

Επίπτωση και μοριακός χαρακτηρισμός του HHV-8 στο σάρκωμα Kaposi σε ασθενείς μετά από μεταμόσχευση νεφρού

ΣΚΟΠΟΣ Η επίπτωση του σαρκώματος Kaposi (ΣΚ) στους μεταμοσχευμένους ασθενείς είναι κατά πολύ υψηλότερη συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό. Η υποβοηθούμενη από την ανοσοκαταστολή εκδήλωση ΣΚ στις μεταμοσχεύσεις μπορεί να σχετίζεται τόσο με την πιθανή παρουσία του HHV-8 στους ασθενείς πριν από τη μεταμόσχευση, ειδικά στις περιοχές που θεωρούνται ενδημικές, όσο και με τον αυξημένο κίνδυνο μετάδοσης του ιού μέσω προσβεβλημένων μοσχευμάτων. Σκοπός της εργασίας ήταν η εκτίμηση της συσχέτισης του HHV-8 με την ανάπτυξη ΣΚ στους Έλληνες ασθενείς ύστερα από μεταμόσχευση νεφρού και ο μοριακός χαρακτηρισμός του HHV-8 με ανάλυση των πολυμορφικών περιοχών των γονιδίων *ORF-26* και *ORF-K1*. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Εξετάστηκαν δείγματα αίματος ή ιστών ασθενών με νεφρικό μόσχευμα, οι οποίοι ανέπτυξαν ΣΚ, και δείγματα μεταμοσχευμένων ασθενών που δεν ανέπτυξαν ΣΚ. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ασθενών με κλασικό ΣΚ, ασθενών με AIDS-σχετιζόμενο ΣΚ και δείγματα υγιών ατόμων. Η ανίχνευση του HHV-8 πραγματοποιήθηκε με ένθετη PCR (nested) και επιβεβαιώθηκε με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η γονοτυπική ταξινόμηση πραγματοποιήθηκε με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πολυμορφικών περιοχών των γονιδίων *ORF-26* και *ORF-K1*. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** 18 από τους 1055 μεταμοσχευμένους ασθενείς κατά την περίοδο 1983–2001 ανέπτυξαν ΣΚ. DNA του HHV-8 ανιχνεύτηκε σε 93,3% των μεταμοσχευμένων ασθενών με ΣΚ, σε 10% των μεταμοσχευμένων ασθενών χωρίς ΣΚ και σε 100% των ασθενών με κλασικό και AIDS-σχετιζόμενο ΣΚ που εξετάστηκαν και σε ποσοστό 16,7% στα υγιή άτομα. Όσον αφορά στο μοριακό χαρακτηρισμό του HHV-8, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μια πιθανή συσχέτιση του C3 γονότυπου με το ΣΚ μετά από μεταμόσχευση νεφρού, του A4 με το AIDS-σχετιζόμενο ΣΚ και του A1 με το κλασικό ΣΚ. Τα στελέχη HHV-8 που ανιχνεύθηκαν στα άτομα χωρίς ΣΚ κατανέμονται στους C1, C3 και A1 γονότυπους. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Το 1,7% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση νεφρού ανέπτυξαν ΣΚ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο C3 γονότυπος του HHV-8 σχετίζεται με την ανάπτυξη ΣΚ σε αυτές τις περιπτώσεις.

Το σάρκωμα Kaposi (ΣΚ) είναι μια σπάνια νεοπλασία, που παρουσιάζεται με ερυθρο-ιώδεις έως κυανές κηλίδες, πλάκες και οζίδια στο δέρμα και σε άλλα όργανα. Έχουν περιγραφεί 4 βασικοί τύποι:¹ (α) ο σποραδικός ή κλασικός υπότυπος, (β) ο ενδημικός τύπος, που παρατηρείται κυρίως στην Αφρική, (γ) ο επιδημικός τύπος, που συναντάται σε ασθενείς με HIV-λοίμωξη, και (δ) ο ιατρογενής τύπος, σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ανοσοκατασταλτική θεραπεία, κυρίως ύστερα από μεταμοσχεύσεις οργάνων.

Η επίπτωση του ΣΚ στους μεταμοσχευμένους ασθενείς είναι κατά πολύ υψηλότερη συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό.² Η συχνότητα των περιπτώσεων ΣΚ μετά από μεταμόσχευση νεφρού ποικίλλει ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση των ασθενών (πίν. 1) και σχετίζεται άμεσα με τη χορηγούμενη ανοσοκατασταλτική αγωγή.^{3–10} Το ιατρογενές ΣΚ μετά τη μεταμόσχευση προσβάλλει κυρίως ασθενείς χωρών της Μεσογείου, της Αφρικής, καθώς και των χωρών της Καραϊβικής.¹¹ Οι ίδιες πληθυσμιακές ομάδες προσβάλλονται επίσης από κλασικό ή ενδημικό ΣΚ σε μεγαλύτερη συχνότητα.

Γ. Ζαββός,¹
Ι. Παπακωνσταντίνου,¹
Μ. Γαζούλη,²
Β. Μεταξά-Μαριάτου,³
Ι. Μπόκος,¹
Π. Αραπαντώνη-Δαδιώτη,⁴
Κ. Γιασθιακιώτης,⁵
Γ. Νασιούλης,³
Α. Κωστάκης¹

¹Μονάδα Μεταμοσχεύσεων, «Λαϊκό»
Νοσοκομείο, Αθήνα

²Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας,
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

³Ερευνητικό Κέντρο Μοριακής Βιολογίας,
Νοσοκομείο «Υγεία»-«Αντώνης Παπαγιάν-
νης», Αθήνα

⁴Τμήμα Παθολογικής Ανατομικής,
Αντικαρκινικό Νοσοκομείο «Μεταξά»,
Πειραιάς

Incidence and molecular
characterization of HHV-8
in Kaposi's sarcoma among renal
transplant recipients

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

HHV-8
Μεταμόσχευση νεφρού
Σάρκωμα Kaposi

Υποβλήθηκε 1.9.2003
Εγκρίθηκε 24.10.2003

Πίνακας 1. Συχνότητα ανάπτυξης σαρκώματος Kaposi (ΣΚ) ύστερα από μεταμόσχευση νεφρού.¹¹

Χώρα και πόλη	Ασθενείς με ΣΚ (%)	Αριθμός μεταμοσχευμένων ασθενών
Αυστραλία/Σίδνεϊ	0,17	4241
Καναδάς/Τορόντο	0,54	1300
Αγγλία/Λονδίνο	0,31	1304
Γαλλία/Λυόν	0,48	2500
Γερμανία/Ανόβερο	0,06	1497
Ιταλία/Μιλάνο	1,5	854
Ρώμη	3,3	320
Ισραήλ/Petah Tikva	2,4	330
Ισπανία/Μαδρίτη	0,5	609
Ελλάδα/Αθήνα (παρούσα μελέτη)	1,7	1055

Όπως σε όλες τις μορφές ΣΚ, έτσι και το ιατρογενές σχετίζεται με την παρουσία του HHV-8, αν και δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί εάν η εμφάνιση του συγκεκριμένου τύπου ΣΚ οφείλεται σε επαναδραστηριοποίηση του HHV-8 ή σε πρωτογενή μόλυνση του ασθενούς μέσω του μοσχεύματος.¹²⁻¹⁴

Διάφοροι υπότυποι του HHV-8, όπως καθορίζονται από τη συγκεκριμένη αλληλουχία των πολυμορφικών περιοχών των *ORF-K1* και *ORF-26*, έχει αναφερθεί ότι επίσης σχετίζονται με τη γεωγραφική προέλευση των ασθενών. Ωστόσο, δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν συγκεκριμένοι υπότυποι του HHV-8 ενοχοποιούνται για συγκεκριμένους τύπους του ΣΚ.^{15,16}

Η Ελλάδα, όπως και οι άλλες Μεσογειακές χώρες, θεωρείται ενδημική περιοχή για το κλασικό ΣΚ, με την οροθετικότητα για τον HHV-8 να κυμαίνεται από 4-35% ανάλογα με την περιοχή δειγματοληψίας.¹⁷ Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν (α) να εκτιμηθεί η συσχέτιση του HHV-8 με την ανάπτυξη ΣΚ στους Έλληνες ασθενείς ύστερα από μεταμόσχευση νεφρού και (β) να χαρακτηριστούν οι υπότυποι του HHV-8 με ανάλυση των πολυμορφικών περιοχών των *ORF-26* και *ORF-K1*.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Ασθενείς

Σε 1055 μεταμοσχεύσεις νεφρού κατά το χρονικό διάστημα 1983-2001, ΣΚ εμφάνισαν 18 ασθενείς (1,7%), από τους οποίους 16 ήταν άνδρες και 2 γυναίκες. Αναδρομικά, μελετήθηκε η παρουσία του HHV-8 σε 15 διαθέσιμα δείγματα μετα-

μοσχευμένων ασθενών με ΣΚ (ΣΚ1-ΣΚ15) και σε 40 δείγματα μεταμοσχευμένων ασθενών χωρίς ΣΚ (Μ1-Μ40). Πέντε δείγματα ασθενών με AIDS-σχετιζόμενο ΣΚ (ΣΚ16-ΣΚ20), 11 δείγματα ασθενών με κλασικό ΣΚ (ΣΚ21-ΣΚ31) και 60 δείγματα υγιών ατόμων (Η1-Η60) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (πίν. 2).

Απομόνωση DNA

DNA απομονώθηκε από περιφερικό αίμα με το σύστημα QIAamp Blood Kit (Qiagen, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες.

Πίνακας 2. Κλινικο-επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με σάρκωμα Kaposi (ΣΚ).

Δείγμα	HIV-1	HHV-8 DNA		Τύπος ΣΚ*
		ORF-26	ORF-K1	
ΣΚ1	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ2	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ3	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ4	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ5	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ6	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ7	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ8	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ9	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ10	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ11	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ12	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ13	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ14	-	+	+	Ιατρογενές
ΣΚ15	-	-	-	Ιατρογενές
ΣΚ16	+	+	+	AIDS-σχετιζόμενο
ΣΚ17	+	+	+	AIDS-σχετιζόμενο
ΣΚ18	+	+	+	AIDS-σχετιζόμενο
ΣΚ19	+	+	+	AIDS-σχετιζόμενο
ΣΚ20	+	+	+	AIDS-σχετιζόμενο
ΣΚ21	-	+	+	Κλασικό
ΣΚ22	-	+	+	Κλασικό
ΣΚ23	-	+	+	Κλασικό
ΣΚ24	-	+	+	Κλασικό
ΣΚ25	-	+	+	Κλασικό
ΣΚ26	-	+	+	Κλασικό
ΣΚ27	-	+	+	Κλασικό
ΣΚ28	-	+	+	Κλασικό
ΣΚ29	-	+	+	Κλασικό
ΣΚ30	-	+	+	Κλασικό
ΣΚ31	-	+	+	Κλασικό

* Ιατρογενές: Ύστερα από μεταμόσχευση νεφρού

γίες του κατασκευαστή, και από μονιμοποιημένους σε παραφίνη ιστούς με το σύστημα QIAamp Tissue Kit (Qiagen). Έλεγχος της ακεραιότητας του DNA έγινε με τον πολλαπλασιασμό περιοχής 430 βάσεων του ανθρώπινου γονιδίου *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

Ανίχνευση του HHV-8 με ένθετη PCR (nested-PCR)

Για την αρχική εξωτερική PCR χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί ανιχνευτές (primers) HHV8AF (5' AGCACTCGCAGGGCAGTACG 3') και HHV8AR (5' GACTCTTCGCTGATGAACTGG 3') για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό περιοχής 700 βάσεων. Η διαδικασία της PCR είχε ως εξής: Αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 35 κύκλους με προφίλ θερμοκρασιών 94 °C για 30 sec, 60 °C για 30 sec και 72 °C για 45 sec. Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min. Το προϊόν της αρχικής PCR (2 μL) χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό (30 επιπλέον κύκλοι) της εσωτερικής περιοχής 233 βάσεων του KS330₂₃₃ (16) με τους ειδικούς ανιχνευτές HHV8BF (5' AGCCGAAAGGATTCCACCAT 3') και HHV8BR (5' TCCGTGTTGTCTACGTCCAG 3'). Τα θετικά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR (*Taq* DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kit and ABI 373A DNA Sequencer, Perkin-Elmer, Forest City, CA, USA).

Γονοτύπηση του HHV-8

Γονοτύπηση του HHV-8 πραγματοποιήθηκε με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των πολυμορφικών περιοχών των *ORF-K1* και *ORF-26* (ΣΚ330), όπως περιγράφεται βιβλιογραφικά.^{18,19} Η φυλογενετική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα PHYLIP package, version 3.5C. Τα πρότυπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν A1(BCBL-R), A4(BCBL-B), A5(Ug374), B1(431KAP), B2(Ug81), B2*(UgD1), BCBL-1, C1(ASM72), C3(BC2), C3(BC3), D1(ΤΣΚ10) και D2(ΖΣΚ3). Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αυτών είναι διαθέσιμες στην GenBank (κωδικός AF133038 έως AF133044, AF130289, AF130291, AF13092, AF170531 και U86667).

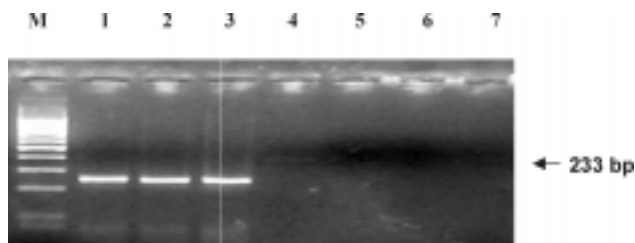
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τους 1055 ασθενείς της μελέτης, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση νεφρού τα τελευταία 18 χρόνια, ΣΚ εμφάνισαν 18 (1,7%). Ο χρόνος εμφάνισης του ΣΚ κυμάνθηκε από 6–102 μήνες (24,7±23,5 μήνες) μετά τη μεταμόσχευση. Δείγματα από 15 ασθενείς ήταν διαθέσιμα για περαιτέρω αναδρομική ανάλυση. HHV-8 DNA εντοπίστηκε σε 14 από τους 15 (93,3%) μεταμοσχευμένους ασθενείς, σε 4 από τους 40 μεταμοσχευμένους ασθενείς (10%) χωρίς ΣΚ και σε 10 από τους 60 (16,7%) υγιείς που εξετάστηκαν (εικ. 1). HHV-

8 DNA ανιχνεύτηκε σε όλες τις περιπτώσεις κλασικού και AIDS-σχετιζόμενου ΣΚ που εξετάστηκαν.

Στις περιπτώσεις όπου εντοπίστηκε HHV-8, ακολούθησε μοριακός χαρακτηρισμός αυτού. Η σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του *ORF-26* ανέδειξε την ύπαρξη διαφόρων γονοτύπων. Συγκεκριμένα, όλα τα στελέχη HHV-8 που εντοπίστηκαν στους μεταμοσχευμένους ασθενείς με ΣΚ, σε δύο μεταμοσχευμένους ασθενείς χωρίς ΣΚ, σε έναν ασθενή με κλασικό ΣΚ και σε 8 από τα 10 δείγματα υγιών ατόμων, ανήκαν στον υπότυπο C. Όπως φαίνεται στον πίνακα 3, 17 στελέχη (ΣΚ1–ΣΚ12 και Η1–Η5) παρουσίαζαν ομολογία με τον κλάδο C3 και 6 στελέχη (ΣΚ13, ΣΚ14, ΣΚ21, Μ1, Μ4 και Η6–Η8) με τον κλάδο C1. Στις 10 από τις 11 περιπτώσεις κλασικού ΣΚ (ΣΚ22–ΣΚ31), στις 5 περιπτώσεις AIDS-σχετιζόμενου ΣΚ (ΣΚ16–ΣΚ20), σε 2 από τους μεταμοσχευμένους ασθενείς χωρίς ΣΚ (Μ2 και Μ3) και σε 2 από τους 11 υγιείς (Η9 και Η10), ο HHV-8 ανήκε στον A/D υπότυπο. Καθώς με το *ORF-26* ο D υπότυπος δεν διαχωρίζεται από τον A (πίν. 3), η χρήση αυτής της ταξινόμησης από μόνη της δεν συνιστάται.

Ο μοριακός χαρακτηρισμός του HHV-8, με ανάλυση των πολυμορφικών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του *ORF-K1* στα στελέχη που εντοπίστηκαν, ανέδειξε την ύπαρξη του C υπότυπου σε 23 στελέχη (πίν. 4). Συγκεκριμένα, όπως και με την ταξινόμηση με το *ORF-26*, 17 από αυτά (ΣΚ1–ΣΚ12 και Η1–Η5) ανήκαν στον κλάδο C3 και 8 (ΣΚ13, ΣΚ14, ΣΚ21, Μ1, Μ4 και Η6–Η8) στον C1 κλάδο. Τα 5 στελέχη από τις περιπτώσεις AIDS-σχετιζόμενου ΣΚ (ΣΚ16–ΣΚ20) ανήκαν στον A4 υπότυπο. Τα στελέχη ΣΚ22–ΣΚ31 από το κλασικό ΣΚ, τα στελέχη Μ2, Μ3, καθώς και τα στελέχη Η9 και Η10 ανήκαν στον A1 υπότυπο. Τα αποτελέσματα του μοριακού χαρακτηρισμού ανέδειξαν υπεροχή συγκεκριμένων γονοτύπων του HHV-8 ανάλογα με τον κλινικο-επιδημιολογικό τύπο του ΣΚ (εικ. 2).



Εικόνα 1. Ηλεκτροφόρηση αντιπροσωπευτικών θετικών για HHV-8 δειγμάτων από ασθενείς με σάρκωμα Καρσί (θέσεις 1–3) και αρνητικών για HHV-8 δειγμάτων από υγιή άτομα (θέσεις 4–6). Το M υποδηλώνει το μάρτυρα μοριακών βαρών 100 bp Ladder (BioLabs). Στη θέση 7 βρίσκεται αρνητικός μάρτυρας για την PCR (δείγμα χωρίς DNA).

Πίνακας 3. Σύγκριση των πολυμορφικών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών 233 βάσεων του *ORF-26*, που προσδιορίστηκαν με διάφορους υπότυπους πρότυπων στελεχών HHV-8.²⁷ Ο υπότυπος D δεν διακρίνεται από τον A.

Στελέχη	<i>ORF-26</i> (233 bp)									Υπότυπος
	981	1032	1055	1086	1094	1103	1122	1132	1139	
BCBL-R	T	C	G	C	G	C	G	A	A	A
BCBL-B	T	C	G	C	G	C	G	A	A	A
431KAP	C	C	G	C	G	C	G	G	C	B
ASM72	C	C	G	T	A	C	G	G	C	C1
BC2	C	A	T	T	A	C	G	G	C	C3
BC3	C	A	T	T	A	C	G	G	C	C3
TKS10	T	C	G	C	G	C	G	G	C	A/D
ZKS3	T	C	G	C	G	C	G	A	A	A/D
ΣΚ1-ΣΚ12, H1-H5	C	A	T	T	A	C	G	G	C	C3
ΣΚ13, ΣΚ14, ΣΚ21, M1, M4, H6-H8	C	C	G	T	A	C	G	G	C	C1
ΣΚ16-ΣΚ20, ΣΚ22-ΣΚ31, M2, M3, H9-H10	T	C	G	C	G	C	G	A	A	A/D

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

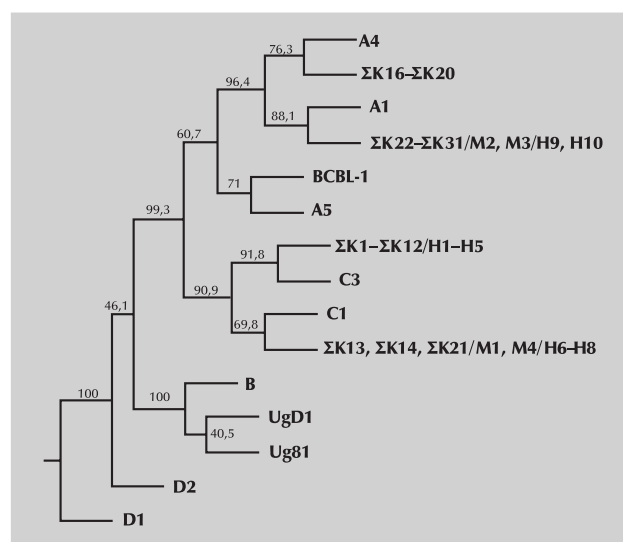
Ο μηχανισμός μετάδοσης του HHV-8 παραμένει υπό συζήτηση, αν και υπάρχει καθολική συμφωνία ότι ο επιπολασμός του συγκεκριμένου ιού εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των διαφόρων γεωγραφικών περιοχών.^{11,20} Στην Ελλάδα, το ΣΚ εμφανίζει επίπτωση 1,7% μετά τη νεφρική μεταμόσχευση.²¹ Το ποσοστό αυτό βρίσκεται σε αντιστοιχία με δεδομένα από άλλες χώρες της Μεσογείου.^{2,4,5,22,23}

HHV-8 ανιχνεύτηκε σε 93,3% των μεταμοσχευμένων ασθενών με ΣΚ που μελετήθηκαν αναδρομικά, ποσοστό σημαντικά υψηλότερο από αυτό που προσδιορίστηκε στους μεταμοσχευμένους ασθενείς χωρίς ΣΚ (10%). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την ισχυρή συσχέτιση του HHV-8 με το ΣΚ.²⁴ Ωστόσο, το γεγονός ότι υπάρχουν και μεταμοσχευμένοι ασθενείς με HHV-8 που δεν έχουν αναπτύξει ΣΚ δείχνει ότι και άλλοι παράγοντες, όπως η γενετική προδιάθεση, η παθογονικότητα του ιικού στελέχους και το ιικό φορτίο, μπορεί να εμπλέκονται στην ανάπτυξη ΣΚ.^{2,25}

Επιδημιολογικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι υψηλή επίπτωση του HHV-8 στο γενικό πληθυσμό μπορεί να συσχετίζεται με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ΣΚ μετά από μεταμόσχευση νεφρού.¹¹ Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες¹⁷ και καθώς η επίπτωση του HHV-8 στα υγιή άτομα προσδιορίστηκε στο 16,7%, μπορεί να υποθεθεί ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης ΣΚ ύστερα από μεταμόσχευση νεφρού οφείλεται κυρίως στην επαναδραστηριοποίηση του HHV-8 και δευτερευόντως στη μετάδοση του ιού μέσω του δότη.²⁶ Καθώς η παρούσα μελέτη είναι

αναδρομική και δεν υπήρχαν δείγματα από τους αντίστοιχους δότες, δεν μπορεί να αποσαφηνιστεί εάν και σε ποιο βαθμό εμπλέκεται η μετάδοση του HHV-8 μέσω του μοσχεύματος.

Αξιοσημείωτο είναι ότι στην παρούσα μελέτη παρατηρείται υπεροχή συγκεκριμένων γονοτύπων του HHV-8 σε συγκεκριμένους κλινικο-επιδημιολογικούς τύπους ΣΚ. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μια πιθανή συσχέτιση του C3 γονότυπου με το ιατρογενές ΣΚ ύστερα από μεταμόσχευση νεφρού, του A4 με το AIDS-σχετιζόμενο ΣΚ και του A1 με το κλασικό ΣΚ



Εικόνα 2. Φυλογενετική ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών της περιοχής *ORF-K1*, των HHV-8 στελεχών που εξετάστηκαν και των πρότυπων στελεχών, όπως συνιστάται από τους Zong et al.¹⁹

Πίνακας 4. Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών της OFR-K1 προτεΐνης του HHV-8. Στην πρώτη σειρά παρουσιάζεται η συνολική αμινοξική αλληλουχία του πρότυπου στελέχους A1 (BCBL-R) και με παύλες σημειώνονται οι ομοιότητες. Αριστερά σημειώνονται οι υπότυποι.

HHV-8 ORF-K1 προτεΐνη:													
BCBL-R	MFLYVVCSLA	VCFRGLLSL	LLSSPNLCPG	VISTPYKILIC	LSNASLPISW	YCNNTRLFRP	TEITLFPVTI	ACNFTCVESQ	GHRQSIWITW	HAQRVILQILC	AQPSNTVTCG	QHVTLYCSTS	A1
BCBL-B	---	---	---	---	---	-D-L	-R---	P----	---	---	---	---	A4
Ug374	---	---	---	---	---	-D-W-L	-DQSFVA-	T----	---	N----	---	---	A5
431KAP	-L-CI-L	-PK-H	-P-F-H	---	P-R	-G-Q-H-I	-ASN-TVSSL	T-MTT-	-PTH-Q-	YT----	---	-P-D-	B
Ug81	-L-CI-L	-PK-H	-P-F-H	---	P-R	-G-H-I	-ASN-TVSSL	T-MTT-	-PTH-E-	YT----	---	-P-D-	B2
UgD1	-L-CI-L	-PK-H	-P-F-H	---	P-R	-G-Q-R-I	RGSN-TVSSL	T-MTA-	-PTH-E-	YT----	---	-P-D-	B2
ASM72	---	---	-Q----	---	P-AT-T-	-D-L	-HD-FTV-NF	I-S-G-	-H-L-M-	YG----	G-A---	---	C1
BC2	---	---	-Q----	---	P-T-T-	-D-L-L	-QQ-FTV-AL	I-S-G-	-H-L-	YP----	G----	---	C3
BC3	---	---	-Q----	-S--T-	P-T-T-	-D-L-L	-QP-TVSNL	I-S-G-F	-H-L-	YP----	G----	---	C3
TKS10	---	-P-H	-SV-QF-A	-L-S-T-	P-D	-G-L-I	-GA-TFSL	TG--DH-	-LSH-QR	YPP----	---	-R-S-H-	D1
ZKS3	-N	-P-H	-PAF-P-	-L-N-T-	P-D	-G-L-M-Y	HR-TLMNL	-A-W-N-	-ISH-Q	YTE----	---	-R-H-	D2
ΣΚ1-ΣΚ10, H2, H5	---	---	-Q----	-S--T-	P-T-T-	-D-L-L	-QQ-FTV-NL	I-S-G-F	-H-L-	YP----	G----	---	C3
ΣΚ11-ΣΚ12	---	---	-Q----	-S--T-	P-T-T-	-D-L-L	-QQ-TVSNL	I-S-G-F	-H-L-	YP----	G----	---	C3
H1, H3, H4	---	---	-Q----	---	P-T-T-	-D-L	-QD-ITV-NL	I-S-G-	-H-L-M-	Y----	G-A---	---	C1
ΣΚ13, ΣΚ14, H6, H7	---	---	-Q----	---	P-AT-T-	-D-L-L	-QG-ITV-SL	V-S-G-	-H-L-M-	S----	G-A---	---	C1
ΣΚ21, H8, M1, M4	---	-Q----	---	---	---	-D-L	-R---	P----	---	---	---	---	A4
ΣΚ16-ΣΚ20	---	-Q----	---	---	---	-D-L	-R---	P----	---	---	---	---	A4
ΣΚ22-ΣΚ31, H9, H10, M2, M3	---	-Q----	---	---	---	---	-K-VI-	---	---	---	---	---	A1

στην Ελλάδα. Τα στελέχη HHV-8 που ανιχνεύτηκαν στον υγιή πληθυσμό κατανέμονται στους C1, C3 και A1 γονότυπους, σε συμφωνία με τις Ευρωπαϊκές βιβλιογραφικές αναφορές.^{16,27-29}

Στην παρούσα μελέτη διακρίνεται η ισχυρή συμμετοχή του C3 υπότυπου του HHV-8 στην αιτιοπαθογένεια του ΣΚ ύστερα από μεταμόσχευση νεφρού στην Ελλάδα. Δεδομένης της υψηλής συχνότητας του ιού στην Ελλάδα, ίσως θα ήταν χρήσιμο να γίνεται έλεγχος της παρουσίας του HHV-8 τόσο στους δότες όσο και στους λήπτες πριν από τη μεταμόσχευση, ώστε να ανιχνεύεται πιθανός κίνδυνος εμφάνισης ΣΚ.

ABSTRACT

Incidence and molecular characterization of HHV-8 in Kaposi's sarcoma among renal transplant recipients

G. ZAVOS,¹ I. PAPACONSTANTINOY,¹ M. GAZOULI,² V. METAXA-MARIATOU,³ I. BOKOS,¹
P. ARAPANTONI-DADIOTI,⁴ K. GIASLAKIOTIS,⁵ G. NASIOULAS,³ A. KOSTAKIS¹

¹Transplantation Department, "Laiko" General Hospital, Athens, ²Department of Histology-Embryology, School of Medicine, University of Athens, Athens, ³Molecular Biology Research Center, "Hygeia" Hospital-"Antonis Papayiannis", Athens, ⁴Department of Pathology, "Metaxa" Anti-Cancer Hospital, Piraeus, ⁵Department of Pathology, "Laiko" General Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2004, 21(3):267-273

OBJECTIVE The incidence of Kaposi's sarcoma (KS) in renal transplant recipients is significantly greater than that in the general population. It is still unclear whether post-transplant KS is due to reactivation of HHV-8 as result of immunosuppressive treatment or to primary HHV-8 infection transmitted via organ transplantation. The goals of the present study were assessment of the association of HHV-8 with KS developing in Greek renal transplant recipients and HHV-8 characterization, by subtyping of the *ORF-26* and *ORF-K1* genomic regions. **METHOD** Blood or tissue samples from transplant recipients with and without KS were examined. As controls, samples from classic KS patients, AIDS-associated KS patients and healthy individuals were examined in parallel. The HHV-8 detection was performed by nested-PCR, and confirmed by nucleotide sequencing of the PCR products. The genotyping of HHV-8 isolates was carried out by nucleotide sequencing of specific variable regions of *ORF-26* and *ORF-K1*. **RESULTS** Of 1055 patients who received renal transplants during the last 18 years, KS was encountered in 18 (1.7%). HHV-8 DNA was detected in 93.3% of KS transplant recipients and in 10% of transplant recipients without KS. HHV-8 DNA was found in all cases of patients with classic and AIDS-associated KS and in 16.7% of healthy individuals tested. Concerning the genotype, the findings imply a possible link with the C3 subtype of HHV-8 in renal-transplant related KS cases, a possible link with the A4 subtype in AIDS-associated KS cases and a potential involvement of the A1 subtype in Greek classic KS cases, as HHV-8 strains among healthy individuals tested belong to the C1, C3 or A1 subtypes. **CONCLUSIONS** Kaposi's sarcoma presented with an incidence of 1.7% after renal transplantation in this study. A possible link with the C3 subtype of HHV-8 was identified in renal-transplant related KS cases.

Key words: HHV-8, Kaposi's sarcoma, Renal transplantation

Βιβλιογραφία

1. KAPOSI M. Idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin. *Arch Dermatol Syphil (Berlin)* 1872, 4:265-273
2. MENDEZ JC, PAYA CV. Kaposi's sarcoma and transplantation. *Herpes* 2000, 7:18-23
3. BEHREND M, KOLDITZ M, KLIEM V. Malignancies in patients under long-term immunosuppression after kidney transplantation. *Transplant Proc* 1997, 29:834-835
4. LESNONI LA PAROLA I, MASINI C, NANNI G, DIOICIAIUTI A, PANOCCHIA N, CERIMELE D. Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients: experience at the Catholic University in Rome, 1988-1996. *Dermatology* 1997, 194:229-233
5. MONTAGNINO G, LORCA E, TARANTINO A, BENCINI P, AROLDI A, CESANA B ET AL. Cancer incidence in 854 kidney transplant recipients from a single institution: comparison with normal population and with patients under dialytic treatment. *Clin Transplant* 1996, 10:461-469
6. SHEIL AG, FLAVEL S, DISNEY AP, MATHEW TH, HALL BM. Cancer incidence in renal transplant patients treated with azathioprine or cyclosporine. *Transplant Proc* 1987, 19:2214-2216
7. SHEPHERD FA, MAHER E, CARDELLA C, COLE E, GREIG P, WADE JA ET AL. Treatment of Kaposi's sarcoma after solid organ transplantation. *J Clin Oncol* 1997, 15:2371-2377
8. SHMUELI D, SHAPIRA Z, YUSSIM A, NAKACHE R, RAM Z, SHAHARABANI E. The incidence of Kaposi's sarcoma in renal transplant patients and its relation to immunosuppression. *Transplant Proc* 1989, 21:3209-3210
9. WEBB MC, COMPTON F, ANDREWS PA, KOFFMAN CG. Skin tumors post-transplantation. A retrospective analysis of 28 year's experience at a single center. *Transplant Proc* 1997, 29:828-830

10. TOURAINE JL, RAFFAELE P, TRAEGER J, POUTEIL-NOBLE C, BETUEL H, GARNIER JL ET AL. *Kaposi's sarcoma in organ transplantation* (Lyon experience, 1965–1995). Kluwer Academic Publ, Amsterdam, 1996:73–80
 11. FRANCES C. Kaposi's sarcoma after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1998, 13:2768–2773
 12. PARRAVICINI C, OLSEN SJ, CAPRA M, POLI F, SIRCHIA G, GAO SJ ET AL. Risk of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus transmission from donor allografts among Italian post-transplant Kaposi's sarcoma patients. *Blood* 1997, 90:2826–2829
 13. RABKIN CS, SHEPERD FA, WADE JA. Human herpes virus 8 and renal transplantation. *N Engl J Med* 1999, 340:1045–1046
 14. SCHULZ TF. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8). *J Gen Virol* 1998, 79:1573–1591
 15. KASOLO FC, MONZE M, OBEL N, ANDERSON RA, FRENCH C, GOMPELS UA. Sequence analyses of human herpesvirus-8 strains from both African human immunodeficiency virus-negative and -positive childhood endemic Kaposi's sarcoma show a close relationship with strains identified in febrile children and high variation in the K1 glycoprotein. *J Gen Virol* 1998, 79:3055–3065
 16. 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, 183:125–129
 17. SCHULZ TF. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8): epidemiology and pathogenesis. *J Antimicrob Chemother* 2000, 45:15–27
 18. POOLE LJ, ZONG JC, CIUFO DM, ALCENDOR DJ, CANNON JS, AMBINDER R ET AL. Comparison of genetic variability at multiple loci across the genomes of the major subtypes of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reveals evidence for recombination and for two distinct types of open reading frame K15 alleles at the right-hand end. *J Virol* 1999, 73:6646–6660
 19. ZONG JC, CIUFO DM, ALCENDOR DJ, WAN X, NICHOLAS J, BROWNING PJ ET AL. High-level variability in the *ORF-K1* membrane protein gene at 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, 73:4156–4170
 20. GAO SJ, KINGSLEY L, LI M, ZHENG W, PARRAVICINI C, ZIEGLER J ET AL. KSHV antibodies among Americans, Italians, and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat Med* 1996, 2:918–928
 21. ZAVOS G, BOKOS J, PAPACONSTANTINO J, BOLETIS J, GAZOULI M, PAPPAS P ET AL. Study of "de novo" malignancies among Greek renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2003, 35:1399–1403
 22. LUPPI M, BAROZZI P, MARASCA R, FERRARI MG, TORELLI G. Human herpesvirus 8 strain variability in clinical conditions other than Kaposi's sarcoma. *J Virol* 1997, 71:8082–8083
 23. MA HJ, SJAK-SHIE NN, VESCIO RA, KAMINSKY M, MIKAIL A, POLD M ET AL. Human herpesvirus 8 open reading frame 26 and open reading frame 65 sequences from multiple myeloma patients as have pattern most found in Kaposi's sarcoma of primary effusion lymphoma. *Clin Cancer Res* 2000, 6:4226–4233
 24. QUNIBI W, AL-FURAYH O, ALMESHARI K, LIN SF, SUN R, HESTON L ET AL. Serologic association of human herpesvirus eight with post-transplant Kaposi's sarcoma in Saudi Arabia. *Transplantation* 1998, 65:583–585
 25. PELLET C, CHEVRET S, FRANCES C, EUVARD S, HURAUULT M, LEGENDRE C ET AL. Prognostic value of quantitative Kaposi sarcoma-associated herpesvirus load in post-transplantation Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis* 2002, 186:110–113
 26. CATTANI P, CAPUANO M, GRAFFEO R, RICCI R, CERIMELE F, CERIMELE D ET AL. Kaposi's sarcoma associated with previous human herpesvirus 8 infection in kidney transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2001, 39:506–508
 27. ZONG JC, METROKA C, REITZ MS, NICHLAS J, HAYWARD GS. Strain variability among Kaposi sarcoma associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genomes: evidence that a large cohort of United States AIDS patients may have been infected by a single common isolate. *J Virol* 1997, 71:2505–2511
 28. NICHOLAS J, ZONG JC, ALCENDOR DJ, CIUFO D, POOLE LS, SARISKY RT ET AL. Novel organization features, captured cellular genes, and strain variability within the genome of KSHV/HHV-8. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1998, 23:79–88
 29. DI ALBERTI L, NGUI SL, PORET SR, SPEIGHT PM, SCULLY CM, ZAKREWSKA JM ET AL. Presence of human herpesvirus 8 variants in the oral tissues of human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis* 1997, 175:703–707
- Corresponding author:*
- G. Nasioulas, Molecular Biology Research Center Hygeia "Antonis Papayiannis", 4 Kifissias Ave. & Erythrou Stavrou street, GR-151 23 Maroussi, Greece
e-mail: g.nasioul@hygeia.gr