

Evaluation of Prevalence of BKV and JCV DNAs in Renal Allograft Recipients in Guilan Province using Real-time PCR, during 2010-2016

Ashouri Saheli Z¹, Shenagari M^{*2,3,4}, Harzandi N¹, Monfared A^{4,5}

1. Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

3. Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

4. Organ Transplant Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

5. Urology Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

*Corresponding author. Tel: +989194406462, Fax: +981333690036, E-mail: shenagari@gmail.com
shenagari@gums.ac.ir

Received: Feb 19, 2019 Accepted: Jun 20, 2019

ABSTRACT

Background & objectives: Immunosuppressive drugs that are used for decreasing risk of acute rejection and renal graft loss can lead to reactivation of latent viruses for example BKV and JCV in either renal allograft or recipients. These viruses can lead to renal graft loss. The purpose of this study was to evaluate the quality and quantity of the genome of these two viruses in the renal recipients' plasmas for early detection.

Methods: In this retrospective descriptive study, at first, DNA extraction test was performed on 102 plasma samples of renal allograft recipients. And then, BKV and JCV DNAs were detected and quantified by Real-Time PCR.

Results: Fifty four (52.94%) BKV DNA positive and 26 (25.50%) JCV DNA positive were found in 102 recipient plasma samples. Linear range of measurements for BKV and JCV DNAs were within the range of 10^7 -0.596 copies/ μ l and 10^7 -0.528 copies/ μ l respectively. After calculation of genes amounts based on copy/ml in the plasmas, numbers and percent of positive cases were highlighted in the four categories. BKV and JCV DNA (Co-infection) were detected in 22 (21.56%) plasma samples.

Conclusion: Real-time PCR is a quantitative and qualitative PCR method that can detect genome of any type of organisms and their amounts (even in trace amounts), so using of this method is very important for early detection of viruses which can cause diseases and graft rejection in renal transplant recipients.

Keywords: Kidney Transplantation; Graft Rejection; Real-time Polymerase Chain Reaction; Polyomavirus Infections

بررسی میزان فراوانی DNA ویروس‌های BKV و JCV در گیرندگان پیوند کلیه در استان گیلان بوسیله Real time PCR ۹۵-۱۳۸۹

زهرا عاشوری ساحلی^۱، محمد شناگری^{۲،۳،*}، ناصر هرزندی^۱، علی منفرد^{۴،۵}

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۲. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۳. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۴. مرکز تحقیقات پیوند اعضا، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۵. مرکز تحقیقات ارولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۹۴۴۰۶۴۶۲، فاکس: ۰۱۳۳۳۶۹۰۰۳۶، پست الکترونیک: shenagari@gmail.com، shenagari@gums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: داروهای مهارکننده ایمنی، جهت کاهش خطر رد حاد و از دست دادن کلیه پیوندی به کار می‌روند که در نتیجه، امکان فعالیت مجدد ویروس‌های مخفی از جمله BKV و JCV در میزبان و یا کلیه پیوندی افزایش می‌یابد که می‌تواند منجر به از دست رفتن کلیه پیوندی گردد. هدف این مطالعه، تشخیص کیفی و کمی DNA این ویروس‌ها در پلاسما بیماران پیوند کلیه استان گیلان، جهت شناسایی به موقع بود.

روش کار: در این مطالعه توصیفی به صورت گذشته نگر ابتدا بر روی ۱۰۲ نمونه پلاسمای گیرندگان آزمایش استخراج DNA ویروس صورت پذیرفت سپس شناسایی و کمیت یابی آن بوسیله Real time PCR انجام گردید.

یافته‌ها: در ۱۰۲ نمونه پلاسما ۵۴ نمونه (۵۲/۹۴٪) دارای BKV DNA و ۲۶ نمونه (۲۵/۵۰٪) دارای JCV DNA بودند. محدوده خطی اندازه گیری برای BKV ۰/۵۹۶ تا ۱۰^۷ copy/μl و برای JCV ۰/۵۲۸ تا ۱۰^۷ copy/μl بود. لذا بعد از محاسبه مقادیر ژن در پلاسما بر اساس copy/ml تعداد و درصد موارد مثبت حاوی DNA هر ویروس بطور اختصاصی در ۴ محدوده مشخص گردید. DNA هر دو ویروس (عفونت همزمان) در ۲۲ نمونه پلاسما (۲۱/۵۶٪) وجود داشت.

نتیجه گیری: Real time PCR، روشی کمی و کیفی است که قادر به تشخیص ژنوم انواع موجودات و مقادیر آن (حتی به مقدار بسیار کم) می‌باشد، لذا استفاده از آن جهت تشخیص به موقع ویروس‌ها که می‌توانند باعث بیماری‌ها و رد پیوند در گیرندگان پیوند کلیه شوند، بسیار حائز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: پیوند کلیه، رد پیوند، Real-time Polymerase Chain Reaction، عفونت‌های پولیوماویروس

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۳۰

دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۳۰

مقدمه

بعد از پیوند به ایمنی اختصاصی مهارشده با واسطه مقدار، دوره و مراحل درمان‌های مهارگر ایمنی، وجود دارد. بسیاری از عفونت‌های ویروسی بعد از پیوند کلیه، از طریق فعال شدن مجدد عفونت ویروسی مخفی در میزبان و یا کلیه پیوند شده رخ می‌دهند. از

پیوند کلیه روش ممتاز درمان برای بیماری‌های کلیوی مرحله آخر می‌باشد. جهت کاهش خطر رد حاد و از دست رفتن کلیه پیوندی، درمان بوسیله مهارکننده‌های ایمنی صورت می‌پذیرد. خطر عفونت

این عوامل عفونت‌زای ویروسی می‌توان به BKV و JCV اشاره نمود [۲،۱].

BKV و JCV متعلق به خانواده پولیوماویریده و جنس پولیوماویروس و دارای ژنوم حلقوی دو رشته‌ای کوچک DNA می‌باشند [۴،۳]. عفونت اولیه BKV در کودکی رخ می‌دهد و اغلب با علائم خفیف بیماری و یا یک بیماری ملایم تنفسی همراه است. سابقه عفونت با BKV در انسان از طریق وجود آنتی بادی در ۹۰ درصد نوجوانان و بزرگسالان سرتاسر دنیا اثبات گردیده است [۵-۷]. بعد از عفونت اولیه، BKV بطور مخفی در اپی تلیوم مجرای ادراری و سلول‌های اپی تلیال لوله ای پایدار می‌ماند. در بیماران با ایمنی مهارشده، BKV دوباره فعال می‌شود و همانندسازی می‌کند. شدیدترین علائم عفونت BKV در گیرندگان کلیوی شامل فقدان تب، کسالت، درد عضلات، لوکوپنی، آنمی و ترومبوسیتوپنی می‌باشد [۸،۵]. بطور تیبیک، BKV کلیه پیوندی را با التهاب فضاهای بین بافت کلیه و تنگی حالب درگیر می‌نماید و با التهاب مثانه همراه با خونریزی شدید مرتبط است [۹،۳]. BKV مرتبط با نفروپاتی، در بیشتر از ۹۵ درصد موارد رخ می‌دهد و بر ۱۰ درصد پیوندهای کلیه اثر می‌گذارد. ضمناً میزان از دست دادن آلوگرافت کلیوی از ۱۰ تا ۸۰ درصد است [۴].

عفونت اولیه JCV در ابتدا در کودکان و بدون علائم رخ می‌دهد و منجر به یک ویرمی اولیه می‌گردد. عفونت اولیه JCV به مانند عفونت اولیه BKV با علائم خفیف بیماری و یا یک بیماری ملایم تنفسی همراه است و با انتشار ویروس به مکان‌های عفونت پایدار، مادام‌العمر گسترش می‌یابد. مکان‌های مهم پایدار برای BKV و JCV، سلول‌های کلیه و مجرای ادراری هستند [۱۰]. همچنین JCV در روده بزرگ، کبد، طحال، مغز استخوان و سیستم عصبی مرکزی و خون پیدا می‌شود [۱۱]. JCV بطور نادر، بعنوان یک عامل نفروپاتی به تنهایی یا در مشارکت با BKV است در کمتر از ۵ درصد گیرندگان پیوند کلیه، مرتبط با

نفروپاتی می‌باشد. این ویروس معمولاً بیشتر، بعنوان یک عامل لوکوآنسفالوپاتی چندکانونی پیش‌رونده (PML) در گیرندگان آلوگرافت کلیوی معروف می‌باشد [۱۱،۱۲]. لذا تشخیص سریع و به موقع فعالیت مجدد این ویروس‌ها در بیماران پیوند کلیه جهت مدیریت موثر بیمار و بکارگیری استراتژی‌های درمانی مناسب‌تر که منجر به کاهش و بطور ایده‌آل حذف موارد نفروپاتی، سایر بیماری‌ها و رد پیوند گردد، بسیار الزامی می‌باشد.

روش کار

این مطالعه توصیفی به صورت گذشته نگر بر روی ۱۰۲ نمونه پلاسما از گیرندگان پیوند کلیه مراجعه‌کننده به مرکز تشخیص مولکولی دانشگاه علوم پزشکی گیلان در سال‌های ۹۵-۱۳۸۹ نگه‌داشته شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس، صورت گرفت. انتخاب نمونه‌های پلاسما برای انجام آزمایش مطابق روش نمونه‌گیری متوالی بود. ۱۰۲ نمونه پلاسما مذکور مربوط به ۶۰ زن و ۴۲ مرد در محدوده سنی ۲۰ تا ۷۸ سال بود که برای اولین بار پیوند کلیه شده و سابقه رد پیوند و بیماری‌های قارچی، سرطان، دیابت و عفونت‌های HIV، HCV، BKV، CMV نداشتند. ۳۷ نفر از این گیرندگان پیوند، تحت دیالیز در بیمارستان قرار گرفته بودند که ۱۶ نفر از آن‌ها بیشتر از یک سال و ۲۱ نفر کمتر از یک سال دیالیز شده بودند. مطابق پروتکل استاندارد ضد رد پیوند و با تجویز نفرولوژیست داروهای مهارکننده ایمنی مثل مایکوفنلات مفتحیل، سیپرولیموس و داروی کورتیکواستروئید پردنیزون، جهت عدم واژنش پیوند کلیه مصرف نموده بودند. مقدار کراتینین خون در ۲۴ نفر از زنان و ۳۴ نفر از مردان بالاتر از محدوده طبیعی کراتینین خون در زنان (۰/۵-۱ mg/dL) و مردان (۰/۷-۱/۲ mg/dL) بود.

استخراج DNA ویروس

بر روی ۱۰۲ نمونه پلاسما، استخراج DNA ویروس با استفاده از QIAamp® DNA mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) انجام گرفت. ابتدا ۲۰۰ μl محلول پروتیناز K به میکروتیوب ۱/۵ ml عاری از DNase و RNase وارد نموده سپس به ترتیب ۲۰۰ μl پلاسما و ۲۰۰ μl بافر AL به میکروتیوب اضافه نموده و بعد از ۱۵ ثانیه میکس، ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سلسیوس انکوبه صورت گرفت و پس از سانتریفوژ، ۲۰۰ μl اتانل اضافه شد. بعد از میکس، تمام محتویات داخل میکروتیوب در ستون دارای فیلتر که در داخل یک لوله جمع آوری قرار می‌گیرد، وارد شده، سپس سانتریفوژ و ۵۰۰ μl بافر شستشوی ۱ حاوی اتانل (AW1) اضافه گردید و دوباره سانتریفوژ انجام شد. در این مرحله ۵۰۰ μl بافر شستشوی ۲ حاوی اتانل (AW2) اضافه و دوباره سانتریفوژ انجام گرفت. لازم به ذکر است که بعد از هر مرحله سانتریفوژ، لوله زیرین دور انداخته شده و ستون دارای فیلتر در لوله جمع آوری بعدی قرار می‌گرفت. به لوله حاوی ژنوم ویروس، محلول حاوی ۵۰ μl بافر شستشو و ۵ μl محلول استاندارد داخلی کیت Real time PCR اضافه شده و سپس سانتریفوژ نهایی انجام می‌شد. در انتها محلول نهایی حاوی DNA ویروس که لوله زیرین می‌باشد در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

Quantitative Real-time PCR

Uniplex Real-time PCR بر روی ۱۰۲ نمونه DNA ویروس استخراج شده از پلاسماهای فوق‌الذکر، براساس ورژن ISEX از کیت‌های BK Virus PCR و JC Virus PCR مربوط به Gene Proof (Víte ská, Czech Republic) اجرا شد. بطور خلاصه ۳۰ μl از ماستر میکس آماده حاوی بافر، dNTPs، رنگ مرجع غیرفعال (SuperROX)، آنزیم hot-start DNA polymerase مقاوم به گرما، پرایمرهای Forward و Reverse و پروب TaqMan (توالی‌های پرایمرها و پروب‌ها در جدول ۱) به ۴ لوله

PCR دارای ۱۰ μl از هر ۴ تنظیم کننده اختصاصی و سایر لوله‌های PCR اختصاصی دارای ۱۰ μl از نمونه‌های DNA استخراج شده و آب مقطر (به‌عنوان کنترل منفی و به مقدار ۱۰ μl) اضافه شد. حجم کلی در تمام لوله‌های PCR، ۴۰ μl گردید. واکنش‌های Real-time PCR با بکارگیری دستگاه (Applied Biosystems, Foster StepOne Plus™ Real-time PCR City, CA, USA) اجرا گردید. برنامه PCR بدین ترتیب بوده است که ابتدا در «مرحله نگهداری اول» زدودن آلودگی احتمالی ناشی از محصولات تکثیر قبلی DNA، بوسیله آنزیم یوراسیل DNA گلایکوزیلاز در دما و زمان مشخص، اجرا می‌شود سپس در «مرحله نگهداری دوم»، در دما و زمان معین جدا شدن اولیه دو رشته DNA انجام می‌گیرد و سپس در مرحله سوم که به مرحله «PCR» معروف است مراحل PCR در ۴۵ سیکل انجام می‌شود. خواندن سیگنال فلورسانس در مرحله اتصال پرایمر به تک رشته DNA صورت می‌گیرد (جدول ۲). اساس تشخیص بر پایه تکثیر توالی محفوظ و اختصاصی DNA واقع در محدوده بین ژن‌های VP1 و VP2 و اندازه‌گیری افزایش غلظت محصول تکثیر با بکارگیری پروب‌های لیبل شده فلورسانس می‌باشد. چهار تنظیم کننده اختصاصی هر یک از دو ویروس که جهت آزمایش Uniplex Real-time PCR، در هر کیت وجود دارد برای شناسایی اختصاصی ژن هر یک از دو ویروس استفاده شده است.

هر تنظیم کننده اختصاصی هر ویروس از ۱۰ تا ۱۰^۴ copy/μl از ژن مورد بررسی آن ویروس را دارا می‌باشد. محدوده خطی آن با استفاده از نمونه کلون‌شده حاوی ژن واقع در بین ژن‌های VP1 و VP2 برای هر کدام از ویروس‌ها بررسی گردیده و برای BKV از ۰/۵۹۶ تا ۱۰^۷ copy/μl و برای JCV از ۰/۵۲۸ تا ۱۰^۷ copy/μl را شامل می‌شود. سپس تیترا محاسبه شده توسط دستگاه، در ۲۵۰ که شامل ۲۰۰ μl نمونه پلاسما DNA استخراج شده و ۵۰ μl بافر

شستشو می‌باشد، ضرب می‌گردد تا نتایج مطلق برحسب copy/ml بدست آید.

جدول ۱. توالی پرایمرهای پیشرو و معکوس هر ویروس و پروب ها

نام ویروس	پرایمرها و پروب ها	توالی (جهت ۵' به ۳')
BKV	پرایمر پیشرو	AGCAGGCAAGGGTTACTAAAT
	پرایمر معکوس	GAAGCAACAGCAGATTCTCAACA
	پروب	FAM-AAGACCCTAAAGACTTTCCTTCTGATCTACACCAGTTT-BHQ1a
JCV	پرایمر پیشرو	AGAGTGTGGGATCCTGTGTTTT
	پرایمر معکوس	GAGAAGTGGGATGAAGACCTGTTT
	پروب	JOE-TCATCACTGGCAAACATTTCTTCATGGC-BHQ3a

جدول ۲. برنامه Real - Time PCR

مرحله	دما و زمان	چرخه ها
مرحله نگهداری	۳۷°C، ۲	۱
مرحله نگهداری	۹۵°C، ۱۰	۱
	۹۵°C، ۵	
PCR -۳	۶۰°C، ۴۰ (خواندن سیگنال فلورسانس)	۴۵
	۷۲°C، ۲۰	

بیماران و جنسیت بیماران (ارتباط اکتساب عفونت با جنسیت بیماران) و بررسی ارتباط عفونت همزمان و جنسیت از آزمون کای دو استفاده شد. سطح معنی‌دار ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (جدول ۳).

در نهایت داده‌ها توسط نرم افزار SPSS-23 تجزیه و تحلیل شد. فراوانی BKV DNA و JCV DNA به صورت توصیفی گزارش شد. جهت بررسی ارتباط وجود ژنوم این ویروس‌ها در نمونه‌های پلاسمای

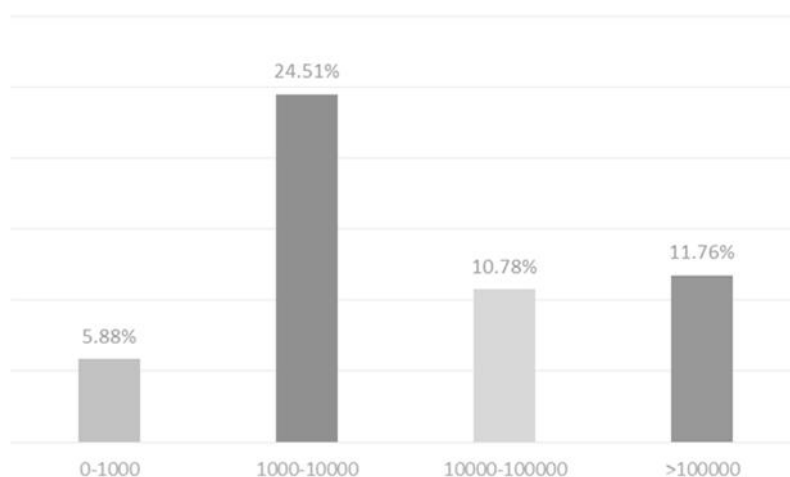
جدول ۳. درصد موارد مثبت و منفی وجود ژنوم ویروس های BKV و JCV در نمونه های پلاسمای گیرندگان پیوند کلیه بر اساس جنسیت و بررسی ارتباط عفونت همزمان برحسب جنسیت بر اساس آزمون کای دو

متغیر	زن تعداد (درصد)	مرد تعداد (درصد)	P.value
بر حسب نوع ویروس	BKV DNA ⁺	۲۷ (۵۰٪)	۰/۰۵۵
	BKV DNA ⁻	۳۳ (۶۸/۷۵٪)	
	JCV DNA ⁺	۱۳ (۵۰٪)	۰/۲۹
	JCV DNA ⁻	۴۷ (۶۱/۸۴٪)	
عفونت همزمان	دارد	۱۳ (۵۹/۰۹٪)	۰/۱۶
	هیچکدام	۳۳ (۷۵٪)	

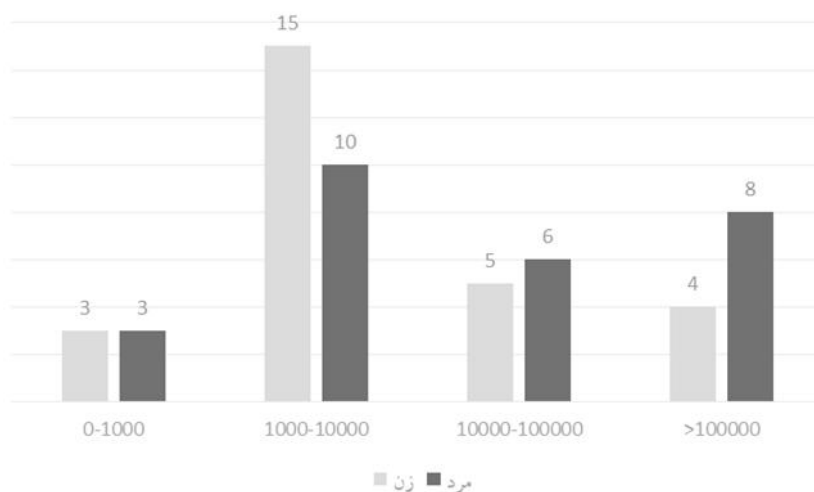
یافته‌ها

۳۲/۳۵ درصد موارد زن (۳۳ نفر) و ۱۴/۷۱ درصد موارد مرد (۱۵ نفر) بوده‌اند. تعداد کپی‌های BKV DNA در محدوده‌های ۰-۱۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰-۱۰۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰۰-۱۰۰۰۰۰۰ داشتند (جدول ۳ و نمودار ۱). در محدوده ۰-۱۰۰۰۰۰۰

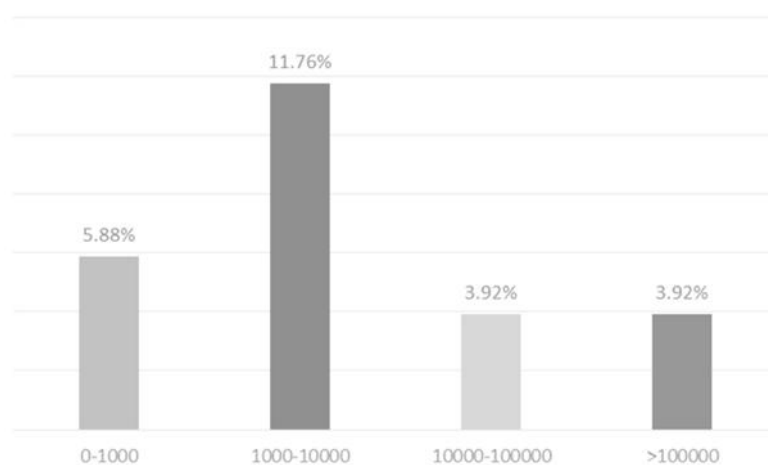
در ۱۰۲ نمونه پلاسمای ۵۴ نمونه (۵۲/۹۴٪) BKV DNA مثبت و ۴۸ نمونه (۴۷/۰۶٪) BKV DNA منفی بودند. از موارد مثبت، ۲۶/۴۷ درصد زن (۲۷ نفر) و ۲۶/۴۷ درصد مرد (۲۷ نفر) و از موارد منفی،



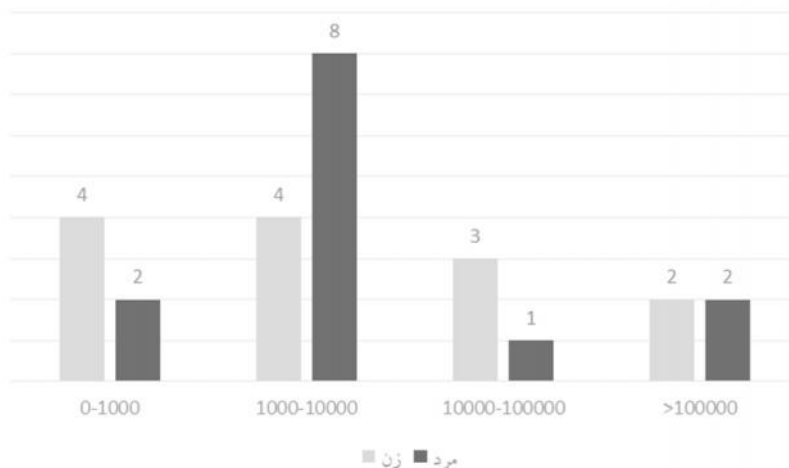
نمودار ۱. درصد موارد مثبت BKV در محدوده های مشخص در کل جمعیت گیرندگان پیوند کلیه تست شده با Real-Time PCR



نمودار ۲. موارد مثبت BKV DNA در محدوده های مشخص به تفکیک جنسیت



نمودار ۳. درصد موارد مثبت JCV در محدوده های مشخص در کل جمعیت گیرندگان پیوند کلیه تست شده با Real-Time PCR



نمودار ۴. موارد مثبت JCV DNA در محدوده های مشخص به تفکیک جنسیت

بحث

ابتداءً به عفونت در بیماران پیوندی در ۳ دوره زمانی بعد از پیوند شامل دوره اولیه، دوره میانی و دوره پایانی دیده می‌شود. عفونت‌های دوره اولیه بعد از پیوند، عفونت‌های ناشی از پذیرندگان و اهداکنندگان و مرتبط با جراحی است. عوامل عفونت‌زای فرصت طلب در دوره میانی بعد از پیوند، باعث ایجاد عفونت و متعاقباً بیماری در عضو پیوندی و یا سایر قسمت‌های بدن می‌دهد. این عوامل عفونت‌زا همچنین می‌توانند باعث اختلال در عملکرد عضو پیوندی، برداشتن عضو پیوندشده و حتی مرگ بیمار گردند. عفونت دوره پایانی بعد از پیوند با گذشت بیشتر از ۶ ماه از پیوند آغاز می‌گردد و با وجود اینکه خطر عفونت در این دوره کاهش می‌یابد، اما پذیرندگان پیوند با خطرات مهمی از جمله عفونت حاصل از پاتوژن‌های محیطی و عفونت‌های ویروسی مزمن آسیب‌رسان به عضو پیوندی مواجه می‌شوند. بنابراین با توجه به اینکه ویروس‌ها معمول‌ترین عوامل عفونت‌زای فرصت طلب در زمان پیوند (عضو پیوندی حاوی سلول‌های دارای آلودگی نهفته با ویروس) و بعد از انجام عمل پیوند می‌باشند، لذا معیارهای بازدارنده مثل غربالگری قبل از پیوند، درمان آنتی‌ویرال پیشگیری‌کننده و تشخیص

آزمایشگاهی وجود ویروس بعد از انجام پیوند حائز اهمیت است [۲].

این تحقیق با هدف شناسایی و تشخیص به موقع DNA ویروس‌های BKV و JCV با استفاده از روش تشخیص مولکولی Real-time PCR در پلاسمای گیرندگان پیوند کلیه انجام گرفت. ابتدا بر روی ۱۰۲ نمونه پلاسمای نگهداری شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس، استخراج DNA این ویروس‌ها اجرا گردید و سپس آزمایش Real-time PCR به صورت Uniplex انجام شد. در این تحقیق از ۱۰۲ نمونه پلاسمای ۵۴ نمونه (۵۲٪/۹۴) دارای DNA BKV و ۲۶ نمونه (۲۵٪/۵۰) دارای JCV DNA بودند و هر دو ویروس (عفونت همزمان) در ۲۲ نمونه پلاسمای (۲۱٪/۵۶) تشخیص داده شد.

در تحقیقی که توسط سمریاف زاده و همکاران در شهرهای تهران، شیراز و اهواز در سال ۲۰۰۹ بر روی نمونه‌های خون و ادرار ۷۸ بیمار پیوند کلیه جهت تشخیص میزان BKV در فواصل زمانی قبل از پیوند، ۱ ماه و ۴ ماه بعد از پیوند به روش semi-nested-PCR انجام گردید. مشخص شد که در نمونه‌های ادرار در فاصله زمانی قبل از پیوند ۵ مورد (۶٪/۸)، در فاصله زمانی یک ماه بعد از پیوند ۱۰ مورد (۱۲٪/۸) و در فاصله زمانی چهار ماه بعد از پیوند ۳۰ مورد (۳۸٪/۵) BKV مثبت وجود داشته است و در

PCR جهت تشخیص فعال شدن دو ویروس BKV و JCV انجام شد نیز بیان گردید که تفاوت معناداری بین شیوع دو ویروس در گیرندگان پیوند کلیه و جنسیت آنها وجود ندارد [۱۸].

در تحقیق حاضر، جهت تشخیص زودهنگام از روش تشخیص مولکولی Real time PCR استفاده گردید و جهت تمایز بسیار حائز اهمیت موارد منفی کاذب از موارد منفی حقیقی از کنترل داخلی غیر رقابتی استفاده گردید. همچنین از پروب نشانه گذاری شده از نوع هیدرولیز به نام TaqMan استفاده شد. در بررسی که توسط موراسه^۵ و همکاران صورت گرفت، بیان که Real time PCR روش روتین تشخیص BKV در نمونه‌های سرم و ادرار می‌باشد و می‌تواند در تشخیص BKV خارج و داخل بیوپسی‌های پیوند کلیه به خصوص در موارد غیرقطعی مفید و حساس باشد [۱۹]. همچنین در مطالعه مروری انجام شده توسط پینتو^۶ و همکاران بیان گردید؛ از آنجایی که تشخیص آنتی بادی‌های آنتی-BKV مفید نیستند و جداسازی ویروس زمان‌بر است، لذا آزمایش تشخیص مولکولی PCR یک روش برگزیده برای تشخیص همانندسازی BKV فعال در ادرار و یا خون می‌باشد [۲۰].

در بررسی‌هایی که توسط محققین جهت تشخیص سایر ویروس‌ها صورت گرفته است نیز از روش مولکولی Real time PCR استفاده گردیده است. از جمله تحقیق صورت گرفته توسط بای^۷ و همکاران جهت تشخیص Dengue Virus، تحقیق نیکلسون^۸ و همکاران در تشخیص Tilapia Lake Virus و تحقیق کوی^۹ همکاران جهت تشخیص Mink Circovirus؛ و اذعان داشته‌اند که این روش آزمایشگاهی در تشخیص ویروس‌ها به علت طبیعت کمی، حساسیت بالا، اختصاصیت، قابلیت کمیّت بندی آن و سرعت در

نمونه‌های خون فاصله زمانی قبل از پیوند ۰ مورد (۰٪)، فاصله زمانی یک ماه بعد از پیوند ۱ مورد (۱/۳٪) و در فاصله زمانی چهار ماه بعد از پیوند ۱۶ مورد (۲۰/۵٪) مثبت وجود داشته است [۱۳].

همچنین در مطالعه ای که توسط هو^۱ و همکاران بر روی تشخیص و آنالیز واریانت‌های JCV در نمونه‌های ادرار بیماران دارای عفونت با HIV-1 از طریق آزمایش PCR انجام گرفت، میزان بالای عفونت با این ویروس (۶۷/۲٪) تشخیص داده شد [۱۴]. در تحقیق فتحی حقیقی و همکاران در شیراز نیز که بر روی ۲۵۰ نمونه خون اهداکنندگان، به روش Semi-nested-PCR و Real time PCR جهت تشخیص DNA دو ویروس BKV و JCV انجام شد، ۶۶ نمونه خون (۲۶/۴٪) دارای DNA ویروس BKV و ۴۵ نمونه خون (۱۸٪) دارای DNA ویروس JCV بودند، ۱۱ نمونه خون (۴/۴٪) نیز دارای DNA هر دو ویروس بودند [۱۵].

تحقیق حاضر نشان داد که تفاوت معناداری بین وجود DNA هر کدام از ویروس‌های BKV و JCV به‌تنهایی و یا به صورت همزمان در نمونه‌های پلاسمای گیرندگان پیوند کلیه و جنسیت آنها وجود ندارد. همچنین در مطالعه ای که توسط نامپوری^۲ و همکاران بر روی ۴۲ نمونه خون و ادرار جهت تشخیص BKV به روش PCR در گیرندگان پیوند کلیه صورت گرفت نیز اعلام شد که تفاوت معناداری بین جنسیت بیماران و شیوع ویروس BKV وجود ندارد [۱۶]. همینطور در تحقیقی که توسط لوپز^۳ و همکاران در ۱۸۶ نمونه ادرار گیرندگان پیوند کلیه به روش PCR جهت تشخیص ویروس‌های BKV و JCV [۱۷] و تحقیق دیگری که توسط ساوند^۴ و همکاران بر روی ۳۰ نمونه ادرار و خون بیماران پیوند کلیه بر اساس روش Quantitative Real-time Multiplex

⁵ Morace

⁶ Pinto

⁷ Bai

⁸ Nicholson

⁹ Cui

¹ Hu

² Nampoory

³ Lopez

⁴ Saundh

بیان نتیجه آزمایش، سودمند است و می‌تواند ابزار مفیدی جهت مدیریت بیماری‌ها و مطالعات اپیدمیولوژیک باشد [۲۱-۲۳].

Real time PCR یک ابزار در تشخیص کلینیکی به جهت تهیه نتایج کمی از اسید نوکلئیک ویروس مدنظر موجود در نمونه کلینیکی تهیه می‌نماید. نتایج کمی تعیین اسید نوکلئیک ویروس مورد نظر در یک نمونه بطور مثال نمونه خون ممکن است برای ارزیابی رابطه بین مقدار ویروس مورد نظر و پیش‌بینی پیشرفت عفونت به سمت بیماری کلینیکی کاربرد داشته باشد. نتایج تست کمی برای اسید نوکلئیک مورد نظر مخصوصاً با سری نمونه‌های بیماران پیوندی جهت بررسی عفونت با علائم گسترش یافته و یا برای ارزیابی کارآیی درمان آنتی‌ویرال مربوط می‌شود. راندهاوا^۱ و همکاران آزمایش Real time PCR را جهت تشخیص کمی BKV DNA در بیماران پیوند کلیه انجام دادند. تعداد ژنوم ویروس در نمونه‌های ادرار، پلاسما و بیوپسی کلیه در این شرایط اندازه‌گیری نمودند. حالت اول: بیماران با داشتن BKV در ادرار ولی بدون علائم آن. حالت دوم: بیماران با کلیه پیوندی دچار نفروپاتی و BKV فعال. عموماً میزان ویروس در بیماران مربوط به حالت اول، پائین‌تر است ولی بعضی مواقع این میزان ویروس، با مقدار ویروسی که بطور مشخص در بیماران دچار نفریتیس مرتبط با BKV دیده می‌شود، مطابقت می‌کند. نفروپاتی با BKV فعال مرتبط با سطوح کمی از BKV DNA به مقدار 10^3 copy/ml در نمونه پلاسما بوده است و همه آن‌ها در سطوح بالاتر از 10^7 copy/ml BKV DNA را در ادرار داشتند. همچنین رخداد هموراژیک سیستیس در بیماران پیوند مغز استخوان، مرتبط با سطوح بیشتر از 10^4 copy/ml BKV DNA در ادرار بوده است. همچنین چهار بیمار دارای نفروپاتی مرتبط با BKV حاد، بیشتر از 10^5 copy/ml BKV DNA را دارا بودند. لازم به

ذکر است که مقادیر BKV DNA در ادرار و خون می‌تواند بطور مستقیم مرتبط با بیماری در عضو پیوندی نباشد و ممکن است بیانگر بازفعال شدن ویروس در بافت‌های مختلف در طول مهار ایمنی باشد [۲۴].

تحقیق انجام شده توسط موراسه و همکاران با بکارگیری روش Real time PCR جهت تشخیص BKV [۱۹] و مطالعه مروری صورت گرفته توسط پینتو و همکاران در مورد تشخیص BKV با استفاده از روش PCR، بر روی هر دو نوع نمونه‌های ادرار و خون بیماران بوده است [۲۰]: اما در تحقیق حاضر فقط از نمونه‌های پلاسما استفاده شد زیرا تشخیص ویروس در ادرار زمانی مناسب است که خطر ایجاد نفروپاتی مرتبط با دو ویروس BKV و JCV پائین باشد و راه تشخیص سریع‌تر و دقیق‌تر مقادیر ژنوم ویروس، استفاده از نمونه پلاسما است، بطوری‌که ۱۶ تا ۳۳ هفته قبل از ایجاد نفروپاتی، ژنوم ویروس قابل تشخیص در نمونه‌های پلاسما است.

از محدودیت‌های تحقیق می‌توان به گران بودن کیت استخراج ژنوم QIAamp® DNA mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) در مقایسه با سایر کیت‌ها اشاره نمود. ضمناً نمونه‌های پلاسما گیرندگان پیوند کلیه که در این تحقیق جهت بررسی ژنوم دو ویروس BKV و JCV انتخاب گردیدند از نظر زمانی در دوره پایانی بعد از عفونت قرار داشتند، لذا بررسی عفونت نمونه‌های پلاسما گیرندگان پیوند کلیه که از نظر دوره زمانی ابتدا به عفونت در دوره‌های اولیه و میانی بعد از پیوند قرار دارند و مقایسه نتایج آن‌ها با نتایج تحقیق حاضر مطلوب به نظر می‌رسد.

با توجه به اینکه تشخیص سریع میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا جهت مدیریت موثر بیمار بسیار مورد نیاز است و از آنجائی‌که تکنیک‌های مولکولی از جمله Real time PCR برای تشخیص اسیدهای نوکلئیک گسترش

¹ Randhawa

یافته‌اند، لذا استفاده از این تکنیک‌های مولکولی در آزمایشگاه‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

به‌موقع ویروس جهت جلوگیری از ایجاد بیماری و متعاقباً رد پیوند، بسیار حائز اهمیت است.

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد Real time PCR روشی کمی و کیفی است که قادر به تشخیص ژنوم انواع ارگانیزمها و مقادیر آن (حتی به مقدار بسیار کم) می‌باشد و ضمناً نسبت به سایر تکنیک‌های مولکولی قابل دسترس‌تر می‌باشد و از حساسیت و اختصاصیت بالا برخوردار است، لذا استفاده از آن در تشخیص

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه دکتری تخصصی رشته زیست شناسی- میکروبیولوژی زهرا عاشوری ساحلی به شماره ۲۵۳۶۷ می‌باشد که در معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج در تاریخ ۹۴/۱۱/۷ به تصویب رسیده است. از پرسنل مرکز تشخیص مولکولی دانشگاه علوم پزشکی گیلان صمیمانه قدردانی می‌گردد.

References

- 1- Culuranovic J, Ugrenovic S, Jovanovic I, Visnjic M, Stefanovic V. Viral infection in renal transplant recipients. *Sci World J.* 2012 Jan; 2012:820621.
- 2- Bansal Sh B, Kher V. Newer infections in kidney transplant recipients. *JIMSA.* 2010 Jan; 23 (1):29-35.
- 3- Vanichanan J, Udomkarnjananun S, Avihingsanon Y, Jutivorakool K. Common viral infections in kidney transplant recipients. *Kidney Res Clin Pract.* 2018 Oct; 37:323-337.
- 4- Karuthu SH, Blumberg EA. Common infections in kidney transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012 Dec; 7(12):2058-2070.
- 5- Mbianda Ch, El-Meanawy A, Sorokin A. Mechanisms of BK virus infection of renal cells and therapeutic implications. *J Clin Virol.* 2015 Oct; 71:59-62.
- 6- Laskin BL, Sullivan KE, Hester J, Goebel J, Davies SM, Jodele S. Antibodies to BK virus in children prior to allogeneic hematopoietic cell transplant. *Pediatr. Blood Cancer.* 2015 Sep; 62(9):1670-1673.
- 7- Pinto GG, Tesser Poloni JA, Paskulin DD, Spuldaro F, de Paris F, Barth AL, et al. Quantitative detection of BK virus in kidney transplant recipients: a prospective validation study. *Braz. J. Nephrol.* 2018; 40(1):59-65.
- 8- Yang Yu, Yu Bo, Chen Y. Blood disorders typically associated with renal transplantation. *Front. Cell Dev. Biol.* 2015 Mar; 3(18):1-12.
- 9- Masutani K. Viral infections directly involved in kidney allograft function. *APSN.* 2018 Jul; 23(2):31-37.
- 10- Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology.* 2009 Feb; 384(2):266-273.
- 11- Delbue S, Ferraresso M, Ghio L, Caloni C, Carlucio S, Belingheri M, et al. A review on JC virus infection in kidney transplant recipients. *Clin Dev Immunol.* 2013 Jan; 2013:926391.
- 12- Boguszewska A, Wos M, Jarzynski A, Polz-Dacewicz M. Frequency of JC virus appearance in the urine of post-transplantation patients. *Curr Issues Pharm Med Sci.* 2018 Mar; 31(2):53-56.
- 13- Samarbaf-Zadeh AR, Makvandi M, Kayedani Gh, Shahbazian H, Poorfarziani V, Yaghoobi R, et al. Prevalence BK virus in renal allograft recipients pre and post transplantation in Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2009 June; 2(2): 47-52.
- 14- Hu C, Huang Y, Su J, Wang M, Zhou Q, Zhu B. Detection and analysis of variants of JC polyomavirus in urine samples from HIV-1-infected patients in China's Zhejiang Province. *JIMR.* 2018 Mar; 46(3): 1024-1032.

- 15- Fathi Haghghi M, Seyyedi N, Farhadi A, Zare F, Kasraian L, Refiei Dehbibi Gh R, et al. Polyomaviruses BK and JC infection in peripheral blood cells from blood donors. *Braz J Infect Dis.* 2019 Jan; 23(1):22-26.
- 16- Nampoory MR, Johny KV, Pacsa A, Nair PM, Said T, Halim MA, et al. BK virus nephropathy in renal transplant recipients in Kuwait: a preliminary report. *Transplant Proc.* 2005 Sep; 37(7):3048-3050.
- 17- Lopez V, Gutierrez C, Sola E, Garcia I, Burgos D, Cabello M, et al. Does JC polyomavirus cause nephropathy in renal transplant patients? *Transplant Proc.* 2010 Oct; 42(8):2889-2891.
- 18- Saundh B, Tibble S, Baker R, Sasnauskas K, Harris M, Hale A. Different patterns of BKV and JCV polyomavirus reactivation following renal transplantation. *J Clin Pathol.* 2010; 63: 714-718.
- 19- Morace R, Kumar T, Tantisattamo E, Gibson J, Britton S, Li W, et al. Feasibility of BK Virus Real-Time PCR testing in renal graft biopsies with negative SV40 staining. *Transplant Proc.* 2017 Jul; 49(6):1294-1300.
- 20- Pinto M, Dobson S. BK and JC virus: a review. *J Infect.* 2014 Jan; 68(1):2-8.
- 21- Bai Zh, Liu L, Tu Z, Yao L, Liu J, Xu B, et al. Real-time PCR for detecting circulating dengue virus in the Guangdong Province of China in 2006 Aug. *J Med Microbiol.* 2008; 57(10):1547-1552.
- 22- Nicholson P, Rawiwan P, Surachetpung W. Detection of Tilapia Lake Virus using conventional RT-PCR and SYBR green RT-q PCR. *J Vis Exp.* 2018 Nov;10(141):1-15.
- 23- Cui , Shi Y, Zhao L, Gu Sh, Wei Ch, Yang Y, et al. Application of real-time quantitative PCR to detect mink circovirus in naturally and experimentally infected minks. *Front Microbiol.* 2018 May;9(937):1-8.
- 24- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan; 19(1): 165-256.