Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 18:50 +0330 on Tuesday November 21st 2017

مطالعه سرواپیدمیولوژیک HTLV در مبتلایان به تالاسمی، هموفیلی و همودیالیزی استان هرمزگان

دکتر فرشید عابدی [۱] دکتر مجید یاوریان [۲] آرش شکیب‌زاده [۳] بهمن خلوتی [۳] دکتر امیرحسن اسدی [۴]

[۱] مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی، [۴] سازمان انتقال خون، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان [۲] استادیار گروه ژنتیک، [۳] مرکز تحقیقات هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

مجله پزشکی هرمزگان سال سیزدهم شماره دوم تابستان ۸۸ صفحات ۸۰-۷۵

چکیده

مقدمه: *انتقال آلودگی‌های ویروسی در افرادی که مکرراً خون و یا فرآورده‌های خونی دریافت می‌کنند، مانند بیماران تالاسمی، هموفیلی و همودیالیزی شایع می‌باشد. ویروس HTLV (human T-lymphotropic virus) یکی از رتروویروس‌های است که از طریق خون منتقل می‌گردد. این ویروس در ایران تنها در ناحیه خراسان بصورت اندمیک وجود دارد. در این مطالعه احتمال وجود HTLV در بیماران تالاسمی، هموفیلی و افراد همودیالیزی ساکن استان هرمزگان مورد بررسی قرار گرفت.*

روش کار: در این بررسی سرواپیدمیولوژیک، در طی یک دوره ٦ ماهه (۷-۱۳۸٦) تعداد ۲۱۰ نفر (۹۸ زن و ۱۱۲ مرد) شامل ۱٦۳ نفر بیماران هموزیگوت تالاسمی، ٤۰ نفر بیمار همودیالیزی و ۷ نفر نیز بیمار هموفیلی A بطور تصادفی انتخاب شدند. پس از کسب رضایت خون‌گیری از بیماران بعمل آمد. سرم به منظور جست‌وجوی آنتی‌بادی ضد HTLV 1&2، به روش ELISA کنترل و با روش وسترن بلات و PCR تأیید شدند.

نتایج: *یافته‌ها نشان می‌داد که ۳/۰٦٪ از بیماران تالاسمی (٥ نفر) دارای آنتی‌بادی علیه HTLV تیپ یک بودند که نسبت به درصد شیوع HTLV در افراد سالم به مراتب بالاتر است. HTLV تیپ ۲ در این مطالعه مشاهد نشد.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد بیماران تالاسمی احتمالاً در نتیجهٔ انتقال خون seropositive شده باشند. فرآورده‌های غیرسلولی (پلاسما) خطر انتقال در حد صفر دارند. احتمالاً ویروس HTLV به منطقه خراسان محدود نمی‌شود.*

کلیدواژه‌ها: *تالاسمی – هموفیلی – همودیالیز – HTLV-I*

نویسنده مسئول:
دکتر مجید یاوریان
دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
شیراز - ایران
تلفن: ۰۹۱۷۳٦۱۲۰٥۹
پست الکترونیکی:
yavarian@sums.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۷/۳/۲۸ اصلاح نهایی: ۸۷/۱۱/۳ پذیرش مقاله: ۸۸/۲/٦

مقدمه:

Human T-Lymphotropic Virus (HTLV) یک ویروس لنفوتروپیک T انسانی جزء خانواده رتروویروس‌ها و از زیرخانواده انکوویروینه می‌باشد که نخستین بار توسط رابرت گالو و همکارانش (سال ۱۹۸۱) از یک بیمار مبتلا به لوسمی سلولهای T انسانی جداسازی شد (۱). این ویروس دارای چهار تیپ ۱-٤ می‌باشد (۲). تیپ‌های ۱ و ۲ شیوع بیشتر دارد و تیپ‌های ۳ و ٤ اخیراً از افریقا گزارش شده است (۳،٤). تیپ ۱ HTLV، در عده‌ای از بزرگسالان لوسمی لنفوسیتی T ایجاد می‌کند که لنفوسیت‌های CD4+ را درگیر می‌کند (٥). علاوه بر لوسمی یکسری بیماریهای مرتبط با لنفوسیت نظیر میلوپاتی یا فلج ناقص اسپاسمی مناطق حاره‌ای (HAM = tropical spastic paraparesis) نیز دیده می‌شود (٦). در تیپ ۲ HTLV، مواردی از لوسمی سلول‌های کناره مویی (Hairy cell Leukemia) (۷) و بیماریهای نورولوژیک گزارش شده است (۱۰-۸).

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 18:50 +0330 on Tuesday November 21st 2017

طریقه سرایت HTLV همانند HIV با تماس سلول با سلول لنفوسیت T آلوده منتقل می‌گردد. تزریق خون، تماس جنسی، تغذیه از شیر مادر آلوده به ویروس و سر سوزن آلوده انتشار می‌یابد (١٤-١١). آنتی‌بادی ضد HTLV بعد از مدت کوتاهی در سرم افراد مشاهده می‌گردد که این آنتی‌بادی قادر به حذف سلول آلوده از بدن نمی‌باشد (١٥).

دوره نهفتگی عفونت و بروز علائم بیماری لوسمی لنفوسیتیT (ATL) ٢٠ تا ٣٠ سال (١٦) و در مورد HAM اغلب موارد بروز بیماری در دهه‌های سوم و چهارم دیده شده است (١٧).

بررسی سرواپیدمیولوژی این ویروس نشان می‌دهد که در اغلب کشورهای جهان وجود دارد و برآورد شده که حدود ١٥ الی ٢٠ میلیون نفر ناقل ویروس در جهان پراکنده باشند (١٨). پراکندگی تیپ‌های مختلف آن در مناطق مختلف جهان یکسان نیست. HTLV تیپ یک در بعضی از مناطق جهان نظیر ژاپن در گروه خاص قومی از فراوانی بالاتری (٣٧٪) برخوردار است و قسمت‌هایی دیگر جهان از اروپا مثل فرانسه (٠/٠٠٣٩٪) دارای پایین‌ترین فراوانی می‌باشد (١٩). HTLV تیپ ٢ در مقایسه با تیپ ١ بمراتب شیوع کمتری دارد و تیپ‌های ٣ و ٤ فقط در مناطقی از افریقا مشاهده و گزارش شده است.

در ایران نخستین بار از استان خراسان ویروس HTLV گزارش شد (٢٠) و متعاقب آن مواردی از بیماری فلج ناشی از HTLV در همان استان گزارش گردید (٢١). گزارشاتی از وجود این ویروس در سایر استانهای ایران وجود دارد از جمله موردی از لوسمی لنفوسیت T از یک خانواده مشهدی ساکن شیراز (٢٢).

بررسی‌های صورت گرفته در نقاط مختلف دنیا نشان می‌دهد درصد قابل توجهی از انتقال این ویروس در جامعه از طریق کیسه‌های خون آلوده می‌باشد (١٩،٢٣) و بیماران تالاسمی و همودیالیزی در این میان از افراد پرخطر محسوب می‌شود.

در هرمزگان مطالعه‌ای در خصوص فراوانی ناقلین ویروس HTLV و وضعیت افراد پرخطر در دسترس نیست. لذا این مطالعه برای بررسی وضعیت سرواپیدمیولوژیک این ویروس در افراد اهداءکننده سالم، بیماران تالاسمی وابسته به خون، هموفیلی و همودیالیزی هرمزگان انجام گرفت.

روش کار:

در طی مدت شش ماه (مهر - اسفند ١٣٨٦)، ٢١٠ نفر (٩٨ زن و ١١٢ مرد) از بیماران بطور تصادفی انتخاب و پس از کسب رضایت از بیمار و یا والدین جهت بررسی آلودگی HTLV نمونه‌برداری گردید. از کل بیماران انتخاب شده ١٦٣ نفر (٧٧/٦٪) تالاسمی، ٤٠ نفر (١٩/٠٤٪) همودیالیزی و ٧ نفر(٣/٣٣٪) هموفیلی بودند. مقدار ٤cc نمونه خون به Edat جهت بررسی ژنومی و همین مقدار خون لخته برای آزمایشات سرولوژیک از بیماران گرفته شد. تعداد ١١٠٠ نفر داوطلب اهداء خون نیز بعنوان جمعیت کنترل بطور تصادفی انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند.

نمونه خون بلافاصله به منظور جداسازی سرم با دور ٣٢٠٠ و به مدت ١٠ دقیقه سانتریفیوژ و سرم جداسازی شد. تا روز انجام تست ELISA در فریزر ٢٠- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

به منظور جست و جوی آنتی‌بادی، کیت ELISA (شرکت Gene lab، آلمان) و برای تأیید روش وسترن بلات (HTLV blot kit; Gene Lab، آلمان) و PCR مورد استفاده قرار گرفت.

PCR برای تأیید نمونه‌هایی که در آزمون ELISA نتایج مثبت و یا مشکوک (border line) بود بر اساس روش انجام شده Kwok و همکارانش (٢٤) با تغییراتی صورت گرفت. بطور خلاصه، پرایمرهای خاص ناحیه pol در HTLV تیپ ١ و ٢ (SK 110 و SK111) انتخاب شد و شرایط PCR بدین ترتیب بود: ٩٥ درجه ١ دقیقه، ٥٥ درجه ١ دقیقه و ٧٢ درجه ١ دقیقه با ٣٥ سیکل.

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 18:50 +0330 on Tuesday November 21st 2017

محصولات بدست آمده پس از الکتروفورز آگاروز و با اتیدیوم بروماید شناسایی گردید.

نتایج با استفاده از روشهای توصیفی ارائه شدند.

نتایج:

این مطالعه بر روی ۲۱۰ بیمار که دریافت کننده مکرر خون یا فرآورده آن بودند، انجام شد و این بیماران به سه گروه تالاسمی، هموفیلی و همودیالیز تعلق داشتند. طیف سنی بیماران از ۹ سال تا ۷۹ سال متغیر بود و عمده افراد میانسال و بالاتر را بیماران دیالیزی تشکیل می‌دادند. از میان این سه گروه آزمایش الیزا فقط در پنج نفر (۳/۰۶٪) از افراد تالاسمی مثبت و سپس تأیید شد که سه نفر از آنها مذکر و دو نفر مونث بودند. افراد مثبت به طور توسط حدود ٥٤٦ کیسه خون از بدو شروع خونگیری تا زمان بررسی حاضر دریافت کرده بودند و مشخصات کامل افراد مثبت در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

نمونه‌های افراد همودیالیز و هموفیلی همگی علی‌رغم سابقه دریافت فرآورده خونی از نظر آنتی HTLV منفی بودند. از تعداد ۱۱۰۰ اهداء کننده خون ۲ مورد مثبت (۰/۱۸٪) بود که با ۹۵٪ اطمینان بین ۰٪ - ۰/٤۳٪ متغییر است. اکثریت اهداء کننده‌گان مرد بودند و دو موارد مثبت نیز مذکر بود.

کلیه موارد مثبت در آزمون ELISA در PCR از نوع HTLV تیپ یک بود و هیچ مورد HTLV تیپ ۲ در PCR شناسایی نشد. از ۱۰ مورد مشکوک در ELISA که تیتری نزدیک به Cutoff بود تنها یک مورد باند ضعیف محصول PCR نشادن داد که بیمار تالاسمی جهت پیگیری و تکرار آزمایشات اقدام شد ولی در این مطالعه جزئی آمار محسوب نگردید.

جدول شماره ۱- مشخصات بیماران تالاسمی با آزمایش الیزای مثبت

شماره بیمار	جنسیت	سن	برداشتن طحال	دریافت خون خارج از مرکز استان	کیسه‌های خون دریافتی	تیتر الیزا (IU)	شروع خونگیری (ماه)
۱	مرد	۱۵ سال	خیر	خیر	٤٦٨	۱/۸۱٦	۲٤
۲	مرد	۱۲ سال	خیر	بله (مشهد)	۲٦٤	۳/۲۸٤	۱۲
۳	مرد	۲۵ سال	بله	بله (مشهد)	٥٦٤	۳/٦٥٤	۳٦
۴	زن	۲۱ سال	خیر	بله (میناب)	۷۲۰	۳/٤۹۷	۷۲
۵	زن	۲۱ سال	خیر	خیر	۷۲۰	۱/٦۰۸	۱۱

بحث و نتیجه‌گیری:

در ایران منطقه خراسان بعنوان منطقه اندمیک شناخته می‌شود (۲۷-۲۵). میزان شیوع این ویروس در افراد سالم جامعه جهانی ۰/۰۸٪ گزارش شده است (۱ به ۱۲۷۰). اخیراً در بعضی از گزارشات از مناطق دیگر نظیر چهارمحال بختیاری این میزان ۰/٦۲٪ بدست آمده است. در این مطالعه هرمزگان با حدود ۰/۱۸٪ نسبتاً به جامعه جهانی بالاتر ولی در مقایسه با بعضی از استان ها شیوع کمتری دارد.

عوارض ناشی از HTLV متأسفانه دیر هنگام ظاهر می‌گردد. بروز ATL در افراد آلوده شده بوسیله فرآورده های خونی نادر است (۲۸،۲۹) ولی حدود ۲۰٪ از افراد مبتلا به HAM ویروسی، HTLV را از خون آلوده کسب کرده‌اند. در برخی موارد نادر، بیماران دچار HAM سرونگاتیو هستند ولی آنتی‌بادی قابل شناسایی ضد HTLV را در مایع مغزی نخاعی دارند (۲۸) خطر نسبی در طول زندگی برای ایجاد ATL (Adult T-cell leukemia) در افراد آلوده به HTLV، ۳٪ است.

بروز ATL در افراد ناقل HTLV-1 در هر ۱۵۰۰ نفر یک نفر برآورد می‌شود، بنظر می‌رسد زمان نسبتاً طولانی بین ابتلا به بیماری و بروز ATL وجود داشته باشد. چهار نوع بالینی از لوسمی ایجاد شده بوسیله HTLV توصیف شده است. حاد، لنفوماتوز، مزمن و

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 18:50 +0330 on Tuesday November 21st 2017

نهفته. همه این تومورها حاصل پرولیفراسیون مونوکلونال سلولهای T_{CD4}+ همراه با ادغام پروویروسی کلونال ژن رسپتور T cell هستند (۳۰).

خطر جمعی برای بروز myelopathy/tropical HAM/TSP(spastic paraparesis) نیز مشابه همین است و بیشتر از ۹۵٪ از افراد مبتلا شواهد سرولوژیک عفونت HTLV را نشان می دهند (۸).

در مقایسه با ATL شیوع بیماری مردان کمی بیشتر از زنان می‌باشد ولی برعکس HAM زنان را بسیار بیشتر از مردان مبتلا می‌کند (۱۹). HAM از بعضی از جهات مشابه مولتیپل اسکلروز است. شروع این بیماری بی‌سروصدا است و علائم آن شامل ضعف یا سستی، درد یک یا هر دو پا، کمردرد و بی‌اختیاری ادراری می‌باشد. تغییرات حسی معمولاً خفیف هستند اما ممکن است نوروپاتی محیطی ایجاد شود (۲۸،۳۱،۳۲) که به طور میانگین ٤٤٥ کیسه خون دریافت کرده بودند.

این مطالعه که اولین بررسی سرواپیدمیولوژی HTLV (تیپ۱&۲) در استان هرمزگان بود بر روی دریافت کنندگان مکرر فرآورده‌های خونی صورت گرفت. الیزا انجام شده بر روی بیماران هموفیلی و همودیالیزی مارکر سرولوژِی مثبتی را نشان نمی‌داد که بدلیل انتقال سلول به سلول احتمالاً این گروه کمتر به نسبت افراد تالاسمی در معرض خطر پائین‌تری قرار دارند. از ۱٦۳ بیمار تالاسمی بررسی شده، پنج نفر از آنها دارای آنتی‌بادی مثبت بر علیه HTLVI/II بودند که با تعمیم این میزان به کل جمعیت تالاسمی استان (۷۰۰ بیمار) با احتمال آلودگی ۳/۰٦٪ پیش‌بینی می‌گردد حدود ۲۱ نفر آلوده عفونت HTLV وجود داشته باشد.

افراد تالاسمی مورد مطالعه به طور میانگین ٤٤٥ کیسه خون دریافت کرده بودند و در بین این بیماران، ٦۰ نفر (۳٦/۸٪) از آنها طحال خود را برداشته بودند و تعداد ۷۳ نفر (٤۲/۹٪) از آنها سابقه دریافت خون از مراکز خارج از استان را نیز داشتند. از ٥ نفر بیمار آنتی‌بادی مثبت، ۲ نفر دارای سابقه دریافت خون از مشهد بودند و احتمال ابتلا شدن به این ویروس از طریق کیسه‌های خون مشهد وجود دارد که با انجام تست PCR از تیپ یک بود.

References منابع

1. Gallo RC. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*. 2005; 2:17.
2. Lairmore M, Franchini G. Human T-Cell Leukemia Virus Types 1 and 2. In: Virology 5. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Melnick JL, et al. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007:2071-2106.
3. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(22):7994-7999.
4. Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology*. 2005;2(1):30.
5. Takatsuki K. Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrovirology*. 2005;2:16.
6. Osame M, Igata A, Matsumoto M, Usuku K, Izumo S, Kosaka K. HTLV-I associated myelopathy: A report of 85 cases. *Ann Neurol*. 1987;22:116.
7. Rosenblatt JD, Giorgi JV, Golde DW, Ezra JB, Wu A, Winberg CD, et al. Integrated human T-cell leukemia virus II genome in CD8 + T cells from a patient with "atypica" hairy cell leukemia: evidence for distinct T and B cell lymphoproliferative disorders. *Blood*. 1988;71:363-369.
8. Berger JR, Svenningsson A, Raffanti S, Resnick L. Tropical spastic paraparesis-like illness occurring in a patient dually infected with HIV-1 and HTLV-II. *Neurology*. 1991;41:5-7.

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 18:50 +0330 on Tuesday November 21st 2017

9. Hjelle B, Appenzeller O, Mills R, Alexander S, Torrez-Martinez N, Jahnke R, et al. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *Lancet*. 1992;339:645-646.

10. Harrington WJ, Sheremata W, Hjelle B, Dube DK, Bradshaw P, Foung SK, et al. Spastic ataxia associated with human T-cell lymphotropic virus type II infection. *Annals Neurol*. 1993;7:1031-1034.

11. Ehrlich GD, Glaser JB, La Vigne K, Quan D, Mildvan D, Sninsky JJ, et al. Prevalence of human T-cell leukemia/lymphomavirus (HTLV) type II infection among high risk individuals: Type specific identification of HTLVs by polymerase chain reaction. *Blood*. 1989;74:1658–1664.

12. Hjelle B, Scalf R, Swenson S. High frequency of human T-cell leukemia-lymphoma virus type II infection in New Mexico blood donors: Determination by sequence-specific oligonucleotide hybridization. *Blood*. 1990;76:450–454.

13. Saji F, Ohashi K, Tokugawa Y, Kamiura S, Azuma C, Tanizawa O. Perinatal infection of Human T-lymphotropic virus type I, the etiologic virus of ATL/L. DNA amplification of specific HTLV-I sequences. *Cancer*. 1990;66:1933–1937.

14. Sullivan MT, Williams AE, Fang CT, Notari EP, Poiesz BJ, Ehrlich GD. Transmission of human T-lymphotrophic virus types I and II by blood transfusion. *Arch Intern Med*. 1991;151:2043–2048.

15. Andersson S, Thorstensson R, Godoy Ramirez K, Krook A, von Sydow M, Dias F, et al. Comparative evolution of 14 immunoassays for the detection of antibodies to the human T lymphotropic virus type I and II using panels of sera from Sweden and West Africa. *Transfusion*. 1999;39:845–851.

16. Shimoyama M, Minato K, Tobinai K, Naqari M, Setoya T, Takenaka T, et al. Atypical adult T-cell leukemia-lymphoma: Diverse cl.inical manifestations of adult T-cell leukemia-lymphoma. *Jpn J Clin Oncol*. 1983;13:165–188.

17. shimada K, Koh CS, Yanagisawa N, Tsukada N, Osame M. Anti-lymphocyte antibodies and circulating immune complexes in the sera of patients with myelopathy associated with human T lymphotropic virus type-I. *J Neuroimmunol*. 1993;42:161–166.

18. de The G, Kazanji M. An HTLV-I/II vaccine: from animal model to clinical trials? *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1996;13:191–198.

19. Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. 2005;24(39):6058-6068.

20. Farid R, Etemadi M. Seroepidemiology and virology of HTLV 1. *Serodiagn Immunother Infectious disease*. 1993;5:251-252.

21. Farid R, Shirdel A. Phylogenetic of HTLV 1 in Iranians born in Mashhad. *Arch Irn Med*. 1999;2:24-25.

22. Sadeghipour A, Khodadad K. The first report of familial adult T-cell leukemia/lymphoma in Iran. *Turkish Journal of Cancer*. 2005;35(3):136-137.

23. Kakuda K, Ikematsu H, Chong WL, Hayashi J, Kashiwagi S. Molecular epidemiology of human T lymphotropic virus type 1 transmission in Okinawa, Japan. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(4):404-408.

24. Kwok S, Kellogg D, Ehrlich G, Poiesz B, Bhagavati S, Sninsky JJ. Characterization of a sequence of human T cell leukemia virus type I from a patient with chronic progressive myelopathy. *J Infect Dis*. 1998;158:1193-1197.

25. Kakuda K, Ikematsu H, Yong Chong WL, Hayashi J, Kashiwagi S. Molecular Epidemiology of human T lymphotropic virus type 1 transmission in Okinawa, Japan. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(4): 404-408.

26. Abbaszadegan MR, Gholamin M, Tabatabaee A, Farid R, Houshmand M, Abbaszadegan M. Prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 among blood donors from Mashhad, Iran. *J Clin Microbiol*. 2003;41(6):2593-2595.

27. Hinuma Y. Seroepidemiology of adult T-cell leukemia virus (HTLV-I/ATLV): Origin of virus carriers in Japan. *AIDS Res*. 1986;2:517–522.

28. Gessain A, Gout O. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type 1(HTLV1). *Ann Intern Med*. 1992;117(11):933-946.

29. Anngela anns, Milery WJ. Quantitive proviral DNA and Antibody levels in natural history of HTLV1 infection. *The Journal of Infectious Disease*. 1999;180:1487-1493.

30. Tajima K. The 4th nation-wide study of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: estimates of risk of ATL and its geographical and clinical features. The T- and B-cell Malignancy Study Group. *Int J Cancer*. 1990;45(2):237-243.

31. Araujo Ade Q, Alfonso CR. Clinical and demographic features of HTLV 1 associated myelopathy/Tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in rio de janerio, Brazil. *Acta Neural Scand*. 1993:88(1):59-62.

32. Oger J. HTLV-1 infection and the viral etiology of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2007;262(1-2):100-104.

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 18:50 +0330 on Tuesday November 21st 2017