

میزان ویروس BK در ادرار بیماران پیوند مغز استخوان و تاثیر آن در تشخیص بیماری هموراژیک سیستائیتیس (Hemorrhagiccystitis)

پرویز کوخایی^{۱*} (Ph.D)، لیلا کوخایی^۲ (B.SC)، بیژن صدیقی مقدم^۱ (M.Sc)، قاسم مسیبی^۳ (Ph.D)

-
-
-

چکیده

سابقه و هدف: هموراژیک سیستائیتیس (HC) در بیماران پیوند مغز استخوان آلوژنیک عموماً همراه با عفونت ویروس BK می‌باشد. از آنجایی که ۷۷-۹۹٪ بیماران بالغ پیوند مغز استخوان واجد آلودگی ویروس BK می‌باشند، لذا فعالیت این ویروس به تنهایی نمی‌تواند عامل هموراژیک سیستائیتیس تلقی شود. اخیراً وجود معنی‌دار موتاسیون $G \rightarrow C$ در ناحیه SP1 در منطقه‌ی ژن‌های کنترل‌کننده ویروس BK در بیماران HC گزارش شده است. در حالی که این موتاسیون در بیماران فاقد HC دیده نشده است. هدف این پژوهش ارتباط وقوع موتاسیون با بیماری‌زایی ویروس BK می‌باشد. مواد روش‌ها: روش Real time PCR برای اندازه‌گیری میزان ویروس BK مورد استفاده قرار گرفت. ۲۱ بیمار با پیوند مغز استخوان و با عوارض HC و بدون HC و نیز با موتاسیون و بدون موتاسیون در موتاسیون $G \rightarrow C$ در ناحیه SP1 در منطقه‌ی ژن‌های کنترل‌کننده ویروس BK در این مطالعه شرکت کردند. یافته‌ها: تعیین میزان ویروس BK در ۱۸ مورد از ۲۱ بیمار با موفقیت انجام شد. (۶ بیمار با موتاسیون $C \rightarrow G$ و ۶ بیمار بدون موتاسیون) و ۶ بیمار بدون HC. میانگین تعداد ویروس HC در بیماران دارای HC با موتاسیون $C \rightarrow G$ برابر بود با $3 \times 10^6 \mu l$ و میانگین تعداد ویروس در بیماران HC بدون موتاسیون $C \rightarrow G$ برابر بود با $1/5 \times 10^6 \mu l$ و میانگین تعداد ویروس در بیماران بدون HC برابر بود با $1 \times 10^6 \mu l$. اگرچه تفاوت مشاهده شده به لحاظ آماری معنی‌دار نیست و این ناشی از یک بیمار بدون HC است که دارای کپی زیادی از ویروس می‌باشد. در حالی که ۵۰٪ بیماران HC دارای تعداد ویروس $10^6 \mu l$ یا بیش‌تر می‌باشند. فقط یک نمونه در گروه بیماران بدون HC دارای تعداد ویروس $5 \times 10^6 \mu l$ می‌باشد. نتیجه‌گیری: اگرچه این مطالعه ارتباط معنی‌دار میزان زیاد ویروس و موتاسیون $C \rightarrow G$ را نشان نمی‌دهد ولی این اطلاعات نشان می‌دهد که میزان کپی (تعداد) بیش از $10^6 \mu l$ بیان‌گر خطر ابتلا به HC است.

واژه‌های کلیدی: ویروس BK، پیوند مغز استخوان، هموراژیک سیستائیتیس، Real time PCR

مقدمه

[]
 BK
 HC BK []
 -
 []
 BK []

()

[]	VP1	NCCR	HC	HC	%
	HC	BK	BK		
	C → T	SP1	C → G		HC
BK		NCCR-SP1	(GVHD)	HC	
HC	HC				
HC		[]		[]	
	BK		HC	BK	[]
	[]		BK		[]
				[]	HC
		DNA		HC	
		BK	BK	HC	
T		T		[]	
mM	Taqman	PCR		HC	BK
	Sence(BK-S)	/ Mgcl ₂			
DNA	/ mM dNTPs	Antienc (BK-AS)	HC		BK
		Taq Gold	C →	HC	%
μl		BK	HC		G
:	PCR			[]	NCCR SP1
					SP1
			[]	BK	
				SP1	
				BK	
		QIAquick		Real-Time PCR	
		pGEM-T			BK
LB			JM	C → G) HC
X-Gal	IPTG	(mg/μl)	HC	(BK	NCCR SP
		LB			
ABI PRISM		QIAprep			
		(Applied Biosystem)			
		Big Dye BK-AS BK-S			()
(bp)				HC	HC

مواد و روش‌ها

نتایج

GenBank

DNA Real- Time PCR NC 001538 , JO 2038 , BK
 VO 01110 , VO 118

Real Time PCR :Real Time PCR

HC BK [] BK
 SP1 C →G)
 (C →G BK DNA (NTC)

Real Time PCR BK

μl . ABI PRISM 7700

C →G HC mM Taqman μl : PCR

× BK SP1 BK-S / Mgcl₂ mM dNTPs /

μl) BK / × BK-Probe / BK-AS /

Taq Gold DNA polymerase /

(×) (×

:

C → G BK duplicates

× / ×

C →G BK
 .() . / × lμ

C → G HC
 / × μl BK SP1
 .() / × -

μl) × - × μl BK HC PCR

% (threshold PCR

μl HC [] cycle (Ct)

HC BK
 .() BK × μl

Man-Whitney :آنالیز آماری:

BK

Real Time PCR SP1 C →G HC

Mann-Whitney SP1 C →G HC

p < / .HC HC

()

.(p = /) SP1 BK

HC HC HC

.(p = /) .

GVHD (p= /) SP1 C →G

HC) SP1 C →G HC

SP1 HC . (p = /)

.() BK (HC (p = /)

PCR μl HC

PCR

/ HC HC

HC HC

HC HC

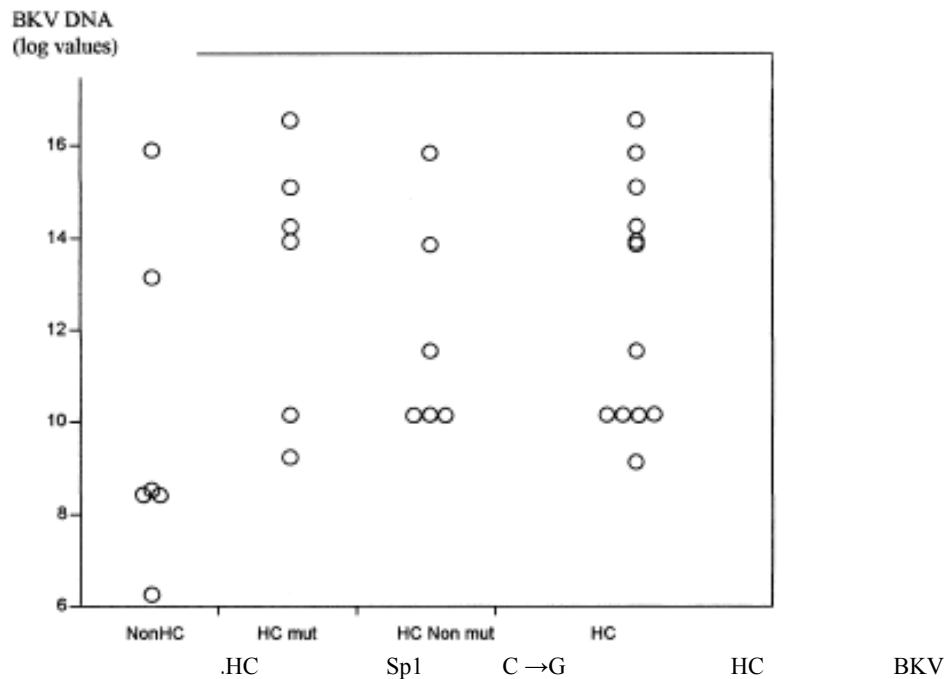
(p = /) SP1

HC HC

BK

BK

Primer	Sequence 5'-3'	Nucleotide positions
BK-S	GCAATCTATCCAAACCAAGGGCTCTT	4746-4771
BK-AS	GGGGCGACGAGGATAAAAATGAAGA	4994-5017
BK-Probe	6-Fam-TTTTTTGAACAAATAGGCCA TTCCTGTCAG-TAMRA	4834-4872



Non-HC: patients without HC, HCmut: HC patients with Sp1 C→G mutations, HC Non-mut: HC patients without Sp1 C→G mutations, HC: All HC patients.

HC BK Mann Whitney

BK

BK

HC

 μ l

Nested PCR

Real Time PCR

 μ l

Real Time PCR

SP1

C → G

HC

HC

HC

BK

بحث و نتیجه گیری

BK

[]

Azzi

C → G

HC

HC

HC

SP1

HC

HC

BK

HC

HC

SP1

Real Time PCR

HC

HC

).

-

BK

DNA

Azzi

.[] (

HC

HC

C → G

HC

BK

PCR

(× μ l) SP1

.[]

Azzi

SP1

HC

HC

(/ × μ l)

Real Time PCR

BK

Real Time PCR

HC

Biel

JC

BK

HC

SP1

Real Time PCR

BK

HC

%

.[]

HC

 μ l

:

× μ l

BK

BK

LT

 μ l

HC

BK

Biel

BK

HC

VP1

BK

HC BK [] JC
 PCR VP1
 BK []
 HC VP1 ()
 QR- [] Real Time PCR
 PCR

تشکر و قدردانی

Nested PCR QR-PCR
 JC BK
 BK
 PCR
 DNA
 Real Time PCR
 BK HC
 BK
 HC
 BK
 HC
 BK
 HC
 R.T- PCR
 BK

منابع

- [1] Walker DL, Padgett BL. The epidemiology of human polyomaviruses. *Prog Clin Biol Res* 1983; 105: 99–106.
- [2] Dorries K, Vogel E, Gunther S, Czub S. Infection of human polyomaviruses Jc and Bk in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology*. 1994; 198: 59-70.
- [3] Chesters PM, Heritage J, McCance DJ. Persistence of DNA sequences of Bk virus and Jc virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis* 1983; 147: 676–684.
- [4] Hashida Y, Gaffney PC, Yunis EJ. Acute hemorrhagic cystitis of childhood and papovavirus-like particles. *J Pediatr*. 1976; 89: 85-87.
- [5] Saitoh K, Sugae N, Koike N, Akiyama Y, Iwamura Y, Kimura H. Diagnosis of childhood Bk virus cystitis by electron microscopy and Pcr. *J Clin Pathol* 1993; 46: 773–775.
- [6] ArthurRR, ShahKV, Baust SJ, SantosGW, Saral R. Association of Bk Viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N Engl J Med* 1986; 315: 230–234.
- [7] Ilhan O, Koc H, Akan H, Gurman G, Arslan O, Ozcan M, Arikan N, Sencer H, Konuk N, Uysal A, Beksac M. Hemorrhagic cystitis as a complication of bone marrow transplantation. *J Chemother* 1997; 9: 56–61.
- [8] Childs R, Sanchez C, Engler H, Preuss J, Rosenfeld S, Dunbar C, van Rhee F, Plante M, Phang S, Barrett AJ. High incidence of adeno- and polyomavirus-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow allotransplantation for hematological malignancy following T cell depletion and cyclosporine. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 889–893.
- [9] Seber A, Shu XO, Defor T, Sencer S, Ramsay N. Risk factors for severe hemorrhagic cystitis following Bmt. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 35–40.
- [10] Vogeli TA, Peinemann F, Burdach S, Ackermann R. Urological treatment and clinical course of Bk polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis in children after bone marrow transplantation. *Eur Urol* 1999; 36: 252–257.
- [11] Ost L, Lonnqvist B, Eriksson L, Ljungman P, Ringden O. Hemorrhagic cystitis a manifestation of graft versus host disease? *Bone Marrow Transplant* 1987; 2: 19–25.
- [12] Bogdanovic G, Ljungman P, Wang F, Dalianis T. Presence of human polyomavirus DNA in the peripheral circulation of bone marrow transplant patients with and without hemorrhagic cystitis. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 573–576.
- [13] Bogdanovic G, Priftakis P, Taemmeraes B, Gustafsson A, Flaegstad T, Winiarski J, Dalianis T. Primary Bk virus (Bkv) infection due to possible Bkv transmission during bone marrow transplantation is not the major cause of hemorrhagic cystitis in transplanted children. *Pediatr Transplant*. 1998; 2: 288-293.
- [14] Jin L, Pietropaolo V, Booth JC, Ward KH, Brown DW. Prevalence and distribution of virus subtypes in healthy people and

early enhancer function at the expense of late promoter activity. *Virology* 1989; 170: 296–298.

[19] Sundsfjord A, Johansen T, Flaegstad T, Moens U, Villand P, Subramani S, Traavik T. At least two types of control regions can be found among naturally occurring Bk virus strains. *J Virol* 1990; 64: 3864–3671.

[20] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time quantitative Pcr. *Genome Res* 1996;6: 986–994.

[21] Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for Real Time quantitative Rt-Pcr. *Genome Res* 1996;6: 995-1001.

[22] Degener AM, Pietropaolo V, Di Taranto C, Li J, Ameglio F, Cordiali-Fei P, Trento E, Sinibaldi L, Orsi N. Identification of a new control region in the genome of Ddp strain of Bk virus isolated from Pbm. *J Med Virol* 1999; 58: 413–419.

[23] Bogdanovic G, Brytting M, Cinque P, Grandien M, Fridell E, Ljungman M, Lönnqvist B, Hammarin A-L. Nested Pcr for detection of Bk virus and Jc virus DNA. *Clin Diagn Virol*. 1994; 211: 2 -20.

immunocompromised patients detected by Pcr-restriction enzyme analysis. *Clin Diagn Virol* 1995; 3:285–295.

[15] Azzi A, Cesaro S, Laszlo D, Zakrzewska K, Ciappi S, De Santis R, Fanci R, Pesavento G, Calore E, Bosi A. Human polyomavirus Bk (Bkv) load and haemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation patients [in process citation] *J Clin Virol* 1999; 14: 79–86.

[16] Biel SS, Held TK, Landt O, Niedrig M, Gelderblom HR, Siegert W, Nitsche A. Rapid quantification and differentiation of human polyomavirus DNA in undiluted urine from patients after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 3689-3695.

[17] Priftakis P, Bogdanovic G, Kalantari M, Dalianis T. Overrepresentation of point mutations in the Sp1 site of the non-coding control region of Bk virus in bone marrow transplanted patients with haemorrhagic cystitis. *J Clin Virol*. 2001; 21: 1-7.

[18] Cassill JA, Subramani S. A naturally occurring deletion in the enhancer repeats of the human papovavirus Bk optimizes