

بررسی شیوع ژنوتایپ‌های ویروس هرپس انسانی هشت در سارکوم کاپوزی در ایران به‌وسیله روش مولکولار

چکیده

رضا شاه‌سیاه*

مهران سکاکی

زهره صفایی نراقی

گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران،
تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۰۱

زمینه و هدف: سارکوم کاپوزی (Kaposi's Sarcoma, KS) در منطقه مدیترانه و در بیماران مبتلا به ایدز شیوع بالایی دارد. کشور ما نزدیک منطقه مدیترانه بوده و شیوع HIV نیز در کشور ما رو به افزایش است. با توجه به وجود ویروس هرپس انسانی هشت (HHV-8) در تمام موارد سارکوم کاپوزی، یافتن آن به‌روش Polymerase Chain Reaction (PCR) به شناسایی موارد غیرتشخیصی کمک می‌کند. ژنوتایپ‌های این ویروس در نژادهای مختلف شیوع خاص خود را دارد که در جمعیت ایرانی این بررسی انجام نشده است.

روش بررسی: بیماران مبتلا به سارکوم کاپوزی را بین سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۹۰ در بیمارستان رازی تهران انتخاب کرده و با استخراج DNA ویروس HHV-8 از بلوک‌های پارافینی آن‌ها، تکثیر قطعه‌ای از ژنوم این ویروس به‌روش PCR انجام شد. در نهایت قطعه موردنظر در ژنوم برای تعیین توالی فرستاده شد و ژنوتایپ تعیین گردید.

یافته‌ها: بر روی ۴۵ نمونه با تشخیص سارکوم کاپوزی PCR انجام گرفت. نتایج PCR در ۳۵ مورد مثبت بودند. روی نمونه‌های ۲۸ بیمار که نتایج مثبت قابل قبول برای ژنوتایپ داشتند، تعیین توالی انجام شد. ۲۰ مورد ژنوتایپ C، هفت مورد ژنوتایپ A و یک مورد هم منفی گزارش شد. ارتباطی بین مراحل مختلف KS با ژنوتایپ‌های HHV-8 یافت نشد.

نتیجه‌گیری: از آنجا که HHV-8 در حدود ۱۰۰٪ ضایعات KS وجود دارد و حساسیت PCR در تشخیص این ویروس بسیار بالاست، می‌توان با شناسایی DNA ویروس به‌وسیله PCR بر روی بلوک‌های پارافینی، تشخیص قطعی KS را در آن‌ها مورد تایید قرار داد. همچنین شیوع ژنوتایپ‌های مختلف HHV-8 در کشور ایران تعیین شد.

کلمات کلیدی: ویروس هرپس انسانی هشت (HHV-8)، سارکوم کاپوزی، واکنش زنجیره پلیمرز (PCR)، ژنوتایپ.

* نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، بیمارستان
امام‌خمینی (ره)، بخش پاتولوژی مولکولار

تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۹۲۵۰۴

E-mail: shahsiah@yahoo.com

مقدمه

می‌باشد. ۳- مرتبط با سرکوب ایمنی یا یاتروژنیک: در بیماران پیوندی دیده می‌شود و نسبت به نوع کلاسیک مهاجم‌تر است ولی بعد از قطع درمان سرکوبگر ایمنی پس‌رفت می‌کند. ۴- اپیدمیک یا مرتبط با ایدز: در ۱/۳٪ بیماران مبتلا به AIDS و بیش‌تر در مردان هم‌جنس‌باز دیده می‌شد که با درمان ضد رتروویروسی میزان آن کاهش یافته است.^۱

ویروس هرپس انسانی هشت (HHV-8) در سال ۱۹۹۴ برای اولین بار در ضایعات جلدی KS در بیمار مبتلا به ایدز شناخته شد و

سارکوم کاپوزی (Kaposi's Sarcoma, KS) یک تومور عروقی با درجه بدخیمی بینابینی می‌باشد که به چهار گروه تقسیم می‌شود: ۱- کلاسیک یا اروپایی: بیش‌تر در مردان مسن در اندام تحتانی و در نژاد یهودی و مدیترانه‌ای دیده می‌شود. ۲- آفریقایی یا اندمیک: بیش‌تر در آفریقا دیده می‌شود در بیماران میان‌سال اغلب به‌شکل بیماری ندولار خوش‌خیم و در بچه‌ها به‌صورت بیماری لنفادنوپاتیک کشنده

تشخیص آن توسط PCR یک ابزار مفید در افتراق KS از انواع مختلف تومورهای شبیه KS می‌باشد.^۹ PCR یک روش آزمایشگاهی از روش‌های تقویت هدف (Target amplification) است که در آن سنتز توالی اسید نوکلئیک هدف انجام می‌شود. در این آزمایش با استفاده از واکنش DNA پلیمرز و تحت شرایط مناسب می‌توان رشته‌ای از DNA را که اختصاصی سلول یا ویروس مورد نظر است، به تعداد زیاد کپی کرد تا قابل شناسایی باشد.^{۱۰}

انجام PCR در تشخیص HHV-8 از حساسیت بالایی برخوردار می‌باشد.^{۱۱،۱۲} ژنوتایپ‌های مختلف HHV-8 در سراسر جهان توزیع منحصر به فردی دارند.^{۱۳}

با توجه به تنوع اپیدمیولوژی و عدم بررسی قبلی در کشور بر آن شدیم تا در این مطالعه شیوع ژنوتایپ‌های HHV-8 در سارکوم کاپوزی در جمعیت ایرانی به وسیله روش ملکولار تعیین نماییم و ارتباط احتمالی ژنوتایپ‌های مختلف را با مراحل بافت‌شناسی سارکوم کاپوزی مشخص کنیم. هم‌چنین می‌توان با تایید وجود ژنوم HHV-8 در موارد مشکوک از نظر مورفولوژی، به تشخیص سارکوم کاپوزی کمک کرد.

روش بررسی

در این مطالعه که به روش مقطعی انجام شد، بیماران که بین سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۹۰ در بیمارستان رازی تهران دارای تشخیص سارکوم کاپوزی بودند، انتخاب شدند و بلوک‌های پارافینی حاوی تومور از آرشیو بخش خارج شدند. اطلاعات مربوط به سن، جنس و محل ابتلا از پرونده بیماران موجود در بایگانی بخش به دست آمد. تمام نمونه‌ها در دوره ذکر شده مورد بررسی قرار گرفتند.

پس از انتخاب نمونه‌ها با مراجعه به شرح بلوک موجود در گزارش پاتولوژی هر یک، لام‌های تومور دوباره مورد بازبینی قرار گرفتند و پس از تایید وجود و نوع تومور از بین آن‌ها بلوکی با بافت تومورال کافی و نکروز کم انتخاب گردید.

برش نمونه‌ها: برش بلوک‌های انتخاب‌شده برای جلوگیری از آلودگی توسط میکروتوم با تیغ یک‌بار مصرف برای هر نمونه انجام شد. به این ترتیب که پس از رد شدن از برش‌های اولیه دو عدد برش ۵ میکرومتری توسط اپلیکاتور یک‌بار مصرف در داخل میکروتیوب

آنرا Kaposi's Sarcoma-associated Herpes Virus (KSHV) نام نهادند. تمام موارد همراه با عفونت HIV دارای HHV-8 می‌باشند. صرف‌نظر از اشکال بالینی مختلف، ۹۵٪ از ضایعات KS دارای HHV-8 می‌باشند. موارد منفی که گه‌گاه دیده می‌شوند ممکن است به دلیل مشکلات تکنیکی در شناسایی ویروس باشد.^{۳،۴}

انتقال ویروس از طریق جنسی به‌ویژه در هم‌جنس‌بازان و غیر جنسی (شاید توسط بزاق یا خون) صورت می‌گیرد.^۴ HHV-8 شرط لازم برای ایجاد KS است ولی کافی نمی‌باشد و فاکتورهای دیگری هم در ایجاد آن ضروری است.^۵ در مراحل اولیه، سلول‌های دوکی کمی آلوده به ویروس هستند ولی با گذشت زمان اغلب سلول‌های دوکی در ضایعه مرحله دیررس حاوی HHV-8 می‌باشند. این سلول‌های دوکی مارکرهای سلول اندوتلیال و سلول عضله صاف، هر دو را بروز می‌دهند.^{۲،۶}

KS از نظر مورفولوژیک دارای سه مرحله Patch، پلاک و ندول می‌باشد. در مرحله Patch که محدود به دیستال اندام تحتانی می‌باشد، فضاهای عروقی نامنظم پوشیده‌شده با سلول‌های اندوتلیال همراه سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای که گاه حاوی هموسیدرین هستند دیده می‌شود. در مرحله پلاک کانال‌های عروقی ناهموار و گشاد پوشیده شده با سلول‌های دوکی شکل Plump دیده می‌شود که در بین این کانال‌ها گلبول‌های قرمز خونی (RBC)، ماکروفاژهای حاوی هموسیدرین و سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای دیگر به چشم می‌خورد. در نوع ندولار صفحاتی از سلول‌های دوکی بزرگ که شکاف‌ها و عروق کوچک حاوی RBC را احاطه می‌کنند، هم‌چنین خون‌ریزی، پیگمان هموسیدرین، سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای، فعالیت میتوزی و گلبول‌های سیتوپلاسمی دیده می‌شود.^{۲،۵}

نمای میکروسکوپی KS در برخی از مراحل آن ممکن است غیرتشخیصی بوده و مشابه تومورهای عروقی خوش‌خیم و بدخیم دیگر باشد.^۷ با توجه به این‌که ویروس هرپس انسانی هشت (HHV-8) یا KSHV در کم‌وبیش تمام ضایعات KS وجود دارد، می‌توان با تشخیص DNA ویروس HHV-8 توسط Polymerase Chain Reaction (PCR) بر روی بلوک‌های پارافینی بیمارانی که تشخیص KS در آن‌ها مطرح می‌باشد، تشخیص KS را مورد تایید قرار داد.^۸ در مطالعات مختلف ترتیب ژنومیک DNA ویروس HHV-8 در انواع مختلف KS شناسایی شده است. در نتیجه وجود HHV-8 در KS و

شد و با سرعت ۸۰۰۰ RPM برای مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد تا محلول از داخل فیلتر عبور کند و اسیدهای نوکلئیک را شسته و به داخل لوله منتقل نماید. در انتها ستون‌های فیلتردار را از داخل لوله‌ها خارج کرده و درب لوله‌ها بسته شدند، محصول نهایی حاوی اسیدهای نوکلئیک استخراج شده می‌باشد که در دمای ۲۰- نگره‌داری می‌شود. در کلیه مراحل استخراج از آلوده شدن فیلتر ستون‌ها پرهیز شده، برای هر بار سمپل کردن از سر سمپلر جدا استفاده گردید و قبل از باز شدن لوله‌ها از انتقال ذرات کوچکی که ممکن است به در لوله متصل شود با دادن اسپین مناسب جلوگیری شد و کلیه مراحل استخراج در زیر هود مناسب انجام شد.

واکنش PCR:

کنترل داخلی: قبل از انجام واکنش PCR بر روی نمونه بیماران و گروه کنترل برای اطمینان از صحیح بودن روند برش و استخراج نمونه‌ها وجود ژن Homo Sapiens Hydroxymethylbilane Synthase (HMBS) که در تمام انسان‌ها وجود دارد در نمونه‌ها بررسی شده در صورت منفی شدن واکنش نمونه فوق با یک نمونه دیگر جایگزین گردید. واکنش PCR برای این ژن در حجم ۲۰ μL با غلظت پرایمر Forward و Reverse $0.2 \mu\text{M}$ و غلظت پروب $0.1 \mu\text{M}$ انجام گردید، نیمی از حجم کل را نیز مواد مورد نیاز برای واکنش PCR (SYBR® Premix Ex. Taq™, PCR TaKaRa Bio Inc., Tokyo, Japan) در صورت ایجاد فلورسانس تایید گردید. ساختمان پرایمرهای HMBS به این ترتیب بودند: GCCTGCAGTTTGGAAATCAGTG و CGGGACGGGCTTTAGCTA.

PCR برای ویروس هرپس انسانی هشت: برای بررسی وجود ژنوم HHV-8 قطعه‌ای از ناحیه VR1 ژن به طول ۳۶۳bp از ORF-K1 که اختصاصی ویروس می‌باشد، به عنوان هدف برای PCR انتخاب شد و دو پرایمر Forward و Reverse طراحی شد که توالی آن‌ها به شرح زیر بود: پرایمر Forward: ACAATCTGGGCATCGACAG و پرایمر Reverse: GTGACACGGTTTCATTTTCGTC.

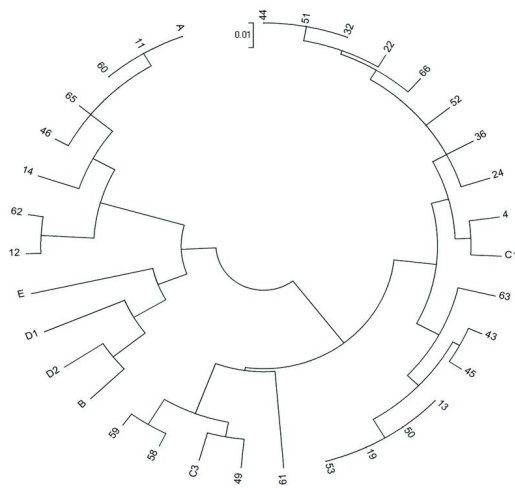
واکنش PCR به صورت Real time توسط سایبرگرین انجام شد. برای دستیابی به بهترین و مناسب‌ترین پروتکل PCR، واکنش در دماهای متفاوت و غلظت‌های مختلف با کنترل مثبت تهیه شده و با روش‌های مختلف آزمایش شد تا آزمایش برای دما، زمان و

۱/۵ میلی‌لیتری (Eppendorf Tubes®, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) قرار گرفت و در نهایت جهت اطمینان از وجود تومور در برش آخر یک عدد لام از آن تهیه و به روش هموتوکسیلین-آئوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شد و مورد بررسی قرار گرفت و اگر توموری در آن مشاهده نشد از مطالعه حذف گردد. پس از برش هر نمونه تیغ عوض شده و مکان قرارگیری تیغ و میکروتوم با الکل و گزین (Xylene) تمیز گردید و بدین وسیله از هرگونه آلودگی جلوگیری شد. دیپارافینه کردن: نمونه‌ها طی دو مرحله توسط اتانل و گزین دیپارافینه شدند.

استخراج اسید نوکلئیک:

استخراج DNA توسط High Pure Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) انجام شد. در ابتدا بافت دیپارافینه همراه با ۱۰۰ μL بافر لیزکننده بافتی و ۴۰ μL پروتیناز K در صفحه داغ با دمای ۵۵ °C برای یک شب قرار گرفت و در صورت حل نشدن کامل بافت به آن مجدداً ۲۰ μL پروتیناز K اضافه شد تا بافت‌ها کاملاً حل شود، به نمونه حاصل ۲۰۰ μL بافر Binding و ۲۰۰ μL ایزوپروپانول اضافه کرده و ورتکس انجام شد و مخلوط آن به داخل ستون منتقل شد و ستون را داخل لوله‌های مخصوص قرار داده و پس از آن نمونه با سرعت ۸۰۰۰ RPM برای مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد. عمل سانتریفوژ به همان سرعت بعد از افزودن ۵۰۰ μL بافر مهارکننده تکرار شد تا محلول از داخل فیلتر عبور کرده و اسیدهای نوکلئیک به فیلتر متصل گردند. محلول داخل لوله‌ها را دور ریخته سپس بر روی فیلتر در داخل ستون ۵۰۰ μL بافر شستشو اول را اضافه نموده و با سرعت ۸۰۰۰ RPM برای مدت یک دقیقه سانتریفوژ شدند تا محلول از داخل فیلتر عبور کند.

محلول داخل لوله‌ها را دور ریخته سپس بر روی فیلتر در داخل ستون ۵۰۰ μL بافر شستشو دوم را اضافه نموده و با سرعت ۸۰۰۰ RPM برای مدت یک دقیقه سانتریفوژ شدند تا محلول از داخل فیلتر عبور کند، در پایان کار مجدداً برای حذف اثر اتانول با سرعت ۱۲۰۰۰ RPM برای مدت یک دقیقه سانتریفوژ شدند. در طی این مراحل عوامل مهارکننده و مختل‌کننده واکنش از محیط خارج شده و اسیدهای نوکلئیک در داخل فیلترها باقی مانده سپس ستون‌ها را در داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری اپندورف قرار داده به داخل ستون‌ها ۵۰ μL بافر شستشو که از قبل در دمای ۷۰ درجه قرار داشت اضافه



شکل ۱: درخت فیلوژنتیک آنالیز توالی اسیدنوکلئیک HHV-8

به‌وسیله دستگاه ABI 3730 XL با استفاده از پرایمر Reverse انجام شد. سپس آنالیز فیلوژنتیک به‌وسیله نرم‌افزار MEGA ویراست ۴،۰،۲ صورت گرفت (شکل ۱).

به‌دلیل نیاز به محتوای ژنتیک بافت بلوک‌های پارافینی، بلوک‌هایی با فیکسسیون نامناسب و عمر طولانی مناسب نیستند و ممکن است که از همه نمونه‌ها نتوانیم DNA مناسب استخراج نماییم که با توجه به حجم نمونه مناسب قابل توجه نبودند. هم‌چنین سعی شد از بلوک‌های تازه‌تر و با فیکسسیون مناسب‌تر استفاده شود. اسیدهای نوکلئیک در شرایط محیطی بسیار حساس بوده و ممکن است در مراحل آماده‌سازی از بین رفته و باعث منفی کاذب شدن تست شوند. برای حذف مواد منفی کاذب، به‌دلیل احتمال مصرف شدن منطقه تومورال طی برش‌های متوالی روی بلوک‌های پارافینی، پس از گرفتن برش نمونه برای انجام PCR یک برش نهایی روی لام با رنگ‌آمیزی H&E تهیه شده و مورد مطالعه قرار گرفت تا از وجود تومور در نمونه PCR اطمینان حاصل شود. مواد فاقد تومور در برش نهایی از مطالعه خارج شدند. هم‌چنین نمونه‌هایی که دارای تومور بودند ولی به‌دلایل فوق DNA مناسب از آن‌ها استخراج نشد نیز از مطالعه خارج شدند.

اطلاعات موردنیاز از پرونده بیماران بدون نام آن‌ها و با ذکر شماره پرونده به‌صورت محرمانه استخراج و مورد مطالعه قرار گرفت.

جدول ۱: شرایط انجام واکنش PCR در شناسایی HHV-8

واکنش	تعداد سیکل	زمان (ثانیه)	دما
دناچوره شدن اولیه	۱	۳۰	۹۴
دناچوره شدن	۴۵	۱۵	۹۵
اتصال و گسترش	۱	۲۰	۶۰
گسترش نهایی	۱	۳۰۰	۷۲
ذوب شدن	۱		۶۰-۹۵

غلظت‌های مناسب فراهم شود. دما و زمان به‌کاررفته در هر سیکل واکنش (جدول ۱) ذکر شده است.

واکنش نهایی PCR: واکنش نهایی در حجم $20 \mu\text{L}$ شامل دو پرایمر Forward و Reverse هر کدام $0.5 \mu\text{L}$ و حجم $10 \mu\text{L}$ به‌عنوان منبع مواد مورد نیاز برای واکنش و سایبرگرین تشکیل می‌دهد. بررسی انجام واکنش (تولید فلورسانس) بر روی کانال FAM و در فاز اتصال انجام گرفت.

کاهش دما در زمان اتصال طی 20 سیکل با کاهش نیم درجه در هر سیکل انجام شد. در هر دوره از انجام واکنش PCR از کنترل مثبت در سه غلظت متفاوت و نیز کنترل منفی برای پیشگیری از آلودگی استفاده شد. کیت استخراج مورد استفاده (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) بوده و از نماینده آن شرکت تهیه گردید. کلیه پرایمرهای واکنش اصلی و پرایمرها و پروب واکنش کنترل داخلی ساخته Bioneer Inc. (Alameda, CA, USA) و از نماینده آن شرکت تهیه گردید. کلیه مواد مورد نیاز برای واکنش PCR (Master mix)، کنترل داخلی و واکنش اصلی ساخته (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) و از نماینده آن شرکت تهیه گردید. کلیه واکنش‌های PCR توسط Thermal cycler مدل Rotor-3000 Gene ساخته (Corbett Research, Mortlake, Australia) انجام شد. برش بافت‌ها در آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان رازی تهران انجام شد. کلیه مراحل بعدی شامل استخراج و انجام آزمایشات در آزمایشگاه مولکولار بیمارستان امام‌خمینی (ره) انجام گردید.

تعیین توالی: ۲۸ نمونه از محصولات PCR که نتیجه مثبت داشتند برای استخراج محصولات و تعیین توالی به شرکت ماکروژن (Geum chun-gu, Seoul, Korea) فرستاده شد، در آنجا تعیین توالی

مورفولوژی KS با ژنوتایپ‌های HHV-8 یافت نشد. از این ۴۵ مورد، نتایج PCR در ۳۵ مورد مثبت، در هفت مورد منفی و در سه مورد محصول کم بودند.

روی نمونه‌های ۲۸ بیمار که نتایج مثبت قابل قبول برای ژنوتایپ داشتند، تعیین توالی انجام شد. ۲۰ مورد دارای ژنوتایپ C (۷۱/۴٪) و هفت مورد دارای ژنوتایپ A (۲۵٪) بودند و یک مورد هم منفی گزارش شد.

بحث

در این مطالعه ما به بررسی شیوع ژنوتایپ‌های مختلف HHV-8 در بیماران مبتلا به سارکوم کاپوزی (KS) پرداختیم.

KS یک تومور عروقی با درجه بدخیمی بینابینی است که از نظر هیستولوژیک به سه Grade تقسیم می‌شود: Patch، پلاک و ندول.^{۱۲} نمای میکروسکوپی KS در مراحل مختلف گاه غیر تشخیصی بوده و می‌تواند مشابه تومورها یا شرایط خوش‌خیم‌تر و یا بدخیم‌تر باشد.^۶ بدیهی است که در صورت عدم تشخیص صحیح می‌تواند درمان نادرست را در پی داشته باشد و به دنبال آن زیان‌های جسمانی و اقتصادی فراوانی را به بیمار و جامعه تحمیل نماید.

با توجه به این‌که HHV-8 در تقریباً تمام ضایعات KS وجود دارد و شرط لازم برای آن است و حساسیت بالای روش PCR، می‌توان با تشخیص DNA ویروس به وسیله PCR بر روی بلوک‌های پارافینی در مواردی که تشخیص KS در آن‌ها مورد شک است، این تشخیص را مورد تایید یا رد قرار داد و از انجام بررسی‌های بی‌جا و درمان‌های اشتباه جلوگیری کرد و به این ترتیب استراتژی درمانی KS بهبود می‌یابد.^{۱۴} در مطالعه‌های دیگر هم روش PCR به‌عنوان ابزار کمکی ساده و حساس برای شناسایی HHV-8 جهت تمایز KS از سایر تومورهای مشابه مطرح شده است.^۹ از طرف دیگر، ژنوتایپ‌های مختلف HHV-8 بر حسب مناطق جغرافیایی و نژاد بیماران، توزیع متفاوتی دارد.^{۱۱،۱۵} HHV-8 دارای هفت ژنوتایپ مختلف است که در مناطق جغرافیایی جهان و بین نژادهای مختلف، توزیع خاصی دارد.^{۱۶-۱۹} برخی ژنوتایپ‌ها در بین بیماران خاصی فراوانی بیش‌تری داشته‌اند. به‌عنوان مثال ژنوتایپ A در بیماران مبتلا به ایدز و ژنوتایپ D در بیماران غیرمبتلا به ایدز بیش‌تر بوده است^{۲۰} و نیز ارتباط

با استفاده از بلوک‌های پارافینی و با توجه به عدم تحمیل هزینه یا مداخله بر بیماران و هم‌چنین عدم فاش شدن مدارک و اسامی بیماران، کلیه ملاحظات اخلاقی بنابر بیانیه هلسینکی حفظ و رعایت شد. جمع‌آوری اطلاعات توسط پرسش‌نامه صورت گرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، اطلاعات به‌دست‌آمده را به‌صورت Code sheet و Master sheet وارد نرم‌افزار آماری SPSS ویراست ۱۶ نموده و در نهایت با استفاده از همین نرم‌افزار اطلاعات موجود، مورد تجزیه و تحلیل و آنالیز آماری قرار گرفت. داده‌های کمی با میانگین و انحراف معیار و داده‌های کیفی براساس فراوانی و درصد فراوانی ارایه شد. میانگین‌ها و فراوانی‌ها با روش‌های آماری Student's t-test و χ^2 تجزیه و تحلیل شد. $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تعداد ۶۶ نمونه پاتولوژی با تشخیص اولیه سارکوم کاپوزی موجود بود که بعد از تهیه برش‌های لازم برای PCR، لام‌های تهیه‌شده از برش‌های نهایی (که به‌روش H&E تهیه شده بودند)، به‌وسیله استاد پاتولوژی مورد بررسی قرار گرفت و تعداد ۱۳ مورد به‌دلیل عدم وجود تومور از مطالعه خارج شدند و ۵۳ نمونه جهت انجام PCR انتخاب شدند. سن بیماران هنگام مراجعه از ۲۵ تا ۹۵ سال با میانگین ۶۲ سال و انحراف معیار ۱۷ سال بود. توزیع جنسیتی بیماران ۷۵/۵٪ مرد و ۲۴/۵٪ زن بودند. ارتباطی بین گروه‌های سنی مختلف و نیز جنس با ژنوتایپ‌های HHV-8 یافت نشد.

بیش‌ترین فراوانی KS در اندام تحتانی بود (۶۲/۳٪). بعد از آن به‌ترتیب شیوع، در اندام فوقانی (۲۶/۴٪)، تنه (۷/۵٪) و سر و گردن (۳/۸٪) توزیع ضایعه وجود داشت. ارتباط معناداری بین محل ابتلای تومور با ژنوتایپ‌های HHV-8 دیده نشد. نتایج PCR در ۳۵ مورد مثبت، در ۱۴ مورد منفی، در سه مورد محصول کم بودند و در یک مورد نمونه نامناسب بودند. از ۵۳ بیمار مورد بررسی هشت مورد دارای مورفولوژی مشکوک بودند که هیچ‌کدام نتایج PCR مثبت نداشتند. از ۴۵ بیمار باقی مانده توزیع مورفولوژی تومور براساس الگوی میکروسکوپی تعیین گردید. بیش‌ترین فراوانی در مراحل پلاک و ندول هر کدام با ۳۳/۳٪ بودند. بعد مرحله Patch (۱۷/۸٪) و مرحله پلاک- ندول (۱۵/۶٪) قرار داشتند. ارتباطی بین مراحل مختلف

منفی شدن نتایج PCR روی بلوک‌های پارافینی چندساله بود. البته این مورد در مطالعات مشابه نیز گزارش شده است.^{۲۲}

برخلاف مناطق مختلف جهان چنین مطالعه‌ای برای تعیین ژنوتایپ‌های HHV-8 با وجود تنوع اپیدمیولوژیک آن تا به حال در ایران انجام نشده است. به همین خاطر بر آن شدیم تا به شناسایی HHV-8 در KS به روش PCR گامی در جهت تشخیص قطعی موارد ابهام‌آمیز و درمان صحیح و به موقع آن برداشته باشیم و از طرفی، با تعیین ژنوتایپ‌های ویروس در ایران برای اولین بار بتوانیم تنوع ژنوتایپ‌های HHV-8 را در جمعیت ایرانی و ارتباط احتمالی آن‌ها را با مراحل مختلف KS مشخص کنیم. پیشنهاد می‌شود بررسی‌های پیش‌تری در جهت تعیین ارتباط ساب‌تایپ‌های HHV-8 با شرایط بالینی و مراحل مورفولوژیک مختلف KS در مناطق مختلف جهان و در ایران انجام شود تا راه برای پیشگیری، تشخیص و درمان موثر این بیماری هموارتر شود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی شیوع ژنوتایپ‌های ویروس هرپس انسانی هشت در سارکوم کاپوزی در ایران به وسیله روش مولکولار" مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران در سال ۱۳۸۹ به شماره ۱۰۹۶۶-۳۰-۰۲-۸۹ می‌باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه اجرا شده است.

ساب‌تایپ C3 با KS همراه به پیوند کلیه و ارتباط ساب‌تایپ A4 در بیماران مبتلا به ایدز در یونان گزارش شده است و پیشنهاد کرده‌اند که انواع مختلف HHV-8 دارای ویژگی‌های بیولوژیکی و تروپیسیم سلولی مختلف می‌باشند ولی این که آیا رفتار بالینی مختلفی هم دارند یا نه، محل مناقشه است.^{۱۴}

در مطالعه‌های مختلف ارتباط مشخصی بین ژنوتایپ‌های مختلف HHV-8 با سن، جنس و مراحل مورفولوژیک KS ذکر نشده است.^{۱۶،۲۱} در مطالعه ما نیز ارتباط معناداری بین آن‌ها یافت نشد. در مطالعه حاضر از ۴۵ بیمار مورد بررسی ۳۵ مورد نتایج PCR مثبت داشتند (۷۷/۸٪) که با مطالعات مشابه قابل مقایسه بود. در مطالعه‌ای در چین ۸۱/۴۸٪ نتایج مثبت در ۲۷ بیمار گزارش شد.^{۱۶} در مطالعه ما ژنوتایپ‌های به دست آمده در جمعیت ایرانی، به ترتیب شیوع، ژنوتایپ C و A بودند که بر حسب منطقه جغرافیایی و نژادی با مطالعات مشابه هماهنگی دارد. در مطالعه‌ای در چین ساب‌تایپ A و C گزارش شد.^{۱۶}

در یونان و پرو هم ساب‌تایپ‌های C و A شایع‌ترین بودند.^{۱۴،۱۹} در ژاپن هم شایع‌ترین ژنوتایپ C بود.^{۱۷،۲۱} در مطالعه‌ای دیگر در جنوب تکزاس ایالات متحده آمریکا ساب‌تایپ C ۷۵٪ و A ۲۵٪ گزارش شد.^{۲۰} محدودیت‌های مطالعه حاضر شامل عدم دسترسی به اطلاعات بالینی کامل بیماران از جمله ابتلای بیماران به ایدز و احتمال

References

- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J, editors. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2010. p. 523-4.
- Weedon D. Weedon's Skin Pathology. 3rd ed. London: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 913-8.
- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994;266(5192):1865-9.
- Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman JE Jr, Cesarman E. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(3):439-64.
- Niedt GW, Myskowski PL, Urmacher C, Niedzwiecki D, Chapman D, Safai B. Histology of early lesions of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Mod Pathol* 1990;3(1):64-70.
- Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 10th ed. Philadelphia: Elsevier; 2011. p. 187-9.
- Kang GH, Kwon GY, Kim CW. Human herpesvirus 8 in Kaposi's sarcoma and Kaposi's sarcoma-mimicking vascular tumors. *J Korean Med Sci* 1998;13(1):54-9.
- Silverberg SG, editor. Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2006. p. 368.
- Li N, Anderson WK, Bhawan J. Further confirmation of the association of human herpesvirus 8 with Kaposi's sarcoma. *J Cutan Pathol* 1998;25(8):413-9.
- McPherson RA, Pincus MR, editors. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2011. p. 1271-6.
- Pak F, Pyakural P, Kokhaei P, Kaaya E, Pourfathollah AA, Selivanova G, et al. HHV-8/KSHV during the development of Kaposi's sarcoma: evaluation by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Cutan Pathol* 2005;32(1):21-7.
- Robin YM, Guillou L, Michels JJ, Coindre JM. Human herpesvirus 8 immunostaining: a sensitive and specific method for diagnosing

- Kaposi sarcoma in paraffin-embedded sections. *Am J Clin Pathol* 2004;121(3):330-4.
13. Boshoff C, Weiss RA. Epidemiology and pathogenesis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356(1408):517-34.
 14. Gazouli M, Papaconstantinou I, Zavos G, Metaxa-Mariatou V, Nasioulas G, Boletis J, et al. Human herpesvirus type 8 genotypes in iatrogenic, classic and AIDS-associated Kaposi's sarcoma from Greece. *Anticancer Res* 2004;24(3a):1597-602.
 15. Zong JC, Ciufu DM, Alcendor DJ, Wan X, Nicholas J, Browning PJ, et al. High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J Virol* 1999;73(5):4156-70.
 16. Zhang D, Pu X, Wu W, Jin Y, Juhear M, Wu X. Genotypic analysis on the ORF-K1 gene of human herpesvirus 8 from patients with Kaposi's sarcoma in Xinjiang, China. *J Genet Genomics* 2008;35(11):657-63.
 17. Kamiyama K, Kinjo T, Chinen K, Iwamasa T, Uezato H, Miyagi JI, et al. Human herpesvirus 8 (HHV8) sequence variations in HHV8 related tumours in Okinawa, a subtropical island in southern Japan. *J Clin Pathol* 2004;57(5):529-35.
 18. Cassar O, Afonso PV, Bassot S, Plancoulaine S, Duprez R, Capuano c, et al. Novel human herpesvirus 8 subtype D strains in Vanuatu, Melanesia. *Emerg Infect Dis* 2007;13(11):1745-8.
 19. Cassar O, Blondot ML, Mohanna S, Jouvion G, Bravo F, Maco V, et al. Human herpesvirus 8 genotype E in patients with Kaposi sarcoma, Peru. *Emerg Infect Dis* 2010;16(9):1459-62.
 20. Zhang YJ, Davis TL, Wang XP, Deng JH, Baillargeon J, Yeh IT, et al. Distinct distribution of rare US genotypes of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in South Texas: implications for KSHV epidemiology. *J Infect Dis* 2001;183(1):125-9.
 21. Kanno T, Sato Y, Nakamura T, Sakamoto K, Sata T, Katano H. Genotypic and clinicopathological characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in Japan. *J Med Virol* 2010;82(3):400-6.
 22. Mahjoub F, Zarei A, Jahanzad I, Shahsiah R, Derakhshandeh S, Najafi M. Comparison of formalin and FineFIX in preserving DNA material in small biopsies. *Pathol Int* 2008;58(10):678-80.

The prevalence of human herpesvirus 8 genotypes in Kaposi's sarcoma in Iran by using molecular technique

Reza Shah Siah M.D.*
Mehran Sakaki M.D.
Zahra Safaie-Naraghi M.D.

Department of Pathology, Tehran
University of Medical Sciences,
Tehran, Iran.

Abstract

Received: May 19, 2013 Accepted: June 22, 2013

Background: In the Mediterranean region, Kaposi's sarcoma (KS) has a high prevalence especially in patients with AIDS. Iran is located close to the Mediterranean region and the HIV prevalence is increasing in our country. In some stages, Kaposi's sarcoma is morphologically similar to other vascular tumors. Owing to the presence of human herpesvirus 8 (HHV-8) in all cases of Kaposi's sarcoma, detection of virus DNA by PCR method can help in the identification of non-diagnostic cases. Moreover, the prevalence of HHV-8 genotypes is different in various regions of the world and in different races. There are limited studies performed on the HHV-8 genotypes in Iranian population.

Methods: Patients with Kaposi's sarcoma from 2001 to 2011 who refer to Tehran Razi Hospital were enrolled in this study. HHV-8 DNA was extracted from paraffin blocks and amplification of the virus genome was performed by PCR method. Finally, the target DNA fragment was used for sequencing and genotype determination.

Results: PCR was performed on 53 cases. In 8 cases with suspicious morphology, PCR was negative and they were excluded from study. Of remaining 45 cases, 35 had positive PCR results, 7 had negative results and 3 had low PCR product. Samples from 28 cases that had positive PCR results, which were acceptable for genotyping, were chosen for sequencing. Twenty cases had genotype C, 7 cases had genotype A and one case was negative. The results are consistent with other studies in our geographical area. No correlation was found between the different microscopic stages and HHV-8 Genotypes.

Conclusion: Since the HHV-8 is obtained in almost 100% of KS lesions and PCR sensitivity in detection of the virus is close to 100%, KS diagnosis can be confirmed in suspicious cases by detection of HHV-8 DNA on paraffin blocks. Moreover the prevalence of HHV-8 genotype was determined in Iran.

Keywords: genotyping techniques, human herpesvirus 8, kaposi, polymerase chain reaction, sarcoma.

* Corresponding author: Molecular Pathology Lab., Imam Khomeini Hospital Complex, Keshavarz Blvd., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-61192504
E-mail: shahsiah@yahoo.com