



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMEL İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI**

**RENAL TRANSPLANT HASTALARINDA
BKV SPESİFİK İMMÜN YANITIN ELISPOT
YÖNTEMİ İLE ÖLÇÜLMESİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Uz. Dr. Esvet MUTLU

Antalya, 2014



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMEL İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI**

RENAL TRANSPLANT HASTALARINDA BKV SPESİFİK İMMÜN YANITIN ELISPOT YÖNTEMİ İLE ÖLÇÜLMESİ

YAN DALUZMANLIK TEZİ

Uz. Dr. Esvet MUTLU

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Meral GÜLTEKİN

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

Antalya, 2014

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2013.04.0103.002 Proje No ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yan dal uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamda bana destek olan; bitmeyen enerjisi, güçlü adalet duygusu ve çalışkanlığıyla kendime örnek aldığım sayın tez hocam Prof.Dr. Meral GÜLTEKİN'e;

Tez çalışmamı yaptığım immünoloji laboratuvarının olanaklarından yararlanmamı sağlayan sayın hocam Prof.Dr. Sadi KÖKSOY'a;

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı hocam sayın Prof.Dr. Tümer VURAL'a ve Anabilim Dalı öğretim üyeleri sayın hocalarım Prof.Dr. Dilek ÇOLAK'a, Prof.Dr. M. Dilara ÖĞÜNÇ'e, Doç.Dr. Gözde ÖNGÜT'e, Doç.Dr. Betil Özhak BAYSAN'a;

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm çalışanları ve arkadaşlarıma;

Laboratuvarda birlikte dayanışma içinde çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Doç.Dr. Emel Şahin'e, Lab.Teknkr. Derya Dertsiz'e ve tüm SBAUM çalışanlarına;

Tez çalışmam süresince bana yardımcı olan ve yakınlık gösteren hastanemiz Prof.Dr. Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Enstitüsünün sayın öğretim üyelerine ve değerli çalışanlarına;

Sadece yan dal eğitimim süresince değil tanıdığım andan itibaren hep yanımda olan ve desteğini esirgemeyen eşim Doç.Dr. Derya MUTLU'ya ve bana en zorlu zamanlarda bile neşeli olmayı hatırlatan biricik kızım Dora MUTLU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	vii
Çizelgeler Dizini	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. BK Virüs	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Sınıflandırma	4
2.1.3. Virionun ve genomun yapısı	5
2.1.4. BKV'nin yaşam siklusu	6
2.1.4.1. Reseptöre bağlanması ve hücre içine alınması	6
2.1.4.2. Kapsidin soyulması ve nükleusa taşınma	7
2.1.4.3. Replikasyon	7
2.1.5. BKV'nin epidemiyolojisi	8
2.1.6. Klinik	9
2.1.6.1. Primer enfeksiyon ve latent dönemi	9
2.1.6.2. Reaktivasyon	10
2.1.6.3. BKVN	11
2.1.6.3.1. Tanı yöntemleri	13
2.1.6.3.1.1. Kültür	13
2.1.6.3.1.2. Serolojik yöntem	13
2.1.6.3.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	13
2.1.6.3.1.4. Radyolojik tanı	14
2.1.6.3.1.5. Sitolojik tanı	14
2.1.6.3.1.6. Biyopsi	15
2.1.6.3.1.7. Elektron mikroskopi	16
2.1.6.3.2. BKV replikasyonu taraması	16

2.1.6.3.3. İmmünolojik izlem	20
2.1.6.3.3.1. Akış sitometri	20
2.1.6.3.3.2. Hücre içi ATP ölçümü (ImmuKnow)	22
2.1.6.3.3.3. ELISPOT	22
2.1.6.3.4. Tedavi	24
2.1.6.3.4.1. İmmünitenin restorasyonu (Düzenlenmesi)	24
2.1.6.3.4.2. Tıbbi tedavi	25
2.1.6.3.4.3. Cerrahi tedavi	26
2.1.6.4. Hemorajik Sistit (HS)	26
2.1.6.5. Üreter stenozu	27
2.1.7. İmmünite	27
2.1.7.1. İntrinsik antiviral immünite	27
2.1.7.2. Doğal immünite	28
2.1.7.3. Edinsel immünite	30
2.1.7.3.1. Humoral immünite	30
2.1.7.3.2. Hücresel immünite	30
3. HASTALAR ve YÖNTEM	33
3.1. Olgular	33
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Malzemeler	35
3.2.2. Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonu ve saklanması	36
3.2.2.1. Dondurma mediumu hazırlanışı	37
3.2.3. Dondurulmuş örneklerin çözündürülmesi	37
3.2.3.1. Çözdürme mediumu	37
3.2.3.2. Çalışma mediumu	38
3.2.4. PKMNH sayımı	38
3.2.5. PKMNH'nin viabilitesinin değerlendirilmesi	38
3.2.6. ELISPOT deneyi	38
3.2.6.1. BKV peptid kokteyli stok solüsyonu hazırlanması	40
3.2.6.2. BKV peptid kokteyli çalışma solüsyonu hazırlanması	40
3.2.7. BKV DNA kantitasyonu	41
3.2.8. İstatistiksel değerlendirme	42

4. BULGULAR	43
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇLAR	72
7. ÖZET	73
8. ABSTRACT	75
9. KAYNAKLAR	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATG	Antitimosit globülin
BKV	BK virüs
BKVN	BKV nefropatisi
CMV	Cytomegalovirus
DH	Decoy hücreleri
dsRNA	Çift zincirli RNA
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme-linked immunosorbent spot
ER	Endoplazmik retikulum
FDA	Food and drug administration
HD5	İnsan α -defensin 5
HD6	İnsan α -defensin 6
HLA	Human leucocyte antigen
HNP 1-4	İnsan nötrofil peptidleri 1-4
HS	Hemorajik sistit
iATP	Hücre içi ATP
IFN	İnterferon
IFN-γ	İnterferon gama
IVIG	İntravenöz immünglobulin
JCV	JC virüs
KİT	Kemik iliği transplantasyonu
LT	Large T
MHC	Major histocompatibility complex
miRNA	Mikro RNA'lar
MMF	Mikofenolat mofetil
MPyV	Murine polyomavirus

MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
NCCR	Non-coding control region
NK	Doğal öldürücü
NOD	Nükleotid oligomerizasyon domain
NPD	Negatif prediktif değer
PAP	Papanicolaou
PVDF	Polyvinyl-difluoride
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PML	Progresif multifokal lökoensefalopati
PML-NBs	Promyelocytic leukemia nuclear bodies
PMT	Photo Multiplier Tubes
PRR	Patern tanıyan reseptörler
PTX3	Pentraksin 3
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RIG-1	Retinoik asit indüklenabilir gen 1
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RTPE	Renal proksimal tubul epitel hücreleri
SFU	Spot forming unit
st	Küçük t
SV40	Simian vacuolating virüs 40
TAK	Takrolimus
TLR	Toll-like reseptörler
Trunc-Tag	Trunke tümör antijeni

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İdrarda BKV'nin elektron mikroskopik görünümü	4
2.2. Kapsid proteinlerinin, histonlarla ve viral DNA ile olan ilişkisi	5
2.3. BKV'nin litik yaşam siklusu	6
2.4. BKV'nin replikasyonu ve eksprese olan proteinler	8
2.5. BKVN'ye ilişkin risk faktörleri	12
2.6. SV-40-LT antijenin dokularda immünohistokimyasal olarak boyanması	16
2.7. BKVN saptanmasına yönelik tarama programı	19
2.8. Hücre içi ve hücre dışı belirteçlerin akış sitometride gösterilmesi	21
2.9. ELISPOT ile sitokinlerin ölçümü	23
2.10. BKV replikasyonu sırasında viral klirens ve BKVN oluşumu	32
3.1. ELISPOT deneyiyle BKV spesifik IFN- γ T hücre yanıtının araştırılması	40
4.1. Hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtlarının aylara göre değişimi	45
4.2. BKV reaktivasyonu görülmeyen hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtları	47
4.3. BKV reaktivasyonu gelişen hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtları	55
4.4. Reaktivasyon gelişen hastanın BKV spesifik immün yanıt düzeyleri	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. BKV'nin sistemlere göre oluşturduğu klinik tablolar	10
3.1. Hastaların klinik özellikleri	34
3.2. BKV kantitasyonu için kullanılan primer ve prob dizileri	42
4.1. Hastaların ve kontrol grubunun BKV spesifik IFN- γ yanıtları	43
4.2. Hastaların tüm aylardaki BKV spesifik immün yanıtları	44

1. GİRİŞ

BK virus (BKV) *Polyomaviridae* ailesi içinde *Orthopolyomavirus* cinsi içinde yer alan ikozahedral kapsidli, zarfsız, 40 nm çapında küçük bir virustur. Yaklaşık 5kb büyüklüğünde olan genom, çift iplikli, çembersel DNA'dan oluşur ve erken, geç ve kodlama yapmayan kontrol bölgesi (non-coding control region; NCCR) olmak üzere üç gen bölgesi içerir. Erken gen bölgesi büyük T (Large T: LT) ve küçük t (small t: st) antijenlerini; geç gen bölgesi ise yapısal kapsid proteinleri olan VP1, VP2 ve VP3 ile yapısal olmayan bir protein olan agnoproteini kodlar (1, 2).

BKV'nin oluşturduğu primer enfeksiyon genellikle asemptomatiktir ve çoğunlukla erken çocukluk döneminde görülür. Toplumda %65-90 arasında değişen bir seroprevalansa sahiptir. (3, 4) Primer enfeksiyonun ardından BKV, çok çeşitli hücre tiplerinde, en sık olarak ürotelyal hücrelerde yaşam boyu latent olarak kalabilmekte ve sağlıklı kişilerde %10-40 oranında geçici reaktivasyonlara neden olabilmektedir (3, 5). İmmün supresyonu olan bireylerde ise reaktivasyon ciddi klinik tablolara yol açabilmektedir. Özellikle böbrek nakil hastalarında BKV enfeksiyonları en önemli viral enfeksiyonlar arasındadır. Bu hastalarda reaktivasyon ile kendi kendini sınırlayan geçici virüriler ve viremler oluşabildiği gibi, immün sistemin üstesinden gelememe durumunda %1-10 oranında BKVN, bunların da %50-90'ında greft kaybı gelişebilmektedir (6). BKV enfeksiyonuna özgül antiviral tedavi bulunmamaktadır. En etkin tedavi yöntemi immün supresyon dozunun azaltılarak, immün yanıtın yeniden yapılanmasını sağlamaktır. İmmün yanıtın düzelmesi ile birlikte BKV enfeksiyonu gerilemektedir. İmmün supresyon dozunun gereğinden fazla azaltılması durumunda ise bu kez rejeksiyon riski ortaya çıkmaktadır. BKVN gelişmesi durumunda hastalar genellikle renal fonksiyonda azalma dışında herhangi bir semptom vermezler. Tanıda gecikme geri dönüşümü olmayan böbrek hasarı ve greft kaybına neden olabileceğinden ve bu dönemde tedaviye yanıt oranı da düşük olduğundan, BKVN gelişimini önleyebilmek için tarama yöntemleriyle erken tanı ve tedavi önemlidir (2, 7).

Böbrek nakli sonrası hastaların BKV açısından izleminde plazma ve idrarda kantitatif olarak BKV yükü saptanmaktadır (7). Plazma veya idrarda BKV DNA'nın saptanması reaktivasyonu gösterir ancak konağın immün yanıtı hakkında bilgi vermez. Bu nedenle BKV reaktivasyonu olan hastalarda BKVN gelişme riskini değerlendirmede

ve antiviral tedaviye yanıtın izleminde; viral yük tayini ile birlikte konağın hücresel immün yanıtının değerlendirilmesi ve izlemi önerilmektedir (8-12).

Bu güncel yaklaşım doğrultusunda; biz de Prof.Dr. Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Enstitüsünde böbrek nakli yapılmış hastalarımızın nakil öncesindeki ve nakilden sonraki 6 aylık dönemde BKV spesifik immün yanıtlarını prospektif olarak izlemeyi, BKV spesifik immün yanıtın eş zamanlı ölçülen BKV DNA yükleri ile ilişkisini incelemeyi amaçladık. Ayrıca BKV spesifik hücresel immün yanıtın, izlem sırasında, BKV reaktivasyonu açısından risk altında olan hastaları saptamadaki yeri ve BKV enfeksiyonunun klinik seyri ile ilgili ön bilgi vermedeki değerini araştırmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BK Virüs

2.1.1. Tarihçe

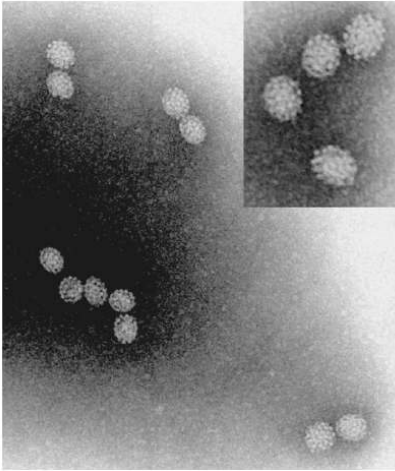
İlk polyomavirus olan fare polyomavirusu [Murine polyomavirus (MPyV)] 1953 yılında farelerde çok sayıda tümör oluşmasına neden olan, bulaşıcı bir etken olarak tanımlanmıştır. 1960 yılında ise polio ve adenovirus aşılarının üretiminde kullanılan Afrika yeşil maymun böbrek hücrelerinden ilk primat polyomavirusu olan Simian vacuolating virus 40 (SV40) izole edilmiştir. O yıllarda yaklaşık 100 milyon kişiye uygulanan ve onkojenik özelliği olduğu düşünülen SV40 ile kontamine olan aşılardan insanlarda kansere neden olabileceğinden korkulmuş ancak sonraki çalışmalarda bu durum kanıtlanmamıştır (13). Sonraları polyomaviruslar kuşlar, kemiriciler, sığırlar dahil pek çok omurgalı türünde saptanmıştır (14).

BKV ve JC virus (JCV) ilk izole edilen insan polyomaviruslarıdır. BKV ilk olarak 1971 yılında İngiltere’de bir virus araştırma laboratuvarında Dr. Sylvia Gardner tarafından böbrek transplant hastalarında cytomegalovirus (CMV) enfeksiyonunun epidemiyolojisi ile ilgili bir çalışma sırasında bulunmuştur. Dr. Gardner, Sudan’lı bir hastanın renal transplantasyondan 3.5 ay sonra alınan idrar örneğinde viral inklüzyonlar içeren çok sayıda hücre saptamıştır. Dr. Anne Field elektron mikroskopi ile viral partiküllerin papillomavirusa benzediğini göstermiş (Şekil 2.1), bunun üzerine hastada genital siğiller olup olmadığı araştırılmış ancak hastada temel sorununun cerrahi tedaviyi gerektirecek boyutta ureter stenoza olduğu anlaşılmıştır. Hasta idrarının maymun böbrek hücre ve insan embriyonik böbrek hücre hattına ekilmesi sonucu viral sitopatik etki gözlenmiş ve bu virusun papillomavirustan farklı, yeni bir virus olduğu anlaşılarak BKV olarak adlandırılmıştır (15). JCV ise aynı yılda progresif multifokal lökoensefalopati (PML) gelişen Hodgkin lenfomalı bir hastanın beyin dokusundan izole edilmiştir (16). Her iki virus da izole edildikleri hastaların isimlerinin baş harfleri ile adlandırılmışlardır (15, 16). BKV ve JCV uzun süre en iyi bilinen 2 insan polyomavirusu olmuştur. 2007’den sonra günümüze dek ise daha az rastlanan 8 yeni polyomavirus daha tanımlanmıştır (13, 14).

BKV’nin bulunmasından sonra pek çok serolojik ve epidemiyolojik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda yetişkinlerin %90’ına yakın bir kısmının seropozitif olduğu,

renal transplant alıcılarının %10-60'ının idrarında BKV'nin saptandığı ancak enfeksiyonun çoğunlukla asemptomatik seyrettiği veya geçici böbrek hasarına yol açtığı bulunmuştur (3). Daha az sayıda çalışma ile konjenital immün yetmezlik ve HIV enfeksiyonu sırasında da bu virusa bağlı sporadik böbrek hasarı bildirilmiştir (17, 18).

Pittsburgh Üniversitesi'nde, 1995 yılında bir hastadan yapılan renal allograft biyopsisinde interstisyel nefrit tanımlanması ve hastanın örneklerinin histolojik ve moleküler incelemeleri sonucunda BKV'nin saptanmasıyla BKV enfeksiyonları açısından yeni bir dönem başlamıştır (19). Bu ilk olgunun ardından dünyadaki pek çok böbrek transplantasyon merkezi tarafından BKV ilişkili interstisyel nefrit rapor edilmiştir (20, 21). İsviçre Basel Üniversitesi'nden patoloğlar 1985-1995 yılları arasında gelen renal allograft biyopsi örneklerinin retrospektif taramasında BKV'yi saptayamamışlardır. Daha sonraki dönemde BKV nefropatisinde artış gözlenmiş ve bu durumun takrolimus, mikofenolat mofetil ve sirolimus gibi immunsupresif ilaçların kullanımının artması ile paralellik gösterdiği düşünülmüş ancak kesin nedeni henüz anlaşılamamıştır (3).



Şekil 2.1. İdrarda BKV'nin elektron mikroskopik görünümü (22).

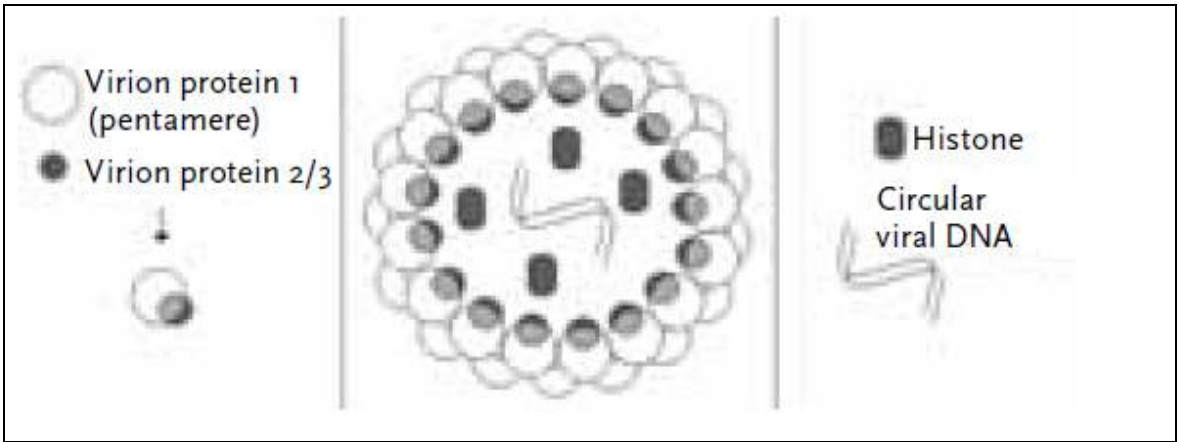
2.1.2. Sınıflandırma

Önceden kendisine çok benzeyen viruslar olan JCV ve SV40 virusları ile birlikte *Papovaviridae* ailesi içinde yer alan BKV, 2000 yılından itibaren *Polyomaviridae* ailesi içinde *Polyomavirus* cinsi içinde sınıflandırılmıştır. 2011 yılında International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) tarafından yapılan yeni sınıflamada *Polyomaviridae* ailesi; *Orthopolyomavirus*, *Wukipolyomavirus* ve *Avipolyomavirus*

olarak üç cinse ayrılmıştır. Bu sınıflamaya göre BKV, JCV ile birlikte insan, primat, kemirici ve diğer memeli polyomaviruslarını içeren *Orthopolyomavirus* cinsi içinde yerini almıştır. Sınıflandırmada aynı cins içinde yer alan virusların genomlarının %81-84 oranında homoloji gösterdiği bildirilmiştir (1).

2.1.3. Virionun ve genomun yapısı

BKV ikozahedral kapsidli, zarfsız, 40 nm çapında küçük bir virustur. BKV'nin viral kapsidi yapısal proteinler olan VP1, VP2 ve VP3'ten oluşur. VP1 pentamerler şeklinde kapsidin dış kısmını oluşturur. VP1 pentamerinin iç kısmındaki bir oluğa ise VP2 veya VP3 yerleşir. Kapsidi oluşturan her üç protein de DNA bağlayan bölgelere sahiptirler, birlikte, merkezde bulunan, konakçı hücreden kazanılan histonların etrafında sarılı olan viral, dairesel DNA'ya yani viral minikromozoma bağlanırlar (Şekil 2.2) (2, 23, 24).

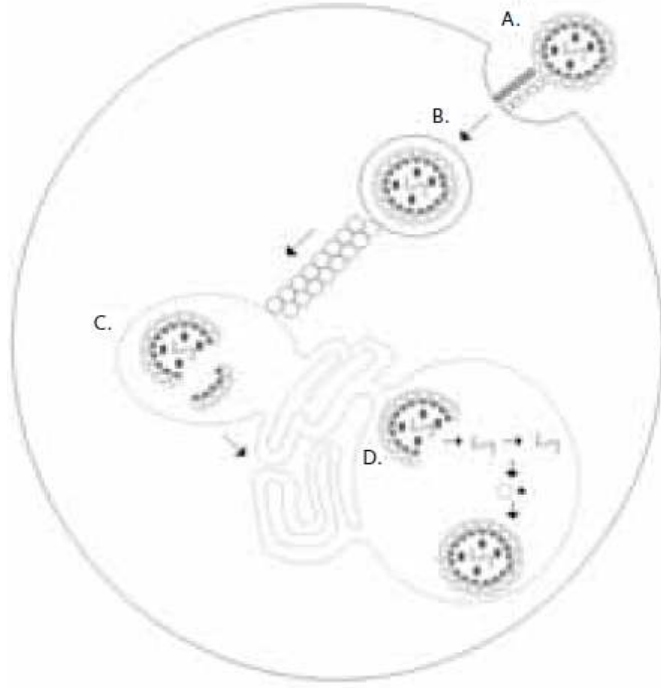


Şekil 2.2. Kapsid proteinlerinin, histonlarla ve viral DNA ile olan ilişkisi (2).

BKV'nin genomu yaklaşık 5kb büyüklüğündedir, çift iplikli, çembersel DNA'dan oluşur ve erken, geç ve kodlama yapmayan kontrol bölgesi (non-coding control region; NCCR) olmak üzere üç gen bölgesi içerir. Erken gen bölgesi büyük T (Large T: LT) ve küçük t (small t: st) antijenlerini; geç gen bölgesi ise yapısal kapsid proteinleri olan VP1, VP2 ve VP3 ile yapısal olmayan bir protein olan agnoproteini kodlar. Erken ve geç bölgeleri ayıran NCCR erken ve geç genlerin replikasyon orijinlerini, erken ve geç genlerin çift taraflı promoter elemanlarını ve konak hücre transkripsiyon faktörlerinin ve LT antijenin bağlanma bölgelerini içerir (2, 22, 25-27).

2.1.4. BKV'nin yaşam siklusu

Persistan veya litik enfeksiyon yoluyla hastalık oluşturabilmek için BKV, çoğalması için uygun bir konak hücresine alınmalıdır. Bunlar vücutta farklı doku veya organlarda bulunan çeşitli hücreler olabilir, ancak replikasyon ve reaktivasyon esas olarak böbrek ve üriner traktusta görülmektedir. BKV'nin litik yaşam siklusu Şekil 2.3'te görülmektedir.



Şekil 2.3. BKV'nin litik yaşam siklusu (2).

2.1.4.1. Reseptöre bağlanması ve hücre içine alınması

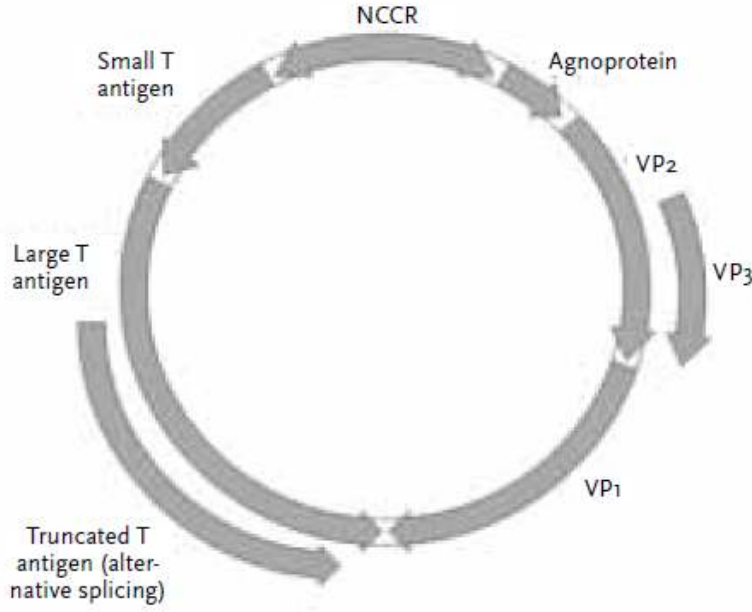
BKV hücre membranı üzerindeki glikoproteinlere N-bağı ile bağlı sialik asite ve/veya gangliozidlere bağlanır (28). Reseptöre bağlanmayı takiben BKV, kaveol aracılı endositozla hücre içine alınır. Kaveol kolesterolden zengin plazma membranında kaveolin proteinlerinden oluşmuş mikrodomanların invajinasyonudur (29). BKV'nin reseptöre bağlanması ve endositoz yoluyla hücre içine alınımı, JCV ve SV40 ile farklılıklar göstermektedir. Ancak, endoplazmik retikulum (ER) ulaşma ve sonrasındaki hücre içi basamakları her üç virus için benzerdir (30, 31).

2.1.4.2. Kapsidin soyulması ve nükleusa taşınma

BKV'nin renal proksimal tubul epitel hücrelerine (RPTE) girişi sonrası erken bir asidifikasyon basamağına ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir. Hücre içine alınan BKV mikrotübüller aracılığı ile endoplazmik retikuluma (ER) taşınır (32). Tüm polyomaviruslar için gerekli olduğu düşünülen ER yoluyla taşınmanın en önemli avantajı kapsidin soyulmasını kolaylaştıran şaperonları, disülfid izomerazları ve redüktazları içermesidir. Ayrıca virionun nükleusa yolculuğuna devam edebilmesi için gerekli etkileşimler ve konformasyonel değişiklikler de ER'de gerçekleşir (33). Dış kapsidin soyulması ile VP2 ve VP3 açığa çıkarlar ve importinler aracılığı ile nükleusa taşınmayı sağlarlar (34). Nükleusta replikasyon başlar.

2.1.4.3. Replikasyon

Polyomavirus dolayısıyla BKV replikasyonu, LT antijenin DNA helikaz fonksiyonu dışında büyük oranda konak hücreye bağlıdır. Replikasyonun ilk basamağı saatin tersi yönünde erken bölgenin transkripsiyonudur, LT antijen, st antijen ve trunke tümör antijeni (Trunc-Tag)'nin ekspresyonuna neden olur. Çok sayıdaki LT antijen molekülleri dodekamerik bir kompleks oluşturarak NCCR bölgesine bağlanır. Burada helikaz gibi davranarak DNA'nın açılmasına ve replikasyonun başlamasına neden olur. Ardından saat yönünde geç bölge genlerinin transkripsiyonu başlar. Aynı zamanda yapısal proteinler olan kapsid proteinleri VP1, VP2 ve VP3'ün translasyonu sitoplazmada olur ve agnoproteinin yardımıyla nükleusa taşınırlar ve virion nükleusta biraraya gelir (2-4, 26, 35). Bu evrede viral partiküller nükleusta elektron mikroskobu ile kristal benzeri yapılar olarak görülürken, ışık mikroskobunda nükleer inklüzyon cisimcikleri olarak tanımlanırlar. Bu evrenin prototipi idrarla atılan “decoy hücreleri” (DH) dir (4, 22, 36). BKV'nin replikasyonu ve eksprese olan proteinler Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. BKV'nin replikasyonu ve eksprese olan proteinler (2).

Nüklesta yeni oluşan virionların birikmesi sonucu hücre membranları parçalanır ve hücre lizisi meydana gelir, virionlar ekstrasellüler boşluğa dökülürler (36).

2.1.5. BKV'nin epidemiyolojisi

BKV'nin kesin geçiş yolu henüz tam olarak bilinmemektedir ancak 5-9 yaş çocukluk döneminde %65-90'a varan seropozitiflik oranı ve tonsiller dokuda viral DNA varlığı, insandan insana respiratuvar veya oral yolla bulaşı düşündürmektedir (3, 4, 22, 25, 37).

BKV, JCV gibi çevresel koşullara oldukça dirençlidir. Her iki virus da insan atıklarıyla kirlenmiş sularda saptanmıştır ve topraklı kirli sular BKV'nin en önemli rezervuarlarından biridir. Bu durum fekal-oral ve ürino-oral bulaşın kuvvetle olası olduğunu düşündürmektedir (22, 25, 26).

Kordon kanı örneklerinde BKV IgM'nin, fetal ve plasental dokularda Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile BKV DNA'nın saptanması transplasental geçişin de olabileceğini düşündürse de henüz bulgular çelişkilidir. Diğer olası bulaş yolları da kan transfüzyonu ve özellikle renal allograft olmak üzere organ transplantasyonudur (2, 22, 25).

BKV enfeksiyonu endemiktir, sık karşılaşılr, her iki cinsi de etkilemektedir, mevsimsel farklılık göstermez ve etkilediği toplumun sosyo-ekonomik düzeyi ile ilişkili değildir (25).

BKV, NCCR bölgesindeki DNA sekansındaki değişikliklere bağlı olarak Archetype virus ve yeniden düzenlenmiş (rearranged form) olmak üzere 2 farklı forma ayrılmaktadır. BKV'nin rearranged formları esas olarak Archetype virusun NCCR bölgesindeki bazı sekans bloklarının delesyona uğraması ve/veya duplike olması ile oluşur. Archetype virus hem BKV hastalığı olan kişilerin hem de geçici reaktivasyon dönemindeki sağlıklı kişilerin idrarlarından yaygın olarak izole edilebilmekteyken, rearranged formu daha çok BKV ilişkili hastalığı olan bireylerin serumlarında bulunmaktadır (4). Bulaşan formun archetype virus olduğu ve in vivo koşullarda değişiklik gösterip rearranged forma dönüşebildiği düşünölmektedir.

NCCR bölgesindeki değişikliklere ek olarak BKV, VP1'in virusun konak hücreye yapışmasında rol alan 61-83. amino asitlerinin olduğu bölgelerdeki sekans farklılıklarına göre genotip I, II, III ve IV olarak dört genotipe ayrılmıştır (38). Genotiplerin coğrafı dağılım gösterdiğine ilişkin kanıtlar bulunmaktadır. En sık rastlanan genotip olan genotip I'in subtiplerinden I/b-2'ye esas olarak Avrupa ve Amerika'da rastlanırken, I/c-2 daha çok Asya'daki topluluklarda görölmüştür (39). Genotip ile klinik tablo arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığı henüz bilinmemektedir. BKV ayrıca dört alt serotipe de ayrılmıştır ancak genotip sistemi daha çok kullanılmaktadır (4).

2.1.6. Klinik

2.1.6.1. Primer enfeksiyon ve latent dönem

BKV'nin oluşturduğu primer enfeksiyon genellikle asemptomatiktir veya hafif solunum yolu hastalığına neden olur. Primer enfeksiyon çoğunlukla erken çocukluk döneminde görölür, 5-9 yaş grubu çocuklarda %65-90 arasında değişen bir seroprevalansa sahiptir (3, 4, 37).

BKV çok çeşitli hücre tiplerinde latent olarak kalabilmekle birlikte en sık ürotelyal hücreleri, ikinci sıklıkta ise periferik kan mononökleer hücreleri tercih etmektedir. Diğer rezervuar hücreler ise servikal skuamöz epitel hücreleri, prostat glandüler epitel hücreleri ve tükrük bezi hücreleridir. BKV'nin tonsiller dokuda saptanması mukoza ilişkili lenfoid dokuda da latent enfeksiyon oluşturduğunu düşündürmektedir (2, 3).

Primer enfeksiyonun ardından belirtilen dokulara göç eden BKV konakta yaşam boyu, immun sistem sağlam olduğu sürece latent olarak kalır, sadece klinik tabloya neden olmayan birkaç geçici virüriye neden olabilir (5).

2.1.6.2. Reaktivasyon

Viral reaktivasyon kişilerde altta yatan bir sebep olmaksızın oluşabilir. Bunun hormonal durumda veya immun sistemin fonksiyonel durumunda değişikliklere bağlı olabileceği düşünülmektedir (3). Reaktivasyonun ve asemptomatik virürinin sağlıklı bireylerde %10-40 oranlarında görüldüğü bildirilmiştir (5, 7, 40).

Yaşlılık, gebelik ve diabetes mellitus'ta görülen hormonal veya immünolojik değişikliklere bağlı da reaktivasyon görülmektedir. Gebelikte %25'e varan oranlarda virüri saptanmıştır (3, 4).

BKV immun suprese bireylerde reaktive olduğunda çeşitli ciddi klinik tablolar oluşturmaktadır. En önemlileri renal transplant hastalarında görülen BKVN ve üreter stenozu ile kemik iliği transplant (KİT) hastalarında görülen geç başlangıçlı hemorajik sistitir (HS). Daha az sıklıkta ise diğer organ transplant hastalarında, sistemik lupus eritematozuslu bireylerde ve AIDS hastalarında reaktivasyona ve hastalığa neden olmaktadır. Ensefalit, retinit, solunum yolu enfeksiyonları ve vaskülopati nadir oluşan tablolardır (2, 4, 25). BKV'nin oluşturduğu klinik tablolar Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. BKV'nin sistemlere göre oluşturduğu klinik tablolar (25).

Hedef Organ	Enfeksiyon şekli	Hastalık
Solunum sistemi	Primer enfeksiyon İmmün depresyon	Üst solunum yolu enfeksiyonu Pnömoni
Mesane	Primer enfeksiyon	Hemorajik sistit
	İmmün depresyon (KİT)	Hemorajik sistit
Böbrek	İmmün depresyon (Renal transplantasyonu)	İntertisyel böbrek hastalığı Üreter stenozu Graft kaybı
Santral sinir sistemi	İmmün depresyon (AIDS)	Menenjit Ensefalit
Göz	İmmün depresyon	Retinit
Sindirim sistemi	İmmün depresyon	Kolit
Endotel	İmmün depresyon	Vaskülit

2.1.6.3. BKVN

Renal transplantasyondan sonra BKV reaktivasyonu oluştuğunda ilk olarak virüri gözlenir. Yüksek düzey virüri (BKV yükü $> 7 \log_{10}$ genom ekivalan (geq) / ml) renal transplant hastalarının yaklaşık üçte birinde viremiye ve BKVN'ye dönüşür (7). Viremi virürinin ardından yaklaşık bir ay sonra gelişir ve viremi öncesinde her zaman virüri vardır. Virüri ve viremi birlikteliği genellikle erişkinde de, çocukta da BKVN'ye öncülük etmektedir (2, 8, 41).

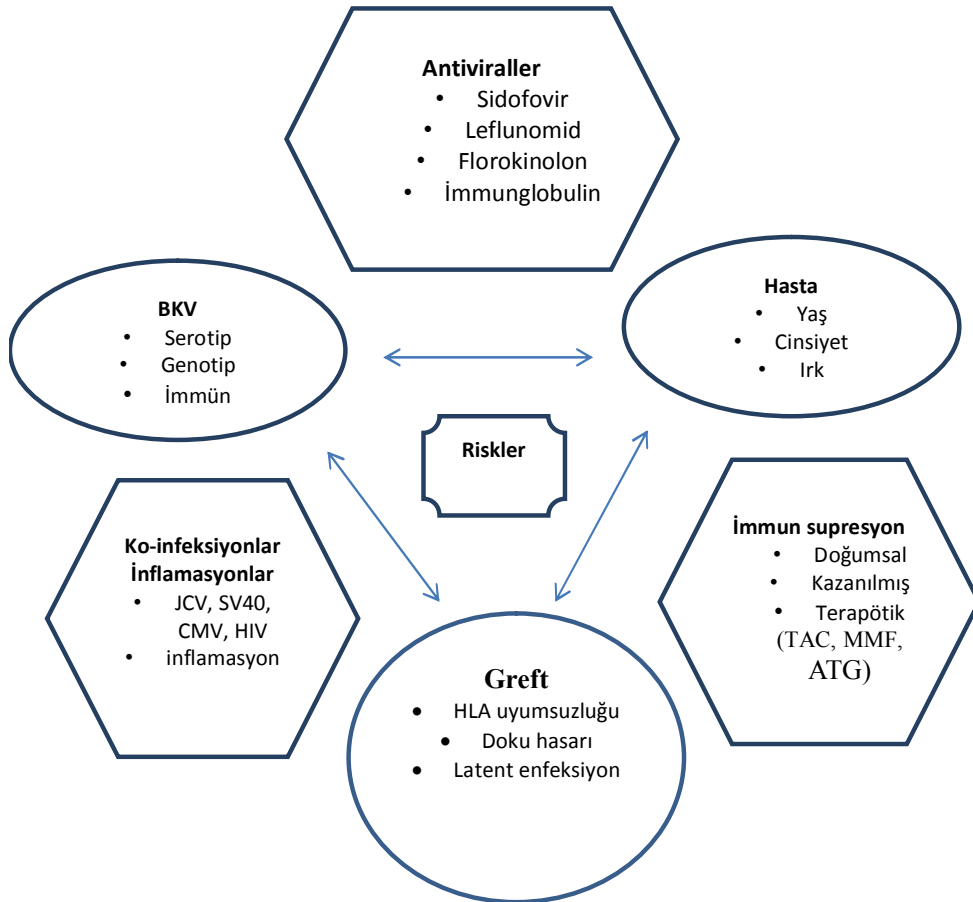
BKVN'nin oluşumundan pek çok risk faktörü sorumlu tutulmuştur. Transplantasyon öncesi risk faktörleri hastaya ve greft özelliklerine ait olmak üzere iki grupta incelenir. Hastaya ait risk faktörleri; ileri yaş, beyaz ırk, erkek cinsiyet, transplantasyon öncesinde BKV seronegatifliği veya BKV spesifik antikor düzeyinde düşüklük, diyabet ve daha önceden BKVN'ye bağlı greft kaybı olarak sayılabilir (4, 22). Risk oluşturduğu düşünölen greft özellikleri ise donörün seropozitif olması veya antikor titresinin yüksek olması, HLA uyumsuzluk düzeyi, HLA C7 eksikliği, soğuk iskemi süresinin uzunluğu, intrarenal inflamasyon ve greftin kadavradan olmasıdır (2, 7, 22, 42).

Transplantasyon sonrasında uygulanan immün supresyon BKVN oluşumunda temel risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Transplantasyon hastalarında immün supresyonu sağlamak amacıyla kullanılan immün supresif ilaçların BKV enfeksiyonu oluşumundaki etkileri halen araştırılmaya devam etmektedir. Henüz herhangi bir etkenin BKVN oluşumunda rolü kanıtlanamamıştır. Yapılan bir meta-analizde kalsinörin inhibitörü takrolimus (TAK) ile ionozin monofosfat dehidrogenaz inhibitörü mikofenolat mofetili (MMF) kombine kullanan hastaların BKV enfeksiyonu açısından daha çok risk taşıdıkları belirtilmiştir (41). Ancak bu konuda yapılan çalışmaların verileri çelişkilidir. Bir başka çalışmada da bu ilaçları almayan hastalarda da BKVN geliştiği ve her iki ilacın da BKVN oluşumu için gerekli olmadığı belirtilmiştir (26). Aynı şekilde rejeksiyon tedavisinde kullanılan Tavşan antitimosit globülini (ATG) ile kortikosteroidlerin de BKV enfeksiyon riskini arttırdığı düşünölmüş ancak kanıtlanamamıştır (41). Sonuç olarak BKVN oluşumunda spesifik bir immün supresif ajandan çok, oluşan immün supresyonun düzeyinin etkili olduğu düşünölmektedir.

Transplantasyon sonrasında viral faktörler de reaktivasyondan sorumlu tutulmaktadır. Serotip, genomun mutasyonu veya yeniden düzenlenmeleri (rearrangement), virusun immün sistemden kaçış mekanizması gibi özellikler viral

faktörler içinde sayılabilir. Birkaç çalışmada NCCR bölgesinde ya da VP kapsidinde oluşan mutasyonların BKV'nin virülansını arttırabileceği bildirilmiştir (43, 44).

Tüm bunlara ek olarak üreterik stent varlığı, akut rejeksiyonlar, ko-infeksiyonlar, tedavide kullanılan inflamatuvar mediatörler, antiviraller, ve son yıllarda önemi giderek artan bir faktör olan hastanın transplantasyondan önceki BKV spesifik immün yanıtının düşük düzeyde olması ya da hiç olmaması da BKV enfeksiyonu açısından risk faktörleri arasında değerlendirilmektedir (7). CMV replikasyonunun direk veya indirek olarak BKV replikasyonunu arttırdığı öne sürülmüşse de CMV profilaksisi almayan CMV ve BKV seropozitif olan hasta grubunda yapılan bir çalışmada herhangi bir korelasyon izlenmemiştir (26, 45). Tübüler epitel hücrelerinde iskemi sonucu, ilaca bağlı, immünolojik veya mekanik hasar sonrasında oluşan hücre yenilenmesinin BKVN'ye zemin hazırladığı düşünülmektedir. Hatta sürekli prolifer olma özelliğine sahip olan üretelyal hücrelerin doku hasarı olmadan bile BKV replikasyonu için fertil bir mikroçevre sağladığı öne sürülmektedir (3, 22, 26). BKVN'ye ilişkin risk faktörlerinden bazıları Şekil 2.5'te özetlenmiştir.



Şekil 2.5. BKVN'ye ilişkin risk faktörleri (22).

Renal transplant hastalarında BKVN, çoğunluğu transplantasyondan sonraki ilk bir yıl içinde olmak üzere %1-10 oranında görülür. Hastalık spektrumu virüri ile başlar, geri dönüşü olmayan böbrek hasarı ve organ kaybı ile sonlanır. Hastalar genellikle renal fonksiyonda azalma dışında herhangi bir semptom vermezler (2, 6, 41). Bu nedenle böbrek hasarının önlenmesi için tarama yöntemleriyle erken tanı ve tedavi önemlidir.

BKVN ayrıca daha nadir olarak KİT hastalarında, akciğer-kalp transplant hastalarında ve HIV ile enfekte hastalarda da görülür (46-48).

2.1.6.3.1. Tanı yöntemleri

2.1.6.3.1.1. Kültür

BKV konvansiyonel hücre kültür ortamlarında çok yavaş üremektedir. Virüsün fare böbrek hücrelerinde ilk sitopatik etkisi inokülasyondan 18 gün sonra gözlenmiştir. Vero hücre kültürlerinde sitopatik etkinin gözlenmesi ise 1-3 ayı bulmaktadır. BKV için en uygun hücre ortamı olan insan embriyonik böbrek hücrelerinde bile sitopatik etki en erken 5 günde oluşmaktadır (49). Kültür spesifik bir yöntem olmasına rağmen tanı süresinin çok uzun olmasından ve pahalı olmasından dolayı nadir kullanılmaktadır (25).

2.1.6.3.1.2. Serolojik yöntem

Polyomavirus serolojisinde hemagglütinasyon inhibisyon, immunfloresan antikor ve Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemler sensitif ve spesifiktirler ancak hem IgG hem de IgM'nin analizi zordur. Virusun latent dönemde olması ya da diğer polyomaviruslarla çapraz-reaksiyon oluşturması IgG'nin, reaktivasyonlar ise IgM'in değerlendirilmesini zorlaştırır (25). Ayrıca immün suprese veya HIV ile enfekte hastalarda BKV spesifik antikorların düşük düzeyde olması ya da yaşla birlikte azalması da sonuçların yorumlanmasında güçlük yaratabilir (50).

2.1.6.3.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İdrarda, kanda ve serebrospinal sıvıda BKV DNA'yı saptamaya yarayan bu yöntem yüksek duyarlık (%100), özgüllük (%88) ve negatif prediktif değere (NPD) (%100) sahip olduğundan ve hızlı sonuç verdiği için en sık kullanılan yöntemdir. Plazmada ve idrarda PZR ile BKV DNA araştırılması renal transplantasyon sonrası BKV replikasyonun izleminde en yaygın ve güvenle kullanılan testlerdir (7, 51).

PZR ile idrarda VP1 messenger RNA da saptanabilmektedir. Bir çalışmada 428

hastanın transplantasyondan sonra bir yıl boyunca takipleri VP1 RNA ile yapılmış, serum BKV DNA testi ile karşılaştırıldığında bu testin sensitivitesi %50, spesifisitesi %85 bulunmuştur. Bu yöntem idrar DNA monitörizasyonuna göre çok daha düşük yanlış pozitif sonuçlara neden olsa da serum viral DNA testinin yerini alacak performansı gösterememiştir (52).

2.1.6.3.1.4. Radyolojik tanı

Radyolojik tanı yöntemlerinden biri olan Manyetik rezonans görüntüleme BKV ensefalitinin tanısında kullanılır. Hastalık nadir görüldüğünden bu konuda çok az veri bulunmaktadır (53).

2.1.6.3.1.5. Sitolojik tanı

BKVN'nin histolojik olarak karakteristik özelliği epitelde inklüzyon cisimleri ve epitelyal nekrozdur (sitopatik etki). En çok etkilenen hücre grubu renal tübüler epitel hücreleridir. Daha az olarak da Bowman boşluğundaki parietal hücreler etkilenir. Etkilenen hücrelerin hacimleri artar, nekrotik hale gelirler ve tübüler lümene dökülürler. Bu aşamada ürotelyal hücrelerde polyomavirusu saptamak için idrarın sitopatolojik incelemesi yapılır ve DH'lerin varlığı araştırılır. DH'ler nükleer bazofilik inklüzyonlar içeren büyük nükleus ve nükleoluslu, kromatin yapısı değişmiş enfekte renal tübüler hücrelerdir (26). İdrar sitoloji yaymalarının Papanicolaou (PAP) boyası ile boyanması sonrası görülürler (20, 54, 55).

BKVN'li tüm hastalarda idrarla DH'ler atılır ve PAP ile boyanmış yaymalarda görülür. DH saptanması viral reaktivasyonu gösterse de BKVN tanısı koydurmaz (35). DH'ler gebelik, tümör, diyabet varlığı gibi immün sistemin zayıfladığı durumlarda da görülebilir. Ayırıcı tanıda ise hücrelerin büyük, pleomorfik nükleuslu görünümünün ürotelyal tümörler ile, nükleer inklüzyon cisimlerinin ise CMV ile karışabileceği akılda tutulmalıdır (56).

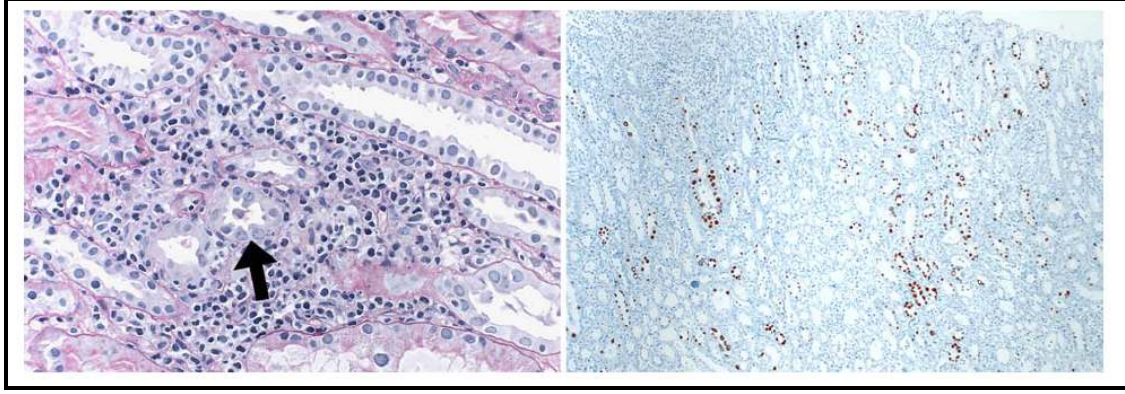
PAP ile boyalı preparat incelemesi duyarlı bir yöntem olmasına rağmen pozitif prediktif değeri düşüktür, çünkü DH'lerin bazıları enfekte renal tübüler epitelden kaynaklanmayıp idrar yolu epiteline ait ürotelyal hücreler olabilir (45). Laboratuvarlar arası yöntem farklılıklarından dolayı, genel kurallar ve sınır değerler belirlenememektedir (35). Bu yöntem polyomavirusların türünü belirlemede de yarar sağlamaz (26).

2.1.6.3.1.6. Biyopsi

Biyopsi ile BKV'nin sitopatik etkisinin gösterilmesi BKVN'de altın standart tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Yüksek özgülüğe sahiptir ve akut hücresel rejeksiyon, ilaç toksisitesi, veya altta yatan hastalığın nüksü gibi durumları da tanıyabilme olanağı sağlar. BKVN'de böbrek lezyonları rastgele ve multifokal olduğundan özellikle hastalığın erken döneminde biyopside yanlış negatif sonuçlar alınabilir (2, 54). Bu nedenle Hirsch ve ark. (7), biyopsi için medüller dokuyu içeren en az iki örneğin alınmasını önermektedirler.

BKV enfeksiyonunda lezyonlar korteks veya medullada rastgele dağılım gösterir. İlk başta sağlıklı parankim içinde viral inklüzyonlar içeren birkaç hücre olarak gözlenirken, hastalık ilerledikçe enfekte hücre sayısı artar ve tübülo-interstisyel inflamatuvar infiltrasyon (tubulit) oluşur. Ayırıcı tanıda en çok akut hücresel rejeksiyon ile karışır, bazen bu tablo ile birlikteliği de görülebilir. BKVN'de görülen inflamatuvar infiltrasyon akut rejeksiyonda saptanandan gösterdiği polimorfizm ile ayrılır: polimorfonükleer hücreler, plazmositoid hücreler ve monositleri içerir. Her iki tabloyu ayırmak için immün işaretleme de kullanılabilir. BKV enfeksiyonu sırasında CD20+ B lenfositler, akut rejeksiyonda ise T lenfositler baskındır. Ayırıcı tanıda kullanılan diğer faktörler ise endarterit, HLA-DR ekspresyonu ve kompleman C4d birikimidir. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde atrofi, tübülo-interstisyel fibrosis ve skarlaşma görülür. Bu evrede görülen yüksek düzey viremi bazal membranların rüptürü sonrası virionların dolaşıma geçmesi ile açıklanabilir. Bu histopatolojik bulgular ışığında BKVN normal renal parankimde az oranda viral sitopatik değişikliklerin olduğu, tübüler atrofi, interstisyel fibrosis ve inflamasyonun olmadığı veya minimal düzeyde olduğu evre A'dan yoğun tübüler atrofi, interstisyel fibrosis ve inflamasyonla birlikte skarlı renal dokunun görüldüğü evre C'ye uzanan bir aralıkta evrelendirilmiştir (35, 36, 54, 57, 58).

İmmünohistokimyasal boyama BKV'nin oluşturduğu sitopatik etkinin diğer viruslarla (adenovirus, herpes virus) oluşan etkiden ayırt edilebilmesi için dokuların boyanmasında kullanılır. Bu amaçla en yaygın kullanılan doğrulama yöntemi BKV ve JCV-LT antijen ile çapraz reaksiyon vererek tüm poliomavirus enfeksiyonlarını saptayabilen SV-40-LT antijeninin dokularda immünohistokimyasal olarak boyanmasıdır (Şekil 2.6) (35, 37, 54). Bu boyama yöntemi Sitolojik yaymalarda da problemsiz olarak kullanılabilir. LT antijeni pozitif tek bir hücreyi bile saptamak polyomavirus nefropatisi tanısını koymada yeterlidir.



Şekil 2.6. SV-40-LT antijenin dokularda immünohistokimyasal olarak boyanması (59).

2.1.6.3.1.7. Elektron mikroskopi

BKVN tanısında idrarda viral agregatların elektron mikroskopik olarak saptanması %90'ın üzerinde negatif prediktif değere sahiptir (60). BKV ile enfekte hücreler elektron mikroskopunda ortalama 40 nm çapında, zarfsız virionların intranükleer agregatlar oluşturması şeklinde görülürler. Binlerce virionu içeren intranükleer inklüzyonlar kristal agregatlar oluşturacak şekilde toplanırlar. Elektron mikroskopik inceleme virus ailelerine yönelik (özellikle adenovirus ve polyomavirus) yüksek spesifisiteye sahiptir ancak sitopatik etkinin aynı aile içinde hangi virus türü ile oluştuğu ayırt edilemez (örn: JCV veya BKV gibi). İmmünohistokimyasal testlere ve gerçek zamanlı PZR yöntemine göre daha düşük sensitiviteye sahiptir ve daha pahalı bir yöntemdir. Bu nedenle geniş çaplı bir kullanım alanına sahip değildir (36, 61).

2.1.6.3.2. BKV replikasyonu taraması

BKVN'nin böbrek hasarı geliştikten sonra oluşan kreatinin yüksekliğinden başka bir bulgu vermemesinden, tanıda gecikmenin geri dönüşü olmayan böbrek hasarı ve hatta greft kaybına neden olmasından ve bu dönemde tedaviye yanıtın düşük olmasından dolayı BKV enfeksiyonunda erken tanı önemlidir. Bu nedenle günümüzde uygulanan ve önerilen renal transplant hastalarının BKV replikasyonu açısından taranmasıdır. Taramanın transplantasyondan sonraki ilk 2 yılda 3 ayda bir, daha sonra 5. yıla dek yıllık olarak yapılması önerilmektedir. Bu şekilde BKVN açısından risk altındaki hastaların en az %80-90'ının renal allograft hasarı gelişmeden saptanabildiği bildirilmiştir. Almeras ve arkadaşlarının (62) yaptıkları bir çalışmada ise BKV viremi tanısı için median zamanın 90 gün olduğu ve çalışmadaki hastaların %77'sinin tanısının transplantasyondan sonraki dördüncü aydan sonra konduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada daha sık yapılan taramanın

daha erken tanı ve daha iyi prognoz olanağı sağladığı bildirilmiş ve 3 ayda bir yapılan taramanın erken BKV viremisini kaçırmaya ve hastaların BKNV açısından daha yüksek risk altında kalmalarına neden olabileceği ve ilk 6 ayda aylık taramaların uygun olacağı öne sürülmüştür. Bu nedenle görülme sıklığı yüksek merkezlerde daha sık tarama programları benimsenmelidir.

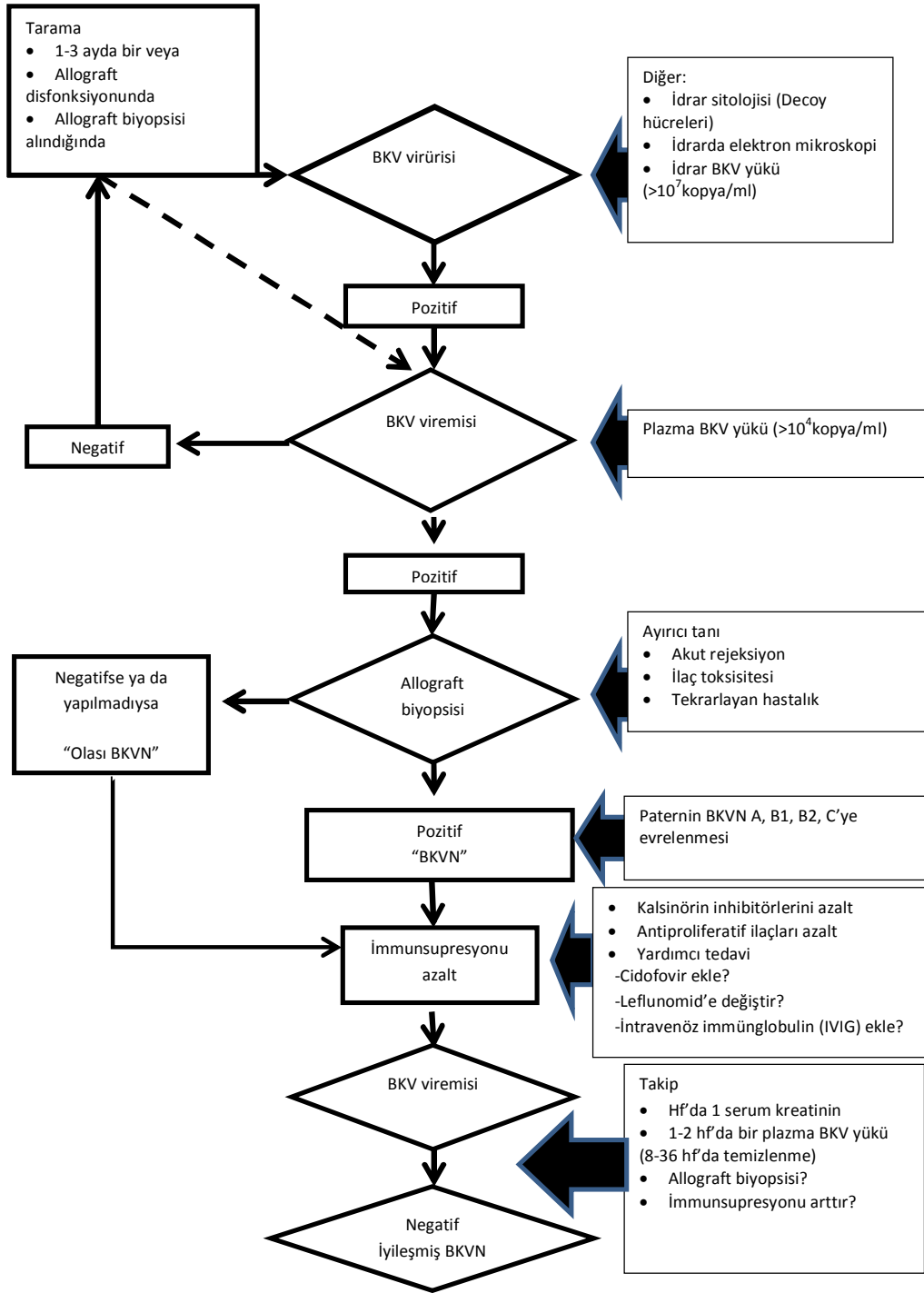
BKV replikasyonunun taraması idrarda DH'lerin araştırılması, yüksek düzey virüri veya plazmanın viremi açısından incelenmesi ile yapılmaktadır (7).

Taramada PZR ile idrarda yüksek düzey BKV araştırılmasının önemli avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Virüriden sonra viremi ve nefropati gelişimi için 6-12 hafta gibi bir sürecin olması, yöntemin noninvaziv olması ve BKNV'yi ekarte edebilmek açısından önemli olan yüksek negatif prediktif değere sahip olması önemli avantajlarından. Diğer yandan BKNV açısından düşük pozitif prediktif değere sahip olması da bir dezavantajdır. İdrardaki BKV düzeylerinin sürekli değişiklikler göstermesi nedeniyle artışın anlamlı olarak değerlendirilebilmesi için $2 \log_{10}$ 'un üzerinde olması gerekmektedir, immün supresyondaki azalmaya yanıt olarak düşüş ise plazma BKV düzeyleri ile karşılaştırıldığında yavaş olmaktadır. Bu da immün supresyonun gereğinden fazla azaltılması ve dolayısıyla rejeksiyon riskini arttırmaktadır. Yüksek düzey virüsünün 2 aydan uzun sürmesi durumunda BKNV için pozitif prediktif değer arttığı ancak bu durumun da geç tanı ve geri dönüşü olmayan organ hasarı riski oluşturduğu belirtilmektedir (7, 45, 58, 63).

Viremi ile BKNV oluşması arasında geçen süre (2-6 hafta) kısadır. Bu nedenle bazı merkezler viremi açısından taramayı aylık olarak yapmaktadır. BKNV tanısında viremi testi %30-50 oranında pozitif prediktif değere sahiptir. Bu değer plazma BKV düzeyleri çok yüksek olduğunda (örn: $6 \log_{10}$ k/ml), renal allograft fonksiyonunun bozulduğu durumlarda veya BKV NCCR bölgesinde yeniden düzenlenmeler (rearrangements) görüldüğünde %90'ın üzerine çıkmaktadır. Plazmada saptanan BKV yükünün çoğunluğu allografttaki replikasyondan kaynaklanmaktadır, BKNV'li hastalarda allograftın cerrahi olarak çıkarılması sonrası BKV plazma düzeyleri hızlı bir şekilde düşme göstermiştir (6). Yüksek düzey viral yük olmasının ve vireminin devam etmesinin BKNV'nin oluşumunu önceden saptamada virüriden daha iyi belirleyici olduğu düşünülmektedir (26, 51, 63-65). Viremisi devam eden ve plazma BKV düzeyi $>4 \log_{10}$ k/ml olan hastalarda, biyopside BKV replikasyonu gösterilememesi ve henüz serum kreatinin düzeylerinde yükselme olmaması durumunda bile olası BKNV düşünülmelidir.

Günümüzde taramada ve tedavinin yönlendirilmesinde en sık kullanılan iki yöntem idrarda ve plazmada BKV DNA düzeyinin izlemidir. Özellikle BKV viremi düzeylerinin takip edilerek immün supresyonun düzenlenmesinin BKVN oluşumunu güvenli bir şekilde engelleyebildiği öne sürülmüştür (66). PZR yönteminin en önemli dezavantajı henüz standardize olmamasıdır. Prosedürlerin laboratuvarlar arası fark göstermesinden dolayı cutoff ve referans değerleri değişiklik göstermektedir. Bu değişikliklere örnek türü veya saklanma şekli, primerlerde, problarda, protokollerde ve nükleik asit ekstraksiyon yöntemlerinde farklılıklar gibi pek çok faktörler neden olabilir. BKVN gelişimi açısından plazma viremi düzeyinin ne olması gerektiği konusu tartışmalıdır. Bir çalışmada 10^4 k/ml eşik olarak alındığında, duyarlılığın %94.9, özgüllüğün %100 olduğunu bulmuşlardır. Bu nedenle uluslar arası, referans bir standart değer kabul edilinceye dek farklı testlerin ve laboratuvarların sonuçları eşit kabul edilmemelidir. BKVN'nin tanısında ve izleminde standardize ve onaylanmış kantitatif PZR yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (42, 51, 62).

2013 yılında Hirsch ve ark. (7) tarafından önerilen tarama programı şu şekildedir (şekil 2.7): Hasta idrar BKV düzeyleri ile takip edilmelidir. Bu amaçla 1-3 ayda bir veya allograft disfonksiyonu varsa ya da hastaya başka bir amaçla biyopsi yapılmışsa virüri açısından değerlendirilir. Virüri pozitif olduğunda plazma BKV düzeyine bakılır. Eğer viremi yoksa tarama protokolüne idrar viral yük tayini ile devam edilir. Plazma BKV yükünün $> 10^4$ k/ml olması durumunda ise renal allograft biyopsisi yapılır. Biyopsi aynı zamanda akut rejeksiyon, ilaç toksisitesi ve tekrarlayan, altta yatan hastalığın ayırıcı tanısında ve BKVN'nin evrelendirilmesinde de yardımcıdır. Biyopsi sonucu BKVN açısından pozitifse “kesin BKVN” tanısı konur ve immün supresyon azaltılır. Bu amaçla kalsinörin inhibitörleri veya antiproliferatif ilaçlar azaltılabilir, sidofovir, IVIG gibi yardımcı tedaviler eklenebilir. Biyopsi sonucu negatifse plazma BKV yükü $> 10^4$ k/ml olduğu için “olası BKVN” şeklinde tanı konarak yine immün supresyonun azaltılması önerilmektedir. Daha sonra 1-2 haftada bir kanda BKV düzeyleri kontrol edilir, beraberinde haftalık kreatinin düzeyleri de takip edilebilir. Virusun kandan temizlenme süresi 8-36 haftadır. Ayrıca bu takip sırasında allograft biyopsileri tekrarlanabilir veya rejeksiyon riskini azaltmak için immünsupresifler tekrar arttırılabilir. Plazmada BKV negatif saptandığında “iyileşmiş BKVN” olarak tanımlanır ve idrarda tarama protokolüne devam edilir.



Şekil 2.7. BKVN saptanmasına yönelik tarama programı (7).

2.1.6.3.3. İmmünolojik izlem

BKVN, BKV replikasyonu ile virus spesifik immün yanıt arasındaki dengenin bozulması sonucu gelişir. Bu nedenle BKV enfeksiyonunun kontrolünde en önemli rolü hücrel immünite üstlenmektedir. Çeşitli çalışmalarda BKV spesifik zayıf T hücre yanıtının tekrarlayan viremlerle ilişkili olduğu, bu hastalarda BKVN riskinin daha yüksek olduğu ve hücrel immüitenin yeniden yapılanması durumunda viral replikasyonun baskılandığı gösterilmiştir. Son yıllarda viral yük tayini ile yapılan taramaların yanısıra spesifik immün yanıtın da ölçülmesinin hastalığın gelişimi açısından risk tahmininde ve antiviral tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde oldukça yararlı olduğu görülmüştür (9, 10, 67, 68). Bu amaçla T hücre temelli testler kullanıma girmiştir. Bunlar akış sitometri, hücre içi ATP ölçümü (ImmuKnow) ve enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) testleridir (2, 9, 11, 67-70).

2.1.3.3.3.1. Akış sitometri

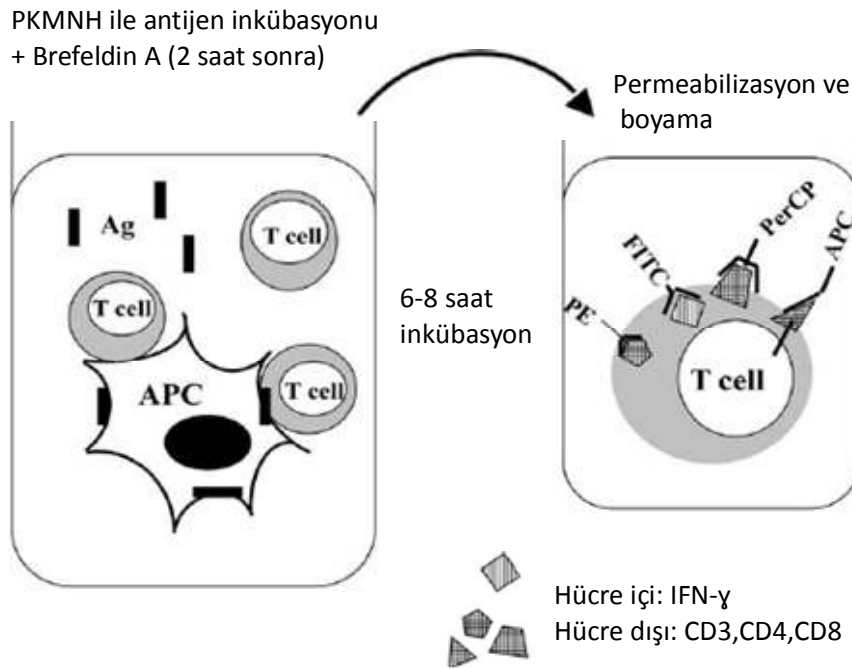
Akış sitometrisi hücrelerin akışkan bir sıvı içerisinde özelliklerinin ölçülmesi esasına göre çalışmaktadır. Bu yöntem ile incelenebilen özellikleri hücrelerin yüzey belirteçleri, intrasellüler faktörleri, DNA içerikleri ve sitokinler gibi salgıladıkları moleküller olarak sıralayabiliriz (71).

Akış sitometri; hidrolik sistem, optik sistem ve elektronik sistem olmak üzere üç ana sistemden oluşur. Akış sitometride prensip olarak akışkan sıvı içerisindeki hücreler tek tek lazer ışınının önünden geçirilir (Hidrolik sistem). Hücreleri işaretlemeye kullanılan florokromlar, lazer ışığı ile aktiflenir ve bu enerjiyle ışın yayar. Yayılan ışık optik filtreler ve aynalarla dalga boylarına göre ayrıştırılır (Optik sistem) ve Photo Multiplier Tubes (PMT) adı verilen dedektörler ile elektrik sinyaline çevrilerek amplifiye edilir ve analiz için sonuçlar bilgisayara aktarılır. Elde edilen sinyallerle hücrenin büyüklüğü, iç yapısı, yüzey morfolojisi ve canlılığı hakkında bilgi edinilir (12, 72, 73).

Akış sitometri ile BKV spesifik T hücreleri tanımlanabilir ya da fonksiyonları belirlenebilir (8, 11, 69, 74, 75). Bu amaçla tetramer boyama yöntemi ve hücre içi sitokin boyama yöntemi kullanılmaktadır. Tetramer boyama yöntemi ile Peptid - Major histocompatibility complex (MHC) 1 tetramer kompleksine direk bağlanan BKV spesifik CD8⁺ T lenfositlerinin sayısı belirlenmektedir. Bu yöntem tek bir MHC-peptid kompleksine spesifik tüm T hücrelerini saptarken, hücrelerin fonksiyonu hakkında bilgi vermemektedir. Bu yöntemde her bir peptidi sunmak için farklı bir tetramer

gerekmektedir ve toplumda farklı HLA allelleri görüldüğünden HLA'ya özgü tetramerler kullanılmaktadır. Bu nedenle tetramer boyama yöntemi ile spesifik bir antijene karşı tüm immün yanıt elde edilemeyebilir. İmmün yanıtın dominant bir komponenti test ediliyorsa, kısmen tüm immün yanıt hakkında fikir verebilir (75).

Daha sık kullanılan hücre içi sitokin boyama yöntemi ile lenfositler fonksiyonel olarak değerlendirilebilmektedir. Bu yöntemde T hücreler 6-8 saat antijen ile inkübe edilmektedir. Uyarım sonucu T hücreler tarafından üretilen İnterferon gamma'nın (IFN- γ) hücre dışına çıkmasının engellenmesi ve hücre içinde birikmesi için inkübasyonun 1-2. saatinde brefeldin A eklenmektedir. Permeabilizasyon uygulanan hücrelerin içine floresan işaretli anti-IFN- γ antikorları girer ve IFN- γ 'ya bağlanırlar. Ayrıca IFN- γ 'nın beraberinde farklı florokrom boyalar kullanılarak farklı hücre içi ve hücre dışı belirteçler de boyanabilir ve akış sitometride incelenirler (Şekil 2.8) (73).



Şekil 2.8. Hücre içi ve dışı belirteçlerin akış sitometride gösterilmesi (73).

Akış sitometri ile yapılan değerlendirmenin en büyük avantajı aynı anda birden fazla parametrenin analizinin ve CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre ayrımının yapılabilmesidir (73). Deney uygulama şekline bağlı olarak aynı gün içinde sonuçlanabilir. Deneyin dezavantajı akış sitometri cihazının idamesi ve deneyde kullanılan malzemelerin pahalı olmasıdır.

2.1.6.3.3.2. Hücre içi ATP ölçümü (ImmuKnow)

ImmuKnow yöntemi (Cylex), 2002 yılında, US Food and Drug Administration (FDA) tarafından immün suprese bireylerde hücresel immün yanıt ölçümünde kullanılmak üzere onaylanmıştır. Bu yöntemde nonspesifik bir uyaran ile inkübasyon sonrasında CD4+ T hücreleri monoklonal CD4+ antikorları ile kaplı paramanyetik partiküller kullanılarak ayrıştırılır ve lize edilir. Parçalanmış hücrelerden açığa çıkan ATP miktarı luminometrik olarak ölçülür.

Gralla ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada 414 renal transplant hastasının transplantasyon öncesi ile transplantasyon sonrası 1, 6 ve 12. aylarında elde edilen hücre içi ATP (iATP) miktarları ile BKV enfeksiyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu hastalarda transplantasyon sonrası 1. aydan 6. aya dek iATP değerlerinde düşüş saptanmasına rağmen, düşüşün aşırı immün supresyon ile ilişkilendirilemediği ve bu dönemde iATP ölçümlerini değerlendirmenin zor olduğu belirtilmiş ve BKV enfeksiyonunun 12. aydaki düşük iATP değerleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak 6. aydan itibaren iATP ölçümlerinde düşme görülen hastaların immün supresyonun düzenlenmesi veya daha yoğun BKV taramasından yarar görebileceği düşünülmüştür (70).

2.1.6.3.3.3. ELISPOT

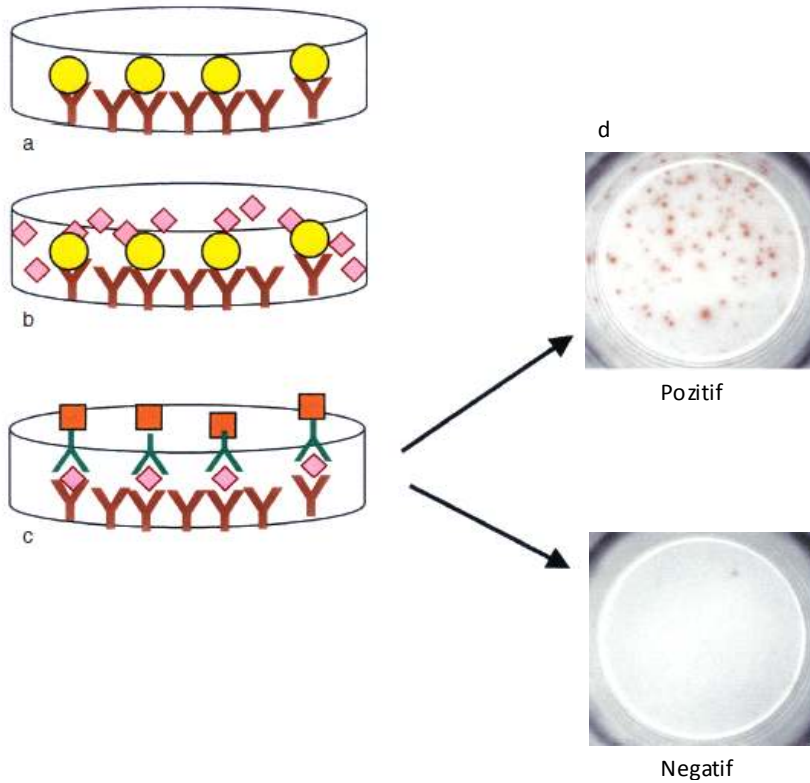
ELISPOT tekniği ilk olarak 1983 yılında Cecil Czerkinsky tarafından antijen spesifik antikor salgılayan B hücrelerin ölçümünde kullanılmıştır (76). Daha sonra 1988 yılında yine aynı araştırmacı tarafından bu kez sitokin salgılayan T hücreleri ölçülmüştür (75). Bununla birlikte ELISPOT yöntemi immünoloji alanında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Transplantasyonda immünolojik izlem ve enfeksiyöz risk tahmininde, viral enfeksiyonun ve tedavinin izleminde, aşı geliştirme çalışmalarının bir parçası olarak, kanser ve tümör antijenlerini saptamada, otoimmün hastalıklarda ve allerjide geniş kullanım alanı bulmuştur (72, 73, 76).

BKV ELISPOT deneyinde PKMNH kullanılır. Bu amaçla heparinli tüplere 5-10 ml kan alınır. Hücre izolasyonu yapılmaya dek örnek oda ısısında ve 4 saat süre ile bekletilebilir. Hücre izolasyonu ficol kullanılarak dansite gradient santrifüjasyonu yöntemi ile yapılır. Bu yöntemde santrifüj sonrası ficol üzerine bulutsu bir tabaka oluşturan mononükleer hücreler toplanır. Daha sonra otomatik olarak veya hemositometre ile manuel olarak sayılan hücreler belli yoğunlukta ayarlanarak ELISPOT deneyine alınır. Hemen çalışılmayacak hücreler kryoviallerde dondurularak

saklanabilir ve örnek sayısı istenilen düzeye geldikten sonra uygun koşullarda çözdürülerek ELISPOT deneyine alınabilir.

ELISPOT testinde sitokin spesifik monoklonal antikorlar solid bir faz üzerinde immobilize edilir. Bunun için BKV ELISPOT testinde genellikle 96 çukurluk mikrolaklarda IFN- γ ile kaplı polyvinyl-difluoride (PVDF) membranlar kullanılır. IFN- γ ile kaplı plaklara hücreler sayıları 2×10^5 olacak şekilde inoküle edilerek (Şekil 2.9 a), antijen veya mitojen varlığında 37°C'de 24 saat inkübe edilir. Bu sürede sitokin salınımı olur. Ortama salınan sitokin (IFN- γ) monoklonal antikor tarafından yakalanır (Şekil 2.9 b). Yıkamalarla hücrelerin uzaklaştırılmasından sonra biotinlenmiş veya enzimle konjuge antisitokin antikorlar eklenir (Şekil 2.9 c). Substrat eklenmesiyle renkli spotlar oluşur. Her bir spot sitokin salgılayan bir hücreyi temsil etmektedir (Şekil 2.9 d). Spotlar bir diseksiyon mikroskobu altında veya çoğunlukla ve daha kolay olarak otomatik ELISPOT okuyucu ile sayılır (72, 73).

BKV spesifik immün yanıt ölçümünde antijen olarak kapsid proteinleri olan VP1, VP2 ve VP3 ile erken proteinler olan st ve LT bölgelerinden dizayn edilen peptidler kullanılır. Pozitif kontrol olarak poliklonal T hücre aktivatörleri kullanılır. Bu amaçla en sık CD3 antikorları, fitohemaglütin, konkanavalin A ve pokeweed gibi uyaranlar kullanılır (8, 10, 11, 67).



Şekil 2.9. ELISPOT ile sitokinlerin ölçümü (72).

ELISPOT en duyarlı hücresel deneylerden biridir ve bir milyonda bir hücreyi saptamaktadır. Bu nedenle nadir hücre popülasyonlarının analizinde kullanılır. Duyarlılığı Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ile benzerlik göstermekte, farklı olarak mRNA yerine salgılanan proteini saptamaktadır. Bu, sitokin analizinde avantaj sağlar çünkü çoğu sitokinin regülasyonu translasyoneldir (77). Buna karşılık akış sitometri ile IFN- γ salgılayan spesifik T hücrelerinin saptanabilmesi için CD3+CD8+ T hücre alt popülasyonundaki spesifik T hücre oranının en az %0.02 oranında olması gerekmektedir, bu da bir milyon PBMC’de yaklaşık 40 spesifik T hücresine denk gelmektedir (73). Çok sayıda örneği bir arada çalışma olanağı sunan ELISPOT yönteminde iki farklı renk kullanılarak tek çalışmada iki parametre birden değerlendirilebilir (örneğin IFN- γ + IL-2 gibi). ELISPOT deneyi uygulama şekline göre iki veya üç günde sonuçlanır, ucuzdur ve tekrarlanabilirliği yüksek bir testtir. Sonuçların değerlendirilmesi özel görüntüleme sistemi ve yazılım programı ile yapılıyor olsa da spotların büyüklükleri ve yoğunlukları ile ilgili eşik değerler kullanıcı tarafından belirlenmektedir. Bu nedenle ELISPOT okuyucuları ve laboratuvarlar arasında pozitif spotu tanımlama için kullanılan parametrelerin standardizasyonu gereklidir.

2.1.6.3.4. Tedavi

2.1.9.3.4.1. İmmünitenin restorasyonu (Düzenlenmesi)

BKVN’li olguların %40-60’ında greft kaybı gelişmektedir (78). BKV replikasyonu ve BKVN’nin tedavisinde uygulanan temel strateji immün supresyonun azaltılarak immün yanıtın artırılmasıdır (2, 7). BKV viral yükün monitörizasyonu ve buna göre immün supresif rejimin ayarlanmasının greft sağkalımını arttırdığı bulunmuştur (66, 79). BKVN ile spesifik bir immün supresif ajan arasında ilişki tam olarak kanıtlanamadığından immün supresif tedaviyi ayarlama da kullanılan standart bir protokol bulunmamaktadır. Genellikle 3 strateji izlenmektedir. Bunlar kullanılan immün supresiflerin azaltılması, bırakılması veya tedavinin modifikasyonu şeklindedir (2, 4, 25, 26, 80). BKV spesifik T hücre yanıtının TAK ile inhibe olurken, MMF veya prednizondan çok etkilenmediği görülmüş ve ilk modifiye edilecek ilaç olarak TAK gösterilmiştir (81). Hirsch ve ark. (7) ilk olarak TAK’ın <6 ng/ml, siklosporinin < 150 ng/ml, sirolimusun <6 ng/ml ve MMF’nin $\leq$ 1000 mg günlük dozlara düşürülmesini önermişler ve bu dozların bazı hastalarda daha da azaltılabileceğini belirtmişlerdir. Ek olarak TAK’tan düşük doz siklosporine, kalsinörin inhibitöründen düşük doz sirolimusa

veya MMF'den leflunomide veya düşük doz sirolimusa geçiş yapılabileceğini de bildirmişlerdir.

2.1.6.3.4.2. Tıbbi tedavi

İmmün supresif ilaçların azaltılması veya değiştirilmesine rağmen yüksek plazma BKV düzeylerinin devam etmesi durumunda antiviral ilaçlar denenmektedir (7).

Bir nükleozid analogu olan ve CMV retinit tedavisinde kullanılan sidofovirin immün supresif doz azaltılması ile birlikte veya immün supresyonun doz düzenlenmesinin yeterli olmadığı durumlarda kullanılması önerilmiştir. Nefrotoksik olan sidofovirin *in vitro* olarak polyomaviruslara inhibitör etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bu ilacın hedefi olan viral DNA polimerazı polyomaviruslar eksprese etmemektedir, dolayısıyla etki mekanizması bilinmemektedir (82). Az sayıda vaka ile yapılan çalışmalarda bu ilaçla tedavinin renal fonksiyonda iyileşmeye neden olduğu rapor edilmiştir ancak daha çok sayıda örnekle yapılacak randomize, kontrollü klinik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır (83, 84).

MMF'nin yerine kullanılan leflunomid pirimidin sentez inhibitörüdür. Romatoid arttritte immün supresif ajan olarak kullanılmaktadır. BKV enfeksiyonunda özellikle T-ag olmak üzere viral proteinlerin sentezini inhibe ettiği düşünölmektedir (85). Klinik etkisi tartışmalıdır, az sayıda hasta serilerinde viral yükü azalttığı veya negatifleştirdiği ileri sürölmüştür. Hemolitik anemi, trombositopeni gibi yan etkileri bulunmaktadır (86-88).

IVIG preparatları yüksek titrede BKV nötralizan antikorları içermektedir. IVIG hücre içi kompartmana penetre olmamaktadır. Direk nötralizan etki ve indirek olarak immünomodulator etki oluşturarak hastalığın gerilemesine katkıda bulunabileceği öne sürölmüştür (7). Buna karşılık başka bir çalışmada ise IVIG'in BKV viral yük düzeyinde azalmadan çok artışa neden olduğu bildirilmiştir (89).

Florokinolonların LT-ag'nin helikaz aktivitesini dolayısıyla BKV replikasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Florokinolonların renal transplant alıcılarında BKV viremisini azalttığı veya negatifleştirdiği gözlemlenmiştir ancak henüz klinik etkinliği ile ilgili sonuçlar çelişkilidir. Yapılan bir meta-analizde, sidofovir, leflunomid ve IVIG kullanılan serilerde bu ilaçların viral yükü azaltma oranlarının (%49-52) benzer olduğunu belirtmişlerdir (90-92).

Son günlerde BKNV tedavisinde mTOR inhibitörleri popölarite kazanmıştır. Bu ilaçlar translasyonu ve hücre siklusunun ilerlemesini azaltırlar, immün supresan

etkilidirler. Ayrıca CD8 bellek T hücrelerini arttırdığı böylece BK virusun temizlenmesini kolaylaştırabileceği belirtilmiştir. Retrospektif bir çalışmada mTOR inhibitör alanlarda almayanlara göre BK virüsü ve viremisinin daha hızlı düzeldiği ve allograft fonksiyonlarının da daha fazla iyileştiği gösterilmiştir (4, 81). Diğer ilaçlar gibi mTOR inhibitörlerinin tedavideki etkinliğinin anlaşılabilmesi için randomize, kontrollü çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

2.1.6.3.4.3. Cerrahi tedavi

BKVN'ye bağlı allograft kaybının ardından yapılan renal transplantasyonda 3 yıllık greft sağkalım oranının %98 olduğu belirtilmiş ve buna bağlı olarak BKVN'ye bağlı greft kaybı durumunda tekrar transplantasyonun düşünülebileceği öne sürülmüştür. Güvenli bir transplantasyon için immün supresiflerin azaltılarak veya bırakılarak plazma BKV düzeylerinin düşürülmesi ve BKV spesifik immün yanıtın tekrar kendine gelmesinin sağlanması ve transplantasyondan sonra BKV replikasyonu açısından sık monitörizasyon yapılması önerilmiştir. Nakil sonrası ikinci greftte BKV enfeksiyonu rekürrens oranı %13 (2/15 vaka) olarak bildirilmiştir (93-95).

2.1.6.4. Hemorajik Sistit (HS)

BKV'ye bağlı hemorajik sistit KİT hastalarında %5-60 arasında değişen oranlarda rastlanan bir durumdur. Solid organ transplant hastalarında (SOT) ve HIV ile enfekte hastalarda nadir görülür. Transplantasyondan sonraki 2 haftada gelişir ve geç başlangıçlı HS olarak isimlendirilir. Hastalarda hematüri, dizüri, mesane krampları ve yan ağrısı görülür. Hastalık şiddetine göre 4 evrede incelenir. Evre I mikroskopik hematüri ile sınırlı iken, evre 4 pıhtılı kanama, pıhtı toplanması ve obstrüktif nefropatiye bağlı renal yetmezlikle karakterizedir (96-98).

HS'nin patogenezinde 2 etkenin rol aldığı düşünülmüştür. Bunlar: şiddetli immün supresyonun yanı sıra ürotelyal hücrelerde hasarlanmanın viral replikasyon için uygun ortam oluşturması ve virusla enfekte konak ürotelyal hücrelere donör T hücrelerinin saldırmasıdır. Ayrıca kordon kanı veya haploidentik greft, NCCR'de mutasyonlar, ATG ile tedavi gibi risk faktörleri de sorumlu tutulmuştur (96, 99-101). Sonuç olarak HS'nin patogenezi komplekstir ve immün supresyondan çok immün rekonstriksiyonla ilişkili olabilir. Bu durum güçlü enflamatuvar yanıtla bağlı organ disfonksiyonu olarak tanımlanabilir. Nötrofiller, doğal öldürücü (NK) hücreler, polyomavirus ile enfekte

hücreler ve viral antijenlerle ilişkili T hücrelerinin rol aldığı düşünülmektedir (11, 74, 102).

HS daha çok immün rekonstriksiyon ile ilişkilendirildiğinden, tedavide immün supresyonun azaltılması etkili bir yöntem olmayabilir. Geç başlangıçlı HS’de destekleyici tedavi önerilmektedir. Hastalığın genellikle kendi kendini sınırlama özelliği taşıdığı gösterilmiştir. Pek çok hastada semptomların intravenöz hidrasyonla hematüriden 2-7 hafta sonra gerilediği görülmüştür (96, 103-105).

2.1.6.5. Üreter stenozu

BK virusun renal transplant hastalarında transplantasyon sonrası %2-6 oranında üreter stenozuna neden olduğu bildirilmiştir. Tedavi immün supresif ilaçların azaltılması ve perkutanöz nefrostomi ile olmaktadır (106-108).

2.1.7. İmmünite

BKV ile primer viral enfeksiyonun sınırlandırılmasında ve virüsün latent olarak kalmasında konak immün yanıtı önemli yer tutmaktadır.

2.1.7.1. İntrinsik antiviral immünite

İntrinsik antiviral immünite doğal immünitenin bir komponenti olarak hücresel düzeydeki antiviral savunma mekanizmalarını içermektedir. Çeşitli hücrelerde yapısal olarak bulunan ve viral enfeksiyonlarla indüklenerek antiviral aktivitelerini daha da arttıran viral restriksiyon faktörlerinin aracılığı ile etki etmektedir. Doğal immüniteye ait patern tanıyıcı reseptörler, interferonlar (IFN) gibi antiviral faktörlerin transkripsiyonuna neden olan sinyal yollarını aktive ederek etki gösterdiklerinden, viral enfeksiyonu indirek yolla inhibe ederler. İntrinsik viral restriksiyon faktörleri ise spesifik viral molekülleri tanır ve viral replikasyonu direk ve hızlı bir biçimde çoğunlukla da IFN yanıtı başlamadan önce bloke ederler (109).

Evrin sürecinde intrinsik antiviral immünite ile birlikte viruslar da kaçış mekanizmaları geliştirmişlerdir.

Promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs) küçük, noktasal nükleer alt yapılardır. Transkripsiyon regülasyonu, apoptoz, DNA hasar yanıtı ve onkogeneizde rol almaktadırlar ve hem DNA hem de RNA viruslarına karşı antiviral etki gösterirler. Hemen hemen tüm hücrelerde bulunan multiprotein kompleksleridir ve protein kompozisyonları stresle birlikte değişkenlik gösterir. BKV enfeksiyonunun PML-

NBs'nin sayısını azaltıp, büyüklüğünü arttırmak yoluyla yeniden organizasyonuna neden olduğu ve iki temel proteini olan hDaxx ve Sp100'ü multiprotein kompleksinden ayırdığı gösterilmiştir. Bu proteinlerin BKV'nin replikasyonunda inhibitör rolü olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak BKV'nin PML-NBs'nin yeniden organizasyonunu sağlayarak, intrinsik antiviral fonksiyonunu inhibe etmek için kullandığı bir strateji geliştirdiği kanıtlanmıştır (110).

2.1.7.2. Doğal immünite

Doğal immünite vücudumuzda erken savunma sistemini oluşturur, edinsel immün yanıt devreye girmeden birçok enfeksiyonu kontrol altına alabilir ve oluşan enfeksiyona karşı oluşacak edinsel immün yanıtı yönlendirmekle görevlidir.

BKV'nin antiviral immün yanıtta rol alan genlerin ekspresyonunu inhibe ederek immün supresif etki oluşturduğu düşünülmektedir.

Antimikrobiyal peptid ailesinin üyesi olan defensinler doğal immün sistemin anahtar düzenleyicilerindendir, direk mikroorganizma ile etkileşerek veya hedef hücrede değişikliklere neden olarak antimikrobiyal etki gösterirler (111). Enfeksiyonu edinsel immün yanıtı uyararak inhibe ederler, özellikle β -defensinler monosit, T hücreleri, mast hücreleri ve dendritik hücrelere kemoatraktan etkilidirler, intrasellüler sinyal yolağını indükleyerek immün hücre maturasyonunu, sitokin salınımını ve antikör üretimini arttırırlar (112). Ek olarak elektrostatik yükleri ve karbohidrat bağlama özelliklerine dayalı olarak virus ve konak hücre arasındaki etkileşimi inhibe ederek pek çok zarflı ve zarfsız virusa karşı antiviral etki gösterirler. Defensinler molekül içi disülfid bağları içeren, 18-45 amino asitlik, küçük, katyonik peptidlerdir. Disülfid bağlarının yerleşimine göre α ve β defensinler olarak ikiye ayrılırlar. α -Defensinleri oluşturan insan nötrofil peptidleri 1-4 (HNP 1-4) immün hücrelerde, insan α -defensin 5 (HD5) ince barsak ve ürogenital traktusta, insan α -defensin 6 (HD6) ince barsakta bulunur. β -Defensinler ise çeşitli epitel hücreleri ve immün hücreler tarafından üretilir. Defensinlerden HD5'in BKV enfeksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. HD5 direk olarak virus partikülleri ile etkileşerek virus agregasyonuna ve BKV'nin konak hücre yüzeyine tutunmasına engel olduğu düşünülmektedir (113).

Defensinlere ek olarak sitokinlerin de BKV enfeksiyonunun kontrolünde önemli olduğu gösterilmiştir. IFN- γ henüz anlaşılamamış bir mekanizma ile BKV replikasyonunu inhibe etmektedir. IFN- γ 'nın BKV gen ekspresyonu üzerinde

transkripsiyon, translasyon ve viral progeni oluşumu düzeylerinde inhibitör etki gösterdiği düşünülmektedir (114). Ancak farklı iki çalışmada renal proksimal tubul epitel hücreleri ve endotel hücrelerinin mikroarray analizi sonucunda BKV enfeksiyonunun hücre bölünmesi, DNA replikasyonu ve apoptozisde rol alan genleri aktive ettiği, buna karşılık tip 1 interferon veya kemokinler gibi proinflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu etkilemediği bulunmuş. Enfeksiyon sırasında sadece iki pro-inflamatuvar genin ekspresyonunun arttığı saptanmış. Bunlar doğal immünite ve inflamasyonda rol alan sitokinle indüklenebilen protein olan pentraksin 3 (PTX3) ile doğal öldürücü (NK) hücreleri ve sitotoksik T hücrelerinde bulunan NKG2D reseptörü ile etkileşerek doğal immün yanıtı düzenleyen MHC sınıf I benzeri molekül olan MICB molekülüdür (115, 116).

Doğal immün sistemin viruslarla ilk aktivasyonu çeşitli viral yapıların konağa ait patern tanıyan reseptörler (PRR) aracılığıyla tanınmasını takiben gelişir (117, 118). PRR'ler genomik DNA, çift zincirli RNA (dsRNA), tek zincirli RNA veya viral proteinler gibi viral yapıları tanımaktadırlar ve Toll-like reseptörler (TLR), retinoik asit indüklenebilir gen 1 (RIG-1) benzeri reseptörler ve nükleotid oligomerizasyon domain (NOD) benzeri reseptörler olmak üzere üç sınıfta toplanmaktadırlar. Viral komponentlerin reseptörlerce tanınması intrasellüler sinyal yollarını aktive ederek tip 1 IFN'lerin, proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınımını ve kostimülatör moleküllerin ekspresyonunu arttırır (119). BKV'nin nükleik asit veya proteinlerini tanıyan reseptörler henüz tanımlanmamıştır ancak BKV enfeksiyonunun dsRNA'yı tanıyan TLR3'ün ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur. Aynı çalışmada TLR3 aktivasyonu ile hücre kültür ortamında IL-6 ve kemokin IL-8/CXCL8'in ekspresyonunun arttığı bildirilmiş. Sonuç olarak BKVN'de TLR3 ile doğal immün yanıt mekanizmalarının aktive olarak, proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salınımı ile antiviral ve antienflamatuvar etki oluşturduğu düşünülmektedir (120).

Doğal immün yanıtın önemli bir komponenti olan dendritik hücreler edinsel immün yanıtta gerekli olan antijen sunumu ve T hücre aktivasyonunda çok önemli yer alırlar. Dendritik hücrelerin azalması durumunda antijen sunumu dolayısıyla antijene spesifik T hücre yanıtında azalma görülür. Womer ve ark. (121) tarafından yapılan bir çalışmada; BKVN görülen transplant hastalarında stabil graft fonksiyonuna sahip hastalara göre dendritik hücreleri daha düşük düzeyde olduğu bulunmuş. Transplantasyon sonrası BKV viremi gelişen hastalarda transplantasyon öncesinde de

dendritik hücre sayılarında azalma gözlenmiş ve buna bağlı olarak transplantasyon öncesi periferik kanda dendritik hücre sayısının saptanmasının BKV enfeksiyonu açısından risk belirlemede yararlı olabileceği öne sürülmüştür.

Mikro RNA'lar (miRNA) immün regülasyonda rol alan, küçük, kodlama yapmayan RNA molekülleridir. Esas olarak protein kodlayan mRNA'ların 3' bölgelerine bağlanarak protein translasyonunun inhibisyonu takibinde mRNA'nın degradasyonuna neden olurlar ve MICA, MICB, ULBP gibi stresle indüklenen ligandları hedef alırlar. BKV'nin stresle indüklenen ligand olan ULBP3'ü hedef alan bir miRNA kodladığı ve ULBP3'ün ekspresyonu baskıladığı saptanmıştır. ULBP3 NK hücreleri ve CD8+ T hücrelerinde bulunan reseptörler ile tanınır. BKV tarafından eksprese edilen miRNA'nın; virusun NKG2D reseptörü aracılı immün tanınmadan ve NK hücrelerince eliminasyonundan kaçışını sağladığı bildirilmiş. Bu mekanizmanın virusun immün sistem tarafından elimine edilmeden latent kalmasında etkili olabileceği düşünülmektedir (122).

2.1.7.3. Edinsel immünite

2.1.7.3.1. Humoral immünite

BKV nötralizan antikorları kapsid proteinin olan VP1'e yöneliktir, klinik gözlemlere dayanarak spesifik antikorların BKV'nin primer enfeksiyonun iyileşmesini arttırabildiği düşünülmektedir (123). Transplantasyon öncesi negatif veya düşük BKV spesifik antikor titreleri BKV viremi ve BKVN açısından risk faktörü olarak gösterilmiş ancak bu antikorların BKV replikasyonu veya BKVN üzerinde koruyuculuğu gösterilememiştir (45, 124). BKV reaktivasyonunun artmış BKV spesifik IgG ve IgM düzeyleri ile ilişkili bulunmuş olmasına karşın antikorların viral yük düzeyi veya BKVN'nin iyileşmesiyle ilgisi bulunamamış (68, 125).

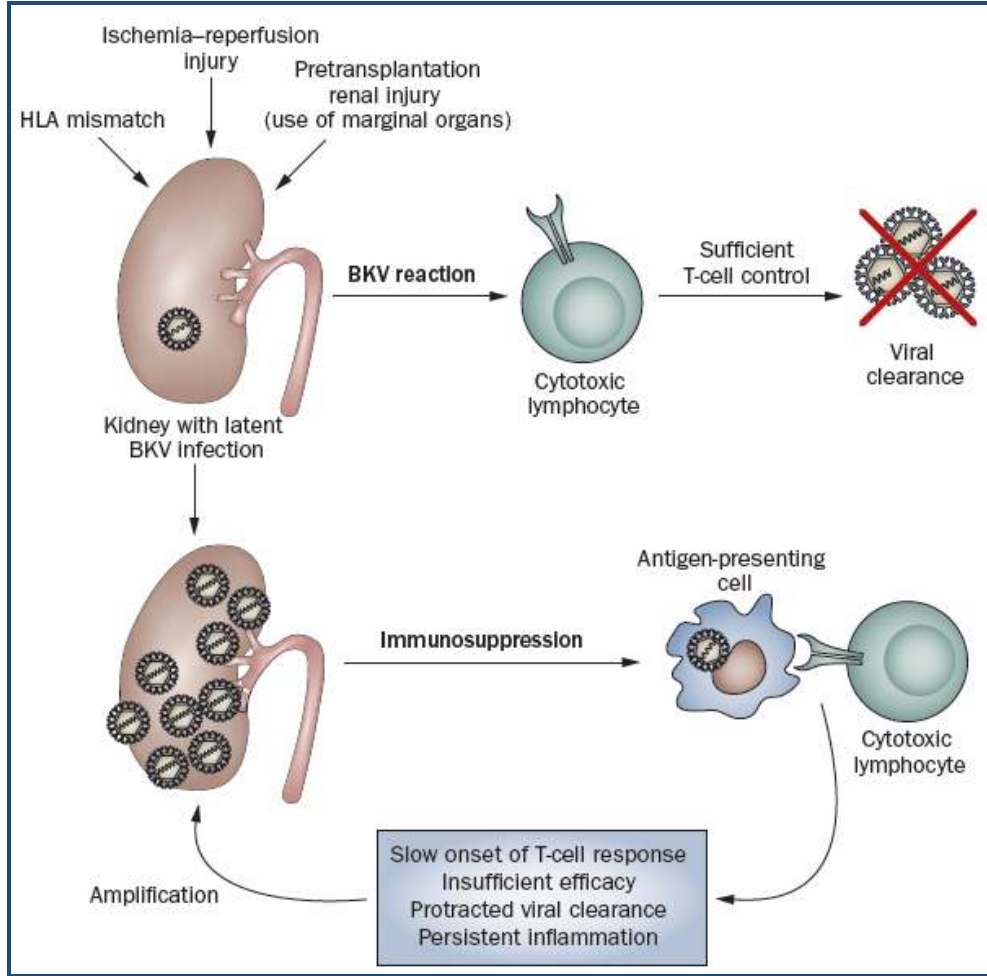
2.1.7.3.2. Hücrel İmmünite

Pek çok viral enfeksiyonda olduğu gibi BKV'nin replikasyonun kontrolünde ve virusun latent kalmasında BKV spesifik T hücreleri önemli rol almaktadır. Çeşitli çalışmalarda sitokin üreten BKV spesifik T hücre yanıtını ölçmede ELISPOT ve akış sitometri yöntemleri uygulanmış ve bu yöntemlerde virusa ait proteinlerin [VP1, VP2, VP3, LT ve küçük t (st)] bazıları veya tümü antijen olarak kullanılmış (8, 11, 67, 68, 74).

BKV'nin antijenlerine karşı oluşan immün yanıtlar sağlıklı bireylerde ve renal transplant hastalarında incelenmiş. BKV enfeksiyonu öyküsü olan hastaları içeren retrospektif bir çalışmada; daha önceden diğer çalışmalarda sıklıkla kullanılan VP1 ve LT antijenlerinin yanı sıra VP2, VP3, LT ve st peptidlerine karşı da T hücre yanıtının alındığı gösterilmiş. VP1 veya LT antijenlerine karşı yanıt alınamayan bir grup hastada ise VP3 antijenine karşı T hücre yanıtı saptanmış (8). Bir diğer çalışmada ise BKV'nin başka bir peptidi olan agnoproteine karşı immünolojik yanıt alınamamış (126). Peptid yanıtlarının birbiriyle karşılaştırıldığı çalışmalarda immünodominant bir antijen belirlenememiş. BKV reaktivasyonunun gerilemesinin tüm BKV proteinlerine spesifik T hücre yanıtlarında artışla birlikte olduğu gözlenmiş; VP1, VP2 ve VP3'ün, LT ve st antijenlerine göre daha erken T hücre yanıtı oluşturduğu ancak LT antijenin viral yükte azalma ile korele olduğu dolayısıyla BKV enfeksiyonunun kontrolünde daha etkin rol oynadığı gösterilmiş (68).

ELISPOT ve akış sitometri yöntemleriyle BKV spesifik T hücre yanıtının araştırıldığı çalışmalarda; zayıf T hücre yanıtının rekürren BKV viremisi ile ilişkili olduğu bulunmuş. BKV reaktivasyonu gelişen hastalarda BKV spesifik IFN- γ salgılayan T hücrelerinin saptanamayacak düzeylerde olduğu gözlenmiş. Bu hastalarda immün supresyonun azaltılması ile virus spesifik T hücre sayısının arttığı ve virus replikasyonun baskılandığı bildirilmiş (11, 123, 127). Bir çalışmada da tedavi rejiminde herhangi bir değişiklik yapılmadan kendi kendini sınırlayan BKV reaktivasyonu olan renal transplant hastalarında BKV spesifik T hücre yanıtının hızlı geliştiği gözlenmiş (68).

BKV enfeksiyonunun kontrolünde gerekli olduğu kanıtlanan BKV spesifik T hücre yanıtının, replikasyonun kalıcı ve yüksek düzeyde olması durumunda greft hasarına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bu görüşe göre; BKV reaktivasyonu olduğunda sitotoksik T lenfositleri yeterli düzeyde yanıt oluşturursa viral replikasyon baskılanır, greftteki inflamasyon düşük düzeyde kalır ve BKVN'ye ilerleme görülmez. Sitotoksik T lenfosit yanıtının yetersiz kalması durumunda ise tam virus eliminasyonu elde edilemez, kronik BKV replikasyonu greftte yoğun inflamasyona neden olur. Aktive olan T hücreleri greftteki inflamasyon alanına göç ederler. Burada hücreler viral replikasyonu kontrol etmekten çok BKV peptidlerini veya donör MHC antijenlerini eksprese eden greft hücrelerine saldırırlar. Oluşan doku hasarı sonucu BKV replikasyonu ve inflamasyon daha da artarak BKVN'ye neden olur (Şekil 2.10) (42, 128).



Şekil 2.10. BKV replikasyonu sırasında viral temizlenme ve BKVN oluşumu (42).

BKV'ye karşı oluşan spesifik hücresel immün yanıtta CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre alt gruplarından hangisinin baskın olduğu henüz tam bilinmemekle birlikte bazı çalışmalarda CD4⁺ T hücre yanıtının CD8⁺ T hücre yanıtından fazla olduğu gözlenmiştir (8, 11, 74). Binggeli ve arkadaşları tarafından özgeçmişinde BKV replikasyon öyküsü olan veya aktif replikasyonu olan böbrek transplant hastalarında CD4⁺ T hücrelerinin daha çok VP1 spesifik, CD8⁺ T hücrelerinin ise LT spesifik immün yanıt oluşturduğu gösterilmiştir (11). BKV reaktivasyonunda, antiviral immünitede koruyuculuğu ve etkinliği en yüksek hücre grubu olan polifonksiyonel ve multifonksiyonel T hücrelerinin sıklığının araştırıldığı çalışmada IFN- γ /IL-2/TNF- α salgılayan polifonksiyonel ve IL-2/TNF- α üreten multifonksiyonel CD4⁺ T hücrelerinin BKV reaktivasyonunun hızlı gerilediği hastalarda, BKVN olan hastalara göre daha çok olduğu saptanmış ve bu hücrelerin saptanmasının BKV reaktivasyonunun klinik seyri hakkında fikir verebileceği öne sürülmüştür (74).

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. Olgular

Çalışmamızda; erişkin, böbrek nakil hastalarında transplantasyon öncesi ve sonrası BKV spesifik hücresel immün yanıtlarının ELISPOT yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla 17.04.12 - 27.09.13 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Organ Nakli Merkezi'ne başvuran ve canlı vericiden böbrek nakli planlanan 113 hastanın örnekleri biriktirilmeye başlandı. Tüm kontrol örnekleri elde edilebilen ve transplantasyon yapılan 31 hasta çalışmaya alındı. 21'i erkek 10'u kadın olan 31 hastadan böbrek nakli öncesi (sıfırıncı ay) ve nakil sonrası bir, üç ve altıncı aylarda olmak üzere dörder kez örnek alındı. İzlem hastalarımıza ek olarak, çalışmamıza baştan itibaren dahil olmayan ancak transplantasyon sonrası yedinci ayda reaktivasyon gelişen bir hasta da reaktivasyondan sonra izleme alındı. Hastanın reaktivasyon sonrası 2.hafta, 1.ay, 2.ay ve 4.aylarda toplam dört kez kan örneği alındı. Tümü canlı vericili olan bu hastaların sadece bir tanesi birinci böbreğini allograft nefropatisinden kaybetmiş, ikinci transplantasyonu yapılmıştır. İzlenen diğer 30 hastanın ilk transplantasyonudur. Reaktivasyon sırasında farkedilen ve çalışmaya dahil edilen 32 yaşındaki erkek hasta ise kadavra vericilidir ve hastanın ilk transplantasyonudur. Hastaların vericileri olan ve seropozitifliği bilinmeyen dört hasta kontrol grubu olarak kabul edildi ve bu hastalardan sadece bir kez kan örneği alındı. Çalışmaya dahil edilen toplam 32 hastanın klinik özellikleri çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çalışmamızın etik kurul onayı Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı tarafından 01.10.2012/232 tarih ve no'su ile verilmiştir. Hastalara kan almadan önce araştırmanın amacı anlatılmış ve yazılı onam alınmıştır.

Çizelge 3.1. Hastaların klinik özellikleri.

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Etiyoloji	Ek sistemik hastalık	Tx sayısı	Donör tipi	Doku uyumu	İndüksiyon protokolü
42	E	34	Bilinmiyor	-	1	canlı	3	-
43	E	40	HT	HT	1	canlı	3	-
45	K	41	Bilinmiyor	-	1	canlı	1	SİM
46	E	41	HT	HT	1	canlı	2	SİM
54	E	29	Bilinmiyor	-	1	canlı	0	SİM
63	E	41	Bilinmiyor	HT	1	canlı	3	-
58	E	49	Alport send.	HT	1	canlı	0	SİM
69	K	60	Bilinmiyor	HT	1	canlı	2	SİM
55	E	31	VUR	-	1	canlı	3	-
72	E	23	Bilinmiyor	HT	1	canlı	3	-
64	E	46	HT	HT	1	canlı	0	SİM
65	E	33	Bilinmiyor	-	1	canlı	3	-
68	E	30	NM	-	1	canlı	3	-
74	K	50	PKBH	-	1	canlı	1	ATG
75	E	46	PKBH	-	1	canlı	1	SİM
90	K	48	PKBH	-	1	canlı	0	ATG
81	K	19	Bilinmiyor	-	1	canlı	4	-
83	K	35	TN	DM	2	canlı	1	ATG
84	K	19	Bilinmiyor	HT	1	canlı	3	ATG
87	E	29	Bilinmiyor	-	1	canlı	3	-
89	E	43	DM	-	1	canlı	3	-
101	E	20	Bilinmiyor	-	1	canlı	3	-
93	E	27	Bilinmiyor	-	1	canlı	6	-
94	E	19	HT	HT	1	canlı	6	-
104	E	39	HT	HT	1	canlı	0	SİM
102	E	58	HT	-	1	canlı	0	ATG
108	K	66	Bilinmiyor	-	1	canlı	3	SİM
57	K	59	Nefrolithiasis	HT	1	canlı	1	SİM
95	E	39	IgA nefropatisi	-	1	canlı	2	SİM
92	E	31	DM	DM	1	canlı	0	SİM
20	K	49	RA	-	1	canlı	3	-
K5	E	34	Bilinmiyor	-	1	kadavra	3	ATG

(HT: hipertansiyon, VUR: veziköüretal reflü, NM: nörojenik mesane, PKBH: polikistik böbrek hastalığı, TN: transplant nefropatisi, DM: diabetes mellitus, RA: renal agenezi, SİM: simulect).

3.2. Yöntem

Yöntemimiz dört basamaktan oluşuyordu. Bunlar tam kandan periferik kan mononükleer hücre (PKMNH) izolasyonu, izole edilen hücrelerin dondurulup saklanması, çözündürülmesi ve ELISPOT deneyine alınmasıdır.

3.2.1. Malzemeler

- Fikol (Sigma Histopaque-1077, Steinheim, Germany)
- Phosphate buffered saline (PBS) (ArgeneNE, Verniolle, France)
- L- Glutamin içeren RPMI 1640 (Invitrogen, GIBCO, Paisley, UK)
- Fetal bovine serum (FBS) (500 ml) (PAA, Pasching, Austria)
- Dimethyl sulphoxide (DMSO) (SIGMA, Steinheim, Germany)
- Gentamisin ampul 160mg
- Tripan mavisi % 0,4 (Sigma, St. Louis, USA)
- IFN- γ kaplı ELISPOT plağı ve kiti (GenID GmbH, Germany)
- BKV VP1 antijeni (JPT, Berlin, Germany)
- BKV VP2 antijeni (JPT, Berlin, Germany)
- BKV VP3 antijeni (JPT, Berlin, Germany)
- BKV LT antijeni (JPT, Berlin, Germany)
- BKV st antijeni (JPT, Berlin, Germany)
- Pokeweed mitojeni (GenID GmbH, Germany)
- Na-pyruvate (Invitrogen, GIBCO, New York, UK)
- Penisilin Streptomisin 10 000 U/ml (Invitrogen, GIBCO, UK)
- -80 °C derin dondurucu (Sanyo, Japan)
- Mr. Frosty Dondurma Kabı (Nalgene, Thermo Fischer, Rochester, NY, USA)
- Sıvı azot tankı (-196°C) (Statebourne Cryogenics, Washington, England)
- Hemogram cihazı (Sysmex XT 2000i, USA)
- Etüv (%5 CO₂, 37°C) (Thermo)
- ELISPOT okuyucu (Aid otoimmun diagnostika, GmbH, Straßberg, Germany)
- Santrifüj (2-16 PK, Sigma)
- Santrifüj (NF-800, Nüve)
- Neubauer lamı (0,0025 mm², Marinfeld, Germany)
- Kriyovial (2 ml) (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany)

- Steril falkon tüpü 12 ml
- Steril falkon tüpü 50 ml
- Steril plastik pastör pipeti
- Steril pipet 5 ml
- Steril pipet 10 ml
- Steril pipet 25 ml

3.2.2. PKMNH izolasyonu ve saklanması

Etilendiamin tetraasetik asitin (EDTA), kalsiyumla şelasyon yapıcı özelliği nedeniyle T hücre aktivasyonunu inhibe edebileceği, dolayısıyla T hücre analizlerinde antikoagülan olarak EDTA'nın kullanıldığı kan tüplerinin uygun olmadığı görüşü yaygın olarak benimsenmiştir. Bull ve arkadaşlarının (129) yaptığı ve antikoagülan olarak EDTA, asit-sitrat-dekstroz (ACD) ve sodyum heparinin karşılaştırıldığı bir çalışmada hücre eldesi, viabilitesi ve fonksiyonu açısından (ELISPOT ve Flowsitometrik yöntemle değerlendirmede) üç antikoagülanın da farklılık göstermediği, ancak bekleme süresi uzayınca EDTA'lı kanların performansının heparinli kanlara göre daha fazla bozulduğu, heparinli kanların viabilite ve IFN- γ sekresyonu açısından daha stabil olduğu belirtilmiştir.

Bizim çalışmamızda sodyum heparinli tüplere alınan 5-10 ml venöz kan örnekleri kullanıldı. Laboratuvarımıza gönderilen ve oda ısısında en fazla dört saat bekletilen kan örneklerinden biyogüvenlik kabininde, steril koşullarda PKMNH izolasyonu gerçekleştirildi.

1. Heparinli tüpteki kanlar on iki kez yavaşça alt-üst edildikten sonra 15 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı.
2. Üzerine kan hacminin yarısı kadar (2.5-3 ml) steril PBS eklendi.
3. Kan-PBS karışımı birkaç kez alt-üst edildikten sonra bir başka falkon tüpüne eklenen 5 ml fikol'ün üzerine tabakalandırıldı.
4. 1800 rpm'de (frensiz, 22°C'de) 30 dk santrifüj edildi.
5. Fikolün üzerindeki bulutsu tabaka (1.5-2 ml) plastik pastör pipeti ile toplanarak başka bir falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine yaklaşık 10 ml kadar steril PBS eklendi.
6. 2500 rpm'de 10 dk çevrildi.

7. Santrifüj sonrası süpernatant döküldü, tüpler kurutma kağıdı üzerine ters kapatılarak süzdürüldü, dipte kalan pellet 1000 µl +4°C’de soğutulmuş dondurma mediumu ile süspanse edildi ve kriyoviallere aktarıldı.
8. Kriyovialler; örneğin dakikada 1°C soğumasını sağlayan dondurma kabı içinde -80°C’ye kaldırıldı.
9. Yirmidört saat sonra -80°C’den çıkarılan kriyovialler uzun süreli saklama için sıvı azot tankına aktarıldı.

3.2.2.1. Dondurma mediumu hazırlanışı

Dondurma mediumu haftalık olarak, aşağıda belirtilen oranlarda malzemelerin eklenmesiyle steril koşullarda hazırlandı ve +4°C’de saklandı.

- % 1 L-Glutaminli RPMI 1640 % 69
- Steril, ısı ile inaktive edilmiş FBS % 20
- DMSO % 10
- Gentamisin % 1

3.2.3. Dondurulmuş örneklerin çözündürülmesi

Örneklerin çözündürülmesi işlemi de biyogüvenlik kabininde ve steril koşullara dikkat edilerek gerçekleştirildi.

1. Azot tankından çıkarılan örnekler 37°C’deki su banyosunda hızla (1-2 dakika içinde) çözündürüldü.
2. Kriyoviallerde bulunan 1 ml örneğe 1 ml çözündürme mediumu eklenerek hafifçe karıştırıldı ve falkon tüpü içinde bulunan 8ml çözündürme mediumuna eklendi.
3. Medium içerisinde alt üst edilerek karıştırılan örnek 1200 rpm’de 7 dk çevrildi.
4. Santrifüj sonrası süpernatantın dökülmesinden ve tüpün kurutma kağıdı üzerine ters kapatılarak süzdürülmesinden sonra yıkama işlemi (2, 3 ve 4. basamaklar) tekrarlandı.
5. En son dipte kalan pellet 1 ml çalışma mediumu ile süspanse edildi.

3.2.3.1. Çözündürme mediumu

- % 1 L-Glutaminli RPMI 1640 % 88
- Steril, ısı ile inaktive edilmiş FBS % 10
- Na-Pyruvate % 1
- Penisilin-Streptomisin %1

3.2.3.2. Çalışma mediumu

% 1 L-Glutaminli RPMI 1640 % 90

Steril, ısı ile inaktive edilmiş FBS % 10

Çözdürme ve çalışma mediumu steril olarak hazırlandı ve 37°C'ye getirilerek kullanıldı.

3.2.4. PKMNH sayımı

1. Çalışma mediumu ile süspanse edilen hücreler Sysmex XT 2000i hemogram cihazında sayıldı.
2. Hemogram cihazında elde edilen değerler kullanılarak, 100 µl'de 2×10^5 hücre olacak şekilde hesaplanan hacimdeki çalışma mediumu ile hücreler yeniden süspanse edildi. Hücreler ELISPOT deneyine alınmaya dek 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

3.2.5. PKMNH'nin viabilitesinin değerlendirilmesi

1. Hücre süspansiyonu eşit hacimdeki (10 µl) % 0.4'lük tripan mavisini ile PCR tüpü içinde karıştırıldı ve 4 dakika beklendi.
2. Bu süre sonunda karışımdan 10 µl alınarak neubauer lamında incelendi.
3. Her biri 16 küçük kareden oluşan 4 alandaki hücreler sayıldı. Canlı hücreler boyayı almadıklarından renksiz görünürken, boyayı alan ölü hücreler ise mavi olarak izlendi. Canlı hücre / ölü hücre %80 ve daha fazlası ise ELISPOT deneyine alındı.

3.2.6. ELISPOT deneyi

Deneyde IFN-γ antikorlu ile kaplı, 96 çukurlu ELISPOT plakları kullanıldı. Deney firmanın (GenID GmbH, Germany) önerileri doğrultusunda çalışıldı. Antijen ve hücrelerin çukurlara inokülasyonu biyogüvenlik kabininde, steril koşullarda gerçekleştirildi.

1. Her bir örnek; negatif kontrol, pozitif kontrol ve BKV peptid uyarımı her biri ikişer çukur olmak üzere toplam 6 çukurda çalışıldı. Negatif kontrol çukurlarına 100 µl çalışma mediumu, pozitif kontrol çukurlarına 100 µl Pokeweed mitojeni, test çukurlarına her biri 1 µg/ml final konsantrasyonda olacak şekilde VP1, VP2, VP3, LT ve st antijenlerinden hazırlanan BKV peptid kokteyli 100 µl hacimde eklendi.

2. Tüm çukurlara 100 µl hücre süspansiyonları (2×10^5 hücre) eklendikten hemen sonra plaklar 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı ve 20 saat inkübe edildi.

Bu basamaktan sonra deneye biyogüvenlik kabini dışında devam edildi.

3. Inkübasyon sonrası tüm çukurlar 200 µl yıkama solüsyonu ile 6 kez yıkandı (Kitle birlikte 10× olarak verilen yıkama solüsyonu distile su ile 1× hale getirildikten sonra kullanıldı).
4. Kitin içinde önerilen şekilde (1/250 oranında) dilüsyon solüsyonu kullanılarak dile edilen sekonder antikordan tüm çukurlara 100’er µl dağıtıldıktan sonra plaklar 22 °C’de nemli ortamda 2 saat inkübe edildi.
5. Inkübasyon bitiminde dördüncü basamakta belirtildiği gibi tekrar yıkama yapıldı.
6. Yıkama sonrası tüm çukurlara 100’er µl substrat solüsyonu eklendi. Spotlar görünür hale gelinceye dek (5-20 dakika) beklendi.
7. Spotlar görünür hale geldikten sonra çukurlara distile su eklenerek reaksiyon durduruldu.
8. ELISPOT plağı kurutma kağıdı üzerine ters çevirilerek kurutulduktan sonra karanlık ve kuru bir ortamda bir gün bekletildi.
9. Plaklar ELISPOT okuyucuda AID ELISPOT Reader programı (versiyon 6.0) yardımıyla değerlendirildi.

Değerlendirmede Pokeweed mitojeni ile uyarılan pozitif kontrol çukurlarında 50’den fazla, negatif kontrol çukurlarında da 10’dan az spot görülen tüm örnekler değerlendirmeye alındı. Her bir örnek için negatif kontrol çukurlarının ortalama spot sayıları background olarak alındı ve BKV antijeni ile uyarım yapılan test çukurlarının ortalama spot sayılarından çıkarıldı. Elde edilen spot sayısı 2×10^5 hücre için olduğundan 1×10^6 hücre için olan değer hesaplandı.

ELISPOT deneyiyle BKV spesifik IFN-γ T hücre yanıtını araştırdığımız plak resmi şekil 3.1’de görülmektedir.



Şekil 3.1. ELISPOT deneyiyle BKV spesifik IFN- γ T hücre yanıtının araştırılması.

3.2.6.1. BKV Peptid Kokteyli Stok Solüsyonu Hazırlanması:

Kullandığımız peptidler BKV AS suşu, genotip III kullanılarak her bir peptidin 11 amino asitlik kısmının bir önceki peptidin üstüne bindiği 15'er amino asitlik peptid havuzları şeklinde JPT (Berlin, Almanya) firması tarafından sentez edilmiştir.

Stok solüsyonunun hazırlanması biyogüvenlik kabininde, steril koşullarda ve buz üzerinde gerçekleştirildi. Yaklaşık konsantrasyonu 25 μg olarak gönderilen, liyofilize haldeki 5 peptidin (VP1, VP2, VP3, LT, st) her biri ayrı ayrı 40 μl DMSO ile sulandırıldı ve 10 tane alikot hazırlandı. Böylece peptidlerin konsantrasyonu 2.5 $\mu\text{g}/4\text{ }\mu\text{l}$ 'ye ulaştı. Hazırlanan alikotlar deney sırasında kullanılmak üzere -20°C 'de saklandı.

3.2.6.2. BKV peptid kokteyli çalışma solüsyonu hazırlanması

Deneyden hemen önce (çalışılacak örnek sayısına göre) stok solüsyonundan PBS ile sulandırılarak biyogüvenlik kabininde, steril koşullarda ve buz üzerinde hazırlandı. Örneğin 6 örnek için; ana stok 62.5 kat sulandırılarak 1230 μl PBS içine 20 μl peptid

stok solüsyonu (4 µl VP1 + 4 µl VP2 + 4 µl VP3 + 4 µl LT + 4 µl st) eklendi. Böylece deneyde 200 µl'lik final hacim içinde her bir peptid konsantrasyonu 1 µg/ ml oldu. (DMSO'nun kokteyl içindeki konsantrasyonunun biyolojik sistemlerde toksisiteye neden olan %1 sınırının altında olmasına dikkat edildi)

3.2.7. BKV DNA kantitasyonu

Rutin istemi yapılan hastaların plazma ve idrarda BKV DNA kantitasyonları Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez laboratuvarı bünyesindeki moleküler testler laboratuvarında çalışıldı. Hastaların 8'inde izlem süresince hiç BKV DNA istemi yapılmadı. Geri kalan 23 hastada ise izlem sırasında çeşitli zamanlarda BKV DNA araştırıldı. Reaktivasyon sırasında yakalanan hastada ise, ELISPOT deneyi ile eş zamanlı olarak BKV DNA kantitasyonu yapıldı. BK virus DNA'sı real-time PZR yöntemiyle araştırıldı. Viral nükleik asit ekstraksiyon kiti (EZ1 virus minikit) ve otomatize cihazı (Biorobot EZ1 Advanced, Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak, plazma ve idrar örneklerinden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamasında, kantitasyonun sağlanabilmesi için, pBR322 plazmidi içerisine klonlanan Dunlop suşunun tüm dizisini içeren pBKV (ATCC45025) ile, UV spektrofotometre kullanılarak onar katlık değişen konsantrasyonlarda plazmid içeren beş standart kullanıldı. Vats ve arkadaşları (130) tarafından tanımlanan primer dizileri kullanılarak virusun VP-1 bölgesi içerisindeki 83 baz çiftlik alan amplifiye edildi. Hedef bölgeye ait sinyal deteksiyonu 5' ve 3' uçları sırasıyla FAM ve TAMRA işaretli Taq-man probu kullanılarak yapıldı. PCR inhibitörü varlığı, internal kontrol olarak, hedef ile aynı tüp içerisinde, gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni içerisinde yer alan bölgenin amplifikasyonu ve amplifiye edilen bölgenin 5' ve 3' uçları sırasıyla BHQ3 ve Cy5 işaretli Taq-man probuyla deteksiyonu ile test edildi. Kullanılan primer ve prob dizileri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. 95°C'de 12 dakikalık süre sonrasında 95°C'de 15 saniye, 60 ve 40°C'de 1'er dakikadan oluşan 45 döngülük real-time amplifikasyon işlemi, Rotor-Gene (Corbett-Research, Australia) real-time PZR cihazında yapıldı.

Çizelge 3.2. BKV kantitasyonu için kullanılan primer ve prob dizileri.

PRİMER	POLARİTE	DİZİ
Target Forw.	Sense	5'-TGATAGCCCAGAGAGAAAAATGC-3'
Target Rev.	Anti-sense	5'-TCCACAGGTTAGGTCCTCATTTAAA-3'
GAPD Forw.	Sense	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
GAPD Rev.	Anti-sense	5'-GAAGTTGAAGTTCGGAGT-3'
Target Probe		5'-FAM-TTACAGCACAGCAAGAATCCCCCTCCC-TAMRA-3'
GAPD Probe		5'-Cy5-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-BHQ3-3'

3.2.8. İstatistiksel değerlendirmeler

Veriler SPSS 18.0 istatistiksel analiz programı kullanılarak analiz edildi. Örneklemi tanımlamak için frekans dağılımı, ortalama (mean), standart sapma (SS) gibi tanımlayıcı istatistikler kullanıldı. İstatistiksel analizlerde parametrik test varsayımları sağlanmadığı için, “Mann-Whitney U”, “Wilcoxon işaretli sıra” ve “Friedman” testleri kullanıldı.

Analizlerde $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamıza aldığımız izlem hastalarının yaş ortalaması 38.7 ± 13.2 (19-66) olarak bulundu. Araştırmamız sürecinde toplam 113 hastamız oldu. Ancak prospektif olan bu araştırmada, tümünün nakil sonrası 1., 3., ve 6. ay örnekleri elde edilemedi. Bu nedenle olgu numaraları ardışık sayılar olmayıp, araştırmamızın amacına uygun olarak tüm örnekleri elde edilebilen hastalar (toplam : 31) değerlendirmeye alınmıştır.

Hastaların transplantasyon öncesindeki (sıfırncı ay) ile transplantasyondan sonraki bir, üç ve altıncı aylardaki ve kontrol grubunun BKV spesifik IFN- γ yanıtları bir milyon hücredeki spot sayısı şeklinde (SFU/10⁶ HÜCRE) Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hastaların ve kontrol grubunun BKV spesifik IFN- γ yanıtları.

OLGU NO	Sıfırncı ay SFU/10 ⁶ HÜCRE	1. ay SFU/10 ⁶ HÜCRE	3. ay SFU/10 ⁶ HÜCRE	6. ay SFU/10 ⁶ HÜCRE
20	20	90	56	364
42	20	15	108	78
43	50	37	153	84
45	55	90	110	137
46	60	46	67	110
54	57	25	96	156
55	32	5	37	130
57	100	55	83	140
58	199	915	238	837
63	32	14	19	20
64	104	12	10	53
65	25	12	96	65
68	222	80	165	312
69	105	56	46	43
72	50	125	134	140
74	470	193	243	397
75	224	112	150	35
81	541	266	281	202
83	60	40	46	80
84	373	132	217	202
87	62	95	184	2
89	376	109	85	10
90	238	185	120	37
92	77	65	91	124
93	285	44	52	60
94	316	296	171	150
95	178	63	144	14
101	237	5	82	20
102	79	38	26	20
104	109	72	111	69
108	86	10	116	125

KONTROL GRUBU	SFU/10 ⁶ HÜCRE
106V	144
109V	285
110V	50
111V	165

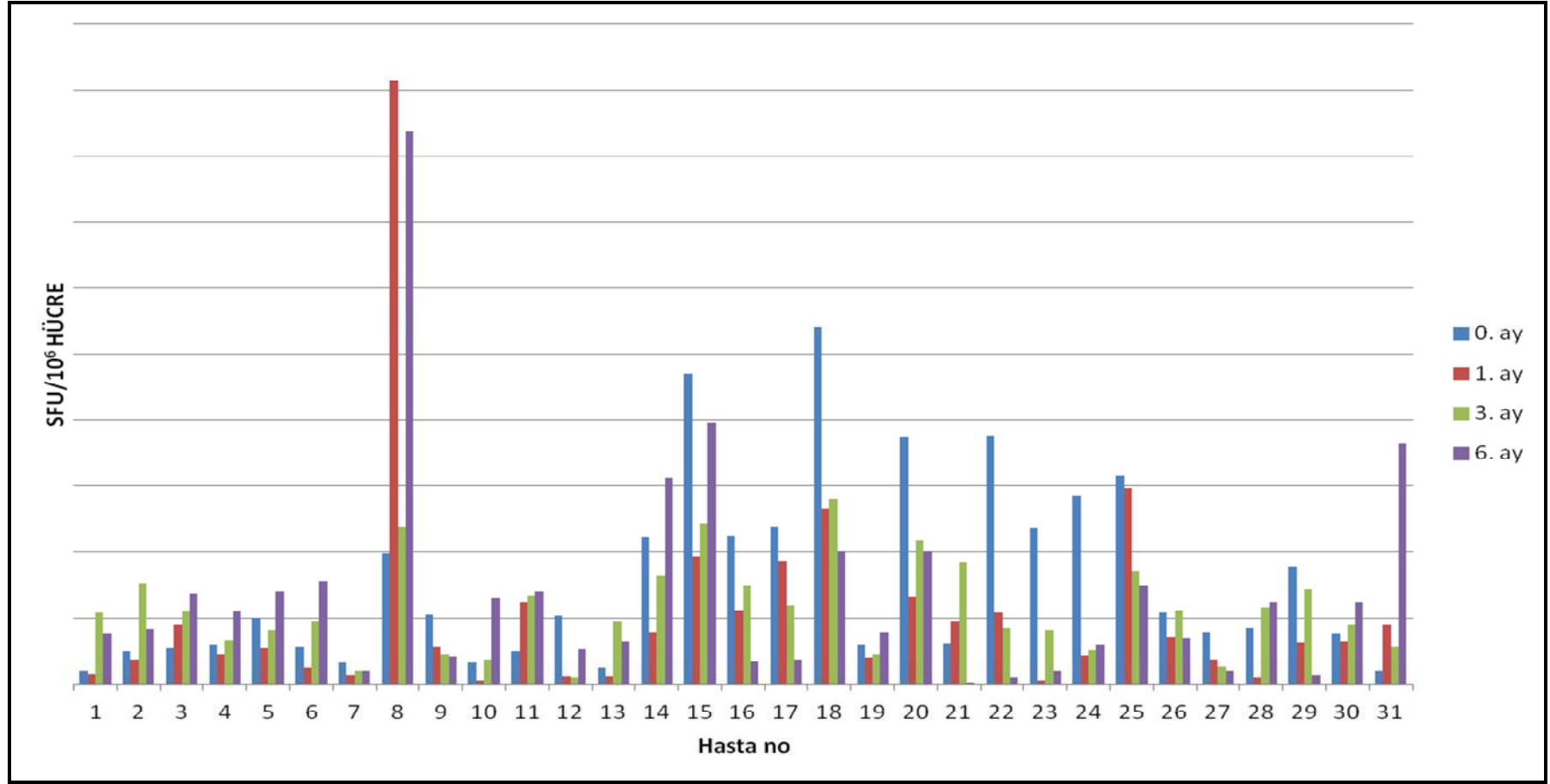
Hastaların transplantasyon öncesi IFN- γ salgılayan T hücre sayıları 156.2 ± 140.4 SFU/ 10^6 H [ortalama $\pm$ standart sapma (SD)], kontrol grubunun IFN- γ salgılayan T hücre sayıları 161.00 ± 96.6 SFU/ 10^6 bulundu. Her iki grubun IFN- γ yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Mann-Whitney U testi, $p=0.708$).

Hastaların sıfır, bir, üç ve altıncı aylarda elde edilen ortalama spot sayıları Çizelge 4.2’de özetlenmiştir. Tüm aylarda elde edilen ortalama spot sayılarının diğer aylarla karşılaştırması yapıldı ve birinci aydaki spot sayılarının ortalamasının nakil öncesi, üçüncü ve altıncı aya göre daha düşük olduğu bulundu (Wilcoxon testi, $p<0.05$).

Çizelge 4.2. Hastaların tüm aylardaki BKV spesifik immün yanıtları.

	N	Ortalama	SD	Minimum	Maximum
IFN- γ yanıtı tx öncesi	31	156.19	140.418	20	541
IFN- γ yanıtı 1. ay	31	106.52	166.727	5	915
IFN- γ yanıtı 3. ay	31	114.10	68.718	10	281
IFN- γ yanıtı 6. ay	31	136.00	163.497	2	837

Tüm hastaların sıfır, bir, üç ve altıncı aylardaki IFN- γ yanıtlarındaki değişim grafik halinde şekil 4.1’de gösterilmiştir.

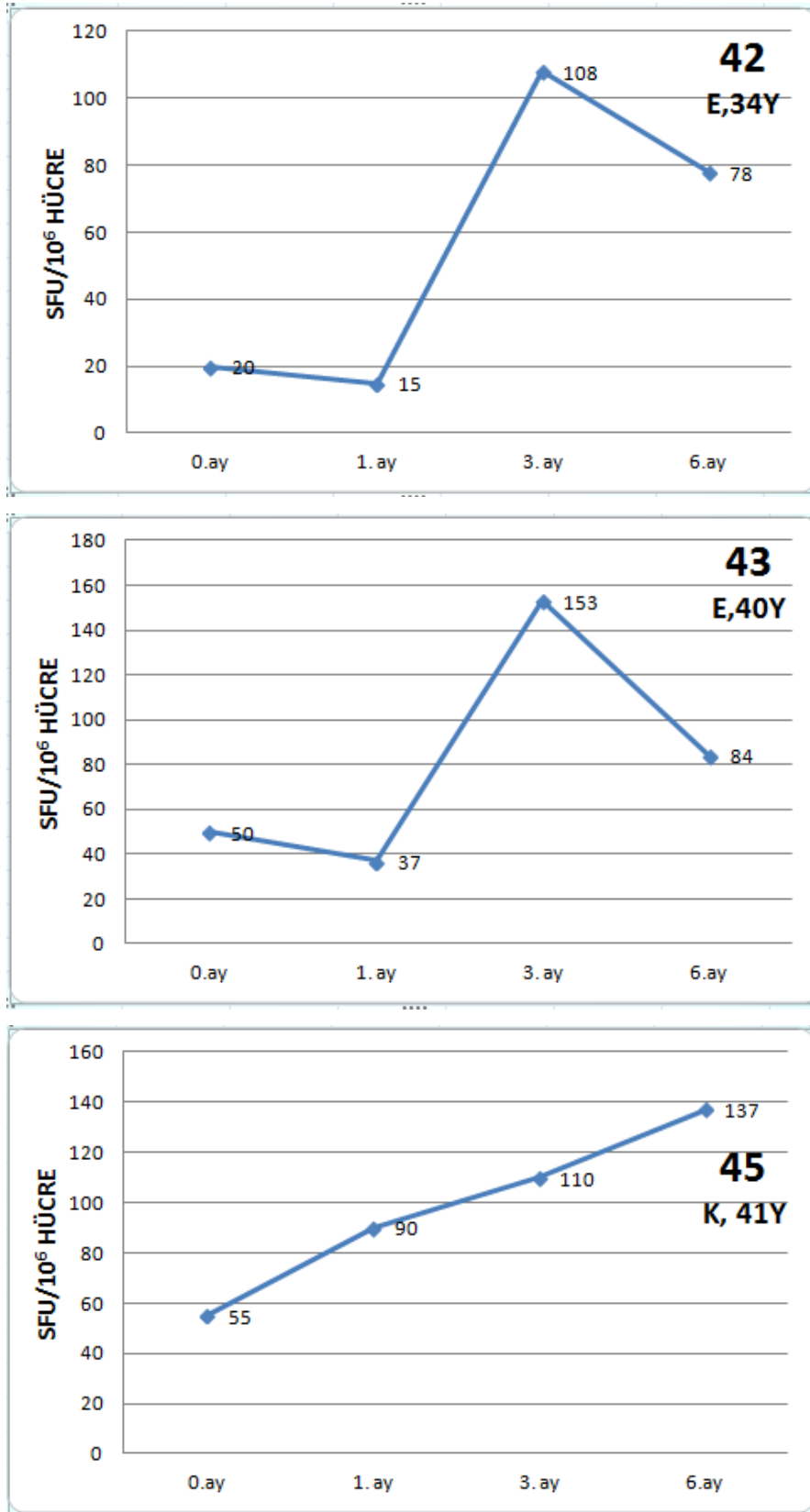


Şekil 4.1. Hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtlarının aylara göre değişimi.

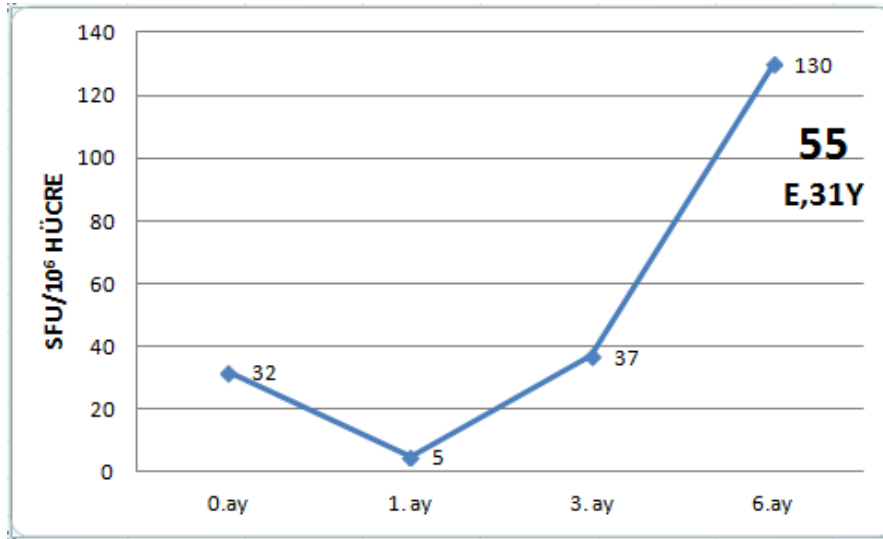
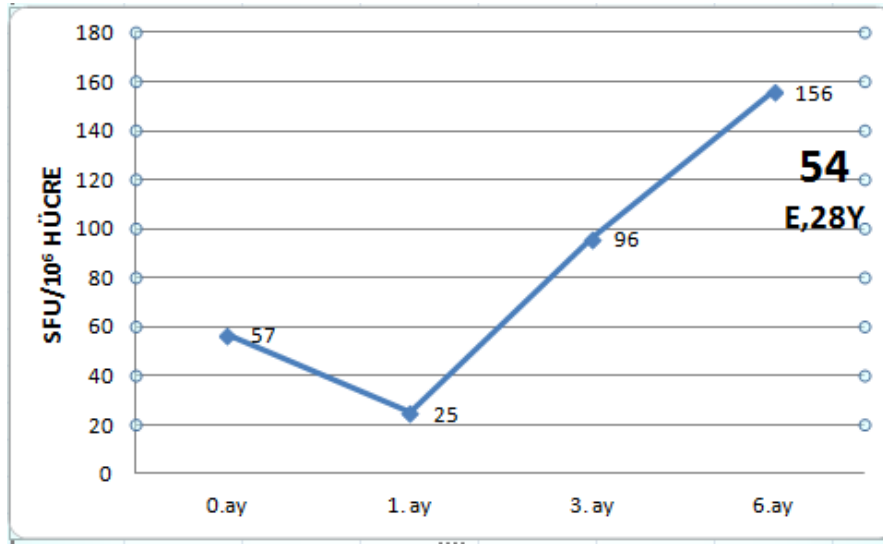
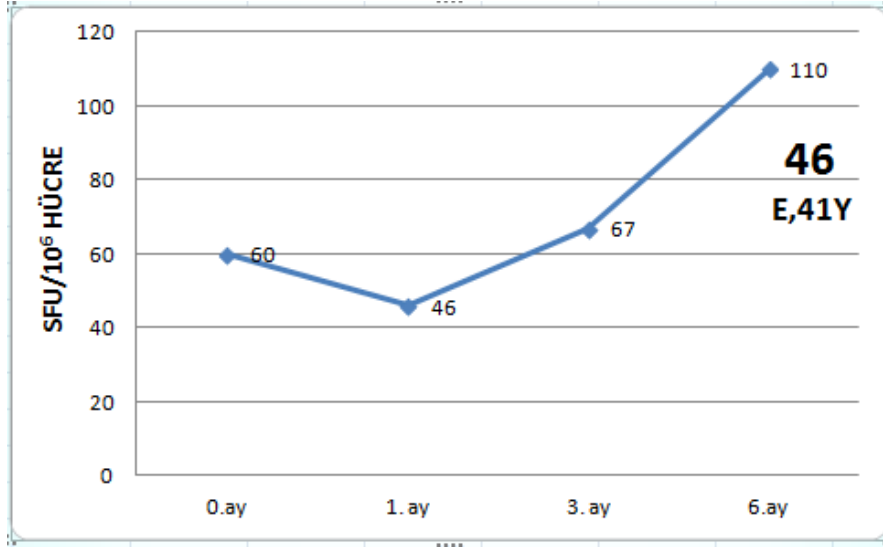
BKV DNA gerçek zamanlı, kantitatif PZR ile elde edilen negatif sonuçlar, BKV DNA negatif olarak kabul edilirken, BKV DNA düzeyleri < 300 kopya / ml ve daha üzeri değerler ise BKV reaktivasyonu açısından pozitif olarak kabul edildi. BKV DNA düzeyleri birinci ayda; 15 hastada negatif, 2 hastada pozitif saptandı, 14 hastada bakılmadı, üçüncü ayda; 9 hastada negatif, 4 hastada pozitif bulundu, 18 hastada bakılmadı, altıncı ayda ise 5 hastada pozitif, 3 hastada negatif saptanırken 23 hastada bakılmadı.

Takip süresince; herhangi bir zamanda BKV reaktivasyonu gelişen hastalarla, BKV reaktivasyonu görülmeyen hastaların transplantasyon öncesindeki IFN-γ yanıtları karşılaştırıldı. BKV reaktivasyonu olmayan hastaların transplantasyon öncesi spot sayıları 175.3±161.1 (ortalama±standart sapma) iken; reaktivasyon gelişen hastalardaki spot sayıları 175.9±146.1 olarak saptandı, her iki hasta grubunun IFN-γ yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Mann-Whitney U testi, p=0.875).

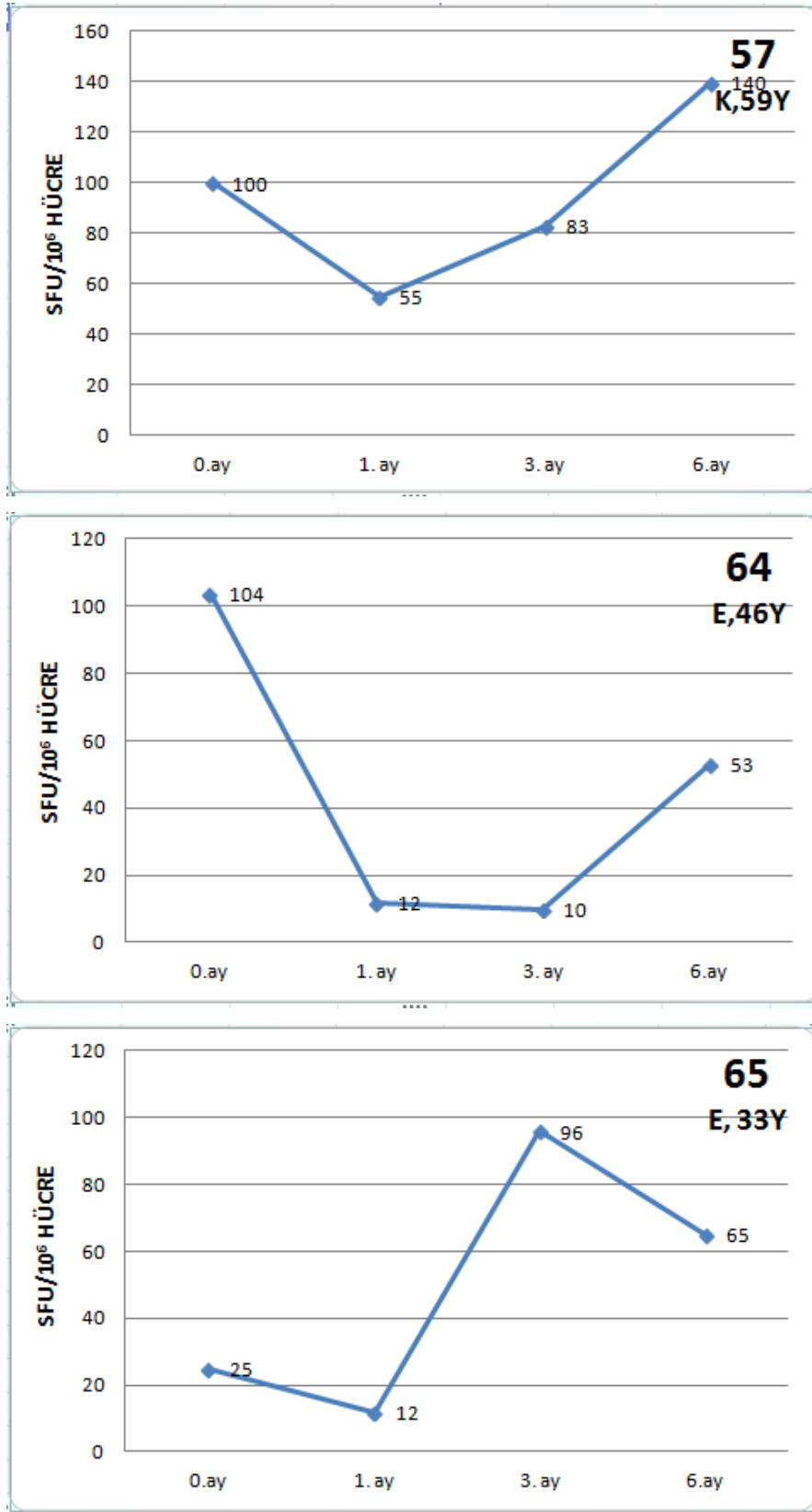
Altı aylık izlem boyunca BKV reaktivasyonu gelişmeyen tüm hastalara ait sıfır, bir, üç ve altıncı aylardaki BKV spesifik IFN-γ yanıtları ayrı ayrı grafikler halinde şekil 4.2’de verilmiştir. Grafiklerin sağ üst köşesinde sırasıyla hastaların numaraları, cinsiyetleri ve yaşları belirtilmiştir.



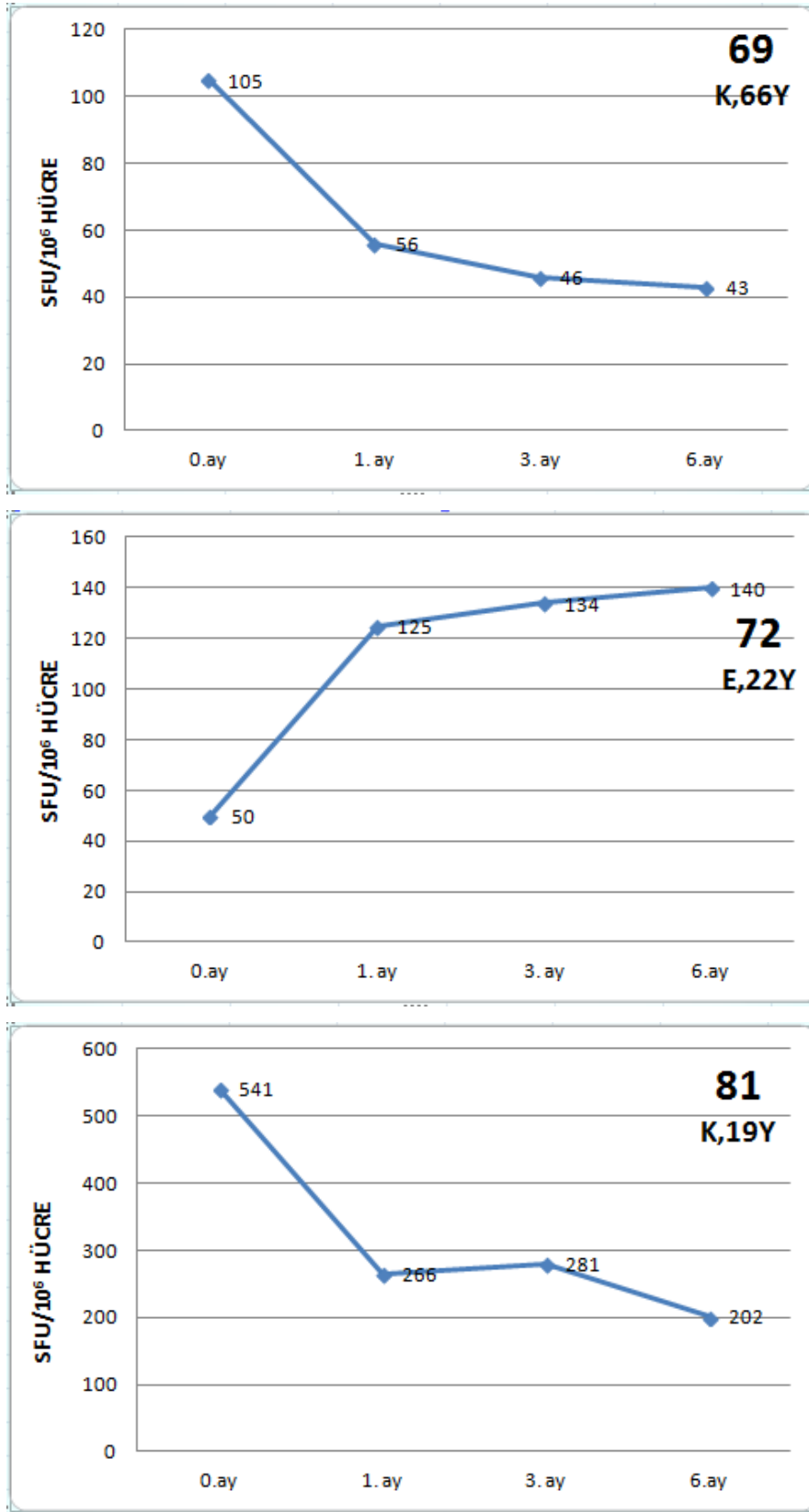
Şekil 4.2. BKV reaktivasyonu görülmeyen hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtları.



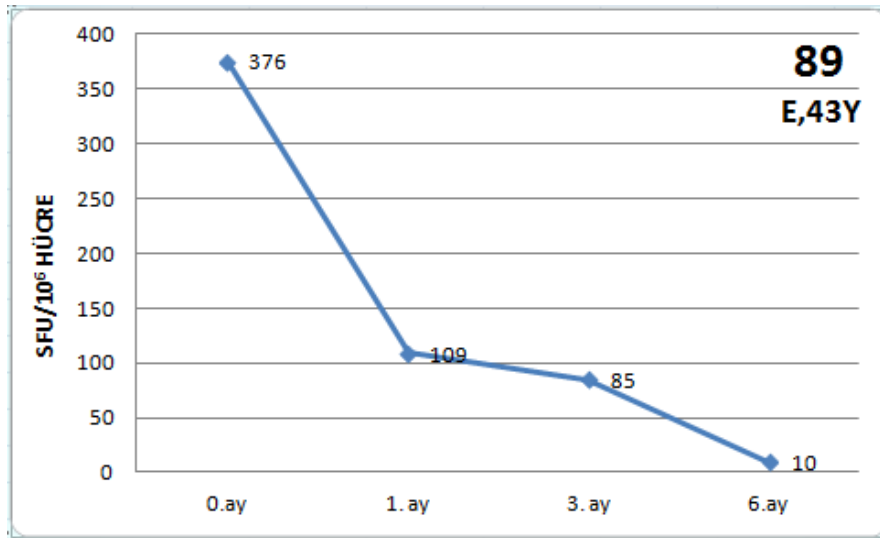
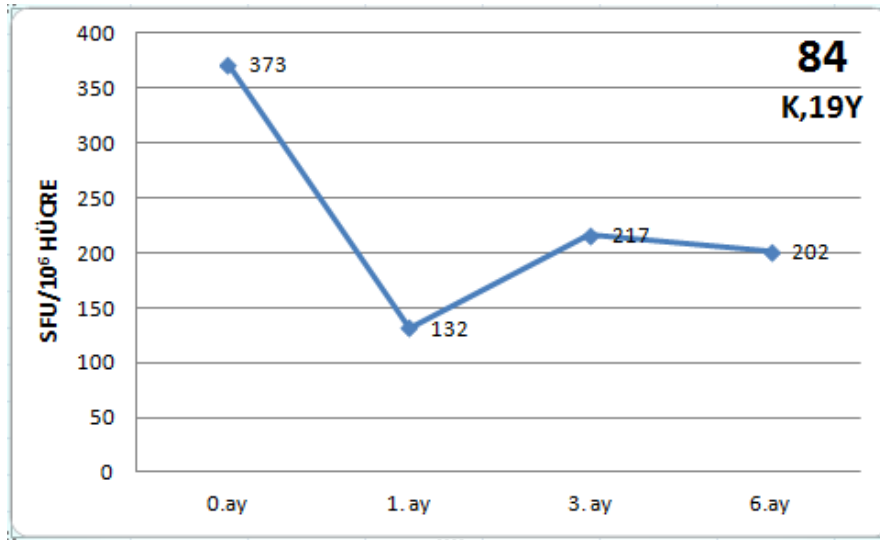
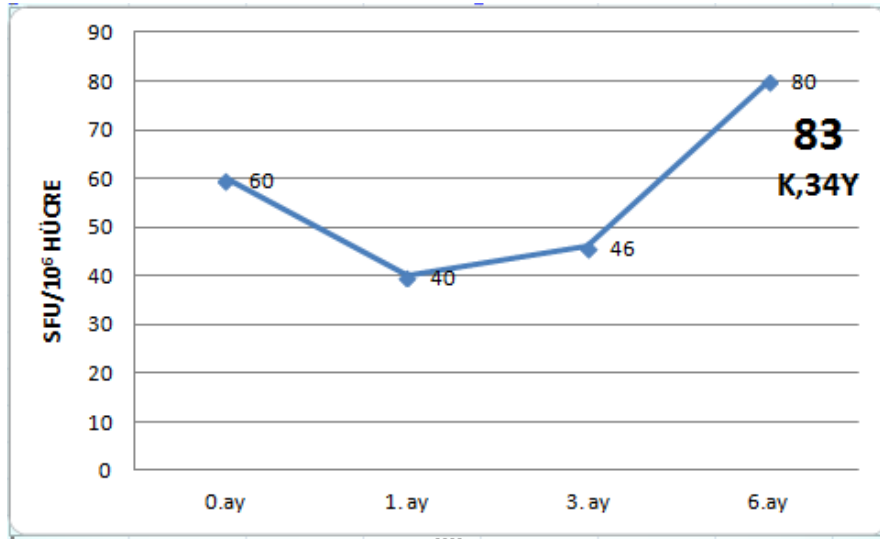
Şekil 4.2. (Devam). BKV reaktivasyonu görülmeyen hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtları.



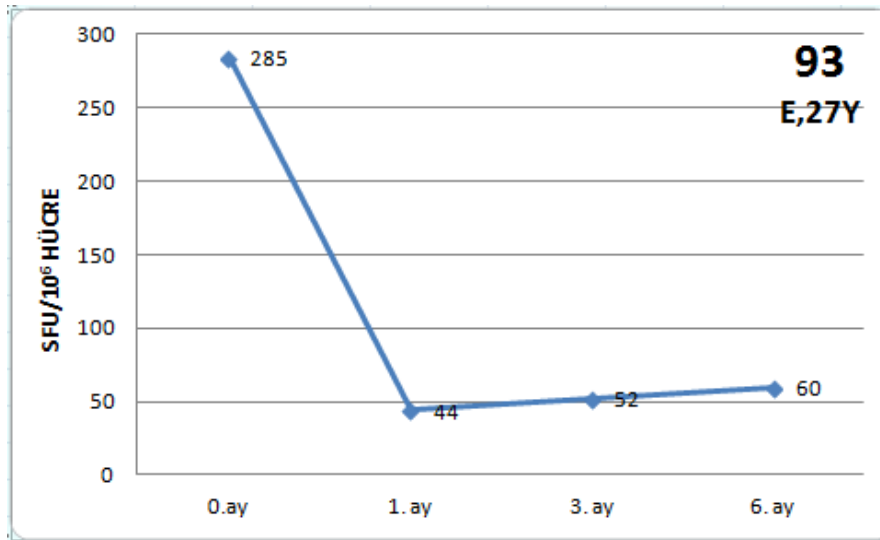
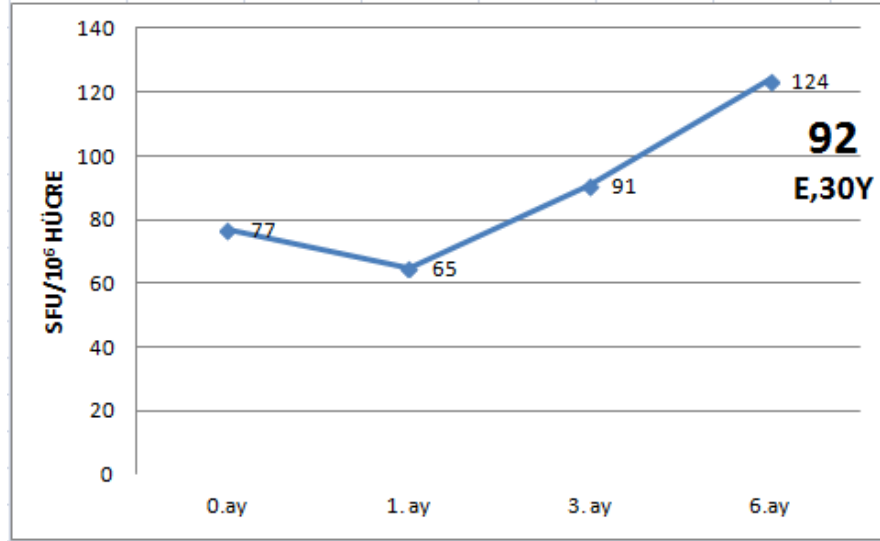
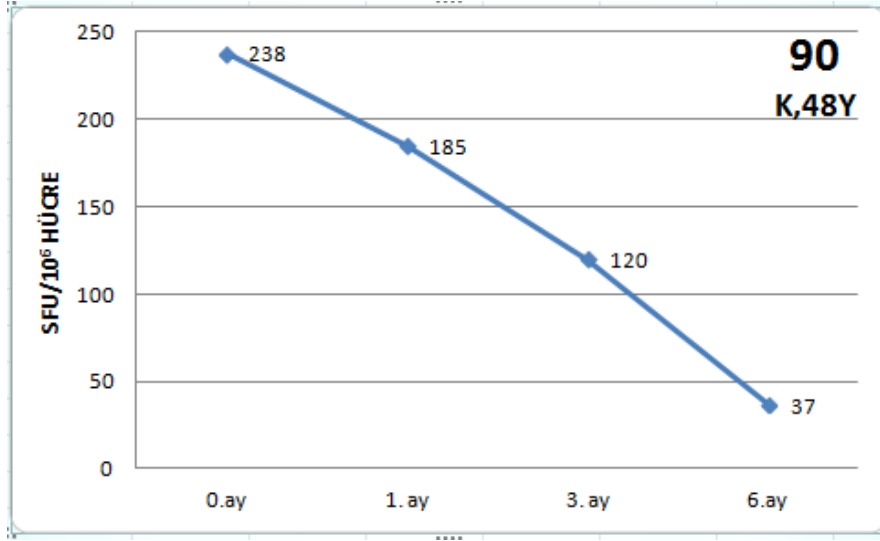
Şekil 4.2. (Devam). BKV reaktivasyonu görülmeyen hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtları.



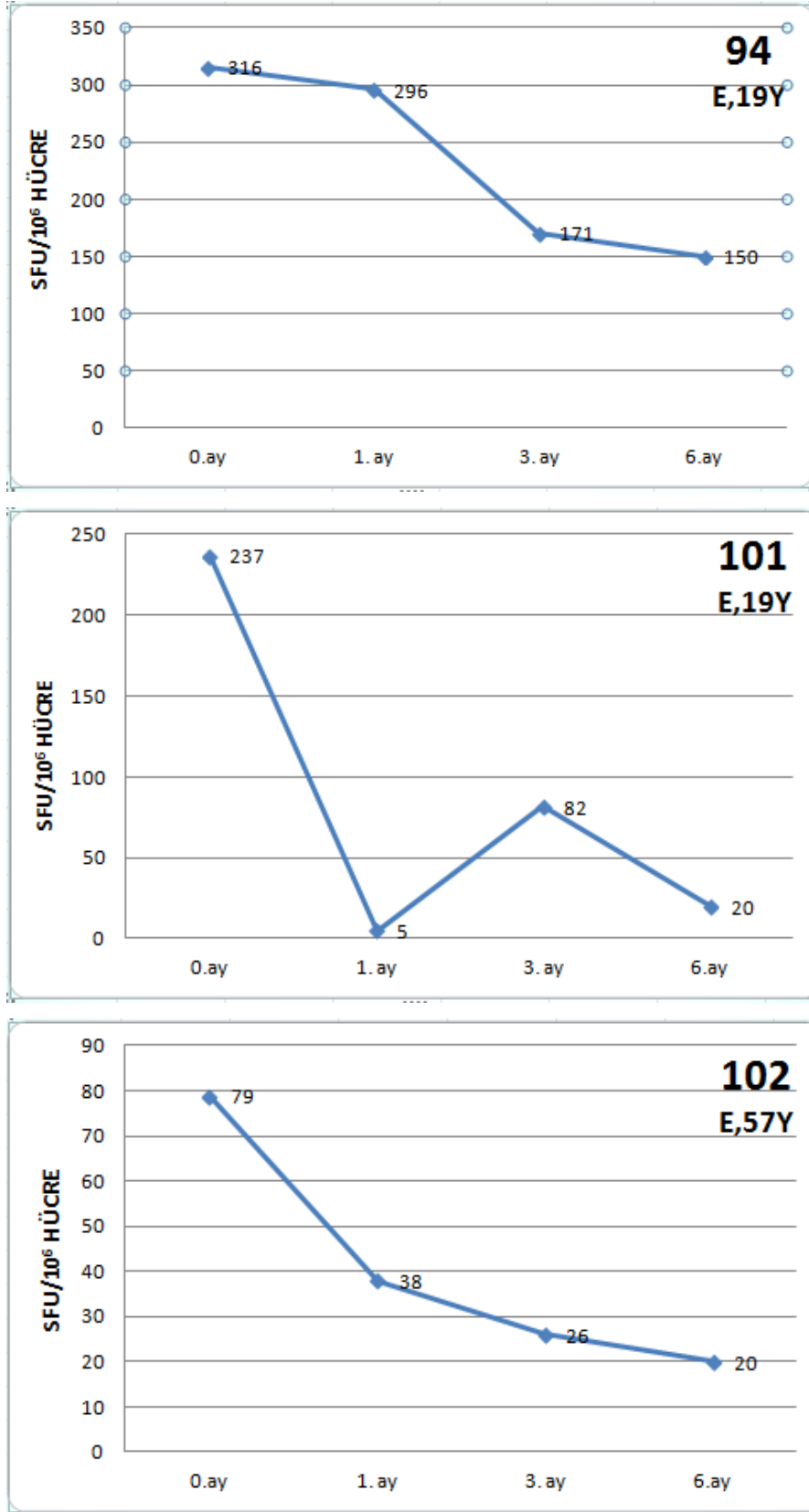
Şekil 4.2. (Devam). BKV reaktivasyonu görülmeyen hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtları.



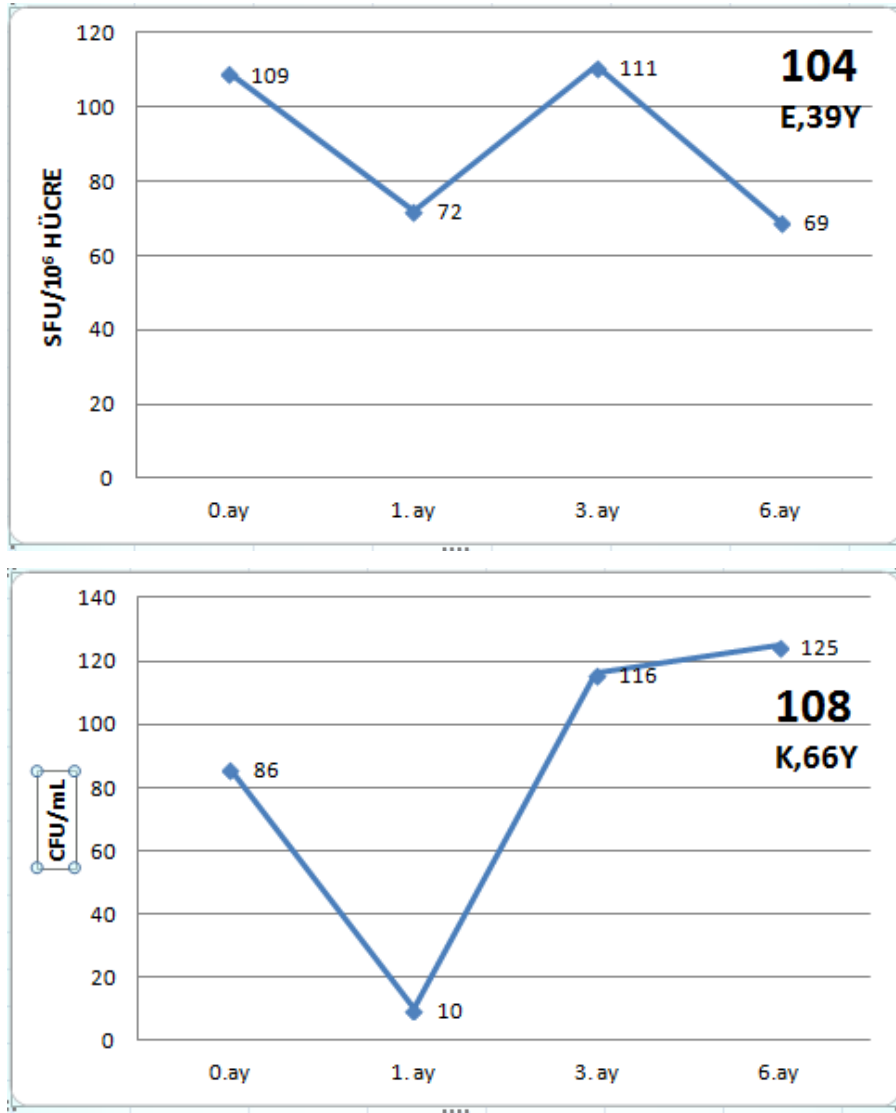
Şekil 4.2. (Devam). BKV reaktivasyonu görülmeyen hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtları.



Şekil 4.2. (Devam). BKV reaktivasyonu görülmeyen hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtları.



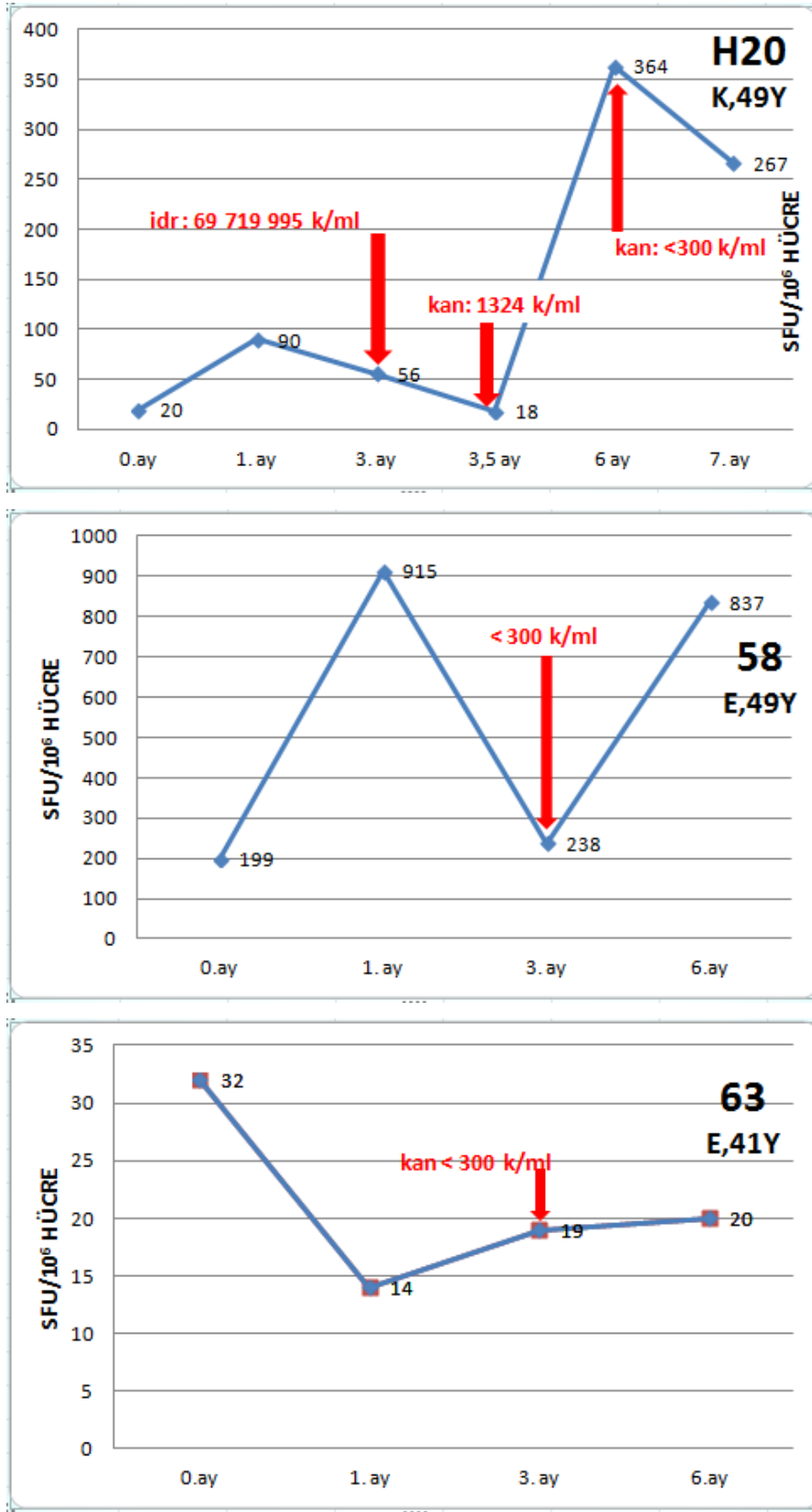
Şekil 4.2. (Devam). BKV reaktivasyonu görülmeyen hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtları.



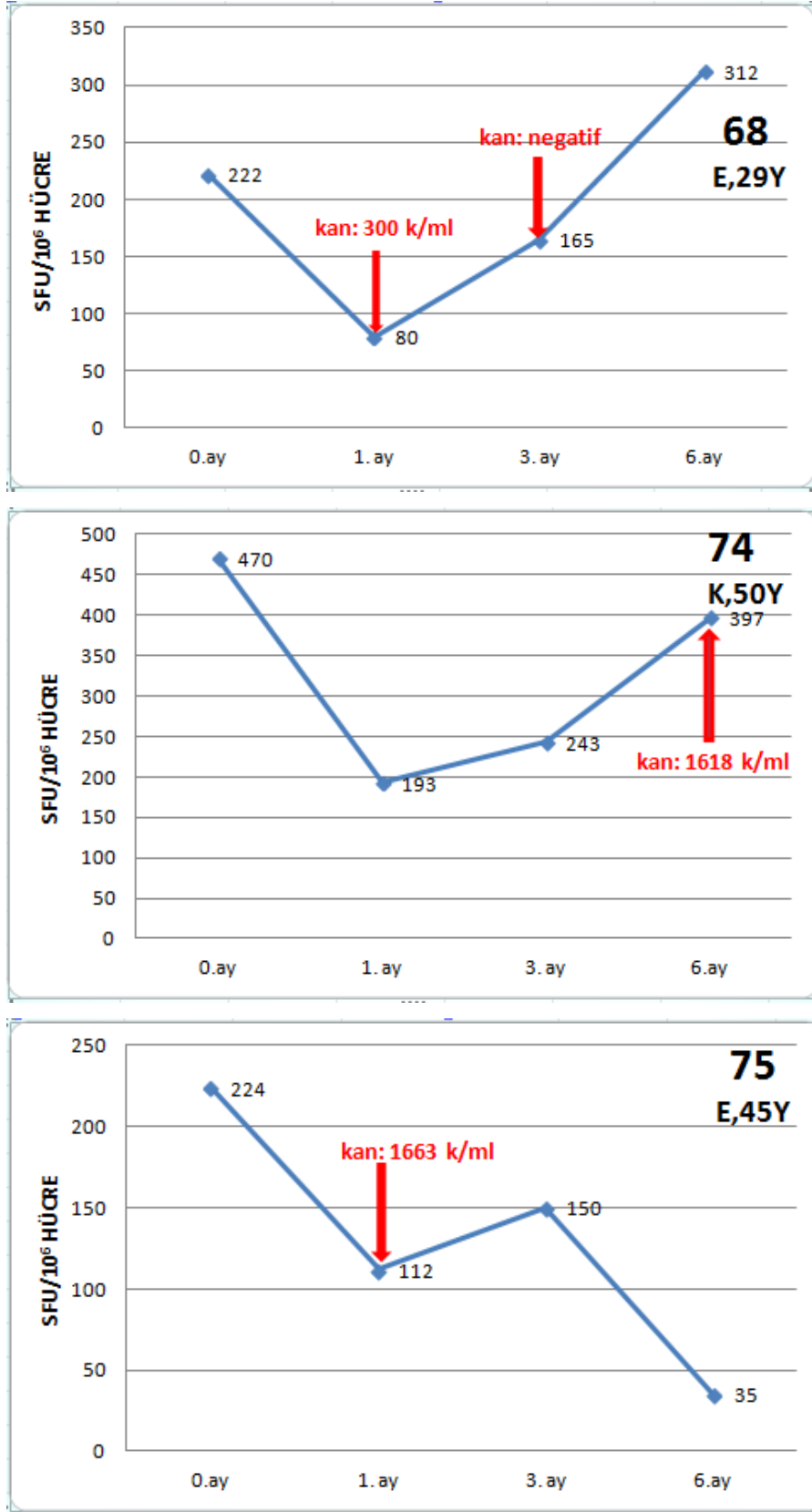
Şekil 4.2. (Devam). BKV reaktivasyonu görülmeyen hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtları.

İzlem süresince toplam 8 hastada (%25.8) BKV reaktivasyonu gelişti. Bu hastaların ikisi kadın, altısı erkekti.

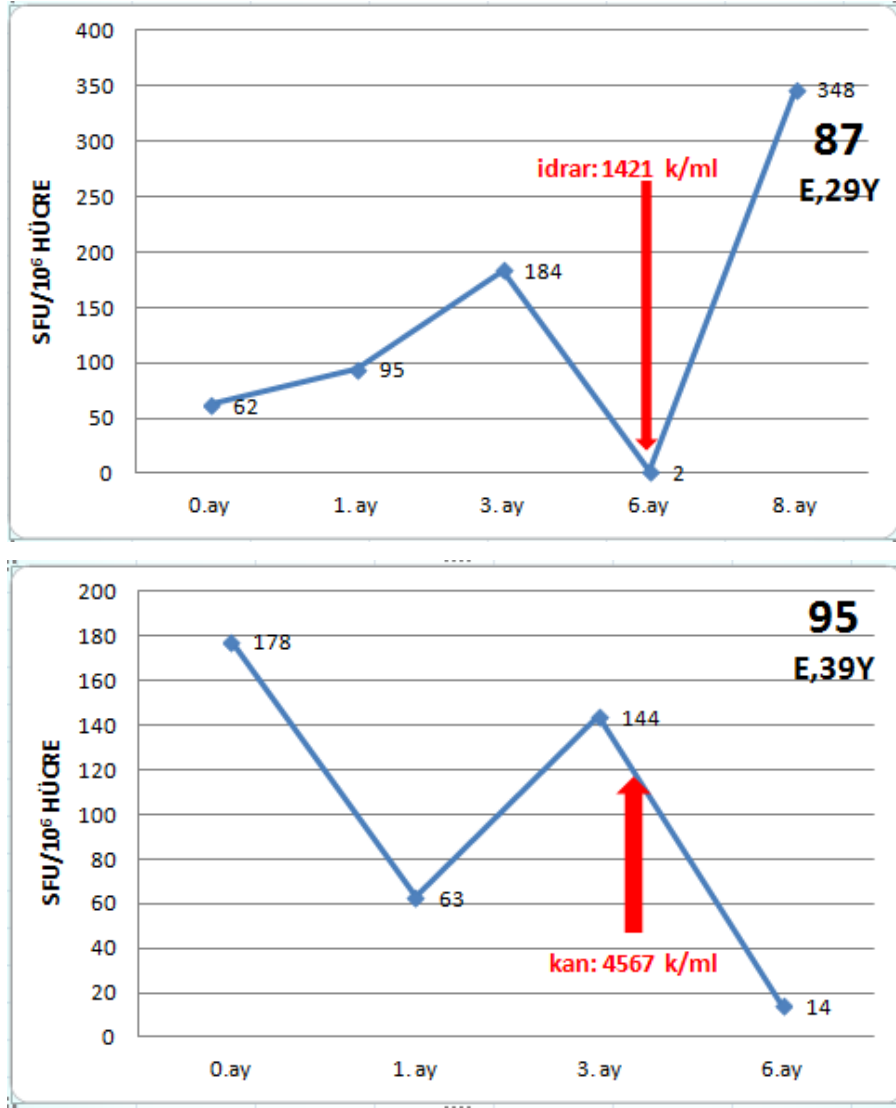
İzlemleri süresince BKV reaktivasyonu gelişen 8 hastanın sıfır, bir, üç ve altıncı aylardaki BKV spesifik IFN- γ yanıtları ayrı ayrı grafikler halinde şekil 4.3'te verilmiştir. Hastaların idrar veya kan BKV değerleri grafik üzerinde, ölçüldükleri aylarda kopya / mL cinsinden belirtilmiştir.



Şekil 4.3. BKV reaktivasyonu gelişen hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtları.



Şekil 4.3. (Devam) BKV reaktivasyonu gelişen hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtları.

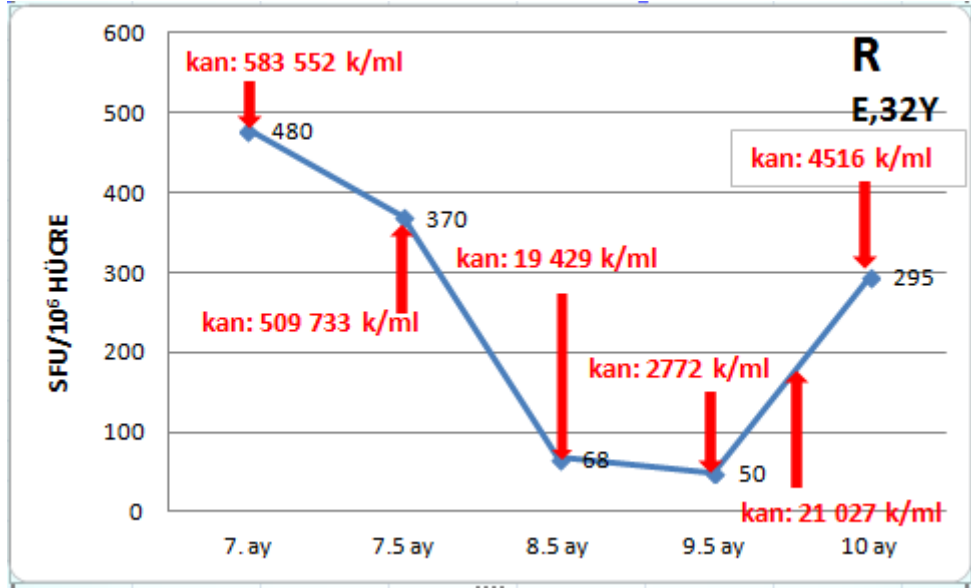


Şekil 4.3. (Devam) BKV reaktivasyonu gelişen hastaların BKV spesifik IFN- γ yanıtları.

H20 ve 68 no'lu hastaların reaktivasyon saptandıktan sonra da BKV DNA düzeyleri ölçülmüştür. H20 no'lu hastada reaktivasyon sonrası ölçülen BKV DNA düzeyi < 300 k/mL'nin altına düşmesi ile 68 no'lu hastada reaktivasyon sonrası viral temizlenmenin spot sayılarında artışla uyumlu olduğu gözlenmiştir. Reaktivasyon görülen diğer 6 hastada reaktivasyondan sonra BKV DNA düzeyleri ölçülmediğinden viral yük ile immün yanıt arasındaki ilişki değerlendirilememiştir.

İzlem hastalarından olmayan ancak böbrek naklinin ardından yedinci ayda BKV reaktivasyonu saptanan hastanın BKV spesifik immün yanıt düzeyleri şekil 4.4'te verilmiştir. Hastanın 7. ayda 583 552 k/mL olan viral yük düzeyi 7 ay 15 gün, 8 ay 15 gün ve 9 ay 15 gün sonraki ölçümlerde giderek düşüş göstermiş, reaktivasyon görülen

diğer 2 hastadan farklı olarak BKV spesifik immün yanıtta düşüş de bu duruma eşlik etmiştir. 9.5 aydan sonra T hücre yanıtında bu kez artış görülen hastanın 10. ayda BKV DNA düzeyinde azalma saptanmıştır.



Şekil 4.4. Reaktivasyon gelişen olgunun BKV spesifik immün yanıt düzeyleri.

BKV reaktivasyonu görülen ve görülmeyen hastaların yaş ortalamaları t testi ile karşılaştırılmıştır. BKV reaktivasyonu gelişen hastaların yaş ortalaması (35.47 ± 13.19), BKV reaktivasyonu görülmeyen hastaların yaş ortalamasından (41.63 ± 8.45) farklı bulunmamıştır (t testi, $p = 0.195$).

Hastaların tümüne kalsinörün inhibitörü + mikofenolik asit türevi + kortikosteroidden oluşan standart immün supresyon protokolü uygulanmıştır. Bunların 17'sinde ATG veya baziliximab'dan oluşan indüksiyon tedavisi uygulanırken, 14'üne indüksiyon tedavisi yapılmamıştır.

Hastaların indüksiyon tedavisi almalarının BKV reaktivasyonu gelişiminde etkili olup olmadığı araştırıldı. İndüksiyon tedavisi alan hastalarla, almayan hastalar arasında BKV reaktivasyonu gelişimi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (Ki-kare testi, $p=0.902$)

Hastalar HLA doku uyumu açısından iki gruba ayrıldı. Doku uyum sayısı 0,1 ve 2 olanlar doku uyumu düşük, 3, 4, 5 ve 6 olanlar doku uyumu yüksek olarak isimlendirildi. Doku uyum oranı düşük olan hastalarla ($n=4$, %40), uyumu yüksek olan hastalar ($n=4$,

%30,8) arasında BKV reaktivasyonu açısından, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Pearson ki-kare testi, $p = 0.545$).

Nakilden sonraki birinci ayda BKV reaktivasyonu gelişen hastaların ortalama kreatinin değerleri (2.0350 ± 0.3) ile reaktivasyon görülmeyen hastaların ortalama kreatinin değerleri (1.8833 ± 1.9) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmadı (Mann-Whitney U testi, $p = 0.711$).

Nakilden sonraki üçüncü ayda BKV reaktivasyonu gelişen hastaların ortalama kreatinin değerleri (1.3045 ± 0.4) ile reaktivasyon görülmeyen hastaların ortalama kreatinin değerleri (1.3556 ± 0.3) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmadı (Mann-Whitney U testi, $p = 0.620$).

Nakilden sonraki altıncı ayda BKV reaktivasyonu gelişen hastaların ortalama kreatinin değerleri (1.3688 ± 0.6) ile reaktivasyon görülmeyen hastaların ortalama kreatinin değerleri (1.376 ± 0.3) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmadı (Mann-Whitney U testi, $p = 0.620$).

5. TARTIŞMA

Son altmış yılda böbrek nakli son dönem böbrek yetmezliğindeki hastalar için yaşam kurtarıcı olmuştur ve diyalize bağımlı hayat süren kronik böbrek yetmezlikli hastaların yaşam süresini ve kalitesini arttırmıştır (131, 132). Böbrek nakli sonrası alloantijenlerin immün efektör hücreler tarafından tanınması sonucu akut ve kronik immün reaksiyonlar ortaya çıkar ve geçici veya kalıcı organ hasarı hatta organ kaybı oluşabilir. Son yıllarda çok güçlü immün supresif ilaçların kullanıma girmesiyle HLA doku uyumsuzluklarına rağmen, böbrek naklinde rejeksiyonlar azalmış ve greft sağkalımı artmıştır (6). Böbrek nakli sonrasında akut rejeksiyon nedeniyle hastaneye yatışlar azalırken, enfeksiyonlar nedeniyle yatış oranlarında artış olmuştur (133, 134). Enfeksiyonlar içinde viral enfeksiyonlar en sık görülürler ve morbidite ve mortalitenin önemli nedenidirler. Nakil hastası virusu eksojen olarak toplumdan, kan ürünlerinden, nakledilen organdan alır ya da latent viruslar reaktif olur (135). BKV, böbrek nakil hastalarında reaktivasyon sonucu ciddi sorunlara neden olabilen bir virustur. BKV seroprevalansı sağlıklı bireylerde %90'lara ulaşmaktadır. Genellikle erken çocukluk döneminde geçirilen ve asemptomatik seyreden primer enfeksiyonun ardından BKV böbrek ve ürotelyal hücrelerde latent olarak kalır (3, 4, 25). İmmün sistemi sağlam bireylerde %10-40 oranlarında klinik tabloya yol açmayan geçici virüsler görülebilir (5, 7, 40). BKV böbrek transplant hastalarında immün supresyonla birlikte kendi kendini sınırlayan reaktivasyonlara neden olabilir veya BKVN oluşturabilir. BKVN nakilden sonraki ilk yılda %1-10 oranında görülür, %50-90 oranında da allograft hasarına neden olur. Bu hastaların %50-90'ında greft kaybı gelişir (6). BKV replikasyonunun kalıcı olmasının greft kaybı olasılığını arttırdığı belirtilmektedir (136). Nakil sonrası oluşan BKV reaktivasyonu ilk olarak virüri şeklinde gözlenir. Yüksek düzey virüslerin (BKV yükü $> 7 \log_{10}$ genom ekivalan (geq) / ml) yaklaşık üçte birinde viremi ve BKVN gelişir (7). Geri kalanı herhangi bir tedavi gerektirmeksizin kendi kendini sınırlar. BKVN'in günümüzde bilinen bir antiviral ilaçla tedavisi bulunmamaktadır. Bilinen en etkin tedavi yöntemi immün supresyonun dozunun azaltılarak, immün yanıtın düzelmesini sağlamaktadır. İmmün yanıtta düzelme ile birlikte BKV enfeksiyonunda iyileşme görülmektedir. Öte yandan immün supresyonun gereğinden fazla azaltılması durumunda da hasta rejeksiyon riski ile karşı karşıya kalmaktadır (2).

BKVN gelişmesi durumunda hastalar genellikle renal fonksiyonda azalma dışında herhangi bir semptom vermezler (2, 41). Tanıda gecikme geri dönüşümü olmayan böbrek hasarı ve greft kaybına neden olabileceğinden tarama yöntemleriyle erken tanı ve tedavi önemlidir. BKV replikasyonunun taraması idrarda DH'lerin araştırılması, plazma ve idrarda BKV DNA kantitasyonu ile yapılmaktadır (7). DH'ler nükleer bazofilik inklüzyonlar içeren enfekte renal tübüler hücrelerdir. İdrarda DH'lerin görülmesi BKV reaktivasyonu olabileceğini gösterir ancak sağlıklı bireylerde de idrarla BKV atılımı olabileceğinden, tanıda sadece kantitatif sitolojik sonuçlar verildiğinde değerli olur. İdrarda DH'lerin saptanması özel deneyim gerektirdiğinden sadece deneyimi olan merkezlerde yapılabilir ve polyomavirusların türünü belirlemede yarar sağlamaz (26). Bu nedenle pek çok merkezde, ve bizim merkezimizde BKV taraması için plazma ve idrarda kantitatif olarak BKV yükü saptanmaktadır. 2013 yılında Hirsch ve ark. (7) tarafından önerilen tarama programına göre, hastalarda 1-3 ayda bir idrar BKV düzeyleri ile izlenmelidir. Virüri pozitif olduğunda plazma BKV düzeylerine bakılır. BKVN gelişimi açısından plazma viremi düzeyinin ne olması gerektiği konusu tartışmalıdır. Pek çok merkez tarafından 10^4 k/ml eşik değer olarak alınmasına rağmen, henüz laboratuvarlar arası bir standardizasyon bulunmadığından farklı laboratuvarlarda elde edilen aynı değerler eşit kabul edilmemelidir (42, 51, 62). Ayrıca aynı kopya sayısı farklı bireylerde farklı klinik tablo ile ilişkili olabilmektedir. Bugün artık bu farklılığın oluşumunda hastanın immün sisteminin en önemli etken olduğu bilinmektedir. BKV replikasyonu ve BKV spesifik hücresel immünite arasındaki dengenin bozulması BKVN'in patogenezinde rol oynayan ana faktördür. Tarama ve izlemde BKV yükünün saptanması BKV replikasyonunun doğru bir şekilde tanısını koydursa da konağın virusa karşı yanıtı hakkında bilgi vermediğinden, hastaların bireysel olarak değerlendirilmesi zordur. Bu nedenle BKV viral yük tayini ile birlikte BKV spesifik hücresel immün yanıtın ölçümü ve izlemi önerilmektedir (8-11, 74, 137).

Böbrek nakil hastalarında BKV enfeksiyonunun değerlendirilmesinde hücresel immün yanıtın değerli olabileceği ilk olarak Comoli ve ark. (138) tarafından öne sürülmüştür. 2003 yılında yayınladıkları çalışmada; insanlarda, sitotoksik T lenfositlerinin, inaktive BKV ile yüklenmiş otolog dendritik hücrelerle uyarılabildiğini göstermişler ve BKV seropozitif sağlıklı kontrollerden ve allograft alıcılarından izole edilen T lenfositlerinin, kültür ortamında, *ex vivo* olarak, tekrarlayan bir şekilde uyarıldığı bir yöntem geliştirmişler. Henüz BKV spesifik T hücre yanıtı ile ilgili bilgiler

sınırlı olduğundan ve immünojenik T hücre epitopları tanımlanmadığından, tüm virus lizatı ile yapılan bu uyarım şeklinin, BKV spesifik IFN- γ salgılayan T hücre sıklığını saptamak için ELISPOT deneyinde, dolayısıyla hücrel immünitinin değerlendirilmesinde kullanılabileceği öne sürülmüştür. Ancak BKV ile yüklenmiş dendritik hücrelerle yapılan tekrarlayan uyarımların naif lenfositlerde primer yanıtları da uyurabileceği düşünülerek, aynı araştırmacılar tarafından periferik kandaki BKV spesifik T lenfositlerin analiz anında kantitatif ölçümüne olanak sağlayan yeni bir yöntem geliştirilmiştir (9). Bu yöntemde, daha önceden işlem görmemiş PKMNH'leri inaktive BKV ile yüklenmiş dendritik hücrelerle uyurarak ELISPOT yöntemi ile çalışmışlardır. Araştırmacılar, 18 böbrek nakil hastasının BKV spesifik immün yanıtlarını retrospektif olarak değerlendirmişlerdir. BKV seropozitif 7 sağlıklı kontrolde BKV spesifik IFN- γ üreten T hücre sayısı ortalama $151 \text{ SFU}/10^6$ hücre (30-430) olarak bulunurken, BKV aktif enfeksiyonu olan ve böbrek fonksiyonları iyi olan (virüri + / viremi -) 6 hastada BKV spesifik lenfosit sıklığı sağlıklı kontrollerdekinden 2 log daha düşük ($5,5 \text{ SFU}/10^6$ hücre, 0-9), aktif enfeksiyonu olmayan BKV seropozitif 6 böbrek alıcısı (virüri - / viremi -) ile aynı aralıkta ($4 \text{ SFU}/10^6$ hücre, 0-9) saptanmıştır. BKVN tanısı almış 5 hastada ise (virüri + / viremi +) BKV spesifik T hücre yanıtı tanı anında saptanamayacak düzeyde bulunmuş, ancak 2 hastada immün supresyonun azaltılması sonrası BKV spesifik immünitinin tekrar yapılandığı belirtilmiştir. İmmün yanıtındaki bu artışın, renal doku veya plazmada viral temizlenme, idrar viral yükünde azalma ve renal fonksiyonun stabil hale gelmesi ile eş zamanlı olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında, BKV'ye karşı koruyucu immünitinin yokluğunun aktif BKV enfeksiyonu gelişimini ve BKVN'ye ilerlemesini kolaylaştırıcı etkisinin olabileceği sonucuna varılmıştır.

Hammer ve ark.'nın (128) araştırmaları farklı sonuçlar içermektedir. Uyarım amacıyla BKV'nin VP1 proteinini meydana getiren üst üste binmiş peptid havuzu (overlapping peptide pool – OPP) kullanılarak 15 böbrek nakil hastasının BKV spesifik CD4+ ve CD8+ T hücre sayıları akış sitometrik yöntemle araştırılmıştır. Araştırmacılar saptanabilir düzeyde T hücre yanıtı olan tüm hastaların plazma BKV yüklerinin $> 250 \text{ 000 k/mL}$ olduğunu bildirmişler ve yüksek düzey BKV yükünün BKV spesifik T hücre yanıtı ile uyumlu olduğu sonucuna varmışlardır. Bu çalışmanın ardından Binggeli ve ark. (139) editöre yazdıkları mektupta hem ELISPOT, hem de akış sitometrik yöntemin kullanıldığı 8 olguluk pilot bir çalışmada Hammer ve ark.'ın (128) elde ettikleri

sonuçların aksine, BKV spesifik T hücre yanıtı saptadıkları tüm hastaların BKV yüklerinin $< 250\ 000$ k/mL olduğunu ve plazma BKV düzeyi ile BKV spesifik hücresele immün yanıt arasında korelasyon saptamadıklarını bildirmişlerdir. Uyarım amacıyla VP1'in yanısıra LT antijeninin de kullanıldığı bu çalışmada, immün yanıtları saptanabilir düzeyde olan tüm hastaların 4-12 hafta içinde BKV düzeylerinde düşme olduğu gözlenmiştir.

Pilot çalışmanın ardından Binggeli ve ark. (11), 2007 yılında, VP1 ve LT antijenlerine spesifik yanıt akış sitometri ile daha ayrıntılı olarak incelemişler ve bir eşik değeri belirlemeye çalışmışlardır. BKV düzeyleri artan veya sabit kalan (önceki BKV düzeyi $> 10^4$ k/mL ve $< 1.5 \log_{10}$ oranında azalma olan) 17 BKV seropozitif böbrek nakli hastasının, önceki BKV pozitifliği olan (n:7) veya o andaki plazma BKV yükünde $> 1.5 \log_{10}$ azalma olan (n:13) böbrek nakil hastalarına göre daha düşük oranda VP1 ve LT'ye spesifik IFN- γ ürettiğini bulmuşlardır. VP1'e spesifik IFN- γ yanıtının, LT antijenine karşı oluşan yanıtın istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek ve CD4+ T hücreleri ile ilişkili olduğu bulunurken; LT antijeninin daha çok CD8+ T hücre yanıtı oluşturduğu saptanmıştır. Periferik kanda BKV spesifik hücresele immün yanıt ölçümünde VP1 antijenine spesifik oluşan IFN- γ yanıtının, LT antijenine göre daha erken saptanabildiği ve daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca LT için $69 \text{ SFU}/10^6$ hücre değeri eşik olarak alındığında plazma BKV yüklerinde $> 2 \log_{10}$ azalma olan daha fazla sayıda hasta saptanabilmiş ve ileride bir cut-off değeri belirlenirse, plazma BKV yükünün ve ELISPOT ile immün yanıtın tek zamanda ölçülmesinin BKVN riskini belirlemeye ve immün supresyonu yönlendirmeye yardımcı olabileceği yorumu yapılmıştır.

BKV spesifik hücresele immün yanıtın, immün supresyonun azaltılmasından sonra iyileştiği ve BKV'nin kandan temizlenmesi ve BKVN'in iyileşmesinin BKV spesifik immün yanıtta artışla paralellik gösterdiği, 2008 yılında Prosser ve ark.'nın (25) araştırmaları ile doğrulanmıştır. BKVN'si olan 8 hastanın LT peptid havuzu ile uyarım yapılarak ELISPOT yöntemi ile BKV spesifik immün yanıtlarını incelemişler ve olguların 5'inde spot sayılarında iyileşme sonrası 2 kattan fazla artış, 3'ünde ise hafif düzeyde artış saptamışlardır. Hafif düzeyde artış olan hastalarda; iyileşmenin çok hızlı olmasından dolayı, kanın virustan temizlenmesinden iki hafta sonra alınan kanda, T lenfosit yanıtlarında düşüş saptanmış olabileceği ; LT antijeni dışında VP1 gibi diğer

antijenlere karşı immün yanıt oluştuğu ve bu çalışmada saptanamamış olabileceği yorumu yapılmıştır.

Yukarıdaki çalışmalarda kullanılan VP1 ve LT antijenlerinin yanı sıra; immünojenik olduğu bilinen diğer üç BKV proteini VP2, VP3 ve st'nin de eklendiği ilk çalışma 2011 yılında Mueller ve ark. (8) tarafından yapılmıştır. Beş BKV peptidinin her biri ile yapılan uyarımın kullanıldığı çok renkli akış sitometri yöntemi ile BKVN'ye neden olan ciddi BKV enfeksiyonu öyküsü olan böbrek nakil hastaları ile geçici BKV reaktivasyonu olan veya reaktivasyon görülmeyen ve kontrol grubunu oluşturan hastaların hücresel immüniteleri tek bir zamanda yapılan analiz ile karşılaştırılmıştır. Ex vivo uyarım sonrası BKV seropozitif tüm böbrek nakil hastalarında tüm proteinlere spesifik T hücre yanıtının oluştuğu gözlenmiştir. Saptanabilir düzeyde VP3 spesifik T hücresi olan hasta sayısının BKVN öyküsü olan böbrek nakil hastalarında kontrol grubuna göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Her antijene spesifik immün yanıtın tek tek incelendiği bu çalışmada; BKVN öykülü hastalarda yanıt saptanabilen tek antijen VP3 olarak saptanırken (Bu gruptan iki hastada VP1'e, 5 hastada da LT'e spesifik yanıt gözlenmemiş), VP3'e yönelik oluşan yanıtın düzeyi diğer proteinlere karşı oluşan yanıttan daha fazla bulunmuştur. Diğer çalışmalarla paralel olarak, BKV reaktivasyonu olmayan sağlıklı kontrollerde düşük sıklıkta BKV spesifik T hücresi saptanırken, bu hücrelerin sıklığının önceki BKV enfeksiyonunun süresi ve şiddeti ile paralellik gösterdiği bulunmuştur (9, 11). Mueller ve ark. (8) ayrıca; daha yüksek oranda koruyuculuğa sahip olduğu düşünülen, aynı anda IFN- γ , IL-2 ve TNF- α gibi çeşitli sitokinler salgılayan polifonksiyonel T hücrelerinin varlığını da araştırmışlar ve her iki grupta da tüm BKV proteinlerine spesifik polifonksiyonel T hücreleri saptamışlar, saptanabilir düzeyde polifonksiyonel T hücre yanıtı olan hastaların geçici BKV reaktivasyonu olan grupta BKVN öyküsü olan gruba göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Tüm BKV antijenlerinin kullanıldığı diğer bir çalışma 2011 yılında Chakera ve ark. (10) tarafından yapılmıştır. BKV spesifik immün yanıtın ölçümünde, bu kez, enfeksiyonlarda ve aşılama hücresel immün yanıtı izlemede basit ve tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntem olan ELISPOT yöntemi kullanılmıştır. ve Mueller ve ark. (8) ile benzer sonuçlar elde etmişlerdir. BKV spesifik immün yanıt; tamamen iyileşmiş BKV enfeksiyonu olan böbrek nakil hastalarında, BKV reaktivasyonu gelişmeyen böbrek nakil hastaları ve sağlıklı kontrollere göre daha yüksek, henüz iyileşmemiş BKV

reaktivasyonu olan hastalarda ise azalmış olarak bulunmuştur. Her iki çalışmanın da sonucu olarak analizin sadece bir veya iki antijenle sınırlandırılmasının BKV spesifik hücrel immün yanıtı tümüyle yansıtmayabileceği ve anlamlı düzeyde BKV spesifik immün yanıtı olan hastaların %60'ına yakını saptayamayacağı bu nedenle optimum duyarlılık elde etmek için tüm antijenleri kapsayan bir analizin gerektiği belirtilmiştir (8, 10).

Schachtner ve ark. (68) 2011 yılında ELISPOT yöntemi ile BKV spesifik immüniteyi BKV reaktivasyonunun farklı evrelerinde analiz ederek, kendi kendini sınırlayan BKV reaktivasyonu olan ve BKVN olan böbrek nakil hastalarını ayırt edebilmeyi amaçlamışlardır. Diğer çalışmalarla paralel olarak BKV spesifik T hücrelerinin oluşmasıyla BKV reaktivasyonunun veya BKVN'in iyileşmesinin korele olduğu gösterilmiş ancak küçük bir grup BKVN'li hastada yapısal olmayan antijenlere karşı yanıt oluştuğu halde vireminin tamamen temizlenemediği gözlenmiştir. Bu hastalarda virusun allograftta kalış süresinin uzaması sonucu BKV spesifik T hücrelerinin istenmeyen sitotoksik etkiye neden olabileceği ve bu hastalarda immün supresyonun azaltılmasının zararlı olabileceğini belirtmişlerdir. BKV antijenlerinin tümünün kullanıldığı bu ölçüm yönteminde yapısal VP1, VP2 ve VP3 antijenlerinin duyarlı belirteç oldukları ve st ve LT antijenlerinden önce saptanabildiğini belirtmişlerdir. Kendi kendini sınırlayan BKV reaktivasyonu olan böbrek nakil hastalarının BKV reaktivasyonu görülmesinden sonra, immün supresyon azaltılmaksızın, 1 ay içinde BKV spesifik hücrel immünite geliştirdiklerini, BKVN'si olan hastaların ise 5 ay sonra VP1, VP2, VP3'e, 8 ay sonra da st ve LT'ye spesifik T hücre yanıtı geliştirdiklerini gözlemişlerdir. İyileşmede ve iyileşmeden 6 ay sonrasında BKVN'li böbrek nakil hastalarında kendi kendini sınırlayan BKV reaktivasyonu olan hastalara göre daha yüksek sayıda BKV spesifik T hücresi saptanmıştır. Tanı anında BKV spesifik immün yanıt açısından her iki grupta da bir fark görülmemesine rağmen, tanıdan bir ay sonra immün supresyon azaltılmadan, kendi kendini sınırlayan BKV reaktivasyonu olan hastalarda BKV spesifik T hücre sayısının arttığı ve bu artışa BKV reaktivasyonunun iyileşmesinin eşlik ettiği gözlenerek, bu veriler ışığında, BKV spesifik hücrel immünitenin BKV reaktivasyonunun ardından 1-3 ay izlenebileceği, BKV spesifik T hücre yanıtının gelişmesinin kendi kendini sınırlayan BKV reaktivasyonu açısından iyi bir prognostik belirleyici olabileceği, tam tersi durumun ise BKVN'ye ilerleme riskini belirlemede kullanılabilecek bir parametre olduğu yorumu yapılmıştır.

Trydzenskaya ve ark. (74) BKV spesifik hücresel immün yanıtın değerlendirilmesi amacıyla ex vivo stimülasyonda yeni bir yaklaşımda bulunmuşlardır. Daha önceki çalışmalarda uygulanan, beş proteine spesifik immün yanıtın ayrı ayrı ölçümünün zaman alıcı ve yüksek maliyetli olduğu ve daha fazla hacimde kan gerektirdiği, ayrıca tek tek antijenlere spesifik yanıtların saptama eşik değerlerinin düşük olmasından dolayı, çoğu BKV seropozitif sağlıklı donörde BKV spesifik T hücrelerinin saptanamayacak düzeyde olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle, uyarımda kullanılmak üzere tüm peptidlerin bir araya getirildiği bir peptid havuzu (MOPP) oluşturulmuştur. Akış sitometri yöntemi ile CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtlarının değerlendirilmesinde hızlı ve duyarlı bir yöntem geliştirilmesinin hedeflendiği bu çalışmada, tek BKV antijeni ile uyarıma göre MOPP ile uyarım sonrası BKV spesifik CD4+ ve CD8+ T hücre ile polifonksiyonel (IFN- γ , IL-2, TNF- α salgılayan) T hücre yanıtının şiddetinde artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca MOPP ile uyarımda saptanabilir düzeyde BKV spesifik CD4+ ve CD8+ T hücresi olan hasta sayısının da arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, 5 BKV antijeninin bir arada olduğu bu yeni uyarım şekli kullanılarak akış sitometri ile BKV spesifik hücresel immün yanıtın ölçülmesinin kolay, duyarlı ve güvenilir bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

Böbrek nakli sonrası hastaların BKV spesifik immünitesinin prospektif olarak izlendiği ilk çalışma 2013 yılında Schachtner ve ark. (137) tarafından yayınlanmıştır. Reaktivasyon gelişen 12 böbrek nakil hastası ile reaktivasyon gelişmeyen 17 hastanın sırasıyla nakilden +1 hafta, +1ay, +2 ay, +3 ay, +6 ay, +9 ay, +12 ay sonra alınan periferik kan örneklerinin 5 BKV antijeni ile uyarımı sonrası BKV spesifik T hücre yanıtları ELISPOT yöntemi ile incelenmiş, beraberinde inflamatuvar yanıtı değerlendirebilmek amacıyla IFN- γ inducible protein (IP-10), çözünür intersellüler adezyon molekülü-1 (sICAM-1), çözünür vasküler hücre adezyon molekülü-1 (sVCAM-1) ELISA yöntemi ile ölçülmüş. Nakil sonrası BKV replikasyonu gelişen 12 nakil hastasının BKV spesifik T hücre sayısı 1. haftada saptanamayacak veya düşük düzeyde iken, replikasyonun gerilemesiyle yükselmiş bulunmuştur. Her iki grupta da nakil sonrası 1. hafta ve 1. ayda BKV spesifik T hücre sayılarında anlamlı fark görülmemiş, 2, 3, 6, 9 ve 12. aylarda yapısal BKV proteinlerine (VP1, VP2, VP3) spesifik T hücre yanıtı reaktivasyon görülen grupta daha fazla saptanmıştır. Aktive T hücresi, NK hücreleri ve monositler için kemotaktik olduğu ve viral enfeksiyonlara karşı Th1 yanıtının gelişiminde gerekliliği gösterilen IP-10'un BKV replikasyonu sırasında artış gösterdiği, BKV replikasyonunun gerilemesiyle normal düzeylerine düştüğü gözlenmiştir. Bu

çalışmanın kısıtlılıkları olarak hastaların transplantasyon öncesi BKV spesifik immün yanıtlarının bilinmemesi ve BKV replikasyonu görülen hasta sayısının az olması gösterilmiştir. BKV spesifik immünitinin izleminin BKV replikasyonu açısından iyi bir prognostik parametre olduğu bu çalışmada da kanıtlanmış ancak tüm böbrek nakil hastalarında erken dönemde BKV replikasyonu açısından risk belirlenmesinde kullanılabileceğine ilişkin kanıt elde edilmemiştir.

BKV spesifik immün yanıtın ölçümünde akış sitometri ve ELISPOT olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır. ELISPOT yöntemi bir milyonda bir hücreyi saptayabilen duyarlı, BKV spesifik T hücre yanıtını belirlemede basitliği, güvenilirliği ve yüksek tekrarlanabilirliği kanıtlanmış bir yöntemdir. ELISPOT yöntemi ile en fazla iki parametre araştırılabildiğinden; BKV spesifik hücrel immünitinin ölçümünde IFN- γ üreten T hücre sıklığı araştırılmaktadır. (9, 10, 67, 68, 137). Akış sitometrik yöntemle IFN- γ yanıtının yanı sıra lenfosit fenotipleri ve diğer sitokinler hakkında da fikir edinilmektedir. (8, 11, 74). Binggelli ve ark. (11) akış sitometri ile VP1 antijenine karşı yanıtın daha çok CD4+, LT'e spesifik yanıtın ise CD8+ T hücreler tarafından oluşturulduğunu yayınlamışlardır. Mueller ve ark. (8) ise BKV spesifik hücrel immünitede CD4+ T hücre yanıtının daha baskın olduğunu, geçirilen BKV enfeksiyonunun şiddetinin CD4+ T hücre sıklığı ile korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Akış sitometrik yöntemle ayrıca, BKV enfeksiyonunda koruyuculuk değerinin daha yüksek olduğu düşünülen polifonksiyonel hücrelerin varlığı da saptanabilmektedir (8, 74). Aynı anda çok sayıda örneği çalışmaya olanak verdiği, maliyeti akış sitometrik yöntemle göre daha ucuz olduğu ve IFN- γ yanıtının BKV spesifik hücrel immüniteyi yansıttığı düşüncesiyle çalışmamızda ELISPOT yöntemini kullanmanın uygun olduğunu düşündük.

ELISPOT deneyinde, uyarım amacıyla immünojenik olduğu kanıtlanan 5 BKV antijenini de kullandık. Trydzenskaya ve ark.'nın (74) da belirttiği gibi antijenlere spesifik yanıtların tek tek araştırılması zaman alıcı ve pahalı olacaktır. Ayrıca hastalardan alınan kan miktarı yeterli olmayabilirdi. Bu nedenle tüm antijenleri bir araya getirerek bir peptid kokteyli oluşturduk. ELISPOT deneyinde, peptidlerin her birinin konsantrasyonu, kokteyl halinde veya tek tek kullanıldıkları araştırmaları değerlendirerek optimize ettik (8, 68, 69, 74). Çalışmamızda peptid kokteyli kullanmamızın bir diğer nedeni, BKV spesifik hücrel immün yanıtın değerlendirilmesinde maksimum duyarlılık elde etmektir. Beş BKV antijeninin

kullanıldığı çalışmalarda; BKV reaktivasyonu öyküsü olmayan veya analiz anında kalıcı viral replikasyonu olan veya BKVN olan böbrek nakil hastalarında BKV spesifik T hücrelerinin saptanamayacak düzeyde olduğu ve BKV enfeksiyonu sonrası iyileşme döneminde VP1, VP2 ve VP3'e spesifik yanıtın st ve LT antijenine yönelik oluşan yanıtın daha önce saptanabilir düzeye geldiği belirtilmiştir (8, 10, 68, 137). Mueller ve ark. (8) ciddi BKVN öyküsü olan ve VP3 antijenine karşı yanıt elde edilen 7 böbrek nakil hastasının 5'inde, LT'ye, 2'sinde VP1'e yanıt saptamamışlardır. Biz, araştırmamızda bazı antijenlere spesifik yanıtın analiz anında henüz oluşmamış olabileceği nedeniyle, BKV spesifik immün yanıtındaki gelişmeyi saptayamama olasılığını ortadan kaldırmayı hedefledik ve bu nedenle, BKV spesifik immün yanıtındaki iyileşmeyi bütünüyle yansıtabilmesi amacıyla peptid kokteyli kullanmanın daha uygun olacağını ön gördük.- Peptid kokteyli ilk olarak Trydzenskaya ve ark. (74) tarafından 2011 yılında akış sitometrik yöntemle BKV spesifik CD4+ ve CD8+ T hücrelerini saptamada kullanılmıştır. Bizim çalışmamız peptid kokteyli ile uyarımın ELISPOT yönteminde kullanıldığı ilk çalışmadır.

BKV enfeksiyonunun prognozunda belirleyici olabilmesi amacıyla hücresel immün yanıtın tek bir zamanda ölçümünden çok belli aralıklarla çalışılması dolayısı ile virolojik ve immünolojik monitörizasyon yapılmalıdır.- Böbrek nakil hastalarının, nakil sonrası immün yanıtlarının izlendiği ilk ve tek çalışma Schachtner ve ark. (137) tarafından 2013 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmada 29 böbrek nakil hastasının nakilden sonra sırasıyla 1. hafta, 1., 2., 3., 6., 9. ve 12. aylarda BKV spesifik T hücre sayıları ELISPOT yöntemi ile değerlendirilmiştir. İzlenen 29 hastanın 12'sinde idrarda veya plazmada BKV replikasyonu görülmüş olup, virüri ve viremi prevalansları sırasıyla % 41 ve % 14 olarak bulunmuştur. 12 hastanın 8'inde BKV replikasyonu kısa sürede iyileşmiş, 4'ünde 6 aydan daha uzun sürmüş, bu hastalarından ikisinde halen viremi devam etmekte iken, birinde de ilerleyen zamanda biyopsi ile BKVN geliştiği kanıtlanmıştır. Onyediyedi hastada izlem süresince BKV reaktivasyonu gelişmediği, BKV replikasyonu gelişen tüm hastaların 1. hafta örneklerinde BKV spesifik T hücre sayısı saptanamadığı veya düşük düzeyde olduğu belirtilmiştir. Viremleri halen devam etmekte olan 2 hastada BKV spesifik T hücreleri izlem boyunca saptanabilecek düzeye ulaşmamıştır. Reaktivasyonun kendi kendini sınırladığı hastalarda iyileşme ile birlikte BKV spesifik immün yanıtın anlamlı olarak yükseldiği gözlenmiştir. Replikasyon görülmeyen 17 hastada ise 1. haftada BKV spesifik T hücre yanıtı düşük veya

saptanamayacak düzeyde bulunmuştur. Her iki grubun da 1. hafta ve 1. ay BKV spesifik T hücre yanıtları arasında anlamlı fark görülmemiş ancak 2, 3, 6, 9 ve 12. aylarda yapısal BKV proteinlere karşı oluşan immün yanıt reaktivasyon gelişen grupta anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada hastaların nakil sonrası erken dönemdeki BKV spesifik hücresel immün yanıtlarının BKV reaktivasyonu açısından yeterince bilgi vermediği, reaktivasyon görülen hasta sayısının daha fazla olduğu ve hastaların transplantasyon öncesindeki immün yanıtlarının da göz önünde bulundurulduğu ileri çalışmalara gereksinim olduğu belirtilmiştir.

Bizim araştırmamız, literatür taramamıza göre böbrek nakil hastalarının prospektif olarak izlendiği ikinci çalışmadır. Otuzbir böbrek nakil hastası nakilden sonra 6. aya dek izledik. Olguların, nakil öncesinde ve nakilden sonraki 1., 3. ve 6. aylardaki BKV spesifik immün yanıtlarını değerlendirdik. Schachtner ve ark.'ın (137) çalışmasından farklı olarak biz 1. haftada, 2. ayda, 9. ayda ve 12. ayda BKV spesifik T hücre yanıtlarını değerlendirmedik. İzlem aralığımız daha genişti ve 6. aya dek izlem yaptık. Ayrıca biz ek olarak nakil öncesi immün yanıtları da değerlendirmeye aldık.

Çalışmamızda toplam 8 hastada (% 25.8) izlem sırasında reaktivasyon gelişti. Ancak idrar ve plazma BKV yükleri rutin istemlere dahil olduğundan ve tüm hastalarda kontroller sırasında düzenli istem yapılmadığından, bazı hastaların BKV spesifik immün yanıt ölçümleriyle eş zamanlı BKV DNA değerleri bulunmamaktadır. Ayrıca izlem aralığımız geniş olduğu için kontrol aralarında, bizim saptayamadığımız kendi kendini sınırlayan reaktivasyonları kaçırmış olabiliriz. Tüm bu nedenlerden dolayı replikasyon görülen hasta sayısını olduğundan daha az saptamış olabiliriz.

Çalışmamızda 4 sağlıklı verici ile bir kontrol grubu oluşturuldu. Bu kişilerin seropozitif olup olmadıkları bilinmiyordu. BKV'nin toplumdaki %90'a varan seroprevalansı ve ELISPOT deneyinde elde edilen spot sayıları göz önünde bulundurularak kontrol grubunu oluşturan vericilerin seropozitif oldukları düşünüldü. Kontrol grubu ile hastaların nakil öncesi, immün supresif tedaviye başlamadan ölçülen IFN- γ salgılayan T hücre sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Tüm hastalarda BKV spesifik immün yanıtı saptanabilir düzeyde bulduk. İzlem sırasında reaktivasyon gelişen ve reaktivasyon görülmeyen grubun nakil öncesi IFN- γ yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Bu durum, çalışmamızdaki hasta sayısının azlığından kaynaklanabilir. İzlem aralığının geniş olması ya da BKV DNA yükünün bakılmamış olması nedeniyle; reaktivasyon gelişmediğini

düşündüğümüz grup içinde fark etmediğimiz reaktivasyon gelişmiş hastalar olabilir. Bir diğer olasılık ise her iki grup arasında BKV spesifik T hücre yanıtları arasında fark görülmemesinin beklenen bir durum olmasıdır. Çalışmamız sırasında BKV spesifik T hücre yanıtlarının çok geniş bir aralıkta dağılım gösterdiğini, bireysel farklılıklar sergilediğini gözlemledik. Bu nedenle hastaların tek ölçüm değerlerinden çok immün yanıtlarının belirli bir zaman aralığında izlenmesinin daha yararlı olacağını düşünüyoruz.

Tüm aylarda elde edilen ortalama spot sayılarının diğer aylarla karşılaştırması yapıldığında; birinci aydaki spot sayılarının ortalamasının nakil öncesi, üçüncü ve altıncı aya göre daha düşük olduğunu saptadık. Merkezimizde hastalara en yoğun immün supresyon ilk 1 ayda uygulanmakta, 1. aydan sonra immün supresif ilaçların dozu azaltılmaktadır. Ortalama spot sayılarının 1. ayda en düşük olmasının, hastaların immün supresyon düzeyleri ile ilişkili olduğunu düşünüyoruz. İmmünsupresyonun azaldığı 3.ve 6.aylarda, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da BKV spesifik immün yanıtın belirteci olan ELISPOT spot sayılarında artış saptadık.

Hastaların 6 aylık izlem süresince immün yanıtlarındaki değişiklikler incelendiğinde bireysel farklılıklar gösterdiğini gözlemledik (Şekil 4.3, şekil 4.4). Reaktivasyon gelişen hastalarda reaktivasyon anında genellikle BKV spesifik immün yanıtta düşüş meydana gelirken, BKV yükündeki azalma ile immün yanıtın artışının paralellik gösterdiği izlenmiştir.

İzlem hastası olmayan ancak böbrek nakli sonrası yedinci ayda BKV reaktivasyonu saptanan bir olguyuda araştırmamız sürecinde çalıştık. Olgunun reaktivasyon sonrası 2.hafta, 1.ay, 2.ay ve 4.aylarda BKV spesifik T hücre yanıtını değerlendirdik. Hastanın 2. hafta, 1. ay ve 2. ay plazma BKV yüklerinde düşüş görülürken, BKV spesifik immün yanıtta artışın eşlik etmediği, tersine immün yanıtta da düşüş gerçekleştiği gözlenmiştir. İkinci aydan sonra hastanın plazma BKV yükü tekrar yükselmiş ancak beraberinde immün yanıtın da artmaya başlamış olduğu görülmüştür. 4. ayda immün yanıtta artış devam etmiş ve plazma BKV yükü azalmıştır. Hastanın halen BKV reaktivasyonu devam etmektedir. Bu hastada reaktivasyonun seyri, sadece BKV DNA yükünün araştırılmasının, hastada enfeksiyonun kliniği ile ilgili yeterli bilgi vermeyeceğini göstermektedir. Bazı BKVN olan hastalarda virusun allograftta kalış süresinin uzaması sonucu BKV spesifik T hücrelerinin allograftta istenmeyen sitotoksik etkiye neden olabileceği, bu hastalarda immün supresyonun azaltılmasının zararlı olabileceği öne sürülmüştür (138). İmmün supresyonun dozu nakil sonrası standart

şekliyle azaltılmaya devam edilen bu hastada benzer durumun söz konusu olabileceği ve bu gibi hastalarda BKV DNA yükü ile birlikte BKV spesifik hücrel immün yanıtın değerlendirilmesinin, BKV reaktivasyonunun prognozu hakkında fikir vermesinin yanı sıra, tedavinin düzenlenmesi ve takibinde de yardımcı olacağını vurguluyoruz.

Çalışmamızda hastaların cinsiyetleri, yaşları, indüksiyon tedavisi alıp almamaları ve doku uyumları ele alındığında reaktivasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu durum Schachtner ve ark.'ın (137) yaptıkları ve hasta sayılarının benzer olduğu çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda; hastaların tümünde BKV antijenlerine spesifik immün yanıt saptadık. Beş BKV antijeninin bir araya getirilmesiyle oluşturulan peptid kokteyli ile uyarım yapılarak uygulanan ELISPOT yönteminin hastaların BKV spesifik immün yanıt ölçümünde kullanılabilecek, güvenilir ve kolay uygulanabilir bir yöntem olduğunu ve organ nakli yapılan merkezlerde laboratuvarların söz konusu yöntemi uygulamaları gerektiğini düşünüyoruz.

Hastalarımızın BKV spesifik T hücre sayıları bireysel farklılıklar gösterdiğinden; BKV replikasyonu açısından risk altında olan hastaların sadece nakil öncesi hücrel immün yanıtlarına bakılarak belirlenebileceğine ilişkin veri elde edilmedi. İzlemleri boyunca hastaların genellikle BKV spesifik immün yanıtlarının reaktivasyon anında düştüğü, immün yanıtta artışın viral yükte azalma ile korele olduğu görüldü.

Organ nakil merkezlerinde böbrek nakil hastalarının idrar ve kanda BKV DNA yükleri ile birlikte, BKV spesifik immün yanıtlarının, ELISPOT yöntemi ile, reaktivasyon gelişikten sonra daha sık olmak üzere, belirli aralıklarla izlenmesi, BKVN gelişimini önleyecektir. BKV spesifik hücrel immünitenin izlemi, BKV reaktivasyonunun prognozu ile ilgili ön tahminde bulunmamıza, özellikle reaktivasyon sonrası hücrel immün yanıtın olmaması veya azalması gibi yüksek riskli durumları saptayarak reaktivasyondan BKVN'ye progresyon gösterebilecek hastaları saptamada yararlı olmaktadır. Ayrıca bu yöntemle yapılan ölçümlerin BKVN'li hastalarda immün supresif tedavi dozlarını ayarlama rehber olabilecektir. Bu şekilde BKVN'in kontrolü için yeterli sayıda BKV spesifik T hücre oluşumunu sağlamak üzere immün supresyonun optimal düzeyde azaltılması ve greftin korunması için immün supresyonun uygun düzeyde kalması sağlanmış olacaktır. Elde edilen veriler ışığında maliyet etkin bir immünolojik izlem protokolü geliştirilmesi uygun olacaktır. Nakil öncesi elde edilen immünolojik yanıtların BKV reaktivasyonu açısından risk belirlemede yeri olup

olmadığını anlamak için ise daha fazla sayıda hasta serileri ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

6. SONUÇLAR

1. Transplant hastalarında BKV enfeksiyonunun değerlendirilmesinde virolojik yanı sıra immünolojik izlem gereklidir.
2. BKV spesifik IFN- γ yanıtı ölçümünde kullanılan yöntemlerden biri olan ELISPOT yönteminde, BKV antijenini bir araya getirerek oluşturulan peptid kokteyli kullandık. Literatür taramamıza göre, peptid kokteyli kullanarak ELISPOT yöntemi ile BKV spesifik hücrel immün yanıtın araştırıldığı ilk çalışmayı gerçekleştirdik.
3. BKV hücrel immünitenin izleminde araştırmamızda kullandığımız ELISPOT yönteminin kolay uygulanabilir, güvenilir bir yöntem olduğunu saptadık.
4. Hastaların nakil öncesi ve sonrası 1, 3 ve 6. aylardaki örneklerinde BKV spesifik IFN- γ yanıtı saptanabilir düzeyde idi.
5. BKV spesifik IFN- γ düzeyi, immün supresyonun en yoğun olduğu 1. ayda en düşük düzeyde bulundu.
6. İzlem sırasında sekiz hastada BKV reaktivasyonu saptandı.
7. Hasta grubumuzda BKVN gözlenmedi.
8. BKV spesifik immün yanıtın bireysel farklılıklar sergilemesinden dolayı tek ölçüm değerlerinden çok belirli bir zaman aralığında yapılan izlem değerlerinin gerekli olduğu sonucuna vardık.

7. ÖZET

RENAL TRANSPLANT HASTALARINDA BKV SPESİFİK İMMÜN YANITIN ELISPOT YÖNTEMİ İLE ÖLÇÜLMESİ

BKV, böbrek nakil hastalarında geri dönüşü olmayan allograft hasarına neden olabilen en sık viral etkenlerden biridir. BKV seroprevalansı sağlıklı bireylerde %90'lara ulaşmaktadır. Asemptomatik seyreden ve genellikle erken çocukluk döneminde geçirilen primer enfeksiyonun ardından BKV böbrek ve ürotelyal hücrelerde latent olarak kalır. İmmün sistemi sağlam bireylerin %10-40'ında reaktivasyon ve asemptomatik virüriler görülebilir. BKV böbrek transplant hastalarında immün supresyonla birlikte kendi kendini sınırlayan reaktivasyonlara neden olabilir veya BKVN oluşturabilir. BKVN nakilden sonraki ilk yılda hastaların %1-10'unda görülür ve bu hastaların %50-90'ında greft kaybına neden olur.

Çalışmamızda Prof. Dr. Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Enstitüsünde böbrek nakli yapılan 31 olgudan nakilden önce ve nakli takiben +1 ay, +3 ay ve +6 ay sonra kan örnekleri alındıktan sonra PKMN izole edildi ve saklandı. PKMN'de BKV spesifik T hücre sıklığı ELISPOT yöntemi kullanılarak araştırıldı. Hastaların plazma veya idrar BKV viral yük tayinleri gerçek zamanlı PZR ile ölçüldü. Nakilden sonra 7. ayda reaktivasyon gelişen bir hasta da çalışmaya dahil edildi ve reaktivasyon sonrası toplam 4 kez BKV spesifik T hücre yanıtları ölçüldü.

Çalışmaya dahil edilen hastaların tüm örneklerinde BKV spesifik T hücre yanıtı ölçülebilir düzeyde bulundu. Kontrol grubunun ortalama spot sayıları ile hastaların transplantasyon öncesi elde edilen spot sayıları arasında anlamlı fark saptanmadı. Hastaların BKV spesifik immün yanıtları karşılaştırıldığında, yanıtın immün supresyonun en yoğun olduğu 1. ayda en düşük olduğu saptandı. İzlem sırasında reaktivasyon gelişen hastalarla; reaktivasyon gelişmeyen hastaların nakil öncesi spot sayıları arasında fark gözlenmedi. İzlem süresince 8 hastada reaktivasyon gelişti. Reaktivasyon gelişen ve BKV DNA'ları 2 ve 3 kez bakılan 2 hastada reaktivasyon zamanında BKV spesifik T hücre yanıtının düştüğü ve immün yanıtta artışın BKV viral yükünde azalma veya temizlenme ile uyumlu olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, böbrek nakil hastalarında idrar veya kanda BKV DNA yükleri ile eş zamanlı olarak, BKV spesifik immün yanıtın ELISPOT yöntemi kullanılarak

izlenmesinin, BKV reaktivasyonunun prognozu ile ilgili ön bilgi verebileceği böylece BKVN gelişiminin önlenebileceği ve tedavi sırasında immün yanıtta oluşan değişikliklerin değerlendirilebileceği düşünölmektedir.

Anahtar sözcükler: BKV, Böbrek Nakli, Hücreseİ İmmünite, ELISPOT.

8. ABSTRACT

MEASURING OF BKV SPECIFIC IMMUNE RESPONSE BY ELISPOT METHOD IN RENAL TRANSPLANT PATIENTS

BKV is one of the most frequent viral agents causing irreversible allograft failure in kidney transplant patients. The seroprevalence of BKV reaches up to 90% in healthy population. After primary infection which is asymptomatic and occurs generally in early childhood, BKV remains latent in renal and urothelial cells. In 10-40% of immunocompetent individuals, reactivation and asymptomatic viruria can be seen. In renal transplant patients, BKV can cause self limited BKV reactivation or BK virus nephritis. After renal transplantation, BKV nephritis occurs in 1-10% of patients and leads to graft loss in 50-90% of them.

In our study, after blood samples from 31 cases who had renal transplantation in Prof. Dr. Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Enstitüsü were collected before transplantation and +1, +3, +6 months following transplantation, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated and cryopreserved. In PBMC, BKV specific T cell frequency was analyzed by using ELISPOT method. Plasma or urine viral loads of patients were measured by real time PCR. A patient who developed reactivation 7 months after transplantation was included in the study and BKV specific T cell responses were measured 4 times in total after reactivation.

All the samples from patients included in the study had detectable levels of BKV specific T cell response. Mean spot numbers obtained from the patients prior to transplantation were not significantly different from the mean spot numbers of the control group. When BKV specific immune responses of patients were compared, it was found that immune response was lowest in the first month in which immune suppression was highest. No difference was observed in the pretransplantation spot numbers between the patients who developed reactivation and who did not have reactivation during the monitoring. Eight patients developed reactivation during monitoring. In the two patients who had reactivation, with 2 and 3 BKV DNA results each, it was observed that BKV specific T cell immunity decreased during reactivation and increase in the immune response was correlated with the decrease or clearance of BKV viral load.

In conclusion, it is thought that monitorization of BKV specific immune response by using ELISPOT method, with detection of plasma or urine BKV DNA viral loads in renal transplant patients, can give us predictive information about prognosis of BKV reactivation, hence leading to prevention of BKVN development and evaluation of changes in immune responses during therapy.

Key words: BKV, Renal Transplantation, Cellular Immunity, ELISPOT.

9. KAYNAKLAR

1. John R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, et al. Taxonomical Developments in the Family Polyomaviridae. *Arch Virol* 2011; 156: 1627-34.
2. van Aalderen MC, Heutinck KM, Huisman C, Ten Berge IJ. BK Virus Infection in Transplant Recipients: Clinical Manifestations, Treatment Options and the Immune Response. *Neth J Med* 2012; 70: 172-83.
3. Randhawa P, Vats A, Shapiro R, Weck K, Scantlebury V. BK Virus: Discovery, Epidemiology and Biology. *Graft* 2002; 5: 19.
4. Bennett SM, Broekema NM, Imperiale MJ. BK Polyomavirus: Emerging Pathogen. *Microbes Infect* 2012; 14: 672-83.
5. Polo C, Perez JL, Mielnichuck A, Fedele CG, Niubo J, Tenorio A. Prevalence and Patterns of Polyomavirus Urinary Excretion in Immunocompetent Adults and Children. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 640-4.
6. Egli A, Binggeli S, Bodaghi S, Dumoulin A, Funk GA, Khanna N, et al. Cytomegalovirus and Polyomavirus BK Posttransplant. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(8): viii72 viii82.
7. Hirsch HH, Randhawa P. BK Virus in Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant* 2009; 9(4):136-46.
8. Mueller K, Schachtner T, Sattler A, Meier S, Friedrich P, Trydzenskaya H, et al. BK-VP3 As a New Target of Cellular Immunity in BK Virus Infection. *Transplantation* 2011; 91: 100-7.
9. Comoli P, Azzi A, Maccario R, Basso S, Botti G, Basile G, et al. Polyomavirus BK-Specific Immunity After Kidney Transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 1229-32.
10. Chakera A, Bennett S, Lawrence S, Morteau O, Mason PD, O'Callaghan CA, Cornall RJ. Antigen-Specific T Cell Responses to BK Polyomavirus Antigens Identify Functional Anti-Viral Immunity and May Help to Guide Immunosuppression Following Renal Transplantation. *Clin Exp Immunol* 2011; 165: 401-9.
11. Binggeli S, Egli A, Schaub S, Binet I, Mayr M, Steiger J, Hirsch HH. Polyomavirus BK-Specific Cellular Immune Response to VP1 and Large T-Antigen in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 1131-9.
12. Gazioğlu SB. Flow Sitometrinin Tarihçesi, Çalışma Metodolojisi. In: Deniz G, Yılmaz MT, Yıllar G, editors. *Flow Sitometri ve Tıpta Kullanımı*. 2. Baskı. İstanbul, Özlem Grafik Matbaacılık 2004; 1-12.
13. Us D. [New, Newer, Newest Human Polyomaviruses: How Far?]. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47: 362-81.

14. Dalianis T, Hirsch HH. Human Polyomaviruses in Disease and Cancer. *Virology* 2013; 437: 63-72.
15. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New Human Papovavirus (B.K.) Isolated From Urine After Renal Transplantation. *Lancet* 1971; 1: 1253-7.
16. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of Papova-Like Virus From Human Brain With Progressive Multifocal Leucoencephalopathy. *Lancet* 1971; 1: 1257-60.
17. Rosen S, Harmon W, Krensky AM, Edelson PJ, Padgett BL, Grinnell BW, et al. Tubulointerstitial Nephritis Associated With Polyomavirus (BK Type) Infection. *N Engl J Med* 1983; 308: 1192-6.
18. Smith RD, Galla JH, Skahan K, Anderson P, Linnemann CC, Jr., Ault GS, et al. Tubulointerstitial Nephritis Due to a Mutant Polyomavirus BK Virus Strain, BKV(Cin), Causing End-Stage Renal Disease. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1660-5.
19. Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, Randhawa P. BK Virus Infection in a Kidney Allograft Diagnosed by Needle Biopsy. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 671-3.
20. Drachenberg CB, Beskow CO, Cangro CB, Bourquin PM, Simsir A, Fink J, et al. Human Polyoma Virus in Renal Allograft Biopsies: Morphological Findings and Correlation With Urine Cytology. *Hum Pathol* 1999; 30: 970-7.
21. Nickeleit V, Hirsch HH, Binet IF, Gudat F, Prince O, Dalquen P, et al. Polyomavirus Infection of Renal Allograft Recipients: From Latent Infection to Manifest Disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1080-9.
22. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 611-23.
23. Chen XS, Stehle T, Harrison SC. Interaction of Polyomavirus Internal Protein VP2 With the Major Capsid Protein VP1 and Implications for Participation of VP2 in Viral Entry. *EMBO J* 1998; 17: 3233-40.
24. Clever J, Dean DA, Kasamatsu H. Identification of a DNA Binding Domain in Simian Virus 40 Capsid Proteins Vp2 and Vp3. *J Biol Chem* 1993; 268: 20877-83.
25. Siguier M, Sellier P, Bergmann JF. BK-Virus Infections: a Literature Review. *Med Mal Infect* 2012; 42: 181-7.
26. Hirsch HH. BK Virus: Opportunity Makes a Pathogen. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 354-60.
27. Deyerle KL, Subramani S. Linker Scan Analysis of the Early Regulatory Region of Human Papovavirus BK. *J Virol* 1988; 62: 3378-87.
28. Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. An N-Linked Glycoprotein With Alpha(2,3)-Linked Sialic Acid Is a Receptor for BK Virus. *J Virol* 2005; 79: 14442-5.
29. Eash S, Querbes W, Atwood WJ. Infection of Vero Cells by BK Virus Is Dependent on Caveolae. *J Virol* 2004; 78: 11583-90.

30. Engel S, Heger T, Mancini R, Herzog F, Kartenbeck J, Hayer A, Helenius A. Role of Endosomes in Simian Virus 40 Entry and Infection. *J Virol* 2011; 85: 4198-211.
31. Querbes W, O'Hara BA, Williams G, Atwood WJ. Invasion of Host Cells by JC Virus Identifies a Novel Role for Caveolae in Endosomal Sorting of Noncaveolar Ligands. *J Virol* 2006; 80: 9402-13.
32. Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. Early Events During BK Virus Entry and Disassembly. *J Virol* 2009; 83: 1350-8.
33. Walczak CP, Tsai B. A PDI Family Network Acts Distinctly and Coordinately With ERp29 to Facilitate Polyomavirus Infection. *J Virol* 2011; 85: 2386-96.
34. Nakanishi A, Itoh N, Li PP, Handa H, Liddington RC, Kasamatsu H. Minor Capsid Proteins of Simian Virus 40 Are Dispensable for Nucleocapsid Assembly and Cell Entry but Are Required for Nuclear Entry of the Viral Genome. *J Virol* 2007; 81: 3778-85.
35. Mihatsch MJ. Polyomavirus Nephropathy: a Brief Review With Special Emphasis on Clinico-Pathological Aspects. *Prilozi* 2012; 33: 5-22.
36. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Wali R, Cubitt CL, Ramos E. BK Polyoma Virus Allograft Nephropathy: Ultrastructural Features From Viral Cell Entry to Lysis. *Am J Transplant* 2003; 3: 1383-92.
37. Kuppachi S, Thomas B, Kokko KE. BK Virus in the Kidney Transplant Patient. *Am J Med Sci* 2013; 345: 482-8.
38. Jin L, Gibson PE, Booth JC, Clewley JP. Genomic Typing of BK Virus in Clinical Specimens by Direct Sequencing of Polymerase Chain Reaction Products. *J Med Virol* 1993; 41: 11-7.
39. Zhong S, Randhawa PS, Ikegaya H, Chen Q, Zheng H, Suzuki M, et al. Distribution Patterns of BK Polyomavirus (BKV) Subtypes and Subgroups in American, European and Asian Populations Suggest Co-migration of BKV and the Human Race. *J Gen Virol* 2009; 90: 144-52.
40. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, et al. Prevalence of Polyomavirus BK and JC Infection and Replication in 400 Healthy Blood Donors. *J Infect Dis* 2009; 199: 837-46.
41. Suwelack B, Malyar V, Koch M, Sester M, Sommerer C. The Influence of Immunosuppressive Agents on BK Virus Risk Following Kidney Transplantation, and Implications for Choice of Regimen. *Transplant Rev (Orlando)* 2012; 26: 201-11.
42. Babel N, Volk HD, Reinke P. BK Polyomavirus Infection and Nephropathy: the Virus-Immune System Interplay. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7: 399-406.
43. Luo C, Hirsch HH, Kant J, Randhawa P. VP-1 Quasispecies in Human Infection With Polyomavirus BK. *J Med Virol* 2012; 84: 152-61.

44. Olsen GH, Hirsch HH, Rinaldo CH. Functional Analysis of Polyomavirus BK Non-Coding Control Region Quasispecies From Kidney Transplant Recipients. *J Med Virol* 2009; 81: 1959-67.
45. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, Steiger J. Prospective Study of Polyomavirus Type BK Replication and Nephropathy in Renal-Transplant Recipients. *N Engl J Med* 2002; 347: 488-96.
46. Verghese PS, Finn LS, Englund JA, Sanders JE, Hingorani SR. BK Nephropathy in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Pediatr Transplant* 2009; 13: 913-8.
47. Menahem SA, McDougall KM, Thomson NM, Dowling JP. Native Kidney BK Nephropathy Post Cardiac Transplantation. *Transplantation* 2005; 79: 259-60.
48. Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Hedquist BG, Nennesmo I, Sundelin B, Seregard S. BK Virus As the Cause of Meningoencephalitis, Retinitis and Nephritis in a Patient With AIDS. *AIDS* 1999; 13: 1071-5.
49. Marshall WF, Telenti A, Proper J, Aksamit AJ, Smith TF. Rapid Detection of Polyomavirus BK by a Shell Vial Cell Culture Assay. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1613-5.
50. Flaegstad T, Permin H, Husebekk A, Husby G, Traavik T. BK Virus Infection in Patients With AIDS. *Scand J Infect Dis* 1988; 20: 145-50.
51. Pollara CP, Corbellini S, Chiappini S, Sandrini S, De TD, Bonfanti C, Manca N. Quantitative Viral Load Measurement for BKV Infection in Renal Transplant Recipients As a Predictive Tool for BKVAN. *New Microbiol* 2011; 34: 165-71.
52. Astegiano S, Bergallo M, Terlizzi ME, Sidoti F, Gambarino S, Messina M, et al. Combined Measurement of Serum DNA and Urine VP1 Messenger RNA in Monitoring BK Virus Replication in Kidney Graft Recipients. *Transplant Proc* 2011; 43: 1052-4.
53. Friedman DP, Flanders AE. MR Imaging of BK Virus Encephalitis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 1016-8.
54. Drachenberg CB, Hirsch HH, Ramos E, Papadimitriou JC. Polyomavirus Disease in Renal Transplantation: Review of Pathological Findings and Diagnostic Methods. *Hum Pathol* 2005; 36: 1245-55.
55. Drachenberg RC, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Ramos E, Fink JC, Wali R, et al. Morphological Spectrum of Polyoma Virus Disease in Renal Allografts: Diagnostic Accuracy of Urine Cytology. *Am J Transplant* 2001; 1: 373-81.
56. Schaub S, Hirsch HH, Dickenmann M, Steiger J, Mihatsch MJ, Hopfer H, Mayr M. Reducing Immunosuppression Preserves Allograft Function in Presumptive and Definitive Polyomavirus-Associated Nephropathy. *Am J Transplant* 2010; 10: 2615-23.

57. Turbat-Herrera EA, Herrera GA. Electron Microscopy Renders the Diagnostic Capabilities of Cytopathology More Precise: an Approach to Everyday Practice. *Ultrastruct Pathol* 2005; 29: 475-82.
58. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, Wali R, Crowder C, Nogueira J, et al. Histological Patterns of Polyomavirus Nephropathy: Correlation With Graft Outcome and Viral Load. *Am J Transplant* 2004; 4: 2082-92.
59. Schaub S, Mayr M, Egli A, Binggeli S, Descoeudres B, Steiger J, et al. Transient Allograft Dysfunction From Immune Reconstitution in a Patient With Polyoma BK-Virus-Associated Nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 2386-90.
60. Borni-Duval C, Caillard S, Olagne J, Perrin P, Braun-Parvez L, Heibel F, Moulin B. Risk Factors for BK Virus Infection in the Era of Therapeutic Drug Monitoring. *Transplantation* 2013; 95: 1498-505.
61. Biel SS, Nitsche A, Kurth A, Siegert W, Ozel M, Gelderblom HR. Detection of Human Polyomaviruses in Urine From Bone Marrow Transplant Patients: Comparison of Electron Microscopy With PCR. *Clin Chem* 2004; 50: 306-12.
62. Almeras C, Vetromile F, Garrigue V, Szwarc I, Foulongne V, Mourad G. Monthly Screening for BK Viremia Is an Effective Strategy to Prevent BK Virus Nephropathy in Renal Transplant Recipients. *Transpl Infect Dis* 2011; 13: 101-8.
63. Funk GA, Gosert R, Comoli P, Ginevri F, Hirsch HH. Polyomavirus BK Replication Dynamics in Vivo and in Silico to Predict Cytopathology and Viral Clearance in Kidney Transplants. *Am J Transplant* 2008; 8: 2368-77.
64. Viscount HB, Eid AJ, Espy MJ, Griffin MD, Thomsen KM, Harmsen WS, et al. Polyomavirus Polymerase Chain Reaction As a Surrogate Marker of Polyomavirus-Associated Nephropathy. *Transplantation* 2007; 84: 340-5.
65. Anzivino E, Bellizzi A, Mitterhofer AP, Tinti F, Barile M, Colosimo MT, et al. Early Monitoring of the Human Polyomavirus BK Replication and Sequencing Analysis in a Cohort of Adult Kidney Transplant Patients Treated With Basiliximab. *Virol J* 2011; 8: 407.
66. Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, et al. Incidence of BK With Tacrolimus Versus Cyclosporine and Impact of Preemptive Immunosuppression Reduction. *Am J Transplant* 2005; 5: 582-94.
67. Prosser SE, Orentas RJ, Jurgens L, Cohen EP, Hariharan S. Recovery of BK Virus Large T-Antigen-Specific Cellular Immune Response Correlates With Resolution of Bk Virus Nephritis. *Transplantation* 2008; 85: 185-92.
68. Schachtner T, Muller K, Stein M, Diezemann C, Sefrin A, Babel N, Reinke P. BK Virus-Specific Immunity Kinetics: a Predictor of Recovery From Polyomavirus BK-Associated Nephropathy. *Am J Transplant* 2011; 11: 2443-52.

69. Lee MC, Lu MC, Lai NS, Liu SC, Yu HC, Lin TY, et al. Renal Dysfunction by BK Virus Infection Is Correlated With Activated T Cell Level in Renal Transplantation. *J Surg Res* 2013; 180: 330-6.
70. Gralla J, Huskey J, Wiseman AC. Trends in Immune Function Assay (ImmuKnow; Cylex) Results in the First Year Post-Transplant and Relationship to BK Virus Infection. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 2565-70.
71. Brosterhus H, Brings S, Leyendeckers H, Manz RA, Miltenyi S, Radbruch A, et al. Enrichment and Detection of Live Antigen-Specific CD4(+) and CD8(+) T Cells Based on Cytokine Secretion. *Eur J Immunol* 1999; 29: 4053-9.
72. Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. Immunologic Monitoring. *Immunol Rev* 2003; 196: 247-64.
73. Letsch A, Scheibenbogen C. Quantification and Characterization of Specific T-Cells by Antigen-Specific Cytokine Production Using ELISPOT Assay or Intracellular Cytokine Staining. *Methods* 2003; 31: 143-9.
74. Trydzenskaya H, Sattler A, Muller K, Schachtner T, Dang-Heine C, Friedrich P, et al. Novel Approach for Improved Assessment of Phenotypic and Functional Characteristics of BKV-Specific T-Cell Immunity. *Transplantation* 2011; 92: 1269-77.
75. Chen Y, Trofe J, Gordon J, Du Pasquier RA, Roy-Chaudhury P, Kuroda MJ, et al. Interplay of Cellular and Humoral Immune Responses Against BK Virus in Kidney Transplant Recipients With Polyomavirus Nephropathy. *J Virol* 2006; 80: 3495-505.
76. Karlsson AC, Martin JN, Younger SR, Bredt BM, Epling L, Ronquillo R, et al. Comparison of the ELISPOT and Cytokine Flow Cytometry Assays for the Enumeration of Antigen-Specific T Cells. *J Immunol Methods* 2003; 283: 141-53.
77. Schmitt A, Keilholz U, Scheibenbogen C. Evaluation of the Interferon-Gamma ELISPOT-Assay for Quantification of Peptide Specific T Lymphocytes From Peripheral Blood. *J Immunol Methods* 1997; 210: 167-74.
78. Hariharan S. BK Virus Nephritis After Renal Transplantation. *Kidney Int* 2006; 69: 655-62.
79. Hardinger KL, Koch MJ, Bohl DJ, Storch GA, Brennan DC. BK-Virus and the Impact of Pre-Emptive Immunosuppression Reduction: 5-Year Results. *Am J Transplant* 2010; 10: 407-15.
80. Cannon RM, Ouseph R, Jones CM, Hughes MG, Eng M, Marvin MR. BK Viral Disease in Renal Transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 576-9.
81. Egli A, Kohli S, Dickenmann M, Hirsch HH. Inhibition of Polyomavirus BK-Specific T-Cell Responses by Immunosuppressive Drugs. *Transplantation* 2009; 88: 1161-8.
82. Andrei G, Snoeck R, Vandeputte M, De CE. Activities of Various Compounds Against Murine and Primate Polyomaviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 587-93.

83. Kadambi PV, Josephson MA, Williams J, Corey L, Jerome KR, Meehan SM, Limaye AP. Treatment of Refractory BK Virus-Associated Nephropathy With Cidofovir. *Am J Transplant* 2003; 3: 186-91.
84. Vats A, Shapiro R, Singh RP, Scantlebury V, Tuzuner A, Saxena M, et al. Quantitative Viral Load Monitoring and Cidofovir Therapy for the Management of BK Virus-Associated Nephropathy in Children and Adults. *Transplantation* 2003; 75: 105-12.
85. Liacini A, Seamone ME, Muruve DA, Tibbles LA. Anti-BK Virus Mechanisms of Sirolimus and Leflunomide Alone and in Combination: Toward a New Therapy for BK Virus Infection. *Transplantation* 2010; 90: 1450-7.
86. Faguer S, Hirsch HH, Kamar N, Guilbeau-Frugier C, Ribes D, Guitard J, et al. Leflunomide Treatment for Polyomavirus BK-Associated Nephropathy After Kidney Transplantation. *Transpl Int* 2007; 20: 962-9.
87. Leca N, Muczynski KA, Jefferson JA, de Boer IH, Kowalewska J, Kendrick EA, et al. Higher Levels of Leflunomide Are Associated With Hemolysis and Are Not Superior to Lower Levels for BK Virus Clearance in Renal Transplant Patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 829-35.
88. Bernhoff E, Tylden GD, Kjerpeseth LJ, Gutteberg TJ, Hirsch HH, Rinaldo CH. Leflunomide Inhibition of BK Virus Replication in Renal Tubular Epithelial Cells. *J Virol* 2010; 84: 2150-6.
89. Maggiore U, Medici MC, Vaglio A, Buzio C. Increased Viral Load After Intravenous Immunoglobulin Therapy for BK Virus-Associated Nephropathy. *Transpl Infect Dis* 2010; 12: 470-2.
90. Gabardi S, Waikar SS, Martin S, Roberts K, Chen J, Borgi L, et al. Evaluation of Fluoroquinolones for the Prevention of BK Viremia After Renal Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 1298-304.
91. Sharma BN, Li R, Bernhoff E, Gutteberg TJ, Rinaldo CH. Fluoroquinolones Inhibit Human Polyomavirus BK (BKV) Replication in Primary Human Kidney Cells. *Antiviral Res* 2011; 92: 115-23.
92. Hilton R, Tong CY. Antiviral Therapy for Polyomavirus-Associated Nephropathy After Renal Transplantation. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 855-9.
93. Dharnidharka VR, Cherikh WS, Neff R, Cheng Y, Abbott KC. Retransplantation After BK Virus Nephropathy in Prior Kidney Transplant: an OPTN Database Analysis. *Am J Transplant* 2010; 10: 1312-5.
94. Hirsch HH, Ramos E. Retransplantation After Polyomavirus-Associated Nephropathy: Just Do It? *Am J Transplant* 2006; 6: 7-9.
95. Womer KL, Meier-Kriesche HU, Patton PR, Dibadj K, Bucci CM, Foley D, et al. Preemptive Retransplantation for BK Virus Nephropathy: Successful Outcome Despite Active Viremia. *Am J Transplant* 2006; 6: 209-13.

96. Gaziev J, Paba P, Miano R, Germani S, Sodani P, Bove P, et al. Late-Onset Hemorrhagic Cystitis in Children After Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Thalassemia and Sickle Cell Anemia: a Prospective Evaluation of Polyoma (BK) Virus Infection and Treatment With Cidofovir. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16: 662-71.
97. Leung AY, Suen CK, Lie AK, Liang RH, Yuen KY, Kwong YL. Quantification of Polyoma BK Viruria in Hemorrhagic Cystitis Complicating Bone Marrow Transplantation. *Blood* 2001; 98: 1971-8.
98. Wong AS, Chan KH, Cheng VC, Yuen KY, Kwong YL, Leung AY. Relationship of Pretransplantation Polyoma BK Virus Serologic Findings and BK Viral Reactivation After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 830-7.
99. Leung AY, Mak R, Lie AK, Yuen KY, Cheng VC, Liang R, Kwong YL. Clinicopathological Features and Risk Factors of Clinically Overt Haemorrhagic Cystitis Complicating Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 509-13.
100. Giraud G, Priftakis P, Bogdanovic G, Remberger M, Dubrulle M, Hau A, et al. BK-Viruria and Haemorrhagic Cystitis Are More Frequent in Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplant Patients Receiving Full Conditioning and Unrelated-HLA-Mismatched Grafts. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 737-42.
101. Giraud G, Bogdanovic G, Priftakis P, Remberger M, Svahn BM, Barkholt L, et al. The Incidence of Hemorrhagic Cystitis and BK-Viruria in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Recipients According to Intensity of the Conditioning Regimen. *Haematologica* 2006; 91: 401-4.
102. Blyth E, Clancy L, Simms R, Gaundar S, O'Connell P, Micklethwaite K, Gottlieb DJ. BK Virus-Specific T Cells for Use in Cellular Therapy Show Specificity to Multiple Antigens and Polyfunctional Cytokine Responses. *Transplantation* 2011; 92: 1077-84.
103. Gorczynska E, Turkiewicz D, Rybka K, Toporski J, Kalwak K, Dyla A, et al. Incidence, Clinical Outcome, and Management of Virus-Induced Hemorrhagic Cystitis in Children and Adolescents After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 797-804.
104. Peinemann F, de Villiers EM, Dorries K, Adams O, Vogeli TA, Burdach S. Clinical Course and Treatment of Haemorrhagic Cystitis Associated With BK Type of Human Polyomavirus in Nine Paediatric Recipients of Allogeneic Bone Marrow Transplants. *Eur J Pediatr* 2000; 159: 182-8.
105. Cesaro S, Brugiolo A, Faraci M, Uderzo C, Rondelli R, Favre C, et al. Incidence and Treatment of Hemorrhagic Cystitis in Children Given Hematopoietic Stem Cell Transplantation: a Survey From the Italian Association of Pediatric Hematology Oncology-Bone Marrow Transplantation Group. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 925-31.

106. Geddes CC, Gunson R, Mazonakis E, Wan R, Thomson L, Clancy M, Carman WF. BK Viremia Surveillance After Kidney Transplant: Single-Center Experience During a Change From Cyclosporine-to Lower-Dose Tacrolimus-Based Primary Immunosuppression Regimen. *Transpl Infect Dis* 2011; 13: 109-16.
107. Coleman DV, Mackenzie EF, Gardner SD, Poulding JM, Amer B, Russell WJ. Human Polyomavirus (BK) Infection and Ureteric Stenosis in Renal Allograft Recipients. *J Clin Pathol* 1978; 31: 338-47.
108. Gardner SD, Mackenzie EF, Smith C, Porter AA. Prospective Study of the Human Polyomaviruses BK and JC and Cytomegalovirus in Renal Transplant Recipients. *J Clin Pathol* 1984; 37: 578-86.
109. Yan N, Chen ZJ. Intrinsic Antiviral Immunity. *Nat Immunol* 2012; 13: 214-22.
110. Jiang M, Entezami P, Gamez M, Stamminger T, Imperiale MJ. Functional Reorganization of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies During BK Virus Infection. *MBio* 2011; 2: e00281-10.
111. Wimley WC, Selsted ME, White SH. Interactions Between Human Defensins and Lipid Bilayers: Evidence for Formation of Multimeric Pores. *Protein Sci* 1994; 3: 1362-73.
112. Lillard JW Jr, Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, McGhee JR. Mechanisms for Induction of Acquired Host Immunity by Neutrophil Peptide Defensins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 651-6.
113. Dugan AS, Maginnis MS, Jordan JA, Gasparovic ML, Manley K, Page R, et al. Human Alpha-Defensins Inhibit BK Virus Infection by Aggregating Virions and Blocking Binding to Host Cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 31125-32.
114. Abend JR, Low JA, Imperiale MJ. Inhibitory Effect of Gamma Interferon on BK Virus Gene Expression and Replication. *J Virol* 2007; 81: 272-9.
115. Global Effects of BKV Infection on Gene Expression in Human Primary Kidney Epithelial Cells. *Virology* 2010; 397: 73-9.
116. Grinde B, Gayorfar M, Rinaldo CH. Impact of a Polyomavirus (BKV) Infection on mRNA Expression in Human Endothelial Cells. *Virus Res* 2007; 123: 86-94.
117. Medzhitov R. Recognition of Microorganisms and Activation of the Immune Response. *Nature* 2007; 449: 819-26.
118. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
119. Takeuchi O, Akira S. Innate Immunity to Virus Infection. *Immunol Rev* 2009; 227: 75-86.
120. Ribeiro A, Wornle M, Motamedi N, Anders HJ, Grone EF, Nitschko H, et al. Activation of Innate Immune Defense Mechanisms Contributes to Polyomavirus BK-Associated Nephropathy. *Kidney Int* 2012; 81: 100-11.

121. Womer KL, Huang Y, Herren H, Dibadj K, Peng R, Murawski M, et al. Dendritic Cell Deficiency Associated With Development of BK Viremia and Nephropathy in Renal Transplant Recipients. *Transplantation* 2010; 89: 115-23.
122. Bauman Y, Nachmani D, Vitenshtein A, Tsukerman P, Drayman N, Stern-Ginossar N, et al. An Identical MiRNA of the Human JC and BK Polyoma Viruses Targets the Stress-Induced Ligand ULBP3 to Escape Immune Elimination. *Cell Host Microbe* 2011; 9: 93-102.
123. Comoli P, Hirsch HH, Ginevri F. Cellular Immune Responses to BK Virus. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 569-74.
124. Bohl DL, Brennan DC, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Major EO, Storch GA. BK Virus Antibody Titers and Intensity of Infections After Renal Transplantation. *J Clin Virol* 2008; 43: 184-9.
125. Randhawa PS, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Viscidi RP. Immunoglobulin G, A, and M Responses to BK Virus in Renal Transplantation. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 1057-63.
126. Leuenberger D, Andresen PA, Gosert R, Binggeli S, Strom EH, Bodaghi S, et al. Human Polyomavirus Type 1 (BK Virus) Agnoprotein Is Abundantly Expressed but Immunologically Ignored. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 959-68.
127. Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, Basso S, Fontana I, Cioni M, et al. Prospective Monitoring of Polyomavirus BK Replication and Impact of Pre-Emptive Intervention in Pediatric Kidney Recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 2727-35.
128. Hammer MH, Brestrich G, Andree H, Engelmann E, Rosenberger C, Tillmann H, et al. HLA Type-Independent Method to Monitor Polyoma BK Virus-Specific CD4 and CD8 T-Cell Immunity. *Am J Transplant* 2006; 6: 625-31.
129. Bull M, Lee D, Stucky J, Chiu YL, Rubin A, Horton H, McElrath MJ. Defining Blood Processing Parameters for Optimal Detection of Cryopreserved Antigen-Specific Responses for HIV Vaccine Trials. *J Immunol Methods* 2007; 322: 57-69.
130. Vats A, Shapiro R, Singh RP, Scantlebury V, Tuzuner A, Saxena M, et al. Quantitative Viral Load Monitoring and Cidofovir Therapy for the Management of BK Virus-Associated Nephropathy in Children and Adults. *Transplantation* 2003; 75: 105-12.
131. Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Waiting Time on Dialysis As the Strongest Modifiable Risk Factor for Renal Transplant Outcomes: a Paired Donor Kidney Analysis. *Transplantation* 2002; 74: 1377-81.
132. Russell RT, Feurer ID, Wisawatapnimit P, Salomon RM, Pinson CW. The Effects of Physical Quality of Life, Time, and Gender on Change in Symptoms of Anxiety and Depression After Liver Transplantation. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 138-44.

133. Dharnidharka VR, Stablein DM, Harmon WE. Post-Transplant Infections Now Exceed Acute Rejection As Cause for Hospitalization: a Report of the NAPRTCS. *Am J Transplant* 2004; 4: 384-9.
134. Dharnidharka VR, Caillard S, Agodoa LY, Abbott KC. Infection Frequency and Profile in Different Age Groups of Kidney Transplant Recipients. *Transplantation* 2006; 81: 1662-7.
135. Kotton CN, Fishman JA. Viral Infection in the Renal Transplant Recipient. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1758-74.
136. Vasudev B, Hariharan S, Hussain SA, Zhu YR, Bresnahan BA, Cohen EP. BK Virus Nephritis: Risk Factors, Timing, and Outcome in Renal Transplant Recipients. *Kidney Int* 2005; 68: 1834-9.
137. Schachtner T, Stein M, Sefrin A, Babel N, Reinke P. Inflammatory Activation and Recovering BKV-Specific Immunity Correlate With Self-Limited BKV Replication After Renal Transplantation. *Transpl Int* 2013.
138. Comoli P, Basso S, Azzi A, Moretta A, De SR, Del GF, et al. Dendritic Cells Pulsed With Polyomavirus BK Antigen Induce Ex Vivo Polyoma BK Virus-Specific Cytotoxic T-Cell Lines in Seropositive Healthy Individuals and Renal Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 3197-204.
139. Binggeli S, Egli A, Dickenmann M, Binet I, Steiger J, Hirsch HH. BKV Replication and Cellular Immune Responses in Renal Transplant Recipients. *Am J Transplant* 2006; 6: 2218-9.