

تعیین شیوع عفونت فعال هرپس ویروس انسانی تیپ ۸ و ژنوتیپ آن در افراد مبتلا به ویروس نقص ایمنی انسان

رضوان کاکاوند قلعه نویی: کارشناس ارشد، گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

ذبیح الله شجاع: استادیار، بخش ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

علیرضا نجفی: کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

مصطفی حاجی ملاحسینی: استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

سمیه جلیوند: استادیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران - نویسنده رابط: sjalilvand@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: از آنجا که بروز فرم اپیدمیک سارکوم کاپوزی در ایران مشخص نمی باشد و از طرفی در مطالعات پیشین شیوع آلودگی با هرپس ویروس انسانی تیپ ۸ (HHV-8) در افراد مبتلا به ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) بالا گزارش شده است (۴۶ درصد)، بنابراین لازم به نظر می رسد بروز سرطان مذکور در این افراد تخمین زده شود. از آنجا که عفونت فعال با HHV-8 منجر به گسترش سارکوم کاپوزی می شود، اولین گام برای حل این مساله این است که یک غربالگری برای تعیین شیوع عفونت فعال با ویروس مذکور بر روی نمونه های HIV مثبت انجام گیرد. به علاوه، بسیاری از افراد HIV مثبت در ایران از بیماری خود اطلاعی ندارند و در صورت میزان بالای آلودگی با HHV-8 ممکن است این افراد با رفتارهای پر خطر باعث انتشار HHV-8 در جامعه از راه جنسی شده و متعاقب آن با افزایش موارد سارکوم کاپوزی کلاسیک مواجه باشیم. بنابراین انجام مطالعه ای جهت تخمین شیوع عفونت با HHV-8 در این افراد لازم بنظر می رسد. روش کار: در این مطالعه ۱۰۰ نمونه پلاسما از افراد HIV مثبت جمع آوری و پس از استخراج ژنوم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ORF26 ویروس با روش nested-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس با nested-PCR دیگری نمونه های مثبت برای قطعه ORF K1 تکثیر و تعیین توالی گردیدند و درخت فیلوژنی برای آنها ترسیم گردید. نتایج: در ۸ نمونه (۸٪) ژنوم ویروس قابل ردیابی بود. از نظر آماری ارتباط معنی داری بین عفونت با HHV-8 و فاکتورهای سن و جنس دیده نشد. دو ژنوتیپ A و C در نمونه ها وجود داشتند، بطوریکه در دو بیمار ژنوتیپ A و در یک بیمار ژنوتیپ C شناسایی شد. نتیجه گیری: اینگونه بنظر می رسد که علیرغم شیوع بالای آلودگی با HHV-8 در افراد HIV مثبت ایرانی، میزان عفونت فعال با ویروس مذکور در این افراد بالا نیست. بنابراین اینگونه تصور می شود که احتمالاً بروز سارکوم کاپوزی اپیدمیک در ایران باید بسیار کم باشد. اگر چه این یافته احتیاج به بررسی دقیق تری دارد. از نظر ژنوتیپ نیز دو ژنوتیپ A و C در نمونه ها یافت شد. واژگان کلیدی: هرپس ویروس انسانی تیپ ۸، ویروس نقص ایمنی انسان، سارکوم کاپوزی اپیدمیک

مقدمه

هرپس ویروس انسانی تیپ ۸ (HHV-8) عضوی از خانواده هرپس ویریده، زیر خانواده گاما هرپس ویرینه است که مثل همه ویروس های هرپس پس از ورود به بدن میزبان نهفته شده و عفونت مادام العمر ایجاد می کند (Mesri et al. 2010). این ویروس برای اولین بار در یک بیوپسی تومور سارکوم کاپوزی در یک فرد آلوده با ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) شناسایی شد و به دنبال آن، این ویروس به عنوان عامل سببی این سرطان شناخته شد (Chang et al. 1994). سارکوم کاپوزی به چهار شکل مختلف اپیدمیولوژیک بروز می یابد که شامل فرم کلاسیک (شایع در مردان مسن)، فرم اپیدمیک (در افراد HIV مثبت)، فرم ایاتروژنیک در گیرندگان پیوند اعضا و فرم اندمیک (شایع در برخی کشورهای استوایی آفریقا) می باشد (Buonaguro et al. 2003; Mesri et al. 2010). لازم به ذکر است که پیش از اپیدمی آیدز، این تومور در افراد مسن ناحیه مدیترانه و خاورمیانه (سارکوم کاپوزی کلاسیک) یا در ساکنان آفریقای مرکزی و شرقی (سارکوم کاپوزی اندمیک) اتفاق می افتاد. امروزه این تومور به فراوانی در طی عفونت HIV-1 (سارکوم کاپوزی اپیدمیک) یا در گیرندگان پیوند (سارکوم کاپوزی ایاتروژنیک) دیده می شود، اگر چه در عصر درمان آنتی رتروویال بروز این سرطان در افراد HIV مثبت کاهش چشمگیری داشته است (Mesri et al. 2010).

مطالعات سرواپیدمیولوژی نشان داده که ویروس هرپس تیپ ۸ انتشار یکسانی در جهان ندارد و بیشتر در مناطقی که اندمیستی بالایی برای فرم های سارکوم کاپوزی کلاسیک و اندمیک دارند، دیده می شود. در افراد نرمال آمریکای شمالی و اروپای شمالی و غربی کمتر از ۰.۵٪، در برخی کشورهای مدیترانه ای مثل یونان، ایتالیا، مصر و اسرائیل بین ۲۰-۵۰٪ و در آفریقای مرکزی و شرقی ۷۰٪ جمعیت بر ضد ویروس آنتی بادی دارند (Mesri et al. 2010).

(Tornesello et al. 2010; Tornesello et al. 2010). مطالعات اندکی در ایران به منظور شناسایی شیوع سرمی با این ویروس انجام گرفته است. این اندک مطالعات حاکی از آنند که میزان آلودگی با این ویروس در جمعیت نرمال ۲٪، بیماران دیالیزی ۱۶/۹٪، گیرندگان پیوند ۲۵٪ و بیماران HIV مثبت ۴۵/۷٪ است (Ahmadpoor et al. 2007; Gharehbaghian et al. 2006). در ارتباط با بروز سارکوم کاپوزی در ایران تنها اطلاعات در مورد سارکوم کاپوزی فرم کلاسیک وجود دارد که بروز آنرا در مردان ۱۷-۰/۱ و در زنان ۰/۰۸-۰/۰۶ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر گزارش کرده است (Mousavi et al. 2007). مطالعات متعددی از ایران حاکی از آنند که سارکوم کاپوزی یکی از شایعترین نئوپلاسمی ها در گیرندگان پیوند کلیه می باشد (Jalilvand et al. 2011)، حال آنکه در مورد بروز فرم اپیدمیک که در افراد HIV مثبت دیده می شود هیچ اطلاعاتی در دسترس نیست.

آنالیز فیلوژنتیک با استفاده از سکانس ژن K1 پنج ژنوتیپ (A,B,C,D,E) اصلی را تا بحال شناسایی کرده است که بیشتر آنها انتشار جغرافیایی متفاوتی دارند. بطوریکه ساب تیپ B در آفریقا، A,C در اروپا و آمریکا، آسیا و خاورمیانه، D در نواحی پاسیفیک و E در سرخپوستان برزیل، آمازون و اکوادور یافت شده است (Jalilvand et al. 2012; Tornesello et al. 2010; Whitby et al. 2002; Zong et al. 2004). همچنین پژوهش ها نشان داده اند که ژنوتیپ A نسبت به ژنوتیپ های دیگر مهاجم تر است و فرم شدیدتری از بیماری را در افراد HIV مثبت بروز می دهد (Ramos da et al. 2011). مطالعات حاکی از آنند که در برخی نواحی که ژنوتیپ C در فرم کلاسیک بیماری غالب است، ژنوتیپ A در افراد HIV مثبت (با و یا بدون سارکوم کاپوزی) شایع تر است و همچنین این ژنوتیپ مهاجم تر از دیگر ژنوتیپ ها می باشد (Kanno et al. 2010; Ramos da et al. 2011; Zong et al. 2002).

این نمونه‌ها از نظر حضور آنتی بادی بر علیه ویروس هپاتیت C به روش الایزا بررسی شده بودند و با استفاده از روش فلوسیتومتری درصد CD4 و CD8 در آنها سنجیده شده بود. سپس نمونه‌های مذکور به گروه ویروس‌شناسی دانشکده بهداشت منتقل گردید و تا زمان استخراج، نمونه‌ها در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه با کد ۳۰۶۸۵ در تاریخ ۹۴/۱۱/۲۸ مورد تأیید قرار گرفته است.

ردیابی ژنوم HHV-8: استخراج نمونه‌ها با استفاده از کیت تجاری (Roche Diagnostics GmbH, Roche Mannheim, Germany) و طبق دستورالعمل موجود در آن انجام گردید. سپس جهت شناسایی ژنوم ویروس nested-PCR با استفاده از دو جفت پرایمر اختصاصی ژن ORF26 انجام گردید. مرحله اول PCR با جفت پرایمر P1: 5'-AGCCGAAAGGATTCCACCATT-3' و P2: 5'-TCCGTGTTGTCTACGTCCAGA-3' و مرحله دوم با جفت پرایمر P3: 5'- و P4: 5'- GTGCTCGAATCCAACGGATT-3' و ATGACACATTGGTGGTATATAG-3' انجام شد که به ترتیب قطعات ۲۳۳ و ۱۷۲ جفت بازی تکثیر گردید. مخلوط واکنش PCR در هر دو مرحله به حجم ۵۰ میکرولیتر شامل، 20 mM MgCl₂, 50 μM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 50 μM dNTP, 20 pmol primer و 2 U Hotstart Taq DNA Polymerase (Qiagen, GmbH, Hildelberg, Germany) تهیه گردید و با شرایط دمایی ذکر شده در جدول ۱ تکثیر ژنوم انجام شد. برای انجام PCR از کنترل مثبت و کنترل منفی استفاده می‌شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ برده شدند.

تعیین ژنوتیپ HHV-8: نمونه‌هایی که در مرحله قبل مثبت شدند مورد تعیین ژنوتیپ ویروس قرار گرفتند. در این مرحله با روش nested-PCR و با استفاده از دو جفت پرایمر اختصاصی، ناحیه ORF K1 که متغیرترین بخش ژنوم

همانگونه که در بالا ذکر شد از آنجا که بروز فرم اپیدمیک سارکوم کاپوزی در ایران مشخص نمی‌باشد و از طرفی شیوع آلودگی با این ویروس در افراد HIV مثبت بالا گزارش شده است (۷/۴۵٪)، بنابراین لازم به نظر می‌رسد بروز بیماری در این افراد تخمین زده شود. از آنجا که عفونت فعال با هرپس ویروس انسانی تیپ ۸ منجر به گسترش سارکوم کاپوزی می‌شود، لذا اولین گام برای حل این مساله این است که یک غربالگری برای تعیین شیوع عفونت فعال ویروس هرپس انسانی تیپ ۸ بر روی نمونه‌های HIV مثبت انجام گیرد. به علاوه، بسیاری از افراد HIV مثبت در ایران از بیماری خود اطلاعی ندارند و در صورت میزان بالای آلودگی با HHV-8 ممکن است این افراد با رفتارهای پر خطر باعث انتشار HHV-8 در جامعه از راه جنسی شده و متعاقب آن با افزایش موارد سارکوم کاپوزی کلاسیک مواجه باشیم. بنابراین انجام مطالعه‌ای جهت تخمین شیوع عفونت با HHV-8 در این افراد لازم بنظر می‌رسد. بنابراین، مطالعه حاضر بر آن است تا شیوع عفونت فعال با ویروس هرپس انسانی تیپ ۸ را در افراد HIV مثبت بررسی کرده و ژنوتیپ‌های شایع این ویروس در بیماران مذکور را مشخص نماید.

روش کار

بیماران: بررسی حاضر یک مطالعه مقطعی در شهر تهران می‌باشد. بر اساس مطالعات پیشین، عفونت فعال با هرپس ویروس انسانی تیپ ۸ در ۳۵٪ بیماران مبتلا به HIV دیده شده بود. بنابراین طبق فرمول آماری تعیین شیوع و با ضریب خطا ۵٪، حداقل ۹۱ نمونه جهت انجام این مطالعه محاسبه گردید. بدین منظور ۱۰۰ نمونه پلاسما از افراد HIV مثبتی که طی سال ۱۳۹۰ به سازمان انتقال خون ایران مراجعه کرده بودند جمع‌آوری گردید. لازم به ذکر است که عفونت با HIV در همه نمونه‌ها قبلاً با روش الایزا شناسایی و با روش وسترن بلات تأیید شده بودند. همچنین

جهت آنالیز داده های کیفی از آزمون های آماری مربع کای دو یا آزمون دقیق فیشر استفاده گردید.

نتایج

به منظور بررسی امکان فعال شدن مجدد ویروس به عنوان نشانگری برای پیشرفت سارکوم کاپوزی، ۱۰۰ نمونه پلاسما از افراد HIV مثبت در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی نمونه ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ORF26 ویروس با روش nested-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۱ الف). سپس با nested-PCR دیگری نمونه های مثبت برای قطعه ORF K1 تکثیر (شکل ۱ ب) و تعیین توالی گردیدند.

خصوصیات دموگرافیک، ایمونولوژیک و ویروژنیک بیماران مبتلا به HIV در جدول ۲ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می شود بیشتر نمونه ها از نظر جنسی مرد بودند (۷۰٪) و از نظر سنی در گروه سنی ۴۰ سال و کمتر از آن (۶۹٪) قرار داشتند. میانگین درصد CD4 و CD8 در این بیماران که قبلا با روش فلوسیتومتری اندازه گیری شده بود به ترتیب ۱۸/۴ و ۵۳/۵ بود، بطوریکه نسبت CD4 به CD8 در اکثر بیماران کمتر از ۱ بود. به علاوه اکثر بیماران (۶۹٪) بطور همزمان با HCV نیز آلوده بودند.

در مجموع ۸ نمونه (۸٪) از نظر حضور ویروس مثبت شدند. همانگونه که از جدول ۳ برمی آید، اگر چه ارتباط آماری معنی داری بین عفونت با HHV-8 و فاکتورهای سن ($p = ۰/۹۹$) یا جنس ($p = ۰/۳۸$) دیده نشد، اما عفونت در زنان و در سن کمتر از ۴۰ سال شایع تر بود. به علاوه، علیرغم عدم مشاهده ارتباط آماری معنی دار بین عفونت همزمان HHV-8 و آلودگی با ویروس هپاتیت C ($p = ۰/۱۱$)، عفونت با HHV-8 در افرادی که از نظر ویروس هپاتیت C منفی بودند بسیار شایع تر بود. در دو گروه HHV-8 مثبت و منفی، میانگین و انحراف معیار درصد CD4 به ترتیب $۱۹/۶ \pm ۷/۳$ و $۱۸/۳ \pm ۱۰/۲$ و برای CD8 به ترتیب $۵۳/۴ \pm ۱۵$ و

ویروس است مورد تکثیر واقع شد. برای تکثیر یک قطعه ۳۷۱ جفت بازی از ناحیه مذکور، در مرحله اول از پرایمرهای 5'- SJ-K1-LF1: ATCAAGATGTTCTGTAT-3' و SJ-K1-LR1: 5'-CATTATTTCCAGAGGTAG-3' در مرحله دوم از پرایمرهای 5'- SJ-K1-LF2: AAGATGTTCTGTATGTT-3' و SJ-K1-LR2: 5'-ATTATTTCCAGAGGTAGAA-3' استفاده گردید که به ترتیب قطعات ۳۷۵ و ۳۷۱ جفت بازی تکثیر گردید (Jalilvand et al. 2012). مخلوط واکنش PCR در هر دو مرحله به حجم ۵۰ میکرولیتر شامل، 1.5 mM MgCl₂, 50 μM dNTP, 20 pmol primer و (Qiagen, GmbH, Hildelberg, Germany) و U Hot start Taq DNA Polymerase تهیه گردید و با شرایط دمایی ذکر شده در جدول ۱ تکثیر ژنوم انجام شد. در هر بار انجام تست PCR از کنترل منفی استفاده می گردید. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شدند و نمونه های مثبت برای تعیین توالی ارسال شدند.

توالی یابی و آنالیز فیلوژنتیک توالی های بدست آمده: نمونه ها با استفاده از دستگاه ABI Genetic Analyzer 3130 در گروه ویروس شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران تعیین توالی شدند. سپس توالی های بدست آمده با نرم افزار Bioedit 7.0.5.2 ویرایش گردیدند. Alignment توالی های ویرایش شده و بررسی و توالی های مرجع گرفته شده از بانک ژنی با استفاده از نرم افزار Bioedit 7.0.5.2 انجام گردید. سپس درخت فیلوژنتیک با نرم افزار Mega 6.06 با استفاده از روش Maximum Likelihood بر اساس مدل Kimura 2 و با ارزش bootstrap 1000 رسم گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از روش های آماری: داده های پژوهش حاضر با برنامه آماری (Atlanta, EPI (GA, USA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

کرده است (Ghareh Baghian et al. 2006). بنابراین اینگونه بنظر می‌رسد که علیرغم شیوع بالای آلودگی با HHV-8 در ایران، میزان عفونت فعال با این ویروس در افراد HIV مثبت بالا نیست. بنابراین اینگونه تصور می‌شود که احتمالاً بروز سارکوم کاپوزی اپیدمیک در ایران باید بسیار کم باشد.

یافته های پژوهش حاضر حاکی از آن است که اختلاف آماری معنی داری بین آلودگی با این ویروس و فاکتورهای دموگرافیک جنس یا سن وجود ندارد. این یافته همسو با دیگر مطالعات از جهان است که نشان داده اند میزان آلودگی در دو جنس و یا گروه‌های سنی متفاوت با همدیگر فرقی نمی‌کند (Masia et al. 2014).

همان گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، موارد مثبت HHV-8 در بیماران مبتلا به عفونت HIV در آنهایی شایع تر بود که عفونت همزمان با HCV نداشتند. در مطالعات متعددی که پیش از این در سراسر جهان صورت گرفته است، اینطور گزارش شده است که عفونت HHV-8 و HBV با هم مرتبط می‌باشند و احتمال می‌دهند این ارتباط بخاطر راه انتقال یکسان در این دو ویروس می‌باشد، اما عفونت همزمان HHV-8 و HCV شایع نمی‌باشد زیرا راه اصلی انتقال این دو ویروس با همدیگر متفاوت است بطوریکه HHV-8 بیشتر از راه بزاق و ترشحات جنسی انتقال می‌یابد حال آنکه راه اصلی انتقال HCV تزریق مشترک و محصولات خونی آلوده است (Collenberg et al. 2006; Engels et al. 2007; Guanira et al. 2008; Zavitsanou et al. 2007). مطالعه‌ای در ایتالیا نشان داده است که عفونت همزمان HHV-8 و HCV در افراد HIV مثبت ۱۶/۲٪ است، حال آنکه شیوع عفونت HHV-8 در افراد HIV مثبتی که فاقد عفونت همزمان با HCV هستند ۳۷/۸٪ گزارش شده است (Parisi et al. 2002). در مطالعه دیگری که در کشور پرو بر روی افراد HIV مثبت انجام شده است دیده شده رابطه معکوسی بین عفونت همزمان HHV-

۱۱/۵±۵۳ بود که بیانگر این است که در هر دو گروه، میانگین درصد CD4 پائین تر از حد نرمال می‌باشد.

۸ نمونه مثبت از نظر حضور ویروس برای ناحیه ORF K1 مورد تکثیر قرار گرفتند، اما فقط در سه مورد تکثیر موفق همراه با تعیین توالی انجام شد. رسم درخت فیلوژنتیک بر اساس ORF K1 نشان داد دو ژنوتیپ یا گروه اصلی A و C در نمونه‌ها وجود داشتند (شکل ۲). در دو بیمار ژنوتیپ A و در یک بیمار ژنوتیپ C شناسایی شد.

بحث

در پژوهش فوق به منظور سنجش فعالیت مجدد ویروس به عنوان نشانگری برای پیشرفت سارکوم کاپوزی نمونه‌های پلاسما بیماران مبتلا به عفونت HIV مورد ارزیابی قرار گرفتند که در ۸ مورد از بیماران آلوده به HIV فعالیت مجدد HHV-8 مشاهده شد و این یافته از این جهت حائز اهمیت است که با شناسایی ژنوم HHV-8 در این بیماران می‌توان پیشروی به سمت سارکوم کاپوزی را پیش بینی کرد. مطالعه‌ای در انگلیس حاکی از آن است که میزان آلودگی ژنومی با HHV-8 در افراد HIV مثبت ۳۳٪ است (Kumar et al. 2007). پژوهشی در چین که بر روی افراد HIV مثبت انجام گردیده است نشان داده که شیوع سرمی HHV-8 ۳۹٪ بود، در حالیکه ۲۸٪ افراد HIV مثبت عفونت فعال HHV-8 را داشتند (این رقم در بیمارانی که برای HIV درمان شده بودند ۱۷٪ و برای افرادی که درمان نشده بودند ۳۵٪ بود) (Zhu et al. 2008). مطالعه‌ای در مجارستان که بر روی ۱۱۵ نمونه از افراد HIV مثبت انجام گردیده حاکی از آن است که ۱۹/۱٪ این افراد بر ضد HHV-8 آنتی بادی دارند، حال آنکه ۶/۱٪ آنها فرم فعال عفونت با HHV-8 را داشتند (Szalai et al. 2005). پژوهشی توسط قره باغیان و همکاران شیوع عفونت با HHV-8 را در افراد HIV مثبت ۴۵/۷٪ گزارش

حاکی از آن است که ژنوتیپ C در ایران غالب بوده و پس از آن ژنوتیپ A با فراوانی کمتری قابل ردیابی است (Jalilvand et al. 2012). جالب آنکه همسو با یافته پژوهش حاضر، در برخی نواحی جغرافیایی اختلاف چشمگیری بین ژنوتیپ ویروس و HIV مثبت بودن دیده شده است، بطوریکه در این نواحی ژنوتیپ غالب در جمعیت عمومی ژنوتیپ C است، حال آنکه در افراد مبتلا به HIV ژنوتیپ A در گردش است. در پژوهشی در ژاپن دیده شده که در جمعیت نرمال ژنوتیپ C غالب است و موارد کمی ژنوتیپ A دارند، اما در افراد HIV مثبت ژنوتیپ A شایع-تر است (Kanno et al. 2010). مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ در برزیل حاکی از آن است که ژنوتیپ A تیب غالب در افراد HIV مثبت مبتلا به سارکوم کاپوزی است، حال آنکه ژنوتیپ C در افراد مبتلا به سارکوم کاپوزی که HIV منفی هستند شایع تر است (Ramos da Silva et al. 2011). دلیل این تفاوت ژنوتیپ در دو گروه افراد HIV مثبت و منفی دقیقاً مشخص نشده است، اما ممکن است این مساله ناشی از خصوصیات بیولوژیک و بیماری زایی متفاوت ژنوتیپ های مختلف ویروس باشد.

یکی از محدودیت‌های مهم پژوهش حاضر، حجم نمونه متوسط برای انجام این کار بود که بهتر است این کار با حجم نمونه بیشتر در استان های مختلف کشور انجام شود. همچنین امکان پیگیری افراد HHV-8 مثبت از نظر بالینی به منظور تخمین میزان بروز سارکوم کاپوزی امکان پذیر نبود.

نتیجه گیری

اینگونه بنظر می رسد که علیرغم شیوع بالای آلودگی با HHV-8 در افراد HIV مثبت ایرانی، طبق یافته های مطالعه حاضر میزان عفونت فعال با این ویروس در این افراد بالا نیست. بنابراین اینگونه تصور می شود که احتمالاً بروز سارکوم کاپوزی اپیدمیک در ایران باید بسیار کم باشد. از نظر ژنوتیپ نیز بر خلاف مطالعات پیشین در جمعیت نرمال که ژنوتیپ C

و HCV در این افراد وجود دارد، بطوریکه عفونت با HHV-8 به ترتیب در ۲/۱٪ و ۱۲/۴٪ افراد HCV مثبت و منفی دیده شده است (Masia et al. 2014).

در مطالعه حاضر توالی نوکلئوتیدی ۳ نمونه برای ژن K1 مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از آن است که ۲ نمونه متعلق به ژنوتیپ اصلی A و ۱ نمونه متعلق به ژنوتیپ C بودند (شکل ۲). مطالعات مختلف در جهان حاکی از آن است که گروه های A و C در جهان شایع تر هستند و گروه های دیگر در مناطق خاصی دیده می شوند (Jham et al. 2011; Montaner 2007; Stallone et al. 2008; Whitby et al. 2004; Ye and Gao 2011). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۲، ۱۳۹ نمونه از بیشتر مناطق جهان بر اساس ژن K1 گروه بندی شدند که نتایج آن حاکی از آن است که گروه C در ۴۰/۳٪ و گروه A در ۴۱/۷٪ موارد شناسایی شدند. در ۱۸٪ مابقی، گروه های B و D دیده شدند. نتایج مطالعه مذکور نشان می دهد که واریته های مختلف گروه های A و C در سراسر حوزه مدیترانه، خاورمیانه، شمال آسیا، شمال آفریقا، اروپا و آمریکا منتشر شده است (Zong et al. 2002). اینگونه فرض شده است که تقریباً ۳۵۰۰۰ سال پیش اشتقاق گروه A/C اثر مهاجرت انسان از راه خاورمیانه به شمال آسیا و اروپا اتفاق افتاده است و سپس این گروه ها به آمریکا وارد شده اند (Biggar et al. 2000; Feller et al. 2010; Tornesello et al. 2007). گستردگی دو گروه A و C در جهان اینگونه توجیه می شود که ممکن است این دو گروه قابلیت انتقال وسیع تری را در جمعیت های مختلف انسانی داشته باشند. به عبارت دیگر، تغییرات در ژن K1 در این دو گروه در طی تکامل ویروس موجب اکتساب مزیتی برای ویروس شده است تا طیف گسترده-تری از انسان ها که از نظر ژنتیکی متفاوت اند را آلوده کند (Gazouli et al. 2004). مطالعه‌ای پیشین از ایران که بر روی افراد مبتلا به سارکوم کاپوزی انجام گرفته است

مجوز اخلاق دریافت کرده است. همچنین این مقاله حاصل پایان نامه در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۹۴ و کد ۲۴۰/۲۰۰۵ می باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

را ژنوتیپ غالب در ایران می دانند، ممکن است در افراد HIV مثبت ژنوتیپ A شایع تر باشد. پیشنهاد می گردد بیماران آلوده با HIV از نظر بالینی بررسی گردند و میزان بروز سارکوم کاپوزی در آنها مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران در سال ۹۴ به کد ۳۰۶۸۵ می باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی تهران و خدمات بهداشتی درمانی تهران انجام شده است. طرح مذکور به شماره نامه IR.TUMS.REC.1394.2007 در تاریخ ۹۴/۱۱/۲۸

جدول ۱- تعداد سیکل ها و شرایط دمایی PCR های دو ناحیه ORF26 و ORF K1

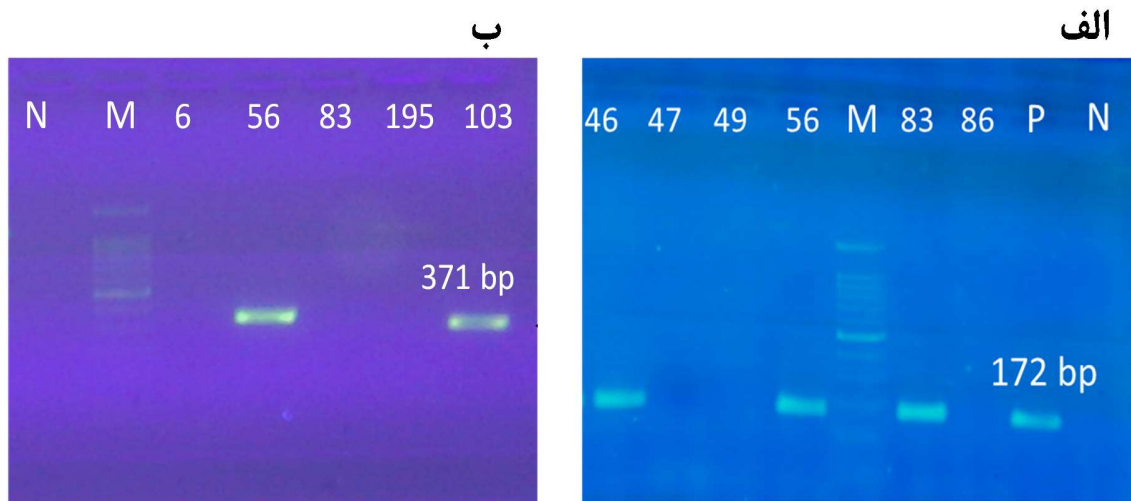
| ژن هدف | PCR | تعداد سیکل | شرایط دمایی |
|--------|-----------|------------|---|
| ORF26 | مرحله اول | ۴۰ | ۹۵ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه؛ ۵۶ درجه سانتیگراد ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۵۰ ثانیه |
| | مرحله دوم | ۳۰ | ۹۵ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه؛ ۵۲ درجه سانتیگراد ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۴۵ ثانیه |
| ORF K1 | مرحله اول | ۴۰ | ۹۵ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه؛ ۵۰ درجه سانتیگراد ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه |
| | مرحله دوم | ۴۰ | ۹۵ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه؛ ۵۰ درجه سانتیگراد ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۵۰ ثانیه |

جدول ۲- خصوصیات دموگرافیک، ایمونولوژیک و ویرولوژیک افراد آلوده به HIV

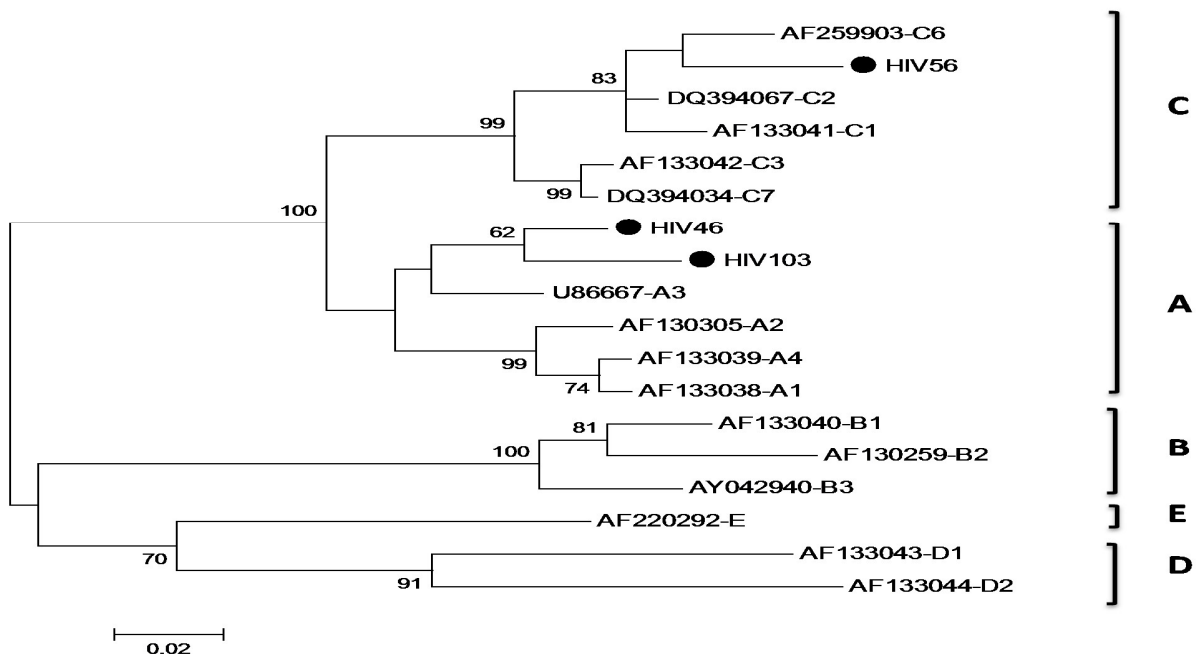
| متغیر | تعداد بیماران آلوده به HIV (درصد) |
|----------------------|-----------------------------------|
| جنس | |
| مرد | ۷۰ (۷۰) |
| زن | ۳۰ (۳۰) |
| سن | |
| ≤ ۴۰ | ۶۹ (۶۹) |
| > ۴۰ | ۳۱ (۳۱) |
| نسبت CD4/CD8 | |
| ≤ ۱ | ۹۸ (۹۸) |
| > ۱ | ۲ (۲) |
| آلودگی همزمان با HCV | |
| بلی | ۶۹ (۶۹) |
| خیر | ۳۱ (۳۱) |
| جمع کل | ۱۰۰ |

جدول ۳- توزیع فراوانی نسبی و مطلق عفونت با HHV-8 در مبتلایان به عفونت HIV بر حسب جنس، سن و عفونت همزمان با ویروس هیپاتیت سی (HCV)

| متغیر | عفونت با HHV-8 | | p-value |
|--------------|----------------|-----------|---------|
| | مثبت (%) | منفی (%) | |
| جنس | | | |
| مرد | ۴ (۵/۷) | ۶۶ (۹۴/۳) | ۰/۳۸ |
| زن | ۴ (۱۳/۳) | ۲۶ (۸۶/۷) | |
| سن | | | |
| ≤ ۴۰ | ۶ (۸/۷) | ۶۳ (۹۱/۳) | ۰/۹۹ |
| > ۴۰ | ۲ (۶/۵) | ۲۹ (۹۳/۵) | |
| عفونت با HCV | | | |
| بله | ۳ (۴/۴) | ۶۶ (۹۵/۶) | ۰/۱۱ |
| خیر | ۵ (۱۶/۱) | ۲۶ (۸۳/۹) | |
| جمع کل | ۸ (۸) | ۹۲ (۹۲) | |



شکل ۱- الف) ژل الکتروفورز برای شناسایی قطعه ۱۷۲ جفت بازی از ORF26 هرپس ویروس انسانی تیپ ۸. ب) ژل الکتروفورز برای شناسایی قطعه ۳۷۱ جفت بازی از ORF K1 ویروس هرپس انسانی تیپ ۸ (M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، P: کنترل مثبت و N: کنترل منفی).



شکل ۲- درخت فیلوژنتیک بر اساس ناحیه ORF K1 ویروس هرپس انسانی تیپ ۸ (HHV-8) در افراد HIV مثبت با استفاده از نرم افزار Mega6.06 با استفاده از روش Maximum Likelihood بر اساس مدل Kimura 2 و با ارزش bootstrap 1000 رسم گردیده است. نمونه های مطالعه حاضر با دایره سیاه نشان داده شده اند.

References

- Ahmadpoor, P., Ilkhanizadeh, B., Sharifzadeh, P., Makhdoomi, K., Ghafari, A., Nahali, A., Yekta, Z. and Noroozina, F., 2007. Seroprevalence of human herpes virus-8 in renal transplant recipients: a single center study from Iran. *TransplantProc.* **39**(4), pp. 1000-1002.
- Biggar, R.J., Whitby, D., Marshall, V., Linhares, A.C. and Black, F., 2000. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *J Infect Dis.* **181**(5), pp. 1562-1568.
- Buonaguro, F.M., Tornesello, M.L., Buonaguro, L., Satriano, R.A., Ruocco, E., Castello, G. and Ruocco, V., 2003. Kaposi's sarcoma: aetiopathogenesis, histology and clinical features. *J EurAcadDermatolVenereol.* **17**(2), pp. 138-154.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M. and Moore, P.S., 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science.* **266**(5192), pp. 1865-1869.
- Collenberg, E., Ouedraogo, T., Ganame, J., Fickenscher, H., Kynast-Wolf, G., Becher, H., Kouyate, B., Krausslich, H.G., Sangare, L. and Tebit, D.M., 2006. Seroprevalence of six different viruses among pregnant women and blood donors in rural and urban Burkina Faso: A comparative analysis. *J Med Virol.* **78**(5), pp. 683-692.
- Engels, E.A., Atkinson, J.O., Graubard, B.I., McQuillan, G.M., Gamache, C., Mbisa, G., Cohn, S., Whitby, D. and Goedert, J.J., 2007. Risk factors for human herpesvirus 8 infection among adults in the United States and evidence for sexual transmission. *J Infect Dis.* **196**(2), pp. 199-207.
- Feller, L., Wood, N.H. and Lemmer, J., 2007. HIV-associated Kaposi sarcoma: pathogenic mechanisms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **104**(4), pp. 521-529.
- Gazouli, M., Zavos, G., Papaconstantinou, I., Lukas, J.C., Zografidis, A., Boletis, J. and Kostakis, A., 2004. The interleukin-6-174 promoter polymorphism is associated with a risk of development of Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. *Anticancer Res.* **24**(2c), pp. 1311-1314.
- Ghareh Baghian, A., Zaghal, A., Farhadi Langerudi, M. and Karimi, G., 2006. Seroepidemiology of the human Herpesvirus (HHV-8) in the haemodialysis patients blood donors and HIV-positive individuals in City of Tehran. *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research.* **4**(4), pp. 57-63.
- Gharehbaghian, A., Zaghal, A., Farhudi Langerudi, M. and Karimi, G.H., 2006. Seroepidemiology of the human Herpesvirus (HHV-8) in the haemodialysis patients blood donors and HIV-positive individuals in City of Tehran. *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research.* **4**, pp. 57-62.
- Guanira, J.V., Casper, C., Lama, J.R., Morrow, R., Montano, S.M., Caballero, P., Suarez, L., Whittington, W.L., Wald, A., Sanchez, J. and Celum, C., 2008. Prevalence and correlates of human herpesvirus 8 infection among Peruvian men who have sex with men. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **49**(5), pp. 557-562.
- Jalilvand, S., Shoja, Z., Mokhtari-Azad, T., Nategh, R. and Gharehbaghian, A., 2011. Seroprevalence of Human herpesvirus 8 (HHV-8) and incidence of Kaposi's sarcoma in Iran. *InfectAgentCancer.* **e6**.
- Jalilvand, S., Tornesello, M.L., Buonaguro, F.M., Buonaguro, L., Naraghi, Z.S., Shoja, Z., Ziaee, A.A., Hamkar, R., Shahmahmoodi, S., Nategh, R. and Mokhtari-Azad, T., 2012. Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 variants in Kaposi's sarcoma from Iranian patients. *Virus Res.* **163**(2), pp. 644-649.
- Jham, B.C., Ma, T., Hu, J., Chaisuparat, R., Friedman, E.R., Pandolfi, P.P., Schneider, A., Sodhi, A. and Montaner, S., 2011. Amplification of the angiogenic signal through the activation of the TSC/mTOR/HIF axis by the KSHV vGPCR in Kaposi's sarcoma. *PLoS One.* **6**(4), P. e19103.
- Kanno, T., Sato, Y., Nakamura, T., Sakamoto, K., Sata, T. and Katano, H., 2010. Genotypic and clinicopathological

- characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in Japan. *J Med Virol.* **82**(3), pp. 400-406.
- Kumar, N., McLean, K., Inoue, N., Moles, D.R., Scully, C., Porter, S.R. and Teo, C.G., 2007. Human herpesvirus 8 genoprevalence in populations at disparate risks of Kaposi's sarcoma. *J Med Virol.* **79**(1), pp. 52-59.
- Masia, M., Robledano, C., Ortiz de la Tabla, V., Antequera, P., Lumbreras, B., Hernandez, I. and Gutierrez, F., 2014. Coinfection with human herpesvirus 8 is associated with persistent inflammation and immune activation in virologically suppressed HIV-infected patients. *PLoS One.* **9**(8), P. e105442.
- Mesri, E.A., Cesarman, E. and Boshoff, C., 2010. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer.* **10**(10), pp. 707-719.
- Mousavi, S.M., Mohagheghi, M.A. and Jerrahi, A.M., 2007. Epidemiology of Kaposi's sarcoma in Iran: 1984-2006. *Asian Pac J Cancer Prev.* **8**(4), pp. 557-560.
- Parisi, S.G., Sarmati, L., Pappagallo, M., Mazzi, R., Carolo, G., Farchi, F., Nicastri, E., Concia, E., Rezza, G. and Andreoni, M., 2002. Prevalence trend and correlates of HHV-8 infection in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **29**(3), pp. 295-299.
- Ramos da Silva, S., Ferraz da Silva, A.P., Bacchi, M.M., Bacchi, C.E. and Elgui de Oliveira, D., 2011. KSHV genotypes A and C are more frequent in Kaposi sarcoma lesions from Brazilian patients with and without HIV infection, respectively. *Cancer Lett.* **301**(1), pp. 85-94.
- Stallone, G., Infante, B., Grandaliano, G., Schena, F.P. and Gesualdo, L., 2008. Kaposi's sarcoma and mTOR: a crossroad between viral infection neoangiogenesis and immunosuppression. *Transpl Int.* **21**(9), pp. 825-832.
- Szalai, E., Gerlei, Z., Szlavik, J., Szladek, G., Patel, R., Hunyadi, J., Gergely, L. and Juhasz, A., 2005. Prevalence of human herpesvirus-8 infection in HIV-positive patients with and without Kaposi's sarcoma in Hungary. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **43**(2), pp. 265-268.
- Tornesello, M.L., Biryahwaho, B., Downing, R., Hatzakis, A., Alessi, E., Cusini, M., Ruocco, V., Katongole-Mbidde, E., Loquercio, G., Buonaguro, L. and Buonaguro, F.M., 2010. Human herpesvirus type 8 variants circulating in Europe, Africa and North America in classic, endemic and epidemic Kaposi's sarcoma lesions during pre-AIDS and AIDS era. *Virology.* **398**(2), pp. 280-289.
- Whitby, D., Marshall, V.A., Bagni, R.K., Wang, C.D., Gamache, C.J., Guzman, J.R., Kron, M., Ebbesen, P. and Biggar, R.J., 2004. Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *J Gen Virol.* **85**(Pt 1), pp. 155-163.
- Zavitsanou, A., Sypsa, V., Petrodaskalaki, M., Kalapothaki, V., Whitby, D. and Hatzakis, A., 2007. Human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in healthy urban employees from Greece: seroprevalence and associated factors. *J Med Virol.* **79**(5), pp. 591-596.
- Zhu, B., Chen, Y., Xie, Y., Wu, N., Shendu, J. and Wang, Y., 2008. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) infection: endemic strains and cladograms from immunodeficient patients in China. *J Clin Virol.* **42**(1), pp. 7-12.
- Zong, J., Ciufu, D.M., Viscidi, R., Alagiozoglou, L., Tyring, S., Rady, P., Orenstein, J., Boto, W., Kalumbuja, H., Romano, N., Melbye, M., Kang, G.H., Boshoff, C. and Hayward, G.S., 2002. Genotypic analysis at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) DNA molecules: clustering patterns, novel variants and chimerism. *J Clin Virol.* **23**(3), pp. 119-148.

The Prevalence of Active Human Herpesvirus 8 Infection and its Genotypes Among Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients

Kakavand-Ghalehnoei, R., MSc. Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Shoja, Z., Ph.D. Assistant Professor, Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Najafi, A., MSc. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Haji Mollahoseini, M., Ph.D. Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Jalilvand, S., Ph.D. Assistant Professor, Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran- Corresponding Author: sjalilvand@tums.ac.ir

Received: Jul 3, 2016

Accepted: Oct 9, 2016

ABSTRACT

Background and Aim: Considering the lack of information on the occurrence of the epidemic form of Kaposi's sarcoma (KS) and the high prevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) infection among human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients (46%), it was decided to estimate the incidence of KS in this group. Based on the fact that active HHV-8 infection leads to KS development, it is essential to first assess the prevalence of active HHV-8 infection in these patients. Most of the Iranian HIV-infected patients are not aware that they are HIV-positive. If the prevalence of HHV-8 infection is high in these patients, they may spread HHV-8 in the community by high-risk sexual behaviors, which would lead to an increase in the incidence of classic Kaposi's sarcoma. The objective of this study was to investigate the prevalence of HHV-8 among HIV-infected subjects.

Materials and Methods: One-hundred plasma samples from HIV-infected patients were collected. Genome was extracted and assessed by the nested PCR assay with specific primers for ORF26. Positive samples were amplified for the ORF K1 region by nested-PCR. Subsequently their products were sequenced and their phylogenetic trees constructed.

Results: HHV-8 was detected in 8 of the patients (8%). No statistically significant associations were found between age and gender on the one hand and HHV-8 infection on the other ($p > 0.05$). Two genotypes, namely, A and C, were identified, the former in two patients and the latter in one.

Conclusion: Although the prevalence of HHV-8 infection is high among Iranian HIV-infected patients, active HHV-8 infection rate is low among them. Therefore, it seems that the incidence of epidemic KS is likely to be very low in this group. Certainly more research is needed in this area. As regards genotypes, genotypes A and C are found in the samples.

Keywords: Human Herpesvirus 8, Human Immunodeficiency Virus, Epidemic Kaposi's Sarcoma