مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۰، شماره۲، اردیبهشت ۱۳۹٤(شماره پی در پی۹۷)

طراحی روش Nested-PCR sequencing برای تعیین تغییرات ژنتیکی ناحیهٔ غیر کد شوندهٔ کنترلی پولیوماویروس BK در بیماران گیرندهٔ پیوند کلیه

امیر امامی[۱]، رامین یعقوبی[۲]*، آفاق معطری[۳]، مجید باصری صالحی[۴]، جمشید روزبه[۵]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، شیراز، ایران، [۲]مرکز تحقیقات پیوند اعضاء، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، [۳]گروه باکتری و ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، [٤] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، فارس، ایران، [٥] مرکز تحقیقات کلیه شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۳/۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: پولیوماویروس BK یک عفونت فراگیر باشیوع بیش از ۸۰ درصد در دنیا می‌باشد. یکی از دلیل اهمیت پولیوماویروس BK ، بروز آسیب‌های کلیوی و رد پیوند در بیماران گیرنده پیوند کلیه می‌باشد. ناحیهٔ غیرکدشوندهٔ کنترلی ژنوم پولیوماویروس نقش تنظیمی در بیان ژن‌ها و تکثیر این ویروس دارد، این مطالعه با هدف راه اندازی روشی مولکولی، حساس و دقیق به منظور بررسی الگوی ژنتیکی این ناحیه در بیماران انجام گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی تعداد ۱۲۹ نمونهٔ ادرار از بیماران گیرندهٔ پیوند کلیه جمع‌آوری گردید. سپس باطراحی و راه اندازی روش ترکیبی PCR آشیانه ای و ترادف یابی (Nested-PCR sequencing) برای اولین بار تغییرات احتمالی ایجاد شده در ناحیهٔ غیر کد کنندهٔ کنترلی ژنوم پولیوماویروس BK در نمونه‌های فوق بررسی گردید.

یافته‌ها: نمونه‌های مورد مطالعه از (۵۸/۹درصد) ۷٦ بیمار مرد و (٤۱/۱درصد) ۵۳ بیمار زن جمع آوری گردیدند. میانگین سنین افراد ۳۸/۰±۰/۸۹ بود. به طور کلی (٥٦/٦درصد) ۷۳ نمونه از نظر حضور پولیوماویروس BK مثبت ارزیابی گردیدند. با بررسی توالی ژنومی، تغییرات ایجاد شده در ناحیهٔ غیر کد کنندهٔ کنترلی ژنوم پولیوماویروس BK در نمونه های مثبت تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: بررسی ناحیهٔ غیر کد شونده کنترلی ژنوم پولیوما ویروس BK در نمونه‌های ادرار بیماران گیرنده پیوند کلیه نشان داد که ژنوتیپ های بازآرایی شده شایع ترین ژنوتیپها در این بیماران می باشند. بررسی این توالی نشان داد که این بازآرایی ها دارای الگوی مشخص و متفاوت از سویهٔ استاندارد آرکی‌تایپ می باشند.

واژه‌های کلیدی: پولیوماویروس BK، پیوند کلیه، نفروپاتی، ناحیهٔ غیر کد شونده

***نویسنده مسئول: رامین یعقوبی**، شیراز ، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات پیوند اعضاء

Email: rayaviro@yahoo.com

مقدمه

ویروس BK از خانوادهٔ پولیوماویروس‌های انسانی یک ویروس شایع از نظر سرولوژی در جمعیت انسانی می‌باشد که تنها در انسان قادر به ایجاد بیماری می‌باشد. افراد معمولاً در سنین کودکی به این ویروس آلوده شده، اما به واسطهٔ عملکرد صحیح سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی، این ویروس سالیان داراز به صورت نهفته در بدن فرد باقی می‌ماند(۳-۱). ویروس‌های پولیوما جزء DNA ویروس‌های کوچک و بدون پوشش هستند که به صورت ۲۰ وجهی، با قطری حدود ٤٤-۳۸ نانومتر و مقاوم نسبت به اسید و دمای بالا می‌باشند. ژنوم ویروس به صورت یک مولکول حلقوی دو رشته‌ای با طولی معادل ٥ کیلو باز می‌باشد(٥ و ٤). بر اساس مطالعه‌های انجام شده مشخص شده است که تیتر آنتی بادی ضد این ویروس در حدود ۸۰ درصد از جمعیت انسانی در دنیا مثبت می‌باشد(۷ و ٦). این ویروس پس از اولین بروز عفونت در انسان این توانایی را دارد که بدون بروز بیماری مشخصی در فرد آلوده در بافت کلیهٔ فرد به صورت نهفته در آمده و تا سالیان دراز بدون علایم بالینی خاصی باقی بماند(۹ و ۸). با توجه به این که پولیوماویروس BK حتی تحت شرایط عملکرد صحیح سیستم ایمنی فرد نمی‌تواند از بدن وی با گذشت زمان به طور کامل پاکسازی شود به این نکته باید توجه کرد که در صورت بروز هر نوع بیماری یا شرایطی که بتواند سیستم ایمنی فرد را دچار اختلال نماید، این ویروس می‌تواند به صورت فعال تکثیر گردیده و در نتیجه به میزان زیاد در ادرار فرد مورد شناسایی و جداسازی قرار گیرد(۱۰). این حالت از تکثیر ویروس بیشتر در افراد پیوندی به ویژه موارد پیوند کلیه دیده می‌شود که به واسطهٔ مصرف داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی، دچار اختلال شدید سیستم ایمنی می‌شوند. نکتهٔ قابل توجه در بیماران پیوند کلیوی تکثیر این ویروس در بافت کلیه و بروز صدمات ناشی از تکثیر ویروس به صورت نفروپاتی می‌باشد که تحت عنوان نفروپاتی وابسته به ویروس BK[1] در این گروه از بیماران نامیده می‌شود(۱۱). در طی مطالعه‌های مختلف مشخص شده است که در دنیا حدود ۸ درصد از بیماران پیوند کلیوی دچار نفروپاتی وابسته به BK می‌شوند که از این میان بیش از ۵۰ درصد آن‌ها پس از حدود ۲ تا ۳ سال پس از عمل پیوند رد بافت کلیه را تجربه می‌نمایند (١٤-١٢). نتایج مطالعه‌های مختلف در رابطه با بیماران پیوندی نشان می‌دهد که در صورت ارزیابی بیماران به جهت فعالیت پولیوماویروس BK در راستای بررسی نفروپاتی وابسته به این ویروس می‌توان در موارد متعددی بیماران پیوندی را از خطر رد بافت پیوندی نجات داد (١٦-١٤). از این رو تشخیص عفونت فعال در مراحل اولیه به جهت جلوگیری از رد پیوند وابسته به پولیوماویروس، با توجه به هزینه‌های مالی و روحی که متعاقب رد پیوند برای بیماران این گروه ایجاد

1- BKV associated nephropathy (BKVAN)

می‌شود، می‌تواند بسیار کاربردی بوده و مورد توجه قرار گیرد. به طور معمول در صورت تشخیص عفونت وابسته به ویروس BK نمی‌توان از داروهای ضد ویروسی استفاده نمود. از این رو با تشخیص به موقع عفونت فعال این ویروس در فرد پیوند کلیوی می‌توان با کاهش دوز داروهای سرکوب کنندهٔ سیستم ایمنی، سیستم ایمنی را به شرایطی برگرداند که بتوان از تکثیر بیشتر ویروس از طریق سیستم ایمنی خود فرد جلوگیری نمود(۱۷ و ۱٤). در مطالعه‌ای که به وسیله رابینستین و همکاران انجام گرفت، مشخص شد که ویروس BK برای تکثیر در سلول‌های میزبان باید که به واسطهٔ یکسری تغییرات دچار سازگاری شود(۱۸). در مطالعه‌های دیگری که در سال ۲۰۱۰ به وسیله بروکِما انجام گرفت مشخص شد که ویروس BK دارای یک ناحیهٔ غیر کد شوندهٔ کنترلی[۱] است که کنترل نسخه برداری از پروموتور ویروس را بر عهده دارد(۱۹). ناحیهٔ غیر کد شونده یک ناحیهٔ بسیار متغیر از نظر ژنتیکی می‌باشد که در مطالعه‌های مختلف دارای طول قطعه ای در حدود ۳۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز می‌باشد(۲۰). به طور کلی ویروس BK بر اساس ناحیهٔ غیر کد شوندهٔ خود به دو واریتهٔ آرکی تایپ[۲] و سویه‌های متغیر[۳] طبقه‌بندی می‌شوند. سویه‌های آرکی تایپ به عنوان سویهٔ ثابت دارای ۵ قطعهٔ O_{142}, P_{68}, Q_{39}, R_{63}, S_{63} می‌باشند که ناحیهٔ O منشاء همانند سازی ویروس و محل اتصال فاکتورهای رونویسی کننده می‌باشد، اما این توالی در سویه‌های متغیر به صورت حذف یا افزوده شدگی دچار تغییر شده‌اند و به این وسیله تغییراتی در نحوهٔ تکثیر، بیماری زایی و میزان تکثیر رخ می‌دهد (۲۱ و ۱۹). سویه‌های آرکی تایپ به عنوان سویهٔ غیر تغییر یافته، قابل تکثیر در کشت سلولی نبوده، اما سویه های متغیر به صورت معمول از بیماران دچار خون‌ریزی مثانه و یا نفروپاتی وابسته به پولیوماویروس[٤] قابل جداسازی بوده و همچنین در کشت سلولی نیز قادر به رشد می‌باشند(۱۹). بر اساس موارد ذکر شدهٔ فوق و با توجه به این که مرکز پیوند دانشگاه علوم پزشکی شیراز به عنوان بزرگ‌ترین مرکز پیوند در کشور مطرح می‌باشد، هدف از این مطالعه بررسی ژنوتیپ‌های شایع از ویروس BK بر اساس تغییرات ناحیهٔ غیر کد شوندهٔ ویروس در افراد پیوند کلیوی بود.

روش بررسی

در این مطالعهٔ مقطعی نمونهٔ ادرار از ۱۲۹ بیمار گیرندهٔ پیوند کلیه بستری در بخش پیوند اعضاء بیمارستان نمازی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شیراز، جمع آوری و از نظر احتما ابتلا به عفونت پولیوماویروس BK مورد بررسی قرار گرفت. تمام اطلاعات مربوط به این بیماران در طی یک فرم پرسشنامه مشتمل بر جنسیت، سن بیماران، زمان پیوند، نوع داروی سرکوب کنندهٔ مورد استفاده، سطح

1-Non Coding Control Region (NCCR)
2- Archetype
3- rearranged variant
4- HC & PVAN

کـراتینین پـس از پیونـد، میزان تصفیه گلومرولی و گزارش پاتولوژی نیز جمع آوری گردیدند.

از تمام ۱۲۹ نمونهٔ ادرار بیماران وارد شده در مطالعه با استفاده از کیت ستونی ژنومیک (شرکت بیونیر- کره) طبق دستورالعمل شرکت سازنده DNA ژنومی استخراج گردید. محلول استخراج شدهٔ نهایی جهت انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی گراد نگه داری گردید.

در این مطالعه به جهت بررسی تشخیصی و تعیین الگوی تغییرات ناحیهٔ غیر کد شوندهٔ کنترلی ژنوم پولیوماویروس BK دو جفت پرایمر به جهت انجام روش مطالعه به صورت PCCR آشیانه ای (Nested-PCR) طراحی و مورد استفاده قرار گرفتند.

انجام این روش به صورت دو مرحلهٔ تکثیر جداگانه و با دو جفت پرایمر متفاوت انجام گرفت. در مرحلهٔ اول انجام تکثیر از دو پرایمر خارجی با مشخصات

NC1-(5′-AAGGTCCATGAGCTCCATGGATTCTTCC-3′)

NC2-(5′-CTAGGTCCCCCAAAAGTGCTAGAGAGC-3′)

استفاده گردید. این مرحله از تکثیر در حجم ۵۰ میکرولیتر و با استفاده از ۲ میکرولیتر از ژنوم تهیه شده از هر نمونه انجام گرفت. مخلوط واکنش حاوی بافر PCR با غلظت ۱x، 4/0 میلی مول از dNTP، 5/1 واحد از آنزیم پلی مراز Taq، 5/1 میلی مول از ترکیب کلرید منیزیوم و ۰/٤ پیکومول از هر پرایمر مورد استفاده قرار گرفت. تمام مواد مورد استفاده در این مرحله از شرکت پلاس انگلیس تهیه شده بودند.

مرحله تکثیر با استفاده از دستگاه اپندورف در طی ۳۵ چرخه که قبل از آن دناتوراسیون نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹٤ درجهٔ سانتی‌گراد صورت گرفته بود انجام گرفت. تمام چرخه‌ها شامل ۱ دقیقه دناتوراسیون دردمای ۹۵ درجهٔ سانتی گراد، ۱ دقیقه زمان اتصال در دمای ٥٤ درجهٔ سانتی‌گراد و ۱ دقیقه زمان طویل شدن در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد انجام گرفت. در انتها نیز یک زمان طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

به جهت انجام مرحلهٔ بعدی آزمایش و تکثیر داخلی قطعهٔ مورد نظر مراحل تکثیر با استفاده از پرایمرهای داخلی با مشخصات

NC3-(5′-TTGGGAGATAGGGTGGAGGC-3′)

NC4-(5′-GCCAAGATTCCTATGCTGGC-3′)

انجام گرفت. این مرحله از تکثیر از نظر غلظت مواد مورد استفاده و شرایط واکنش PCR کاملا شبیه به مرحله اول بود با این تفاوت که دمای اتصال که در این مرحله ٦۰ درجهٔ سانتی گراد استفاده شد. مراحل تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام گرفت.

پس از اتمام این مرحله از تکثیر نمونه ها با استفاده از سیستم الکتروفورز افقی و با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد (حاوی ۱میکرولیتر ژل رِد) و بافر TAE 1X، مورد ارزیابی از نظر تکثیر قطعهٔ مورد نظر قرار گرفتند. برای تعیین طول قطعه نیز از مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز-آلمان) استفاده

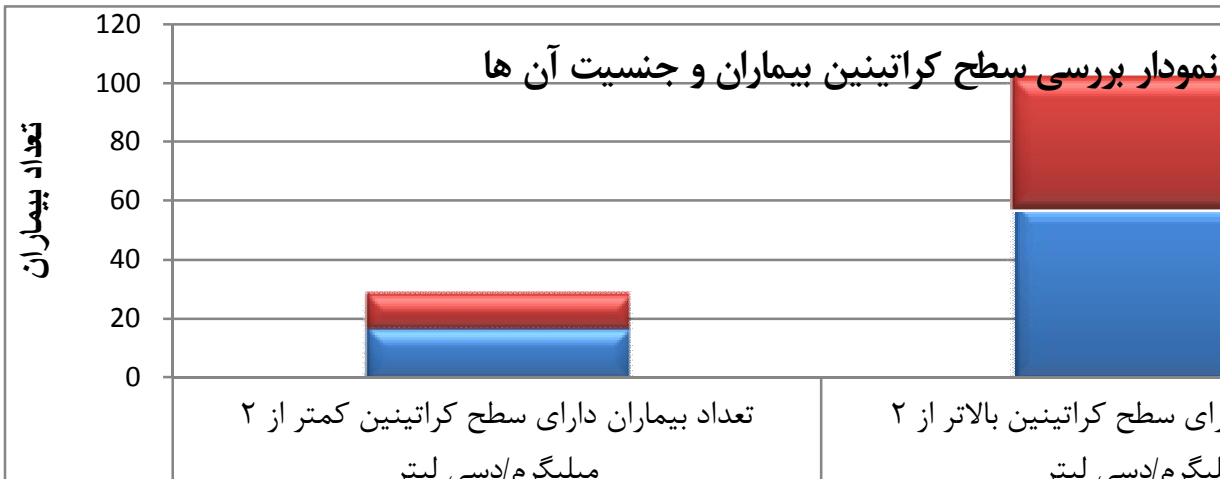
گردید. پس از اتمام مرحله الکتروفورز ژل مورد نظر با استفاده از دستگاه لومینسانس (ژل داک) مورد بررسی قرار گرفت. به جهت کنترل مثبت در مراحل آزماش از سویهٔ پولیوماویروس BK که قبلاً در مرکز تحقیقات پیوند اعضاء دانشگاه علوم پزشکی شیراز با کد STRC38-1 استفاده گردید. قطعهٔ نهایی حاصل از تکثیر که در حدود ۲۷۰ جفت باز می بود پس از ارزیابی و تأیید برروی ژل الکتروفورز مورد استخراج از ژل قرار گرفت. برای استخراج از ژل آگاروز از روش کیت استخراج از ژل ستونی (شرکت بیونیر- کره) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید.

به جهت بررسی و تعیین توالی ناحیهٔ غیر کد شوندهٔ کنترلی ژنوم پولیوماویروس BK نمونه های مورد مطالعه آلوده به ژنوم این ویروس، قطعات استخراج شده از ژل برای ترادف یابی به مرکز دیگر (stBASE۱- مالزی) ارسال گردید. در نهایت نتایج تعیین توالی پس از بررسی و خوانش در ابتدا با توالی های موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفته تا از صحیح بودن قطعه اطمینان حاصل گردد. پس از تأیید نهایی توالی ژنومی قطعات با استفاده از نرم افزار DNAMAN (نسخهٔ ٤.١٣) مورد بررسی و مقایسه با یکدیگر و دیگر توالی های ثبت شده در بانک ژن قرار گرفتند. در این مرحله از آزمایش پس از تعیین الگوی بین نمونه های همین مطالعه، توالی ها در طی دو گروه آرکی تایپ (فاقد تغییر) و تغییر یافته مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی ایزوله های آرکی تایپ از قطعه ثبت شده تحت عنوان سویهٔ dick استفاده گردید. در صورت وجود شباهت بیش از ۹۵ درصدی ایزوله مشابه با سویهٔ آرکی تایپ در نظر گرفته شد. به جهت اعلام ایزوله های تغییر یافته نیز مواردی همچون قطعات اضافه شده، حذف شده، دوبل شده و یا هر تغییری که باعث تفاوت بیش از ۳۰ درصدی ایزوله ها با سویهٔ اصلی آرکی تایپ بود، در نظر گرفته شد. در ایزوله‌های تغییر یافته به جهت سهولت و دقت در بررسی قطعه توالی‌های به دست آمده در چارچوب ٥ قطعهٔ معرفی شده در مطالعه‌های قبلی مورد ارزیابی قرار گرفتند(۲۲). این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز مورد تایید واقع شد.

یافته‌ها

با توجه به آنالیز اطلاعات بیماران ۱۰۱ بیمار از ۱۲۹ بیمار (۷۸/۳ درصد) دارای سطح کراتینین بالای۲ میلی گرم/دسی لیتر و ۲۸ بیمار (۲۱/۷ درصد) دارای سطح کراتینین در محدودهٔ ۰/۲ میلی گرم/دسی لیتر بالاتر از سطح نرمال بودند. از نظر تفکیک جنسیت، (۵۸/۹ درصد) ٧٦ بیمار مرد و (٤١/١درصد) ٥٣ زن بودند (نمودار ۱). محدودهٔ سنی بیماران از ۱۵ سال تا ٦٨ سال با میانگین سنی ۳۸/۰±۰/۸۹ بود که بیشترین بیماران (٦١/٢درصد) مربوط به سنین بین ۳۰ تا ۵۰ سال بودند. در نتایج به دست آمده از روش تکثیر کیفی نمونه‌ها با استفاده از روش تکثیر PCR آشیانه ای (۵۸/۹درصد) ٧٦ نمونه مورد ارزیابی مثبت قرار

گرفتند. همچنین نتایج صحت تکثیر منطقهٔ مورد مطالعه از ژنوم پولیوماویروس BK با روش راه اندازی شدهٔ PCR آشیانه ای با روش استاندارد کمی Real-Time PCR مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفت. قطعات مورد تکثیر قرار گرفته در این روش با استفاده از ترادف یابی مورد شناسایی و تأیید از نظر صحت قطعات تکثیر یافته و تغییرات احتمالی قرار گرفتند. در نتایج ارزیابی تعیین توالی قطعات به دست آمده در روش تکثیر آشیانه ای بیماران گیرندهٔ پیوند کلیه الگوی تقریباً مشابهی از نظر ناحیهٔ غیر کد شوندهٔ کنترلی ژنوم این ویروس را دارا بودند، اما برخی از این توالی به جهت مقایسه با سویهٔ آرکی تایپ یا سویهٔ فاقد تغییر این ویروس دارای یکسری تغییرات بوده و در گروه سویه های تغییر یافته قرار می گرفتند. نتایج مقایسه ای این مطالعه و نتایج ترادف یابی مشخص نمود که پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه جواب گوی تشخیص قطعهٔ غیر کد شونده پولیوماویروس BK و تعیین تغییرات این ناحیه با حساسیت و دقت مطلوب بوده است. همچنین با توجه به نتایج تعیین توالی در ناحیهٔ فرضی O, تغییرات زیادی به صورت اضافه و حذف شدگی مشاهده در مقایسه با سویهٔ آرکی تایپ مشخص گردید. در ناحیهٔ فرضیP، بدون مشاهدهٔ اضافه یا حذف شدگی در توالی ها شباهت بسیار زیادی از نظر تعداد نوکلئوتیدها بین ایزوله با یکدیگر و با ایزولهٔ آرکی تایپ مشاهده گردید و تنها چندین ناحیهٔ موتاسیون یافته[1] مشاهده گردید. در مقایسهٔ بین ناحیهٔ فرضی Q در بین ایزولهٔ های شناسایی شده الگوی کاملاً مشابهی مشاهده گردید که این الگو با سویهٔ آرکی تایپ کاملاً تفاوت وجود داشت. در ناحیهٔ فرضی R نیز ایزوله های بالینی از الگوی یکسانی تبعیت می کردند.



نمودار ۱: بررسی سطح کراتئین بیماران بر حسب جنسیت

```
NCCR        TTTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAAT    40
U_191_NC4   ........................................AA     2
U_182_NC4   ......................................AAATT     5
U_181_NC4   .....................................AAAT     4
U_178_NC4   .....................................AAAT     4
Consensus                                           aaat

NCCR        ATTTTT...GCTAGGCCTCAGAAAAAGCCTCCACACCCTT    77
U_191_NC4   ACTTTCGTTGCTGCTTTCCCTCCTTTGCCCGTTTCCACTT    42
U_182_NC4   GTGTTTCTGGCTGCTTCCCTCCTTTGGCCCGTTTCCACTT    45
U_181_NC4   TTCTTTCTGGCTGCTTTCCCTCCTTTGGCAGTTTCCACTT    44
U_178_NC4   ATCTTTCTGGCTGCTTCCCTCCTTTGGCCCGTTTCCACTT    44
Consensus   atctttctggctgcttcccccccttggcccgtttccactt

NCCR        ACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGC   117
U_191_NC4   CCTCTTGTGTTTATTTAGAGAATTTCAGGGGCGGGGTTTC    82
U_182_NC4   CCTCTTGTGTTTATTTAGAGAATTTCAGGGGCGGGGTTTC    85
U_181_NC4   CCTCTTGTGTTTATTT.GAGAATTTCAGGGGCGGGGTTTC    83
U_178_NC4   CCTCTTGTGTTTATTTAGAGAATTTCAGGGGCGGGGTTTC    84
Consensus   cctcttgtgtttatttagagaatttcaggggcggggtttc

NCCR        CTCTTA...................................   123
U_191_NC4   ACTATTAACTGCCACTGGCTGGCTGCCCAGTCATGCACTT   122
U_182_NC4   ACTATTAACTGCCACTGGCTGGCTGCCCAGTCATGCACTT   125
U_181_NC4   ACTATTAACTGCCACTGGCTGGCTGCCCAGTCATGCACTT   123
U_178_NC4   ACTATTAACTGCCACTGGCTGGCTGCCCAGTCATGCACTT   124
Consensus   actattaactgccactggctggctgcccagtcatgcactt

NCCR        ........................................   123
U_191_NC4   TCCTTCCTGAGGTCATGGTTTGGCTGCATTCCATGGGTAA   162
U_182_NC4   TCCTTCCTGAGGTCATGGTTTGGCTGCATTCCATGGGTAA   165
U_181_NC4   TCCTTCCTGAGGTCATGGTTTGGCTGCATTCCATGGGTAA   163
U_178_NC4   TCCTTCCTGAGGTCATGGTTTGGCTGCATTCCATGGGTAA   164
Consensus   tccttcctgaggtcatggtttggctgcattccatgggtaa

NCCR        ............................TATATTATAAAAA   136
U_191_NC4   GCAGCTCCTCCCTGTGGCCTTTTTTTTTATAAAATATAAA   202
U_182_NC4   GCAGCTCCTCCCTGTGGCCTTTTTTTTTATAAAATAAAAA   205
U_181_NC4   GCAGCTCCTCCCTGTGGCCTTTTTTTTTATAATATATAAG   203
U_178_NC4   GCAGCTCCTCCCTGTGGCCTTTTTTTTTATAAAATAAAAA   204
Consensus   gcagctcctccctgtggcctttttttttataaaataaaaa

NCCR        AAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATG.TA   175
U_191_NC4   ...AGGCCGAGGCCGCCTCTGCCTCCACCCTTTCTCTCAA   239
U_182_NC4   ...AGGCCGAGGCCGCCTCTGCCTCCACCCTTTCTCTCAA   242
U_181_NC4   ...AGGCCGGGGCCCCGTCTCGCCCCACCCTTGATTG.AA   239
U_178_NC4   ...AGGCCGAGGCCGCCTCTGCCTCCACCCTTTCTCTCAA   241
Consensus      aggccgaggccgcctctgcctccacccttttctctcaa
```

شکل ۱: نمایش توالی ژنتیکی ناحیهٔ غیر کد شوندهٔ بیماران پیوند کلیوی در سه گروه طبقه بندی شد. کدهای KJ مرتبط با توالی ژنتیکی به دست آمده از بیماران این مطالعه و NCCR مربوط به توالی ژنتیکی سویهٔ آرکی تایپ ثبت شده در بانک ژن می‌باشد که با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفته اند. در قسمت هایی که توالی به رنگ سیاه به نمایش در آمده‌اند نشان از شباهت ۱۰۰ درصدی بین توالی هر چهار گروه بوده و توالی هایی که به رنگ قرمز مشاهده می‌شوند نشان دهندهٔ شباهت بین توالی تنها سه گروه بیمار این مطالعه می‌باشد. در مواردی که توالی به رنگ آبی مشاهده می‌شود این امر نشان‌دهندهٔ شباهت در بین توالی دو گروه می‌باشد. در مواردی که به صورت نقطه چین به نمایش در آمده است نیز این امر نشان‌دهندهٔ وجود حذف در این قسمت از توالی می‌باشد.

1-Single Nucleotide Polymorphism

بحث

با توجه بررسی صورت گرفته در این بیماران مشخص گردید که اغلب بیمارانی که پس از پیوند با مشکلات کلیوی روبرو بودند دارای سطح کراتینین بالاتر از ۳ میلی گرم/دسی‌لیتر می باشند. در حال حاضر به عنوان اولین نکتهٔ مورد توجه به جهت بررسی های بیشتر فرد در راستای بروز آسیبهای کلیوی افزایش سطح کراتینین سرم می باشد (۲۲). در طی بررسی که بر روی کلیهٔ نمونه ها از نظر حضور پولیوماویروس BK انجام گرفت، حدود ٦٠ درصد بیماران مثبت ارزیابی گردیدند، که این امر نشان می دهد تمام موارد مشکوک به بروز آسیبهای کلیوی مرتبط با پولیوماویروس BK در این گروه از بیماران بستری در مرکز نمازی مربوط به عفونت این ویروس نمی باشد. پرایمر های طراحی شده در این مطالعه به گونه ای انتخاب گردید که در بین توالیهای متفاوت ثبت شده در بانک ژن از اشتراک بسیار زیادی برخوردار باشند. این امر باعث گردید که حتی در موارد بروز تغییرات در ناحیهٔ غیر کد شونده کنترلی ژنوم این ویروس نیز کمتر اختلالی در نتایج مطالعه ایجاد نماید. همچنین با توجه به این که نمونه های تشخیص داده شده مورد تعیین توالی و تأیید قرار گرفته بودند پس این امر می تواند نشان از کاربردی تر بودن پرایمرهای مورد استفاده باشد. هم‌چنین با توجه به این که در روش کیفی از روش PCR آشیانه ای که یک روش تکثیر ژنومی دو مرحله ای است استفاده می شود، حساسیت روش نیز به نسبت در موارد کم بودن تعداد ویروس های داخل نمونه افزایش قابل توجهی خواهد داشت.

تاکنون اطلاعات خوب و دقیقی در رابطه با چگونگی فعال شدن و بروز تغییرات در توالی ژنومی پولیوماویروس BK و ارتباط آن با سیستم ایمنی افراد دارای ضعف سیستم ایمنی و بروز آسیبهای کلیوی وابسته به آن به دست نیامده است (۲۲, ۲۳). در طی مطالعات، وو و همکاران ذکر نمودند که به دلیل تضعیف سیستم ایمنی در افراد به واسطهٔ مصرف داروهای سرکوب کنندهٔ ایمنی، این ویروس قدرت تکثیر آزادانه یافته که همین امر باعث بروز یکسری تغییرات در توالی تنظیمی ژنومی این ویروس و افزایش قدرت تکثیر آن می شود (٢٤). در مطالعات انجام گرفته توسط موانز و همکاران که برروی همانند سازی، بیان ژن، قدرت تکثیر و بیماری زایی ویروس ها انجام گرفته است، مشخص شده که تغییرات در توالی ژنوم ویروس ها مثل اضافه شدن، حذف شدن و موتاسیون در توالی نوکلئوتیدی آن ها یکی از مهمترین دلائل سازگاری و افزایش قدرت تکثیر و بروز بیماری در آن ها می باشد(۲۵-۲۸). یکی از نواحی که تغییر در توالی آن می تواند سازگاری

ویـروس را بسـیار بهینـه نمایـد ناحیـهٔ کنترلـی ژنـوم ویروس ها می باشد که در سال های اخیر این نـواحی که در یک قسمت غیر کد شونده قرار گرفته اند و تحت عنوان ناحیهٔ غیر کد شوندهٔ کنترلی خوانده مـی شـوند (۲۹). با توجه به نتایج مربوط بـه تعیـین تـوالی نمونـه هایی که در این مطالعه از نظر حضور ویـروس مثبـت ارزیابی شده بودند کاملاً مشخص است که نمونه های ادرار تمامی افراد آلـوده بـه سـویه هـایی از ویـروس بودند که توالی کنترلی غیر کد شـونده در آنهـا دچـار تغییرات عمده ای شده بودند. با توجه به تقسیم بنـدی ژنوتیپی که برای این ویروس از نظـر ناحیـهٔ غیـر کـد شونده وجـود دارد، پولیومـاویروس هـای BK در دو گروه آرکی تایپ یعنی مشـابه سـویهٔ اسـتاندارد ثبـت شدهٔ این ویروس و گروه متغیر یا بازآرایی شده قـرار می گیرند. از این نظر ویروس هایی که در ناحیـهٔ غیـر کد شوندهٔ خود دچار تغییرات و ایجاد تفاوت با سـویهٔ استاندارد شده اند در این گروه قرار می گیرند. در این مطالعه نیز تمامی موارد بیمار و مثبت از نظر حضـور پولیوماویروس BK، در ادرار آن ها نشـان از تغییـرات متعدد نسبت به سویهٔ استاندارد این ویروس بـود. بـر این اساس تمامی بیمارانی که از نظـر پولیومـاویروس BK مثبت بودند در گروه بازآرایی شده قرار گفتند.

همان طور کـه در قسـمت هـای قبـل نیـز ذکـر گردید ناحیهٔ غیـر کـد شـوندهٔ پولیومـاویروس BK در برگیرندهٔ منشاء همانند سازی ویروس به صـورت دو طرفه می باشد که نقش مهمـی را در هماننـد سـازی و تکثیر ویروس بـازی مـی نمایـد. بـا توجـه بـه نقـش و اهمیـت ایـن ناحیـه در مطالعـات مختلـف بـه صـورت فرضـی تـوالی ایـن منطقـه بـه ۵ ناحیـهٔ O، P، Q، R و S تقسیم شده انـد کـه اصـل ایـن تـوالی بـر پایـهٔ تـوالی جداشده از این ویروس تحت عنوان سویهٔ آرکی تایـپ کـه از افـراد سـالم کـه ویـروس قـدرت تکثیـر نـدارد، می‌باشد(۳۱ و ۳۰). با توجه به این که تغییـر در تـوالی این ناحیه یک منشاء بروز سازگاری و قدرت ویـروس در تکثیر درون سلول های میزبان مـی باشـد بـه نظـر می‌رسد بررسی بروز آلودگی پولیوما ویـروس BK از نظر تغییرات در ناحیهٔ غیر کد شوندهٔ کنترلی ویـروس می توانـد کمـک شـایان تـوجهی در بررسـی افـزایش سطح فعالیت ویروس در این گـروه از بیمـاران و نیـز احتمال بروز نفروپاتی وابسته به آن را، نماید.

از آنجایی که در صورت تکثیر بیش از حد این ویروس در بدن فرد این ویروس باعث صدمات بـافتی به ویژه در سلول های کلیوی می شوند که این امر می توانـد گلـومرول هـا را دچـار التهـاب و در نهایـت ار کارافتادگی نماید. از آنجایی که بهتـرین روش درمـان در ایـن گـروه از بیمـاران در صـورت بـروز علایـم آسیب‌های کلیوی مشکوک بـه وابسـتگی بـه ویـروس کاهش داروهای سـرکوب کننـدهٔ سیسـتم ایمنـی و یـا

تعویض آن‌ها می‌باشد از این رو تشخیص به موقع عملکرد ویروس می‌تواند در نجات بیمار از عوارض رد بافت پیوندی و هزینه های مجدد پیوند بسیار کمک کنندهباشد.

همان طور که در نتایج این مطالعه مشخص گردید تمامی نمونه های بیماران که توسط روش PCR آشیانه ای مورد استفاده در ان مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفته بودند از نظر توالی ژنومی ناحیهٔ غیر کد شونده دچار تغییر نسبت به ایزولهٔ ثبت شده در بانک ژن تحت عنوان آرکی تایپ بودند. مقایسهٔ نتایج این افراد با افراد سالم و ایزوله های ثبت شده در بانک ژن نشان می دهد که تنها در حدود ۱۰ درصد از نمونه های ادرار افراد پیوند کلیوی که با توجه به علائم معمولی بالینی به عنوان مشکوک به آسیبهای کلیوی وابسته به این ویروس قلمداد می شوند به طور واقعی دچار آن هستند و در بسیاری از موارد به دلائل دیگری از جمله عدم سازگاری های بافتی می باشد که با توجه به نوع درمان صورت گرفته خطر رد پیوند در آن ها بسیار بالا خواهد رفت.

مطالعات متعددی در رابطه با تعیین یک الگوی تشخیص عوارض کلیوی انجام شده است. با توجه به این امر در صورت مشاهدهٔ افزایش سطح کراتینین در سرم فرد، ادرار و سرم فرد از نظر ویروس BK با روش های مولکولی مثل تکثیر ژنومی کمی با استفاده از تکنیک Real-Time PCR مورد بررسی قرار گیرند (۳۳ و ۳۲ ، ١٤). در طی نتایج مختلف به دست آمده در دنیا مطالعات افرادی همچون زیاــ اوولی و همکاران صورت گرفت نشان داد که روش های مولکولی که بر پایهٔ کیت های تجاری به ویژه نواحی قابل تغییر ویروس مورد استفاده قرار می گیرند با توجه به متغیر بودن این نواحی نمی توانند همیشه و با قطعیت کامل پاسخگوی شناسایی دقیق عفونت این ویروس باشند (١٤)، اما در طی مطالعهٔ حاضر پیشنهاد بررسی تغییرات ناحیهٔ کنترلی ویروس با روش آشیانه ای انجام شد تا به این وسیله بتوان هم ارزیابی دقیق از احتمال افزایش فعالیت پولیوماویروس BK را در بیماران کلیوی داد و هم این که بتوان تشخیص سریع تری از بروز بیماری وابسته به این ویروس را به جهت جلوگیری از رد بافت پیوندی در بیمار را انجام داد. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه مشخص گردید که بیماران پیوندی که دچار اختلالات کلیوی می شوند هیچکدام دارای الگوی ژنتیکی ناحیهٔ غیر کد شوندهٔ کنترلی مشابه با الگوی آرکی تایپ نبودند. بر پایهٔ نتایج به دست آمده در این مطالعه و دیگر مطالعات می توان نتیجه گیری نمود که صرف حضور پولیوماویروس BK و تعداد آن در ادرار فرد نمی تواند شاخص مناسبی برای احتمال بروز آسیب کلیوی وابسته به این ویروس در فرد گیرنده پیوند

باشد، اما بر اساس ارزیابی توالی ژنومی این ویروس در ناحیهٔ غیر کد شوندهٔ که کنترل تکثیر ویروس را بر عهده دارد می تواند شاخص بسیار مناسبی برای احتمال بروز آسیب های کلیوی بر پایهٔ تکثیر این ویروس باشد.

نتیجه گیری

بسیاری از بیماران پیوند کلیه که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند دارای سطح کراتینین بالای ۲ بودند. نکتهٔ مورد توجه مثبت بودن اکثر این بیماران از نظر حضور پولیوما ویروس BK بود. بررسی ناحیهٔ غیر کد شونده در در نمونه‌های مثبت از نظر حضور پولیوماویروس BK نشان داد، که توالی این ناحیهٔ ژنومی به صورت ژنوتیپ بازآرایی شده می باشد. بررسی مقایسه ای این توالی نشان داد که این بازآرایی‌ها دارای الگوی مشخص و متفاوت از سویهٔ استاندارد آرکی‌تایپ می‌باشند

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان نامهٔ دکتری تخصصی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز بود که با که با حمایت مالی مرکز تحقیقات ترمیم و پیوند اعضاء دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد. کلیهٔ نویسندگان این مقاله از همکاری اساتید و پرسنل گروه باکتری و ویروس شناسی دانشکدهٔ پزشکی شیراز کمال تشکر را دارند.

REFRENCES

1.Bollag B, Chuke WF, Frisque RJ. Hybrid genomes of the polyomaviruses JC virus, BK virus, and simian virus 40: identification of sequences important for efficient transformation. *J Virol*. 1989;63(2):863-72.

2.Trowbridge PW, Frisque RJ. Identification of three new JC virus proteins generated by alternative splicing of the early viral mRNA. *J Neurovirol*. 1995;1(2):195-206.

3.Nishimoto Y, Zheng HY, Zhong S, Ikegaya H, Chen Q, Sugimoto C*, et al.* An Asian origin for subtype IV BK virus based on phylogenetic analysis. *J Mol Evol*. 2007;65(1):103-11.

4.Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC. Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. *Nature*. 1991;354(6351):278-84.

5.Stehle T, Gamblin SJ, Yan Y, Harrison SC. The structure of simian virus 40 refined at 3.1 A resolution. *Structure*. 1996;4(2):165-82.

6.Chatterjee M, Weyandt TB, Frisque RJ. Identification of archetype and rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals. *J Med Virol*. 2000;60(3):353-62.

7.Knowles WA, Khalili K, Stoner GL. the epidemiology of bk virus and the occurrence of antigenic and genomic subtypes. *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives*. 2001;1(19):527-59.

8.Heritage J, Chesters P, McCance D. The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue. *J Med Virol*. 1981;8(2):143 - 50.

9.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(4):676-84.

10.Nickeleit V, Mihatsch MJ. Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allografts: an update on an escalating threat. *Transpl Int*. 2006;19(12):960-73.

11.De Bruyn G, Limaye AP. BK virus-associated nephropathy in kidney transplant recipients *Rev Med Virol*. 2004;14(1):193-205.

12.Drachenberg C, Hirsch H, Papadimitriou J, Mozafari P, Wali R, McKinney J. Cost efficiency in the prospective diagnosis and follow up of polyomavirus allograft nephropathy. *Transplantation proceedings*. 2004;36(1):3028-31.

13.Drachenberg CB, Beskow CO, Cangro CB, Bourquin PM, Simsir A, Fink J*, et al.* Human polyoma virus in renal allograft biopsies: morphological findings and correlation with urine cytology. *Human pathology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1999;30(8):970-7.

14.Pang XL, Doucette K, LeBlanc B, Cockfield SM, Preiksaitis JK. Monitoring of polyomavirus BK virus viruria and viremia in renal allograft recipients by use of a quantitative real-time PCR assay: one-year prospective study. *J Clin Microbiol*. 2007;45(11):3568-73.

15.Rubinstein R, Harley EH. BK virus DNA cloned directly from human urine confirms an archetypal structure for the transcriptional control region. *Virus Genes*. 1989;2(2):157-65.

16.Broekema NM, Abend JR, Bennett SM, Butel JS, Vanchiere JA, Imperiale MJ. A system for the analysis of BKV non-coding control regions: application to clinical isolates from an HIV/AIDS patient. *Virology*. 2010;407(2):368-73.

17.Christopher LC, Gerald LS. Molecular genetics of the BK virus. *graft*. 2002;5(supplement december 2002):28-34.

18.Markowitz RB, Dynan WS. Binding of cellular proteins to the regulatory region of BK virus DNA. *J Virol*. 1988;62(9):3388-98.

Drachenberg C, Papadimitriou J, Ramos E. Histologic versus molecular diagnosis of BK polyomavirus associated nephropathy: a shifting paradigm? *Clin j AS of Nephro: CJASN*. 2006;1(3):374-9.

19.Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Ramos E. Histologic versus molecular diagnosis of BK polyomavirus-associated nephropathy: a shifting paradigm? *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2006;1(3):374-9.

20.Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M*, et al.* Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant*. 2005;5(3):582-94.

21.Perets TT, Silberstein I, Rubinov J, Sarid R, Mendelson E, Shulman LM. High frequency and diversity of rearrangements in polyomavirus bk noncoding regulatory regions cloned from urine and plasma of Israeli renal transplant patients and evidence for a new genetic subtype. *J Clin Microbiol*. 2009;47(5):1402-11.

22.Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney international*. 2006;69(4):655-62.

23.Moens U, Van Ghelue M. Polymorphism in the genome of non-passaged human polyomavirus BK: implications for cell tropism and the pathological role of the virus. *Journal of Clinical Virology*. 2005;331(2):209-31.

24.Wu SW, Chang HR, Hsieh MC, Chiou HL, Lin CC, Lian JD. Early diagnosis of polyomavirus type BK infection in tailoring immunosuppression for kidney transplant patients: screening with urine qualitative polymerase chain reaction assay. *Transplantation proceedings*. 2008;40(7):2389-91.
25.Moens U, Van Ghelue M. Polymorphism in the genome of non-passaged human polyomavirus BK: implications for cell tropism and the pathological role of the virus. *Virology*. 2005;331(2):209-31.
26.Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, Egli A, Ramos E, Drachenberg CB*, et al.* Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med*. 2008;205(4):841-52.
27.Stoner GL, Alappan R, Jobes DV, Ryschkewitsch CF, Landry ML. BK virus regulatory region rearrangements in brain and cerebrospinal fluid from a leukemia patient with tubulointerstitial nephritis and meningoencephalitis. *Am J Kidney Dis*. [Case Reports Comparative Study]. 2002;39(5):1102-12.
28.Hirsch HH, steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:611-23.
29.Randhawa P, Brennan DC. BK virus infection in transplant recipients: an overview and update. *Am J Transplant*. 2006;6(9):2000-5.
30.Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Singer EJ, Stoner GL. JC virus regulatory region rearrangements and genotypes in progressive multifocal leukoencephalopathy: two independent aspects of virus variation. *J Gen Virol*. 1997;78 (3):659-64.
31.Mackenzie EF, Poulding JM, Harrison PR, Amer B. Human polyoma virus (HPV)--a significant pathogen in renal transplantation. *Proceedings of the European Dialysis and Transplant Association European Dialysis and Transplant Association*. 1978;15:352-60.
32.Hirsch HH. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant*. 2002;2(1):25-30.
33.Merlino C, Bergallo M, Gribaudo G, Gregori G, Paolo Segoloni G, Giacchino F*, et al.* Polyomavirus BK DNA quantification assay to evaluate viral load in renal transplant recipients. *Journal of Clinical Virology*. 2003;28(3):265-74.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ) **Original Article**

Evaluation of the Genetic Variation of Non Coding Control Region of BK Virus Using Nested-PCR Sequencing Method in Renal Graft Patients

Emami A[1], Yaghobi R[2*], Moattari A[3], Baseri salehi M[4], Roozbeh J[5]

[1]Department of Microbiology, Science and research branch, Islamic Azad University, Fars, Iran, [2] Shiraz Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran,[3] Department of Bacteriology and Virology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran ,[4] Department of Microbiology, Kazeroon branch, Islamic Azad University, Kazeroon, Iran, [5] Shiraz Nephrology Urology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 8 Dec 2014 Accepted: 5 Mar 2015

Abstract

Background: Polyomavirus BK is a ubiquitous infectious agent with more than totally 80% prevalence in the world. One of the clinical importances of polyomavirus BK is association with of kidney injury and graft rejection in kidney transplant recipients. Non Coding Control region of the genome of this virus play a regulatory role in replication and amplification of the virus. This study was performed to design a specific and sensitive molecular technique to evaluate of the genetic variation of Non Coding Control Region of polyomavirus BK in kidney transplant patients

Materials and Methods: In this study, total of 129 urine samples were collected from renal graft patients. Then, for the first time an in-house-nested-PCR sequencing method was optimized to evaluate of the possible genetic variation of Non Coding Control Region of polyomavirus BK in urine samples of studied kidney transplant patients.
Results: Urine samples were collected from 76 (58.9%) males and 46 (35.7%) females with the mean age 38.0±.089 years. Totally 76 (58.9%) samples were positive for polyomavirus BK infection. The algorithm of the sequences of Non Coding Control Region was identified in polyomavirus infected urine samples.
Conclusion: Sequence analysis of the Non Coding Control Regions of polyomavirus BK genome among urine samples showed a widespread rearranged genetic format in this region of viral genome among kidney transplant patients. Evaluation of these sequences showed a defined and different genetic algorithm form standard Archetype strains among studied patients.

Key Words: Polyomavirus BK, Renal graft, Nephropathy, Non Coding Control Region.

[*]Corresponding author: Yaghobi R, Organ Transplants Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
Email: emami_a@gmail.com
Please cite this article as follows:
Emami A, Yaghobi R, Moattari A, Baseri salehi M, Roozbeh J. Evaluation of the Genetic Variation of Non Coding Control Region of BK Virus Using Nested-PCR Sequencing Method in Renal Graft Patients. Armaghane-danesh 2015; 20 (2): 89-102.