

283948

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOPLUMUMUZDA ÇEŞİTLİ YAŞ GRUPLARINDA
BK VİRUS ANTİKOR DÜZEYLERİNİN SAPTANMASI VE
BÖBREK VE KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONLU HASTALARDA
BK VİRUS AKTİVASYONUNUN
SEROLOJİK VE VİROLOJİK YÖNDEN ARAŞTIRILMASI**

MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

Mik. Uzm. A. DÜRDAL US

ANKARA — 1991

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TOPLUMUMUZDA ÇEŞİTLİ YAŞ GRUPLARINDA
BK VİRUS ANTİKOR DÜZEYLERİNİN SAPTANMASI VE
BÖBREK VE KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONLU HASTALARDA
BK VİRUS AKTİVASYONUNUN
SEROLOJİK VE VİROLOJİK YÖNDEN ARAŞTIRILMASI

MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

Mik. Uzm. A. DÖRDAL US

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Prof. Dr. ŞEMSETTİN USTAÇELEBİ

ANKARA - 1991

DOKTORA TEZ SAVUNMA JÜRİSİ

PROF. DR. EKREM GÜLMEZOĞLU
BAŞKAN

PROF. DR. AYFER GÜNALP
ÜYE

PROF. DR. RASİM CİCİOĞLU
ÜYE

PROF. DR. ŞEMSETTİN USTACELEBİ
DANIŞMAN ÜYE

PROF. DR. RUHİ ALAÇAM
ÜYE

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>SAYFA NO</u>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	52
6. ÖZET	63
7. KAYNAKLAR	64

G İ R İ Ş

Papovaviridae ailesi, polyoma alt grubunda yer alan BK virusu (BKV), ilk olarak 1971 yılında Gardner tarafından böbrek transplantasyonu yapılan ve immunosüpresif tedavi alan bir hastanın idrarından izole edilmiş ve hastanın ad ve soyad başharfleri ile adlandırılmıştır (1).

Yeni insan polyoma virusu olan BKV nin ilk izolasyonu Vero hücre kültürlerinde yapılmış olmasına rağmen virus, insan embriyonik böbrek (HEK) ve insan diploid akciğer fibroblast (WI-38) hücrelerinde de üretilmektedir (2). İkozahedral yapılı, çıplak bir DNA virusu olan BKV, 43.6 nm büyüklüğündedir ve çeşitli yapısal polipeptidlerin yanısıra immünolojik yönden grubun diğer üyeleri ile çapraz reaksiyon veren intranükleer T ve t (tümör) antijenlerine sahiptir (2,3). BKV un onkojenik potansiyeli de, in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiştir (4,5).

BKV, genellikle belirtisiz bir enfeksiyonla vücuda girmektedir. Konağa giriş yolu tam olarak bilinmemekle beraber solunum yolu olduğu düşünülmektedir (6). Primer enfeksiyondan sonra böbrek dokusuna yerleşen virus latent bir döneme girmekte ancak immün sistemde meydana gelen bir değişikliklerle reaktif olabilir (7). Yapılan çalışmalar, immün süpresif tedavi alan böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda, immün yetmezliği olanlarda, sitotoksik ilaç kullananlarda, diabetli, kanserli ve otoimmün hastalığı olanlarda ve hamilelikte virusun reaktif olduğunu ve idrarla salındığını göstermektedir (8-17).

BKV, dünya üzerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Çeşitli ülkelerde

yapılan seroepidemiolojik çalışmalar bu virusun birçok toplumda enfeksiyon etkeni olduğunu göstermiştir (6,18). BKV enfeksiyonunun genellikle erken çocukluk döneminde kazanıldığı ve populasyonlarda bu virusa karşı antikor varlığı oranının oldukça yüksek olduğu bildirilmektedir (19,20).

Seropozitiflik oranını saptamak amacıyla hemaglütinasyon önlenim (HÖ), kompleman birleşmesi (KB) ve nötralizasyon (Nt) testleri uygulanarak alınan sonuçlara göre, 3-4 yaş grubunda % 50, 4-6 yaş grubunda % 73, 10-14 yaş grubunda % 90 dan fazla, erişkinlerde ise % 70-80 oranında seropozitiflik saptanmıştır (21,22).

Doğada yaygın olarak bulunmasına rağmen, primer BKV enfeksiyonu sağlıklı çocuklarda herhangi bir klinik hastalık oluşturmamaktadır. Hafif seyreden solunum yolu enfeksiyonu sırasında bu çocuklarda serokonversiyon gösterilebilmektedir (23,24). Solunum yolu hastalığının yanı sıra, BKV nin hemorajik sistit ve üriner sistem enfeksiyonuna da neden olabileceği bildirilmektedir (6).

BKV reaktivasyonu özellikle böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda büyük önem taşımakta ve üreterik stenoz gibi komplikasyonlara neden olabileceği ileri sürülmektedir (25,26). Bu nedenle risk altındaki kişiler ve organ vericileri latent bir BKV enfeksiyonu yönünden değerlendirilmelidir.

Yapılan çalışmalar hamilelik sırasında da BKV reaktivasyonunun olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum konjenital bir enfeksiyon riskini düşündürmektedir ancak konuyla ilgili araştırmalar çelişkili sonuçlar vermektedir (27-30).

Onkojenik potansiyeli, immun süpresif hastalarda reaktivasyonu ve konjenital enfeksiyon riski yönünden ilk izole edildiği yıllardan bu yana ilgileri üzerinde toplayan BKV ile ilgili bugüne değin yurdumuzda herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Sunulan çalışmanın amacı aşağıdaki şekilde planlanmıştır :

1. Toplumumuzda çeşitli yaş gruplarındaki sağlıklı bireylerde BK virusa karşı antikor insidansını ve düzeylerini HÜ testiyle araştırmak,
2. Latent enfeksiyon oluşturan BK virusun, böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda reaktivasyonunu serolojik ve virolojik yöntemlerle göstermek,
3. BKV serolojisinde pratik olarak kullanılan HÜ, KB ve ELISA-IgG testlerinin duyarlılık ve özgüllüklerini saptamak.

Çeşitli yaş gruplarında BKV a karşı antikor düzeylerinin ve prevalansının saptanması, özellikle çocukluk yaş döneminde geçirilen ve eti-yolojisi tanımlanamayan viral solunum yolları enfeksiyonları arasında BKV un yerini belirlemek açısından yararlı olacaktır. Ayrıca bu çalışma, böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda reaktive olduğu bilinen birçok latent virusun yanı sıra BKV un da yer aldığıının gösterilmesi konusunda ilk ve öncü bir araştırma olacaktır kanısındayız.

G E N E L B İ L G İ L E R

Papovaviruslar, DNA içeren kanser viruslarıdır. Bu gruptaki ilk virus, yenidoğan farede neoplazi oluşturmaları nedeniyle polyomavirus (= tümör oluşturan virus) olarak adlandırılmıştır. Daha sonra, Sweet ve Hilleman, Rhesus maymun böbrek kültürlerinde latent olarak bulunan SV₄₀ virusunu tanımlamışlardır. Bu virusun da yenidoğan hamsterlere enjeksiyonu ile sarkoma oluşturduğu gösterilmiştir (2).

İnsan polyomavirusları ise ilk kez Progresif Multifokal Lökoensefalopati (PML)'li bir hastanın beyin dokusundan (JC) ve böbrek transplantasyonu yapılan ve immünsüpresif tedavi alan bir hastanın idrarından (BK) izole edilmişlerdir (1,31).

1971 yılında Gardner tarafından tanımlanan BK virus (BKV), ikozahedral simetrik ve çıplak bir virustur. Büyüklüğü 43.6 nm olan BKV 72 kapsomer içermektedir. BKV DNA sı çembersel çift iplikli yapıda olup uzunluğu 5 Kb kadardır. DNA histonlarla birlikte nükleozomlar oluşturmaktadır (3). Molekül ağırlığı 3.4×10^6 dalton olan DNA 4963 baz çifti içermektedir. Moleküler hibridizasyon teknikleriyle BK ve JC viruslarının genomları ve bunların SV₄₀ ile ilişkileri incelenmiştir. Genom haritaları karşılaştırıldığında, BKV ile SV₄₀ arasında % 70, BKV ile JCV arasında ise % 85 homoloji saptanmıştır (18). Bu benzerlikler, BKV, JCV ve SV₄₀ arasında evrimsel bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Bugün artık BKV DNA'sının fiziksel haritası çeşitli restriksiyon enzimleriyle belirlenmiştir (32).

BKV, enfekte ettiği hücrelerde üretken veya üretken olmayan enfeksiyon oluşturabilmektedir. Üretken enfeksiyonda hücreye pinositoz ile giren virionlar nükleusa taşınmakta ve intranükleer V antijeni inokülasyondan 40 saat sonra saptanmaktadır. Progeni virionlar 4 gün sonra lizis ile hücreden olgunlaşırlar (3). BKV tarafından sentezlenen 3 erken protein vardır ve tümör (T,t) antijenleri olarak bilinmektedir. T antijenleri çekirdekte, t antijenleri stoplazma veya çekirdekte yer almaktadır. Membrana bağlanan antijenler ise orta T (Middle T=MT) olarak isimlendirilmiştir (2). T ve MT antijenleri onkojenik özelliğe sahiptir. T antijenlerinin de viral replikasyon ve transformasyondan sorumlu olduğu bildirilmektedir (2). Yapılan çalışmalar, T antijeninin 97 bin, t antijeninin 17 bin dalton molekül ağırlığında olduğunu ve her iki molekülde ortak dizilerin bulunduğunu göstermiştir (3). BKV un geç proteinleri ise 4 tanedir ve bunlardan 3 ü virion içinde yer alır. Kapsid proteini olan VP-1 (virion protein 1) ortak antijendir. VP-2 ve VP-3 ise minor kapsid proteinleridir. Dördüncü protein olan agnoproteinin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber virionların biraraya gelmesi sırasında rol oynadığı düşünölmektedir (2).

Üretken olmayan enfeksiyonda ise virus, hücreleri transforme etmektedir. Viral DNA hücresel DNA ya kovalent olarak ve özgül olmayan bölgelere bağlanmaktadır (2).

BKV, fare embryo, fare böbrek, fare derialtı dokusu, primer insan fetal beyin veya böbrek, insan diploid akciğer (WI-38), insan deri veya embryo fibroblast hücre kültürlerinde üretken enfeksiyona neden olurken tavşan, Rhesus maymun ve Vero (Afrika yeşil maymun devamlı böbrek) hücre kültürlerinde yarı üretken (semipermissive) enfeksiyona neden

BKV, enfekte ettiği hücrelerde üretken veya üretken olmayan enfeksiyon oluşturabilmektedir. Üretken enfeksiyonda hücreye pinositoz ile giren virionlar nükleusa taşınmakta ve intranükleer V antijeni inokülasyondan 40 saat sonra saptanmaktadır. Progeni virionlar 4 gün sonra lizis ile hücreden olgunlaşırlar (3). BKV tarafından sentezlenen 3 erken protein vardır ve tümör (T,t) antijenleri olarak bilinmektedir. T antijenleri çekirdekte, t antijenleri stoplazma veya çekirdekte yer almaktadır. Membrana bağlanan antijenler ise orta T (Middle T=MT) olarak isimlendirilmiştir (2). T ve MT antijenleri onkojenik özelliğe sahiptir. T antijenlerinin de viral replikasyon ve transformasyondan sorumlu olduğu bildirilmektedir (2). Yapılan çalışmalar, T antijeninin 97 bin, t antijeninin 17 bin dalton molekül ağırlığında olduğunu ve her iki molekülde ortak dizilerin bulunduğunu göstermiştir (3). BKV un geç proteinleri ise 4 tanedir ve bunlardan 3 ü virion içinde yer alır. Kapsid proteini olan VP-1 (virion protein 1) ortak antijendir. VP-2 ve VP-3 ise minor kapsid proteinleridir. Dördüncü protein olan agnoproteinin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber virionların biraraya gelmesi sırasında rol oynadığı düşünülmektedir (2).

Üretken olmayan enfeksiyonda ise virus, hücreleri transforme etmektedir. Viral DNA hücresel DNA ya kovalent olarak ve özgül olmayan bölgelere bağlanmaktadır (2).

BKV, fare embryo, fare böbrek, fare derialtı dokusu, primer insan fetal beyin veya böbrek, insan diploid akciğer (WI-38), insan deri veya embryo fibroblast hücre kültürlerinde üretken enfeksiyona neden olurken tavşan, Rhesus maymun ve Vero (Afrika yeşil maymun devamlı böbrek) hücre kültürlerinde yarı üretken (semipermissive) enfeksiyona neden

olmaktadır (3). Buna karşın BKV, hamster, sıçan, fare, tavşan, Afrika yeşil maymun ve Rhesus maymunlarından hazırlanan çeşitli hücre kültürlerini de transforme etme yeteneğindedir (3). Transformasyonun majör kriteri, hücrelerin % 90 veya daha fazlasında çekirdek içi T antijenlerinin saptanması ancak V antijeninin ya da enfeksiyöz virusun saptanmamasıdır.

BKV, insan O grubu ve kobay eritrositlerini 4°C de hemaglutine etme yeteneğindedir. Serojik testlerde SV₄₀ a karşı antiserumla zayıf reaksiyon vermekte ancak grubun diğer üyelerine karşı hazırlanmış antiserumla reaksiyon vermemektedir (6). Aglutininler 56°C de 1 saat stabil kalır ve eter ve kloroform ile reaktivasyona dirençlidir (33). Diğer bütün papovaviruslar gibi BKV da, ısıya ve formaline oldukça duyarlı, etere dirençlidir (33).

BKV, ürettiği hücrede birkaç haftada (1-3 hafta) sitopatik etki oluşturmaktadır. Sitopatik etki, stoplazmanın koyulaşması, granüler, yuvarlak hücre oluşumu ve daha ileri safhada hücre kümeleşmesi şeklindedir (34). Aynı zamanda virus, ürettiği hücrede çekirdeğin değişmesine ve büyümesine neden olmaktadır. Hücre çekirdeğinde bazofilik inklüzyon cisimcikleri oluşur ve histolojik boyalarla boyandığında kuş gözü (bird eye) olarak adlandırılan görünüme sebep olur.

BK Virus ile Primer Enfeksiyon

Primer BKV enfeksiyonu klinik olarak genellikle belirtisiz geçmektedir ve spesifik bir sendrom ile ilişkili değildir (6). Enfeksiyon sıklıkla çocukluk döneminde kazanılmakta ve özellikle küçük çocuklarda akut üst solunum yolu enfeksiyonu şeklinde seyretmektedir (22). BKV ile ilk karşılaşma muhtemelen 1 yaşından önce olmakta ancak maternal antikör

girmektedir. Normal insan böbrek dokusunda BKV DNA sının persistansının gösterilmesine karşın beyin dokusunda gösterilememiştir (7,40).

İmmunokompetan çocuk ve erişkinlerde primer enfeksiyon sırasında nadiren viremi veya idrarla virus salınımı olmakla birlikte enfeksiyon sonrası seropozitif kişilerin idrarlarında virus saptanamamaktadır (18).

Seroepidemioloji

Seroepidemiyolojik çalışmalar, insan polyomavirusu olan BKV un doğada insan popülasyonunda çok yaygın olduğunu ortaya koymaktadır. Brown ve ark. ın farklı popülasyonlar arasında yaptıkları geniş bir seroepidemiyolojik çalışmada BKV antikor pozitiflik oranı % 75-90 olarak bulunmuştur. Bu araştırmacılar Brezilya, Paraguay, Yeni Gine ve Malezya gibi izole bölgelerdeki popülasyonların ise bu virusla hiç karşılaşmadığını ya da çok az karşılaştığını belirtmişler ve BKV antikor pozitiflik oranını bu ülkelerde % 0-20 olarak bildirmişlerdir (41).

Finlandiya'da yapılan bir çalışmada 10 yaşından küçük çocuklarda BKV HÜ antikor pozitifliği % 60 (36), İngiltere'de aynı yaş grubunda % 83 (35), A.B.Devletlerinde % 100 (42), Portekiz'de % 85, Norveç'te % 70 (43) ve İtalya'da % 85 (44) olarak saptanmıştır. Bu çalışmalarda, 12-27 yaş grubunda % 80-90, 18-40 yaş grubunda % 75-80 ve daha ileri yaş grubunda % 65-75 oranlarında seropozitiflik gösterilmiştir.

Bu bulgular ışığında BKV un bazı izole toplumlar dışında tüm dünya üzerinde çok yaygın olduğunu, virusun erken çocukluk döneminde kazanıldığını ve çocukların yaklaşık % 90 ının 10 yaşına kadar BKV antikorlarına sahip olduğunu söylemek mümkündür. Genç erişkinlerde de bu oranlar yüksek seyretmekte ve ileri yaşlarda % 65-75 oranına düşerek devam etmektedir

varlığı nedeniyle bebekler korunmaktadır (18). Ancak daha ileriki yaşlarda ve özellikle 4-6 yaş arasında BKV enfeksiyonu geçirilmektedir. Dolayısıyla 10 yaşına kadar olan çocukların % 83 ünde BKV antikorları saptanabilmektedir (35). Ayrıca, rinit ve rinofarenjit ile birlikte ÜSYE olan çocuklarda BKV serokonversiyonu gösterilmiş ve bu çocukların tonsillerinde BKV DNA sı saptanmıştır (24).

ÜSYE şikayetleriyle hastaneye başvuran 66 çocuk üzerinde yapılan bir çalışmada ise bunların 11 inin seri serum örneklerinde BKV serokonversiyonu belirlenmiştir (36). İngiltere'de yapılan bir başka araştırmada da 1-11 yaş arasında ÜSYE, ateş, döküntü, kusma, konvulsiyon ve lenfadenopati şikayetleri olan çocukların % 20 sinde BKV e özgül IgM antikorları saptanmıştır (6). Bu bulgular, primer BKV enfeksiyonunun subklinik geçirilmesinin yanısıra açık bir hastalık şeklinde de seyredebileceğinin indirekt kanıtıdır.

BKV un konağa giriş yolu tam olarak bilinmemekle beraber ÜSYE ile olan ilişkisi, virusun oral olarak veya solunum yolu ile kazanıldığını göstermektedir (21).

Primer BKV enfeksiyonunun sistit ile ilişkisi olduğu da ileri sürülmektedir. Akut hemorajik sistiti olan küçük çocukların idrarlarından BKV izolasyonu yapıldığı ve BKV IgM antikorlarının saptandığı bildirilmiştir (37,38). Ayrıca, immün yetmezliği olan bir başka çocukta BKV un tubulointerstisyel nefrite neden olduğunun gösterilmesiyle de bu virusun atipik primer enfeksiyonlara yol açabileceği ortaya konmuştur (39).

Akut solunum hastalığı veya nadiren sistit şeklinde geçirilen primer enfeksiyondan sonra BKV böbrek dokusuna yerleşerek latent döneme

(21). Genç erişkinlerde BKV antikorlarının ikinci bir pik yapmasını bazı araştırmacılar seksüel aktiviteye bağlamaktadırlar (6).

BKV un doğada yaygın olmasına karşın kaynağının ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. BKV için hayvan orijinli olma ihtimali araştırılmış ancak hiçbir bulgu elde edilememiştir (18). Bugün için insandan insana bulaştığı kabul edilen BKV, latent olarak böbrek dokusuna yerleştiğinden sıklıkla idrar veya böbrekten izole edilebilmektedir (6,7). Yapılan çalışmalarda BKV, dışkı, nazofarengeal sekresyonlar ya da BOS'tan izole edilememiştir. Ancak DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları BKV un renal kanalda sınırlı kalmadığını ve BKV genomunun tonsiller, lenf nodları, dalak ve akciğerde saptanabildiğini ortaya koymaktadır (24,40).

Renal Transplantasyonlu Hastalarda BKV Enfeksiyonu

BKV un ilk izolasyonunun böbrek transplantasyonu yapılan bir hastadan gerçekleşmiş olması, bu konu üzerindeki çalışmaları hızlandırmıştır. İlk izolasyonu takiben daha sonra birçok araştırmacı renal transplant alıcısının idrarlarından BKV u izole etmeyi başarmışlardır. Bu hastalarda BKV reaktivasyonu ayrıca serokonversiyonun ya da BKV e özgül IgM antikorlarının gösterilmesi ile de gösterilmiştir (8,45). Hogan ve Coleman renal allograft alıcılarında BKV antikor titrelerinin transplantasyondan sonra belirgin olarak yükseldiğini ve titre artışı ile idrardan virus salınımı arasında önemli bir ilişki olduğunu savunmaktadırlar (9,25).

Böbrek transplantasyonu yapılan çeşitli hasta grupları üzerindeki çalışmalar bu hastaların % 20 sinde BKV reaktivasyonunun olduğunu ve idrar örneklerinin sitolojik yöntemlerle incelenmesinin de yararlı olacağını göstermektedir (46,47).

Böbrek allograft alıcılarında primer BKV enfeksiyonu, seropozitif bir donörden seronegatif bir alıcıya böbrek naklinden sonra ortaya çıkmaktadır. Bu enfeksiyondan donör böbreğinde latent olarak bulunan BKV sorumlu tutulmaktadır (48). Primer enfeksiyonların % 10 ya da daha az oranlarda ortaya çıktığı bildirilmektedir (6).

Transplantasyondan önce seropozitif olan hastalarda ise transplantasyon sonrası immunosüpresif ilaçların kullanılması sonucu BKV reaktif olarak sekonder enfeksiyon oluşturmaktadır. Bu hastalarda meydana gelen BKV reaktivasyon oranının donördeki antikor titresi ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (47). Böbrek transplantasyonlu hastaların idrarlarından BKV izole edilebilmekte ya da sitolojik olarak gösterilebilmektedir. Bu hastalarda virus salınım oranı % 10-45 arasında değişmektedir (6,21). Oranların bu denli farklı olması, virüsün zaman aralıklarına göre değişmesi ve virus saptanmasında kullanılan yöntemlerin farklılığından kaynaklanmaktadır.

BKV enfeksiyonu, transplantasyondan sonraki 4-8 haftada ortaya çıkar. Ancak bazen bu süre 12 ayı bulabilir (18). Virüsün idrarla salınımı ise birkaç günden birkaç haftaya hatta birkaç aya kadar devam edebilmektedir (21). Hastaların % 35-50 sinde serolojik olarak enfeksiyonu kanıtlamak mümkündür. Bu şekilde gerek seri serum örneklerinde BKV antikor titresinde artış gerekse özgül BKV-IgM antikorları saptanabilmektedir (47). Yapılan çalışmalar özellikle seronegatif bir alıcıya seropozitif bir donörün böbreğinin transplante edilmesinin büyük bir risk olacağını vurgulamaktadır (21,47).

Böbrek transplantasyonundan sonra BKV enfeksiyonu genellikle sub-klinik ve patolojik etkisi tam olarak bilinmemektedir (6,9). Ancak

nadiren de olsa üreterik stenoz ve obstrüksiyon gibi komplikasyonlar bildirilmiştir (9,26). Stenoza uğramış üreter laparotomi ile çıkarılıp histolojik olarak incelendiğinde ülserli ve fibrozlu üreter duvarında iskemik değişiklikler saptanmaktadır (18). Aynı zamanda, üreterik daralmanın olduğu bölgede ürotelyumda çok sayıda inklüzyon içeren hücreler gözlenmektedir. Üreterik obstrüksiyonun, BKV un üreterdeki transisyonel epitel hücrelerinin proliferasyonunu indüklemesi sonucu ortaya çıktığı saptanmıştır (6).

Böbrek transplantasyonlu hastalarda BKV enfeksiyonunun en önemli komplikasyonu olan üreterik obstrüksiyon transplantasyondan sonra 50-300 gün içinde ortaya çıkabilmektedir. Bu hastalarda tanı ancak graft nefrektomi ya da postmortem olarak konulabilir (6). Post-transplant periodda üreterik obstrüksiyonun görülme sıklığı yaklaşık % 1 oranındadır. Virusun ilk izole edildiği 1971 yılından 1984 yılına kadar bu şekilde 10 vaka bildirilmiştir (1,9,26,49). Dolayısıyla böyle şüpheli bir durumda idrar ya da doku biyopsi örneğinin sitolojik incelemesinde inklüzyon içeren hücrelerin görülmesi polyomavirus tanısını destekleyecektir. Böylece immun süpresyon dozu azaltılarak böbrek graftın kaybı önlenabilir.

Yakın zamana kadar, böbrek transplantasyonunu takiben en sık karşılaşılan virusun CMV olduğu düşünülüyorsa da son yıllardaki çalışmalar, bu tip hastalarda polyomavirusların da önemli oranda etkili olduğunu göstermektedir (49).

Kemik iliği Transplantasyonlu Hastalarda BKV Enfeksiyonu

Bilindiği gibi, kemik iliği transplantasyonu, kombine immun yetmezliği olanlarda, kemik iliği aplasilerinde, akut lenfoblastik ve myeloid

lösemili hastalarda geniş çapta uygulanmaktadır. Bu hastalarda immün süpresyon tedavisi ile birlikte hücrel ve humoral immunitenin bozulmasıyla fırsatçı viral enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır. BK ve JC virusları da bu hastaların idrarlarından yalnız veya birlikte izole edilebilmekte ve özellikle ağır immunosüpresif tedavi uygulanan myeloid lösemili hastalarda virüri insidansında artış olmaktadır (50).

Kemik iliği alıcılarında BKV reaktivasyonu HSV, CMV ve EBV dan sonra dördüncü sırayı almakta ve transplantasyonu takiben 2-8 hafta içinde ortaya çıkmaktadır (51). Kemik iliği transplantasyonu yapılan önceden seropozitif hastaların % 55 inde BK virürisi ile birlikte reaktivasyon gösterilmiş ve BK virürisi ile hemorajik sistit arasında önemli bir ilişki bulunmuştur (51,52). Ayrıca bu tip hastalarda geçici hepatik fonksiyon bozukluğu da bildirilmektedir (50,51).

BKV, kemik iliği transplantasyonundan sonra hücrel immün fonksiyonların bozulmasıyla reaktif olmakta ve BKV a özgü hücrel cevabın baskılanmasıyla da virüri oluşmaktadır (53). BK virürisi, idrardan virus izolasyonu ya da serolojik yöntemler ile gösterilebilmektedir (53).

Kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda BKV reaktivasyonunun hemorajik sistit ile olan ilişkisi dikkate alınmalı ve endojen BKV reaktivasyonu kontrol altında tutulmaya çalışılmalıdır (51).

Hamilelikte BKV Enfeksiyonu ve Konjenital Enfeksiyon Riski

BKV un onkojenik potansiyeli ve hamile kadınların viral enfeksiyonlara olan duyarlılığı dikkate alındığında, hamilelik sırasında BKV reaktivasyonunun araştırılması ve transplasental geçiş ile ilişkisi önem kazanmaktadır.

İlk kez 1975 yılında hamilelik sırasında BKV reaktivasyonu gösterilmiş ve izlenen bu kadınların bebeklerinde % 7.5 oranında BKV-IgM antikorlarında pozitiflik saptanmıştır (29). Bunu izleyen araştırmalar, polyomavirus enfeksiyonlarının hamile kadınlarda sık görüldüğünü ve % 3-7 sinde virüsünün bulunduğunu ortaya koymuştur (6,18). Ancak virüsü, genellikle diabet, sarkoidoz ve tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu gibi altta yatan bir hastalığı olan hamilelerde ortaya çıkmaktadır. Önceden seropozitif olan sağlıklı hamile kadınlarda ise reaktivasyon olsa dahi virüsü olmaz ve reenfeksiyon belirtisizdir (6). Virus salınımı olmaksızın, sadece yükselen antikor titreleriyle hamilelerin % 20 sinde BKV reaktivasyonu olduğu saptanmıştır (12,27).

Hamilelik sırasında polyomavirus reaktivasyonunun gösterilmesi, virusun transplasental geçişinin olup olmadığı konusunda şüpheler uyandırmıştır. Deneyisel olarak fare polyomavirusunun transplasental geçişi saptanmış ve bazı araştırmacılar hamile kadınlarda kord kanında BKV-IgM antikorlarını göstermişlerdir (29,54,55). Rhiza ve ark. ise konjenital enfeksiyona bağlı anomalileri olan bebeklerde BKV-IgM antikorlarının varlığını saptamışlardır (55). Ancak bu bulgulara karşın, bir grup araştırmacı çalışmalarında transplasental geçişi gösteren herhangi bir kanıt bulamadıklarını ileri sürmektedirler (27,28,30,56,57).

Transplasental geçiş ve konjenital enfeksiyon ile ilgili bu farklı görüşlere rağmen BKV in onkojenik potansiyeli düşünüldüğünde fötüs üzerindeki risk tam olarak ortadan kalkmamaktadır.

BKV un Onkojenik Potansiyeli

Papovavirusların onkojenik yetenekleri uzun zamandan beri bilinmektedir. Bu aile içerisinde yer alan BKV un da deney hayvanlarında tümör

oluşturduğu ve çeşitli hücre kültürlerinde transformasyona neden olduğu saptanmıştır (58,59). BKV, hamsterlere subkütan verildiğinde zayıf onkojenite gösterirken intravenöz veya intraserebral verildiğinde kuvvetli onkojenik etki gösterir. Intraserebral inokülasyonda hamsterlerin çoğunda sıklıkla malign papiller ependimoma nadiren de koroid pleksus papillomu, inulinoma ve osteosarkoma gelişebilmektedir (60,61,62).

Ancak, insan polyomaviruslarının insan tümörlerindeki rolü tartışmalıdır. Wiskott Aldrich'li bir çocuğun beyin sarkoma hücrelerinden BKV izolasyonunun gerçekleştirilmesi (63) bu yöndeki araştırmalara hız kazandırmıştır. Yapılan çalışmalarda, BKV DNA'sının insan hücrelerinde de transformasyona neden olduğu gösterilmiştir (64). Daha sonraki bir çalışmada ise, 74 beyin tümörlü hastanın 18 inde ve 5 pankreas tümörlü hastanın 2 sinde blot hibridizasyon analizi ile BKV DNA'sı saptanmıştır (65,66). Ayrıca, transforme insan fetal beyin ve böbrek hücrelerinde persistan BKV enfeksiyonu da bildirilmektedir (5,67). Malignant tümörlü hastalarda yapılan serolojik çalışmalarda herhangi bir bulgu elde edilmemesine karşın bir grup kanserli hastada BKV tümör antijenine karşı özgül antikorların gösterilmesi anlam taşımaktadır (11,55). Ancak, bu bulguları destekleyen çalışmalar da mevcuttur (68,69).

Kanserli çocuklar, kemoterapi alan tümörlü hastalar, AIDS ve Kaposi Sarkoma'lı hastalarda BKV enfeksiyonunu gösteren bulgular da bildirilmektedir (13,14,15,16,70).

Bütün bu bulgular, BKV'nin insan tümörlerindeki rolünü tam olarak açıklayamamaktadır. Örneğin kanserli hastalarda BKV-T antijenine karşı antikorların saptanması, hücresel immün sistemdeki bozukluk sonucu vücutta latent olarak bulunan virusun litik faza geçmesi nedeniyle mümkün

olabilir. Benzer olarak, tümör hücrelerinde BKV DNA sının bulunması da, dokularda önceden varolan enfeksiyöz virusun, tümör hücrelerinin mitotik aktivitelerinin artmasıyla fazla miktarda sentez edilmesi sonucu olabilir. Dolayısıyla bugün için insan polyomaviruslarının onkojenik potansiyelinin bilinmesine rağmen insan tümörleriyle ilişkisi aydınlatılamamıştır.

BKV Enfeksiyonlarının Tanısı

Primer BKV enfeksiyonlarının genellikle belirtisiz ya da hafif ve nonspesifik üst solunum yolu bulguları ile seyretmesi nedeniyle tanı klinikte pratik olarak zorunluluk arzetmemektedir. Ancak, ayırıcı tanı amacıyla ya da seroepidemiolojik olarak BKV enfeksiyonu serolojik yöntemlerle belirlenebilir. Bu şekilde, BKV-özüml IgM antikorlarının varlığı veya akut ve konvelesan serum örneklerinde antikor titresindeki artışın gösterilmesi mümkün olmaktadır.

Böbrek ve kemik iliği transplantasyonlu hastalar ve kemoterapi alan kanserli hastalar gibi immünsüpresif bireylerde ise serolojik tanının yanı sıra idrar örneklerinden virusun izolasyonu ve sitolojik inceleme yöntemleri de değer taşımaktadır.

Laboratuvar tanı yöntemleri

Virus izolasyonu : BKV izolasyonu, hastadan alınan steril idrar örneğinin HEK ve Vero hücre kültürlerine inokülasyonu ile yapılabilmektedir. Virus izolasyonu genellikle birkaç hafta alabilmekte ve virusa özgül sitopatik etki ile saptanabilmektedir. Virus üremesinin saptanması ve titrasyonu, enfekte hücre kültürü sıvısının insan O grubu eritrositleri kullanılarak hemagglütinasyon testine tabi tutulmasıyla da belirlenebilir (1).

Sitolojik inceleme : Hastaların idrar sedimentinden hazırlanan preparatların papanicalou, hematoksilen eosin veya giemsa ile boyanmasıyla transisyonel hücrelerde genişleme, hiperkromatik çekirdek içi inklüzyonlar ve çekirdek zarında kalınlaşma ile karakterize sitolojik değişiklikler incelenebilir. Inklüzyonlar, çekirdek zarından ayrılmış ve tipik "baykuş gözü" görünümündedir. Eksfoliye olmuş hücrelerde bulunan virus antijenleri immunofloresans yöntemiyle de saptanabilir (71,72).

Elektron mikroskopi : Hastadan alınan idrar örnekleri 20.000 rpm de santrifüj edildikten sonra negatif boyama ile elektron mikroskopunda incelenebilir. Immun elektron mikroskopi yöntemi ile de virionlar gösterilebilmektedir (73).

Serolojik testler : Birçok viral enfeksiyonun tanısında olduğu gibi, bireylerde BKV antikorlarının saptanmasında ya da enfeksiyonun takibi sırasında serolojik yöntemler yardımcı olmaktadır. Kazanılmış bağışıklığın belirlenmesi amacıyla kişilerde BKV antikorlarının gösterilmesinde ve seroepidemiyolojik çalışmalarda en sık kullanılan test HÜ testidir. Bu yöntemde, test serumlarının RDE (reseptor destroying enzyme) veya sodyum periodatla inaktivasyonu ve insan O grubu eritrositlerle absorbe edilmesi gerekmektedir. HÜ testinde insan O grubu eritrositleri % 0.5 lik süspansiyonda hazırlanarak kullanılmaktadır.

BKV antikorlarının saptanmasında, kompleman birleşmesi testinin de yeri vardır. Ancak bu testte antikor titreleri, HÜ testine göre oldukça düşük bulunmakta ve seroepidemiyolojik çalışmalar için tavsiye edilmemektedir (35).

Son yıllarda sıklıkla kullanılan ELISA testi de BKV IgG ve IgM antikorlarının saptanmasında önem taşımaktadır. Özellikle akut enfeksiyon

sırasında oluşan IgM antikorlarının gösterilmesi amacıyla immünsüpresif ilaç alan hasta gruplarında tercih edilmektedir (55,56).

Bunların yanısıra BKV serolojisinde kullanılan diğer testler arasında immunofloresans, nötralizasyon, western immunoblotting ve RIA yer almaktadır (57,72,74-79).

Son yıllarda teknolojinin gelişmesine paralel olarak BKV tanısında da çok daha duyarlı yöntemler uygulanabilmektedir. Bunlar arasında ise DNA hibridizasyon ve polimeraz zincir reaksiyonu(PCR) bulunmaktadır. Bu yöntemlerle klinik bir örnekte polyomavirus DNA sı kısa zamanda ve çok spesifik olarak gösterilebilmektedir (10,80).

BKV Enfeksiyonlarında Bağışıklık

Primer BKV enfeksiyonu sırasında, diğer viral enfeksiyonlarda olduğu gibi hüморal immun cevap ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyonun akut döneminde IgM antikorlarının yanısıra IgA tipi antikorlar da oluşmaktadır. IgA tipi antikorların IgM antikorlarından daha uzun süre serumda kaldığı gösterilmiştir (79). Enfeksiyon sırasında IgM antikorlarından sonra oluşan IgG tipi antikorlar da bilindiği gibi uzun yıllar serumda saptanabilmektedir. BKV a karşı oluşan IgG ve IgM antikorlarının nötralizan etkilerinin bilinmesine karşın IgA nın biyolojik etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir. BKV-IgG ve IgA antikorlarının uzun süre serumda bulunması, virusun persistansı, reaktivasyonu ya da reenfeksiyon gibi nedenlerle sürekli antijenik uyarımın olduğunu ortaya koymaktadır (79).

BKV enfeksiyonlarında oluşan hüморal immun cevaba rağmen latent virusun reaktivasyonu ve idrarla salınımı yüksek antikor titreleri ile önlenememekte hatta birbiri ile ilişkili bulunmaktadır (51,79). Dolayısıyla

BKV enfeksiyonlarında hücresele immunitenin daha büyük önem taşıdığı ortaya çıkmaktadır. Hücresele immun sistemin baskılandığı durumlarda örneğin kemoterapi alanlarda, immun süpresif veya sitotoksik ilaç kullananlarda BKV reaktivasyonu sıklıkla bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, immun bireylerden alınan lenfositlerin in-vitro şartlarda BKV antijeni ile proliferere olduğu ancak immun olmayan kişilerden alınan lenfositlerin proliferasyona uğramadığı gösterilmiştir (81).

İnsan papovavirus enfeksiyonu sırasında, virusun latent olarak kaldığı hücrelerde viral antijenlerin sentezi olabilir veya olmayabilir (58, 82). Çalışmalar, BKV un lökosit ve monositlerde de bulunabileceğini ancak bu hücrelerde viral antijen sentezinin yapılmadığını bildirmektedir (83,84).

Hamilelik sırasında da BKV un reaktif olması hormonal değişikliklerden ziyade immunolojik mekanizmalara dayanmaktadır (6). Virus reaktivasyonunun monosit/lenfosit oranı yüksek kadınlarda daha sık olduğu ve idrarla virus salınımının saptandığı bildirilmektedir (85). Bu mekanizmanın, makrofajların prostaglandin sentezi üzerinde kuvvetli baskılayıcı etki göstermesiyle monosit/lenfosit oranının artması ve virusun reaktivasyon riskini arttırması şeklinde olduğu düşünülmektedir (85).

BKV Enfeksiyonlarında Tedavi

Bugün için, primer veya sekonder BKV enfeksiyonlarının tedavisinde bilinen ve kullanılan antiviral bir ajan mevcut değildir. BKV un reaktivasyonu sonucu üreteral stenoz tesbit edilen böbrek transplantlı hastalara 3×10^6 U dozda intramuskuler olarak uygulanan interferon tedavisinin de başarılı olmadığı bildirilmektedir (86).

Latent virus enfeksiyonlarının tedavisindeki sorunlar nedeniyle bugünkü şartlarda semptomlara yönelik tedavi daha uygulanabilir görünmektedir. BKV un latentliği ve patogenezi ile ilgili yeni bilgiler, ileride etkin bir antiviral ajan geliştirilmesinde yararlı olacaktır.

G E R E Ç V E Y Ö N T E M

Virus : Orijinal BK virus GS suşu Dr. Sylvia Gardner, Virus Reference Laboratory, Colindale, Londra'dan temin edildi. Özel şartlarda saklanmak suretiyle gönderilen virus örneği tek tabaka Vero hücre kültürlerine 0.1 ml ekilerek üretildi ve antijen hazırlanarak kullanıldı.

Standart serumlar : Pozitif ve negatif standart serumlar, Dr. S. Gardner, Virus Reference Laboratory, Colindale, Londra'dan temin edildi.

Hücre Kültürleri : BKV un üretilmesi için Vero (Afrika yeşil maymun devamlı böbrek) hücre kültürleri kullanıldı. Vero hücre kültürleri orijinal olarak Flow Laboratuvarları, Irvine, Scotland'dan sağlandı. Hücre kültürleri 50 ml kapasiteli Greiner (Labortechnic) disposable şişelerinde monolayer olarak üretildi ve seri pasajlarla devam ettirildi.

Test Serumları ve İdrar Örnekleri : Hacettepe Üniversitesi, Marmara Üniversitesi ve Karadeniz Tıp Fakültesi Hastanelerine başvuran ve akut üst solunum yolu enfeksiyonu şikayeti olmayan çeşitli yaş gruplarındaki bireylerden ve Hacettepe Üni. Tıp Fakültesinde görev yapan sağlıklı gönüllülerden alınan kan örneklerinden ayrılan serumlar çalışılincaya kadar -25°C de saklandı. Ayrıca, transplantasyon yapılan hastalarda virus reaktivasyonunu araştırmak amacıyla, Hacettepe Üni. hastanelerinde böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalardan transplantasyondan önce ve 21 gün sonra olmak üzere 2 serum örneği toplandı. Ayrıca bu hastalardan transplantasyondan sonra olmak üzere steril idrar örnekleri alındı ve fenol red ve sodyum bikarbonat ile pH ları nötral pH a ayarlandı.

İdrar örneklerine daha sonra penisilin-streptomisin içeren antibiyotik süspansiyonu eklenerek buzdolabında bir süre bekletildi ve tek tabaka olmuş Vero hücre kültürlerine ekildi.

Hücre Kültürü Hazırlanmasında Kullanılan Vasat ve Solüsyonlar

Üretim vasatı : Vero hücre kültürlerinin üretilmesi için Eagle's MEMO (Minimal Essential Medium Otoclavable) vasatı ticari olarak Gibco firmasından sağlandı. Toz halindeki vasattan 9.526 gr, 1000 ml iyonsuz suda çözülerek 121°C de 15 dakika otoklavda steril edildi ve kullanılıncaya kadar 4°C de saklandı. Hücre kültürleri için kullanılacağı zaman sodyum bikarbonat (NaHCO_3) ile pH sı nötral pH a ayarlandı ve içine üremeyi desteklemek amacıyla % 1 oranında glutamin ve % 10 oranında fetal dana serumu eklendi. Bakteriyel kontaminasyonun önlenmesi için de % 1 streptomisin-penisilin ilave edildi.

Fetal Dana Serumu : Gibco firmasından ticari olarak sağlanan 500 ml hacimdeki FCS, 100 ml lik hacimlere bölünerek -25°C de, çözüldükten sonra ise 4°C de saklandı.

Glutamin : Isıya duyarlı olmasından dolayı MEMO vasatı içeriğinde bulunmayan L-glutamin, ticari olarak Sigma firmasından sağlandı. Yüz ml iyonsuz suda çözülen 2.92 gr glutamin süspansiyonu Seitz filtresinden süzülerek steril edildi ve 4°C de saklandı.

Streptomisin-Penisilin Süspansiyonu : 1 milyon ünite kristalize penisilin ve 1 gr streptomisinin 100 ml steril iyonsuz su içerisinde çözülmesiyle hazırlanan SP solüsyonu, 10 ar ml olmak üzere steril kapaklı tüplere dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar -25°C de saklandı.

Sodyum bikarbonat (NaHCO_3) çözeltisi : Hücre kültürü vasatlarının pH sınırın ayarlanması amacıyla kullanılan bu solüsyon, 100 ml iyonsuz suda 7.8 gr NaHCO_3 ün çözülmesiyle hazırlandı ve 10 atm. de 15 dakika steril edilerek 4°C de saklandı.

Fosfat-tuzlu su tamponu (PBS) : Hücre kültürlerinin artık maddelerden temizlenmesi ve yıkanması amacıyla kullanılan PBS standart formüle göre (Dulbecco's PBS) hazırlandı (87a). Kullanılincaya kadar 4°C de saklandı.

Tripsin : Proteolitik bir enzim olan tripsin, hücre pasajı sırasında hücrelerin şişe yüzeyinden ayrılması amacıyla kullanıldı ve aşağıdaki formüle göre hazırlandı :

NaCl		4.00 gr
KCl		0.10 gr
Na_2HPO_4		0.575 gr
veya		
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.720 gr
KH_2PO_4		0.10 gr
Tripsin		2.50 gr

Bu maddeler 500 ml iyonsuz suda eritildi ve 0.5 ml fenol kırmızısı eklenerek % 7.8 lik NaHCO_3 ile pH ayarlandı. Bir gece 4°C de bekletildikten sonra 5 ml SP eklendi ve Seitz filtresinden süzülerek steril edildi. 100 er ml olmak üzere şişelere bölündü ve kullanılincaya kadar -25°C de saklandı.

Versene : Hücre kültürlerinin pasajı sırasında kullanılan bu kelat ajanı Ca ve Mg iyonlarını tutarak hücrelerin şişe yüzeyinden ayrılmasını sağlamaktadır. Versene solüsyonu aşağıdaki formüle göre hazırlandı :

NaCl		4.00 gr
KCl		0.10 gr
Na_2HPO_4		0.575 gr
KH_2PO_4		0.10 gr
Versene (EDTA)		0.10 gr

(EDTA : Ethylene diamine tetra-acetic acid disodyum tuzu)

Bu maddeler 500 ml iyonsuz suda eritilerek, otoklavda 15 dakika 10 atm. de steril edildi ve 4°C de saklandı.

Hücre Kültürlerinin Pasajlarla Çoğaltılması :

Bu amaçla, tek tabaka olarak üretilen hücre kültürlerinin vasatı dökülerek tripsin-versene karışımı ile iyice yıkandı. Bu karışım döküldükten sonra tekrar 0.1 ml tripsin ve 0.1 ml versene ilave edilerek hücreler 37°C de 5-10 dakika bekletildi. Böylece tüm hücrelerin şişe yüzeyinden iyice ayrılması sağlandı. Hücreler tamamıyla döküldükten sonra hücre kültürü şişesine 5 ml MEMO vasatı eklenerek pipetaj yapıldı. Bu hücre süspansiyonu, steril kapaklı bir tüpe alınarak 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Bu süre sonunda, üst sıvı atılarak hücre çökeleği 5 ml MEMO vasatı ile pipetaj yapıldı ve her şişeye 2×10^8 hücre düşecek şekilde 2 ya da 3 şişeye bölünerek üzerlerine (5-7 ml) % 10 FCS ve % 1 SP içeren MEMO vasatı eklendi. 37°C lik etüve kaldırılan hücre kültürleri hergün izlenerek gerektiğinde vasatın pH sı % 7.8 lik NaHCO_3 ile nötral pH ya ayarlandı. Gerektiğinde ise, ölü hücrelerin ve yoğun metabolik artıkların uzaklaştırılması amacıyla hücreler PBS solüsyonu ile yıkanarak, üzerlerine yeni vasat eklendi. 3-4 gün içinde tek tabaka olarak üreyen hücre kültürleri, bu şekilde tekrar pasajlarla çoğaltıldı (87a) (Resim 1-a).

Hücre Kültürlerinde BKV un Üretilmesi ve Antijenin Hazırlanması :

Bu amaçla, tek tabaka halinde üretilen Vero hücre kültürlerinin vasatları dökülerek PBS ile yıkandıktan sonra, hemagglütinasyon titresi 1/256 olan BKV GS suşu 0.1 ml inoküle edildi ve 37°C de 90 dakika, 10 dakikada bir karıştırılarak inkübe edildi. Böylece virusun hücrelere adsorbsiyonu ve penetrasyonu sağlandı. Bu süre sonunda virus ekili hücre kültürlerinin üzerine % 2 FCS, % 1 glutamin ve % 1 SP içeren MEMO vasa-

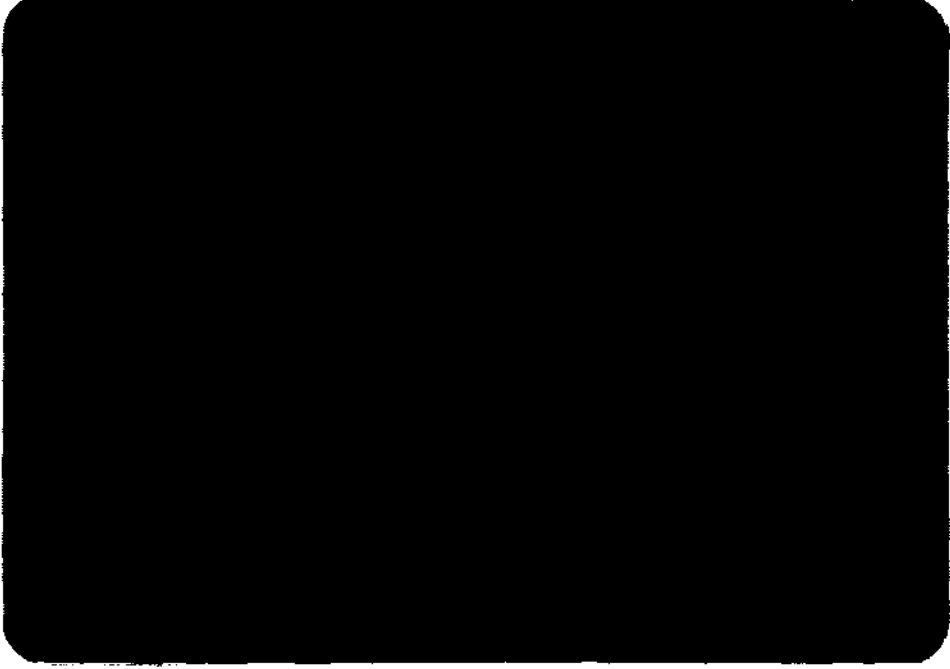
tından 7 ml eklenerek inkübasyona bırakıldı. Hücreler hergün sitopatik etki yönünden izlenerek gerektiğinde NaHCO_3 ile pH ayarlandı. Hücre yuvarlaklaşması ve granülasyon ile karakterize sitopatik etki 10-15 inci günde saptandı. Virus üremesi, belirli aralıklarla alınan hücre kültürü vasatının hemagglütinasyon testine tabi tutulmasıyla da izlendi. Tam sitopatik etkinin görüldüğü 3 ya da 4 üncü haftalarda üreyen virus titresi hemagglütinasyon testi ile saptandıktan sonra enfekte hücreler tamamen dökülerek kültür vasatı steril kapaklı tüplere alındı. 50 Watt da 30-60 saniye sonifiye edildi (Sonifier B-12) ve bu işlemle hücrelerin parçalanması ve virusun vasata geçmesi sağlandı. Bu süspansiyon, 20 dakika, 2000 rpm de santrifüj edilerek üst sıvı alındı ve 1 ml lik hacimlere bölünerek antijen olarak kullanılmak üzere -25°C de saklandı. Kullanılacağı zaman antijenin titresi hemagglütinasyon testi ile saptandı (33).

BKV antijeninin hazırlanması sırasında, normal hücre kültürlerine de virus ekilmeksizin aynı işlemler uygulandı ve kontrol antijen olarak kullanıldı. Vero hücre kültürlerinde üretilen BKV, antijen hazırlanmasının yanısıra yeni hücreleri enfekte etmek amacıyla küçük miktarlara bölünerek -25°C de stok olarak saklandı (Resim 1-b).

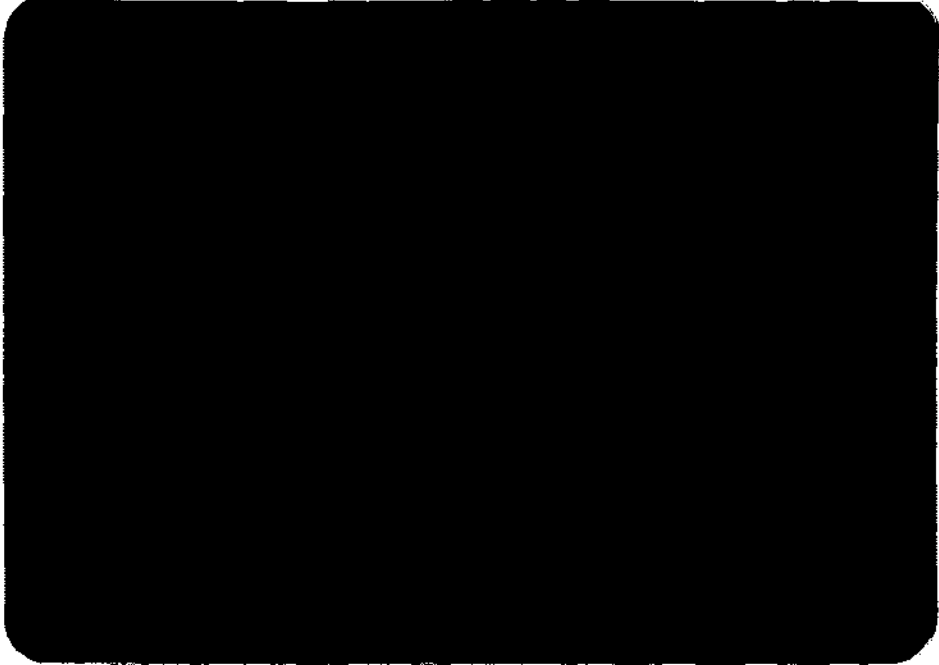
Hücre Kültürlerinde Üretilen BKV Titresinin Hemagglütinasyon (HA) ile Saptanması :

Deneyde kullanılan solüsyon ve gereçler :

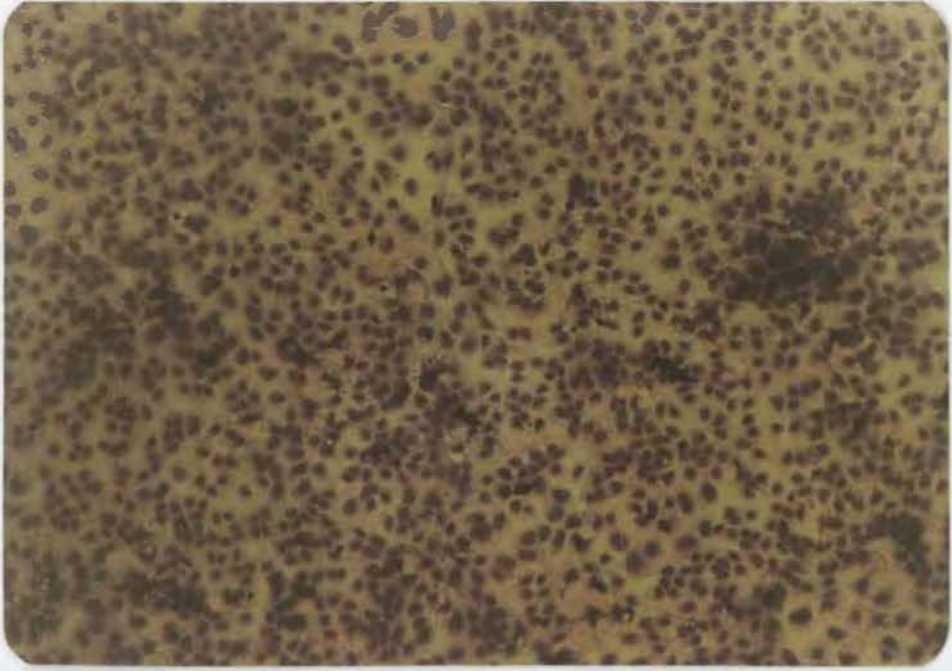
Eritrositler : HA ve HÖ deneylerinde kullanılan insan 0 grubu eritrositleri, heparinli tüpe alınan 0 grubu kanın 3-4 kez serum fizyolojik (SF) ile yıkanması ile hazırlandı. Paket eritrositlerin SF içerisinde % 0.5 lik süspansiyonu yapılarak deneyde kullanıldı.



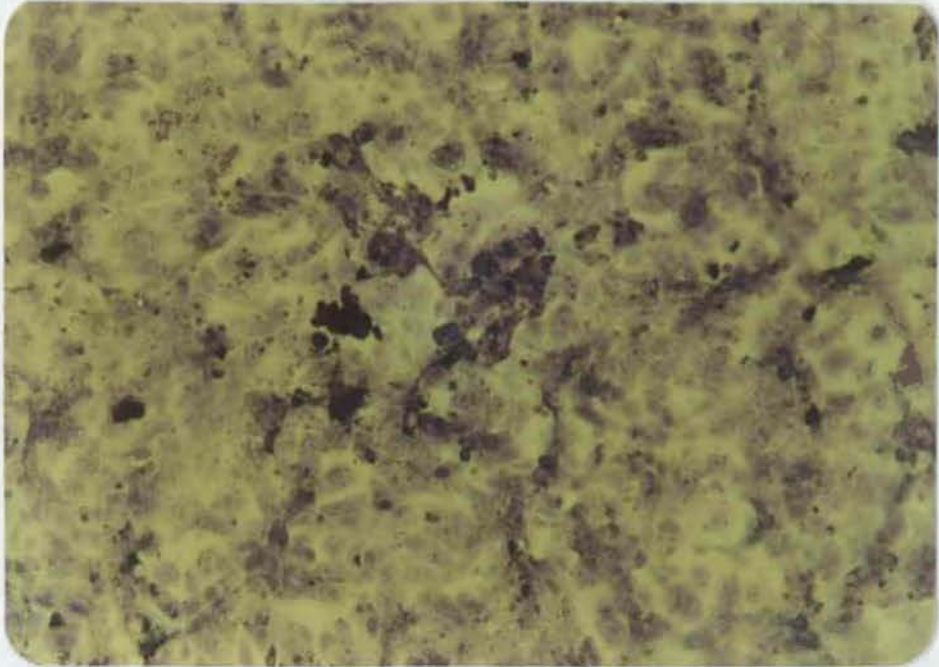
Resim 1-a : Normal devamlı maymun böbrek hücre kültürü (Vero)
(Giemsa boyası, 10X).



Resim 1-b : BK virusu ile enfekte olan Vero hücre kültürlerinde
oluşan sitopatik etki. Enfeksiyonun 14. günü.
(Giemsa boyası, 10X).



Resim 1-a : Normal devamlı maymun böbrek hücre kültürü (Vero)
(Giemsa boyası, 10X).



Resim 1-b : BK virusu ile enfekte olan Vero hücre kültürlerinde
oluşan sitopatik etki. Enfeksiyonun 14. günü.
(Giemsa boyası, 10X).

Serum Fizyolojik (SF) : HA ve HÖ deneylerinde Baxter firması tarafından ticari olarak sağlanan steril SF kullanıldı.

Mikroteknik gereçleri :

- Mikrodiluter (loop) : 0.025 ml sıvı tutma yeteneğinde bir araçtır.
- Damlalık pipeti : 0.025 ml damla verme yeteneğinde olan polipropilen yapısında özel pipetlerdir.
- Test Kağıtları (go-no-go) : Loopların hacmini kontrol etmek için kullanılan ve üzerinde 0.025 ml sıvı emme yeteneğinde daireler bulunan özel emici kağıtlardır.
- U tabanlı pleytler : Tabanları U şeklinde olan ve 8x12 adet çukur içeren polistiren yapısında pleytlerdir.
- Test okuma aynası : Deney sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan içbükey (konkav) yapıda bir aynadır.

Hemaglütinasyon Deneyi : Hücre kültürlerinde üretilerek hazırlanan BKV titresini HA deneyi ile saptandı (87b).

- U tabanlı pleytin çalışılacak tüm çukurlarına 0.025 ml SF damlatıldı.
- İlk çukura diluter ile test edilecek virus örneğinden 0.025 ml konuldu ve seri sulandırılmaları yapıldı. Üzerlerine 0.050 ml SF damlatıldı.
- Tüm çukurlara % 0.5 lik insan 0 grubu eritrosit süspansiyonundan 0.025 ml damlatılarak pleytler karıştırıldı ve 4°C de en az 1 saat inkübe edildi.
- Eritrosit kontrol çukuruna ise, 0.075 ml SF ve 0.025 ml % 0.5 lik insan 0 grubu eritrositleri damlatıldı.
- Değerlendirme : Tam hemaglütinasyon gösteren en yüksek virus sulandırımı, 1 HA ünitesi olarak kabul edildi. HÖ deneyinde 4 HA ü antijen kullanıldı. Çalışmamızda hücre kültürlerinde ürettiğimiz BKV un 1 HA ünitesi 1/256 olarak saptandı ve HÖ deneyinde 1/64 oranında sulandırılarak kullanıldı.

Test Serumlarında BKV Antikorlarının Hemaglutinasyon Önlenim (HÖ) Deneyi ile Saptanması :

Çeşitli yaş gruplarından toplanan serum örneklerinde BKV antikorları HÖ deneyi ile araştırıldı. Deneyden önce tüm serum örnekleri absorbe ve inaktive edildi.

Test serumlarının absorpsiyonu : Test serumlarında insan 0 grubu eritrositlerine karşı bulunabilecek antikorların ortadan kaldırılması amacıyla tüm serumlar, 3 kez SF ile yıkanmış insan 0 grubu paket eritrositleri ile absorbe edildi. Bu amaçla, serum örneklerinin içerisine 0.05 ml paket eritrosit eklenerek oda ısısında 30 dakika bekletildi ve daha sonra serum örnekleri 2000 rpm de 5-7 dakika santrifüj edilerek eritrositler serumdan uzaklaştırıldı (1).

Test serumlarının inaktivasyonu : Test serumlarındaki özgül olmayan inhibitörlerin uzaklaştırılması amacıyla önce tüm serumlar 56°C de 30 dakika ısı ile inaktive edildi. Daha sonra tüm serum örnekleri sodyum periodat (NaIO_4) ile aşağıdaki gibi muamele edildi (33) :

- 1 volüm (0.1 ml) serum örneği üzerine 3 volüm (0.3 ml) M/90 NaIO_4 eklendi ve 15 dakika oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra üzerine 6 volüm (0.6 ml) % 0.6 lık gliserol eklendi ve böylece NaIO_4 ın fazlası nötrale edilmiş oldu.
- Bu şekilde hazırlanan ve final dilüsyonu 1/10 olan serum örnekleri HÖ deneyine alındı.

Esas Deney :

- Mikropleyitin çalışılacak tüm çukurlarına 0.025 ml SF damlatıldı.
- İlk çukurlara inaktive edilerek 1/10 dilüsyonda hazırlanmış serum örneklerinden 0.025 ml diluter ile konuldu ve seri sulandırılmaları hazırlandı. Böylece serum örnekleri 1/20 titreden başlayarak 1/2560 titreye kadar sulandırılmış oldu.

- Tüm çukurlara 0.025 ml daha önce HA testi ile titresi saptanmış vi-rus antijeninden 4 HA nitesi eklendi ve bu karışım 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- Daha sonra tüm çukurlara 0.025 ml SF ve 0.025 ml % 0.5 lik insan 0 grubu eritrosit süspansiyonundan eklendi ve mikropleytler 4°C de en az 1 saat inkübe edildi.
- Virus kontrol çukuru, 0.050 ml SF, 0.025 ml virus ve 0.025 ml % 0.5 lik insan 0 grubu eritrosit süspansiyonu damlatılarak hazırlandı.
- Eritrosit kontrol çukuru, 0.075 ml SF ve 0.025 ml % 0.5 lik insan 0 grubu eritrosit süspansiyonu damlatılarak hazırlandı.
- Her seri çalışmada ayrıca negatif ve pozitif kontrol serumları da teste alındı.
- Değerlendirme : Virus kontrol çukurunda hemaglütinasyon, eritrosit kontrol çukuruna çökme olduğunda test değerlendirildi ve hemaglti-nasyonun tamamen önlendiği en yüksek serum sulandırımı o serumun H antikor titresi olarak kaydedildi (Resim 2).



Test Serumlarında BKV Antikorlarının Kompleman Birleşmesi Deneyi (KBD) ile Saptanması :

Test serumlarında BKV antikorlarının saptanmasında KBD in duyarlılığı ve HÖ testi ile uyumluluğunu belirlemek amacıyla farklı HÖ titrelerine sahip çeşitli yaş gruplarına ait serum örneklerinde KBD kullanılarak BKV antikorları aranmıştır.

Kullanılan madde ve solüsyonlar :

Veronal Buffer (VB) : VB solüsyonu, içerdiği Ca ve Mg iyonları nedeniyle KBD inde, komplemanın yüksek serum dilüsyonlarında bile tam olarak fikse edilmesini sağlamak amacıyla dilüent olarak kullanıldı ve aşağıdaki formüle göre hazırlandı :

NaCl	8.50 gr
5.5 diethyl barbitürük asit	0.575 gr
Na 5.5 diethyl barbitürat	0.20 gr
MgCl ₂ . 6H ₂ O	1.65 gr
CaCl ₂	0.28 gr

Hazırlanırken, önce barbitürük asit 50 ml sıcak iyonsuz suda eritildi. Diğer maddeler eklenerek iyonsuz su ile 200 ml ye tamamlandı ve otoklavda 20 dakika, 120°C de steril edilerek 4°C de saklandı. Kullanılırken iyonsuz su ile 1/5 lik sulandırımı yapıldı ve pH 7.2 ye ayarlandı (87c).

Eritrositler : KBD inde kullanılan koyun eritrositleri, H.Ü. Deney Hayvanları Bölümünden sağlandı. Standart yöntemlere göre hazırlanan ve eritrositlerin stabilitesini sağlayan Alsever solüsyonunda 4°C de saklandı (87c). Kullanılacağında VB ile 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek 3 kez yıkandı ve üst sıvı tamamen berrak olduğunda paket eritrositler alınarak deneyde kullanıldı.

Hemolitik Serum : Koyun eritrositlerine karşı tavşandan elde edilen anti-koyun eritrosit antikorlarını içeren hemolitik serum, Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsünden sağlandı.

Hemolitik Sistem : Paket koyun eritrositlerinin VB içerisinde hazırlanan % 4 lük süspansiyonu ile yine VB ile 1/100 oranında sulandırılmış hemolitik serumun eşit hacimlerde karıştırılmasıyla hazırlandı. 15 dakika 37°C de bekletilerek duyarlılaştırıldıktan sonra deneyde kullanıldı.

Kompleman : Kompleman olarak 1 yaşından küçük erkek kobaydan alınan kalp kanının ayrılan serumu -25°C de saklandı. Kullanılacağı zaman aşağıdaki yöntemle titre tayini yapıldı.

- Mikropleyitin çalışılacak çukurlarına 0.025 ml VB damlatıldı.
- Test edilecek komplemandan loop ile 0.025 ml alınarak ilk çukura kondu ve diğer çukurlara seri dilüsyonları yapıldı.
- Tüm çukurlara tekrar 0.050 ml VB ve daha sonra hemolitik sistemden 0.025 ml damlatıldı.
- Hemolitik sistem kontrol çukuruna ise, 0.075 ml VB ve 0.025 ml hemolitik sistem eklendi.
- Mikropleyt 37°C de, 30 dakika karıştırmak suretiyle 1 saat inkübe edildi. Daha sonra 4°C ye kaldırılarak tam çökme sağlandıktan sonra sonuçlar değerlendirildi.
- Değerlendirme : % 50 hemoliz ve % 50 çökmenin saptandığı kompleman sulandırımı 1 kompleman ünitesi olarak kabul edildi (Hemolitik Doz 50 - HD₅₀). KBD inde ise komplemanın 4 ünitesi kullanıldı.

KBD de Kullanılan BKV Antijeninin Hazırlanması :

Tek tabaka olarak üretilmiş Vero hücre kültürlerine ekilerek 2-3 hafta inkübe edilen BKV, yüksek HA titresi (1/512) verdiği hücreler tamamen dökülerek vasat sıvısı steril bir tüp içinde toplandı ve 3 kez

dondurulup çözüldü (1). Bu şekilde, hücrelerin parçalanmasıyla olgunlaşmış virus antijenlerinin tamamen sıvıya geçmesi sağlandı. Daha sonra bu süspansiyon 20 dakika 2000 rpm de santrifüj edilerek üst sıvı alındı ve antijen olarak kullanılmak üzere küçük hacimlere bölünerek -25°C de saklandı. Kullanılacağında antijenin titresi chessboard yöntemiyle saptandı.

BKV-KB antijeninin hazırlanışı sırasında, normal hücre kültürlerine de virus ekilmeksizin aynı işlemler uygulanarak kontrol antijen olarak kullanıldı.

Antijen ve Antiserum Titrelerinin Chessboard Yöntemi ile Saptanması :

Hazırlanan antijenin optimal dilüsyonunu ve kontrol antiserumun titresini saptamak amacıyla uygulanan chessboard yöntemi aşağıdaki gibi yapıldı (87d) :

- Serolojik tüplerde antijen ve inaktive edilmiş antiserumun 1/2, 1/4, 1/8 1/256 titrelerde seri sulandırılmaları hazırlandı.
- U tabanlı pleytin çalışılacak çukurlarına 0.025 ml VB damlatıldıktan sonra, en yüksek antijen sulandırımından başlanarak makrodilüsyonlara karşılık gelen çukurlara vertikal olarak (yukarıdan aşağıya doğru) 0.025 ml antijen sulandırımları damlatıldı. Bu şekilde en düşük sulandırmaya kadar devam edildi. Antiserum sulandırımları da aynı yöntemle fakat horizontal olarak (soldan sağa doğru) karşılık gelen çukurlara her sulandırımından 0.025 ml olarak damlatıldı.
- Antijen kontrol çukurları 0.025 ml VB ve 0.025 ml antijen sulandırımlarını, antiserum kontrol çukurları ise 0.025 ml VB ve 0.025 ml antiserum sulandırımlarını içermekteydi.
- Daha sonra kontroller dahil tüm çukurlara 0.025 ml kompleman (4 HD_{50}) damlatıldı. Kompleman için 4, 2 ve 1 ünite olmak üzere 3 ayrı kontrol çukuru hazırlandı. 4 Ü kompleman çukuru, 0.050 ml VB ve 0.025 ml 4 Ü kompleman içermekteydi. 2 Ü kompleman çukuruna 0.025 ml VB

ve 0.025 ml 4 Ü kompleman konulduktan sonra loop ile karıştırılarak 1 ünite için ayrılan ve 0.025 ml VB içeren kontrol çukuruna dilüsyonu yapıldı. Sonra 2 ve 1 Ü kompleman kontrol çukurlarına 0.050 ml VB damlatıldı.

- Pleyt iyice karıştırılıp 4°C de bir gece bekletildi. Ertesi gün, % 4 koyun eritrositleri süspansiyonu ile 1/100 sulandırılmış hemolitik serumdan eşit hacimlerde içeren ve duyarlılaştırılan hemolitik sistemden tüm çukurlara 0.025 ml damlatıldı. Hemolitik sistem kontrol çukuru ise 0.075 ml VB ve 0.025 ml hemolitik sistem konularak hazırlandı.
- Mikropleyt 37°C de 30 dakika, 10 ar dakikada bir karıştırılarak, 30 dakika ise karıştırılmadan olmak üzere 1 saat bekletildi. Daha sonra 4°C ye kaldırılarak eritrositlerin tamamen çökmesi sağlandıktan sonra sonuçlar değerlendirildi.
- Değerlendirme : Optimal antijen ile antiserum konsantrasyonunun karşılaştığı ve komplemanı bağladığı titreler değerlendirmede dikkate alındı. % 50 çökme ve % 50 hemolizin olduğu en yüksek antijen ve antiserum sulandırımı saptanarak, KBD inde 4 Ü antijen kullanıldı. % 100 hemolizin saptandığı sulandırım dikkate alındığında ise antijenin 2 ünitesi kullanıldı.

Chessboard deneyi ile, hazırladığımız BKV antijeninin titresi 1/8 olarak bulundu ve esas deneyde 1/2 oranında sulandırılarak kullanıldı.

Test Serumlarının Hazırlanması :

Çalışılacak tüm serumlar KBD inden önce, 56°C de 30 dakika inaktive edilerek kompleman ve antikomplementer etki uzaklaştırıldı. Isıyla inaktivasyona rağmen, kimyasal veya bakteriyel kontaminasyona, yüksek gammaglobulin miktarına veya komplemana karşı inhibitör varlığına bağlı olarak ortaya çıkan antikomplementer etki aşağıdaki şekilde uzaklaştırıldı (87d):

- 4 volüm (0.4 ml) serum üzerine 1 volüm (0.1 ml) sulandırılmamış kompleman eklenerek bir gece 4°C de bekletildi. Daha sonra 37°C de 30 dakika tutuldu.

- Üzerine 2.7 ml VB eklenerek test edilecek serumun 1/8 dilüsyonu elde edildi. 60°C de 30 dakika inkübe edildi ve böylece fazla komplement da inaktive edilmiş oldu.

Esas Deney :

- Test edilecek her serum için ayrılan bir sıra mikropleyt çukuruna 0.025 ml VB damlatıldı.
- Her serum örneğinden loop ile 0.025 ml alınarak ilk çukurlara konuldu ve karıştırılarak diğer çukurlara seri dilüsyonları yapıldı.
- Serumların 1/2 sulandırımalarını içeren ilk çukurlara 0.025 ml VB (antijen yerine), diğer dilüsyon çukurlarına ise 0.025 ml 4 Ü antijen damlatıldı. Böylece antijen içermeyen ilk çukurlar, test serumu kontrolü olarak değerlendirildi. Ayrıca, antijen kontrol çukuruna 0.025 ml VB ve 0.025 ml 4 Ü antijen konuldu.
- Kontroller dahil tüm çukurlara 4 ünite komplemandan 0.025 ml damlatıldı. 4, 2 ve 1 ünite kompleman kontrol çukurları ise aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

4 Ü kompl. kontr.	0.025 ml 4 Ü kompl. + 0.050 ml VB
2 Ü kompl. kontr.	0.025 ml VB + 0.025 ml 4 Ü kompl. + 0.050 ml VB
1 Ü kompl. kontr.	0.025 ml VB + 2 Ü komplemanın dilüsyonu + 0.050 ml VB

- Mikropleyt karıştırılarak 4°C de 1 gece bekletildi. Ertesi gün kontroller dahil tüm çukurlara 0.025 ml hemolitik sistem damlatıldı. Hemolitik sistem kontrol çukuru ise 0.075 ml VB ve 0.025 ml hemolitik sistem içermekteydi.
- Pleyt 37°C de 30 dakika karıştırılarak, 30 dakika ise karıştırılmadan toplam 1 saat inkübe edildikten sonra 4°C ye kaldırılarak hücrelerin çökmesi sağlandı ve sonuçlar değerlendirildi.
- Değerlendirme : Antijen, hasta serumu ve komplemanın 4 ve 2 ünite kontrollerinde tam hemoliz, hemolitik sistem kontrolünde tam çökme ve 1 ünite kompleman kontrolünde % 50 çökme, % 50 hemoliz saptandığında değerlendirme doğru olarak gerçekleştirildi.

Özgöl antikor içermesi dolayısıyla antijeni ve komplemanı tam olarak bağlayan ve hemoliz vermeyen test serumu dilüsyonları pozitif olarak kabul edildi. Hemoliz vermeyen en yüksek serum sulandırımı, o serumun kompleman birleşmesi antikor titresi olarak değerlendirildi. 1/4 den yüksek titreler antijene karşı immunitayı, 1/4 den düşük titreler ise duyarlılığı göstermektedir.

Test Serumlarında BKV Antikorlarının ELISA-IgG Yöntemiyle Saptanması :

Test serumlarında BKV antikorlarının saptanmasında ELISA-IgG yönteminin duyarlılığını ve HÖ testi ile uyumluluğunu belirlemek amacıyla HÖ ve KBD ile antikor titreleri saptanan çeşitli yaş gruplarına ait serum örneklerinde ELISA-IgG testi ile BKV antikorları araştırılmıştır (75,81).

Kullanılan madde ve gereçler :

Crude (ham) BKV antijeni : Vero hücre kültürlerinde üretilen ve yüksek (1/512) HA titresi veren BKV süspansiyonu 2000 rpm de 30 dakika santrifüj edilerek hücrelere ait organel ve artıkların çökmesi sağlandı. Üst sıvı alınarak 1/2 oranında sulandırıldı ve crude antijen olarak kullanıldı.

U tabanlı mikropleytler : Deneyde antijen bağlamak amacıyla kullanılan özel yapıdaki U tabanlı pleytler Organon Teknika firmasından alındı.

Otomatik pipet : 10-100 mikrolitre damla verme yeteneğindeki Eppendorf varipette pipeti Abott firmasından temin edildi.

Anti-insan IgG konjugatı : İnsan IgG H zinciri Fc kısmına karşı keçiden elde edilen ve horseradish peroxidase ile işaretli konjugat ticari olarak Electro-Nucleonics Inc, Columbia'dan temin edildi.

OPD tabletleri : o-Phenylenediamine . 2HCl yapısındaki tabletler Organon Teknika firmasından temin edildi.

OPD dilüsyon sıvısı : % 0.02 Hidrojen peroksit içeren sitrat fosfat tampon solüsyonu Organon Teknika firmasından temin edildi.

Sülfürik asit : Reaksiyonun durdurulması amacıyla kullanılan H_2SO_4 , 1 N konsantrasyonda hazırlandı.

Yıkama ve inkübasyon Cihazları : Tween 80 ile fosfatlı tampon solüsyonundan oluşan yıkama solüsyonu ile otomatik olarak 300 µl sıvı verip çekerek yıkama yapan cihaz Organon Teknika firmasından alındı. Aynı şekilde, otomatik olarak ısı ve zamanın ayarlanması suretiyle mikropleytlerin inkübasyonunun yapıldığı araç da aynı firmadan temin edildi.

Spektrofotometre : Mikroelisa test sonuçlarının değerlendirilmesinde Organon Teknika'dan sağlanan Microwell System Reader 510 marka okuyucu kullanıldı. Optik dansite değerleri 492 nm dalga boyunda okundu.

Esas Deney :

- U tabanlı mikroelisa pleytlerinin çalışılacak çukurlarına, 50 µl crude BKV antijeni damlatılarak 4°C de 12-48 saat inkübe edildi. Bu şekilde antijenin çukur yüzeylerine bağlanması sağlandı.
- Bu süre sonunda çukurlarda kalan sıvı varsa alınarak pleytler kurumaya bırakıldı.
- Negatif kontrol serum için ayrılan 3, pozitif kontrol serum için ayrılan 2 çukura 100 µl ve test edilecek serumlar için belirlenen çukurlara da 100 er µl serum örnekleri otomatik pipetle damlatıldı.
- Mikroelisa pleytleri inkübatöre konularak 50°C de 30 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda yıkama cihazı ile tüm çukurlar 4 kez 300 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı.

- Mikroelisa pleytlerinin çalışılan tüm çukurlarına 100 µl anti-insan IgG konjugatı eklendi ve tekrar 50°C de 30 dakika inkübe edildi.
- Yıkama cihazı ile çukurlar 4 er kez 300 µl yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra tüm çukurlara 100 µl OPD solüsyonu damlatıldı. OPD solüsyonu, OPD tabletlerinin özel dilüent sıvısında verilen standart miktarda çözülmesiyle hazırlandı. Blank çukuruna ise sadece 100 µl OPD damlatıldı.
- Pleytler 30 dakika oda ısısında ve karanlık ortamda inkübe edildi ve daha sonra tüm çukurlara 100 µl 1 N H₂SO₄ konularak spektrofotometrede optik dansite değerleri renk değişimine göre okundu.

Böbrek ve Kemik İliği Transplantasyonu Yapılan Hasta Serumlarında
BKV Reaktivasyonunun ELISA-IgM Yöntemiyle Saptanması :

Böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalardan transplantasyondan önce ve 21 gün sonra alınan serum örneklerinde akut enfeksiyonun ya da reaktivasyonun göstergesi olan BKV-özgül IgM antikorları ELISA-IgM yöntemiyle araştırıldı. Bu amaçla deneyde, anti-insan IgM konjugatı kullanıldı ve ticari olarak Electro-Nucleonics Inc., Columbia'dan temin edildi. ELISA testi yukarıda açıklandığı şekilde uygulandı (76).

ELISA IgG ve IgM testlerinde Cut off değerinin hesaplanması :

Bu amaçla, standart negatif ve pozitif kontrol serumlarının ortalama optik dansite değerleri kullanılarak Microwell System Peader 510 model okuyucu tarafından önerilen modul ve aşağıdaki formüle göre cut off hesaplandı.

$$\text{Cut off değeri} = (1.000) \text{NC}_{\bar{x}} + (0.000) \text{PC}_{\bar{x}} + 0.025$$

NC _{$\bar{x}$} : Negatif kontrol serumlarının ortalaması

PC _{$\bar{x}$} : Pozitif " " " "

Böbrek ve Kemik İliği Transplantasyonu Yapılan Hastalarda BKV Reaktivasyonunun Araştırılması :

Serolojik Çalışmalar : Böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda transplantasyon öncesi ve transplantasyondan 21 gün sonra alınan serum örneklerinde HÖ, KBD, ELISA-IgG ve ELISA-IgM yöntemleri ile BKV antikor titreleri saptandı. HÖ ve KBD inde, önce ve sonra alınan 2 serum örneği arasında BKV antikor titrelerinde 4 kat veya daha fazla artış saptandığında, ELISA-IgG testinde optik dansite değerlerinde artış saptandığında ve ELISA-IgM testinde pozitif değerler bulunduğunda sonuçlar, virus reaktivasyonunun göstergesi olarak kabul edildi.

İdrar örneklerinden virus izolasyon çalışmaları : Böbrek ve kemik iliği transplantasyonundan 21 gün sonra hastalardan alınan steril idrar örnekleri 2500 rpm de 15 dakika santrifüj edildikten sonra supernatan steril şartlarda alınarak pH sı % 5 lik fenol kırmızısı ve NaHCO_3 ile nötral pH ya ayarlandı. Daha sonra idrar örneklerine 0.1/1 ml SP solüsyonu eklendi ve 4°C de 1 saat bekletilerek anti-bakteriyel etki sağlandı. İdrar örnekleri, steril kapaklı tüplerde tek tabaka olarak üretilmiş Vero hücre kültürlerine 0.5 ml inoküle edildi ve 90 dakika 37°C de inkübe edildi. Bu şekilde, idrar örneklerinde varlığı araştırılan virusun hücrelere absorpsiyonu sağlanmış oldu. Bu sürenin sonunda, tüplerdeki örnekler dökülerek hücre kültürleri üzerine % 2 FCS, % 1 glutamin ve % 1 SP içeren MEMO vasatından 2 ml eklendi. Hücre kültürleri 37°C de inkübasyona bırakıldı ve 30-40 gün boyunca sitopatik etki ve HA yönünden virus üremesi takip edildi. Gerektiğinde pH ayarlanması veya vasat değişimi yapıldı.

Sitolojik inceleme : Transplantasyondan sonra hastalardan alınan ve yukarıda bahsedildiği şekilde santrifüj edilen idrar örneklerinin

dipteki çökelek kısmından hazırlanan preparatlar, metil alkol ile tesbit edildikten sonra 1/10 sulandırılarak hazırlanmış giemsa boyası ile 37°C de 30 dakika boyanarak ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelendi. Preparatlar, idrar sedimentindeki epitelial hücrelerde çekirdek içi inklüzyon varlığı yönünden değerlendirildi (71). Her hastanın idrar sedimentinden ikişer preparat hazırlandı.

B U L G U L A R

Çalışmaya, yaşları 0-69 arasında değişen 1123 birey (551 kadın, 572 erkek) dahil edildi. Bu test grubu, Hacettepe Üniversitesi çocuk ve büyük hastanelerine çeşitli nedenlerle başvuran 456, Marmara Üni. hastanelerine başvuran 186, Trabzon Üni. hastanelerine başvuran 133 hasta ve sağlıklı 348 gönüllüden oluşmaktaydı. Ayrıca, böbrek transplantasyonu yapılmış 3 ve kemik iliği transplantasyonu yapılmış 7 hasta olmak üzere toplam 10 transplantlı hasta çalışıldı. Transplantasyon yapılan hasta grubunun yaşları 8-34 arasında değişmekteydi.

Çeşitli yaş gruplarında BKV-HÜ antikor düzeyleri ile ilgili bulgular :

HÜ deneyinde negatif ve 1/20 titre veren serumlar negatif, 1/40 ve üzerindeki titreler pozitif kabul edildi. 1/40 ve 1/320 arasındaki titreleri önceden geçirilmiş enfeksiyon, 1/640 ve üzerindeki titreler ise yeni geçirilmiş enfeksiyon yönünden anlamlı olarak değerlendirildi.

Çalışmaya alınan bireylerin HÜ antikor titreleri, 0-11 ay, 1-5 yaş, 6-10 yaş, 11-17 yaş, 18-25 yaş, 26-40 yaş ve 40 yaşın üzerindeki olmak üzere 7 grupta değerlendirildi.

Çalışmaya alınan toplam 1123 bireyin 881 inde (% 78.5) BKV-HÜ antikorları pozitif, 242 sinde (% 21.5) ise negatif bulundu. Çeşitli yaş gruplarında saptanan BKV HÜ antikor pozitifliği ve negatifliği oranları Tablo 1 de gösterilmiş ve şematik olarak Şekil 1 de sunulmuştur.

Tablo 1 : Çeşitli yaş gruplarında Anti-BKV antikor prevalansı.

Yaş Grupları	Anti-BKV antikorları		Toplam
	Negatif (%)	Pozitif (%)	
0-11 ay	51 (38.6)	81 (61.4)	132
1- 5 yaş	51 (34.7)	96 (65.3)	147
6-10 yaş	30 (18.2)	135 (81.8)	165
11-17 yaş	14 (10.7)	117 (89.3)	131
18-25 yaş	21 (14.9)	120 (85.1)	141
26-40 yaş	46 (18.9)	198 (81.1)	244
40 yaş üzeri	29 (17.8)	134 (82.2)	163
Toplam	242 (21.5)	881 (78.5)	1123

Görüldüğü gibi pozitiflik oranı 6-10 yaş grubunda yükselmeye başlamakta (% 81.8), 11-17 yaş grubunda en yüksek düzeye ulaşmakta (% 89.3) ve yaş ilerledikçe hafif bir düşme göstermektedir.

Çalışmaya alınan bireylerin BKV-HÜ antikor pozitiflik veya negatiflik oranları cinsiyetlerine göre değerlendirilmiş ve yüzdeler arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır ($P > 0.5$; Tablo 2).

Tablo 2 : Çeşitli yaş gruplarında BKV-HÜ antikorlarının cinsiyete göre dağılımı.

Yaş	Cins	Anti-BKV antikorları		Toplam
		(-)	(+)	
0-11 ay	K	25 (39.7)*	38 (60.3)	63
	E	26 (41.3)	43 (58.7)	69
1- 5 yaş	K	25 (37.9)	41 (62.1)	66
	E	26 (32.1)	55 (67.9)	81
6-10 yaş	K	11 (14.7)	64 (85.3)	75
	E	19 (21.1)	71 (78.9)	90
11-17 yaş	K	5 (8.5)	54 (91.5)	59
	E	9 (12.5)	63 (87.5)	72
18-25 yaş	K	14 (16.1)	73 (83.9)	87
	E	7 (12.9)	47 (87.1)	54
26-40 yaş	K	25 (18.5)	110 (81.5)	135
	E	21 (19.2)	88 (80.8)	109
40 yaş üzeri	K	13 (19.7)	53 (80.3)	66
	E	16 (16.5)	81 (83.5)	97
Toplam		242	881	1123

* Parantez içindeki sayılar yüzde oranlarını ifade etmektedir.

Belirtilen yaş gruplarında BKV-HÜ antikor titrelerinin dağılımı ve oranları da Tablo 3 de verilmiştir.

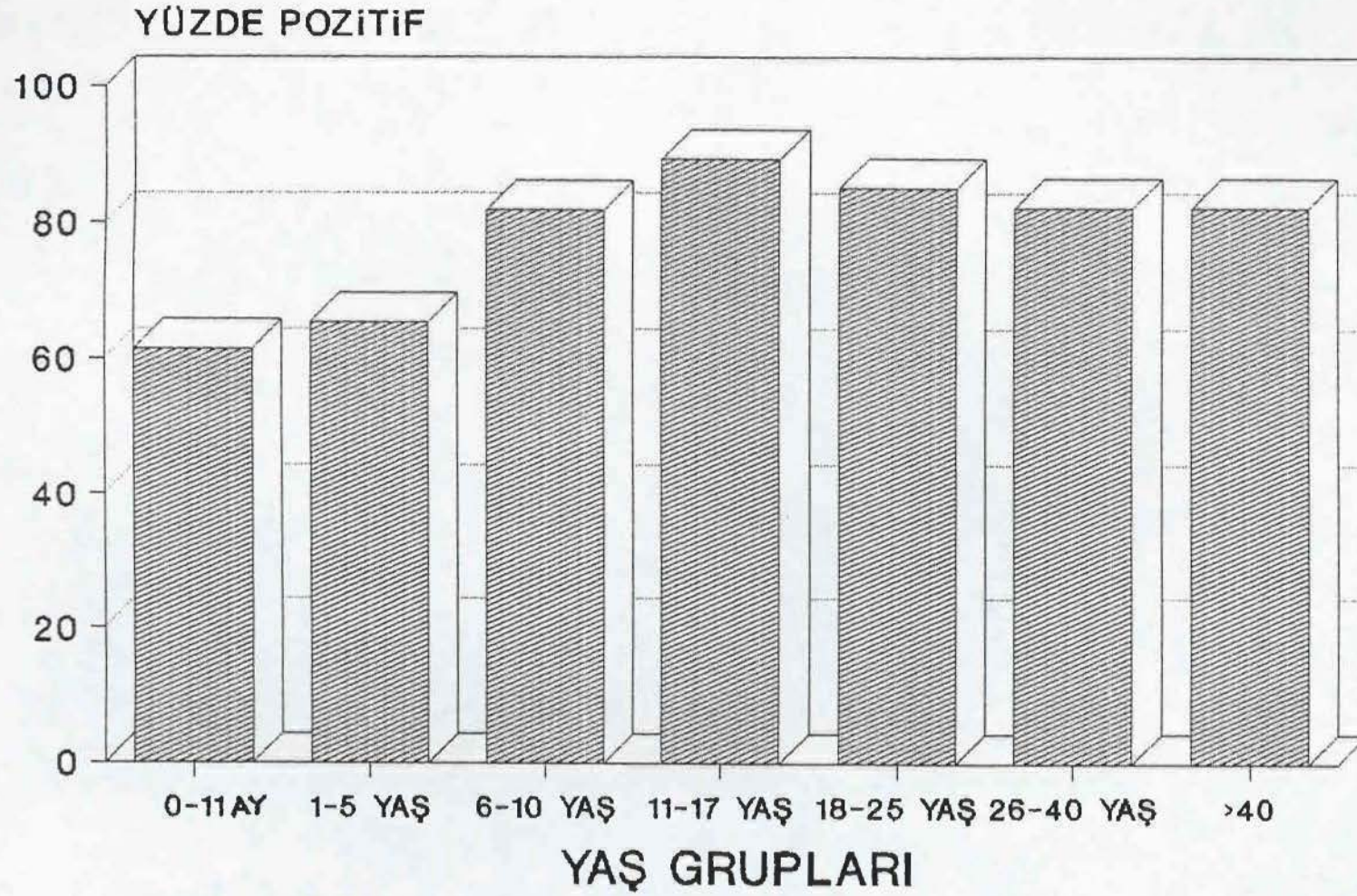
Tablo 3 : Çeşitli yaş gruplarında BKV-HÖ antikor titrelerinin dağılımı ve oranları.

Yaş grupları	Çalışılan serum sayısı	Anti-BKV-HÖ antikor titreleri								
		0	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560 ve ↑
0-11 ay	132	31 (38.6)*	20	26 ()	25 59.1	18	9 ()	3 ()	- 2.3	- ()
1- 5 yaş	147	30 (34.7)	21	12 ()	17 39.5	14	15 ()	17 ()	14 25.8	7 ()
6-10 yaş	165	13 (18.2)	17	19 ()	25 59.4	28	26 ()	18 ()	12 22.4	7 ()
11-17 yaş	131	7 (10.7)	7	14 ()	18 67.2	31	25 ()	23 ()	4 22.1	2 ()
18-25 yaş	141	8 (14.9)	13	22 ()	28 71.6	22	28 ()	15 ()	3 14.2	2 ()
26-40 yaş	244	15 (18.9)	31	40 ()	48 70.5	50	34 ()	16 ()	7 10.6	3 ()
40 yaş üzeri	163	7 (17.8)	22	35 ()	40 73.0	26	18 ()	12 ()	2 9.2	1 ()
Toplam	1123	111	131	168	201	189	155	104	42	22

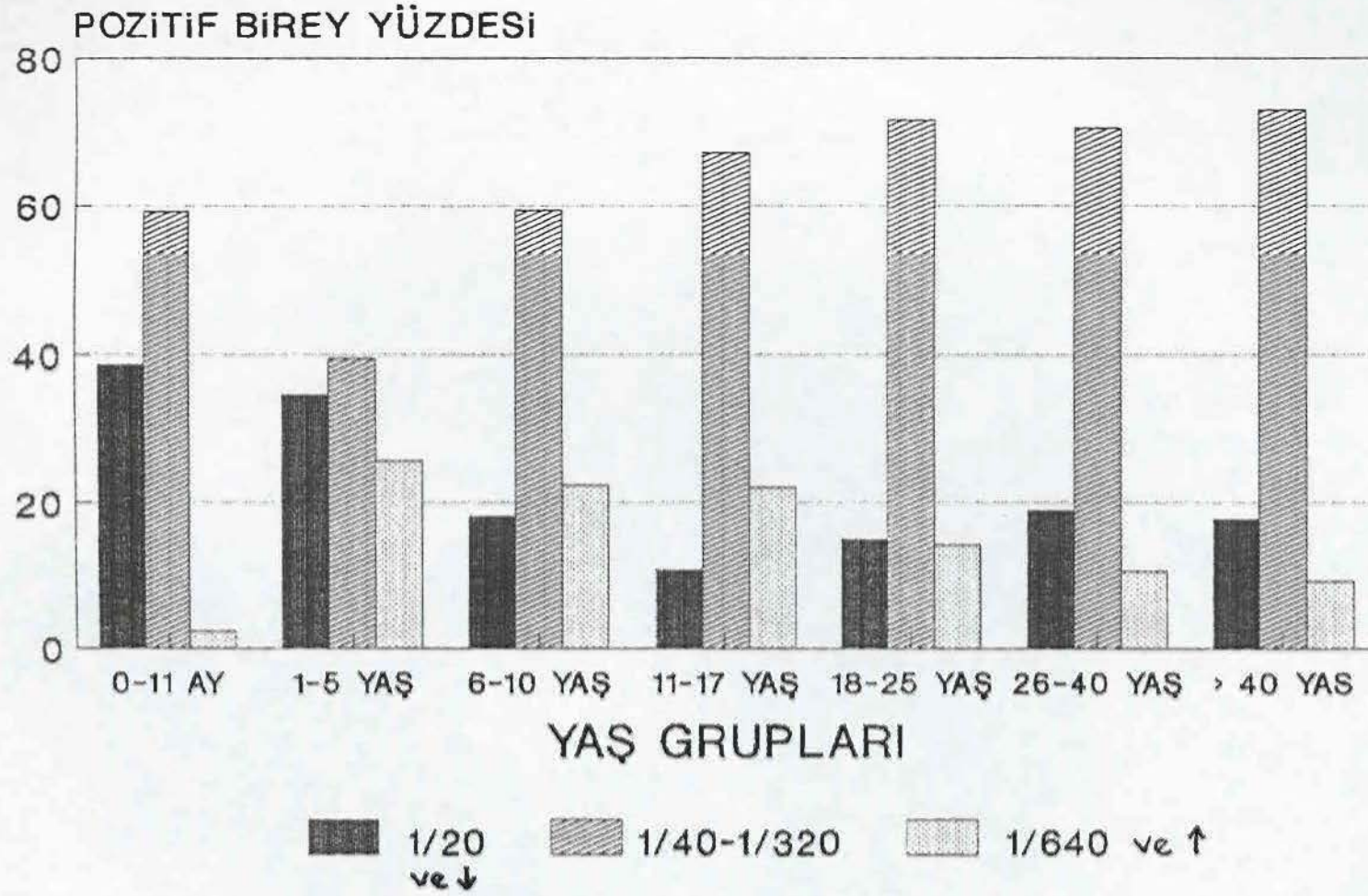
* Parantez içindeki sayılar yüzde oranlarını ifade etmektedir.

Tabloda görüldüğü gibi, kazanılmış bağışıklığı ifade eden 1/40-1/320 arasında HÖ antikor titrelerine sahip bireylerin oranı yaş ilerledikçe artmakta ancak yeni geçirilen bir enfeksiyonu ifade eden 1/640 ve daha üzerinde HÖ antikor titresine sahip bireyler % 25.8 oranı ile 1-5 yaş grubunda toplanmaktadırlar. 6-10 yaş grubunda bu oran % 22.4, 11-17 yaş grubunda ise % 22.1 bulunmuştur. Yüksek HÖ antikor titrelerinin en az oranda bulunduğu (% 2.3) yaş grubu 0-11 ay olup bunu % 9.2 ile 40 yaş üzeri yaş grubu izlemektedir.

BKV-HÖ antikor prevalansı ile yaş grupları arasındaki ilişki Şekil 2 de gösterilmiştir.



ŞEKİL 1 : ÇEŞİTLİ YAŞ GRUPLARINDA ANTİ-BKV ANTİKOR PREVALANSI.



ŞEKİL 2 : BKV-HÜ ANTİKOR PREVALANSI İLE YAŞ GRUPLARI ARASINDAKİ İLİŞKİ.

Anti-BKV antikorlarının saptanmasında HÖ, KB ve ELISA-IgG testlerinin titre değerlerinin karşılaştırılması, duyarlılık ve özgüllüklerinin saptanması ile ilgili bulgular :

Bu amaçla, çeşitli yaş grupları arasında rastgele seçilen 110 serum örneğinde BKV antikor düzeyleri HÖ, KB ve ELISA-IgG testleri ile araştırılmıştır. Testlerin özgüllük, duyarlılık ve uyumlulukları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (88).

$$\text{Özgüllük} = \text{GN} \times 100 / \text{YP} + \text{GN}$$

$$\text{Duyarlılık} = \text{GP} \times 100 / \text{GP} + \text{YN}$$

$$\text{Uyumluluk} = (\text{GP} + \text{GN}) \times 100 / \text{GP} + \text{YP} + \text{GN} + \text{YN}$$

(G= gerçek, Y= yalancı, P= pozitif, N= negatif)

HÖ testinde 1/40 ve üzeri, KB testinde 1/4 ve üzeri ve ELISA-IgG testinde cut off değerinin üzerinde absorbans veren serum örnekleri pozitif olarak kabul edilmişlerdir.

Çalışılan 110 serum örneğinin 46 sı her test için pozitif, 21 i ise her test için negatif sonuç vermiştir. Dolayısıyla 110 serum örneğinin 67 si (% 60) her üç test ile de uyumlu sonuç vermiştir.

BKV antikorları yönünden test edilen 110 serum örneğinin testlere göre negatiflik ve pozitiflik oranları Tablo 4 de görülmektedir.

Tablo 4 : BKV antikorları yönünden test edilen 110 serum örneğinin testlere göre negatiflik ve pozitiflik oranları.

Test	Negatif serum sayısı (%)	Pozitif serum sayısı (%)	Toplam
HÖ	23 (21.0)	87 (79.0)	110
CF	58 (52.7)	52 (47.3)	110
ELISA-IgG	34 (31.0)	76 (69.0)	110

Görüldüğü gibi HÖ testinde serumların % 79 u, KB testinde % 47.3 ü ve ELISA-IgG testinde % 69 u pozitif sonuç vermiştir.

HÖ ve ELISA-IgG testi sonuçları duyarlılık, özgüllük ve uyumluluk yönünden karşılaştırılmış ve sonuçlar Tablo 5 de verilmiştir.

Tablo 5 : HÖ ve ELISA-IgG testlerinin özgüllük, duyarlılık ve uyumluluğunun saptanması.

Test	HÖ Pozitif	Negatif	Özgüllük (%)	Duyarlılık (%)	Uyumluluk (%)
ELISA					
Pozitif	73	2			
Negatif	13	22	92	86	88
Toplam	86	24			

Görüldüğü gibi, ELISA-IgG testinin duyarlılığı % 86, özgüllüğü % 92 ve her iki testin uyumluluğu % 88 olarak saptanmıştır.

HÖ ve KB testi sonuçları da Tablo 6 da verilmiştir. KB testinde özgüllük % 96, duyarlılık % 70.5 ve her iki testin uyumluluğu % 74.8 olarak belirlenmiştir.

Tablo 6 : HÖ ve KB testlerinin özgüllük, duyarlılık ve uyumluluğunun saptanması.

Test	HÖ Pozitif	Negatif	Özgüllük (%)	Duyarlılık (%)	Uyumluluk (%)
KB					
Pozitif	50	1			
Negatif	36	23	96	70.5	74.8
Toplam	86	24			

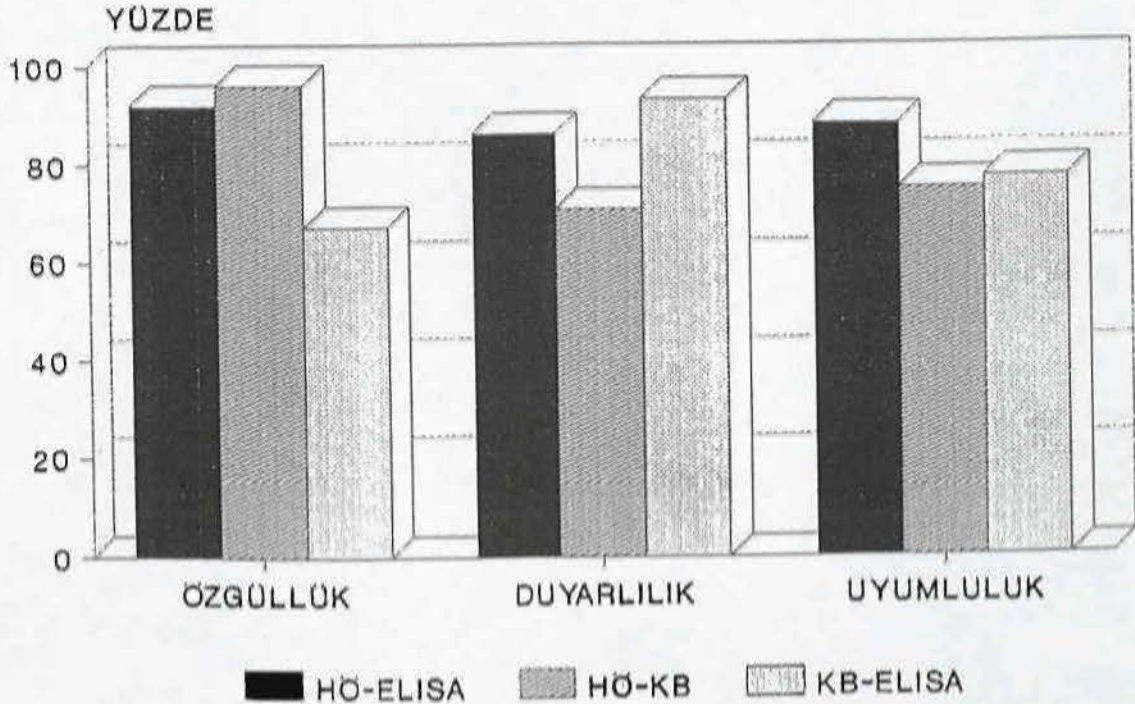
KB ve ELISA-IgG testlerinin karşılaştırmalı sonuçları ise Tablo 7 de görülmektedir.

Tablo 7 : KB ve ELISA-IgG testlerinin özgüllük, duyarlılık ve uyumluluğunun saptanması.

Test	KB pozitif	KB Negatif	özgüllük (%)	Duyarlılık (%)	Uyumluluk (%)
ELISA Pozitif	47	29	67	92.7	76.9
Negatif	4	30			
Toplam	51	59			

KB testine göre ELISA-IgG testinin özgüllüğü % 67, duyarlılığı % 92.7 ve her iki testin uyumluluğu ise % 76.9 olarak bulunmuştur.

Hö, KB ve ELISA-IgG testleri arasındaki özgüllük, duyarlılık ve uyumluluk şematik olarak Şekil 3 de gösterilmiştir.



ŞEKİL 3 : TESTLER ARASINDAKİ ÖZGÜLLÜK, DUYARLILIK ve UYUMLULUK.

Böbrek ve Kemik İliği Transplantasyonu Yapılan Hastalarda BKV Reaktivasyonunun Serolojik Bulguları :

Böbrek transplantasyonu yapılan 3, kemik iliği transplantasyonu yapılan 7 olmak üzere toplam 10 transplantlı hastadan transplantasyon öncesi ve 21 gün sonrasında alınan serum örneklerinde BKV antikor düzeyleri HÜ, KB, ELISA-IgG ve ELISA-IgM testleriyle araştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 8 de gösterilmiştir.

Tablo 8 : Böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan hastaların Serolojik Bulguları.

No	İsim	Cins	Yaş	Transp. Tipi	HÜ titresi		KB titresi		ELISA-IgG O.D cutoff:0.151		ELISA-IgM O.D cutoff:1.201	
					t.ö.	t.s.	t.ö.	t.s.	t.ö.	t.s.	t.ö.	t.s.
1	L.E	K	34	Böbrek	1/80	1/160	1/8	1/8	0.190	0.204	0.773	0.578
2	E.C	E	26	Böbrek	1/40	1/160	1/4>	1/4	0.111	0.126	0.140	0.978
*3	H.Y	E	29	Böbrek	1/40	1/320	1/4>	1/4	0.091	0.211	0.964	1.655
4	F.S	K	16	K.İ.	1/160	1/160	1/4>	1/4	0.155	0.181	0.771	0.510
*5	L.K	E	22	K.İ.	1/160	1/640	1/4>	1/4	0.104	0.185	0.903	1.227
6	H.O	K	23	K.İ.	1/160	1/320	1/8	1/8	0.178	0.286	1.067	0.775
7	Y.E	K	8	K.İ.	1/640	1/1280	1/4>	1/16	0.098	0.117	0.759	1.040
*8	F.R.	K	19	K.İ.	1/320	1/1280	1/4>	1/4	0.106	0.190	1.013	2.078
9	H.T.	E	12	K.İ.	1/320	1/640	1/4>	1/4	0.176	0.184	1.030	1.045
*10	B.B.	E	15	K.İ.	1/40	1/160	1/4>	1/4	0.122	0.166	0.757	1.791

Görüldüğü gibi, böbrek transplantasyonu yapılan 3 no'lu hastada ve kemik iliği transplantasyonu yapılan 5, 8 ve 10 no'lu hastalarda transplantasyondan önce ve sonra alınan serumlar arasında HÜ titrelerinde 4 katı artış saptanmıştır. Ayrıca bu hastaların transplantasyon öncesi serumlarında ELISA-IgG antikor düzeyleri cutoff değerinin altında iken transplantasyon sonrası serumlarında cutoff değerinin oldukça üzerinde optik dansite değerleri saptanmıştır.

Bu hastaların transplantasyon sonrası serumlarında ELISA-IgM değerleri de pozitif bulunmuştur.

Diğer transplantlı hastaların serum örneklerinde ise HÖ ve KB testleriyle önemli bir artış saptanamamıştır. 1, 4, 6 ve 9 no'lu hastaların transplantasyondan önce ve sonraki serum örneklerinde IgG antikorları pozitif, 2 no'lu hastanın ise negatif olarak tesbit edilmiş ve bu hastaların hiçbirisinde IgM antikorları bulunamamıştır.

7 no'lu hastanın KB antikor titreleri iki serum örneği arasında oldukça büyük bir artış göstermiş ancak HÖ testinde 2 kat artış saptanırken IgG ve IgM antikorları negatif bulunmuştur.

Böbrek ve Kemik iliği Transplantasyonu Yapılan Hastaların İdrar Örneklerinde BKV Reaktivasyonunun Gösterilmesinde Virolojik ve Sitolojik Çalışmalar ile İlgili Bulgular :

Böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan 10 hastadan transplantasyon sonrası 21. gün alınan steril idrar örneklerinin Vero hücre kültürlerine inokülasyonu ve santrifüj edilen idrar sedimentinin Giemsa boyası ile boyanarak incelenmesiyle elde edilen bulgular Tablo 9 da verilmiştir.

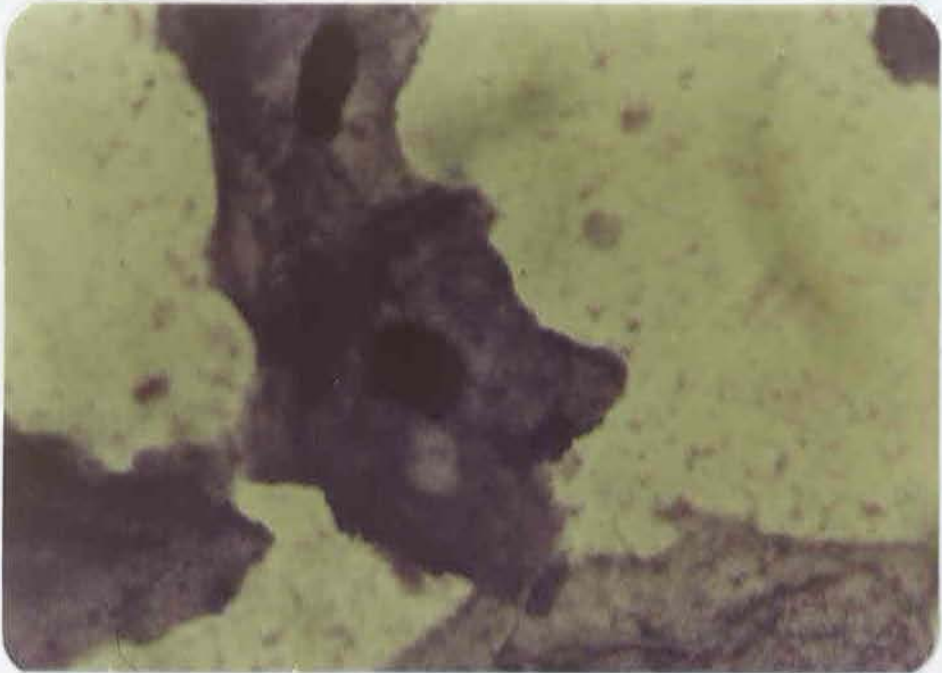
Tablo 9 : Böbrek ve Kemik iliği transplantasyonu yapılan hastaların virolojik ve sitolojik bulguları.

No	İsim	Cins	Yaş	Transp.tipi	İdrar Örneğinde	
					Virus izolasyonu	İnklüzyon cis.
1	L.E	K	34	Böbrek	-	-
2	E.C	E	26	Böbrek	-	-
3	H.Y	E	29	Böbrek	-	-
4	F.S	K	16	K.i.	-	-
5	L.K	E	22	K.i.	-	+
6	H.O	K	23	K.i.	-	-
7	Y.E	K	8	K.i.	-	-
8	F.R	K	19	K.i.	-	-
9	H.T	E	12	K.i.	-	-
10	B.B	E	15	K.i.	-	-

Tabloda görüldüğü gibi, transplantasyon yapılan hastaların idrar örneklerinden hiçbirisinde virus izolasyonu başarılı olmamıştır.

İdrar örneklerinin santrifügasyonu ile sedimentin Giemsa ile boyanarak mikroskopta incelenmesi sonunda da yalnızca 5 no'lu hastanın idrar örneğinde BKV için tanımlanan tipik görünümde, çekirdek içinde inklüzyon cisimciği görülmüştür (Resim 3). Bu hasta, serolojik olarak da BKV reaktivasyonunu gösteren serokonversiyonun ve IgM antikorlarının saptandığı hastadır (Tablo 8).

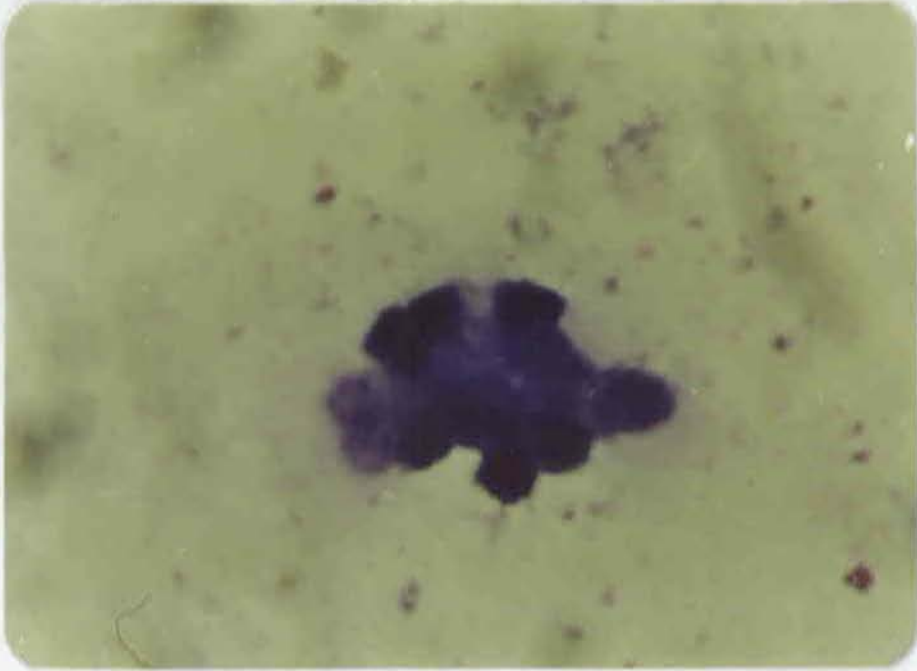
Serokonversiyon saptanan ve IgM antikorları pozitif olan diğer transplantlı hastaların idrar sedimentlerinde inklüzyon cisimciğine rastlanmamıştır.



Resim 3-a : Böbrek transplantasyonu yapılan hastanın (L.K.) idrar sedimentinden hazırlanan preparatta görülen normal epitel hücreler (Giemsa boyası, 100X).



Resim 3-b : Aynı hastanın preparatında görülen çekirdek içi "Baykus gözü" şeklindeki inklüzyon cisimciği. (Giemsa, 100X)



Resim 3-c : Aynı hastanın preparatında, stoplazmanın daralması ve çekirdeğin yoğunlaşması ile karakterize etkinin görüldüğü hücreler. (Giemsa, 100X)

T A R T I Ş M A

Çocukluk döneminde viruslar birçok solunum yolu enfeksiyonuna neden olmakla beraber benzer klinik bulgular oluşturmaları nedeniyle ayırıcı tanı mümkün olamamaktadır. Bu konuda klinisyene yardımcı olan en önemli kriter bir viral enfeksiyonun toplumda epidemiyolojik özelliğidir. Viral enfeksiyonların laboratuvar tanısı ise, etkenin klinik örnekte gösterilmesi veya izolasyonu ile etkene karşı oluşan antikor titrelerindeki artışın saptanması veya özgül IgM antikorlarının gösterilmesi ile yapılmaktadır.

İnsan polyomavirusu olan BK virusunun da çocukluk çağında solunum yolu enfeksiyonundan sorumlu viruslar arasında yer aldığı ve dünyada birçok popülasyonda bu virusa karşı yüksek oranda antikor bulunduğu bildirilmektedir (6,18). İlk kez 1971 yılında böbrek transplantasyonu yapılan bir hastanın idrarından izole edilen BKV ile ilgili olarak 1973-75 yılları arasında yapılan ilk seroepidemiolojik çalışmalar sonunda birçok ülkede bu virusa karşı antikor insidansının % 65-80 oranında olduğu ve yaşa bağımlı olarak değiştiği gösterilmiştir (36,41).

Özellikle Brown ve ark.nın, aralarında Türkiye'nin de bulunduğu birçok ülkeden sağladığı toplam 1544 serum örneğinde BKV HÖ antikorlarının araştırıldığı çalışma oldukça ilginçtir (41). Bu araştırmacılar, Türkiye'den sağladıkları 38 serum örneğinde BKV antikor pozitifliğini % 63 olarak bildirirken Brezilya, Paraguay, Malezya ve Yeni Gine gibi ülkelerde bu oranı çok düşük (% 2-10) bulmuşlardır.

Bu ilk çalışmaları takiben, birçok ülkeden çeşitli araştırmacılar gerek seroepidemiyolojik olarak gerekse immün süpresyonu olan ve hamilelik gibi riskli gruplarda BKV antikor düzeylerini araştıran çalışmalar yapmışlardır (27,55,70,89). Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, 1-10 yaş arasındaki çocuklarda % 65, 10-17 yaş arasında % 90 dan fazla ve erişkin kişilerde ise % 80 oranlarında BKV seropozitifliği olduğu ve BKV enfeksiyonunun erken çocukluk döneminde kazanıldığı gerçeği ortaya çıkmaktadır.

Ancak BKV un seroepidemiyolojisine ışık tutan bütün bu bulgular coğrafi, kültürel ve sosyoekonomik koşulları oldukça farklı olan ülkemiz için aynı şekilde değerlendirilemeyebilir. Oysa yurdumuzda şimdiye dek BKV ile ilgili herhangi bir araştırma yapılmamıştır.

Bu nedenle, toplumumuzda BKV antikor bulunma sıklığını ve yaşlara göre dağılımını araştırmak amacıyla sunulan çalışma planlanmıştır. Çeşitli yaş gruplarındaki toplam 1123 bireyden toplanan serum örnekleri HÜ testiyle araştırılmış ve % 78.5 oranında BKV antikor pozitifliği saptanmıştır (Tablo 1). Bu oran Gardner tarafından İngiltere'de yapılan çalışmada % 62 (35), Flaegstad ve ark. tarafından Norveç ve Portekiz'de yapılan çalışmada % 71 (43), Mantyjarvi ve ark. tarafından Finlandiya'da yapılan çalışmada % 58 (36), Shah ve ark. tarafından A.B.D. de yapılan çalışmada % 74 (42) ve Portolani ve ark. tarafından İtalya'ya yapılan çalışmada ise % 75 (44) olarak bildirilmektedir.

Çalıştığımız populasyon Ankara, İstanbul ve Trabzon illeri ve çevrelerinden hastanelere başvuran bireyleri kapsadığından, saptadığımız % 78.5 BKV antikor pozitifliği oranı yurdumuzda BKV un yayılımı ile ilgili genel bir fikir verebilir.

BKV antikör pozitiflik oranının yaş gruplarına dağılımı incelendiğinde, 0-11 ay yaş grubunda % 61.4 ve 1-5 yaş grubunda % 65.3 olan seropozitiflik 6-10, 11-17 ve 18-25 yaş gruplarında % 81-90 a ulaşmakta ileri yaş gruplarında ise % 82 ye düşerek stabil kalmaktadır (Tablo 1). Bu bulgularımız da, okul çağına kadar olan çocukların % 80-90 ında BKV antikorlarının varlığını gösteren Gardner (35), Shah ve ark. (42) ve Mantyjarvi ve ark. (36) ile paralellik göstermektedir.

0-11 ay yaş grubunda saptanan 1/40-1/320 arasındaki HÖ antikör titreleri % 59 oranındadır ve büyük olasılıkla anneden pasif olarak geçen antikorları yansıtmaktadır. Ancak bebeklerin % 2.3 ünde 1/640 titrede antikor bulunması, ya 6. aydan itibaren kazanılan primer BKV enfeksiyonunu ya da annenin BKV reaktivasyonu sonucu antikor titresindeki artıştan dolayı olabilir. 0-11 ay yaş grubunda saptanan % 38.6 oranındaki negatiflik ise annenin seronegatif veya düşük titrelerde BKV antikorlarına sahip olmasına bağlanabilir.

1-5 yaş grubunda ise seropozitiflik % 65.3 oranında saptanırken, 1/640 ve daha yüksek HÖ antikör titrelerinin saptanma oranı % 25.8 olarak bulunmuştur. Bu oran yaş grupları içinde saptanan en yüksek orandır ve primer BKV enfeksiyonunun yeni geçirildiğini yargulamaktadır. Benzer olarak, 6-10 yaş grubunda da yüksek BKV HÖ antikör titrelerine sahip çocuklar % 22.4 oranındadır. Dolayısıyla 1-10 yaş arasındaki çocukların yaklaşık % 50 si yeni geçirilen veya tekrarlayan BKV enfeksiyonunun sonucu olarak 1/640 ve daha yüksek antikor titrelerine sahiptirler. 1-5 yaş grubunda, 1/40-1/320 arasında HÖ antikör titrelerine sahip bireyler % 39.5 iken 6-10 yaş grubunda bu oran % 59.4 dür (Tablo 3). Görüldüğü gibi, 6-10 yaş grubundaki çocukların yaklaşık % 82 sinde BKV antikor

pozitifliği saptanmıştır. Bu bulgular bize, primer BKV enfeksiyonunun toplumumuzda da çocukluk yaşlarında kazanıldığını göstermektedir.

11-17 yaş grubunda ise BKV seronegatiflik oranı % 10.7 ye düşerken, seropozitiflik yaklaşık % 90 a ulaşmaktadır. Bu yaş grubundaki bireylerin % 67.2 si daha önceden bağışık olduklarını ifade eden 1/40-1/320 antikor titrelerine, % 22.1 i ise yeni geçirilen veya tekrarlayan enfeksiyonu ifade eden yüksek antikor titrelerine sahiptirler.

18-25 yaş grubunda seropozitiflik oranı % 85.1 olarak saptanmış ve bu bireylerin de % 14.2 si BKV enfeksiyonunu bu yaş döneminde kazanmışlardır. 26-40 ve daha ileri yaş gruplarında 1/640 ve daha yüksek HÜ antikor titreleri saptanan bireylerin oranı sırasıyla % 10.6 ve % 9.2 dir. 26-40 ve daha ileri yaş gruplarında ve seropozitiflik % 82 oranındadır. Her iki grupta da saptanan yaklaşık % 18 oranındaki seronegatiflik ise ya bireylerin BKV ile hiç karşılaşmadığını ya da çocukluk döneminde geçirilen enfeksiyon sonucu meydana gelen antikorların yaş ilerledikçe saptanamayacak düzeylere düştüğünü ifade etmektedir.

Bulgularımız, BKV antikor prevalansının yaş gruplarına bağımlı olarak bir dağılım gösterdiğini vurgulayan Flaegstad ve ark. ile Dei ve ark. ile uyumluluk göstermektedir (19,20).

Seroepidemiolojik çalışmalarda, BKV antikor prevalansının saptanmasında en çok kullanılan serolojik test HÜ testidir. HÜ testi, uygulanabilirliği ve çok sayıda serumun aynı anda çalışılabilmesi gibi nedenlerle tercih edilmektedir. Ancak BKV serolojisinde kompleman birleşmesi, nötralizasyon, ELISA ve son yıllarda da immunoblotting ve DNA amplifikasyonuna dayalı ileri yöntemler çeşitli amaçlara yönelik olarak kullanılmaktadır (72,77,78,80).

Çalışmamızda, anti-BKV antikorlarının saptanmasında önemli yeri olan HÜ, KB ve ELISA testlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin saptanması amacıyla çeşitli yaş gruplarından seçilen 110 serum örneği çalışılmıştır. Çalışılan 110 serum örneği, HÜ testi ile % 79, KB testi ile % 47 ve ELISA-IgG testi ile % 69 pozitif sonuç vermiştir (Tablo 4). KB testindeki pozitiflik yüzdesinin diğer 2 teste oranla düşük olmasının nedeni genellikle akut enfeksiyon sırasında pozitif olması ve IgM antikorlarının komplemanı daha iyi fikse etmesinden dolayıdır. Gardner, HÜ ve KB testleri ile yaptığı seroepidemiolojik çalışmada, KB testi ile daha düşük titreler ve düşük pozitiflik yüzdesi saptadığını ve HÜ testinin diğerinden daha duyarlı olduğunu bildirmiştir (35).

Bulgularımıza göre HÜ testi KB testi ile kıyaslandığında özgüllük daha yüksektir (Tablo 6). Ancak, HÜ testi ile ELISA-IgG testi arasındaki uyumluluk diğer testlere göre daha fazladır (Tablo 5). KB ve ELISA-IgG testleri kıyaslandığında ise duyarlılık daha yüksek bulunmuştur (Tablo 7).

Flaegstad ve ark., HÜ ve ELISA testlerini karşılaştıran çalışmalarında uyumluluğun yüksek olduğunu bildirmektedirler (75,76). Bizim çalışmamızda da bu iki testin uyumluluğu % 88 olarak saptanmıştır.

Sonuçlarımız HÜ testinin BKV antikorlarının saptanmasında oldukça özgül ve duyarlı bir test olduğunu düşündürmektedir. ELISA-IgG testi de HÜ testi ile oldukça uyumlu olmakla birlikte KB testi ile uyumluluk oranı % 76.9 dur. Çalışmamızda KB testi ELISA-IgG testine göre daha duyarlı saptanmıştır ancak seroepidemiolojik çalışmalardan ziyade BKV serolojisinde, akut bir enfeksiyonun gösterilebilmesi ya da serokonversiyonun takibi amacıyla uygulanabilir.

Genellikle belirtisiz ya da solunum yolu enfeksiyonu şeklinde geçirilen primer enfeksiyondan sonra böbrek dokusunda latent olarak kalan BKV, immünsüpresif veya sitotoksik ilaçlarla özellikle hücresel immun sistemin baskılanmasıyla reaktifte olmakta ve idrarla salınmaktadır (7,24, 40,82). Bu durumda BKV reaktivasyonu gerek serolojik olarak gerekse idrardan virus izolasyonu ile gösterilebilmektedir. Immünsüpresyon tedavisinin en sık uygulandığı hasta grubu olan transplantasyonlu ya da kanserli hastalarda BKV reaktivasyonu çeşitli yöntemlerle araştırılmıştır (8,9, 10,25,45,49,90).

Bu bilgiler ışığında, biz de çalışmamızda böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan 10 hastada BKV reaktivasyonunu serolojik ve virolojik yöntemlerle araştırmayı planladık. Transplantasyondan önce ve 21 gün sonra hastalardan alınan serum örneklerinde BKV antikor düzeyleri HÖ, KB ve ELISA-IgG testleri ile çalışılmış ve sonuçlar Tablo 8 de verilmiştir. Böbrek transplantasyonu yapılan 1 hastada (3 no'lu hasta) ve kemik iliği transplantasyonu yapılan 3 hastada (5,8,10 no'lu hastalar) transplantasyondan önce ve sonraki serum örnekleri arasında HÖ testiyle 4 katı artış gösterilmiştir. Bu hastaların transplantasyon öncesi serumlarında IgG düzeyleri ELISA testiyle saptanamayacak düzeydeyken transplantasyon sonrası serumlarında cutoff değerinin üzerinde absorbands veren IgG antikorları saptanmıştır. Ayrıca, belirtilen hastalarda, ELISA testiyle BKV-özgül IgM antikorları da pozitif bulunmuştur.

Çalışmaya alınan böbrek ve kemik iliği transplantlı hastalarımızın hepsi transplantasyondan önce seropozitiflerdir. Dolayısıyla bu sonuçlarımız çalışılan transplantlı 10 hastanın 4 ünde BKV reaktivasyonu olduğunun serolojik kanıtıdır. Çalışmaya aldığımız hasta sayısının az olması nedeniyle istatistiksel bir değerlendirme mümkün olmamıştır. Ancak

bilindiği gibi, transplantasyonlu hastaların takibindeki zorluklar nedeniyle bu gruptaki hasta sayımız kısıtlı kalmıştır.

Flower ve ark. böbrek transplantasyonu yapılan 11 hastadan 8'inin transplantasyon sonrası serum örneklerinde IgM antikorlarını pozitif bulmuşlar ve takip sonucunda bu hastalarda IgM antikorlarının uzun süre kaldığını göstermişlerdir (8). Bu durum, hastalarda uzun süren bir antijenik uyarım olduğunu düşündürmektedir. Andrews ve ark. ise, böbrek transplantasyonu yapılan 496 hastanın % 22'sinde HÜ testi ile BKV antikorlarında artış saptadıklarını ve bu hastalarda BKV enfeksiyonunun primer kazanılmasından ziyade önceden seropozitif olan bu bireylerde BKV reaktivasyonunun gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir (47). Kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda da BKV reaktivasyon oranı % 55 olarak, Arthur ve ark. tarafından bildirilmiştir (51). Bu araştırmacılar ayrıca, hastaların idrar örneklerinden virus izolasyon oranını % 18 olarak belirtmişler ve BK virürisi ile yüksek antikor titreleri arasında bir ilişki olduğunu öne sürmüşlerdir.

Kemik iliği transplantasyonu yapılan 1 hastamızda (7 no'lu hasta) HÜ antikor titreleri arasında önemli bir artış saptanmazken KB antikor titrelerinde iki serum arasında oldukça büyük bir artış olduğu gözlenmiştir (Tablo 8). Komplemanı fikse eden antikorların IgM türü antikorlar olduğu düşünülürse, KB antikor titresindeki yükselme HÜ antikorlarına göre daha anlamlı olabilir. Ancak bu hastada ELISA testi ile IgG ve IgM antikorlarının saptanamaması bu düşüncayı desteklememektedir.

Diğer transplantlı hastalarımızda ise BKV reaktivasyonunun kanıtı olabilecek serolojik değerler elde edilememiştir. HÜ ve KB antikor titrelerinde, iki serum arasında ya 2 kat artış belirlenmiş ya da herhangi bir

artış saptanmamıştır. Dört hastamızın (1,4,6,9 no'lu hastalar) transplantasyondan önce ve sonraki serum örneklerinde IgG antikorları ELISA testi ile pozitif, 1 hastanın ise (2 no'lu hasta) negatif bulunurken, hiçbirisinde IgM antikorları saptanmamıştır (Tablo 9).

Çalışmamızda, bir böbrek ve 3 kemik iliği transplantasyonu yapılan 4 hastada HÜ ve KB gibi klasik testlerle serokonversiyonun gösterilmesi ve bu sonuçların ELISA-IgG ve IgM testleriyle de teyid edilmesi BKV reaktivasyonunu açıkça ifade etmektedir.

Böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda BKV reaktivasyonu, serolojik yöntemlerin yanısıra hastaların idrarlarından virus izolasyonu ya da idrar sedimentinin sitolojik yöntemlerle incelenmesi ve inklüzyon cisimciğinin aranması ile de saptanabilmektedir. Jung ve ark., böbrek transplantasyonlu 54 hastanın 10 unda HÜ ve KB testleri ile akut enfeksiyonu gösteren artış olduğunu bildirmişler ve 3 hastanın idrarlarından da BKV izolasyonu yapmışlardır (45). Bu araştırmacılar hücre kültürlerinde BKV a özgül sitopatik etkinin 8 haftada ortaya çıktığını ifade etmektedirler. BKV un idrardan ilk izolasyonunu gerçekleştiren Gardner ve ark. da, virusun Vero hücre kültüründe ürediğini gösteren bulguların 109. günde tesbit edildiğini bildirmektedirler (1).

Çalışmamızda böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalardan alınan steril idrar örnekleri Vero hücre kültürlerine inoküle edilmiş ancak hiçbirinden BKV izolasyonu yapılamamıştır. Bilindiği gibi, klinik bir örnekten virus izolasyonunun mümkün olabilmesi için örneğin uygun zamanda ve uygun şartlarda alınmış olması ve laboratuvara uygun şartlarda gönderilmiş olması gerekmektedir. Hastalarımızın idrar örnekleri uygun şartlarda alınmış ve gönderilmiştir. Ancak idrarların alındığı

zamanlar virürinin başlamadığı ya da bittiği dönemlere rastlamış olabilir. Arthur ve ark., BK virürisinin transplantasyondan sonraki 4. ve 113. günlerde, ortalama 16-63 gün arasında olduğunu ve hastaların 13 hafta izlenerek bir hastadan en az 2 ya da daha fazla idrar örneği alınması gerektiğini vurgulamaktadırlar (51). Aynı araştırmacılar, BK virürisi olan 26 hastadan alınan 4'er idrar örneğinden yalnızca bir tanesinden virus izolasyonu yapabildiklerini bildirmektedirler. Bu konu ile ilgili diğer çalışmalarda da virürinin intermitan tabiatı dolayısıyla virus izolasyonunun oldukça güç olduğu ileri sürülmektedir (45,51,90). Çalışmamızda hastalardan idrar örnekleri transplantasyondan sonraki 15-21. günlerde alınmış ve Vero hücre kültürlerine ekildikten sonra 30-40 gün kadar takip edilmiştir. Hastalarımızdan mükerrer idrar örneklerinin toplanması mümkün olmadığından virus izolasyon şansımız da kısıtlı kalmıştır.

BKV salınımının hücre kültürlerinde üreyerek belirgin bir sitopatik etki oluşturması çok uzun zamanda gerçekleşmektedir. Bu süre, klinik örneğin içerdiği enfektif viral partikül sayısına bağlı olarak haftalar veya aylar arasında değişebilmektedir. Çalışmamızda, virus üremesi ancak 30-40 güne kadar takip edilebilmiş ancak bu süreden sonra hücre kültürlerinde meydana gelen spontan bozulma nedeniyle izlenememişlerdir. Hernekadar hastalarımızın idrar örnekleri -25°C de saklanmış ve hücre kültürlerine tekrarlayan ekimler yapılmışsa da virus üremesi saptanamamıştır (Tablo 9).

Gardner ve ark., Coleman ve ark. ve Lecatsas ve ark. BKV ekskresyonunun, virus izolasyonu ya da inklüzyon cisimciğinin görülmesi ile tesbit edilebilme oranının % 0-44 arasında değiştiğini bildirmektedirler (25,49,90).

Böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarımızın idrar

örneklerinden BKV izolasyonunun başarısız olması, idrar örneklerinin alındığı sırada virüsünün olmamasına, hastanın takip edilememesi ve değişik zamanlarda birden fazla örneğin toplanamamasına ya da hücre kültürü sistemlerinin çok uzun süre devam ettirilememesine bağlı olabilir.

BKV reaktivasyonu, virusun idrardan izole edilmesinin yanısıra gerek elektron mikroskopik olarak gerekse sitolojik boyalarla idrar sedimentinin incelenmesiyle de gösterilebilir. Traystman ve ark., böbrek transplantasyonu yapılan 91 hastanın 24 ünde elektron mikroskopu ve immün elektron mikroskopi ile idrarda BKV varlığını göstermişlerdir (46). Coleman ve ark. da, immün süpresif tedavi alan 37 kanserli hastanın 5 inde sitolojik olarak BKV inklüzyon cisimciğine rastladıklarını ve bu sonuçların da elektron mikroskopi ile teyid edildiğini bildirmektedirler (73). Bizim hastalarımızın idrar sedimentinin Giemsa ile boyanarak incelenmesi sonucunda yalnızca bir hastada (5 no'lu hasta) BKV için tanımlanan tipik görünümde, çekirdek içinde inklüzyon cisimciği gösterilmiştir (Tablo 9). Bu hasta, BKV reaktivasyonunun serolojik olarak gösterildiği ve BKV-IgM antikorları pozitif olan hastadır. Diğer hastaların ve özellikle serokonversiyonun ve IgM antikorlarının pozitif olarak saptandığı hastaların idrar sedimentlerinde inklüzyon cisimciğine rastlanmamıştır. Bu sonuç, idrar sedimentindeki epitel hücre sayısının yeterli olmamasına, virüsünün belirli zaman aralıklarında olmasına ya da teknik yetersizliklerden dolayı daha hassas histolojik boyaların kullanılamamasına bağlanabilir.

Böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda BKV reaktivasyonunun nadiren de olsa üretral stenoz gibi bir komplikasyona neden olduğu ve kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda da hemorajik sistit

oluşturduğu bilinmekte ve bu hastaların klinik olarak takip edilmeleri gerektiği ileri sürölmektedir (26,39,49,50,52). Ancak BK virus enfeksiyonunun veya reaktivasyonunun doku atılımındaki rolü ve hastalığın prognozundaki yeri henüz tam olarak bilinmemektedir.

Toplumlarda yaygın olarak bulunan ve onkojenik potansiyeli iyi bilinen BK virus, oldukça geniş bir araştırma konusu teşkil etmektedir. Sunulan çalışmamız bu konu ile ilgili ilk ve öncü bir çalışma olup bundan sonraki birçok araştırmanın bir başlangıcıdır. Bundan sonraki amacımız, daha fazla immünsüpresif hasta gruplarını içine alan ve virus izolasyonuna ağırlık veren çalışmaları gerçekleştirmek olacaktır.

Ö Z E T

Çalışmamızda, çeşitli yaş gruplarındaki 1123 bireyden toplanan serum örneklerinde yeni insan polyoma virusu olan BKV a karşı antikor düzeyleri HÖ testi ile araştırılmış ve BKV serolojisinde kullanılan HÖ, KB ve ELISA-IgG testleri ile 110 serum örneğinde saptanan titre değerleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca, böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan 10 hastadan transplantasyon öncesi ve sonrasında alınan serum örneklerinde BKV reaktivasyonu serolojik olarak, bu hastaların idrar örneklerinde ise virolojik ve sitolojik olarak araştırılmıştır.

Çalışılan 1123 serum örneğinin % 78.5 inde BKV-HÖ antikorları pozitif bulunmuş ve en yüksek seropozitiflik oranı % 89.3 ile 11-17 yaş grubunda saptanmıştır. Özellikle 1-5 ve 6-10 yaş gruplarında HÖ antikor düzeylerinin diğer gruplara göre daha yüksek titrelerde pozitif bulunması, BKV enfeksiyonunun primer olarak çocukluk döneminde geçirildiğini vurgulamaktadır.

BKV antikorlarının saptanmasında sıklıkla kullanılan HÖ, KB ve ELISA-IgG testleri ile de 110 serum örneğinde alınan değerler kıyaslanmış ve sonuçlar testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü yönünden tartışılmıştır. Özgüllük HÖ ve KB testleri kıyaslandığında % 96, duyarlılık KB ve ELISA-IgG testleri kıyaslandığında % 92.7 ve uyumluluk HÖ ve ELISA-IgG testleri arasında % 88 olarak saptanmıştır.

Böbrek ve kemik iliği transplantasyonu yapılan 10 hastanın 4 ünde BKV reaktivasyonu, serokonversiyon ve IgM antikorlarının pozitifliği ile gösterilmiş ancak hastaların idrar örneklerinin hiçbirisinden BKV izolasyonu yapılamamıştır. Ancak, serolojik olarak BKV reaktivasyonunun saptandığı bir hastanın idrar sedimentinin Giemsa boyası ile incelenmesinde BKV a özgül çekirdek içi inklüzyon cisimciği gösterilmiştir.

Yurdumuzda BKV ile ilgili olarak yapılan bu ilk çalışmanın bulguları ışığında daha geniş ve ileri araştırmalar yapılacağı inancındayız.

PREVALENCE OF BK VIRUS ANTIBODIES IN VARIOUS AGE GROUPS
IN OUR POPULATION AND INVESTIGATION OF BK VIRUS ACTIVATION
IN RENAL AND BONE MARROW TRANSPLANTATION PATIENTS
BY VIROLOGICAL AND SEROLOGICAL METHODS

SUMMARY

This study aimed to investigate BK virus (BKV) antibodies in various age groups by using hemagglutination inhibition (HI) test in sera collected from 1123 subjects. In addition to this seroepidemiological study, antibody titers of 110 sera samples were compared by HI, Complement fixation (CF) and ELISA-IgG tests which are commonly used in BKV serology. Furthermore, BKV reactivation was serologically investigated in 10 patients with renal and bone marrow transplantation and urine samples of those patients were used for virus isolation and cytological examination.

Overall 78.5 % seropositivity were detected in 1123 sera by HI test. The highest value was found in 11-17 age group with 89.3 % seropositivity. However the antibody titers were found higher in 1-5 and 6-10 age groups when compared with others. This finding confirms that primary BKV infections are acquired during childhood.

HI, CF and ELISA-IgG tests were commonly used in BKV serology and 110 sera samples were tested for BKV antibodies by those 3 tests. The results of each individual test was compared with others for sensitivity and specificity. Specificity found to be 96 % when HI and CF tests were compared. Sensitivity also found to be 92.7 % when CF and ELISA-IgG tests were compared. Agreement of HI and ELISA-IgG tests were 88 %.

BKV reactivation was detected in 4 out of 10 patients with renal and bone marrow transplantation. Seroconversion were shown by IgM antibody positivity and 4 fold antibody increase in HI test between 2 sera samples taken before and after transplantation. However BKV isolation in Vero cell lines could not be succeed from any urine samples. Only 1 patient's urine sediment contained uroepithelial cells with intranuclear inclusion bodies characteristic for BKV when examined by Giemsa staining.

We hope this preliminary study will lead to most extensive studies in the future in our country.

K A Y N A K L A R

1. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B : New human papovavirus (BK) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*, 1: 1253-1257, 1971.
2. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS : *Oncogenic Viruses I : DNA-containing Viruses*. In *Microbiology*, pp: 1103-1121, J.B. Lippincott Company, 4th ed., Philadelphia, 1990.
3. Padgett BL : Human Papovaviruses. In J.Tooze (ed), *Molecular Biology of Tumor Viruses*, pp: 339-370, Cold Spring Harbor Lab., 2nd ed., New York, 1980.
4. Shah KV, Daniel RW, Strandberg JD : Sarcoma in a hamster inoculated with BK virus, a human papovavirus. *J. Natl. Cancer Inst.*, 54: 945-950, 1975.
5. Purchio AF, Fareed GC : Transformation of human embryonic kidney cells by human papovavirus BK. *J. Virol.*, 29: 763-769, 1979.
6. McCance DJ, Gardner SD : Papovaviruses : Papillomaviruses and Polyomaviruses. In AJ Zuckerman, JE Banatvala, JR Pattison (eds), *Principles and Practice of Clinical Virology*, pp: 479-506, John Wiley and Sons Ltd., Chichester, Great Britain, 1987.
7. 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.*, 147: 676-684, 1983.
8. Flower AJE, Banatvala JE, Chrystie IL : BK antibody and virus specific IgM responses in renal transplant recipients, patients with malignant disease and healthy people. *Br. Med. J.*, 2: 220-223, 1977.

9. Hogan TF, Borden EC, Mc Bain JA, Padgett BL, Walker DL : Human polyoma-virus infections with JC virus and BK virus in renal transplant patients. *Ann. Intern. Med.*, 92: 373-378, 1980.
10. Arthur RR, Beckmann AM, Li CC, Saral R, Shah KV : Direct detection of the human papovavirus BK in urine of bone marrow transplant recipients : comparison of DNA hybridization with ELISA. *J. Med. Virol.*, 16: 29-36, 1985.
11. Corallini A, Barbanti-Brodano G, Portolani M, Balboni PG, Gross MP, Possati C, et al. : Antibodies to BK virus structural and tumor antigens in human sera from normal persons and from patients with various diseases including neoplasia. *Infect. Immun.*, 13: 1684-1691, 1976.
12. Andrews CA, Daniel RW, Shah KV : Serologic studies of papovaviruses in pregnant women and renal transplant recipients. In JL Sever, DL Madden (eds), *Polyomaviruses and Human Neurological Disease*. pp: 133-141, Alan R. Liss, New York, 1983.
13. Lacatsas G, Schoub BD, Prozesky OW, Pretorius F, DeBeer FC : Polyoma-virus in urine in aplastic anaemia. *Lancet*, 1: 259-260, 1976.
14. Barbanti-Brodano G, Pagnani M, Viadana P, Beth-Giraldo E, Giraldo G, Corallini A : BK virus DNA in Kaposi's sarcoma. *Antibiot. Chemother.*, 38: 113-120, 1987.
15. Flaegstad T, Traavik T, Kolmannskog S, Stokland T : BK virus infection in children with cancer : Serologic response studied by haemagglutination inhibition, neutralization and IgG and IgM specific ELISA tests. *J. Med. Virol.*, 24: 33-44, 1988.
16. Flaegstad T, Perkin H, Husebekk A, Husby G, Traavik T : BK virus infection in patients with AIDS. *Scand. J. Infect. Dis.*, 20: 145-150, 1988.

17. Taguchi F, Hara K, Nagaki D : BK papovavirus in urine of patient with SLE. *Acta Virol.*, 22: 513, 1978.
18. Coleman DV : Recent Developments in the Papovaviruses : The human polyomaviruses (BK virus and JC virus). In, AP Waterson (ed), *Recent Advances in Clinical Virology*. pp: 89-110, Number 2, Churchill Livingstone Inc., New York, 1980.
19. Dei R, Marmo F, Corte D, Sampietro MG, Franceschini E, Urbano P : Age related changes in the prevalence of precipitating antibodies to BK virus in infants and children. *J. Med. Microbiol.*, 15: 285-291, 1982.
20. Flaegstad T, Traavik T, Kristiansen BE : Age-dependent prevalence of BK virus IgG and IgM antibodies measured by ELISA. *J. Hygiene (Lond)*, 96: 523-528, 1986.
21. Shah KV : Papovaviruses. In, BN Fields (ed), *Virology*, pp: 371-391, Raven Press, New York, 1985.
22. Lehrich JR : JC, BK and other polyomaviruses. In, GL Mandell, RG Douglas, JE Bennett (eds) *Principles and Practice of Infectious Diseases*, pp: 1200-1203, Churchill Livingstone, 3rd ed., New York, 1990.
23. Noordea JVD, Wertheim Van Dillen P : Rise in antibodies to human papovavirus BK and clinical disease. *Brit. Med. J.*, 1: 1471, 1977.
24. Goudsmit J, Wertheim Van Dillen P, Van Strien A, Noordea JVD : The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsills. *J. Med. Virol.*, 10: 91-99, 1982.
25. Coleman DV, Gardner SD : Human polyomavirus infection in renal allograft recipients. *Brit. Med. J.*, 3: 371-375, 1973.
26. Coleman DV, McKenzie EFD, Gardner SD, Poulding JM, Amer B, Russel WJ : Human polyomavirus (BK) infection and ureteric stenosis in renal allograft recipients. *J. Clin. Pathol.*, 31: 338-347, 1978.

27. Coleman DV, Wolfendale MR, Daniel RA, Dhanjal NK, Gardner SD, Gibson PE, Field AM : A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. *J. Infect. Dis.*, 142: 1-8, 1980.
28. Shah KV, Daniel R, Madden D, Stagno S : Serological investigation of BK papovavirus infection in pregnant women and their oppspring. *Infect. Immun.*, 30: 29-35, 1980.
29. Taguchi F, Nagaki D, Saito M, Haruyana C, Iwasaki K, Suzuki T : Transplacental transmission of BK virus in human. *Jpn. J. Microbiol.*, 19: 395-398, 1975.
30. Borgatti M, Constanzo F, Portolani M, Vullo C, Osti L, Masi M, Barbanti-Brodano G : Evidence for reactivation of persistent infection during pregnancy and lack of congenital transmission of BK virus, a human papovavirus. *Microbiologica*, 2: 173-178, 1979.
31. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ : Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leuco-encephalopathy. *Lancet*, 1: 1257-1260, 1971.
32. Howley PM : DNA sequence of human papovavirus BK. *Nature (Lond)*, 284: 124-125, 1980.
33. Warren J : Papovavirus Infections. In, EH Lennette, NJ Schidt (eds), *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. pp: 1000-1005, American Public Health Association Inc., Washington DC, 1979.
34. Padgett BL, Walker DL : New human papovaviruses. *Prog. Med. Virol.*, 22: 1-35, 1976.
35. Gardner SD : Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (BK). *Brit. Med. J.*, 1: 77-78, 1973.
36. Mantyjarvi RA, Meurman OH, Vihma L, Berglund B : A human papovavirus

- (BK), biological properties and seroepidemiology. *Ann. Clin. Res.*, 5: 283-287, 1973.
37. Hashida Y, Gaffney PC, Yunis EJ : Acute haemorrhagic cystitis of childhood and papovavirus-like particles. *J. Paediatr.*, 89: 85-87, 1976.
38. Padgett B, Walker D : BK virus and nonhemorrhagic cystitis in a child. *Lancet*, 1: 770, 1983.
39. Rosen S, Harmon W, Krensky AM, Edelson PJ, Padgett BL, Grinnell BW, Rubino MJ, Walker DL : Tubulo-interstitial nephritis association with polyomavirus (BK type) infection. *N. Engl. J. Med.*, 308: 1192-1196, 1983.
40. Heritage J, Chesters PM, McCance DJ : The persistence of papovavirus BK-DNA sequences in normal human renal tissue. *J. Med. Virol.*, 8: 143-150, 1981.
41. Brown P, Tsai T, Gadjusek 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.*, 102: 331-340, 1975.
42. Shah KV, Daniel RW, Warszawski RM : High prevalence of antibodies to BK virus, an SV40 related papovavirus, in residents of Maryland. *J. Infect. Dis.*, 128: 784-787, 1973.
43. Flaegstad T, Rønne K, Filipe AR, Traavik T : Prevalence of anti BK virus antibody in Portugal and Norway. *Scand. J. Infect. Dis.*, 21: 145-147, 1989.
44. Portolani M, Marzocchi A, Barbanti-Brodano G, La Placa M : Prevalence in Italy of antibodies to a new human papovavirus (BK). *J. Med. Microbiol.*, 7: 543-546, 1974.

45. Jung M, Krech U, Price PC, Pyndiah MN : Evidence of chronic persistent infections with polyomaviruses (BK) in renal transplant recipients. Arch. Virol., 47: 39-46, 1975.
46. Traystman MD, Gupta PK, Shah KV, Reissig M, Cowles LT, Hillis WD, Frost JK : Identification of viruses in the urine of renal transplant recipients by cytomorphology. Acta Cytol. (Baltimore), 24: 501-510, 1980.
47. Andrews CA, Shah KV, Daniel RW, Hirsch MS, Rubin RH : A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. J. Infect. Dis., 158: 176-181, 1988.
48. Andrews CA, Shah KV : BK papovavirus infections in renal transplant recipients : contribution of donor kidneys. J. Infect. Dis., 145: 276, 1982.
49. Gardner SD, McKenzie EFD, Smith C, Porter AA : Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. J. Clin. Pathol., 37: 578-586, 1984.
50. O'Reilly RJ, Lee FK, Grossbard E, Kapoor N, Kirkpatrick D, Dinsmore R et al : Papovavirus excretion following marrow transplantation : incidence and association with hepatic dysfunction. Transplant. Proc., 13: 262-266, 1981.
51. Arthur RR, Shah KV, Charache P, Saral R : BK and JC virus infections in recipients of bone marrow transplants. J. Infect. Dis., 158: 563-569, 1988.
52. 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., 315: 230-234, 1986.
53. Drummond JE, Shah KV, Saral R, Santos GW, Donnenberg AD : BK virus specific humoral and cell-mediated immunity in allogeneic bone marrow transplant recipients. J. Med. Virol., 23: 331-344, 1987.

54. McCance DJ, Mims C : Transplacental transmission of polyomavirus in mice. *Infect. Immun.*, 18: 196-202, 1977.
55. Rziha HJ, Belohradsky BH, Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm GW, ZurHausen H : BK virus II : Serologic studies in children with congenital disease and patients with malignant tumours and immunodeficiencies. *Med. Microbiol. Immunol.*, 165: 83-92, 1978.
56. Gibson PE, Field AM, Gardner SD, Coleman DV : Occurrence of IgM antibodies against BK and JC polyomavirus during pregnancy. *J. Clin. Pathol.*, 34: 674-679, 1981.
57. Brown DGW, Gardner SD, Gibson PE, Field AM : BKV specific IgM responses in cord sera, young children and healthy adults detected by RIA. *Arch. Virol.*, 82: 149-160, 1984.
58. Howley PM : Molecular biology of SV40 and the human polyomaviruses BK and JC. In, G.Klein (ed), *Viral Oncology*, pp: 489-550, Raven Press, New York, 1980.
59. Pater A, Pater MM : Expression of the control elements of BK and SV40 viruses in human cells exhibiting different transformed phenotypes. *Virology*, 163: 625-628, 1988.
60. Mantyjarvi RA : New oncogenic human papovaviruses. *Med. Biology*, 57: 29-35, 1979.
61. Watanabe S, Yoshuke K, Nozawa A, Yausa Y, Uchida S : Viable deletion mutant of human papovavirus BK that induces insulinomas in hamsters. *J. Virol.*, 32: 934, 1979.
62. Greenlee JE, Narayan O, Johnson RT, Herndon RM : Induction of brain tumors in hamsters with BK virus, a human papovavirus. *Lab. Invest.*, 36: 636-641, 1977.
63. Takemoto KK, Rabson AS, Mullarkey MF, Blaese RM, Garon CF, Nelson D :

Isolation of papovavirus from brain tumour and urine of a patient with Wiscott Aldrich syndrome. J. Natl. Cancer Inst., 53: 1205-1207, 1974.

64. Grossi MD, Caputa A, Meneguzzi G, Corallini A, Carra L, Portolani M, Borgatti M, et al : Transformation of human embryonic fibroblasts by BK virus, BK virus DNA and a subgenomic BK virus DNA fragment. J. Gen. Virol., 63: 393-403, 1982.
65. Barbanti-Brodano G, Corallini A, Fabi S, Farracini R, Gainst G, Migliore A, Pagnani M, et al : Studies on the association of BK virus to human brain tumors. J. Neurosurg. Sci., 30: 242-243, 1986.
66. Corallini A, Pagnani M, Viadana P, Silini E, Mottes M, Milanese G, Gerna G, Vettor R, et al : Association of BK virus with human brain tumors and tumors of pancreatic islets. Int. J. Cancer, 39: 60-67, 1987.
67. Takemoto KK, Link H, Miyamura T, Fareed GC : Persistent BK papovavirus infection of transformed human fetal brain cells. J. Virol., 29: 1177-1185, 1979.
68. Costa J, Yee C, Rabson AS : Absence of papovavirus T antibody in patients with malignancies. Lancet, 2: 709, 1977.
69. Grossi MP, Meneguzzi G, Chenciner N, Corallini A, Poli F, Altavilla G, Alberti S, et al : Lack of association between BK virus and ependymomas, malignant tumors of pancreatic islets, osteosarcomas and other human tumors. Intervirology, 15: 10-18, 1981.
70. Reese JM, Reissig M, Daniel RW, Shah KV : Occurrence of BK virus and BK virus specific antibodies in the urine of patients receiving chemotherapy for malignancy. Infect. Immun., 11: 1375-1381, 1975.
71. Khan AV, Coleman DV, Koss LG : Activation of human polyomavirus infection-detection by cytologic technics. Am. J. Clin. Pathol., 74: 326-332, 1980.

72. Ilits JP, Cleghorn CS, Madden DL, Sever JL : Detection of antibody to BK virus by ELISA compared to haemagglutination inhibition and immunofluorescent antibody staining. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 105: 157-168, 1983.
73. Coleman DV, Russel WJI, Hodgson J, Tun PE, Mowbray JF : Human papovavirus in papanicolaou smears of urinary sediment detected by transmission electron microscopy. *J. Clin. Pathol.*, 30: 1015-1020, 1977.
74. Zapata M, Mahony IB, Chernesky MA : Measurement of BK papovavirus IgG and IgM by radioimmunoassay. *J. Med. Virol.*, 14: 101-114, 1984.
75. Flaegstad T, Traavik T : Detection of BK virus antibodies measured by enzyme linked immunosorbent assay and two haemagglutination inhibition methods. A comparative study. *J. Med. Virol.*, 16: 351-356, 1985.
76. Flaegstad T, Traavik T : Detection of BK virus IgM antibodies by two enzyme linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition method. *J. Med. Virol.*, 17: 195-204, 1985.
77. Flaegstad T, Traavik T, Christie KE, Joergensen J : Neutralization test for BK virus : Plaque reduction detected by immunoperoxidase staining. *J. Med. Virol.*, 19: 287-296, 1986.
78. Christie KE, Flaegstad T, Traavik T : Characterization of BK virus specific antibodies in human sera by Western immunoblotting. *J. Med. Virol.*, 24: 183-190, 1988.
79. Nilsen I, Flaegstad T, Traavik T : Detection of specific IgA antibodies against BK virus by ELISA. *J. Med. Virol.*, 33: 89-94, 1991.
80. Eisenstein BI : The polymerase chain reaction. *N. Engl. J. Med.*, 332: 178-183, 1990.

81. Drummond JE, Shah KV, Donnenberg AD : Cell-mediated immune responses to BK virus in normal individuals. *J. Med. Virol.*, 17: 237-247, 1985.
82. Notkin LC : Papovaviral persistent infections. *Microbiol. Rev.*, 46: 384-425, 1982.
83. Portolani M, Piani M, Gazzanelli G, Borgatti M, Martoletti A, Grossi MP, Corallini A, Barbanti-Brodano G : Restricted replication of BK virus in human leucocytes. *Microbiologica*, 8: 59-66, 1985.
84. Traavik T, Uhlin-Hansen L, Flaegstad T, Christie KE : Antibody-mediated enhancement of BK virus infection in human monocytes and a human macrophage-like cell line. *J. Med. Virol.*, 24: 283-297, 1988.
85. Coleman DV, Gardner SD, Mulholland C, Firidiksdottir V, Porter AA, Lulford R, Valdimarsson H : Human polyomavirus in pregnancy. A model for the study of defence mechanisms to virus reactivation. *Clin. Exp. Immunol.*, 53: 289-296, 1983.
86. Cheeseman SH, Black PH, Rubin RH, Cantell K, Hirsch MS : Interferon and BK papovavirus. Clinical and laboratory studies. *J. Infect. Dis.*, 141: 157-161, 1980.
87. Grist NR, Bell EJ, Follet EAC, Urquhart GED : a) Cell culture, pp: 60-80, b) Haemagglutination and haemagglutination inhibition tests, pp: 116-128, c) Reagents and methods, pp: 215-223, d) Complement fixation tests, pp: 95-115, In. *Diagnostic Methods in Clinical Virology*. Blackwell Scientific Pub., 3rd ed., London, 1989.
88. Galen RS, Gambino SR : Beyond normality : the predictive value and efficiency of medical diagnoses. New York, John Wiley and Sons, 1975.
89. Rziha HJ, Bornkamm GW, ZurHausen H : BK virus I: Seroepidemiologic studies and serologic response to viral infection. *Med. Microbiol. Immunol.*, 165: 73-81, 1978.
90. Lacatas B, Brozesky OW, Van Wyck J, Els HJ : Papovavirus in urine after renal transplantation. *Nature*, 241: 343-344, 1973.