

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ VİROLOJİ BİLİM DALI

**BK VE JC VİRÜSLERİNİN KLİNİK ÖRNEKLERDEN TESPİTİNDE KÜÇÜK t
GENİ VE BÜYÜK T GENİ BAZLI REAL-TIME PCR METOTLARININ
KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZM. DR. UĞUR TÜZÜNER

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2017

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ VİROLOJİ BİLİM DALI

**BK VE JC VİRÜSLERİNİN KLİNİK ÖRNEKLERDEN TESPİTİNDE KÜÇÜK t
GENİ VE BÜYÜK T GENİ BAZLI REAL-TIME PCR METOTLARININ
KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZM. DR. UĞUR TÜZÜNER

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Danışman: DOÇ. DR. MEHMET ÖZDEMİR

KONYA, 2017

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen anabilim dalı başkanımız saygıdeğer Prof. Dr. Mahmut BAYKAN hocama, yandal asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum, hiçbir konuda yardımını esirgemeyen çok değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e, birçok konuda desteklerini aldığım Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU, Doç. Dr. Metin DOĞAN ve Yrd. Doç. Dr. Fatma ESENKAYA TAŞBENT'e, tez çalışmam sırasında çok büyük bir sabırla ve özveriyle bana yardımcı olan Biyolog Duygu DALKILIÇ'a, bilimsel katkılarıyla Dr. Murat ŞEVİK'e, örnek toplama sırasındaki yardımlarıyla Uzm. Dr. Sinan DEMİRCİOĞLU'na, tezimi 161518010 no'lu proje ile destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü yöneticilerine, paylaşımlarıyla her zaman bana destek olan asistan arkadaşlarıma, tüm mikrobiyoloji laboratuvarı teknisyen ve personeline en içten dileklerle teşekkür ederim.

Uzm. Dr. Uğur TÜZÜNER

Haziran 2017

ÖZET

BK VE JC VİRÜSLERİNİN KLİNİK ÖRNEKLERDEN TESPİTİNDE KÜÇÜK t GENİ VE BÜYÜK T GENİ BAZLI REAL-TIME PCR METOTLARININ KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ UĞUR TÜZÜNER

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

KONYA-2017

Amaç: Çalışmamızın amacı, BK ve JC virüslerinin viral genomunda meydana gelen polimorfizmler de dikkate alınarak, viral genomdaki küçük t ve büyük T gen bölgelerini hedef alan real-time PCR metotları ile etkenlerin tespiti ve elde edilen sonuçların karşılaştırılıp değerlendirilmesidir.

Yöntem: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Moleküler Mikrobiyoloji laboratuvarına, BKV ve JCV şüphesi ile gönderilen 18 yaş üstü 82 hastaya ait idrar örneği çalışmaya alındı. Küçük t geni varlığı ticari bir kit (LightMix, Roche, USA) ile real-time PCR yöntemi kullanılarak araştırıldı. Büyük T genine spesifik nükleik asit varlığı ise Dumoulin ve Hirsch (2011) tarafından tarif edilen primer ve probe kullanılarak, optimize edilen in-house real-time PCR yöntemi ile araştırıldı. PCR sonuçları arasında farklılık bulunan 19 örneğin VP1 bölgesinin sekans analizi, Sanger metodu kullanılarak yapıldı.

Bulgular: Küçük t gen bölgesine spesifik real-time PCR yöntemi ile 9 örnekte BKV pozitifliği, 61 örnekte JCV pozitifliği; büyük T gen bölgesine spesifik real-time PCR yöntemi ile 21 örnekte BKV pozitifliği, 67 örnekte JCV pozitifliği saptandı. İstatiksel olarak iki yöntem arasında; BKV için anlamlı farklılık bulundu, JCV için anlamlı farklılık bulunmadı. Dizi analizi standart yöntem olarak kabul edilerek, tasarladığımız primer ve problemlerle yaptığımız in-house yöntemin; BKV için duyarlılığı %100, özgüllüğü %81.3, pozitif prediktif değeri %33.3, negatif prediktif değeri %100, JCV için duyarlılığı %98.5, özgüllüğü %100, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %93.3 olarak bulundu.

Sonuç: Çalışmamız sonunda elde edilen farklı sonuçlardan, hedef alınan farklı gen bölgesindeki polimorfizmlerin sorumlu olduğu düşünüldü. Yöntemimiz bu duyarlılık ve özgüllük oranlarıyla, rutin teşhiste kullanılmaya aday bir yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: BK Virüs, JC Virüs, Real-time PCR, Polimorfizm

Bu çalışmayı Necmettin Erbakan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü 161518010 no'lu proje ile desteklemiştir.

ABSTRACT

COMPARATIVE EVALUATION OF SMALL t GENE AND LARGE T GENE BASED REAL-TIME PCR METHODS FOR THE DETECTION OF THE BK AND JC VIRUSES IN CLINICAL SAMPLES UĞUR TÜZÜNER

KONYA-2017

Objective: The aim of our study is to compare and evaluate the results of real-time PCR methods targeting the small and large T gene regions of the viral genome, taking into account polymorphisms occurring in the viral genome of BK and JC viruses.

Method: Urinary specimen of 82 patients over 18 years old who were sent with suspicion of BKV and JCV to Molecular Microbiology laboratory of Necmettin Erbakan University, Meram Medical Faculty were taken into study. The small t gene was investigated using a commercial kit (LightMix, Roche, USA) and real-time PCR method. Large T gene-specific nucleic acid probes were investigated using the optimized in house real-time PCR method using primers and probes as described by Dumoulin and Hirsch (2011). Sequence analysis of the VP1 region was also performed using the Sanger method in 19 samples that has different PCR results.

Results: BKV positivity in 9 samples and JCV positivity in 61 samples by real-time PCR method specific to small t gene region; BKV positivity in 21 samples and JCV positivity in 67 samples were determined by real-time PCR method specific to the large T gene region. Statistically, there are two methods; There was a significant difference for BKV, no significant difference for JCV. Sequence analysis is accepted as the standard method and the in-house method we designed with primers and probes; Sensitivity for BKV was 100%, specificity was 81.3%, positive predictive value was 33.3%, negative predictive value was 100%, sensitivity for JCV was 98.5%, specificity was 100%, positive predictive value was 100% and negative predictive value was 93.3%.

Conclusion: It was thought that polymorphisms in the different gene regions targeted were responsible for the different outcomes obtained at the end of our study. With this sensitivity and specificity, our method is a candidate for routine diagnosis.

Key Words: BK Virus, JC Virus, Real-time PCR, Polymorphism

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Tarihçe ve Sınıflandırma.....	3
2.2 Epidemiyoloji.....	6
2.3 Genom Yapısı	8
2.3.1 Reseptörler ve Hücre Girişi.....	10
2.4 Replikasyon	11
2.5 Serotipler ve Subtipler	12
2.6 Yaş ve Seroprevalans.....	13
2.7 Yeni İnsan Polyomavirüsleri	14
2.8 Bulaş Yolları	15
2.9 Patogenez	15
2.10 Klinik Bulgular	16
2.10.1 BKV ile ilişkili Hastalıklar.....	17
2.10.2 JCV ile ilişkili Hastalıklar.....	19
2.11 Tanı	21
2.11.1 Hücre kültürü.....	21
2.11.2 Sitolojik inceleme.....	21
2.11.3 Elektron mikroskopisi	22
2.11.4 İmmunohistokimyasal ve Serolojik testler.....	22
2.11.5 Renal Biyopsi	22
2.11.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)/Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	23
2.12 Korunma ve Tedavi	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1 Çalışma Yerleri ve Çalışma Aralığı.....	26
3.2 Çalışmada Kullanılan Örneklerin Temini.....	26

3.3 Etik Kurul Onayı.....	26
3.4 Proje Desteği.....	26
3.5 İstatiksel Analiz	26
3.6 Kullanılan malzemeler	26
3.7 Örnek toplanması ve saklanması	29
3.8 DNA ekstraksiyonu.....	29
3.9 Örneklerde küçük t gen bölgesine ait viral DNA varlığının real-time PCR ile araştırılması.....	31
3.10 Örneklerde Büyük T gen bölgesine ait viral DNA varlığının real-time PCR ile araştırılması.....	33
4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
7. KAYNAKLAR	58

TABLÖLAR

Tablo 3.1. Master miks bileşenleri.

Tablo 3.2. Real-time PCR çalışma protokolü.

Tablo 3.3. Büyük T gen bölgesine spesifik real-time PCR metotunda kullanılan primer ve probalar.

Tablo 3.4. Real-time PCR çalışma protokolü.

Tablo 4.1. BK ve JC virüslerinde her iki yöntemle saptanan pozitifliklerin cinsiyete göre dağılımı.

Tablo 4.2. Örneklerin gönderildiği bölümler.

Tablo 4.3. BK ve JC virüslerinde her iki yöntemle saptanan pozitifliklerin yaşa göre dağılımı.

Tablo 4.4. Real-time PCR yöntemlerine göre saptanan BK ve JC virüs sonuçları.

Tablo 4.5. VP1 Gen bölgesinin Sanger dizi analizi sonuçları birinci yöntem ile uyumlu 12 örnek.

Tablo 4.6. VP1 Gen bölgesinin Sanger dizi analizi sonuçları ile uyumlu 4 örnek.

Tablo 4.7. VP1 Gen bölgesinin Sanger dizi analizi sonuçları her iki yöntemle de uyumsuz 3 örnek.

Tablo 4.8. Çalıştığımız 82 örneğin her üç yöntemle bulunan sonuçları

Tablo 4.9. Ticari kitin BKV ve JCV için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerleri.

Tablo 4.10. In-house yöntemin BKV ve JCV için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerleri.

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Polyomavirüslerin sınıflandırılması ve filogenetik ilişkileri.

Şekil 2.2. Polyomavirüslerin kapsid yapısı.

Şekil 2.3. SV40 genomu.

Şekil 2.4. Polyomavirüslerin litik replikasyon döngüsü.

Şekil 4.1. Küçük t gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde pozitif BKV örneği ekran görüntüsü (640 kanalında).

Şekil 4.2. Küçük t gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde pozitif JCV örneği ekran görüntüsü (705 kanalında).

Şekil 4.3. Küçük t gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde negatif BKV örneği ekran görüntüsü (640 kanalında).

Şekil 4.4. Küçük t gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde negatif JCV örneği ekran görüntüsü (705 kanalında).

Şekil 4.5. Büyük T gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde pozitif BKV örneği ekran görüntüsü (530 kanalında).

Şekil 4.6. Büyük T gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde pozitif JCV örneği ekran görüntüsü (530 kanalında).

Şekil 4.7. Büyük T gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde negatif BKV örneği ekran görüntüsü (530 kanalında).

Şekil 4.8. Büyük T gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde negatif JCV örneği ekran görüntüsü (530 kanalında).

KISALTMALAR VE SİMGELER

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome/Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu

ART: Antiretroviral terapi

BKPyV/BKV: BK virüs/Human polyomavirus 1

GCN: Granül Hücre Nöropatisi

HAI: Hemaglutinasyon İnhibisyon

HIV: Human Immunodeficiency Virus/İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV)

IgA: İmmunglobulin A

IgG: İmmunglobulin G

IgM: İmmunglobulin M

IRIS: Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome/İmmün Rekonstitüsyon İnflamatuvar Sendrom

JCPyV/JCV: JC virüs/Human polyomavirus 2

KIPyV: KI virüs/Human polyomavirus 3

MCC: Merkel Cell Carcinom/Merkel hücre karsinomu

MCPyV: *Merkel cell polyomavirus*/Human polyomavirus 5

MPyV: *Mouse polyomavirus*/Fare polyomavirüsü

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

MSS: Merkezi sinir sistemi

MuPyV: *Murine K virus*

MWPyV: *Malawi polyomavirus*

MXPpyV: *Mexico polyomavirus*

PCR: Polymerase Chain Reaction/Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PML: Progresif Multifokal Lökoensefalopati

PyV: Polyomavirüs

STLpyV: *Saint Louis polyomavirus*/Human polyomavirus 11

SV40: *Simian vacuolating virus 40*/Simian virüs 40

TS: Trichodysplasia Spinulosa

TSPyV: TS polyomavirüs/Human polyomavirus 8

WUPyV: WU virüs/Human polyomavirus 4



1. GİRİŞ VE AMAÇ

BK (BKPyV) ve JC (JCPyV) virüsleri, çift iplikli DNA virüsleri olup, *Papovaviridae* familyasının, *Polyomavirus* genusunda yer almaktadırlar. İnsan polyomavirüsleri (PyV) endemik olup dünya genelinde sağlıklı bireylerin büyük bir kısmını enfekte etmektedirler. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda bu enfeksiyonların seroprevalansının %35-90 arasında değiştiği görülmektedir. BKV ve JCV, genetik olarak kendi aralarında yaklaşık %75 nükleotid benzerliği gösterirler. BKV immünsüpresif tedavi gören, nakil olmuş hastalardaki hemorajik sistit, üretra stenozu ve diğer üriner sistem hastalıkları ile ilişkilidir. JCV ise Progresif Multifokal Lökensefalopati (PML) ve özellikle Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu (Acquired Immune Deficiency Syndrome; AIDS) hastalarında görülen nörolojik hastalıkların etkeni olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyonun etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için hastalık etkenlerinin erken teşhisi, idrar ve kan numunelerinde PyV viral yük miktarının doğru olarak tespit edilmesi gerekmektedir.

İnsan PyV enfeksiyonlarının tespiti için konvansiyonel serolojik metotlar ve hücre kültüründen virüs izolasyonu yöntemleri kullanılmıştır. Serolojik yöntemlerin duyarlılıklarının düşük olması ve virüs izolasyonunun uzun zaman alması tanıda dezavantaj oluşturmaktadır. Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler sonrası Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) gibi yeni diyagnostik testlerle, BKV ve JCV'leri güvenilir bir şekilde tespit etmek mümkün hale gelmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda, farklı klinik örneklerden insan PyV'lerinin tespitinde PCR yöntemi etkili bir araç olmakla birlikte, BKV ve JCV viral genotiplerinin ayırımında tek güvenilir yöntem olduğu da ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, günümüzde PCR metotlarının yerini daha hassas ve güvenilir real-time PCR yöntemleri almıştır. Real-time PCR metotlarında, en iyi performansı sağlamak için hedef, sekans dizileri korunmuş bölgelerden dikkatle seçilmeli ve düzenli olarak yeni, kullanılabilir sekans dizilerine karşı değerlendirilmelidir. Yapılan farklı çalışmalarda BKV ve JCV'nin hedef sekans dizilerinde, sekans farklılıklarının olduğu ve bu sekans dizisi değişkenliklerinin analiz performansını etkileyebileceği bildirilmiştir.

Bugüne kadar küçük t, büyük T ve VP1 genlerini hedef alan farklı real-time PCR metotları geliştirilmiştir. VP1 gen bölgesinin mutasyona açık olduğu, küçük t ve büyük T gen bölgelerinin virüs varyantları arasında daha homolog bir yapıya sahip olduğu ve PyV'lerin tespiti için daha uygun oldukları bildirilmiştir. Yapılan literatür taramasında şu

ana kadar küçük t ve büyük T gen bölgelerini hedef alan real-time PCR metotlarının, klinik örneklerden BKV ve JCV'lerin tespitinde sahip oldukları performansı karşılaştıran bir çalışma olmadığı görülmektedir. Bu durum, bu çalışmanın özgünlüğünü arttırmaktadır. Çalışma kapsamında klinik örneklerden BKV ve JCV'lerin tespiti; daha önceki çalışmalarda tespit edilen polimorfizmler de dikkate alınarak, küçük t geni ve büyük T geni bazlı real-time PCR metotları kullanılarak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma sonunda elde edeceğimiz sonuçlar, BKV ve JCV'lerin ve farklı varyantlarının rutin teşhisinde güvenilir bir yöntemle tespiti için kaynak olacak, ayrıca bilimsel literatüre katkı sağlayacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

İnsan polyomavirüsleri dünya genelinde insan popülasyonlarının çoğunda bulunur ve immünkompetan bireylerde hastalığa neden olmazlar. Yapılan birçok çalışmada genel erişkin nüfusun büyük çoğunluğu polyomavirüsler için seropozitif bulunmuştur (Weber ve ark 1997, Knowles 2006). JC virüs, immün süpresif bireylerde merkezi sinir sisteminin (MSS) demiyelinizan bir hastalığı olan PML'nin etyolojik ajanıdır (Tan ve Koralnik 2010, Gheuens ve ark 2013). BK virüs ise nefropati, hemorajik sistit ve üreteral stenoza neden olur. PML, AIDS hastalarında görülen fırsatçı bir enfeksiyondur (Berger ve ark 1987). BKV nefropatisi ise, böbrek transplant alıcılarında allograft kaybının önemli bir nedenidir.

2.1 Tarihçe ve Sınıflandırma

Bilinen ilk polyomavirüs olan Murine K virüsü (MuPyV) 1952 yılında Kilham tarafından farelerde tanımlanmıştır (Kilham 1952). 1953 yılında fare polyomavirüsü (*Mouse polyomavirus*; MPyV), Gross tarafından “farelerde tümör oluşturan filtre edilebilir bir ajan” olarak tanımlanmıştır (Gross 1953) 1958 yılında Steward ve Eddy polyomavirüs olarak tanımladıkları bu virüsün kemiricilerde tümör oluşumunu indüklediğini göstermişlerdir (Eddy ve ark 1958, Eddy ve Stewart 1959). Bu virüs, araştırmacıların soyadlarının ilk harflerine istinaden *SE polyomavirus* olarak isimlendirilmiştir. Rhesus tipi maymunları enfekte eden, ilk primat polyomavirüsü 1960 yılında tanımlanmıştır (Sweet ve Hilleman 1960). Hücrelerde vakuol oluşturmaları ve maymunlarda saptanan kırkinci virus olması nedeniyle SV40 (*Simian vacuolating virus 40*) olarak adlandırılmıştır. Aynı sıralar poliovirüs ve adenovirüs aşılarının hazırlanması sırasında kullanılan rhesus maymun böbrek hücrelerinin bir virüs ile kontamine olduğu saptanmış ve bu virüsün onkojenik özelliği olan SV40 olduğunu bildirmiştir (Eddy ve ark 1962). 1955-1963 yılları arasında kullanılan poliovirüs aşılarında SV40'in mevcut olduğunun saptanması sonrasında aşılanan kişiler için kanser gelişimi açısından büyük bir risk oluşturabileceği düşünülmüş, daha sonra yapılan çalışmalarda bu durumu destekleyen hiçbir veri elde edilmemiştir (Engels 2005, Shah KV 2007). Serolojik veriler insanlarda SV40'in bağımsız dolaşımını desteklememektedir. Ancak halen kanser dahil üzere insan hastalıklarında olası rolü tartışmalıdır.

İlk insan polyomavirüsleri olan BKV ve JCV, 1971 yılında tanımlanmışlardır. Böbrek transplantasyonu yapılan nefropatik bir hastanın idrar örneğinden BKV, PML gelişen Hodgkin lenfomalı bir hastanın beyin dokusundan ise JCV izole edilmiştir. Her iki

virüs de izole edildikleri hastaların baş harfleriyle adlandırılmışlardır (Gardner ve ark 1971, Padgett ve ark 1971).

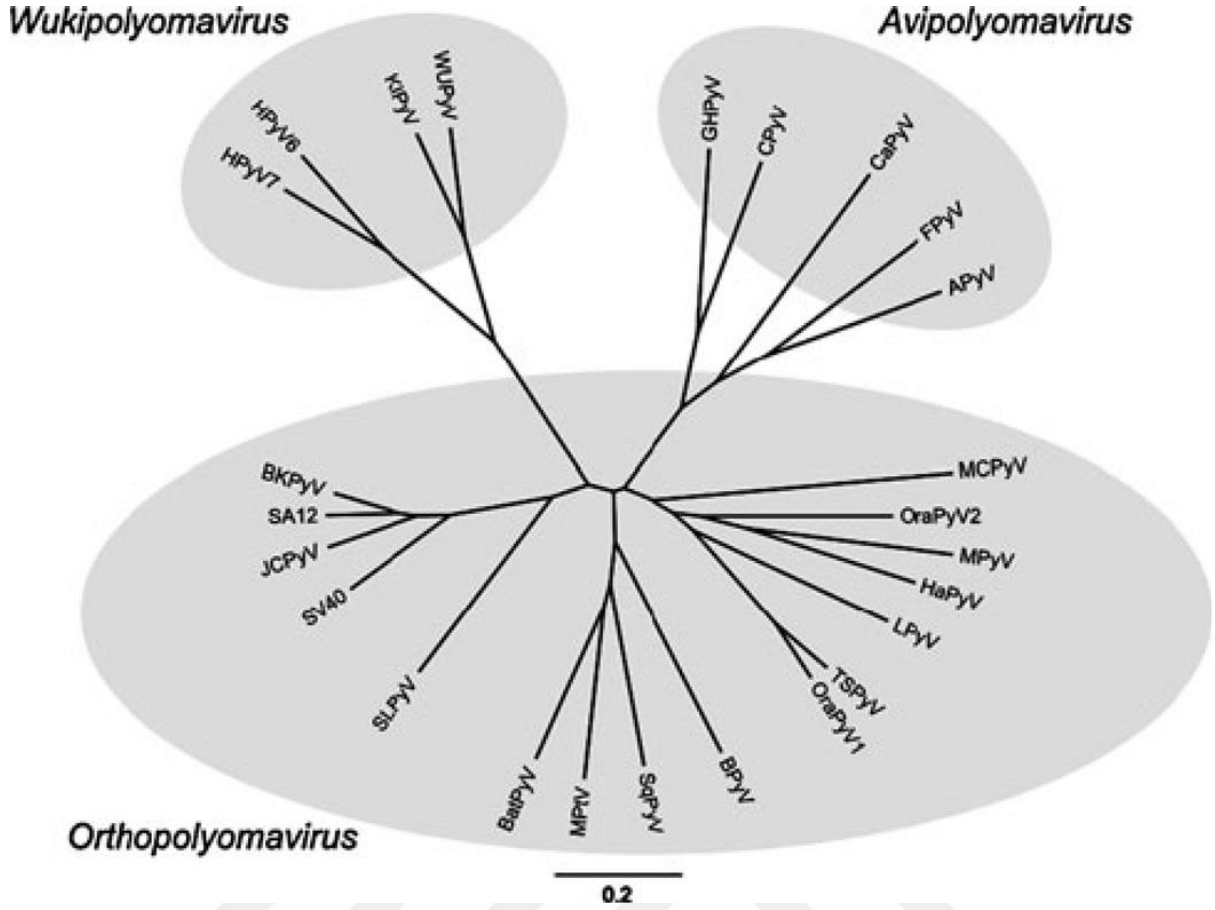
Sonraki yıllar içinde, polyomavirüslerin yapı ve özellikleri ayrıntılı olarak incelenmiş; toplumda yüksek seroprevalansa sahip oldukları ve vücutta latent olarak kaldıkları gösterilmiş; immün sistemi baskılanmış hastalarda oluşturdukları klinik tablolar araştırılmış, hatta bazı insan tümörleriyle ilişkili oldukları ileri sürülmüştür (Knowles 2006, Boothpur ve Brennan 2010, Gjoerup ve Chang 2010).

BKV ve JCV'nin insanlarda oluşturduğu hastalıklar bilinmekte iken, yakın zamanda insanlardan izole edilmiş olan ve '*yeni insan polyomavirüsleri*' olarak da bilinen KI, WU ve Merkel cell virüslerinin etkileri netlik kazanmamıştır. KI (KIPyV/Human polyomavirus 3) ve WU (WUPyV/Human polyomavirus 4), 2007 yılında (Karolinska Institute, Stockholm, Sweden ve Washington University, St. Louis, USA) birbirinden bağımsız olarak, akut solunum yolu enfeksiyonu olan çocukların nazofaringeal aspirat örneklerinden izole edilmişlerdir (Allander ve ark 2007, Gaynor ve ark 2007). Bu viruslar, KI; Karolinska Institute (Stockholm, Sweden) ve WU; Washington University (St. Louis, USA) şeklinde tanımlandıkları kurumların baş harfleri ile isimlendirilmiştir. 2008 yılında, Merkel hücre karsinomu olan bir hastanın tümör dokusunda yeni bir polyomavirüs genomu saptanmış ve *Merkel cell polyomavirus* (MCPyV/Human polyomavirus 5) olarak adlandırılmıştır (Feng ve ark 2008). HPyV6 (Human polyomavirus 6) ve HPyV7 (human polyomavirus 7), 2010 yılında normal cilt florasından izole edilmiştir (Schowalter ve ark 2010). HPyV6 herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilememiş olmasına rağmen HPyV7, akciğer nakilli hastalardaki kaşıntılı döküntü ve viremi ile ilişkilendirilmiştir (Ho ve ark 2015). 2010 yılında Human polyomavirus 8, immün sistemi baskılanmış hastalarda nadir görülen bir deri hastalığı olan *Trichodysplasia Spinulosa* (TS) ile birlikte tespit edildiği için TS polyomavirüs (TSPyV) olarak isimlendirilmiştir (Van der Meijden ve ark 2010). Human polyomavirus 9 (HPyV9) asemptomatik böbrek nakilli hastanın kan ve idrarında 2011 yılında tespit edilmiştir (Scuda ve ark 2011).

2012 yılında yeni insan polyomavirusları tanımlanmıştır. Bunlardan biri, WHIM (**W**art, **H**ypogammaglobulinemia, **I**nfections, **M**yelokathexis) sendromlu bir hastanın anal kondiloma örneklerinden tanımlanan HPyV10 (Human polyomavirus 10) (Buck ve ark 2012) diğeri Malawili sağlıklı bir çocuğun dışkı örneğinden tanımlanan MWPyV (*Malawi polyomavirus*) (Siebrasse ve ark 2012); bir diğeri ise ishali olan Meksikalı bir çocuğun dışkı örneğinden tanımlanan MXPpyV (*Mexico polyomavirus*) virüsleridir (Yu ve ark 2012). 2013 yılında *Saint Louis polyomavirus* (STLPyV/Human polyomavirus 11) olarak

adlandırılan yeni bir polyomavirus, dışkı örneklerinden tespit edilmiştir ve klinik önemi bulunamamıştır (Lim ve ark 2013). Yine 2013 yılında dışkı örneklerinden Human polyomavirus 12 (HPyV12) tespit edilmiştir ve ishal ile ilişkilendirilmiştir (Ehlers ve Wieland 2013). En son olarak da Human polyomavirus 13 (HPyV13) de denilen New Jersey polyomavirüs, 2014 yılında bildirilmiştir. Virüs, sistemik vaskülit, miyozit, ve retinal körlüğü olan pankreas nakilli bir hastadan alınan kas biyopsi örneğinden izole edilmiştir (Mishra ve ark 2014).

Önceden papillomavirüsler ile birlikte *Papovaviridae* ailesinde yer alan polyomavirüsler, 2000 yılından itibaren *Polyomaviridae* ailesi *Polyomavirus* cinsi içinde sınıflandırılmıştır. Ancak ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) tarafından 2011 yılında yapılan yeni sınıflamada *Polyomaviridae* ailesi *Orthopolyomavirus*, *Wukipolyomavirus* ve *Avipolyomavirus* olarak üç cinse ayrılmıştır (Johns ve ark 2011). Bunlardan *Wukipolyomavirus* sadece insan polyomavirüslerini (KIPyV, WUPyV, HPyV6, HPyV7); *Orthopolyomavirus* insan (BKPyV, JCPyV, MCPyV, TSPyV, HPyV9), primat (maymun, orangutan, şempanze, goril), kemirici (fare, hamster) ve diğer memeli (yarasa, sığır vb.) polyomavirüslerini; *Avipolyomavirus* ise kuş polyomavirüslerini içermektedir (Şekil 2.1). Bu cinsler içinde yer alan virüslerin tüm genom nükleotid dizi homolojisi %81-84 arasında olup; ICTV'ye göre dizi benzerliği %81'den az olan suşlar yeni bir virüs olarak kabul edilmektedir (Us 2013).



Şekil 2.1. Polyomavirüslerin sınıflandırılması ve filogenetik ilişkileri. Filogenetik ağaç, tüm genom dizi analizine göre temsili olarak çizilmiştir; tüm türleri içermemektedir (Johne ve ark 2011).

2.2 Epidemiyoloji

BKV ve JCV'lerin, diğer enfeksiyonlara az maruz kalmış coğrafik nüfus da dahil olmak üzere, dünya çapında yaygın bir dağılımı vardır (Brown ve ark 1975). Seropozitiflik oranlarında genellikle yaşla birlikte artış olmasına rağmen, coğrafi dağılım ve virüsün son replikasyonu, virüse bağlı farklılıklar gösterir. BKV çocukluk döneminde özellikle 3-4 yaşlarında kazanılmaktadır (Jiang ve ark 2009, Kean ve ark 2009, Gjoerup ve Chang 2010). Yeni insan polyomavirüsleri için elde edilen veriler de, bunların BKV ve JCV'ye benzer olarak, yüksek seroprevalansa sahip olduklarını göstermiştir. Yapılan çalışmalarda en yüksek seroprevalans WUPyV, TSPyV ve HPyV6 için %60-95, en düşük seroprevalans ise HPyV9 için %15-45 olarak saptanmış; KIPyV, MCPyV ve HPyV7 seropozitifliğinin ortalama %50-87 arasında değiştiği belirtilmiştir (Knowles ve ark 2003, Schowalter ve ark 2010, Touzé ve ark 2010, Chen T ve ark 2011, Van der Meijden ve ark 2011, Babakir-

Mina ve ark 2011, Feltkamp ve ark 2013, Dalianis ve Hirsch 2013, Nicol ve ark 2013).

Her iki virüsün de dikey bulaşma yoluyla kazanılması kanıtlanmıştır (Boldorini ve ark 2011). Ancak insan polyomavirüslerine ait DNA'ların farklı klinik örneklerde bulunduğu gösterilmesi, yayılımın solunum, oral-fekal ve direkt temas gibi çok çeşitli yollarla olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalar BKV ve JCV'nin tükürük, idrar ve dışkıda; KIPyV ve WUPyV'nin çocukların solunum salgılarında ve dışkı örneklerinde; MCPyV'nin çocuk ve erişkinlerin tükürük, nazal sürüntü, solunum yolu örnekleri, lenfoid dokular, idrar ve gastrointestinal sisteminde bulunduğunu göstermiştir (Jiang ve ark 2009, Bialasiewicz ve ark 2009, Vanchiere ve ark 2009, Schowalter ve ark 2010, Babakir-Mina ve ark 2011, Moens ve ark 2011). HPyV6, HPyV7 ve MCPyV, sağlıklı kişilerin deri sürüntü örneklerinde saptanmakta, hatta bu virüslerin normal deri florasında bulunduğu belirtilmektedir (Schowalter ve ark 2010, Foulongne ve ark 2012). Ayrıca, MCPyV DNA'sının insan cildi ile temas eden çevresel örneklerde de %75 gibi yüksek bir oranda bulunduğu rapor edilmiştir (Foulongne ve ark 2011).

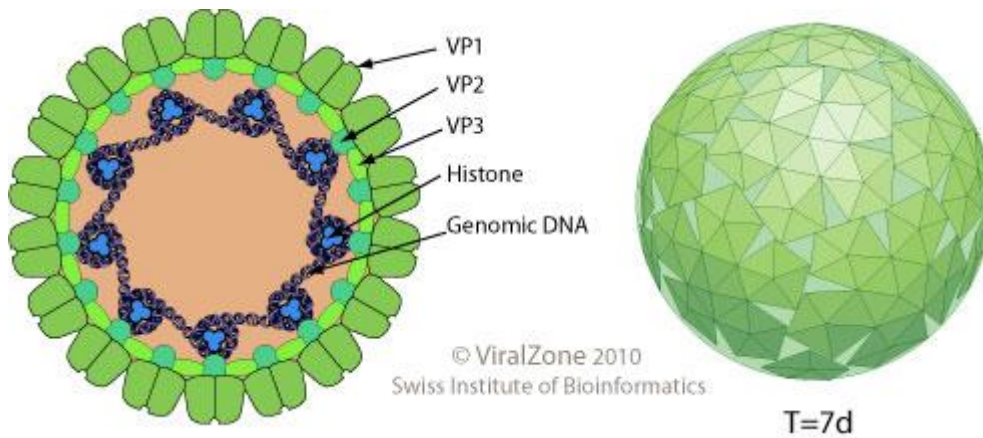
BKV ilişkili hastalıklarla, BK virüsü ve viremisi arasında iyi bir korelasyon varken, JCV ilişkili hastalıklar için durum böyle değildir. Özellikle de PML ve JC virüsü arasında tutarlı bir korelasyon yoktur (Drachenberg ve ark 2007, Lautenschlager ve ark 2014). JC virüsü, konakçının bağışıklık durumundan bağımsız olarak meydana gelmesine rağmen, JC viremisi genellikle sadece immünoşüpresif bireylerde saptanır. Aslında JCV; PML'li ya da PML'li olmayan, sağlıklı ve immünoşüpresif bireylerin %20-30'unun idrarında bulunur (Doerries 2006). Bununla birlikte, JCV viremisi, PML'siz insan immün yetmezlik virüsü (HIV) pozitif olan bireylerin %20-40'ında ve PML'li hastaların %60-80'inde tespit edilmiştir (Koralnik ve ark 1999). Tersine, BKV virüsü asemptomatik immünkompetan bireylerin %0-20'sinde ortaya çıkar, ancak immünoşüpresif bireylerde viral dökülme daha fazladır (%10-60) (Knowles 2006) ve bu durum, immünoşüpresyonun dereceleri ile korelasyon gösterir (Bressollette-Bodin ve ark 2005). Özellikle, HIV pozitif olan hastaların idrarında, BKV viral yükü, azalmış CD4⁺ T hücre sayılarıyla birlikte artar (Knowles ve ark 1999). İmmünkompetan veya immünoşüpresif hastaların periferik kanlarında genellikle BKV bulunmasa da, böbrek nakli yapılan hastaların plazmasında BKV DNA'sının saptanması, BKV kaynaklı nefropati gelişiminin bir göstergesidir (Hirsch ve ark 2002).

İnsan polyomavirüsleri, sıklıkla asemptomatik olarak geçirilen primer enfeksiyondan sonra vücutta latent olarak kalırlar ve viral replikasyon, çok düşük düzeyde de olsa hayat boyu devam eder. BKV ve JCV reaktivasyonları, immün sistemin baskılandığı/bozulduğu durumlarda gerçekleşir ve ciddi klinik hastalıklar ortaya çıkabilir

(Boothpur ve Brennan 2010). Ancak immün sistemin baskılanmasıyla yeni insan polyomavirüslerinin reaktif olmaları arasındaki ilişki henüz netlik kazanmamıştır. Bunun nedeni, MCPyV ve TSPyV hariç yeni insan polyomavirüslerini henüz herhangi bir klinik hastalıkla ilişkilendirilmemiş ve latentlik mekanizmalarının aydınlatılmamış olmasıdır. TSPyV ve MCPyV'nin etyolojik etken olarak kabul edildiği sırasıyla TS ve MCC'nin patogeneğinde ise, immün süpresyonun yanı sıra konağa bağlı diğer faktörlerin (yaş, UV/güneş ışığı, genetik faktörler vb.) de etkin rol oynadığı düşünülmektedir (Feltkamp ve ark 2013, Dalianis ve Hirsch 2013). En yeni virüsler olan HPyV10, MWPyV, MXPyV ve STLPyV ile ilgili olarak ise seroprevalans ve epidemiyolojik veriler henüz yeterli değildir. Bu virüslerin ortak özelliğinin, gastrointestinal sistemde bulunmaları olduğuna dikkat çekilmekte, ancak patogenezi ve klinik hastalık ile ilişkilerinin açıklanabilmesi için zamana ve ileri çalışmalara gereksinim olduğu vurgulanmaktadır (Dalianis ve Hirsch 2013, Lim ve ark 2013).

2.3 Genom Yapısı

PyV virionları 40-45 nm çaplı, küçük, zarfsız, $3-5 \times 10^6$ dalton molekül ağırlığında, 72 pentamerden oluşan ikozahedral kapsid içeren parçacıklardır (Şekil 2.2). Viral genom yaklaşık 5 kilobaz (kb) büyüklüğünde, çembersel, çift iplikli, hiper sarmal DNA'dan oluşur (Feltkamp ve ark 2013).



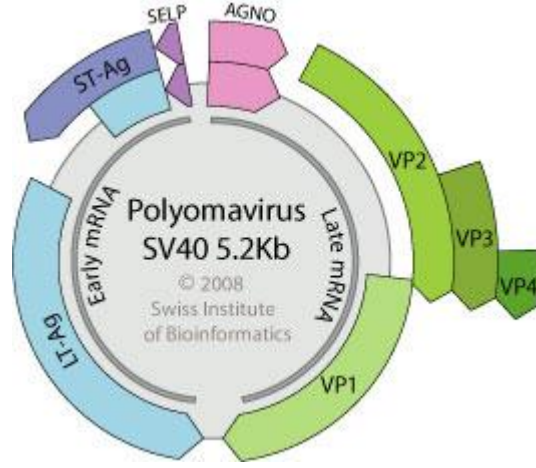
Şekil 2.2. Polyomavirüslerin ikozahedral simetrlili, yaklaşık 45 nm çapında, zarfsız kapsid yapısı (ViralZone 2010).

BKV ve JCV genomları, aşırı derecede korunan kodlama bölgeleri nedeniyle, insan nüfusu göç çalışmalarında kapsamlı bir şekilde kullanılmıştır. JCV ve BKV yaklaşık %70 genom homolojisine sahiptir (Hirsch ve Steiger 2003).

Polyomavirüslerin genomu; üç gen bölgesi içerir (Şekil 2.3).

- **Kodlama yapmayan bölge: Non-coding control region (NCCR);** bu bölge çeşitlilikten ve virülanstan sorumludur. Replikasyon ve transkripsiyonun merkezidir. Ayrıca erken ve geç gen transkripsiyonundan sorumlu kontrol bölgeleri içerir. (Sriaroon ve ark 2010).
- **Erken viral gen bölgesi: The early viral gene region (EVGR);** büyük T (large T; LT) ve küçük T (small T; ST) antijen olarak adlandırılan, yapısal olmayan, düzenleyici proteinleri kodlar. Bu antijenler nükleusta toplanır ve hücre büyümesini stimüle ederler. Bu antijenler replikasyon için önemlidir. Büyük T antijeni Rb ve p53 tümör supresör proteinlerine bağlanarak hücre ölümünü engeller.
- **Geç viral gen bölgesi: The late viral gene region (LVGR);** çekirdekte toplanıp hücre lizisi ile yaklaşık 10.000 ile 100.000 viryonun serbest kaldığı, VP1, VP2, ve VP3 olarak adlandırılan kapsid proteinlerini kodlar (Funk ve ark 2008). BKV ve JCV'nin, geç viral gen bölgesi aynı zamanda birden fazla düzenleyici işleve sahip, 'agnoprotein' denilen küçük sitoplazmik bir proteini kodlar (Khalili K ve ark 2005, Unterstab ve ark 2010). Esas olarak litik enfeksiyon ile ilişkili olan agnoprotein, virion olgunlaşmasında rol oynar. Hücre döngüsünün regülasyonunu bozarak transformasyona katkıda bulunur (Gjoerup ve Chang 2010, Dalianis ve Hirsch 2013).

Küçük ve büyük T antijenleri, onkojenik transformasyon ve PyV replikasyon aktivasyonunda anahtar rolü oynar. Aynı zamanda, viral yük belirleme ve çeşitli teşhis çalışmaları için bir hedef olarak kullanılır. Benzer şekilde kapsid VP1 proteini; PyV serotipleri, hücrel immün tanınma, nötralize edici antikorlar ve teşhis antikor yanıtlarını belirlemede de bilgilendirici olmuştur (Hirsch ve Steiger 2003, Gosert ve ark 2008).



Şekil 2.3. SV40 genomu. Genom diğer polyomavirüslerin prototipidir; erken, geç ve kodlama yapmayan bölgeleri içerir (ViralZone 2010).

Viral kapsid proteinleri (VP1, VP2, VP3 ve VP4), geç gen bölgesi tarafından kodlanan bir primer transkriptin alternatif kesimi yoluyla oluşmaktadır. Kapsidin majör komponenti VP1 olup, beş adet VP1 molekülünün VP2 ya da VP3 ile birleşmesiyle kapsomer; 72 adet VP1 pentamerinin hücre çekirdeğinde kendiliğinden bir araya gelmesiyle de viral kapsid oluşur (Feltkamp ve ark 2013). Bütün yeni insan polyomavirüslerinde bu üç kapsid proteinini kodlayan dizilerin benzer olduğu ve kapsid oluşumunun aynı mekanizmayla gerçekleştiği düşünülmekte, ancak MCPyV VP3 proteininin fonksiyonel olmadığı belirtilmektedir (Spurgeon ve Lambert 2013).

2.3.1 Reseptörler ve Hücre Girişi

PyV'ler, proteinler ya da lipidler üzerinde yer alabilen, farklı glikozile reseptörler kullanırlar. BKV, reseptör olarak α 2-3-bağlantılı sialik asit ihtiva eden, N-bağlantılı bir glikoprotein kullanır (Dugan ve ark 2006). JCV de hücre girişi için serotonerjik 5-HT2A reseptörünü ve buna ek olarak, bir lineer siyalilleştirilmiş pentasakkarit zincirini kullanır (Elphick ve ark 2004, Elphick ve ark 2004, Neu ve ark 2010). 5-HT2A reseptörü, glial hücreler, astrositler, B lenfositler, trombositler ve böbrek epitel hücreleri üzerinde bulunur. Serotonerjik reseptörlerin farmakolojik blokajı, JCV enfeksiyonunu *in-vitro* kısıtlar (Eash ve ark 2006).

PyV'lerin bağlama ve adsorpsiyon sonrasında endositozla meydana gelen hücre içi alımında, BKV'ler hücre membranı invajinasyonlarını (kaveola), JCV'ler VP1 kapsid proteininin aracılık ettiği, hücre yüzeylerindeki klattrin kaplı çukurları kullanır (Dugan ve ark

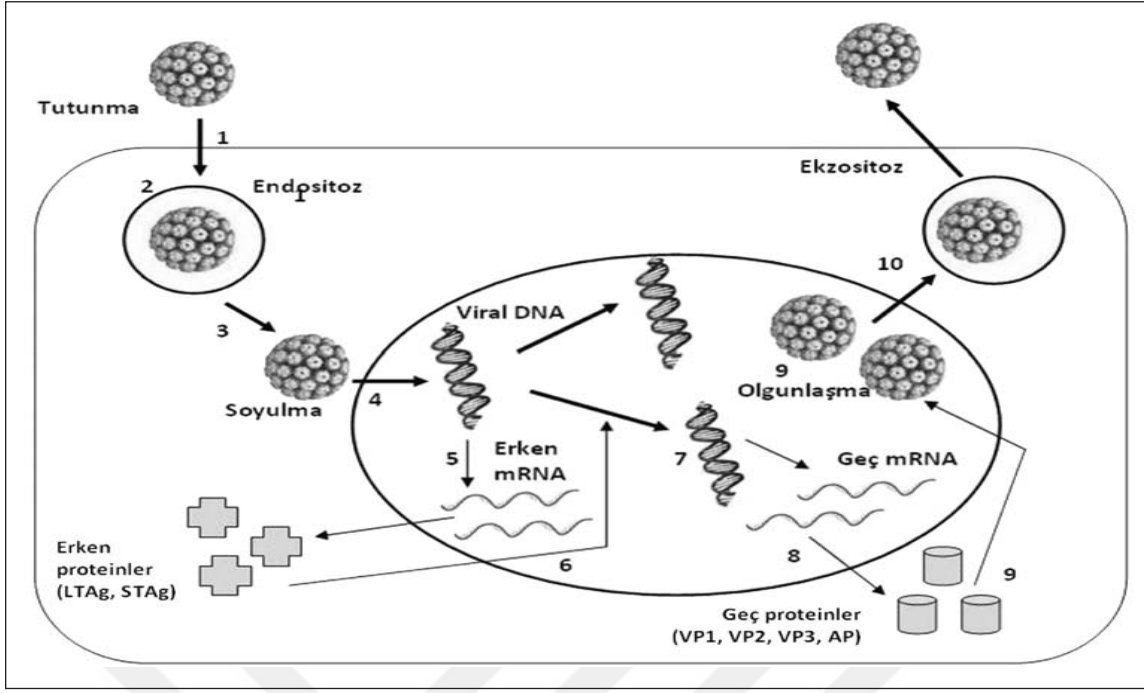
2006, Neu ve ark 2009).

Diğer insan polyomavirüslerinin reseptörleri halen bilinmemektedir.

2.4 Replikasyon

Polyomavirüsler, dar bir konak spektrumuna ve kısıtlı hücre tropizmine sahiptir. Bu nedenle üreyebildikleri hücrelerde litik (üretken) enfeksiyon; üreyemedikleri hücrelerde abortif (üretken olmayan) enfeksiyon ya da transformasyon oluştururlar. Permisif hücreler, hücre ölümü ile sonuçlanan, geç viral haberci ribonükleik asit (mRNA) transkripsiyonuna ve viral replikasyona izin verirler. Bununla birlikte, bazı non-permisif hücrelerde, hücre büyümesini arttıran ve hücrenin onkojenik transformasyonuna neden olabilen, T antijenini içeren, sadece erken genlerin ekspresyonuna izin verilir (Feltkamp ve ark 2013). Polyomavirüslerin replikasyonu ve virion olgunlaşması hücre çekirdeğinde gerçekleşir; hücreden salınım ise ekzositoz yoluyla olur (Şekil 2.4).

Virüs hücreye girdikten sonra, DNA soyulur ve nükleusa gönderilir. Hücre büyümesini arttıran erken genler, büyük T ve küçük t antijenlerini kodlarlar. Viral replikasyon, büyüyen hücre tarafından sunulan transkripsiyon ve DNA replikasyon mekanizmalarına ihtiyaç duyar. SV40, BKV ve JCV'lerin büyük T antijenleri birçok işleve sahiptir. Örneğin, SV40'ın büyük T antijeni, DNA'ya bağlanır ve viral DNA replikasyonu yanında erken ve geç gen transkripsiyonunu kontrol eder. Buna ek olarak, T antijeni, hücre büyümesini arttırma ile sonuçlanan, iki önemli hücresel büyüme baskılayıcı protein olan p53 ve p105RB'ye bağlanır ve inaktive eder.



Şekil 2.4. Polyomavirüslerin litik replikasyon döngüsü (Us 2013).

Virüs, VP1 kapsid proteini ile hücre reseptörlerine tutunur. Endositoz ile hücreye penetre olur. Endozom içinde endoplazmik retikuluma taşınır ve burada endozom füzyonu gerçekleşir. Kapsidin çekirdek membranında soyulması ile viral DNA çekirdeğe girer. Viral DNA'dan önce erken mRNA transkripsiyonu olur. Erken mRNA'lar sitoplazmaya geçerek erken proteinlerin sentezini gerçekleştirir. Erken proteinler çekirdeğe dönerek DNA replikasyonunu sağlar. Viral replikasyonun ilerlemesiyle geç bölge genleri eksprese edilir ve bunların ürünleri olan kapsid proteinleri, translasyondan sonra çekirdeğe geri taşınarak replike olmuş viral DNA'larla bir araya gelirler. Genomun paketlenmesi ve virion oluşumu çekirdekte gerçekleşir. Olgun virüs partikülleri çekirdekten çıkarak veziküller içinde taşınır ve hücre membranından ekzositoz ile salınırlar (Us 2013).

2.5 Serotipler ve Subtipler

BKV - Majör kapsid proteininin (VP1) farklılıklarına dayalı olarak en az dört ana serotip tespit edilmiştir, ancak genotipleme kullanılarak ek alt tipler ve alt gruplar ayırt edilebilir. BKV ve JCV alt tipleri insan nüfusunun farklı coğrafik risk ve göç yollarını yansıtabilir (Zhong ve ark 2009, Yogo ve ark 2009). BKV tip I en sık tespit edilen, dünya genelinde yaygın olarak görülen alt tiptir, dört alt gruba (Ia, Ib1, Ib2 ve Ic) ayrılmaktadır. Alt tip I'in alt grubu (Ib2) öncelikle Avrupa ve Amerikan nüfusunda tespit edilmiştir oysa ki alt grup

İc Asya toplumlarında egemendir (Egeli ve ark 2009). BKV subtip IV, insan popülasyonları arasında yakın ilişkiye sahip olan 6 alt gruba (IVa1, IVa2, IVb1, IVb2, IVc1 ve IVc2) ayrılmaktadır. Alt tip IV izolatları arasında alt grup IVc2 Amerikalılar ve Avrupalılar arasında daha yaygındır, oysa ki Asya popülasyonlarında diğer alt gruplar daha yaygındır (Randhawa ve ark 2002).

JCV - JCV'nin başlıca tek serotipi vardır, ancak 12 alt tipi belirli coğrafi bölgelerde bulunmuştur. Genotipler dizilerde, yaklaşık %1-3 oranında farklılıklar ve kendine özgü coğrafi üstünlükler gösterebilir. JCV tip 1 ABD'de, tip 4 ABD ve Avrupa'da, tip 2 Asya'da, tip 3 ve 6 Afrika'da bulunur (Cubitt 2006). 65 JCV DNA dizisinin, tam viral genom analizi kullanılarak, A, B ve C olarak adlandırılan üç üst küme tespit edilmiştir (Sugimoto ve ark 2002).

- **Tip A**, ağırlıklı olarak Avrupa ve Akdeniz suşlarında bulunur
- **Tip B**, küçük bir Avrupa alt tipi (B1-c), yedi Asya alt tipleri (B1-a, -b, -d, B2, MY, CY, ve SC), ve büyük Afrika alt tipinden (Af2) meydana gelir
- **Tip C** Batı Afrika kaynaklıdır (Af1)

2.6 Yaş ve Seroprevalans

Seroprevalans çalışmaları, polyomavirüs enfeksiyonlarının tipik zamanlamasını tanımlamakta bilim adamlarına yardımcı olmuştur. BKV antikorlarının seroprevalansı 2-4 yaş arasındaki çocukluk çağında büyük oranda artar (<%20'den >%90'a kadar). Oranlar erişkinlikte sabitlenir (Shah ve ark 1973, Knowles ve ark 2003, Egeli ve ark 2009). JCV'e spesifik antikorlar 10 yaş civarında artma eğilimindedir ve daha sonra yetişkinlik döneminde de yaş ilerledikçe artar (%50-70) (Knowles 2006).

Merkel hücreli polyomavirüs (MCPyV) erken çocukluk döneminde, 1-4 yaşlarında %9'lardan, 4-13 yaşlarında %35'lere artma eğilimindedir (Chen ve ark 2011). Yetişkinlik döneminde, seropozitiflik oranları %50-90 civarındadır (Tolstov ve ark 2009).

Kuzey Amerika'da, 21-70 yaş grubundaki 1501 sağlıklı kan bağışçısında yapılan bir çalışmada seroprevalans; KI polyomavirüs için %55, WU polyomavirüs için %69 olarak bulunmuştur (Kean ve ark 2009). Aynı çalışmada 21 yaş altındaki kişilerde seroprevalans KIV için %56, WuV için %54'tür.

2.7 Yeni İnsan Polyomavirüsleri

Yeni insan poliomavirüsleri için seroprevalanslar %25 ile %90 arasında değişmektedir (Nguyen ve ark 2009, Schowalter ve ark 2010, Trusch ve ark 2012). KIPyV ve WUPyV ilk önce solunum yolu örneklerinden izole edilmiştir. Sonradan, çocukların solunum sekresyonlarındaki moleküler kanıtlar Avustralya'da KIPyV için %2.5 (Bialasiewicz ve ark 2007) ve Güney Kore'de WUPyV için %7 (Han ve ark 2007) gibi insidans oranlarıyla her iki virüs için de dünya çapında bir dağılım olduğunu göstermiştir. Birleşik Krallık'taki nazofaringeal aspiratları inceleyen bir çalışma, KIPyV'nin bimodal yaş dağılımı gösterdiğini ve WUPyV'ü 15 yaşından küçük hastalardan alınan örneklerde saptandığını belirtmiştir (Abedi ve ark 2008). Hem KIPyV hem de WUPyV'ün, BKV ve JCV ile önemli genomik ve protein benzerlikleri vardır. Bu virüslerin DNA'sı, solunum yolu hastalıklarına sahip hastaların solunum yollarında ikna edici şekilde mevcut olmakla birlikte henüz olgun viral partiküllerin izolasyonu bildirilmemiştir. Ayrıca, solunum yolu steril bir alan olmadığı için, insanlarda patojen olan virüslerin yanı sıra, çevrede bulunan virüsler tespit edilebilir. Benzer şekilde, HPyV6, HPyV7, MWPyV ve STLPyV, aynı zamanda cilt, dışkı ve siğiller gibi steril olmayan bölgelerden de izole edilmiştir. Son olarak, HPyV9'un normal olarak steril kanda saptanması, bu virüsü olası bir insan patojeni olmaktan ayırmıştır.

2008 yılında keşfedilen Merkel hücre polyomavirüsü (MCPyV) de 2010 yılında keşfedilen trikodisplazi spinulosa ile ilişkili poliomavirüs (TSPyV) de, insan cilt hastalıklarıyla ilişkili virüslerdir. MCPyV esas olarak, immünsüpresif hastaları etkileyen, agresif ve ölümcül nöroektodermal bir tümör olan Merkel hücre karsinoması bulunan dokuların %80'inde tespit edilebilir (Feng ve ark 2008). Moleküler çalışmalar, MCPyV'nin diğer insan polyomavirüsleriyle benzer bir genomu paylaştığını ve MCPyV'nin tümör genomuna entegrasyonunun, muhtemelen tümör hücrelerinin klonal genişlemesi öncesinde gerçekleştiğini göstermektedir. MCPyV, Afrika yeşil maymun lenfotropik polyomavirüsüne çok benzemektedir. TSPyV viral parçacıkları, immün süpresif hastaları etkileyen, seyrek görülen bir cilt hastalığı olan trikodisplazi spinulosa'lı bir kalp nakli hastasından alınan bir saç folikülü üzerinde elektron mikroskobu ile tespit edilmiştir (Van der Meijden ve ark 2010).

İlginç olarak, JCV ve BKV'den farklı olarak, bu yeni insan polyomavirüsleri agnoproteini kodlayan bir gen içermezler. Bununla birlikte, bu proteinin hem

polyomavirüslerin hem de konakçı hücrelerin önemli düzenleyici işlevlerine sahip olduğu görülmektedir. Bu polyomavirüslerde agnoprotein delesyonunun önemini belirleme çalışmaları devam etmektedir (Tan 2015).

2.8 Bulaş Yolları

Önemli araştırmalara rağmen, PyV'lerin herhangi biri için bulaş yolları açıkça tespit edilememiştir. Ağızdan ve/veya solunum yoluyla bulaş, BKV, JCV, KIPyV ve WUPyV içingeçerli olduğu düşünülmüştür. Oysa ki doğrudan cilt teması MCPyV, insan polyomavirüs 6, insan polyomavirüs 7 ve TS polyomavirüs için öne sürülmüştür (Wieland ve ark 2009). Çocuklarda ve erişkinlerde yapılan çalışmalar bazı polyomavirüslerin dışkı örnekleri (Vanchiere ve ark 2009) ve kent kanalizasyonlarında (Bofill-Mas ve ark 2000) sıklıkla mevcut olduğu gösterilmiştir; bu bulgular fekal-oral bulaş olabileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak, BKV, JCV, WUPyV ve MCPyV tonsil dokusunda tespit edilmiştir, bu da oral veya solunum yoluyla bulaşın mümkün olduğunu göstermektedir (Goudsmit ve ark 1982).

Aile içinde ebeveynlerden çocuklara JCV bulaşı için deliller vardır, ancak enfeksiyonların yaklaşık yarısının ailelerin dışında meydana geldiği görülmektedir (Kitamura ve ark 1994, Kunitake ve ark 1995). BKV veya JCV'nin prenatal ve perinatal bulaş olasılığı, primer enfeksiyon sonrasında viremi hipotezi açısından da ele alınmıştır. Bu durum yenidoğanlarda, BKV IgM tespit çalışmaları ile desteklenmiştir (Gibson ve ark 1981).

Abort fetüslerin farklı dokularında, BKV genom dizileri, VP1 ve kodlama yapmayan kontrol bölgesi oranları arasında bazı uyumsuzluklar ile tespit edilmiştir (Boldorini ve ark 2010). Ancak günümüzde halen fetüse prenatal polyomavirüs bulaşı ile ilgili kesin kanıtlar bulunmamaktadır.

2.9 Patogenezi

BKV primer enfeksiyonu çocukluk çağında görülür ve asemptomatiktir. Bundan sonra virüs böbrekte latent kalır. Asemptomatik BKV virüsü vakalarının çoğu nefropati veya hemorajik sistit ile ilişkili değildir. Bu nedenle BKV patogenezi, konağın yatkınlığı, hedef organ hasarı ve immünoşüpresyonu da içeren birkaç faktörün sonucudur. Transplantasyondan sonraki ilk dönemde, ciddi terapötik, immünoşüpresif iyileştirme

rejimleri, böbrek hücrelerinde BKV'nin reaktivasyonu için tetikleyici bir faktördür. Bu reaktivasyon, enfeksiyona ve böbrek tübüler epitel hücrelerinin parçalanmasına yol açabilir. Konağın BKV'ye spesifik immün yanıtı, immünosüpresif ilaçlarla sınırlı olmasına rağmen, oluşan hücre lizisi ve bağışıklık hücrelerinin aracılık ettiği nekroz, daha fazla renal disfonksiyona neden olabilir. Böbrek nakli olmuş hastalarda BKV nefropatisi; yaş, cinsiyet, ırk, alıcıların BK serostazı, ABO uyumsuzluğu ve kullanılan immünsüpresyon tipleri gibi risk faktörleri ile ilişkilidir (Manitpisitkul ve ark 2009, Sharif ve ark 2012, Steubl ve ark 2012, Sood ve ark 2013).

Hematopoietik kök hücre transplantasyonu hastalarında, BKV seropozitifliği, yaş, transplant öncesi yüksek anti-BKV IgG seviyeleri ve düşük toplam lenfosit sayısı; BKV yeniden aktivasyonu için artmış risk ile ilişkilendirilmiştir (Wong ve ark 2007, Drew ve ark 2013). Dahası, geç engrafman (verilen lenfohematopoetik hücrelerin konakçıda yerleşmesi) döneminde bağışıklık fonksiyonunun düzelmesi, bağışıklık sisteminin yeniden yapılandırılmasından kaynaklanan inflamasyondan dolayı ek sorunlara neden olabilir ve bu da hemorajik sistit ile sonuçlanır (Leung ve ark 2005).

BKV'nin çoğalması ve hastalık oluşturmaya için immünsüpresyonun derecesinin, önemli bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir. Hatta BKV replikasyonunun, aşırı immünsüpresyonun bir göstergesi olarak düşünülebileceği söylenmiştir (Gralla ve ark 2012). Enfeksiyon sırasında viremi ile ürogenital sisteme giden virüs, tübüler epitel hücrelerinde latent döneme geçer. Genellikle kollektör tüplerin epitel hücrelerini, renal kaliks ve renal pelvisin tübüler epitelini etkiler. Bazal membranda nekroz ve litik destrüksiyon yaparak tübüler sıvının interstisyel alana geçip, burada birikerek interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi yapmasına neden olur (Tan 2010). Primer enfeksiyon sırasında diğer viral enfeksiyonlarda olduğu gibi humoral immün yanıt ortaya çıkar. Akut dönemde IgM ve IgA antikorları oluşmaktadır. Yüksek antikor titreleri virüsün reaktivasyonunu ve idrarla salınımını önleyememektedir. Alıcının ileri yaşta ve yüksek anti-BKV IgG seviyelerine sahip olması transplantasyon sonrası BKV reaktivasyon riskini arttırmaktadır (Wong ve ark 2007).

2.10 Klinik Bulgular

İnsan PyV'leri ile oluşan primer enfeksiyon genellikle asemptomatik veya minimal semptomatik geçer. Primer enfeksiyonu geçiren çocuklarda nadiren ateş ve belirgin olmayan akut üst solunum yolu semptomları veya akut sistit şeklinde görülebilir. İmmün

sistemi normal çocuk ve erişkinlerde primer enfeksiyon sırasında nadiren viremi veya virüri olabilmekle birlikte enfeksiyon sonrası seropozitif kişilerin idrarlarında virüs saptanamamaktadır. Akut enfeksiyon sonrasında JCV ve BKV'nin özellikle böbrekte ve lenfoid sistem hücrelerinde latent olarak kaldığı düşünülmektedir (Major 2009). BKV kısmi veya mutlak hücre bağışıklık yetmezliği sırasında latent enfekte kişilerde yeniden aktif hale gelebilir. Semptomsuz virüriden, şiddetli ya da ölümcül bir hastalığa kadar değişik tablolara neden olabilir (Major 2009). Pnömoni, hepatit, retinit, meningoensefalit, hemorajik sistit, üretral darlık ve nefrit yapabilir (Boothpur ve Brennan 2010). BKV genitoüriner sistem hücrelerine tropizm gösterir. Kemik iliği ve solid organ transplantasyonu yapılanlarda (hemorajik veya hemorajik olmayan) sistit ve üretral darlığa neden olur. Ayrıca böbrek transplantasyonu yapılanlarda erken fark edilmezse polyomavirüs bağlantılı nefropatiye neden olabilir (Major 2009).

BKV virüri ve viremi genellikle transplantasyondan sonra ilk 6 ay içinde görülmekte olup insidansı 1 yıldan sonra azalmaktadır (Koukoulaki ve ark 2009). BKV virürisi sağlıklı bireylerde %20'ye kadar görülebilir. İmmüsupresyon durumunda ise bu oran artabilir (%10-60) (Knowles 2006). Yapılan immüsupresyon yoğunluğu ile bu oranın arttığı görülmüştür (Ahsan ve Shah 2006). Böbrek transplantasyonu yapılan hastaların %10-45'inde, kemik iliği transplantasyonu yapılan hastaların %50'sinde transplantasyondan sonraki ilk 3 ay içinde idrardan BKV izole edilebilmektedir (Us 1999). Hamile kadınların %3'ünde ve kanserli hastaların %10'unda JCV veya BKV virürisi ortaya çıkmaktadır ancak belirli bir klinik bulgu ile ilişkili değildir. Bu durum immun ya da hormonal sistem değişiklikleri sonucu virüsün reaktivasyonu ile açıklanmaktadır. Hamilelik sırasındaki virüs reaktivasyonu sonucu transplasental geçiş ve konjenital enfeksiyon ile ilgili kesin kanıtlar elde edilememiştir (Andrews 1983).

Genel populasyonda JC virürisi, BK virüriden daha yaygınken, immüsuprese grupta BKV virürisi daha yaygındır. Ayrıca bilinmeyen nedenlerle BKV virürinin ortaya çıkması immüsupresyonun yoğunluğu ile doğru orantılı iken, JCV virürinin değildir (Boothpur ve Brennan 2010). BKV viremi ise hem sağlıklı hem de immüsuprese bireylerde genellikle çok nadir saptanır.

2.10.1 BKV ile ilişkili Hastalıklar

2.10.1.1 Nefropati

BKV kaynaklı nefropati, nativ (doğuştan gelen) bir böbrekte nadiren ortaya çıkmasına

rağmen (Limaye ve ark 2005, Barber 2006), böbrek transplant alıcılarında bu durumun prevalans oranı %1 ile %10 arasında değişmektedir (Nickleit ve ark 2000, Hirsch ve ark 2005). Nefropati yaklaşık 24. haftada zirvededir ve tanı, transplantasyondan ortalama 44 hafta sonra konur (Nickleit ve ark 2000). Böbrek nakli yapılan hastalarda, takrolimus ve mikofenolat gibi güçlü immünsüpresif ilaçların varlığı ile BKV kaynaklı nefropati prevalansının artmasına yönelik bir eğilim olduğu görülmüştür (Dharnidharka ve ark 2009). Çoğu vaka organ naklinden sonraki ilk 1 yıl içinde görülür. BKV virürisi ortalama 4 haftada viremiye ve ortalama 12 hafta sonra da nefropatiye dönüştüğü için, nakilden sonra idrarda virüs varlığına aralıklı olarak bakılması önerilmektedir (Hirsch HH ve ark 2002). Transplantasyondan 1 yıl sonra BKV viremi ve virürisi görülme sıklığı azalır ve BKV yeniden aktivasyon riskini azaltır (Koukoulaki ve ark 2009).

2.10.1.2 Üreteral darlık

Böbrek nakli yapılan hastalarda BKV kaynaklı üreteral stenoz insidans hızının %3 olduğu tahmin edilmektedir (Coleman ve ark 1978) ve genel nakil popülasyonunun %0.5 ile %6'sında görülür (Karam ve ark 2006). Üreteral darlık gelişen böbrek transplantasyon hastalarında, transplante edilen böbreğin innervasyonu olmadığı için genelde ağrı ve rahatsızlık hissi olmaz. Bununla birlikte üriner obstrüksiyon ortaya çıktığında buna bağlı kreatinin düzeylerinde yükselme görülür (Tan 2015).

2.10.1.3 Hemorajik sistit

Hemorajik sistit, BKV ile ilişkili en yaygın komplikasyondur ve kemik iliği transplant alıcılarının %10-25'inde görülür (Arthur ve ark 1986). Böbrek üriner sistem hücrelerinin BKV tropizminden dolayı kemik iliği transplantasyonu yapılanların yaklaşık %50'sinde BKV virürisi genellikle transplantasyondan sonra 2 ay içinde görülür. BKV virüri oranı, allojenik ile otolog greft arasında farklı değildir ve hemorajik sistit, üreteral stenoz ve interstisyel nefritin klinik bulgularıyla ilişkilendirilir (Hirsch ve Steiger 2003).

2.10.1.4 Prognoz

BKV kaynaklı nefropati, olguların %1-10'unda irreversibl greft yetmezliği ile ilişkilidir (Monaco ve ark 1998). Minimal inflamatuvar infiltratlar veya fibrozis ile hafif viral sitopatik değişikliklerin histolojik bulguları, allogreft sonuç için daha iyi prognoz ile

korelasyon gösterir. Yapılan çalışmalarda, BKV virüsü ve vireminin düzenli ve erken taramaları, idrarda virüs bulaştırılmış "decoy" hücrelerinin sitolojik tespiti ve daha sonra immüno-supresif ajanlar azaltılması ile nefropati sıklığının azaldığı gösterilmiştir (Hirsch ve ark 2002, Burgos ve ark 2006, Chakera ve ark 2011). BKV kaynaklı nefropatinin kötü sonucu, yüksek BKV serum viral yükü, takrolimus ile immüno-supresyon ve tanı gecikmesi ile bağlantılıdır (Schwarz ve ark 2012).

2.10.2 JCV ile ilişkili Hastalıklar

2.10.2.1 Klasik Progressif Multifokal Lokoensefalopati (PML)

PML'de histopatolojik olarak, beyin beyaz cevherde fokal veya multifokal miyelin kaybına neden olan litik oligodentrosit enfeksiyonu mevcuttur. PML'nin başlangıçtaki semptomları hastadan hastaya değişebilirken, baskın semptomlar koordinasyon zorlukları, yürüyüş dengesizliği, bilişsel işlev bozukluğu, görsel problemler ve ekstremitelerde pareziyi içermektedir. Merkezi sinir sisteminin optik sinirleri ve omurilik genellikle korunur, ancak hemisferik PML'li HIV pozitif olan bir hastanın omuriliğinde PML lezyonlarının postmortem bulguları tesadüfen keşfedilmiştir (Bernal-Cano ve ark 2007). Ayrıca, PML lezyonları genellikle beyaz cevherde bulunurken, genellikle kortikal kökenli olduğu düşünülen nöbetler, PML'li hastaların %18'inde görülebilir ve kortekse hemen komşu demiyelize lezyonların lokalizasyonu ile ilişkilidir (Lima ve ark 2006).

2.10.2.2 PML-İmmün Rekonstitüsyon İnflamatuvar Sendrom (IRIS)

İmmün rekonstitüsyon sendromu, antiretroviral tedavi başladıktan sonraki birkaç hafta içinde bağışıklık sisteminin toparlanması sonucu bazı hastalıklara karşı bağışıklık yanıtının ve dolayısıyla hastalık belirtilerinin artmasıyla karakterize bir sendromdur. İlk olarak antiretroviral tedavi alan AIDS hastalarında, CD4⁺ T lenfosit sayısında artma ve viral yükteki azalmaya rağmen, klinik seyirde kötüleşme, farklı klinik formlarda fırsatçı enfeksiyonların görülmesi olarak tanımlanan İmmün Rekonstitüsyon Sendromu ya da diğer adıyla İmmün Rekonstitüsyon İnflamatuvar Sendromu (IRIS), daha önce teşhis edilmiş veya asemptomatik fırsatçı enfeksiyonlara, henüz tanınmamış antijenlere karşı artmış enflamatuvar yanıt sonucu ortaya çıkar. İnflamatuvar PML, HIV'li hastalarda antiretroviral terapi (ART) ile immün yanıt hızlı bir şekilde onarıldığında sıklıkla tespit edilmiştir. Hastalar genellikle artan bir CD4⁺ hücre sayısına ve azalan plazma HIV viral yüküne

sahiptir. Klasik PML'den farklı olarak, PML-IRIS lezyonlarının %57'sine kadar olan kısmı, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) kontrast artışı gösterebilir (Gheuens ve ark 2013) ve bu da, kan-beyin bariyerinin bozulmasını ve başlangıç semptomlarının kötüleşmesini gösterir. Belirtiler ilk kez kötüleştikten sonra durumlar stabilize olabilir, ancak fatal sonuçlar bildirilmiştir (Du Pasquier ve ark 2003, Vendrely ve ark 2005).

2.10.2.3 JCV Granül Hücre Nöropatisi

Serebellumdaki beyaz maddenin demiyelinizasyonu PML'li hastalarda iyi tanımlanmıştır. Oligodendrositlere ve astrositlere ek olarak, JCV de serebellar granül hücre nöronlarına bulaşabilir ve yok edebilir. Bu nöron enfeksiyonu, ilişkili demiyelinizasyon olmaksızın, serebellar atrofi, yürüme ataksisi ve koordinasyon ile karakterize yeni bir sendroma neden olabilir (Hecht ve ark 2007). PML'den farklı olan bu yeni sendrom, JCV Granül Hücre Nöropatisi (GCN) olarak adlandırılmıştır (Koralnik ve ark 2005). JCV GCN'nin nedeni, VP1 geninin karboksil terminalinde 10 bp'lik bir delesyon barındıran bir JCV varyantı gibi görünmektedir (Dang ve ark 2006). Yakın tarihli histolojik bir araştırma, granül hücre nöron enfeksiyonunun PML'li hastaların yarısında olabileceğini göstermiştir (Wuthrich ve ark 2009). Bu bulgu, çeşitli coğrafi kökenlerden izole edilmiş diğer JCV GCN'de de doğrulanmıştır. VP1 geninin bu bölgesinde meydana gelen diğer mutasyonların tanımlanması GCN enfeksiyonu ile olan ilişkisini güçlendirmiştir (Dang ve ark 2012).

2.10.2.4 JCV Ensefalopatisi

JCV ayrıca hemisferik kortikal piramidal nöronları enfekte edebilir. Klinik tablo hem klasik PML hem de JCV GCN'den farklıdır. Beyin lezyonları başlangıçta MRG'deki gri cevher ile sınırlandırılmıştır ve hastada duyu veya motor işlev bozukluğu gibi fokal nörolojik defisitlerden ziyade küresel bir bilişsel gerileme ve afazi görülür (Wuthrich ve ark 2009).

2.10.2.5 JCV Menenjit

Meningeal semptomları olan hastalarda JCV rutin olarak bakılmamasına rağmen, boyun sertliği ve diplopi gibi tipik menenjit semptomları olan hastaların BOS'unda mevcut tek patojen JCV'yi belgeleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Behzad-Behbahani ve ark 2003, Viallard ve ark 2005). Bu vakaların JCV primer enfeksiyonundan mı yoksa yeniden aktif hale gelmesinden mi kaynaklandığı belirsizdir. JCV PCR, MSS lezyonu olmayan menenjitli hastaların BOS'unda rutin olarak uygulanmadığından, JCV menenjitinin kesin insidansı bilinmemektedir.

2.10.2.6 Prognoz

PML, mortalitesi yüksek bir hastalıktır. ART'nin yaygın kullanımı sonrasında, HIV pozitif olan hastaların 1 yıllık sağkalım oranı % 10'dan 50'ye yükselmiştir (Antinori ve ark 2003). Bir dizi çalışma, daha düşük bir JCV BOS yükü ile başvuran hastalarda (Yiannoutsos ve ark 1999), kan ve BOS'ta saptanabilir. JCV'ye spesifik immün yanıt ve BOS'ta inflamatuvar immün yanıtın gelişimi gibi çeşitli prognostik belirteçleri tanımlamıştır (Katz-Brull ve ark 2004). Bununla birlikte, PML'li hastalarda JCV'ye karşı hücrel immün yanıt saptanmıştır ve güçlü bir yanıt daha iyi prognoz ile ilişkilidir.

2.11 Tanı

Polyomavirüs enfeksiyonlarının genellikle asemptomatik veya spesifik olmayan belirtilerle seyretmesi nedeniyle, klinik tanı konulması mümkün değildir. İmmünsüpresif hastalarda tanı genellikle sitolojik inceleme, biyopsi ve/veya moleküler yöntemlerle konulmaktadır.

2.11.1 Hücre kültürü

Hücre kültürüyle PyV izolasyonu, mümkün olsa da rutin tanıda pratik olmadığı için kullanılmaz. BKV primer tek katmanlı hücre kültürlerinde, insan diploid akciğer fibroblast, insan fetal beyin ve maymun böbrek hücre kültürlerinde üreyerek bu kültürlerdeki hücrelerin yuvarlaklaşıp küçülmesine, çekirdeklerinin büyümesine ve hücrelerin tabakadan koparak kültür sıvısına dökülmesine neden olurlar (Us 1999).

2.11.2 Sitolojik inceleme

BK virüsünün saptanmasında sıkça kullanılan bir yöntem de idrarın sitolojik incelenmesidir. İdrar sedimentinden hazırlanan preparatların Papanicalou, Hemotoksilen-Eozin veya Giemsa boya ile boyanmasıyla enfekte hücreler, normalden büyük çekirdek yapıları ve çekirdek içi buzlu cam görünümü oluşturan tek, geniş, bazofilik inklüzyon cisimciklerinin varlığı ile tanınırlar. Hücrelerin bu görünümüne 'kuş gözü' görünümü denir. Enfekte bu hücreler 'decoy' hücreleri olarak adlandırılır (Us 1999). Enfekte hücre içermeyen idrar örneğinin sitolojik incelemesinin negatif prediktif değeri %99.4, enfekte hücre içeren idrar sitolojisinin pozitif prediktif değeri ise %88 olarak belirlenmiştir. (Us 2008). Bu yöntem, travmatik olmaması ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle özellikle transplantasyon sonrası PyV enfeksiyonları gelişme riskinin takibinde yararlıdır. Ancak,

duyarlılığının düşük olması, polyomavirüs tiplerinin birbirinden ayırt edilememesi ve hücrelerde saptanan inklüzyonların CMV, HSV ve adenovirüs gibi diğer virüslere ait olma olasılığı gibi dezavantajları mevcuttur. Ayrıca hastanın PyV enfeksiyonu açısından ileri incelemeye alınabilmesi için, idrarda enfekte hücre persistansının saptanması gereklidir. Zira bazı durumlarda (akut hücresel atılım, takrolimus nefrotoksitesisi, akut tübüler nekroz) idrarda geçici olarak virüsle enfekte hücreler bulunabilir. Yapılan çalışmalarda, idrarda enfekte hücrelerin persistansı ile BK viremi arasında yakın bir ilişki bulunmuş ve bu hastaların biyopsilerinde PVAN tanısı doğrulanmıştır (Us 2008).

2.11.3 Elektron mikroskopisi

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

2.11.4 İmmunohistokimyasal ve Serolojik testler

PyV antikorlarının saptanmasında en yaygın kullanılan yöntem hemagglütinasyon inhibisyon (HAI) testidir. HAI, daha ziyade kazanılmış bağışıklığın belirlenmesinde ve seroepidemiolojik çalışmalarda önerilmektedir. PyV IgG ve IgM antikorları, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), immünofloresans ve dot-blot gibi daha hızlı ve pratik yöntemlerle araştırılabilir. Ancak serolojik tanı; toplumlarda yüksek seropozitifliğin olması, reaktivasyon sırasında IgM kinetiğinin değişken olması ve reaktivasyonların genellikle asemptomatik seyretmesi gibi nedenlerden dolayı çoğu zaman yetersiz kalmaktadır (Us 2008).

İdrarda direk floresan antikor yöntemi ile antijen saptanması mümkün olmakla birlikte rutin uygulama için pratik değildir. BKV antijenlerinin (VP1 ve agnoprotein) tespitinde poliklonal serumlar denenmiştir. BKV büyük T antijenini tanıyan monoklonal antikorlar böbrek biyopsi örneklerinde virüs tespiti için kullanılmıştır (Major 2009). Polyomavirüs enfeksiyonlarında antikorların saptanmasında kullanılan temel serolojik yöntemler ELISA ve HAI testleridir. Bu yöntemler kazanılmış bağışıklığı belirlemekte ve seroepidemiolojik çalışmalar için önerilmektedir. Ayrıca JCV veya BKV spesifik IgM antikorlarının tespiti için enzim immunoassay testi kullanılabilir (Major 2009).

2.11.5 Renal Biyopsi

İnvaziv bir yöntem olmasına rağmen greft disfonksiyonu veya reddi şüphesi varsa, nefropati tanısı için renal biyopsi yapılmaktadır. Yapılan histolojik incelemede, renal

tübüler epitelyum ve üretra dokusunun enfekte epitel hücrelerinde nukleus içinde bazofilik inklüzyonlar ve yer değiştirmiş kromatin gözlenmesi, tübüler nekroz, atrofi ve fibrozis saptanması önemlidir (Major 2009). Bu sitopatik değişiklikler başlangıçta medüller ve distal tübüle lokalizedir ve proksimal tübüllere doğru ilerler. Bununla birlikte, böbrek biyopsisi, hastalığın fokal doğası yüzünden %30'a kadar yanlış negatif bir oran ile ilişkilidir (Tan 2010).

2.11.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)/Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PCR, kan, idrar ve BOS gibi örneklerde polyomavirüs DNA tespiti için günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. İdrarda BKV tespiti çoğu zaman kandaki viral bulgulardan önce gelir ve iki veya daha fazla ardışık idrar örneğinde saptama olarak tanımlanan sürekli virüri, BKV viremi için %100 duyarlı ve %94 özgül olabilir (Babel ve ark 2009).

Hemorajik sistitli hastaların idrarında PCR ile BKV DNA'nın saptanması duyarlı olmakla birlikte, asemptomatik BK virürisi yaygın olduğu için nonspesifiktir. Bununla birlikte, idrarda hematüri ile birlikte artmış BK virüs yükü tanıya yardımcı olabilir. Kantitatif PCR testleri ile viral yük ne kadar fazla saptanmışsa, BKV nefropatisi gelişme riski o kadar yüksektir (Boothpur ve Brennan 2010).

BKV DNA böbrek transplant alıcılarının plazmasında bulunabilir. Bununla birlikte plazmada BKV DNA saptanması BKV nefropatisi tanısını ekarte etmede, bu tanıyı koymadan daha yararlıdır. Kandaki BKV PCR testinin BKV nefropatisi için negatif prediktif değeri %100'dür, ancak sadece %50 pozitif prediktif değeri vardır (Hirsch ve Steiger 2003). Bununla birlikte, bir çalışmada $>10^4$ kopya/mL plazma BKV viral yükünün, nefropatinin histolojik bulgularını tahmininde %93'lük duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğunu belirtilmiştir (Drachenberg ve ark 2004). Nefropatiden farklı olarak BKV, genellikle hemorajik sistit veya üreteral stenoza hastaların kanlarında görülmez. Bununla birlikte, bir çalışmada KİT (kemik iliği transplantasyonu) hastalarında BKV viremisinin KİT sonrası böbrek yetmezliği gelişimi için bağımsız bir öngösterge olduğu bulunmuştur (O'Donnell ve ark 2009).

Böbrek transplantasyonunun ardından geçici virüri olabildiği gösterildiğinden tek bir pozitif tarama sonucu çok az tanısal değere sahiptir. Düzenli aralıklarla ek taramalar veya 4 hafta içinde periferik kan veya idrardaki viral yük ölçümünün doğrulanması tavsiye edilir (Hirsch ve ark 2005).

PML'li hastalarda BOS'ta PCR ile JCV tayini, alternatif bir tanı yöntemi olarak

daha yaygın kullanılır. Bu hastalar genellikle, pleositoz da dahil olmak üzere, hafifçe yükselmiş protein ve normal glikoz düzeyleri olan, spesifik olmayan bir BOS profiline sahiptir. ART'nin yaygın kullanımından önce BOS'ta PCR ile JCV saptanması %72-92 duyarlılık ve %92-100 özgüllüğe sahipti (Cinque ve ark 1997). Bununla birlikte, ART sırasında PML ile başvuran HIV hastalarında, ART sonrası serumda BOS'un JCV PCR'ın duyarlılığı önemli derecede (%58) düşmüştür, spesifitesi değişmemiştir (Marzocchetti ve ark 2005).

Polyomavirüsler için PCR testinin dizaynı, bunların genom dizilimindeki yüksek düzeydeki benzerlik yüzünden zordur. PCR yönteminde genellikle, farklı polyomavirüsler arasında en fazla değişiklik gösteren bölgeler olan büyük T antijeni ve VP1 genlerindeki bölgeler hedef olarak kullanılmıştır (Major 2009).

2.12 Korunma ve Tedavi

BKV kaynaklı nefropatinin tedavisi, immünosüpresyonun azaltılmasıdır. Sidofovir, leflunomid (Williams ve ark 2005), kinolonlar (Leung ve ark 2005) ve intravenöz immün globulin gibi çok sayıda antiviral ajan, küçük klinik çalışmalarda farklı başarılar göstermiştir (Krisl ve ark 2012). Bununla birlikte, bu çalışmalardaki hastalar eşzamanlı olarak aldıkları immünosüpresif ilaçlarını azaltmıştır. BKV için özgül bir antiviral tedavi mevcut olmadığı için, immünosüpresyonun azaltılması tercih edilen tedavidir ve greft reddi riskindeki artış ile dengelenmelidir. BKV'nin plazmadan temizlenmesi, böbrek dokusu patolojisinin giderildiğinin gösteren bir işarettir. Siprofloksasin gibi florokinolonlar BKV-kodlu DNA girazını inhibe ederek BKV çoğalmasını *in-vitro* inhibe edebilir (Ferrazzi ve ark 1988). Florokinolonlara maruz kalan gruptaki iki küçük retrospektif çalışma, renal transplantasyondan sonra BKV enfeksiyonunun azaldığını göstermiştir (Gabardi ve ark 2010, Wojciechowski 2012).

Hemorajik sistitin tedavisi semptomatiktir. 50.000 hücre/mm³ üzerindeki trombosit düzeylerini ve %25'ten daha yüksek hematokrit değerlerini korumak için sürekli mesane irrigasyonu, analjezi, hiperhidratasyon, zorlu diürez ve transfüzyonu içerir. Birçok vaka bildiriminde ve retrospektif çalışmalarda intravezikal sidofovir hemorajik sistit tedavisinde kullanılmıştır (Bridges ve ark 2006, Eisen ve ark 2009, Ganguly ve ark 2010). Bu madde semptomatik rahatlama sağlayabilir, ancak tedavi ile idrar BKV yükünde kesin bir azalma sağlamaz (Mackey 2012). Hemorajik sistitte intraveziküler sidofovir kullanımının faydalarını netleştirmek için randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır. Retrospektif

bir çalışmada siprofloksasin ile profilaksinin KİT sonrası BKV ilişkili hemorajik sistit insidansını azalttığı görülmüştür (Miller ve ark 2011).

PML için özel bir tedavi mevcut değildir. Bununla birlikte, HIV ile enfekte olan hastalarda, ART'nin başlatılması veya optimizasyonu, 1 yılda PML sağkalım oranının %10'dan %50'ye yükselmesi ile ilişkilendirilmiştir (Antinori ve ark 2003). HIV negatif olan hastalar için, bağışıklık baskılanmasının azaltılması yoluyla bağışıklık durumunun iyileştirilmesi, adaptif bağışıklık sisteminin enfeksiyonu kontrol altına almasına izin verebilir. JCV'ye karşı güçlü bir hücresel bağışıklık, daha iyi bir klinik sonuç ile ilişkili olduğu için, bu bağışıklık tepkisini artırmaya yönelik immünoterapiler PML için bir tedavi seçeneği haline gelebilir (Marzocchetti ve ark 2009). Sitarabin, JCV replikasyonu ve çoğalmasının kontrolünde *in-vitro* bir etkinlik göstermiştir (Hou ve Major 1998). PML ile HIV pozitif olan hastalarla yapılan randomize kontrollü bir klinik araştırmada sitarabinin etkinliği gösterilememiştir (Hall ve ark 1998). Ancak küçük bir retrospektif çalışmada, lösemi/lenfoma tanısı alan PML'li 19 HIV negatif hastanın 7'sinde (%37) sitarabin ile intravenöz tedaviden sonra stabilizasyon görülmüştür (Aksamit 2001). Sidofovir, MPyV ve SV40'a karşı *in-vitro* aktiviteler gösteren güçlü bir antiviral ajan olup, JCV veya BKV'ye karşı henüz kullanılmamıştır. Bununla birlikte, HIV (+) olan ve olmayan hastalarda sidofovir ile farklı merkezlerde yapılan çok sayıda çalışma, hastalık seyrini değiştirmede belirgin bir etki göstermemiştir (Marra ve ark 2002, Osorio ve ark 2002, Antinori ve ark 2003).

Son olarak, *in-vitro* çalışmalar, JCV'nin serotonin reseptörü 5-HT_{2A}, serotonin reseptör blokerleri olan mirtazapin yoluyla hücrelere bulaştığını ortaya çıkardığı için, JCV enfeksiyonunun tutulması için potansiyel bir aday olarak kabul edilmiştir (Elphick ve ark 2004). Son zamanlarda, geniş bir farmakolojik tarama çalışması, antimalarial bir ilaç olan meflokinin hücre kültüründe JCV replikasyonunu inhibe etme kabiliyetine sahip olduğunu ileri sürmüştür. PML tedavisinde meflokinin rolünü inceleyen çok merkezli bu çalışma etkinliğin eksikliği nedeniyle programdan önce sonlandırılmıştır (Clifford ve ark 2013).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Çalışma Yerleri ve Çalışma Aralığı

Çalışmamız, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Laboratuvarında Nisan 2016 - Mart 2017 tarihleri arasında yapılmıştır.

3.2 Çalışmada Kullanılan Örneklerin Temini

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı ve Onkoloji Bilim Dalı kliniklerinden, ayrıca organ nakli polikliniğinden laboratuvarımıza, BKV ve JCV şüphesi ile gönderilen 18 yaş üstü 82 hastaya ait idrar örneği çalışma kapsamına alınmıştır.

3.3 Etik Kurul Onayı

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, İlaç ve Tıbbi Cihaz dışı Araştırmalar Etik Kurulundan 22.01.2016 tarihinde 14567952-050 sayı numarası ve 2016/424 karar sayısı ile etik kurul onayı alınmıştır.

3.4 Proje Desteği

Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 161518010 no'lu proje ile desteklenmiştir.

3.5 İstatiksel Analiz

Küçük t gen ve büyük T gen bölgelerine spesifik real-time PCR analizleri sonucu elde edilen veriler, iki kuyruklu eşleştirilmiş t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca hasta kayıt bilgilerine dayanarak BKV ve JCV enfeksiyonlu hastaların, cinsiyet ve yaş ilişkileri hakkındaki değerlendirmeler, ki kare testi ile yapılmıştır. Bütün istatiksel değerlendirmelerde GraphPad InStat version 3.10 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılmıştır. $p < 0.05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.6 Kullanılan malzemeler

Örneklerinin toplanması ve depolanması aşamasında kullanılanlar;

- 100 cc steril idrar kabı
- 50 cc steril falcon tüp

- 1.5 cc steril eppendorf tüpü
- 1-10, 10-100 ve 100-1000 µl'lik pipet ucu ile uyumlu otomatik pipet
- 1000 µl'lik filtreli pipet ucu
- Santrifuj cihazı
- -20°C derin dondurucu

DNA izolasyonu sırasında kullanılanlar;

- 1000 µl'lik filtreli pipet ucu
- 100 µl'lik filtreli pipet ucu
- 1-10, 10-100 ve 100-1000 µl'lik pipet ucu ile uyumlu otomatik pipet
- 1.5 cc steril eppendorf tüpü
- Eppendorfların ısıtılmasına uygun 72°C sıcaklığa ayarlanabilen kuyucuklu termostat (inkübator)
- Mikro santrifuj cihazı
- Absolut etanol
- Sınıf II biyogüvenlik kabini
- Viral nükleik asit izolasyon kiti (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Version 19, Ref; 11 858 874 001: *Roche Diagnostic*)

Kit içeriği;

- Binding Buffer (bağlayıcı tampon)
- Poly (A)
- Proteinase K (Proteinaz K)
- Inhibitor Removal Buffer (inhibitor uzaklaştırıcı tampon)
- Wash Buffer (yıkama tamponu)
- Elution Buffer (elüsyon tamponu)
- High Pure Filter Tubes (filtreli tüpler)
- Collection Tubes (toplayıcı tüpler)

Her iki Real-time PCR basamağında kullanılanlar;

- 1000 µl'lik filtreli pipet ucu
- 100 µl'lik filtreli pipet ucu
- 10 µl'lik filtreli pipet ucu

- 1-10, 10-100 ve 100-1000 µl'lik pipet ucu ile uyumlu otomatik pipet
- Sınıf II biyogüvenlik kabini
- Pudrasız eldiven
- Real-time PCR Kiti (LightMix® Kit *Polyomaviruses JC and BK*, Ver 130813, TIB MOLBIOL)
- BK JC Primer Prob Real-time PCR Kiti (Macrogen, *Humanizing Genomics, Seoul, South Korea*)
- Light Cycler® 1.5 PCR cihazı (Roche)

- Real-time PCR Kit içeriği (LightMix® Kit *Polyomaviruses JC and BK*, Ver 130813, Roche Diagnostics Ltd. TIB MOLBIOL, GmbH, Berlin, Germany);
 - PCR grade su (nükleaz free)
 - Her biri 32 reaksiyonluk deteksiyon kiti (Liyofilize primer, fast start master hibridizasyon problemleri ve internal kontroller)
 - Kapiller (lightcycler centrifuge adapters) = kılcal cam tüpler
 - -10¹'den -10⁶ kp/ml ye kadar BKV ve JCV DNA içeren 6 adet liyofilize standart
 - 1a (enzim, Taq polimeraz)
 - 1b (buffer, tampon)
 - Magnezyum
 - İşaretleyici molekül (Primer prob miks-PP mix)

- BK JC Primer Prob Real-time PCR Kit içeriği (Macrogen, *Humanizing Genomics, Seoul, South Korea*);
 - PCR grade su (nükleaz free)
 - Light Cycler® 480 Probes Master
 - Liyofilize JCV-Probe (FAM-5'
TAGAGTGTTGGGATCCTGTGTTTTTCATCATCACT 3'-TAMRA)
 - Liyofilize BKV-Probe (FAM-5'
AAGACCCTAAAGACTTTCCYTCTGATCTACACCAGTTT 3'-TAMRA)
 - JCV-R Primer (5' CATTTAATGAGAAGTGGGATGAAGAC 3')
 - JCV-F Primer (5' CTAAACACAGCTTGACTGAGGAATG 3')
 - BKV-R Primer (5' GARGCAACAGCAGATTCYCAACA 3')

- BKV-F Primer (5' AGCAGGCAAGRGTCTATTACTAAAT 3')

3.7 Örnek toplanması ve saklanması

İdrar örnekleri, hastalara verilen steril idrar kaplarına, hastaların üretral yolla idrar vermeleri istenerek toplandı. Listelenen her bir örneğe sıra numarası verildi. Her örneğin 5 cc'si falcon tüpe alınarak 4000 devirde 10 dakika santrifuj edildi. Tüpün üst kısmında kalan süpernatant atıldı. Kalan pellete 1 cc steril serum fizyolojik eklenerek 10 sn vorteksledikten sonra DNAaz/RNAaz'dan arındırılmış 1,5 ml hacimli steril eppendorflara alındı. Eppendorflar çalışılana kadar -20°C'de saklandı.

3.8 DNA ekstraksiyonu

Toplanan BKV ve JCV şüpheli örnekler, hazır ticari bir ekstraksiyon kiti (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Version 19, Ref; 11 858 874 001: *Roche Diagnostic*) kullanılarak manuel şekilde ekstrakte edildi.

- İzolasyon işlemi öncesi çalışılacak örnekler -20°C'lik dondurucudan çıkarılarak oda ısısında eriyene dek bekletildi.
- Çalışmadan önce ticari kit içinde mevcut bulunan tampon çözeltiler üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı;
 - Proteinaz K, 5 ml elüsyon tamponunda çözdürüldü ve iyice karıştırıldı
 - Poly(A) carrier RNA, 0.5 ml elüsyon tamponu içinde çözdürüldü, 50 µl miktarlarda alikotlandı. Çalışma solüsyonu; Alikotlanmış bir şişe 50 µl Poly(A) carrier RNA çözüldükten sonra 2.5 ml bağlama tamponu ile iyice karıştırıldı.
 - İnhibitor uzaklaştırıcı tampona 20 ml absolut etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.
 - Yıkama tamponuna 80 ml absolut etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.
 - Bağlayıcı tampon ve elüsyon tamponu sulandırılmadan kullanıldı.
- 200'er µl hasta örneği daha önce numaralandırılmış steril eppendorflara numara sırasına uygun şekilde konuldu.

- Üzerine 200 µl taze hazırlanmış çalışma solüsyonu + 50 µl proteinaz K eklendi, birkaç kez pipet ile karıştırıldı.
- Her bir eppendorftan sonra diğerine geçmeden pipet ucu değiştirildi.
- Bu işlemlerden önce elüsyon tamponu, her bir örnek için x 50 µl olacak şekilde eppendorflara aktarılıp ısınması için 72°C inkübatöre koyuldu.
- Eppendorf içinde toplam 450 µl hacim elde edilmiş örnekler, kapakları kapatılarak önceden 72°C ye ısıtılmış inkübatörde 10 dk bekletildi.
- İnkübatörden çıkarılan eppendorfların her birinin üzerine 100'er µl bağlayıcı tampon pipetlendi ve vortekslendi.
- Boş bir spora kollektor tüpler içine filtreli tüpler oturtularak hasta örnek numarasına uygun olarak numaralandırıldı.
- Bütün karışımlar filtreli tüplere aktarıldı, tüpler 8.000 devirde 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonucunda alttaki kollektor tüpler içlerinde biriken sıvı ile birlikte atıldı, filtreli tüplerise bunların içinden alınarak yeni boş kollektor tüpler içine konuldu ve bunların üzerine 500'er µl inhibitor uzaklaştırıcı tampon konuldu.
- Yeniden 8.000 devirde 1 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonucunda kollektor tüpler içlerinde biriken sıvı ile birlikte atıldı, filtreler yeniden boş kollektor tüpler içine alınarak üzerlerine 450'şer µl yıkama tamponu eklenip 8.000 devirde 1 dk santrifuj edildi.
- Tekrar santrifüj sonucunda kollektor tüpler, içlerinde biriken sıvı ile birlikte atıldı, filtreler yeniden boş kollektor tüpler içine alınarak üzerlerine 450'şer µl yıkama tamponu eklenip 8.000 devirde 1 dk santrifuj edildi.
- Bu işlemde sonra filtrelerin kollektor tüpleri değiştirilerek bu defa 13.000 (max) devirde 10 sn santrifuj edildi.
- Santrifuj edilen filtreler kollektor tüplerinden alınarak, hasta numarasına uygun numaralandırılmış boş, nükleazdan arındırılmış steril eppendorflar içine oturtuldu. Altta kalan kollektor tüpler ise içlerindeki sıvı ile birlikte atıldı.
- Eppendorfa oturtulmuş filtrelerin her birinin üzerine 50 µl sıcak haldeki elüsyon tamponundan pipetlenip kapakları kapatıldı.
- 8.000 devirde 1 dakika santrifuj edildi.
- Bu aşamadan sonra sıcak elüsyon tamponu yardımı ile filtre porlarından alttaki eppendorflara viral DNA geçtiği için önceki basamakların tam tersine filtreler çöpe

atılarak, kollektor eppendorflara toplanmış olan ekstraksiyon ürünü PCR çalışılana kadar -20°C’de saklandı.

3.9 Örneklerde küçük t gen bölgesine ait viral DNA varlığının real-time PCR ile araştırılması

Kit içinde mevcut bulunan enzim ve çözeltiler üretici firmanın önerileri doğrultusunda reaksiyon öncesi hazırlandı;

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

- Master miks hazırlanışı;

Master miks hazırlamak için; örnek sayısı ile çarpımları kadar miktarda olacak şekilde, önce 9,0 µl H₂O, 2,0 µl magnezyum, 2,0 µl reagent miks (primerler, prob ve IC içeren parametre özgül reagen) ve 2 µl Roche master (b katılmış a) kullanıldı. Master miks bileşenleri Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Roche FastStart Master ile kullanmak için;

Tek Reaksiyon	Bileşen
9.0 µl	Su, PCR sınıfı (renksiz kapaklı, Roche Master Kit ile birlikte verilmiştir)
2.0 µl	Mg ²⁺ çözeltisi 25mM (mavi kapaklı, Roche FastStart Kiti ile birlikte verilmiştir)
2.0 µl	Reaktif karışımı (primerler, problar ve internal kontrolleri içeren parametrelere özgül reaktifler)
2.0 µl	Roche Master (kırmızı kapaklı)
15 µl	Reaksiyon miksinin toplam hacmi

Tablo 3.1. Master miks bileşenleri.

- Kapiller altlığına oturtulan boş kapiller tüplerin her birinin içine 15’şer µl master miks konuldu.
- İlk kapillere negatif kontrol konuldu. Negatif kontrol olarak su kullanıldı.
- Daha sonraki kapillerlere önceden sulandırılmış standartlardan 5’er µl konuldu.
- Kalan kapillerlere hazırlanan DNA ekstraksiyonlarından 5’er µl konuldu.
- Her işlemde bir kapiller içinde toplam 20 µl reaksiyon hacmi elde edildi.
- Basamakların her birinden hemen sonra kapiller kapakları kapatıldı.
- Hasta örnekleri ve standartları içeren bu kapillerler 2000 devirde 10 sn santrifuj edildikten sonra real-time PCR sistemine (Light Cycler® 1.5, Roche) yüklendi.
- Çalışma başlatıldı.

Bu analiz ile BKV’ünün küçük t gen bölgesinin 175 bp’lik bölgesi, JCV’ünün 172 bp’lik bölgesinin amplifiye edilmesi amaçlanmıştır. Analizin performansının değerlendirilmesi için internal kontrol (IC), BKV ve JCV’lere ait pozitif kontroller her çalışmada kullanılmıştır. Real-time PCR protokolü Tablo 3.2’deki gibidir.

Program Basamağı	Döngü	Sıcaklık (°C)	Zaman
Denatürasyon	1	95	10 dk
		95	5 sn
Amplifikasyon	50	62	5 sn
		72	15 sn
		95	20 sn
Erime	1	40	20 sn
		85	-
Soğuma	1	40	30 sn

Tablo 3.2. Real-time PCR çalışma protokolü.

Çalışma sonunda elde edilen veriler, BKV için 640 kanalında, JCV için 705 kanalında okunmuştur. Her bir örnek için 17-37 arasında elde edilecek cycle threshold (Ct) pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.10 Örneklerde Büyük T gen bölgesine ait viral DNA varlığının real-time PCR ile araştırılması

Büyük T gen bölgesine spesifik olarak kullanılacak primer ve prob bilgileri Tablo 3.3'te verilmiştir.

Primer-Prob	Sekans (5'- 3')
BKV-F	AGCAGGCAAGRGTCTATTACTAAAT
BKV-R	GARGCAACAGCAGATTCYCAACA
BKV-Probe	FAM-AAGACCCTAAAGACTTTCCYTCTGATCTACACCAGTTT-TAMRA
JCV-F	CTAAACACAGCTTGACTGAGGAATG
JCV-R	CATTTAATGAGAAGTGGGATGAAGAC
JCV-Probe	FAM-TAGAGTGTTGGGATCCTGTGTTTTTCATCATCACT-TAMRA

Tablo 3.3. Büyük T gen bölgesine spesifik real-time PCR metotunda kullanılan primer ve proplar (Dumoulin ve Hirsch 2011).

- Macrogen (*Humanizing Genomics, Seoul, South Korea*) firmasına ait liyofilize şekilde gelen primer ve proplar, üretici firma önerileri doğrultusunda nükleaz free suyla sulandırılarak kullanıma hazır hale getirildi.
- Master miks karışımı için ticari bir kit (LightCycler 480 Probes Master, Roche Applied Science, Indianapolis, ABD) kullanıldı.
- BKV ve JCV için miks hazırlama protokolü, aşağıda yazıldığı şekildedir;
Her bir örnek için olacak şekilde sırasıyla;
 - 2 µl PCR-grade su
 - 1 µl F primer (BKV ya da JCV için)
 - 1 µl R primer (BKV ya da JCV için)
 - 1 µl probe (BKV ya da JCV için)
 - 10 µl master mix (LightCycler 480 Probes Master) konuldu.
- İki adet eppendorf tüpe BKV ve JCV için ayrı ayrı olmak üzere iki adet master miks hazırlandı. 2000 devirde kısa bir süre santrifuj yapıldı.
- Master miks içinde, her bir primer konsantrasyonu 0,5 pmol ve prob konsantrasyonu 0,2 pmol oldu.

- Kapiller altlığına oturtulan boş kapiller tüplerin her birinin içine hazırlanan miksten 15 µl konuldu.
- Negatif kontroller için 5 µl nükleaz free su eklenip üzerleri kapakla kapatıldı.
- Miks üzerine sırasıyla 5'er µl ekstrakte edilen DNA ilave edildi, kapaklar kapatıldı.
- Her işlemde bir kapiller içinde toplam 20 µl reaksiyon hacmi elde edildi.
- Pozitif kontroller için LightMix Kit Polyomaviruses JC and BK (Roche Applied Science) kiti ile elde edilen BKV ve JCV pozitif kontroller kullanıldı.
- Kapillerler 2000 devirde 10 sn santrifuj edildikten sonra real-time PCR sistemine (Light Cycler[®] 1.5, Roche) yüklendi.
- Çalışma başlatıldı.
- Primer prob real-time PCR çalışma protokolü Tablo 3.4'deki gibidir.

Program Basamağı	Sıcaklık (°C)	Zaman
Denatürasyon	95	10 min
	95	15 sec
Amplifikasyon (45 döngü)	60	60 sec
	72	1 sec
Soğuma	40	30 sec

Tablo 3.4. Real-time PCR çalışma protokolü.

- Çalışma sonunda elde edilen veriler, BKV ve JCV için 530 kanalında okundu.
- Her bir örnek için 40'ın altında elde edilen cycle threshold (Ct) pozitif olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan örneklerin sahibi 82 hastanın, 48'i erkek, 34'ü kadındı (Tablo 4.1).

Cinsiyet	BKV		JCV	
	Ticari Kit (sayı/pozitif)	In-house yöntem (sayı/pozitif)	Ticari Kit (sayı/pozitif)	In-house yöntem (sayı/pozitif)
Erkek	48/4	48/12	48/39	48/40
Kadın	34/5	34/9	34/22	34/27
Toplam	82/9	82/21	82/61	82/67

Tablo 4.1. BK ve JC virüslerinde her iki yöntemle saptanan pozitifliklerin cinsiyete göre dağılımı.

Küçük t gen bölgesine spesifik real-time PCR yöntemi ile **48 erkeğin 4'ünde BKV** tespit edilir iken, **34 kadının 5'inde BKV** tespit edilmiştir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0.4784$, ki kare testi).

Büyük T gen bölgesine spesifik real-time PCR yöntemi ile **48 erkeğin 12'sinde BKV** tespit edilir iken, **34 kadının 9'unda BKV** tespit edilmiştir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=1.000$, ki kare testi).

Küçük t gen bölgesine spesifik real-time PCR yöntemi ile **48 erkeğin 39'unda JCV** tespit edilir iken, **34 kadının 22'sinde JCV** tespit edilmiştir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0.1241$, ki kare testi).

Büyük T gen bölgesine spesifik real-time PCR yöntemi ile **48 erkeğin 40'ında JCV** tespit edilir iken, **34 kadının 27'sinde JCV** tespit edilmiştir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0.7737$, ki kare testi).

Bu sonuçlara göre BKV ve JCV yönünden **cinsiyet grupları arasında farklılık olmadığı** görülmektedir.

İdrar örneklerinin 44'ü Hematoloji, 33'ü Onkoloji servislerinden, 5'i de böbrek transplantasyon ünitesinden laboratuvarımıza gelmiştir (Tablo 4.2).

Bölüm	Sayı (%)
Hematoloji	44 (53.7)
Onkoloji	33 (40.2)
Böbrek Transplantasyon Ünitesi	5 (6.1)
Toplam	82 (100)

Tablo 4.2. Örneklerin alındığı klinikler.

Örnek alınan hastaların hepsinde (n= 82), altta yatan hematolojik/onkolojik bir hastalık veya organ nakli nedeniyle immün süpresyon mevcuttu.

İdrar örneği alınan hastaların 26 tanesi 50 yaş altında, 56 tanesi 50 yaş üstündeydi (Tablo 4.3). Hastaların yaşları 19-86 arasında değişmekteydi. Ortalama yaş 56,1 olduğu için istatistiksel hesaplamalarda 50 yaş sınır olarak alınmıştır.

Yaş	BKV		JCV	
	Ticari Kit (sayı/pozitif)	In-house yöntem (sayı/pozitif)	Ticari Kit (sayı/pozitif)	In-house yöntem (sayı/pozitif)
< 50	26/5	26/8	26/16	26/19
> 50	56/4	56/13	56/45	56/48
Toplam	82/9	82/21	82/61	82/67

Tablo 4.3. BK ve JC virüslerinde her iki yöntemle saptanan pozitifliklerin yaşa göre dağılımı.

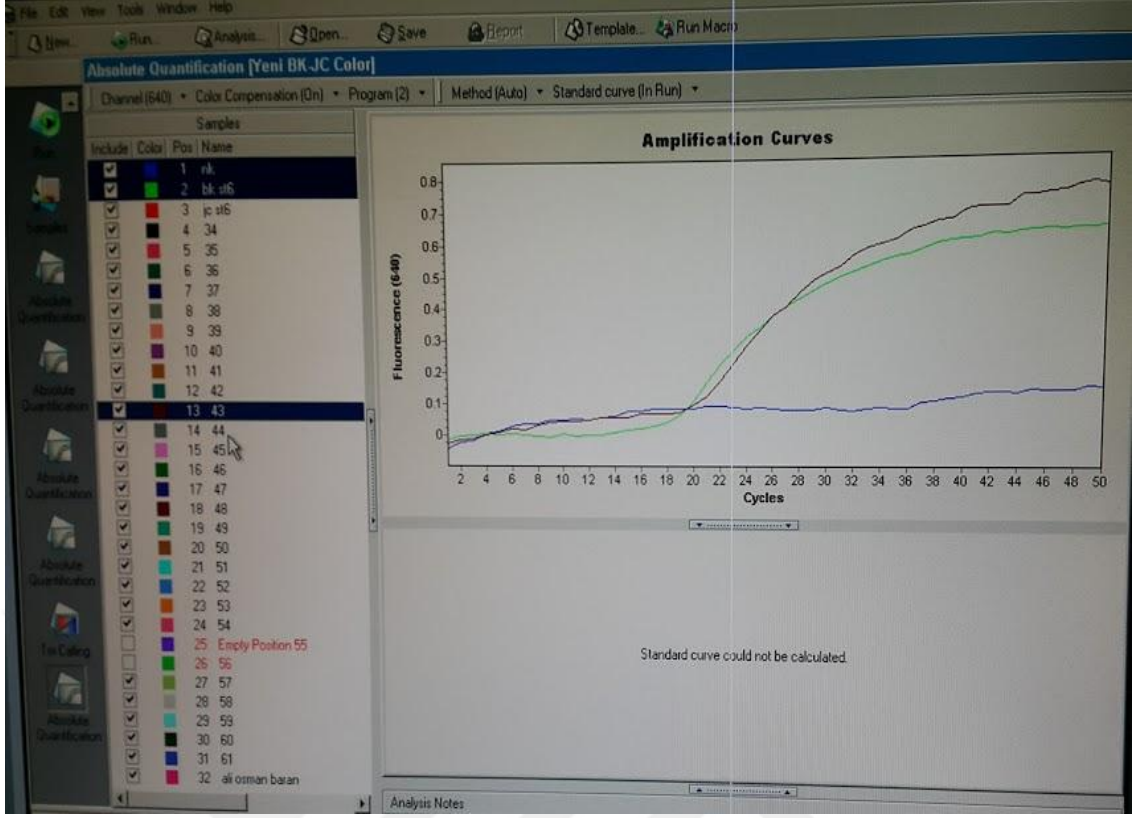
Küçük t gen bölgesine spesifik real-time PCR yöntemi ile **50 yaş ve altı 26 kişinin, 5'inde BKV** tespit edilir iken, **50 yaş üzeri 56 kişinin, 4'ünde BKV** tespit edilmiştir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p= 0.1338, ki kare testi).

Büyük t gen bölgesine spesifik real-time PCR yöntemi ile **50 yaş ve altı 26 kişinin, 8'inde BKV** tespit edilir iken, **50 yaş üzeri 56 kişinin, 13'ünde BKV** tespit edilmiştir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p= 0.5876, ki kare testi).

Küçük t gen bölgesine spesifik real-time PCR yöntemi ile **50 yaş ve altı 26 kişinin, 16'sında JCV** tespit edilir iken, **50 yaş üzeri 56 kişinin, 45'inde JCV** tespit edilmiştir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p= 0.1019, ki kare testi).

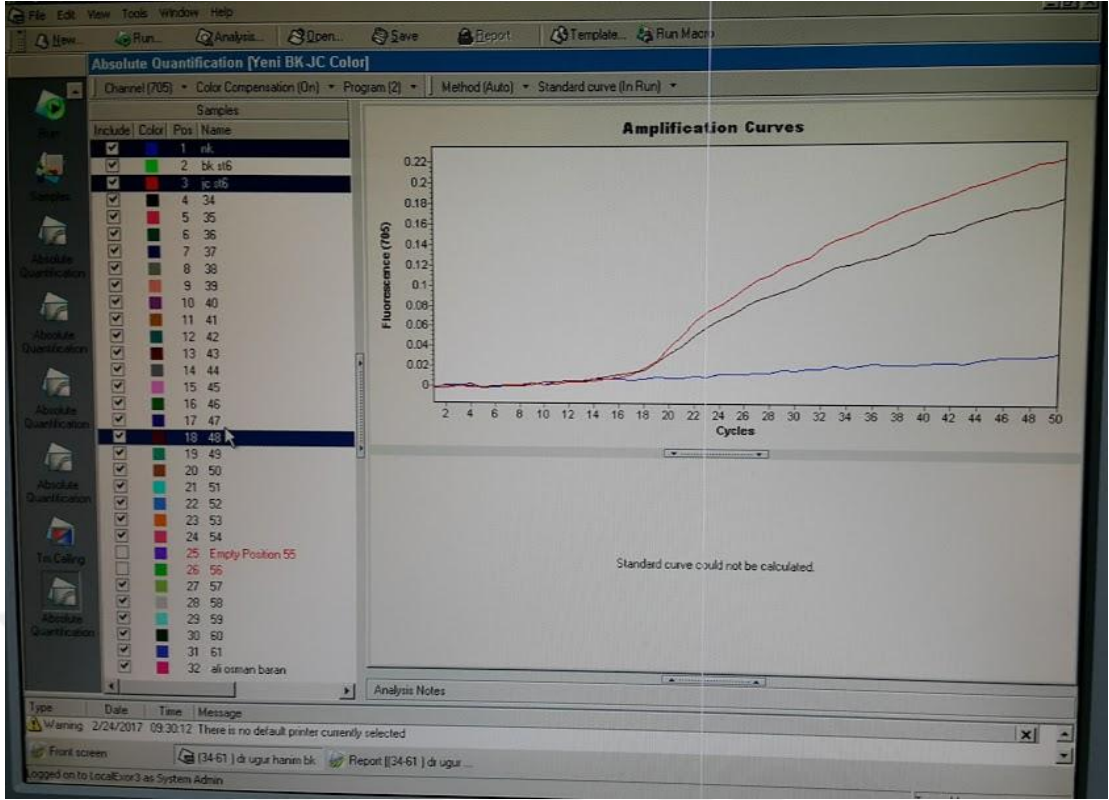
Büyük t gen bölgesine spesifik real-time PCR yöntemi ile **50 yaş ve altı 26 kişinin, 19'unda JCV** tespit edilir iken, **50 yaş üzeri 56 kişinin, 48'sinde JCV** tespit edilmiştir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p= 0.2210, ki kare testi).

Bu sonuçlara göre BKV ve JCV yönünden **50 yaş ve altı ile 50 yaş üzeri arasında farklılık olmadığı** görülmektedir.



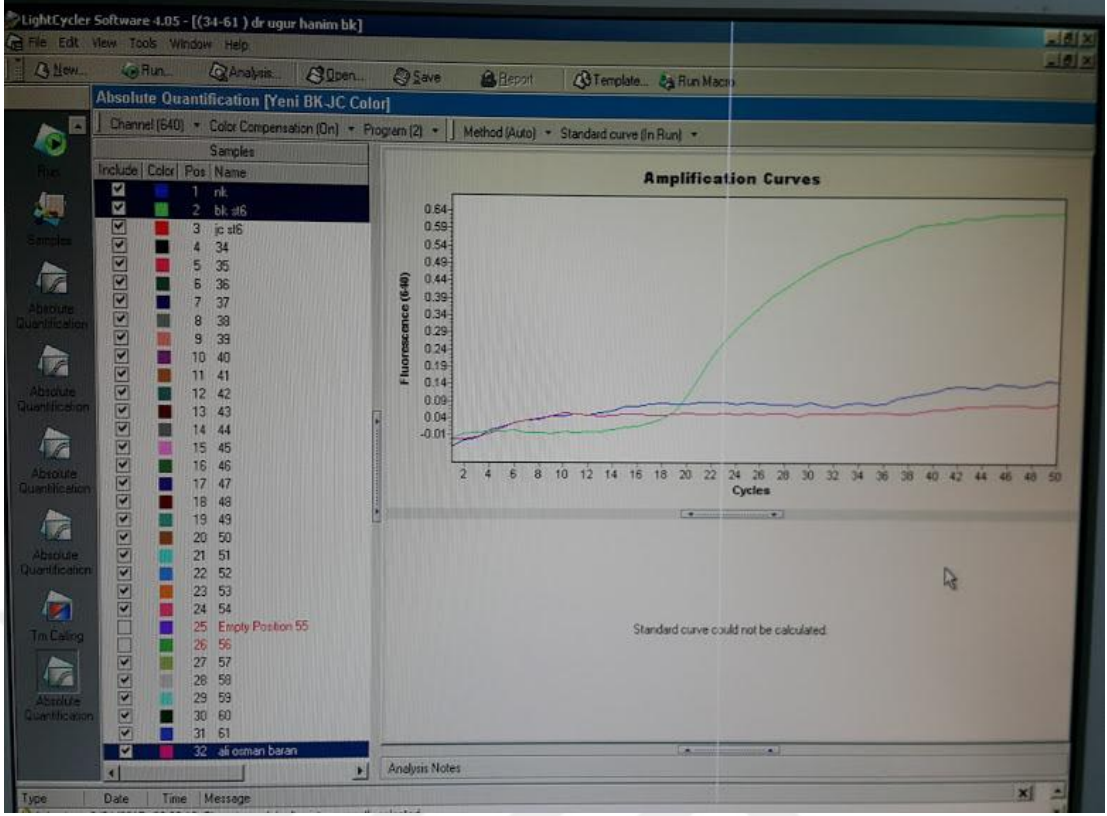
Şekil 4.1. Küçük t gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde **pozitif BKV** örneği ekran görüntüsü (640 kanalında).

Mavi çizgi negatif kontrolü, yeşil çizgi BKV için pozitif kontrolü ve kahverengi çizgi de örneğin BKV pozitif olduğunu göstermektedir.



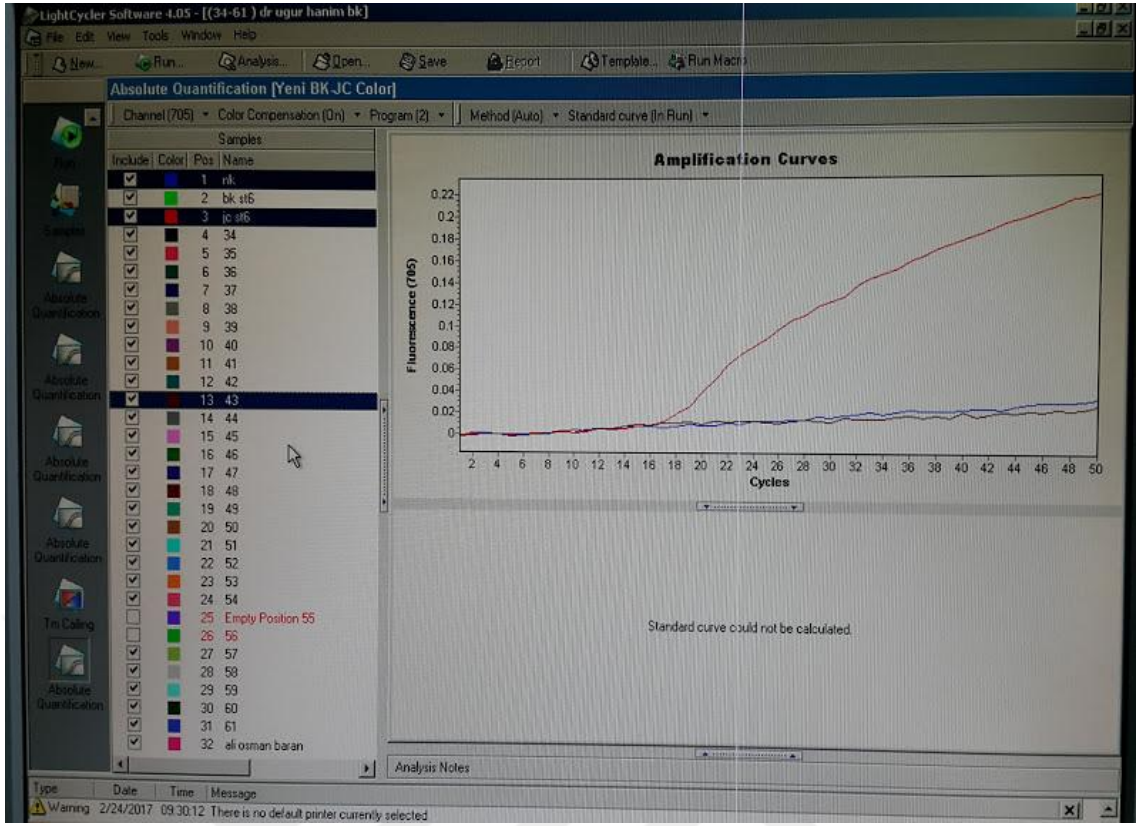
Şekil 4.2. Küçük t gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde **pozitif JCV** örneği ekran görüntüsü (705 kanalında).

Mavi çizgi negatif kontrolü, kırmızı çizgi JCV için pozitif kontrolü ve kahverengi çizgi de örneğin JCV pozitif olduğunu göstermektedir.



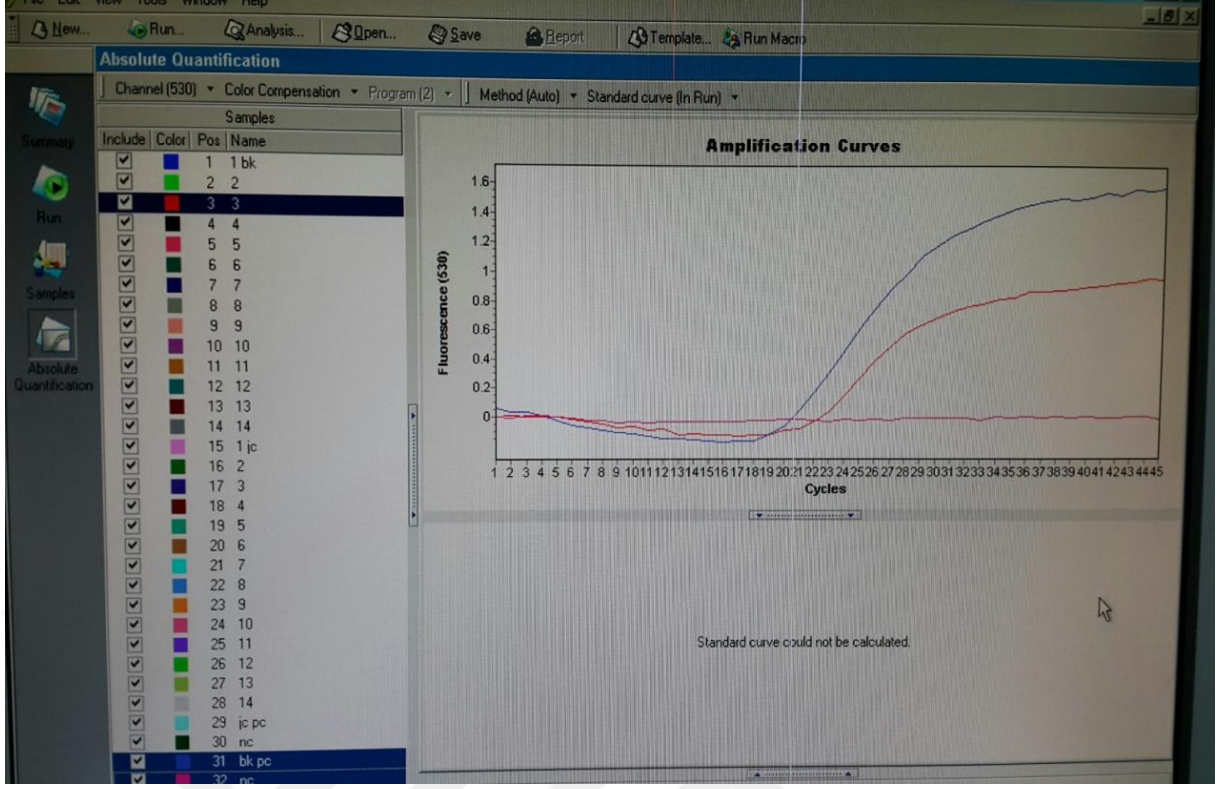
Şekil 4.3. Küçük t gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde **negatif BKV** örneği ekran görüntüsü (640 kanalında).

Mavi çizgi negatif kontrolü, yeşil çizgi BKV için pozitif kontrolü ve pembe çizgi de örneğin negatif olduğunu göstermektedir.



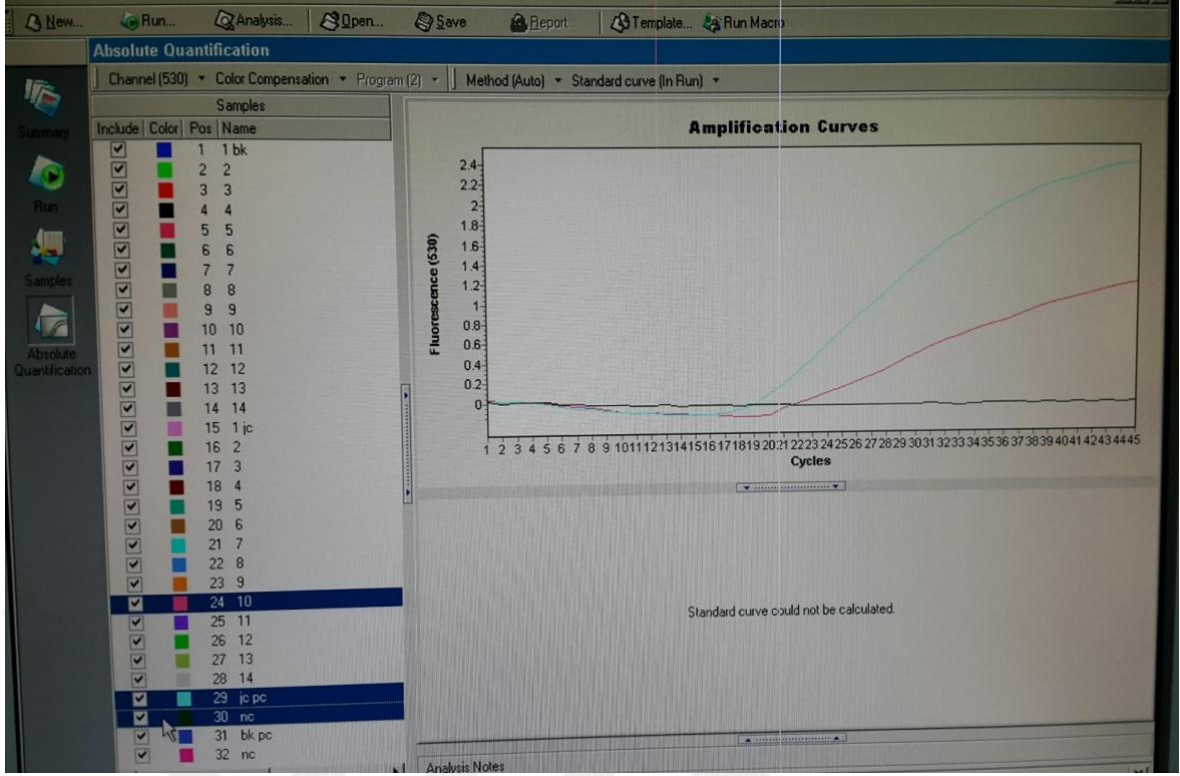
Şekil 4.4. Küçük t gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde **negatif JCV** örneği ekran görüntüsü (705 kanalında).

Mavi çizgi negatif kontrolü, kırmızı çizgi JCV için pozitif kontrolü ve kahverengi çizgi de örneğin negatif olduğunu göstermektedir.



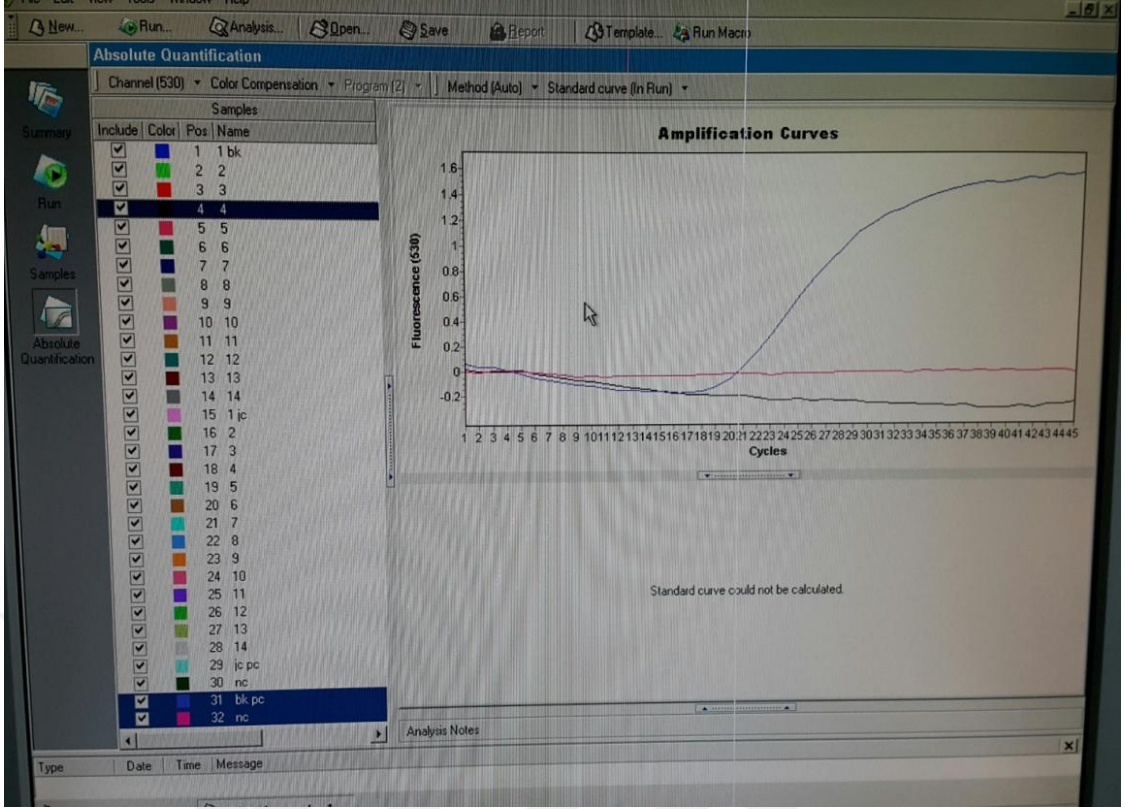
Şekil 4.5. Büyük T gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde **pozitif BKV** örneği ekran görüntüsü (530 kanalında).

Pembe çizgi negatif kontrolü, mavi çizgi BKV için pozitif kontrolü ve kırmızı çizgi de örneğin BKV pozitif olduğunu göstermektedir.



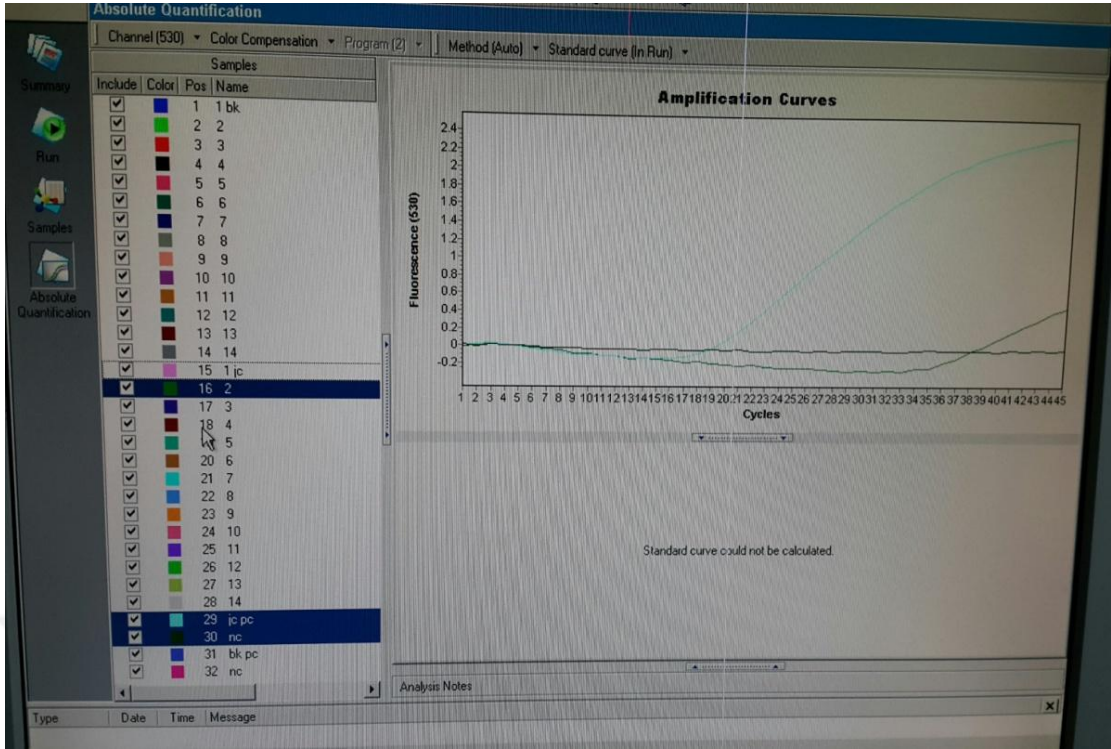
Şekil 4.6. Büyük T gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde **pozitif JCV** örneği ekran görüntüsü (530 kanalında).

Koyu yeşil çizgi negatif kontrolü, açık mavi çizgi JCV için pozitif kontrolü ve pembe çizgi de örneğin JCV pozitif olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.7. Büyük T gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde **negatif BKV** örneği ekran görüntüsü (530 kanalında).

Pembe çizgi negatif kontrolü, mavi çizgi BKV için pozitif kontrolü ve kahverengi çizgi de örneğin negatif olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8. Büyük T gen bölgesinin araştırıldığı real-time PCR yönteminde **negatif JCV** örneği ekran görüntüsü (530 kanalında).

Koyu yeşil çizgi negatif kontrolü, açık mavi çizgi JCV için pozitif kontrolü ve yeşil çizgi de örneğin negatif olduğunu göstermektedir.

Sonuçlar	Ticari Kit	In-house yöntem
BK Pozitif	9	21
JC Pozitif	61	67
Negatif	12	8
Toplam	82	82

Tablo 4.4. Real-time PCR yöntemlerine göre saptanan BK ve JC virüs sonuçları.

BKV için birinci yöntemle karşılaştırıldığında, ikinci yöntemin performansı; farklı primer ve prob kullanılarak güncellenmiş BKV real-time PCR yönteminin değerlendirilmesi için, prospektif olarak toplanan 82 idrar örneği kullanıldı. Çalışma sonunda birinci yöntem ile 9, ikinci yöntem ile 21 BKV pozitifliği, birinci yöntem ile 12, ikinci yöntem ile 8 negatiflik saptandı (Tablo 4.4). Negatif saptananların 8 tanesi her iki yöntemle de negatif bulundu. Her iki yöntemle BKV pozitifliği sadece 4 örnekte vardı. Birinci yöntemle negatif saptananların 2 tanesi ikinci yöntemde BKV pozitifliği. Birinci yöntemle pozitif saptananların 5 tanesinde ikinci yöntemle BKV ve JCV birlikte pozitifliği vardı.

Birinci yöntem ile aynı örnekte BKV ve JCV pozitifliği bulunmazken, ikinci yöntem ile 14 örnekte aynı anda BKV ve JCV pozitifliği saptandı.

BKV tespitinde; birinci yöntem ile 9 örnekte pozitiflik saptanırken, ikinci yöntem ile 21 örnekte pozitiflik saptanmıştır. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak iki yöntem arasında **anlamli farklılık bulunmaktadır** ($p= 0.0252$, iki kuyruklu eşleştirilmiş t-testi).

JCV için birinci yöntemle karşılaştırıldığında, ikinci yöntemin performansı; farklı primer ve prob kullanılarak güncellenmiş BKV real-time PCR yönteminin değerlendirilmesi için, prospektif olarak toplanan 82 idrar örneği kullanıldı. Çalışma sonunda birinci yöntem ile 61, ikinci yöntem ile 67 JCV pozitifliği, birinci yöntem ile 12, ikinci yöntem ile 8 negatiflik saptandı (Tablo 4.4). 8 örnek her iki yöntemle de negatif bulundu. Birinci yöntemle negatif saptananların 3 tanesi ikinci yöntemle pozitifliği. İkinci yöntemde negatif saptananların 6 tanesi birinci yöntemle pozitifliği.

JCV tespitinde; birinci yöntem ile 61 örnekte pozitiflik saptanırken, ikinci yöntem ile 67 örnekte pozitiflik saptanmıştır. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak iki yöntem arasında **anlamli farklılık bulunmamaktadır** ($p= 0.3457$, iki kuyruklu eşleştirilmiş t-testi).

İki yöntemle çalışma sonrasında, PCR sonuçları arasında farklılık bulunan 19 örnek her iki real-time PCR yöntemiyle bir kez daha çalışmaya alındı. İkinci çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edildi. Sonrasında bu 19 örneğin VP1 bölgesinin sekans analizi Sanger metodu kullanılarak özel bir laboratuvara yaptırıldı. Yapılan dizi analizlerinin sonuçlarına

göre 12 örnek birinci yöntemle uyumlu, 3 örnek ikinci yöntemle uyumlu 3 örnek ise her iki yöntemle de uyumsuz bulunmuştur.

Örnek Numarası	Ticari Kit	In-house Yöntem	Dizi Analizi
1	JC Pozitif	BK Pozitif	JC Pozitif
24	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
27	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
29	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
30	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
33	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
34	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
41	JC Pozitif	BK Pozitif	JC Pozitif
43	BK Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	BK Pozitif
46	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
73	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
78	Negatif	BK Pozitif/JC Pozitif	Negatif

Tablo 4.5. VP1 Gen bölgesinin Sanger dizi analizi sonuçları birinci yöntem ile uyumlu 12 örnek.

Örnek Numarası	Ticari Kit	In-house Yöntem	Dizi Analizi
45	BK Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif
72	Negatif	JC Pozitif	JC Pozitif
75	Negatif	JC Pozitif	JC Pozitif
76	BK Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif

Tablo 4.6. VP1 Gen bölgesinin Sanger dizi analizi sonuçları ile uyumlu 4 örnek.

Örnek Numarası	Ticari Kit	In-house Yöntem	Dizi Analizi
18	BK Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
44	BK Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
74	Negatif	BK Pozitif	JC Pozitif

Tablo 4.7. VP1 Gen bölgesinin Sanger dizi analizi sonuçları her iki yöntemle de uyumsuz 3 örnek.

Çalıştığımız ticari kit ve in-house yöntemle ilgili duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerleri hesaplayabilmek için, polyomavirüslerin tespitinde dizi analizini standart yöntem olarak kabul ederek; bu 19 örneğin sonuçlarıyla beraber ilk iki yöntemde aynı sonucu bulduğumuz kalan 63 örneğin sonuçlarını bir sütunda topladık (Tablo 4.8).

Örnek Numarası	Ticari Kit	In-house Yöntem	Dizi Analizi
1	JC Pozitif	BK Pozitif	JC Pozitif
2	Negatif	Negatif	Negatif
3	BK Pozitif	BK Pozitif	BK Pozitif
4	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
5	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
6	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
7	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
8	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
9	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
10	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
11	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
12	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
13	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
14	Negatif	Negatif	Negatif
15	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
16	Negatif	Negatif	Negatif
17	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
18	BK Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
19	Negatif	Negatif	Negatif
20	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
21	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
22	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
23	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
24	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
25	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
26	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
27	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
28	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
29	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
30	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
31	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
32	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
33	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
34	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
35	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
36	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
37	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
38	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
39	Negatif	Negatif	Negatif
40	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
41	JC Pozitif	BK Pozitif	JC Pozitif
42	Negatif	Negatif	Negatif
43	BK Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	BK Pozitif
44	BK Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif

45	BK Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif
46	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
47	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
48	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
49	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
50	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
51	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
52	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
53	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
54	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
55	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
56	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
57	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
58	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
59	BK Pozitif	BK Pozitif	BK Pozitif
60	Negatif	Negatif	Negatif
61	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
62	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
63	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
64	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
65	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
66	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
67	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
68	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
69	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
70	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
71	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
72	Negatif	JC Pozitif	JC Pozitif
73	JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	JC Pozitif
74	Negatif	BK Pozitif	JC Pozitif
75	Negatif	JC Pozitif	JC Pozitif
76	BK Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif	BK Pozitif/JC Pozitif
77	Negatif	Negatif	Negatif
78	Negatif	BK Pozitif/JC Pozitif	Negatif
79	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
80	JC Pozitif	JC Pozitif	JC Pozitif
81	BK Pozitif	BK Pozitif	BK Pozitif
82	BK Pozitif	BK Pozitif	BK Pozitif

Tablo 4.8. Çalıştığımız 82 örneğin her üç yöntemle bulunan sonuçları.

Buna göre ticari PCR kiti ile yaptığımız yöntemin BKV için duyarlılığı %100, özgüllüğü %97.3, pozitif prediktif değeri %77.8, negatif prediktif değeri %100, JCV için duyarlılığı %89.7, özgüllüğü %100, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %66.7 (Tablo 4.9); tasarladığımız primer ve problarla yaptığımız in-house yöntemin BKV için duyarlılığı %100, özgüllüğü %81.3, pozitif prediktif değeri %33.3, negatif prediktif değeri %100, JCV için duyarlılığı %98.5, özgüllüğü %100, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %93.3 olarak bulunmuştur (Tablo 4.10).

	BKV	JCV
Duyarlılık (%)	100	89.7
Özgüllük (%)	97.3	100
Pozitif Prediktif Değer (%)	77.8	100
Negatif Prediktif Değer (%)	100	66.7

Tablo 4.9. Ticari kitin BKV ve JCV için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerleri.

	BKV	JCV
Duyarlılık (%)	100	98.5
Özgüllük (%)	81.3	100
Pozitif Prediktif Değer (%)	33.3	100
Negatif Prediktif Değer (%)	100	93.3

Tablo 4.10. In-house yöntemin BKV ve JCV için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerleri.

5. TARTIŞMA

İnsan polyomavirüsleri, *Papovaviridae* familyasında, *Polyomavirus* alt grubunda yer almaktadırlar (Eash ve ark 2006). En yaygın iki insan polyomavirüsü ilk kez 1970'lerde tanımlanan BK ve JC virüsleridir (Gardner ve ark 1971, Padgett ve ark 1971). Polyomavirüsleri ile ilişkili hastalıklar, genellikle organ nakli, AIDS ve lösemi gibi şiddetli hücrel immün süpresyonun söz konusu olduğu durumlarda ortaya çıkmaktadır (Major 2001).

İnsanların çoğu BK ve JC virüsleri ile çocukluk çağında karşılaşılır ve bu dönemde enfeksiyon hafif ya da asemptomatik seyreder (Chesters ve ark 1983, Di Taranto ve ark 1997). Bu dönemden sonra virüsler, latent olarak böbreklerde ve B lenfositlerde bulunurlar (Monaco ve ark 1996, Lafon ve ark 1998). Bununla birlikte BK ve JC virüsleri reaktif olurlarsa veya immün sistemi baskılanmış konak tarafından alınılırsa, bir dizi hastalığa neden olabilmektedirler. BKV en yaygın olarak üreter stenozu, hemorajik sistit ve nefropati gibi böbrek tutulumu ile ilişkilendirilmektedir. Daha az oranda da pnömoni, retinitis, karaciğer hastalıkları ve meningoensefalite neden olduğu bildirilmektedir. Genellikle nefropati virüsün idrar ve plazmada varlığından önce gerçekleşir (Tan 2010). Böbrek nakli alıcılarının yaklaşık %80'inde BKV virüsü bulunmaktadır ve bunların da %5-10'unda BKV ile bağlantılı nefropati gelişmektedir (Binet ve ark 1999, Hirsch 2002, Bressollette-Bodin ve ark 2005).

JCV ise PML ile ilişkisi en iyi bilinen virüstür. PML, serebral beyaz madde demiyelinizasyonu ile birlikte kognitif yıkım, yürüyüş ve koordinasyon bozuklukları, uzuvlarda parezi ve nöbet aktivitesine neden olmaktadır (Lima ve ark 2006). JCV'ün latent olarak böbrekleri enfekte edebileceği (Randhawa ve ark 2004), fakat özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda nörolojik enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmektedir (Hou ve Major 2000). Ayrıca, JCV'ün bireysel konağa bağlı olarak 2 formda (latent; nonpatojenik form ve virülan; nörotropik form) persiste olabileceği de yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Yogo ve ark 1990).

BKV ve JCV viral yükleri; idrar, dışkı, kan ve beyin omurilik sıvısı örneklerinden belirlenebilmektedir (Ryschkewitsch ve ark 2004, Vanchiere ve ark 2005, Vilchez ve Kusne 2006). BKV viral yükü genellikle idrarda, plazmanın 1000 katı oranında bulunmaktadır (Randhawa ve ark 2004). Benzer şekilde, JCV'ün de sağlıklı bireylerde

yüksek oranda idrar ile atıldığı bildirilmektedir (Kitamura ve ark 1990, Chang ve ark 1996).

BK ve JC virüslerinin genetik olarak birbirleri ile yakın ilişkili oldukları ve %75'e varan oranda genom homolojisi gösterdikleri tespit edilmiştir (Feng ve ark 2008). Polyomavirüslerde, viral genom, 6 proteini kodlamaktadır ve 3 segmente (erken genler, geç genler ve kodlanmayan kontrol bölgesi) ayrılmaktadır. Erken bölge genleri tarafından kodlanan proteinler, viral replikasyon ve geç bölge genlerinin transkripsiyonunda görev almaktadırlar. Geç genler ise kapsid proteinlerini (VP1, VP2 ve VP3) kodlarlar. Kodlanmayan kontrol bölgesi ise erken ve geç genlerin transkripsiyonu kontrol etmektedir (Yogo ve ark 1990, Safak ve Khalili 2003).

BK ve JC virüsleri, genellikle çok az izole edilmiş birkaç topluluk dışında dünyanın her yerinde yaygındır. Çocuklar, yetişkin seroprevalans oranları olan %65-90'lara on yaşına kadar ulaşırlar (Knowles 2006, Kean ve ark 2009), 9-11 yaşları arasındaki çocuklarda JC seroprevalansının %50, BK seroprevalansının ise %90 olduğu tespit edilmiştir (Gardner ve ark 1971, Stolt ve ark 2003). Bulaşmanın, erken yaşta solunum yolu ile veya ağız yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Stoner ve Hubner 2001).

BKV ve JCV enfeksiyonlarının sıklığı ve immünolojik bozukluğu olan konaklarda enfeksiyonun yayılma riskinin yüksek olması polyomavirüslerinin hızlı teşhisini önemli bir konu haline getirmiştir. Hastanın yönetimi için polyomavirüsünün tanımlanması önem taşımaktadır.

Virüs izolasyonu ve serolojik analizler gibi geleneksel metotlar teknik sınırlamalar veya ticari reaktif eksikliği nedenlerinden dolayı, günümüzde polyomavirüslerin rutin teşhisinde yaygın olarak kullanılmamaktadır. Nükleik asit çoğaltma teknikleri, özellikle de PCR yöntemi, polyomavirüslerin tespitinde diğer tanı yöntemlerine göre daha üstün hassasiyete sahiptir (Boldorini ve ark 2004). PCR, günümüzde polyomavirüslerin tespiti için "altın standart" olarak tanımlanmaktadır (Whiley ve ark 2001). Bununla birlikte, klinik laboratuvarlarda nükleik asit amplifikasyon tekniklerini rutinde uygulamanın bazı zorlukları vardır. Amplikon kontaminasyon riski ve teknik açıdan zahmetli PCR ürünü tespit yöntemleri bu zorlukların başlıcalarıdır (Udaykumar ve ark 1993, Espy ve ark 2000).

Real-time PCR enstrümantasyonu, nükleik asit amplifikasyonu ve tespit teknolojisinin gelenen son aşamadır ve rutinde PCR uygulama kısıtlamalarını ortadan kaldırmaktadır (Whiley ve ark 2001). Günümüzde, real-time PCR metotları, klinik viroloji alanında viral kopya sayılarının miktarının belirlenmesine ve virüs genom kopya sayısının kesin olarak

tespit edilmesine imkân vererek, enfeksiyon hakkında, özellikle latent virüs enfeksiyonlarında tespit edilen virüsün patojen olup olmadığını, enfeksiyonun şiddetini ve tedavinin seyrini değerlendirmek için yararlı bilgiler sağlar (Funahashi ve ark 2010).

Real-time PCR metotlarında, en iyi performansı sağlamak için, hedef sekans dizileri korunmuş bölgelerden dikkatle seçilmeli ve düzenli olarak yeni kullanılabilir sekans dizilerine karşı değerlendirilmelidir (Gunson ve ark 2006). Yapılan farklı çalışmalarda BK ve JC virüslerinin hedef sekans dizilerinde, sekans farklılıklarının olduğu ve bu sekans dizisi değişkenliklerinin analiz performansını etkileyebileceği bildirilmiştir (Jin ve ark 1993, Chen ve ark 2004, Gosert ve ark 2008, Tremolada ve ark 2010). BKV ve JCV genomları büyük dizi varyasyonları göstermektedir. Bu dizi varyasyonları aynı zamanda farklı subtipler arasında da görülmektedir. Bu durum, BKV ve JCV'lerinin tespiti amacıyla real-time PCR analizlerinde kullanılan primer ve probe dizaynını güçleştirmektedir. BKV ve JCV'lerinin sensitif ve spesifik bir yöntemle tespiti için hedef bölgenin, korunmuş bağlanma yerleri arasında olması gerektiği bildirilmektedir (Whiley ve ark 2001).

Viral genomun kodlanmayan kontrol bölgesinde genetik mutasyonların ve yeniden düzenlemelerin yoğun olduğu tespit edilmiştir (Yogo ve Sugimoto 2001, Sharma ve ark 2007). Kapsid bölgesinde, özellikle VP1 geninde de mutasyonların sıklıkla görüldüğü (Baksh ve ark 2001, Boldorini ve ark 2009, Sunyaev ve ark 2009), bu durumun polyomavirüslerinin ve varyantlarının tespitini ve viral yük miktar tayinini olumsuz yönde etkileyebileceği ve yanlış negatifliğe neden olabileceği bildirilmiştir (Landry ve ark 2008). Bununla birlikte, viral genomun küçük t gen ve büyük T gen bölgelerinin homolog bölgelere sahip olduğu, sekans varyasyonlarının daha az görüldüğü ve her bir polyomavirüsün tespitinde uygun hedef gen bölgesi olduğu bildirilmiştir (Dhar ve ark 1979, Fedele ve ark 1999).

Çalışmamız kapsamında polyomavirüs viral genomundaki iki korunmuş bölgeyi (küçük t gen ve büyük T gen bölgeleri) hedef alan iki farklı real-time PCR yönteminin klinik teşhiste performansının karşılaştırılması amaçladık. Bu sebeple, büyük T gen bölgesinde bugüne kadar meydana gelen poliformizmleri de dikkate alarak, Dumoulin ve Hirsch (2011) tarafından dizayn edilmiş primer ve problemleri kullandık. Küçük t geni varlığını ise, ticari olarak hazırlanmış bir kit (LightMix Kit for the detection of Polyomaviruses JC and BK, Roche Diagnostics Ltd. TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany) kullanılarak araştırdık. Küçük t genine spesifik olarak hazırlanan ticari kit ile 10 kopya BKV ve JCV DNA'sı belirlenebilir iken, Dumoulin ve Hirsch (2011) tarafından

tanımlanan büyük T gen bölgesine spesifik yöntem ise 4.15 kopya BKV DNA'sı ve 3.37 kopya JCV DNA'sının belirlenebileceği belirtilmiştir (Dumolin ve Hirsch 2011).

Çalışmamızda; küçük t gen bölgesine spesifik real-time PCR metodu ile çalışılan 82 örnekte; 9 BKV pozitifliği, 61 JCV pozitifliği, 12 negatiflik, büyük T gen bölgesine spesifik real-time PCR yöntemi ile çalışılan 82 örnekte; 21 BKV pozitifliği, 67 JCV pozitifliği ve 8 negatiflik saptandı.

4 örnekte; her iki yöntemle de BKV pozitifliği, 51 örnekte; her iki yöntemle de JCV pozitifliği vardı. Birinci yöntemle aynı örnekte BKV ve JCV pozitifliği bulunmazken, ikinci yöntem ile 14 örnekte aynı anda BKV ve JCV pozitifliği saptandı.

Birinci yöntemle negatif saptanan örneklerden; 1 tanesi ikinci yöntemde BKV pozitif, 2 tanesi JCV pozitif, 2 tanesi ise beraber BKV ve JCV pozitif. İkinci yöntemle negatif saptananların hepsi birinci yöntemle de negatifti.

İki yöntem ile elde edilen pozitif örnek sayısı arasındaki farklılıkların, her iki yöntemde kullanılan primer çiftlerinin farklı gen bölgelerini hedef almasına ve bu gen bölgelerinde meydana gelmiş olan değişimlere (nokta mutasyon, delesyon, insersiyon, substisyon vb.) bağlanabilir. Bu değişimler, primer bağlanmasını engelleyerek, yanlış/farklı sonuçlar elde etmeye neden olabilmektedir.

Elde edilen verileri karşılaştırdığımızda, istatistiksel olarak iki yöntem arasında, BKV tespitinde anlamlı bir farklılık bulunduğunu saptadık. Bu da bize uyguladığımız metodun doğruluğunu ispatlamamız gerektiği fikrine yönlendirdi. İki yöntemle çalışma sonrasında, PCR sonuçları arasında farklılık bulunan 19 örnek her iki yöntemle de bir kez daha çalışmaya alındı. İkinci çalışmalarda da benzer PCR sonuçları elde edildi. Sonrasında bu 19 örneğin VP1 bölgesinin sekans analizi Sanger metodu kullanılarak yapıldı. Yapılan dizi analizlerinin sonuçlarına göre 12 örnek birinci yöntemle uyumlu, 4 örnek ikinci yöntemle uyumlu, 3 örnek ise her iki yöntemle de uyumsuz bulundu.

Bulduğumuz duyarlılık ve özgüllük oranları tasarladığımız in-house yöntemin, BKV ve JCV'lerin tespitinde başarıyla kullanılmaya aday bir yöntem olduğunu desteklemektedir. Öyle ki JCV'lerin tespitinde yöntemin duyarlılığı ticari kit ile yaptığımız yöntemin duyarlılığına göre daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu da ticari real-time PCR kitlerinin

hedef gen bölgelerini, teşhiste en iyi performansı sağlamak için yeni elde edilen sonuçlara göre düzenli olarak güncellemeleri gerekliliğini doğurmaktadır.

Çalışmamız bu konudaki ülkemizde yapılan ilk, dünyada yapılan nadir çalışmalardan olup, ‘uygulanması daha az zahmetli ve maliyeti daha ucuz’ bir yöntem olmasıyla da ayrıca önem kazanmaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamız sonucunda, elde edilen farklı sonuçlardan, hedef alınan farklı gen bölgesindeki polimorfizmlerin sorumlu olduğunu ve BKV hedef gen bölgesinde JCV hedef gen bölgesine göre daha fazla değişim olduğunu düşünmekteyiz.
2. Polyomavirüslerin tespitinde in-house yöntem, duyarlılık ve özgüllük oranlarıyla, rutin teşhiste güvenle kullanılmaya aday bir yöntemdir.
3. BKV ve JCV tespitinde uyguladığımız in-house real-time PCR yöntemi uygulanması kolay ve daha az maliyetlidir.
4. Çalışmamız bu konuda ülkemizde yapılan ilk, dünyada yapılan nadir çalışmalardan biridir.
5. PCR tabanlı moleküler analizler polyomavirüslerin teşhisinde merkezi bir role sahiptir. En iyi performansı sağlamak için, hedef alınan bölgeler yeni elde edilen bilgiler ışığında güncellenmelidir. Çalışmamız bu güncellemelere yol gösterici niteliktedir.

7. KAYNAKLAR

- Abedi Kiasari B, Valley PJ, Corless CE, Al-Hammadi M, Klapper PE. Age-related pattern of KI and WU polyomavirus infection. *J Clin Virol.* 2008;43:123-5.
- Agostini HT, Deckhut A, Jobes DV, Girones R, Schlunck G, Prost MG, et al. Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. *J Gen Virol.* 2001;82:1221-31.
- Ahsan N, Shah KV. Polyomaviruses and Human Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2006;577:1-18.
- Aksamit AJ. Treatment of non-AIDS progressive multifocal leukoencephalopathy with cytosine arabinoside. *J Neurovirol.* 2001;7:386-90.
- Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MAA, et al. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol.* 2007;81(8):4130-6.
- Andrews CA, Daniel RW, Shah KV. Serologic Studies of Papovaviruses in Pregnant Women and Renal Transplant Recipients. In: Sever, Madden, editors. *Polyomaviruses and Human Neurological Disease.* New York: Alan R Liss; 1983. p.133-41.
- Antinori A, Cingolani A, Lorenzini P, Giancola ML, Uccella I, Bossolasco S, et al. Clinical epidemiology and survival of progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of highly active antiretroviral therapy: data from the Italian Registry Investigative Neuro AIDS (IRINA). *J Neurovirol.* 2003;9:47-53.
- Arthur RR, Shah KV, Baust SJ, Santos GW, Saral R. Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N Engl J Med.* 1986;315:230-4.
- Babakir-Mina M, Ciccozzi M, Perno CF, Ciotti M. The novel KI, WU, MC polyomaviruses: possible human pathogens? *New Microbiol.* 2011;34(1):1-8.
- Babel N, Fendt J, Karaivanov S, Bold G, Arnold S, Sefrin A, et al. Sustained BK viruria as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: analysis of 4128 urine and serum samples. *Transplant.* 2009;88:89-95.
- Baksh FK, Finkelstein SD, Swalsky PA, Stoner GL, Ryschkewitsch CF, Randhawa P. Molecular genotyping of BK and JC viruses in human polyomavirus-associated interstitial nephritis after renal transplantation. *Am J Kidney Dis.* 2001;38:354-65.
- Barber CE, Hewlett TJ, Geldenhuys L, Kiberd BA, Acott PD, Hatchette TF. BK virus nephropathy in a heart transplant recipient: case report and review of the literature. *Transpl Infect Dis.* 2006;8:113-21.
- Behzad-Behbahani A, Klapper PE, Valley PJ, Cleator GM, Bonington A. BKV-DNA and JCV-DNA in CSF of patients with suspected meningitis or encephalitis. *Infection.* 2003;31:374-8.

- Berger JR, Kaszovitz B, Post MJ, Dickinson G. Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection: a review of the literature with a report of sixteen cases. *Ann Intern Med.* 1987;107:78-87.
- Bernal-Cano F, Joseph JT, Koralnik IJ. Spinal cord lesions of progressive multifocal leukoencephalopathy in an acquired immunodeficiency syndrome patient. *J Neurovirol.* 2007;13:474-6.
- Bialasiewicz S, Lambert SB, Whiley DM, Nissen MD, Sloots TP. Merkel cell polyomavirus DNA in respiratory specimens from children and adults. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):492-4.
- Binet I, Nickeleit V, Hirsch HH, Prince O, Dalguen P, Gudat F, et al. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplant.* 1999;67:918-22.
- Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:238.
- Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Nestasio I, Paganotti A, Veggiani C, et al. BK virus sequences in specimens from aborted fetuses. *J Med Virol.* 2010;82:2127.
- Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Paganotti A, Cocca N, Zaffaroni M et al. Serological evidence of vertical transmission of JC and BK polyomaviruses in humans. *J Gen Virol.* 2011;92(pt 5):1044-50
- Boldorini R, Zorini EO, Vigano P, Nebuloni M, Mena M, Monga G. Cytologic and biomolecular diagnosis of polyomavirus infection in urine specimens of HIV-positive patients. *Acta Cytol.* 2000;44:205-10.
- Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Paganotti A, Veggiani C, Mischitelli M, et al. Genomic mutations of viral protein 1 and BK virus nephropathy in kidney transplant recipients. *J Med Virol.* 2009;81:1385-93.
- Boothpur R, Brennan DC. Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. *J Clin Virol.* 2010;47(4):306-12.
- 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. *Am J Transplant.* 2005;5:1926-33.
- Bridges B, Donegan S, Badros A. Cidofovir bladder instillation for the treatment of BK hemorrhagic cystitis after allogeneic stem cell transplantation. *Am J Hematol.* 2006;81:535-7.
- Brown P, Tsai T, Gajdusek DC. Seroepidemiology of human papovaviruses: discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence among

- remote peoples of the world. *Am J Epidemiol.* 1975;102:331-40.
- Buck CB, Phan GQ, Raiji MT, Murphy PM, McDermott DH, McBride AA. Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. *J Virol.* 2012;86(19):10887.
- Burgos D, Lopez V, Cabello M, Sola E, Gutiérrez C, García I, et al. Polyomavirus BK nephropathy: the effect of an early diagnosis on renal function or graft loss. *Transplant Proc.* 2006;38:2409-11.
- Chakera A, Dyar OJ, Hughes E, Sola E, Gutiérrez C, García I, et al. Detection of polyomavirus BK reactivation after renal transplantation using an intensive decoy cell surveillance program is costeffective. *Transplantation.* 2011;92:1018-23.
- Chang D, Wang M, On WC, Lee MS, Ho HN, Tsai RT. Genotypes of human polyomaviruses in urine samples of pregnant women in Taiwan. *J Med Virol.* 1996;48:95-101.
- Chen T, Hedman L, Mattila PS, Jartti T, Ruuskanen O, Söderlund-Venermo M, et al. Serological evidence of Merkel cell polyomavirus primary infections in childhood. *J Clin Virol.* 2011;50:125.
- Chen T, Mattila PS, Jartti T, Ruuskanen O, Söderlund-Venermo M, Hedman K. Seroepidemiology of the newly found trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *J Infect Dis.* 2011;204(10):1523-6.
- Chen Y, Sharp PM, Fowkes M, Kocher O, Joseph JT, Koralnik IJ. Analysis of 15 novel full-length BK virus sequences from three individuals: evidence of a high intra-strain genetic diversity. *J Gen Virol.* 2004;85:2651-63.
- Chesters PM, Heritage J, McCance DJ. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis.* 1983;147:676-84.
- Cinque P, Scarpellini P, Vago L, Linde A, Lazzarin A. Diagnosis of central nervous system complications in HIV-infected patients: cerebrospinal fluid analysis by the polymerase chain reaction. *AIDS.* 1997;11:1-17.
- Clifford DB, Nath A, Cinque P, Brew BJ, Zivadinov R, Gorelik L, et al. A study of mefloquine treatment for progressive multifocal leukoencephalopathy: results and exploration of predictors of PML outcomes. *J Neurovirol.* 2013;19:351-8.
- Coleman DV, Mackenzie EF, Gardner SD, Poulding JM, Amer B, Russell WJI. Human polyomavirus (BK) infection and ureteric stenosis in renal allograft recipients. *J Clin Pathol.* 1978;31:338-47.
- Cubitt CL. Molecular genetics of the BK virus. *Adv Exp Med Biol.* 2006;577:85.
- Dalianis T, Hirsch HH. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology.* 2013;437(2):63-72.

- Dang X, Koralnik IJ. A granule cell neuron-associated JC virus variant has a unique deletion in the VP1 gene. *J Gen Virol.* 2006;87:2533-7.
- Dang X, Vidal JE, Oliveira AC, Simpson DM, Morgello S, Hecht JH, et al. JC virus granule cell neuronopathy is associated with VP1 C terminus mutants. *J Gen Virol.* 2012;93(pt 1):175-83.
- Dhar R, Seif I, Khoury G. Nucleotide sequence of the BK virus DNA segment encoding small t antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76:565-9.
- 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;87:1019-26.
- Di Taranto C, Pietropaolo V, Orsi GB, Jin L, Sinibaldi L, Degener AM. Detection of BK polyomavirus genotypes in healthy and HIV-positive children. *Eur J Epidemiol.* 1997;13:653-7.
- Doerries K. Human polyomavirus JC and BK persistent infection. *Adv Exp Med Biol.* 2006;577:102-16.
- 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;84:323.
- Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, Wali R, Crowder C, Nogueira J, et al. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant.* 2004;4:2082-92.
- Drew RJ, Walsh A, Ni Laoi B, Conneally E, Crowley B. BK virus (BKV) plasma dynamics in patients with BKV-associated hemorrhagic cystitis following allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2013;15:276-282.
- Du Pasquier RA, Koralnik IJ. Inflammatory reaction in progressive multifocal leukoencephalopathy: harmful or beneficial? *J Neurovirol.* 2003;9:25-31.
- Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. Update on BK virus entry and intracellular trafficking. *Transpl Infect Dis.* 2006;8:62.
- Dumoulin A, Hirsch HH. Reevaluating and Optimizing Polyomavirus BK and JC Real-Time PCR Assays To Detect Rare Sequence Polymorphisms. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1382-8.
- Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ. The human polyomaviruses. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:865-76.
- Eddy BE, Borman GS, Grubbs GE, Young RD. Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell culture as simian virus 40. *Virology.* 1962;17:65-75.
- Eddy BE, Stewart SE, Young R, Mider GB. Neoplasms in hamsters induced by mouse

- tumor agent passed in tissue culture. *J Natl Cancer Inst.* 1958;20(4):747-61.
- Eddy BE, Stewart SE. Characteristics of the SE polyoma virus. *Am J Public Health Nations Health.* 1959;49:1486-92.
- Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis.* 2009;199:837.
- Ehlers B, Wieland U. The novel human polyomaviruses HPyV6, 7, 9 and beyond. *APMIS.* 2013;121:783.
- Eisen DP, Fraser IR, Sung LM, Finlay M, Bowden S, O'Connell H. Decreased viral load and symptoms of polyomavirus-associated chronic interstitial cystitis after intravesical cidofovir treatment. *Clin Infect Dis.* 2009;48:e86-e88.
- Elphick GF, Querbes W, Jordan JA, Gee GV, Eash S, Manley K, et al. The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science.* 2004;306:1380-3.
- Us D, Ustaçelebi Ş. Polyomaviruslar ve Enfeksiyonları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editors. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.* İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2008. p. 1704-10.
- Engels EA. Cancer risk associated with receipt of vaccines contaminated with simian virus 40: epidemiologic research. *Expert Rev Vaccines.* 2005;4(2):197-206.
- Espy MJ, Uhl JR, Mitchell PS, Thorvilson JN, Svien KA, Wold AD, et al. Diagnosis of herpes simplex virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38:795-9.
- Fedele CG, Ciardi M, Delia S, Echevarria JM, Tenorio A. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection and typing of polyomavirus JC, BK and SV40 DNA in clinical samples. *J Virol Methods.* 1999;82:137-44.
- Feltkamp MC, Kazem S, van der Meijden E, Lauber C, Gorbalenya AE. From Stockholm to Malawi: recent developments in studying human polyomaviruses. *J Gen Virol.* 2013;94(Pt 3):482-96.
- Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 2008;319:1096-100.
- Ferrazzi E, Peracchi M, Biasolo MA, Faggionato O, Stefanelli S, Palu G. Antiviral activity of gyrase inhibitors norfloxacin, coumermycin A1 and nalidixic acid. *Biochem Pharmacol.* 1988;37:1885-6.
- Foulongne V, Courgnaud V, Champeau W, Segondy M. Detection of Merkel cell polyomavirus on environmental surfaces. *J Med Virol.* 2011;83(8):1435-9.
- Foulongne V, Sauvage V, Hebert C, Dereure O, Cheval J, Gouilh MA, et al. Human skin

- microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. *PLoS One*. 2012;7(6):e38499.
- Funahashi Y, Iwata S, Ito Y, Kojima S, Yoshikawa T, Hattori R, et al. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous quantification of BK polyomavirus, JC polyomavirus, and adenovirus DNA. *J Clin Microbiol*. 2010;48:825-30.
- Funk GA, Gosert R, Comoli P, et al. Polyomavirus BK replication dynamics in vivo and in silico to predict cytopathology and viral clearance in kidney transplants. *Am J Transplant*. 2008;8:2368.
- Gabardi S, Waikar SS, Martin S, Roberts K, Chen J, Borgi L, et al. Evaluation of fluoroquinolones for the prevention of BK viremia after renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5:1298-1304.
- Ganguly N, Clough LA, Dubois LK, Mcguirk JP, Abhyankar S, Aljitawi OS, et al. Low-dose cidofovir in the treatment of symptomatic BK virus infection in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis of an algorithmic approach. *Transpl Infect Dis*. 2010;12:406-11.
- Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*. 1971;1(7712):1253-7.
- Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog*. 2007;3(5):e64.
- Gheuens S, Ngo L, Wang X, Alsop DC, Lenkinski RE, Koralnik IJ. Metabolic profile of PML lesions in patients with and without IRIS: an observational study. *Neurology*. 2012;79:1041-8.
- Gheuens S, Wuthrich C, Koralnik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy: why gray and white matter. *Annu Rev Pathol*. 2013;8:189-215.
- Gibson PE, Field AM, Gardner SD, Coleman DV. Occurrence of IgM antibodies against BK and JC polyomaviruses during pregnancy. *J Clin Pathol*. 1981;34:674.
- Gjoerup O, Chang Y. Update on human polyomaviruses and cancer. *Adv Cancer Res*. 2010;106:1-51.
- 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. *J Exp Med*. 2008;205:841-52.
- Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol*. 1982;10:91.

- Gralla J, Huskey J, Wiseman AC. Trends in immune function assay (ImmuKnow; Cylex™) results in the first year post-transplant and relationship to BK virus infection. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27:2565.
- Gross L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953;83(2):414-21.
- Gunson RN, Collins TC, Carman WF. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *J Clin Virol*. 2006;35:355-67.
- Hall CD, Dafni U, Simpson D, Clifford D, Wetherill PE, Cohen B, et al. Failure of cytarabine in progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. AIDS Clinical Trials Group 243 Team. *N Engl J Med*. 1998;338:1345-51.
- Han TH, Chung JY, Koo JW, Kim SW, Hwang ES. WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, South Korea. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1766-8.
- Hecht JH, Glenn OA, Wara DW, Wu YW. JC virus granule cell neuronopathy in a child with CD40 ligand deficiency. *Pediatr Neurol*. 2007;36:186-9.
- 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;79:1277-86.
- 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. *N Engl J Med*. 2002;347:488-96.
- Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:611-23.
- Hirsch HH. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant*. 2002;2:25-30.
- Ho J, Jedrych JJ, Feng H, Natalie AA, Grandinetti L, Mirvish E, et al. Human polyomavirus 7-associated pruritic rash and viremia in transplant recipients. *J Infect Dis*. 2015;211:1560.
- Hou J, Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy: JC virus induced demyelination in the immune compromised host. *J Neurovirol*. 2000; 6:98-100.
- Hou J, Major EO. The efficacy of nucleoside analogs against JC virus multiplication in a persistently infected human fetal brain cell line. *J Neurovirol*. 1998;4:451-6.
- ViralZone 2010; http://viralzone.expasy.org/all_by_species/58.html (Erişim tarihi: 05.04.2017).
- Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology*. 2009;384(2):266-73.

- Jin L, Gibson PE, Knowles WA, Clewley JP. BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope. *J Med Virol.* 1993;39:50-6.
- Jin L, Pietropaolo V, Booth JC, Ward KH, Brown DW. Prevalence and distribution of BK virus subtypes in healthy people and immunocompromised patients detected by PCR restriction enzyme analysis. *Clin Diagn Virol.* 1995; 3(3):285-95.
- Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, et al. Taxonomical developments in the family *Polyomaviridae*. *Arch Virol.* 2011;156(9):1627-34.
- Karam G, Hetet JF, Mailliet F, Rigaud J, Hourmant M, Soullillou JP et al. Late ureteral stenosis following renal transplantation: risk factors and impact on patient and graft survival. *Am J Transplant.* 2006;6:352-6.
- Katz-Brull R, Lenkinski RE, Du Pasquier RA, Igor J, Koralnik. Elevation of myoinositol is associated with disease containment in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology.* 2004;63:897-900.
- Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog.* 2009;5(3):e1000363.
- Khalili K, White MK, Sawa H, Nagashima K, Safak M. The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein. *J Cell Physiol.* 2005;204:1.
- Kilham L. Isolation in suckling mice of a virus from C3H mice harboring Bittner milk agent. *Science.* 1952;116(3015):391-2.
- Kitamura T, Aso Y, Kuniyoshi N, Hara K, Yogo Y. High incidence of urinary JC virus excretion in nonimmunosuppressed older patients. *J Infect Dis.* 1990;161:1128-33.
- Kitamura T, Kunitake T, Guo J, Tominaga T, Kawabe K, Yogo Y. Transmission of the human polyomavirus JC virus occurs both within the family and outside the family. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2359.
- Knowles WA, Pillay D, Johnson MA, Hand JF, Brown DW. Prevalence of long-term BK and JC excretion in HIV-infected adults and lack of correlation with serological markers. *J Med Virol.* 1999;59:474-9.
- 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. *J Med Virol.* 2003;71:115-123.
- Knowles WA. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Adv Exp Med Biol.* 2006;577:19-45.
- Koralnik IJ, Schmitz JE, Lifton MA, Forman MA, Letvin NL. Detection of JC virus DNA in peripheral blood cell subpopulations of HIV-1-infected individuals. *J Neurovirol.* 1999;5:430-5.

- Koralnik IJ, Wuthrich C, Dang X, Rottnek M, Gurtman A, Simpson D, et al. JC virus granule cell neuronopathy: a novel clinical syndrome distinct from progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol*. 2005;57:576-80.
- Koukoulaki M, Grispou E, PISTOLAS D, Balaska K, Apostolou T, Anagnostopoulou M, et al. Prospective monitoring of BK virus replication in renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2009;11:1-10.
- Krisl JC, Taber DJ, Pilch N, Chavin K, Bratton C, Thomas B, et al. Leflunomide efficacy and pharmacodynamics for the treatment of BK viral infection. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7:1003-9.
- Kunitake T, Kitamura T, Guo J, F Taguchi, K Kawabe, Y Yogo. Parent-to-child transmission is relatively common in the spread of the human polyomavirus JC virus. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1448.
- Lafon ME, Dutronc H, Dubois V, Pellegrin I, Barbeau P, Ragnaud IM, et al. JC virus remains latent in peripheral blood B lymphocytes but replicates actively in urine from aids patients. *J Inf Dis*. 1998;177:1502-5.
- Landry ML, Eid T, Bannykh S, Major E. False negative PCR despite high levels of JC virus DNA in spinal fluid: Implications for diagnostic testing. *J Clin Virol*. 2008;43:247-9.
- Lautenschlager I, Jahnukainen T, Kardas P, Lohi J, Auvinen E, Mannonen L, et al. A case of primary JC polyomavirus infection-associated nephropathy. *Am J Transplant*. 2014;14:2887.
- Leung AY, Chan MT, Yuen KY, Cheng VC, Chan KH, Wong CL, et al. Ciprofloxacin decreased polyoma BK virus load in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2005;40:528-37.
- Leung AY, Yuen KY, Kwong YL. Polyoma BK virus and haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36:929-37.
- Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, et al. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology*. 2013;436(2):295-303.
- Lima MA, Drislane FW, Koralnik IJ. Seizures and their outcome in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*. 2006;66:262-4.
- Limaye AP, Smith KD, Cook L, Groom DA, Hunt NC, Jerome KR, et al. Polyomavirus nephropathy in native kidneys of non-renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2005;5:614-20.
- Mackey MC. Intravesicular cidofovir for the treatment of polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis. *Ann Pharmacother*. 2012;46:442-6.

- Major EO, Ryschkewitsch C. Human Polyomaviruses (Çeviren: Parlak Ü). In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, editors. *Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology)*. Ankara: Atlas Kitapçılık; Cilt 2, 9.baskı, 2009. p.1612-21.
- Major EO. Human polyomavirus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Marto MA, Roizman B, Strauss SE, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 2175-96.
- Manitpisitkul W, Drachenberg C, Ramos E, Munivenkatappa R, Philosophe B, Klassen D, et al. Maintenance immunosuppressive agents as risk factors for BK virus nephropathy: a case-control study. *Transplantation*. 2009;88:83-8.
- Marra CM, Rajcic N, Barker DE, Cohen BA, Clifford D, Donovan Post MJ, et al. A pilot study of cidofovir for progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS. *AIDS*. 2002;16:1791-7.
- Marzocchetti A, Di Giambenedetto S, Cingolani A, Ammassari A, Cauda R, De Luca A. Reduced rate of diagnostic positive detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid in cases of suspected progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of potent antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4175-7.
- Marzocchetti A, Lima M, Tompkins T, Kavanagh DG, Gandhi RT, O'Neill DW, et al. Efficient in vitro expansion of JC virus-specific CD8(+) T-cell responses by JCV peptide-stimulated dendritic cells from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Virology*. 2009;383:173-7.
- 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. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17:1176-81.
- Mishra N, Pereira M, Rhodes RH, An P, Pipas JM, Jain K, et al. Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy. *J Infect Dis*. 2014;210:1595.
- Moens U, Ludvigsen M, Van Ghelue M. Human polyomaviruses in skin diseases. *Patholog Res Int*. 2011;123491.
- Monaco MC, Atwood WJ, Gravell M, Tornatore CS, Major EO. JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: Implications for viral latency. *J Virol*. 1996;70:7004-12.
- Monaco MC, Jensen PN, Hou J, Durham LC, Major EO. Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *J Virol*. 1998;72:9918-23.
- Neske F, Prifert C, Scheiner B, Ewald M, Schubert J, Opitz A, et al. High prevalence of antibodies against polyomavirus WU, polyomavirus KI, and human bocavirus in German blood donors. *BMC Infect Dis*. 2010;10:215.

- Neu U, Maginnis MS, Palma AS, Ströh LJ, Nelson CD, Feizi T, et al. Structure-function analysis of the human JC polyomavirus establishes the LSTc pentasaccharide as a functional receptor motif. *Cell Host Microbe*. 2010;8:309.
- Neu U, Stehle T, Atwood WJ. The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology*. 2009;384-9.
- Nguyen NL, Le BM, Wang D. Serologic evidence of frequent human infection with WU and KI polyomaviruses. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1199-205.
- Nickeleit V, Hirsch HH, Zeiler M, Gudat F, Prince O, Thiel G, et al. BK-virus nephropathy in renal transplants-tubular necrosis, MHC-class II expression and rejection in a puzzling game. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15:324-32.
- 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. *N Engl J Med*. 2000;342:1309-15.
- Nicol JT, Robinot R, Carpentier A, Carandina G, Mazzoni E, Tognon M, et al. Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, Human polyomaviruses 6, 7 and 9 and Trichodysplasia Spinulosa-associated polyomavirus. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(3):363-8.
- 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. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:1038-48.
- Osorio S, de la Camara R, Golbano N, Marti E, Fedele CG, Nieto S, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after stem cell transplantation, unsuccessfully treated with cidofovir. *Bone Marrow Transplant*. 2002;30:963-6.
- Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet*. 1971;1(7712):1257-60.
- Rafique A, Jiang SC. Genetic diversity of human polyomavirus JCV in Southern California wastewater. *Journal of Water and Health*. 2008;6(4):533-8.
- 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. *J Clin Microbiol*. 2004;42:1176-80.
- Randhawa P, Vats A, Shapiro R. The pathobiology of polyomavirus infection in man. *Adv Exp Med Biol*. 2006;577:148-59.
- Randhawa PS, Khaleel-Ur-Rehman K, Swalsky PA, Vats A, Scantlebury V, Shapiro R, et al. DNA sequencing of viral capsid protein VP1 region in patients with BK virus interstitial nephritis. *Transplantation*. 2002;73:1090.

- Ryschkewitsch C, Jensen P, Hou J, Fahle G, Fischer S, Major EO. Comparison of PCR-southern hybridization and quantitative real-time PCR for the detection of JC and BK viral nucleotide sequences in urine and cerebrospinal fluid. *J Virol Methods*. 2004;121:217-21.
- Safak M, Khalili K. An overview: Human polyomavirus JC virus and its associated disorders. *J Neurovirol*. 2003;9:3-9.
- Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe*. 2010;7(6):509-15.
- Schwarz A, Linnenweber-Held S, Heim A, Bröcker V, Rieck D, Framke T, et al. Factors influencing viral clearing and renal function during polyomavirus BK-associated nephropathy after renal transplantation. *Transplantation*. 2012;94:396-402.
- Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, et al. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol*. 2011;85(9):4586-90.
- Shah KV, Daniel RW, Warszawski RM. High prevalence of antibodies to BK virus, an SV40-related papovavirus, in residents of Maryland. *J Infect Dis*. 1973;128:784-7.
- Shah KV. SV40 and human cancer: a review of recent data. *Int J Cancer* 2007;120(2):215-23.
- Sharif A, Alachkar N, Bagnasco S, Geetha D, Gupta G, Womer K, et al. Incidence and outcomes of BK virus allograft nephropathy among ABO and HLA-incompatible kidney transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7:1320-7.
- Sharma PM, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Randhawa PS. Polyomavirus BK non-coding control region rearrangements in health and disease. *J Med Virol*. 2007;79(8):1199-207.
- Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, et al. Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *J Virol*. 2012;86(19):10321-6.
- Sood P, Senanayake S, Sujeet K, Medipalli R, Van-Why SK, Cronin DC, et al. Donor and recipient BKV-specific IgG antibody and posttransplantation BKV infection: a prospective single-center study. *Transplantation*. 2013;95:896-902.
- Spurgeon ME, Lambert PF. Merkel cell polyomavirus: a newly discovered human virus with oncogenic potential. *Virology*. 2013;435(1):118-30.
- Sriaroon C, Greene JN, Vincent AL, Tucci VT, Kharfan-Dabaja MA, Sandin R. BK virus: microbiology, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations and treatment. *Asian Biomedicine*. 2010;4(1):3-18.

- Steubl D, Baumann M, Schuster T, Fischereeder M, Krämer BK, Heemann U, et al. Risk factors and interventional strategies for BK polyomavirus infection after renal transplantation. *Scand J Urol Nephrol*. 2012;46:466-74.
- Stolt A, Sasnauskas K, Koskela P, Lehtinen M, Dillner J. Seroepidemiology of the human polyomaviruses. *J Gen Virol*. 2003;84:1499-504.
- Stoner GL, Hubner R. The human polyomaviruses: past, present, and future. In: Khalili K, Stoner GL, editors. *Human polyomaviruses, molecular and clinical perspectives*. New York: Wiley-Liss Inc.; 2001. p. 622-6.
- Sugimoto C, Hasegawa M, Kato A, Zheng HY, Ebihara H, Taguchi F, et al. Evolution of human Polyomavirus JC: implications for the population history of humans. *J Mol Evol*. 2002;54:285.
- Sunyaev SR, Lugovskoy A, Simon K, Gorelik L. Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *PLoS Genet*. 2009;5:e1000368.
- Sweet BH, Hilleman MR. The vacuolating virus SV40. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1960;105:420-7.
- Tan CS, Koralnik IJ. JC, BK, and other Polyomaviruses: Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. In: Mandell, Douglas and Bennett editors. *Principles and Practices of Infectious Diseases*. 7th ed. Volume 2. Philadelphia: Churchill Livingstone, Elsevier. 2010. 145: p. 2051-8.
- Tan CS, Koralnik IJ. JC, BK, and other Polyomaviruses: Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. In: Mandell, Douglas and Bennett editors. *Principles and Practices of Infectious Diseases*. 8th ed. Volume 1. Philadelphia: Churchill Livingstone, Elsevier. 2015. 147: p. 1807-14.
- Tan CS, Koralnik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol*. 2010;9:425-37.
- Tolstov YL, Pastrana DV, Feng H, Becker JC, Jenkins FJ, Moschos S, et al. Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int J Cancer*. 2009;125:1250.
- Touzé A, Gaitan J, Arnold F, Cazal R, Fleury MJ, Combelas N, et al. Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1767-70.
- 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 Res*. 2010;149:190-6.
- Trusch F, Klein M, Finsterbusch T, Kühn J, Hofmann J, Ehlers B. Seroprevalence of

- human polyomavirus 9 and cross-reactivity to African green monkey–derived lymphotropic polyomavirus. *J Gen Virol.* 2012;93(pt 4):698-705.
- Udaykumar, Epstein JS, Hewlett IK. A novel method employing UNG to avoid carry-over contamination in RNA-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1993;21:3917-8.
- Unterstab G, Gosert R, Leuenberger D, Lorentz P, Rinaldo CH, Hirsch HH. The polyomavirus BK agnoprotein co-localizes with lipid droplets. *Virology.* 2010;399:322.
- Us D. İnsan Polyomavirusları. In: Ustaçelebi Ş, editor. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.* Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. p. 803-6.
- Us D. Yeni, Daha Yeni, En Yeni İnsan Polyomavirusları: Nereye Kadar? *Mikrobiyol Bul.* 2013;47(2):362-81.
- 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.
- Van der Meijden E, Kazem S, Burgers MM, Janssens R, Bavinck JNB, de Melker H, et al. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(8):1355-63.
- Vanchiere JA, Abudayyeh S, Copeland CM, Lu LB, Graham DY, Butel JS. Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults. *J Clin Microbiol.* 2009;47(8):2388-91.
- Vanchiere JA, Nicome RK, Greer JM, Demmler GJ, Butel JS. Frequent detection of polyomaviruses in stool samples from hospitalized children. *J Infect Dis.* 2005;192:658-64.
- Vendrey A, Bienvenu B, Gasnault J, Thiebault JB, Salmon D, Gray F. Fulminant inflammatory leukoencephalopathy associated with HAART-induced immune restoration in AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol (Berl).* 2005;109:449-55.
- Viallard JF, Ellie E, Lazaro E, Lafon ME, Pellegrin JL. JC virus meningitis in a patient with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2005;14:964-6.
- Vilchez RA, Kusne S. Molecular and clinical perspectives of polyomaviruses: emerging evidence of importance in non-kidney transplant populations. *Liver Transplant.* 2006;12:1457-63.
- Weber T, Trebst C, Frye S, Cinque P, Vago L, Sindic CJ, et al. Analysis of the systemic and intrathecal humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis.* 1997;176:250-4.

- Whiley DM, Mackay IM, Sloots TP. Detection and differentiation of human polyomaviruses JC and BK by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4357-61.
- Wieland U, Mauch C, Kreuter A, Krieg T, Pfister H. Merkel cell polyomavirus DNA in persons without merkel cell carcinoma. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1496.
- Williams JW, Javaid B, Kadambi PV, Gillen D, Harland R, Thistlewaite JR, et al. Leflunomide for polyomavirus type BK nephropathy. *N Engl J Med.* 2005;352:1157-8.
- Wojciechowski D, Chanda R, Chandran S, Lee B, Webber A, Macaraig M, et al. Ciprofloxacin prophylaxis in kidney transplant recipients reduces BK virus infection at 3 months but not at 1 year. *Transplantation.* 2012;94:1117-23.
- Wong AS, Chan KH, Cheng VC, Yuen KY, Kwong YL, Leung AY. Relationship of pretransplantation polyoma BK virus serologic findings and BK viral reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2007;44:830-7.
- Wuthrich C, Cheng YM, Joseph JT, Kesari S, Beckwith C, Stopa E, et al. Frequent infection of cerebellar granule cell neurons by polyomavirus JC in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009;68:15-25.
- Wuthrich C, Dang X, Westmoreland S, McKay J, Maheshwari A, Anderson MP, et al. Fulminant JC virus encephalopathy with productive infection of cortical pyramidal neurons. *Ann Neurol.* 2009;65:742-8.
- Yanagihara R, Nerurkar VR, Scheirich I, Agostini HT, Mgone CS, Cui X, et al. JC virus genotypes in the western Pacific suggest Asian mainland relationships and virus association with early population movements. *Hum Biol.* 2002;74:473-88.
- Yiannoutsos CT, Major EO, Curfman B, Jensen PN, Gravell M, Hou J, et al. Relation of JC virus DNA in the cerebrospinal fluid to survival in acquired immunodeficiency syndrome patients with biopsy-proven progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol.* 1999;45:816-21.
- Yogo Y, Sugimoto C, Zhong S, Homma Y. Evolution of the BK polyomavirus: epidemiological, anthropological and clinical implications. *Rev Med Virol.* 2009;19(4):185-99.
- Yogo Y, Kitamura T, Sugimoto C, Ueki T, Aso Y, Hara K, et al. Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J Virol.* 1990;64:3139-43.
- Yogo YS, Sugimoto C. The archetype concept and regulatory region rearrangement. In: Khalili K, Stoner GL, editors. *Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives.* New York: NY:Wiley-Liss; 2001. p. 127-48.
- Yu G, Greninger AL, Isa P, Phan TG, Martínez MA, de la Luz Sanchez M, et al.

Discovery of a novel polyomavirus in acute diarrheal samples from children. PLoS One. 2012;7(11):e49449.

Zhong S, Randhawa PS, Ikegaya H, Chen Q, Zheng HY, Suzuki M, et al. Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. J Gen Virol. 2009;90:144.



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı:25

Toplantı Tarihi: 22.01.2016

Karar Sayısı:2016/424:Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR' in "BK ve JC virüslerinin klinik örneklerden tespitinde küçük t geni ve büyük T geni bazlı Real-Time PCR metotlarının karşılaştırılmalı değerlendirilmesi" başlıklı uzmanlık tez çalışması ile ilgili 19.01.2016 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Arş. Gör. Dr. Uğur TÜZÜNER' in yan dal uzmanlık tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR' in sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR

Yardımcı Araştırmacılar: Arş. Gör. Dr. Uğur TÜZÜNER, Dr. Murat ŞEVİK, Prof. Dr. Rüçhan SERTÖZ

ASLI GİBİDİR

22.01.2016

Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZÜGLÜ
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

