Archive of SID

مجله علمی - پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1389، دوره دوم، شماره ششم، صفحه 32-25

بررسی شیوع سارکوم کاپوسی ناشی از هرپس ویروس انسانی تیپ 8 در ایران با استفاده از روش Nested PCR

زینب سادات نوروزفر[1،2] ، امیر سهرابی [2،6] ،پریچهر یغمایی[1] ، زهرا صفائی نراقی[3] ، افشین مرادی[4] ، علی اسلامی فر[5] ، کیهان آزادمنش[2]

1- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
2- انستیتو پاستور ایران، بخش ویروس شناسی
3- دانشگاه علوم پزشکی تهران، بخش پاتولوژی بیمارستان رازی
4- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، واحد تحقیقات سرطان
5- انستیتو پاستور ایران، بخش تحقیقات بالینی
6- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده فناوریهای نوین پرشکی، بخش پزشکی مولکولی

نویسندگان مسؤول: دکتر علی اسلامی فر. انستیتوپاستور ایران، بخش تحقیقات بالینی. eslamifar@pasteur.ac.ir

دریافت: 89/5/29 پذیرش: 89/8/3

چکیده

زمینه و هدف: کاپوسی سارکوما یکی از سرطانهای بدخیم مربوط به بافت پیوندی است که در بیماران مبتلا به ایدز و بیمارانی که سیستم ایمنی تضعیف شده دارند شیوع دارد . این مطالعه بمنظور تعیین و بررسی اپیدمیولوژی سرطان کاپوسی ناشی از هرپس ویروس انسانی تیپ 8 برای مراجعین به بیمارستانهای تهران انجام شد.

روش بررسی: از تابستان 1387 تا پایان تابستان 1388 جمعاً تعداد 42 نمونه با تشخیص کاپوسی یا مشکوک به آن ، بصورت بافت پارافینه از بیمارانی که بین سالهای 1379 تا 1389 به بیمارستانهای لقمان – شهدا – رازی و انستیتو کانسر مراجعه نموده اند جمع آوری گردید . پس از استخراج نمونه ها ، با بکارگیری پرایمرهای اختصاصی برای قطعه ORF26 و با روش Nested PCR ویروس هرپس انسانی تیپ 8 شناسایی شد.

یافته ها: از تعداد 42 نمونه بافت پارافینه ، 30 نمونه از نظرویروس هرپس انسانی تیپ 8 مثبت شدند. میانگین سنی موارد مثبت 61/6 سال گزارش گردید که تعداد موارد مثبت در مردان 23 مورد و در زنان 7 مورد گزارش گردید.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه ویروس هرپس تیپ 8 در 30 مورد از تعداد کل42 نمونه پارافینه جداسازی گردید . با در نظر گرفتن 4 بیمار که مبتلا به بیماری سودوکاپوسی بودند ، ویروس هرپس تیپ 8 در 78/9% از بیماران جداسازی گردید. این مطالعه بیانگر حساسیت بالای روش Nested PCR برای تشخیص این ویروس می باشد.

واژه‌های کلیدی: هرپس ویروس تیپ 8 ، کاپوسی سارکوما ، Nested PCR

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

رایج ترین روش برای تشخیص هرپس ویروس تیپ 8 (HHV8) و یا هرپس ویروس مرتبط با کاپوسی سارکوما (KSHV) در نمونه های کلینیکی ، استفاده از تکنیک PCR برای جداسازی ناحیه کوچک ORF26 است که در سال 1994 توسط Chang و همکاران انجام شد (1). PCR برای ناحیه ORF26 بیشترین نتایج مثبت از بیمارانی را که در شرایط سارکوم کاپوسی هستند نشان می دهد (2). HHV8 ویروسی پوشش دار با DNA دو رشته ای بوده و عضو جدید خانواده گاما هرپس ویروس ها است (3و4). فرم کلاسیک این بیماری در سال 1872 توسط Mortiz Kaposi برای اولین بار در مردان مدیترانه ای جدا گردید (5). چهار فرم کلینیکی مهم تا کنون از KSHV مشاهده شده است : 1- اپیدمیک یا در رابطه با سندرم نقص سیستم ایمنی AIDS 2- کلاسیک 3- اندمیک آفریقایی 4- در رابطه با پیوند عضو در بیمارانی که به علت دریافت عضو پیوندی دارای سیستم ایمنی تضعیف شده می باشند (6). مطالعات مولکولی تاکنون هفت ساب تایپ مهم از KSHV را مشخص کرده است که از A تا F و Z نامگذاری شده است (7). این نامگذاری براساس تنوع ژنتیکی در ناحیه ORF K1 می باشد (6). ORF K1 در انتهای سمت چپ ژنوم ویروس قرار گرفته است که کد کننده گلیکوپروتئین غشایی بوده و حاوی 289 اسیدآمینه است (3). DNA ویروس kb 160-170 است و حاوی ORF 87 می باشد (8). هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان شیوع سارکوم کاپوسی در بیمارانی است که با تشخیص پاتولوژیکی آلوده گزارش شدند. برای دستیابی به این هدف ابتدا بیماران مبتلا به سارکوم کاپوسی شناسایی شده و از نمونه های پارافینه حاصل از زخم های این بیماران برای جداسازی ویروس HHV8 استفاده گردید. جداسازی قسمتی از ژنوم این ویروس با روش Nested PCR نمایانگر حضور ویروس در نمونه می باشد.

روش بررسی

نمونه بیماران: تعداد 42 نمونه بافتی پارافینه از زخمهای مبتلایان به KS که از سالهای 1379 تا 1388 به بیمارستانهای لقمان ، رازی و شهدا مراجعه کرده بودند جمع آوری شد. نمونه ها از زخم های موجود در ساعد، آرنج ، بازو و قسمت های تحتانی پای بیماران تهیه شده و از این تعداد 38 مورد با تشخیص قطعی سارکوم کاپوسی توسط پاتولوژیست مربوطه و 4 مورد مشکوک گزارش گردیده بود.

استخراج DNA : دو برش 20 ماکرومتری توسط تیغ از نمونه های بافتی پارافینه تهیه گردید. مقدار 100µl محلول 20٪tween به غلظت 0/5% به نمونه ها افزوده شد (برای حذف چربی دیواره سلول)، سپس در مایکروویو با قدرت 700w به مدت 1 دقیقه و نیم حرارات داده شد، به دنبال آن به مدت 15 دقیقه با دور 10500(rpm) در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید، سپس نمونه ها به مدت 15 دقیقه در یخ قرار داده شد و بعد از آن جداسازی پارافین با استفاده از سر سمپلر صورت گرفت. سپس 400µl بافر هضم (شامل پودر Tric-Hcl به مقدار 1/576 گرم و 50 µl tween به غلظت 0/05% با PH = 7/5) و 20µl پروتئیناز K به هر نمونه افزوده شد. نمونه ها به مدت 3 ساعت در 55 درجه سانتی گراد انکوبه شده و 10 دقیقه در 100 درجه سانتی گراد جوشانده شد بعد به هر میکروتیوپ 6 µl RNase افزوده و 1 تا 2 ساعت در 37 درجه سانتی گراد انکوبه گردید، سپس به هر نمونه 300µl فنل و 300µl کلروفرم افزوده گردید و بعد از shaking به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ در دور 12000 به مدت 5 دقیقه انجام شد. میکروتیوپ در این مرحله دارای دو فاز بوده که فاز رویی به یک میکروتیوپ جدید منتقل شده و به آن 1 میلی لیتر ایزوپروپانول افزوده شد، سپس نمونه ها به مدت یک شبانه روز در 20- درجه سانتی گراد نگهداری نموده و پس از آن 10 دقیقه سانتریفیوژ با دور(rpm) 12000 انجام گردید. مایع را دور ریخته و به هر میکروتیوپ 200µl اتانول 70% اضافه گردید. پس از سانتریفیوژ به مدت 5 دقیقه 12000(rpm) ، مایع را دور ریخته و به رسوب حاصله 30µl آب دیونیزه افزوده شد. رسوب بدست آمده حاوی DNA انسانی و احتمالاً DNA ویروسی می باشد (9).

PCR برای β گلوبین انسانی: این مرحله به منظور اطمینان از صحت استخراج و سالم بودن DNA حاصله انجام گرفت. پرایمرهای این مرحله شامل GH20 وPCO4 می باشند (جدول 1) . نمونه ها در دستگاه PCR Techne قرارداده شد. در مرحله اول نمونه ها به مدت 5 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی گراد قرارداده شد، چرخه های حرارتی شامل Denaturing دمای95 درجه سانتی گراد به مدت 45 ثانیه

www.SID.ir

Archive of SID

، Annealing دمای57 درجه سانتی گراد به مدت 50 ثانیه و Extention دمای72 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه می باشد. نمونه ها 40 مرتبه این چرخه را طی کرده و در نهایت مرحله Final Extention در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه اجرا گردید.

Nested PCR: Nested PCR با استفاده از دو جفت پرایمر انجام شده و از PCR اختصاصی تر است. در این روش محصول PCR مرحله اول به عنوان الگو جهت PCR مرحله دوم استفاده می گردد . منظور از انجام این کار جداسازی قطعه ORF26 138 bp است ، پرایمرهای مورد استفاده شامل جفت پرایمرها برای مرحله اول (پرایمرهای خارجی)KS1 و KS2 و مرحله دوم (پرایمرهای داخلی)KS4 وKS3 می باشد (جدول 1). مخلوط های به کار گرفته شده برای هر دو مرحله شامل Master 2x 12/5 µl ، 1µl پرایمرForward 10 (pmol\ml) و 1µl پرایمر Reverse (10 pmol\ml) ، (Taq polymerase 0/3µl (5 u/ul، آب دوبار تقطیر استریل در مرحله اول 7/2 µl و در مرحله دوم 8/2 µl و در نهایت DNA الگو در مرحله اول 2 µl و در مرحله دوم 3µl به کار گرفته شد . Master Mix 2x استفاده شده شامل 200 µl - dNTP; 40 µl - Buffer 10x; 60 MgCl2; و 700 µ l آب دوبار تقطیر استریل، درحجم 1 میلی لیتر تهیه گردید. نمونه ها در دستگاه PCR Techne(England) قرارداده شد. در مرحله اول نمونه ها به مدت 5 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی گراد قرارداده شد ، چرخه های حرارتی شامل Denaturing دمای95 درجه سانتی گراد به مدت 45 ثانیه، Annealing دمای59 درجه سانتی گراد به مدت 45 ثانیه و Extention دمای72 درجه سانتی گراد به مدت 45 ثانیه می باشد. نمونه ها 35 مرتبه این چرخه را طی کرده و در نهایت مرحله Final Extention در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه اجرا گردید. از محصولات PCR این مرحله به عنوان الگو برای مرحله دوم استفاده گردید. مرحله دوم مشابه مرحله اول انجام شد با این تفاوت که زمان سپری شدن هر سه مرحله در چرخه تکرار از 45 ثانیه به 40 ثانیه تغییر یافت.

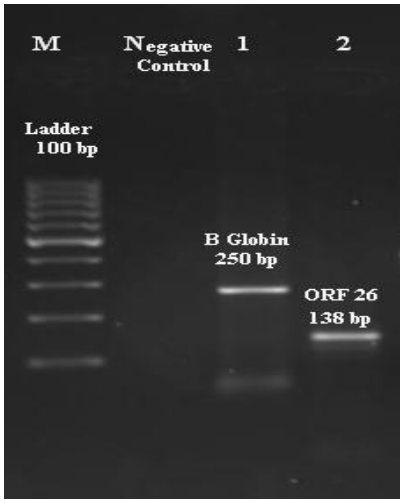
جدول 1. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	سکانس(´5 - ´3)	وزن قطعه حاصل (bp)
GH20	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	250
PCO4	CAACTTCATCCACGTTCACC	
KS1	AGC CGA AAG GAT TCC ACC AT TCC	233
KS2	GTG TTG TCT ACG TCC AG	
KS3	TAT TCT GCA GCA GCT GTT GG	138
KS4	TCT ACG TCC AGA CGA TAT GTG C	

الکتروفورز محصولات PCR: در پایان به منظور مشاهده نتیجه PCR ، 10 µl از محصول PCR مرحله دوم بر روی ژل 1/5 % آگارز الکتروفورز گردید .

یافته ها

در شکل یک نتایج الکتروفورز محصولات PCR قابل مشاهده است (شکل 1). از تعداد 42 نمونه بافت پارافینه، 30 نمونه از نظر ویروس هرپس انسانی تیپ 8 مثبت شدند (جدول 2). 4 مورد که با احتمال شبه سارکوم کاپوسی گزارش گردیده بود از نظر هرپس ویروس منفی گزارش گردید .



شکل 1. نتایج الکتروفورز محصولات PCR

M : Ladder100 bp N : نمونه کنترل منفی 1 : بتا گلوبین 2: ORF26

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره 2 . اطلاعات پاتولوژیک و نتایج حاصل از مطالعه بیماران

ردیف	سن	جنس	تاریخ نمونه گیری	محل نمونه گیری	بیماری زمینه ای	تشخیص	گلوبین B	ORF 26
1	82	F	86/6/19	ب - شهدا	---	KS	+	+
2	76	M	86/4/10	ب - شهدا	---	KS	+	-
3	62	M	84/1/25	ب - شهدا	---	KS	+	+
4	44	M	84/2/8	ب - شهدا	---	KS	+	+
5	95	F	84/10/20	ب - شهدا	---	مشکوک بهKS	+	-
6	64	F	85/12/23	ب - شهدا	---	KS	+	+
7	41	M	84/6/31	ب - شهدا	---	مشکوک بهKS	+	-
8	37	M	87/10/29	ب - لقمان	HIV +	KS	+	+
9	60	M	87/2/28	ب - لقمان	---	KS	+	+
10	23	M	81/6/9	ب - لقمان	دیابت-سندرم نفروتیک	مشکوک بهKS	+	-
11	49	M	82/2/3	ب - لقمان	---	KS	+	-
12	57	M	83/12/16	ب - لقمان	---	KS	+	+
13	54	M	87/1/20	ب - شهدا	---	KS	+	+
14	63	M	87/5/30	ب - شهدا	---	KS	+	+
15	58	F	87/12/7	ب - شهدا	---	KS	+	+
16	44	M	83/6/3	ب - شهدا	HIV +	KS	+	-
17	*49	M	82/10/5	ب - شهدا	---	KS	+	+
18	58	F	85/5/14	ب- رازی	پیوند کلیه	KS	+	+
19	71	M	86/10/25	ب- رازی		KS	+	+
20	83	M	86/5/31	ب- رازی		KS	+	+
21	84	M	86/6/29	ب- رازی	سفلسیس	KS	+	+
22	81	M	85/8/28	ب- رازی		KS	+	+
23	50	M	85/8/21	ب- رازی		KS	+	+
24	84	M	85/7/25	ب- رازی		KS	+	+
25	35	M	85/4/10	ب- رازی	addict	KS	+	-
26	58	M	85/2/30	ب- رازی		KS	+	+
27	68	M	85/2/30	ب- رازی		KS	+	+

www.SID.ir

Archive of SID

28	68	M	85/2/30	ب- رازی		KS	+	+
29	48	M	85/2/25	ب- رازی		KS	+	+
30	65	M	85/1/30	ب- رازی		KS	+	+
31	51	M	84/12/2	ب- رازی		KS	+	+
32	68	M	84/8/28	ب- رازی		KS	+	-
33	79	M	83/9/8	ب- رازی	رادوتراپی	KS	+	-
34	43	F	82/7/19	ب- رازی	پیوند کلیه	KS	+	+
35	70	M	81/6/13	ب- رازی		KS	+	+
36	55	F	88/2/21	ب- رازی		KS	+	+
37		M	80/8/5	ب- رازی		مشکوک بهKS	+	-
38	61	M	80/5/15	ب- رازی		KS	+	-
39	58	M	79/9/2	ب- رازی	پیوند کلیه	KS	+	+
40	64	M	79/3/1	ب- رازی	سندرم هوچکین	KS	-	+
41	60	F	79/2/18	ب- رازی		KS	-	+
42	75	M	79/1/15	ب- رازی		KS	-	-

وجود ویروس در 8 مورد از بیماران تایید نگردید که علت آن می تواند ناشی از وجود مقدار کم قطعه DNA تخلیص شده از نمونه های بافتی پارافینه ، حضور درصد پایین از ویروس در بافت بیوپسی و کمبود حضور تومور در نمونه های بیوپسی می باشد. از طرفی ممکن است گذشت زمان طولانی از تاریخ بیوپسی سبب خورد شدن DNA باشد. بیشترین موارد مثبت در افراد گروه سنی 62 سال مشاهده گردید که تعداد موارد مثبت در مردان 23 مورد و در زنان 7 مورد گزارش گردید. از موارد مثبت 2 مورد مبتلا به AIDS ، 1 مورد مبتلا به بیماری سفلیس ، 1 مورد با اعتیاد به مواد مخدر و 2 مورد با سابقه پیوند کلیه گزارش گردیده بود. تعداد موارد مثبت در بیماران ساکن استان تهران 8 مورد ، استان مازندران 1 مورد ، استان گیلان 1مورد ، استان مرکزی 1 مورد ، استان آذربایجان شرقی 1 مورد ، استان قم 2 مورد ، استان اردبیل 1 مورد ، استان قزوین 1 مورد ، استان زنجان 1 مورد ، استان سمنان 1 مورد و استان سیستان و بلوچستان 2 مورد بود.

بحث

نتایج این مطالعه موید حضور ویروس HHV8 در مبتلایان به سارکوم کاپوسی بوده و حضور این ویروس در مبتلایان به این بیماری مشاهده گردید که تایید کننده تحقیقات Zong et al (10)، Nicholas et al (11)و DiAlberti et al (12) می باشد. انتشار ساب تایپ A و C در اروپا ، آمریکا و آسیا ، سویه B و A5 بطور عمده در آفریقا، فرانسه و Guiana ، ساب تایپ D برای اولین بار در تایوان و در برخی از جزایر اقیانوس آرام و استرالیا ، E در بین جمعیت سرخپوستان برزیلی، نواحی آمازونی اکوادور می باشد (13). ساب تایپ Z در جمعیت کمی از کودکان زامبیایی مشاهده شده (14) و در نهایت ساب تایپ جدید F که در اوگاندا یافت شده است (15). اما اثبات گردیده که مطالعات بر اساس PCR روش قابل اطمینانی برای ارزیابی عفونت KSHV در نمونه های بیولوژیکی است. با استفاده از این تکنیک Moore and Chang ژنوم KSHV را در بافت های منجمد جداسازی کرده اند. در این مطالعه 11 مورد از فرم KS در ارتباط با AIDS (91%) و تمام موارد سارکوم کاپوسی کلاسیک، همچنین بیماران همجنس باز مبتلا به HIV- KS جداسازی شده است (16).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج مشابهی با این مطالعه توسط Jin et al. انجام گردیده است، که KSHV را در 100% از 17 نمونه بیوپسی مبتلا به سارکوم کاپوسی مرتبط با HIV ، شناسایی کرده اند (17). در نمونه های مورد مطالعه ما دو مورد از بیماران مبتلا به AIDS و دو مورد از آنها سابقه پیوند کلیه داشتند. با بکارگیری روش PCR Huang et al. عفونت KSHV را در تمام 12 بیمار مبتلا به KS و HIV مثبت و دو بیمار HIV منفی جداسازی نمود (18). در مطالعه سرواپیدمیولوژیک در ایران، HHV8 در بیماران دیالیزی 16/9%، پیوند کلیه 25% و بیماران مبتلا به ایدز 45/7% گزارش گردیده است (19) . همچنین مطالعه ای در مشهد در سال 1383، ویروس HHV8 در 35 نمونه بافت پوستی جدا گردیده است (20). روش های PCR به صورت استاندارد و با حساسیت بالا برای تعیین ژنوم KSHV در DNA نمونه های بافتی مورد استفاده قرار می گیرد. (21). در مطالعات دیگری از 51 نمونه، 31 نمونه (60/8%) در راند اول PCR سارکوم کاپوسی گزارش گردیده است و به دنبال آن با انجام Nested PCR 14 نمونه از 20 نمونه ای که در مرحله نخست منفی گزارش گردیده ، ثبت و شناسایی شد ، سپس با انجام PCR برای ناحیه KSHV ORF72 ، 3 نمونه از 6 نمونه باقی مانده مثبت گزارش گردیده است. در این مطالعه نهایتاً 94/1% از موارد KS با انجام PCR مثبت شده است. این مطالعات اهمیت بهینه سازی PCR را برای کاهش دادن موارد منفی نشان داده اند. نتایج منفی ممکن است به علت وجود مقدار کم یا زیاد قطعه DNA تخلیص شده از نمونه های بافتی پارافینه بوده باشد. همچنین ممکن است به علت حضور درصد پایین از ویروس در بافت بیوپسی و یا کمبود حضور تومور در نمونه های بیوپسی باشد (22). 12 نمونه از موارد مشکوک گزارش شده منفی گردید که 4 مورد با تشخیص پاتولوژی سودوکاپوسی بوده و 3 مورد مشکوک به کاپوسی گزارش گردید. با حذف این 7 نمونه درصد موارد مثبت با روش Nested PCR به 90% افزایش می یابد. برخی مطالعات در مورد انتقال KSHV اثبات نموده که ویروس قادر است از طریق دهندگان بافت که دچار KS هستند به بیماران دریافت کننده پیوند عضو منتقل گردد (23)، در این موارد گسترش تومور در رابطه با درمان های ایمونوساپرس بوده است (24). دو نمونه از موارد مثبت در این مطالعه سابقه پیوند کلیه داشتند. بهترین روش برای ثبت نتایج مثبت سارکوم کاپوسی و همچنین بررسی شیوع این سرطان، استفاده از روش PCR می باشد (21). مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین فراوانی منطقه ای این بیماری می تواند در تحقیقات برای ساخت واکسن و کیت تشخیصی راه گشا باشد. در انتها پیشنهاد می گردد قبل از پیوند عضو و در داوطلبین اهدا خون برای عفونت HHV8 غربالگری صورت پذیرد.

References

1- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, et al. *Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma*. Science. 1994; 266(5192): 1865-1869.

2- Moore PS, Chang Y. *Kaposi's sarcoma (KS), KS-associated herpesvirus, and the criteria for causality in the age of molecular biology*. Am J Epidemiol.1998; 147(3): 217-21.

3- Moore PS, Chang Y, Knipe DM , Howely PM , Griffin DE. *Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus*. Field virology. 4 Ed. USA; Lippincott Williams and Wilkins. 2001.pp.2833-2838.

4- Lallemand F, Desire N, Rosenbaum W. *Quantitative Analysis of Human Herpesvirus 8 Viral Load using a Real-Time assay*. J Clin Microbiol. 2000; 38(4): 1404-1408.

5- Marchioli CC, Love JL , Abbott LZ. *Prevalence of Human Herpesvirus 8 DNA sequences in several patient Populations*. J Med Microbiol. 1996; 34(10):2635-2638.

6- Treurnicht FK, Engelbrecht S, Taylor MB. *HHV8 Subtypes in South Africa: identification of a case suggesting a novel B vatiant*. J Med Virol. 2002; 66:235-240.

7- Zhong JC, Ciufo DM, Alcendor DJ. *High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the kaposi's sarcoma-assocaited herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations*. J Virol. 1999; 73:4156-4170.

8- Russo JJ, Bohenzky RA, Chein MC. *Nucleotide sequence of the kaposi's sarcoma-assocaited herpesvirus (HHV-8)*. PNAS. 1996; 93:14862-14867.

9- Mirshahabi H, Meshkat Z, Soleimanjahi H. *Different DNA extraction methods for paraffin-embedded pathlogical samples*. Iran J Pathol. 2007; 2(4): 159-164.

10- Zong JC, Metroka C, Reitz MS. *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.

11- Nicholas J, Zong JC, Alcendor DJ. *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.

12- DiAlberti L, Ngui SL, Porter SR. *Presence of human herpesvirus 8 variants in the oral tissues of human immunodeficiency virus-infected persons*. J Infect Dis. 1997; 175:703–707.

13- Whitby D, Marshall VA, Bagni RK. *Genotypic characterization of Kaposis sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from*

www.SID.ir

Archive of SID

isolated populations. J Gen Virol. 2004; 85:155-163.

14- Kasolo FC, Monze M, Obel N. *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.

15- Kajumbula H, Wallace RG, Zong JC. *Ugandan Kaposi's Sarcoma-Assocaited Herpesvirus phylogeny: Evidence for cross-ethnic transmission of viral subtypes.* Intervirology. 2006; 49:133-143.

16- Moore PS, Chang Y. *Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection.* New Eng J Med. 1995; 332: 1181-1185.

17- Jin YT, Tsai ST, Yan JJ. *Detection of Kaposi's sarcomaassociated herpesvirus-like DNA sequence in vascular lesions.* Am J Clin Pathol.1996; 105: 360-363.

18- Huang YQ, Li JJ, Poiesz BJ. *Detection of the herpesvirus-like DNA sequences in matched specimens of semen and blood from patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma by polymerase chain reaction in situ hybridization.* Am J Pathol.1997; 150: 147-153.

19- Jalilvand S, Shoja Z, Mokhtari-Azad T. *Seroprevalence of Human herpesvirus 8 (HHV-8) and incidence of Kaposi's sarcoma in Iran.* Infect Agent Cancer. 2011; 6:5.

20- Mahmoodi M, Rastin M, Khoie A. *Survey of HHV8 and HTLV1 Genomes with Kaposi's Sarcoma.* J Basic Med Sci. 2005; 8(2):119-124.

21- Caterino-de-Araujo A, Calabrò ML, Favero A. *Detection of herpes virus (KSHV) DNA sequences in Brazilian patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma*. Braz J Infect Dis. 1997; 1(5): 256-259.

22- Ramos- da-Silva S, Elgui-de-Oliveira D, Borges L. *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and Kaposi'ssarcoma in Brazil*. J Med Bio Res. 2006; 39: 573-580.

23- Luppi M, Barozzi P, Santagostino G. *Molecular evidence of organ-related transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus or human herpesvirus-8 in transplant patients.* Blood. 2000; 96: 3279-3281.

24- Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK. *Update on Kaposi's sarcoma and other HHV-8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy.* Lancet. 2002; 2: 281-292.

www.SID.ir