مقایسه میزان بار ژنومی سایتومگالوویروس با نتایج آنتی ژنمی در گیرندگان پیوند" سلولهای خون ساز" بر حسب درجه GVHD

امید پژند[۱]
مازیار ضیائیان[۲]
اسدالله موسوی[۳]
زویا هژبری[۱]
بهرام کاظمی[۴]
عباس بهادر[۱]
محمد حمیدیان[۱]
اشرف السادات موسوی[۳]
فرهاد بنکدار هاشمی[۱*]

۱. گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲. مرکز تحقیقات میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
۳. مرکز خون و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴. مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

*نویسنده مسئول
نشانی: تهران، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه میکروب شناسی
تلفن تماس: ۸۸۹۵۵۸۱۰
پست الکترونیک: bonakdar@sina.tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: نقش GVHD (Graft Versus Host Disease) حاد در بروز افزایش‌یافته فعال شدن عفونت HCMV (Human CytoMegaloVirus) نشان داده شده است. در این مطالعه، روش ساده، سریع و کم هزینه PCR نیمه‌کمّی در اندازه‌گیری بارژنومی HCMV در سلول‌های لکوسیت (PBL) و نمونه پلاسمای بیماران گیرنده پیوند " سلول‌های بنیادی خون ساز" بر اساس درجه GVHD بیماران بررسی گردیده است.

روش بررسی: وجود DNA سایتومگالوویروس در ۲۰۱ نمونه لکوسیت خون محیطی (PBL) و ۲۰۱ نمونه پلاسما جمع آوری شده از ۲۶ بیمار گیرنده " سلول‌های خون ساز" (HCT) مورد بررسی قرار گرفت. باندهای بدست آمده از PCR ۱۰ تا $۱۰^{۶}$ ملکول در میکرولیتر از "پلاسمید کلون شده" و همچنین نمونه‌های بالینی، با نرم افزار Lab Works تعیین دانسیته گردید و با نتایج مربوط به پلاسمید منحنی استاندارد رسم گردیده و. با نتایج آزمون آنتی ژنمیای هر بیمار نیز مقایسه شد.

یافته‌ها: دامنه بار ویروسی در نمونه‌های PBL و پلاسما، از کمتر از ۱۰۰ تا $۱/۳\times۱۰^{۴}$ اندازه‌گیری شد. همچنین هفت بیمار (۲۶٪)، ۱۴ دوره مثبت شدن آنتی ژنمیا را بروز دادند که بیشترین میزان بار ویروسی (آنتی ژنمیا و ژنوم ویروسی) در بیماران مبتلا به GVHD حاد مشاهده شد. ارتباط معناداری بین میزان بار ویروسی در PBL و پلاسما ($P<۰/۰۰۵$)، و آنتی ژنمیا ($r:۰/۹۱$ و $P<۰/۰۰۰۱$) شناسایی شد. بوسیله آنالیز Receiver Operating Characteristic (ROC) تعداد ۲۲۰۰ نسخه ویروسی در هر میکروگرم DNA در نمونه‌های PBL به عنوان ارزش آستانه (Threshold value) جهت شروع درمان با گان سیکلویر تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: GVHD grade II-IV به عنوان عامل مساعدکننده فعال شدن عفونت HCMV و بروز بیماری ناشی از آن مطرح می‌باشد به همین دلیل استفاده از تست‌های حساس‌تری چون PCR کمّی برای اثبات عفونت فعال که منجر به بیماری HCMV می‌گردد توصیه میشود.

کلمات کلیدی: پیوند سلول‌های خون ساز، سایتومگالوویروس، آنتی ژنمیا، بیماری پیوند علیه میزبان، PCR کمّی.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]

مقدمه

عفونت با ویروس سایتومگال‌انسانی (HCMV) شایع‌ترین و خطرناکترین عفونت فرصت طلب در گیرندگان "پیوند سلول‌های بنیادی خون ساز" می‌باشد که سبب بیماری‌های شدیدی مثل پنومونی، اختلالات معدی- روده‌ای و سرکوب فعالیت مغز استخوان می‌گردد.[۱] ریسک فاکتورهای متعددی در افزایش فعال شدن عفونت HCMV و بروز بیماری ناشی از این ویروس وجود دارد که می‌توان به‌فرم حاد "بیماری پیوند بر علیه میزبان" (Acute GVHD) اشاره نمود. GVHD حاد ملایم تا شدید (grade II-IV) می‌تواند سبب پیشرفت سریع عفونت نهفته HCMV به سمت بیماری گردد، به همین دلیل شناسایی به‌موقع افزایش بار ویروسی می‌تواند یک فاکتور کلیدی در کنترل عفونت HCMV و جلوگیری از بیماری ناشی از آن باشد.[۲و۳] روش‌های متعددی به منظور اندازه‌گیری بار ویروسی در خون وجود دارد که از آن جمله می‌توان به آزمون آنتی‌ژنمیا اشاره کرد. آزمون آنتی‌ژنمیا در بیشتر مراکز پیوند برای تشخیص HCMV مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آزمون مزایایی چون تخمین بار ویروسی و معایبی از قبیل طولانی و پرهزینه بودن و همچنین عدم حساسیت کافی در تشخیص HCMV در بیماران در معرض خطر چون بیماران مبتلا به GVHD حاد را دارا باشد. تست کمّی PCR اگرچه قابلیت‌های با ارزشی در تعیین بار ژنومی ویروس دارد و می‌تواند راهنمای مناسبی در شروع درمان باشد، ولی بسیار پرهزینه بوده و فقط در مراکز محدودی انجام پذیر است. به همین دلیل نیاز به یک تست تشخیصی کارآمد و در عین حال دقیق و کم‌هزینه در اندازه‌گیری بار ویروسی به‌منظور راهنمایی شروع درمان گانسیکلویر وجود دارد.[۴و۵] اهدف این مطالعه ارزیابی روش ساده و کم هزینه PCR نیمه‌کمّی در اندازه‌گیری بارژنومی HCMV در سلول‌های لکوسیت (PBL) و پلاسمای بیماران گیرنده پیوند " سلول‌های بنیادی خون ساز" و مقایسه نتایج آنها با آزمون آنتی‌ژنمیا برحسب درجه GVHD بیماران، می‌باشد. همچنین در این مطالعه، یک حد نصاب در میزان بار ژنومی HCMV با بهره‌گیری از نتایج آنتی‌ژنمیا جهت شروع درمان عفونتHCMV در بیماران پیوند مغز استخوان نیز تعیین گردیده است.

روش بررسی

بیماران این مطالعه شامل ۳۱ بیمار دریافت‌کننده "پیوند مغز استخوان آلوژنیک" بودند که در فاصله زمانی بین خرداد ۱۳۸۴ تا بهمن ۱۳۸۴ به مرکز خون و انکولوژی بیمارستان شریعتی مراجعه کردند. از بین این ۳۱ بیمار، پنج بیمار به علت فوت در هفته‌های اول پس از پیوند از مطالعه حذف شدند و در نهایت ۲۶ بیمار در طول ۱۰۰ روز پس از پیوند مورد پایش قرار گرفتند. لازم به ذکر است که اطلاعات سرولوژی تمامی گیرندگان و اهدا کنندگان پیوند در این مطالعه نسبت به HCMV جمع‌آوری گردید. همچنین وجود DNA ویروس سایتومگال در ۴۰۲ نمونه، شامل ۲۰۱ نمونه لکوسیتهای خون محیطی (PBLs) و ۲۰۱ نمونه پلاسمای گرفته شده از بیماران مورد بررسی قرار گرفت. پنج میلی‌لیتر از خون بیمار در لوله‌های حاوی EDTA (ماده ضد انعقاد) جمع‌آوری گردید. پلاسما و لکوسیتها در عرض شش ساعت پس از نمونه‌گیری جدا شدند و تا زمان بررسی با آزمون PCR در $-20^{\circ}C$ ذخیره گردیدند. تعداد 10^{5} تا 2×10^{6} لکوسیت و مقدار ۲۰۰µl پلاسما به‌وسیله روش نونیدت (Nonidet P40) مورد استخراج DNA قرار گرفت و سپس به‌وسیله روش فنل- کلروفرم ایزوآمیل الکل خالص‌سازی شد.

واکنش PCR کیفی در حجم ۵۰µl تنظیم گردید که شامل ۵۰mM KCl، ۱/۵mM $MgCl_2$، ۷۵mM Tris HCl (pH:9)، ۲۰mM $(NH_4)_2SO_4$، ۵۰µM از هر یک از دئوکسی نوکلئوتیدها، ۲U از آنزیم Taq DNA polymerase و ۲۰pM از هر یک از پرایمرها بود. همچنین یک میکروگرم DNAی استخراج شده از نمونه‌های بالینی به هر واکنش PCR اضافه گردید. مشخصات پرایمر NC- NCBI: (001347) مورد استفاده به‌صورت زیر بوده است:

Forward : 5′-CGG TGG AGA TAC TGC TGA GGT C-3′

Reverse : 5′- CAA GGT GCT GCG TGA TAT GAA G-3′

مشخصات چرخه‌های حرارتی مورد استفاده به‌صورت زیر بوده است: انکوباسیون در $^{\circ}C$ ۹۴ به‌مدت سه دقیقه و سپس ۴۰ سیکل شامل: $^{\circ}C$ ۹۴ (۳۰ ثانیه)، $^{\circ}C$ ۵۵ (۳۰ ثانیه)، $^{\circ}C$ ۷۲ (۳۰ ثانیه) و در نهایت $^{\circ}C$ ۷۲ به‌مدت سه دقیقه. هر واکنش PCR شامل یک کنترل مثبت (DNA HCMV) و یک کنترل منفی (آب مقطر) بود. به منظور تایید سالم بودن DNAهای استخراج شده و همچنین معرف‌های مورد استفاده در PCR، قطعه bp ۱۱۰ از ژن بتاگلوبین سلول‌های میزبان با استفاده از پرایمرهای Pco_3 و Pco_4 مورد تکثیر قرار گرفت. برای انجام PCR کمّی و تهیه منحنی استاندارد از پلاسمید PTZ57R که با قطعه bp ۲۵۷ از ژن gB HCMV کلون شده بود استفاده شد. این

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]

پلاسمید از بخش ویروس‌شناسی بیمارستان نمازی شیراز، (دکتر مازیار ضیائیان) تهیه گردید. دانسیته باندهای حاصل از PCR تعداد ۱۰ مولکول تا $۱۰^{۶}$ مولکول از این پلاسمید و همچنین نمونه‌های بالینی به‌وسیله نرم افزار Lab Works (version 3.0.02) تعیین گردید. سپس با استفاده از داده‌های مربوط به پلاسمید، یک منحنی استاندارد رسم گردید و فرمول آن نیز به‌دست آمد. به کمک این فرمول تعداد نسخه ویروسی نمونه‌های بالینی محاسبه گردید: (y=5944.2Ln(x)-31407 و r^2=0.95).

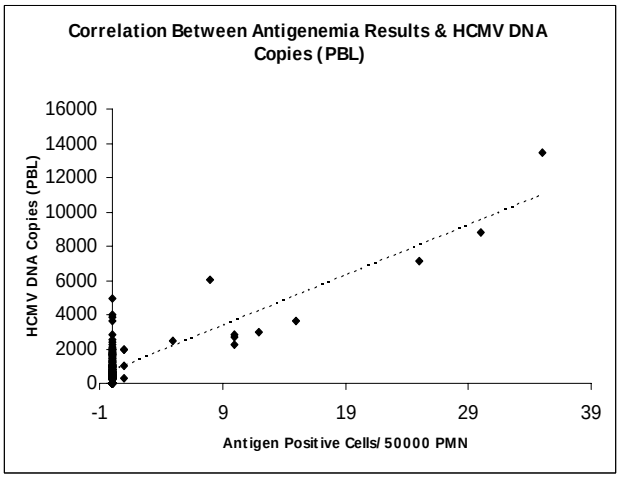
آزمون آنتی ژنمیا توسط آزمایشگاه بیمارستان دی انجام شد و نتایج آن جهت مقایسه با نتایج PCR مورد استفاده قرار گرفت. شناسایی حتی یک سلول رنگ آمیزی شده، دال بر عفونت فعال HCMV و به‌علاوه ملاک شروع درمان گان سیکلویر در بیماران مورد مطالعه وجود پنج سلول مثبت یا بیشتر در ۵×۱۰^{۴} PMNs مورد بررسی بوده است. محاسبات آماری با استفاده از تعیین ضریب همبستگی Pearson انجام شد و p<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظرگرفته شد. همچنین به‌منظور تعیین یک ارزش آستانه در نتایج PCR کمّی برای شروع درمان گان سیکلویر از منحنی ROC استفاده گردید.

یافته‌ها

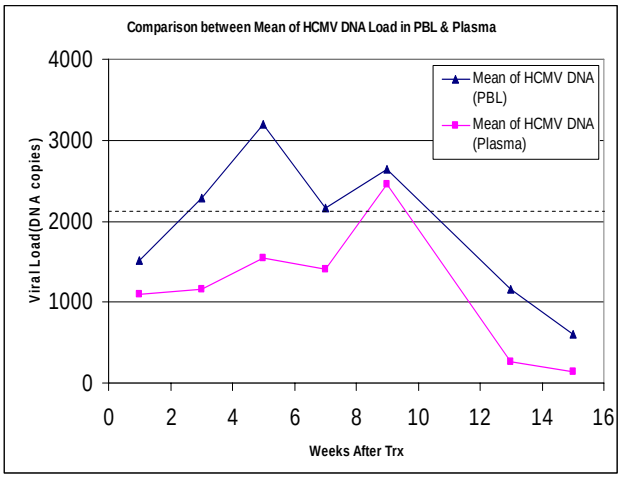
تعداد ۱۴ نمونه آنتی‌ژن مثبت (۷٪) از هفت بیمار (۲۷٪) دارای آزمون آنتی‌ژنمیای مثبت در طول زمان پایش جمع‌آوری گردید. همچنین ۷۳٪ (۱۴۷ نمونه) از نمونه‌های پلاسما و ۷۵٪ (۱۵۱ نمونه) از نمونه‌های PBL دارای آزمون PCR کیفی مثبت بودند. تمامی بیماران مورد مطالعه دارای آنتی‌بادی IgG ضد HCMV بودند. با توجه به اینکه باند حاصل از PCR تعداد ۱۰۰ مولکول پلاسمید واضح بوده و تعیین دانسیته گردید، لذا در این مطالعه "حداکارسازی" (Detection Limit) برابر با ۱۰۰ نسخه ژنومی از ویروس در نظر گرفته شد. میانگین بار HCMV DNA در نمونه‌های PBL و پلاسمای گرفته شده از بیماران در طول زمان پایش با یکدیگر مورد بررسی آماری قرار گرفت و ارتباط معنی‌داری بین نتایج آنها شناسایی شد (correlation coefficient :۰/۸۳, P<۰/۰۵) (نمودار شماره۱). همچنین ارتباط معنی‌داری بین نتایج آنتی‌ژنمیا و آزمون PCR از نمونه‌های PBL به‌دست آمد (r =۰/۸۲۵ و P<۰/۰۰۰۱) (نمودار شماره۲). در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین نتایج آزمون آنتی‌ژنمیا و پلاسما PCR شناسایی نشد (r^2=۰/۰۰۶ و p=۰/۹۳۳)، به همین دلیل ما در این مطالعه نتایج PCR کمّی مربوط به نمونه‌های PBL را مورد بررسی قرار می‌دهیم. از آنجائیکه وجود پنج سلول آنتی‌ژن مثبت در آزمون آنتی‌ژنمیا به عنوان یک" آستانه پیشگویی کننده" برای بیماری HCMV انتخاب شده و معیار شروع درمان ضد HCMV در بیماران سرکوب ایمنی می‌باشد، لذا تعیین یک "ارزش آستانه" مشابه برای HCMV DNA مهم می‌باشد. به منظور تعیین مناسب‌ترین آستانه از تعداد نسخه ژنومی HCMV برای شروع درمان، از منحنی ROC با استفاده از نتایج آزمون آنتی‌ژنمیا به عنوان یک ملاک درمانی استفاده گردید. بالاترین حساسیت و ویژگی در تعداد ژنوم ۲۲۰۰ نسخه ویروسی مشاهده گردید، لذا در این مطالعه تعداد ۲۲۰۰ کپی از ژنوم HCMV به‌عنوان یک معیار مناسب که برابر با پنج سلول آنتی‌ژن مثبت می‌باشد، انتخاب گردید. ازآنجائیکه بروز GVHD grade II-IV به‌عنوان یک "فاکتور مساعدکننده" برای فعال شدن عفونت HCMV مطرح می‌باشد، در این مطالعه اثر بروز GVHD را به‌عنوان یک ریسک‌فاکتور بر روی عود عفونت HCMV بررسی گردید. در این مطالعه بیماران بر اساس "وجود" یا "عدم وجود" بیماری GVHD به دو گروه تقسیم‌بندی شدند: گروه۱، بیمارانی که GVHD grade 0-I را دارا بودند (۲۳ بیمار که شامل هفت بیمار مبتلا به grade I و۱۶ بیمار دارای علائم grade 0) و گروه ۲، بیمارانی که GVHD grade II-IV را نشان دادند (سه بیمار). نکته مهم و قابل توجه در این تقسیم‌بندی بروز بیشترین "تعداد سلول آنتی ژن مثبت" و دوره‌های بیشتر عود عفونت HCMV در بیماران دارای علائم GVHD grade II-IV بوده است (جدول شماره۱). به‌عنوان مثال بیماران ۹، ۱۵ و ۲۳ که در طول زمان پایش، علائم GVHD grade II-IV را بروز دادند، دوره‌های بیشتری از فعال شدن عفونت HCMV و در نتیجه مثبت شدن آنتی‌ژنمیا را در مقایسه با سایر بیماران نشان دادند. منحنی تغییرات بار ژنومی HCMV و نتایج آنتی‌ژنمیا در دو بیمار دارای علائم GVHD grade I (بیمار ۱۷) و grade II (بیمار۲۳) به‌عنوان نمونه نشان داده شده است (نمودار شماره۳). همچنین بیمار ۲۳ که بیماری هپاتیت HCMV را در روز ۷۱+ نشان داد، مبتلا به GVHD کبدی grade II بود. این بیمار در هفته دوم پس از پیوند که نخستین فعال شدن عفونت HCMV بود، بالاترین تیتر آنتی‌ژنمیا و بار DNA ویروسی را در مقایسه با سایر بیماران نشان داد (۳۵ سلول مثبت و ۹×۱۰^{۴} نسخه ویروسی/ میکروگرم DNA).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]

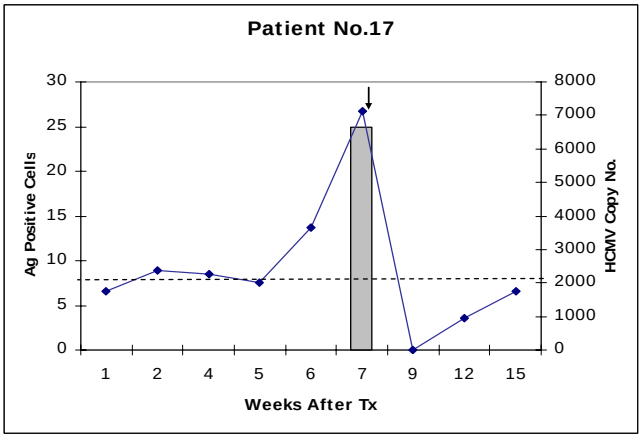
همچنین در هنگام بروز بیماری هپاتیت HCMV در هفته دهم پس از پیوند، تیتر ژنومی HCMV در PBLs و تعداد سلول آنتی‌ژن مثبت به ترتیب به $۱/۳ \times ۱۰^{۴}$ کپی/ میکروگرم DNA و ۳۰ سلول رسید.

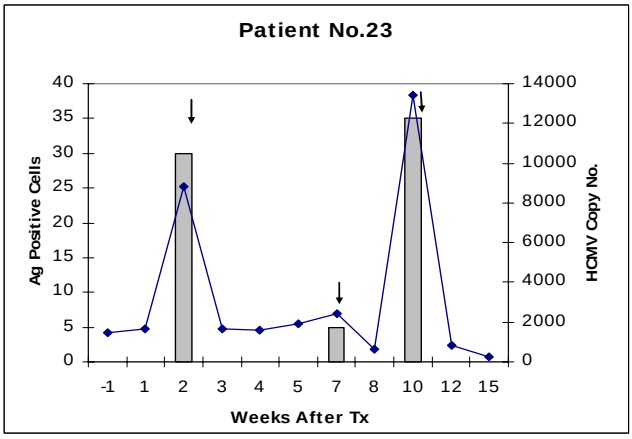


نمودار-۱: مقایسه میانگین تعداد کپی ژنوم HCMV در نمونه‌های PBLs و پلاسمای بیماران با آزمون آنتی‌ژنمیای مثبت بر طبق هفته‌های پس از پیوند.
نقطه‌چین= حد نصاب ۲۲۰۰ نسخه ویروسی برای شروع درمان



نمودار-۲: مقایسه نتایج آزمون آنتی‌ژنمیا و تعداد نسخه ژنومی HCMV در نمونه های PBL در بیماران مورد مطالعه. (r =۰/۸۲۵ و p<۰/۰۰۱)
نقطه‌چین= حد نصاب ۲۲۰۰ نسخه ویروسی برای شروع درمان





نمودار-۳: منحنی بررسی تطابق تعداد نسخه‌های ژنومی HCMV در نمونه‌های PBLs و تعداد سلول‌های آنتی‌ژن مثبت برحسب درجه GVHD. خط نقطه‌چین نشان‌دهنده حد نصاب تعیین شده (۲۲۰۰ کپی ژنومی) می‌باشد (فلش نشان دهنده روز شروع درمان با گان سیکلویر می‌باشد).

جدول۱- ارتباط بین درجات GVHD و بار ژنومی ویروس و تعداد دوره‌های مثبت شدن آنتی‌ژنمیا در بیماران BMT

بیماری GVHD (Grade)	میانگین تعدادسلول آنتی‌ژن مثبت(دامنه)	میانگین تعداد نسخه ژنومی ویروس/ میکروگرم DNA(دامنه)	حداکثر دوره‌های مثبت شدن آنتی‌ژنمیا در طول ۱۰۰ روز
0-I	۹(۰-۲۵)	۸۱۷ (۰-۷۱۲۳)	۲
II-IV	۱۵(۱۰-۳۵)	۵۲۸۸ (۱۰۴۰-۱۳۴۳۶)	۴

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]

بحث

شناسایی وضعیت سرولوژی مثبت برای HCMV در تمامی گیرندگان و اهداکنندگان پیوند در این مطالعه نشان‌دهنده خطر بالای فعال شدن عفونت نهفته HCMV می‌باشد. همچنین مشاهده مثبت بودن ۷۴٪ از نمونه‌های PBL و پلاسمای گرفته شده از بیماران این مطالعه به‌وسیله PCR با مشاهدات قبلی که توسط دکتر ضیائیان و همکاران ایشان گزارش شده است (۷۱٪ مثبت) همخوانی دارد.[۶] مثبت شدن ۷٪ از نمونه‌های PBL در آزمون آنتی‌ژنمیا می‌تواند گویای این نکته باشد که رویه‌های پیشگیرانه مورد استفاده در کنترل عفونت HCMV در بیماران مورد مطالعه ما موفقیت آمیز بوده است. نتایج ما مانند سایر محققین نشان می‌دهد که شناسایی ژنوم ویروس با PCR حساس‌تر از شناسایی آنتی‌ژن pp65 در آزمون آنتی‌ژنمیا در تشخیص HCMV می‌باشد. بالاتر بودن خطر فعال شدن عفونت HCMV و بروز بیماری ناشی از آن در بیماران مبتلا به GVHD grade II-IV (گروه۲) در مقایسه با grade 0-I (گروه۱) در این مطالعه نشان داده شده زیرا بالاترین میزان دوره‌های فعال شدن عفونت HCMV، بیشترین میانگین میزان بار ویروسی و بالاترین میزان سلول آنتی‌ژن مثبت در بیماران گروه ۲ مشاهده گردیده است. بالاتر بودن میزان شناسایی HCMV DNA در نمونه‌های PBL بیماران مبتلا به grade II-IV در مقایسه با بیماران دارای علائم grade 0-I توسط Maeda و همکاران نیز نشان داده شده است.[۷] مشاهده تجویز بیش از یک دوره از درمان گان سیکلویر برای سرکوب فعال شدن عفونت HCMV در بیماران گروه۲ (grade II-IV) نشان‌دهنده پرخطر بودن این دسته از بیماران در مقایسه با سایرین می‌باشد (جدول شماره۱). به‌علاوه کیفیت پاسخ به‌درمان گان‌سیکلویر نیز در این گروه از بیماران با گروه اول متفاوت بوده است همچنین بروز هپاتیت HCMV در سومین وعده فعال شدن این عفونت ویروسی در بیمار ۲۳ را می‌توان به‌دلیل ایجاد نقص در پاسخ ایمنی حاصل شده از بروز GVHD حاد و یا استفاده ازداروهای سرکوب‌کننده سیستم‌ایمنی (کورتیکوستروئیدها) که به‌منظور کنترل بیماری GVHD مورد استفاده قرار می‌گیرند و افزایش احتمال بروز بیماری HCMV همراه با افزایش دوره‌های مصرف گان‌سیکلویر مرتبط دانست. عدم شناسایی ارتباط معنی‌دار بین نتایج PCR در نمونه‌های پلاسما با نتایج آنتی‌ژنمیا توسط مطالعات دیگر محققین نیز نشان داده شده است.[۸و۹] این عدم ارتباط شاید دلیل تکثیر ویروس سلول‌های هسته‌دار در خون باشد. HCMV ابتدا لکوسیتها را آلوده می‌نماید ولی مقادیر اندکی از ویروس به‌طور معمول در پلاسما یافت می‌شود لذا تغییرات قابل توجهی در میزان بار ویروسی در پلاسما دیده نشده است. تعیین تعداد ۲۲۰۰ نسخه ویروسی/ میکروگرم DNA در این مطالعه با حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۹۵٪ به‌عنوان حد نصابی که برابر با پنج سلول آنتی‌ژن مثبت می‌باشد، نشانگر توانایی تست در تعیین شروع و یا عدم شروع گان‌سیکلویر می‌باشد. در مطالعه Kalpoe و همکاران به‌وسیله Real Time PCR به‌منظور تعیین cut off در بار ژنومی HCMV بر روی نمونه‌های خون تام و پلاسمای بیماران گیرنده "سلول‌های بنیادی خون‌ساز"، تعداد 10^4 نسخه ویروسی/میلی‌لیتر از خون تام به عنوان حدنصاب تعیین گردیده است.[۹] شاید علت این تفاوت درمیزان تعیین شده در آن مطالعه با ۲۲۰۰ نسخه ژنومی به‌دست آمده درمطالعه ما به خصوصیات PCR (طول قطعه مورد تکثیر و شرایط انجام تست PCR) مورد استفاده بستگی داشته باشد (۱۲۶ bp در مقابل ۲۵۶ bp و ۵۰ سیکل در مقابل ۴۰ سیکل). اهمیت کاربردی حدنصاب ۲۲۰۰ نسخه ویروسی/ میکروگرم DNA در نمونه‌های PBL این مطالعه هنگامی بیشتر مشخص می‌شود که بیماران دارای بیش از پنج سلول آنتی‌ژن مثبت در آزمون آنتی‌ژنمیا، بار ویروسی بالاتر از این cut off داشته‌اند. این امر می‌تواند تاییدکننده دقت حدنصاب مشخص‌شده در این مطالعه باشد. در خاتمه از این مطالعه چنین نتیجه‌گیری می‌شود که آزمون PCR نیمه کمی طراحی شده در این مطالعه در مواردی‌که هزینه و وسائل محدود است و یا شرایط تهیه کیت میسر نیست قابلیت جایگزینی آنتی‌ژنمیا را داراست. چه بسا، این تست قابلیت بهتری در کنترل عفونت و جلوگیری از بروز بیماری HCMV داشته باشد. با توجه به تقسیم‌بندی بیماران این مطالعه بر اساس درجه GVHD، نتیجه گرفته‌ایم که به‌منظور پرهیز از درمان بیش از حد با گانسیکلویر در بیمارانی که در معرض خطر بروز بیماری HCMV نیستند (بیماران grade 0-I)، درمان می‌تواند بعد از رسیدن تیتر آنتی‌ژنمیا به بیش از پنج سلول مثبت و یا بعد از دو تیتر ژنومی بالاتر از ۲۲۰۰ نسخه ویروسی /µg DNA آغاز گردد. ولی در بیمارانی که علائم grade II-IV را نشان داده‌اند درمان ضد HCMV بایستی پس از یک تیتر ویروسی بالاتر از ۲۲۰۰ نسخه ژنومی و یا هر تعدادی از سلول "آنتی ژن مثبت" در آزمون آنتی ژنمیا شروع گردد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]

References

1. Meijer E, Boland GJ, Verdonck LF. Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 647-57.
2. Stocchi R, Ward KN, Fanin R, Baccarani M, Apperley JF. Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation . *Haematologica* 1998 ; 84: 71-9.
3. Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J, Avetisyan G, Sparrelid E, Aschan J, et al. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006; 91: 78-83.
4. Razonable R, Paya CV, Smith TV. 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.
5. Preiser W, Brauninger S, Schwerdtfeger R, Ayliffe U, Garson JA, Brink NS, et al. Evaluation of diagnostic methods for the detection of cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplants. *J Clin Virol* 2001; 20: 59-70.
6. Ziyaeyan M, Sabahi F, Alborzi A, Mahboudi F, Kazemnejad A, Ramzi M, et al. Diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipients by quantitative competitive PCR. *Exp Clin Transplant* 2006; 4: 470-4.
7. Maeda Y, Teshima T, Yamada M, Shinagawa K, Nakao S, Ohno Y. Monitoring of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1999; 105: 295-302.
8. 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.
9. Garrigue I, Boucher S, Couzi L, Caumont A, Dromer C, Neau-Cransac M, et al. Whole blood real-time quantitative PCR for cytomegalovirus infection follow-up in transplant recipients. *J Clin Virol* 2006; 36: 72-5.
10. Kalpoe JS, Kroes AC, de Jong MD, Schinkel J, de Brouwer CS, Beersma MF, et al. Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1498-504.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]

Comparison of HCMV DNA load and antigenemia results in hematopoietic transplant recipients based on GVHD grade

Pajand O.[1]
Ziyaeyan M.[2]
Mousavi A.[3]
Hojabri Z.[1]
Kazemi B.[4]
Bahador A.[1]
Hamidian M.[1]
Mousavi A.[3]
Hashemi F B.[1]*

1- Microbiology Department Tehran University of Medical Sciences
2- Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences
3- Hematology and Oncology Research Center, Tehran University of Medical Sciences
4- Cellular and Molecular Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

* Corresponding author
Department of Microbiology School of Medicine Tehran University of Medical Sciences
100 Poursina St. Keshavarz Blvd. Tehran
Tel: +98-21-88955810
Email: bonakdar@sina.tums.ac.ir

Abstract

***Background*:** Human Cytomegalovirus (HCMV) infections are a significant challenge in patients with Hematopoietic Cell Transplant (HCT). Acute Graft vs. Host (GVHD) is recognized as a predisposing factor for increased incidence of HCMV reactivation. Availability of rapid and accurate tests for HCMV detection in HCT recipients is of foremost importance in developing countries, such as Iran.

***Methods*:** A total of 201 peripheral blood leukocyte (PBL) and plasma specimens from 26 allogeneic HCT recipients were examined for HCMV DNA by polymerase chain reaction (PCR) assay. Densitometric analysis of 257bp PCR products from clinical samples and 10^1-10^6 "cloned plasmid" per µg DNA containing a HCMV specific fragment were analyzed using LabWorks software (v3.0.02). Optical density of amplicons was plotted, and calculated HCMV viral loads were compared with the patients' antigenemia results.

***Results*:** HCMV viral loads ranged between $<10^2$ to 1.35×10^2 copies per µg DNA among 7 HCT patients. In addition, 14 episodes of positive antigenemia assay in 7 patients in which peak HCMV load were compared with GVHD grade II-IV patients. Significant correlation was also detected between HCMV DNA load in PBL and plasma samples, as well as HCMV DNA load in PBL samples and antigenemia results. Receiver–Operating Characteristic analysis determined that 2,200 HCMV copies in PBL samples as the threshold value for initiation of Ganciclovir therapy.

***Conclusion*:** This report shows that rapid and sensitive assays, like quantitative PCR, are extremely valuable for detection of active HCMV infection, and life-threatening HCMV disease in HCT recipients during the post transplant period. Furthermore, high HCMV DNA load among GVHD grade II-IV patients confirms the high risk of HCMV reactivation among these HCT recipients. Tests such as quantitative PCR also helps physicians initiate timely preemptive therapy and for a shorter period, which may lead to better clinical outcome in HCMV-infected transplant patients.

Keywords: Hematopoietic cell transplantation, HCMV, Antigenemia, GVHD, Quantitative PCR.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-06]