شناسایی عفونت ویروس اپشتین- بار در بیماران مبتلا به لنفوم: آزمون ELISA و PCR

بابک پوراکبری[۱]، ستاره ممیشی[۲و۱*]
امید پژند[۳]، سید علیرضا ناجی[۴]
فاطمه محجوب[۵]، لیلی کوچک‌زاده[۱]
مینا ایزدیار[۱]، نیما پروانه[۱]
فرح صابونی[۱]

۱- گروه بیماری‌های کودکان، دانشکده پزشکی
۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی کودکان
دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۴- مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵- گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان دکتر قریب، پلاک ۶۲، بیمارستان مرکز طبی‌کودکان، دانشگاه علوم‌پزشکی تهران
تلفن: ۶۶۴۲۸۹۹۶
email: smamishi@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۵/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۸/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: ژنوم فاز نهفته عفونت ویروس اپشتین- بار (EBV) در سلول‌های بدخیم تقریباً در یک‌سوم موارد بیماری لنفوم هوچکین یافت می‌شود. شناسایی DNA ویروسی می‌تواند به‌طور بالقوه به‌عنوان یک بیومارکر از فعالیت بیماری به‌کار رود. ***روش بررسی:*** از نمونه خون ۴۴ بیمار مبتلا به لنفوم و ۴۴ فرد کنترل جهت استخراج DNA و اندازه‌گیری تیتر IgG ضد EBNA-1 ویروس استفاده شد. همزمان بلوک‌های پارافینه هر فرد بیمار نیز مورد استخراج DNA قرار گرفت. جهت شناسایی ویروس آزمون Nested PCR که هر دو تیپ ویروس را شناسایی می‌کردند، انتخاب شدند. ***یافته‌ها:*** از ۴۴ بیمار به‌ترتیب (۸۴/۱٪)۳۷ آزمون ELISA، (۲۷/۳٪)۱۲ Blood PCR و (۱۳/۶٪)۶ Biopsy PCR و از افراد کنترل نیز به‌ترتیب (۴۷/۷٪)۲۱ و (۱۶٪)۷ آزمون ELISA و Blood PCR مثبت داشتند. نتایج آزمون‌های ELISA و Blood PCR و Biopsy PCR مثبت در گروه بیماران هوچکینی و غیرهوچکینی به‌ترتیب (۸۴٪)۲۱، (۲۴٪)۶، (۱۶٪)۴ و (۸۴/۲٪)۱۶، (۳۱/۶٪)۶، (۱۰/۵٪)۲ بوده است. مقایسه نتایج این آزمون‌ها بین دو گروه بیماران تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (مقادیر p برای ELISA، Blood PCR و Biopsy PCR به‌ترتیب ۰/۲۶، ۰/۷۳ و ۰/۶۸ بوده است). ***نتیجه‌گیری:*** نتایج مقایسه ELISA و Blood PCR این مطالعه در طیف سنی اطفال و بالغین بیمار با طیف سنی مشابه در گروه کنترل نشان داد که تنها در آزمون ELISA و فقط در بین اطفال تفاوت معنی‌دار وجود داشت و نتایج حاصل از PCR معنی‌دار نبود. به‌علاوه نتایج آزمون‌ها بین بیماران هوچکینی با گروه کنترل فقط در نتایج ELISA دارای تفاوت معنی‌دار بود. نتایج آزمون‌های بیماران هوچکینی و غیر هوچکینی در هیچ‌یک از آزمون‌ها تفاوت معنی‌دار نشان نداد.

کلمات کلیدی: لنفوم، ویروس اپشتین بار، Elisa، PCR.

مقدمه

ژنوم‌های مخفی ویروس اپشتین بار(Epstein- Barr Virus (EBV در سلول‌های هوچکینی بدخیم رد- اشترنبرگ Reed-Sternberg در تقریباً یک‌سوم موارد لنفوم‌های هوچکین (HL) یافت شده است، اگرچه میزان درگیری با این ویروس در کشورهای در حال توسعه به ۱۰۰٪ نیز می‌رسد.[۲و۱] مطالعات اخیر ارتباطی را بین مونونوکلئوز عفونی و لنفوم‌های هوچکین EBV مثبت را در بالغین جوان نشان می‌دهد.[۳] آنالیز پلی‌مورفیسم HLA کلاس I پیشنهاد می‌کند که نقص در ارائه آنتی‌ژن با خطر بروز لنفوم هوچکین EBV مثبت ارتباط دارد.[۴] کسب عفونت اولیه EBV به عفونت پایدار برای تمام عمر منجر شده که در آن سلول‌های B خاطره‌ای مخازن اصلی ویـروس بوده و میـزان آلودگی با این ویروس در افراد سالم سرمی مثبت بین یک تا ۵۰ سلول آلوده در ۱۰^۶ سلول B تخمین زده شده است.[۵] Khan با مقایسه لنفوم هوچکین EBV مثبت و EBV منفی نشان داد که میزان سلول‌های B خاطره‌ای آلوده با این ویروس که در حال گردش هستند در نمونه‌های قبل از درمان افراد EBV مثبت افزایش یافته است.[۶] او ادعا کرد که میزان افزایش یافته سلول‌های B آلوده با EBV در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) به‌عنوان یک عامل خطر برای بروز لنفوم هوچکین EBV مثبت مطرح می‌باشد. تعداد سلول‌های آلوده با EBV در بیماری‌های مختلف مرتبط با EBV افزایش یافته و این عفونت مرزی می‌تواند به‌وسیله اندازه‌گیری بار DNA ویروسی مورد پایش قرار گیرد. پایش بار ویروسی سلولی به‌طور موفقیت‌آمیزی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-17]

جهت شناسایی بیماران در معرض خطر بالا که ممکن است بیماری Post Transplantation Lymphoproliferative Disease (PTLD) را بروز دهند به‌کار رفته است.[۷] نشان داده شده که این ویروس با حدود ۴۰٪ از موارد بیماری هوچکین مرتبط می‌باشد. زیر تیپ هیستولوژیکی از نوع Mixed cellularity با احتمال بیشتری در مقایسه با زیر تیپ nodular sclerosis بروز می‌کند و بیماران مبتلا بیشتر در مراحل اولیه کودکی و یا در گروه‌های مسن‌تر قرار دارند تا این‌که جزو گروه بالغین جوان باشند. به‌علاوه، در قیاس با کشورهای توسعه‌یافته، بیماران بیشتر در کشورهای در حال توسعه شناسایی می‌شوند.[۸] از آنجایی‌که معمولاً روش‌های تشخیصی که بر پایه ردیابی محصولات ژنی ویروس انجام می‌گیرد نمی‌تواند همه موارد عفونت EBV را تشخیص دهد، ولی استفاده از روش‌های ملکولی مبتنی بر ژن مثل PCR می‌تواند در شناسایی موارد ابتلا به عفونت با این ویروس در بین بیماران مبتلا به لنفوم بسیار کمک‌کننده باشد.[۹] در این مطالعه قصد داریم میزان عفونت با ویروس EBV را در دو گروه بیماران مبتلا به لنفوم و همچنین افراد کنترل مورد بررسی قرار دهیم. لذا برای این منظور از روش‌های سرولوژی و ملکولی استفاده می‌نماییم. همچنین قصد داریم تا با مقایسه میزان عفونت بین گروه بیماران هوچکینی و کنترل، نقش احتمالی عفونت با این ویروس را در بروز لنفوم هوچکین بررسی نماییم.

روش بررسی

مطالعه مذکور از نوع مورد- شاهدی بوده و در فاصله زمانی مهر ۱۳۸۵ الی مهر ۱۳۸۷ در مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی اطفال انجام گردیده است. در زمان نمونه‌گیری از بیماران مورد مطالعه رضایت‌نامه دریافت گردید. در این مطالعه ۴۴ بیمار مبتلا به لنفوم (هوچکین و غیرهوچکین) و همچنین ۴۴ فرد سالم بدون بیماری لنفوم و یا بیماری ناشی از EBV که از لحاظ طیف سنی مطابق با بیماران مورد مطالعه بودند، وارد مطالعه شدند. از ۴۴ بیمار مورد نظر ۱۷(٪۳۸/۵) زن و ۲۷(٪۶۱/۵) مرد بوده و طیف سنی ۵۰-۴/۵ (میانگین ۱۶/۵) سال را دارا بودند. از لحاظ نوع لنفوم، ۱۹(٪۴۳) غیر هوچکین و ۲۵(٪۵۷) هوچکینی بوده‌اند. ابتدا پس از پر کردن پرسشنامه از هر فرد بیمار و کنترل ۲ml نمونه خون گرفته شد که ۱ml آن همراه با EDTA به‌عنوان ماده ضد انعقاد جهت جداسازی لکوسیت‌های خون محیطی (PBLs) و ۱ml دیگر به‌صورت لخته و جهت جداسازی سرم به‌منظور تعیین تیتر آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن EBNA-1 ویروس به‌وسیله آزمون ELISA بوده است. همزمان با این مراحل نمونه‌های بیوپسی پارافینه مربوط به هر بیمار که بیماری لنفوم آن به‌وسیله بررسی هیستوپاتولوژی تایید شده بود نیز جمع‌آوری گردید تا مورد استخراج DNA قرار گیرد. جهت تعیین تیتر آنتی‌بادی IgG علیه آنتی‌ژن EBNA-1 ویروس، سرم هر فرد بیمار و کنترل به‌میزان ۰/۰۱ رقیق گردید و با آزمون ELISA تعیین تیتر گردید. PBLsهای هر فرد بیمار و کنترل پس از جداسازی از خون و همچنین نمونه‌های بلوک هر بیمار به‌وسیله روش Nonidet P40 مورد استخراج DNA قرار گرفت و سپس توسط روش فنل-کلروفرم تخلیص شد. پس از استخراج DNA از نمونه‌های خون و بلوک، جهت تایید سالم بودن DNAهای استخراج شده، قطعه 110bp از ژن بتاگلوبین سلول میزبان مورد تکثیر قرار گرفت و سالم بودن DNA در تمام نمونه‌ها تایید شد.

Nested PCR: مشخصات پرایمرهای آزمون Nested PCR از مقاله مشابه‌ای انتخاب گردید.[۱۰]

اولین دور PCR که در حجم ۵۰µl تنظیم گردید شامل: ۳µl از DNA استخراج شده، ۱/۵mM $Mgcl_2$، ۵µl 10X PCR buffer، ۲U آنزیم Taq و ۲۰pM از هر یک از پرایمرهای مشترک برای دو ژنوتیپ ویروس (E2P1:AGG GAT GCC TGG ACA CAA GAG) و

(E2P2: TGG TGC TGC TGG TGG YGG CAA T) برای تکثیر قطعه ۵۹۶bp از ژن EBNA-2 ویروس، بوده است. مشخصات چرخه‌های حرارتی به‌صورت زیر بوده است: ۹۴^{oc} به‌مدت سه دقیقه، سپس ۴۰ سیکل شامل ۹۴^{oc} به‌مدت ۳۵ ثانیه، ۶۰^{oc} برای ۳۵ ثانیه و ۷۲^{oc} به‌مدت ۴۵ ثانیه. دور دوم PCR با ۵µl از محصول PCR مرحله اول و تحت همان شرایط PCR ولی با پرایمرهای درونی اختصاصی به‌نام‌های Ap1(TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA) و Ap2(ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT) برای تیپ A ویروس و Bp1(CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA) و Bp2(AGA CTT AGT TGA TGC CCT AG) برای تیپ B ویروس در دو تیوب مجزا انجام گردید.

الکتروفورز روی ژل آگارز: ۵µl از محصول PCR در ژل آگارز ۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید. محصول ۴۹۷bp و ۱۵۰bp

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-17]

به‌ترتیب برای تیپ A و B ویروس زیر نور UV مشاهده گردید. ۱۰۰bp DNA size marker به‌عنوان یک سایز مارکر استفاده شد.

برای مقایسات آماری بین نتایج آزمون‌ها بین دو گروه بیمار و کنترل، آزمون Mann Whitney U test به‌کار گرفته و p<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۴۴ فرد بیمار که با آزمون ELISA، Blood PCR و Biopsy PCR مورد بررسی قرار گرفتند به‌ترتیب: ۳۷(٪۸۴/۱)، ۱۲(٪۲۷/۳) و ۶(٪۱۳/۶) دارای نتایج مثبت بودند. همچنین نتایج ELISA و Blood PCR در گروه کنترل به‌ترتیب شامل ۲۱(٪۴۷/۷) و ۷(٪۱۶) نمونه‌های مثبت بوده‌اند. مقایسه نتایج ELISA بین دو گروه بیمار و کنترل ارتباط معنی‌داری را بین این دو داده نشان داد (میانگین ELISA در گروه بیمار ۱۴۶/۹ و در گروه کنترل ۶۳) (p<۰/۰۰۰۱) ولی مقایسه نتایج Blood PCR در بین دو گروه مورد نظر تفاوت معنی‌داری نداشت (p=۰/۳). با گروه‌بندی بیماران مبتلا به لنفوم به دو گروه هوچکینی و غیر هوچکینی، نتایج ELISA، Blood PCR و Biopsy PCR در جدول ۱ نشان داده شده است. بررسی آماری بین نتایج مربوط به بیماران هوچکینی و افراد کنترل نشان داد که تنها نتایج ELISA بین این دو گروه معنی‌دار است (p<۰/۰۰۰۱) (میانگین ELISA در بیماران هوچکینی و کنترل به‌ترتیب: ۱۵۰ و ۵۴)، ولی نتایج Blood PCR تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (p=۰/۲). از آنجایی‌که هم بیماران مورد مطالعه و هم افراد کنترل از لحاظ طیف سنی مشابه بودند، لذا ما در این مطالعه این دو جمعیت را به دو گروه سنی اطفال (زیر ۱۳ سال) و بالغین (بالای ۱۳ سال) تقسیم نموده و نتایج را در دو جمعیت در طیف سنی مشابه مورد بررسی قرار دادیم. مقایسه نتایج ELISA در دو گروه بیمار و کنترل بر حسب سن، فقط در طیف سنی اطفال تفاوت معنی‌دار را دارا بود (p<۰/۰۰۰۱) (میانگین ELISA در اطفال بیمار و اطفال کنترل به‌ترتیب: ۱۳۵ و ۲۴)، به‌علاوه مقایسه نتایج Blood PCR در هر دو طیف سنی اطفال و بالغین بین دو گروه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (اطفال p=۰/۳۸ و بالغین p= ۱).

مقایسه نتایج جمعیت بیمار و کنترل برحسب سن و لنفوم: با تقسیم‌بندی بیماران اطفال بر حسب نوع لنفوم و مقایسه نتایج آزمون‌ها با گروه اطفال جمعیت کنترل، تفاوت معنی‌دار تنها در آزمون ELISA بین اطفال هوچکینی و اطفال کنترل مشاهده شد (میانگین ELISA به‌ترتیب ۱۴۳ و ۲۴ بوده است). در حالی‌که نتایج Blood PCR نه در اطفال و نه در بالغین هوچکینی در مقایسه با اطفال و بالغین کنترل تفاوتی نشان نداد (p= ۱).

مقایسه نتایج به‌دست آمده از بیماران با یکدیگر: مقایسه نتایج بیماران هوچکینی با بیماران غیر هوچکینی در هیچ‌یک از آزمون‌های انجام شده تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (مقادیر به‌دست آمده برای ELISA، Blood PCR و Biopsy PCR به‌ترتیب: ۰/۲۶، ۰/۷۳ و ۰/۶۸). نکته مهم در مورد نتایج biopsy PCR، بروز نتایج مثبت بیشتر در بیماران هوچکینی در قیاس با بیماران غیرهوچکینی بوده است (جدول ۱). با آنالیز آماری بین دو گروه اطفال و بالغین در جمعیت بیماران، هیچ‌یک از آزمون‌ها تفاوت معنی‌داری را در این دو گروه سنی دارا نبودند (pهای به‌دست آمده در مورد ELISA، Blood PCR و biopsy PCR به‌ترتیب:۰/۵، ۰/۱۷ و ۰/۱۸). نکته قابل ذکر در مورد biopsy PCR، بروز نتایج مثبت بیشتر در گروه اطفال در قیاس با بالغین بوده است.

جدول-۱: نتایج آزمون‌ها در گروه بیماران و کنترل بر حسب نوع سن و نوع لنفوم بیماران

متغیر	گروه بیمار				گروه کنترل	
نوع لنفوم	**هوچکین (۲۵(۵۶/۸**)		**غیرهوچکین (۱۹(۴۳/۲**)		–	
تقسیم‌بندی بر حسب سن	**اطفال** (۱۳(٪۲۹/۵)	**بالغین** (۱۲(٪۲۷/۲)	**اطفال** (۱۰(٪۲۲/۷)	**بالغین** (۹(۲۰/۴)	**اطفال** (۳۰(٪۶۸)	**بالغین** (۱۴(٪۳۲)
نتیجه ELISA مثبت	۹(٪۶۹/۲)	۱۲(٪۱۰۰)	۸(٪۸۰)	۸(٪۸۸)	۸(٪۲۶/۷)	۱۳(٪۹۳)
نتیجه Blood PCR مثبت	۱(٪۷)	۵(٪۴۱/۶)	۳(٪۳۰)	۳(٪۳۳)	۲(٪۶/۷)	۵(٪۳۵/۷)
نتیجه Biopsy PCR مثبت	۳(٪۲۳)	۱(٪۸)	۲(٪۲۰)	۰	–	–

* مقادیر به‌صورت فراوانی مطلق و نسبی آمده است

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-17]

بحث

در این مطالعه ما یک آنالیز سرولوژی و ملکولی جهت تعیین وضعیت عفونت با ویروس EBV در خون محیطی و بیوپسی بیماران مبتلا به لنفوم (هوچکین و غیرهوچکین) و همچنین نمونه‌های خون افراد کنترل انجام دادیم. شناسایی موارد مثبت به‌دست آمده به‌وسیله آزمون ELISA در بخش عمده‌ای از بیماران مورد مطالعه دال بر میزان بالای عفونت با این ویروس در جامعه می‌باشد. این نکته ثابت شده است که در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران تا ۹۰٪ از افراد سالم از لحاظ سرمی دارای تیتر آنتی‌بادی بر علیه این ویروس بوده و میزان مثبت بودن سرمی با افزایش سن بالا می‌رود. در مطالعه ما تقریباً تمامی بالغین کنترل (۹۳٪) و بیمار (۹۶٪) در مقایسه با اطفال کنترل (۲۶/۷٪) و بیمار (۷۴٪) آزمون سرولوژی مثبت داشته‌اند. عفونت دوران کودکی احتمالاً از طریق تماس بزاقی با اعضای خانواده و یا سایر کودکان بروز می‌کند، در صورتی‌که بیشترین تغییر سرمی در انتهای دوران بلوغ که همزمان با سنی می‌باشد که در آن تماس‌های اجتماعی جدید ایجاد می‌شود، رخ می‌دهد.[11] شناسایی تفاوت معنی‌دار در نتایج آزمون ELISA بین دو گروه بیمار و کنترل و همچنین بین اطفال کنترل و اطفال هوچکین می‌تواند بر نقش احتمالی این ویروس در اتیولوژی بیماری هوچکین دلالت داشته باشد. این امر توسط مطالعات دیگر نشان داده شده است. نشان داده شده است که در کشورهای در حال توسعه، اکثریت موارد بیماری هوچکین دوران کودکی مرتبط با عفونت EBV بوده، در حالی‌که در کشورهای توسعه‌یافته غربی بیماری هوچکین مرتبط با عفونت EBV در بالغین و افراد مسن رخ می‌دهد.[12] این مطلب تاکید کننده یافته ما از عدم شناسایی ارتباط معنی‌دار بین نتایج ELISA در بالغین هوچکینی و بالغین کنترل می‌باشد، اگرچه میانگین تیتر IgG ضد EBNA-1 ویروس در بالغین هوچکینی به‌طور قابل توجهی بالاتر از گروه کنترل بوده است. عدم شناسایی تفاوت معنی‌دار در میزان موارد PCR مثبت در نمونه‌های خون افراد بیمار و کنترل توسط مطالعات مشابه نشان داده شده است. از آنجایی‌که ما در این مطالعه از لکوسیت‌های خون محیطی برای شناسایی وجود ویروس توسط PCR کیفی استفاده کرده‌ایم و با توجه به این‌که تقریباً بخش عمده‌ای از افراد کنترل و بیمار قبلاً با این ویروس آلوده شده‌اند، لذا به‌دست آوردن چنین نتیجه‌ای دور از انتظار نبوده است. در مطالعه مشابهی با این‌که توسط Gandhi صورت گرفته نشان داده شده است که EBV در "سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی" (PBMC) بیماران بهبود یافته قابل شناسایی بوده و هیچ ارتباطی بین حضور تومور EBV مثبت و وجود DNA آن در PBMC وجود ندارد. همچنین نتیجه‌گیری شده است که EBV DNA در این سلول‌ها نمی‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر برای فعالیت بیماری در بیماران هوچکینی EBV مثبت به‌کار رود.[13] در مطالعه Khan، افزایش بار EBV DNA در سلول‌های PBMC عامل خطری برای بروز لنفوم هوچکین ناشی از این ویروس می‌باشد. بنابراین سطح افزایش یافته EBV DNA می‌تواند به‌دلیل نقص در نظارت سیستم ایمنی باشد که منجر به افزایش سلول‌های غیر نئوپلاستیک آلوده با این ویروس می‌شود.[6] در مطالعه Wagner، بار EBV DNA را در سلول‌های PBMC و پلاسمای افراد سالم و بیماران هوچکینی به‌طریق Real Time PCR مورد ارزیابی قرار داده و نشان داده که بار ویروسی در سلول‌های PBMC بیماران هوچکینی قبل یا بعد از درمان در مقایسه با افراد کنترل هیچ افزایشی نداشته است. نکته مهمی که در این مطالعه نتیجه‌گیری شده این است که بیماران هوچکینی EBV DNA مثبت در پلاسما در قیاس با بیماران EBV DNA منفی در پلاسما، سطح بالاتری از ویروس را در PBMC خود دارا هستند. دلیل این امر نیز این طور ذکر شده که حذف نظارت سیستم ایمنی در بیماران هوچکینی می‌تواند به پرولیفراسیون افزایش یافته‌ای از سلول‌های آلوده با این ویروس و فعال شدن EBV در سلول‌های غیر نئوپلاستیک موجود در خون محیطی منجر گردد. نتیجه این امر بار ویروسی بالا در سلول‌های PBMC بیماران هوچکینی EBV DNA مثبت در پلاسما می‌باشد.[14] بالاتر بودن میزان موارد مثبت در Biopsy PCR در بیماران هوچکینی (۱۶٪) در قیاس با غیر هوچکینی (۱۰/۵٪) در مطالعه ما به‌دلیل کم بودن موارد مثبت تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در مطالعه‌ای که Lacroix با استفاده از Real Time PCR بر روی نمونه‌های بیوپسی غدد لنفاوی بیماران هوچکینی انجام داده است به‌ترتیب ۶۱٪ از کل نمونه‌ها و ۴۱/۷٪ از نمونه‌های اطفال هوچکین دارای PCR مثبت بوده‌اند.[15] علت احتمالی برای این میزان مثبت کم در مطالعه ما را می‌توان به طراحی PCR (PCR کیفی در مقابل Real Time PCR) نسبت داد. در خاتمه از این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که اولاً با توجه به نتایج آزمون ELISA می‌توان نقش ویروس EBV را

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-17]

در اتیولوژی لنفوم هوچکین به‌خصوص در اطفال با اهمیت دانست، ثانیاً آزمون PCR کیفی در نمونه‌های خون نمی‌تواند شاخصی جهت ارزیابی عفونت EBV در بیماران با لنفوم هوچکین باشد. آزمون PCR کمّی اطلاعات دقیق‌تری را از نقش ویروس در ایجاد بیماری و مونیتور کردن درمان فراهم می‌نماید، می‌تواند در نمونه‌های خون و نمونه‌هایی چون پلاسما و بیوپسی انجام و کمک‌کننده باشد.

References

1. Gandhi MK, Tellam JT, Khanna R. Epstein-Barr virus associated Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 2004;125(3):267-81.
2. Meyer RM, Ambinder RF, Stroobants S. Hodgkin's lymphoma: evolving concepts with implications for practice. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004:184-202.
3. Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K, Hamilton-Dutoit S, Frisch M, Zhang JS, et al. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med* 2003;349(14):1324-32.
4. Diepstra A, Niens M, Vellenga E, van Imhoff GW, Nolte IM, Schaapveld M, et al. Association with HLA class I in Epstein-Barr-virus-positive and with HLA class III in Epstein-Barr-virus-negative Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 2005;365(9478):2216-24.
5. Yao QY, Rickinson AB, Epstein MA. A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer* 1985;35(1):35-42.
6. Khan G, Lake A, Shield L, Freeland J, Andrew L, Alexander FE, et al. Phenotype and frequency of Epstein-Barr virus-infected cells in pretreatment blood samples from patients with Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2005;129(4):511-9.
7. Rooney CM, Loftin SK, Holladay MS, Brenner MK, Krance RA, Heslop HE. Early identification of Epstein-Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease. *Br J Haematol* 1995;89(1):98-103.
8. Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, Ambinder RF, Jarrett RF, Brousset P, et al. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer* 1997;70(4):375-82.
9. Lucas KG, Burton RL, Zimmerman SE, Wang J, Cornetta KG, Robertson KA, et al. Semiquantitative Epstein-Barr virus (EBV) polymerase chain reaction for the determination of patients at risk for EBV-induced lymphoproliferative disease after stem cell transplantation. *Blood* 1998;91(10):3654-61.
10. Mohammadi F, Nadji AR, Karimi Sh, Mansoori D, Sharifkashani S, Bahadori M; National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease, Iran. Detection of Epstein-Barr Virus DNA in thymic epithelial tumor using nested PCR. *Tanaffos* 2006;5(4);9-13.
11. Crawford DH. Epstein-Barr virus. In: Zuckerman AJ. Banatvala JE, Pattison JR. editors. Principles and Practice of Clinical Virology. 4th ed. UK: John Wiley and Sons; 2004. p. 131-5.
12. Jarrett RF. Viruses and Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002;13 Suppl 1:23-9.
13. Gandhi MK, Lambley E, Burrows J, Dua U, Elliott S, Shaw PJ, et al. Plasma Epstein-Barr virus (EBV) DNA is a biomarker for EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(2):460-4.
14. Wagner HJ, Schläger F, Claviez A, Bucsky P. Detection of Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood of paediatric patients with Hodgkin's disease by real-time polymerase chain reaction. *Eur J Cancer* 2001;37(15):1853-7.
15. Lacroix A, Jaccard A, Rouzioux C, Piguet C, Petit B, Bordessoule D, et al. HHV-6 and EBV DNA quantitation in lymph nodes of 86 patients with Hodgkin's lymphoma. *J Med Virol* 2007;79(9):1349-56.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-17]

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 11, Feb 2010: 787-792

Detection of Epstein- Barr virus infection in lymphoma: ELISA and PCR method

Pourakbari B.[1]
Mamishi S.[1,2*]
Pajand O.[3]
Nadji SAR.[3]
Mahjob F.[5]
Kochakzadeh L.[1]
Izadyar M.[1]
Parvaneh N.[2]
Saboni F.[1]

1- Department of Infectious Disease, Medical School
2- Pediatric Infectious Diseases Research Center
Tehran University of Medical Sciences
3- Department of Microbiology, Tabriz University of Medical Sciences
4- Lung Disease Research Center, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences
5- Department of Pathology, Medical School, Tehran University of Medical Sciences

[*] Corresponding author: No. 62, Children Medical Center, Dr. Gharib St., Tehran, Iran
Tel: +98-21-66428996
email: smamishi@tums.ac.ir

Received: August 04, 2009 Accepted: November 21, 2009

Abstract

Background: Latent Epstein- Barr virus (EBV) genomes are found in the malignant cells of approximately one-third of Hodgkin's lymphoma (HL) cases. Detection of EBV viral DNA could potentially be used as a biomarker of disease activity. Our goal was to compare of EBV DNA detection in samples obtained from lymphoma patients *versus* controls.
Methods: One milliliter uncoagulated and 1ml coagulated blood sample for DNA extraction and serum analysis using ELISA for IgG anti EBNA-1 were obtained from 44 lymphoma patients and from 44 normal controls, respectively. EBV genome, EBNA-2, was examined from DNA extracts of paraffin embedded and blood samples using Nested PCR with type specific inner primers.
Results: Positive results for ELISA, Blood and biopsy PCR in study group were, 84.1%, 27.3% and 13.6%, respectively. However, these results in control group were 47.7% and 16% for ELISA and Blood PCR assays, respectively. Positive results in ELISA, Blood PCR and Biopsy PCR in Hodgkin and non-Hodgkin patients were found in 21(84%), 6(24%), 4(16%) and 16(84.2%), 6(31.6%), 2(10.5%) of specimens, respectively. No significant differences in EBV detection were found between these two patient groups (p values for ELISA, Blood PCR and Biopsy PCR were 0.26, 0.73 and 0.68, respectively).
Conclusion: Comparison of ELISA and Blood PCR results in children and adult patients with the same age of controls have showed difference in ELISA results of children, only. None of the test results have showed statistically significant difference between Hodgkin and non-Hodgkin patients. However, the mean of ELISA results in Hodgkin patients was higher as compared with controls. Blood PCR assay cannot be recommended as a biomarker of disease activity in EBV positive Hodgkin's lymphoma patients.

Keywords: Lymphoma, Epstein- Barr virus infection, ELISA, PCR.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-17]