

# BK Virüs (BKV) Kantitasyonunda Kullanılan İki Farklı Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminin Karşılaştırması ve BKV Genotip Tayini\*

## Evaluation of the Two Different Real Time Polymerase Chain Reaction Methods Used for BK Virus (BKV) Quantification and BKV Genotype Assignment

Aylin ERMAN DALOĞLU<sup>1</sup>, Derya MUTLU<sup>1</sup>, İmran SAĞLIK<sup>2</sup>, Rabia CAN SARINOĞLU<sup>3</sup>, Esvet MUTLU<sup>1</sup>, Hubert G.M. NIESTERS<sup>4</sup>, Dilek ÇOLAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

<sup>1</sup> Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Antalya, Turkey.

<sup>2</sup> Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

<sup>2</sup> Uludağ University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Bursa, Turkey.

<sup>3</sup> Marmara Üniversitesi, Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, İstanbul.

<sup>3</sup> Marmara University, Pendik Training and Research Hospital, Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

<sup>4</sup> University Medical Center Groningen, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Groningen, Hollanda.

<sup>4</sup> University Medical Center Groningen, Department of Medical Microbiology, Groningen, The Netherlands.

\* Bu çalışma, 2. Ulusal Viroloji Günleri (22-24 Mart 2018, İzmir, Türkiye)'nde bildiri olarak sunulmuştur.

**Makale Atfı:** Erman Daloğlu A, Mutlu D, Sağlık İ, Can Sarınoğlu R, Mutlu E, Niesters HGM, Çolak D. BK virüs (BKV) kantitasyonunda kullanılan iki farklı gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin karşılaştırması ve BKV genotip tayini. Mikrobiyol Bul 2019;53(3):285-296.

### ÖZ

BK virüs (BKV) viral yük kantitasyonu, böbrek transplant alıcılarında BKV'e bağlı gelişen nefropati ve organ reddinin klinik olarak belirlenmesinde belirgin role sahiptir. Bu çalışmada, böbrek transplant alıcılarında viral yük tayininde BKV'nin farklı gen bölgelerine yönelik olarak tasarlanan iki farklı gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) yöntemi ile ölçülen BKV DNA değerlerinin karşılaştırılması ve BKV genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İki farklı laboratuvar (Lab-1 ve Lab-2), böbrek transplantasyonu yapılmış yetişkin ve çocuk hastalara ait, daha önce çalışılmış toplam 150 klinik örnek (Lab-1'den 50 hastaya ait 50 plazma örneği, Lab-2'den 58 hastaya ait 50 plazma ve 50 idrar örneği) çalışmaya alınmıştır. Viral nükleik asit izolasyonu Lab-1 ve Lab-2'de otomatize sistemler (sırası ile; EZ1, Qiagen, Almanya ve MagNA Pure 96, Roche Diagnostics, Almanya) ile elde edilmiştir. Rt-PCR işlemi Lab-1'de VP-1 gen bölgesine yönelik primer ve prob dizilerini içeren amplifikasyon karışımı ile Rotor-Gene (Qiagen, Almanya) cihazında, Lab-2'de BKV VP-2 gen bölgesine yönelik primer ve prob dizilerini içeren amplifikasyon karışımı ile ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, ABD) cihazında gerçekleştirilmiştir. BKV genotipleri, I-IV genotiplerine yönelik primer ve problarla multiplex Rt-PCR ile araştırılmıştır. Her iki Rt-PCR yönteminin kalitatif sonuçları arasında orta derecede uyum saptanmış ( $k=0.56$ ,  $p<0.001$ ), her iki laboratuvar (Lab-1 ve Lab-2)de örneklerin 82 (%54.6)'si pozitif, 37 (%24.6)'si negatif bulunmuştur.

**İletişim (Correspondence):** Prof. Dr. Dilek Çolak, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 07070, Antalya, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 242 249 6000/6405-6264, **E-posta (E-mail):** dcolak@akdeniz.edu.tr

pozitif örneklerin ortanca viral yükleri sırası ile;  $4.1 \times 10^4$  kopya/ml (aralık:  $321-6 \times 10^9$ ) ve  $3.3 \times 10^5$  kopya/ml (aralık:  $224-8.3 \times 10^{10}$ ) olarak hesaplanmıştır. Her iki Rt-PCR yönteminin kantitatif sonuçlarının lineer regresyonu incelendiğinde; plazma (n= 52) örnekleri için orta ( $R^2= 0.52$ ,  $p< 0.001$ ), idrar (n= 30) örnekleri için ise yüksek derecede ( $R^2= 0.88$ ,  $p< 0.001$ ) korelasyon saptanmıştır. Bland-Altman analizine göre her iki testle pozitif bulunan tüm örnekler için farkların ortalaması  $-0.58 \log_{10}$  bulunmuş olup bu değer plazma örneklerinde  $-0.29 \log_{10}$ , idrar örneklerinde ise  $-1.1 \log_{10}$ 'dur. Tüm örneklerde Lab-1 ölçümleri Lab-2'den daha düşük seviyelerdedir. Viral yük farkının  $-1.1 \log_{10}$  olması; Lab-2'nin Lab-1'den ortalama olarak  $1.1 \log_{10}$  daha yüksek ölçüm yaptığını göstermektedir. Bu bulguyu destekler şekilde; iki test arasında aynı örneklerde ölçüm farkı; %71.9 örnekte  $0.5 \log_{10}$ 'dan, %29.2 örnekte ise  $1 \log_{10}$ 'dan fazla bulunmuştur, sadece %28.1 örnekte sonuçlar arasındaki fark klinik olarak kabul edilebilir aralık olan  $0.5 \log_{10}$ 'dan daha az çıkmıştır. BKV genotiplendirmesi, kopya sayıları yeterli olan her biri farklı hastaya ait 74 örneğe uygulanabilmiş ve genotip I (%81.7), IV (%15.5), II (%1.4) ve I+IV (%1.4) varlığı saptanmıştır. Genotip IV bulunan hastaların (n= 12), %66.6'sında  $1 \log_{10}$ 'dan fazla, %83.3'ünde  $0.5 \log_{10}$ 'dan fazla viral yük ölçüm farkı tespit edilmiş, kantitasyon uyumsuzluğunun en çok genotip-IV hastalarında olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak; iki farklı testin sonuçlarının karşılaştırılması amaçlandığında korelasyon ve lineer regresyon analizleri yetersiz kaldığı, çalışma sonuçlarımızda da bu durumun açıkça gözlemlendiği belirlenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün geliştirdiği uluslararası BKV standardı optimize edilinceye dek, her merkezlin hastalarını aynı testle takip etmesi uygun olacaktır. Testlerin klinik korelasyonu, kullanılan mevcut testle sınırlı kalmaktadır. BKV kantitasyonunun yanlış yapılması klinik kararı etkilemektedir. Gerçek değerinden düşük ölçümler hastada BKV nefropatisi gelişmesine, yüksek ölçümler ise gereksiz allogreft biyopsisi yapılmasına ve immünsupresyonun gereksiz yere azaltılmasına yol açarak rejeksiyona zemin hazırlayacaktır.

**Anahtar kelimeler:** BK virüs; gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu; kantitasyon; genotip.

## ABSTRACT

BK virus (BKV) viral load quantification has a distinct role in the clinical control of BKV nephropathy and organ rejection among renal transplant recipients. In this study, it was aimed to compare BKV DNA measurement values performed with two different real-time polymerase chain reaction (PCR) methods and to determine BKV genotypes in renal transplant recipients. Totally, 150 clinical samples tested previously in two different laboratories (Lab-1 and Lab-2) from adult and pediatric renal transplantation patients were included in the study. Fifty plasma samples of 50 different patients from Lab-1, 50 plasma and 50 urine samples of 58 different patients from Lab-2 were included in the study. Viral nucleic acid extraction was performed with automatized systems in Lab-1 and Lab-2 (EZ1, Qiagen, Germany and MagNA Pure 96, Roche Diagnostics, Germany; respectively;). Real-time PCR procedure was carried out in Lab-1 with an amplification mixture of primer, probe sequences targeting VP-1 gene region using Rotor-Gene (Qiagen, Germany) and in Lab-2 with an amplification mixture of primer, probe sequences targeting VP-2 gene region using ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, USA). BKV genotyping was performed with multiplex PCR using primer, probe sequences for BKV genotypes I-IV. In both of the laboratories, 82 (54.6%) of the samples were found as positive, 37(24.6%) samples were found as negative and a moderate agreement was found between qualitative results of two real-time PCR methods ( $k= 0.56$ ,  $p< 0.001$ ). Median viral load values were  $4.1 \times 10^4$  copies/ml ( $321-6 \times 10^9$ ) in Lab-1 and  $3.3 \times 10^5$  copies/ml ( $224-8.3 \times 10^{10}$ ) in Lab-2 for positive samples. According to the linear regression analysis of quantitative results, moderate ( $R^2= 0.52$ ,  $p< 0.001$ ) and high ( $R^2= 0.88$ ,  $p< 0.001$ ) correlation was found for plasma (n= 52) and urine (n= 30) samples, respectively. Bland-Altman analysis yielded a mean difference of  $-0.58 \log_{10}$  for all samples. For plasma samples mean difference was  $-0.29 \log_{10}$ , while it was  $-1.1 \log_{10}$  for urine samples. In all samples, Lab-1 measurements were lower than Lab-2 measurements. A mean difference of  $-1.1 \log_{10}$  indicated that the measurement values of Lab-2 were more higher than Lab-1 measurements with an average of  $1.1 \log_{10}$ . Supporting this result, 71.9% of the samples had a measurement difference more than  $0.5 \log_{10}$  and 29.2% of the samples had a measurement difference more than  $1 \log_{10}$ . Only 28.1% of the samples were measured within clinically acceptable log difference range (less than  $0.5 \log_{10}$ ). BKV genotyping was performed only for 74 different patient samples with sufficient copy numbers and genotype I (81.7%), IV (15.5%), II (1.4%), I+IV (1.4%) were detected. When the results

were compared; 66.6% (n= 12) of the genotype IV samples had more than 1 log<sub>10</sub> and 83.3% of them had more than 0.5 log<sub>10</sub> viral load measurement difference. Correlation and linear regression analyzes were insufficient for the comparison of the results of the two different tests. It will be appropriate for each center to monitor patients with the same test until the international BKV standard developed by the World Health Organization is optimized. The clinical correlation of the tests is limited to the currently used test. The result of incorrect BKV quantification affects the clinical decision. Measurements less than the actual value will lead to the development of BKV nephropathy, and higher measurements will lead to unnecessary allograft biopsy and unnecessary reduction of immunosuppression.

**Keywords:** BK virus; real-time polymerase chain reaction; quantification; genotype.

## GİRİŞ

BK virüs (BKV) Polyomavirus ailesinde yer alan, yaklaşık 5000 baz çifti (bp)'nden oluşan çift sarmal çembersel DNA'ya sahip, ikozahedral kapsitli, zarfsız, küçük (40-45 nm çapında) bir virüstür. Erken, geç ve kodlama yapmayan kontrol bölgesi olmak üzere üç gen bölgesi bulunmaktadır. Erken gen bölgesi büyük T ve küçük t antijenlerini; geç gen bölgesi ise yapısal kapsit proteinleri olan VP1, VP2 ve VP3 ile yapısal olmayan bir protein olan agnoproteini kodlamaktadır<sup>1</sup>. BKV, majör kapsit proteini olan VP1'in gen dizisine göre, farklı prevalans ve coğrafik dağılıma sahip dört genotipe ayrılmaktadır<sup>2</sup>. Genotip I'de dört alt grup (Ia, Ib-1, Ib-2 ve Ic), genotip IV'de ise altı alt grup (IVa-1, IVa-2, IVb-1, IVb-2, IVc-1 ve IVc-2) tanımlanmıştır. Alt grup Ib-2 yeni sınıflamada genotip V, Ib-1 ise genotip VI olarak belirlenmiştir<sup>3</sup>.

BKV primer enfeksiyonu, genellikle asemptomatik veya bir üst solunum yolu hastalığı şeklinde geçirilmektedir. İnsidansı 2-5 yaş aralığında pik yaptığı için erken çocukluk döneminde solunum veya oral yolla bulaştığı düşünülmektedir. Sağlıklı erişkinlerde bildirilen BKV seroprevalansı genel olarak %90 civarındadır<sup>4,5</sup>.

Asemptomatik enfeksiyon sonrasında BKV, en sık üroepitelyal hücrelerde ikinci sıklıkta periferik kanın mononükleer hücrelerinde latent olarak kalabilir. İmmünkompetan hastalarda latent virüse bağlı reaktivasyonlar herhangi bir klinik önem taşımamaktadır. Ancak böbrek transplantasyonu, kök hücre transplantasyonu nedeniyle immüsupresif tedavi almakta olan bireylerde reaktivasyon ile geçici virüri ve viremi oluşabildiği gibi, allogreft disfonksiyonu, nefropati, üreter stenozu ve hemorajik sistit gibi ciddi klinik tablolar da gelişebilir<sup>1</sup>. Viremi virüriden yaklaşık bir ay sonra gelişir ve viremi öncesinde her zaman virüri gözlenmektedir. BKV'nin kan dolaşımına yayılımının tübüler harabiyet sonucu peritübüler kılcal damarlar yoluyla olduğu düşünülmektedir<sup>4</sup>.

Böbrek transplantasyonu yapılanlarda BKV enfeksiyonu saptandığında en önemli tedavi yöntemi immüsupresyonun azaltılmasıdır, ancak bu azaltma akut rejeksiyon gelişimi için risk oluşturabilir. Bu nedenle bu dönemde hastaların takibi büyük önem taşımaktadır. Böbrek transplantasyonu sonrasındaki dönemde BKV reaktivasyonuna bağlı komplikasyonların önlenmesi için erken tanı ve hastaların gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) testi ile monitörize edilmesi önerilmektedir<sup>6</sup>.

Günümüzde BKV viral yükünün saptanmasında kullanılan Rt-PCR testlerinde henüz bir standardizasyon yoktur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün uluslararası BKV kantitasyon standardı geliştirme çalışması tamamlanmış olmakla birlikte uygulamaya geçildiğinde, bu standardın farklı yöntemler arası sonuçların uyumuna ve farklı kurumlarda BKV klinik eşik değerlerinin tanımlanmasına imkan sağlayacağı bildirilmektedir<sup>7,8</sup>.

Ticari ya da laboratuvar tasarımı olsun, farklı Rt-PCR testleri; nükleik asit ekstraksiyon yöntemi, başlangıç volümü, seçilen primer ve problemler, testin uygulanım şekli, amplifikasyon koşulları gibi nedenlere bağlı olarak aynı örnek için farklı sonuçlar verebilmektedir<sup>3</sup>.

Bu çalışmada böbrek transplant alıcılarında BKV'nin farklı gen bölgelerine yönelik olarak tasarlanan iki Rt-PCR yöntemi ile ölçülen BKV DNA değerlerinin karşılaştırılması ve BKV genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu Başkanlığı onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 26.04.2017 ve Karar no: 247).

### Çalışma Grubu

İki farklı laboratuvar (Lab-1, Lab-2) böbrek transplantasyonu yapılmış yetişkin ve çocuk hastalara ait, daha önce çalışılmış plazma ve idrar örnekleri çalışmaya alındı. Lab-1'den 50 hastaya ait 50 plazma örneği, Lab-2'den 58 hastaya ait 50 plazma ve 50 idrar örneği olmak üzere toplam 150 klinik örnek test edildi. Araştırma boyunca örnekler -80°C'de saklandı.

### Lab-1'de Yapılan Testler

**Viral yük tayini:** Viral DNA ekstraksiyonu ticari bir kit (EZ1 Virus Mini Kit, Qiagen, Almanya) ve otomatize cihaz (Biorobot EZ1 Advanced, Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda 400 µl örnekten 60 µl ekstrakt elde edecek şekilde yapıldı. Vats ve arkadaşları tarafından tanımlanan primer dizileri kullanılarak virüsün VP-1 bölgesi içerisindeki 83 bp bölge amplifiye edildi (Tablo I)<sup>9,10</sup>. Amplifikasyon aşamasında, bir BKV negatif kontrol ve kantitasyonun sağlanabilmesi için pBR322 plazmidini içerisine klonlanan Dunlop suşunun tüm dizisini içeren pBKV (ATCC45025) ile, UV spektrofotometre kullanılarak log<sub>10</sub> tabanına göre değişen konsantrasyonlarda plazmit içeren beş standart kullanıldı. İnternal kontrol olarak, hedef ile aynı tüp içerisinde, gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni içinde yer alan bir bölge çoğaltıldı. Örnek başına düşen reaksiyon karışım toplam hacim 25 µl olacak şekilde; Quantitect Prob PCR Master Mix (Qiagen, Almanya) ile birlikte Tablo I'de yer alan BKV'ye ve internal kontrole yönelik primerler, problemler, GAPDH amplikonu ve 5 µl ekstrakt içermekteydi. Amplifikasyon ve saptama işlemi için Rotor-Gene (Qiagen, Almanya) cihazı kullanıldı. PCR döngüsü; 95°C'de 12 dakika bir döngü; 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 1 dakika ve 40°C'de 1 dakikadan oluşan 45 döngü olarak uygulandı. Testin analitik duyarlılığı ve saptama limiti 300 kopya/ml (2.5 log kopya/ml) olarak belirlendi.

**Tablo 1.** Lab-1 ve Lab-2'de BKV Viral Yük Tayini ve BKV Genotip Tayininde Kullanılan Primer ve Prob Dizileri

Birim	Primer-Prob	Dizi
Lab-1 Rt-PCR	BK-F	5'-TGA TAG CCC AGA GAG AAA AAT GC-3'
	BK-R	5'-TCC ACA GGT TAG GTC CTC ATT TAA A-3'
	BK-P	5'-FAM-TTA CAG CAC AGC AAG AAT TCC CCT CCC-TAMRA-3'
	IC-GAPDH-F	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'
	IC-GAPDH-R	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT-3'
	IC-GAPDH-P	5'-joe-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC-BHQ-3'
Lab-2 Rt-PCR	BK-F	5'-ATG GGT GCT GCT CTA GCA CTT T-3'
	BK-R-1	5'-GGA TGC AAT TTG AAC TTC TAT GGC-3'
	BK-R-2	5'-GGA TGC AAT TTG AAC TTC TAT AGC AG-3'
	BK-P	5'-FAM-CAG TGT ATC TGA GGC TG-MGB-3'
Lab-2 Multiplex Rt-PCR	IC-PhHV-F	5'-GGG CGA ATC ACA GAT TGA ATC-3'
	IC-PhHV-R	5'-GCG GTT CCA AAC GTA CCA A-3'
	IC-PhHV-P	5'-Cy5-CGC CAC CAT CTG GAT-BBQ-3'
	BK-Tip1-F	5'-TAA CCT TCA TGC AGG GTC ACA A-3'
	BK-Tip1-R	5'-CTCCACCAACAGCAAARAAGTG-3'
	BK-Tip1-P-1	5'-FAM-AGTGCATGAGCATGG-MGB-3'
	BK-Tip1-P-2	5'-TACATGAGCATGGTGA-3'
	BK-Tip2-F	5'-GGT AGA TGC TAT AAC AGA GGT AGA ATG C-3'
	BK-Tip2-R	5'-TGT CTG GGC TAT CAC TsT CAA AGG-3'
	BK-Tip2-P	5'-VIC-CAG TTA GCT TTA GAC TAT A-MGB-3'
	BK-Tip3-F	5'-GGT AGA TGC TAT AAC AGA GGT AGA ATG C-3'
	BK-Tip3-R	5'-TGT CTG GGC TAT CAC TsT CAA AGG-3'
	BK-Tip3-P	5'-VIC-AsT TAG GTG CTG ACT ATA G-MGB-3'
	BK-Tip4-F	5'-ACT GGG GTA GAT GCT ATA ACA GAA GTA GA-3'
	BK-Tip4-R	5'-TGG GCT ATC ACT sTC AAA GGC AG-3'
	BK-Tip4-P	5'-FAM-CAG CAG TTA GTC TTA GAC T-MGB-3'

F: 'Forward (İleri)', R: Revers, P: Prob, IC: Internal control, GAPDH: Gliseraldehit-3-Fosfat dehidrogenaz, PhHV: 'PhocineHerpesvirus (Fokherpesvirüs)'.

### Lab-2'de Yapılan Testler

**Viral yük tayini:** Viral DNA ekstraksiyonu ticari bir kit (MagNA Pure 96 DNA-Viral NA Small Volume Kit, Roche Diagnostics, Almanya) ve otomatize cihaz (MagNA Pure 96 System, Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda 190 µl örnekten 100 µl ekstrakt hacmi elde edilecek şekilde yapıldı. Fok herpesvirüsü

(Phocine Herpesvirus-PhHV) içeren internal kontrolden 10 µl klinik örneğe eklendi. Virüsün VP-2 bölgesi içerisindeki 131 bp bölge amplifiye edildi (Tablo I)<sup>11</sup>. Amplifikasyon aşamasında, bir BKV negatif kontrol ve kantitasyonun sağlanabilmesi için beş spesifik kantitasyon standardı kullanıldı. Örnek başına düşen reaksiyon karışımı toplam hacim 50 µl olacak şekilde; "TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Amerika Birleşik Devletleri)" ve 1 µl (5 mg/ml) sığır serum albumin (Roche Diagnostics, Almanya) ile birlikte Tablo I'de yer alan BKV'ye ve internal kontrole yönelik primerler, probalar, PhHV ampikonu ve 20 µl ekstrakt içerecek şekilde hazırlandı. Amplifikasyon ve saptama işlemi için ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, ABD) cihazı kullanıldı. PCR; 50°C'de 2 dakika, 95°C'de 10 dakikayı takiben 42 döngü; 95°C 15 sn ve 60°C'de 1 dakika şeklinde uygulandı. Testin analitik duyarlılığı ve saptama limiti 100 kopya/ml (2 log kopya/ml) olarak belirlendi.

**BKV genotip tayini:** Farklı genotipler için gerekli primer ve probalar eklenerek (VP-1 gen bölgesine yönelik), Rt-PCR ile aynı protokole multipleks Rt-PCR yapıldı. Testin saptama limiti 1000 kopya/ml (3 log kopya/ml) olarak saptandı (Tablo I)<sup>11</sup>.

### İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS Version 22.0 programı kullanıldı. İki Rt-PCR testi arasındaki kalitatif uyumun araştırılmasında McNemar testi kullanılarak kapa değeri ( $\kappa$ ) hesaplandı. Kantitatif sonuçlar korelasyon, lineer regresyon ve Bland-Altman testleri ile analiz edildi. Normal dağılım ölçümü için Shapiro-Wilk testi uygulandı. İstatistiki değeri belirlemede  $p < 0.05$  olması anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

Her iki laboratuvarında tüm örneklerin ( $n = 150$ ) 82 (%54.6)'si pozitif, 37 (%24.6)'si negatif bulunmuştur. Toplam 31 (%20.6) örnekte (21 plazma, 10 idrar) uyumsuz sonuç elde edilmiştir (Tablo II). Her iki Rt-PCR yönteminin kalitatif sonuçları arasında orta derecede uyum saptanmıştır ( $\kappa = 0.56$ ,  $p < 0.001$ ). Her iki laboratuvarında plazma örneklerinin ( $n = 100$ ) 52 (%52)'si pozitif, 27 (%27)'si negatif bulunmuştur ( $\kappa = 0.56$ ,  $p < 0.001$ ). Yirmi bir (%21) plazma örneğinde uyumsuz sonuç elde edilmiştir. İdrar örnekleri için ( $n = 50$ ), her iki laboratuvarında örneklerin 30 (%60)'u pozitif, 10 (%20)'u negatif bulunmuştur ( $\kappa = 0.54$ ,  $p < 0.001$ ). On (%20) idrar örneğinde uyumsuz sonuç elde edilmiştir (Tablo II).

**Tablo II.** Lab-1 ve Lab-2'ye Ait BKV Kantitatif Rt-PCR Sonuçları

Testler		Lab-1				Toplam
		Pozitif		Negatif		
		Plazma	İdrar	Plazma	İdrar	
Lab-2	Pozitif	52	30	19	10	111
	Negatif	2	0	27	10	39
	Total	54	30	46	20	150

BKV: BK virüs, Rt-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.

Her iki Rt-PCR yönteminin kantitatif sonuçlarının logaritmalarının lineer regresyonu incelendiğinde; plazma (n= 52) örnekleri için orta derecede ( $R^2= 0.52$ ,  $p< 0.001$ ,  $y= 0.77x+1.3$ ), idrar (n= 30) örnekleri için ise yüksek derecede ( $R^2= 0.88$ ,  $p< 0.001$ ,  $y= 0.87x+1.87$ ) korelasyon saptanmıştır ( $y= \text{Lab-2}$ ,  $x= \text{Lab-1}$ ).

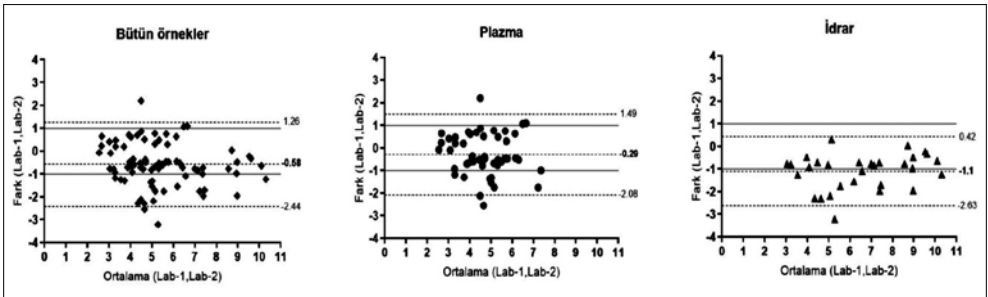
Her iki laboratuvarıda pozitif saptanan tüm örnekler, pozitif saptanan plazma örnekleri ve pozitif saptanan idrar örnekleri için viral yük ortanca değerleri arasında laboratuvarlar arası anlamlı bir fark görülmemekle birlikte; sonuçlar tek tek incelendiğinde özellikle idrar örnekleri başta olmak üzere, Lab-2'de Lab-1'e göre daha yüksek ölçümler olduğu gözlenmiştir (Tablo III).

Her iki laboratuvarıda pozitif bulunan 82 örneğin viral yük ölçümlerinin logaritmik değerlerinin ortalamalarına karşı farklarının dağılımı Bland-Altman grafiğinde gösterilmiştir (Şekil 1). Ortalama fark; bütün örnekler için  $-0.58 \log_{10}$  kopya/ml (standart sapma= 0.94), plazma örnekleri için  $-0.29 \log_{10}$  kopya/ml (standart sapma= 0.91), idrar örnekleri için  $-1.1 \log_{10}$  kopya/ml (standart sapma= 0.78) olarak bulunmuştur (Şekil 1).

İki laboratuvar arasındaki ölçüm farkı; 24 (%29.2) örnekte  $1 \log_{10}$ 'dan fazla (ortanca  $1.63 \log_{10}$  kopya/ml; aralık 1.07-3.21), 59 (%71.9) örnekte ise  $0.5 \log_{10}$ 'dan fazla (ortanca: 0.84, aralık: 0.51-3.21) bulunmuştur.

**Tablo III. Pozitif Bulunan Tüm Örneklerin, Plazma örneklerinin ve İdrar örneklerinin Lab-1 ve Lab-2'deki Ortanca Viral Yük Değerleri**

Pozitif örnekler	Test Birimi	Lab-1 Viral yük ortanca değer (aralık)	Lab-2 Viral yük ortanca değer (aralık)
Tüm örnekler (n= 82)	Kopya/ml $\log_{10}$ kopya/ml	$4.1 \times 10^4$ ( $321-6 \times 10^9$ ) 4.61 (2.51-9.78)	$3.3 \times 10^5$ ( $224-8.3 \times 10^{10}$ ) 5.52 (2.35-10.92)
Plazma (n= 52)	Kopya/ml $\log_{10}$ kopya/ml	$2.2 \times 10^4$ ( $321-1.6 \times 10^7$ ) 4.34 (2.51-7.20)	$8 \times 10^4$ ( $224-1.2 \times 10^8$ ) 4.90 (2.35-8.10)
İdrar (n= 30)	Kopya/ml $\log_{10}$ kopya/ml	$1.1 \times 10^6$ ( $461-6 \times 10^9$ ) 6.05 (2.66-9.78)	$1.1 \times 10^7$ ( $2691-8.3 \times 10^{10}$ ) 7.04 (3.43-10.92)



**Şekil 1.** Her iki laboratuvarıda pozitif bulunan 82 örneğin (52 plazma ve 30 idrar) viral yük ölçümlerinin logaritmik değerlerinin ortalamalarına karşı farklarının dağılımının incelendiği Bland-Altman grafikleri. Kesikli çizgiler ortalama ve  $\pm 1.96$  uyum sınırlarını göstermekte, düz çizgiler ortalamadan  $1 \log_{10}$  kopya/ml farkı göstermektedir.

**Tablo IV.** Saptanan BKV Genotipleri

BKV Genotipleri	Lab 1 n (%)	Lab 2 n (%)	Tüm örnekler n (%)
Genotip I	25 (80.7)	33 (82.5)	58 (81.7)
Genotip II	1 (3.2)	0 (0)	1 (1.4)
Genotip III	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Genotip IV	5 (16.1)	6 (15)	11 (15.5)
Genotip I+IV	0 (0)	1 (2.5)	1 (1.4)
Toplam	31 (100)	40 (100)	71 (100)

BKV: BK virüs.

BKV genotiplendirmesi, kopya sayıları yeterli olan her biri farklı hastaya ait 74 örnekte yapılmıştır. Üç örnekte tiplendirme yapılamamıştır. Yetmiş bir farklı hastada saptanan genotipler Tablo IV'te gösterilmiştir. Tüm örnekler arasında; genotip IV bulunan hastaların (n= 12), %66.6'sında  $1 \log_{10}$ 'dan fazla, %83.3'ünde  $0.5 \log_{10}$ 'dan fazla viral yük ölçüm farkı saptanmıştır.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada, BKV'nin farklı gen bölgelerini hedefleyen iki farklı Rt-PCR yönteminin klinik örneklerde BKV kantitasyonu açısından karşılaştırılması ve BKV genotip tayini amaçlanmıştır. İki Rt-PCR yönteminin kalitatif sonuçları arasında orta düzeyde uyum bulunmuştur. Analitik duyarlılığı daha iyi olan Lab-2 testi ile daha fazla pozitiflik saptanmıştır. Kalitatif değerlendirmede uyumsuz örneklerin çoğunluğunu plazma örneklerinin oluşturduğu görülmüştür. İdrara göre plazmada daha düşük BKV viral yük değerlerine rastlandığı için, plazmadaki ufak viral yük farklılıkları kalitatif sonuçları daha yüksek oranda etkilemektedir<sup>12</sup>. Kantitatif sonuçlar korelasyon ve lineer regresyon analizi ile incelenmiş; plazma örnekleri için orta, idrar örnekleri için yüksek derecede korelasyon saptanmıştır. Korelasyon ve lineer regresyon analizleri iki değer arasında sadece doğrusal ilişkiyi değerlendirmekte ve iki yöntem arasında yüksek korelasyon olması sonuçların uyumlu olduğu anlamına gelmemektedir. İki farklı testin sonuçlarının birbirlerine yakınlık derecesinin araştırılmasında Bland-Altman analizi olarak tanımlanan; iki testten elde edilen ölçümlerin ortalamalarına karşı farklarının dağılım grafiğinin çizilmesi gerekmektedir. Sunduğumuz çalışmada her iki Rt-PCR sonuçları arasında korelasyon ve lineer regresyon analizlerine göre uyum saptanmakla birlikte; Bland-Altman analizine göre her iki testle pozitif bulunan tüm örnekler için ortalama fark  $-0.58 \log_{10}$  bulunmakta, plazma örneklerinde kantitatif sonuçlar daha uyumlu bulunurken (ortalama fark  $-0.29 \log_{10}$ ), idrar örneklerinde fark artarak  $-1.1 \log_{10}$  değerine ulaşmaktadır. Tüm örneklerde Lab-1 ölçümleri Lab-2'den daha düşük seviyelerde gözlenmiştir. Ortalama viral yük farkının  $-1.1 \log_{10}$  olması; Lab-2'nin Lab-1'den ortalama olarak  $1.1 \log_{10}$  daha yüksek ölçüm yaptığını göstermektedir. Bu bulguyu destekler şekilde; iki test arasında aynı örneklerde ölçüm farkı; %71.9 örnekte  $0.5 \log_{10}$ 'dan, %29.2 örnekte ise  $1 \log_{10}$ 'dan fazla bulunmuştur, sadece %28.1 örnekte sonuçlar arasındaki fark klinik olarak kabul edilebilir aralıkta ( $0.5$



$\log_{10}$ 'dan daha az) saptanmıştır. İki farklı testin sonuçlarının karşılaştırılması amaçlandığında korelasyon ve lineer regresyon analizleri yetersiz kalmaktadır, çalışma sonuçlarımızda bu durum açıkça görülmektedir. BKV'nin VP1 başta olmak üzere, büyük T antijen, küçük t antijen, VP2 gibi farklı gen bölgelerine yönelik hem ticari hem de laboratuvar tasarımı Rt-PCR yöntemleri bulunmaktadır. Farklı gen bölgelerinin hedeflendiği BKV Rt-PCR yöntemlerinin karşılaştırdığı çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da sonuçlar arasında uyumsuzluklar saptanmıştır<sup>13</sup>.

Amerikan Transplantasyon Derneği'nin 2009'da yayınlanan rehberinde, kanıt düzeyi düşük olsa da; renal transplant alıcılarının plazma BKV nükleik asit testleri (NAT) ile izlemi önerilmekte,  $10^4$  kopya/ml üzerindeki viral yük değerlerinin BKV ilişkili nefropati açısından önemli olduğu belirtilmektedir<sup>14</sup>. Ancak BKV NAT'ta henüz bir standardizasyon sağlanamamış olması araştırmalarda farklı sonuçları karşımıza çıkarmaktadır. Hassan ve arkadaşlarının çalışmasında<sup>15</sup>; biyopsi ile BKV ilişkili nefropati tanısı alan 31 hastanın 11 (%35)'inde viral yük düzeylerinin  $10^4$  kopya/ml altında olduğu bildirilmiştir. Ruangkanhanasetr ve arkadaşları<sup>16</sup> ise in situ hibridizasyon yöntemi ile BKV ilişkili nefropati tanısı alan bir hastada BKV viremi saptanmadığını rapor etmişlerdir. Hayden ve arkadaşlarının çalışmasında<sup>17</sup> seçilen hedef genin büyük T olması durumunda aynı örneklerde yapılan ölçümlerin ortalama viral yükleri arasında anlamlı farklar ( $2.70-7.20 \log_{10}$ ) olduğu ve VP-1 genine yönelik testler ile daha yüksek değerler saptandığı bildirilmiştir. Fransa'da çok merkezli bir çalışmada klinik örneklerin ancak %68'inde ölçümler arası farkın  $0.5 \log_{10}$ 'dan küçük olduğu, %32 örnekte ölçümler arasında  $1.32-5.55 \log_{10}$  fark bulunduğu vurgulanmıştır<sup>18</sup>. Tan ve arkadaşlarının, VP-1 gen bölgesine yönelik laboratuvar tasarımı BKV Rt-PCR ve büyük T antijen gen bölgesine yönelik Altona Realstar BKV ticari kitini karşılaştırdıkları çalışmalarında; iki test arasındaki ortalama viral yük ölçüm farkının Bland-Altman analizlerine göre  $-0.7 \log_{10}$  kopya/ml olduğu, Altona Realstar BKV ticari kiti ile daha düşük ölçümler yapıldığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra uluslararası standart kullanımı ile değerler IU/ml olarak kalibre edildiğinde ortalama farkın  $-0.1 \log_{10}$  kopya/ml'ye kadar gerilediğini gözlemlemişlerdir<sup>7</sup>. Diğer yandan, Bateman ve arkadaşları<sup>19</sup>, dijital PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada, hedef olarak BKV'nin büyük T bölgesi seçildiğinde VP-1 bölgesine göre DSÖ standardı ile yaklaşık dört kat daha düşük ölçüm yapıldığını belirterek, DSÖ standardındaki alt popülasyonların büyük T bölgesinde delesyonlara yol açtığını yeni nesil dizileme yöntemi ile göstermişlerdir. Tüm bu çalışmaların sonuçları, bizim sonuçlarımızla birlikte; farklı BKV Rt-PCR testleri arasında henüz tam bir standardizasyon sağlanmadığını, DSÖ'nün hazırladığı standardın da geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu durumda; testler arasında standardizasyon sağlanana kadar, BKV viral yük artışının takibinin aynı Rt-PCR yöntemi ile yapılması önemini korumaktadır. Testlerin klinik korelasyonu, henüz mevcut kullanılan testle sınırlı kalmaktadır. Viral yük ölçümlerindeki değişkenliklerin sebepleri; kullanılan örnek matriksi, örnek miktarı, nükleik asit ekstraksiyon yöntemi, primer ve probaların seçimi, hedefin amplifikasyon gücü, kullanılan standart ve kontroller arasındaki farklılıklar olabilmektedir<sup>15,20,21</sup>.

Tüm dünyada BKV genotip I'in en sık saptanan genotip olduğu bilinmektedir<sup>22</sup>. Ulaşılabilirliği kadarı ile, ülkemizde BKV genotip tayini açısından en yüksek olgu sayısına sahip olan çalışmamızda böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda BKV genotip I (%81.7), IV (%15.5), II (%1.4) ve I + IV (%1.4) saptanmıştır. Hiçbir örnekte genotip III saptanmamıştır. Ülkemize ait örneklerde BKV genotiplendirmesinin yapıldığı iki çalışmadan birinde; altı idrar örneği incelenmiş, beş örnekte genotip V (eski sınıflamada genotip Ib-2) ve bir örnekte genotip Ia saptanmıştır<sup>23</sup>. Diğer çalışmada ise 13 yaşında böbrek transplant hastasında BKV Afrika varyantı bildirilmiştir<sup>24</sup>. Çalışma sonuçlarımız incelendiğinde; kantitasyon uyumsuzluğunun yüzde olarak en çok genotip-IV belirlenen hastalarda olduğu gözlenmiştir. Rt-PCR testleri arasındaki kantitasyon uyumsuzluklarının, özellikle genotip-IV varlığında olabileceği bildirilmektedir<sup>3</sup>. Solis ve arkadaşları<sup>18</sup> laboratuvarlar arası uyumsuzluklarda BKV genotiplerinin önemli olabileceğini, kendi çalışmalarındaki uyumsuzlukdan BKV genotip II ve genotip IV'deki polimorfizmler dolayısı ile hedef gen ile primer-prob uygunsuzluğunun sorumlu olduğunu belirtmektedirler. Yapılan diğer araştırmalarda da BKV genomundaki nadir sekans polimorfizmlerine bağlı olarak BKV saptama duyarlılıklarının azaldığı ve hatta viral yük kantitasyonunun etkilendiği belirtilmektedir<sup>25</sup>.

Bu çalışma ile ilgili bulgularımız sadece laboratuvar tasarımı iki Rt-PCR yöntemi için sınırlı olmaktadır. Hedef genlerde ve genotiplerde dizi analizi yapılamamıştır. Diğer laboratuvarlarda kullanılan farklı gen bölgelerini hedefleyen, farklı ekstraksiyon ve amplifikasyon-saptama cihazları ile gerçekleştirilen gerek ticari, gerek laboratuvar tasarımı yöntemlerde sonuçlar değişiklik gösterebilir. Daha fazla örnek sayısının incelenmesi ve genotip dağılımının dizi analizi ile desteklenmesi ve laboratuvarlar arası sonuçların karşılaştırılabilmesine olanak sağlayarak hasta örneklerini en doğru şekilde yansıtabilecek uluslararası bir standardın uygulamaya konulması gerekliliği bulunmaktadır.

Sonuç olarak; sunulan çalışmada iki farklı hedefe yönelik BKV Rt-PCR testi arasında kalitatif olarak orta derecede korelasyon gözlenmiş, örneklerin ancak %28.1'inin sonuçları arasında kantitatif olarak kabul edilebilir bir ölçüm farkı saptanmıştır. DSÖ'nün geliştirdiği uluslararası BKV standardı optimize edilinceye dek, her merkezin hastalarını aynı testle takip etmesi uygun olacaktır. BKV kantitasyonunun yanlış yapılması klinik kararı etkilemektedir. Gerçek değerinden düşük ölçümler hastada BKV nefropatisi gelişmesine, yüksek ölçümler ise gereksiz allogreft biyopsisi yapılmasına ve immüsupresyonun gereksiz yere azaltılmasına yol açarak rejeksiyona zemin hazırlayacaktır.

## TEŞEKKÜR

Yayın yazarları olarak, bu çalışmaya katkılarından dolayı Annelies Riezebos-Brilman ve Lilli Rurenga-Gard'a teşekkürlerimizi sunarız.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Ahsan N, Shah KV. Polyomaviruses: an overview. *Graft* 2002;5(suppl):S9-S18.
2. Gambarino S, Costa C, Astegiano S, Piasentin EA, Segoloni GP, Cavallo R, et al. Genotyping of polyomavirus BK by Real Time PCR for VP1 gene. *Mol Biotechnol* 2011;49(2):151-8.
3. Hoffman NG, Cook L, Atienza EE, Limaye AP, Jerome KR. Marked variability of BK virus load measurement using quantitative real-time PCR among commonly used assays. *J Clin Microbiol* 2008;46(8):2671-80.
4. Hirsch HH, Babel N, Comoli P, Friman V, Ginevri F, Jardine A, et al. European perspective on human polyomavirus infection, replication and disease in solid organ transplantation. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(Suppl 7):74-88.
5. Randhawa P, Vats A, Shapiro R, Weck K, Scantlebury V. BK Virus: Discovery, Epidemiology and Biology. *Graft* 2002;5(SUPPL):S19-S27.
6. Hirsch HH, Randhawa P. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013;13(Suppl 4):179-88.
7. Tan SK, Milligan S, Sahoo MK, Taylor N, Pinsky BA. Calibration of BK Virus Nucleic Acid Amplification Testing to the 1<sup>st</sup> WHO International Standard for BK Virus. *J Clin Microbiol* 2017;55(3):923-30.
8. Govind S, Hockley J, Morris C; the Collaborative Study Group. Collaborative Study to establish the 1<sup>st</sup> WHO International Standard for BKV DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. World Health Organization, www.who.int, WHO/BS/2015.2270.
9. Mutlu D, Sağlık İ, Koyun M, Comak E, Mutlu E, Uslu Gokceoglu A, et al. BK virus infections in pediatric kidney transplant recipients. *Mikrobiyol Bul* 2013;47(3):461-71.
10. Vats A, Shapiro R, Singh Randhawa P, Scantlebury V, Tuzuner A, Saxena M, et al. Quantitative viral load monitoring and cidofovir therapy for the management of BK virus-associated nephropathy in children and adults. *Transplantation* 2003;75(1):105-12.
11. Gard L, Niesters HG, Riezebos-Brilman A. A real time genotyping PCR assay for polyomavirus BK. *J Virol Methods* 2015;221:51-6.
12. Descamps V, Martin E, Morel V, Francois C, Helle F, Duverlie G, et al. Comparative Evaluation of three nucleic acid-based assays for BK Virus quantification. *J Clin Microbiol* 2015;53(12):3822-7.
13. Stellrecht KA, Espino AA, Nattanmai SM, Jackson WF, Conti DJ. Comparison of three real-time PCR for the quantification of polyomavirus BK. *J Clin Virol* 2013;56(4):354-9.
14. KDIGO. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9(Suppl 3):1-150.
15. Hassan S, Mittal C, Amer S, Khalid F, Patel A, Delbusto R, et al. Currently recommended BK virus (BKV) plasma viral load cutoff of  $\geq 4 \log_{10}/\text{ml}$  underestimates the diagnosis of BKV-associated nephropathy: a single transplant center experience. *Transpl Infect Dis* 2014;16(1):55-60.
16. Ruangkanchanasetr P, Pumchandh N, Satirapoj B, Termmathurapoj S, Pongthanapisith V. Biopsy-proven Bk virus nephropathy without detectable Bk viremia in a one-year post-kidney transplant recipient. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2015;46(4):657-61.
17. Hayden RT, Yan X, Wick MT, Rodriguez AB, Xiong X, Ginocchio CC, et al. Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: a multivariate analysis. *J Clin Microbiol* 2012;50(2):337-45.
18. Solis M, Meddeb M, Sueur C, Domingo-Calap P, Soulier E, Chabaud A, et al. Sequence Variation in Amplification Target Genes and Standards Influences Interlaboratory Comparison of BK Virus DNA Load Measurement. *J Clin Microbiol* 2015;53(12):3842-52.
19. Bateman AC, Greninger AL, Atienza EE, Limaye AP, Jerome KR, Cook L. Quantification of BK Virus Standards by Quantitative Real-Time PCR and Droplet Digital PCR Is Confounded by Multiple Virus Populations in the WHO BKV International Standard. *Clin Chem* 2017;63(3):761-9.
20. Muldrew KL, Lovett JL. An in-house assay for BK polyomavirus quantification using the Abbott m2000 RealTime system. *J Med Microbiol* 2013;62(11):1714-20.

21. Sueur C, Solis M, Meddeb M, Soulier E, Domingo-Calap P, Lepiller Q, et al. Toward standardization of BK virus monitoring: evaluation of the BK virus R-gene kit for quantification of BK viral load in urine, whole-blood, and plasma specimens. *J Clin Microbiol* 2014;52(12):4298-304.
22. Sawinski D, Goral S. BK virus infection: an update on diagnosis and treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30(2):209-17.
23. Zheng HY, Nishimoto Y, Chen Q, Hasegawa M, Zhong S, Ikegaya H, et al. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect* 2007;9(2):204-13.
24. Colakoglu S, Dursun H, Cengiz N, Bulat MC, Noyan A. The African variant of BKV in a Turkish renal transplant patient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;79(2):245-6.
25. Randhawa P, Kant J, Shapiro R, Tan H, Basu A, Luo C. Impact of genomic sequence variability on quantitative PCR assays for diagnosis of polyomavirus BK infection. *J Clin Microbiol* 2011;49(12):4072-6.