

## میزان بار سائتومگالوویروس و پیگیری آن در گیرندگان پیوند مغز استخوان آلوزنیک مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی

نرگس عبیدی<sup>۱</sup>، دکتر حمیداله غفاری<sup>۲</sup>، دکتر احمد قره باغیان<sup>۳</sup>، دکتر کامران علی مقدم<sup>۴</sup>، دکتر مهدی دهقان<sup>۵</sup>،  
دکتر اردشیر قوامزاده<sup>۶</sup>، دکتر احمد رضا شمشی<sup>۷</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

CMV به عنوان مهم ترین پاتوژن ویروسی در دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان آلوزنیک و بافت جامد می باشد. بر اساس مطالعات سرواپیدمیولوژی، شیوع آن در کشورهای مختلف ۱۰۰-۳۰ درصد است. پیشرفت بیماری CMV تنها در ۲۵-۲۰ درصد از گیرندگان پیوند مغز استخوان اتفاق می افتد. به دلیل تشابه علائم بیماری CMV و پیوند در دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان و متفاوت بودن درمان این دو، لازم است با استفاده از روش Real-Time PCR (RQ-PCR)، میزان بار CMV را در گیرندگان پیوند مغز استخوان بررسی نمود.

#### مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. کلیه گیرندگان پیوند مغز استخوان آلوزنیک که خود یا دهنده آنها آلوده به CMV بوده و روش آنتی ژنمیا آنها مثبت بود، به ترتیب مراجعه، مورد مطالعه قرار گرفتند. ۵۱ گیرنده پیوند مغز استخوان به شکل هفتگی به مدت ۱۰۰ روز پیگیری شدند. بر روی ۴۱۵ نمونه خون کامل جمع آوری شده از آنها، این ویروس با دو روش RQ-PCR و آنتی ژنمیا بررسی گردید. برای تهیه استاندارد RQ-PCR، ژن UL83 مربوط به پروتئین pp65 کلون شد و در این روش از پروب تک من برای Real-Time PCR استفاده گردید. نتایج دو روش با هم ارتباط معنی داری داشتند ( $\text{correlation coefficient} = 0.916$ ). برای تجزیه و تحلیل نتایج از نرم افزار SPSS ۱۱/۳ و آزمون های t (t test)، من ویتنی (Mann-whitney)، کای دو (Chi-square) و اسپیرمن (Spearman) استفاده شد.

#### یافته ها

گستره تشخیصی RQ-PCR،  $2 \times 10^5$  cells،  $15 \times 10^1$  -  $13 \times 10^1$  بود. از ۹۳ نمونه مثبت، ۸۱ نمونه دارای میزان کپی بالاتر از آستانه ( $2 \times 10^5$  cells،  $10^3$  copies) بودند. اولین نتیجه مثبت RQ-PCR در مقایسه با آنتی ژنمیا، ۱۳ روز زودتر بود. زمان لازم برای منفی شدن RQ-PCR بعد از درمان preemptive ۱۶ روز بود.

#### نتیجه گیری

نتایج ما نشان داد که نتایج منفی RQ-PCR بعد از درمان preemptive، شاخص مناسبی برای تعیین موفقیت درمان و زمان قطع درمان می باشد. واکنش CMV در بیماران تحت مطالعه، به نوع داورى سرکوب کننده ایمنی بستگی داشت.

**کلمات کلیدی:** سائتومگالوویروس، پیوند مغز استخوان، PCR

تاریخ دریافت: ۸۵/۵/۷

تاریخ پذیرش: ۸۶/۱/۱۸

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۲- مؤلف مسؤول: PhD ایمونوزنیک - استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی - صندوق پستی ۱۴۱۱۴

۳- PhD ایمونوهماولوژی بالینی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۴- فوق تخصص هماتولوژی انکولوژی - استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی

۵- فوق تخصص هماتولوژی انکولوژی - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۶- فوق تخصص هماتولوژی انکولوژی - استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی

۷- PhD آمار حیاتی - مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی

**مقدمه**

CMV به عنوان مهم ترین پاتوژن ویروسی در گیرندگان پیوند مغز استخوان آلونژنیک و بافت جامد (allogenic bone marrow and solid organ transplant recipients) می باشد (۱-۳). بر اساس مطالعات سرواپیدمیولوژی، شیوع سرمی آن در کشورهای مختلف می تواند تا ۱۰۰٪ باشد (۴). واکنش های ویروسی در ۵۰٪ از گیرندگان پیوند مغز استخوان (BMT) آلونژنیک رخ می دهد و ممکن است منجر به پیشرفت بیماری CMV شود. عفونت ناشی از این ویروس، یکی از شایع ترین عوارض بعد از پیوند بوده و مهم ترین عامل از کار افتادگی و مرگ و میر بعد از پیوند مغز استخوان می باشد (۷-۵، ۳).

CMV در افراد سالم توسط سیستم ایمنی به خصوص سیستم ایمنی سلولی کنترل می شود ولی در افراد با نقص یا ضعف سیستم ایمنی (مثل افراد پیوندی) افزایش یافته و باعث ویرمی و نهایتاً ایجاد بیماری می شود (۵). پیشرفت بیماری CMV تنها در ۲۵-۲۰ درصد از بیماران پیوندی رخ داده و می تواند باعث افزایش استعداد به هپاتیت، عفونت های گوارشی، پنومونی، آنسفالیت، رتینیت، ایتروکولیت، رد پیوند و در نهایت مرگ بیماران گردد (۱۰-۸، ۴، ۵). چنین علائمی در بیماری رد پیوند (GVHD) حاد نیز رخ می دهد (۱۱). ارزیابی های اولیه برای تشخیص عفونت فعال CMV بعد از شروع علائم می باشند ولی با پیشرفت تکنولوژی می توان قبل از آن، عفونت را تشخیص داد (۲). به دلیل تشابه بیماری CMV و GVHD در گیرندگان BMT و متفاوت بودن درمان این دو، پس با این روش می توان تشخیص را آسان نمود.

دو روش اساسی برای جلوگیری از تولید بیماری CMV در این گروه بیماران استفاده می شود:

- ۱- تجویز داروی مؤثر ضد ویروسی، در تمام بیمارانی که در خطر فعال شدن مجدد CMV می باشند که به پروفیلاکسی عمومی معروف است.
- ۲- استفاده از داروهای ضد ویروسی، فقط در اشخاص دارای واکنش ویروسی قبل از وقوع بیماری، که آن را درمان بازدارنده (preemptive therapy) گویند (۱۳، ۱۲، ۱).

داروهای ضد ویروسی از جمله گان سیکلوویر، از بیماری CMV در مدت سه ماه بعد از پیوند ممانعت کرده و تقریباً ۷۰-۵۰ درصد از بیماری و مرگ و میر ناشی از آن را کاهش می دهند (۸، ۱۱). ولی سمیت مربوط به این داروها (ganciclovir, Foscarnet, cidofovir) به عنوان مشکل عمده ای باقی مانده است (۱۴). از آن جایی که این عوامل میلوتوکسیک و نفروتوکسیک بوده و باعث نوتروپنی طولانی مدت و استعداد به عفونت های فرصت طلب و ثانویه (قارچی و باکتریایی) می شوند و از طرفی پیشرفت بیماری CMV تنها در ۲۵-۲۰ درصد از بیماران رخ می دهد، پس استفاده اختصاصی و کوتاه مدت از این عوامل، در بیماران با خطر بالا، از عوارض جانبی آن می کاهد (۱۵، ۱۳، ۵، ۳، ۱). این مستلزم وجود مارکرهای شناسایی جهت پیش گویی حمله CMV و استفاده از روش های سریع، دقیق، حساس و اختصاصی برای تشخیص بیماران با خطر بالا می باشد (۱۶، ۱۲). البته باید در نظر داشت که همیشه تشخیص CMV به تنهایی، تعیین کننده نیاز به درمان نبوده و علائم بالینی نیز لازم می باشد (۱۷، ۱۶). در این تحقیق هدف ما بررسی میزان بار سایتومگالوویروس با استفاده از دو روش Real-Time PCR و آنتی ژنمیا در گیرندگان پیوند مغز استخوان آلونژنیک مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی بود.

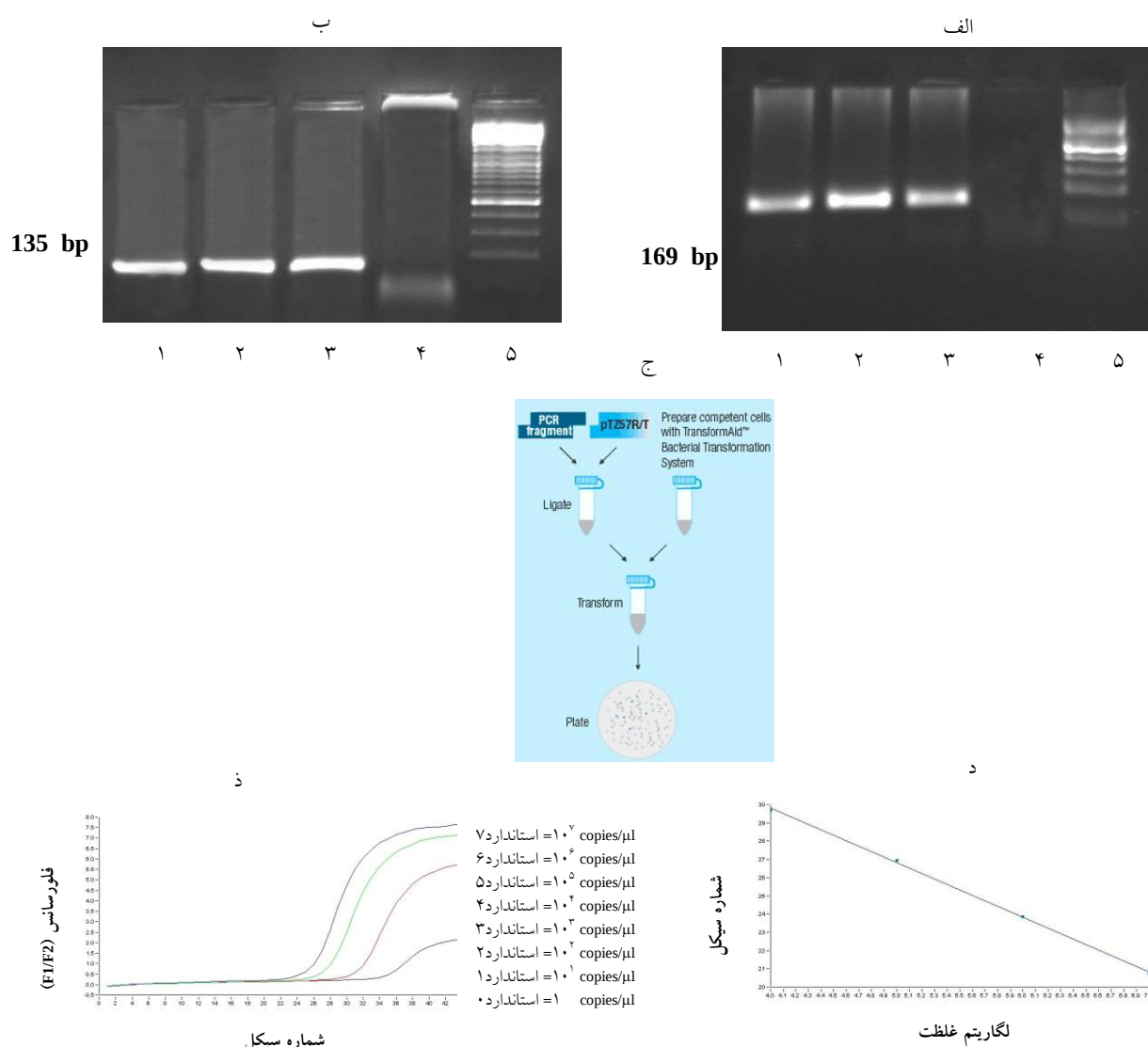
**مواد و روش ها**

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی (Cross-sectional) بود. کلیه گیرندگان پیوند مغز استخوان آلونژنیک که خود یا دهنده آن ها آلوده به CMV بوده و روش آنتی ژنمیا آن ها مثبت بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. بیماران به ترتیب مراجعه انتخاب و به صورت هفتگی به مدت ۱۰۰ روز بعد از پیوند پیگیری شدند (۱۳، ۸، ۱).

از نمونه های مختلف مثل خون کامل، پلاسما، ادرار، اسپیراسیون و لاواژ ریه، مغز استخوان، مایع مغزی - نخاعی، مایع آمیوتیک، شستشوی گلو، مایع منی و بیوپسی بافت می توان استفاده نمود (۱۹، ۱۸، ۲). مناسب ترین نمونه برای تعیین CMV DNA، نمونه خون کامل یا لکوسیت ها می باشد (۲۱، ۲۰). در این تحقیق از ۵-۳ میلی لیتر خون

حساسیت کار و احتمال از دست دادن نمونه‌ها در حین پی‌گیری، از ۵۱ بیمار استفاده شد. ۸ بیمار به دلیل نگرشتن پیوند و یا فوت بلافاصله پس از پیوند، کنار زده شدند و نهایتاً ۴۳ بیمار به صورت هفتگی به مدت ۱۰۰ روز بعد از پیوند پیگیری شدند. در مجموع بر روی ۴۱۷ نمونه آزمایش انجام شد.

کامل به همراه ضد انعقاد EDTA استفاده شد. با توجه به مطالعات مشابه انجام شده، امکانات موجود، مطالعه پیلوت و فرمول‌های آماری باید ۳۹ گیرنده پیوند مغز استخوان که خود یا دهنده آن‌ها آلوده به CMV بوده و روش آنتی‌ژنمیا آن‌ها مثبت بود، صرف نظر از سن و جنس و نوع بیماری زمینه به ترتیب مراجعه انتخاب می‌شدند. برای بالا رفتن



شکل ۱: الف - CMV PCR بر روی نمونه‌های DNA استخراج شده، ستون ۱ و ۲ نمونه بیمار CMV<sup>+</sup>، ستون ۳ کنترل مثبت، ستون ۴ کنترل منفی و ستون ۵ ساینز مارکر. ب- PCR  $\beta_2$  میکروگلوبولین بر روی نمونه‌های DNA استخراج شده، ستون ۱-۳ نمونه بیمار، ستون ۴ کنترل منفی و ستون ۵ ساینز مارکر. ج- مراحل کلونینگ در نمودار استاندارد با رقت‌های  $10^4$  -  $10^7$  copies/μl. د- منحنی استاندارد با رقت‌های  $10^4$  -  $10^7$  copies/μl.

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی آغازگرها و پروب PCR، شرایط و مواد مورد نیاز جهت انجام PCR و Real-Time PCR

| آغازگرها و پروب                                                                                                                               | Master Mix                                                                                                     | شرایط PCR                                                                                                                                                                    | شرایط RQ-PCR                                                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CMV-RT-F-5-<br>GCAGCCACGGGATCGTACT-3<br>CMV- RT-R-5-<br>GGCTTTTACCTCACACGAGCATT-<br>3<br>CMV- PROB-5-FAM-<br>CGCGAGACCGTGGAAGTGGC-<br>TAMRA-3 | Buffer 10X,<br>MgCl <sub>2</sub> 50mM,<br>dNTP mix 10mM,<br>CMV-F 10μM,<br>CMV-R 10μM,<br>Taq Polymerase 5u/μl | دنا تورا سیون در دمای ۹۵°C<br>برای ۴ دقیقه (دمای ۹۵°C)<br>برای ۳۰ ثانیه، دمای ۶۰°C<br>برای ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲°C<br>برای ۴۰ ثانیه (برای ۴۰<br>سیکل، دمای ۷۲°C برای ۷<br>دقیقه | دنا تورا سیون در دمای ۹۵°C<br>برای ۴ دقیقه - (دمای ۹۵°C)<br>برای ۳۰ ثانیه، دمای ۶۰°C<br>برای ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲°C<br>برای ۴۰ ثانیه (برای ۴۰<br>سیکل - دمای ۷۲°C برای ۷<br>دقیقه |

1-FAM : 6-Carboxy fluorescein

2-TAMRA : 6-Carboxy tetra methyl rhodamine

Derivative Maximum Method استفاده شد. در این روش به طور خودکار تعداد سیکل Cross Point هر نمونه مشخص گردید (Cross point هر نمونه نقطه ای است که در آن سیکل وارد فاز لگاریتمی شده و اندازه گیری کمی نهایی در این نقطه با مقایسه Cross point های نمونه ها نسبت به منحنی استاندارد به دست می آید (شکل ۱، د، ذ)). در تجزیه و تحلیل نهایی اطلاعات از نرم افزار SPSS ۱۱/۳ و آزمون های t، من ویتنی، کای دو و اسپیرمن استفاده شد.

#### یافته ها

۷ نمونه به طور هم زمان، با هر دو روش Real-Time PCR و آنتی ژنمیا، pp65 مثبت بودند، ۷۴ نمونه با روش Real-Time PCR مثبت ولی با روش آنتی ژنمیا منفی بودند. در ۳۲۹ نمونه نیز، CMV با هر دو روش منفی باقی ماند. بین تمام نتایج به دست آمده با آنتی ژنمیا و Real-Time PCR ارتباط معنی داری مشاهده شد ( $p < 0/012$ )، ۱۶۹/۰ (cc: ۱۲ نمونه دارای آنتی ژنمیا بالاتر از cells  $2 \times 10^5$  : ۲۰ positive cells) cut off بودند. در حالی که ۸۱ نمونه دارای Real-Time PCR بالاتر از مقدار (cell  $2 \times 10^5$  : ۱/۴  $\times 10^3$  copies) cut off بودند.

با توجه به نمودار «الف» در شکل ۲، میانگین میزان سلول های مثبت با روش آنتی ژنمیا، در تمامی بیماران طی مدت پی گیری در هفته پنجم شروع به افزایش کرد، بین هفته های ۸ و ۹ به حداکثر رسید و پس از آن کاهش یافت.

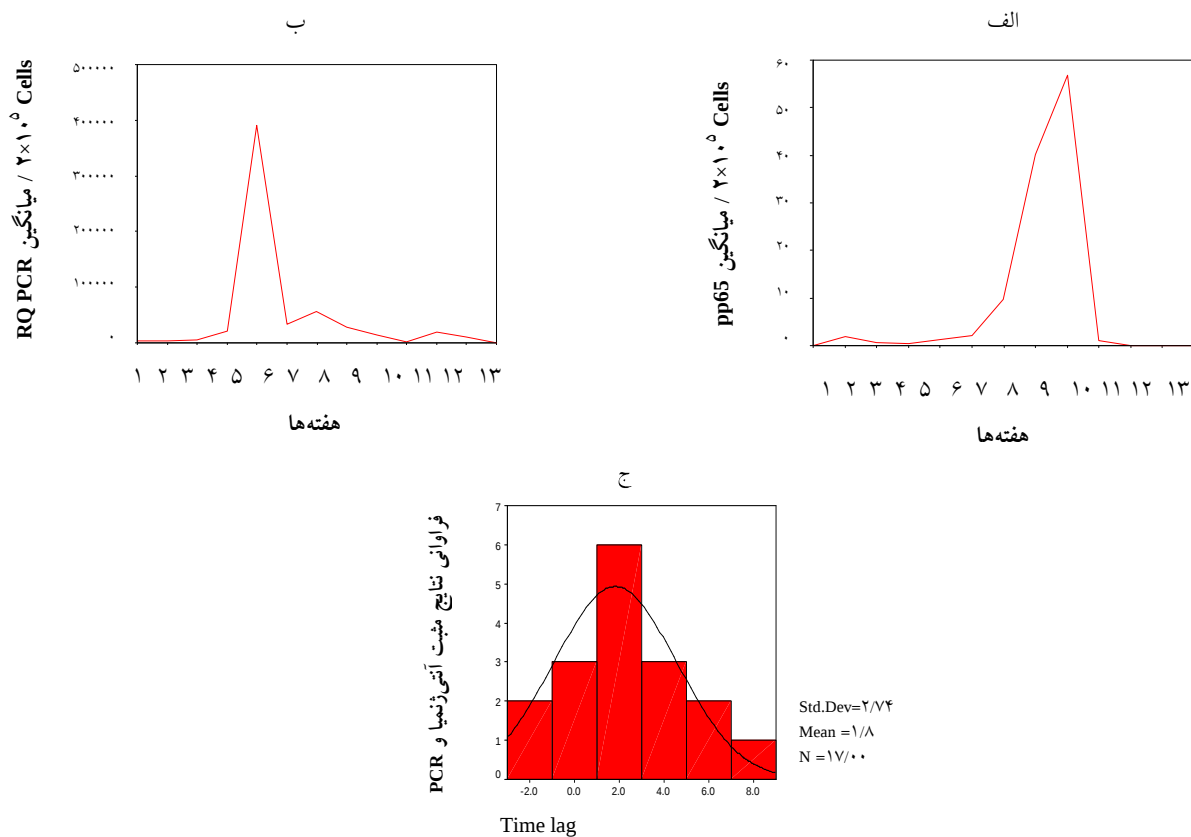
#### استخراج DNA:

DNA به دو روش جوشاندن و استفاده از کیت کیاژن استخراج گردید (۲۲). جهت بررسی وجود DNA در نمونه های استخراج شده، PCR برای ژن  $\beta_2$  میکروگلوبولین انجام شد. آزمایش  $\beta_2$  میکروگلوبولین برای همه نمونه ها باید مثبت بوده و منفی بودن این آزمایش به منزله عدم وجود DNA در نمونه است و انجام آزمایش CMV PCR بر روی نمونه مربوطه ارزشی ندارد (شکل ۱، ب) (۲۲).

#### RQ-PCR:

بر روی نمونه های DNA استخراج شده، با استفاده از آغازگرها و پروب مندرج در جدول ۱، CMV PCR انجام شد (شکل ۱، الف و جدول ۱). جهت تهیه استاندارد CMV RQ-PCR، قطعه هدف با استفاده از کیت InsT/Aclone<sup>TM</sup> PCR Product Cloning Kit فرمتاز، کلون گردید (شکل ۱، ج) (۲۲). پس از استخراج پلاسמיד، تعیین غلظت و محاسبه تعداد کپی آن، نهایتاً Real-Time PCR با استفاده از رقت های مختلف استاندارد راه اندازی و برای نمونه های بیماران انجام گرفت.

نتیجه نهایی در این روش به صورت اندازه گیری کمی مطلق، از طریق محاسبه تعداد کپی DNA CMV در نمونه بیمار به دست آمد. برای تحلیل اطلاعات در دستگاه Light Cycler از برنامه نرم افزاری دستگاه به نام Second



شکل ۲- الف: نمودار توزیع فراوانی نتایج آنتی ژنمایا pp65 در جمعیت تحت مطالعه. ب- نمودار توزیع فراوانی نتایج Real-Time PCR در جمعیت تحت مطالعه. ج- نمودار توزیع فراوانی نتایج آنتی ژنمایا با Real-Time PCR.

CMV در بیماران پس از پیوند، ۲۵-۲۰ درصد به دست آمد (۲۳).

در ۱۶/۳٪ کل بیماران مورد مطالعه و در ۳۰/۴٪ بیماران با میزان بالای بار CMV DNA، درمان preemptive انجام شد. نتایج به دست آمده نشان دادند که بین نیاز به درمان preemptive و بالا بودن بار CMV DNA ارتباط معنی داری مشاهده شد ( $p < 0/007$ ). این ارتباط به این معناست، در بیمارانی که درمان preemptive داشتند، میزان بار CMV DNA بالا است، آن‌ها افراد پرخطری برای بیماری CMV می‌باشند و به توجه بیشتری نیاز دارند. از طرفی در افرادی که درمان preemptive داشتند، میزان CMV DNA کاهش یافته و به صفر رسیده و تنها در ۲ بیمار میزان CMV DNA دوباره بالا رفته که با درمان مجدد میزانش کاهش یافته است. در حالی که میزان آن در بیمارانی که درمان preemptive نگرفته بودند، همواره بالا بوده و هیچ‌گاه به صفر نرسید.

با توجه به نمودار «ب» در شکل ۲، میانگین میزان CMV DNA در تمامی بیماران طی مدت پی‌گیری در هفته سوم شروع به افزایش نمود، در هفته پنجم به حداکثر رسید و پس از آن کاهش یافت. در برخی از بیماران این میزان دوباره افزایش یافت.

با توجه به نمودار «ج» در شکل ۲، میانگین فاصله زمانی که Real-Time PCR توانسته زودتر از آنتی ژنمایا مثبت شود، ۱/۸ هفته بود. یعنی Real-Time PCR، ۱/۸ هفته (۱۳ روز) زودتر از آنتی ژنمایا مثبت شد.

## بحث

در ۱۸/۶٪ از کل بیماران مورد مطالعه و در ۲۶/۱٪ بیماران دارای افزایش بار CMV DNA، علایم بیماری CMV مشاهده شد. پس نتایج ارزیابی Real-Time PCR، فاکتوری برای پیش‌گویی بیماری CMV، قبل از وقوع علایم بالینی آن است. در مطالعه یائو میزان بروز بیماری

میزان بقای بیماران با درمان preemptive، ۱۰۰٪ و در بیماران بدون درمان preemptive، ۹۱/۷٪ بود. هیچ مقاومت دارویی در بیماران دیده نشد. هر چند در ۲ بیمار پس از قطع درمان با گان سیکلوویر، بار CMV DNA افزایش یافت.

در ۱۹٪ بیماران تحت مطالعه، میزان CMV DNA بعد از پیوند، افزایش نشان داد. مندوز و توماس نیز نتیجه مشابهی به دست آوردند. میزان افزایش CMV DNA در بیماران مورد مطالعه آن‌ها بعد از پیوند، ۲۵-۲۰ درصد بود که باعث پیشرفت بیماری CMV در این بیماران گردید (۸، ۳).

با توجه به مطالب به دست آمده، در ۷ نمونه به طور هم زمان، CMV در هر دو روش Real-Time PCR و آنتی ژنمیا pp65 مثبت شد، در ۷۴ نمونه، CMV با روش Real-Time PCR مثبت ولی با روش آنتی ژنمیا منفی شد. در ۳۲۹ نمونه نیز، CMV با هر دو روش منفی باقی ماند. ۱۲ نمونه دارای آنتی ژنمیا بالاتر از cut off (cells)  $2 \times 10^5$ : Positive cells  $\geq 20$ ) بودند در حالی که ۸۱ نمونه دارای نتیجه Real-Time PCR بالاتر از مقدار cut off (cell)  $2 \times 10^5$ : Copies  $\geq 1/4 \times 10^3$ ) بودند. این میزان cut off با توجه به تحقیق منگل و همکارانش که مشابه این مطالعه بود، به دست آمد (۲۰). میزان cut off برای روش آنتی ژنمیا، بر اساس معیار مورد نظر در مرکز و با توجه به تحقیق بلانک می باشد (۲۴). بین نتایج مثبت بالاتر از cut off به دست آمده با روش آنتی ژنمیا pp65 و روش Real-Time PCR، ارتباط معنی داری مشاهده شد ( $p < 0/001$ ).

بین تمام نتایج به دست آمده با آنتی ژنمیا و Real-Time PCR ارتباط معنی داری مشاهده شد ( $p < 0/012$ ). از طرفی بین نتایج مثبت بالاتر از cut off به دست آمده با روش آنتی ژنمیا pp65 و روش Real-Time PCR، ارتباط معنی داری مشاهده شد ( $p < 0/001$ ).

تعداد نتایج مثبت بیماران با روش آنتی ژنمیا ۳۶ تا و با روش Real-Time PCR ۹۳ تا بود. این نشان داد که روش Real-Time PCR دارای حساسیت بالایی برای تشخیص CMV DNA بوده است. البته حساسیت بالا به تنهایی کافی

نیست زیرا گاهی باعث تجویز نابجا و اضافی درمان preemptive می شود، در صورتی که بیمار به این درمان نیازی نداشته است. ولی نتایج منفی این روش بعد از درمان preemptive، شاخص مناسبی جهت نشان دادن موفقیت درمان و تعیین زمان قطع آن می باشد. پس روش Real-Time PCR برای پی گیری پاسخ به درمان در بیماران مفید است. چنین نتیجه ای در تحقیق لیمایه و گولت به دست آمد. آن‌ها از این روش برای پی گیری پاسخ به درمان بیماران استفاده نمودند (۲۶، ۲۵).

اولین نتیجه مثبت روش Real-Time PCR، ۱۳ روز زودتر از روش آنتی ژنمیا pp65 به دست آمد. در حالی که، در تحقیق گریسلی، روش Real-Time PCR، ۱۵ روز زودتر از ارزیابی آنتی ژنمیا مثبت شد (۲۷). لروئز و همکاران این مدت زمان را ۸ روز محاسبه نمودند (۶). منگل و همکاران با روش Real-Time PCR، واکنش CMV را در ۳ بیمار ۱۰ روز زودتر از روش آنتی ژنمیا شناسایی نمودند (۲). لیمایه با روش Real-Time PCR این واکنش را ۱۳ روز زودتر از ارزیابی آنتی ژنمیا تشخیص داد (۲۵). در مطالعه یاکوشیچی این مدت زمان ۵ روز محاسبه شده است. گوارین و همکاران این مدت زمان را ۱۱/۲۵ روز ارزیابی نمودند (۲۹، ۲۸).

در طی مطالعه، بیماری CMV در دو بیمار پیشرفت کرد. در حالی که روش آنتی ژنمیا در این دو هم چنان منفی باقی مانده بود ولی میزان CMV DNA آن‌ها با روش Real-Time PCR، به طور پیشرونده ای افزایش یافت. چنین نتیجه ای در مطالعه بویون نیز به دست آمد (۱). در مطالعه ای که او انجام داد، بیماری CMV در یکی از بیماران پیشرفت کرد در حالی که ارزیابی آنتی ژنمیا او منفی باقی ماند و روش Real-Time PCR آن بیمار ۱۰ روز قبل از مرگش مثبت شد. در تحقیق لروئز و همکاران نیز CMV PCR پلاسمای ۲ کودک مبتلا به بیماری CMV (یکی مبتلا به پنومونیای CMV و دیگری مبتلا به گاستریت CMV) مثبت بود در حالی که آنتی ژنمیا آن‌ها هم چنان منفی باقی مانده بود (۶).

میانگین فاصله زمانی مورد نیاز برای منفی شدن ارزیابی Real-Time PCR بعد از تجویز درمان preemptive، در

(۵۰-۳۵۰ copies/ml) به دست آمد (۲۵).

### نتیجه گیری

هر دو روش با هم ارتباط معنی داری داشتند. مثبت شدن زودهنگام RQ-PCR و نیز نتایج منفی دیرهنگام RQ-PCR بعد از درمان preemptive، شاخص مناسبی برای تعیین موفقیت درمان و زمان قطع درمان می باشد. از آن جایی که در برخی بیماران میزان کپی CMV DNA، با روش Real-Time PCR بالاتر از cut off بوده ولی هیچ علائم بالینی از بیماری CMV در آن ها دیده نشد و نیازی به درمان preemptive نداشتند، پس لازم است علاوه بر نتایج Real-Time PCR، علائم بالینی نیز در نظر گرفته شود.

بیماران تحت مطالعه ۱۶ روز (۷-۱۶) روز بود. این در حالی است که در مطالعه لروئز این فاصله زمانی ۲۸ روز به دست آمد (۶).

حد پایین تشخیص CMV DNA با روش Real-Time PCR،  $2 \times 10^5$  copies و حد بالایی آن  $2 \times 10^5$  cell:  $15 \times 10^7$  copies cell: به دست آمد. یعنی با این روش، قادریم میزان  $2 \times 10^5$  cell:  $15 \times 10^7$  copies را اندازه گیری نماییم. البته کمترین میزان CMV DNA در هر واکنش، ۱۰ copies/capillary به دست آمد. در صورتی که در تحقیق ماچیدا، حد حساسیت Real-Time PCR، ۲۰ copies/wells بود (۱۵). در تحقیق لیمایه، حداکثر بار CMV در پلاسما به طور متوسط  $700$  copies/ml و حداقل آن  $50$  copies/ml و  $5-5 \times 10^7$  copies/ml بود (۱۵).

### References:

- Boivin G, Belanger R, Delage R, Beliveau C, Demers C, Goyette N, et al. Quantitative analysis of cytomegalovirus (CMV) viremia using the pp65 antigenemia assay and the cobas amplicor CMV monitor PCR test after blood and marrow allogeneic transplantation. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4356-60.
- Mengelle C, Pasquier C, Rostaing L, Sandres-Saune K, Puel J, Berges L, et al. Quantitation of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia. *J Med Virol* 2003; 69: 225-31.
- Mendez JC, Espy MJ, Smith TF, Wilson JA, Paya CV. Evaluation of PCR primers for early diagnosis of cytomegalovirus infection following liver transplantation. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 526-30.
- Piiparinen H. Quantitative PCR in the diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in organ transplant patients. Helsinki: Helsinki University Printing House; 2004: 1-72.
- Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 746-52.
- Leruez-Ville M, Ouachee M, Delarue R, Sauget AS, Blanche S, Buzyn A, et al. Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2040-6.
- Griscelli F, Barrois M, Chauvin S, Lastere S, Bellet D, Bourhis JH. Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 43: 62.
- Thomas DE. Hematopoietic cell transplantation. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, editors. *Cytomegalovirus infection*. 3rd ed. J.A: Zaiz; 2004: 700-26.
- Patel R, Paya CV. Cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients. In: Bowden RA, Ljungman P, Paya CV, editors: *Transplant infections*. Washington: Lippincott-Raven; 1999: 229-44.
- Griffiths PD, Clark DA, Emery VC. Herpesviruses in transplant recipients. *J of Antimicrobial Chemotherapy* 2000; 45: 29-43.
- Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, Bowden RA, Huang ML, Myerson D, et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. Clinical observations, interventions, and therapeutic trials. *Blood* 2003; 101(2): 407-14.
- Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA, Landt O, Ellerbrok H, Pauli G, et al. Detection of human cytomegalovirus DNA by real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 27: 34-7.
- Solano C, Munoz I, Gutierrez A, Farga A, Prosper F, Garcia-Conde J, et al. Qualitative plasma PCR assay (AMPLICOR CMV Test) versus pp65 antigenemia assay for monitoring cytomegalovirus viremia and guiding preemptive stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 38-41.
- Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *J Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 533-54.
- Machida U, Kami M, Fukui T, Kazuyama Y, Kinoshita M, Tanaka Y, et al. Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2536-42.
- Tong CY, Cuevas L, Williams H, Bakran A. Use of laboratory assays to predict cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1998; 36:

- 2681-5.
- 17- Li H, Dummer JS, Estes WR, Meng S, Wright PF, Tang YW. Measurement of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 187-91.
- 18- "<http://www.specialtylabs.com/default.htm>"
- 19- "[http://hhv6.com/diagnostic-virals-cmv\\_assay.htm](http://hhv6.com/diagnostic-virals-cmv_assay.htm)"
- 20- Mengelle C, Sandres-Saune K, Pasquier C, Rostaing L, Mansuy JM, Marty M, *et al.* Automated extraction and quantification of human cytomegalovirus DNA in whole blood by real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3840-5.
- 21- Sia IG, Wilson JA, Espy MJ, Paya CV, Smith TF. Evaluation of the Cobas amplicor CMV monitor test for detection of viral DNA in specimens taken from patients after liver transplantation. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 600-6.
- 22- McPherson MJ, Moller SG, Beynon R, Howe C. PCR (The basics from background to bench). Cambridge: Bios Scientific Publishing Ltd; 2000: 701-726.
- 23- Xiao Y, Shi K, Mao X. Detection of cytomegalovirus antigens and virus DNA in the peripheral blood after organ transplantation. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 1999;13(3) : 287-90.
- 24- Blank BS, Meenhorst PL, Weverling GJ, Stout-Zonneveld AA, Pauw W, Mulder JW, *et al.* Quantitative pp65-antigenemia assay for the prediction of human cytomegalovirus disease in HIV-infected patients. *AIDS* 1999; 13(18): 2533-9.
- 25- Limaye AP, Huang ML, Leisenring W, Stensland L, Corey L, Boeckh M. Cytomegalovirus (CMV) DNA load in plasma for the diagnosis of CMV disease before engraftment in hematopoietic stem-cell transplant recipients. *J Infe Dis* 2001; 183:377-82.
- 26- Gault E, Michel Y, Dehee A, Belabani C, Nicolas JC, Garbarg-Chenon A. Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 772-5.
- 27- Griffiths PD. Tomorrow's challenges for herpesvirus management: potential applications of valganciclovir. *J Infe Dis* 2002; 186 suppl 1:131-7.
- 28- Yakushiji K, Gondo H, Kamezaki K, Shigematsu K, Hayashi S, Kuroiwa M, *et al.* Monitoring of cytomegalovirus reaction after allogenic stem cell transplantation: comparison of an antigenemia assay and quantitative real - time PCR. *Bone Marrow Transplantation* 2002; 29 (7): 599-606.
- 29- Gouarin S, Vabret A, Gault E, Petitjean J, Regeasse A, Hurault de Ligny B, *et al.* Quantitative analysis of CMV DNA load in whole blood of renal transplant patients using real-time PCR assay. *J Clin Virol* 2004; 29(3): 194-201.

## CMV detection and monitoring in Bone Marrow Transplant (BMT) recipients by Real-Time PCR (RQ-PCR)

Obeidi N.<sup>2</sup> (MS), Ghaffari H.<sup>1</sup> (PhD), Gharehbaghian A.<sup>2</sup> (PhD), Alimoghaddam K.<sup>1</sup> (MD),  
Dehghan M.<sup>3</sup> (MD), Ghavamzadeh A.<sup>1</sup> (MD), Shamshiri A.<sup>1</sup> (PhD)

<sup>1</sup>Hematology-Oncology & BMT Research Center, Shariati Hospital

<sup>2</sup>Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center

<sup>3</sup>Hematology-Oncology & BMT Research Center, Shiraz University of Medical Sciences

### Abstract

#### Background and Objectives

Cytomegalovirus (CMV) is an important pathogen in patients undergoing bone marrow transplantation. The prevalence of CMV varies from 30-100% in different countries as shown by seroepidemiological studies. Only 20-25% of patients develop CMV disease. Because of the similarity between CMV and GVHD and the different therapies required, detection of viral load will be effective in patients' survival.

#### Materials and Methods

51 recipients of BMT were monitored for 100 days post-BMT during which the samples were collected weekly. The Real-Time PCR was developed for quantitation of CMV viral DNA, using TaqMan technology. For generation of standard curve, UL83 gene from CMV was cloned into a plasmid using a T/A cloning procedure. RQ-PCR assay was performed in parallel with pp65 antigenemia assay on 415 samples.

#### Results

The results obtained by both techniques were significantly correlated ( $p < 0.01$ ). We could detect  $13 \times 10^1$  -  $15 \times 10^7$  (CMV DNA copies/ $2 \times 10^5$  cells) by RQ-PCR method. About 76% of patients developed at least one episode of CMV reactivation. First positive result of RQ-PCR appeared 13 days earlier than of pp65 antigenemia. After preemptive therapy, 16 days were required to achieve negative result by RQ-PCR.

#### Conclusions

Both assays were highly correlated; however, RQ-PCR was more sensitive than the antigenemia assay. After preemptive therapy, negative results of RQ-PCR were the best indicator to determine the endpoint of treatment and its success.

**Key words:** Cytomegalovirus (CMV), Bone Marrow Transplant (BMT), PCR.  
SJIBTO 2007; 4(1): 1-9

Received: 29 July 2006

Accepted: 7 Apr. 2007

Correspondence: Ghaffari H. PhD of Genetics. BMT-Research Center of Shariati Hospital.  
P.O.Box: 14114, Tehran, Iran. Tel: (+9821)84902665; Fax: (+9821)88004140.  
E-mail: shghaffari2000@yahoo.com