فراوانی عفونت فعال سیتومگالویروس در گیرندکان 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 واحد سنندج
۲- دکترای باکتری شناسی، استادیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
۳- متخصص داخلی، استادیارگروه 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 روش‌هاای الایزا و Real-Time PCR بود.*

روش کار: *مطالعه حاضر یک مطالعه توصیفی مقطعی می باشد که برروی ۱۴۲ بیمار گیرنده کلیه استان کرمانشاه در سال‌های 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 IgG ، IgM 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 ۱۴۲بیمار مورد مطالعه، ۹۳ مورد (۶۵/۵٪) مرد بودند. میانگین سنی بیماران ۲۹/۴۳ ±۴۷/۶۱ سال بود. باتوجه به نتایج تست الایزا، ۱۳۰ مورد (۹۱/۵٪) از نظر IgG و۵۳ 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.*

نتیجه‌گیری: *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 می‌توان عفونت فعال این ویروس را شناسایی کرد.*

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

مقدمه

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

سیتومگالوویروس انسانی عضوی از خانواده هرپس ویروس‌ها است که در میزبان آلوده شده برای همیشه باقی می‌ماند(۵). این ویروس دارای DNA دو رشته‌ای حاوی بیش از kbp ۲۴۰ و قابلیت کدگذاری بیش از ۲۰۰ فراورده پروتئینی است(۷،۶). این ویروس ۹۰-۵۰ درصد افراد جوامع مختلف را در طول حیات خود آلوده می‌سازد 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، کریورتینیت و در مواردی مرگ این بیماران می‌شود(۱۰). این ویروس

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 آنتی بادی‌های IgG و IgM با استفاده از روش‌هایی مانند الایزا (ELISA) و روش های مولکولی مانند PCR است(۱۲). هر چند وجود آنتی بادی IgM در سرم بیماران می تواند 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 ویروس ها، از روش Real Time PCR استفاده می‌گردد که علاوه بر شناسایی دقیق این عوامل، وجود DNA ویروس را نشان داده و عفونت‌های فعال سیتومگالوویروسی را شناسایی می‌کند باتوجه 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 ۱۳۹۲و ۱۳۹۳ انجام شد.

روش کار

پژوهش حاضر از نوع توصیفی-مقطعی است. با استفاده از روش نمونه گیری 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 نمونه ها ،با استفاده از کیت استخراج DNA جداسازی شد. روش Real-Time PCR بر پایه‌ی کاوشگر Taqman-MGB probeو براساس دستورالعمل های 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.

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

جنسیت متغیر	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 هـای درمـانی پیشـرفته ،امید به بهبود ویا افزایش طول عمر بیماران ،رونـد رو بـه رشـدی را داشته است.از جمله این روش های درمانی ،پیوند اعضـای بـدن و از جمله کلیه است. روند پیوند کلیه،نیاز به سرکوب گسـترده سیسـتم ایمنی داردکه امکان بروز عفونت های فرصت طلب را در این بیماران بـه شـدت افـزایش مـی دهـد. یکـی از شـایع تـرین ایـن عوامـل، سیتومگالوویروس است که شیوع بالایی در بیماران پیوند کلیـه دارد که علاوه بر رد پیوند می تواند موجب مرگ این بیمـاران گـردد (۴-۱). از طرف دیگر شناسایی به موقع این ویروس و درمان این عفونت ها با داروهایی مانند گان سیکلووير و فوسکارنت، می تواند در بقـای این بیماران، اهمیت خاصی داشته باشد (۱۳). روش‌های تشخیصی مختلفی برای شناسایی عفونت‌های سیتومگالوویروسی استفاده می-شود که مهمترین آن‌ها شناسایی و اثبات وجود آنتی بادی‌های ضـد ویروسی با روش‌هایی مانند الایزا و روش‌های مولکولی ماننـد PCR است. با توجه به این نکته که تاکنون مطالعه‌ای در این خصـوص در استان کرمانشاه انجام نشده است، این مطالعه با هدف تعیین فراوانی عفونت فعال سـیتومگالوویروس در دریافـت کننـدگان کلیـه اسـتان کرمانشاه در سال های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ با استفاده از روش‌های الایـزا و Real Time PCR انجام شد.

نتایج این مطالعه در خصوص میزان موارد مثبت IgG نشان داد کـه ۹۱/۵٪ از بیماران از نظر این آنتی بادی مثبت بودنـد کـه بـا میـزان شیوع این آنتی بادی در بیماران پیوند کلیه مطالعات انجام شـده در کشورهای به خصوص در حال پیشرفت مطابقت دارد. در مطالعـه‌ی Obeid از عربستان سعودی (۱۴)، مطالعه‌ی Haile از کشور اریتره (۱۵)، مطالعه‌ی Andrew از کشور غنا (۱۶) و مطالعه‌ی Enan از کشـور سـودان (۱۷) میـزان شـیوع آنتـی بـادی IgG ضـد سیتومگالوویروس به ترتیب ۹۹/۳٪، ۹۰٪، ۷۷/۶٪ و ۱۰۰٪ گـزارش شده است. شیوع بالای این آنتـی بـادی در بـین کشـورهای جهـان سوم، می‌تواند در ارتباط با وضعیت اقتصادی، اجتمـاعی و بهداشـتی پایین این جوامع باشد (۱۸).

نتایج مطالعه مـا، باسـتفاده از روش الایـزا نشـان داد کـه ۵۳ مـورد (۳۷/۳٪) از بیماران پیوندی مورد مطالعه از نظر آنتی بـادی IgM ضد سیتومگالوویروس مثبت بودند. این نتایج با نتایج مطالعه خامنـه که در سال ۱۳۹۲ انجام شـده و ایـن میـزان را ۳۷/۵٪ نشـان داده ،مطابقت دارد (۱۹). اما در مقایسه با مطالعه‌ی Obeid و همکاران و همچنین مطالعه‌ی Enan که میـزان مـوارد مثبـت آنتـی بـادی IgM را به ترتیب ۲۷/۳٪ و ۶/۱٪ گزارش نموده‌اند(۱۷و۱۴)، مقادیر بالاتری را نشان می‌دهد. هر چند که وجود آنتـی بـادی IgM مـی-تواند نشان دهنده‌ی وجود عفونت اخیر و یا عفونـت کنـونی در ایـن بیماران باشد اما همیشه دال بـر عفونـت فعـال نیسـت. زیـرا نتـایج تست‌های سرولوژیک و از جمله الایزا می‌توانـد تحـت تـاثیر تزریـق خون، آنتی بادی درمانی و واکنش‌های متقاطع ناشی از عفونت‌های ویروسـی دیگـر قـرار گرفتـه و تشـخیص عفونـت فعـال ویروسـی سیتومگالوویروس را با استفاده از این روش محدود سازد.

نتایج تست Real-Time PCR در این مطالعه نشـان داد کـه ۵۱ مورد(۳۵/۹٪) از بیماران از نظر این تست و وجود DNA ویـروس سیتومگالوویروس مثبت بودند که همگی آن‌ها از نمونه‌هـایی بودنـد که از نظر وجود آنتی بادی IgM مثبت بودند. نتایج این مطالعه بـا مطالعه Obeid که نشان داد تمام موارد مثبت از نظر وجـود آنتـی بـادی IgM ضـد سـیتومگالوویروس، تسـت Real-Time PCR مثبت داشتند، همخوانی داشت، اما بـا نتـایج مطالعـه Enan کـه نشان داد که مواردی از نمونه‌های مثبت از نظر تست Real-Time PCR ، تست IgM منفی داشته و فقط ازنظر تست مثبت بودنـد، متفاوت بود. از نظر میزان موارد مثبـت تسـت Real-Time PCR در مقایسه با مطالعات دیگری که توسط Durand در سـال ۲۰۱۳ (۲۰)، Cariani در سـال ۲۰۰۷ (۲۱) و Enan در سـال ۲۰۱۰ (۱۷) که در این خصوص انجام شده و میزان موارد مثبت این تسـت را به ترتیب ۲۴/۶٪، ۲۸٪ و ۳۲/۷٪ گزارش نموده‌اند، میـزان شـیوع بـالاتری را در ایـن مطالعـه مـی‌بینـیم. شـیوع بـالای عفونـت سیتومگالوویروس در بیماران پیوندی، مـی‌توانـد ناشـی از سـرکوب سیستم ایمنی در این بیماران باشد که شرایط را بـرای فعـال شـدن ویروس و بروز عفونت فراهم می‌سازد.

نتایج این مطالعه هر چند نشـان دهنـده‌ی سـرعت و دقـت بیشـتر روش‌های مولکولی به خصـوص Real Time PCR در شناسـایی موارد عفونت فعال سیتومگالوویروس در بیماران پیوندی می‌باشد، اما از طرف دیگر با توجه به نتـایج بررسـی وجـود آنتـی بـادی IgM ، مثبت شدن این تست که ساده و کم هزینه‌تر می‌باشد توانسته است به درسـتی بـا مـوارد مثبـت تسـت مولکـولی Real Time PCR مطابقت داشته باشد.

نتیجه گیری

نتـایج ایـن مطالعـه نشـان داد کـه میـزان مـوارد عفونـت فعـال سیتومگالوویروس در بیماران پیوند کلیـه در اسـتان کرمانشـاه بـالا است کـه مـی‌توانـد در ارتبـاط بـا وضـعیت اقتصـادی، اجتمـاعی و بهداشتی پایین این جوامع باشد. همچنین نتایج این مطالعـه نشـان داد که هر چند استفاده از روش‌های مولکولی ماننـد Real Time PCR از دقت بالایی برخوردار بوده و کمتر تحت تاثیر شرایط خاص پاسخ‌های ایمنی در بیماران پیوندی قرار می‌گیرد، اما بـا اسـتفاده از روش‌های سرولوژیک به خصوص شناسایی موارد مثبت آنتـی بـادی IgM ، مـی تـوان بـا تـا حـد قابـل قبـولی مـوارد فعـال عفونـت سیتومگالوویروس را در بیماران پیوندی شناسایی و درمان نمـوده و میزان موارد مرگ و میر این بیماران دراثر این عفونت را کاهش داد.

تشکر و قدر دانی
نتایج این مطالعه حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج می باشد. بر خود لازم می‌دانیم که از پرسنل محترم بیمارستان امام رضا(ع) کرمانشاه که در انجام این مطالعه کمال همکاری را داشتند صمیمانه تشکر کنیم.

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, Melinck J, Adberg EA, Broks GO, Butel JS, Ornston NL. Medical microbiology. 23. Applenton 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.