مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد
سال یازدهم ، شماره سوم ، پاییز ۱۳۸۲ ، ص ۱۰
Archive of SID

مقایسه الیزا با تکنیک آنتی ژنمی (pp65) در تشخیص عفونت های ویروس سیتو مگال در گیر ندگان پیوند کلیه

مهدی راه پیما [۱] ، دکتر منوچهر مکوندی [۲] ، دکتر علیرضا سمرباف زاده [۳] ، دکتر عبدالحسین جوادنیا [٤] ، دکتر حیات ممبینی [٥] ، دکتر ناصر سیم فروش [٦]

چکیده

مقدمه : ویروس سیتومگال به عنوان یکی ازعوامل خطر در دریافت کنندگان پیوند کلیه محسوب می گردد. بطور معمول عفونت با این ویروس درمیان دریافت کنندگان پیوند کلیه منجربه رد عضوپیوندی و دربرخی مواقع باعث مرگ بیمار می شود لذا بررسی وضعیت بیماران نسبت به عفونت فعال با این ویروس ضروری می باشد. هرچند روشهای تشخیص آزمایشگاهی جهت کمک به پزشک برای پیشگیری یادرمان عفونت های ویروس سیتومگال وجوددارد اما برخی از این روشها در ارزیابی وضعیت بیماران از ارزش کافی برخوردارنمی باشد. **روش بررسی :** هدف ازاین مطالعه مقایسه الیزا با تکنیک آنتی ژنمی است به همین منظور مطالعه ای بصورت توصیفی-مقطعی طی سالهای ۸۱-۱۳۸۰ برروی ۵۰ دریافت کننده پیوندکلیه انجام گرفت. دو نمونه خون ازهر بیمار گرفته شد. نمونه اول (۶ میلی لیتر) واجد فاکتور ضدانعقاد که برای روش آنتی ژنمی بکار برده شد و نمونه دوم (۳ میلی لیتر) بدون فاکتور ضدانعقاد که برای روش الیزا استفاده گردید. جهت آنالیز نتایج از روشهای آماری مجذورکای و Relative prevalance استفاده گردید. **یافته ها :** نتایج نشان داد که ۱۰٪ با روش آنتی ژنمی مثبت بودند. تمامی بیماران با روش الیزا - IgG ، ۸۴٪ IgGB و ۶٪ IgM مثبت بودند. اختلاف آماری میان آنتی ژنمی و الیزا جهت تشخیص عفونت فعال ویروس سیتومگال معنی دار بود ($p<0.05$). سن بیماران در نتایج تاثیر داشت ($p<0.05$) ولی چنین ارتباطی میان جنسیت وجود نداشت. **نتیجه گیری :** مطالعه حاضرنشان داد که الیزا جهت تشخیص آزمایشگاهی عفونتهای فعال ویروس سیتومگال قابل اعتماد و کافی نمی باشد ، پیشنهاد می گردد که افرادی که تست الیزا درآنها مثبت است فعالیت بیماری با تکنیک آنتی ژنمی کنترل و ملاک تجویز داروی ضدویروسی تکنیک آنتی ژنمی مثبت باشد.

واژه های کلیدی : آنتی ژنمی ، PP65 ، پیوند کلیه ، ویروس سیتومگال

مقدمه

درهرسال هزاران بیمارپیوندی دراثرعفونتهای متعدد ازجمله عفونتهای ویروسی و یا باکتریایی با خطررد پیوند و حتی مرگ مواجه می شوند [۱،۲].

ویروس سیتومگال انسانی یا ویروس هرپس انسانی شماره ۵- جزء خانواده ویروس های هرپس می باشد. ویژگی بارز ویروس های این خانواده درصد بالای شیوع آنان و باقی ماندن بصورت نهفته پس ازعفونت اولیه می باشد که در

۱- مربی گروه ویروس شناسی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد
۲- استاد گروه ویروس شناسی
۳- استادیار گروه ویروس شناسی
٤و٥- دانشیار گروه ارولوژی
٦- استاد گروه ارولوژی
۲و۳و٤و٥- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی اهواز
٦- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی -تهران

www.SID.ir

Archive of SID

صورت تضعیف سیستم ایمنی توانایی فعال شدن را دارند. ویروس سیتومگال که درافراد واجد سیستم ایمنی طبیعی عفونتهای تحت حاد بالینی مشابه سندرم منونوکلئوز عفونی ایجاد می نماید(۳) ، به عنوان شایعترین عفونت فرصت طلب ویروسی در میان گیرندگان پیوند بشمار می آید و پس ازعمل پیوند در ۴۰ تا ۷۰ درصد از بیماران فعال شده و ممکن است با تظاهرات متعدد از قبیل تب ، کاهش لکوسیت ، کاهش پلاکت ، هپاتیت ، ذات الریه و عفونت دستگاه گوارش ، رد پیوند و حتی مرگ بیمار همراه شود [۴].

مرگ ومیر در این دسته از بیماران با وجود در دسترس بودن داروهای مؤثر علیه این ویروس عدم تشخیص صحیح و به موقع عفونت فعال می باشد. لذا تشخیص زود هنگام و تمایز آلودگی از عفونت فعال در این دسته ازبیماران جهت درمان به موقع از مشکلات پس از پیوند محسوب می شود [۵].

در کشور ما جهت بررسی وضعیت بیماران پیوندی نسبت به ویروس سیتومگال از روش سرولوژی الیزا استفاده می شود که به علت تضعیف شدید سیستم ایمنی در دوره پس از پیوند و به دلیل مصرف داروهای مهارکننده سیستم ایمنی این روش در این دسته از بیماران اغلب گاهی نگر بوده و از ارزش کافی برخوردار نمی باشد [۵]. به دلیل فعال شدن مکررعفونت نهفته ویروس سیتومگال و یا سایر ویروسهای خانواده هرپس ویروس و واکنش متقاطع سرولوژی تیتر آنتی بادی IgG درآنان بالا می باشد و آنتی بادی IgM ممکن است برای ماهها وجود داشته باشد که نمی تواند نشان دهنده عفونت حاد در آنان قلمداد گردد [۶].

آزمایش آنتی ژنمی (antigenemia) یا pp65 در سالهای اخیر جهت تشخیص به موقع عفونت فعال و پیش از شروع علایم بالینی در این دسته از بیماران معرفی گردیده است [۷]، که این آزمایش از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار بوده و ارزش اخباری منفی آن در این بیماران ۱۰۰٪ می باشد [۸]. با توجه به اهمیت حیاتی عضو پیوندی و سلامت فرد پیوندی و هزینه بالای عمل پیوند و مراقبت های پس از آن نیاز به جایگزینی روش های دقیق تر احساس می شود که هدف از این مطالعه معرفی روش آنتی ژنمی و کاربرد آن در این دسته از بیماران می باشد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی و به روش تحلیلی و مقطعی طی سالهای ۸۱-۱۳۸۰ در شهر اهواز بر روی ۵۰ بیمار دریافت کننده ی پیوند کلیه در بیمارستان گلستان انجام شده است.انتخاب ۵۰ بیمار به چند دلیل بود،دلیل اول به علت محدود بودن عمل پیوند کلیه در شهر اهواز بود ودلیل دیگر استفاده از مطالعات مشابه خارجی بود که از حجم مشابه استفاده شده بود.دو نمونه خون از هر بیمار به طور همزمان گرفته شد که از مدت پیوند آن بیش از چهار ماه نگذشته بود.نمونه اول به حجم ۶ میلی لیتر که واجد ماده ضد انعقاد بود وجهت روش آنتی ژنمی بکار برده شد و نمونه دوم به حجم ۳ میلی لیتر که فاقد ماده ضد انعقاد بود وسرم آن برای روش الیزا استفاده گردید.

روش آنتی ژنمی با استفاده از کیت Clonab ساخت شرکت Biotest آلمان انجام شد که در این روش بلافاصله پس از خون گیری، لوکوسیت های بیمار توسط محلول ۵٪ دکستران جدا گردید وبر روی لام گسترش داده شدندو سپس آنتی بادی منوکلونال pp65 جهت بررسی وجود آنتی ژن pp65 در لوکوسیت ها به گسترش اضافه گردید و پس از انکوباسیون به مدت یک ساعت در مکان مرطوب با بافر TBS شستشو داده شدند و به روش ایمونو سیتو شیمیایی جهت تشخیص واکنش آنتی بادی و آنتی ژن رنگ آمیزی گردیدند و در زیر میکروسکوپ نوری جهت وجود آنتی ژن pp65 بررسی شدند.

در نمونه های مثبت هسته لوکوسیت ها به رنگ قرمز و در نمونه های منفی به رنگ آبی مشاهده می شدند.مشاهده حد اقل یک لوکو سیت با هسته قرمز رنگ به عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شد. جهت اطمینان از صحت آزمایش در کنار آزمایش از لام های مثبت ومنفی موجود در کیت استفاده شد.

کیت های الیزا ساخت شرکت Biotest آلمان بودند. در روش الیزا - IgG کمی از سرمها رقت $\frac{۱}{۱۶۸}$ ودر روش IgM رقت $\frac{۱}{۲۱}$ ودر الیزا IgGB و IgG کیفی رقت $\frac{۱}{۴}$ طبق راهنمای

www.SID.ir

Archive of SID

کیت تهیه گردید و پس از انجام مراحل بعدی طبق راهنمای موجود در هر کیت، نتایج توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانو متر قرائت گردیدند.

Cut off value کیت های IgG و IgGB طبق محاسبه از روی راهنمای کیت برابر میانگین جذب نوری کنترل منفی به علاوه ۰/۳۰۰ بود که عدد ۰/۵۶۰ وبرای IgM برابر میانگین cut off sample بود که عدد ۰/۴۵۰ به دست آمد. IgG و IgGB Cut off value > حد مشکوک> Cut off value-10% IgM Cut off sample > حد مشکوک> 0.9 Cut off sample تیتر بالاتر از ۲۰۰Iu/ml به عنوان تیتر مثبت در نظر گرفته شد.

نتایج توسط روشهای آماری مجذور کای و Relative Prevalance تجزیه و تحلیل گردید.

نتایج

بیماران مورد مطالعه در ۶ گروه سنی قرار داشتند. ۱۱ بیمار در گروه سنی ۱۹-۱۰ سال، ۱۳ بیمار ۲۹-۲۰ سال، ۱۲ بیمار ۳۹-۳۰ سال، ۱۱ بیمار ۴۹-۴۰ سال. ۱۰ بیمار ۵۹-۵۰ سال و ۲ بیمار در گروه سنی بالاتر از ۶۰ سال قرار داشتند. از بیماران مورد بررسی ۳۲ نفر مرد(۶۴٪ جمعیت بیماران) و ۱۸ نفر زن(۳۴٪ جمعیت بیماران) بودند. جوان ترین بیمار با ۱۴ سال سن و مسن ترین بیمار با ۶۲ سال سن که میانگین سنی بیماران ۳۸/۳ سال بود(جدول۱). از ۵۰ بیمار مورد مطالعه ، ۱۰٪ به روش آنتی ژنمی مثبت تشخیص داده شدند که ۴ مورد مرد و ۱ مورد زن بود.

جدول ۱ : میانگین تیتر IgG بر حسب گروه سنی

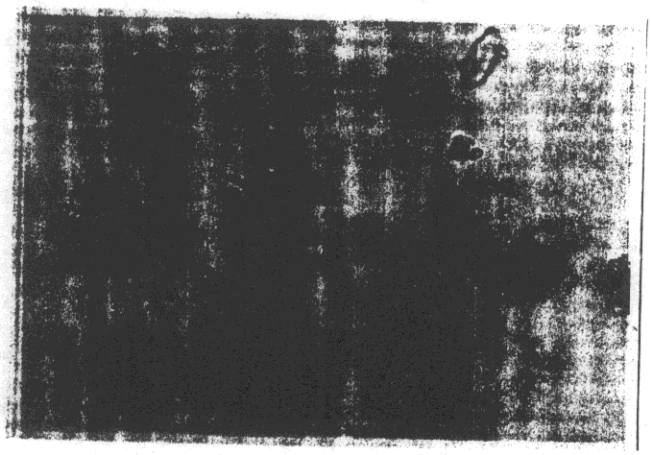
گروه سنی بیماران بر حسب سال	میانگین تیتر IgG برحسب UI/ml
۱۰-۱۹	۳۱۱
۲۰-۲۹	۳۲۷
۳۰-۳۹	۳۵٤
٤۰-٤۹	۳۳۱
۵۰-۵۹	۳۲۲
≥٦۰	۳۰۲

۵/۵٪ جمعیت زنان و۱۲/۵٪ مردان را تشکیل می دادند. برآورد آماری ارتباط معنی داری میان موارد مثبت آنتی ژنمی و جنس نشان نداد ($p>0.05$). از ۵ مورد مثبت به روش آنتی ژنمی ، ۲ مورد در گروه سنی ۳۹-۳۰ سال ، ۲ مورد در گروه سنی ۴۹-۴۰ سال و ۱ مورد در گروه سنی ۵۹-۵۰ سال قرار داشتند. برآورد آماری نشان داد که در مطالعه ما ارتباط معنی داری بین موارد مثبت آنتی ژنمی و سن وجود دارد ($p<0.05$).

تمامی ۵۰ بیمار از نظرآنتی بادی IgG ویژه ویروس سیتومگال مثبت بودند و تیتر همگی آنان مثبت بود. میانگین تیتر بیماران در گروههای سنی نشان داده شده است. برآورد آماری نشان داد که اختلاف معنی داری بین موارد مثبت آنتی ژنمی و روش الیزا درتشخیص عفونت فعال وجود دارد($p<0.05$) .

۴۲ نفر از بیماران دارای آنتی بادی IgGB ویروس پسیتومگال (۲۷ نفر مرد و ۱۵) نفر زن بودندکه ۸۴/۷٪ جمعیت مردان و۸۳/۴٪ جمعیت زنان را تشکیل می داد.

۶٪ بیماران دارای آنتی بادی IgM ویژه ویروس سیتومگال بودند که شامل ۲ نفر زن و ۱ نفر مرد بود که آنتی ژنمی دراین ۳ نفر منفی بود که ۱۱/۱٪ جمعیت زنان و ۳/۱٪ جمعیت مردان را تشکیل می داد و جذب نوری ما بقی بیماران کمتر از Cut Off Value بود و هیچکدام در حد مشکوک قرار نداشت.



شکل ۱ : ۳ نمونه مثبت ویروس سیتومگال انسانی با روش آنتی ژنمی

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

عفونت فعال ویروس سیتومگال در بیماران پیوندی از مشکلات عمده پس از پیوند می باشد. امروزه با در دسترس بودن داروهای ضدویروسی می توان از بروز بیماریهای ویروس سیتومگال جلوگیری نمود. دو استراتژی برای این منظور می توان در نظر گرفت. استراتژی اول ، تجویز داروهای ضدویروسی به تمامی دریافت کنندگان پیوند می باشد بدون اینکه عفونت فعال در آنها به اثبات رسیده باشد که به آن پروفیلاکسی عمومی گویند. از معایب این روش میتوان افزایش هزینه های درمان ، اثرات جانبی دارو بر بیماران و ظهور نژادهای مقاوم به دارو را نام برد.

استراتژی دوم تجویز دارو فقط به آن دسته از بیماران پیوندی که دلیلی برفعال بودن عفونت (آنتی ژنمی مثبت) درآنهاوجود دارد ولی علایم بیماری هنوز در آنان بروز نکرده است انجام گردد که به آن درمان اولیه گویند.مزایای این روش شامل کاهش هزینه های درمان ؛ جلوگیری از اثرات جانبی دارو بر بیمارانی که نیاز به درمان ندارند و پیشگیری از ظهور نژادهای مقاوم به دارو می باشد[۹].

گرچه کشت ویروس هنوز هم به عنوان روش طلایی استاندارد (gold standard) برای تشخیص ویروس سیتومگال مطرح می باشد ولی ارزش کاربردی آن در بیماران پیوندی به دلیل وقت گیر بودن آن که نیاز به ۶-۱ هفته زمان جهت تشخیص دارد کم می باشد[۳].

روشهای سرولوژی در این دسته از بیماران بطور معمول گذشته نگر بوده و در این دسته از بیماران ارزش چندانی ندارد[۵]، در مطالعه ما تمامی ۵۰ بیمار از نظر آنتی بادی IgG مثبت بودند ولی تنها ۱۰٪ آنها دارای عفونت فعال بودند. مشکل دیگر این است که به دلیل تضعیف شدن سیستم ایمنی در آنها ، هم در دوره پیش از پیوند و هم در دوره پس از پیوند و فعال شدن مکرر ویروس تعیین آنتی بادی IgM برای تشخیص عفونت حاد ارزش چندانی ندارد[۱۰]، بطوری که در مطالعه ما ۳ نفر از بیماران که از نظر آنتی بادی IgM مثبت بودند ولی با روش آنتی ژنمی عفونت حاد در آنان تشخیص داده نشد.

علت اختلاف موارد مثبت میان روش الیزا-IgG و الیزا-IgGB اینست که در روش الیزا-IgGB از گلیکو پروتئین B که آنتی ژن اختصاصی ویروس سیتومگال میباشد استفاده شده است که با آنتی بادی هایی که ممکن است بر علیه سایر ویروس های خانواده هرپس ایجاد شود واکنش متقا طع نمی دهد[۱۱].

مطالعات نشان داده است که میزان رخداد عفونت فعال ویروس سیتومگال دردر یافت کنندگان پیوند طی ۴ ماه پس از پیوند ۴۰ تا ۷۰ درصد است [۲]. در مطالعه حاضر عفونت فعال در ۱۰٪ از این بیماران شناسایی گردید.

مطالعه ای که Van den Berg و همکارانش در مقایسه روش سرولوژی با آنتی ژنمی بر روی ۴۷ بیمار پیوندی انجام دادند ۵۱٪ به روش آنتی ژنمی و ۹۵٪ به روش الیزا مثبت بودند[۱۲].

عواملی که می توانند در نتایج ما موثر بوده باشند عبارتنداز:

۱-پروفیلاکسی بیماران پس از عمل پیوند به طوری که تمامی ۵۰ بیمار داروی آسیکلو ویر در یافت کرده بودند.

۲- موارد مثبت آنتی ژنمی به طور معمول در هفته سوم الی هفتم پس از پیوند ظاهر می شود. نمونه گیری در مطالعه ما در هفته های مختلفی صورت گرفت که میتواند در نتایج ما موثرباشد. از ۶۲٪ نمونه های به دست آمده در هفته دوم تنها ۳/۳٪ مثبت بودند در حالی که ۱۰۰٪ نمونه های به دست آمده در هفته سوم و پنجم مثبت بودند (ازنظرآنتی ژنمی) .

نتیجه گیری: از آنجا که عمل پیوند سالهای متمادی است که در کشور ما انجام می شود و با توجه به اینکه عفونت ویروس سیتومگال در این دسته از بیماران می تواند باعث رد پیوند و یا مرگ بیمار شود تشخیص زود هنگام عفونت فعال دارای اهمیت زیادی می باشد. بر اساس نتایج مطالعه ما روش سرولوژی الیزا در این دسته از بیماران از ارزش کافی برخوردار نبوده و نمی توان عفونت فعال را در آنان به موقع تشخیص داد لذا توصیه می گردد از روش های دقیق تر از جمله آنتی ژنمی بعنوان مکمل تستهای سرولوژی استفاده گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Cainelli . F , Vento . S. ***Infections and solid organ ransplant rejection : a cause- and - effect relationship ?*** Lancet Infect Dis 2002; 2:539.

2- Their M, Ronnholm K,Sairanen H, et al. ***Serum c-reactive protien in pediatric kidney and transplant.*** Pediatr Transplant 2002 ; 6 : 153-60.

3- Jawetz , Melnick , Adelberg, et al. ***Herpesviruses. In: jawetz, melnick and adelberg,s medical microbiology.*** 21 st ed. Norwalk: Appleton and Lange, 2001:370-90.

4- Stroch.G.A. ***Viral infection in immunocompromised patients.*** In: Diagnostic Virology. 1 st ed. New York : Churchill- Livingstone, 2001 : 203-32.

5- Ho. S.K.N , Lo. C, Cheng. I.K.P , Chan. T. ***Rapid cytomegalovirus PP65 antigenemia assay by direct erytrocyte lysis and immunoflurescence staining.*** J clin Microbiol 1998; 36; 638-40.

6- Deyi .Y.M ,Goubau. P , Bodeus. M. ***Fals-positive IgM antibody test for cytomegalovirus in patients with acute Epestien-Barr virus infection.*** Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:557-6-.

7- Bein. G, Bitsch. A, Hoyer. J, Kirchner. H. ***The detection of human cytomegalovirus immediate early antigen in peripheral blood leucocytes.*** J Immunol Methods 1991; 137: 175-80.

8- Plachter. B. ***Monoclonal antibodies against cytomegalovirus protiens as tool in diagnostics and research.*** Biotest Bulletin 1995; 5: 211-20.

9- Robin. P,Thomas. F.S , Mark. E & et al. ***Detection of cytomegalovirus DNA in sera of liver transplant recipients.*** J. Clin Microbiol 1994;32:1431-4.

10- Giuseppe. G , Donato. Z , Maurizio. P & et al. ***Monitoring of human cytomegalovirus infections and Ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia and DNAemia.*** J. Infect Dis 1991 , 164 : 488-98.

11- Minoru. A , Tohru. S , Tsugiya. M & et al. ***Different antibody response to a neutralizing epitope of human cytomegalovirus glycoprotein B among seropositive individuals.*** J. Med Virol 1994 , 43 : 386-92.

12- Van den Berg Ap, Klompmaker IJ, Haagsma EB & et al. ***Antigenemia in the diagnosis and monitoring of active cytomegalovirus infection after liver transplantation.*** J. Infect Dis 1991; 164: 265-70.

www.SID.ir