مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۸۸/هفته دوم تیرماه ۱۳۹۱

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۲۰

مقایسه‌ی دقت شناسایی ویروس سیتومگال انسانی به روش‌های Real-time PCR و ایمونوفلورسانس غیر مستقیم در دریافت‌کنندگان پیوند کلیه

مجید کمیجانی[۱]، محمدتقی کاردی[۲]، سید مرتضی جوادی راد[۳]، نیلوفر نقشینه[۴]، مرضیه رضایی[۱]، دکتر سیمین همتی[۵]، آزاده حمزه‌ئی سیچانی[۳]

چکیده

مقدمه: ویروس سیتومگال انسانی (Human cytomegalovirus یا HCMV) یکی از ویروس‌های خانواده‌ی هرپس می‌باشد. تشخیص به موقع این ویروس از اهمیت بسیار زیادی در افراد دریافت‌کننده‌ی پیوند کلیه برخوردار است. علت این امر، وسعت تظاهرات بالینی آلودگی به این ویروس در این افراد، از پس زدن پیوند تا حتی مرگ، می‌باشد. هدف این پژوهش، بررسی دقت دو روش رایج Real-time Polymerase chain reaction (Real-time PCR) و ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (pp65 antigen assay) در دریافت‌کنندگان پیوند کلیه برای شناسایی HCMV بود.

روش‌ها: در این پژوهش خون کامل ۱۳۵ نفر از دریافت‌کنندگان پیوند کلیه در شهر اصفهان طبق پروتکل کیت کیاژن (Qiagen DNA mini kit) استخراج گردید. برای تشخیص HCMV از دو روش Real-time PCR و ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (pp65 antigen assay) استفاده شد. روش اول بر پایه‌ی روبش کاوش‌گر TaqMan و روش دوم بر پایه‌ی شناسایی آنتی‌ژن pp65 به روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم استوار بودند.

یافته‌ها: تعداد افرادی که نتیجه‌ی آزمایش آن‌ها در روش Real-time PCR مثبت گزارش شد ۳۶ نفر (۲۷ درصد) بود، در حالی که، این تعداد در روش pp65 antigen assay در مجموع ۲۹ مورد (۲۱ درصد) بود. همچنین مشخص شد که، بیشینه‌ی فراوانی عفونت فعال در فصل بهار (۲۸ درصد) و کمینه‌ی فراوانی آن متعلق به فصل زمستان (۱۶ درصد) بود؛ اما، رابطه‌ی معنی‌داری بین فراوانی عفونت HCMV و فصل مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که روش Real-time PCR با دقت بیشتری قادر به تشخیص عفونت HCMV در افراد دریافت‌کننده‌ی پیوند کلیه می‌باشد. همچنین مشخص شد که بیشترین فراوانی عفونت HCMV چه به صورت نهفته و چه به صورت فعال، متعلق به فصل بهار است که البته این ارتباط معنی‌دار نبود.

واژگان کلیدی: ویروس سیتومگال انسانی، پیوند کلیه، ایمونوفلورسانس غیر مستقیم، Real-time PCR

مقدمه

ویروس سیتومگال انسانی (Human cytomegalovirus یا HCMV) یکی از ویروس‌های خانواده‌ی هرپس است (۱). این ویروس از طرق مختلف مانند انتقال خون، پیوند اعضا و تماس جنسی قابل انتقال است (۲). در سرم ۸۰ درصد افراد بالغ سالم علیه این ویروس آنتی‌بادی شناسایی شده است که بیانگر آلودگی قبلی این افراد به ویروس مذکور است. همچنین نهفته بودن (Latenty) ویروس و احتمال فعال شدن مجدد آن را نشان می‌دهد (۱).

آثار بالینی و شدت عفونت با این ویروس در افرادی که دچار نقص ایمنی هستند و در دریافت

[۱] مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، مؤسسه‌ی آموزش عالی نور دانش، اصفهان، ایران
[۲] آزمایشگاه تشخیصی مهدیه، خیابان احمدآباد، اصفهان، ایران
[۳] دانشجو، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] آزمایشگاه تشخیصی برادران، خیابان فردوسی، اصفهان، ایران
[۵] استادیار، گروه پرتودرمانی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: محمدتقی کاردی
Email: m.kardi@gmail.com

www.mui.ac.ir

کنندگان پیوند عضو بسیار شدیدتر است. در حقیقت سرکوب شدن سیستم ایمنی به وسیله‌ی عوامل مختلف باعث فعال شدن مجدد HCMV می‌شود (۳). آلودگی به ویروس سیتومگال در چنین افرادی حتی می‌تواند منجر به مرگ شود (۴).

HCMV توانایی ایجاد عفونت اولیه و ثانویه را دارد. عفونت اولیه در بیماران سرونگاتیو (افرادی که سرم آن‌ها از نظر وجود این ویروس منفی است) رخ می‌دهد که هرگز به این ویروس آلوده نشده‌اند و عفونت ثانویه بیانگر فعال شدن مجدد عفونت نهفته است (۳). حالت سوم عفونت با HCMV در افراد دریافت کننده‌ی پیوند به صورت Super infection یا Reinfection است و زمانی به وجود می‌آید که فرد گیرنده‌ی سروپازیتیو (افرادی که سرم آن‌ها از نظر وجود این ویروس مثبت است)، سلول‌های عفونی Latent را از فرد دهنده‌ی سروپازیتیو دریافت کند؛ به این معنی که منشأ ویروس فعال شده پس از پیوند از فرد دهنده باشد (۲).

با توجه به این که تظاهرات بالینی آلودگی به این ویروس در افراد دریافت کننده‌ی پیوند از آسیب به عضو پیوندی، پس زدن پیوند و یا حتی مرگ متفاوت می‌باشد، پس تشخیص به موقع این ویروس از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است (۵-۴).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR یا Polymerase chain reaction) روش خوب و بسیار حساسی برای شناسایی HCMV است (۳). همچنین برای تشخیص عفونت HCMV در دریافت کنندگان پیوند یک روش استاندارد به نام آنتی‌ژنمیا pp65 وجود دارد. این روش مبتنی بر تشخیص آنتی‌ژن‌های اختصاصی HCMV در سلول‌های آلوده به این ویروس در مراحل اولیه‌ی عفونت می‌باشد (۶). در این مطالعه، این دو روش را برای شناسایی HCMV در دریافت کنندگان پیوند کلیه با یکدیگر مقایسه کردیم.

روش‌ها

در این پژوهش خون تام ۱۳۵ نفر از دریافت کنندگان پیوند کلیه که از تیر ماه ۱۳۸۹ تا خرداد ماه ۱۳۹۰ به آزمایشگاه مهدیه‌ی شهر اصفهان مراجعه نموده بودند، جمع‌آوری گردید. از این تعداد ۴۹ نفر مرد (۳۶/۳ درصد) و ۸۶ نفر زن (۶۳/۷ درصد) بودند. افراد مورد آزمایش محدوده‌ی سنی بین ۱۲ تا ۸۳ سال داشتند. برای استخراج DNA طبق پروتکل کیت کیاژن آلمان (Qiagen mini DNA #51304 Germany) رفتار شد.

برای تشخیص HCMV از دو روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی (Real-time PCR) و شناسایی آنتی‌ژن pp65 به روش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم (pp65 antigen assay) استفاده گردید. برای انجام فرایند Real-time PCR که بر پایه‌ی کاوشگر (TaqMan®-MGB probe) استوار بود، طبق پروتکل کیت نانوژن ایتالیا (Q-HCMV Real Time Complete Kit) رفتار شد. کیت Real-time PCR حاوی چهار استاندارد با مقادیر ۵۰، ۵۰۰، ۵۰۰۰۰، ۵۰۰۰۰۰ کپی در میلی‌لیتر از DNA سیتومگالوویروس بود. کیت مذکور علاوه بر نمونه‌ی استاندارد HCMV حاوی استاندارد برای کنترل داخلی (بتا اکتین) نیز بود. میزان DNA تکثیر یافته ی ژنوم HCMV روی کانال FAM و میزان کنترل داخلی روی کانال JOE اندازه‌گیری شد. دستگاه Real time PCR مورد استفاده در این تحقیق دستگاه Rotor gene ۶۰۰۰ از کمپانی Corbett بود. در این دستگاه جهت بررسی، تفسیر داده‌ها و محاسبه‌ی شیب

منحنی از نرم‌افزار Rotor-Gene ۶۰۰۰ نسخه‌ی ۱/۷ استفاده شد.

همچنین برای تشخیص HCMV با استفاده از روش pp65 antigen assay، از کیت CMV برایت توربو هلند (CMV brite^{TM} turbo kit) استفاده شد که بر پایه‌ی سلول‌های خون محیطی استوار است. کیت مذکور بر اساس روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم و با استفاده از دو آنتی‌بادی منوکلونال موشی C10/C11 که به طور اختصاصی به آنتی‌ژن pp65 متصل می‌شوند، عمل می‌کند.

در این تحقیق برای تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از نرم‌افزار Graphpad استفاده گردید و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این پژوهش برای مقایسه‌ی دقت شناسایی HCMV در افراد دریافت کننده‌ی پیوند کلیه از دو روش Real-time PCR و pp65 antigen assay استفاده شد. تعداد افرادی که نتیجه‌ی آزمایش آن‌ها در روش Real-time PCR مثبت گزارش گردید، ۳۶ نفر (۲۷ درصد) بود که شامل ۱۸ نفر مرد (۵۰ درصد) و ۱۸ نفر زن (۵۰ درصد) بودند. در روش pp65 antigen assay در کل ۲۹ مورد از نمونه‌ها (۲۱ درصد) مثبت گزارش شد که از این ۲۹ مورد، ۱۶ نفر مرد (۵۵/۲ درصد) و ۱۳ نفر زن (۴۴/۸ درصد) بودند. نتیجه‌ی Real-time PCR در کلیه‌ی افرادی که pp65 antigen assay آن‌ها مثبت گزارش شد، مثبت بود. در این بین نتیجه‌ی Real-time PCR برخی از نمونه‌ها مثبت و نتیجه‌ی pp65 antigen assay آن‌ها منفی بود. اما در هیچ کدام از موارد نمونه‌ای یافت نشد که نتیجه‌ی pp65 antigen assay مثبت و نتیجه‌ی Real-time PCR منفی داشته باشد.

بررسی فراوانی HCMV در فصول مختلف نشان داد که بیشترین فراوانی این ویروس متعلق به فصل بهار بود. این فراوانی بر اساس دو روش Real-time PCR و pp65 antigen assay به ترتیب ۳۱ و ۲۸ درصد بود (جدول ۱). اما کمترین فراوانی این ویروس برای روش Real-time PCR متعلق به فصل تابستان و برای روش pp65 antigen assay متعلق به فصل زمستان بود (جدول ۱). همچنین بررسی فراوانی عفونت فعال نشان داد که بیشینه‌ی فراوانی این نوع از عفونت در فصل بهار (۲۸ درصد) و کمینه‌ی فراوانی آن متعلق به فصل زمستان (۱۶ درصد) بود (جدول ۱).

جدول ۱. بررسی تأثیر جنسیت و فصل بر فراوانی ویروس سیتومگال انسانی

فصل	تعداد کل مراجعه‌کنندگان	pp65 antigen assay مثبت			Real-time PCR مثبت		
		زن تعداد	مرد تعداد	کل درصد	زن تعداد	مرد تعداد	کل درصد
تابستان	۲۱	۲	۳	۲۴	۲	۳	۲۴
پاییز	۲۷	۴	۳	۲۶	۴	۳	۲۶
زمستان	۵۸	۶	۳	۱۶	۱۰	۵	۲۶
بهار	۲۹	۱	۷	۲۸	۲	۷	۳۱
جمع	۱۳۵	۱۳	۱۶	۲۱	۱۸	۱۸	۲۷

www.mui.ac.ir

سپس، فراوانی عفونت نهفته و فعال در بین دو جنس مرد و زن در فصول مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که فراوانی عفونت فعال و نهفته در فصل زمستان در زنان دو برابر بیشتر از مردان است، در حالی که مردان در فصل بهار تا ۷ برابر بیشتر از زنان عفونت فعال و نهفته را نشان می‌دهند (جدول ۱).

بحث

در افراد دریافت کننده‌ی پیوند و به طور کلی افرادی که دچار نقص سیستم ایمنی شده‌اند، شدیدترین علایم کلینیکی آلودگی به HCMV مشاهده می‌شود (۷). تشخیص دقیق و به موقع ویروس سیتومگال در دریافت‌کنندگان پیوند از اهمیت بسزایی برخوردار است؛ چرا که HCMV از عوامل مهم مرگ و میر در این افراد محسوب می‌شود (۴).

در این پژوهش برای شناسایی HCMV در ۱۳۵ نفر از دریافت‌کنندگان پیوند کلیه، از هر دو روش Real-time PCR و pp65 antigen assay استفاده شد و مشخص گردید که افراد HCMV مثبت در روش Real-time PCR ۳۶ نفر (۲۷ درصد) و در روش pp65 antigen assay ۲۹ نفر (۲۱ درصد) بودند. در پژوهشی که توسط Cariani و همکاران صورت گرفت، از ۴۷۵ نمونه ی مورد مطالعه تعداد ۱۳۳ نفر (۲۸ درصد) به روش Real-time PCR و تعداد ۳۰ نفر (۶/۳۱ درصد) به روش pp65 antigen assay از نظر وجود HCMV مثبت بودند (۸).

در مطالعه‌ی مشابهی که توسط Marchetti و همکاران صورت پذیرفت، از ۱۲۸۴ نمونه ای که بر روی آن‌ها آزمایش pp65 antigen assay انجام شد، تعداد ۵۲ نمونه (۴/۱ درصد) و از ۲۶۶۲ نمونه‌ای که بر روی آن‌ها آزمایش Real-time PCR انجام شد، ۶۴۶ نمونه (۲۴/۳ درصد) مثبت گزارش شد (۱). این موضوع می‌تواند بیانگر بالاتر بودن دقت روش PCR نسبت به روش pp65 antigen assay باشد. همچنین Real-time PCR دارای نکات مثبت دیگری نسبت به روش pp65 antigen assay است که شامل ساده‌تر بودن، سرعت بالاتر و همچنین توانایی بیشتر این روش جهت بررسی هم‌زمان تعداد بیشتری از نمونه‌ها می‌باشد (۱۰-۹).

روش‌های گوناگونی جهت شناسایی HCMV وجود دارد که از بین این روش‌ها بیشتر از PCR و pp65 antigen assay استفاده می‌شود (۱۲-۱۱). نکته‌ی قابل توجه در این دو روش، نحوه‌ی شناسایی ویروس است؛ به طوری که اساس کار PCR بر پایه‌ی شناسایی ویروس از طریق DNA آن می‌باشد که در این حالت فقط ویروس شناسایی می‌شود و فرقی بین عفونت فعال و نهفته وجود ندارد (۱۲). چنان چه به جای PCR کیفی از PCR کمی (Real-time PCR) استفاده شود، تعداد کپی‌های ویروس نیز مشخص می‌گردد (۱). اما روش pp65 antigen assay بر پایه‌ی شناسایی آنتی‌ژن pp65 استوار است و وجود آن به معنی تکثیر ویروس و وجود عفونت فعال می‌باشد (۱۳). در حقیقت در این روش عفونت Latent قابل شناسایی نیست. از طرف دیگر می‌دانیم که اساس شناسایی HCMV در روش pp65 antigen assay بر پایه‌ی شناسایی آنتی‌ژن pp65 در سطح لوکوسیت‌ها (سلول‌های لنفوسیت T نوع $CD8^+$) می‌باشد (۱۴).

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمال دارد بیمارانی که Real time-PCR آن‌ها مثبت ولی

pp65 antigen assay آن‌ها منفی بوده است، در معرض کاهش لوکوسیت (لوکوپنی) قرار داشتند و پیشنهاد می‌گردد بیماران مذکور تحت مراقبت کامل کلینیکی قرار گیرند.

الگوی به‌دست آمده در این پژوهش جهت بررسی فراوانی HCMV در طی فصول مختلف نشان داد که بیشترین فراوانی عفونت فعال مربوط به فصل بهار و کمترین آن مربوط به فصل زمستان بود (جدول ۱)؛ اما، رابطه‌ی معنی‌داری بین فراوانی عفونت HCMV و فصل مشاهده نشد که می‌تواند به دلیل تعداد کم نمونه‌ها باشد. این در حالی است که مطالعه‌ی Yakushiji و همکاران در ایالات متحده‌ی آمریکا به صورت معنی‌داری (P = ۰/۰۹) نشان داد که بیشترین فراوانی عفونت HCMV در دریافت کنندگان پیوند مربوط به فصل پاییز بود (۱۰).

تشکر و قدردانی

از آزمایشگاه مهدیه‌ی اصفهان و آزمایشگاه دکتر برادران اصفهان به خاطر همکاری **تشکر** و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Marchetti S, Santangelo R, Manzara S, D'onghia S, Fadda G, Cattani P. Comparison of real-time PCR and pp65 antigen assays for monitoring the development of Cytomegalovirus disease in recipients of solid organ and bone marrow transplants. New Microbiol 2011; 34(2): 157-64.
2. Aguado JM. Cytomegalovirus infection in transplant patients [monograph on the internet]. American college of chest physicians. [Online]. 2003. Available from: URL: http://www.accpstorage.org/newOrganization/pccu/PCCU_Volume15.zip
3. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone; 2005.
4. Forman SJ, Zaia JA. Treatment and prevention of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: where do we stand? Blood 1994; 83(9): 2392-8.
5. Kouri V, Resik S, Enamorado A, Moreno D, Garcia S, Acosta B, et al. Longitudinal study of herpesviruses in kidney transplant recipients in Cuba. Clin Infect Dis 2003; 36(6): 818-21.
6. Schulenburg A, Watkins-Riedel T, Greinix HT, Rabitsch W, Loidolt H, Keil F, et al. CMV monitoring after peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation by pp65 antigen and quantitative PCR. Bone Marrow Transplant 2001; 28(8): 765-8.
7. Soderberg-Naucler C, Emery VC. Viral infections and their impact on chronic renal allograft dysfunction. Transplantation 2001; 71(11 Suppl): SS24-SS30.
8. 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.
9. Onishi Y, Mori S, Higuchi A, Kim SW, Fukuda T, Heike Y, et al. Early detection of plasma cytomegalovirus DNA by real-time PCR after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Tohoku J Exp Med 2006; 210(2): 125-35.
10. Yakushiji K, Gondo H, Kamezaki K, Shigematsu K, Hayashi S, Kuroiwa M, et al. Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation: comparison of an antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction. Bone Marrow Transplant 2002; 29(7): 599-606.
11. Kusne S, Grossi P, Irish W, St GK, Rinaldo C, Rakela J, et al. Cytomegalovirus PP65 antigenemia monitoring as a guide for preemptive therapy: a cost effective strategy for prevention of cytomegalovirus disease in adult liver transplant recipients. Transplantation 1999; 68(8): 1125-31.
12. Gimeno C, Solano C, Latorre JC, Hernandez-Boluda JC, Clari MA, Remigia MJ, et al. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. J Clin Microbiol 2008; 46(10): 3311-8.
13. Mazzulli T, Rubin RH, Ferraro MJ, D'Aquila RT, Doveikis SA, Smith BR, et al. Cytomegalovirus antigenemia: clinical correlations in transplant recipients and in persons with AIDS. J Clin Microbiol 1993; 31(10): 2824-7.
14. Barouch DH, Letvin NL. CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses to lentiviruses and herpesviruses. Curr Opin Immunol 2001; 13(4): 479-82.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 30, No 188, 2nd week, July 2012 Received: 21.11.2011 Accepted: 9.5.2012

Comparison of Real-Time Polymerase Chain Reaction and pp65 Antigen Assay for Monitoring the Development of Cytomegalovirus Disease in Recipients of Kidney Transplant

Majid Komeijani[1], Mohammad Taghi Kardi[2], Seyyed Morteza Javadirad[3], Niloofar Naghshineh[4], Marzieh Rezaei[1], Simin Hemmati MD[5], Azadeh Hamzei Sichani[3]

Abstract

Background: Human cytomegalovirus (HCMV) is a member of herpes virus family and its early diagnosis could be very critical in kidney transplant patients. The clinical manifestations of HCMV infection include a wide range from tissue rejection to death. The aim of this study was to compare the accuracy of two common methods of HCMV monitoring, i.e. real-time polymerase chain reaction (PCR) and pp65 antigen assay.

Methods: We extracted the genomic DNA of 135 kidney transplant patients from their whole blood. HCMV monitoring was performed using TaqMan scanning probes and pp65 surface antigen detection by real-time PCR and pp65 antigen assay, respectively.

Findings: According to our results, real-time PCR and pp65 antigen assay showed positive results in 36 (27%) and 29 patients (21%), respectively. In addition, the maximum and minimum rates of infection with HCMV were detected in spring (28%) and winter (16%), respectively. However, no significant association was established between HCMV infection and seasonal patterns.

Conclusion: Our results indicated that real-time PCR was more accurate than pp65 antigen assay to detect HCMV infection in kidney transplant patients. We could also show that the maximum rate of infections with HCMV belonged to spring. However, the rates in the 4 seasons were not significantly different.

Keywords: Human cytomegalovirus, Kidney transplantation, pp65 protein, Real-time polymerase chain reaction

[1] Lecturer, Department of Biology, School of Sciences, Noor-e-Danesh Institute for Higher Education, Isfahan, Iran
[2] Mahdieh Laboratory, Isfahan, Iran
[3] BSc Student, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
[4] Baradaran Laboratory, Isfahan, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Radiation Therapy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mohammad Taghi Kardi, Email: m.kardi@gmail.com