

شیوع ویروس سیتومگال در اهداکنندگان خون ایران با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

دکتر صدیقه امینی کافی آباد^{۱*}، فهیمه رنجبر کرمانی^۱، فرشته فردوسیان^۱، مریم سبحانی^۱، شهرام سمیعی^۱

۱- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

* نویسنده مسؤول: تهران، بزرگراه همت، سازمان انتقال خون ایران، کدپستی ۱۴۴۹۶۱۳۱۱۱ تلفن و نمابر: ۸۸۶۰۱۵۸۵
پست الکترونیک: dr.amini@gmail.com , s-amini@cc.sbu.ac.ir

دریافت: ۸۸/۵/۲۸ پذیرش: ۸۸/۸/۱۶

چکیده

مقدمه: ویروس سیتومگال یکی از مهم‌ترین ویروس‌های منتقله از راه خون است که می‌تواند سبب عوارض شدید و حتی کشنده در نوزادان با وزن کم، بیماران دارای مشکلات در سیستم ایمنی و گیرندگان پیوند شود. استفاده از روش‌های کاهش لکوسیت در محصولات خون و غربالگری Anti-CMV بروز عفونت در گیرندگان فرآورده‌های خون را کاهش داده اما همچنان مواردی از انتقال عفونت به گیرندگان خون گزارش می‌شود. هدف از این مطالعه ارزیابی شیوع CMV DNA در اهداکنندگان خون است.

روش کار: نمونه‌های ۴۵۰ اهداکننده خون با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای CMV DNA آزمایش شدند. حساسیت آزمایش ۱۰۰۰ Copies/ml و کیت مورد استفاده کاملاً اختصاصی برای CMV DNA بود. کلیه نمونه‌های CMV DNA مثبت برای CMV-IgM و CMV-IgG ارزیابی شدند.

یافته‌ها: ۵ نمونه (۱/۱٪) از ۴۵۰ نمونه، CMV DNA مثبت بودند. (۸۷٪) ۳۹۰ اهداکننده مذکر و (۶۰٪) ۲۷۲ آنان مستمر بودند. ۵ نمونه مثبت CMV-IgG مثبت و CMV-IgM منفی بودند.

نتیجه‌گیری: برای ارزیابی اثربخشی آزمایشات مولکولی برای جلوگیری از انتقال CMV به گیرندگان خون مطالعات بیشتری لازم است. مهم‌ترین عوامل در اتخاذ تصمیم برای غربالگری CMV DNA عبارتند از حساسیت کیت که مناسب برای شناسایی CMV در فرآورده‌های خون باشد و تعیین کمترین تعداد ویروس که می‌تواند سبب انتقال عفونت در گیرندگان خون شود.

کلواژگان: ویروس سیتومگال، CMV DNA، اهداکنندگان خون، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

مقدمه

عفونت می‌تواند در بیماران CMV منفی، بیماران با سرکوب سیستم ایمنی و یا عدم بلوغ سیستم ایمنی، نوزادان نارس با وزن کمتر از ۱۲۵۰ گرم متولد از مادران CMV-Ab منفی و یا دریافت‌کنندگان پیوند مغز استخوان رخ دهد و منجر به عوارض خطرناک و حتی مرگ و میر گردد (۷ و ۸). در مطالعه یاگر و همکارانش ۷۴-۱۰٪ نوزادان CMV منفی که واحدهای خون CMV مثبت دریافت نموده بودند مبتلا به CMV شده و برخی از نوزادان مبتلا به عوارض کشنده عفونت شدند (۹). یافته‌های بالینی و تجربی بر انتقال عفونت یا فعال شدن آن با تزریق لکوسیت‌های (تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای) حاوی ویروس رخ می‌دهد و عدم انتقال عفونت در تزریق پلاسمای منجمد (۱۰) و

ویروس سیتومگال^۱، از نظر اندازه بزرگ‌ترین ویروسی است که انسان را آلوده می‌کند و می‌تواند از طریق تزریق خون و فرآورده‌های آن، پیوند مغز استخوان و بافت‌های توپر منتقل شود (۳-۱)، بنابراین استفاده از واحدهای خون CMV-Ab منفی یا واحدهایی که تعداد لکوسیت آنها با استفاده از فیلتر کاهش یافته جهت جلوگیری از انتقال عفونت در گیرندگان خون به کار گرفته شده است (۴ و ۵). احتمال انتقال عفونت با مصرف واحدهای خون CMV-Ab منفی ۱٪ و پس از تزریق واحدهایی که لکوسیت آنها کاهش یافته ۱/۲٪ گزارش شده است (۶). پس از دریافت خون و بافت پیوندی از اهداکنندگان CMV مثبت،

^۱ Cytomegalovirus

CMV DNA مثبت بودند از نظر وجود CMV-IgM و CMV-IgG با کیت تجاری طبق دستورالعمل کیت بررسی شدند.

تهیه و نگهداری نمونه: در این مطالعه مقطعی خون تام از ۴۵۰ اهداکننده خون با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده در مرکز ثابت خون‌گیری مستقر در میدان امام حسین (ع) در تهران در لوله‌های دارای EDTA جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها بلافاصله به دمای 8°C -۲ منتقل شد و حداکثر طی ۶ ساعت پس از سانتریفیوژ، پلاسماي آن در میکروتیوب‌های ۱/۵ ml تقسیم و در دمای 70°C - تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شدند. نمونه‌های مورد مطالعه در آزمایشات غربالگری از نظر Anti-HIV, Anti-HCV, HBsAg و RPR منفی بودند.

استخراج و تخلیص: برای استخراج DNA ژنوم ویروس سیتومگال از ۲۰۰ لاند پلاسما و کیت تخلیص اسید نوکلئیک ویروس^۴ با شماره کاتالوگ ۰۰۱ ۸۷۴ ۸۵۸ ۱۱ از محصولات کمپانی رش^۵ استفاده شد. مراحل استخراج مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. در این کیت از پروتئیناز K و فیلتر برای استخراج DNA استفاده شد. حجم نهایی مرحله استخراج $50\ \mu\text{m}$ بود.

تکثیر ژنوم ویروس: برای تکثیر CMV DNA از کیت تولید داخل آزمایشگاه با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز داخلی^۶ یک مرحله‌ای استفاده شد. مخلوط اصلی^۷ حاوی الیگونوکلوئیدها یا dNTP (با غلظت $2\ \mu\text{m}$) همراه با بافر حاوی گلیسرول ۱۰٪، منیزیم کلراید $1/5\ \mu\text{m}$ و بافر 10X بود. بافر $10\times$ شامل تریس اسید کلریدریک با $\text{pH}=8/8$ ، $2\ \text{SO}_4$ (NH4) با غلظت $166\ \mu\text{m}$ و محلول Tween20 با غلظت ۱/۵٪ است. از مخلوط اصلی همراه با آنزیم ویژه تکثیر^۸ به میزان ۱ Unit در هر واکنش استفاده شد. کلیه محلول‌ها و مواد مصرفی از شرکت پرومگا تهیه شده بودند. در محلول اصلی ۴ آغازگر وجود داشت که دو آغازگر دارای غلظت $1\ \mu\text{m}$ و دو آغازگر دیگر دارای غلظت $10\ \mu\text{m}$ بودند. توالی آغازگرها به شرح زیر است:

CMV1: GGG TGC TGT CCT GCT ATG TCT
 CMV2: CAT CAC TCT GCT CAC TTT CTT
 CMV3: CGG AAT CTG ATA GCC AAG CCA
 CMV4: AGT CGC ATC TAC AGG GGA CTA

کاهش احتمال انتقال عفونت در تزریق پلاکت و خون (خون تام و متراکم) که لکوسیت آنها از طریق فیلتراسیون قبل از ذخیره‌سازی کاهش یافته، بیانگر اهمیت لکوسیت‌ها و ویروس نهفته درون آنها در انتقال عفونت است (۶ و ۱۱). البته مواردی از انتقال عفونت یا فعال شدن عفونت حتی با مصرف فرآورده‌های CMV-Ab منفی و یا واحدهای با کاهش لکوسیتی گزارش شده است (۱۷-۱۲). این مطالعات محدودیت روش‌های فوق را برای تهیه خون CMV منفی برای بیماران به ویژه بیماران نیازمند به خون Anti-CMV منفی را نشان داد. استفاده از روش‌های مولکولی^۲ مانند واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز^۳ برای شناسایی واحدهای خون پیشنهاد شد و مطالعات متعددی جهت شناسایی CMV DNA در اهداکنندگان خون انجام شد ولی این مطالعات توصیه نمودند جهت کاهش انتقال عفونت از طریق تزریق خون و فرآورده‌های آن لازم است مطالعات دیگری برای ارزیابی و کاربردی نمودن روش‌های مولکولی با هدف غربالگری اهداکنندگان انجام شود (۱۴ و ۱۶).

هر چند شناسایی HIV، HCV و HBV و سایر ویروس‌های منتقله از راه خون با استفاده از روش‌های مولکولی بر روی نمونه‌های پلاسما انجام می‌شود، برخی از محققین انجام آزمایش CMV DNA را بر روی پلاسما توصیه نکرده و این گروه از محققین معتقد هستند برای شناسایی CMV DNA از پلاسما غنی از لکوسیت استفاده شود، اما وجود مقادیر زیاد DNA موجود در لکوسیت‌ها منجر به وجود واکنش‌های کاذب می‌گردد که علت تفاوت شیوع CMV DNA در مطالعات ناشی از این مسأله است (۱۷). مشکل دیگر در انجام آزمایش به روش‌های مولکولی با هدف غربالگری برای شناسایی CMV DNA در اهداکنندگان، تعیین میزان حداقل حساسیت آزمایش برای شناسایی نمونه‌های مثبت است؛ زیرا حداقل تعداد ویروس که می‌تواند عفونت را از اهداکنندگان به بیماران منتقل نماید یا باعث فعالیت مجدد عفونت شود هنوز تعیین نشده است (۲۰-۱۷). در مطالعه بر روی اهداکنندگان ایرانی ۱۰۰-۹۰٪ اهداکنندگان CMV-Ab مثبت گزارش شده‌اند (۲۱ و ۲۲). در این مطالعه شیوع CMV DNA در پلاسماي اهداکنندگان ایران برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

برای ارزیابی وجود CMV DNA در اهداکنندگان خون از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. نمونه‌هایی که

^۲ Nucleic Acid Amplification Technique-NAT

^۳ Polymerase Chain Reaction-PCR

^۴ High Pure Viral Nucleic Acid

^۵ Roche

^۶ Nested PCR

^۷ Master Mix

^۸ Taq DNA Polymerase

متعلق به نمونه‌های اهداکنندگان مذکر بود. توزیع سنی و جنسی جمعیت مورد مطالعه و نمونه‌های مثبت در جدول ۲ ذکر شده است. کلیه نمونه‌های CMV DNA مثبت، CMV-IgM منفی و CMV-IgG مثبت بودند.

جدول ۲- توزیع سنی و جنسی جمعیت اهداکنندگان مورد مطالعه و نمونه‌های CMV DNA مثبت

گروه سنی (سال)	۲۵ >	۲۶-۳۵	۳۶-۴۵	۴۶-۵۵	۵۶ <	جمع (%)
اهدانندگان خون شاخص						
مذکر	۸۰	۱۳۲	۸۶	۶۶	۲۵	۳۹۰ (۸۷)
مونث	۹	۸	۱۹	۱۹	۵	۶۰ (۱۳)
جمع	۸۹	۱۴۱	۱۰۵	۸۵	۳۰	۴۵۰
CMV DNA مثبت						
مذکر	۱	۰	۲	۱	۱	۵ (۱/۳)
مونث	۰	۰	۰	۰	۰	۰
جمع	۱	۰	۲	۱	۱	۵ (۱/۸)

بحث و نتیجه‌گیری

طی نزدیک به ۴ دهه است که برای جلوگیری از انتقال CMV از طریق خون و فرآورده‌های آن در گیرندگان پیوند مغز استخوان و بافت‌های توپر، از غربالگری سربولوژیک برای شناسایی واحدهای خون Anti-CMV منفی استفاده می‌شود و با عرضه فیلترهای خون قابل بهره‌برداری بر بالین بیمار^{۱۱} و سپس استفاده از فیلتر قبل از ذخیره‌سازی^{۱۲}، عفونت CMV منتقله از راه خون کاهش یافته است (۴ و ۵). ولی با وجود استفاده از واحدهای خون Anti-CMV منفی یا کاهش لکوسیت همچنان مواردی از انتقال عفونت گزارش می‌گردد که سبب عوارض خطرناک یا حتی منجر به مرگ و میر بیماران می‌شود. عفونت پس از دریافت واحدهای خون Anti-CMV منفی، ۱/۳-۱٪ و در گیرندگان واحدهای با کاهش لکوسیتی ۲/۴-۱/۳٪ گزارش شده است (۶ و ۱۸). در مطالعه دیگری در سال ۱۹۹۵، مقایسه بین گیرندگان واحدهای خون Anti-CMV منفی و واحدهای با کاهش لکوسیت قبل از ذخیره‌سازی انجام شد، در هر دو گروه بیماران مواردی از عفونت پس از تزریق گزارش شد ولی اختلاف در بروز عفونت در دو گروه معنادار نبود (۶).

علل مختلفی برای بروز عفونت در بیماران پس از دریافت خون و فرآورده‌های Anti-CMV منفی بیان شده که مواردی از آن عبارتند از: اهداکنندگانی که بر علیه ویروس آنتی‌بادی اندکی ساخته‌اند و یا هرگز آنتی‌بادی نساخته‌اند (عفونت‌های فاقد پاسخ آنتی‌بادی)؛ وجود گونه‌هایی از ویروس که با آزمایش‌های رایج

مخلوط اصلی با $5\mu\text{m}$ از DNA استخراج شده، مجاور شدند. جداسازی دو رشته DNA، اتصال آغازگر به زنجیره‌های DNA هدف و طولیل شدن رشته‌های مکمل با استفاده از تغییرات دما طبق جدول ۱ در ترمال سایکلر تکنه انجام شد.

جدول ۱- دما، زمان و تعداد سیکل برای تکثیر CMV DNA در ترمال سایکلر

مرحله	دما (°C)	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
جداسازی اولیه	۹۵	۲	۱
جداسازی	۹۵	۱	۴۰
اتصال	۵۵	۱	۴۰
طولیل شدن	۷۲	۱	۴۰
طولیل شدن نهایی	۷۲	۱۰	۱

شناسایی و ارزیابی: ۱۳ لانداز از محصول تکثیر ژنوم ویروس با استفاده از ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. به وسیله رنگ اتیدیوم بروماید و در طول موج ۳۰۲ نانومتر باند CMV DNA در جایگاه bp ۲۳۰ رؤیت شد.

ارزیابی کیفی هر سری آزمایش: برای ارزیابی هر سری آزمایش که شامل ۱۱ نمونه پلاسما بود، از یک نمونه پلاسمای مثبت قطعی حاوی ۱۰۰۰ copies/ml به عنوان نمونه مثبت و از یک نمونه پلاسمای منفی به عنوان کنترل منفی استفاده شد که مطابق نمونه‌های پلاسمایی کلیه مراحل آزمایش بر روی آن انجام گرفت.

ویژگی و حساسیت آزمایش: برای تکثیر CMV DNA از آغازگرهایی استفاده شد که از ناحیه ژن مجاور ابتدای ویروس سیتومگال^۹ انتخاب شده بودند. جهت تعیین و تأیید ویژگی آغازگرها با برنامه نرم‌افزاری بلاست مورد ارزیابی قرار گرفتند که جهت CMV کاملاً اختصاصی بود. حساسیت کیت با استفاده از پانل‌های کنترل کیفی ویروسی کمپانی اکروماتریکس^{۱۰} به میزان ۱۰۰۰ copies/ml با اطمینان ۹۵٪ برآورد گردید. اطلاعات به دست آمده جمع‌آوری و بر حسب درصد در جمعیت مورد مطالعه بیان شد.

نتایج

از ۴۵۰ نمونه مورد بررسی که از اهداکنندگان خون تهیه شد (۳-۷: CI 95%): ۵ نمونه برای CMV DNA با روش PCR مثبت بود. ۶۰٪ جمعیت مورد مطالعه اهداکننده مستمر بوده و محدوده سنی اهداکنندگان ۱۷ تا ۶۹ سال بود. از نظر توزیع سنی بیشترین اهداکنندگان در گروه سنی ۳۵-۲۶ سال قرار داشتند، و فقط ۱۳٪ اهداکنندگان مؤنث بودند. ۵ نمونه مثبت،

¹¹ Bed-Side filter

¹² Pre-storage filter

⁹ CMV Immediate Early Gene

¹⁰ Virological Quality Control- Acrometrix company

قابل شناسایی نیستند؛ ناپدید شدن و یا کاهش تیتراژ آنتی‌بادی در اهداکنندگانی که قبلاً آنتی‌بادی ساخته‌اند؛ حساسیت ناکافی آزمایش‌های سنجش آنتی‌بادی؛ نمونه‌های منفی کاذب در آزمایش‌های غربالگری؛ ابتلا اخیر اهداکنندگانی که هنوز آنتی‌بادی بر علیه ویروس ساخته‌اند و در دوره پنجره قرار دارند که از سایر علل شایع‌تر است؛ و بالاخره انتقال عفونت که مرتبط با دریافت خون و فرآورده‌های آن نبوده ولی همزمان با تزریق خون رخ داده است (۱۷ و ۲۰). مهم‌ترین عامل انتقال عفونت دوره پنجره است که بر خلاف عفونت‌های HCV، HIV و HBV که دارای دوره پنجره و تعداد ذرات ویروسی مشخص برای انتقال عفونت هستند برای CMV تعداد ذرات ویروسی عامل انتقال عفونت و دوره پنجره تعیین نشده ولی ۸-۶ هفته تخمین زده می‌شود، در این دوره تعداد ذرات ویروس در خون زیاد بوده و به راحتی عفونت می‌تواند منتقل شود (۲۳ و ۲۴).

خون و فرآورده‌های با کاهش لکوسیت با روش فیلتراسیون قبل از ذخیره‌سازی راهکاری دیگر جهت کاهش انتقال CMV پس از تزریق است اما مواردی از عفونت پس از مصرف فرآورده‌های با کاهش لکوسیتی گزارش شده است. فرآورده‌های مورد استفاده با روش استاندارد تهیه شده و تعداد لکوسیت در هر واحد $10^6 - 10^5$ بوده و تخمین زده می‌شود که به ازای هر $10000 - 1000$ لکوسیت تزریق شده یک لکوسیت آلوده به ویروس وجود داشته است (۲۵). برخی از محققین واحدهای خون را قبل و پس از فیلتراسیون برای وجود CMV DNA و کشت ویروس بررسی کردند. اکثریت واحدها پس از فیلتراسیون منفی بودند ولی واحدهای مثبت نیز گزارش شدند (۲۶ و ۲۷). کشت مثبت پس از فیلتراسیون فرآورده می‌تواند به علت وجود ویروس خارج از لکوسیت و موجود در پلاسما باشد که در حین فرآیند فیلتراسیون قابل برداشت از فرآورده‌های خون نبوده و توجیه دیگر وجود تعداد زیاد ذرات ویروس در لکوسیت‌ها است که با وجود کاهش تعداد قابل قبول لکوسیت‌ها، به علت آلودگی تعداد زیاد لکوسیت‌های باقیمانده حاوی ویروس در واحدها همچنان در کشت قابل شناسایی است (۱۷ و ۲۰)، بنابراین همچنان احتمال انتقال عفونت CMV حتی در واحدهای خون پس از کاهش لکوسیتی ثابت شده است.

جهت جلوگیری از انتقال این موارد، مراکز انتقال خون از آزمایش‌های مولکولی جهت شناسایی واحدهای CMV DNA استفاده کردند. در مطالعات متعددی CMV DNA در واحدهای Anti-CMV مثبت و منفی شناسایی شد. وجود CMV DNA در ۱۰۰٪ نمونه‌های غنی از منوسیت‌های واحدهای خون

اهداکنندگان Anti-CMV مثبت، و در ۵۵٪ اهداکنندگان واحدهای Anti-CMV منفی، گزارش شده است (۱۹)، ولی در سایر مطالعات که بر روی خون تام و سرم انجام شده، شیوع CMV DNA در واحدهای Anti-CMV مثبت کمتر از ۱٪، و در واحدهای Anti-CMV منفی، به ندرت مثبت گزارش شده است (۱۴ و ۱۶ و ۱۷ و ۲۰). برای بررسی کیفیت، نحوه انجام و حساسیت آزمایش به عنوان عوامل مؤثر در تفاوت قابل توجه شیوع موارد مثبت در تحقیقات مختلف که تاکنون منتشر شده است گزارش شده است، رباک و همکارانش در سال ۲۰۰۳ چندین گروه نمونه از پلاسمای منجمد را به تعدادی آزمایشگاه ارسال کردند و در تحلیل نتایج اعلام نمودند برخی از آزمایشگاه‌ها مواردی را مثبت کاذب گزارش کرده و موارد مثبت کاذب را به عنوان مهم‌ترین عامل مؤثر در تفاوت شیوع موارد مثبت در مطالعات مختلف مطرح کردند (۱۷ و ۲۸).

در این مطالعه بر روی کلیه نمونه‌های اهداکنندگان بدون در نظر گرفتن وضعیت Anti-CMV آزمایش CMV DNA (PCR) انجام شد و با توجه به شیوع Anti-CMV که در اهداکنندگان ایران ۱۰۰-۹۰٪ گزارش شده (۲۱ و ۲۲)، احتمال وجود موارد اندکی نمونه Anti-CMV منفی در بین ۴۵۰ نمونه اهداکنندگان مورد مطالعه وجود داشته است. در بین ۴۵۰ نمونه (۱/۱٪) ۵ نمونه CMV DNA مثبت گزارش شدند و هر ۵ نمونه از نظر Anti-CMV (IgG) مثبت و از نظر Anti-CMV (IgM) منفی بودند. پس در صورت وجود نمونه‌های آنتی‌بادی منفی، CMV DNA نیز منفی بوده است. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعاتی که بر روی نمونه‌های پلاسما انجام شده و شیوع ۲/۵-۲۰٪ را در اهداکنندگان گزارش کرده‌اند مشابه است. با توجه به شیوع ۱/۱٪ CMV DNA در نمونه‌های اهداکنندگان، کلیه نمونه‌هایی که Anti-CMV مثبت هستند، توانایی انتقال عفونت را به گیرندگان نخواهند داشت. هر چند با مطالعه بر روی نمونه‌های اهداکنندگان در سایر مناطق تهران می‌توان با اطمینان بیشتری شیوع آن را در جامعه اهداکنندگان بررسی نمود. ارزش کاربرد روش‌های مولکولی برای کاهش انتقال عفونت از طریق تزریق خون و فرآورده‌های آن سؤال است که برای مراکز انتقال خون مطرح است و نوع نمونه مورد نیاز برای آزمایش مانند استفاده از پلاسما، خون تام، پلاسمای غنی از لکوسیت، منوسیت و... لازم است مشخص شود. سؤالات دیگری که هنوز پاسخ داده نشده عبارتند از: آیا انتقال عفونت رخ داده و یا فعالیت مجدد آن پیش آمده است؟ عوامل مؤثر میزبان در انتقال عفونت کدامند؟ و نقش این عوامل چقدر است؟

روش استفاده کرده‌اند مانند غربالگری Anti-CMV در واحدهای گلبول سرخ و واحدهای پلاکت که لکوسیت آنها کاهش یافته و از فیلترهای قبل از ذخیره‌سازی استفاده شده است (۴ و ۳۰). اما عده‌ای از محققین توصیه نمودند که کاهش لکوسیت در واحدهای Anti-CMV مثبت انجام شود (۱۰) چون در این گروه اهداکنندگان نسبت به گروهی که در دوره کمون قبل از دگرگونی سرمی هستند احتمال ویرمی کمتر بوده و همواره در اهداکنندگان Anti-CMV منفی احتمال ویرمی به علت ابتلا اخیر را باید مد نظر داشت (۳۱). بکارگیری روش NAT برای غربالگری در واحدهایی که کاهش لکوسیتی با استفاده از فیلترهای قبل از ذخیره‌سازی نیز داشته‌اند (۱۸)، بکارگیری واحدهای خون اشعه دیده همراه و یا بدون فیلتراسیون قبل از ذخیره‌سازی (۳۲)، استفاده از ایمونوگلوبولین اختصاصی CMV قبل از تزریق خون و فرآورده‌های آن (۳۳)، روش‌های فتودینامیک (ترکیب مواد شیمیایی و نور ماورابنفش) برای کاهش ویروس‌ها و سایر عوامل بیماری‌زا در فرآورده‌های پلاکتی (۳۴ و ۳۵) راهکارهای توصیه شده برای مراکز انتقال خون و متخصصین بالینی برای کاهش انتقال CMV در گیرندگان پیوند و بیماران در معرض خطر است.

References

- 1- Ho M. Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (Suppl 7): S701-10.
- 2- Tegtmeier GE. Posttransfusion cytomegalovirus infections. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 236-45.
- 3- Bowden RA. Transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995; 9: 155-66.
- 4- Bowden RA, Slichter SJ, Sayers MH, et al. Use of Leukocyte-Depleted Platelets and Cytomegalovirus-Seronegative Red Blood Cells for Prevention of Primary Cytomegalovirus Infection After Marrow Transplant. *Blood* 1991; 78(1): 246-50.
- 5- De Witte T, Schattenberg A, Van Dijk BA, et al. Prevention of primary cytomegalovirus infection after allogeneic bone marrow transplantation by using leukocyte-poor random blood products from cytomegalovirus-unscreened blood-bank donors. *Transplantation* 1990; 50: 964-8.
- 6- Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M, et al. A Comparison of Filtered Leukocyte-Reduced and Cytomegalovirus (CMV) Seronegative Blood Products for the Prevention of Transfusion-Associated CMV Infection After Marrow Transplant. *Blood* 1995; 86(9): 3598-603.
- 7- Adler SP, Chandrika T, Lawrence L, et al. Cytomegalovirus infections in neonates acquired by blood transfusions. *Pediatr Infect Dis* 1983; 2: 114-8.
- 8- Gunter KC. Transfusion-transmitted cytomegalovirus: the part-time pathogen. *Pediatr Pathol Lab Med* 1995; 15(3): 515-34.
- 9- Yeager AS, Grumet FC, Hafleigh EB, et al. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J Pediatr* 1981; 98: 281-7.
- 10- Bowden R, Sayers M. The risk of transmitting cytomegalovirus infection by fresh frozen plasma. *Transfusion* 1990; 30(8): 762-3.
- 11- Hillyer CD, Emmens RK, Zago-Novaretti M, et al. Methods for the reduction of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection: filtration versus the use of seronegative donor units. *Transfusion*. 1994 Oct; 34(10): 929-34.
- 12- Söderberg-Nauclér C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997; 91(1): 119-26.
- 13- Cassol SA, Poon MC, Pal R, et al. Primer-mediated enzymatic amplification of cytomegalovirus (CMV) DNA application to the early diagnosis of CMV infection in marrow transplant recipients. *J Clin Invest* 1989; 83(4): 1109-15.
- 14- Greenlee DJ, Fan H, Lawles K, et al. Quantitation of CMV by real-time PCR in transfusable RBC units. *Transfusion* 2002; 42: 403-8.
- 15- Smith KL, Kulski JK, Cobian T, et al. Detection of cytomegalovirus in blood donors by the polymerase chain reaction. *Transfusion* 1993; 33(6): 497-503.
- 16- Zhang LJ, Hanff P, Rutherford C, et al. Detection of human cytomegalovirus DNA, RNA, and antibody in normal donor blood. *J Infect Dis* 1995; 171(4): 1002-6.

- 17- Roback JD, Drew L, Laycock ME, et al. CMV DNA is rarely detected healthy blood donors using validated PCR assays. *Transfusion* 2003; 43: 314-21.
- 18- Preiksaitis JK, Prevention of transfusion-acquired CMV infection: is there a role for NAT? *Transfusion* 2003; 43: 302-4.
- 19- Larsson S, Söderberg-Nauclér C, Wang Z, et al. Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. *Transfusion* 1998; 38: 271-8.
- 20- Drew WL, Tegtmeier GE, Alter HJ, et al. Frequency and duration of plasma CMV viremia in seroconverting blood donors and recipients. *Transfusion* 2003; 43: 309-13.
- 21- Aghaiepour M, Tarabadi FA, Shaiegan M, et al. Detection of anti-CMV antibodies in thalassemia major patient and blood donors. *Blood* 2005; 1(2): 37-43.
- 22- Hejazi S, Molla Abaszadeh A, Karamiyar M. Prevalence of anti-CMV antibodies in blood donors in Urmia. *Blood* 2007; 3(Supp5); 427-35.
- 23- Revello MG, Zavattoni M, Sarasini A, et al. Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: prognostic implications for pregnancy. *J Infect Dis* 1998; 177(5): 1170-5.
- 24- Zanghellini F, Boppana SB, Emery VC, et al. Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. *J Infect Dis* 1999; 180(3): 702-7.
- 25- Slobedman B, Mocarski ES. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J Virol* 1999; 180: 702-7.
- 26- Lipson SM, Shepp DH, Match ME, et al. Cytomegalovirus infectivity in whole blood following leukocyte reduction by filtration. *Am J Clin Pathol* 2001; 116 (1): 52-5.
- 27- Dumont LJ, Luka J, VandenBroeke T, et al. The effect of leukocyte-reduction method on the amount of human cytomegalovirus in blood products: a comparison of apheresis and filtration method. *Blood* 2001; 97(11): 3640-7.
- 28- Roback JD, Hillyer CD, Drew WL, et al. Multicenter evaluation of PCR methods for detecting CMV-DNA in blood donors. *Transfusion* 2001; 41(10): 1249-57.
- 29- Boom R, Sol CJ, Schuurman T, et al. Human cytomegalovirus DNA in plasma and serum specimen of renal transplant recipients is highly fragmented. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4105-13.
- 30- Reesink HW, Engelfriet CP. Prevention of post-transfusion cytomegalovirus: leucoreduction or screening? *Vox sang* 2002; 83: 72-87.
- 31- Ziemann M, Krueger S, Maier AB, et al. High prevalence of cytomegalovirus DNA in plasma samples of blood donors in connection with seroconversion. *Transfusion* 2007; 47(11): 1955-8.
- 32- Luban NC, Manno C. Lack of difference in difference in CMV transmission via the transfusion of filtered-irradiated and nonfiltered-irradiated blood to newborn infants in an endemic area. *Transfusion* 2000; 40: 387-9.
- 33- Bowden RA, Sayers M, Flournoy N, et al. Links Cytomegalovirus immune globulin and seronegative blood products to prevent primary cytomegalovirus infection after marrow transplantation. *N Engl J Med* 1986; 314(16): 1006-10.
- 34- Lin L, Hanson CV, Alter HJ, et al. Inactivation of viruses in platelet concentrates by photochemical treatment with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* 2005; 45(4): 580-90.
- 35- Roback JD, Conlan M, Drew WL, et al. The role of photochemical treatment with amotosalen and UV-A light in the prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infections. *Transfus Med Rev* 2006; 20(1): 45-56.

Assessing the Frequency of Cytomegalovirus Viremia in Iranian (Tehran) Blood Donors by Polymerase Chain Reaction Method

Amini Kafi-abad S^{*1} (MD), Ranjbar Kermani F¹ (MSc), Ferdowsian F¹ (MSc), Sobhani M¹ (MSc), Samie Sh¹ (MSc)

¹Research Center of Iranian Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran

Received: 19 Aug 2009, Accepted: 7 Nov 2009

Abstract

Introduction: CMV is one of the most significant blood born pathogens that can cause serious morbidity and mortality in low birth weight newborns, immunocompromised patients and transplant recipients. Both serologic screening and leukoreduction of blood components reduces the incidence of infection in recipients but cases of transfusion-transmitted CMV infection still occur. The aim of this study was to assess the prevalence of CMV DNA in Iranian blood donors.

Methods: 450 blood donor samples were tested for the presence of CMV DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR) assay. The sensitivity of CMV DNA PCR was estimated 1000 copies/ml and it was specific for CMV. All of CMV DNA positive samples were evaluated for CMV-IgM and CMV-IgG.

Results: 5 (1/1%) out of 450 samples were positive for CMV DNA. 390 (87%) out of 450 donors were male, and 272 (60%) were repeat donor. All of 5 samples were positive for CMV-IgG and they were negative for CMV-IgM.

Conclusion: Further studies are needed to determine the effectiveness of molecular testing for prevention of CMV transmission to recipients. The most important elements contributing in the decision whether to implement CMV DNA screening or not, are the sensitivity of assay that is sufficient for detection of CMV in blood components and minimum viral load that is needed for transmission of CMV in recipients.

Key words: Cytomegalovirus, Blood Donors, Polymerase Chain Reaction

Hakim Research Journal 2009; 12(3): 61- 67.

*Corresponding Author: Research Center of Iranian Blood Transfusion Organization, Hemmat Highway, Tehran 1449613111, Iran. Telefax: +98- 21- 88601559, Email: dr.amini@gmail.com, s-amini@cc.sbu.ac.ir