Original Article

# Comparison of Qualitative PCR and pp65 Antigenemia for the Diagnosis of CMV Infection in Hematopoietic Stem Cell Transplanted Patients

**Behzad Khansarinejad[1], Hoorieh Soleimanjahi[2*], Amir Ali Hamidieh[3], Siamak Mirab Samiee[4], Mahdi Paryan[5], Yadollah Sanahmadi[6], Soghrat Faghihzadeh[7]**

1- Ph.D. Candidate, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Associated Professor, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Hematology Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Food and Drug Laboratory Research Center, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

5- Ph.D. Candidate, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

6- Ph.D., Day General Hospital Laboratory, Tehran, Iran

7- Professor, Department of Biostatistics, Faculty of medical science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
*Email: soleim_h@modares.ac.ir*

**Received: 25/Dec/2011, Accepted: 10/Mar/2012**

## Abstract

**Objectives:** Human cytomegalovirus (CMV) is a major life-threatening pathogen for hematopoietic stem cell transplant recipients. Specific tests are used for the diagnosis and monitoring of CMV infection in transplant patients. This study evaluates the performance of pp65 antigenemia and qualitative PCR assays for monitoring CMV in such patients.

**Methods:** We analyzed 179 clinical samples from 41 patients by using a validated home-brewed qualitative PCR and a commercial antigenemia assay. The obtained results were evaluated using quantitative real-time PCR as the gold standard.

**Results:** CMV was observed in 26.8% of samples analyzed by the antigenemia assay and in 42.6% of the samples by qualitative PCR. Among 179 clinical samples, 50.8% were negative and 21.2% were positive by both assays. On the other hand, 26.3% were only positive by qualitative PCR whereas 1.7% were positive by the antigenemia assay. A comparison of the results with real-time PCR showed that qualitative PCR has a higher sensitivity than the antigenemia assay (98.7% vs. 45.7%). The specificity of both assays was equal (96.8%). Quantitative results of the antigenemia assay showed good correlation with real-time PCR ($r=0.715$; $p<0.001$).

**Conclusion:** Both the qualitative PCR and antigenemia assays have special deficiencies for efficient diagnosis of CMV infection. Therefore, effective management of CMV infection in transplant patients requires the use of other sensitive quantitative methods such as qPCR.

**Keywords:** Antigenemia, Cytomegalovirus, PCR, pp65, Real-time PCR

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 1, Spring2012, Pages: 13-22

**مقاله اصیل**

# مقایسهٔ روش آنتی‌ژنمی pp65 و PCR کیفی برای تشخیص ویروس سیتومگال در بیماران دریافت کننده پیوند سلول‌های بنیادی خونساز

**بهزاد خوانساری‌نژاد[۱]، حوریه سلیمان‌جاهی[۲*]، امیرعلی حمیدیه[۳]، سیامک میراب‌سمیعی[۴]، مهدی پریان[۵]، یدالله سان‌احمدی[۶]، سقراط فقیه‌زاده[۷]**

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات هماتولوژی-انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- استادیار، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
۵- دانشجوی دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۶- دکتری تخصصی، آزمایشگاه بیمارستان دی، تهران، ایران
۷- استاد، گروه آمار زیستی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی
Email: Soleim_h@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۰۴ پذیرش مقاله: ۹۰/۱۲/۲۰

## چکیده

**هدف:** ویروس سیتومگال انسانی بیماری‌زای اصلی‌ای است که سلامت بیماران دریافت کننده پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز را تهدید می‌کند. برای تشخیص و پایش عفونت ویروس سیتومگال انسانی در دریافت کنندگان پیوند از روش‌های به‌خصوصی استفاده می‌شود. پژوهش حاضر با هدف بررسی کارایی روش‌های آنتی‌ژنمی pp65 و PCR کیفی در پایش ویروس سیتومگال در این بیماران انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۱۷۹ نمونهٔ بالینی از ٤١ بیمار بررسی شد. در این مطالعه از یک PCR کیفی خانگی معتبر شده و از یک روش آنتی‌ژنمی تجاری استفاده شد. در نهایت نتایج به‌دست آمده به وسیلهٔ یک روش Real-time PCR کمّی به عنوان استاندارد طلایی ارزیابی شد.

**نتایج:** عفونت ویروس سیتومگال انسانی در ٢٦/٨ درصد و ٤٢/٦ درصد از بیماران به‌ترتیب براساس روش‌های آنتی‌ژنمی و PCR کیفی مشاهده شد. از مجموع ۱۷۹ نمونه بالینی، ۵۰/۸ درصد به‌وسیلهٔ هر دو روش منفی بود و ۲۱/۲ درصد به‌وسیلهٔ هر دو روش مثبت شد. از سوی دیگر؛ ٢٦/٣ درصد نمونه‌ها منحصراً به‌وسیلهٔ PCR کیفی نتیجه مثبت را نشان داد و ۱/۷ درصد تنها به‌وسیله روش آنتی‌ژنمی، مثبت شد. مقایسه نتایج به‌دست آمده با روش Real-time PCR نشان داد که روش PCR کیفی دارای حساسیت بیشتری نسبت به روش آنتی‌ژنمی است (۹۸/۷ درصد در مقابل ٤٥/٧درصد). با این وجود ویژگی هر دو روش با هم برابر بود (٩٦/٨ درصد). به علاوه نتایج کمّی حاصل از روش آنتی‌ژنمی دارای همبستگی مناسبی با روش Real-time PCR است ($R=۰/۷۱۵$ $P<۰/۰۰۰۱$).

**نتیجه‌گیری:** هر دو روش آنتی‌ژنمی و PCR کیفی دارای نقایصی خاصی در تشخیص مؤثر عفونت ویروس سیتومگال انسانی است. از این‌رو به‌نظر می‌رسد مدیریت مناسب عفونت ویروس سیتومگال انسانی در بیماران پیوندی نیازمند روش‌های حساس کمّی دیگری همچون qPCR است.

**کلیدواژگان:** آنتی‌ژنمی، ویروس سیتومگال، PCR، pp64، Real-time PCR

**مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات: ۱۳-۲۲**

## مقدمه

ویروس سیتومگال انسانی (Human Cytomegalovirus: CMV) یکی از شایع‌ترین بیماری‌زاهایی است که سلامت افراد دارای نقص ایمنی را تهدید می‌کند. شدت عفونت CMV با درجه سرکوب ایمنی سلولی رابطهٔ مستقیم دارد و شدیدترین عفونت در دریافت کنندگان پیوند آلوژن سلول‌های بنیادی خون‌ساز (Hematopoietic Stem Cell Transplantation: HSCT) و بیماران مبتلا به ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrom: AIDS) با تعداد سلول‌های $T_{CD4+}$ پایین رخ می‌دهد. به علاوه بیماری CMV در دریافت کنندگان پیوند بافت جامد (Solid Organ Transplantation: SOT)، بیماران سرطانی دریافت کننده شیمی‌درمانی و بیماران دارای نقص ایمنی مادرزادی، به‌طور قابل توجهی دیده می‌شود [۱]. در حدود سه دهه گذشته تقریباً ۲۵ درصد از پیوندهای بافت جامد آلوژن با بیماری CMV همراه بوده که میزان مرگ و میری حدود ۸۵ درصد داشته است. امروزه با وجود پیشرفت‌های قابل توجهی که در زمینه بهبود روش‌های مربوط به پیوند و کنترل عفونت ویروسی صورت گرفته، میزان بیماری CMV در دریافت کنندگان آلوژن سلول‌های خون‌ساز نسبت به گذشته کاهش یافته است [۲]، اما همچنان CMV به عنوان اصلی‌ترین عامل عفونی فرصت‌طلب، زندگی دریافت کنندگان پیوند را تهدید می‌کند و باید در هر پیوندی مورد توجه قرار گیرد [۳، ٤].

چگونگی تشخیص آزمایشگاهی CMV بسته به نوع بیماری و وضعیت بیماران متفاوت است. در افراد دریافت کننده پیوند روش‌های آزمایشگاهی به‌خصوصی برای تشخیص و کنترل این ویروس وجود دارد. کشت CMV فرایندی سخت و زمان‌بر است و ممکن است ده روز و گاهی بیش از ۲ هفته برای شناسایی آثار تخریب سلولی ناشی از ویروس نیاز باشد. به علاوه جداسازی ویروس به‌وسیله کشت فاقد ارزش تشخیصی برای پیگیری بیماران پیوندی است چرا که معمولاً این بیماران به علت دریافت داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی، CMV را با مقدار متفاوتی در ترشحات خود دفع می‌کنند [۵]. روش‌های سرولوژیک نیز برای پیگیری و تشخیص عود مجدد و عفونت CMV در بیماران پیوندی مفید نیست زیرا به‌علت عود نسبی ویروس در اثر سرکوب سیستم ایمنی، آنتی‌بادی ضد CMV همواره در خون افرد شناسایی می‌شود. در واقع کاربرد روش‌های سرولوژیک در مرحلهٔ پیش از پیوند و برای پی‌بردن به وجود آنتی‌بادی ضد CMV در افراد دهنده و گیرنده پیوند و نیز فرآورده‌های خونی مفید است [٦]. روش آنتی‌ژنمی pp65 (pp65 Antigenemia) و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در تشخیص و پایش عفونت CMV در افراد دارای نقص ایمنی، از بیشترین مقبولیت برخوردار هستند. برای بیش از یک دهه آزمون آنتی‌ژنمی pp65 پر استفاده‌ترین روش برای تعیین کمّیت CMV در خون بود. در این روش از آنتی‌بادی مونوکلونال برای شناسایی پروتئین pp65 تگومنت CMV در لکوسیت‌های خون محیطی (Peripheral Blood Lymphocyte: PBL) به‌وسیله رنگ‌آمیزی ایمنی با روش ایمنوفلوئورسانس استفاده می‌شود [۷، ۸]. با وجود این‌که می‌توان از روش آنتی‌ژنمی به‌صوررت کمّی استفاده نمود و اگرچه این روش نسبتاً آسان و ارزان قیمت است و تجارب گسترده موجود نشان می‌دهد که می‌توان از آن برای شناسایی بیماران دارای خطر بیماری CMV با درستی قابل قبولی استفاده کرد، این روش معایبی نیز دارد که در برخی از موارد کاربرد آن را با مشکل مواجه کرده است [۹، ۱۰] که مهم‌ترین این معایب عبارت است از: شناسایی سلول‌های مثبت از فردی به فرد دیگر متفاوت بوده و وابسته به تجربه آزمایش‌گر است، این روش قابل خودکار شدن نبوده و از این‌رو برای بررسی‌های انبوه مناسب نیست، پس از جمع‌آوری نمونه بیمار، در زمان کوتاهی (حدود ٦-۷ ساعت) باید این آزمایش انجام شود.

امروزه استفاده از روش‌های مولکولی همچون PCR کاربرد بسیاری در تشخیص و پایش عفونت CMV در بیماران پیوندی دارد. نتایج بسیاری با استفاده از روش‌های مولکولی

مختلف برای شناسایی CMV در خون افراد پیوندی به‌دست آمده است و تحقیقات زیادی روش‌های مولکولی مختلف را با روش pp65 مقایسه کرده‌اند [۱۱-۱۵]. روش‌های مولکولی در دو شکل کیفی و کمّی در فرایند پایش CMV در بیماران پیوندی استفاده می‌شود. روش PCR کیفی قادر است با سرعت، دقت، حساسیت و ویژگی نسبتاً زیادی ویروس CMV را در خون بیماران تشخیص دهد. البته هرچند این روش بسیار حساس است، ولی لازم به ذکر است که ارتباط یک نتیجه کمّی با ایجاد بیماری CMV مهم‌تر از حساسیت مطلق برای شناسایی ویروس است. از این‌رو روش‌های مولکولی کمّی امکان ارتباط بین میزان ویروس در خون بیمار و پیشرفت به سمت بیماری را فراهم می‌سازد. در این میان روش Real-time PCR کمّی (quantitative PCR: qPCR) بسیار مورد توجه قرار گرفته است و از آن‌جایی که این روش فاقد معایب ذکر شده در روش آنتی‌ژنمی است، امروزه در بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی در کشورهای توسعه یافته، استفاده از روش qPCR برای تعیین کمیت CMV جایگزین روش آنتی‌ژنمی pp65 شده است [۱۰]. با این‌حال اصلی‌ترین مشکل روش qPCR هزینهٔ زیادتر آن نسبت به روش آنتی‌ژنمی است و از آن‌جایی که بیماران پیوندی نیازمند دفعات زیاد آزمون کمّی برای پایش ویروس سیتومگال هستند، هزینهٔ نهایی تمام شده در روش qPCR نسبت به روش آنتی‌ژنمی به‌طور قابل توجهی بیشتر خواهد شد. این مشکل اصلی‌ترین مانع برای کاربرد متداول روش qPCR در پایش عفونت CMV در مراکز پیوند بسیاری از کشورهای جهان، از جمله کشور ما، ایران محسوب می‌شود و مراکز پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز در کشور به‌طور معمول از روش‌های آنتی‌ژنمی یا PCR کیفی (یا دستورالعمل ترکیبی از هر دو روش) برای پایش متداول ویروس CMV در دریافت کنندگان پیوند آلوژن استفاده می‌کنند.

از این‌رو هدف پژوهش حاضر مقایسهٔ روش‌های آنتی‌ژنمی pp65 و روش PCR روی نمونه‌های بالینی بیماران دریافت کننده پیوند آلوژن سلول‌های بنیادی خون‌ساز است. به منظور بررسی درستی نتایج به‌دست آمده به‌وسیلهٔ این دو روش، از آزمون qPCR به عنوان روش استاندارد استفاده شده است.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌ها

تعداد ۱۷۹ نمونه از ٤١ بیمار دریافت کننده پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز تهیه شد (٢٦ مذکر و ١٥ مؤنث). نمونه‌های خون واجد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) از آذر ماه ۱۳۸۸ تا فروردین ۱۳۸۹ از بخش هماتولوژی-انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی برای پایش متداول CMV به آزمایشگاه بیمارستان دی تهران فرستاده شدند. سایر آزمایش‌های ارایه شده در این مطالعه روی بقایای نمونه‌های بیماران و بدون درخواست نمونه بیشتر صورت گرفت. بدین‌صورت که در زمان تهیه نمونه در روش آنتی‌ژنمی، نمونه پلاسمای باقیمانده بیماران برای استخراج DNA و انجام آزمون‌های مولکولی استفاده شد. پژوهش حاضر با کسب مجوز رسمی کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

### آزمون آنتی‌ژنمی pp65

آزمون آنتی‌ژنمی با استفاده از کیت تجاری CMV Brite Turbo kit (IQ Corporation, The Netherlands) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به‌طور خلاصه، پس از لیز گلبول‌های قرمز بیمار تعداد ۲۰۰۰۰۰ عدد از لکوسیت‌های خون محیطی روی اسلایدهای میکروسکوپی سایتوسانتریفوژ (Cytocentrifugation) شدند (با دور ۵۰۰g به‌مدت ٤ دقیقه). پس از مرحلهٔ نفوذ پذیر کردن، سلول‌ها به‌وسیلهٔ مخلوط آنتی‌بادی‌های C۱۱/C۱۰ موجود در کیت انکوبه شدند و در نهایت از آنتی‌بادی فلوئورسانس ثانویه و میکروسکوپ فلوئورسانس برای تشخیص سلول‌های مثبت استفاده شد. لازم به ذکر است که هر نمونه به‌صورت دوتایی بررسی شد و در صورت مثبت بودن، میانگین تعداد سلول‌های مثبت در دو اسلاید ثبت شد.

## استخراج ژنوم

به منظور استخراج DNA، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از نمونهٔ پلاسمای هر بیمار با استفاده از کیت QIAamp DNA mini Kit (Qiagen، آلمان) و براساس دستور العمل شرکت سازنده تخلیص شد. در نهایت DNA استخراج شده در حجم ۵۰ میکرولیتر از بافر ایلوشن (Elution Buffer) کیت حل شد.

## آزمون PCR کیفی

برای طراحی آغازگرهایی که قادر به شناسایی سویه‌های مختلف CMV باشد، از توالی ژن UL۸۳ این ویروس استفاده شد. بدین‌صورت که توالی‌تمامی گزارش‌های موجود این ژن از پایگاه نوکلئوتیدی NCBI (National Center for Biotechnology Information) به‌دست آمد و سپس مراحل هم‌ردیفی چندگانه و طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار AlleleID نسخه ۷ صورت گرفت. آغازگرهای طراحی شده یک قطعه ۲۰۵ نوکلئوتیدی از ژن مذکور را تکثیر می‌کند. توالی آغازگر سنس (Sense Primer) 5`-TACTGGCTGGTGAAGGTG-3` است که این آغازگر به نواحی ۵۶۹ تا ۵۸۶ از توالی ژن UL83 (توالی مرجع NC_006273.2) متصل می‌شود و توالی آغازگر آنتی‌سنس (Antisense Primer) 5`-TGTGTCCCAAGAGCATCC-3` است که به ناحیه ۷۵۶ تا ۷۷۳ متصل می‌شود.

پس از بهینه‌سازی اجزای واکنش، آزمون PCR کیفی در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد و شامل اجزای زیر بود:

۵ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (Qiagen, Germany)، ۰/۳ میکرومول از هریک از آغازگرها، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۲۰۰ میکرومول از مخلوط نوکلئوتیدها، یک واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq (Qiagen) و ۱۰۰ نانوگرم آلبومین سرم گاوی. دستورالعمل دمایی تکثیر شامل واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤ دقیقه و به‌دنبال آن ٤۰ چرخهٔ سه مرحله‌ای شامل واسرشت شدن در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه و طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه بود. در نهایت محصولات واکنش روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) (در غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) ارزیابی شد.

## آزمون Real-time PCR کمّی

آزمون qPCR در دستگاه Rotor-Gene ۳۰۰۰ و به‌وسیلهٔ کیت تجاری artus® CMV RG PCR، براساس دستور العمل شرکت سازنده انجام شد.

## تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل رگرسیون خطی با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Chicago ،SPSS Inc) نسخه ۱٦ انجام شد. حساسیت و ویژگی بالینی با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد.

$$\text{حساسیت} = \frac{\text{تعداد پاسخ‌های مثبت حقیقی}}{\text{تعداد پاسخ‌های مثبت حقیقی + تعداد منفی‌های کاذب}}$$

$$\text{ویژگی} = \frac{\text{تعداد پاسخ‌های منفی حقیقی}}{\text{تعداد پاسخ‌های منفی حقیقی + تعداد مثبت‌های کاذب}}$$

# نتایج

## حساسیت و ویژگی آنالیتیک PCR کیفی

برای تعیین ویژگی آنالیتیک روش تشخیصی، علاوه بر بررسی درستی اتصال اختصاصی آغازگرها به الگوی مورد نظر در پایگاه NCBI nucleotide BLAST، از یک گروه نمونه ویروسی (پنل) حاوی ژنوم برخی از ویروس‌های بالقوه مداخله کننده شامل ویروس‌های هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و ۲ (Herpes SimplexVirus Type 1 and 2)، اپیستن بار (Epstein Barr Virus)، آبله مرغان-زونا، هرپس‌های انسانی تیپ ٦، ۷، و ۸، هپاتیت B، هپاتیت C، HIV (Human Immunodeficiency Virus)، HTLV (Human T-lymphotropic virus)، آدنو ویروس (Adenovirus)، ویروس‌های BK و JC و پاروو ویروس B19 (Parvovirus B19) استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که آغازگرهای طراحی شده با هیچ‌یک از عوامل مذکور واکنش متقاطع نشان نمی‌دهد و PCR کیفی طراحی شده تنها ژنوم CMV را تکثیر می‌کند.

برای تعیین حساسیت آنالیتیک روش PCR کیفی از یک نمونه تجاری حاوی DNA ویروس سیتومگال که تعداد کپی‌های ویروس در آن مشخص بود، استفاده شد (Vircell، اسپانیا). با استفاده از این نمونه‌رقت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، و ۵۰ کپی در میلی‌لیتر تهیه شد. از هر رقت ۹ تکرار به‌وسیلهٔ روش PCR کیفی بررسی شد تا پایین‌ترین رقت قابل اندازه‌گیری از نمونه‌ها توسط روش راه‌اندازی شده تعیین شود (جدول ۱). پس از بررسی نتایج حاصل، حساسیت آنالیتیک روش معادل ۲۵۰ کپی در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

**جدول ۱** تعیین حساست آنالیتیک روش PCR کیفی

| غلظت (کپی در میلی‌لیتر) | تعداد موارد مثبت |
|---|---|
| ۱۰۰۰ | ۹/۹ |
| ۵۰۰ | ۹/۹ |
| ۲۵۰ | ۹/۹ |
| ۱۰۰ | ٤/۹ |
| ۵۰ | ۱/۹ |

## مقایسه روش آنتی‌ژنمی pp65 و PCR کیفی

طی این بررسی ۱۱ (۲٦/۸ درصد) بیمار براساس روش آنتی‌ژنمی و ۲٦ (٤۲/٦ درصد) بیمار به‌وسیلهٔ روش PCR دست کم یک‌بار عفونت CMV را نشان دادند. نتایج ۱۷۹ نمونهٔ بررسی شده در چهار گروه طبقه‌بندی شد: گروه اول شامل ۳۸ نمونه (۲۱/۲ درصد) که به‌وسیلهٔ هر دو روش مثبت بود، گروه دوم شامل ٤۷ نمونه (۲٦/۳ درصد) که منحصراً به‌وسیلهٔ PCR کیفی مثبت بود، گروه سوم دارای ۳ نمونه (۱/۷ درصد) که تنها به‌وسیله روش آنتی‌ژنمی مثبت شد و در نهایت گروه چهارم شامل ۹۱ نمونه (۵۰/۸ درصد) که به‌وسیلهٔ هر دو روش منفی بود. به منظور تعیین درستی نتایج به‌دست آمده، تمامی نمونه‌ها با استفاده از روش qPCR نیز مورد ارزیابی کمّی قرار گرفت. بر این اساس هر ۳۸ نمونهٔ گروه اول به‌وسیلهٔ qPCR نیز مثبت شد و میانگین تعداد کپی‌های DNA ویروس سیتومگال در این گروه ۲۰۸۸ کپی در میلی‌لیتر بود (دامنهٔ ۱۵۰ تا ۳۱۹۱۰۰ کپی در میلی‌لیتر). در مقابل تنها در ٤٤ نمونه از ٤۷ نمونهٔ گروه دوم نتیجهٔ مثبت qPCR به‌دست آمد و متوسط تعداد کپی‌های DNA ویروسی سیتومگال در این گروه ۷۱٤ کپی در میلی‌لیتر بود (از دامنهٔ ۱٤ تا ۱۱۸۳۵ کپی در میلی‌لیتر) که این عدد در مقایسه با میانگین گروه اول بسیار کمتر بود. در نمونه‌های‌گروه سوم که هر یک دارای یک سلول pp65 مثبت بود، مانند نتایج حاصل از PCR کیفی، نتایج qPCR نیز منفی بود و از ۹۱ نمونهٔ گروه چهارم ۹۰ نمونه منفی و تنها یک نمونه مثبت شد که بار آن ۱۳٤ کپی در میلی‌لیتر بود. بر این اساس اگر روش qPCR به عنوان استاندارد طلایی (Gold Standard) در نظر گرفته شود، حساسیت و ویژگی بالینی روش PCR کیفی را می‌توان به‌ترتیب معادل ۹۸/۷ و ۹٦/۸ درصد در نظر گرفت؛ در حالی‌که این شاخص‌ها در آزمون آنتی‌ژنمی pp65 به‌ترتیب معادل ٤۵/۷ و ۹٦/۸ درصد بود (جداول ۲ و ۳).

بررسی پرونده درمانی بیماران مشخص نمود که بیماری علامت‌دار CMV که نیازمند درمان به‌وسیلهٔ گانسیکلوویر

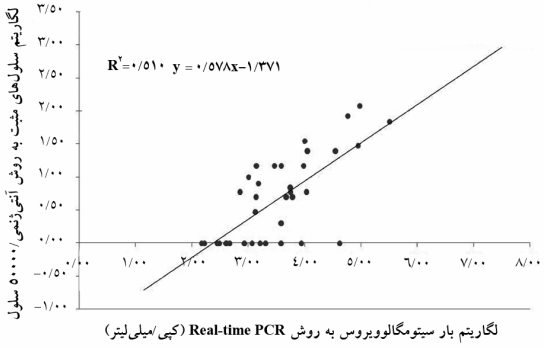
(Ganciclovir) باشد، در ۹ بیمار رخ داده است. ارزیابی‌های انجام شده نشان داد که در دورهٔ پیش از درمان این بیماران، ۷ بیمار دارای نتیجه مثبت آنتی‌ژنمی و PCR بودند (متعلق به گروه اول) و میانگین تعداد سلول‌های مثبت در دوره پیش از بروز بیماری ۱۸ عدد بود (بین ۳ تا ۷۱ سلول مثبت). در مقابل در ۲ بیمار دیگر تنها نتیجه PCR مثبت شده بود (گروه دوم). به علاوه مشخص شد که یکی از این دو بیمار در دورهٔ پایش مربوط دارای لکوپنی (Leukopenia) بوده و از این‌رو امکان تشخیص مناسب عفونت CMV با روش آنتی‌ژنمی وجود نداشته است.

**جدول ۲** نتایج حاصل از مقایسه روش آنتی‌ژنمی pp65 و qPCR

| | | qPCR | |
|---|---|---|---|
| | | + | − |
| آنتی‌ژنمی | + | ۳۸ | ۳ |
| | − | ٤٥ | ۹۳ |

**جدول ۳** نتایج حاصل از مقایسه PCR کیفی و qPCR

| | | qPCR | |
|---|---|---|---|
| | | + | − |
| PCR | + | ۸۲ | ۳ |
| | − | ۱ | ۹۳ |




**نمودار ۱** همبستگی نتایج کمیت سنجی CMV با روش‌های آنتی‌ژنمی pp65 و qPCR؛ منحنی خطی لگاریتم غلظت DNA بر حسب کپی در میلی‌لیتر بر علیه لگاریتم تعداد سلول‌های آنتی‌ژنمی مثبت محاسبه شده است. مقادیر ضریب تعیین و معادلهٔ رگرسیون در قسمت بالا و سمت چپ نمودار مشخص شده است.

## بررسی همبستگی روش آنتی‌ژنمی pp65 و qPCR

برای مقایسه نتایج کمّی حاصل از روش آنتی‌ژنمی و روش qPCR از تجزیه و تحلیل رگرسیون خطی استفاده شد. همان‌گونه که در نمودار ۱ نشان داده شده است، نتایج حاصل از این دو آزمون به‌طور معنی‌داری دارای همبستگی مثبت است ($R = ۰/۷۱۵$ $P < ۰/۰۰۰۱$).

## بحث

از آن‌جایی که امروزه اصلی‌ترین استراتژی درمانی CMV در بیماران دریافت کننده پیوند براساس پایش و درمان پیش‌دستانه (Preemptive Therapy) است [۱٦–۱۸]، وجود آزمون‌های تشخیصی حساس و کارا نقش بسیار مهمی در کنترل این ویروس ایفا می‌کند. در پژوهش حاضر به مقایسه کارایی دو روش آنتی‌ژنمی pp65 و PCR کیفی به عنوان روش‌های اصلی پایش عفونت CMV در بیماران پیوندی ایران پرداخته شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که روش PCR کیفی نسبت به روش آنتی‌ژنمی pp65 حساسیت آنالیتیک و بالینی بیشتری دارد و قادر است مقادیر اندکی از CMV فعال شده را تشخیص دهد. با این وجود در بسیاری از موارد بیماری که تنها پاسخ PCR کیفی مثبت بوده (گروه دوم) هیچ‌گاه عوارض علامت‌دار عفونت CMV رخ نداده و سیستم ایمنی بدن خود بیمار قادر به پاک‌سازی ویروس بدون نیاز به درمان بوده است. بنابراین در پژوهش حاضر نیز مشخص شد که مشکل عمدهٔ روش PCR کیفی عدم ارایه نتایج مرتبط با بار ویروسی (Viral Load) و برقراری یک ارتباط کمّی با شدت بیماری است. در مقابل روش آنتی‌ژنمی pp65 اگرچه دارای حساسیت کمتری از روش PCR کیفی مورد استفاده است ولی دارای ویژگی یکسان با این روش است. همچنین روش آنتی‌ژنمی قادر به ارایه ارتباط بین تعداد سلول‌های مثبت و شدت بیماری CMV است. همان‌گونه که در قسمت نتایج نیز عنوان شد، در ۷ مورد از ۹ مورد (۷۷/۷ درصد) علامت‌دار بیماری پاسخ آنتی‌ژنمی قبل از بروز بیماری مثبت بوده است و در ۲۲/۲ درصد موارد پاسخ قبل از بروز بیماری CMV

منفی بوده است. بنابراین اگرچه روش آنتی‌ژنمی انجام شده توسط افراد مجرب در اغلب موارد قادر است بیماران دارای خطر ابتلا به عفونت CMV را تشخیص دهد ولی در برخی از مواقع و به‌خصوص زمانی که بیمار دچار لکوپنی است، قادر به تشخیص عفونت CMV نیست. البته چنین مشکلی می‌تواند بیمار را با خطرات جدی مواجه کند چرا که معمولاً پزشکان پس از مشاهدهٔ نتیجهٔ آزمون آنتی‌ژنمی pp65، اقدام به درمان بیماران پیوندی می‌کنند.

براساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر با وجود همبستگی با روش آنتی‌ژنمی pp65، روش qPCR قادر است با حساسیت و ویژگی بالاتری یک رابطه کمّی از شدت فعال شدن ویروس CMV ارایه دهد که این یافته کاملاً مطابق بر یافته‌های مطالعات دیگر در این زمینه است [۱۰، ۱۷، ۱۹-۲۱]. از سوی دیگر؛ در مواقعی که بیمار دچار لکوپنی است، آزمون آنتی‌ژنمی فاقد کارایی مناسب است و تنها روش qPCR قادر به ارایه نتایج کمّی است. با این‌حال همچنان هزینهٔ بالای روش qPCR در تشخیص و پایش بیماران پیوندی امکان استفاده متداول از آن را در مدیریت ویروس CMV در کشور با مشکل مواجه می‌کند و به‌نظر می‌رسد با جایگزینی روش‌های qPCR خانگی (In-house) معتبر شده به‌طور قابل ملاحظه‌ای از هزینه‌های این روش کاسته شود.

در نتیجه یافته‌های بررسی حاضر نشان می‌دهد که روش‌های آنتی‌ژنمی pp65 و PCR کیفی به‌ترتیب به علت حساسیت پایین و عدم توانایی کمیت سنجی، دارای نقایصی در تشخیص مؤثر عفونت CMV در بیماران پیوندی است. از این‌رو بهتر است که حتی در صورت عدم امکان پایش متداول عفونت CMV به‌وسیلهٔ روش qPCR، دست کم در موارد مبهم بالینی، مانند بیماران دارای لکوپنی و بیماران علامت‌دار که دارای نتیجه منفی آزمون آنتی‌ژنمی هستند، از روش qPCR برای تشخیص عفونت CMV استفاده شود.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله مراتب قدردانی خود را از تمامی پرسنل مرکز هماتولوژی- انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی تهران به‌ویژه خانم اشرف‌السادات حسینی و نیز پرسنل آزمایشگاه بیمارستان دی اعلام می‌داریم. تحقیق حاضر براساس رساله دکتری رشته ویروس‌شناسی و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

## منابع

[1] Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. Med Microbiol Immunol 2008; 197(2): 65-73.

[2] Ljungman P. Cytomegalovirus infections in transplant patients. Scand J Infect Dis Suppl 1996; 100: 59-63.

[3] Falagas ME, Arbo M, Ruthazer R, Griffith JL, Werner BG, Rohrer R, Freeman R, Lewis WD, Snydman DR. Cytomegalovirus disease is associated with increased cost and hospital length of stay among orthotopic liver transplant recipients. Transplantation 1997; 63(11): 1595-601.

[4] Legendre CM, Norman DJ, Keating MR, Maclaine GD, Grant DM. Valaciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in renal transplantation: an economic evaluation. Transplantation 2000; 70(10): 1463-8.

[5] Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens

by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. J Clin Microbiol 1984; 19(6): 917-9.

[6] Mocarski ES, Shenk T, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM ,Griffin DE, editors. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007; p: 2701-72.

[7] Boeckh M, Bowden RA, Goodrich JM, Pettinger M, Meyers JD. Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. Blood 1992; 80(5): 1358-64.

[8] The TH, van der Bij W, van den Berg AP, van der Giessen M, Weits J, Sprenger HG, van Son WJ. Cytomegalovirus antigenemia. Rev Infect Dis 1990; 12 Suppl 7: S734-44.

[9] Bordils A, Plumed JS, Ramos D, Beneyto I, Mascarós V, Molina JM, Cordoba J, García J, Crúz JM. Comparison of quantitative PCR and antigenemia in cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. Transplant Proc 2005; 37(9): 3756-9.

[10] Sanghavi SK, Abu-Elmagd K, Keightley MC, St George K, Lewandowski K, Boes SS, Bullotta A, Dare R, Lassak M, Husain S, Kwak EJ, Paterson DL, Rinaldo CR. Relationship of cytomegalovirus load assessed by real-time PCR to pp65 antigenemia in organ transplant recipients. J Clin Virol 2008; 42(4): 335-42.

[11] Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. Clin Microbiol Rev 1998; 11(3): 533-54.

[12] Gerna G, Lilleri D, Baldanti F, Torsellini M, Giorgiani G, Zecca M, De Stefano P, Middeldorp J, Locatelli F, Revello MG. Human cytomegalovirus immediate-early mRNAemia versus pp65 antigenemia for guiding pre-emptive therapy in children and young adults undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective, randomized, open-label trial. Blood 2003; 101(12): 5053-60.

[13] Hebart H, Wuchter P, Loeffler J, Gscheidle B, Hamprecht K, Sinzger C, Jahn G, Dietz K, Kanz L, Einsele H. Evaluation of the Murex CMV DNA Hybrid Capture assay (version 2.0) for early diagnosis of cytomegalovirus infection in recipients of an allogeneic stem cell transplant. Bone Marrow Transplant 2001; 28(2): 213-8.

[14] Lilleri D, Baldanti F, Gatti M, Rovida F, Dossena L, De Grazia S, Torsellini M, Gerna G. Clinically-based determination of safe DNAemia cutoff levels for preemptive therapy or human cytomegalovirus infections in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. J Med Virol 2004; 73(3): 412-8.

[15] Limaye AP, Bakthavatsalam R, Kim HW, Kuhr CS, Halldorson JB, Healey PJ, Boeckh M. Late-onset cytomegalovirus disease in liver transplant recipients despite antiviral prophylaxis. Transplantation 2004; 78(9): 1390-6.

[16] Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. Blood 2009; 113(23): 5711-9.

[17] Kalpoe JS, Kroes AC, de Jong MD, Schinkel J, de Brouwer CS, Beersma MF, Claas EC. 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(4): 1498-504.

[18] Lilleri D, Gerna G, Furione M, Bernardo ME, Giorgiani G, Telli S, Baldanti F, Locatelli F. Use of a DNAemia cut-off for monitoring human cytomegalovirus infection reduces the number of preemptively treated children and young adults receiving hematopoietic stem-cell transplantation compared with qualitative pp65 antigenemia. Blood 2007; 110(7): 2757-60.

[19] Boeckh M, Huang M, Ferrenberg J, Stevens-Ayers T, Stensland L, Nichols WG, Corey L. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. J Clin Microbiol 2004; 42(3): 1142-8.

[20] Ghaffari SH, Obeidi N, Dehghan M, Alimoghaddam K, Gharehbaghian A, Ghavamzadeh A. Monitoring of cytomegalovirus reactivation in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. Pathol Oncol Res 2008; 14(4): 399-409.

[21] Deback C, Fillet AM, Dhedin N, Barrou B, Varnous S, Najioullah F, Bricaire F, Agut H. Monitoring of human cytomegalovirus infection in immunosuppressed patients using real-time PCR on whole blood. J Clin Virol 2007; 40(3): 173-9.