Detection of human CMV PP65 protein in glioma brain tumors with immunohistochemistry method

MR. Jabbari[*] F. Sabahi[**] B. Khansarinejad[***] R. Shirkoohi[****] H. Saberi[*****] M. Parvin[******]

*M.Sc. in Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
**Professor of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
***Assistant Professor of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
****Assistant Professor of Genetics, Cancer Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
*****Associate Professor of Neurosurgery, Brain and Spinal Injury Research Center, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
******Associate Professor of Pathology, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

Abstract

Background: Human cytomegalovirus (HCMV) may play a role in the development of glioma disease that is one of the most common brain tumors.

Objective: The aim of this study was to detect human CMV in patients with glioma in Imam Khomeini hospital, Tehran.

Methods: This experimental study was conducted on paraffin-embedded tumor samples of 18 patients referred to Imam Khomeini hospital in 2012. Immunohistochemistry (IHC) was performed with monoclonal antibody specific for HCMV PP65 protein and the samples were assessed using a light microscope.

Findings: Of 18 patients, 13 (72.2%) were positive for HCMV PP65 protein and four of them expired.

Conclusion: With regards to the results, more comprehensive studies are recommended for detection of HCMV in patients with glioma using different diagnostic methods.

Keywords: Cytomegalovirus, Immunohistochemistry, Glioma

Citation: Jabbari MR, Sabahi F, Khansarinejad B, Shirkoohi R, Saberi H, Parvin M. Detection of human HCMV PP65 protein in glioma brain tumors with immunohistochemistry method. J Qazvin Univ Med Sci. 2015; 19 (3): 4-10.

Corresponding Address: Farzaneh Sabahi, Faculty of Medicine, Tarbiat Modars University, Tehran, Iran
Email:sabahi_f@yahoo.com
Tel: +98-218-2883836
Received: 5 May 2014
Accepted: 23 Feb 2015

شناسایی پروتئین PP٦٥ سایتومگالوویروس انسانی در تومورهای مغزی گلیووما با روش ایمنوهیستوشیمی

محمدرضا جباری* دکتر فرزانه صباحی** دکتر بهزاد خوانساری نژاد*** دکتر رضا شیرکوهی**** دکتر هوشنگ صابری***** دکتر محمود پروین******

* کارشناس ارشد ویروس‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
** استاد ویروس‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
*** استادیار میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
**** استادیار ژنتیک مرکز تحقیقات سرطان، انستیتو کانسر ایران دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
***** دانشیار جراحی اعصاب مرکز ترمیم ضایعه‌های مغزی- نخاعی بیمارستان امام خمینی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
****** دانشیار آسیب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: تهران، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تلفن ۸۲۸۸۳۸۳۶- ۰۲۱
Email: sabahi_f@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۴

چکیده

زمینه: سایتومگالوویروس‌های انسانی ممکن است در ایجاد بیماری گلیوما که یکی از شایع‌ترین تومورهای مغزی است، نقش داشته باشند.

هدف: مطالعه به منظور شناسایی سایتومگالوویروس‌های انسانی در بیماران مبتلا به گلیوما در بیمارستان امام خمینی تهران انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۱ بر روی نمونه‌های پارافینه تومور مغزی گلیومای بیماران مراجعه‌کننده به بخش جراحی اعصاب بیمارستان امام خمینی (۱۸ بیمار) انجام شد. نمونه‌ها با استفاده از آنتی بادی منوکلونال اختصاصی بر ضد پروتئین PP۶۵ سایتومگالوویروس انسانی و با روش ایمنوهیستوشیمی آماده شدند. نمونه‌های بیماران برای شناسایی این ویروس با میکروسکوپ نوری دیده شدند.

یافته‌ها: از ۱۸ بیمار مورد مطالعه، ۱۳ بیمار (۷۲/۲٪) از نظر پروتئین PP۶۵ سایتومگالوویروس انسانی مثبت بودند که ۴ نفر آن‌ها فوت شدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، مطالعه‌های گسترده‌تری با استفاده از روش‌های تشخیصی متفاوت، برای ردیابی سایتومگالوویروس انسانی در بیماران مبتلا به گلیوما پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: سایتومگالوویروس، ایمنوهیستوشیمی، گلیوما

مقدمه:

سایتومگالوویروس‌های انسانی بتاهرپس ویروس‌های پراکنده در همه جا و از عوامل شایع بیماری‌های انسانی هستند و مانند تمام ویروس‌های هرپس در تمام طول عمر فرد عفونت مخفی ایجاد می‌کنند. این ویروس‌ها پس از عفونت اولیه در کلیه، مغز استخوان، گلبول‌های سفید و غدد بزاقی پنهان و به طور متناوب از گلو و ادرار دفع می‌شوند.[۱] تحقیق‌های اخیر نشان داده‌اند که سایتومگالوویروس انسانی ممکن است با بعضی از تومورها از جمله تومورهای دستگاه عصبی مرکزی ارتباط داشته باشد.[۲]

یکی از شایع‌ترین تومورهای مغزی گلیوما نام دارد که در نتیجه بدخیمی سلول‌های گلیال در مغز به وجود می‌آید. موارد گلیوما را براساس شدت به ۴ درجه طبقه‌بندی کرده‌اند. درجه ۱ و ۲ نوع خفیف و درجه ۳ و ۴ نوع شدید و بدخیم بیماری هستند. این نوع تومورها بدترین پیش آگهی را در بین سرطان‌های سیستم عصبی مرکزی دارند و با وجود تمام اقدام‌های درمانی، میانگین مدت زمان زنده ماندن بیمار در انواع شدید بیماری ۱۴ ماه است.[۳و۴]

واکنش متقابل این ویروس و سیستم ایمنی بدن در نهایت باعث پیشبرد فرایندهای مولکولی درون سلول به سمت گلیوما می‌شود. ویروس‌های هرپس به سلول‌های

بافت عصبی تمایل دارند و می‌توانند در محیط آزمایشگاه پیش سازهای بافت عصبی را آلوده کنند و روند تبدیل آن‌ها را به بافت نورون کامل تحت تأثیر قرار دهند.[۵] سایتومگالوویروس انسانی روند افتراق نورون‌ها و آستروسیت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد و شاید به همین علت نوزادان آلوده به این ویروس دچار عقب ماندگی ذهنی و نقایص عصبی می‌شوند. این ویروس به مخفی شدن در سلول‌های کلیه تمایل دارد و در محیط آزمایشگاه نیز در سلول‌های عصبی مخفی می‌شود و به حالت نهفته باقی می‌ماند. فعال شدن مجدد ممکن است در شرایطی مثل بارداری، تنش یا پیری اتفاق بیفتد که بدن فرد از لحاظ ایمنی تحت تأثیر قرار می‌گیرد.[۶] سلول‌های پیش ساز عصبی به شدت به این ویروس حساس هستند. سایتومگالوویروس انسانی به راحتی در آن‌ها وارد می‌شود و رشد می‌کند.[۷] پروتئین‌های IE-۷۲ و IE-۸۶ که از ژن‌های بسیار زودرس سایتومگالوویروس انسانی تولید می‌شوند با پروتئین‌های P۵۳ و Rb سلولی که مهارکننده تومور هستند، واکنش می‌دهند و آن‌ها را مهار می‌کنند.[۸]

در سلول‌های فیبروبلاست، سایتومگالوویروس انسانی عوامل زیر را فعال می‌کند: پروتواونکوژن‌های سلولی، سایکلین‌ها، کینازهای درگیر در تقسیم سلولی مثل C-foc، C-jun و سایکلین B. این ویروس همچنین باعث تولید عوامل رونویسی سلولی مثل NF-kb می‌شود. NF-kb باعث بقای سلول‌های طبیعی و سرطانی و در نتیجه ایجاد مسیر پس نورد مثبت برای رونویسی از ژن‌های بسیار زودرس آن می‌شود.[۹] سایتومگالوویروس انسانی باعث فرار ایمنی سلول‌های آلوده و ایجاد یک محیط امن برای ایجاد تومور می‌شود. در فرایند القای تومور، از کار انداختن سیستم ایمنی میزبان یک گام مهم و اساسی است. این ویروس ژن‌هایی دارد که پروتئین‌های حاصل آن باعث عدم کارایی سیستم ایمنی در تشخیص سلول‌های خودی از سلول‌های توموری است.[۱۰] گلیکوپروتئین‌های سایتومگالوویروس انسانی ممکن است در ایجاد تومور نقش داشته باشند. گلیکوپروتئین B که فراوان‌ترین گلیکوپروتئین این ویروس است بیش‌ترین خاصیت ایمنی‌زایی را دارد. شواهد نشان می‌دهد گلیکوپروتئین B به طور مستقیم به گیرنده عامل رشد پلاکتی متصل می‌شود و آن را فعال می‌کند. گیرنده عامل رشد پلاکتی در چندین بدخیمی از جمله گلیوما افزایش زیادی نشان می‌دهد. افزایش تولید گلیکوپروتئین B در گلیوما به اثبات رسیده است. شواهد کافی برای دخالت این ویروس در وقایع مولکولی زمینه‌ساز سرطان وجود دارد و محققین دریافته‌اند این ویروس در بافت سرطانی مغز وجود دارد، اما در بافت سالم مجاور وجود ندارد.[۱۱و۱۲]

این مطالعه با هدف شناسایی سایتومگالوویروس انسانی در بیماران مبتلا به گلیوما انجام شد.

❋مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی بر روی بیمارانی انجام شد که در سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ با تشخیص گلیوما برای عمل به بخش جراحی اعصاب بیمارستان امام خمینی تهران مراجعه کرده بودند (۱۸نفر). با مراجعه به بخش آسیب‌شناسی بیمارستان، بلوک بیماران تحویل گرفته شد. با توجه به تعداد سلول‌های توموری آلوده به سایتومگالوویروس شدت عفونت به صورت تخمینی از ۱+ تا ۴+ تعیین شد. بدین ترتیب که اگر تا ۲۵ درصد سلول‌های مشاهده شده آلوده به این ویروس بودند، ۱+ ، از ۲۵ تا ۵۰ درصد ۲+ ، از ۵۰ تا ۷۵ درصد ۳+ و اگر بیش از ۷۵ درصد سلول‌های مورد مشاهده آلوده بودند، ۴+ در نظر گرفته شدند. فسفوپروتئین ۶۵ کیلو دالتنی که به اختصار PP۶۵ نامیده می‌شود یکی از فراوان‌ترین پروتئین‌های این ویروس است که با ردیابی آن در بافت می‌توان ویروس را شناسایی کرد. لازم به ذکر است که گلیوم بودن تک تک نمونه‌ها توسط آسیب‌شناس تأیید شد.

برای انجام ایمنوهیستوشیمی مراحل زیر انجام شد: ابتدا بافت‌های پارافینه بیماران توسط دستگاه میکروتوم به

قطعه‌های با ضخامت ۵ میکرومتر برش داده شدند و روی لام قرار گرفتند. سپس برای پارافین زدایی ۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سیلسیوس قرار داده شدند. لام‌ها با گزیلن شستشو و در رقت‌های ۹۹/۵، ۹۵، ۷۰ و ۵۰ درصد از اتانول قرار داده شدند. لام‌ها به مدت چند ثانیه در آب مقطر قرار گرفتند و با آنزیم پپسین مجاور شدند. آنزیم پپسین باعث هضم بافت و در معرض قرار گرفتن آنتی ژن‌های بافتی می‌شود. در مرحله بعد مقاطع بافتی توسط پراکسیداز (H۲O۲ ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه) پوشانده شدند. این مرحله باعث می‌شود پراکسیداز داخل بافت مهار و از مثبت کاذب شدن آزمایش جلوگیری شود. لام‌ها با محلول آنتی بلوک آویدین، بیوتین و مهارکننده گیرنده FC آنتی بادی‌ها به منظور جلوگیری از اتصال‌های غیراختصاصی آنتی بادی PP۶۵ با آنتی ژن مربوطه مجاور شدند. در مرحله بعد ۳۰۰ میکرولیتر از رقت ۱ به ۱۰۰ آنتی بادی اولیه بر علیه PP۶۵ سایتومگالوویروس انسانی که یک آنتی بادی مونوکلونال موشی از نوع IgG۱ است (ab۴۹۲۱۴) روی لام‌ها ریخته و به مدت یک شب در ۴ درجه سیلسیوس قرار گرفت. در مرحله اضافه کردن آنتی بادی ثانویه ۳۰۰ میکرولیتر از رقت ۱ به ۳۰۰ آنتی بادی ثانویه (Dako) به مدت ۴۵ دقیقه به لام‌ها اضافه شد. بعد از این مرحله برای آشکارسازی محل قرار گرفتن آنتی ژن‌های PP۶۵ از استرپتوآویدین نشان دار شده با پراکسیداز (Biogenex) و محلول DAB (Innovex) به عنوان رنگ زا استفاده شد. سپس لام‌ها به مدت ۳۵ ثانیه با هماتوکسیلین به عنوان رنگ زمینه رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت لام‌های آماده شده با میکروسکوپ نوری (OLYMPUS مدل ۳۰X۳۱) مشاهده شدند. وجود نقاط قهوه‌ای مایل به قرمز در لام نشان‌دهنده وجود آنتی ژن PP۶۵ سایتومگالوویروس انسانی در بافت توموری مغز بود. لازم به ذکر است در این پژوهش از بافت ریه یک بیمار مبتلا به ایدز که در اثر پنومونی ناشی از سایتومگالوویروس انسانی فوت کرده بود به عنوان شاهد مثبت و از بخش غیرتومورال مغز یکی از بیماران نیز به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

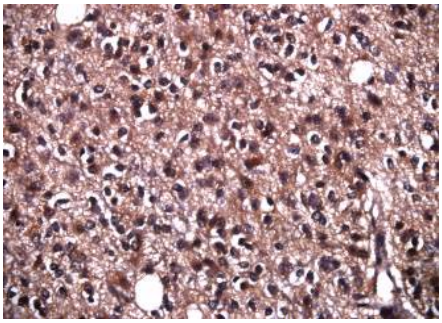
❋یافته‌ها:

از ۱۸ بیمار مورد مطالعه ۱۰ بیمار (۵۵/۵ درصد) مرد و ۸ بیمار (۴۵/۵ درصد) زن بودند. میانگین سن بیماران ۱±۳۹/۵ سال (حداقل ۹ و حداکثر ۵۹ سال) بود. اکثر بیماران (۱۰ نفر، ۵۵/۵ درصد) گلیومای درجه ۲ داشتند. ۱۳ بیمار (۷۲/۲ درصد) از نظر آنتی‌ژن PP۶۵ مثبت شدند که ۴ نفر از آن ها فوت کردند. (جدول شماره ۱).

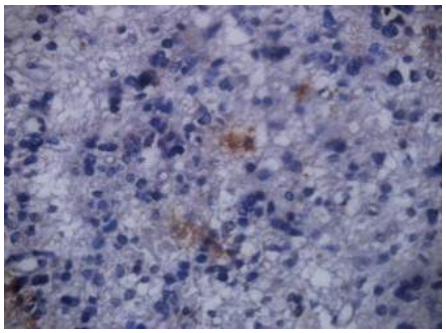
جدول ۱- اطلاعات مربوط به بیماران مورد مطالعه و نتایج PP٦٥ آن‌ها

شماره	عمر بیمار	مدت بیماری (ماه)	درجه بیماری	جنسیت	سن بیمار هنگام جراحی (سال)	شدت PP۶۵
۱	فوت شده	۶۰	۲	مرد	۳۰	+۳
۲	در قید حیات	۲۳	۳	زن	۴۷	-
۳	در قید حیات	۲۳	۲	زن	۳۵	-_
۴	در قید حیات	۷۱	۲	مرد	۳۰	-_
۵	در قید حیات	۷	۴	زن	۵۵	+۲
۶	فوت شده	۱۸	۴	مرد	۵۹	+۲
۷	فوت شده	۱۳	۴	زن	۵۷	+۲
۸	در قید حیات	۳	۲	مرد	۳۳	-_-_
۹	در قید حیات	۱	۲	زن	۳۹	+۲
۱۰	فوت شده	۱۱	۴	مرد	۵۰	+۴
۱۱	در قید حیات	۳	۲	مرد	۳۳	+۱
۱۲	در قید حیات	۴	۲	مرد	۳۲	+۱
۱۳	در قید حیات	۶۳	۲	زن	۴۰	+۱
۱۴	در قید حیات	۲	۱	مرد	۹	+۱
۱۵	در قید حیات	۲۵	۲	مرد	۳۶	+۱
۱۶	در قید حیات	۳	۳	زن	۴۵	+۲
۱۷	در قید حیات	۲	۲	مرد	۳۶	-_-_
۱۸	در قید حیات	۸	۳	زن	۴۴	+۱

در بیماران با درجه‌های بالاتر گلیوما، شدت عفونت با پروتئین PP۶۵ بیش‌تر بود و این پروتئین علاوه بر هسته در سیتوپلاسم سلول‌های آلوده نیز وجود داشت. اما در درجه‌های پایین‌تر بیماری فقط در هسته سلول‌های آلوده مشاهده شد (شکل‌های شماره ۱ و ۲).



شکل ۱- نمونه ٤+ بیمار از نظر PP٦٥



شکل ۲- نمونه ۱+ بیمار از نظر PP٦٥

❋بحث و نتیجه‌گیری:

در این تحقیق سایتومگالوویروس از ۷۲/۲ درصد از بیماران مبتلا به گلیوما جدا شد. نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابق با نتایجی است که برخی از محققین دیگر به دست آورده‌اند.[۲و۱۴-۱۲] در یک تحقیق با استفاده از آنتی بادی PP۶۵، میزان جداسازی حدود ۵۳ درصد بود.[۲] تفاوت در میزان جداسازی سایتومگالوویروس انسانی در مطالعه حاضر نسبت به سایر مطالعه‌ها ممکن است به دلایل مختلفی باشد از جمله استفاده از روش‌های دیگر تشخیصی مثل واکنش زنجیری پلیمراز (PCR)، هیبریداسیون درجا ، مطالعه در جمعیت‌های مختلف و همچنین ناحیه ژنی که از آن برای طراحی پرایمر استفاده می‌شود.

در یک مطالعه موش‌های تراریخته که توانایی بیان ژن US۲۸ سایتومگالو ویروس را در روده داشتند، به آدنوکارسینومای روده مبتلا شدند. به همین دلیل ناحیه ژنی US۲۸ ممکن است به عنوان اونکوژن مطرح باشد.[۱۴] با توجه به آبشاری بودن بیان ژن‌های خانواده هرپس ویریده و جنس سایتومگالوویروس، در طراحی پرایمرها حتماً باید از ژن‌هایی استفاده شود که بیان آن‌ها در بافت تومور به اثبات رسیده باشد. همچنین حساسیت روش‌های مختلف واکنش زنجیری پلیمراز نیز ممکن است با هم تفاوت داشته باشد. جداسازی سایتومگالوویروس از بافت بسیار مشکل است، به همین دلیل محققین از عنوان عفونت بسیار بسیار جزئی (Microininfection) برای عفونت این ویروس استفاده می‌کنند.[۹]

بهینه‌سازی روش جداسازی و استفاده از کنترل مثبت مناسب نیز مسأله مهمی است که در مقاله‌ها به آن اشاره شده است.[۱۵] در مطالعه حاضر از ریه بیمار ایدزی که در اثر پنومونی ناشی از سایتومگالوویروس انسانی فوت کرده بود به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

درجه بیماری گلیوما نیز ممکن است در نتایج تأثیرگذار باشد (در درجه ۴ بیماری میزان جداسازی بیش‌تر است). در برخی مطالعه‌ها در بیش از ۹۰ درصد بیمارانی که گلیومای درجه ۴ داشتند، سایتومگالوویروس انسانی جدا شده است.[۱۲و۱۴] بیش‌تر بیماران مطالعه حاضر (۵۵/۵ درصد) در مراحل ابتدایی‌تر بیماری قرار داشتند.

به هر حال ایمنوهیستوشیمی روشی است که به طور متداول برای تشخیص مکان آنتی ژن‌ها در بافت به کار می‌رود و یک روش مناسب برای تشخیص بیماری‌های سرطانی است. در سال‌های اخیر با توجه به تولید آنتی بادی‌های مناسب استفاده از این روش گسترش یافته است.[۱۶] با توجه به نکته‌های ذکر شده در بالا و مقایسه نتایج روش ایمنوهیستوشیمی با سایر روش‌ها مثل واکنش

زنجیری پلیمراز (که در آن‌ها میزان جداسازی این ویروس کم‌تر گزارش شده است)،[۱۷و۱۸] به نظر می‌رسد ایمنوهیستوشیمی روش مناسب‌تری برای تشخیص سایتومگالوویروس انسانی در بافت مغز باشد.

در این تحقیق مشاهده شد هرچه شدت عفونت سلول‌های مغزی با پروتئین‌های این ویروس بالاتر باشد، میزان مرگ و میر بیماران بیش‌تر خواهد شد. البته با استفاده از تعداد نمونه‌های بیش‌تر می‌توان آمار دقیق‌تر و صحیح‌تری ارایه داد. البته کم بودن موارد بالینی این بیماری و کمبود نمونه، مطالعه در این زمینه را دشوار و طولانی می‌کند. به هر حال اگر ارتباط گلیوما با سایتومگالوویروس انسانی ثابت شود، استفاده از طب پیشگیرانه و یک واکسن مناسب می‌تواند از روند این بیماری جلوگیری کند.

❋سپاس‌گزاری:

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد رشته ویروس‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی آن دانشگاه انجام شده است.

❋مراجع:

1. Mocarski ES Jr, Shenk T, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. Fields virology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. 1960-2014.

2. Lucas KG, Bao L, Bruggeman R, Dunham K, Specht C. The detection of CMV pp65 and IE1 in glioblastoma multiforme. J Neurooncol 2011 Jun; 103 (2): 231-8.

3. David FG, Kupelian V, Freels S, McCarthy B, Surawicz T. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by behavior and major histology groups. Neuro Oncol 2001 Jul; 3 (3): 152-8.

4. Van Meir EG, Healjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. CA Cancer J Clin 2010 May-Jun; 60 (3): 166-93.

5. Luo MH, Hannemann H, Kulkarni AS Schwartz PH, O'Dowd JM, Fortunato EA. Human cytomrgalovirus infection causes premature and abnormal differentiation ofhuman neural progenitor cells. J Virol 2010 Apr; 84 (7): 3528-41.

6. Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Seiger A, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus inhibits neuronal differentiation and induces apoptosis in human neural precursor cells. J Virol 2006 Sep; 80 (18); 8929-39.

7. Luo MH, Schwartz PH, Fortunato EA. Neonatal neural progenitor cells and their neuronal and glial cell derivatives are fully permissive for human cytomegla virus infection. J Virol 2008 Oct; 82 (20): 9994-10007.

8. Cobbs CS, Soroceanu L, Denham S, Zhang W, Kraus MH. Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1- mediated mitogenicity. Cancer Res 2008 Feb 1; 68 (3): 724-30.

9. Soroceanu L, Cobbs CS. Is HCMV a tumor promoter? Virus Res 2011 May; 157 (2): 193-203.

10. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumor immunity. Immunology 2006 Oct; 119 (2): 254-64.

11. Soroceanu L, Akhavan A, Cobbs CS. Platelet- derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomeglavirus infection. Nature 2008 Sep 18; 455 (7211): 391-5.

12. Mitchell DA, Xie W, Schittling R, Learn C, Friedman A, McLendon RE, et al. Sensitive detection of human cytomeglavirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma. Neuro Oncol 2008 Feb; 10 (1): 10-8.

13. Cobbs C, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, et al. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. Cancer Res 2002 Jun 15; 62 (12): 3347-50.

14. Rahbar A, Stragliotto G, Orrego A, Peredo I, Taher C, Willems J, et al. Low levels of human cytomeglavirus infection in glioblastoma multiforme associates with patient survival; a case-control study. Herpesviridae 2012 Mar 16; 3: 3.

15. Scheurer ME, Bondy ML, Aldape KD, Albrecht T, El-Zein R. Detection of human cytomegalovirus in different histological types of gliomas. Acta Neuropathol 2008 Jul; 116 (1): 79-86.

16. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. Vet Pathol 2005 Jul; 42(4): 405-26.

17. Lau SK, Chen YY, Chen WG, Diamond DJ, Mamelak AN, Zaia JA, et al. Lack of association of cytomegalovirus with human brain tumors. Mod Pathol. 2005 Jun; 18 (6): 838-43.

18. Poltermann S, Schlehofer B, Steindorf K, Schnitzler P, Geletneky K, Schlehofer JR. Lack of association of herpesviruses with brain tumors. J Neurovirol 2006 Apr; 12 (2): 90-9.