خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۴ شماره ۱ بهار ۸۶ (۹-۱)

میزان بار سایتومگالوویروس و پیگیری آن در گیرندگان پیوند مغز استخوان آلوژنیک مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی

نرگس عبیدی[۱]، دکتر حمیداله غفاری[۲]، دکتر احمد قره‌باغیان[۳]، دکتر کامران علی مقدم[۴]، دکتر مهدی دهقان[۵]، دکتر اردشیر قوام‌زاده[۶]، دکتر احمدرضا شمشیری[۷]

چکیده

سابقه و هدف

CMV به عنوان مهم‌ترین پاتوژن ویروسی در دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان آلوژنیک و بافت جامد می‌باشد. 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 می‌افتد. به دلیل تشابه علایم 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 وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. کلیه گیرندگان پیوند مغز استخوان آلوژنیک که خود یا دهنده آن‌ها آلوده به CMV بوده و روش آنتی‌ژنمیا 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 جمع‌آوری شده از آن‌ها، این ویروس با دو روش RQ-PCR و آنتی‌ژنمیا بررسی گردید. برای تهیه استاندارد RQ-PCR ، ژن UL83 مربوط به پروتئین pp65 کلون شد و در این روش از پروب تک‌من برای Real-Time PCR استفاده گردید. نتایج دو روش با هم ارتباط معنی‌داری داشتند (correlation coefficient=۰/۱۶۹). برای تجزیه و تحلیل نتایج از نرم‌افزار SPSS ۱۱/۳ و آزمون‌های t(t test)، من ویتنی(Mann-whitny)، کای‌دو(Chi-square) و اسپیرمن(Spearman) استفاده شد.

یافته‌ها

گستره تشخیصی RQ-PCR ، cells ۲×۱۰^{۵} :copies $۲ \times ۱۰^{۷} - ۱۵ \times ۱۰^{۱} \times ۱۳$ بود. از ۹۳ نمونه مثبت، ۸۱ نمونه دارای میزان کپی بالاتر از آستانه(cells ۲×۱۰^{۵} :copies $۱/۴ \times ۱۰^{۳}$) بودند. اولین نتیجه مثبت RQ-PCR در مقایسه با آنتی‌ژنمیا، 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 می‌باشد. واکنش CMV در بیماران تحت مطالعه، به نوع داوری سرکوب کننده ایمنی بستگی داشت.

کلمات کلیدی: سایتومگالوویروس، پیوند مغز استخوان، PCR

تاریخ دریافت : ۸۵/۵/۷

تاریخ پذیرش : ۸۶/۱/۱۸

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

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

۳- PhD ایمونوهماتولوژی بالینی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

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

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

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

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-22]

مقدمه

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

CMV در افراد سالم توسط سیستم ایمنی به خصوص سیستم ایمنی سلولی کنترل می‌شود ولی در افراد با نقص یا ضعف سیستم ایمنی(مثل افراد پیوندی) افزایش یافته و باعث ویرمی و نهایتاً ایجاد بیماری می‌شود(۵). پیشرفت بیماری CMV تنها در ۲۵-۲۰ درصد از بیماران پیوندی رخ داده و می‌تواند باعث افزایش استعداد به هپاتیت، عفونت‌های گوارشی، پنومونی، آنسفالیت، رتینیت، انتروکولیت، رد پیوند و در نهایت مرگ بیماران گردد(۱۰-۸، ۵، ۴). چنین علایمی در بیماری رد پیوند(GVHD) حاد نیز رخ می‌دهد(۱۱). ارزیابی‌های اولیه برای تشخیص عفونت فعال CMV بعد از شروع علایم می‌باشند ولی با پیشرفت تکنولوژی می‌توان 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 می‌توان تشخیص را آسان نمود.

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

۱- تجویز داروی مؤثر ضد ویروسی، در تمام بیمارانی که در خطر فعال شدن مجدد CMV می‌باشند 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 می‌دهند(۱۱، ۸). ولی سمیت مربوط به این داروها(cidofovir، Foscarnet، ganciclovir) به عنوان مشکل عمده‌ای باقی مانده است(۱۴). از آن جایی که این عوامل میلوتوکسیک و نفروتوکسیک بوده و باعث نوتروپنی طولانی مدت و استعداد به عفونت‌های فرصت طلب و ثانویه(قارچی و باکتریایی) می‌شوند و از طرفی پیشرفت بیماری CMV تنها در ۲۵-۲۰ درصد از بیماران رخ می‌دهد، پس استفاده اختصاصی و کوتاه مدت از این عوامل، در بیماران با خطر بالا، از عوارض جانبی آن می‌کاهد(۱۵، ۱۳، ۵، ۳، ۱). این مستلزم وجود مارکرهای شناسایی جهت پیش‌گویی حمله CMV و استفاده از روش‌های سریع، دقیق، حساس و اختصاصی برای تشخیص بیماران با خطر بالا می‌باشد(۱۶، ۱۲). البته باید در نظر داشت که همیشه تشخیص CMV به تنهایی، تعیین‌کننده نیاز به درمان نبوده و علایم بالینی نیز لازم می‌باشد(۱۷، ۱۶). در این تحقیق هدف ما بررسی میزان بار سایتومگالوویروس با استفاده از دو روش Real-Time PCR و آنتی‌ژنمیا در گیرندگان پیوند مغز استخوان آلوژنیک مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی بود.

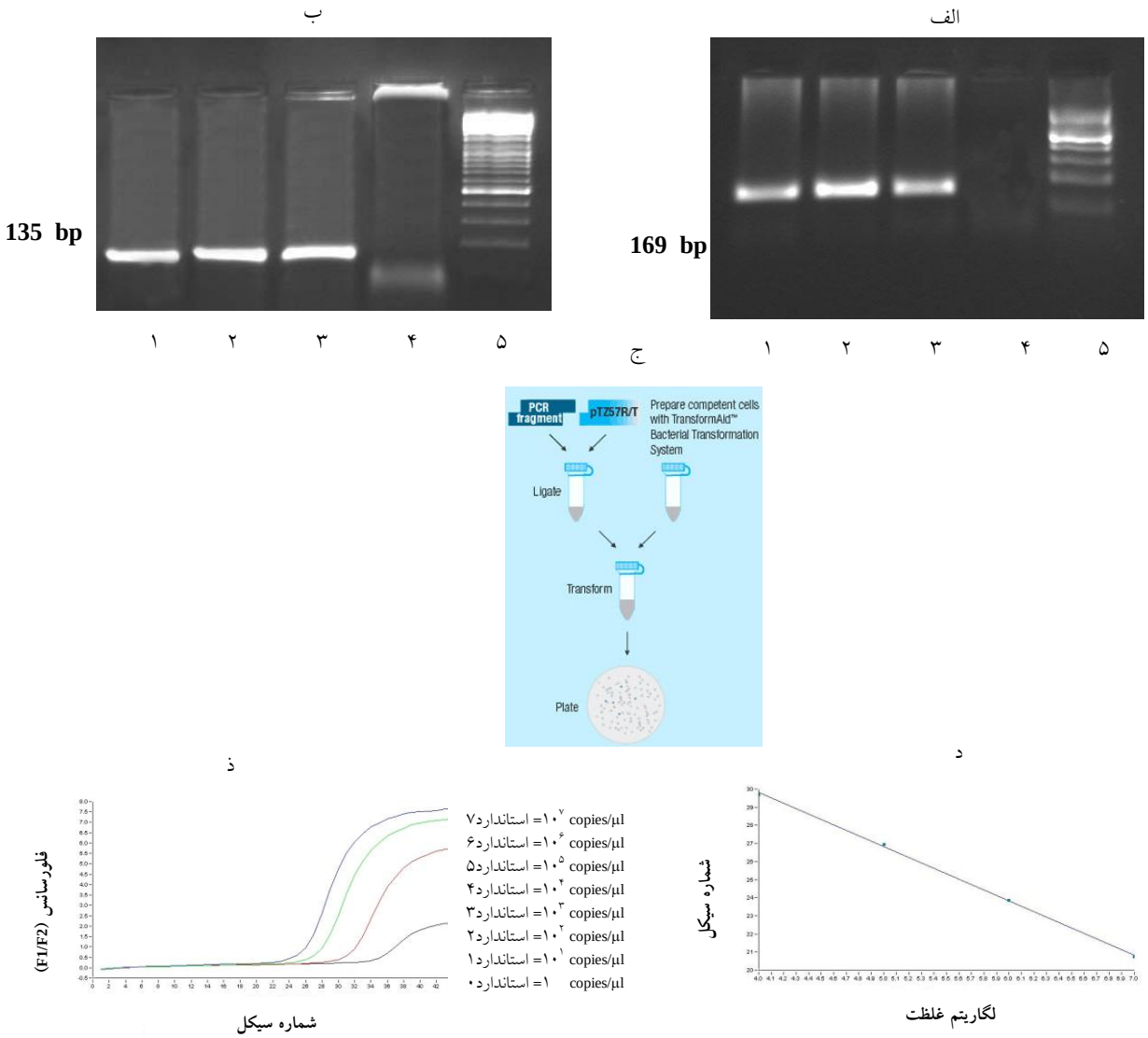
مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی(Cross-sectional) بود. کلیه گیرندگان پیوند مغز استخوان آلوژنیک که خود یا دهنده آن‌ها آلوده به CMV بوده و روش آنتی‌ژنمیا آن‌ها 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 نمونه‌های مختلف مثل خون کامل، پلاسما، ادرار، آسپیراسیون و لاواژ ریه، مغز استخوان، مایع مغزی ـ نخاعی، مایع آمنیوتیک، شستشوی گلو، مایع منی و بیوپسی بافت می‌توان استفاده نمود(۱۹، ۱۸، ۲). مناسب‌ترین نمونه برای تعیین CMV DNA، نمونه خون کامل یا لکوسیت‌ها می‌باشد(۲۱، ۲۰). در این تحقیق از ۵-۳ میلی‌لیتر خون

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-22]

کامل به همراه ضد انعقاد EDTA استفاده شد. با توجه به مطالعات مشابه انجام شده، امکانات موجود، مطالعه پایلوت 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 حساسیت کار و احتمال از دست دادن نمونه‌ها در حین پی‌گیری، از ۵۱ بیمار استفاده شد. ۸ بیمار به دلیل نگرفتن 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.



شکل ۱: الف ـ CMV PCR بر روی نمونه‌های DNA استخراج شده، ستون ۱ و ۲ نمونه بیمار CMV^+، ستون ۳ کنترل مثبت، ستون ۴ کنترل منفی و ستون ۵ سایز مارکر. ب ـ PCR β_2 میکروگلوبولین بر روی نمونه‌های DNA استخراج شده، ستون ۳-۱ نمونه بیمار، ستون ۴ کنترل منفی و ستون ۵ سایز مارکر. ج ـ مراحل کلونینگ د ـ نمودار استاندارد با رقت‌های copies/µl $۱۰^۷$-$۱۰^۴$. ذ ـ منحنی استاندارد با رقت‌های copies/µl $۱۰^۷$-$۱۰^۴$.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-22]

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

شرایط RQ-PCR	شرایط PCR	Master Mix	آغازگرها و پروب
دناتوراسیون در دمای ۹۵°C برای ۴ دقیقه- (دمای ۹۵°C برای ۳۰ ثانیه، دمای ۶۰°C برای ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲°C برای۴۰ ثانیه) برای ۴۰ سیکل- دمای ۷۲°C برای ۷ دقیقه	دناتوراسیون در دمای ۹۵°C برای ۴ دقیقه(دمای ۹۵°C برای ۳۰ ثانیه، دمای ۶۰°C برای ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲°C برای ۴۰ ثانیه) برای ۴۰ سیکل، دمای ۷۲°C برای ۷ دقیقه	Buffer 10X, $MgCl_2$ 50Mm, dNTP mix 10mM, CMV-F 10µM, CMV-R 10µM, Taq Polymerase 5u/µl	CMV-RT-F-5-GCAGCCACGGGATCGTACT-3 CMV- RT-R-5-GGCTTTTACCTCACACGAGCATT-3 CMV- PROB-5-FAM-CGCGAGACCGTGGAACTGCG-TAMRA-3

1-FAM : 6-Carboxy fluorescein
2-TAMRA :6-Carboxy tetra methyl rhodamine

استخراج DNA:

DNA به دو روش جوشاندن و استفاده از کیت کیاژن استخراج گردید(۲۲). جهت بررسی وجود DNA در نمونه‌های استخراج شده، PCR برای ژن β_2 میکروگلوبولین نیز انجام شد. آزمایش β_2 میکروگلوبولین برای همه نمونه‌ها 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 نمونه‌های 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™ PCR Product Cloning Kit فرمنتاز، کلون گردید (شکل ۱، ج) (۲۲). پس از استخراج پلاسمید، تعیین غلظت و محاسبه تعداد کپی آن، نهایتاً Real-Time PCR با استفاده از رقت‌های مختلف استاندارد راه‌اندازی و برای نمونه‌های بیماران انجام گرفت.

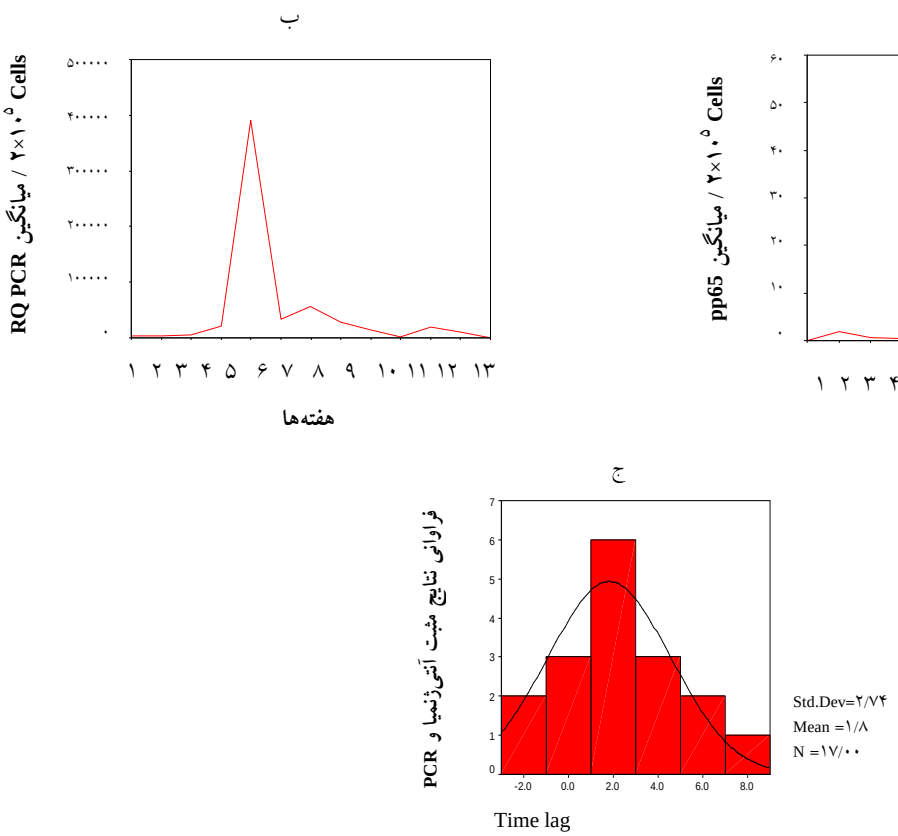
نتیجه نهایی در این روش به صورت اندازه‌گیری کمی مطلق، از طریق محاسبه تعداد کپی CMV DNA در نمونه بیمار به دست آمد. برای تحلیل اطلاعات در دستگاه Light Cycler از برنامه نرم‌افزاری دستگاه به نام Second Derivative Maximum Method استفاده شد. در این روش به طور خودکار تعداد سیکل Cross Point هر نمونه مشخص گردید(Cross point هر نمونه نقطه‌ای است که در آن سیکل وارد فاز لگاریتمی شده و اندازه‌گیری کمی نهایی در این نقطه با مقایسه Cross pointهای نمونه‌ها نسبت به منحنی استاندارد به دست می‌آید(شکل ۱، د، ذ)). در تجزیه و تحلیل نهایی اطلاعات از نرم‌افزار SPSS ۱۱/۳ و آزمون‌های t ، من‌ویتنی، کای‌دو و اسپیرمن استفاده شد.

یافته‌ها

۷ نمونه به طور هم زمان، با هر دو روش Real-Time PCR و آنتی‌ژنمیا، pp65 مثبت بودند، ۷۴ نمونه با روش Real-Time PCR مثبت ولی با روش آنتی‌ژنمیا منفی بودند. در ۳۲۹ نمونه نیز،CMV با هر دو روش منفی باقی ماند. بین تمام نتایج به دست آمده با آنتی‌ژنمیا و Real-Time PCR ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($p< ۰/۰۱۲$ ، cc: ۰/۱۶۹). ۱۲ نمونه دارای آنتی‌ژنمیا بالاتر از (۲×۱۰^{۵} cells : ۲۰ ≤ positive cells) cut off بودند. در حالی که ۸۱ نمونه دارای Real-Time PCR بالاتر از مقدار(۲×۱۰^{۵} cells : $۱/۴\times۱۰^{۳}$ ≤) cut off بودند.

با توجه به نمودار «الف» در شکل ۲، میانگین میزان سلول‌های مثبت با روش آنتی‌ژنمیا، در تمامی بیماران طی مدت پی‌گیری در هفته پنجم شروع به افزایش کرد، بین هفته‌های ۸ و ۹ به حداکثر رسید و پس از آن کاهش یافت.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-22]



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

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 آنتی‌ژنمیا مثبت شود، ۱/۸ هفته بود. یعنی Real-Time PCR، ۱/۸ هفته(۱۳ روز) زودتر از آنتی‌ژنمیا 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 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 معنی‌داری مشاهده شد($p< ۰/۰۰۷$). 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-22]

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. مندز و توماس نیز نتیجه مشابه‌ای 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 آنتی‌ژنمیا pp65 مثبت شد، در ۷۴ نمونه، CMV با روش Real-Time PCR مثبت ولی با روش آنتی‌ژنمیا منفی شد. در ۳۲۹ نمونه نیز، CMV با هر دو روش منفی باقی ماند.

۱۲ نمونه دارای آنتی‌ژنمیا بالاتر از cut off(cells ۲×۱۰^{۵}: ۲۰≤ Positive cells) بودند در حالی که ۸۱ نمونه دارای نتیجه Real-Time PCR بالاتر از مقدار cut off(cell ۲×۱۰^{۵} Copies: $۱/۴\times۱۰^{۳}$ ≤) 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 آنتی‌ژنمیا، بر اساس معیار مورد نظر در مرکز و با توجه به تحقیق بلانک می‌باشد(۲۴). بین نتایج مثبت بالاتر از cut off به دست آمده با روش آنتی‌ژنمیا pp65 و روش Real-Time PCR ، ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($p< ۰/۰۰۱$).

بین تمام نتایج به دست آمده با آنتی‌ژنمیا و Real-Time PCR ارتباط معنی‌داری مشاهده شد($p< ۰/۰۱۲$). از طرفی بین نتایج مثبت بالاتر از cut off به دست آمده با روش آنتی‌ژنمیا pp65 و روش Real-Time PCR، ارتباط معنی‌داری مشاهده شد($p< ۰/۰۰۱$).

تعداد نتایج مثبت بیماران با روش آنتی‌ژنمیا 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 می‌شود، 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 می‌باشد. پس روش Real-Time PCR برای پی‌گیری پاسخ به درمان در بیماران مفید است. چنین نتیجه‌ای در تحقیق لیمایه و گولت به دست آمد. آن‌ها از این روش برای پی‌گیری پاسخ به درمان بیماران استفاده نمودند(۲۶، ۲۵).

اولین نتیجه مثبت روش Real-Time PCR ، ۱۳ روز زودتر از روش آنتی‌ژنمیا pp65 به دست آمد. در حالی که، در تحقیق گریسلی، روش Real-Time PCR ، ۱۵ روز زودتر از ارزیابی آنتی‌ژنمیا 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 آنتی‌ژنمیا شناسایی نمودند(۲). لیمایه با روش Real-Time PCR این واکنش را ۱۳ روز زودتر از ارزیابی آنتی‌ژنمیا تشخیص داد(۲۵). در مطالعه یاکوشیجی 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 آنتی‌ژنمیا در این دو هم چنان منفی باقی مانده بود ولی میزان CMV DNA آن‌ها با روش Real-Time PCR ، به طور پیشرونده‌ای افزایش یافت. چنین نتیجه‌ای در مطالعه بویوین نیز به دست آمد(۱). در مطالعه‌ای که او انجام داد، بیماری CMV در یکی از بیماران پیشرفت کرد در حالی که ارزیابی آنتی‌ژنمیا 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 آنتی‌ژنمیا 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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-22]

بیمـاران تحـت مطالعـه ۱۶ روز(۱۶-۷ روز) بـود. ایـن در حالی است که در مطالعه لروئز این فاصله زمانی ۲۸ روز به دست آمد(۶).

حد پایین تشخیص CMV DNA بـا روش Real-Time PCR ، ۲×۱۰^{۵} cell: ۱۳۰ copies و حـد بـالایی آن ۲×۱۰^{۵} copies cell: ۱۵×۱۰^{۷} به دست آمـد. یعنـی بـا ایـن روش، قـادریم میـزان ۲×۱۰^{۵} cell: ۱۵×۱۰^{۷} copies- ۱۳×۱۰^{۱} را اندازه‌گیری نماییم. البته کم‌ترین میزان CMV DNA در هـر واکنش، ۱۰ copies/capilary به دست آمد. در صورتی کـه در تحقیـق ماچیـدا، حـد حساسـیت Real-Time PCR ، ۲۰ copies/wells بود(۱۵). در تحقیق لیمایـه، حـداکثر بـار CMV در پلاسـما بـه طـور متوسـط ۷۰۰ copies/ml ($۵-۵/۵\times۱۰^{۷}$ copies/ml) و حـداقل آن ۵۰ copies/ml> (۵۰-۳۵۰ copies/ml) به دست آمد(۲۵).

نتیجه‌گیری

هر دو روش با هـم ارتبـاط معنـی‌داری داشـتند. مثبـت شدن زودهنگام RQ-PCR و نیز نتایج منفی دیرهنگام RQ-PCR بعد از درمان preemptive ، شـاخص مناسـبی بـرای تعیین موفقیت درمان و زمان قطع درمان می‌باشد.

از آن جایی کـه در برخـی بیمـاران میـزان کپـی CMV DNA ، با روش Real-Time PCR بـالاتر از cut off بـوده ولی هیچ علایم بالینی از بیماری CMV در آن‌ها دیده نشـد و نیازی به درمـان preemptive نداشـتند، پـس لازم اسـت علاوه بر نتایج Real-Time PCR ، علایم بالینی نیز در نظر گرفته شود.

References:

1- 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.
2- 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.
3- 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.
4- Piiparinen H.Quantitative PCR in the dignosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in organ transplant patients. Helsinki: Helinki University Printing House; 2004: 1-72.
5- 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.
6- 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.
7- 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;4362.
8- Thomas DE. Hematopoietic cell transplantation. In: Blume KG, Forman SJ, Aprelbaum FR, editors. Cytomegalovirus infection. 3rd ed. J.A: Zaiz; 2004: 700-26.
9- 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.
10- Griffiths PD, Clark DA, Emery VC. Herpesviruses in transplant recipients. J of Antimicrobial Chemotherapy 2000; 45: 29-43.
11- 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.
12- 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 2000:2734-7.
13- 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: 3938-41.
14- Boeckh M, Boivin G.Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. J Clin Microbiol Rev 1998;11: 533-54.
15- 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.
16- 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:

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-22]

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"
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 valacyclovir. 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: comparision 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-22]

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

Obeidi N.[2] (MS), Ghaffari H.[1](PhD), Gharehbaghian A.[2] (PhD), Alimoghaddam K.[1] (MD), Dehghan M.[3](MD), Ghavamzadeh A.[1](MD), Shamshiri A.[1](PhD)

[1]*Hematology-Oncology & BMT Research Center, Shariati Hospital*
[2]*Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center*
[3]*Hematology-Oncology & BMT Research Center, Shiraz University of Medical Scienses*

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 tecnnology. For generation of standard curve, UL83 gene from CMV was cloned into a plasmid using a T/A cloning procedure. RQ-PCR assay was preformed 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 13×10^1 -15×10^7 (CMV DNA copies/2×10^5 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*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-22]