survival. Am J Transplant. 2006; 6: 352-356.
34. Arthur RR. et al. Association of BK viremia with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. N Engl J Med. 1986; 315: 230-234
35. Polyomavirus Virion Structure. Swiss Institute of Bioinformatics 2010. (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/58.html) Erişim tarihi: 31.03.2013
36. Cubitt CL. Molecular Genetics of the BK Virus. (<http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/2743>) Erişim tarihi: 31.03.13
37. Cole CN. Polyomaviridae: the viruses and their replication. Eds: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fields Virology, 3rd ed. Lippincott- Raven Publishers, Philadelphia; 1996: p.1997-2025
38. Shah K. V. Polyomaviruses. Eds Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. Fields virology 3rd ed. Raven Publishers, Philadelphia, 1995; pp 1997–2025
39. Weber T. et al. Specific diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy by polymerase chain reaction. J. Infect. Dis. 1994; 169:1138-1141
40. Wong AS. et al. Relationship of pretransplantation polyoma BK virus serologic findings and BK viral reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis. 2007;44: 830-837
41. Hirsch H.H. et al. Polyomavirus associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. Transplantation 2005; 79: 1277-1286.
42. McNees AL. et al. Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV, JCV and SV 40 by real time PCR. J. Clin. Virol. 2005; 34: 52-62.

43. Sehbani LB. et al. Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV and JCV by LightCycler real-time PCR. *Journal of Clinical Virology* 2006; 36: 159–162
44. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3: 611-623
45. Erensoy S. Viral İnfeksiyonların Tanısında Moleküler Biyolojik Yöntemler ve Filogenetik Analiz. Ed: Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S. *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Güneş kitabevi. Ankara* 2004; 75-77
46. Tim J. Harrison. *Molecular virology by D. R. Harper. A medical perspectives book. Bios Scientific Publishers* 1994; 154 pp.
47. Narayanan M. et al. BK Virus Associated Renal Cell Carcinoma: Case Presentation with Optimized PCR and Other Diagnostic Tests. *American Journal of Transplantation* 2007; 7: 1666–1671
48. Thuns SN, Gerber MA. *Histopathology of Liver Transplantation. Eds: TL Fabry, FL Klion. "Guide to Liver Transplantation". Çeviren: Çubukçu O. Igaku-Shoin Medical Publishers, Inc. New York* 1992; 334 pp
49. Owens WD, Felts JA, Spitznagel EL. ASA Physical Status Classifications: A study of consistency of ratings. *Anesthesiology.* 1978; 49: 239-243
50. Jiang M. et al. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology* 2009; 384(2): 266-73.
51. Us D, Hayran M, Ustaçelebi S. Yeni insan polyomavirüsleri; Farklı yaş gruplarında hemagglütinasyon inhibisyon testi ile saptanan BK virüs antikor seviyeleri. *Mikrobiyol Bul* 1991; 25(2): 173-7
52. Randhawa PS, Demetris AJ. Nephropathy due to polyomavirus type BK. *N Engl J Med* 2000; 342: 1361-1363
53. Loeches B. et al. BK Virus in Liver Transplant Recipients: A Prospective Study. *Transplantation Proceedings* 2009; 41: 1033-1037
54. Puliyananda DP. et al. Isolated heart and liver transplant recipients are at low risk for polyomavirus BKV nephropathy. *Clin Transplant* 2006; 20: 289-294
55. Munoz P. et al. Prevalence of BK virus replication among recipients of solid organ transplants. *Clin Infect Dis.* 2005; 41: 1720-1725.
56. Splendiani G. et al. Polyoma virus BK and renal dysfunction in a transplanted population. *Transplant Proc* 2004; 36: 713–5

57. Marshall WF. et al. Rapid detection of polyomavirus BK by a shell vial cell culture assay. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1613-5
58. Barton TD. et al: A prospective cross-sectional study of BK virus infection in non-renal solid organ transplant recipients with chronic renal dysfunction. *Transpl Infect Dis.* 2006; 8: 102-107
59. Mitterhofer AP. et al. Polyomavirus BK Replication in Liver Transplant Candidates with Normal Renal Function. *Transplantation Proceedings* 2011; 43: 1142–1144
60. Amir A. et al. BK Virus Infection and Its Effect on Renal Function in Pediatric Liver-Transplant Recipients: A Cross Sectional, Longitudinal, Prospective Study. *Transplantation* 2011;92: 943–946
61. Merlino C. et al: BKV-DNA and JCV-DNA co-quantification assay to evaluate viral load in urine and serum. *Mol Biotechnol* 2005; 30: 1-8
62. Alexander RT. et al: The prevalence of BK viremia and urinary viral shedding in a pediatric renal transplant population: a single-center retrospective analysis. *Pediatr Transplant* 2006; 10: 586-592
63. Hu J. et al. Prospective study of posttransplant polyomavirus infection in renal transplant recipients. *Exp Clin Transplant.* 2011; 9(3):175-80.
64. Rota S. et al. Investigation of BK and JC virus DNA positivities by real-time polymerase chain reaction in the clinical samples of patients with high risk. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45(2):280-7
65. Kroth L.V. et al. Prevalence of Urinary Decoy Cells and Associated Risk Factors in a Brazilian Kidney, Pancreas, and Kidney–Pancreas Transplant Population. *Transplantation Proceedings*, 2012; 44: 2394–2396
66. Kwak EJ. et al. Pathogenesis and management of polyomavirus infection in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1081–1087
67. Akdur A., Sevmiş Ş., Karakayalı H. Erişkin Karaciğer Naklinde Postoperatif Bakım. *Yoğun Bakım Dergisi.* Şubat 2010; 85-97
68. Ojo AO. et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med* 2003; 349: 931-940
69. Brinkert F. et al. Prevalence of polyomavirus viruria (JC virus/BK virus) in children following liver transplantation. *PediatrTransplantation* 2010;14: 105–108.
70. Saundh BK. et al. Different patterns of BK and JC polyomavirus reactivation following renal transplantation. *J Clin Pathol* 2010; 63(8): 714-8.

71. Humar A, Michaels M. American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6(2): 262-74.
72. Haririan A. et al: Polyomavirus reactivation in native kidneys of pancreas alone allograft recipients. *Transplantation* 2003; 75: 1186-90
73. Limaye AP. et al: Polyomavirus nephropathy in native kidneys of non-renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5: 614-20
74. Menahem SA. et al: Native kidney BK nephropathy post cardiac transplantation. *Transplantation* 2005; 79: 259-60
75. Schmid H. et al: BK virus associated nephropathy in native kidneys of a heart allograft recipient. *Am J Transplant* 2005; 5: 1562-8
76. Schwarz A. et al: Polyoma virus nephropathy in native kidneys after lung transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 2582-5
77. Barber CE. et al: BK virus nephropathy in a heart transplant recipient: case report and review of the literature. *Transpl Infect Dis* 2006; 8: 113-21
78. Dadhania D. et al: Epidemiology of BK virus in renal allograft recipients: independent risk factors for BK virus replication. *Transplantation* 2008; 86: 521-528
79. Brennan DC. et al. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant* 2005; 5: 582-594
80. Gardner SD. et al. Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J Clin Pathol* 1984; 37: 578–586
81. Elfaitouri A., Hammarin AL., Blomberg J. Quantitative real-time PCR assay for detection of human polyomavirus infection. *Journal of Virological Methods* 2006; 135: 207–213
82. Kidney Disease: improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; suppl3: 1-155
83. BK Virus. *American Journal of Transplantation* 2004; 4 (Suppl. 10): 89–91 [No authors listed]
84. Khalili K, Stoner GL. Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives. Wiley-Liss. New York. 2001; 704 pp

Ek Tablo: KAN BKV PZR, İDRAR BKV PZR VE İDRARDA DECOY TARAMA TESTLERİNDEN EN AZ BİRİ POZİTİF OLAN HASTALAR

HASTA NO 3 (E, 60 y)

VİZİT	KAN BKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	0.6	6300	%3	%4	yok
2	0	0	0	0.7	4600	%8	%10	
3	0	0	0	0.6	5100	%7	%14	
4	0	7.8 kp/ml	0	0.6	6500	%9	%7	
5	0	269 kp/ml	0	0.6	4500	%7	%15	
6	0	21.6 kp/ml	0	0.6	3800	%8	%15	

HASTA NO 5 (E, 49 y)

VİZİT	KAN BKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	0.6	7000	%3	%15	yok
2	0	0	0	0.9	7400	%7	%26	
3	0	0	+	0.9	7200	%7	%27	
4	0	0	0	1.1	5400	%8	%20	
5	0	0	?	0.9	3400	%8	%31	
6	0	0	+	0.9	6000	%5	%33	

HASTA NO 6 (E, 47 y)

VİZİT	KAN BKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	0.7	4900	%12	%15	yok
2	0	0	0	0.9	5000	%13	%26	
3	0	0	+	0.8	6200	%10	%19	
4	0	0	0	0.8	6000	%11	%18	
5	0	0	0	0.7	5600	%10	%24	
6	0	0	0	0.9	4900	%12	%27	

HASTA NO 8 (K, 42y)

VİZİT	KAN BKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	0.6	5400	%8	%11	yok
2	0	0	0	0.7	2700	%6	%11	
3	0	131 kp/ml	0	0.8	3800	%7	%12	
4	0	197 kp/ml	0	0.8	3500	%8	%16	
5	0	66.7 kp/ml	0	0.9	3500	%7	%15	
6	0	0	0	0.8	2900	%7	%37	

HASTA NO 12 (E, 55 y)

VİZİT	KAN BKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	6660 kp/ml	0	2.5	4800	%1	%1	VAR (klinik+ patolojik) EX
2	.	.	.	.	.	.	.	
3	.	.	.	.	.	.	.	
4	.	.	.	.	.	.	.	
5	.	.	.	.	.	.	.	
6	.	.	.	.	.	.	.	

HASTA NO 15 (E, 50 y)

VİZİT	KAN BKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	+	0.6	18200	%8	%5	VAR patolojik
2	0	0	+	0.7	26600	%8	%2	
3	0	0	0	0.6	13500	%12	%12	
4	0	0	0	0.6	8700	%12	%18	
5	0	0	0	0.8	9900	%9	%20	
6	0	0	?	0.7	9000	%1	%12	

HASTA NO 16 (E,43 y)

VİZİT	KAN BKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	0.6	15300	%4	%11	yok
2	0	0	0	0.7	8800	%5	%12	
3	0	0	+	0.7	9100	%6	%11	
4	0	0	0	0.8	9200	%4	%10	
5	0	0	?	0.8	9900	%5	%6	
6	0	0	0	0.7	7400	%6	%14	

HASTA NO 18 (E, 59 y)

VİZİT	KAN BKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	0.9	10900	%3	%6	VAR patolojik
2	0	0	?	1.5	6900	%7	%8	
3	0	0	+	1.8	6800	%6	%5	
4	0	0	0	1.5	6300	%6	%4	
5	0	0	+	1.4	8800	%5	%6	
6	0	0	?	1.3	5700	%5	%8	

HASTA NO 21 (E, 49 y)

VİZİT	KAN BKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	0.4	5200	%8	%9	yok
2	0	0	0	0.6	6400	%3	%8	
3	0	0	0	0.5	5000	%4	%9	
4	0	12 kp/ml	0	0.6	4600	%4	%13	
5	0	0	0	0.6	7500	%3	%6	
6	0	13.6 kp/ml	0	0.8	6700	%7	%12	

HASTA NO 22 (E, 54 y)

VİZİT	KAN BKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	+	1.2	19300	%1	%6	yok EX
2	.	.	.	.		.	.	
3	.	.	.	.	.	.	.	
4	.	.	.	.	.	.	.	
5	.	.	.	.	.	.	.	
6	.	.	.	.	.	.	.	

HASTA NO 23 (E, 49 y)

VİZİT	KAN BKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	0.9	6800	%9	%20	yok
2	0	0	0	0.9	12500	%10	%10	
3	0	0	+	0.8	12500	%8	%11	
4	0	0	+	0.9	11700	%7	%10	
5	0	0	+	1.2	9300	%13	%9	
6	0	0	+	0.9	6500	%9	%16	

HASTA NO 24 (K, 45 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	1.8	6300	%9	%13	YOK
2	0	0	0	0.7	14600	%7	%24	
3	0	0	0	0.8	19100	%4	%22	
4	0	0	0	0.7	18000	%4	%30	
5	0	0	0	0.7	11300	%3	%24	
6	0	6.9 kp/ml	0	0.7	13100	%4	%32	

HASTA NO 25 (E, 58 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	0.5	9500	%3	%6	YOK
2	0	0	+	0.7	8700	%8	%13	
3	8 kp/ml	0	+	0.7	10500	%4	%11	
4	0	0	0	0.7	8700	%5	%13	
5	0	0	+	0.9	8500	%3	%9	
6	111kp/ml	0	+	0.7	8300	%4	%11	

HASTA NO 26 (E, 56 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	+	0.6	3900	%6	%8	YOK
2	0	0	?	0.6	5500	%7	%7	
3	0	0	+	0,7	5600	%10	%7	
4	.	.	.	.	.	.	.	
5	.	.	.	.	.	.	.	
6	.	.	.	.	.	.	.	

HASTA NO 27 (E, 60 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	48.5kp/ml	0	0	0.8	7600	%10	%10	VAR K+P
2	0	0	0	0.9	7100	%7	%35	
3	0	0	0	1.1	8800	%5	%18	
4	0	0	0	1.0	10500	%7	%16	
5	31 kp/ml	0	0	0.9	4800	%4	%22	
6	0	0	0	0.9	5500	%8	%22	

HASTA NO 28 (E, 37 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	30 kp/ml	0	0	0.7	11100	%6	%4	VAR K+P
2	0	0	0	0.8	15600	%3	%2	
3	0	0	0	0.8	8700	%7	%8	
4	0	0	0	0.8	7100	%7	%13	
5	0	16.5 kp/ml	0	1.1	9000	%7	%13	
6	0	154 kp/ml	0	1.1	8000	%10	%16	

HASTA NO 29 (K, 58 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	0.4	5900	%6	%11	YOK
2	0	0	0	0.6	4900	%7	%16	
3	0	0	0	0.8	6100	%8	%18	
4	0	0	0	0.8	5300	%8	%29	
5	0	18.5 kp/ml	0	0.8	6400	%6	%16	
6	0	0	0	0.8	3700	%10	%30	

HASTA NO 32 (E, 47 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	0.6	4800	%4	%5	YOK
2	0	0	+	0.6	6200	%8	%9	
3	0	0	+	0.6	6000	%7	%6	
4	0	0	0	0.7	5100	%8	%8	
5	0	0	+	0.7	4600	%9	%12	
6	0	0	?	0.7	4000	%8	%10	

HASTA NO 33 (E, 55 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	9.3 kp/ml	0	0.6	2500	%2	%21	VAR Patolojk
2	0	156 kp/ml	0	0.8	7300	%4	%11	
3	0	20.7 kp/ml	0	0.6	5100	%5	%8	
4	0	68.7 kp/ml	0	0.6	4400	%11	%27	
5	0	914 kp/ml	0	0.5	3300	%7	%20	
6	0	48700kp/ml	0	0.7	4800	%6	%23	

HASTA NO 34 (E, 57 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	20.8 kp/ml	0	1.0	8400	%1	%4	YOK
2	0	0	0	1.3	6500	%11	%15	
3	0	0	0	1.3	7200	%10	%14	
4	9.3 kp/ml	0	0	1.2	6600	%10	%15	
5	0	0	0	1.1	6900	%10	%18	
6	0	0	0	1.1	6800	%10	%18	

HASTA NO 36 (E, 22 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	11 kp/ml	0	0	0.5	28500	%8	%2	YOK
2	0	0	0	0.5	14100	%12	%9	
3	0	0	0	0.5	14900	%5	%9	
4	0	0	+	0.5	11600	%12	%9	
5	0	0	0	0.6	13600	%10	%15	
6	0	0	0	0.5	12100	%12	%14	

HASTA NO 37 (K, 24 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	0.4	8900	%9	%15	YOK
2	0	0	+	0.6	12500	%5	%31	
3	0	0	0	0.8	7500	%4	%6	
4	0	0	0	0.5	5600	%17	%33	
5	0	0	0	0.5	6400	%9	%23	
6	0	0	0	0.6	5900	%9	%25	

HASTA NO 38 (K, 61 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	1.4	13800	%8	%11	YOK
2	0	0	0	1.5	10100	%6	%7	
3	0	12.4 kp	0	1.0	15500	%5	%7	
4	0	0	0	1.1	5900	%2	%21	
5	0	0	0	1.7	7100	%1	%24	
6	0	48.4 kp	0	1	3400	%2	%39	

HASTA NO 39 (E, 43 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	0	0.5	9000	%9	%3	YOK
2	0	230 kp/ml	0	0.5	8500	%9	%7	
3	.	.	.	.	.	.	.	
4	.	.	.	.	.	.	.	
5	.	.	.	.	.	.	.	
6	.	.	.	.	.	.	.	

HASTA NO 2 (E, 60 y)

VİZİT	KANBKV	İDRARBKV	DECOY	KREATİN	WBC	MONO	LENFO	REJEKS
1	0	0	?	1.8	14300	%3	%4	YOK
2	0	0	0	1.1	7100	%8	%17	
3	0	0	+	1.0	5000	%11	%23	
4	0	0	0	1.4	5300	%9	%21	
5	0	0	+	0.9	6700	%7	%18	
6	0	0	0	0.8	7900	%6	%19	