



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

**TRANSPLANT HASTALARINDA BK VİRÜS VİRAL YÜK
ÖLÇÜMÜNDE LABORATUVAR TASARIMI VE TİCARİ
Rt-PZR TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. İrem TÜMKAYA KILINÇ

Antalya, 2023



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

**TRANSPLANT HASTALARINDA BK VİRÜS VİRAL YÜK
ÖLÇÜMÜNDE LABORATUVAR TASARIMI VE TİCARİ
Rt-PZR TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. İrem TÜMKAYA KILINÇ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek ÇOLAK

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2023

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki uzmanlık eğitimim boyunca mesleki bilgilerinden çok şey öğrendiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve çalışmalarımnda değerli fikirleri ile bana yol gösteren, tez sürecimde yardımını esirgemeyen değerli hocam tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Dilek ÇOLAK'a

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum, desteğini bizden esirgemeyen ve her konuda yol gösteren başta Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. M. Dilara ÖĞÜNÇ olmak üzere Prof. Dr. Derya MUTLU'ya, Prof. Dr. Gözde ÖNGÜT'e, Prof. Dr. Mete EYİĞÖR'e, Prof. Dr. Betil ÖZHAK'a, Prof. Dr. Sadi KÖKSOY'a Prof. Dr. Esvet MUTLU'ya, Doç. Dr. Hatize YAZISIZ'a, Dr. Öğretim Üyesi Özlem KOYUNCU ÖZYURT'a

Uzmanlık eğitimim sırasında birlikte çalıştığım; yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen değerli Moleküler Testler ve Merkez Laboratuvarı çalışanlarına, asistan arkadaşlarıma, tezimdeki verilerin analizi için desteğini esirgemeyen Doç. Dr. C. Aylin ERMAN DALOĞLU'na,

Hayatım boyunca bana verdikleri her türlü destek ve duydukları güven ile her zaman yanımda olan sevgili aileme, varlığı ile bana her zaman güç veren biricik eşim Uzm. Dr. Can KILINÇ'a ve neşe kaynağım canım oğlum Atlas'a

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma	4
2.3. Epidemiyoloji	5
2.4. Patogenez.....	6
2.5. Serotipler ve Subtipler	8
2.6. Viriyon ve Genom Yapısı.....	9
2.7. BKV Yaşam Döngüsü	11
2.8. Klinik.....	14
2.8.1. Risk Faktörleri	15
2.8.3. BKV İle İlişkili Nefropati	16
2.8.4. BKV İle İlişkili Hemorajik Sistit:.....	18
2.8.5. İmmün Yanıt	20
2.9. Tanı ve Tarama.....	21
2.9.1. Moleküler Testler (Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri - NAAT)..	22
2.9.2. Kültür	26
2.9.3. Seroloji.....	26
2.9.4. İdrar Sitolojisi	27
2.9.5. Histoloji	27
2.10. Tedavi Ve Koruma	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Hastalar.....	31
3.2. BKV DNA Tetkiki	31
3.3. İstatistiksel Değerlendirme	38

4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇLAR	48
7. ÖZET.....	49
8. ABSTRACT	50
9. KAYNAKLAR	53



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenozin Trifosfat
BKV	BK virüs
BKV-HS	BKV ile ilişkili hemorajik sistit
BKVİN	BKV İle İlişkili Nefropati
bp	Baz çifti
CD8 T lenfosit	Sitotoksik T hücrelerine
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ER	Endoplazmik retikulum
EVGR	Early Viral Gene Region
GVHD	Graft Versus Host Hastalığı
HKHT	Hematopoietik Kök Hücre Transplantasyonu
HPyV-1	Human Polyomavirus 1
HS	Hemorajik Sistit
IC	İnternal Control
JCV	JC virüs
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KİT	Kemik iliği transplantasyonu
LVGR	Late Viral Gene Region
MESNA	2-merkaptetan sodyum
miRNA	Mikro RNA
NAAT	Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri
NCCR	Non-coding control region
PAP	Papanicolaou
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Rt-PZR	Real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SOT	solid organ transplantasyonu
tag	Küçük t Antijeni
TAg	Büyük T Antijeni
truncTAg	Trunke TAg

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1. QuantiNova® Pathogen +IC PZR saptama kiti içeriği.....	34
Tablo 3.2. Primer ve prob dizileri	34
Tablo 3.3. Amplifikasyon protokolü.....	37
Tablo 3.4. PZR protokolü	37
Tablo 4.1. Artus BKV PZR ve laboratuvar tasarımı BKV PZR testlerinin kalitatif sonuçları	39



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. BKV enfeksiyonunun doğal süreci (40)	8
Şekil 2.2. BKV genomu (78).....	11
Şekil 2.3. BKV yaşam siklüsü (92).....	13
Şekil 4.1. Artus BKV PZR ve laboratuvar tasarımı BKV PZR testlerinde log10 kopya/mL birimlerindeki kantitatif sonuçların korelasyon analizi.	40
Şekil 4.2. Artus BKV PZR ve laboratuvar tasarımı BKV PZR testlerinde dinamik ölçüm aralığındaki viral yüklerin log10 değerlerinin ortalamalarına karşı farklarının dağılımının verildiği Bland- Altman grafiği. Kesikli çizgi ortalama farkı, düz çizgiler ± 1 log10 farkı göstermektedir.....	41

1. GİRİŞ

Polyomaviridae ailesi içinde yer alan BK Virüsü (BKV), yakın zamanda İnsan Polyoma Virüsü 1 (Human Polyomavirus 1: HPyV-1) olarak yeniden sınıflandırılmıştır. Bu aile aynı zamanda JC Virüs (JCV) ve SV40 virüslerini de içermektedir. BKV enfeksiyonları tüm dünyada yaygın olarak görülmekte ve prevalansı toplumda %90'nın üzerindedir. Yaklaşık 5000 baz çifti (bp) büyüklüğünde, ikozahedral kapsidli, zarfsız, dairesel çift iplikli bir Deoksiribo nükleik asit (DNA) virüsüdür (1, 2). BKV ilk olarak 1971 yılında, kronik piyelonefrit ve ileri böbrek yetmezliği nedeniyle böbrek nakli olan ve baş harfleri BK olan 39 yaşındaki Sudanlı bir erkekten Gardner ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir (3). BKV ile ilgili hastalıkların sıklığı, hematoloji, onkoloji ve transplantasyon alanlarında yeni tedavilerin ortaya çıkmasıyla aynı zamana denk gelen 1990'lardan beri artmaktadır (4). BKV, böbrek, üreter ve mesane epitel tabakasını etkileyen bir virüstür (5). Virüs genomu erken, geç ve kodlama yapmayan (non-coding control region: NCCR) üç ana bölgeden oluşmaktadır. Erken gen bölgesi, büyük T antijenini (TAg) ve küçük t antijenini (tag) kodlamaktadır. Geç gen bölgesi, viral kapsid proteinleri VP1, VP2, VP3 ve agnoproteini kodlamaktadır (6).

BKV enfeksiyonu erken çocukluk döneminde genellikle fekal-oral yolla veya solunum yoluyla bulaşır (7, 8). Primer enfeksiyon çoğunlukla asemptomatik geçirilir ve sonrasında başta böbrek ve idrar yollarındaki epitel hücreleri ve kandaki mononükleer hücreler olmak üzere hedef hücrelerde latent olarak kalır (9-12). Genel popülasyonda, latent enfeksiyon normalde herhangi bir semptoma neden olmaz ve reaktivasyon meydana gelmez. Ancak kök hücre nakli veya böbrek nakli yapılan transplantasyon alıcıları gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda hemorajik sistit (HS), nefropati (BK virüsü ile ilişkili nefropati: BKVİN) ve daha az yaygın olarak pnömoni, retinit, karaciğer hastalığı ve meningoensefalit dahil olmak üzere çeşitli komplikasyonlarla ilişkili olduğu bilinmektedir (13).

Erken tanı BKVİN'nin gelişimi ve ilerlemesine ilişkin bilgiler dikkate alındığında, çok önemlidir. BKVİN'nin önlenmesinde immünsüpresyonun

zamanında azaltılması çok önemlidir (14). Böbrek nakli alıcılarında BKVİN tanısında idrar ve serum örneklerinde viral yük ölçümü yapan kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testleri hem tarama hem de tanı testi olarak kullanılmaktadır (15). Hem idrar hem de plazma örneklerinde kantitatif BKV PZR ile BKVİN'nin izleminde çok yüksek duyarlılık, özgüllük ve pozitif ve negatif prediktif değere sahiptir. Viral yük takibi ile viral replikasyon izlenerek allogreft hasarını önlemek için gerektiğinde immünsüpresyon azatılması mümkündür (16).

BKV viral yük ölçümünde farklı ticari firmalara ait BKV PZR testlerinin yanında laboratuvar tasarımı BKV PZR testleri de bulunmaktadır. Ancak herhangi bir standardizasyon henüz sağlanamadığı için BKV kantitasyonunda laboratuvarlar arası değişkenlik söz konusudur. Bu durum böbrek nakli hastalarının yönetimini önemli ölçüde etkilemektedir. Standardize edilmiş kantitatif ölçüm yapan BKV PZR kitlerinin olmaması kurumlar arası ölçüm farklılıklarına yol açmaktadır. Bu nedenle hasta izleminde bir eşik değer belirlenmesi mümkün olmamaktadır (17).

Bu çalışmanın amacı, transplantasyon yapılan hastalarda plazma örneklerinde BKV DNA viral yük tespitinde laboratuvar tasarımı kantitatif gerçek zamanlı (Real-time: Rt) PZR testiyle ticari bir kit olan Artus BKV Rt-PZR testinin sonuçlarını karşılaştırmak ve değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Polyomavirüsler ilk olarak Ludwig Gross tarafından 1953 yılında murin lösemi virüsleri olarak keşfedilmiştir. Özellikle, yeni doğan farelere lösemi dokularının hücre içermeyen ekstrelerinin enjekte edilmesiyle, lösemiye ek olarak parotis bezinde adenokarsinomun geliştiği görülmüştür. Bu da malignitelerin nedeninin enfeksiyöz bir ajan olduğunu düşündürmüştür (18). Farelerde tümör oluşturan bu virüs S.Steward ve B.Eddy tarafından 1958 yılında hücre kültürlerinden izole edilmiştir. Polyomavirüs olarak tanımlanan bu virüsün fare, hamster ve tavşan gibi kemiricilerde tümör oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. Araştırmacıların soyadlarının ilk harflerine istinaden SE polyomavirüs olarak isimlendirilmiştir. 1960 yılında ise B.H. Sweet ve M.R. Hilleman tarafından Afrika yeşil maymun böbrek hücre kültürlerinden izole edilen ilk primat polyomavirüsü tanımlanmıştır. Bu virüs hücrelerde maymunlarda saptanan kırkinci virüs olup vakuol oluşturmaları nedeniyle SV40 olarak adlandırılmıştır (19). Araştırmacılar, tümör oluşumu ile olan ilişkisi nedeniyle “polyomavirüs” (Yunanca kaynaklı poly-, çoklu; -oma, tümörler anlamındadır) olarak adlandırmışlardır (20).

Moleküler yöntemlerin gelişmesi ve yeni nesil dizileme teknolojilerinin kullanılması ile insan polyomavirüslerinin sayısında artış olmuştur (21). Bugüne kadar, ailenin birçok farklı üyesi, insan, maymun, hamster, sığır, fare, tavşan, muhabbet kuşu, atimik sıçan ve balık olmak üzere çeşitli memeli, kuş ve balık türlerinden izole edilmiştir (22, 23).

BKV ve JCV ilk izole edilen insan polyomavirüsleridirler. BKV ilk olarak 1971 yılında Gardner ve arkadaşları tarafından kronik piyelonefrit ve ileri böbrek yetmezliği nedeniyle böbrek nakli olan ve baş harfleri BK olan 39 yaşındaki Sudan’lı bir erkeğin idrarından izole edilmiştir. Böbrek nakli yapılmış hastanın idrar örneğinde, nakilden 3.5 ay sonra çok sayıda epitel hücresi gözlenmiştir. Londra’da Halk Sağlığı Laboratuvarı’nda Dr. Anne Field boyanan numuneyi elektron mikroskopuyla incelemiştir. Siğil virüsünü andıran yaygın viral partikül gözlemlemiştir. Beş gün sonra alınan idrar numunesi elektron mikroskobu ile ultra

ince bir kesit şeklinde incelendiğinde genişletilmiş hücre çekirdeğinde bir çok viral partikül gözlemlenmiştir. İlk idrar örneği Afrika maymunu böbrek hücreleri (Vero), Rhesus maymunu böbrek hücreleri ve insan embriyosu akciğer fibroblastlarına inoküle edilmiştir. İnokulasyondan 18 gün sonra Rhesus maymunu böbrek hücrelerinde, 28 gün sonra ise Afrika maymunu böbrek hücrelerinde sitopatik bir değişiklik gözlenmiştir. İnsan embriyosu akciğer fibroblastlarında ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Daha sonra bu virüs keşfedildiği hastanın isminin baş harfleri ile adlandırılmıştır, izolata ise Gardner suşu denilmiştir (3). Aynı yıl baş harfleri JC olan Hodgkin lenfomalı bir hastada progresif multifokal lökoensefalopati gelişmiş, beyin dokusu incelenerek virüs izole edilmiş ve JCV olarak adlandırılmıştır (24).

Virüsün klinik önemi 1978 yılında Mackenzie ve arkadaşlarının araştırmaları sonucunda bildirilmiştir (25). Rosen ve arkadaşları, primer immün yetmezliği olan (organ nakli olmayan) 6 yaşında bir erkek çocukta bu virüse bağlı tübülointerstisyel nefrit tespit ederek 1983'te ilk raporu yayınlamışlardır. Bu hastada yoğun BKV virüsü, böbrekte yaygın viral inklüzyonlar, pozitif BKV kültürü ve diyaliz gerektiren akut böbrek yetmezliği saptanmıştır (26). BKV nefropatisi (BKVN) ilk kez 1995 yılında böbrek nakli alıcılarında rapor edilmiştir (27). BKVN'nin güçlü immünsüpresif rejimlerin sonucunda renal allograft hasarına neden olduğu bulunmuştur (28).

2.2. Sınıflandırma

JCV ve SV40 virüsleri ile birlikte daha önce Papovaviridae ailesi içinde yer almakta olan BKV, 2000 yılından itibaren Polyomaviridae ailesinin Polyomavirüs cinsi içinde sınıflandırılmıştır. International Committee on Taxonomy of Viruses tarafından 2017 yılında yapılan yeni sınıflamada Polyomaviridae ailesi, TAG antijeninin amino asit dizisine göre, 112'si 6 cinsi içeren 117 türün tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır: Alphapolyoma Virüs, Betapolyoma Virüs, Gammapolyoma Virüs, Deltapolyoma Virüs, Epsilonpolyoma Virüs ve Zetapolyoma Virüs. Bu cinslerin üyeleri memelileri ve kuşları enfekte edebilir. Son zamanlarda balıklarda polyomavirüs genomları tespit edilmiştir.

Her aile üyesinin sınırlı ana konağı vardır. Bazı üyeler, doğal konaklarında semptomatik enfeksiyona veya kansere neden olan insan ve hayvan patojenleri olup klinik belirtiler özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda gözlenmektedir. BKV ve JCV, Betapolyoma Virüs cinsi içinde yer almaktadır. Betapolyoma Virüs 20'den fazla tür içerir ve memelileri enfekte eder (2).

2.3. Epidemiyoloji

BKV enfeksiyonu immünkompetan kişilerde genellikle erken çocukluk döneminde asemptomatik geçirilir veya hafif üst solunum yolu semptomları olabilir (29). BKV, tüm dünyada yaygın görülen bir virüstür ve seroprevalansı yaklaşık % 90'tır (30, 31). Çocuklarda seroprevalans oranları 3-4 yaşlarında yaklaşık %50 (32), 5-9 yaşlarında ise %91 olarak bildirilmiştir (33). BKV enfeksiyonu endemiktir, her iki cinsiyeti de etkiler, mevsimsel olmayıp, enfekte olan nüfusun sosyoekonomik durumuyla ilişkili değildir (34).

Çeşitli bulaş yolları tanımlanmıştır:

- Solunum yolu (çocuklarda gözlenen bademcik taşıyıcılığı),
- Fekal-oral bulaş,
- Kan yoluyla (lökositlerde BK virüs taşıyıcılığı)
- Cinsel yolla bulaş (sperm taşıyıcılığı) (35).
- Plasenta yoluyla (dikey geçiş yoluyla bebeğe bulaş) (36)
- Organ nakli sırasında (seropozitif donörden seronegatif alıcıya) (37)

BKV enfeksiyonu tipik olarak çocukluk döneminde, genellikle fekal-oral yolla veya solunum yolu ile bulaşır. Virüs çevresel inaktivasyona karşı dirençlidir, kanalizasyon ve su kaynaklarında yüksek konsantrasyonda saptanması fekal-oral bulaşı göstermektedir. Virüs enfekte hücrelerde çoğalır ve diğer dokulara lökositler ile kan dolaşımı yoluyla taşınır. Primer enfeksiyondan sonra (semptomu olan veya olmayan), BKV konaktan tamamen elimine edilemez. İmmün sistem tarafından BKV replikasyonu kontrol altına alınarak üroepitelyum ve renal tübüler epitel hücrelerine tropizim gösterdiğinden yaşam boyu latent kalır (38, 39). Şekil 2.1.'de BKV'nin doğal süreci gösterilmektedir (40).

2.4. Patogenez

Çoğu hastada hem primer enfeksiyon hem latent enfeksiyon klinik olarak sessizdir ve bilinen herhangi bir yan etki ile ilişkili değildir. Genellikle immünsüpresyon durumunda virüs reaktif olur. Reaktivasyon ile birlikte enfekte olan renal tübüler epitel hücreleri intranükleer bazofilik inklüzyonlar oluşturur ve hücrelerin nükleer boyutu artar. Bu hücreler bazal membrandan ayrılır ve papanicolaou (PAP) boyası ile boyanması sonucu idrarda Decoy hücreleri olarak görünürler. İnsan tübüler epitel hücrelerinde yaklaşık 48 saat süren viral proliferasyona bağlı genomik değişiklikler ile apoptoz, DNA hasarı ve immün mediatörlerin salınması gibi süreçler meydana gelir. Bu değişiklikler viral reaktivasyonun litik fazına ve renal allogreftte hasara katkıda bulunur (41).

Virüs persistansı, viral replikasyon ve hücresel inflamasyon sonucu renal tübüler epitel hasarıyla meydana gelir. İnflamasyon ve fibrozis, daha fazla hasar ve devamında tübüler atrofi, nekroz ve nefron kaybına yol açar (42). Ortaya çıkan inflamasyon, viral replikasyonu daha da arttırabilir (43). BKV daha sonra interstisyumda çoğalır ve peritübüler kapillerlere geçerek viremiye neden olur. Sonuç, hasarın, iltihaplanmanın ve fibrozisin derecesine bağlıdır. Böbrek nakli alıcılarında BKVİN veya hematopoietik kök hücre transplantasyonu (HKHT) hastalarında hemorajik sistit ile sonuçlanır (41).

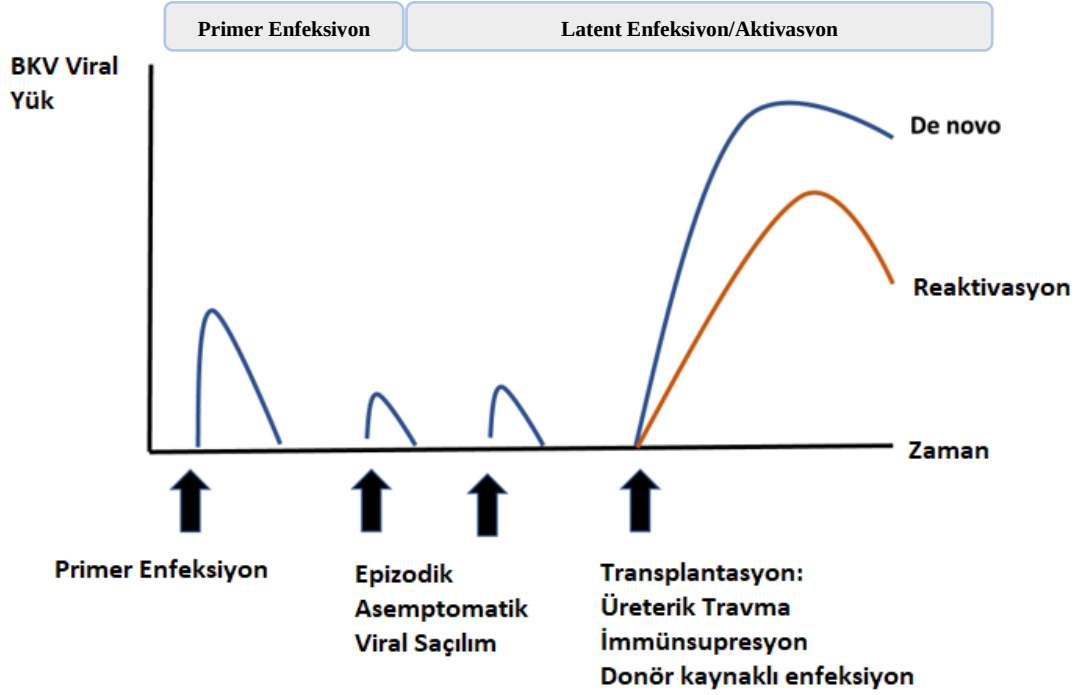
Virürlü hastaların yaklaşık üçte birinde BKV viremi gelişebilir ve BKVİN'ye ilerleyebilir. Renal transplant alıcılarındaki viremi oranları literatüre baktığımızda büyük farklılıklar göstermekte olup, prevalans %1.5 ile %33 arasında değişmektedir. İnsidans transplantasyon sonrası ilk yıl en yüksektir (44-46). Vakaların yaklaşık %1 ila %10'unda BKVİN meydana gelmektedir ve bunlar da %50'ye varan oranda greft kaybıyla sonuçlanmaktadır (44, 47-49). Böbrek transplantasyonu dışında, BKV'ye en çok HKHT alıcılarında rastlanmaktadır (50).

BKVİN'nin inflamatuvar profili değerlendirildiğinde, akut allogreft reddine benzer olup hem virüs hem allogreftte yönelik inflamatuvar yolların aktivasyonu gösterilmiştir (51). Alloimmünite ve akut rejeksiyon (BKV replikasyonu sonrası immünsüpresyon azaltılması sonucunda) allogreft disfonksiyonuna ve greft kaybına neden olmaktadır (52). BKVİN gelişiminde başlangıç noktası muhtemelen

renal allogreftteki inflamatuvar hücre infiltrasyonudur. Hücre aracılı immün yanıtta bozulma, greftte aktif viral replikasyon ile başlayan, idrarda viral saçılım ve viremi ile devam eden reaktivasyon ile ilişkilendirilmiştir (38, 50).

BKVİN patogeneğinde hücrel bağışıklık yetmezliğinin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinden oluşan hücrel bağışıklık kontrolü bozulduğunda BKV aktiveleşebilir (53, 54). Yapılan çalışmalar TAg'nin CD8⁺ T hücrelerini uyarırken, Vp1'in ise CD4⁺ T hücrelerini uyardığını bildirmiştir (55). CD4⁺ Th hücreleri, tümör nekroz faktörü- α , interferon- γ , IL-2 salgılayarak spesifik polifonksiyonel antiviral bir etkiye sahiptir (56).

Dentritik hücreler virüsü alır, peptidlerine ayırır ve viral antijenleri MHC-II ile Th hücrelerine, MHC-I ile de sitotoksik T hücrelerine (CD8 T lenfosit) sunar. Aktive olan Th sentezlediği sitokinler ile yeni sitotoksik T hücreleri ve B hücrelerini aktive eder. CD8 T lenfosit aktivasyonu sonucu sitoplazmik granüllerde bulunan perforin ve granzimler salgılanır ve hücrenin ölümüne yol açar. Aktive olan CD8 T lenfositler konak hücreye sitotoksik olarak hasara neden olabilmektedir (57).



Şekil 2.1. BKV enfeksiyonunun doğal süreci (40)

2.5. Serotipler ve Subtipler

BKV genomunun en değişken 2 bölgesi, NCCR ve VP1 genidir (58). Sekanslamaya dayalı olarak BKV, majör kapsid proteini olan VP1 gen dizisine göre dört genotipe ayrılmaktadır. Filogenetik analiz ile genotip I'in dört subtipi (I/a, I/b-1, I/b-2 ve I/c) ve genotip IV'ün altı subtipi tanımlanmıştır (IV/a-1, IV/a-2, IV/b-1, IV/b-2, IV/c-1 ve IV/c-2) (59). Dünyada en sık genotip I görülmektedir (%80). 2. sıklıkta genotip IV (%15)'e rastlanmaktadır (60). Afrika'da genotip III daha sık görülmekte olup Asya ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde ise genotip IV daha yaygındır (61). Her genotipin subtiplerinin de popülasyonlara (Amerikan ve Avrupa popülasyonlarında bulunan IB ve Asyalılarda IC) göre farklı dağılıma sahip olduğu gözlenmektedir (59). Daloğlu ve arkadaşları tarafından Antalya'da yapılan çalışmada böbrek transplantasyonu yapılan 71 hastada BKV genotip I (%81.7), IV (%15.5), II (%1.4) ve I + IV (%1.4) saptanmış. Örneklerin hiçbirinde genotip III saptanmamıştır (62). Ülkemizde BKV genotiplendirmesinin yapıldığı başka bir çalışmada altı idrar örneği incelenmiş, beş örnekte genotip V ve bir örnekte genotip

la saptanmıştır (61). Başka bir çalışmada ise böbrek transplantasyonu yapılan 13 yaşındaki bir hastada BKV Afrika varyantı bildirilmiştir (63).

2.6. Viriyon ve Genom Yapısı

BKV, 40 ila 44 nm çapında, 72 kapsomerden oluşan ikosahedral kapsidli küçük, zarfsız bir virüstür. Genomu yaklaşık 5000 baz çiftinden ve dairesel çift iplikli DNA'dan oluşur (22). Viral genom konak hücre histonları (H2A, H2B, H3 ve H4) ile paketlenmiştir (64). Her genom yaklaşık 20 nükleozom içerir (65). İnsan polyomavirüsleri, diğer polyomavirüsleriyle benzerdir (66). BKV, SV40 ile %70 ve JCV ile yaklaşık %75 nükleotid sekans homolojisi göstermektedir (67). Bu benzerlik, BKV'ye özgü PZR testinin tasarımı sırasında dikkate alınmalıdır (68).

BKV'nin dairesel genomu altı ana viral proteini kodlar ve üç fonksiyonel bölgeye ayrılır. Bunlar;

- Erken viral gen bölgesi (The early viral gene region - EVGR)
- Geç viral gen bölgesi (The late viral gene region - LVGR)
- Kodlama yapmayan bölge (Non-coding control region: NCCR)'dir.

Şekil.2.2.'de BKV genomunun genomik yapısı yer almaktadır. Genomunda iki farklı transkripsiyonel birim bulunmaktadır. Büyük tümör antijeni (TAg) ve küçük tümör antijeni (tAg) erken kodlama bölgesinden eksprese edilirken, VP1, VP2, VP3 ve agnoprotein geç gen bölgesinden eksprese edilir.

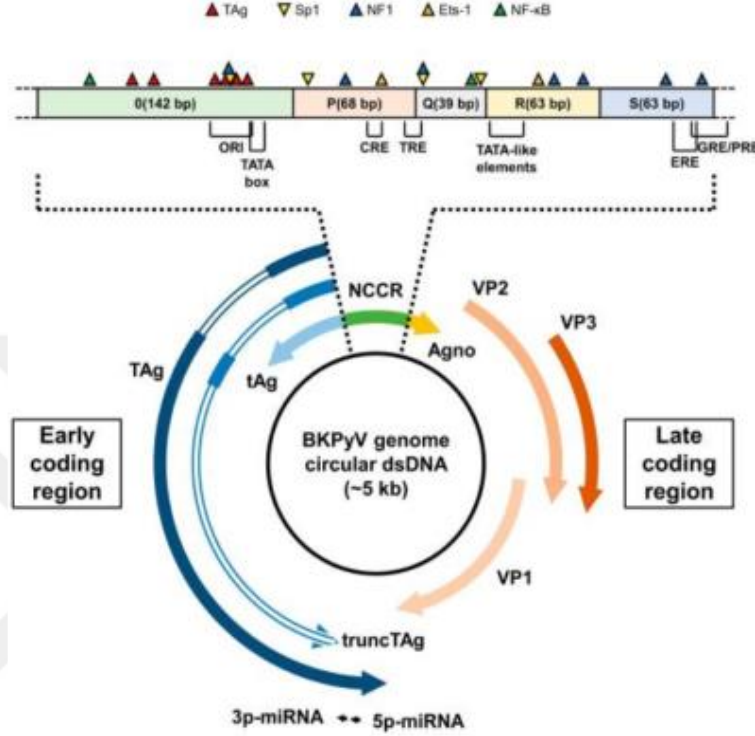
EVGR, DNA replikasyonundan önce kopyalanır. Konak hücrenin enfekte olmasından sonra mRNA'lar tarafından eksprese edilen TAg, tAg ve trunke TAg'yi (truncTAg) kodlar. TAg hem çekirdek hem sitoplazmada, truncTAg çekirdekte lokalizedir. tAg'nin rolü tam olarak bilinmemektedir ancak hücre transformasyonuna yardımcı olduğu ve TAg'nin aktivitesinde görev aldığı bilinmektedir. Viral DNA sentezi, TAg'nin viral DNA replikasyon orijinine bağlanmasıyla başlatılmaktadır. TAg, helikaz aktivitesi nedeniyle DNA replikasyonunda LVGR için önemli bir düzenleyici proteindir. Aynı zamanda TAg, Rb ve p53 tümör supresör proteinlerine bağlanıp hücre ölümünü engellemektedir (6, 69, 70).

LVGR, DNA replikasyonu meydana geldikten sonra kopyalanır. Viral kapsid proteinleri olan VP1, VP2, VP3 ve agnoproteini kodlar (6). Kapsid proteinleri, kromatin zincirleri şeklinde histon proteinleri ile kompleks oluşturan tek bir DNA molekülünü çevreler. VP1, pentamerik yapıda 360 VP1 molekülünün bir araya gelmesiyle kapsid yapısını oluşturan ana yapısal proteindir. VP1, viriyonun dışında açığa çıkan tek viral proteindir ve virüsün hücreye girişine yardımcı olan konak hücre reseptörlerine bağlanmasından sorumludur. VP1, genetik heterojeniteye sahiptir. VP2 ve VP3 minör kapsid proteinleri olup, her VP1 pentameriyle ilişkili olarak kapsidin iç yüzeyinde bulunurlar. Hurdiss ve ark. minör kapsid proteinlerinin histonlar ve genomik DNA ile ayrı temas noktalarına sahip olduğunu göstermiştir. VP2 ve VP3, nükleer lokalizasyon sinyali olarak işlev görmektedir bu da viriyonların konak hücre çekirdeğine doğru ilerlemesine yardımcı olur (71, 72). VP-3, adenosin difosfat riboz polimerazın aktivasyonu ile adenosin trifosfat (ATP) tüketimine ve hücre ölümüne neden olmaktadır (73). Agnoprotein, hücre döngüsünün ilerlemesi, virüs transkripsiyonunun regülasyonu, kapsid yapımı, konak DNA onarım fonksiyonunun inhibisyonu ve hücreden progeni virüs salınımı dahil olmak üzere birçok hücresel süreçte rol oynar (74).

NCCR, erken ve geç bölgeler arasında, düzenleyici bölge olarak da adlandırılan 400bp'den oluşan hiperdeğişken bölgedir. Viral geç ve erken kodlama bölgelerinin genlerinin ekspresyonunu düzenlemektedir (35). Erken ve geç kodlama bölgelerinin transkripsiyonu NCCR içindeki replikasyon kaynağından çift yönlü olarak ilerler. Konak hücre transkripsiyon faktörlerinin ve TAg antijenin bağlanma bölgelerini içerir (69, 75).

NCCR'deki farklılıklar, BKV genomunun iki formunu birbirinden ayırır. Bunlar arketip ve yeniden düzenlenmiş (rearranged form) BKV olarak adlandırılmaktadır. NCCR, immünkompetan konaklarda arketip konfigürasyonundadır, BKVİN'si olan immünkompremise hastalarda genetik olarak yeniden düzenlenebilir. Arketip virüsünün, kalıcı, asemptomatik enfeksiyon oluşturabilen bulaşıcı form olduğu düşünülmektedir. Yeniden düzenlemelerin, transkripsiyon faktörü bağlama bölgelerinin afinitesini veya sayısını artırıp azaltarak virüsün konak hücrede meydana gelen değişikliklere uyum sağlamasını kolaylaştırdığına inanılmaktadır (76). Yeniden düzenlenmiş form NCCR içinde

delesyonlar veya duplikasyonlar içermektedir ve hastalıkla ilişkili BKV formu olduğu düşünülmektedir (77). NCCR'de meydana gelen mutasyonlar klinik olarak önemli viral replikasyona sahip böbrek nakli alıcılarında artmış BKV yükleriyle ilişkilidir (73).



Şekil 2.2. BKV genomu (78)

2.7. BKV Yaşam Döngüsü

Bir hücreyi başarılı bir şekilde enfekte edebilmek için viral partikülün hücre yüzeyine tutunması, reseptörler ile etkileşime girmesi ve çoğalmak için bir yolu hedeflemesi gerekir. Bu da DNA virüsleri için viral genomun çekirdeğe taşınması gerektiği anlamına gelir. Polyomavirüslerin yaşam döngüsü erken ve geç aşamalara ayrılır. Erken aşama, virüsün konak hücrenin yüzeyi ile etkileşimi ile başlayıp viral DNA replikasyonunun başlangıcına kadar devam eder. Geç aşama, yeni viriyonların bir araya gelmesi ile başlayıp viral progeninin serbest bırakılmasıyla sonuçlanır. Bu da tüm viral replikasyon döngüsünün tamamlandığını gösterir (79, 80).

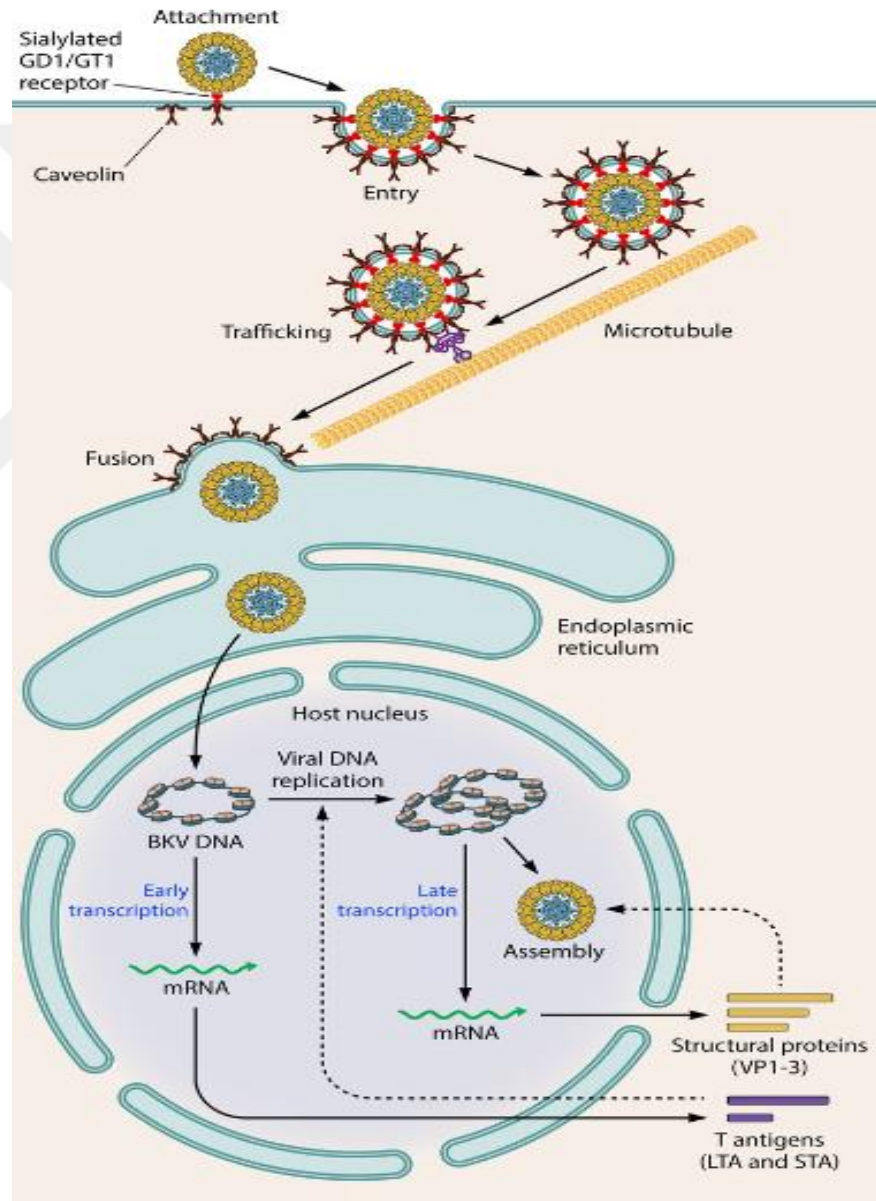
BKV'nin replikasyon döngüsü, hücresel bir reseptöre bağlanarak başlar (Şekil.2.3). BKV, hücre yüzeyindeki gangliosid reseptörlerine (özellikle GT1b ve

GD1b) ve/veya $\alpha(2,3)$ -bağlı sialik asit içeren N-bağlı bir glikoproteine bağlanır. Bağlanma sonrası, BKV kaveola aracılı endositoz yoluyla hücreye alınır (81). Girişi takiben enfeksiyondan 8 ila 16 saat sonra mikrotübüller aracılığıyla endoplazmik retikulum (ER) yoluyla ER'ye taşınır. ER yoluyla taşınmanın polyomavirüsler için en önemli avantajı viral kapsidin soyulmasını kolaylaştıran şaperonları, redüktazları ve disülfid izomerazları içermesidir. Viriyonun nükleusa ilerleyebilmesi için gerekli etkileşimler ve konformasyonel değişiklikler de ER'de gerçekleşir. Dış kapsidin soyulması sonucu VP2/VP3'ü açığa çıkaran hidrofobik bir yüzey oluşur ve kısmen soyulmuş virüslerin sitozole salınmasını sağlar (82, 83). BKV daha sonra VP2 ve VP3 üzerinde nükleer lokalizasyon sinyaliyle bağlanan α/β importin ile çekirdeğe aktarılır.

BKV, enfeksiyonun başlamasından 24 saat sonra çekirdekte viral DNA'dan önce erken gen ekspresyonuna başlar. Erken mRNA'lar sitoplazmaya geçer ve EVGR sentezi gerçekleşir. Sonra çekirdeğe dönerek DNA replikasyonunu sağlar. Viral replikasyonun ilerlemesiyle LVGR genleri eksprese edilir. Sitoplazmadaki translasyon aşamasından sonra viral kapsid proteinleri olan VP1, VP2 ve VP3 nükleusa taşınır ve viriyon nükleusta bir araya gelir (84). Yüksek kalsiyum konsantrasyonu, yeni sentezlenmiş genom çevresinde viral kapsomerlerin çekirdekte bir araya gelmesine yardımcı olmaktadır (85). Bu evrede viral partiküller, enfeksiyondan iki gün sonra enfekte olmuş hücrelerin çekirdeğinde görülmeye başlarlar (86). Elektron mikroskobu ile nükleusta kristal benzeri yapılar, ışık mikroskobunda nükleer inklüzyon cisimcikleri olarak tanımlanırlar. İdrarda elektron mikroskobuyla tipik “decoy hücreleri” olarak saptanırlar (87). Viriyonlar hücre lizizinden sonra enfekte hücrelerden salınırlar. Ayrıca, bunların bir kısmı, nonlitik bir yolla extrasellüler ortama da salınabilirler (86, 88).

Geç viral gen replikasyonu, viral DNA replikasyonu başlatıldıktan sonra başlar. İki primer RNA kopyalanır ve alternatif splicing ile 16S RNA'dan Vp1 ve 19S RNA'dan Vp2 ve Vp3'ün mRNA'sı translasyona uğrar. Agnoprotein, viral replikasyonun bu kritik geç aşaması sırasında mitokondriyal membran potansiyelini bozarak doğal bağışıklık sistemini bozup viral replikasyonu kolaylaştırır. Hasarlı mitokondriyal ağ parçalanır ve otofaji hedeflenir (89, 90).

BKV aynı zamanda 5p-miRNA ve 3p-miRNA olmak üzere iki mikroRNA(miRNA)'yı kodlamaktadır. MikroRNA ekspresyonu, TAg'nin 3' ucundan transkribe edilmektedir. MiRNA'lar immün regülasyonda rol alan, küçük, kodlama yapmayan RNA molekülleridir. Bu miRNA'ların erken mRNA ekspresyonunu düzenleyebildiği ve polyomavirüs ile ilişkili hastalığı olan bireylerde ifade edildiği de gösterilmiştir. Yapılan bazı çalışmalara göre miRNA'ların viral latentlik için önemli bir rol oynayabileceği belirtilmektedir (90, 91).



Şekil 2.3. BKV yaşam siklüsü (92)

2.8. Klinik

İmmunkompetan kişilerde primer enfeksiyonların çoğu ya asemptomatiktir ya da nonspesifik viral sendroma neden olur. İmmüsupresif kişilerde ise, primer enfeksiyon ve/veya reenfeksiyon, spesifik sendromlara ve morbiditeye neden olabilir. BKV enfeksiyonu ile ilişkili hastalıklar spesifik hasta popülasyonlarında daha sık karşılaşırlar (69).

BKV'nin yerleştiği ana bölgeler böbrek tübüler epitel hücreleri ve mesane transizyonel yüzey hücreleridir. Genellikle bu hücrelerde latent olarak kalır. Ancak BKV replikasyonu solid organ transplantasyonu, kemik iliği transplantasyonu (KİT), AIDS, multipl skleroz, gebelik, kemoterapi uygulaması gibi çeşitli immünyetmezlik durumlarında aktif hale gelebilir (54). Güçlü immünsüpresif ajan kullanımı ve geliştirilen viral sürveyans protokolleri ile BKV günümüzde böbrek nakli alıcılarında önemli bir morbidite nedeni olarak saptanmaktadır. Böbrek nakli durumunda, hastalık nakledilen böbrekte meydana gelmektedir. Kalp, karaciğer veya akciğer gibi diğer organların nakli durumunda, alıcının nativ böbreklerinde ve nadiren diğer organlarda BKV enfeksiyonu saptanmaktadır (93).

BKV, transplantasyon sonrası iki ana komplikasyonla ilişkilidir: Şiddetli tübülointerstisyel nefrit (yani BKVİN) en sık böbrek nakli alıcılarında, hemorajik sistit ise allojenik HKHT'yi takiben görülmektedir (94-96). Böbrek nakli hastalarının %1 ila %10'unda BKVİN (97) ve HKHT hastalarının %5 ila %25'inde BKV ile ilişkili hemorajik sistit (BKV-HS) saptanır (98).

BKV enfeksiyonu genellikle nakilden 10 ila 13 ay sonra ortaya çıkar. BKVİN, nakil sonrası ilk haftada veya nakil sonrası 5 yıla kadar ortaya çıkabilir (74). BKVİN böbrek nakli alıcılarında tübülointerstisyel nefrit veya üreteral obstrüksiyona bağlı olarak greft disfonksiyonu ve yetmezliği ile sonuçlanabilmektedir. Nadir görülmesine rağmen böbrek dışı solid organ transplantasyonu (SOT), otoimmün hastalıkları ve kalıtsal, edinsel veya ilaca bağlı immün yetmezliği olan hastalarda da BKV ile ilişkili patolojiler görülebilir (69, 99).

BKV'nin, immünsüprese konaklarda, hemorajik sistit ve BKVİN dışında daha az yaygın olarak pnömonit, retinit, karaciğer hastalığı ve meningoensefalit dahil olmak üzere çeşitli komplikasyonlarla ilişkili olduğu bilinmektedir (32).

Ayrıca bazı kanserler de BKV enfeksiyonu ile ilişkili komplikasyonlar arasındadır. (69, 100). BKV replikasyonun aşamaları şu şekilde gelişir: virüri, viremi ve ardından viral replikasyon ile nefropati gelişebilmektedir.

Primer enfeksiyon sonrası immünkompetan kişilerde, idrarda BKV-DNA'nın düşük seviyelerde saptanması aktif viral replikasyonu göstermektedir. Genellikle klinik sonuçlara neden olmaz. İmmünkompremize hastalarda virüri insidansı artar. İdrarda BKV'nin dökülmesi, sağlıklı yaşlı hastalar, hamileler ve hücrel bağışıklığı baskılanmış hastalar arasında yaygındır. İdrar sitolojisinde saptanan decoy hücreleri, idrarda 7 log10 kopya/mL'den fazla viral yüke karşılık gelen yüksek seviyeli virüsün belirteçidir (61, 68). Böbrek dışındaki solid organ nakli alıcılarında, virüri hastaların yaklaşık yüzde 15'inde görülür ve ortalama idrar viral yükü böbrek nakli alıcılarına kıyasla daha düşüktür, bu da yaklaşık 6 log10 kopya/mL'dir (49, 101-103).

Böbrek nakli alıcılarında, kanda BKV-DNA'nın saptanmasının, BKVİN için belirteç olduğu ve BKV viremisinin derecesi ile orantılı olduğu gösterilmiştir. Prospektif bir çalışmaya göre, vireminin hastalığın başlangıcı ve ilerleyişi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (97, 104, 105). Böbrek dışındaki transplant alıcılarında, BKV viremi nadirdir. Genellikle düşük düzeydedir ve klinik önemi yoktur (106).

2.8.1. Risk Faktörleri

En önemli risk faktörü, immünsüpresyondur. Ancak yapılan çalışmalara göre immünsüpresyon ile ilişkisi değişkenlik göstermektedir. Daha yüksek immünsüpresyon tedavisi alan böbrek dışı SOT hastalarıyla böbrek nakli alıcıları kıyaslandığında nativ böbreklerde nadiren BKVİN gelişmektedir (93, 106). Bu da klinik seyrin transplant tipine göre değiştiğini göstermektedir. Başka bir çalışma, böbrek nakline göre daha düşük doz immünsüpresyon tedavisi alan karaciğer nakli alıcılarında daha düşük BKV viremi insidansı görülmüştür. Bu da immünsüpresyonun derecesine bağlı olabileceğini göstermektedir. Uygunsuz böbrek nakilleri de yüksek BKV enfeksiyon oranına sahiptir (49). Yaygın olmamakla birlikte, BKV-HS VE BKVİN için diğer risk faktörleri aşağıda yer almaktadır.

BKV-HS için risk faktörleri genel olarak hasta, transplant ve virüsle ilişkili olarak üç ana grupta sınıflandırılabilir:

1. Hastayla ilişkili: yaş, sitopeni
2. Transplantla ilişkili: akraba dışı donör, kök hücre kaynağı, GVHD, CMV seropozitifliği
3. Virüsle ilişkili: yüksek düzeyde BKV virürisi ve/veya viremi (98, 107)

BKVİN ile ilgili risk faktörleri 4 ana grupta sınıflandırılabilir:

1. Virüsle ilişkili: NCCR bölgesinin yeniden düzenlenmesi
2. Transplantla ilişkili: immünsüpresyon derecesi, akut rejeksiyon epizodları, transplante böbrekte uyumsuzluk, geç tip allogreft fonksiyonu, HLA uyumsuzluğu, ABO uyumsuz transplantasyon, idame steroid immünsüpresyonu
3. Alıcıyla ilişkili faktörler: Azalmış hücrel bağışıklık, yaş (<17-18 ve >55-60 yaş), cinsiyet (erkek), ırk (Afro-Amerikan), üreteral stent varlığı, diabetes mellitus, üreter travması, CMV ile koenfeksiyon
4. Donör faktörleri: BK seropozitif donör (özellikle D+/R- çiftleri), kadavradan nakil (73, 97, 108-111).

Yapılan çalışmalara göre donörde BKV antikor varlığı, BKV reaktivasyonu ve replikasyonu için başka bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Donörde saptanan BKV-DNA, nakil sonrası BKV enfeksiyonu için bir belirleyici olarak kabul edilebilir. Son çalışmalar, nakil sonrası alıcıda BKV replikasyonunun genellikle donörden bulaşan enfeksiyona bağlı olduğunu göstermiştir (112, 113).

2.8.3. BKV İle İlişkili Nefropati

BKV, renal allogreft kaybına kadar ilerleyebilen BKVİN'ye yol açabilmektedir. Böbrek nakli alıcılarında, böbreklerde ilerleyici fonksiyon bozukluğu olarak başlar. Nativ böbreklerde ise BKVİN nadirdir ancak böbrek dışı organ nakli alıcılarında tanımlanmıştır (102, 103, 114).

BKVİN renal transplantasyondan sonra latent virüsün reaktivasyonu ile başlar. Transplantasyondan sonraki ilk üç ay içinde transplant alıcılarının %30-

50'sinde gözlenir. İlerleyen zamanlarda ise yaklaşık %80'inde BKV saptanabilir ve bunların %5-10'u BKVİN'ye ilerleyebilmektedir (115, 116). BKVİN gelişen hastalarda renal tübüler hücrelerin yıkımına, inflamasyonun derecesine ve renal fibrozise bağlı greft yetmezliği gelişmektedir (117).

Son yıllarda artan BKV viremi insidansının, daha güçlü immünsüpresyon rejimlerinin mi yoksa güvenilir test yöntemlerinin artmasının bir sonucu mu olduğu tartışma konusudur. BKVİN, ilk tanımlandığı dönemlerde greft kaybı oranı %50-90 civarında bildirilmiştir (72). Artan tanı yöntemleri ve immünsüpresyon rejimlerinin etkin yönetimiyle greft kaybındaki bu oranda düşüş saptanmıştır (118).

BKVİN'de klinik değişkendir. Semptom görülmeyebilir ya da ateş, hematüri, serum kreatinin düzeyinde yavaş ve progresif artış ve renal allogreft biyopsisinde beklenmeyen progresif renal hasar olabilir (119). Kantitatif BKV PZR sonuçlarını bildiren çalışmalara göre, BKVİN gelişiminde viral yük düzeyi ile saptanan semptomlar arasında pozitif bir ilişki olduğu gözlenmektedir (97).

BKVİN ve allogreft reddi, immün spektrumun zıt uçlarında yer alan nakil sonrası iki önemli komplikasyondur. Parajuli ve arkadaşları bu komplikasyonlarla ilgili sonuçları 3 yıl boyunca incelemiştir. BKVİN ve rejeksiyon, böbrek hasarının önde gelen nedenleri iken, tanıdan 3 yıl sonra böbrek fonksiyonu BKVİN'de rejeksiyondan daha kötü olarak sonuçlanmıştır (120). BKVİN'nin önde gelen nedeni, alıcıdaki latent virüsü reaktif eden aşırı immünsüpresyon veya allogreftte latent bulunan BKV'nin şiddetli hale gelmiş enfeksiyonudur.

Şu anda direkt etkili antiviral tedavi mevcut değildir. 1971'de ilk vaka tanımlandığından beri, immünsüpresif tedaviyi azaltma, BKVİN için birincil strateji olmaya devam etmektedir (3). Ancak, yetersiz immünsüpresif kullanımı hastayı akut veya kronik rejeksiyona yatkın hale getirerek greft fonksiyonunun azalmasına veya greft kaybına neden olabilir (121). Böbrek nakli alıcılarında immünsüpresif ilaçlarla tedavi sonucunda virüs çoğalabilir ve ciddi komplikasyonlara yol açabilir. Bununla birlikte, virüsün persistansı ve immünsüpresyon sonrası replikasyona yol açan koşullar belirsizliğini korumaktadır (54, 93). Bu hastaların renal tübüler epitel hücrelerinde BKV'nin reaktivasyonu, immünsüpresif tedavinin tipinden bağımsız olarak gerçekleştiği (13) ve

immünsüpresyonun derecesi ile daha yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir (44). Schwarz ve arkadaşları 2016 yılında, nakil öncesi ve sonrası donör ve alıcılardaki virüs genotipini karşılaştırmışlardır. Alıcıda nakil öncesi tespit edilen virüs genotipinin nakil sonrası tespit edilen virüs genotipinden farklı olduğunu ve donördeki virüsün genotipiyle uyumlu olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma, nakil sırasındaki enfeksiyonun önemine dair kanıt sağlamıştır. Ancak virüsün orijininin BKV'İN gelişme sıklığını etkileyip etkilemediği bilinmemektedir (122).

2.8.4. BKV İle İlişkili Hemorajik Sistit:

BKV, allojenik HKHT olan hastalarda hemorajik sistite neden olabilir (44). HKHT, lenfoma ve lösemi gibi malign hastalık grubuna ve metabolik hastalıklar ve immün yetmezlik sendromları olmak üzere malign olmayan durumlara sahip hastalar için hayati bir küratif tedavi seçeneği sunar. Ancak nakille ilişkili komplikasyonlar tedaviyi olumsuz etkileyebilir. (123, 124).

BKV, HKHT alıcılarında bağışıklık sistemi yeniden yapılandırıldığından virüse karşı bir cevap oluşturur ve mesane mukozasında iltihaplanma ile hasara neden olur. Morbidite ve mortalite ile birlikte hastanede kalış süresini arttırmaktadır (125). BKV, HKHT alıcılarının %50'sinden fazlasını etkileyip nakil sonrası yaygın görülmektedir (126, 127). Yani BKV-HS, allojenik HKHT alıcılarında virüs replikasyonunun en ciddi sonucudur ve %5-25'inde gelişir (98, 107).

Semptom ve hastalık şiddeti, viremi ve virüri derecesi ile ilişkili görülmektedir. Virürisi olan hastaların çoğunda semptomatik hastalık gelişmemektedir. Klinik poliüri, dizüri, hematüri, idrarda kan pıhtıları ve suprapubik ağrı ile karakterizedir (128, 129). Durumun şiddeti, minör hematüriden mesanede pıhtı oluşumuna kadar değişebilir. Kan pıhtıları idrar yolunda, tübülointerstisyel nefrite veya nefropatiye yol açabilen obstrüktif bir sendroma neden olabilir. Sonuçta nativ böbrekte yetmezliğe neden olabilmektedir (13, 37, 92, 130).

BKV-HS'nin patogenezi için iki ana hipotez vardır. Birincisi, hem viral hem de immün aracılı ürotelyal hasarla ilgili bir süreçtir. Buna göre; tedavi rejimleri ürotelyal mukozaya hasar verir, immün baskılanma sırasında virüs reaktif olup çoğalır ve donör immün hücreleri viral antijenlere saldırıp mesane ve mukozal

hasarı sürdürür (44, 98). İkinci hipotez ise, temel olarak immünsüpresif tedavinin neden olduğu hasarı takiben mesane hücrelerinde BKV'nin neden olduğu sitopatik etkileri içerir (131).

HKHT hastalarında nakil sonrası HS'nin zamanlaması, altta yatan etiyolojiyi belirlemede çok önemlidir. İlk 2 haftada gelişen HS erken başlangıçlı olarak tanımlanmaktadır ve alkile edici ajanlar (siklofosfamid, busulfan) ile tüm vücut ışın tedavisi gibi rejimlerin bileşenlerinin yol açtığı ürotelyal hasardan kaynaklanmaktadır (98). BKV-HS genellikle HKHT'den 2 hafta ila 6 ay arasında bir zaman diliminde görülmektedir. Nadiren adenovirüs enfeksiyonu, BKV-HS'ye benzer kliniğe sahip geç başlangıçlı HS'ye yol açabilmektedir (132).

BKV ile ilişkili diğer hastalıklar:

BKV, in vitro ve hayvan modellerindeki davranışı nedeniyle tümör virüsü olarak gösterilmiştir (133). BKV'nin karsinogenezdeki kesin rolü tartışmalıdır. Beyin, prostat, mesane, ürotelyum ve diğer organları içeren bazı tümörlerde viral DNA dizileri ve protein ekspresyonu saptanmıştır. Ayrıca yayınlanan bir vaka raporuna göre BKV'nin tedavisi gören böbrek nakli alıcılarında mesane kanseri insidansı beklenenden yüksek saptanmıştır (134-136). Bazı çalışmalar, BKV enfeksiyonunun hem immünsüpresif hem de immünkompetan kişilerde mesane kanseri gelişimi için önemli bir risk faktörü olabileceğini düşündürmektedir (137, 138). TAG antijeninin, konak hücrelerde hücre döngüsünü başlatan ve deaktive eden pRB ve p53 baskılayıcı proteinlere bağlanabildiği bilinmektedir. Bu yolla onkogenik hücre transformasyonu ile bağlantılı olabileceği belirtilmektedir (139).

Bazı vaka raporlarında yaygın BKV enfeksiyonunun nadir olarak böbrek, akciğer, beyin, mesane, gastrointestinal sistem, kardiyak ve endotelial hücrelerde histoloji ve/veya immünohistokimyasal tanı ile sistemik yayılımının doğrulandığı çoklu organ enfeksiyonuna neden olduğu belirtilmektedir (140-143). Bu sistemik yayılım, NCCR bölgesindeki yeniden düzenlemelerle bağlantılı olabilir (142).

2.8.5. İmmün Yanıt

BKVİN gelişiminde başta hücresel bağışıklık olmak üzere immün yanıt çok önemlidir. Doğal bağışıklık yanıtı, primer enfeksiyona ilk savunma yanıtını oluşturur (144). Dendritik hücreler, sekonder immün yanıtın uyarılmasında çok önemli bir role sahiptir (145). Womer ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmaya göre BKVİN gelişen böbrek nakilli hastalarda kandaki dendritik hücre sayısının daha düşük olduğu bildirilmiştir (146).

Sekonder immün yanıt, viral antijenlere maruz kaldıktan sonra oluşur. Hümorale immün yanıt sistemi, nötralize edici antikorlar aracılığıyla viral bulaşı engellemek için çalışır. Yapılan araştırmalar, viremi ve BKVİN gelişimi açısından seronegatif alıcıların seropozitif alıcılara göre daha yüksek risklere sahip olduğunu ve bu da hümorale bağışıklığın BKV enfeksiyonunu sınırlamada yardımcı olabileceğini göstermiştir (113, 147, 148). Yapılan başka bir çalışmaya göre, seropozitif donöre sahip alıcılarda, seronegatif donöre sahip alıcılara göre nakil sonrası daha yüksek BKV'ye özgü antikor titresi saptanmıştır (149). Bu da donörün BKV enfeksiyonunun alıcıda hümorale immün yanıtı indükleyebileceği anlamına gelmektedir (150). Yani nakil öncesi yüksek düzeyde nötralize edici anti-BKV antikorlarının varlığı BKVİN riskini azaltabilir. Ancak virüs, nötralizasyondan viral antikor reseptörlerinde oluşabilecek bir mutasyon ile saklanabilir.

Latent virüsün reaktivasyonu T hücreleri ile çok iyi bir şekilde kontrol altına alınabilmektedir. Hücresel bağışıklık, sitotoksikite ve patojen tespiti açısından daha etkili bir enfeksiyon kontrolü sağlar (92, 151). Hücresel bağışıklık sisteminin elemanları olan başta BKV'ye özgü polifonksiyonel T hücreleri olmak üzere CD8+ T ve CD4+ T hücreleri çok önemli role sahiptir (152, 153).

İmmünkompetan konakta virüs replikasyonu başlıca, antikorları nötralize ederek ve sitotoksik T hücre yanıtıyla sınırlandırılabilir. Hücresel immün yetmezliği olan hastalarda ise BKVİN ve BKV-HS daha sık tanımlanmaktadır (5, 154, 155). BKV'ye spesifik T hücresindeki artış, böbrek nakli sonrası vireminin kontrolünü kolaylaştırmaktadır (152, 156, 157). Böbrek nakli alıcılarında nakil öncesi ve sonrası BKV'ye özgü T hücre kaybı, nakil sonrası artan BKV replikasyonu riski ile ilişkilendirilmiştir (53). BKVİN tedavisinde

immünsüpresyonun azaltılması ile böbrek nakli olanların bir kısmında BKV'ye özgü T hücre artışı ile BKV viremisinin düzelmesi sağlanmaktadır (158). Böbrek transplantasyonunda BKV virüri ve viremi riski, hem donör hem alıcıda BKV'ye özgü antikor titresinin başlangıç seviyelerine bağlanmıştır. Aynı zamanda, BKV'ye özgü antikor varlığı veya yokluğu hücresele bağışıklık için bir aracı olabilir (147, 154, 159).

2.9. Tanı ve Tarama

Erken tanı BKVİN gelişimi ve ilerlemesine ilişkin bilgiler dikkate alındığında, çok önemlidir. Virüri veya vireminin saptanmasıyla immünsüpresyonun azaltılması, BKVİN'nin önlenmesinde şu an için en temel yöntem olarak uygulanmaktadır. BKVİN'de allograft sağkalımı, ilerlemiş lezyonlara kıyasla erken histolojik değişiklikleri olanlarda daha iyidir. Bu nedenle, histolojik hasar oluşmadan saptamak için tüm böbrek nakli alıcılarında BKV replikasyonunun izlenmesi önerilir (160).

BKVİN gelişmeden viral aktivasyonu ve böbrek dokusu hasarını saptamak için birçok tarama yöntemi geliştirilmiştir. Tarama, böbrekte geri dönüşümsüz fonksiyonel bozukluk gelişmeden erken tanıya ve immünsüpresif ilaçların azaltılmasına izin verir. Bu nedenle, Amerika Transplantasyon Derneği 2019 yılında yayınlanan kılavuzunda, idrar veya plazmada BKV reaktivasyonunun PZR yöntemiyle düzenli olarak taranmasını önermektedir. Önemli sınırlamalarından biri, uluslararası bir laboratuvar standardının olmaması ve laboratuvarlar arasında yüksek değişkenlik olmasıdır. İdrarda enfekte renal tübüler epitel hücrelerinin (Decoy hücreleri) saptanması gibi tarama yöntemleri, kişiye bağlı değişkenlik ile sensitivite ve spesifite açısından değerlendirildiğinde daha az optimaldir (161).

BKV replikasyonunu veya BKVİN'yi tedavi edecek veya engelleyecek etkili antiviral tedavi bulunmamaktadır. BKVİN tanısında böbrek nakli biyopsisi, altın standart yöntemdir ancak invazivliğinden dolayı her zaman uygulanamamaktadır. Bu nedenle kanda veya idrarda BKV taraması, immüno-kompresif hastalarda oluşabilecek ciddi komplikasyonlar açısından önerilmektedir. (97, 162, 163). BKV replikasyonu ve nefropatisinin izlenmesine yönelik yayınlanan kılavuzların tümü, nakilden sonra ilk yıl ve böbrekte

açıklanamayan bir fonksiyon bozukluğu geliştiğinde daha yoğun tarama yapılmasını önermektedir (44, 161, 164, 165). Ancak, önerilen metodolojiler ve tarama zaman aralıkları birbirinden farklıdır. Bu durum nakil merkezi uygulamalarında da farklılıklara yol açmaktadır.

2.9.1. Moleküler Testler (Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri - NAAT)

BKV'yi saptarken en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri polimeraz zincir reaksiyonudur (PZR). PZR, bir DNA veya RNA dizisinin enzimatik olarak amplifikasyonunu sağlayan moleküler bir tekniktir (166). BKV PZR genellikle majör protein VP1, TAg veya NCCR'yi kodlayan genlerdeki yüksek oranda korunmuş dizileri amplifiye etmek için kullanılır (41, 167, 168).

BKV böbreklerde latent olarak kalır ve replikasyonu genetik materyalin varlığı ile teşhis edilir. (169). Virüs, hastalığın başlangıcı ile eş zamanlı olarak saptanamaz. Ancak hasta örneğinde bulunan virüs partiküllerinin kantitasyonu düzenli olarak izlenebilir (69, 170).

Günümüzde BKV'nin viral yük değerlendirmesinde NAAT'nin rutin kullanımı hasta tanı-tedavi ve yönetiminin ayrılmaz bir parçası olmuştur. BKV reaktivasyonunda viral izlem hem kan (tam kan veya plazma) hem de idrarda yapılmaktadır. Viral reaktivasyon viremiden birkaç hafta önce idrarda tespit edilebilir ve BK virüsü 7.0 log₁₀ kopya/mL'ye ulaştığında BKVİN açısından erken bir belirteç olabilir (171). İdrarda kantitatif PZR testinin negatif prediktif değeri %100'dür, pozitif prediktif değeri ise %31'dir (97).

İdrar, plazma veya beyin omurilik sıvısında BKV reaktivasyonu izleminde kantitatif PZR yöntemi tercih edilmektedir (172). Kalitatif PZR'nin aktif viral replikasyon tespitinde sensitivitesi yüksektir ancak BKVİN'de düşük bir pozitif prediktif değere (PPV) (%30 ila %50) sahiptir (97, 162).

BKV viremisinin BKVİN gelişme riski ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (173). Hirsch ve arkadaşları tarafından 2002'de yapılan prospektif çalışma plazmadaki ortalama viral yükün, biyopsi ile kanıtlanmış BKVİN'si olan hastalarda, BKVİN'si olmayan hastalara göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, BKVİN'li tüm böbrek nakli alıcılarının plazma viral

yüklerini >7,700 kopya/ml olarak bulmuşlardır. Buna göre, BKV PZR testlerinde standart bir protokolün olmaması çalışmalar arasında viral yüklerin karşılaştırılmasında zorluk yaratsa da, PPV'yi arttırmak için BKV'de plazmada eşik değeri olarak 1×10^4 kopya/ml önerilmiştir (97).

BKV DNA kantitasyonunun saptanmasında testler arasındaki değişkenlik, sonuçların yorumlanmasını ve karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Bu farklılıklar klinik müdahale için uygulanabilir eşik değerlerin oluşturulmasını engeller. Özellikle iki laboratuvar farklı sonuçlar bildirdiğinde yanlış veya uyumsuz kantitatif sonuçlara bağlı olarak tedavi yönetimi başlatıldığında veya geciktirildiğinde hasta için olumsuz etki yaratabilmektedir. Başta kantitasyon için farklı standartların kullanılması ve genotipik varyasyona göre tasarlanmayan primer ve prob sekansları olmak üzere DNA ekstraksiyon yöntemlerindeki farklılıklar, örnek tipi/kaynağı kantitasyonda farklılıklara neden olmaktadır. Ancak, 2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) BKV PZR tabanlı testler için uluslararası bir standart yayınlamıştır. Bu standart uygulamaya geçilirse, farklı yöntemler ve laboratuvarlar arasındaki sonuçların uyumuna ve BKV klinik eşik değerlerinin tanımlanmasına imkan vereceği düşünülmektedir. Bu uluslararası standardın kullanıma sunulmasıyla BK PZR sonuçlarının raporlanmasında iyileşme olsa da, laboratuvarlar arasında PZR primer tasarımı, DNA ekstraksiyon teknikleri ve amplikon boyutuna bağlı değişkenlikler devam etmektedir (174-177).

PZR ile tanı konulan BKV enfeksiyonlarında genotiplerinin ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesiz gerekmektedir. Şu anda çalışılan testlerde primerlerin ve probların tasarlanmasına yönelik referans sekans olarak Genotip I (Dunlop) suşu kullanılmaktadır. Ancak, daha çok subtip III ve IV izolatlarında meydana gelen subtip bağımlı polimorfizmler nedeniyle primer veya prob uyumsuzluğu olan testler vardır. Genotip I referans olarak kullanıldığında BKV PZR testi, varyant suşlar için dört kat daha az duyarlı olabilir (genotip I için saptama sınırı 10 kopya/ μ L iken varyant suş için 10.000 kopya/ μ L'dir). Bu durum, daha sitopatik ve BKVİN ile daha sık ilişkili olabilecek nadir genotiplerin saptanamamasına neden olabilir (17, 178). BKVİN düşük viral yüklerle birlikte saptandığında nadir genotipler dikkate alınmalıdır.

Plazma PZR: Birçok çalışma, Rt-PZR ile plazma viral yükünün düzenli olarak taranmasının, erken viral replikasyonu belirlemek, BKVİN veya allogreft kaybına ilerlemeyi önlemek için en yararlı yöntem olduğunu bildirmiştir (179-181). BKV viremi taraması, renal allogreftte önemli bir fonksiyonel bozulma meydana gelmeden BKVİN riski taşıyan hastaların en az %90'ını tespit edebilir (182).

Tarama için en uygun sıklık ve metodoloji belirsizliğini korusa da, Amerikan Transplantasyon Derneği kılavuzu, altı aya kadar aylık, ardından iki yıla kadar her üç ayda bir ve ardından beş yıla kadar yıllık düzenli olarak plazma BKV taranmasını önermiştir (183). Pediatrik hastalarda, BKVİN prevalansının yüksek olması nedeniyle nakilden iki yıl sonraya kadar sık sık BKV taraması yapılması önerilir (184).

Birçok çalışma, idrar veya plazma BKV seviyeleri ile BKVİN tanısı arasındaki ilişkiyi incelemiştir (44, 162, 185). Viscount ve arkadaşları, plazma BKV DNA seviyesinin $>1,6 \times 4 \log_{10}$ kopya/mL ve idrar BKV DNA seviyesinin $>2,5 \times 7 \log_{10}$ kopya/mL olmasının BKVİN ile güçlü bir ilişkisi olduğunu bildirmiştir (162). Hirsch ve arkadaşları, BKVİN'nin tanısında viral yük seviyesinin plazmada $4 \log_{10}$ kopya/mL ve idrarda $7 \log_{10}$ kopya/mL'yi aştığını bildirmiştir (44). Böbrek Hastalığı: Küresel Sonuçların Geliştirilmesi (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) klinik uygulama kılavuzları ayrıca, plazmadaki BKV yükü sürekli olarak $4 \log_{10}$ kopya/mL den yüksek saptandığında, hastalığın ilerlemesini önlemek için immünsüpresyonun azaltılmasını önermektedir (186).

İdrar PZR: Yüksek düzeyde virüri saptanan hastaların yaklaşık yarısında 2-6 hafta sonra BKV viremi gelişmekte ve bunların da yaklaşık yarısına 2-6 hafta sonra biyopsi ile BKVİN tanısı konulmaktadır (187). Bu nedenle, böbrekte viral proliferasyonun erken belirtileri, idrardaki BKV yükünün saptanmasını gerektirir. PZR kullanılarak viral yükün belirlenmesi idrar sitolojisindeki düşük özgüllük ve duyarlılığı giderir ve hastalık şiddetinin belirlenmesine izin verir (162). Virüs reaktivasyonunun erken teşhisinde idrarda BKV izlemi, BKVİN için yüksek risk taşıyan hastaların belirlenmesi açısından değerlidir (188).

BKV'nin idrarda saptanma oranı çalışmalar arasında değişiklik göstermektedir (179, 185, 189). Saundh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada BKV virüsünün esas olarak renal transplantasyondan 3-6 ay sonra saptandığını bildirmişlerdir (190). Ayrıca idrarda BKV-DNA düzeyinin renal transplantasyondan sonra ilk altı ayda yüksek olduğu ve sonrasında giderek azaldığı gösterilmiştir (185).

BKVİN taramasında idrar viral yükünün tespiti, plazma viral yükünün tespitinden çeşitli açılardan daha üstündür. Virüri, viremi ve BKVİN başlangıcından daha uzun bir süre önce saptanır. İdrarda BKV DNA testinin negatif prediktif değeri yüksektir. Bu nedenle, idrarda viral yük tespiti, BKVİN riskini daha erken bir aşamada saptamak için daha uygundur (191). Ancak, idrardaki düşük viral yük dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdır. BKV, normal popölasyonda bile ürotelyal hücrelerde latent olarak bulunur. Bu da demek oluyor ki idrarda BKV DNA tespiti daima tübülointerstisyel bozukluğu desteklememektedir. Özellikle idrarda BKV-DNA viral yükü düşük saptanan vakalarda tek başına BKV virüsü çok az klinik öneme sahip denilmektedir. Hirsch ve arkadaşlarının yaptığı prevelans çalışmasına göre, sağlıklı yetişkinlerin taranması sonucunda, %7'lik pozitif asemptomatik BKV oranı bildirilmiştir. Renal transplantasyondan sonra, yaklaşık %10'unda herhangi bir klinik sorun olmadan idrar BKV DNA viral yükü 5 log₁₀ kopya/mL den düşük olarak saptanmıştır (183). Tedavi sonrası idrarda viral klirensin gecikmesi veya olmaması ile özgüllüğünün düşük olması, immünsüpresyonun aşırı azaltılmasına ve akut rejeksiyon riskine yol açabilir. İdrar BKV-PZR testi sensitiftir ancak BKVİN tanısına spesifik değildir. Risk altındaki hastaları viremi veya BKVİN gelişmeden önce belirlerken yararlı olabilir (191).

Genotipleme:

BKV'nin moleküler tiplendirmesi, virüs varyantlarının belirli bir popölasyondaki dağılımının analizi ve izolatlar arasındaki filogenetik ilişkinin saptanması amacıyla gerekmektedir. Bu amaçla, sekans analizi yaygın bir yöntem olarak kullanılmaktadır (59, 192, 193). Sekans analizi, bir popölasyonda görülen BKV genotiplerini tanımlamayı sağlar. Genotipik varyasyon, varyantların dağılımı ve coğrafi konumu hakkında bilgi edinip virüsün evrimi ve göçü üzerine

hipotezlerin formüle edilmesini sağlamaktadır (59, 61). 1979 yılında BKV'nin tam genomu sekanslanmıştır (194). NCBI veri tabanı şu anda virüse ait 4000'den fazla nükleotid dizisini içermektedir. Son yıllarda yeni nesil dizileme yöntemlerinin gelişmesiyle kullanılan moleküler yöntemlerde önemli ilerlemeler meydana gelmiştir (21, 150). BKV genotiplendirmesi esas olarak VP1 kapsid proteinine dayanmaktadır. Bununla birlikte, polimorfizmleri tanımlamak ve BKV sınıflandırılması için LT antijeni ve NCCR bölgelerindeki varyasyona dayalı birçok çalışma yürütülmektedir (167, 192).

2.9.2. Kültür

BKV, insan embriyonik böbrek, diploid akciğer fibroblastları ve ürotelyal hücreler dahil olmak üzere birçok insan hücresinde üretilebilir (195). Kültür uzun zaman aldığından ve çoğu laboratuvarında bulunmadığından, rutin olarak kullanılan bir tanı yöntemi değildir.

2.9.3. Seroloji

BKV taraması için çeşitli hasta popülasyonlarında uygun maliyetli stratejiler araştırılmıştır. Bunlar; enzim immünassay yöntemi, nötralizasyon testleri, multipleks immünassay ve hemagglütinasyon inhibisyon testleridir. BKV'ye karşı oluşan antikorların tespitinde en yaygın olarak hemagglütinasyon inhibisyon testi kullanılmıştır. Polyomavirüs antikor tespitinde, artan duyarlılık, daha az çapraz reaksiyon, daha iyi sonuç ve üretim ve kullanım kolaylığı nedeniyle, enzim immünassay yöntemi daha çok tercih edilmeye başlanmıştır.

Serolojik yöntemlerde, araştırma çalışmalarında çoğunlukla VP1 ve TAg ile çalışılmaktadır. Çoğu serolojik yöntem, BKV kapsid proteini olan VP1'i saptamaktadır (148, 196, 197). Sistemik BKV enfeksiyonlarının, viral kapsid proteinlerine karşı daha güçlü ve uzun süreli antikor yapımını indüklediği bilinmektedir. TAg'ye karşı oluşan antikorlar düşük titreye sahiptir. Bu yüzden yüksek duyarlılıkla tespit edilebilen anti-VP1 antikorlarının kullanıldığı yöntem tercih edilmektedir (198).

Çocukluk döneminde yüksek prevalansla (>%90) antikor geliştiğinden, tanısal açıdan fayda sağlayamamışlardır (199). Yüksek seropozitiflik, IgM

kinetiğinin reaktivasyon sırasında değişken olması ve reaktivasyonların genellikle asemptomatik seyretmesi gibi nedenlerden serolojik değerlendirme yetersiz kalmaktadır. Ancak transplantasyon öncesi serolojik değerlendirmenin, transplantasyon sonrası BKV replikasyon riskini öngörebileceği düşünülmektedir (147, 200).

2.9.4. İdrar Sitolojisi

Papanicolaou yöntemiyle boyanmış hücresel yaymalarda virüsle enfekte ürotelyal hücrelerde tipik buzlu cam intranükleer inklüzyonları olarak tanımlanan "Decoy hücresi" saptanmaktadır. Decoy hücresinin renal tübüllerden kaynaklandığı düşünülmektedir. BKV'İN'li hastaların çoğunda gözlenmektedir (201, 202). Decoy hücresi ve virüri, viremiden veya BKV'İN gelişiminden önce oluşmaktadır (97). Daha önceleri, idrar sitolojisinde decoy hücrelerin saptanması, BKV enfeksiyonu/reaktivasyonu ve BKV'İN için ilk tanısal test olmuştur. Transplante böbrekte BKV replikasyonunun erken belirtilerini gösterdiğinden yüksek riskli hastaların taranmasında yararlı olabilmektedir. Ancak BKV'İN için pozitif prediktif değeri %5-29'dur ve subjektif bir değerlendirmedir (42).

Decoy hücreleri virüsün idrar yolunda aktif replikasyonunu gösterdiğinden BKV'İN için tanısal değeri çok düşüktür ve kesin olarak BKV'İN'yi göstermemektedir. (69, 150). Decoy hücre sayısı ile böbrek hasarının şiddeti arasındaki ilişki de tam olarak bilinmemektedir (203). Ek olarak decoy hücreleri idrarda BKV için spesifik değildir. JCV ve adenovirüs enfeksiyonlarında da görülebilmektedir. Bu nedenle, BKV'İN'nin kesin tanısı biyopsi ile konulmaktadır (93, 191).

2.9.5. Histoloji

Akut rejeksiyon, kronik allogreft nefropatisi ve akut tübüler nekroz gibi tüm majör allogreft bozukluklarının teşhisinde renal allogreft biyopsisi altın standart yöntemdir. Böbrek biyopsisi, böbrek skarının boyutu, bağışıklık tepkisinin tipi ve kapsamı ve eşlik eden patolojilerin varlığı hakkında yararlı bilgiler sağlayabilir (204). BKV'İN'nin karakteristik histolojik bulguları, lenfositler ve plazma hücrelerinden zengin interstisyel enflamasyon, tübüler epitel hücrelerinde

intranükleer inklüzyonlar, lekeli nükleer kromatin, hücresel atipi ve tübüler epitel hücre dejenerasyonu ile birlikte apopitozudur (42, 97).

Fonksiyon bozukluğu olan böbrek nakilli hastalarda risk sınıflandırması, viremi düzeyi, patolojik tanı ve klinik yönetimi belirlemek için biyopsi gerekmektedir (205). BKV böbrekte fokal tutulum yapabildiğinden biyopsi sonucu yalancı negatiflik oranı %34 civarında saptanmaktadır (13). Sitopatik değişiklikler en iyi medulla tübüllerinde gözlenmektedir. Yapılan çalışmalar en az birinin medüller dokuyu içerecek şekilde iki örnek alınmasını önermektedir (205). SV40 TAG'nin immünohistokimyasal olarak boyanması ile virüsle enfekte tübüler epitel hücreleri saptanabilmektedir. İmmünohistokimyasal boyama, BKV'nin oluşturduğu sitopatik etkinin diğer virüslerin oluşturduğu etkiden ayırt edilebilmesi için çok önemlidir (206).

Hastalığın şiddetine göre kliniği ve en uygun tedaviyi belirlerken tek bir histolojik bulguya göre değil de sistematik olarak değerlendirmek için sınıflandırma sistemleri önerilmektedir. Amerikan Transplantasyon Derneği ve Banff Çalışma Grubu BKVİN'yi histolojik bulgulara göre evrelere ayırmıştır. Amerikan Transplantasyon Derneği histolojik bulguları sınıflandırırken, sırasıyla akut tübüler hasar, interstisyel nefrit ve şiddetli interstisyel fibrozise karşılık gelen A-B-C paternleri olarak tanımlamıştır. Banff Çalışma Grubu ise intrarenal viral yük ve interstisyel fibrozisin derecesine göre sınıflandırmıştır (104, 207).

2.10. Tedavi Ve Koruma

BKV ile ilgili en önemli konulardan biri terapötik yönetimdir. Bu konu, Amerikan Transplantasyon Derneği kılavuzunda kapsamlı bir şekilde sunulmaktadır. Kılavuz, böbrek nakli alıcılarında BKV viremi taramasının sıklığı, terapötik yönetim algoritması ve BKV viremi ve BKVİN tedavisi stratejileri ile ilgili öneriler sunmaktadır.

İmmünsüpresyonun modülasyonu viral replikasyonun azaltılmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Şu anda, leflunomid, sifovir, florokinolonlar veya intravenöz immünoglobulin (IVIG) gibi ilaçların birlikte kullanımının, tek başına immünsüpresyonu azaltmaktan daha avantajlı olduğunu doğrulayan hiçbir

randomize kontrollü çalışma yoktur. Bu nedenle kılavuzlar, immünsüpresyon dozunun azaltılmasını önermektedir.

Beklenen ve elde edilen terapötik etkiye bağlı olarak, genellikle bir kalsinörin inhibitörünün dozunun %25 ila %50 oranında azaltılmasını ve/veya antiproliferatif ilacın tamamen kesilene kadar başlangıçta %50 oranında azaltılmasını içeren ayrıntılı birçok aşamalı prosedür önerilmektedir. Ayrıca, takrolimustan düşük doz siklosporin-A'ya geçilmesini veya kalsinörin inhibitörleri yerine sirolimus kullanılmasını veya mikofenolik asidin düşük doz sirolimus ile veya mikofenolik asidin leflunomid ile değiştirilmesini öneren ek stratejiler de vardır (104). BKVİN'ye bağlı greft yetmezliği olan hastalarda retransplantasyon iyi bir seçenektir ve başarıyla uygulanmıştır (208-210).

BKV-HS için muhtemelen en iyi tedavi seçeneği önlemektir (211). Önleyici tedaviler olarak idrar alkalizasyonu, hiperhidrasyon ve sık sık 2-merkaptetan sodyum (MESNA) kullanımı erken başlangıçlı HS'nin görülme sıklığını azaltmıştır (212, 213). MESNA, üroprotektif bir ajan olarak kullanılmaktadır ve siklofosfamidin ana toksik metaboliti olan akroleini inaktive eder (212). Birçok hasta bu prosedürler uygulanarak tedavi edilebilir. Ek olarak, BKV-HS, anti-viral ajanlarla tedavi edilebilir, ancak etkinlikleri sınırlıdır. Çoğu BKV-HS vakası hafiftir ve kendini sınırlar. Ancak şiddetli BKV-HS için standart ve onaylanmış bir tedavi yoktur. BKV'ye karşı T hücre sayısını arttırmak ve viremiyi azaltmak için kullanılan tipik klinik yöntem, immünsüpresyon rejiminin kademeli olarak azaltılmasıdır. HKHT sonrası immünsüpresyon dozunun azaltılması, akut rejeksiyon riskini artırıp greft versus host hastalığını (GVHD) şiddetlendirir. Ayrıca uzun dönem sonucu ise yüksek kronik rejeksiyon insidansıdır. Virüs replikasyonunu etkileyen ve tedavi seçenekleri olarak uygulanabilen çeşitli ajanlar tanımlanmıştır. Bunlar genellikle immünsüpresyon dozunun düşürülmesi ile kombine edilmiştir (54, 214).

Sidofovir, en yaygın kullanılan geniş spektrumlu antiviral ilaçtır. Retrospektif vaka serilerinde yanıt oranı %60 ila %86 arasında gözlemlenmektedir. İntravenöz sidofovir kullanımında % 50'ye varan böbrek fonksiyon bozukluğu saptanmaktadır (215). Nefrotoksik etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla BKV-

HS'de intravezikal sidofovir denenmiştir. Retrospektif bir çalışmaya göre, intravenöz sidofovire benzer yanıt oranları vermiştir (%62'ye karşı %66). Ayrıca bazı çalışmalarda intravezikal sidofovirde daha yüksek renal disfonksiyon oranı bildirilmiştir (216).

Florokinolon grubundan siprofloksasin ve levofloksasin, BKV-HS'nin tedavisinde kullanılan en eski ajanlardandır. Florokinolonların, ürotelyal hücrelerde topoizomerez enziminin inhibisyonu ile viral replikasyonu engellediği düşünülmektedir (217). BKV-HS'de profilaksi olarak siprofloksasin için yeterli kanıt yoktur. Siprofloksasinin virüsü inhibe edici etkisini destekleyen in vitro çalışmalar bulunmasına rağmen, BKV'de profilaktik olarak kullanıldığında çelişkili sonuçlar bulunmuştur. Ayrıca HKHT'li hastalarda uzun süreli kullanımı antimikrobiyal direnç yol açabilmektedir (218).

BKV-HS genellikle yoğun ağrı ile ilişkilidir. Semptomatik tedavide tolterodin ve oksibutinin gibi antispazmodik ajanlar, mesane spazmlarını engelleyerek ağrıyı hafifletir (219). Şiddetli HS meydana geldiğinde üç yollu bir kateter yerleştirilip soğuk normal salinle sürekli mesane irrigasyonu gerekmektedir (220). Trombosit sayısının 50.000/ μ L ve hemoglobinin 8 g/dL nin üzerinde tutulmaya çalışılması hematürinin şiddetini azaltmada faydalı olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (221).

BKV aşısı günümüzde yoktur ve çoğu tasarım aşamasındadır. BKV'ye karşı hümmoral veya hüccresel immün yanıtı artırmak temel hedeftir (222).

Bu çalışmanın amacı, transplantasyon yapılan hastalarda plazma örneklerinde BKV DNA viral yük tespitinde laboratuvar tasarımı kantitatif Rt-PZR testiyle ticari bir kit olan Artus BKV Rt-PZR testinin sonuçlarını karşılaştırmak ve değerlendirmektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hastalar

- 17.05.2021-15.06.2022 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran böbrek nakli ve hematopoetik kök hücre nakli yapılmış 3-69 yaş aralığındaki yetişkin ve çocuk hastalara ait 124 hastadan toplanan daha önce çalışılmış 199 plazma örneği çalışmaya dahil edilmiştir.
- Hastalara ait rutin istem ile farklı zamanlarda EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümü Moleküler Testler Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Kan örnekleri 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilip, plazma kısmı ayrılarak alikotlanarak çalışma zamanına kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2. BKV DNA Tetkiki

1- Laboratuvar tasarımı Rt-PZR

- Viral DNA İzolasyonu:

Ticari bir kit ile (EZ1&2[™] Virüs Mini Kit v2.0 (48) Qiagen, Almanya) ve otomatize cihazda (Biorobot EZ1 Advanced XL, Qiagen, Almanya) üretici firmanın önerileri doğrultusunda 400 µl örnekten 60 µl ekstrakt elde edecek şekilde yapılmıştır.

- EZ1® Virüs Mini Kit v2.0 (48) (Qiagen, Almanya) içeriği:
 - Reaktif kartuşu
 - Elüsyon tüpü (1,5 ml)
 - Örnek tüpü (2 ml)
 - Pipet ucu
 - Pipet ucu tutucusu
 - Carrier RNA (Qiagen, Hilden, Almanya)

- Buffer AVE (Qiagen, Hilden, Almanya)

- Test çalışma prensibi:

1. Örnekler izolasyon işlemi öncesi -80°C'den çıkartılarak oda ısısına gelmeleri beklendikten sonra vortekslenmiştir.
2. Nükleik asit izolasyonu ticari otomatize bir sistem olan EZ1 Advanced XL (Qiagen, Almanya) cihazı kullanılarak EZ1&2™ Virüs Mini Kit v2.0 (48) (Qiagen, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir.
3. Kitin belirttiği protokole göre, hasta başına 3,8 µl Carrier RNA ve 50,2 µl Buffer AVE ile bir miks hazırlanmıştır.
4. Bu miks her hasta için 1,5 ml'lik elüsyon tüplerine 60 µl olarak ayrılmıştır.
5. Cihaza konulacak 2ml'lik tüpler numaralandırılarak plazma örneklerinden 400 µl tüplere konulmuştur.
6. Cihaz çalıştırılmış ve 45 dk sonra klinik materyallere ait ekstraksiyon ürünleri elde edilmiştir.

- Amplifikasyon:

1. Amplifikasyon işlemi QuantiNova® Pathogen +IC (İnternal Control) (Qiagen, Hilden, Almanya) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
2. Her hasta için QuantiNova® Pathogen +IC PZR saptama kiti içinde bulunan tüm solüsyonlar ile BKV primer ve problarından tablo 3.1 ve tablo 3.2'de belirtilen miktarlarda eklenerek miks hazırlanmıştır. Kit içerisinde bulunan internal kontrol PZR inhibisyonunun kontrolü için kullanılmıştır.
3. Hazırlanmış olan bu miksten her hasta için 15 µl amplifikasyon tüplerine alınarak üzerine 5 µl hasta izolatından ilave edilmiştir.
4. Toplam 20 µl olarak hazırlanan amplifikasyon tüpleri cihaza yerleştirilip belirlenen PZR döngü protokolüne göre çalışılmıştır.
5. 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 Q 5PLEX HRM real-time PZR cihazında yapılmıştır.

6. Amplifikasyon aşamasında, bir BKV negatif kontrol (RNase ve DNAaz free su) ve kantitasyonun sağlanabilmesi için pBR322 plazmidi içerisine klonlanan Dunlop suşunun tüm dizisini içeren pBKV (ATCC45025) ile UV spektrofotometre kullanılarak log10 tabanına göre değişen konsantrasyonlarda plazmid içeren beş standart kullanılmıştır.

Standartlar

1. Standart 1: 1.500.000 kopya/ml
 2. Standart 2: 150.000 kopya/ml
 3. Standart 3: 15.000 kopya/ml
 4. Standart 4: 1.500 kopya/ml
7. Vats ve arkadaşları tarafından tanımlanan primer dizileri kullanılarak virüsün VP-1 bölgesi içerisindeki 83 bp bölge amplifiye edilmiştir (223). Hedef bölgeye ait sinyal deteksiyonu 5' ve 3' uçları sırasıyla FAM (reporter) ve TAMRA (quencher) işaretli Taq-man probu kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan primer ve prob dizileri tabloda gösterilmiştir.
 8. Testin saptama ve kantitasyon alt sınırı 300 kopya/ml ya da 2.5 log kopya/ml'dir (yayımlanmamış bulgu).

Tablo 3.1. QuantiNova® Pathogen +IC PZR saptama kiti içeriği

Solüsyon	Miktar (µl)
BK-F	0.4 (16 pmol/reaks'a karşılık gelen değer)
BK-R	0.4 (16 pmol/reaks'a karşılık gelen değer)
BK-P	0.4 (16 pmol/reaks'a karşılık gelen değer)
QuantiNova Pathogen Master Mix, 4x (Kırmızı kapaklı)	5
QuantiNova IC Probe Assay 10X (turuncu kapaklı)	2
QuantiNova IC template (mavi kapaklı) (QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer (siyah kapaklı) ile sulandırıldı 1/20 oranında)	1
Su (RNAaz free DNAaz free water)	5.8
Toplam	15

Tablo 3.2. Primer ve prob dizileri

Primer-Prob	Polarite	Dizi
BK-F (Hedef öncül)	Sense	5'-TGA TAG CCC AGA GAG AAA AAT GC-3'
BK-R (internal kontrol öncül)	Sense	5'-TCC ACA GGT TAG GTC CTC ATT TAA A-3'
BK-P (Hedef prob)		5'-FAM-TTA CAG CAC AGC AAG AAT TCC CCT CCC-TAMRA-3'

- Kullanılan malzemeler:
 - Buzdolabı
 - EDTA'lı tüp
 - Santrifüj cihazı
 - Eppendorf tüpü (1.5 mL)
 - Filtreli pipet ucu (20, 200, 1000 µl)
 - 1-10, 10-100 ve 100-1000 µl'lik pipet ucu ile uyumlu otomatik pipet
 - QIAGEN EZ1 DNA Advanced XL (Qiagen, Almanya)
 - QIAGEN EZ1 VİRUS MİNİ KİT V2 (Qiagen, Almanya)
 - QuantiNova® Pathogen +IC PZR saptama kiti
 - Rt-PZR cihazı Rotor Gene Q 5PLEX HRM (Qiagen, Almanya)

- Sınıf II biyogüvenlik kabini
- Pudrasız eldiven

2. Artus Kiti ile Rt-PZR

- İzolasyon:

1. DNA İzolasyonu QIAasympphony® DSP Virus/Pathogen Kit ve Virus Cellfree 500 protokolü (Qiagen, Almanya) kullanılarak QIAasympphony SP (Qiagen, Hilden, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir.
2. Hasta örneği 500 µl kullanılıp elüsyon volümü 90 µl elde edilmiştir, 60 µl kullanılmıştır.
3. İnternal kontrol hem DNA izolasyon prosedürünün hem de olası PZR inhibisyonunun kontrolü için kullanılmıştır.
4. Elde edilen DNA'lar amplifikasyon yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

- Amplifikasyon:

Amplifikasyon işlemi Artus® BK Virus RG PZR Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

1. Kullanılacak olan kit -20 °C de muhafaza edilmektedir. İşlem öncesinde oda sıcaklığında gerekli malzemeler çözdürülmüştür.
2. Çözöldükten sonra sırasıyla vorteks ve santrifüj işlemi yapılmıştır.
3. Çalışılacak hasta sayısı, 4 kantitasyon standardı ve negatif kontrol için 0,1 ml'lik PZR tüpleri soğutma bloğunun adaptörlerine yerleştirilmiştir.
4. Her hasta için 7 µl master miks ve 3 µl magnezyum solüsyonundan oluşan karışım hazırlanarak bu karışımdan 10 µl amplifikasyon tüplerine alınıp üzerine 15 µl hasta izolatından ilave edilmiştir (Tablo 3.3). Bu işlem kullanıcı tanımlı yazılımın yönlendirdiği şekilde QIAasympphony cihazının (QIAasympphony AS) otomatik test kurulum modülünde gerçekleştirilmiştir.
5. Hazırlanan amplifikasyon tüpleri manuel olarak Rotor Gene Q 5PLEX HRM (Qiagen, Almanya) cihazına yerleştirilip PZR döngü protokolüne göre çalışılmıştır (Tablo 3.4).

6. BKV VP2 ve VP3 gen dizilerinin 274-bp'lik bir bölgesi amplifiye edilmiştir.
7. BKV için kitin belirlediği negatif kontrol ve kopya sayısı bilinen standartlar (QS1–QS4 (10 ila 10.000 kopya/μL) kullanılmıştır.
8. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda test okutularak üretici firmanın kurduğu software programında değerlendirmesi yapılmıştır.
9. Testin saptama alt limiti 53.34 kopya/mL ve kantitasyon alt sınırı <100 kopya/mL'dir.

- Kit içeriği:

- BK Virus RG master mix
- BK Virus RG Magnezyum solüsyonu
- Su (RNAaz free) : negatif kontrol
- BK Virus Kantitasyon standardı 1 (1 x 10⁴kopya/μl)
- BK Virus Kantitasyon standardı 2 (1 x 10³ kopya/μl)
- BK Virus Kantitasyon standardı 3 (1 x 10² kopya/μl)
- BK Virus Kantitasyon standardı 4 (1 x 10¹ kopya/μl)

Kantitasyon standartları kopya/μl olarak tanımlanmaktadır. Artus® BK Virus RG PZR Kit Kılavuzunda yer alan; standart eğri kullanılarak belirlenen değerleri örnek materyalinin kopya/ml'sine dönüştürürken aşağıdaki denklem uygulanmalıdır:

$$\text{Result (copies/ml)} = \frac{\text{Result (copies/μl)} \times \text{Elution Volume (μl)}}{\text{Sample Volume (ml)}}$$

Bu denkleme göre çalışmalarımızda uyguladığımız standartlarımız şu şekildedir:

- BK Virus Kantitasyon standardı 1 (1 x 10⁴ kopya/μl): 1800000 kopya/ml
- BK Virus Kantitasyon standardı 2 (1 x 10³ kopya/μl): 180000 kopya/ml
- BK Virus Kantitasyon standardı 3 (1 x 10² kopya/μl): 18000 kopya/ml
- BK Virus Kantitasyon standardı 4 (1 x 10¹ kopya/μl): 1800 kopya/ml

Tablo 3.3. Amplifikasyon protokolü

Solüsyon	Miktar
BK Virus RG Master Miks	7 µl
BK Virus RG Magnezyum solüsyonu	3 µl
Hasta izolatu	15 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.4. PZR protokolü

Program	Derece	Süre	Döngü
Ön denatürasyon	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	45
Bağlanma (Okuma)	65 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	20 saniye	

- Kullanılan Malzemeler
 - QIASymphony SP cihazı (Qiagen,Almanya)
 - QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Kit ve Virus Cellfree 500 protokolü (Qiagen, Almanya)
 - Artus® BK Virus RG PZR Kit
 - Real-Time PZR ROTOR GENE 5PLEX HRM
 - Filtreli steril pipet uçları
 - Otomatik pipet
 - Vorteks karıştırıcı
 - 2 ml sample tüpleri için rotorlu tezgah santrifüjü
 - Soğutma bloğu (Yükleme Bloğu 72 x 0,1 ml)
 - Pudrasız eldiven
- PZR işleminin sonuçları Green ve Orange kanallarından değerlendirilmiştir.
- PZR eğrileri; pozitif ve negatif kontroller göz önüne alınarak sonuçlar yorumlanmıştır. Green kanalında bir sinyal algılandığı durumda örnek, BK virüs DNA'sı içeriyor şeklinde yorumlanmaktadır. Orange kanalında ise testin internal kontrolünün tespiti ve eş zamanlı olarak kantitatif standartların (BK Virüs RG QS 1-4) amplifikasyonu yorumlanmaktadır.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS Version 22.0 ve GraphPad Prism Version 8.0. programları kullanılmıştır. Kategorik değişkenler olan her iki testin kalitatif sonuçlarının uyumu için Cohen's kappa değeri hesaplanmıştır. Sürekli değişkenler olan her iki testin kantitasyon aralığında kalan kantitatif sonuçların log 10 kopya/mL değerlerinin normal dağılım ölçümü için Kolmogorov-Smirnov testi uygulanmıştır. Normal dağılıma uyan sonuçlar için parametrik korelasyon testi Pearson, Bland-Altman ve Fisher'in kesin ki-kare testleri ile veriler analiz edilmiş, $p<0.05$ olması anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

Bu çalışmada 124 farklı hastaya ait (yaş ortalaması: 34,47; aralık: 3-69 yaş; kadın hasta/erkek hasta: 35/89) toplam 199 plazma örneğinde BKV DNA araştırılmıştır.

BKV DNA; her iki testte 125 (%62.8) örnekte saptanmış, 36 (%18.1) örnekte saptanmamıştır. Toplam 38 (%19.1) örnekte uyumsuz sonuç elde edilmiştir. Her iki testin kalitatif sonuçları arasında orta derecede uyum saptanmıştır (kappa=0.505, $p<0.001$). BKV DNA, 29 örnekte Artus BKV PZR testi ile saptanmış, laboratuvar tasarımı BKV PZR testi ile saptanmamış; dokuz örnekte ise laboratuvar tasarımı BKV PZR testi ile saptanmış, Artus BKV PZR testi ile saptanmamıştır. Uyumsuzluk saptanan bu 38 örnekten Artus BKV PZR testiyle saptanan 29 örneğin üçünde viral yük Artus BKV PZR testinin alt kantitasyon değerinin altındadır. Geriye kalan 26 örneğin kopya/ml ve log10 kopya/mL cinsinden ortalama viral yük değerleri sırasıyla 207.312 (aralık: 118-3.850.489) kopya/ml ve 3.37 (aralık: 2.07-6.59) log10 kopya/ml olarak saptanmıştır. Uyumsuz saptanan örneklerden laboratuvar tasarımı BKV PZR test ile saptanan ancak Artus BKV PZR ile saptanmayan dokuz örneğin kopya/ml ve log10 kopya/mL cinsinden ortalama viral yük değerleri sırasıyla 16.622 (aralık: 322-139.571) kopya/ml ve 3.24 (aralık: 2.51-5.14) log10 kopya/ml olarak saptanmıştır.

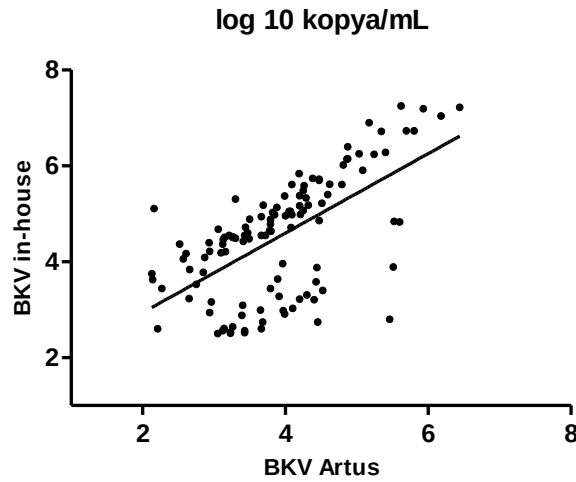
Tablo 4.1. Artus BKV PZR ve laboratuvar tasarımı BKV PZR testlerinin kalitatif sonuçları

BKV DNA		Laboratuvar tasarımı BKV PZR		Toplam
		Saptanmadı	Saptandı	
Artus BKV PZR	Saptanmadı	36	9	45
	Saptandı	29	125	154
Toplam		65	134	199

Her iki testin dinamik ölçüm aralığında elde edilen kantitatif sonuçlar (n:116) incelendiğinde Artus BKV PZR ve laboratuvar tasarımı BKV PZR testi ile ölçülen ortalama viral yük değerleri sırası ile 7.329 kopya/mL (aralık: 136-2.731.125) ve 35.543 kopya/mL (aralık: 314-17.905.381) olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçların log₁₀ kopya/mL değerleri incelendiğinde Artus BKV PZR ve laboratuvar tasarımı BKV PZR testi ile ölçülen ortalama viral yük değerleri sırası ile 3.86 log₁₀ kopya/mL (aralık: 2.13-6.44) ve 4.55 log₁₀ kopya/mL (aralık: 2.50-7.25) olarak hesaplanmıştır.

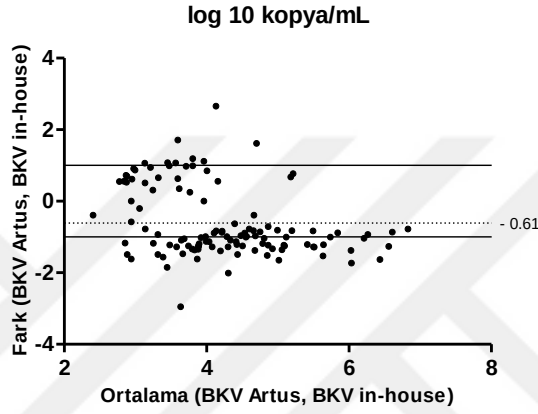
Artus BKV PZR ve laboratuvar tasarımı BKV PZR testlerinin dinamik ölçüm aralığında elde edilen kantitatif sonuçlarının (n:116) log₁₀ kopya/mL değerlerinin; korelasyon ve Bland-Altman analizleri yapılmıştır. Korelasyon analizine göre her iki testin log kopya/mL birimlerinde verilen sonuçlarının karşılaştırılmasında orta derecede korelasyon saptanmıştır (sırası ile $r=0.616$, $p<0.001$) (Şekil 4.1).

Her iki testin dinamik ölçüm aralığında sonucu olan 116 örnekte; log kopya/mL sonuçları için ölçüm farkı 108 (%93.1) örnekte ± 0.5 log₁₀'dan fazla, 61 (%52.5) örnekte ± 1 log₁₀'dan fazla saptanmıştır. Testler arasında ± 1 log₁₀'dan fazla ölçüm farkı saptanan örneklerin ortalama viral yük değeri 1.27 log₁₀ kopya/mL (1.02-2.95) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. Artus BKV PZR ve laboratuvar tasarımı BKV PZR testlerinde log₁₀ kopya/mL birimlerindeki kantitatif sonuçların korelasyon analizi.

Her iki testin dinamik ölçüm aralığında elde edilen kopya/mL birimlerinde hesaplanan kantitatif sonuçların (n:116) logaritmalarının ortalamalarına karşı farklarının saçılımı Şekil 2’de Bland-Altman plot grafiğinde gösterilmiştir. Buna göre; Artus BKV PZR ile laboratuvar tasarımı BKV PZR testinden daha düşük ölçümler yapılmış, ortalama fark 0.61 log10 (standart sapma: 0.98) kopya/mL olarak bulunmuştur (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Artus BKV PZR ve laboratuvar tasarımı BKV PZR testlerinde dinamik ölçüm aralığındaki viral yüklerin log10 değerlerinin ortalamalarına karşı farklarının dağılımının verildiği Bland-Altman grafiği. Kesikli çizgi ortalama farkı, düz çizgiler ± 1 log10 farkı göstermektedir.

5. TARTIŞMA

BKV-DNA'nın kantitasyonunda laboratuvarlar arası değişkenlik, böbrek nakli hastalarının yönetimini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu değişkenlik büyük ölçüde, standart kalibratörlerin olmamasından ve BKVİN'yi önlemek için viral yük izleminde ulusal düzeyde kullanım onayı olan ticari kitlerin bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Ticari kitlerin yokluğunda, laboratuvarlar kendi standardize ettikleri kitleri kullanır. Bu nedenle hasta izleminde bir eşik değerin belirlenmesi mümkün olmamaktadır. Testlerin doğruluğunun güvenilirliğini sağlayan rutin kalite kontrol görevleriyle birlikte, üreticilerin önerileri doğrultusunda (test kurulumu, analitik verifikasyon ve testin klinik performansı) testler uygulanır. Test protokolleri, BKVİN'de virüri ve vireminin eşik değerleri ve prediktif değerleri ile ilgili farklı sonuçlara yol açan kantitasyon ve dinamik aralık limitlerine sahip olabilmektedir. Bu durum tanı ve tarama protokollerinde uygulanabilir eşik değerlerin oluşturulmasını engellemektedir. Ve bu da böbrek nakli hastalarının yönetimini önemli ölçüde etkilemektedir (17, 178, 224). Ancak, nakil hastalarında kan ve idrarda viral replikasyon takibini ve reaktivasyonunu tespit etmenin en iyi yolu kantitatif olarak BKV DNA'nın taranmasıdır. Böylece komplikasyonlar ortaya çıkmadan immünsüpresif tedavi düzenlenebilmektedir (74, 225).

Bu çalışmada, BKV kantitasyonu açısından plazma numunelerinde polyomavirüs viral genomunun farklı bölgelerini hedef alan biri ticari diğeri laboratuvar tasarımı iki farklı Rt-PZR testinin sonuçları karşılaştırılmıştır. Her iki testin kalitatif sonuçları arasında orta derecede uyum saptanmıştır ($\kappa=0.505$, $p<0.001$). Korelasyon analizi ile kantitatif sonuçlar arasında orta derecede uyum bulunmuştur (sırası ile $r=0.616$, $p<0.001$). Artus BKV PZR testi ile daha fazla pozitiflik saptanmıştır. Greer ve ark tarafından, farklı gen bölgelerini hedefleyen laboratuvar tasarımı iki farklı Rt-PZR testi ve ticari kit olan VP2 ve VP3 gen bölgelerini hedefleyen Artus BKV PZR testlerinin performansı karşılaştırılmış; daha düşük alt saptama limitine ve daha geniş kantitasyon aralıklarına sahip testlerle daha fazla pozitiflik saptandığı bildirilmiştir (226).

Çalışmamızda her iki testin dinamik ölçüm aralığında elde edilen kantitatif sonuçlar (n:116) incelendiğinde Artus BKV PZR ve laboratuvar tasarımı BKV PZR

testi ile ölçülen ortanca viral yük değerleri sırası ile 7.329 kopya/mL (aralık: 136-2.731.125) ve 35.543 kopya/mL (aralık: 314-17.905.381) olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçların log₁₀ kopya/mL değerleri incelendiğinde Artus BKV PZR ve laboratuvar tasarımı BKV PZR testi ile ölçülen ortanca viral yük değerleri sırası ile 3.86 log₁₀ kopya/mL (aralık: 2.13-6.44) ve 4.55 log₁₀ kopya/mL (aralık: 2.50-7.25) olarak hesaplanmıştır. Leuzinger ve arkadaşları TAg gen bölgesini hedefleyen farklı ampikon boyutlarına sahip primer dizileri olan BKV-DNA PZR testlerini karşılaştırmışlar; 88 bp primer dizisine sahip kısa ampikon oluşturan test ile daha yüksek viral yük kantitasyonu saptandığı bildirilmiştir. En düşük BKV viral yük ölçümü 239 bp primer dizisi olan test ile saptanmıştır. Bu da büyük ölçüde yetersiz kantitasyona ve yanlış negatif sonuçlara yol açmıştır (227). Bizim çalışmamızda da Artus BKV PZR kitinin ampikon boyutu laboratuvar tasarımı BKV PZR testine göre daha uzundur ve Artus BKV PZR kiti ile daha düşük viral yük değerleri saptanmıştır. Farklı virüslerle yapılan çalışmalarda da primer dizisi kısa ampikon oluşturan kitlerde daha yüksek viral yük kantitasyonu saptandığı belirtilmektedir (228, 229). Yüksek verimli Rt-PZR testlerinde, 200 bp'den daha kısa ampikonlar kullanılmaktadır ve genel olarak 75-150 bp'lik bir ampikon uzunluğunun hedeflenmesi önerilmektedir. Bu şekilde polimerizasyon hatasının oluşma ihtimalinin daha düşük olacağı, bunun da hızlı, doğru ve verimli kantitasyon sağlayacağı belirtilmektedir (230, 231).

Korelasyon analizine göre her iki testin log₁₀ kopya/mL birimlerinde verilen sonuçlarının karşılaştırılması sonucunda orta düzeyde korelasyon saptanmıştır ($r=0.616$, $p<0.001$). Bland Altman analizine göre; iki test arasındaki ortalama fark 0.61 (standart sapma: 0.98) log₁₀ kopya/mL olarak bulunmuştur. Tan ve arkadaşları 2017 yılında, VP-1 gen bölgesini hedef alan laboratuvar tasarımı BKV PZR ile TAg gen bölgesini hedef alan Altona Realstar BKV PZR ticari kitini karşılaştırmışlardır. Araştırmalarında, 161 plazma örneği üzerinde çalışılmış ve sonuçlar karşılaştırıldığında %96.3 uyumlu olarak saptanmıştır (155\161). Uyumsuz olan altı örneğin viral yükleri düşük olarak saptanmıştır. Bland-Altman analizlerine göre testler arasındaki ortalama viral yük ölçüm farkı -0.7 log₁₀ kopya/ml saptanmıştır. Altona Realstar BKV ticari kiti ile daha düşük ölçümler tespit edilmiştir. Ayrıca uluslararası standart kullanımı ile çalışmadaki değerler

IU/ml olarak kalibre edildiğinde ortalama farkın $-0.1 \log_{10}$ kopya/ ml'ye kadar gerilediği gözlenmiştir (175). Daloğlu ve ark tarafından 2019 yılında viral yük tayininde BKV'nin farklı gen bölgelerine (VP1 ve VP2) yönelik olarak tasarlanan iki farklı laboratuvar tasarımı Rt-PZR yöntemi ile ölçülen BKV DNA değerleri karşılaştırılmıştır. Her iki yöntemin kalitatif sonuçları arasında orta derecede uyum saptanmıştır. Her iki testle pozitif saptanan örnekler için Bland-Altman analizine göre VP1 gen bölgesini hedefleyen PZR ile yapılan ölçümler VP2 gen bölgesini hedefleyen PZR testine göre daha düşük bulunmuş ve bütün örneklerde ortalama fark $-0.58 \log_{10}$ olarak saptanmıştır (62). Rennert ve ark. VP2\VP3 gen bölgesi hedefli Artus BKV Rt-PZR testi ile tüm BKV suşlarını saptamak üzere tasarlanmış laboratuvar tasarımı Rt-PZR testini, referans laboratuvarında çalışılıp pozitif saptanan 34 numune üzerinden karşılaştırmışlardır. İki test arasında yüksek derecede korelasyon saptanmış olup Bland-Altman analizlerine göre testler arasındaki ortalama viral yük ölçüm farkı $0,39 \log_{10}$ kopya/mL olarak saptanmıştır. İki test arasındaki en büyük farklılık düşük viral yüklerde gözlenmiştir (232). Tüm bu çalışmalarla bizim çalışmamız değerlendirildiğinde hala tam bir standardizasyonun sağlanamadığı görülmektedir.

Bizim çalışmamızda uyumsuzluk saptanan 38 örneğin üçünde viral yük Artus BKV PZR testinin alt kantitasyon değerinin altındadır. Birçok çalışmada uyumsuzluk saptanan örneklerin düşük viral yüke sahip olduğu belirtilmiştir (233, 234).

BKV-DNA için uluslararası kantitasyon standardının belirlenmesinin farklı laboratuvarlarda elde edilen sonuçların karşılaştırılmasına yardımcı olabileceği belirtilmektedir (174). Henüz bir standardizasyon sağlanamamış olması BKV PZR ile ilgili yapılan araştırmalarda farklı sonuçlarla karşılaşmamıza neden olmaktadır. Bizim çalışmamızda her iki testin dinamik ölçüm aralığında sonucu olan 116 örnekten; 108 (%93.61) örnekte $\pm 0.5 \log_{10}$ 'dan fazla, 61 (%52.5) örnekte $\pm 1 \log_{10}$ 'dan fazla ölçüm farkı saptanmıştır. Solis ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada klinik örneklerin ancak %68'inde ölçümler arası fark $0.5 \log_{10}$ 'dan küçük olarak saptanmıştır (235). Stellrecht ve arkadaşları ise farklı gen bölgelerini hedefleyen iki ticari ve bir laboratuvar tasarımı kiti karşılaştırdıkları çalışmalarında kitler arasında viral yük ölçüm farkı $1,0 \log_{10}$ kopya/ml'den daha büyük

saptamamışlardır (234). Daloğlu ve arkadaşları iki test arasında ölçüm farkını; %71.9 örnekte 0.5 log₁₀'dan, %29.2 örnekte ise 1 log₁₀'dan fazla saptamıştır (220). Diğer çalışmalarla birlikte bizim çalışmamızı karşılaştırdığımızda kabul edilebilir ölçüm farkı olan 0.5log₁₀'dan küçük çok farklı oranlarla karşılaşmaktayız.

Rt-PZR'nin duyarlılığını azaltabilen faktörler arasında primer ve prob tasarımı yer almaktadır. Ayrıca farklı sekanslara bağlı olarak da duyarlılık değişmektedir. BKV genomunun VP2/3 bölgelerinin oldukça kararlı olduğu bildirilirken, VP-1 ve TAg için farklı sekans varyasyonları rapor edilmiştir. Ayrıca BKV'İN olan hastalarda VP-1 geni mutasyonlarında artış bildirilmiştir (236-239). Greer ve ark'nın çalışmasında Uluslararası Standart olarak pasajlanan BKV'nin T bölgesinde delesyonlar içeren alt popülasyonlar içerdiği gösterilmiştir. Bu durum bu referans materyal ile normalize edilen sekonder standartlar ve saptanan kantitatif değerlerde önemli potansiyel etkilere neden olabilir (226).

Moleküler testlerin hem yüksek sensitivite hem de güvenilir kantitasyon sağlaması gerekir. Birçok laboratuvar, VP1 başta olmak üzere VP2, tAg veya TAg'yi hedef alan ticari ve yetersiz standardize edilmiş laboratuvar tasarımı Rt-PZR testlerini kullanmaktadır. Bu da, viral gen polimorfizmleri ve farklı subtipler dikkate alındığında, laboratuvarlar arasında karşılaştırılabilirliği zorlaştırmaktadır. Hoffmann ve arkadaşları tarafından, BKV DNA kantitasyonundaki değişkenlikler daha önce yayınlanmıştır. Yedi farklı Rt-PZR primer/prob setini karşılaştırmışlardır. BKV viral yükünün ölçümünde testler arası değişkenliğin boyutunu belgelemişlerdir. Test sonuçları arasındaki farklılığın en önemli kaynağının, subtip ile ilişkili polimorfizm kaynaklı primer veya prob uyumsuzluğu olduğunu göstermişlerdir (17). Yapılan bir çalışmaya göre VP-1 gen bölgesini hedefleyen ticari bir kit, genotip II, III, IV olarak saptanan hasta örneklerini düşük olarak ölçmüştür. Bu bulgu da, kitin duyarlılığının azalmasında sekans farklılığının rolünü desteklemektedir. Yapılan çalışmada hasta örneklerinin %12'si, Rennert ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, örneklerin %9'u genotip II, III veya IV olarak rapor edilmiştir (232). Yapılan farklı çalışmalarda BKV'nin hedef sekans dizilerinde, sekans farklılıklarının olduğu ve değişkenliklerinin analiz performansını etkileyebileceği belirtilmiştir. Rt-PZR metotlarında, iyi bir

performans sağlayabilmek için, düzenli olarak yeni kullanılabilir sekans dizilerine karşı değerlendirilmeli ve hedef sekans dizileri korunmuş bölgelerden seçilmelidir (73, 240, 241).

Bizim çalışmamızda testler arasındaki kantitasyon değerlerindeki farklılık sekans analizi yapılamadığından genetik açıdan değerlendirilememiştir. Daha önce Daloğlu ve ark.'nın bölgemizde yaptığı çalışmada BKV genotiplendirmesi sonucunda genotip I (%81.7), IV (%15.5), II (%1.4) ve I+IV (%1.4) varlığı saptanmıştır. Genotip IV saptanan 12 hastanın %83.3'ünde 0.5 log₁₀'dan fazla, %66.6'sında 1 log₁₀'dan fazla viral yük ölçüm farkı tespit edilmiştir. Kantitasyon uyumsuzluğu en çok genotip-IV saptanan hastalarda gözlemlenmiştir (62). Bizim çalışmamız Daloğlu ve ark.'nın çalışmasıyla aynı bölgede yer aldığından benzer genotip özelliğine sahip olabilir.

KDIGO ve Amerikan Transplantasyon Derneği kılavuzlarına göre plazmada BKV-DNA'nın 10⁴ kopya/ml üzerinde saptanması BKVİN oluşumu açısından riskli olarak kabul edilmiştir. Nakil hastalarının BKV-DNA açısından rutin olarak taranmasının hastalara ait tedavi protokollerinin belirlenmesi ve oluşabilecek organ reddinin engellenmesi açısından uygun olduğu belirtilmektedir (160). Birçok çalışma, idrar veya plazma BKV seviyeleri ile BKVİN tanısı arasındaki ilişkiyi incelemiştir. PINTO ve arkadaşları tarafından böbrek nakli alıcılarında BKVİN'nin öngörülebilmesi için iki farklı kit kullanarak eşik değer tanımlamak amacıyla çalışma yapılmıştır. BKV'nin kantitatif tespiti için 200 hastanın plazma örneğinde ticari (ELITechGroup Nanogen, İtalya) ve laboratuvar tasarımı Rt-PZR testlerinin performansı değerlendirilmiştir. BKVİN, histopatolojiye dayalı olarak doğrulanmıştır. BKV viral yükü, BKVİN'li hastalarda BKVİN olmayan hastalara kıyasla daha yüksek saptanmıştır. Laboratuvar tasarımı Rt-PZR testi ile elde edilen sonuçlar, ticari kit ile doğrusallık göstermiş, ancak eşik değer yaklaşık 2 log kopya/ml farklı saptanmıştır. Ticari kit ile BKVİN için saptanan eşik değer 4.1 log kopya/ml, laboratuvar tasarımı kit ile 6.1 log kopya/ml olarak saptanmıştır (242). Hirsch ve arkadaşları, BKVİN'nin tanısında viral yük seviyesinin plazmada 4 log₁₀ kopya/mL ve idrarda 7 log₁₀ kopya/mL'yi aştığını bildirmiştir (44). Viscount ve arkadaşları, plazma BKV DNA seviyesinin >1,6 x 4

log10 kopya/mL ve idrar BKV DNA seviyesinin $>2,5 \times 7 \log_{10}$ kopya/mL olmasının BKV'ın ile güçlü bir ilişkisi olduğunu bildirmiştir.

Bizim çalışmamızın sonuçlarıyla birlikte tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde BKV Rt-PZR testleri arasında tam bir standardizasyonun hala sağlanamadığı görülmektedir. Bu nedenle BKV kantitasyon takibi farklı testler arasında standardizasyon sağlanana kadar aynı Rt-PZR yöntemi ile yapılmalıdır. Farklı Rt-PZR testleriyle oluşturulan eşik değerlerin henüz standardizasyon sağlanamadığı için karşılaştırılması doğru bir yaklaşım değildir. DNA ekstraksiyonu için farklı protokoller, primer ve prob dizaynındaki farklılıklar, hedef gen bölgesi, genotip farkı, amplikon boyutu, farklı standart ve kontrol kullanımı, PZR koşulları, numune tipi, virüsün örnek içindeki formu dahil olmak üzere çeşitli faktörler bu farklılığa katkıda bulunmaktadır (17, 177, 178, 243, 244).

Bu çalışmanın sonucu sadece laboratuvar tasarımı BKV PZR yöntemi ile ticari kit olan Artus BKV PZR yöntemi için sınırlı olmaktadır. Testler arasındaki kantitasyon değerlerindeki farklılık sekans analizi yapılamadığından genetik açıdan değerlendirilememiştir. Çalışmamızın sonucunda iki farklı hedefe yönelik BKV Rt-PZR testi arasında kalitatif ve kantitatif olarak orta derecede uyum ve korelasyon saptanmıştır. Kantitatif test sonuçları arasında kabul edilebilir bir ölçüm farkı sadece %6.9'dur. DSÖ'nün hazırladığı kantitasyon standardının iyileştirmeler yapılarak en kısa sürede kullanıma sunulması ve testlerin bu standart ile kalibre edilmesi gerekli ve önemlidir. Bu sağlanana kadar elde edilen sonuçlar teste ve hastaya özgüdür.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmamızın sonucunda iki farklı hedefe yönelik BKV Rt-PZR testi arasında kalitatif olarak orta derecede uyum, kantitatif olarak orta derecede korelasyon saptanmıştır.
2. Sadece %6.9 örnekte sonuçlar arasındaki fark klinik olarak kabul edilebilir aralık olan 0.5 log₁₀'dan daha az çıkmıştır.
3. Artus BKV PZR kiti ile daha düşük viral yük değerleri saptanmıştır.
4. Bland Altman analizine göre; iki test arasındaki ortalama fark 0.61 log₁₀ (standart sapma: 0.98) kopya/mL olarak bulunmuştur.
5. Uyumsuzluk saptanan örneklerin düşük viral yüke sahip olduğu gözlenmiştir.
6. Her iki testin dinamik ölçüm aralığında sonucu olan 116 örnekten; 108 (%93.61) örnekte ± 0.5 log₁₀'dan fazla, 61 (%52.5) örnekte ± 1 log₁₀'dan fazla ölçüm farkı saptanmıştır.
7. DSÖ Uluslararası BKV Standardının klinik örneklerde kullanımında iyileşme sağlanana kadar elde edilen sonuçlar teste ve hastaya özgül olarak değerlendirilmelidir.

7. ÖZET

Transplant Hastalarında BK Virüs Viral Yük Ölçümünde Laboratuvar Tasarımı ve Ticari Rt-PZR Testlerinin Karşılaştırılması

BKV enfeksiyonları tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup prevalansı toplumda %90'nın üzerindedir. Primer enfeksiyondan sonra virüs ürogenital sistemde latent olarak kalmaktadır. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda başta BK virüsü ile ilişkili nefropati (BKVN) ve hemorajik sistit (HS) olmak üzere önemli komplikasyonlara neden olmaktadır. Transplant alıcılarında BKVN ve allograft hasarının klinik olarak kontrolünde BKV viral yük takibi çok önemli role sahiptir.

Bu çalışmada amacımız, transplantasyon yapılan hastalarda plazma örneklerinde BKV DNA viral yük tespitinde laboratuvar tasarımı BKV PZR testiyle ticari bir kit olan Artus BKV PZR testinin sonuçlarını karşılaştırmak ve değerlendirmektir.

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne 17.05.2021-15.06.2022 tarihleri arasında başvuran; böbrek nakli ve hematopoetik kök hücre nakli yapılmış yetişkin ve çocuk hastalara ait 124 hastadan toplanan 199 plazma örneği farklı gen bölgelerini hedefleyen laboratuvar tasarımı BKV PZR ve ticari bir kit olan Artus BKV PZR testleriyle çalışılmıştır. Viral nükleik asit izolasyonu laboratuvar tasarımı ve ticari kit için sırasıyla EZ1&2™ Virüs Mini Kit (Qiagen, Almanya) ve QIAasymphony® DSP Virus/Pathogen Kit (Qiagen,Almanya) ile otomatize sistemlerde elde edilmiştir. Laboratuvar tasarımı BKZ PZR testinde VP1 gen bölgesine yönelik bir primer ve prob ile amplifikasyon kiti olan QuantiNova® Pathogen +IC birlikte kullanılarak, Artus BKZ PZR testinde VP2 ve VP3 gen bölgesine yönelik primer ve prob dizilerini içeren Artus® BK Virus RG PZR Kiti kullanılarak Rt-PZR işlemleri Rotor Gene (Qiagen, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Her iki testin kalitatif sonuçları arasında orta derecede uyum saptanmıştır (kappa=0.505, $p<0.001$). BKV DNA; her iki testte 125 (%62.8) örnekte saptanmış, 36 (%18) örnekte saptanmamıştır. Uyumsuzluk saptanan bu 38 örnekten Artus BKV PZR testiyle saptanan 29 örneğin üçünde viral yük Artus BKV PZR testinin alt kantitasyon değerinin altındadır. Artus BKV PZR ve laboratuvar tasarımı BKV PZR testi ile ölçülen pozitif örneklerin ortalama viral yük değerleri sırası ile 7.329 kopya/mL (aralık: 136-2.731.125) ve 35.543 kopya/mL (aralık: 314-17.905.381) olarak hesaplanmıştır. Bland Altman analizine göre; iki test arasındaki ortalama fark 0.61 log₁₀ kopya/mL (standart sapma: 0.98) olarak bulunmuştur. Bu bulguyu destekler şekilde, korelasyon analizinde her iki testin kantitatif sonuçları arasında orta derecede korelasyon saptanmıştır ($r=0.616$, $p<0.001$). Buna ek olarak, her iki testin dinamik ölçüm aralığında sonucu olan 116 örnekten; 108 (%93.1) örnekte ± 0.5 log₁₀'dan fazla, 61 (%52.5) örnekte ± 1 log₁₀'dan fazla (ortalama: 1.27 log₁₀ kopya/mL (aralık:1.02-2.95)) ölçüm farkı saptanmıştır. İki test arasında %6.9 örnekte sonuçlar arasındaki fark klinik olarak kabul edilebilir aralık olan 0.5 log₁₀'dan daha az çıkmıştır. Artus BKV PZR testi ile laboratuvar tasarımı BKV PZR teste göre daha düşük ölçümler saptanmıştır.

Sonuç olarak; biri laboratuvar tasarımı, diğeri ticari olarak kullanıma sunulan BKV PZR testlerinin sonuçları arasında önemli ölçüm farkı saptanmıştır. Bu durum hastaların yönetiminde ciddi sonuçlara yol açabilir. DSÖ'nün uluslararası kantitasyon standardının güncellenerek, testlerin bu standartla kalibre edilmesi testler arasındaki anlamlı ölçüm farkını azaltabilir.

Anahtar kelimeler: BK Virüs, PZR, BKV, Transplantasyon, Laboratuvar tasarımı, Standardizasyon

8. ABSTRACT

Comparison of a Commercial and a Laboratory Developed BKV Polymerase Chain Reaction Tests for Measurement of BKV Viral Load in Transplant Patients

BKV infections are common all over the world and its seroprevalence reaches up to 90% of the general population. Typically, BKV remains latent in the urogenital tract after primary infection. BKV is known to be associated with a variety of complications in immunocompromised hosts, including: BK virus-associated nephritis (BKVAN) and hemorrhagic cystitis (BKV-HC). BKV viral load monitoring has a very important role in the clinical control of BKVAN and allograft damage in transplant recipients.

In this study, it was aimed to compare and evaluate BKV DNA measurement values performed with a commercially available Artus BKV PCR assay and laboratory developed BKV PCR assay in plasma samples of transplant recipients.

Between May 2021 and June 2022, 199 plasma samples were collected from 124 adult and pediatric patients who had kidney transplant and hematopoietic stem cell transplant in Akdeniz University Medical Faculty Hospital. Viral nucleic acid extraction was performed with automatized systems for laboratory developed BKV PCR assay and commercially available Artus BKV PCR assay (EZ1&2[™] Virüs Mini Kit (Qiagen, Germany) and QIAsymphony® DSP Virus/Pathogen Kit (Qiagen, Germany); respectively). Rt-PCR procedure was carried out laboratory developed test using QuantiNova® Pathogen +IC, an amplification kit with a primer and probe sequences for the VP1 gene region and commercially available Artus BK Virus RG PCR Kit containing the primer and probe sequences for the VP2 and VP3 gene region using Rotor Gene (Qiagen, Germany).

In both of the assays, 125 (62.8%) of the samples were found as positive, 36 (18.1%) of samples were found as negative and a moderate agreement was found between qualitative results of two real-time PCR methods ($\kappa=0.505$, $p<0.001$). There were 38 qualitatively discrepant samples. Twenty nine samples were Artus BKV PCR positive and laboratory developed BKV PCR negative, and three of them were detected less than the Artus assay's lower limit of quantitation. Median viral load values were detected 7.329 copies/ml (136-2.731.125) by Artus BKV Rt-PCR and 35.543 copies/ml (314 -17.905.381) by laboratory developed BKV PCR for positive samples. Bland-Altman analysis yielded a mean difference of 0.61 log₁₀ (standard deviation: 0.98) copies/mL. Supporting this result, according to the correlation analysis of quantitative results, moderate ($r:0.616$, $p<0.001$) correlation was found. In addition, out of 116 samples, which were the results in the dynamic measurement range of both tests; a measurement difference of more than 0.5 log₁₀ was detected in 108 (93.1%) and a measurement difference of more than 1 log₁₀ was detected in 61 (52.5%) samples. The median viral load value of the samples with a measurement difference of more than 1 log₁₀ in the results of both assays was found to be 1.27 log₁₀ copies/mL (1.02-2.95). Only 6.9% of the reported results fell within the acceptable range of the expected result ± 0.5 log₁₀ for quantitative Rt-PCR assays. Artus BKV PCR measurements were lower than laboratory developed BKV PCR measurements.

In conclusion, a significant difference in measurement was detected between the results of two BKV PCR tests, one laboratory developed and the other commercially available. This may have serious consequences in the management of patients. Updating the WHO's international quantitation standard and calibrating the tests with this standard can reduce the significant measurement difference between the tests.

Keywords: BK Virus, PCR, BKV, Transplantation, Laboratory Developed, Standardization

9. KAYNAKLAR

1. Knowles WA. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Polyomaviruses and human diseases*. 2006:19-45.
2. Moens U, Calvignac-Spencer S, Lauber C, Ramqvist T, Feltkamp MC, Daugherty MD, et al. ICTV virus taxonomy profile: Polyomaviridae. *Journal of General Virology*. 2017;98(6):1159-60.
3. Gardner S, Field A, Coleman D, Hulme B. New Human Papovavirus (B.K.) Isolated From Urine After Renal Transplantation. *The Lancet*. 1971;297(7712):1253-7.
4. Gilis L, Morisset S, Billaud G, Ducastelle-Leprêtre S, Labussière-Wallet H, Nicolini F, et al. High burden of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2014;49(5):664-70.
5. Mani J, Jin N, Schmitt M. Cellular immunotherapy for patients with reactivation of JC and BK polyomaviruses after transplantation. *Cytotherapy*. 2014;16(10):1325-35.
6. Boothpur R, Brennan DC. Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. *Journal of Clinical Virology*. 2010;47(4):306-12.
7. Vanchiere JA, Abudayyeh S, Copeland CM, Lu LB, Graham DY, Butel JS. Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47(8):2388-91.
8. Sundsfjord A, Spein A-R, Lucht E, Flaegstad T, Seternes OM, Traavik T. Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *Journal of clinical microbiology*. 1994;32(5):1390-4.
9. Azzi A, De Santis R, Ciappi S, Leoncini F, Sterrantino G, Marino N, et al. Human polyomaviruses DNA detection in peripheral blood leukocytes from immunocompetent and immunocompromised individuals. *Journal of neurovirology*. 1996;2(6):411-6.
10. Ling PD, Lednicky JA, Keitel WA, Poston DG, White ZS, Peng R, et al. The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults: a 14-month longitudinal study. *The Journal of infectious diseases*. 2003;187(10):1571-80.
11. Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, Di Taranto C, Ziccheddu M, Spanu MA, et al. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *Journal of General Virology*. 2000;81(8):1967-73.
12. Dörries K, Vogel E, Günther S, Czub S. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology*. 1994;198(1):59-70.
13. Tan CS, Koralnik IJ. JC, BK, and other polyomaviruses: Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases: Elsevier Inc; 2014. p. 1807-14. e3.*

14. Ramos E, Drachenberg CB, Wali R, Hirsch HH. The decade of polyomavirus BK-associated nephropathy: state of affairs. *Transplantation*. 2009;87(5):621-30.
15. 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. *American Journal of Transplantation*. 2005;5(3):582-94.
16. Bechert CJ, Schnadig VJ, Payne DA, Dong J. Monitoring of BK viral load in renal allograft recipients by real-time PCR assays. *American journal of clinical pathology*. 2010;133(2):242-50.
17. Hoffman NG, Cook L, Atienza EE, Limaye AP, Jerome KR. Marked variability of BK virus load measurement using quantitative real-time PCR among commonly used assays. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(8):2671-80.
18. Biology SfE, Medicine. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*: Blackwell Science; 1960.
19. Sweet BH, Hilleman MR. The vacuolating virus, SV 40. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1960;105(2):420-7.
20. Stewart SE, Eddy BE, Gochenour AM, Borgese NG, Grubbs GE. The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture. *Virology*. 1957;3(2):380-400.
21. Sharma R, Tzetzio S, Patel S, Zachariah M, Sharma S, Melendy T. BK virus in kidney transplant: current concepts, recent advances, and future directions. *Exp Clin Transplant*. 2016;14(4):377-84.
22. Knipe D, Howley P, Griffin D, Lamb R, Martin M, Roizman B, et al. *Fields Virology*, Volumes 1 and 2. 2013.
23. Van Doorslaer K, Kraberger S, Austin C, Farkas K, Bergeman M, Paunil E, et al. Fish polyomaviruses belong to two distinct evolutionary lineages. *The Journal of general virology*. 2018;99(4):567.
24. Padgett B, Zurhein G, Walker D, Eckroade R, Dessel B. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *The Lancet*. 1971;297(7712):1257-60.
25. Mackenzie E, Poulding J, Harrison P, Amer B. Human polyoma virus (HPV)-a significant pathogen in renal transplantation. *Proceedings of the European Dialysis and Transplant Association European Dialysis and Transplant Association*. 1978;15:352-60.
26. Rosen S, Harmon W, Krensky AM, Edelson PJ, Padgett BL, Grinnell BW, et al. Tubulo-interstitial nephritis associated with polyomavirus (BK type) infection. *New England Journal of Medicine*. 1983;308(20):1192-6.
27. Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, Randhawa P. BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *American journal of kidney diseases*. 1995;26(4):671-3.
28. Barri YM, Ahmad I, Ketel BL, Barone GW, Walker PD, Bonsib SM, et al. Polyoma viral infection in renal transplantation: the role of immunosuppressive therapy. *Clinical transplantation*. 2001;15(4):240-6.
29. Reploeg MD, Storch GA, Clifford DB. BK virus: a clinical review. *Clinical Infectious Diseases*. 2001;33(2):191-202.

30. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS pathogens*. 2009;5(3):e1000363.
31. Antonsson A, Green AC, Mallitt K-A, O'Rourke PK, Pawlita M, Waterboer T, et al. Prevalence and stability of antibodies to the BK and JC polyomaviruses: a long-term longitudinal study of Australians. *Journal of General Virology*. 2010;91(7):1849-53.
32. Pinto M, Dobson S. BK and JC virus: a review. *Journal of Infection*. 2014;68:S2-S8.
33. Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DW, et al. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *Journal of medical virology*. 2003;71(1):115-23.
34. Ahsan N, Shah KV. Polyomaviruses and human diseases. *Polyomaviruses and Human Diseases*. 2006:1-18.
35. Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology*. 2009;384(2):266-73.
36. Mazzoni E, Pellegrinelli E, Mazziotta C, Lanzillotti C, Rotondo JC, Bononi I, et al. Mother-to-child transmission of oncogenic polyomaviruses BKPyV, JCPyV and SV40. *Journal of Infection*. 2020;80(5):563-70.
37. De Gascun CF, Carr MJ. Human polyomavirus reactivation: disease pathogenesis and treatment approaches. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:373579.
38. Shinohara T, Matsuda M, Cheng SH, Marshall J, Fujita M, Nagashima K. BK virus infection of the human urinary tract. *Journal of medical virology*. 1993;41(4):301-5.
39. Heritage J, Chesters PM, McCance DJ. The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue. *Journal of medical virology*. 1981;8(2):143-50.
40. Chong S, Antoni M, Macdonald A, Reeves M, Harber M, Magee CN. BK virus: current understanding of pathogenicity and clinical disease in transplantation. *Reviews in Medical Virology*. 2019;29(4):e2044.
41. Sawinski D, Goral S. BK virus infection: an update on diagnosis and treatment. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2015;30(2):209-17.
42. Nankivell B, Renthawa J, Sharma R, Kable K, O'Connell P, Chapman J. BK virus nephropathy: histological evolution by sequential pathology. *American Journal of Transplantation*. 2017;17(8):2065-77.
43. Babel N, Volk H-D, Reinke P. BK polyomavirus infection and nephropathy: the virus-immune system interplay. *Nature Reviews Nephrology*. 2011;7(7):399-406.
44. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation*. 2005;79(10):1277-86.
45. Hsiao C-Y, Pilmore HL, Zhou L, de Zoysa JR. Outcomes of renal transplant recipients with BK virus infection and BK virus surveillance in the Auckland region from 2006 to 2012. *World Journal of Nephrology*. 2016;5(6):497.

46. Dogan S, Celebi Z, Akturk S, Kutlay S, Tuzuner A, Keven K, et al., editors. Prevalence and risk factors of BK viremia in patients with kidney transplantation: a single-center experience from Turkey. *Transplantation proceedings*; 2017: Elsevier.
47. Vasudev B, Hariharan S, Hussain SA, Zhu Y-R, Bresnahan BA, Cohen EP. BK virus nephritis: risk factors, timing, and outcome in renal transplant recipients. *Kidney international*. 2005;68(4):1834-9.
48. Park WY, Kang SS, Jin K, Park SB, Choe M, Han S. Long-term prognosis of BK virus-associated nephropathy in kidney transplant recipients. *Kidney Research and Clinical Practice*. 2018;37(2):167.
49. Muñoz P, Fogeda M, Bouza E, Verde E, Palomo J, Banares R, et al. Prevalence of BK virus replication among recipients of solid organ transplants. *Clinical infectious diseases*. 2005;41(12):1720-5.
50. Leung AY, Chan M, Tang SC, Liang R, Kwong Y. Real-time quantitative analysis of polyoma BK viremia and viruria in renal allograft recipients. *Journal of virological methods*. 2002;103(1):51-6.
51. Mannon R, Hoffmann S, Kampen R, Cheng O, Kleiner D, Ryschkewitsch C, et al. Molecular evaluation of BK polyomavirus nephropathy. *American journal of transplantation*. 2005;5(12):2883-93.
52. Ramos E, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hamze O, Fink JC, Klassen DK, et al. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2002;13(8):2145-51.
53. Schachtner T, Stein M, Babel N, Reinke P. The loss of BKV-specific immunity from pretransplantation to posttransplantation identifies kidney transplant recipients at increased risk of BKV replication. *American Journal of Transplantation*. 2015;15(8):2159-69.
54. Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK polyomavirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging therapies. *Clinical microbiology reviews*. 2017;30(2):503-28.
55. Binggeli S, Egli A, Schaub S, Binet I, Mayr M, Steiger J, et al. Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2007;7(5):1131-9.
56. Schmidt T, Adam C, Hirsch HH, Janssen M, Wolf M, Dirks J, et al. BK polyomavirus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication. *American Journal of Transplantation*. 2014;14(6):1334-45.
57. Zhang S, Zhang H, Zhao J. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;384(4):405-8.
58. Sharma PM, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Randhawa P. Phylogenetic analysis of polyomavirus BK sequences. *Journal of virology*. 2006;80(18):8869-79.
59. Zhong S, Randhawa PS, Ikegaya H, Chen Q, Zheng H-Y, 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. *Journal of General Virology*. 2009;90(1):144-52.

60. Takasaka T, Goya N, Tokumoto T, Tanabe K, Toma H, Ogawa Y, et al. Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 10):2821-7.
61. Zheng H-Y, Nishimoto Y, Chen Q, Hasegawa M, Zhong S, Ikegaya H, et al. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes and infection*. 2007;9(2):204-13.
62. Daloglu E, Mutlu D, Sağlık İ, Mutlu E, Niesters H, Çolak D. Evaluation of the two different real time polymerase chain reaction methods used for bk virus (BKV) quantification and BKV genotype assignment. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2019;53(3):285-96.
63. Colakoglu S, Dursun H, Cengiz N, Bulat MC, Noyan A. The African variant of BKV in a Turkish renal transplant patient. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014;79(2):245-6.
64. Fang C-Y, Chen H-Y, Wang M, Chen P-L, Chang C-F, Chen L-S, et al. Global analysis of modifications of the human BK virus structural proteins by LC-MS/MS. *Virology*. 2010;402(1):164-76.
65. Meneguzzi G, Pignatti PF, Barbanti-Brodano G, Milanesi G. Minichromosome from BK virus as a template for transcription in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1978;75(3):1126-30.
66. Imperiale MJ. The human polyomaviruses: an overview. *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives*. 2001:53-71.
67. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*. 2008;319(5866):1096-100.
68. Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, Gosert R, Wali RK, Munivenkatappa R, et al. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation*. 2007;84(3):323-30.
69. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus Bk. *The Lancet infectious diseases*. 2003;3(10):611-23.
70. Carbone M, Rizzo P, Grimley PM, Procopio A, Mew DJ, Shridhar V, et al. Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas. *Nature medicine*. 1997;3(8):908-12.
71. Hurdiss DL, Morgan EL, Thompson RF, Prescott EL, Panou MM, Macdonald A, et al. New structural insights into the genome and minor capsid proteins of BK polyomavirus using cryo-electron microscopy. *Structure*. 2016;24(4):528-36.
72. Randhawa P, Ramos E. BK viral nephropathy: an overview. *Transplantation Reviews*. 2007;21(2):77-85.
73. Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, Egli A, Ramos E, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(4):841-52.
74. Randhawa P, Brennan D. BK virus infection in transplant recipients: an overview and update. *American Journal of Transplantation*. 2006;6(9):2000-5.
75. Van Aalderen M, Heutinck K, Huisman C, Ten Berge I. BK virus infection in transplant recipients: clinical manifestations, treatment options and the immune response. *Neth J Med*. 2012;70(4):172-83.

76. Anzivino E, Zingaropoli MA, Iannetta M, Pietropaolo VA, Oliva A, Iori F, et al. Archetype and rearranged non-coding Control Regions in urothelial bladder carcinoma of immunocompetent individuals. *Cancer Genomics & Proteomics*. 2016;13(6):499-509.
77. Sharma PM, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Randhawa PS. Polyomavirus BK non-coding control region rearrangements in health and disease. *Journal of medical virology*. 2007;79(8):1199-207.
78. Helle F, Brochot E, Handala L, Martin E, Castelain S, Francois C, et al. Biology of the BKPyV: an update. *Viruses*. 2017;9(11):327.
79. Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. An N-linked glycoprotein with α (2, 3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. *Journal of virology*. 2005;79(22):14442-5.
80. Liu CK, Wei G, Atwood WJ. Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal α (2-6)-linked sialic acids. *Journal of virology*. 1998;72(6):4643-9.
81. Eash S, Querbes W, Atwood WJ. Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *Journal of virology*. 2004;78(21):11583-90.
82. Bennett SM, Jiang M, Imperiale MJ. Role of cell-type-specific endoplasmic reticulum-associated degradation in polyomavirus trafficking. *Journal of virology*. 2013;87(16):8843-52.
83. Dupzyk A, Tsai B. How polyomaviruses exploit the ERAD machinery to cause infection. *Viruses*. 2016;8(9):242.
84. Bennett SM, Zhao L, Bosard C, Imperiale MJ. Role of a nuclear localization signal on the minor capsid proteins VP2 and VP3 in BKPyV nuclear entry. *Virology*. 2015;474:110-6.
85. Teunissen EA, de Raad M, Mastrobattista E. Production and biomedical applications of virus-like particles derived from polyomaviruses. *Journal of Controlled Release*. 2013;172(1):305-21.
86. Low J, Humes HD, Szczypka M, Imperiale M. BKV and SV40 infection of human kidney tubular epithelial cells in vitro. *Virology*. 2004;323(2):182-8.
87. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Wali R, Cubitt CL, Ramos E. BK polyoma virus allograft nephropathy: ultrastructural features from viral cell entry to lysis. *American Journal of Transplantation*. 2003;3(11):1383-92.
88. Evans GL, Caller LG, Foster V, Crump CM. Anion homeostasis is important for non-lytic release of BK polyomavirus from infected cells. *Open biology*. 2015;5(8):150041.
89. Manzetti J, Weissbach FH, Graf FE, Unterstab G, Wernli M, Hopfer H, et al. BK polyomavirus evades innate immune sensing by disrupting the mitochondrial network and promotes mitophagy. *Iscience*. 2020;23(7):101257.
90. Seo G, Fink L, O'Hara B, Atwood W, Sullivan C. Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *Journal of virology*. 2008;82(20):9823-8.
91. Broekema NM, Imperiale MJ. miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(20):8200-5.
92. Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(2):503-28.

93. Vigil D, Konstantinov NK, Barry M, Harford AM, Servilla KS, Kim YH, et al. BK nephropathy in the native kidneys of patients with organ transplants: clinical spectrum of BK infection. *World journal of transplantation*. 2016;6(3):472.
94. Krumbholz A, Bininda-Emonds OR, Wutzler P, Zell R. Evolution of four BK virus subtypes. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2008;8(5):632-43.
95. Lee YJ, Zheng J, Kolitsopoulos Y, Chung D, Amigues I, Son T, et al. Relationship of BK polyoma virus (BKV) in the urine with hemorrhagic cystitis and renal function in recipients of T Cell-depleted peripheral blood and cord blood stem cell transplantations. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2014;20(8):1204-10.
96. Mohammadi Najafabadi M, Soleimani M, Ahmadvand M, Soufi Zomorrod M, Mousavi SA. Treatment protocols for BK virus associated hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. *American journal of blood research*. 2020;10(5):217-30.
97. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(7):488-96.
98. Cesaro S, Dalianis T, Hanssen Rinaldo C, Koskenvuo M, Pegoraro A, Einsele H, et al. ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(1):12-21.
99. Elidemir O, Chang IF, Schechter MG, Mallory GB. BK virus-associated hemorrhagic cystitis in a pediatric lung transplant recipient. *Pediatric transplantation*. 2007;11(7):807-10.
100. Hirsch HH, Snydman DR. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;41(3):354-60.
101. Egli A, Helmersen D, Taub K, Hirsch H, Johnson A. Renal failure five years after lung transplantation due to polyomavirus BK-associated nephropathy. *American journal of transplantation*. 2010;10(10):2324-30.
102. Barton T, Blumberg E, Doyle A, Ahya V, Ferrenberg J, Brozena S, et al. A prospective cross-sectional study of BK virus infection in non-renal solid organ transplant recipients with chronic renal dysfunction. *Transplant infectious disease*. 2006;8(2):102-7.
103. Doucette KE, Pang XL, Jackson K, Burton I, Carbonneau M, Cockfield S, et al. Prospective monitoring of BK polyomavirus infection early posttransplantation in nonrenal solid organ transplant recipients. *Transplantation*. 2008;85(12):1733-6.
104. Hirsch HH, Randhawa PS, Practice AIDCo. BK polyomavirus in solid organ transplantation—guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clinical transplantation*. 2019;33(9):e13528.

105. Nickeleit V, Klimkait T, Binet IF, Dalquen P, Del Zenero V, Thiel G, et al. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *The New England journal of medicine*. 2000;342(18):1309-15.
106. Randhawa P, Uhrmacher J, Pasculle W, Vats A, Shapiro R, Eghtsead B, et al. A comparative study of BK and JC virus infections in organ transplant recipients. *Journal of medical virology*. 2005;77(2):238-43.
107. Laskin BL, Denburg MR, Furth SL, Moatz T, Altrich M, Kleiboeker S, et al. The Natural History of BK Polyomavirus and the Host Immune Response After Stem Cell Transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2020;71(12):3044-54.
108. Dharnidharka VR, Cherikh WS, Abbott KC. An OPTN analysis of national registry data on treatment of BK virus allograft nephropathy in the United States. *Transplantation*. 2009;87(7):1019-26.
109. Thangaraju S, Gill J, Wright A, Dong J, Rose C, Gill J. Risk factors for BK polyoma virus treatment and association of treatment with kidney transplant failure: insights from a paired kidney analysis. *Transplantation*. 2016;100(4):854-61.
110. Schold JD, Rehman S, Kayler LK, Magliocca J, Srinivas TR, Meier-Kriesche HU. Treatment for BK virus: incidence, risk factors and outcomes for kidney transplant recipients in the United States. *Transplant International*. 2009;22(6):626-34.
111. Ginevri F, De Santis R, Comoli P, Pastorino N, Rossi C, Botti G, et al. Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a single-center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches. *Transplantation*. 2003;75(8):1266-70.
112. Thomas A, Dropulic LK, Rahman MH, Geetha D. Ureteral Stents: A Novel Risk Factor for Polyomavirus Nephropathy. *Transplantation*. 2007;84(3):433-6.
113. Bohl DL, Storch GA, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Schnitzler MA, Major EO, et al. Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(9):2213-21.
114. Shah A, Kumar V, Palmer MB, Trofe-Clark J, Laskin B, Sawinski D, et al. Native kidney BK virus nephropathy, a systematic review. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2019;21(4):e13083.
115. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebille V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(8):1926-33.
116. Hirsch HH. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2002;2(1):25-30.

117. Egli A, Binggeli S, Bodaghi S, Dumoulin A, Funk GA, Khanna N, et al. Cytomegalovirus and polyomavirus BK posttransplant. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2007;22 Suppl 8:viii72-viii82.
118. Wadei H, Rule A, Lewin M, Mahale A, Khamash H, Schwab T, et al. Kidney transplant function and histological clearance of virus following diagnosis of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN). *American Journal of Transplantation*. 2006;6(5p1):1025-32.
119. Kahan AV, Coleman DV, Koss LG. Activation of human polyomavirus infection-detection by cytologic technics. *Am J Clin Pathol*. 1980;74(3):326-32.
120. Parajuli S, Astor BC, Kaufman D, Muth B, Mohamed M, Garg N, et al. Which is more nephrotoxic for kidney transplants: BK nephropathy or rejection? *Clinical Transplantation*. 2018;32(4):e13216.
121. Shen CL, Wu BS, Lien TJ, Yang AH, Yang CY. BK Polyomavirus Nephropathy in Kidney Transplantation: Balancing Rejection and Infection. 2021;13(3).
122. Schwarz A, Linnenweber-Held S, Heim A, Framke T, Haller H, Schmitt C. Viral Origin, Clinical Course, and Renal Outcomes in Patients With BK Virus Infection After Living-Donor Renal Transplantation. *Transplantation*. 2016;100(4):844-53.
123. Ottaviano G, Chiesa R, Feuchtinger T, Vickers MA, Dickinson A, Gennery AR, et al. Adoptive T cell therapy strategies for viral infections in patients receiving haematopoietic stem cell transplantation. *Cells*. 2019;8(1):47.
124. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(17):1813-26.
125. Kerbaux LN, Kerbaux MN, Bautzer V, Chapchap EC, de Mattos VRP, da Rocha JDA, et al. Severe hemorrhagic cystitis caused by the BK polyomavirus is associated with decreased survival post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Infectious Disease*. 2019;21(5):e13101.
126. O'Donnell PH, Swanson K, Josephson MA, Artz AS, Parsad SD, Ramaprasad C, et al. BK virus infection is associated with hematuria and renal impairment in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2009;15(9):1038-48.e1.
127. Hill JA, Mayer BT, Xie H, Leisenring WM, Huang ML, Stevens-Ayers T, et al. Kinetics of Double-Stranded DNA Viremia After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2018;66(3):368-75.
128. Imlay H, Xie H, Leisenring WM, Duke ER, Kimball LE, Huang ML, et al. Presentation of BK polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood advances*. 2020;4(4):617-28.
129. Dosin G, Aoun F, El Rassy E, Assi T, Lewalle P, Blanc J, et al. Viral-induced Hemorrhagic Cystitis After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2017;17(7):438-42.
130. Haines HL, Laskin BL, Goebel J, Davies SM, Yin HJ, Lawrence J, et al. Blood, and not urine, BK viral load predicts renal outcome in children with

- hemorrhagic cystitis following hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2011;17(10):1512-9.
131. Erard V, Kim HW, Corey L, Limaye A, Huang ML, Myerson D, et al. BK DNA viral load in plasma: evidence for an association with hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*. 2005;106(3):1130-2.
 132. Sahu KK, Prakash G, Khadwal A, Varma SC, Malhotra P. A rare case of hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant patient. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 2016;32(1):196-200.
 133. Tognon M, Corallini A, Martini F, Negrini M, Barbanti-Brodano G. Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene*. 2003;22(33):5192-200.
 134. Dalianis T, Hirsch HH. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology*. 2013;437(2):63-72.
 135. Abend JR, Jiang M, Imperiale MJ. BK virus and human cancer: innocent until proven guilty. *Seminars in cancer biology*. 2009;19(4):252-60.
 136. Gupta G, Kuppachi S, Kalil RS, Buck CB, Lynch CF, Engels EA. Treatment for presumed BK polyomavirus nephropathy and risk of urinary tract cancers among kidney transplant recipients in the United States. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2018;18(1):245-52.
 137. Yin WY, Lee MC, Lai NS, Lu MC. BK virus as a potential oncovirus for bladder cancer in a renal transplant patient. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2015;114(4):373-4.
 138. Starrett GJ, Buck CB. The case for BK polyomavirus as a cause of bladder cancer. *Current opinion in virology*. 2019;39:8-15.
 139. Harris KF, Christensen JB, Imperiale MJ. BK virus large T antigen: interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *J Virol*. 1996;70(4):2378-86.
 140. Petrogiannis-Haliotis T, Sakoulas G, Kirby J, Korálnik IJ, Dvorak AM, Monahan-Earley R, et al. BK-related polyomavirus vasculopathy in a renal-transplant recipient. *The New England journal of medicine*. 2001;345(17):1250-5.
 141. Kim GY, Peji J, Nuovo G, Thomas F. BK virus colonic ulcerations. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2004;2(2):175-7.
 142. Stoner GL, Alappan R, Jobes DV, Ryschkewitsch CF, Landry ML. BK virus regulatory region rearrangements in brain and cerebrospinal fluid from a leukemia patient with tubulointerstitial nephritis and meningoencephalitis. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2002;39(5):1102-12.
 143. Lee Y, Kim YJ, Cho H. BK virus nephropathy and multiorgan involvement in a child with heart transplantation. *Clinical nephrology*. 2019;91(2):107-13.
 144. Comoli P, Binggeli S, Ginevri F, Hirsch H. Polyomavirus-associated nephropathy: update on BK virus-specific immunity. *Transplant Infectious Disease*. 2006;8(2):86-94.

145. Drake III DR, Moser JM, Hadley A, Altman JD, Maliszewski C, Butz E, et al. Polyomavirus-infected dendritic cells induce antiviral CD8⁺ T lymphocytes. *Journal of virology*. 2000;74(9):4093-101.
146. 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(1):115-23.
147. Wunderink HF, van der Meijden E, van der Blij-de Brouwer CS, Mallat MJ, Haasnoot GW, van Zwet EW, et al. Pretransplantation Donor-Recipient Pair Seroreactivity Against BK Polyomavirus Predicts Viremia and Nephropathy After Kidney Transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2017;17(1):161-72.
148. Abend JR, Changala M, Sathe A, Casey F, Kistler A, Chandran S, et al. Correlation of BK virus neutralizing serostatus with the incidence of BK viremia in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2017;101(6):1495-505.
149. Andrews CA, Shah KV, Daniel RW, Hirsch MS, Rubin RH. A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *Journal of Infectious Diseases*. 1988;158(1):176-81.
150. Lamarche C, Orio J, Collette S, Sénécal L, Hébert M-J, Renoult É, et al. BK polyomavirus and the transplanted kidney: immunopathology and therapeutic approaches. *Transplantation*. 2016;100(11):2276.
151. Ciarlet M, Hoshino Y, Liprandi F. Single point mutations may affect the serotype reactivity of serotype G11 porcine rotavirus strains: a widening spectrum? *Journal of virology*. 1997;71(11):8213-20.
152. Schaenman JM, Korin Y, Sidwell T, Kandarian F, Harre N, Gjertson D, et al. Increased Frequency of BK Virus-Specific Polyfunctional CD8⁺ T Cells Predict Successful Control of BK Viremia After Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2017;101(6):1479-87.
153. Renner F, Dietrich H, Bulut N, Celik D, Freitag E, Gaertner N, et al., editors. The risk of polyomavirus-associated graft nephropathy is increased by a combined suppression of CD8 and CD4 cell-dependent immune effects. *Transplantation proceedings*; 2013: Elsevier.
154. Furmaga J, Kowalczyk M. BK Polyomavirus-Biology, Genomic Variation and Diagnosis. 2021;13(8).
155. Nelson AS, Heyenbruch D, Rubinstein JD, Sabulski A, Jodele S, Thomas S, et al. Virus-specific T-cell therapy to treat BK polyomavirus infection in bone marrow and solid organ transplant recipients. *Blood advances*. 2020;4(22):5745-54.
156. Mutlu E, Köksoy S, Mutlu D, Yılmaz VT, Koçak H, Dinçkan A, et al. Quantitative analysis of BKV-specific CD4⁺ T cells before and after kidney transplantation. *Transplant immunology*. 2015;33(1):20-6.
157. Ahlenstiel-Grunow T, Sester M, Sester U, Hirsch HH, Pape L. BK Polyomavirus-specific T Cells as a Diagnostic and Prognostic Marker for BK Polyomavirus Infections After Pediatric Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2020;104(11):2393-402.

158. Bruminhent J, Srisala S, Klinmalai C, Pinsai S, Watcharananan SP, Kantachuvesiri S, et al. BK Polyomavirus-specific T cell immune responses in kidney transplant recipients diagnosed with BK Polyomavirus-associated nephropathy. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):974.
159. Bohl DL, Brennan DC, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Major EO, Storch GA. BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. *Journal of Clinical Virology*. 2008;43(2):184-9.
160. Group KDIGOTW. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009;9:S1-S155.
161. Hirsch H, Randhawa P, Practice AIDCo. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *American journal of transplantation*. 2013;13(s4):179-88.
162. 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(3):340-5.
163. Dadhania D, Snopkowski C, Ding R, Muthukumar T, Lee J, Bang H, et al. Validation of noninvasive diagnosis of BK virus nephropathy and identification of prognostic biomarkers. *Transplantation*. 2010;90(2):189.
164. Hirsch HH, Babel N, Comoli P, Friman V, Ginevri F, Jardine A, et al. European perspective on human polyomavirus infection, replication and disease in solid organ transplantation. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20:74-88.
165. Kasiske BL, Zeier MG, Chapman JR, Craig JC, Ekberg H, Garvey CA, et al. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney international*. 2010;77(4):299-311.
166. Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de biologie clinique*. 1990;48(8):579-82.
167. Pastrana DV, Ray U, Magaldi TG, Schowalter RM, Çuburu N, Buck CB. BK polyomavirus genotypes represent distinct serotypes with distinct entry tropism. *J Virol*. 2013;87(18):10105-13.
168. Chen P, Lei Y, He X, Zhong L, Yu X, Huang B. Sample Processing Effect on BK Virus Detection by Real-Time PCR in Urine Samples. *Clinical laboratory*. 2016;62(5):833-7.
169. van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog*. 2010;6(7):e1001024.
170. Pezeshgi A, Ghods A, Keivani H, Asgari M, Shatty M. Incidence of BK virus nephropathy (BKVN) in renal transplant recipients. *International journal of organ transplantation medicine*. 2012;3(3):115.
171. Randhawa P, Ho A, Shapiro R, Vats A, Swalsky P, Finkelstein S, et al. Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant patients. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(3):1176-80.
172. Pavšič J, Devonshire AS, Parkes H, Schimmel H, Foy CA, Karczmarczyk M, et al. Standardization of Nucleic Acid Tests for Clinical Measurements of Bacteria and Viruses. *J Clin Microbiol*. 2015;53(7):2008-14.

173. Egli A, Dumoulin A, Köhli S, Hirsch HH. Polyomavirus BK after kidney transplantation: role of molecular and immunological markers. *Trends Transplant.* 2009;3:85-102.
174. Govind S, Hockley J, Morris C, Almond N, Group CS. The development and establishment of the 1st WHO BKV International Standard for nucleic acid based techniques. *Biologicals.* 2019;60:75-84.
175. Tan SK, Milligan S, Sahoo MK, Taylor N, Pinsky BA. Calibration of BK virus nucleic acid amplification testing to the 1st WHO international standard for BK virus. *Journal of Clinical Microbiology.* 2017;55(3):923-30.
176. WHO. First WHO international standard for BK virus DNA. WHO Geneva, Switzerland; 2016.
177. Hayden R, Yan X, Wick M, Rodriguez A, Xiong X, Ginocchio C, et al. Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: a multivariate analysis. *Journal of clinical microbiology.* 2012;50(2):337-45.
178. Randhawa P, Kant J, Shapiro R, Tan H, Basu A, Luo C. Impact of genomic sequence variability on quantitative PCR assays for diagnosis of polyomavirus BK infection. *Journal of clinical microbiology.* 2011;49(12):4072-6.
179. Hsieh MC, Hung CW, Chiou HL, Yang SF. Effect of a BK viruria reaction detected by qualitative polymerase chain reaction on the renal function of kidney transplant recipients. *Molecular medicine reports.* 2013;7(4):1319-23.
180. Masutani K, Shapiro R, Basu A, Tan H, Ninomiya T, Randhawa P. Putative episodes of T-cell mediated rejection in patients with sustained BK viruria but no viremia. *Transplantation.* 2012;94(1):43.
181. Huang G, Wang C-x, Zhang L, Fei J-g, Deng S-x, Qiu J, et al. Monitoring of polyomavirus BK replication and impact of preemptive immunosuppression reduction in renal-transplant recipients in China: a 5-year single-center analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2015;81(1):21-6.
182. Schaub S, Hirsch H, Dickenmann M, Steiger J, Mihatsch M, Hopfer H, et al. Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy. *American journal of transplantation.* 2010;10(12):2615-23.
183. Hirsch HH, Randhawa P. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2013;13 Suppl 4:179-88.
184. Höcker B, Schneble L, Murer L, Carraro A, Pape L, Kranz B, et al. Epidemiology of and risk factors for BK polyomavirus replication and nephropathy in pediatric renal transplant recipients: An international CERTAIN registry study. *Transplantation.* 2019;103(6):1224-33.
185. Funahashi Y, Kato M, Fujita T, Tsuruta K, Inoue S, Gotoh M, editors. Correlation between urine and serum BK virus levels after renal transplantation. *Transplantation Proceedings;* 2014: Elsevier.
186. Eckardt K-U, Kasiske BL. Kidney disease: improving global outcomes. *Nature Reviews Nephrology.* 2009;5(11):650-7.
187. Bicalho CS, Oliveira RdR, David DR, Fink MCDS, Agena F, Castro MC, et al. Determination of viremia cut-off for risk to develop BKP yV-associated

- nephropathy among kidney transplant recipients. *Transplant Infectious Disease*. 2018;20(5):e12969.
- 188.Saundh BK, Baker R, Harris M, Welberry Smith MP, Cherukuri A, Hale A. Early BK polyomavirus (BKV) reactivation in donor kidney is a risk factor for development of BKV-associated nephropathy. *The Journal of infectious diseases*. 2013;207(1):137-41.
 - 189.Johnston O, Jaswal D, Gill JS, Doucette S, Fergusson DA, Knoll GA. Treatment of polyomavirus infection in kidney transplant recipients: a systematic review. *Transplantation*. 2010;89(9):1057-70.
 - 190.Saundh BK, Tibble S, Baker R, Sasnauskas K, Harris M, Hale A. Different patterns of BK and JC polyomavirus reactivation following renal transplantation. *Journal of clinical pathology*. 2010;63(8):714-8.
 - 191.Funahashi Y. BK Virus-Associated Nephropathy after Renal Transplantation. *Pathogens*. 2021;10(2):150.
 - 192.Morel V, Martin E, François C, Helle F, Faucher J, Mourez T, et al. A simple and reliable strategy for BK virus subtyping and subgrouping. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(4):1177-85.
 - 193.Ikegaya H, Saukko PJ, Terti R, Metsärinne KP, Carr MJ, Crowley B, et al. Identification of a genomic subgroup of BK polyomavirus spread in European populations. *Journal of general virology*. 2006;87(11):3201-8.
 - 194.Seif I, Khoury G, Dhar R. The genome of human papovavirus BKV. *Cell*. 1979;18(4):963-77.
 - 195.Beckmann AM, Shah KV. Propagation and primary isolation of JCV and BKV in urinary epithelial cell cultures. *Progress in clinical and biological research*. 1983;105:3-14.
 - 196.Moens U, Van Ghelue M, Song X, Ehlers B. Serological cross-reactivity between human polyomaviruses. *Reviews in Medical Virology*. 2013;23(4):250-64.
 - 197.Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji: Güneş kitabevi; 1999.
 - 198.Malhotra J, Waterboer T, Pawlita M, Michel A, Cai Q, Zheng W, et al. Serum biomarkers of polyomavirus infection and risk of lung cancer in never smokers. *British journal of cancer*. 2016;115(9):1131-9.
 - 199.Cook L. Polyomaviruses. *Microbiology spectrum*. 2016;4(4).
 - 200.Kadar N. Yeni, Daha Yeni, En Yeni İnsan Polyomavirusları. *Mikrobiyol Bul*. 2013;47(2):362-81.
 - 201.Koukoulaki M, O'Donovan M, Pursglove S, Alexopoulou D, Hadjiconstantinou V, Drakopoulos S. Prospective study of urine cytology screening for BK polyoma virus replication in renal transplant recipients. *Cytopathology*. 2008;19(6):385-8.
 - 202.Cimbaluk D, Pitelka L, Kluskens L, Gattuso P. Update on human polyomavirus BK nephropathy. *Diagnostic cytopathology*. 2009;37(10):773-9.
 - 203.Koh MJ, Lim BJ, Noh S, Kim YH, Jeong HJ. Urinary decoy cell grading and its clinical implications. *Korean journal of pathology*. 2012;46(3):233.
 - 204.Gonzalez S, Escobar-Serna D, Suarez O, Benavides X, Escobar-Serna J, Lozano E, editors. BK virus nephropathy in kidney transplantation: an approach proposal and update on risk factors, diagnosis, and treatment. *Transplantation Proceedings*; 2015: Elsevier.

- 205.Nankivell BJ, Renthawa J, Shingde M, Khan A. The importance of kidney medullary tissue for the accurate diagnosis of BK virus allograft nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2020;15(7):1015-23.
- 206.Drachenberg C, Papadimitriou J, Chaudhry M, Ugarte R, Mavanur M, Thomas B, et al. Histological evolution of BK virus–associated nephropathy: importance of integrating clinical and pathological findings. *American Journal of Transplantation*. 2017;17(8):2078-91.
- 207.Nickeleit V, Singh HK, Randhawa P, Drachenberg CB, Bhatnagar R, Bracamonte E, et al. The Banff Working Group classification of definitive polyomavirus nephropathy: morphologic definitions and clinical correlations. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2018;29(2):680-93.
- 208.Geetha D, Sozio SM, Ghanta M, Josephson M, Shapiro R, Dadhania D, et al. Results of repeat renal transplantation after graft loss from BK virus nephropathy. *Transplantation*. 2011;92(7):781-6.
- 209.Huang J, Danovitch G, Pham PT, Bunnapradist S, Huang E. Kidney retransplantation for BK virus nephropathy with active viremia without allograft nephrectomy. *Journal of nephrology*. 2015;28(6):773-7.
- 210.Ginevri F, Pastorino N, de Santis R, Fontana I, Sementa A, Losurdo G, et al. Retransplantation after kidney graft loss due to polyoma BK virus nephropathy: successful outcome without original allograft nephrectomy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2003;42(4):821-5.
- 211.Zwaans BM, Nicolai HG, Chancellor MB, Lamb LE. Challenges and opportunities in radiation-induced hemorrhagic cystitis. *Reviews in urology*. 2016;18(2):57.
- 212.Savva-Bordalo J, Pinho Vaz C, Sousa M, Branca R, Campilho F, Resende R, et al. Clinical effectiveness of hyperbaric oxygen therapy for BK-virus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2012;47(8):1095-8.
- 213.Masieri L, Sessa F, Mari A, Campi R, Cito G, Verrienti P, et al. Intravesical application of platelet-rich plasma in patients with persistent haemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation: a single-centre preliminary experience. *International Urology and Nephrology*. 2019;51(10):1715-20.
- 214.Miller AN, Glode A, Hogan KR, Schaub C, Kramer C, Stuart RK, et al. Efficacy and safety of ciprofloxacin for prophylaxis of polyomavirus BK virus–associated hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2011;17(8):1176-81.
- 215.Philippe M, Ranchon F, Gilis L, Schwiertz V, Vantard N, Ader F, et al. Cidofovir in the treatment of BK virus–associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2016;22(4):723-30.
- 216.Coomes EA, Wolfe A, Michelis FV, Thyagu S, Viswabandya A, Lipton JH, et al. Efficacy of cidofovir in treatment of BK virus–induced hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2018;24(9):1901-5.

217. Toptas T, Kaygusuz-Atagunduz I, Kani HT, Adiguzel C, Firatli-Tuglular T. Levofloxacin for the treatment of severe refractory BK virus-associated hemorrhagic cystitis in hematopoietic stem cell transplantation recipients: A report of three cases. *Oncology Letters*. 2014;8(4):1775-7.
218. Knoll GA, Humar A, Fergusson D, Johnston O, House AA, Kim SJ, et al. Levofloxacin for BK virus prophylaxis following kidney transplantation: a randomized clinical trial. *Jama*. 2014;312(20):2106-14.
219. Visintini C, Venturini M, Botti S, Gargiulo G, Palese A. Nursing management of haemorrhagic cystitis in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation: a multicentre italian survey. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2019;11(1).
220. Gander R, Asensio M, Guillén G, Royo GF, Bolaños A, Pérez M, et al. Hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation: a challenge for the pediatric urologist. *Journal of Pediatric Urology*. 2018;14(5):366-73.
221. Cheuk DK, Lee TL, Chiang AK, Ha SY, Lau YL, Chan GC. Risk factors and treatment of hemorrhagic cystitis in children who underwent hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant International*. 2007;20(1):73-81.
222. Kaur A, Wilhelm M, Wilk S, Hirsch HH. BK polyomavirus-specific antibody and T-cell responses in kidney transplantation: update. *Current opinion in infectious diseases*. 2019;32(6):575-83.
223. Vats A, Shapiro R, Randhawa PS, 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 adults¹. *Transplantation*. 2003;75(1):105-12.
224. Hirsch HH, Mohaupt M, Klimkait T. Prospective monitoring of BK virus load after discontinuing sirolimus treatment in a renal transplant patient with BK virus nephropathy. *The Journal of Infectious Diseases*. 2001;184(11):1494-5.
225. Nicleleit V, Singh HK. Polyomaviruses and disease: is there more to know than viremia and viruria? *Current opinion in organ transplantation*. 2015;20(3):348.
226. Greer A, Forman M, Valsamakis A. Comparison of BKV quantification using a single automated nucleic acid extraction platform and 3 real-time PCR assays. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015;82(4):297-302.
227. Leuzinger K, Naegel K, Schaub S, Hirsch HH. Quantification of plasma BK polyomavirus loads is affected by sequence variability, amplicon length, and non-encapsidated viral DNA genome fragments. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2019;121:104210.
228. Preiksaitis JK, Hayden RT, Tong Y, Pang XL, Fryer JF, Heath AB, et al. Are We There Yet? Impact of the First International Standard for Cytomegalovirus DNA on the Harmonization of Results Reported on Plasma Samples. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;63(5):583-9.
229. Zincir İTKCP, ÇOLAK D, SAĞLIK İ, SARINOĞLU RC, MUTLU D, PEKER BO, et al. Özgün Çalışma/Original Article Mikrobiyol Bul 2020; 54 (2): 257-265. *Mikrobiyol Bul*. 2020;54(2):257-65.
230. Samadikuchaksaraei A. Polymerase chain reaction for biomedical applications: BoD–Books on Demand; 2016.

231. Bergkvist A, Burns M, Sanders R, Redshaw N, Wilkes T. Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR).
232. Rennert H, Jenkins SG, Azurin C, Sipley J. Evaluation of a BK virus viral load assay using the QIAGEN Artus BK Virus RG PCR test. *Journal of clinical virology*. 2012;54(3):260-4.
233. Fritzsche A, Berneking L, Nörz D, Reucher S, Fischer N, Roggenkamp H, et al. Clinical evaluation of a laboratory-developed quantitative BK virus-PCR assay using the cobas® omni Utility Channel. *Journal of Virological Methods*. 2021;290:114093.
234. Stellrecht K, Espino A, Nattanmai S, Jackson W, Conti D. Comparison of three real-time PCR for the quantification of polyomavirus BK. *Journal of Clinical Virology*. 2013;56(4):354-9.
235. Solis M, Meddeb M, Sueur C, Domingo-Calap P, Soulier E, Chabaud A, et al. Sequence Variation in Amplification Target Genes and Standards Influences Interlaboratory Comparison of BK Virus DNA Load Measurement. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;53(12):3842-52.
236. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005;39(1):75-85.
237. Luo C, Hirsch HH, Kant J, Randhawa P. VP-1 quasispecies in human infection with polyomavirus BK. *Journal of medical virology*. 2012;84(1):152-61.
238. Dumoulin A, Hirsch H. Reevaluating and optimizing polyomavirus BK and JC real-time PCR assays to detect rare sequence polymorphisms. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(4):1382-8.
239. Randhawa P, Vats A, Shapiro R, Weck K, Scantlebury V. BK virus: discovery, epidemiology, and biology. *GRAFT-GEORGETOWN-*. 2002;5:S19-S27.
240. Tremolada S, Delbue S, Larocca S, Carloni C, Elia F, Khalili K, et al. Polymorphisms of the BK virus subtypes and their influence on viral in vitro growth efficiency. *Virus research*. 2010;149(2):190-6.
241. Jin L, Gibson PE, Booth JC, Clewley JP. Genomic typing of BK virus in clinical specimens by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *Journal of medical virology*. 1993;41(1):11-7.
242. Pinto GG, Poloni JAT, Paskulin DDA, Spuldaro F, Paris Fd, Barth AL, et al. Quantitative detection of BK virus in kidney transplant recipients: a prospective validation study. *Brazilian Journal of Nephrology*. 2018;40:59-65.
243. Hassan S, Mittal C, Amer S, Khalid F, Patel A, Delbusto R, et al. Currently recommended BK virus (BKV) plasma viral load cutoff of $\geq 4 \log_{10}/\text{mL}$ underestimates the diagnosis of BKV-associated nephropathy: a single transplant center experience. *Transplant Infectious Disease*. 2014;16(1):55-60.
244. Sueur C, Solis M, Meddeb M, Soulier E, Domingo-Calap P, Lepiller Q, et al. Toward Standardization of BK Virus Monitoring: Evaluation of the BK Virus R-gene Kit for Quantification of BK Viral Load in Urine, Whole-Blood, and Plasma Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(12):4298-304.