

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

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

۱ - دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی

۲ - دانشگاه اراک، گروه زیست شناسی

۳ - دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی

چکیده

سابقه و هدف: هموراژیک سیستائیتیس (HC) در بیماران پیوند مغز استخوان آلونژنیک عموماً همراه با عفونت ویروس BK می‌باشد. از آنجایی که ۷۷-۹۹٪ بیماران بالغ پیوند مغز استخوان واجد آلودگی ویروس BK می‌باشند، لذا فعالیت این ویروس به تنهایی نمی‌تواند عامل هموراژیک سیستائیتیس تلقی شود. اخیراً وجود معنی‌دار موتاسیون $G \rightarrow C$ در ناحیه SP1 در منطقه‌ی ژن‌های کنترل کننده ویروس BK در بیماران HC گزارش شده است. در حالی که این موتاسیون در بیماران فاقد HC دیده نشده است. هدف این پژوهش ارتباط وقوع موتاسیون با بیماری‌زایی ویروس BK می‌باشد. مواد روش‌ها: روش Real time PCR برای اندازه‌گیری میزان ویروس BK مورد استفاده قرار گرفت. ۲۱ بیمار با پیوند مغز استخوان و با عوارض HC و بدون HC و نیز با موتاسیون و بدون موتاسیون دارموتاسیون $G \rightarrow C$ در ناحیه‌ی SP1 در منطقه‌ی ژن‌های کنترل کننده ویروس BK در این مطالعه شرکت کردند.

یافته‌ها: تعیین میزان ویروس BK در ۱۸ مورد از ۲۱ بیمار با موفقیت انجام شد. (۶ بیمار با موتاسیون $G \rightarrow C$ و ۶ بیمار بدون موتاسیون) و ۶ بیمار بدون HC. میانگین تعداد ویروس HC در بیماران دارای HC با موتاسیون $G \rightarrow C$ برابر بود با 3×10^6 و میانگین تعداد ویروس در بیماران HC بدون موتاسیون $G \rightarrow C$ برابر بود با $1/5 \times 10^6$ و میانگین تعداد ویروس در بیماران بدون HC برابر بود با 1.0×10^6 . اگرچه تفاوت مشاهده شده به لحاظ آماری معنی‌دار نیست و این ناشی از یک بیمار بدون HC است که دارای کپی زیادی از ویروس می‌باشد. در حالی که ۵۰٪ بیماران HC دارای تعداد ویروس 10^6 یا بیش‌تر می‌باشند. فقط یک نمونه در گروه بیماران بدون HC دارای تعداد ویروس 5×10^6 می‌باشد. نتیجه‌گیری: اگرچه این مطالعه ارتباط معنی‌دار میزان زیاد ویروس و موتاسیون $G \rightarrow C$ را نشان نمی‌دهد ولی این اطلاعات نشان می‌دهد که میزان کپی (تعداد) بیش از 10^4 بیان‌گر خطر ابتلا به HC است.

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

مقدمه

ویروس BK یک پلئوما ویروس با شیوع ۶۰-۹۰ درصد می‌باشد [۱]. ویروس در اوایل زندگی انسان را آلوده نموده [۲] و به صورت نهفته در کلیه، خون محیطی و مغز باقی می‌ماند [۳]. اگر چه شواهد قاطع مبنی بر دخالت عفونت اولیه در هیچ بیماری وجود ندارد ولی موارد محدودی از

بیماری‌زایی در مجاری ادراری گزارش شده است [۴ و ۵]. مشاهده شده است که در بیماران پیوند مغز استخوان آلونژنیک فعال شدن مجدد ویروس BK مرتبط با بیماری HC تاخیری است. این وضعیت در ۳۴-۵ درصد از موارد با درد در ناحیه پایین شکم، دشواری ادرار، و وجود خون در ادرار دیده شده است [۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰]. معهداً، از آنجایی که ویروس BK در

ادار ۹۰-۷۷٪ تمام افراد پیوند مغز استخوان با HC و بدون HC دیده می‌شود و گفته می‌شود که باز فعالی ویروس BK به تنهایی علت بیماری HC نیست. مطالعات تحقیقی زیادی با تمرکز روی عوامل دیگر دخیل در ایجاد بیماری HC انجام شد (GVHD) بیماری پیوند علیه میزبان به عنوان یکی از عوامل موثر پیشنهاد شده است [۱۱] ولی به عنوان فاکتور موثر تایید نشده است [۱۲]. عفونت اولیه BK بعنوان عامل اصلی HC مورد قبول نیست [۱۳] و دخالت نوع خاصی از ویروس BK در تحریک بیماری HC نقش دارد [۱۴]. اخیراً نشان داده شده که بیماران پیوند مغز استخوان با HC در مقایسه با بیماران پیوند مغز استخوان فاقد HC، واجد میزان بیش‌تری ویروس BK هستند [۱۵ و ۱۶]. این موضوع بیان‌گر مشارکت قوی ویروس BK در ایجاد بیماری HC می‌باشد. به علاوه تعیین ترادف نوکلئوتیدی ناحیه‌ی غیر کد شونده‌ی منطقه کنترلی ویروس BK در نمونه ادرار بیماران پیوند مغز استخوان با HC و بدون HC نشان می‌دهد ۴۳٪ بیماران با HC، دارای موتاسیون C → G می‌باشند در حالی که این موضوع در بیماران بدون HC در منطقه NCCR SP1 دیده نمی‌شود [۱۷]. از آنجایی که SP1 می‌تواند یک عامل تنظیم‌کننده‌ی مثبت بر نسخه برداری ویروس BK باشد [۱۸ و ۱۹]، در این تحقیق اثر موتاسیون ناحیه‌ی SP1 در تکثیر ویروس و نقش احتمالی آن در افزایش میزان ویروس BK بررسی می‌شود. بدین منظور یک روش Real-Time PCR طراحی و برای تعیین میزان ویروس BK مورد استفاده قرار گرفت. میزان ویروس در ادرار بیماران با HC (با و بدون موتاسیون C → G روی ناحیه‌ی NCCR SP1 در ویروس BK) و بیماران بدون HC مورد مطالعه واقع شد.

مواد و روش‌ها

۲۱ نمونه از بیماران پیوند مغز استخوان که دارای سیستم ایمنی سرکوب شده بودند در بیمارستان هدینگه (سوئد) مورد پیوند واقع شدند و مورد مطالعه قرار گرفتند. ۱۳ بیمار دارای HC و ۸ بیمار فاقد HC بودند. این بیماران مورد سکانس

نوکلئوتیدی ناحیه‌ی NCCR و VP1 قرار گرفتند [۱۷]. ویروس BK در ۷ بیمار از بیماران دارای HC دارای موتاسیون G → C در ناحیه‌ی SP1 بودند. موتاسیون T → C در ناحیه‌ی اتصال NCCR-SP1 دیده شد و این موتاسیون در ویروس BK استخراج شده از هر دو گروه بیماران با HC و بدون HC دیده شد [۱۷]. قابل ذکر است که تمام نمونه‌ها در جریان بیماری HC جمع‌آوری شد و قبل از تعیین میزان ویروس BK هیچ‌گونه پردازشی روی نمونه‌ها انجام نشده بود [۱۶].

طراحی DNA استاندارد برای Real Time PCR: به منظور تهیه DNA استاندارد با تعداد معین، یک نمونه مثبت از ویروس BK با استفاده از پرایمر اختصاصی برای ناحیه کد کننده‌ی آنتی ژن T کوچک و جزء کوچک آنتی ژن T بزرگ تکثیر شد. برای هر واکنش PCR از بافر، Taqman، ۲۰،۱/۵MgCl₂ پیکومول پرایمر (BK-S)، ۲۰،۱/۵MgCl₂ پیکومول پرایمر (BK-AS)، ۳،۰/۶ mM dNTPs، واحد Taq Gold DNA پلی‌مراز، آب مقطر دو بار تقطیر و ۱۰ μl از ویروس BK کنترل یا نمونه در حجم کل ۵۰ μl استفاده شده است. مراحل تکثیر PCR متشکل است از: ۹۶ درجه سانتیگراد برای ۲ دقیقه، ۳۰ سیکل ۹۲ برای ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه و در پایان ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه. قطعه‌ی تکثیر شده به طول ۲۷۲ جفت باز از ژل جدا شده و با استفاده از کیت QIAquick از ژل استخراج شد. قطعه‌ی استخراج شده به وکتور pGEM-T منتقل شد و به میزبان JM۱۰۹ ترانسفورم شد. باکتری در محیط LB که دارای آمپی‌سیلین (۱۰۰ mg/μl) قبلاً با IPTG و X-Gal تیمار شده بود کشت داده شد. ۵ کلونی مثبت پلاسمید انتخاب شد و مجدداً در LB کشت داده شد. پلاسمید با استفاده از کیت QIAprep استخراج شد و با استفاده از سیستم ABI PRISM (Applied Biosystem) ۳۱۰ سکانس شد. برای تعیین ترادف از BK-S، BK-AS و Big Dye استفاده شد.

همان‌گونه که قبلاً توضیح داده شد استفاده شد، برای تایید ترادف قطعه‌ی تکثیر شده با ۲۷۲ جفت باز (bp) ترادف مذکور

نتایج

روش Real-Time PCR با استفاده از رقت‌های DNA ویروس BK ارزیابی و استاندارد شد. با این روش ما قادر به تعیین تعداد ویروس در رقت‌های 10^2 تا 10^8 بودیم. تعداد ویروس BK در نمونه‌های ادرار ۱۲ از مجموع ۱۳ بیمار با HC (۶ بیمار با موتاسیون C → G در ناحیه ی SPI و ۶ ویروس BK و ۶ بیمار بدون موتاسیون C → G بودند) و ۶ بیمار از مجموع ۸ بیمار که فاقد HC بودند شمارش شد و نتایج زیر به دست آمد:

نمونه ادرار از بیماران با HC و با موتاسیون C → G در ناحیه ی SPI در ویروس BK دارای تعداد $10^4 \times 10^7$ و $10^6 \times 10^7$ نسخه ویروس BK در هر میکرو لیتر (میانگین 3×10^6) بود (شکل ۱).

جزئیات به شرح زیر است:

تعداد ویروس BK با موتاسیون C → G در موقیت ۲۴۹ دارای تعداد $10^4 \times 10^7$ تا $10^4 \times 10^7$ نسخه بود، در حالی که تعداد ویروس BK با موتاسیون C → G در ناحیه ی ۲۵۱ برابر با $2/5 \times 10^4$ بود. (شکل ۱).

در نمونه ادرار بیماران با HC و بدون موتاسیون C → G در ناحیه ی SPI تعداد ویروس BK برابر بود با $7/5 \times 10^6 \mu\text{l}$ - $2/5 \times 10^4$ (شکل ۱). و نیز در نمونه ادرار از بیماران بدون HC تعداد ویروس BK $8 \times 10^6 - 5 \times 10^2 \mu\text{l}$ (با میانگین 10^6) تشخیص داده شد. علاوه بر این در حالیکه ۵۰٪ نمونه‌ها در گروه دارای HC دارای تعداد $10^6 \mu\text{l}$ نسخه یا بیش‌تر از ویروس BK بودند. فقط یک بیمار در گروه بیماران بدون HC واجد $5 \times 10^5 \mu\text{l}$ نسخه از ویروس BK بود (شکل ۱). از این رو محدوده‌ی تعداد ویروس تعیین شده در نمونه‌های ادرار بیماران مطالعه شده بین 10^2 تا 10^7 می‌باشد. فقط تغییرات اندکی در نمونه‌ای که به صورت دوبله انجام شده بود دیده شد که بیان‌گر تکرار پذیری آزمایش Real Time PCR انجام شده می‌باشد. تست Mann-Whitney برای بررسی اختلافات معنی‌دار بین گروه‌های مختلف بیماران

با ترادف موجود در GenBank مقایسه شد و تطابق آن ترادف ویروس BK با شماره‌ی دسترسی JO 2038 , NC 001538 , VO 118 , VO 01110 تایید شد.

Real Time PCR: از Real Time PCR برای تعیین میزان ویروس BK در نمونه‌های ادرار استفاده شد [۲۰]. نمونه‌های ادرار و نمونه‌ی بدن الگو به عنوان کنترل منفی (NTC) و رقت سریال از مقادیر متفاوت استاندارد DNA ویروس BK با استفاده از دستگاه Real Time PCR در یک ABI PRISM 7700 مورد بررسی قرار گرفت. هر $25 \mu\text{l}$ از واکنش PCR حاوی: $2 \mu\text{l}$ از نمونه، بافر Taqman ، $0/8$ از dNTPs ، 2 mM از MgCl_2 ، $7/5$ پیکومول از BK-S ، $7/5$ پیکومول از BK-AS ، $1/25$ واحد آنزیم Taq Gold DNA polymerase و آب مقطر می‌باشد.

همه نمونه‌ها به صورت duplicates مورد بررسی قرار گرفتند و با در پوش‌های اپتیک پوشانده شدند و ابتدا در ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و سپس در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و در ادامه ۴۰ سیکل که شامل باز شدگی دو رشته بود و سپس در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه قرار داده شد. میزان فلورسانس به صورت اتوماتیک در طول هر سیکل PCR اندازه‌گیری شد و فلورسانس حاصل از سیکل اول PCR به عنوان حد پایه میزان فلورسانس threshold cycle (Ct) در نظر گرفته شد [۱۶، ۲۰ و ۲۱] و میزان فلورسانس در سیکل‌های بعدی نسبت به میزان پایه سنجیده شد.

آنالیز آماری: آزمون Man-Whitney برای تعیین تفاوت معنی‌دار در تعداد ویروس BK در نمونه‌های ادرار گروه‌های مختلف استفاده شد و شامل موارد ذیل است:

بیماران با HC با موتاسیون C → G در ناحیه ی SPI و بیماران با HC بدون موتاسیون C → G در ناحیه ی SPI و همه‌ی بیماران با HC و بدون HC. میزان $p < 0/05$ به عنوان مرز معنی‌دار تعیین شد.

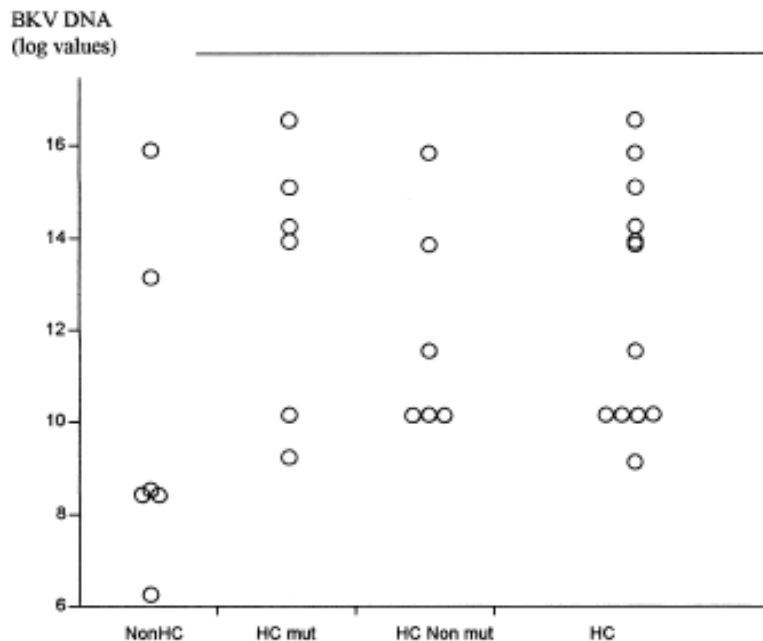
HC بدون موتاسیون در ناحیه‌ی Sp1 هم دیده شد ($p = 0/0446$). لازم به ذکر است که بیمار ذکر شده علائم سیستمیسیس را نشان می‌داد بدون آن که خون‌ریزی قابل تشخیص نشان دهد و همچنین GVHD را به صورت خفیف نشان می‌داد. در ۳ بیمار از مجموعه‌ی ۲۱ بیمار (یک بیمار از گروه بیماران با HC و با موتاسیون در ناحیه‌ی Sp1 و دو بیمار از گروه بیماران بدون HC) تعیین میزان ویروس BK ممکن نشد (شکل ۱).

برای رد این موضوع که نتیجه‌ی منفی PCR، ناشی از اثر بازدارندگی در عمل‌کرد PCR نبوده است، نمونه‌ها بعد از رقیق سازی ۱/۱۰ و حرارت دادن و سانتیفریوژ نمودن دوباره آزمایش شدند و نتیجه‌ی آزمایش همچنان منفی شد. این موضوع بیان‌گر این حقیقت است که میزان ویروس BK در این نمونه‌ها کم‌تر از حساسیت تست ما بود.

استفاده شد. گرایش به افزایش ترشح ویروس BK در بیماران پیوند مغز استخوان با HC در مقایسه با بیماران پیوند مغز استخوان بدون HC دیده شد. ($p = 0/0752$). این گرایش در بیماران با HC و با موتاسیون C → G در ناحیه‌ی Sp1 قوی‌تر از ($p = 0/0782$) بیماران با HC و بدون موتاسیون C → G در ناحیه‌ی Sp1 ($p = 0/2002$) بود. اگر چه بین دو گروه بیماران HC تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($p = 0/4712$), به هر حال ما تاکید داریم با اینکه فقط یک بیمار در گروه بدون HC بیش از 10^6 μl نسخه از ویروس را داشت، نتیجه‌ی حاصل از این یک بیمار باعث تفاوت بین بیماران با HC و بیماران بدون HC به صورت $p > 0/05$ شد. اگر این بیمار را از نتایج حذف کنیم تفاوت معنی‌دار بین دو گروه بیماران بدون HC و با HC با موتاسیون در ناحیه‌ی Sp1 به صورت ($p = 0/0176$) حاصل می‌شود. این تفاوت بین بیماران بدون HC و بیماران با

جدول ۱. ترادف پرایمر و پروب ویروس BK

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



شکل ۱. عداد BKV در ادرار بیماران HC با و بدون موتاسیون C → G در ناحیه Sp1 و بیماران بدون HC.

هر دایره نماینده یک بیمار است.

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

نمی‌توان نادیده گرفت. میزان ویروس BK در یک بیمار بدون HC موجب عدم دست یابی به تفاوت معنی‌دار آماری بین ۲ گروه بیماران با و بدون HC شد. همچنین میزان ویروس BK کم‌تر از حد اندازه‌گیری سیستم Real Time PCR ما در یک بیمار با HC دارای موتاسیون $G \rightarrow C$ در ناحیه ی SP1 و دو بیمار بدون HC تغییری در نتایج آماری ایجاد نکرد. اما این موضوع سبب ارائه‌ی مشکل جدیدی در درمان بیماری HC شد. زیرا در شروع درمان قرار بود که سطح خاصی از ویروس BK باشد.

معهدا، نتایج ما گزارش Azzi را تایید می‌کند [۱۵] که تفاوت معنی‌داری را بین دو گروه بیماران با HC و بدون HC اعلام کرده بود. علت این که ما تفاوت معنی‌داری را در میزان ویروس BK بین ۲ گروه بیماران با HC و بدون HC پیدا نکردیم، می‌تواند ناشی از تعداد کمتر نمونه‌ها در مطالعه‌ی ما باشد. (مطالعات ما روی ۱۳ بیمار با HC و ۸ بیمار بدون HC انجام شد در حالی که مطالعات Azzi و همکارانش روی ۱۷ بیمار با HC و ۲۰ بیمار بدون HC انجام شد) [۱۵]. روش و چگونگی انجام مطالعات نیز حائز اهمیت است. بدین معنا که روش ما تقریباً ۱۰۰ بار حساس‌تر از روش PCR رقابتی استفاده شده توسط Azzi و همکاران ایشان است [۱۵]. که این موضوع نیز ممکن است یکی دیگر از دلایل اختلاف در نتایج حاصل از دو مطالعه باشد.

اگر چه روش حساس تر Real Time PCR اخیراً مورد استفاده قرار گرفته است، ولی روش Real Time PCR برای ویروس BK و ویروس JC توسط Biel و همکاران ایشان معرفی شده است که محدوده‌ی تشخیص آن در نمونه‌ی ادرار بین $10^7 - 10^9$ می‌باشد که از روش Real Time PCR ما $10^7 - 10^9$ بار حساس‌تر است [۱۶].

روش ما دو امتیاز دارد: اول این که این روش برای ویروس BK یک روش کاملاً اختصاصی است چون از پرایمر اختصاصی برای برای ناحیه‌ی کد کننده‌ی LT که خاص ویروس BK است استفاده کردیم، در صورتی که Biel و همکارانش از پرایمری استفاده کردند که ناحیه‌ی VP1 را کد

تست Mann Whitney در حالی انجام شد که برای این ۳ نمونه عدد ۵۰ به عنوان تعداد نسخه‌های ویروس BK در نظر گرفته شد. زیرا حساسیت Nested PCR برابر با $10 \mu l$ و حساسیت Real Time PCR برابر است با $100 \mu l$ است. اما این موضوع منتهی به تفاوت معنی‌دار بین ۳ گروه متفاوت بیماران نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ما احتمال افزایش میزان ترشح ویروس BK را در بیماران HC تحت تاثیر موتاسیون $G \rightarrow C$ در ناحیه‌ی SP1 بررسی کردیم و این میزان را با ترشح میزان ویروس در بیماران پیوند مغز استخوان با HC ولی بدون موتاسیون در ناحیه ی SP1 و بیماران بدون HC مقایسه کردیم. یک سیستم Real Time PCR اختصاصی طراحی نمودیم که قادر به تشخیص DNA ویروس BK در محدوده ی $10^8 - 10^9$ نسخه بود. با این سیستم با موفقیت قادر به آنالیز ۱۸ نمونه از ۲۱ نمونه ادرار بیماران پیوند مغز استخوان شدیم. میانگین تعداد ویروس BK در ادرار بیماران HC با موتاسیون $G \rightarrow C$ در ناحیه ی SP1 ($3 \times 10^6 \mu l$) بیش از میانگین تعداد ویروس در بیماران HC بدون موتاسیون در ناحیه ی SP1 بود ($1/5 \times 10^6 \mu l$) و میزان ویروس در بیماران بدون HC 10^6 بود.

بنابراین یک افزایش واضح در ترشح ویروس BK در بیماران پیوند مغز استخوان با HC و دارای موتاسیون در ناحیه ی SP1 در مقایسه با بیماران بدون HC دیده می‌شود ولی تفاوت بین ۳ گروه به لحاظ آماری معنی‌دار نیست. به علاوه در ۵۰٪ نمونه‌ها از بیماران دارای HC تعداد ویروس BK برابر بود با $10^6 \mu l$ یا بیشتر و فقط در یک نمونه در بیماران بدون HC تعداد ویروس BK بیش از $5 \times 10^5 \mu l$ بود. نگاه کلی به نتایج نشان می‌دهد که میانگین تعداد ویروس BK در بیماران HC افزایش می‌یابد که میزان بالاتر از $10^6 \mu l$ بیان‌گر خطر بروز HC می‌باشد. اما تنوع بالای تعداد ویروس BK در بیماران متفاوت را در گروه‌های مختلف بیماران

روش ساده‌ای است که اطلاعات مفیدی را در تعیین تعداد ویروس BK در نمونه‌ی ادرار بیماران پیوند مغز استخوان در اختیار ما قرار می‌دهد. اطلاعات ما نشان می‌دهد که اگر میزان ویروس BK بیش از 10^4 μ l باشد، خطر ابتلا به بیماری HC را مطرح می‌کند. اما با وجود این که تنوع گسترده‌ای در میزان ترشح ویروس BK در بیماران مختلف دیده می‌شود، این موضوع مستقل از وضعیت HC افراد است. در نتیجه این اطلاعات باید با احتیاط استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه علوم پزشکی سمنان قدردانی

می‌نمایند

منابع

- [1] Walker DL, Padgett BL. The epidemiology of human polyomaviruses. *Prog Clin Biol Res* 1983; 105: 99-106.
- [2] Dorries K, Vogel E, Gunther S, Czub S. Infection of human polyomaviruses Jc and Bk in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology*. 1994; 198: 59-70.
- [3] Chesters PM, Heritage J, McCance DJ. Persistence of DNA sequences of Bk virus and Jc virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis* 1983; 147: 676-684.
- [4] Hashida Y, Gaffney PC, Yunis EJ. Acute hemorrhagic cystitis of childhood and papovavirus-like particles. *J Pediatr*. 1976; 89: 85-87.
- [5] Saitoh K, Sugae N, Koike N, Akiyama Y, Iwamura Y, Kimura H. Diagnosis of childhood Bk virus cystitis by electron microscopy and Pcr. *J Clin Pathol* 1993; 46: 773-775.
- [6] Arthur RR, Shah KV, Baust SJ, Santos GW, Saral R. Association of Bk Viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N Engl J Med* 1986; 315: 230-234.
- [7] Ilhan O, Koc H, Akan H, Gurman G, Arslan O, Ozcan M, Arikan N, Sencer H, Konuk N, Uysal A, Beksac M. Hemorrhagic cystitis as a complication of bone marrow transplantation. *J Chemother* 1997; 9: 56-61.
- [8] Childs R, Sanchez C, Engler H, Preuss J, Rosenfeld S, Dunbar C, van Rhee F, Plante M, Phang S, Barrett AJ. High incidence of adeno- and polyomavirus-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow allotransplantation for hematological malignancy following T cell depletion and cyclosporine. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 889-893.
- [9] Seber A, Shu XO, Defor T, Sencer S, Ramsay N. Risk factors for severe hemorrhagic cystitis following Bmt. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 35-40.
- [10] Vogeli TA, Peinemann F, Burdach S, Ackermann R. Urological treatment and clinical course of Bk polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis in children after bone marrow transplantation. *Eur Urol* 1999; 36: 252-257.
- [11] Ost L, Lonqvist B, Eriksson L, Ljungman P, Ringden O. Hemorrhagic cystitis a manifestation of graft versus host disease? *Bone Marrow Transplant* 1987; 2: 19-25.
- [12] Bogdanovic G, Ljungman P, Wang F, Dalianis T. Presence of human polyomavirus DNA in the peripheral circulation of bone marrow transplant patients with and without hemorrhagic cystitis. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 573-576.
- [13] Bogdanovic G, Priftakis P, Taemmeraes B, Gustafsson A, Flaegstad T, Winiarski J, Dalianis T. Primary Bk virus (Bkv)

می‌کرد و این پرایمر هم برای ویروس BK و هم برای ویروس JC استفاده می‌شد [۱۶]. دومین امتیاز این است که چون تشخیص ناحیه‌ی کد کننده‌ی VP1 همیشه با PCR ممکن نیست [۲۲، ۱۷] (حتی اگر از وجود ویروس BK اطمینان داشته باشیم) این به احتمال وقوع اشتباه در استفاده از پرایمر VP1 برای Real Time PCR می‌افزاید [۱۶]. در نتیجه روش QR-PCR که ما برای آنالیز نمونه‌های مثبت ادرار استفاده کردیم کاملاً مناسب است و خطر آلودگی در این روش کمتر از PCR کمی است.

به هر حال، برای کاربردهای روتین کلینیکی بهتر است که علاوه بر سیستم QR-PCR از سیستم Nested PCR کمی با حساسیت تشخیصی ۱۰ عدد ویروس BK و ویروس JC هم استفاده شود. البته در حالتی که از ویروس BK نتیجه‌ی منفی گرفته شود [۲۳].

علاوه بر این اگر سیستم اتوماتیک برای انجام تست PCR وجود داشته باشد یک امتیاز خواهد بود، زیرا مقادیر DNA استاندارد و نمونه‌ی مورد تست باید با دقت بسیار برداشته شود.

در نهایت اگر قرار است که از روش Real Time PCR برای تعیین آغاز درمان بیماری HC استفاده شود باید تلاش بیشتری در ارزیابی تعداد نسخه‌های ویروس BK صورت گیرد، چرا که ممکن است به طور بالقوه موجب خطر HC شود.

از نتایج ما برداشت می‌شود که اگر مقدار ویروس BK بالاتر از 10^4 μ l باشد خطر ابتلا به بیماری HC را مطرح می‌کند. اما داشتن این تعداد ویروس BK در برخی از افراد منتهی به بیماری HC نمی‌شود و قابل درمان خواهد بود.

به طور خلاصه ما در این مطالعه تفاوت معنی‌داری که بیان‌گر این موضوع باشد که موتاسیون ناحیه‌ی SP1 در ویروس BK موجب می‌شود که بیماران HC در مقایسه با بیماران بدون HC مقادیر بیشتری از ویروس BK را داشته باشند بدست نیاوردیم. اما ما نشان دادیم که روش R.T-PCR

- [18] Cassill JA, Subramani S. A naturally occurring deletion in the enhancer repeats of the human papovavirus Bk optimizes early enhancer function at the expense of late promoter activity. *Virology* 1989; 170: 296–298.
- [19] Sundsfjord A, Johansen T, Flaegstad T, Moens U, Villand P, Subramani S, Traavik T. At least two types of control regions can be found among naturally occurring Bk virus strains. *J Virol* 1990; 64: 3864–3671.
- [20] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time quantitative Pcr. *Genome Res* 1996;6: 986–994.
- [21] Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for Real Time quantitative Rt-Pcr. *Genome Res* 1996;6: 995-1001.
- [22] Degener AM, Pietropaolo V, Di Taranto C, Li J, Ameglio F, Cordiali-Fei P, Trento E, Sinibaldi L, Orsi N. Identification of a new control region in the genome of Ddp strain of Bk virus isolated from Pbmc. *J Med Virol* 1999; 58: 413–419.
- [23] Bogdanovic G, Brytting M, Cinque P, Grandien M, Fridell E, Ljungman M, Lo`nnqvist B, Hammarin A-L. Nested Pcr for detection of Bk virus and Jc virus DNA. *Clin Diagn Virol*. 1994; 211: 2 -20.
- infection due to possible Bkv transmission during bone marrow transplantation is not the major cause of hemorrhagic cystitis in transplanted children. *Pediatr Transplant*. 1998; 2: 288-293.
- [14] Jin L, Pietropaolo V, Booth JC, Ward KH, Brown DW. Prevalence and distribution of virus subtypes in healthy people and immunocompromised patients detected by Pcr-restriction enzyme analysis. *Clin Diagn Virol* 1995; 3:285–295.
- [15] Azzi A, Cesaro S, Laszlo D, Zakrzewska K, Ciappi S, De Santis R, Fanci R, Pesavento G, Calore E, Bosi A. Human polyomavirus Bk (Bkv) load and haemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation patients [in process citation] *J Clin Virol* 1999; 14: 79–86.
- [16] Biel SS, Held TK, Landt O, Niedrig M, Gelderblom HR, Siegert W, Nitsche A. Rapid quantification and differentiation of human polyomavirus DNA in undiluted urine from patients after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 3689-3695.
- [17] Priftakis P, Bogdanovic G, Kalantari M, Dalianis T. Overrepresentation of point mutations in the Sp1 site of the non-coding control region of Bk virus in bone marrow transplanted patients with haemorrhagic cystitis. *J Clin Virol*. 2001; 21: 1-7.

BK virus (BKV) quantification in urine samples of bone marrow transplanted patients is helpful for diagnosis of hemorrhagic cystitis

P. Kokhaei (Ph.D)^{*1}, L. Kokhaei (B.Sc)², B. Sadighimoghadam (M.Sc)¹, G. Mossayebi (Ph.D)³

1- Dept. of Immunology, Semnan Medical University, Semnan Iran.

2 - Department of Biology, Arak University, Arak, Iran.

3 - Department of Immunology & Microbiology, Arak Medical University Arak, Iran.

Background: Hemorrhagic cystitis (HC) in allogeneic bone marrow transplanted (BMT) patients is associated with BK virus (BKV) reactivation manifested as BK viruria. However, since 77–90% of all adult BMT patients excrete BKV, viral reactivation alone cannot be responsible for HC. Recently, a significant overrepresentation of C→G mutations in the Sp1 binding site in the non-coding control region (NCCR) of BKV was shown to be present in HC patients and absent in non-HC patients. We aimed to investigate if this mutation resulted in excessive BKV excretion in HC patients. Study design: A Real-Time PCR was developed and used to quantify BKV in urine samples from 21 patients with HC, with and without the mutations, as well as from patients without HC.

Material and method: A Real-Time PCR was developed and used to quantify BKV in urine samples from 21 patients with HC, with and without the mutations, as well as from patients without HC

Results: Quantification of BKV was successful in 18 of 21 urine patients (six with and six without C→G mutations) and six patients without HC. A mean of 3.0×10^6 BKV copies/ μ l was detected in urine samples of HC patients with C→G mutations, compared to a mean of 1.5×10^6 BKV copies/ μ l in HC patients without C→G mutations and a mean of 1.0×10^6 BKV copies/ μ l in patients without HC. The obtained differences were however not statistically significant, due to one individual non-HC patient with an extremely high BKV copy number. Nevertheless, while 50% of the samples in the HC groups expressed 1×10^6 copies/ μ l or more, only one of the samples in the non-HC group contained a virus quantity higher than 5×10^5 copies.

Conclusions: Although we could not confirm that the C→G mutations in the Sp1 site of BKV were responsible for an increased viral load in patients with HC, our data suggest that levels of BKV above 10^4 copies/ μ l may indicate a risk for HC.

Keywords: Bone marrow transplantation; BKV; Real-time PCR; Hemorrhagic cystitis

* Corresponding author: Fax: +98 231 3354162; Tel: +98 231 3354161
parviz.kokhaei@ki.se