

İmmünsüpre Hastalarda Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) ile BKV ve JCV DNA Pozitifliğinin Araştırılması[§]

Meryem ÇOLAK*, Aylin ALTAY*, Yasemin ERTEN**, Zübeyde Nur ÖZKURT***, Seçil ÖZKAN****, Ahmet PINAR*****, Güleendam BOZDAYI*

* Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nefroloji Bilim Dalı

*** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı

**** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı

***** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: BK virüs (BKV) ve JC virüs (JCV) DNA pozitifliğinin risk grubunda olan hastalarda gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR) ile retrospektif olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 2014 Mart-2015 Mayıs tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen 129 hastaya ait, toplam 296 örnek dâhil edilmiştir. Klinik örneklerden nükleik asit izolasyonu "MagNA-Pure Compact Nucleic Acid Isolation" (Roche, Almanya) kiti kullanılarak yapılmıştır. Viral DNA amplifikasyonu JCV ve BKV primer dizilerini içeren amplifikasyon karışımı "LightMix® BK/JC Polyomavirus Detection" (TIB-Molbiol GmbH, Almanya) kiti ile LightCycler® 2.0 (Roche, Almanya) cihazında yapılmıştır.

Bulgular: Çalışılan örneklerde %35.4 (105/296) BKV ve JCV DNA pozitifliği tespit edilmiştir. İdrar örneklerinin %56.5 (26/46)'inde BKV, %10.8 (5/46)'inde JCV DNA varlığı saptanmıştır. Kan örneklerinde %29.2 (73/250) BKV, %3.2 (8/250) JCV, %2.4 (6/250) hem BKV hem de JCV DNA'sı saptanmıştır. BKV ve JCV pozitiflik oranlarının örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımı, kemik iliği transplantasyon ünitesi %59.6 ve %13.4, çocuk nefroloji %32.4 ve %1.2, erişkin nefroloji %16.8 ve %2.9'dur. Erişkin ve çocuk hematoloji servislerinden gelen örneklerde sırasıyla %78.5 (11/14) ve %57.1 (8/14) BKV pozitifliği, çocuk hematolojide bir hastada BKV ve JCV pozitifliği tespit edilmiştir. Erişkin hematoloji servisinden gelen örneklerde JCV pozitifliği bulunmamıştır. Çalışılan örneklerin %25.2 (25/99)'ünde BKV DNA $\geq 10^4$ kopya/ml olarak tespit edilmiş olup, bu örneklerin %80 (20/25)'inin idrar olduğu görülmüştür.

Sonuç: Böbrek transplant hastalarında BKV riskinin artması nedeniyle BKV'ün gerçek zamanlı PZR ile izlenmesi oldukça önemlidir. Yapılan birçok çalışmada, BKV yükü böbrek transplantasyonu sonrası greft fonksiyon bozukluğu ve organ reddi ile ilişkili bulunmuştur. Gerçek zamanlı PZR ile BKV nefropatisinin düzenli olarak takibi ve kantitasyon verilmesi sayesinde, transplantasyon sonrası organ kayıpları belirgin oranda azalacaktır.

Anahtar kelimeler: BK-JC virüs, immünsüpresif hasta, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

SUMMARY

Investigation of BK and JC Virus DNA Positivities by Real-Time Polymerase Chain Reaction in Immunosuppressive Patients

Aim: This study was aimed to investigate the BK virus (BKV) and JC virus (JCV) DNA by real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR) in immunosuppressive patients with high risk.

Materials and Methods: A total of 296 samples obtained from 129 patients hospitalized in Gazi University Hospital, Ankara, Turkey between March 2014-May 2015 were included in the study. Viral DNA was extracted by the "MagNA-Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit" (Roche, Germany). By using amplification mix LightMix® BK/JC Polyomavirus Detection Kit (TIB-Molbiol, Germany) that included primers targeting JCV and BKV, nucleic acids were amplified with LightCycler® 2.0 (Roche, Germany).

Result: BKV-JCV positivity rate was found as 35.4% (105/296). In urine samples the rate of positivity was 56.5% (26/46) for BKV and 10.8% (5/46) for JCV. In blood samples the rate of positivity were 29.2% (73/250) for BKV, 3.2% (8/250) for JCV. The distribution of the units with BKV-JCV positive patients, respectively, were as follows: 59.6%-13.4% from the bone marrow transplantation unit, 32.4%-1.2% from paediatric nephrology, 16.8%-2.9% from nephrology. BKV positivity rate was 78.5% (11/14) in adult haematology and 57.1% (8/14) in paediatric haematology. One patient from paediatric haematology revealed both BKV and JCV positivity. There were no JCV positivity in patients followed at the adult haematology unit. In 25.2% (25/99) of the samples, BKV-DNA was detected $\geq 10^4$ copies/ml and 80% (20/25) of those samples were urine.

Conclusion: Monitorization of BKV by Real-Time PCR in kidney transplant patients is of crucial importance since high quantities of BKV is associated with graft dysfunction and organ rejection following transplantation. Follow-up of BKV nephropathy through BKV quantitation by real-time PCR, may help to decrease the detrimental effects on transplant outcome.

Key words: BK-JC virus, immunosuppressive patient, real-time polymerase chain reaction

Alındığı tarih: 13.09.2015

Kabul tarihi: 23.10.2015

Yazışma adresleri: Güleendam Bozdayı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Beşevler, Ankara **Tel:** (0312) 202 54 76 **e-posta:** gbozdayi@hotmail.com

[§] Bu araştırma, 9-12 Eylül 2015 tarihlerinde Edinburgh, İngiltere'de düzenlenen 18th Annual Meeting of European Society for Clinical Virology Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Polyomavirusler; sık rastlanılan, küçük (40-45 nm), zarfsız, ikozahedral simetrik, çift iplikli DNA virüsleridir. BK ve JC virüs polyomavirus ailesi içinde yer alan virüslerdir. BKV ilk olarak Gardner ve ark.⁽¹⁾ tarafından 1971 yılında böbrek transplantasyonu yapılmış bir hastanın idrarından, JCV yine 1971 yılında Padgett ve Walker⁽²⁾ tarafından progresif multifokal lökoensefalopati (PML) gelişmiş Hodgkin's lenfoma hastasının beyin dokusunun otopsi örneklerinden izole edilmiştir. Tanımlanan bu virüsler izole edildikleri hastaların isimlerinin baş harfleri kullanılarak adlandırılmıştır. BK ve JC virüs DNA'ları yaklaşık %75, aminoasitleri %68 homoloji göstermekte, fakat serolojik olarak çapraz reaksiyona neden olmamaktadırlar.

İnsanlar yaşamlarının ilk 10 yılında bu virüslerden yalnız birisi ve/veya her ikisi ile birden karşılaşmaktadırlar. Polyomavirusler toplumda yaygın olup, antikor pozitifliğinin %70-90 arasında olduğu belirtilmektedir. Ancak bu virüslerin vücuda girişi ile primer enfeksiyonları birbirinden bağımsızdır⁽³⁾.

Akut enfeksiyon genellikle asemptomatik geçirmekte, sonrasında BK virüsler özellikle ürogenital kanal, böbrek epitelyal hücreleri, lenfoid sistem hücreleri ve santral sinir sistemini de içine alan çeşitli dokularda, JC virüs, B lenfositlerinde latent hâle geçmektedir. Sağlıklı insanda yaşam boyu semptomsuz olarak latent kalan BK ve JC virüsün immünsüpresyon durumunda aktif hâle gelerek enfeksiyona neden olduğu düşünülmektedir. Ancak BK virüsün sağlıklı insanların %5-20'sinde immünsüpresyon görülmeden kendiliğinden reaktif olabildiği de bildirilmiştir⁽⁴⁾. Toplumlarda 5-9 yaşlarında BKV seropozitifliğinin %70-90; JCV seropozitifliğinin 25 yaşından sonra %50-72 oranında olduğu

belirtilmektedir⁽⁴⁾.

Ülkemizde, 142 pediatrik hasta renal transplantasyon sonrası gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile düzenli aralıklarla izlenmiş ve %80.3'ünde (114/142) BKV DNA pozitifliği, bu hastaların %59.6'sında (68/114) viremi görüldüğü bildirilmiştir⁽⁵⁾. Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada, farklı yaş gruplarından 1123 sağlıklı kişide BKV seropozitifliği araştırılmış ve 881 kişide %78.5 oranında BKV pozitif bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada, 1-5 yaş grubunda seropozitiflik oranı %65.3 olarak bildirilmiştir⁽⁶⁾. Bu sonuçlar ülkemizde de BK virüsün erken çocukluk döneminde kazanıldığını ve enfeksiyonlarının yaygın olduğunu göstermektedir.

BK virüs enfeksiyonunda semptomsuz virüsten ölümcül nefropatiye kadar değişen tablolar görülmektedir. BKV, genitouriner sistem hücrelerine tropizm gösterdiği için kemik iliği ve solid organ transplantasyonu yapılan hastalarda sıklıkla hemorajik sistit ve üretral darlığa, fark edilmezse nefropati ve allograft kaybına neden olmaktadır. Ayrıca pnömoni, retinit, meningoensefalit ve hepatit etkeni olabildiği tespit edilmiştir. JCV reaktivasyonu ise immün sistemi baskılanmış hastalarda progresif multifokal lökoensefalopati gelişimine yol açmaktadır⁽⁷⁾.

BK ve JC virüs reaktivasyonları, solid organ transplantasyonu, kemik iliği transplantasyonu, kanser, AIDS gibi immünsüpre hastalarda ciddi klinik tablolara neden olabildiği için oldukça önemlidir. Dolayısıyla bu hasta gruplarında enfeksiyonların erken tanısı, immünsüpresyona neden olan ilaç dozunun azaltılması veya alternatif tedavi planlanması ile ağır kliniklerin ve greft kaybının engellenmesi önem göstermektedir.

Ülkemizde 142 hasta ile yapılan bir çalışmada,

gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak BKV nefropatisi tanısı koyulmuş 28 hastanın (28/142, %19.7) immünsüpresyon tedavisi azaltılmış ve hastalara antiviral ilaç kullanımı ile müdahale edilmiştir. Bu hastaların %93'ünde (26/28) tedavi başarılı olmuş ve greft kaybı engellenmiştir⁽⁵⁾. Yapılan çalışma, greft kaybının %50'yi aştığı, BK virüs nefropatisinin henüz anlaşılmadığı ve erken tanı yöntemlerinin yaygın olmadığı dönemler düşünüldüğünde erken tanının ve tedavi stratejilerinin çok önemli olduğunu vurgulamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, retrospektif olarak polyomavirus enfeksiyonu bakımından risk grubunda olan immünsüprese hastalarda BKV ve JCV DNA varlığının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time-PCR) ile araştırılması, klinik ve viral yük ile ilişkilendirilmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada Mart 2014-Mayıs 2015 tarihleri arasında çocuk nefroloji, erişkin nefroloji, kemik iliği transplantasyon ünitesi, çocuk hematoloji ve erişkin hematoloji kliniklerden moleküler mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen 129 hastaya ait toplam 296 örnek gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmıştır.

Çalışma Örneklerinin Toplanması

Çalışmamıza, çocuk nefroloji, erişkin nefroloji, kemik iliği transplantasyon ünitesi çocuk hematoloji ve erişkin hematoloji ünitelerinden; yaşları 6-71 yaş arasında değişen 85 erkek (%65.9) ve 44 kadın (%34.1) olmak üzere toplam 129 hasta dâhil edilmiştir.

Erişkin nefroloji ünitesinden 80 hasta, kemik iliği transplantasyon ünitesinden 21 hasta, çocuk nefroloji ünitesinden 18 hasta, çocuk hematoloji

ünitesinden 5 hasta ve erişkin hematoloji ünitesinden 5 hastaya ait 250 kan 46 idrar olmak üzere toplam 296 klinik örnek ile çalışılmıştır. Kan örnekleri 3000 devirde 5 dakika santrifüj edilip, serum kısmı ayrılarak çalışma zamanına kadar -80°C'de korunmuştur. İdrar örnekleri ise direkt ependorf tüpe alınarak çalışma zamanına kadar -80°C'de saklanmıştır.

Nükleik Asit İzolasyonu

Klinik örneklerden nükleik asit izolasyonu "MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kiti" (Roche, Almanya) kullanılarak "MagNA Pure Compact Instrument" (Roche, Almanya) cihazında yapılmıştır. Viral DNA eldesi, üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'lar amplifikasyon yapılına kadar -80°C'de korunmuştur.

Viral DNA Amplifikasyonu

Amplifikasyon, BK virüs için 219 bp'lık kısmını; JC virüs için 174 bp'lık kısmını amplifiye eden küçük "t antijeni primerleri"ni içeren "Light Mix" (TIB Molbiol GmbH, Almanya) ve hibridizasyon problemleri (Roche, Almanya) kullanılarak LightCycler® 2.0 (Roche Applied Science, Almanya) cihazında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile yapılmıştır.

BK virüs analizi için her biri farklı sayıda (10^1 - 10^6 kopya/ml) BKV DNA içeren altı adet standart ve bir adet negatif kontrol kullanılmıştır. Standartların amplifikasyon eğrileri LightCycler® 2.0 (Roche Applied Science, Almanya) cihazının 640 kanalında "absolute quantification" analizi ile değerlendirilmiş ve BK virüs pozitifliği ile sonuçlar sayısal olarak belirlenmiştir.

JC virüs analizi için bir adet pozitif kontrol ve

bir adet negatif kontrol kullanılmıştır. Kullanılan pozitif kontrol, JC virüs pozitifliğinin değerlendirilmesini sağlamaktadır. JC virüs analizi LightCycler® 2.0 (Roche Applied Science, Almanya) cihazının 705 kanalında değerlendirilmiştir. JC virüs sonuçları kalitatif olarak alınmış, sayısal hesaplama yapılmamıştır.

Analizlerde kullanılan negatif kontrollere ait eğrilerde pik görülmemiştir. Negatif sonuçların değerlendirilmesi ve analizlerin doğruluğunun kontrolü LightCycler® 2.0 (Roche Applied Science, Almanya) cihazının 640 kanalında "melting curve" analizi ile 49.5°C'de pik yapan internal kontrol ile sağlanmıştır.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 20.0 bilgisayar programı aracılığıyla yapılmıştır. Mann-Whitney U ve ki-kare testi kullanılarak veriler değerlendirilmiş ve yapılan analizlerde $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmada yaşları 6-71 yaş arasında değişen 85 erkek (%65.9) ve 44 kadını (%34.1) olmak üzere toplam 129 hastaya ait 250 kan 46 idrar olmak üzere toplam 296 klinik örnek araştırılmıştır. Örneklerin gönderildiği kliniklere göre hasta sayıları ve yaş aralıkları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Çalışmaya alınan hastaların primer hastalıkları incelendiğinde, erişkin nefroloji ünitesinden gelen 80 hastanın %97.5'inin (78/80) böbrek nakli olduğu, kemik iliği transplantasyon ünitesinden gelen 20 hastanın lösemi olduğu görülmüştür. Çocuk nefroloji ünitesinden gelen 18 hastanın %88.9'unun (16/18) böbrek nakli olduğu; çocuk hematoloji ünitesinden gelen beş hasta ve erişkin hematoloji ünitesinden gelen dört hastanın lösemi olduğu görülmüş; erişkin hematoloji ünitesinden gelen bir hasta ile kemik iliği transplantasyon ünitesinden gelen bir hastada multipl miyelom tespit

Tablo 1. Kliniklere göre hasta sayıları ve yaş aralıklarının değerlendirilmesi.

Klinik	Erkek hasta sayısı	Median (Min.-Max.)	Mean±SD	Kadını hasta sayısı	Median (Min.-Max.)	Mean±SD	Toplam hasta sayısı	Median (Min.-Max.)	Mean±SD
Erişkin nefroloji	50	40 (19-69)	41±13	30	34 (21-71)	38±13	80	37 (19-71)	40±13
KİT	14	35 (16-59)	35±13	7	35 (8-55)	35±16	21	35 (8-59)	34±14
Çocuk nefroloji	12	16 (12-19)	15±2	6	16 (13-18)	16±2	18	16 (12-19)	16±2
Çocuk hematoloji	4	13 (6-17)	12±5	1	8 (8-8)	8	5	13 (6-17)	11±4
Erişkin hematoloji	5	38 (20-57)	36±15	-	-	-	5	38 (20-57)	36±15
Toplam	85	35 (6-69)	36±16	44	34 (8-71)	33±15	129	34 (6-71)	34±15

KİT: Kemik iliği transplantasyonu; SD: Standart sapma

Tablo 2. Hasta sayısı ve primer hastalıkların kliniklere göre dağılımı.

Klinik	Hasta sayısı	Primer hastalık	Hasta sayısı	Primer hastalık	Toplam
Erişkin nefroloji	78	Böbrek nakli	2	Böbrek yetmezliği	80
KİT	20	Lösemi	1	Multipl miyelom	21
Çocuk nefroloji	16	Böbrek nakli	2	Böbrek yetmezliği	18
Çocuk hematoloji	5	Lösemi	-		5
Erişkin hematoloji	4	Lösemi	1	Multipl miyelom	5
Toplam	123		6		129

KİT: Kemik iliği transplantasyonu

Tablo 3. BK virüs ve JC virüs DNA pozitiflik oranları ve kliniklere göre dağılımı.

Klinik (örnek sayısı)	BKV DNA pozitif		JCV DNA pozitif		BKV+JCV DNA pozitif	
	İdrar n (%)	Kan n (%)	İdrar n (%)	Kan n (%)	İdrar n (%)	Kan n (%)
Erişkin nefroloji (138)	-	23 (16.8)	2 (1.4)	2 (1.4)	-	1 (0.7)
Çocuk nefroloji (78)	1 (1.2)	24 (31.1)	-	1 (1.2)	-	-
KİT ünitesi (52)	13 (25.0)	18 (34.6)	2 (3.8)	5 (9.6)	-	5 (9.6)
Çocuk hematoloji (14)	8 (57.0)	1 (7.1)	1 (7.1)	-	1 (7.1)	-
Erişkin hematoloji (14)	4 (28.5)	7 (50.0)	-	-	-	-
Toplam (296)	26 (8.7)	73 (24.6)	5 (1.6)	8 (2.7)	1 (0.3)	6 (2.0)

KİT: Kemik iliği transplantasyonu

p: >0.05

edilmiştir. Hasta sayısı ve primer hastalıkların kliniklere göre dağılımı Tablo 2’de gösterilmiştir.

Çalışılan klinik örneklerde %35.4 (105/296) polyomavirus DNA pozitifliği (%33.4 BKV; %4.3 JCV; %2.3 BKV+JCV) tespit edilmiştir. Polyomavirus DNA pozitifliği tespit edilen hastaların %91.4 (96/105)’ünü düzenli aralıklarla izlenen takipli hastalar oluşturmuştur.

BK ve JC virüs DNA pozitiflik oranlarının örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımı incelendiğinde, erişkin hematoloji servisinden gelen örneklerde %78.5 (11/14) BKV pozitifliği saptanırken, JCV pozitifliği bulunmamıştır. Kemik iliği transplantasyon ünitesinden gelen örneklerde BK virüs ve JC virüs DNA pozitiflik oranları %59.6 ve %13.4’tür. Çocuk hematoloji servisinden gelen örneklerde %57.1 (8/14) oranında BK virüs pozitifliği, bir hastada da BKV

ve JCV pozitifliği tespit edilmiştir. Çocuk nefroloji servisinden gelen örneklerde BK ve JC virüs DNA pozitiflik oranları %32.4 ve %1.2, erişkin nefrolojiden gelen örneklerde %16.8 ve %2.9’dur (Tablo 3).

BK virüs ve JC virüs DNA pozitiflik oranlarının kliniklere göre dağılımı incelendiğinde istatistiki anlam taşıyan fark görülmemiştir (p>0.05). Ancak idrar ve kan örnekleri BK ve JC virüs pozitifliği açısından incelendiğinde idrar örneklerinde kan örneklerine göre daha yüksek oranda pozitiflik saptanmıştır. İdrar örneklerinin %56.5 (26/46)’inde BKV, %10.8 (5/46)’inde JCV ve %2.2 (1/46)’sinde BKV ve JCV DNA’sı birlikte saptanmıştır. Kan örneklerinde %29.2 (73/250) oranında BKV, %3.2 (8/250) oranında JCV, %2.4 (6/250) oranında hem BKV hem de JCV DNA’sı saptanmıştır. BK virüs ve JC virüs pozitifliğinin idrarda, kandan yüksek oranda tespit edilmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05) (Tablo 4).

Tablo 4. BK virüs ve JC virüs DNA pozitiflik oranlarının klinik örneklere göre dağılımı.

Klinik örnek	BKV DNA Pozitif	p değeri*	JCV DNA Pozitif	p değeri*	BKV+JCV DNA pozitif	p değeri*
İdrar	%56.0	<0.001	%10.8	<0.001	%2.2	>0.05
Kan	%29.2		%3.2		%2.4	

*ki-kare testi

Tablo 5. BK virüs miktarı $\geq 10^4$ kopya/ml tespit edilen örneklerin kliniklere göre dağılımı.

Klinikler	$\geq 10^4$ kopya/ml BKV DNA			%
	İdrar	Kan	Toplam	
Çocuk hematoloji (9)	5	1	6	66.7
Erişkin hematoloji (11)	3	-	3	27.3
KİT ünitesi (31)	7	2	9	29
Erişkin nefroloji (23)	4	1	5	22
Çocuk nefroloji (25)	1	1	2	8
Toplam (99)	20	5	25	25.2

KİT: Kemik iliği transplantasyonu;
 $p > 0.05$

BK virüs DNA pozitifliği saptanan örneklerin %25.2'sinde (25/99) BKV DNA miktarı $\geq 10^4$ kopya/ml olarak tespit edilmiş olup, bu örneklerin %80 (20/25)'inin idrar olduğu görülmüştür ve örneklerin kliniklere göre dağılımı Tablo 5'te gösterilmiştir.

Çalışmada, BK virüs DNA miktarı ($> 10^4$) ile örneklerin gönderildiği klinikler arasındaki ilişki incelendiğinde, çocuk hematoloji ünitesinden gelen örneklerde diğer kliniklere kıyasla daha fazla sayıda $> 10^4$ BKV DNA'sı saptanan örnek olduğu görülmüş, ancak istatistiki anlam taşıyan fark görülmemiştir ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

Polyomavirüslerin toplumda antikor pozitifliği %70-90 arasındadır ve erken çocukluk döneminde bu virüslerle karşılaşmaktadır⁽⁴⁾. Ancak, BK virüs ve JC virüsün vücuda girişi sonrası akut enfeksiyon genellikle asemptomatik geçirilirken, BK virüsler özellikle ürogenital kanal, böbrek epitelyal hücreleri, lenfoid sistem hücreleri ve santral sinir sistemini de içine alan çeşitli dokularda, JC virüs, B lenfositlerinde latent hâle geçmektedir. Sağlıklı insanlarda yaşam boyu semptomsuz olarak latent kalabilen BK ve JC virüs özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde reaktif olup, çok ciddi klinik tablolar meydana getirmektedirler⁽⁷⁾.

Sağlıklı insanların %20'sinde BK virüsü görülebilirken, immünsüpresyon söz konusu olduğunda bu oran %60'a kadar çıkmakta ve immünsüpresyonun yoğunluğuna bağlı olarak bu oranlar daha da artabilmektedir⁽⁷⁾. Us ve ark.⁽⁶⁾ 1123 sağlıklı kişide BKV seropozitifliğini araştırmışlar ve 881 kişide %78.5 oranında BKV pozitifliği tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, BK ve JC virüs reaktivasyonu açısından yüksek risk grubunda olan hastalara ait örneklerde BKV ve JCV DNA pozitifliği gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle araştırılmış, örnekler ve örneklerin kliniklere göre dağılımı belirlenmiştir.

Çalışmaya dâhil edilen immünsüprese hastalara ait klinik örneklerde toplam %35.4 (105/296) BKV ve JCV DNA pozitifliği (%33.4 BKV; %4.3 JCV; %2.3 BKV+JCV) tespit edilmiştir. İmmünsüprese hastalarda BK virüs pozitiflik oranının JC virüse göre daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da BKV DNA pozitifliği (%33.4), JCV DNA pozitifliğine (%4.3) oranla daha yüksek bulunmuştur^(7,8). Saundh ve ark.⁽⁸⁾ böbrek transplantasyonu sonrası izlenen 30 hastada %40 (12/30) BKV, %16 (5/30) JCV tespit etmişlerdir. Rota ve ark.⁽⁹⁾ immün sistemi baskılanmış 115 hastaya ait 268 kan ve idrar örneğinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle toplam BKV ve JCV DNA pozitifliğini %33.2 olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada belirlenen %35.4 oranındaki toplam BK ve JC virüs DNA pozitifliğinin ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür. BKV, genitoüriner sistem hücrelerine tropizm gösterdiği için kemik iliği ve solid organ transplantasyonu yapılan hastalarda hemorajik sistit, üretral darlık, nefropati ve allograft kaybına neden olmakta ve bu hastalarda sıklıkla izole edilmektedir.

Çalışmamızda idrar örneklerinin %56.5 (26/46)'inde BKV, %10.8 (5/46)'inde JCV ve %2.2 (1/46)'sinde BKV ve JCV DNA'sı birlikte saptanmıştır. Kan örneklerinde %29.2 (73/250) BKV, %3.2 (8/250) JCV, %2.4 (6/250) oranında hem BKV hem de JCV DNA'sı saptanmıştır. Çalışmamızda BK ve JC virüs kan örneklerine göre idrarda daha yüksek oranda saptanmış ve BK JC virüsün idrarda daha yüksek oranda tespit edilmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, Mutlu ve ark.⁽⁵⁾ düzenli aralıklarla BKV DNA pozitifliği açısından izlenen 142 pediatrik hastanın %80.3'ünde (114/142) virüri, bu hastaların %59.6 (68/114)'sında da viremi tespit etmişlerdir. Muñoz ve ark.⁽¹⁰⁾ kalp, karaciğer, böbrek nakli olmuş 156 hastayı izlemiş ve idrar örneklerinde %19, kan örneklerinde %6 oranında pozitiflik saptamışlardır. Rota ve ark.⁽⁹⁾ idrar örneklerinin %25.2'sinde (53/206) BKV, %14.5'inde (30/206) JCV DNA varlığı tespit etmiş; kan örneklerinde bir adet %1.6 (1/62) BKV DNA pozitifliği bulunmuş, JCV DNA'sı saptanmamıştır. BK viremisine göre virürinin daha yüksek oranda saptandığı bu çalışmalar ile çalışmamız benzerlik göstermektedir.

Çalışmaya alınan hastalardan erişkin nefroloji ünitesinden gelen 80 hastanın %97.5'inin (78/80); çocuk nefroloji ünitesinden gelen 18 hastanın %88.9'unun (16/18) böbrek nakli olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, böbrek nakli sonrası %10-60 oranında BK virüs enfeksiyonu ortaya çıkmakta, BK virüs enfeksiyonlarının %5'i BKV nefropatisine neden olmaktadır. BKV nefropatisi gelişen hastaların ise %15-50'sinde greft kaybı ortaya çıkmaktadır^(11,12). Özellikle böbrek transplantasyonlu hastada kanda BKV DNA pozitifliği saptanması, BKV ilişkili nefropati gelişimine işaret etmektedir. Saundh ve ark.⁽⁸⁾ böbrek transplantasyonu sonrası izlenen 30 hastanın

12'sinde (%40) BKV, 5'inde (%16) JCV virürisi tespit etmişlerdir. BKV tespit edilen hastalardan birinde nefropati gelişmiştir. Böbrek nakli sonrası gelişen BKV enfeksiyonu ve BKV nefropatisi, transplantasyon sonrası organ reddine neden olabildiği için böbrek nakil hastalarında BK virüs pozitifliğinin ve BKV DNA miktarının düzenli olarak takip edilmesi önem göstermektedir.

Kemik iliği transplantasyon ünitesinden gelen 21 hasta ile çocuk hematoloji ünitesinden beş hasta ve erişkin hematoloji ünitesinden dört hastanın lösemi olduğu görülmüştür. Erişkin hematoloji ünitesinden gelen bir hasta ile kemik iliği transplantasyon ünitesinden gelen bir hastada multipl miyelom tespit edilmiştir. O'Donnell ve ark.'nın⁽¹³⁾ hematopoetik kök hücre nakli yapılmış 124 hastada BK virüs varlığını araştırdıkları çalışmada tüm hastaların %64.8'inde BK virürisi %16.9'unda BK viremi saptanmıştır. Lösemi tanılı hastaların %63.4'ünde (45/71) BK virürisi; %18.3'ünde (13/71) BK viremi; multiple myelom tanısı alan hastaların %33'ünde BKV DNA'sı tespit etmişlerdir. BK virüsün immünsüpresyon durumunda reaktif olması ve özellikle böbrek epitelyal hücreleri, lenfoid sistem hücrelerine tropizmi nedeniyle, böbrek nakli olan hastalardan sonra en fazla kemik iliği transplantasyonlu hastalarda belirlenmektedir. Bu nedenle lösemi, multiple myelom ve kemik iliği transplantasyonu tanılı hastalarda BK virüs tespiti ve viral yükün izlenmesi oldukça önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada, en yüksek pozitiflik oranının %82.6 ile kemik iliği transplantasyon ünitesinden gelen örneklere (43/52) ait olduğu tespit edilmiştir. Rota ve ark.⁽⁹⁾ immün sistemi baskılanmış 115 hastaya ait 268 idrar ve kan örneğinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanarak gerçekleştirdiği çalışmalarda

rında da en yüksek BKV pozitifliği, çalışmamızda olduğu gibi kemik iliği transplantasyon ünitesinden gelen örneklerde görülmüş, örneklerin gönderildiği kliniklere göre BK ve JC virüs DNA pozitiflik oranlarının dağılımında istatistiksel bir fark tespit edilmemiştir. Güneş ve ark.'nın⁽¹⁴⁾ hematopoietik kök hücre transplantasyonu ve yüksek doz kemoterapi uygulanan çocuklarla gerçekleştirdiği çalışmalarında BK virüsünün hastaların %50-80'inde görüldüğü, bu hastaların %64'ünde hemorajik sistit geliştiği bildirilmiştir. Çalışmamızda da BK virüs ve JC virüs DNA pozitiflik oranlarının, örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımı incelendiğinde istatistiksel anlam taşıyan fark görülmemiştir ($p>0.05$), ancak yapılan çalışmalar kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarının BKV açısından takip edilmesinin gerekliliğini göstermektedir.

Çalışmamızda BK virus DNA pozitifliği saptanan örneklerin %25.2'sinde (25/99) BKV DNA miktarı $\geq 10^4$ kopya/ml olarak tespit edilmiş olup, bu örneklerin %80 (20/25)'inin idrar olduğu görülmüştür. BK ve JC virüsün idrarda daha yüksek oranda tespit edilmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş, ancak tespit edilen DNA miktarı ($>10^4$) ile örneklerin gönderildiği klinikler arasındaki istatistiksel anlam taşıyan fark görülmemiştir ($p>0.05$). Virüri düzeyinin yüksek bulunduğu hastaların nefropati gelişimi bakımından risk altında olduğu bilinmektedir. Özellikle böbrek transplantasyonlu hastada, kanda BKV DNA pozitifliği saptanması BKV ilişkili nefropati gelişimine işaret etmektedir. Saundh ve ark.⁽⁸⁾ böbrek transplantasyonu sonrası izlenen 30 hastanın 12'sinde BKV (%40), 5'inde JCV (%16) virüsü görüldüğünü bildirmişlerdir. Aynı çalışmada BKV tespit edilen hastalardan birinde nefropati gelişmiş, diğer BKV ve JCV pozitifliği saptanan kişilerde nefropati görülmemiştir. Bu durumu $\geq 10^7$ kopya/ml

olan BK virüs miktarı ile ilişkilendirmişlerdir⁽⁸⁾. Amerikan Transplantasyon Derneği'nin de verilerine göre idrarda polyomavirus DNA'sının $\geq 10^7$ kopya/ml, plazmada $\geq 10^4$ kopya/ml düzeyinde bulunması durumunda nefropati gelişebilmektedir⁽¹⁵⁾.

Polyomavirüs enfeksiyonlarının asemptomatik seyirli olması ya da spesifik olmayan belirtiler göstermesi nedeniyle klinik ile tanı konulamamaktadır. Ayrıca toplumdaki polyomavirüs seroprevalansının yüksek oluşu ve sağlıklı asemptomatik kişilerin idrarında BKV tespit edilebilmesi, virüsün tek başına tanı koydurucu olmasını olanaksız kılmaktadır. Virüsün tanınması viremiden düşüktür, kanda BKV DNA saptanması BKV nefropatisinin tanısında daha değerlidir. Asemptomatik hastaların idrarı ile, BKV enfeksiyonu geçiren hastaların idrarındaki BKV konsantrasyon ölçümleri kıyaslandığında, BKV enfeksiyonu geçiren hastalarda, asemptomatik hastalara göre daha fazla miktarda viral yük olduğu bildirilmiştir⁽¹⁶⁾.

PZR ile BK virüs DNA tespiti oldukça duyarlı ve özgündür. Kanda BKV PZR testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %88 olarak belirtilmektedir⁽¹⁶⁾. Nickeleit ve ark.⁽¹²⁾ çalışmalarında, hastaların %50'sinde nefropati bulgusu görülmeye başlamadan 16-33 hafta önce, kan örneklerinde PZR ile BK virüs DNA'sı saptadıklarını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar erken tanıya polimeraz zincir reaksiyonunun önemini ortaya koymaktadır.

İmmünsüpre hastalarda gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile BK ve JC virüs enfeksiyonlarının erken tanısı ve viral yükün tespiti sayesinde immünsüpresyona neden olan ilaç dozunun azaltılması veya alternatif tedavi planlanması ile ağır kliniklerin ve greft kaybının engellendiği çalışmalar umut vericidir. Mutlu ve

ark.⁽⁵⁾ gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile yüksek miktarda BK virüs tespit edilen 28 hastanın 8'ine biyopsi ile BKV nefropatisi tanısı koymuş, bu hastaların immünsüpresyon tedavisi azaltılıp antiviral ilaç verilerek %75'inde (6/8) greft kaybı engellenmiştir. Yazısız ve ark.⁽¹⁷⁾ çalışmalarında kemik iliği ve kök hücre nakli olan 12 hastanın tamamında BKV pozitifliği saptamıştır. Hemorajik sistit görülen iki hastadan birinde immünsüpresyon dozu azaltılarak düzelme sağlanmıştır. Yapılan bu çalışmalar, greft kaybının %50'yi aştığı, erken tanı yöntemlerinin yaygın olmadığı dönemler düşünüldüğünde, erken tanı ve buna bağlı olarak tedavi stratejilerinin planlanmasının önemini ortaya koymaktadır.

Transplantasyon sonrası ilk üç ay, immünsüpresyonun en yüksek olduğu dönemdir ve viral enfeksiyonlar en yoğun olarak bu dönemde ortaya çıkmaktadır. BK viremisinin %78-90'ının transplantasyon sonrası ilk üç ayda görülmesi, %50-80'inde ise BK virüsüne rastlanması bu hastaların düzenli ve planlı olarak izlenmesi gerektiğini göstermektedir^(10,18).

BK ve JC virüslerin, seropozitif bir vericinin dokusunun seronegatif bir alıcıya nakli veya transplantasyon sonrası immünsüpresif ilaç kullanımı nedeniyle reaktif olması, immünsüprese hastalarda çok ciddi klinik tablolara yol açmaktadır. Dolayısıyla özellikle böbrek ve kemik iliği transplantı yapan merkezlerde, BK virüs ve JC virüs enfeksiyonlarının erken tanısında uygun yöntemlerin seçilmesi ve hastaların takibinin sağlanması gerekmektedir. Böbrek transplant hastalarında BK virüs riskinin artması nedeniyle BK virüsün gerçek zamanlı PZR ile izlenmesi oldukça önemlidir.

Gerçek zamanlı PZR testi çok hassas olduğu için immünsüprese hastalarda BKV pozitifliği, son

yıllarda kullanılan duyarlı yöntemler sayesinde oldukça yüksek oranda tespit edilmektedir. BK virüs yükü böbrek transplantasyonu sonrası greft fonksiyon bozukluğu ve organ reddi ile ilişkilidir ve gerçek zamanlı PZR ile BKV nefropatisinin düzenli olarak takibi ve kantitasyon verilmesi sayesinde, transplant sonrası organ kayıplarının belirgin oranda azalacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, et al. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1971; I:1253-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91776-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91776-4)
2. Padgett BL, Walker DL, Zu Rhein GM, et al. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1971; i:1257-60. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91777-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91777-6)
3. Ribeiro T, Fleury MJ, Granieri E, et al. Investigation of the prevalence of antibodies against neurotropic polyomaviruses BK, JC and SV40 in sera from patients affected by multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2010; 31:517-21. <http://dx.doi.org/10.1007/s10072-010-0353-y>
4. Tan CS, Koranik IJ, JC, BK and other polyomaviruses: progressive multifocal leucoencephalopathy. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Volume 2. Churchill Livingstone Elsevier. 2010; 145:2051-8. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-443-06839-3.00145-4>
5. Mutlu D, Sağlık İ, Koyun M, et al. Pediatric renal transplant alıcılarında BK virüs enfeksiyonları. *Mikrobiyol Bul* 2013;47(3):461-71. <http://dx.doi.org/10.5578/mb.4957>
6. Us D, Hayran M, Ustacelebi S. New human polyomavirus; BK virus antibody levels in different age groups using the hemagglutination inhibition test. *Mikrobiyol Bul* 1991; 25(2):173-7.
7. Boothpur R, Brennan DC. Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. *J Clin Virol* 2010; 47(4):306-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.12.006>
8. Costa C, Bergallo M, Sidoti F, et al. Polyomaviruses BK- and JC-DNA quantitation in kidney allograft biopsies. *J Clin Virol* 2009; 44(1):20-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2008.08.006>
9. Saundh BK, Tibble S, Baker R, Sasnauskas K, Harris M, Hale A. Different patterns of BK and JC polyomavirus reactivation following renal transplantation. *J Clin Pathol* 2010; 63(8):714-8. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2009.074864>
10. Munoz P, Fogeda M, Bouza E, et al. Prevalence of

- BK virus replication among recipients of solid organ transplants. *Clin Infect Dis* 2005; 41:1720-5.
<http://dx.doi.org/10.1086/498118>
- 11. Viscount HB, Eid AJ, Espy MJ, et al.** Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplant* 2007; 84(3):340-5.
<http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000275205.41078.51>
- 12. Nickeleit V, Klimkait T, Binet IF, et al.** Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med* 2000; 342:1309-15.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200005043421802>
- 13. O'Donnell PH, Swanson K, Josephson MA, et al.** BK virus infection is associated with hematuria and renal impairment in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15(9):1038-48.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.04.016>
- 14. Güneş D, Uysal KM.** Yüksek doz kemoterapi ve hematopöietik kök hücre transplantasyonu uygulanan çocuklarda hemorajik sistit. *UHOD-Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi* 2007; 17(2):118-28.
- 15. Humar A, Michaels M.** American society of transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6(2):262-74
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01207.x>
- 16. Hirsch HH, Vincenti F, Friman S, et al.** Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal transplant recipients. *N Engl J Med* 2002; 347:488-96.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa020439>
- 17. Yazısız H, Uygun V, Mutlu D, Özcan A, Hazar V, Colak D.** Kemik iliği/kök hücre transplantasyonu yapılan çocuklarda BK virüs surveyansı. III. Ulusal Viroloji Kongresi Kitabı, 9-13 Aralık 2007, Uludağ: Türiye. Sayfa 224.
- 18. Loeches B, Valerio M, Perez M, et al.** BK virus in liver transplant recipients: A prospective study. *Transplantation Proceedings* 2009; 41:1033-7.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.02.021>