مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره‌های۲ و۳ تابستان و پائیز ۱۳۸۸، صفحات ۶۵- ۶۱

بررسی شیوع عفونت فعال سیتومگالو ویروس در دریافت کنندگان پیوند کلیه با روش‌های PCR و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم

شهاب فلاحی[۱] ، حوریه سلیمان جاهی[۱*]، ابراهیم کلانتر[۲] ، عذرا کنارکوهی [۱] ، امل ساکی[۳]

۱)گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲) گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
۳) گروه آمار زیستی ، دانشگاه تربیت مدرس
نویسنده رابط : حوریه سلیمان جاهی، گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۵۶۱ soleim_h@modares.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۳/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۰/۱۵

چکیده:

زمینه و اهداف: ویروس سیتومگال (CMV) از مهم‌ترین پاتوژن‌هایی است که حضورآن در دریافت کنندگان پیوند عضو بررسی شده‌است. این ویروس می‌تواند بیماری و مرگ و میر چشمگیر ایجاد کند. شیوع عفونت CMV در دریافت کنندگان پیوند اعضاء از کشوری به کشور دیگر متفاوت گزارش شده است. روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم نشان دهنده تکثیر ویروس و عفونت فعال است، و روش PCR حضور ویروس را نشان می‌دهد. هدف از این مطالعه تعیین شیوع عفونت فعال CMV در دریافت کنندگان پیوند کلیه با روش‌های PCR و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و بروز آن براساس متغیرهای فصل، سن و جنس بود.

روش بررسی: نمونه‌های ارسال شده بیماران داوطلب پیونداز مراکز پیوند کلیه سراسر کشور، ازسال ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۶، به آزمایشگاه قلهک بررسی شدند. این بررسی با روش‌های PCR و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (pp_{65} antigenemia) انجام گرفت. نتایج با آزمون‌های کای دو و رگرسیون لجستیک تجزیه وتحلیل شدند.

یافته ها: در مجموع ۹۲۳ نمونه بررسی شد. شیوع عفونت CMV با روش های آنتی‌ژنمیا pp65 و PCR , به ترتیب در ۷۱ (۷/۷٪) و ۳۲۳ (۳۵ ٪) نمونه بود. ارتباط معنی داری بین میزان مثبت بودن حضور CMV وسن و جنس مشاهده نشد ($p > 0.05$). بین مثبت بودن حضور CMV و فصل انجام آزمایش ارتباط معنی داری یافت شد($p = 0.01$). بیشترین نتایج مثبت به هر دو روش در فصل بهار بود.

نتیجه گیری : نتایج به روش PCR بیشتر از نتایج روش pp_{65} antigenemia است. هیچ کدام از روش‌ها ارتباط با سن و جنس را نشان نمی‌دهند. عفونت در فصل بهار افزایش معنی دار دارد.

کلید واژه ها: سیتومگالوویروس، اپیدمیولوژی، آنتی ژنمیا pp_{65} , PCR، پیوند کلیه

مقدمه:

عفونت سیتومگالوویروس (CMV) انسانی در سراسر جهان مشاهده شده است. آثار بارز این عفونت در دریافت کنندگان پیوند، از تظاهرات بالینی بیماری حاد CMV تا آسیب به عضو پیوندی یا پس زدن پیوند متفاوت می‌باشد(۲،۱).

علی‌رغم استفاده از داروهای ضدویروسی و تلاش‌های زیادی که برای جلوگیری از این عفونت صورت می‌گیرد ، عفونت با این ویروس هنوز یک عامل مهم بیماری و مرگ و میر بعد از پیوند مغز استخوان و کلیه می‌باشد(۴،۳). مطالعات نشان داده افراد سرم مثبت ازنظر CMV ، در معرض خطر گسترش عفونت یا عود CMV هستند (۵). رخداد بیماری CMV اغلب در یک دوره زمانی حدود ۲۸ و ۷۲ روز بعد از پیوند دیده می‌شود و می‌تواند چندین عضو از جمله ریه و روده را درگیر کند. علی رغم پیشرفت‌های زیاد در این زمینه (تولید داروهای ضدویروسی جدید، درمان ترکیبی) میزان مرگ و میر ناشی از پنومونی در اثر CMV هنوز بالا است(۵).

با در نظر گرفتن اینکه آلودگی با ویروس CMV مهم‌ترین عامل ایجاد بیماری سیتومگال است ،تشخیص زود هنگام آن به منظور جلوگیری از پیشرفت بیماری توصیه شده است. یک روش کلاسیک استاندارد برای تشخیص عفونت CMV در گیرندگان پیوند روش آنتی ژنمیا pp_{65} می‌باشد. در این روش آنتی‌ژن اختصاصی CMV، که به‌وسیله سلول‌ها در مراحل اولیه پس از عفونت بیان می‌شود، مورد تشخیص قرار می‌گیرد(۵)، به هر حال این روش در تعداد کمی از بیماران، به دلیل پایین بودن سطح بیان آنتی‌ژن در گلبول‌های سفید خون، گاهی نتایج منفی کاذب نشان می‌دهد. اما حساسیت فناوری PCR که در دهه‌ی اخیر برای تشخیص DNA ویروس CMV در نمونه‌های خونی به کار گرفته می‌شود، ۱۰۰٪ است. روش PCR به طور کلی برای تشخیص ویروس از pp65 حساس‌تر است، اما قادر به تفکیک عفونت فعال و مخفی نیست. در حالیکه آزمایش pp65 برای تمایز عفونت فعال و مخفی بکار می‌رود. هدف این مطالعه تعیین شیوع عفونت فعال CMV در دریافت‌کنندگان پیوند کلیه با دو روش PCR و PP65آنتی ژنمیا بوداز طرف دیگر بررسی ارتباط بین شیوع عفونت با فصل، جنس وسن از اهداف فرعی مطالعه حاضر بود.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه از نوع توصیفی وآینده‌نگر بود. نمونه‌ها در فاصله‌ی سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۶ از آزمایشگاه قلهک، به عنوان یکی از مهم‌ترین مراکز آزمایشگاهی پیوند در تهران، جمع آوری شد. برای این منظور ۲ لوله ۴ میلی لیتری حاوی EDTA از نمونه خون جمع‌آوری شد. سپس پلاسما با دور500xg برای ده دقیقه سانتریفوژ و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره و نگهداری شد.

روش CMV pp_{65} antigenemia

روش pp_{65} antigenemia به عنوان یک روش تشخیصی معمول با استفاده از کیت Brite^{TM} Turbu(IQ Products, CMV Groningen, Netherlands) انجام شد.

تشخیص آنتی‌ژن pp65 در سلول‌های خون محیطی به تشخیص عفونت CMV حاد یا دوباره فعال شده کمک می‌کند. در این روش از یک ترکیب واجد ۲ آنتی‌بادی منوکلونال (C10/C11) علیه آنتی‌ژن pp65 و به روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم استفاده می‌شود.

استخراج DNA ویروس CMV و انجام PCR :

DNA از ۲۰۰میکرولیتر سلول‌های تک هسته ای خون محیطی با روش فنل – کلروفرم استخراج و درلوله‌های حاوی ۵۰ میکرولیتر بافر، نگه داری شد.

پرایمرهای طراحی شده توسط برنامه (version 3.o5 gene runner (Hastings sottunre Inc برای یک ناحیه حفاظت شده آنتی ژن pp_{65} شامل:

پیشرو 5- TCG CGC CCG AAG AGG 3

پیرو 5- CGG CCG GAT TGT GGA TT3

روش PCR در حجم کلی واکنش ۲۵ µL انجام شد. لوله واکنش واجد ۲/۵ µL بافرPCR ۱۰X (fermentas)، dNTP(10mM) ۰/۵ µL ، ۱µL از DNA taq ۵ u/ µL polymerase ، MgCl2(50mM) ۰/۷۵µL ،بود. ۵ µL از نمونه استخراج شده واجد ۰/۵ µ g و ۰/۵ µL از هر کدام از پرایمرهای پیشرو و پیرو مخلوط شد. مراحل تکثیر مشتمل بر مراحل واسرشتی اولیه در ۹۴درجه به مدت۶ دقیقه، سپس ۳۵ دور شامل: ۵۰ ثانیه در ۹۴ درجه،۴۰ ثانیه در۵۷ ، ۵۰ثانیه در ۷۲درجه و در پایان در ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه بود.

تجزیه و تحلیل آماری:

اطلاعات حاصله در برنامه آماری SPSS وارد شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، از آزمون آماری کای‌دو(Chi-2) و رگرسیون لجستیک(Logistic Regression) استفاده شد. P-value کمتر از ۵ درصد با فاصله اطمینان ٪۹۵ به عنوان حد معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

۹۲۳ نمونه شامل ۵۶۹ (٪۶۱/۶) نمونه مرد و ۳۵۴ (٪۳۸/۴)

نمونه زن بررسی شد. به ترتیب ۳۲۳(٪۳۵) و۷۱(٪۷/۷) نمونه به روش‌های PCR و PP65 مثبت شدند. بین سن، جنس و نتایج هیچ یک از آزمایش‌های PCR و PP65 ، ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد($p > 0.05$).

بیشترین نتایج مثبت با روش PCR (٪۵۰)طی فصل بهار ($p = 0.01$)دیده شد. بیشترین موارد عفونت فعال (PP65 مثبت) هم در فصل بهار (٪۶۰) مشاهده گردید($p = 0.01$) . درصد نتایج مثبت به روش‌های PCR وPP65 در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: نتایج روش‌های آنتی ژنمیا و PCR به تفکیک فصل

آزمایش	نتیجه	بهار	تابستان	پاییز	زمستان	جمع کل
PCR	مثبت	۵۰/%	۱۵%	۱۸%	۱۷%	۱۰۰%
Pp65	مثبت	۶۰%	۲۰%	۲/۹%	۱۷/۱%	۱۰۰%

جدول ۱ درصد نتایج آزمایش‌های PCR و آنتی ژنمیا را در طی چهار فصل سال نشان می‌دهد. آزمون کای دو رابطه بین فصل و نتایج آزمایش PCR و نیز آنتی ژنمیا ($p = 0.0$) را نشان داد.

جدول ۲ نتایج آزمایش‌های PCR و آنتی ژنمیا را برای دو جنس نشان می‌دهد. آزمون کای دو، نشان دهنده عدم ارتباط بین نتایج آزمایش‌های PCR و جنسیت (P=0.31) و آنتی ژنمیا (P=0.638) بود.

جدول ۲: نتایج روش‌های آنتی ژنمیا و PCR به تفکیک جنس

	نتیجه	PCR	pp65
مرد	منفی	%۶۳	%۹۳
	مثبت	%۳۷	%۷
زن	منفی	%۶۷	%۹۱
	مثبت	%۳۳	%۹

برای بررسی ارتباط بین سن با آزمایش‌های PCR و آنتی ژنمیا از رگرسیون لجستیک استفاده شد. ضریب سن در معادله رگرسیون لجستیک به ترتیب برابر ۰،۰۰۵ =β با $p = 0.28$ و ۰،۰۱۳ =β با $p = 0.15$ بود. لذا، نشان دهنده عدم ارتباط بین سن با نتایج آزمایش‌های PCR و آنتی ژنمیا بود.

بحث:

سیتو مگالوویروس انسانی یکی از عفونت‌های شایع در جمعیت‌های انسانی است که در افراد سالم بدون علامت بالینی است. اما، پس از عفونت اولیه برای همیشه در بدن باقی می‌ماند. عفونت حاد در افراد مبتلا به نقص ایمنی و نیز در گیرندگان پیوند عضو بروز می‌نماید (۷،۶). علی رغم وجود داروهای ضد ویروسی مناسب (گان سیکلوویر،فوسکارنت) عفونت CMV هنوز به عنوان یک عامل مهم ایجاد بیماری و مرگ و میر در بیماران پیوندی است، که اغلب علت آن تاخیر در تشخیص و درمان مناسب می‌باشد.

تشخیص با روش کشت سلول و روش‌های سرولوژی معمولا وقت‌گیراست و گاهی حساسیت لازم را ندارند. حضور آنتی ژن pp65 نشان‌دهنده تکثیر ویروس و عفونت فعال است. حال آنکه نتایج مثبت با روش PCR تنها حاکی از حضور ویروس است، که قادر به تمایز بین عفونت فعال و نهفته نمی‌باشد. از آنجا که نسبت وسیعی از جامعه با ویروس CMV آلوده هستند، در غربالگری بیماران برای ارزیابی خطرات عفونت منتشره استفاده از تست pp65آنتی ژنمیا مناسب ولازم به نظر می‌رسد (۸). در مطالعه حاضر شیوع عفونت CMV با روش‌های PCR و PP65 آنتی ژنمیا به ترتیب ۳۵ و ۷/۷ درصد محاسبه شد. نتایج همخوانی نزدیکی با دیگر مطالعات صورت گرفته دارد(۱۲-۹).

از بین متغیرهای مورد بررسی (سن، جنس و فصل) تنها بین میزان مثبت بودن CMV و فصل ارتباط معنی‌دار مشاهده شد. به‌طوری که بیشترین نتایج مثبت مربوط به فصل بهار است. یکی از مهم‌ترین اشکالات در تشخیص عفونت CMV با روش‌های سرولوژی تاخیر در زمان تشخیص می‌باشد. در این موارد آزمایش آنتی‌ژنمیا برای تشخیص بموقع کمک می‌کند(۱). در یک مطالعه نشان داده شد که نتیجه آزمایش آنتی‌ژنمیا ۲ بیمار گیرنده پیوند کلیه، ۸ و ۲۳ روز قبل از مرگ به علت عفونت CMV، منفی بوده‌است(۱).

شک بالینی به بیماری CMV و اقدام جهت تشخیص و درمان زودرس این بیماری در دریافت‌کنندگان پیوند کلیه، به‌خصوص در ۶ ماه اول پس از پیوند، از اهمیت انکارناپذیری برخوردار است(۲).

تجزیه و تحلیل اطلاعات نشان داد که مردان و زنان به ترتیب درگروه‌های سنی ۴۵-۳۶ و ۵۵-۴۶ سال دارای نتایج آنتی‌ژنمیای منفی بیشتری بودند. از سوی دیگر مردان در گروه سنی ۶۵-۵۵ و زنان گروه سنی ۴۵-۳۶ سال بیشترین نتایج مثبت را در این آزمایش نشان دادند.

در آزمایش PCR، مردان گروه سنی ۶۵-۵۵ و زنان گروه سنی ۴۵-۳۶ سال آلودگی بیشتری بهCMV را نشان مب دهند. در مقابل با همین آزمایش مردان در گروه سنی ۳۵-۲۶ و زنان گروه سنی ۴۵-۳۶ نتایج منفی بیشتری دارند. با این حال، تفاوت‌های مشاهده شده بین داده‌ها به اندازه‌ای نیست که رابطه معنی‌دار آماری را بیان کند. در واقع بین سن و جنس با نتایج آزمایش‌ها رابطه وجود ندارد.

نتایج حاکی از وجود ارتباط بین میزان نتایج مثبت روش PCR در فصل بهار است. در یک مطالعه نشان داده شد که پیوند کبد در فصل پائیز یک عامل خطر مهم برای CMV است (۱۳). در مطالعه‌ی دیگری نیتا و همکاران احتمال ارتباط بین بروز بیماری CMV و فصل پائیز را مطرح می‌کنند. به گونه‌ای که بیمارانی که در فصل پاییز پیوند دریافت می‌کنند، احتمال بروز CMV در آنها بیشتر است(۱۴). هر چند که در گزارش‌های دیگر در مورد ارتباط یا عدم ارتباط بین عفونت CMV و فصل یافته‌ها متفاوت هستند (۱۶،۱۵). مطالعات نشان می‌دهد که تعدادی از بیماری‌ها الگوی فصلی دارند. این الگو می‌تواند به عنوان یک عامل مهم در شناسایی اتیولوژی بیماری، مورد توجه قرار گیرد. یکی از ضرورت‌های دیگر که در بررسی ارتباط بین یک عفونت و فصل و تعیین الگوی فصلی وجود دارد، به‌خصوص در مورد ویروس‌هایی مثل CMV، بحث پروفیلاکسی وابسته به فصل است. البته این موضوع نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری:

مطالعه ما نیز مشابه سایر مطالعات انجام شده علاوه بر؛ نشان دادن ارتباط فصلی بین دریافت پیوند کلیه وعفونت CMV با روش‌های حساس، بیانگر این حقیقت است که تشخیص به‌موقع و دقیق فرم فعال عفونت ، ونیز بررسی حضور عفونت نهفته، و شروع فعالیت آن در زمان پیوند از الزامات تشخیص محسوب می‌گردد. این موضوع می‌تواند در ارائه راهکارهای درمانی راهگشا باشد.

فهرست مراجع:

1.Mocarski ES, Shenk T, Pass RF. Cytomegalovirus. In: Knipe DM, Howley PM, ed, *Fields Virology*, Philadelphia, Lippicott Williams&Wilkins. 2007; PP:2701-2772.

2.Kouri V, Resik S, Enamorado A, Moreno D, Garcia S, Acosta B, *etal*. Longitudinal study of herpesviruses in kidney transplant recipients in Cuba. *Clin Infect Dis* 2003 15;**36** (6):818-21.

3.Erice A. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin Microbiol Rev* 1999; **12**(2):286-297.

4.Forman SJ, Zaia JA. Treatment and prevention of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: where do we stand? *Blood* 1994; **83**:2392-2398.

5.Schulenburg A, Watkins-Riedel T, Greinix HT, Rabitsch W, Loidolt H, Keil F*, etal*. CMV monitoring after peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation by pp65 antigen and quantitative PCR. *Bone Marrow Transpl* 2001;**28**: 765 – 768.

6.B. Vahid, D Salerno, T Raman. CMV Pneumonia in a Renal-Transplant Recipient: Diagnosis and Treatment. . *Int J Pulm Med* 2005; 5. 2

7.J Carstens, H K Andersen, E Spencer, M Madsen. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2007; **8**(4): 203-212

8.Ho, SK, Lo, IK, Cheng, T, Chan M. Rapid cytomegalovirus pp65 antigenemia assay by direct erythrocyte lysis and immunofluorescence staining. *J. Clin. Microbiol* 1998;**36**:638-640

9.Rao M, Cytomegalovirus infection after renal transplantation - the Indian experience, *Indian J Nephrol* 2002;**12**: 16-24

10.Sola R, Diaz J M, Guirado L, Ravella N, Vila L, Sainz Z,*etal*. Significance of cytomegalovirus infection in renal transplantation, Transplan 2003; Proc. **35**: 1753–1755.

11.Rao M, Finny GJ, Abraham P, Juneja R, Thomas PP, Jacob CK, *et al.* Cytomegalovirus infection in a seroendemic renal transplant population: A longitudinal study of virological markers. *Nephron* 2000**; 84**: 367-373.

12.Aquino VH, Figueiredo LTM. High prevalence of renal transplant recipients infected with more than one cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *J Med Virol* 2000; **61**: 138-142.

13.Robinson LE, Hilinski J, Graham F, Shaw M, Nesheim S, Hymes L. Cytomegalovirus (CMV) Disease in Pediatric Renal Transplant Recipients: Identification of a Novel Risk Factor. Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother 1999; **39**: 610 , Emory Univ, Atlanta, GA.

14.Nina S, Marilyn M W, Timothy G. Seasonal pattern of early mortality and infectious complications in liver transplant recipients. *Liver Transplantat* 2001**, 7**(10): 884-889.

15.Robinson LG, Hilinski J, Graham F, Hymes L, Beck-Sague C.M. Hsia J, *et al.* Predictors of cytomegalovirus disease among pediatric transplant recipients within one year of renal transplantation. *Pediatric Transplant* 2000**; 6**(2):111-118.

16.Tazawa y, Numazaki y. Cytomegalovirus Infection in acute Respiratory Tract Disease accompanying Hepatitis in Infancy. *Tohoku J. exp. Med* 1988; **155**:349-354