

فراوانی عفونت فعال سیتومگالوویروس در گیرندگان کلیه استان کرمانشاه با استفاده از روش های الایزا و Real-Time PCR

سمیرا تنها^۱، نصراله سهرابی*^۲، داریوش رئیسی^۳

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد سنندج

۲- دکترای باکتری شناسی، استادیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۳- متخصص داخلی، استادیار گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

*نشانی برای مکاتبه: کرمانشاه، بلوار دولت آباد، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، na.sohrabi@yahoo.com

دریافت مقاله: تیر نود و پنج پذیرش برای چاپ: شهریور نود و پنج

چکیده

سابقه و هدف: عفونت فعال ناشی از سیتومگالوویروس از مشکلات عمده در دریافت کنندگان کلیه است که می تواند مرگ و میر بالایی در این بیماران به همراه داشته باشد. هدف مطالعه، تعیین فراوانی عفونت فعال سیتومگالوویروس در گیرندگان کلیه استان کرمانشاه با استفاده از روش های الایزا و Real-Time PCR بود.

روش کار: مطالعه حاضر یک مطالعه توصیفی مقطعی می باشد که بر روی ۱۴۲ بیمار گیرنده کلیه استان کرمانشاه در سال های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ انجام شده است. اطلاعات دموگرافیک بیماران ثبت شد. نمونه های سرم بیماران با استفاده از روش های الایزا و Real-Time PCR، از نظر وجود آنتی بادی های Igm، IgG ضد سیتومگالو ویروس و همچنین DNA ویروس بررسی شد. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: از ۱۴۲ بیمار مورد مطالعه، ۹۳ مورد (۶۵/۵٪) مرد بودند. میانگین سنی بیماران ۲۹/۴۳±۴۷/۶۱ سال بود. با توجه به نتایج تست الایزا، ۱۳۰ مورد (۹۱/۵٪) از نظر IgG و ۵۳ مورد (۳۷/۳٪) از نظر وجود Igm مثبت بودند که از این تعداد، در ۵۱ مورد (۳۵/۹٪)، وجود DNA ویروس با استفاده از روش Real-Time PCR ثابت شد. ارتباط معنی داری بین سن، جنس با عفونت فعال سیتومگالوویروس مشاهده نگردید.

نتیجه گیری: میزان شیوع عفونت فعال سیتومگالوویروس در بین بیماران پیوند کلیه بالا است و با استفاده از روش Real-Time PCR با سرعت و دقت بیشتری می توان عفونت فعال این ویروس را شناسایی کرد.

واژگان کلیدی: سیتومگالوویروس، پیوند کلیه، الایزا، Real-Time PCR

مقدمه

سیتومگالوویروس انسانی عضوی از خانواده هرپس ویروس ها است که در میزبان آلوده شده برای همیشه باقی می ماند (۵). این ویروس دارای DNA دو رشته ای حاوی بیش از ۲۴۰ kbp و قابلیت کدگذاری بیش از ۲۰۰ فراورده پروتئینی است (۶، ۷). این ویروس ۹۰-۵۰ درصد افراد جوامع مختلف را در طول حیات خود آلوده می سازد و عفونت اولیه معمولاً خاموش و تحت بالینی است (۹، ۸). عفونت سیتومگالوویروس در گیرندگان کلیه با توجه به سرکوب سیستم ایمنی در این بیماران شایع بوده و باعث بروز علائم شدیدی از جمله پنومونی، هپاتیت، کریورتنیت و در مواردی مرگ این بیماران می شود (۱۰). این ویروس

در حال حاضر یکی از مشکلات بعد از عمل پیوند اعضای بدن، بروز عفونت های مختلف میکروبی خصوصاً عفونت های فرصت طلب است (۱). اغلب عفونت های مهم در این بیماران در طول ۳ تا ۴ ماه بعد از عمل رخ می دهند (۲). عواملی مانند استفاده از داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی، واکنش های آلو گرافت، مشکلات در رابطه با جراحی (مانند استرس جراحی و عفونت های بیمارستانی)، دریافت خون آلوده در حین جراحی و اثرات مستقیم یا غیرمستقیم بیماری زمینه ای، میزان بروز عفونت های فرصت طلب را افزایش می دهد (۳، ۴). یکی از شایع ترین عوامل فرصت طلب در بیماران پیوندی، سیتومگالوویروس (Cytomegalovirus) CMV است.

DNA ویروس را نشان داده و عفونت‌های فعال سیتومگالوویروسی را شناسایی می‌کند با توجه به اهمیت عفونت سیتومگالوویروس در بیماران پیوندی، پژوهش حاضر به هدف تعیین فراوانی عفونت فعال سیتومگالوویروس در گیرندگان کلیه استان کرمانشاه با استفاده از روش‌های الایزا و Real Time PCR در سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ انجام شد.

روش کار

پژوهش حاضر از نوع توصیفی-مقطعی است. با استفاده از روش نمونه‌گیری در دسترس از ۱۴۲ دریافت‌کننده کلیه مراجعه کننده به بیمارستان‌های استان کرمانشاه در سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ نمونه خون گرفته شد و حداکثر ۲ ساعت پس از نمونه‌گیری سرم کلیه نمونه‌ها، جداسازی شد و تا روز انجام آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تعیین آنتی‌بادی ضد سیتومگالوویروس از نوع IgG و IgM، از روش الایزا و کیت تشخیصی رادیم (Radim) ایتالیا استفاده شد. برای انجام تست Real Time PCR ابتدا DNA نمونه‌ها، با استفاده از کیت استخراج DNA جداسازی شد. روش Real-Time PCR بر پایه‌ی کاوشگر Taqman-MGB probe و براساس دستورالعمل‌های خاص این روش انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ و آزمون مربع کای استفاده شد. سطح معنی داری نتایج کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

سلول‌های سیستم خون ساز را آلوده می‌سازد و با تداخل در اعمال سلول‌های ایمنولوژیک، از خود محافظت می‌نماید (۹). محل تجمع سلولی CMV لوکوسیت‌ها به خصوص سلول‌های تک هسته‌ای، سلول‌های اپیتلیال و غدد بزاقی است. در عفونت فعال، ویروس ممکن است در ادرار، بزاق، خون، اشک و شیر نیز مشاهده شود (۱۱، ۵). سیتومگالوویروس می‌تواند به وسیله تزریق خون و فرآورده‌های آن، پیوند اعضا و همچنین پیوند سلول‌های بنیادی منتقل گردد (۸).

درمان موثر عفونت سیتومگالوویروسی نیاز به تشخیص آن در مراحل اولیه عفونت دارد. روش‌های متداول شناسایی عفونت سیتومگالوویروس شامل: کشت ویروس، تست سنجش آنتی‌بادی‌های IgG و IgM با استفاده از روش‌هایی مانند الایزا (ELISA) و روش‌های مولکولی مانند PCR است (۱۲). هر چند وجود آنتی‌بادی IgM در سرم بیماران می‌تواند نشان دهنده‌ی عفونت اخیر سیتومگالوویروس باشد اما نمی‌تواند به طور دقیق عفونت فعال با این ویروس را نشان دهد. روش PCR حساسیت بالایی جهت شناسایی ویروس در نمونه‌های ادرار، خون، پلاسما و مایع مغزی نخاعی دارد در صورتی که روش کشت زمان بر بوده و انجام آن نیز مشکل تر است (۵).

در سال‌های اخیر با توجه به اهمیت سنجش کمی عوامل عفونی به خصوص در مورد ویروس‌ها، از روش Real Time PCR استفاده می‌گردد که علاوه بر شناسایی دقیق این عوامل، وجود

جدول ۱- توزیع دریافت کنندگان پیوند کلیه براساس جنس و نتیجه تست الایزا و Real-Time PCR برای سیتومگالوویروس. کرمانشاه-۹۳-۱۳۹۲

متغیر	جنسیت	مرد	زن	کل
بیماران شرکت کننده در مطالعه		۹۳ (۶۵/۵)	۴۹ (۳۴/۵)	۱۴۲ (۱۰۰)
موارد مثبت IgG		۸۴ (۶۴/۶)	۴۶ (۳۵/۴)	۱۳۰ (۱۰۰)
موارد مثبت IgM		۳۱ (۵۸/۵)	۲۲ (۴۱/۵)	۵۳ (۱۰۰)
نتایج Real-Time PCR		۲۹ (۵۶/۸)	۲۲ (۴۳/۲)	۵۱ (۱۰۰)

بحث

در دهه های اخیر به دلیل استفاده از روش های درمانی پیشرفته ، امید به بهبود ویا افزایش طول عمر بیماران ، روند رو به رشدی را داشته است. از جمله این روش های درمانی ، پیوند اعضای بدن و از جمله کلیه است. روند پیوند کلیه ، نیاز به سرکوب گسترده سیستم ایمنی دارد که امکان بروز عفونت های فرصت طلب را در این بیماران به شدت افزایش می دهد. یکی از شایع ترین این عوامل ، سیتومگالوویروس است که شیوع بالایی در بیماران پیوند کلیه دارد که علاوه بر رد پیوند می تواند موجب مرگ این بیماران گردد (۴-۱). از طرف دیگر شناسایی به موقع این ویروس و درمان این عفونت ها با داروهایی مانند گان سیکلوویر و فوسکارنت ، می تواند در بقای این بیماران ، اهمیت خاصی داشته باشد (۱۳). روش های تشخیصی مختلفی برای شناسایی عفونت های سیتومگالوویروسی استفاده می - شود که مهمترین آن ها شناسایی و اثبات وجود آنتی بادی های ضد ویروسی با روش هایی مانند الایزا و روش های مولکولی مانند PCR است. با توجه به این نکته که تاکنون مطالعه ای در این خصوص در استان کرمانشاه انجام نشده است ، این مطالعه با هدف تعیین فراوانی عفونت فعال سیتومگالوویروس در دریافت کنندگان کلیه استان کرمانشاه در سال های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ با استفاده از روش های الایزا و Real Time PCR انجام شد.

نتایج این مطالعه در خصوص میزان موارد مثبت IgG نشان داد که ۹۱/۵٪ از بیماران از نظر این آنتی بادی مثبت بودند که با میزان شیوع این آنتی بادی در بیماران پیوند کلیه مطالعات انجام شده در کشورهای به خصوص در حال پیشرفت مطابقت دارد. در مطالعه ای Obeid از عربستان سعودی (۱۴)، مطالعه ای Haile از کشور اریتره (۱۵)، مطالعه ای Andrew از کشور غنا (۱۶) و مطالعه ای Enan از کشور سودان (۱۷) میزان شیوع آنتی بادی IgG ضد سیتومگالوویروس به ترتیب ۹۹/۳٪ ، ۹۰٪ ، ۷۷/۶٪ و ۱۰۰٪ گزارش شده است. شیوع بالای این آنتی بادی در بین کشورهای جهان سوم ، می تواند در ارتباط با وضعیت اقتصادی ، اجتماعی و بهداشتی پایین این جوامع باشد (۱۸).

نتایج مطالعه ما ، با استفاده از روش الایزا نشان داد که ۵۳ مورد (۳۷/۳٪) از بیماران پیوندی مورد مطالعه از نظر آنتی بادی IgM ضد سیتومگالوویروس مثبت بودند. این نتایج با نتایج مطالعه خامنه که در سال ۱۳۹۲ انجام شده و این میزان را ۳۷/۵٪ نشان داده ، مطابقت دارد (۱۹). اما در مقایسه با مطالعه Obeid و همکاران و همچنین مطالعه ای Enan که میزان موارد مثبت آنتی بادی IgM را به ترتیب ۲۷/۳٪ و ۶/۱٪ گزارش نموده اند (۱۷ و ۱۴)، مقادیر بالاتری را نشان می دهد. هر چند که وجود آنتی بادی IgM می - تواند نشان دهنده وجود عفونت اخیر و یا عفونت کنونی در این بیماران باشد اما همیشه دال بر عفونت فعال نیست. زیرا نتایج تست های سرولوژیک و از جمله الایزا می تواند تحت تاثیر تزریق خون ، آنتی بادی درمانی و واکنش های متقاطع ناشی از عفونت های

ویروسی دیگر قرار گرفته و تشخیص عفونت فعال ویروسی سیتومگالوویروس را با استفاده از این روش محدود سازد. نتایج تست Real-Time PCR در این مطالعه نشان داد که ۵۱ مورد (۳۵/۹٪) از بیماران از نظر این تست و وجود DNA ویروس سیتومگالوویروس مثبت بودند که همگی آن ها از نمونه هایی بودند که از نظر وجود آنتی بادی IgM مثبت بودند. نتایج این مطالعه با مطالعه Obeid که نشان داد تمام موارد مثبت از نظر وجود آنتی بادی IgM ضد سیتومگالوویروس ، تست Real-Time PCR مثبت داشتند ، همخوانی داشت ، اما با نتایج مطالعه Enan که نشان داد که مواردی از نمونه های مثبت از نظر تست Real-Time PCR ، تست IgM منفی داشته و فقط از نظر تست مثبت بودند ، متفاوت بود. از نظر میزان موارد مثبت تست Real-Time PCR در مقایسه با مطالعات دیگری که توسط Durand در سال ۲۰۱۳ (۲۰) ، Cariani در سال ۲۰۰۷ (۲۱) و Enan در سال ۲۰۱۰ (۱۷) که در این خصوص انجام شده و میزان موارد مثبت این تست را به ترتیب ۲۴/۶٪ ، ۲۸٪ و ۳۲/۷٪ گزارش نموده اند ، میزان شیوع بالاتری را در این مطالعه می بینیم. شیوع بالای عفونت سیتومگالوویروس در بیماران پیوندی ، می تواند ناشی از سرکوب سیستم ایمنی در این بیماران باشد که شرایط را برای فعال شدن ویروس و بروز عفونت فراهم می سازد.

نتایج این مطالعه هر چند نشان دهنده سرعت و دقت بیشتر روش های مولکولی به خصوص Real Time PCR در شناسایی موارد عفونت فعال سیتومگالوویروس در بیماران پیوندی می باشد ، اما از طرف دیگر با توجه به نتایج بررسی وجود آنتی بادی IgM ، مثبت شدن این تست که ساده و کم هزینه تر می باشد توانسته است به درستی با موارد مثبت تست مولکولی Real Time PCR مطابقت داشته باشد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان موارد عفونت فعال سیتومگالوویروس در بیماران پیوند کلیه در استان کرمانشاه بالا است که می تواند در ارتباط با وضعیت اقتصادی ، اجتماعی و بهداشتی پایین این جوامع باشد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که هر چند استفاده از روش های مولکولی مانند Real Time PCR از دقت بالایی برخوردار بوده و کمتر تحت تاثیر شرایط خاص پاسخ های ایمنی در بیماران پیوندی قرار می گیرد ، اما با استفاده از روش های سرولوژیک به خصوص شناسایی موارد مثبت آنتی بادی IgM ، می توان با تا حد قابل قبولی موارد فعال عفونت سیتومگالوویروس را در بیماران پیوندی شناسایی و درمان نموده و میزان موارد مرگ و میر این بیماران در اثر این عفونت را کاهش داد.

تشکر و قدر دانی

لازم می دانیم که از پرسنل محترم بیمارستان امام رضا(ع) کرمانشاه که در انجام این مطالعه کمال همکاری را داشتند صمیمانه تشکر کنیم.

نتایج این مطالعه حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج می باشد. بر خود

REFERENCES

1. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med.* 1998;338(24):1741-1751.
2. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med.* 2007;357(25):2601-2614.
3. Alangaden GJ, Thyagarajan R, Gruber SA, Morawski K, Garnick J, El-Amm JM, et al. Infectious complications after kidney transplantation: current epidemiology and associated risk factors. *Clin Transplant.* 2006;20(4):401-9.
4. Courivaud C, Bamoulid J, Chalopin JM, Gaiffe E, Tiberghien P, Saas P, et al. Cytomegalovirus exposure and cardiovascular disease in kidney transplant recipients. *J Infect Dis.* 2013;207(10):1569-1575.
5. Ziyaeyan, M, Sabahi F. Human Cytomegalovirus: Infections and Diagnosis. *Iranian Journal of Medical Sciences* 2008;33(3):127-132.
6. Smith MA, Brennessel DJ. Cytomegalovirus. *Infect Dis Clin North Am.* 1994;8(2):427-38.
7. Pignatelli S1, Dal Monte P, Rossini G, Landini MP. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev Med Virol.* 2004;14(6):383-410.
8. Pass RF. Cytomegalovirus infection. *Pediatr Rev.* 2002;23(5):163-170.
9. Ho M. Cytomegalovirus: biology and infection: New York, USA; Plenum Publishing; 1998.127-130
10. Rubin RH. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 1990, 12(Supplement 7), S754-S766.
11. Koch S, Solana R, Dela Rosa O, Pawelec G. Human cytomegalovirus infection and T cell immunosenescence: a mini review. *Mech Ageing Dev.* 2006;127(6):538-43.
12. Hughes BL, Gyamfi-Bannerman C. Diagnosis and antenatal management of congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2016 Jun;214(6):B5-B11.
13. Yoshida A, Hitomi S, Fukui T, Endo H, Morisawa Y, Kazuyama Y, et al. Diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus disease in patients with human immunodeficiency virus infection by use of a real-time PCR assay. *Clin Infect Dis.* 2001;33:1756-1761.
14. Obeid E. Obeid and Alhusain J. Alzahrani. Analysis of chemokines and soluble adhesion molecules in cytomegalovirus-positive renal transplant recipients. *J Infect Dev Ctries* 2010; 4(2):110-113.

15. Haile G, Ulla R, Susan C, Britta W, Monica G. Prevalence of herpes simplex virus types 1 and 2, cytomegalovirus, and varicella-zoster virus infections in Eritrea. *J Clin Virol.* 1999;12:53-64.
16. Adjei AA, Armah HB, Gbagbo F, Boamah I, Adu-Gyamfi C, Asare I. Seroprevalence of HHV-8, CMV, and EBV among the general population in Ghana, West Africa. *BMC Infect Dis.* 2008;8:111.
17. Enan KA, Rennert H, Ei-Eragi AM, Ei Hussein AR, Eikhidir IM. (2011) Comparison of real-time PCR to ELISA for the detection of human cytomegalovirus infection in renal transplant patients in the Sudan. *Virol J.* 2011; 8: 222.
18. Jawetz E, Melnick J, Adberg EA, Brooks GO, Butel JS, Ornston NL. *Medical microbiology.* 23. Appleton and Lange: Norwalk, USA; 2004.
19. Khameneh ZR, Sepehrvand N, Aghazadeh T. Cytomegalovirus infection among Iranian kidney graft recipients. *Transplant Proc.* 2013;45(1):178-81.
20. Durand, CM, Marr KA, Arnold CA, Tang L, Durand DJ, Avery RK, et al. Detection of cytomegalovirus DNA in plasma as an adjunct diagnostic for gastrointestinal tract disease in kidney and liver transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2013;57(11):1550-1559.
21. Cariani E, Pollara CP, Valloncini B, Perandin F, Bonfanti C, Manca N. Relationship between pp65 antigenemia levels and real-time quantitative DNA PCR for Human Cytomegalovirus (HCMV) management in immunocompromised patients. *BMC Infect Dis.* 2007;7:138.

