Journal of Research in Urology
www.urology.umsha.ac.ir | Original Article

Prevalence of Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 Infections in Renal Transplant Recipients and Their Renal Function

Ali Farhadi*[1], Abbas Behzad Behbahani[2], RaminYaghobi[3], Mehdi Salehipour[4]

1. *Assistant professor of Medical Virology, Department of Medical Laboratory Sciences, School of Paramedical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.*
2. *Professor of Medical Virology, Diagnosis Laboratory Sciences and Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.*
3. *Associate professor of Medical Virology, Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.*
4. *Associate professor of Urology, Department of urology, Shiraz university medical sciences, Shiraz, Iran*

Article Information

Article History

Received: 2019/11/25
Accepted: 2020/05/07
Available Online: 2020/05/24

JUR 2019; 3(2):41-48

DOI: 10.30699/jru.3.2.40

Use your device to scan and read the article online

Corresponding Author
Ali Farhadi
Associate professor of Urology, Department of urology, Shiraz university medical sciences, Shiraz, Iran

Tel: 071 - 32270301
Email:
farhadi_a@sums.ac.ir

Abstract

Background & Objective: Viral infections are a major problem for transplant recipients. Reactivation of viruses is associated with the use of strong immunosuppressive drugs. Herpes simplex virus infections in renal transplant patients may become severe without treatment. Although the prevalence and role of herpes simplex viruses 1 and 2 in bone marrow and lung recipients are well known; however, the prevalence of the virus from the time of transplantation to the one-year period after transplantation is vague. The aim of this study was to investigate the prevalence of herpes simplex virus infections and renal function after transplantation.

Methods: In a prospective single-center study we followed 58 renal transplant recipients who received a living or cadaveric kidney transplant at Namazi hospital. Samples were taken from each individual 1 week before transplantation and 2 weeks post-transplantation. The patients were then sampled every 4 weeks up to 52 weeks after transplantation. Urine and blood samples were also collected from 37 organ donors. We investigated the presence of HSV-DNA in the urine and peripheral blood samples of renal transplant recipients using PCR-RFLP. The presence of viral DNA in the urine and peripheral blood samples of living donors were investigated as well. The patients were also examined for any signs or symptoms of renal dysfunction.

Results: HSV-1 DNA was detected in urine samples of only 19% of transplant patients. HSV-2 DNA, however, was not detected in any group of subjects including renal transplant recipients. A significant association was observed between HSV-1 infection among kidney recipients and donors (P=0.002).

Conclusions: Although there was no significant association between HSV-1 infection and renal dysfunction in renal transplant recipients, however, due to life-threatening infections caused by this virus, periodic testing for the presence of HSV-1 is recommended.

Keywords: HSV 1 and 2, Renal Transplant Recipients, PCR-RFLP

How to cite this article:
Farhadi A, Behzad Behbahani A, Yaghobi R, Salehipour M. Prevalence of herpes simplex virus type 1 and 2 infections in renal transplant recipients and their renal function. J Res Urol. 2019; 3 (2) :

Copyright © 2019 Iranian Journal of Research in Urology. All rights reserved

دوفصلنامهٔ علمی پژوهشی تحقیقات در اورولوژی
پاییز و زمستان ۱۳۹۸
2019;3(2):41-48
www.urology.umsha.ac.ir
مقاله پژوهشی

بررسی شیوع عفونت ویروس‌های هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و ۲ در دریافت‌کنندگان کلیهٔ پیوندی و میزان عملکرد کلیوی آنان

علی فرهادی[۱*]، عباس بهزاد بهبهانی[۲]، رامین یعقوبی[۳]، مهدی صالحی‌پور[۴]

۱. استادیار، گروه علوم‌آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علومپزشکی شیراز، ایران
۲. استاد، مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی، دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز، ایران
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا، دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز، ایران
۴. دانشیار، گروه ارولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله
دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۰۴
پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۸
انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۳/۰۴

JUR 2019; 3(2):41-48

برای دانلود این مقاله، کد زیر را با موبایل خود اسکن کنید.

چکیده

زمینه و هدف: در بیمارانی که عمل پیوند عضو انجام داده‌اند، به دلیل استفاده از داروهای سرکوب‌کنندهٔ ایمنی زمینهٔ مناسبی برای تکثیر میکروارگانیسم‌های فرصتطلب ایجاد می‌شود. با اینکه شیوع و نقش ویروس‌های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ در دریافت‌کنندگان مغز استخوان و ریه به‌خوبی شناخته شده است ولی میزان شیوع ویروس از زمان پیوند تا دورهٔ یک‌ساله پس از دریافت کلیهٔ پیوندی ناشناخته است. در این مطالعه شیوع عفونت با ویروس‌های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ در دریافتکنندهٔ پیوند کلیه را بررسی کردیم و عملکرد کلیهٔ پیوندی در طول دوره را سنجیدیم.

مواد و روش‌ها: این پژوهش طی یک دورهٔ یک‌ساله روی نمونه‌های خون کامل و ادرار ۵۸ دریافتکنندهٔ پیوند کلیه و همچنین ۳۷ نفر از اهداکنندگان آنان به‌عنوان گروه کنترل انجام شد. پس از ارزیابی آزمایشگاهیِ بیماران در هر دوره، نمونه‌ها جمع‌آوری و DNA آنها استخراج شد. آزمایش PCR-RFLP برای تشخیص و افتراق HSV-۱ و HSV-۲ و همچنین آزمایش تعیین توالی برای اثبات حضور DNA ویروسی در نمونه‌های موردمطالعه انجام شد.

یافته‌ها: DNA ویروس HSV-۱ در نمونهٔ ادرار ۱۱ نفر (۱۹ درصد) و در نمونهٔ خون محیطی ۲۷ نفر از ۵۸ بیمار (۴۶/۶ درصد) در طول دورهٔ پیگیری شناسایی شد. نتایج آماری نشان از وجود اختلاف معنی‌دار در شیوع HSV-۱ در جمعیت دریافت‌کنندگان پیوند در مقایسه با گروه کنترل دارد (P=۰/۰۲).

نتیجه‌گیری: انجام آزمایش ملکولی دوره‌ای برای تشخیص HSV در بیماران پیوندی به‌ویژه پس از گذشت ۶ ماه از دریافت کلیهٔ پیوندی برای اتخاذ تصمیم‌های صحیح درمانی برای دریافت پروفلاکسی ضدویروسی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ویروس هرپس سیمپلکس انسانی تیپ ۱ و ۲، دریافت‌کنندگان پیوند کلیه، PCR-RFLP

نویسندهٔ مسئول: علی فرهادی، استادیار، گروه علوم‌آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علومپزشکی شیراز، ایران

تلفن : ۰۷۱-۳۲۲۷۰۳۰۱ **ایمیل:** farhadi_a@sums.ac.ir

مقدمه

هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ [1]دو ویروس از خانوادهٔ هرپس ویریدهٔ انسانی هستند که اکثر جوامع انسانی را آلوده می‌کنند [۱]. پس از عفونت اولیه، این ویروس‌ها به‌طور نهفته درون سلول‌های عصبی باقی می‌مانند ولی در طول این مدت همچنان می‌توانند به افراد دیگر انتقال یابند [۲]. فعالشدن دوبارهٔ این ویروسها می‌تواند در نتیجهٔ عوامل محیطی مختلفی نظیر استرس‌های فیزیکی و روحی اتفاق بیفتد. در نتیجهٔ این عوامل، ویروس مجدداً شروع به تکثیر در سلول‌های اپیتلیال کرده و عوارض پوستی و مخاطی ایجاد می‌کند [۳].

حدود ۶۷ درصد از جمعیت زیر ۵۰ سال در جهان (۳۷۰۹ میلیون نفر) به عفونت HSV-۱ مبتلا هستند که در این میان، بیشترین شیوع مربوط به آفریقا و آسیای جنوب‌شرقی است [۴]. عفونت HSV-۱ معمولاً نواحی اطراف و روی لب را درگیر کرده و موجب ایجاد تبخال‌هایی در این نواحی می‌شود [۵]. این ویروس همچنین می‌تواند نواحی تناسلی را آلوده کند [۶]. در سال ۲۰۱۲، ۴۱۷ میلیون نفر با سنین بین ۱۵ تا ۴۹ سال در سراسر جهان به HSV-۲ مبتلا بوده‌اند (۱۱/۳ درصد) که در این میان، ۲۶۷ میلیون نفر را زنان تشکیل می‌داده‌اند [۷]. این ویروس ازطریق روابط جنسی به‌خوبی انتقال می‌یابد و عفونت دائمی ایجاد می‌کند که قابل حذف‌شدن نیست [۸].

در بیمارانی که عمل پیوند عضو انجام داده‌اند، به‌دلیلِ استفاده از داروهای سرکوب‌کنندهٔ ایمنی، زمینهٔ مناسبی برای تکثیر و فعالیت ارگانیسم‌های فرصت‌طلب به‌ویژه ویروس‌ها ایجاد می‌شود [۹]. ریسک ابتلا به عفونت‌های ویروسی بعد از پیوند به عوامل مختلفی همچون قدرت بیماری‌زایی ویروس، نوع داروهای سرکوب‌کنندهٔ ایمنی که به بیمار تجویز می‌شود و اینکه آیا از قبل ایمنی علیه ویروس وجود دارد یا نه، بستگی دارد [۱۰]. عفونت‌های ویروسی می‌توانند آثار مختلفی در بیماران دریافت‌کنندهٔ پیوند بر جای بگذارند که می‌توان آن‌ها را به دو دستهٔ آثار مستقیم و غیرمستقیم تقسیم کرد. آثار مستقیم عفونت ویروسی شامل آثار تهاجمی ویروس ازقبیل آسیب‌های سلولی و بافتی می‌شوند. آثار غیرمستقیم عفونت ویروسی درواقع تأثیراتی هستند که در نتیجهٔ پاسخ سیستم‌ایمنی به عفونت ویروسی ایجاد می‌شوند. آزادشدن سیتوکینها، کموکین‌ها و فاکتورهای رشد نمونه‌هایی از این پاسخ‌ها هستند [۱۱].

بسیاری از ویروس‌ها ازجمله ویروس‌های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ اثرات تنظیم‌کنندهٔ سیستم‌ایمنی دارند که از آن برای فرار از سیستم‌ایمنی و بقای خود استفاده می‌کنند [۱۲]. آلودگی با چنین ویروس‌هایی بعد از پیوند می‌تواند منجر به سرکوب مضاعف سیستم‌ایمنی و افزایش احتمال ابتلا به سایر عفونت‌های فرصت‌طلب شود [۱۳، ۱۴]. به‌علاوه، عفونت ویروسی می‌تواند بیان آنتیژن‌های سطحی از قبیل آنتی‌ژن‌های اصلی سازگاری بافتی[2] را تغییر دهد و از این طریق ممکن است به رد پیوند کمک کند [۱۱]. از طرف دیگر، افزایش تکثیر و پایداری ویروس ممکن است به آسیب به آلوگرافت و فیبروز آن و درنتیجه رد پیون مزمن کمک کند [۱۵].

روشن نیست که عفونت با HSV-۱ و HSV-۲ چه تأثیری بر نتیجهٔ پیوند کلیه دارد. از این رو، در این مطالعه شیوع عفونت با HSV-۱ و HSV-۲ با روش RFLP-PCR در بیماران پیوند کلیه بررسی شد و تأثیر عفونت‌های ناشی از فعالیت این ویروس‌ها در عملکرد کلیهٔ بیمارانِ دریافتکنندهٔ پیوند کلیه مورد سنجش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمعیت موردمطالعه

این پژوهش به‌طور مقطعی روی ۵۸ دریافت‌کنندهٔ پیوند کلیه که در یک دورهٔ یک‌ساله در بیمارستان نمازی شیراز تحت عمل پیوند کلیه قرار گرفته بودند و همچنین ۳۷ نفر از اهداکنندگان آنان به‌عنوان گروه کنترل و نیز برای تعیین وضعیت اهداکنندگان ازنظر آلودگی با ویروس‌های HSV-۱ و HSV-۲ انجام شد. این مطالعه در کمیتهٔ اخلاق دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز مورد بررسی و با کد اخلاق IR.SUMS. REC.1394.S1145 تصویب گردید. دریافت‌کنندگان عضو در این مطالعه ۳۱ نفر مرد (۵۳/۵ درصد) و ۲۷ نفر زن (۴۶/۵ درصد) بودند. میانگین سنی بیماران ۳۲/۷ سال بوده و همهٔ بیماران سنین بین ۵ تا ۵۵ سال داشتند معیارهای ورود به مطالعه؛ کلیه ی بیمارانی که تحت نخستین پیوند کلیه قرار خواهند گرفت و معیارهای خروج از مطالعه؛ بیمارانی که پیوند همزمان چند عضو دارند و یا در سه ماه قبل از عمل تحت درمان با هرگونه داروی ضد ویروسی قرار گرفته باشند.

نمونه‌گیری

براساس سوابق پزشکی، همهٔ بیماران دریافت‌کنندهٔ پیوند کلیه و همچنین افراد اهداکنندهٔ کلیه ازنظر وجود آنتی‌بادی ضدویروس هپاتیت C (anti-HCV) و ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) و وجود آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B (HBsAg) منفی بودند. از همهٔ دریافت‌کنندگان پیوند یک نمونهٔ ادرار و خون محیطی، یک هفته قبل و دو هفته بعد از جراحی جمع‌آوری شد و بعد از آن هر ۴ هفته یک نمونهٔ خون و یک نمونهٔ ادرار تا هفتهٔ ۵۲ از این بیماران گرفته شد. به‌علاوه، از گروه اهداکنندگان نیز فقط یک نمونهٔ ادرار و خون محیطی یک هفته قبل از عمل جراحی دریافت شد. همهٔ افراد شرکت‌کننده در این مطالعه با تکمیل و امضا فرم رضایتنامه، آمادگی کتبی خود را برای حضور در مطالعه اعلام کردند.

ارزیابی آزمایشگاهی بیماران

سطح کراتینین سرم (Cr) و نیتروژن اورهٔ خون (BUN) با دستگاه‌های استاندارد اتوآنالایزر بیوشیمی (Abbott 300, model Alcyon. USA)، یک هفته قبل، دو هفته بعد و سپس هر ۴ هفته بعد از عمل جراحی اندازه‌گیری شد و تا هفتهٔ ۵۲ ادامه یافت. نتایج تعیین سطح سیکلوسپورین A که به‌طور دوره‌ای با روش رادیوایمینواسی (RIA) برای تمامی

1. Herpes simplex virus =HSV
2. Major Histocompatibility Complex = MHC

دریافت‌کنندگان پیوند انجام و گزارش می‌شود نیز از پروندهٔ بیماران استخراج و در تحلیل داده‌های حاصل از این طرح استفاده شد.

انتخاب و بررسی پرایمرها

در این مطالعه از پرایمرهایی استفاده شد که اولینبار Klapper و همکارانش طراحی کردند [۱۶]. این پرایمرها از حساسیت و اختصاصیت بالا و امکان استفاده از آنزیم‌های محدودکننده[1] برای افتراق HSV-۱ و HSV-۲ برخوردار هستند. پرایمرهای مذکور با هدف قراردادن ژن تیمیدین‌کیناز ژنوم HSV-۱ و HSV-۲ سبب تکثیر این قطعهٔ ژنی و جداسازی همزمان HSV-۱و HSV-۲ می‌شوند. توالی پرایمرها با بررسی در وبسایت NCBI[2] بازنگری مجدد شدند و صحت همخوانی آنها با توالی‌های ثبت‌شده برای ژنوم هر دو ویروس HSV-۱ و HSV-۲ تأیید شد (جدول ۱).

استخراج DNA و بررسی مقادیر کمی و کیفی آن

استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل با کیت CinnaPure DNA (شرکت سیناکلون، ایران) انجام شد. نمونه‌های ادرار به روش پلی‌اتیلن گلیکول (شرکت SIGMA، آمریکا) و Nonidet P40 (شرکت Merck، آلمان) براساس روشی که قبلاً منتشر شده است با اندکی تغییر انجام شد [۱۷]. به‌طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از ادرار بیمار با حجم برابر از محلول حاوی ۳۰ درصد پلی‌اتیلن گلیکول ۸هزار و NaCl دو مولار مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شد. سپس در دور ۱۴هزار rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ C° سانتریفیوژ شد. روی رسوب حاصل، ۲۰ میکرولیتر از ترکیب Tris-HCl ده میلی‌مولار و Nonidet P40 نیم‌درصد اضافه شد و مخلوط حاصل در دمای ۲۰- C° برای بررسی بیشتر نگهداری شد.

پس از تهیه و آماده‌سازی ژل آگارز ۱٫۵ درصد (شرکت سیناژن، ایران)، محصولات واکنش در کنار نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت بازی (شرکت سیناژن، ایران) داخل چاهک‌های ژل ریخته شدند و پس از الکتروفورز و رنگآمیزی اتیدیوم بروماید نتایج بررسی شد.

1. Restriction Enzyme
2. http://www. blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html

تعیین غلظت DNA با دستگاه نانودراپ (شرکت Thermo Fisher Scientific، آمریکا) در طول موج ۲۶۰ نانومتر و همچنین نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر برای تعیین خلوص آن برای تمامی نمونه‌ها انجام بافت. همچنین برای تأیید کیفیتِ DNA استخراج‌شده، از پرایمرهای بتاگلوبین (PCO3/ PCO4) که توالی آنها در جدول ۱ آورده شده است استفاده شد [۱۸].

واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR[3])

برای تکثیر ژن بتاگلوبین پس از مخلوطکردن واکنشگرهای PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (شرکت امپلیکون، دانمارک)، ۷/۵ میکرولیتر آب‌مقطر دیونیزه، ۱/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (غلظت ۱۰ پیکومول) و ۲ میکرولیتر DNA تخلیص‌شده، در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. برنامهٔ دمایی PCR با ۳۵ سیکل حرارتی شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۴ C° به مدت ۳ دقیقه، واسرشت در دمای ۹۴ C° به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۵ C° به مدت ۴۵ ثانیه، و تکثیر در دمای ۷۲ C° به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ C° به مدت ۵ دقیقه اعمال شد.

همچنین برای تکثیر ژن تیمیدین‌کیناز ژنوم HSV-۱ و HSV-۲ در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (شرکت امپلیکون، دانمارک)، ۵/۵ میکرولیتر آب‌مقطر دیونیزه، ۲/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (غلظت ۱۰ پیکومول) و ۲ میکرولیتر DNA تخلیص‌شده مخلوط شد و در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. برنامهٔ دمایی PCR با ۴۰ سیکل حرارتی مطابق با شرایط ذکرشده در بالا با این تفاوت که دمای اتصال پرایمرها در دمای ۵۲ C° صورت پذیرفت.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورداستفاده برای تکثیر نواحی ژنی بتاگلوبین انسانی و تیمیدین‌کیناز HSV-۱ و HSV-۲

منبع	قطعه (جفت بازی)	ژن هدف	پرایمر	نام پرایمر
۱۸	۱۱۰	بتاگلوبین	F: 5′ ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3′	pCO3
			R: 5′ CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3′	pCO4
۱۶	۳۵۱	تیمیدین‌کیناز	F: 5′ CGCGCGGTACCTTATGGGCAGCATGA 3′	TK1
			R: 5′ CAGGGTAAATAACGTGTCCCCGATATGG 3′	TK2

افتراق ویروس‌های HSV-۱ و HSV-۲ با روش واکنش هضم آنزیمی (RFLP[4])

انجام PCR روی هرپس سیمپلکس ویروس‌ها سبب تکثیر قطعه‌ایِ ۳۵۱ جفت بازی از ژن تیمیدین‌کیناز می‌شود که

3.Polymerase Chain Reaction
4. Restriction Fragment Length Polymorphism

محصول آن برای HSV-۱ دارای یک توالی قابل‌شناسایی برای آنزیم AvaII (شرکت Roche، آلمان) و تولید دو قطعه ۱۸۸ و ۱۶۳جفت بازی و برای HSV-۲ دارای یک توالی قابلشناسایی برای آنزیم AvaI (شرکت Roche، آلمان) و تولید دو قطعه ۲۵۶ و ۹۵ جفت بازی است. بدین ترتیب امکان افتراق این دو ویروس به کمک هضم آنزیمی RFLP فراهم شده است. برای هضم آنزیمی، ۹ میکرولیتر از محصول PCR که برای وجود ویروس مثبت گزارش شده است به همراه ۱ واحد آنزیم AvaI و یا AvaII و نیز ۱ میکرولیتر بافر به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ C° گرمخانه‌گذاری شد و پس از آن EDTA نیم‌مولار با pH =۸ در حجم نهایی ۱۰ میلی مولار به میکروتیوب اضافه شد. تمامی محصول واکنش، مطابق مرحله قبلی در ژل اگاروز دو درصد به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز و سپس با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید، نتایج بررسی شدند. محصولات PCR که توسط هیچ‌کدام از آنزیم‌های AvaI و یا AvaII مورد هضم آنزیمی قرار نگرفتند، پس از برش از ژل آگارز با کیت GF-1 PCR Clean-Up (شرکت Vivantis، مالزی) مطابق با روش توصیه‌شدهٔ شرکت سازنده، تخلیص شدند و برای تأیید و شناسایی تیپ ویروسی‌شان آزمایش تعیین توالی (شرکت SEQLAB، آلمان) روی آنها انجام شد.

روش‌های تحلیل آماری

برای انجام بررسی‌های آماری از نرمافزار SPSS ویرایش ۱۶ (SPSS Inc., Chicago, III., USA)، برای مقایسهٔ میانگین گروه‌ها از آزمون آماری تی‌تست، و برای تعیین ارتباط میزان شیوع ویروس در دو گروه موردمطالعه از آزمون کای دوی پیرسون استفاده شد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

شناسایی HSV-۱ و HSV-۲ در گروه‌های موردمطالعه

DNA ویروس HSV-۱ در نمونهٔ ادرارِ ۱۱ نفر از ۵۸ نفر بیمار (۱۹ درصد) و در نمونهٔ خون محیطی ۲۷ نفر از ۵۸ بیمار (۴۶,۶ درصد) در طول دورهٔ پیگیری شناسایی شد. همهٔ ۱۱ نمونهٔ ادرار متعلق به بیمارانی بودند که در نمونهٔ خون محیطی آنان نیز ویروس شناسایی شد. DNA ویروس HSV-۲ در هیچ‌کدام از نمونه‌های ادرار و خون محیطی بیماران پیوند کلیه شناسایی نشد. همچنین در افراد اهداکننده، DNA ویروس HSV-۱ در نمونهٔ ادرار هیچ‌کدام از ۳۷ نفر شناسایی نشد اما در نمونهٔ خون محیطی ۶ نفر از ۳۷ نفر اهداکنندهٔ کلیه (۱۶/۲ درصد) شناسایی شد. نتایج آماری نشان از وجود اختلاف معنی‌دار در شیوع HSV-۱ در جمعیت دریافت‌کنندگان پیوند در مقایسه با گروه کنترل دارد (P =۰/۰۲). نکتهٔ دیگر آنکه شناسایی ویروس در نمونهٔ ادرار بیماران در ۶ ماههٔ دوم پس از پیوند، اختلاف معنی‌داری در مقایسه با ۶ ماهه اول داشت (P =۰/۰۱)، بدین معنی که DNA ویروس HSV-۱ در نمونه‌های ۱۰ نفر از ۱۱ (۹۱ درصد) بیمار بعد از ماه ششم پس از دریافت عضو پیوندی قابلشناسایی بود. به قابل ذکر آنکه DNA ویروس HSV-۲ در هیچ‌کدام از نمونه‌های ادرار و خون محیطی اهداکنندگان کلیه شناسایی نشد. شکل شماره ۱ عملکرد آنزیم‌های AvaI و AvaII بر روی محصولات آزمایش PCR را نشان می دهد.

شناسایی جهش‌های شناسایی‌شده در ژن تیمیدین کیناز HSV

از میان ۲۷ نمونهٔ مثبت متعلق به گروه بیماران، ۸ بیمار (۲۹/۶ درصد) متعلق به مواردی بودند که پس از بررسی با روش RFLP توسط هیچ‌کدام از آنزیم‌های برشگر هضم نشدند. پس از مطابقت توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژن، با نرم‌افزار BLAST [1] مشخص شد که تمامی نمونه‌ها HSV با ژنوتیپ ۱ دارند که دارای موتاسیون‌های متعدد در سرتاسر توالی‌های تکثیرشده و ازجمله در جایگاه برش آنزیم AvaII (´GGACC 3 ´5) هستند که در آنان باز تیمیدین (T) جایگزین گوانین (G) و تبدیل جایگاه عمل آنزیم به صورت ´TGACC 3 ´5 شده بود. نکتهٔ جالب آنکه تمامی این نمونه‌ها متعلق به بیمارانی بودند که حداقل ۶ ماه از از زمان دریافت عضو پیوندی توسط آنان سپری شده بود.

ارتباط میانگین سطح BUN، کراتینین سرم (Cr) و سیکلوسپورین A با حضور ویروس‌های HSV-۱ و HSV-۲

بیماران گیرندهٔ پیوند براساس مثبت یا منفی بودن عفونت HSV-۱ به دو گروه تقسیم شدند. در این دو گروه از سطح کراتینین سرم و نیتروژن اورهٔ خون (BUN) به‌عنوان شاخصه‌هایی برای تشخیص اختلال در عملکرد کلیه استفاده شد. سپس میانگین‌های سطح BUN و کراتینین سرم در این دو گروه با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج بررسی‌های آماری نشان داد ارتباط معنی‌داری میان سطح BUN و حضور HSV-1-DNA در نمونه‌های ادرار (P =۰/۶۳۸) و خون محیطی (P =۰/۷۹۷) وجود ندارد. همچنین، ارتباط معنی‌داری میان سطح کراتینین سرم و حضور HSV-1-DNA در نمونه‌های ادرار (P =۰/۲۰۶) و خون محیطی (P =۰/۴۳۶) مشاهده نشد. باتوجه‌به اینکه دوز سایکلوسپورین A در بیماران براساس میزان کراتنین سرم تعیین می‌شود، به‌طور متوسط بیماران میانگین دوز ۰/۳۶ ± ۵/۱ به‌ازای هر کیلوگرم از وزن دریافت می‌کردند. باتوجه‌به اینکه بالاترین غلظت دارو در سرم بیماران ۱/۵ ساعت بعد از مصرف دارو است، بنابراین آزمایش تعیین سطح دارو دقیقاً در این فاصلهٔ زمانی انجام شد. میانگین سطح دارو در سرم بیماران ۴۹۵/۹ ± ۵۱/۱ تعیین شد. مطالعات آماری، تفاوت معناداری را ازنظر وجود ویروس در نمونهٔ خون یا ادرار بیماران با سطوح مختلف دارو در سرم دریافت‌کنندگان پیوند تأیید نکرد. ازآنجاکه هیچ‌یک از بیماران دریافت‌کنندهٔ پیوند ازنظر عفونت ویروسی HSV-۲ مثبت نبودند، امکان بررسی تأثیر عفونت HSV-۲ بر عملکرد کلیه پس از پیوند وجود نداشت.

1. http://www. blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html

شکل ۱: عملکرد آنزیم‌های AvaI و AvaII بر محصولات آزمایش PCR، شماره ۱ : محصول PCR روی کنترل مثبت HSV-۱ بدون تیمار آنزیمی، شماره ۲: محصول PCR روی کنترل مثبت HSV-۱ با تیمار آنزیم AvaI، شماره ۳ : محصول PCR روی کنترل مثبت HSV-۱ با تیمار آنزیم AvaII، شماره ۴: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی شماره ۵: محصول PCR روی کنترل مثبت HSV-۲ بدون تیمار آنزیمی، شماره ۶: محصول PCR روی کنترل مثبت HSV-۲ با تیمار آنزیم AvaII، شماره ۷ : محصول PCR روی کنترل مثبت HSV-۲ با تیمار آنزیم AvaI

نتیجه‌گیری و بحث

عفونت با HSV در اکثر جمعیت‌های دنیا وجود داشته و آزمایشات سرواپیدمیولوژیکی نشان‌دهندهٔ این است که در بعضی جمعیت‌ها بیش نیمی از افراد، تیتر آنتی‌بادی بر علیه HSV دارند [۲۰]. عفونت اولیه با HSV در اکثر موارد بدون علائم کلینیکی است و ویروس به‌طور نهفته در سلول‌های مختلف بدن استقرار می‌یابد. فعالیت مجدد ویروس‌های نهفته توسط محرک‌های مختلفی ازقبیل تب، اشعهٔ فرابنفش، ترشح بعضی از هورمون‌ها و درمان با داروهای سرکوب‌کنندهٔ ایمنی اتفاق می‌افتد. تاکنون مطالعهٔ جامعی درارتباطبا نقش HSV در بیماران دریافت‌کنندهٔ پیوند کلیه انجام نشده است و اغلب گزارش‌ها موردی بوده است [۲۰]. ویروس هرپس سیمپلکس در بیماران دریافت‌کنندهٔ پیوند مغز استخوان حتی با تجویز داروهای ضدویروسی به صورت پروفیلاکسی، قادر به فعالیت بوده و سبب بروز بیماری‌های خطرناکی می‌شود [۲۱]. عموماً HSV-۱ در افرادی که سیستم‌ایمنی آن‌ها سرکوب شده است فعال می‌شود ولی HSV-۲ کمتر مشاهده شده است [۲۰]. این بیماران در صورتی که سرونگاتیو نیز باشند می‌توانند در معرض بیماری‌های خطرناکی مانند آنسفالیت ناشی از HSV و هپاتیت ناشی از HSV قرار گیرند [۲۲,۲۳].

در این مطالعه، افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در تعداد افرادی که پس از پیوند دچار ویرمی با HSV-۱ شده‌اند مشاهده کردیم. مقایسهٔ نتایج قبل از پیوند نشان داد HSV-۲ تنها در خون محیطی ۳ نفر (۵/۱ درصد) از ۵۸ بیمار دریافت‌کنندهٔ کلیه در هفتهٔ قبل از پیوند شناسایی شده است درحالیکه این میزان پس از پیوند به ۲۷ نفر (۴۶/۵۵ درصد) از ۵۸ نفر رسیده که افزایشی بیش از ۹ برابر داشته است. دلایل این افزایش را می‌توان استفاده از داروهای سرکوب‌کنندهٔ سیستم‌ایمنی در طول دورهٔ مطالعه در این گروه از افراد و استفاده‌نکردن از داروی آسیکلووِیر به‌عنوان پروفیلاکسی دانست. همچنین منشأ عفونت ضمن اینکه می‌تواند داخلی باشد، امکان خارجی بودن آن و انتقال از طریق کلیهٔ پیوندی یا محیط نیز وجود دارد. این افزایش در شیوع عفونت با HSV-۱ در نمونهٔ ادرارِ گیرندگان پیوند کلیه پس از پیوند نیز مشاهده می‌شود. شیوع عفونت HSV-۱ در ادرار بیماران پیوند کلیه بعد از عمل پیوند، پنج‌برابر نسبت به قبل از پیوند افزایش داشت.

با اینکه ارتباط معنی‌داری میان بروز عفونت با HSV-۱ و تغییر شاخص‌های عملکرد کلیوی نظیر سطح BUN و کراتینین سرم گیرندگان پیوند کلیه مشاهده نشد ولی درگیری مستقیم دو نفر از بیماران با HSV-۱ به صورت عفونت کانونی سبب شد یک دورهٔ کامل درمان ضدویروسی برای آنان در نظر گرفته شود. نکتهٔ قابل توجه آنکه در هشت بیمار که پس از سپری‌شدن حداقل ششماه از دریافت پیوند، HSV-۱ در نمونهٔ آنان شناسایی شد که ناحیهٔ ژنی مورد بررسی در آنان دچار جهش‌های نقطه‌ای مختلفی شده بود، به نظر می‌رسد سرکوب سیستم‌ایمنی در این گروه از بیماران می‌تواند منجر به پدیدارشدن سویه‌های نوظهوری شود. باتوجه‌به اینکه فعال‌شدن داروی ضدویروس آسیکلووِیر توسط محصول همین ناحیهٔ ژنی (تیمیدین‌کیناز) صورت می‌پذیرد، بنابراین، بررسی بروز مقاومت‌های دارویی ضدویروسی در این گروه از بیماران ضروری به نظر می‌رسد. با اینکه در چندین دههٔ گذشته از آسیکلووِیر به‌منظور پروفیلاکسی برای کنترل عفونت‌های هرپس سیمپلکس ویروس‌ها استفاده شده است و فوسکارنت به‌عنوان داروی جایگزین پیشنهاد نمی‌شود اما با انجام این تحقیق به نظر می‌رسد در صورت شناسایی سویه‌های مقاوم به آسیکلووِیر، جایگزین‌کردن فوسکارنت به‌عنوان پروفیلاکسی در این گروه از بیماران اَجتناب‌ناپذیر است.

تاکنون به ویروس HSV و به‌ویژه HSV-۱ و عفونت‌های حاصل از فعالیت آن در بیماران دریافت‌کنندهٔ کلیه توجه نشده است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد هرچند ارتباط معنی‌داری میان وجود عفونت HSV-۱ و مقادیر شاخصه‌های عملکرد کلیه نظیر BUN و کراتینین سرم در بیماران دریافت‌کنندهٔ پیوند کلیه وجود ندارد اما باتوجه‌به اینکه این ویروس می‌تواند با ایجاد عفونت‌های گوناگون و در بعضی از

موارد با ایجاد عفونت‌های سیستمیک خطرناک، فارغ از تأثیر در نحوهٔ عملکرد کلیهٔ پیوندی، به‌عنوان عامل تهدیدکنندهٔ حیات این گروه از بیماران محسوب شود، بنابراین به نظر می‌رسد انجام آزمایش ملکولی دوره‌ای برای تشخیص HSV در بیماران پیوندی به‌ویژه پس از گذشت شش‌ماه از دریافت کلیهٔ پیوندی برای اتخاذ تصمیم‌های صحیح درمانی برای دریافت پروفلاکسی ضدویروسی و همچنین انجام برای غربالگری اهداکنندگان پیوند که دارای آنتی‌بادی علیه HSV هستند (seropositive) برای بررسی انتقال احتمالی ویروس از طریق عضو پیوندی ضروری است.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از ریاست محترم سرکار خانم دکتر بیتا گرامی‌زاده و پرسنل مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضای دانشگاه علومپزشکی شیراز برای همکاری در این پژوهش تشکر می‌کنند.

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارضی در منافع وجود ندارد.

References

1. Akhtar J, Shukla D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. The FEBS Journal. 2009; 276(24):7228-36. [DOI:10.1111/j.1742-4658.2009.07402.x] [PMID] [PMCID]
2. Shukla D, Spear PG. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. Journal of Clinical Investigation. 2001; 108(4):503-10. [DOI:10.1172/JCI200113799] [PMID] [PMCID]
3. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. The lancet. 2001; 357(9267):1513-8. [DOI:10.1016/S0140-6736(00)04638-9]
4. Looker KJ, Magaret AS, May MT, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, et al. Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. PloS One. 2015; 10(10): e0140765. [DOI:10.1371/journal.pone.0140765] [PMID] [PMCID]
5. Arduino PG, Porter S. Oral and perioral herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection: review of its management. Oral Diseases. 2006; 12(3):254-7 [DOI:10.1111/j.1601-0825.2006.01202.x] [PMID]
6. Lafferty WE, Downey L, Celum C, Wald A. Herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes: impact on surveillance and prevention. Journal of Infection. 2000; 181(4):1454-7. [DOI:10.1086/315395] [PMID]
7. Looker KJ, Magaret AS, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, Newman LM. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. PloS One. 2015; 10(1): e114989. [DOI:10.1371/journal.pone.0114989] [PMID] [PMCID]
8. Johnston C, Corey L. Current concepts for genital herpes simplex virus infection: diagnostics and pathogenesis of genital tract shedding. Clinical Microbiology Reviews. 2016; 29(1):149-61. [DOI:10.1128/CMR.00043-15] [PMID] [PMCID]
9. Wilck M, Zuckerman R, Practice AIDCo. Herpes simplex virus in solid organ transplantation. American Journal of Transplantation. 2013; 13(s4):121-7. [DOI:10.1111/ajt.12105] [PMID]
10. Bernabeu-Wittel M, Naranjo M, Cisneros J, Canas E, Gentil M, Algarra G, et al. Infections in renal transplant recipients receiving mycophenolate versus azathioprine-based immunosuppression. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2002; 21(3):173-80. [DOI:10.1007/s10096-001-0684-y] [PMID]
11. Kotton CN, Fishman JA. Viral infection in the renal transplant recipient. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2005; 16(6):1758-74. [DOI:10.1681/ASN.2004121113] [PMID]
12. Sarikonda G, von Herrath MG. Immunosuppressive mechanisms during viral infectious diseases. Suppression and Regulation of Immune Responses: Springer; 2010. p. 431-47. [DOI:10.1007/978-1-60761-869-0_27] [PMID] [PMCID]
13. Ljungman P. β-Herpesvirus challenges in the transplant recipient. Journal of Infec-

tion. 2002; 186(Supplement-1): S99-S109. [DOI:10.1086/342962] [PMID]

14. Boeckh M, Nichols WG. Immunosuppressive effects of beta-herpesviruses. Herpes: The Journal of the IHMF. 2003; 10(1):12-6.

15. Babel N, Schwarzmann F, Prang N, Jaeger M, Wolf H, Kern F, et al. Association between epstein-barr virus infection and late acute transplant rejection in long-term transplant patients. Transplantation. 2001; 72(4):736-9. [DOI:10.1097/00007890-200108270-00031] [PMID]

16. Klapper PE, Cleator GM, Dennett C, Lewis AG. Diagnosis of herpes encephalitis via Southern blotting of cerebrospinal fluid DNA amplified by polymerase chain reaction. Journal of Medical Virology. 1990; 32(4):261-4. [DOI:10.1002/jmv.1890320413] [PMID]

17. Behzadbehbahani A, Klapper PE, Vallely PJ, Cleator GM. Detection of BK virus in urine by polymerase chain reaction: a comparison of DNA extraction methods. Journal of Virological Methods. 1997; 67(2):161-6. [DOI:10.1016/S0166-0934(97)00101-8]

18. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified β-globin and HLA-DQα DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature. 1986; 324(6093):163. [DOI:10.1038/324163a0] [PMID]

19. Bradley H, Markowitz LE, Gibson T, McQuillan GM. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2-United States, 1999-2010. Journal of Infection. 2013; 209(3):325-33. [DOI:10.1093/infdis/jit458] [PMID]

20. Gomez E, Melon S, De Ona M, Alvarez R, Laures A, Alvarez-Grande J. Disseminated herpes simplex virus infection in a renal transplant patient as possible cause of repeated urinary extravasations. Nephron. 1999; 82(1):59-64. [DOI:10.1159/000045368] [PMID]

21. Fillet AM. Prophylaxis of herpesvirus infections in immunocompetent and immunocompromised older patients. Drugs & Aging. 2002; 19(5):343-54. [DOI:10.2165/00002512-200219050-00003] [PMID]

22. Kusne S, Schwartz M, Breinig MK, Dummer JS, Lee RE, Selby R, et al. Herpes simplex virus hepatitis after solid organ transplantation in adults. Journal of Infection. 1991; 163(5):1001-7. [DOI:10.1093/infdis/163.5.1001] [PMID] [PMCID]

23. Amenabar J, Duran M, Montejo M, Lampreabe I. Herpes simplex virus encephalitis in a renal transplant patient. Nefrologia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia. 2006; 26(2):270-3.