

# היארעות הנגיף VZV בתחלואה של מערכת העיכול כתוצאה מריאקטיבציה (אנטרוזוסטר)

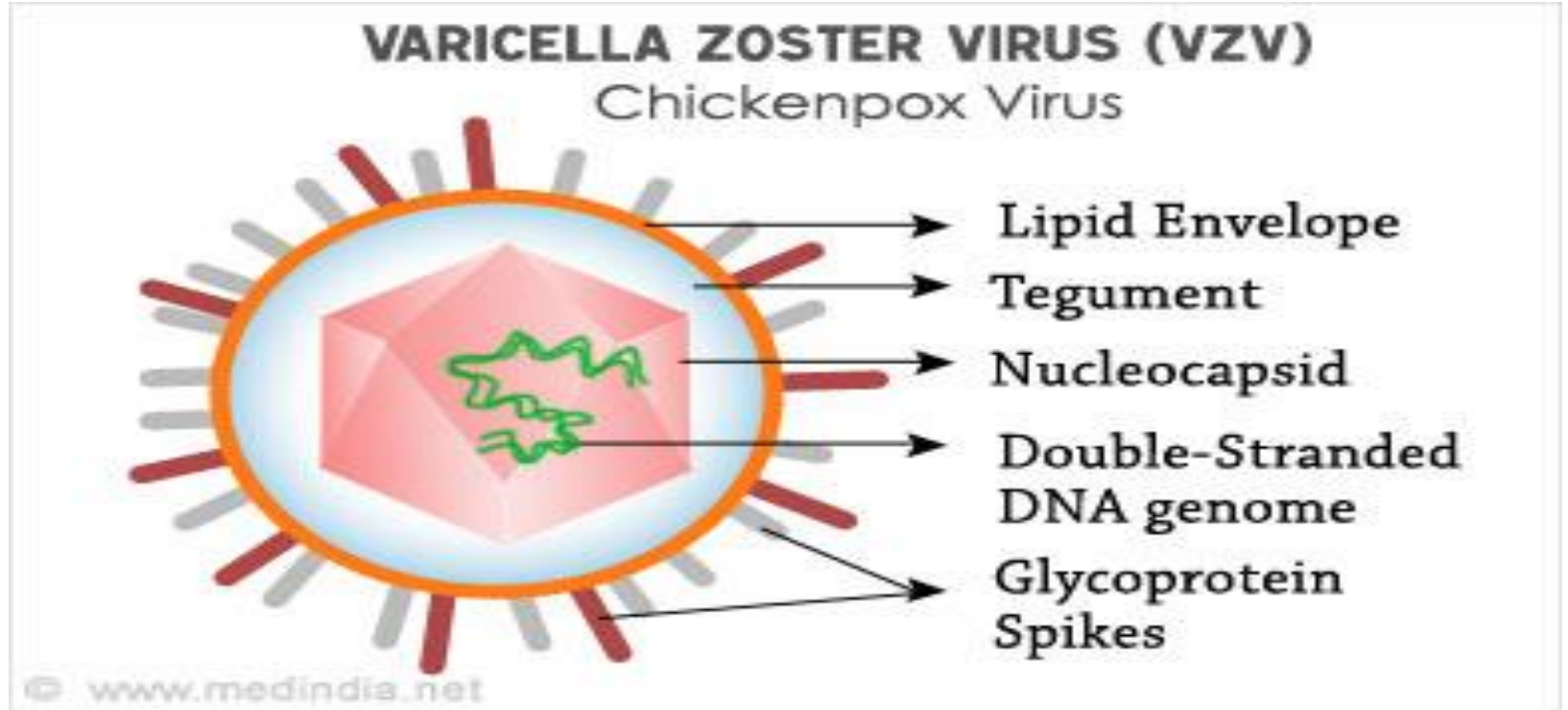
מוגש במסגרת פרויקט מחקר (20576)  
באוניברסיטה הפתוחה

שם המגישה: אלה קשי.  
שם המנחה: ד"ר שרה דוברת  
מוגש לד"ר רונית ויסמן  
סמסטר 2017 ג

# הרקע למחקר

- נגיף VZV משתייך למשפחת נגיפי הרפס המונה 8 נגיפים שונים התוקפים אדם.
  - המשותף לכל הנגיפים היא היכולת ליצור מצב חבוי (לטנטי) לאחר הדבקה ראשונית המלווה באירועי התלקחות (ראקטיבציה) מעת לעת.
  - נגיף ה-VZV הוא הגורם האטיולוגי עבור שתי מחלות: אבעבועות רוח המכונה גם Chickenpox ושלבקת חוגרת (Shingles; Herpes Zoster)
- [1, 2]

# נגיף ה-VZV



• נגיף ה-VZV מכיל ארבעה מרכיבים עיקריים: קופסית, טגומנט, מעטפת וגנום שמהווה את הליבה.

• קוטרו של נגיף VZV בוגר הוא 180-200 nm

# הרקע למחקר

- בעבר רווחה הדעה כי המעבר של הנגיף, בעקבות הדבקה ראשונית, לגנגליונים נעשה דרך נדידה לאורך האקסון ועל כן הנגיף נמצא לטנטי באקסונים מעטים.
- כיום ידוע כי הנגיף מועבר לגנגליונים גם במהלך וירמיה ולא רק דרך האקסון ונמצא בגנגליונים מרובים כולל במערכת העיכול –ENS.
- בספרות מציינים שכל מי שחלה באבעבועות או חוסן נושא נגיף גם במערכת העצבית של המעי.
- התלקחות של נגיף ממערכת העצבית של מערכת העיכול מכונה Enterzoster [3, 4, 5]

# אנטרוזוסטר

- התלקחות של נגיף לטנטי מה- ENS אינו מגיע לעור ולכן אין בהכרח מופע שלפוחיות אופייני לזוסטר.
- התסמינים החיצוניים לאנטרוזוסטר הינם כאבי בטן עזים ללא הסבר ברור.
- ייתכן גם זוסטר מלווה באנטרוזוסטר. במקרים אלה תמצא פריחה מלווה גם בכאבי בטן.

[6]

# התלקחות אנטרוזוסטר על פי הספרות

## המדעית

- זיהוי הנגיף כגורם אטיולוגי לכאבי הבטן יכול להיעשות על ידי קביעת נוכחותו ברוק באמצעות PCR.
- לאחרונה פורסם על 11 מקרים של כאבי בטן לא מוסברים אשר נבדקו לנוכחות VZV ברוק. ב-6 מקרים אובחן נגיף. ב-3 מקרים נעשה טיפול בגנציקלוויר.
- בכל שלושת המקרים הטיפול האנטי וירלי סייע להיעלמות הכאבים.

[7]

# שכיחות התלקחות הנגיף

- ידוע כי זוסטר נפוץ יותר בגיל המבוגר עקב ירידה בפעילות מערכת החיסון התאית.
- במחלות דלקתיות הקשורות במערכת העיכול כגון IBD תסמיני כאבי הבטן נפוצים וכן נפוצים טיפולים בתרופות המדכאות את מערכת חיסון כמו סטרואידים, תרופות כימותרפיות (יפורטו בהמשך) ונוגדי הציטוקין TNF a [8, 9]

# מהי מחלת IBD?

- מחלת מעי דלקתית (IBD) היא הפרעה דלקתית עם אטיולוגיה לא ידועה.
- היא מורכבת משני מופעים שונים של מחלה: מחלת קרוהן (CD)-פעילות דלקתית שהמקור שלה הוא בשפעול כרוני של מערכת החיסון כנגד מרכיבים (שטרם זוהו) בדופן או בחלל המעי וקוליטיס (IBD)- מחלה דלקתית כרונית שפוגעת במעי הגס.
- הפתוגנזה של IBD הפכה מובנת יותר לאחרונה בשל התקדמות במחקר גנטי ואימונולוגי. [10]



# טיפולם בחולי IBD

- אסטרטגיות טיפוליות חדשות:
- מעבר לטיפול קונבנציונאלי הגורם לדיכוי חיסוני, ישנן תרופות ביולוגיות המכוונות כנגד גורמי דלקת ספציפיים שנמצאו מעורבים במחלה כגון נוגדי הציטוקין  $TNF \alpha$ .
- טיפולים אלו גורמים להפוגה במחלה בחלק מחולי IBD. [8, 9, 10]

# אמונוסופרסיה והשפעתה על התלקחות

## נגיפים ממשפחת נגיפי ההרפס

- בחולים עם כשל במערכת החיסון כדוגמת חולי HIV או מושתלי מח עצם ורקמות סולידיות המקבלים טיפול תרופתי המדכא את המערכת החיסונית מתרחשת התלקחות של נגיפי הרפס, בעיקר *CMV*, *EBV*, *VZV*, *HSV type 1&2*.
- חולי IBD מקבלים טיפולים אימונוסופרסיביים בתרופות הפועלות כגון *Infliximab* ו-*Azathioprine* ולכן יש סיכוי להתעוררות של נגיפים ממשפחת ההרפס.  
[11, 12, 13, 14]

# מנגנון תרופות אימונוסופרסריות בחולי

## IBD

- אזאתיופריין (azathioprine) שייכת לקבוצת התרופות שמדכאות את המערכת החיסונית, שאותה מקבלים בין היתר גם מושתלי איברים על-מנת שהמערכת החיסונית לא תדחה את האיבר המושתל.
- אזאתיופריין מתערבת בתהליך סינתזה הפורינים ולכן גורמת לעיכוב של תאי B ו-T ובכך מחלישה את מערכת החיסון.

[15]

# מנגנון תרופות אימונוסופרסריות בחולי

## IBD

- התרופה **Infliximab** מכילה נוגדנים כנגד **TNF** אלפא (נוגדנים כימריים עם רצף עכברי). התרופה חוסמת פעילות של חלבון בשם **TNF** אשר מיוצר על ידי תאים ממערכת החיסון שתפקידם להגביר דלקת.
- במחלות מעי דלקתיות דוגמת מחלת קרוהן, נמצא שחסימת הפעילות של חלבון זה מפחיתה את הפעילות הדלקתית במעי.
- השיפור מתבטא גם בהרגשה הכללית, בירידה בכאבי הבטן, בשלשולים ובמדדים דלקתיים בבדיקות. [15]

# התלקחות בנגיף VZV

- התלקחות של הנגיף ממקור ENS בחולי IBD היא אפשרית תיאורטית אך מעולם לא נבדקה בתבחין מעבדתי ולכן אין לדעת האם אנטרוזוסטר מעורב ותורם לתסמיני המחלה הכוללים כאבי בטן.

# מטרת המחקר - בדיקת מעורבות של נגיף הוריצלה בתחלואה מסוג IBD (קוליטיס וקרוהן)

- המחקר בוצע בשיתוף עם מרפאת גסטרו ועם ד"ר אורי קופלוב.
- הרשאת ועדת הלסינקי קיימת וכוללת הרשאה ללקיחת דגימות רוק לבדיקת מזהמים נגיפיים וחידקיים.
- החתמת הנבדקים על ידי טופס הסכמה מדעת על ידי ד"ר אורי קופלוב.

# שלב המחקר

אסוף דגימות רוק מחולי קרוהן וקוליטיס המגיעים לקבלת עירוניים כחלק מהטיפול במחלתם במרפאת גסטרו

אסוף דגימות רוק מאנשים בריאים - קבוצת ביקורת.

הפקת DNA

זיהוי נגיפי הרפס מקבוצת אלפא באמצעות טכנולוגיית PCR

זיהוי גן תאי כביקורת פנימית לדגימת רוק תקינה

אנליזה של התוצאות והסקת מסקנות

## שיטת איסוף הדגימות

- נלקחו דגימות רוק מחולי IBD שמגיעים למרפאת גסטרו בתל השומר (57 דגימות) וחולים בריאים - אנשי הצוות במעבדה (8 דגימות).
- בוצע מיצוי DNA.
- נבדקה בדיקת נוכחות HSV, VZV בשיטת Taqman real time PCR



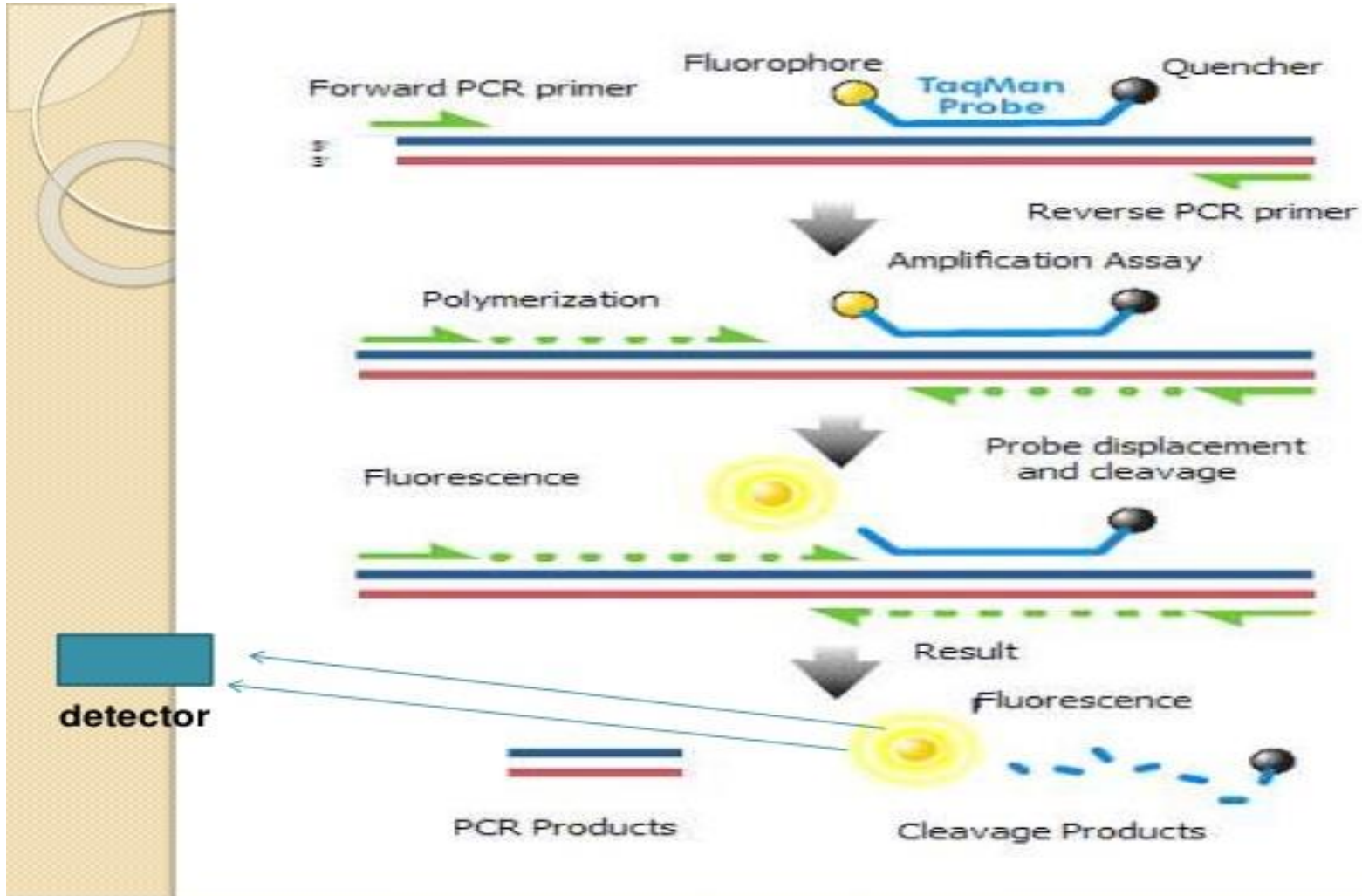
# זיהוי רצפי DNA באמצעות Taqman Real Time PCR

- שיטת ה- Real Time PCR Taqman מאפשרת בו זמנית הערכה כמותית של מולקולות התבנית שנמצאות בדגימה על ידי טכניקת ה-Taqman שנועזרת בהוספת גלאי ייחודי לתהליך ה-PCR שמסומן בקבוצה פלורסנטית ומאפשר מעקב אחרי הריאקציה באמצעות מדידת עוצמת הפלורסנציה בכל מחזור ומחזור. [17, 18]

# זיהוי רצפי DNA באמצעות Taqman Real Time PCR

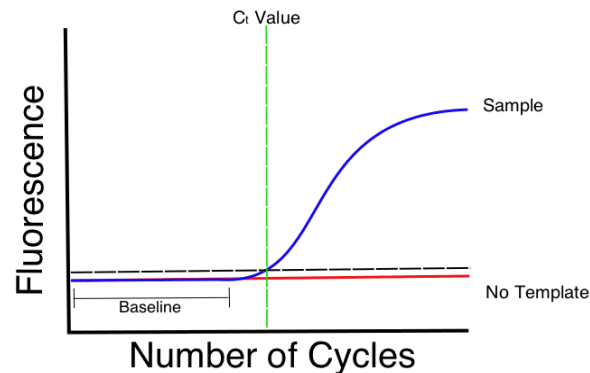
- הגלאי שנקשר לאחד הגדילים מפריע לפעולת האנזים ולכן מתפרק על ידו לבסיסים בודדים פעולה שמפרידה בין הקבוצה הפלואורסצנטית לקבוצה הגורמת לבליעת האור הנפלט ולדיכוי הפלואורסצנציה ולכן בכל מחזור של סינתזה מתפרקות מולקולות גלאי ומשתחרר אות פלורסנטי. [17, 18]

# Taqman Real Time PCR



# ערך CT (Cycle Thershold)

- ככל שנוספים מחזורי שכפול האות הפלואורסצנטי עולה והכמות שלו נאמדת על ידי גלאי פלואורסנציה רגיש במכשיר.
- כאשר כמות האות הפלואורסצנטי עוברת סף מסוים שמכונה Cycle Threshold (CT) - הריאקציה נחשבת חיובית.



## ערך CT (Cycle Thershold)

- ככל שכמות עותקי DNA תבנית רבים יותר אירוע זה יתרחש במחזור מוקדם יותר ולכן ערך CT הוא מדד לכמות עותקי ה-DNA שנמצאו מלכתחילה בדגימה.
  - בצורה הזאת אפשר לקבל מידע בזמן אמת על כמות עותקי ה-DNA שנמצאו בדגימה.
- [17, 18]

# יתרונות שיטת Taqman Real Time PCR לזיהוי רצפי DNA

- יתרונות של שיטת ה-Real Time PCR הם בעיקר חיסכון בזמן, רגישות יותר גבוהה והפחתת הסיכון לזיהומים מולקולאריים מכיוון שההגברה מתרחשת במערכת סגורה ללא פתיחת המבחנה.
- בשיטה זו נעשה שימוש קליני נרחב המאפשר בדיקת נוכחות נגיפים שונים במספר גדול של דגימות קליניות. [17, 18]

# תוצאות PCR שנמצאו חיוביות לנגיפי הרפס בדגימות רוק של חולי IBD

תאריך דיגום	תאריך מיצוי	מספר דגימה	HSV 2 ערך ct	HSV 1 ערך ct	VZV ערך ct
4.5.17	23.5.17	IBD 1	*42.3689-CN	-	-
4.5.17	23.5.17	IBD 9	* 39.0979-LP	-	-
4.5.17	23.5.17	IBD 10	-	25.0717-CP	-
18.5.17	23.5.17	IBD 25	-	28.5406-CP	-
7.6.17	22.6.17	IBD 30	-	-	*43.0-CN
8.6.17	22.6.17	IBD 33	-	35.2-CP	-

**מקרא ממצאים של ערכי Ct: ערך Ct קטן מ-36 - חיובי**  
(Clinical Positive=CP),

ערך Ct גדול מ-36 וקטן מ-42 חיובי חלש (Low Positive=LP)  
וערך Ct גדול מ-42 שלילי (Clinical Negative=Cn).

# תיקוף תוצאות ה-PCR

- דגימות שנמצאו חיוביות בערך  $ct \geq 39$  נבדקו פעם נוספת מאותו מיצוי או לאחר מיצוי נוסף על מנת לאשר את התוצאות.
- תוצאת בדיקת ה-PCR השנייה נמצאה שלילית עבור כל הדגימות ולכן יש להתייחס לתשובות אלו כאל תוצאות שליליות.



## מסקנות ודיון

- נמצאו שלושה מקרים חיוביים של נוכחות נגיף הרפס מסוג 1 (HSV 1) - בדגימות IBD שמספרן 10,25,33.
- דגימות אשר הראו ערך Ct גבוה מ-39 עבור הנגיפים HSV2, VZV נבדקו בשנית ובבדיקה חוזרת התגלו כדגימות שליליות.
- הממצאים לגבי הרפס 1 יכולים להצביע על נגע או שחרור נגיף אסימפטומטי.

## מסקנות ודיון

- ריאקטיבציה של VZV לא אובחנה באף אחת מדגימות הרוק שנלקחו מחולי IBD.
- היעדר תוצאה חיובית ל-VZV מצביעה על כך שריאקטיבציה של נגיף זה בחולי IBD איננה שכיחה.
- בקבוצת הביקורת לא נמצא שחרור של נגיפי הרפס

# מסקנות ודיון

- שחרור אסימפטומטי של הרפס מטיפוס 1 נצפה גם באנשים בריאים, הוא אינו מצדיק טיפול התערבותי ויכול לשקף מצב של ירידה בכושר החיסוני.
- שכיחות הפרשה אסימפטוטית בחולי IBD ביחס לאוכלוסייה הנחשבת בריאה מצריך קבוצת ביקורת בגודל קבוצת החולים ודורש מספר גבוה של דגימות ולכן לא ניתן להסיק מתוצאות אלו על שכיחות מוגברת בחולי IBD מפאת גודל המדגם.

# מסקנות ודיון

- ייתכן שבמחקר שבו יילקחו דגימות רק ממצבים אקוטיים המלווים בכאבי בטן עזים בעת לקיחת הדגימה יהיה ניתן לזהות אנטרו-זוסטר במקרים בודדים כפי שהתגלו מקרים של זוסטר או אף אנצפליטיס מנגיף VZV בחולים אלו ופורסמו כמחקרי מקרה (ref)

## מסקנות ודיון

**CMV, HHV-6 ו-EBV משתייכים למשפחת נגיפי ההרפס מטיפוס ביתא ונוכחתם מצביעה על כך שריאקטיבציה של נגיפים ממשפחת ההרפס מתרחשת בשכיחות גבוהה יותר בחולי IBD, אבל תרומתם להתפתחות המחלה או להיווצרות תהליכים אימונופתולוגיים המתווכים תהליכים דלקתיים ברירית של המעי איננה ברורה ודורשת מחקרים נוספים.**

- **כפי הנראה VZV איננו מתווך עיקרי של תהליכים אלה.**

# מסקנות ודיון

- במחקר שהתפרסם לאחרונה - יולי 2017, נמצאה שכיחות גבוהה סטטיסטית דווקא של נגיפי EBV, HHV6 ו-CMV ברירית של המעי בחולי IBD בהשוואה לאנשים בריאים- דגימות רוק לא נבדקו במחקר זה. [18]
- ייתכן והסתכלות כוללת על כלל הנגיפים ממשפחת נגיפי ההרפס, העוברים התלקחות בחולים אלו ביחס לאנשים בריאים, יעיד על הצורך בהתמודדות עם עומס נגיפי (מנגיפים שונים) לפרקי זמן ממושכים בחולים אלו ביחס לאוכלוסייה בריאה. עומס שכזה יכול אולי לתרום לתגובות חיסוניות פתולוגיות המעורבות בהתפתחות או השארות מצב דלקתי כרוני.
- נושא זה יכול להוות מחקר עתידי

# Ref

1. Cohen, J.I., S.E. Straus, and A.M. Arvin, *Varicella-Zoster Virus Pathogenesis and Management*, in *Fields Virology*, D.M. Knipe, Repliation and P.M. Howley, Editors. 2007, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 2774-802.
2. Sueli L.T et al, *Complete DNA Sequences of Two Oka Strain Varicella-Zoster Virus Genomes*, in *Journal of Virology*, Nov.2008,p.11023-11044.
3. Gershon, A. A., & Silverstein, S. J. (2009). Varicella-zoster virus. *Clinical virology*, (Ed. 3), 451-473.
4. Gan, L., Wang, M., Chen, J. J., Gershon, M. D., & Gershon, A. A. (2014). Infected peripheral blood mononuclear cells transmit latent varicella zoster virus infection to the guinea pig enteric nervous system. *Journal of neurovirology*, 20(5), 442-456.
5. Chen, J. J., Gershon, A. A., Li, Z., Cowles, R. A., & Gershon, M. D. (2011). Varicella zoster virus (VZV) infects and establishes latency in enteric neurons. *Journal of neurovirology*, 17(6), 578-589.

# Ref

6. Rao, M., & Gershon, M. D. (2016). The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13(9), 517-528.
7. Gershon, A. A., Chen, J., & Gershon, M. D. (2015). Use of saliva to identify varicella zoster virus infection of the gut. *Clinical Infectious Diseases*, 61(4), 536-544.
8. Boettler, T., Lutz, L., Schmidt, N., Thimme, R., & Neumann-Haefelin, C. (2015). An uncommon presentation of a common pathogen. *Gut*, gutjnl-2014.
9. Nishimura, S., Yoshino, T., Fujikawa, Y., Watanabe, M., & Yazumi, S. (2015). A rare case of ulcerative colitis exacerbated by VZV infection. *Clinical journal of gastroenterology*, 8(6), 390-392.
10. 10. Kim, D. H., & Cheon, J. H. (2017). Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. *Immune network*, 17(1), 25-40.



# Ref

11. Brennan, D. C., Aguado, J. M., Potena, L., Jardine, A. G., Legendre, C., Säemann, M. D., ... & Nashan, B. (2013). Effect of maintenance immunosuppressive drugs on virus pathobiology: evidence and potential mechanisms. *Reviews in medical virology*, 23(2), 97-125.
12. Maves, R. C., Tripp, M. S., Dell, T. G., Bennett, J. W., Ahluwalia, J. S., Tamminga, C., ... & Dempsey, M. P. (2014). Disseminated vaccine-strain varicella as initial presentation of the acquired immunodeficiency syndrome: A case report and review of the literature. *Journal of Clinical Virology*, 59(1), 63-66.
13. Kim, D. H., & Cheon, J. H. (2017). Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. *Immune network*, 17(1), 25-40.
14. Kim, D. H., & Cheon, J. H. (2017). Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. *Immune network*, 17(1), 25-40.

# Ref

15. Colombel, J. F., Sandborn, W. J., Reinisch, W., Mantzaris, G. J., Kornbluth, A., Rachmilewitz, D., ... & Tang, K. L. (2010). Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *New England Journal of Medicine*, 362(15), 1383-1395.
16. Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 30(6), 1292-1305.
17. Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology*, 30(6), 503-512.
18. Lopes, S., Andrade, P., Conde, S., Liberal, R., Dias, C. C., Fernandes, S., ... & Macedo, G. (2017). Looking into Enteric Virome in Patients with IBD: Defining Guilty or Innocence?. *Inflammatory Bowel Diseases*, 23(8), 1278-1284.