

## مقایسه شیوع آنتی‌بادی‌های (IgM، IgG) ضدسایتومگالوویروس و آنتی‌ژن ویروس در دریافت کنندگان پیوند کلیه

فروغ اعظم طرآبادی<sup>۱</sup>، دکتر ژولیت قالدی<sup>۲</sup>، دکتر مژگان شایگان<sup>۳</sup>، دکتر غلامرضا بابایی<sup>۴</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

ویروس سایتومگال انسانی یک ویروس DNA دار با اندازه تقریبی ۲۰۰ نانومتر متعلق به خانواده هرپس ویروس‌ها می‌باشد. عفونت با CMV در بیماران دچار نقص ایمنی، دریافت کنندگان پیوند، بیماران مبتلا به ایدز، بیماران تحت درمان با عوامل سرکوب‌کننده ایمنی و جنین در حال رشد می‌تواند منجر به بیماری لوکالیزه یا منتشر شود. بیماران در معرض خطر هردو عفونت اولیه و فعالیت مجدد عفونت نهفته می‌باشند. CMV از طریق خون یا عضو پیوندی قابل انتقال است. با اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های (CMV IgM، IgG) و بررسی CMV Ag در خون بیماران، عفونت اولیه یا عود عفونت را می‌توان تشخیص داد.

#### مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی بر روی ۶۲ بیمار دریافت‌کننده کلیه شامل ۲۶ فرد مؤنث (۴۱/۹٪) و ۳۶ فرد مذکر (۵۸/۱٪) در محدوده سنی ۲ تا ۵۸ سال (با میانگین سنی  $34 \pm 15$ ) با نمونه‌گیری آسان انجام شد. جهت بررسی شیوع آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن ویروس از دو روش الیزا و ایمونوفلورسانس و آزمون آماری مجذورکای (Chi-square) استفاده شد.

#### یافته‌ها

نتایج ما نشان دادند که همه بیماران از نظر CMV IgG مثبت و از نظر حضور CMV IgM، ۱۰ نفر از آنان (۱۶/۱٪) مثبت، ۷ نفر (۱۱/۴٪) مشکوک و مابقی منفی بودند. همچنین ۲۳ نفر از دریافت کنندگان کلیه (۳۷/۱٪) CMV Ag مثبت بودند. در بررسی آماری، همبستگی معنی‌داری بین آنتی‌بادی‌های ضد CMV و CMV آنتی‌ژن‌ها مشاهده نگردید.

#### نتیجه‌گیری

علی‌رغم حضور آنتی‌بادی‌های IgG و IgM ضد CMV، آنتی‌ژن ویروس در تعدادی از بیماران مشاهده می‌گردد و به نظر می‌رسد که ارتباط خوبی بین آنتی‌بادی‌ها و ردیابی آنتی‌ژن در عفونت حاد وجود ندارد.

**کلمات کلیدی:** سایتومگالو ویروس (CMV)، پیوند کلیه، ELISA

تاریخ دریافت: ۱۳/۳/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴/۴/۲۲

۱- مؤلف مسئول: کارشناس شیمی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - صندوق پستی ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

۲- دکترای علوم آزمایشگاهی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۳- PhD ایمونولوژی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۴- PhD آمار حیاتی - دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

**مقدمه**

ویروس سایتومگال انسانی (Human Cytomegalo Virus)، یک ویروس DNA دار با اندازه تقریبی ۱۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر متعلق به خانواده هرپس ویروس‌ها می‌باشد (۱). این ویروس انتشار وسیعی داشته و در نمونه خون، ادرار، بزاق، اشک، شیر، مایع منی، مایع آمنیوتیک و ترشحات واژن افراد آلوده به این ویروس یافت می‌شود (۲، ۳). میزان شیوع این ویروس وابسته به فاکتورهای اقتصادی، سن، گروه‌های اجتماعی و محل جغرافیایی می‌باشد و در جمعیت‌های مورد مطالعه شیوع آن بین ۳۰ تا ۸۰ درصد و در بیماران پیوند کلیه ۱۵ تا ۹۵ درصد گزارش شده است. بین ۵۰ تا ۸۵ درصد بالغین تا ۴۰ سالگی در ایالات متحده به این ویروس آلوده می‌شوند (۲، ۳، ۴).

در آلودگی با ویروس CMV می‌توان اشکال مختلف عفونت نظیر عفونت اولیه، فعال شدن عفونت نهفته و یا آلودگی با یک سوش جدید را شاهد بود. عفونت با CMV شایع است و در میزبانان سالم معمولاً به صورت تحت بالینی و فاقد علامت می‌باشد، ولی عفونت CMV در میزبانانی که دارای سیستم ایمنی سرکوب شده هستند و جنین در حال رشد می‌تواند منجر به بیماری موضعی یا منتشر شود (۴، ۵). با وجود پیشرفت امکانات درمانی، عفونت CMV می‌تواند منجر به بیماری و مرگ و میر در بیماران تحت پیوند، بیماران مبتلا به ایدز و بیماران سرطانی به خصوص مبتلایان به لوسمی یا لنفوم شود. بیماران، درخطر هر دو عفونت اولیه CMV و فعالیت مجدد عفونت نهفته می‌باشند (۵-۸).

راه‌های انتقال عفونت عبارتند از: انتقال مستقیم طی تماس با یکدیگر، پیوند اعضا و انتقال خون. افرادی که در خطر انتقال عفونت CMV طی انتقال خون هستند شامل افراد سرم منفی از نظر CMV و افرادی با سیستم ایمنی سرکوب شده نظیر نوزادان و گیرندگان پیوند می‌باشند.

روش‌های تشخیص آلودگی با CMV شامل بررسی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس به روش ELISA، فیکسایون کمپلمان، بررسی آنتی‌ژن ویروس به روش ایمونوفلورسانس و بررسی DNA ویروس به روش PCR هستند (۹، ۱۰). شناسایی آنتی‌ژن CMV در سلول‌های

پلی‌مورفونوکلئار خون محیطی (آنتی‌ژن‌ها) در مقایسه با روش‌های دیگر کشت سلول و کشت ویروس حساس‌تر و سریع‌تر است (۱۱، ۱۲).

در این مطالعه جهت بررسی آنتی‌بادی‌های ضد CMV از روش الیزا و بررسی حضور آنتی‌ژن CMV از روش ایمونوفلورسانس استفاده گردید و سعی شد نتایج دو آزمایش فوق مقایسه شود تا به روند درمانی بیماران نیز کمک گردد.

**مواد و روش‌ها**

در این مطالعه توصیفی ۶۲ بیمار دریافت‌کننده پیوند کلیه شامل (۴۱/۹٪) ۲۶ فرد مؤنث و (۵۸/۱٪) ۳۶ فرد مذکر در محدوده سنی ۲ تا ۵۸ سال با میانگین سنی (۱۵ ± ۳۴ سال) که قبل و بعد از پیوند کلیه جهت بررسی آنتی‌بادی‌های ضد CMV به آزمایشگاه تشخیص طبی سازمان انتقال خون مراجعه نمودند، به صورت آسان نمونه‌گیری شدند. بیشترگیرندگان کلیه پس از پیوند مبتلا به تب، لرز و لوکوپنی شده بودند. اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های CMV (IgM و IgG) به روش ELISA انجام گرفت. برای بررسی آنتی‌ژن CMV از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم استفاده شد. در این روش پس از جداسازی پلی‌مورفونوکلئارهای خون محیطی، آنتی‌بادی‌های منوکلونال جهت شناسایی فسفو پروتئین آنتی‌ژن (pp65) استفاده گردید. pp65 یک آنتی‌ژن فاز زودرس چرخه همانندسازی CMV در سلول میزبان است و به میزان فراوان در پلی‌مورفونوکلئارهای آلوده یافت می‌شود (۱۳، ۱۴).

مراحل انجام آزمایش به شرح زیر می‌باشند:

- جداسازی سلول‌های پلی‌مورفونوکلئار از خون هپارینه به کمک محلول دکستران ۶٪
- لیز گلبول‌های قرمز موجود در سوسپانسیون سلولی
- شستشوی سلول‌های جدا شده
- شمارش سلول‌ها و سپس قرار دادن حجم معینی از سوسپانسیون سلولی شمارش شده بر روی اسلایدهای شیشه‌ای کاملاً تمیز
- فیکس سلول‌ها بر روی اسلاید و رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس اسلایدها با استفاده از آنتی‌بادی

یک مورد نیز مشکوک بود که از لحاظ آماری رابطه معنی‌داری بین رد پیوند و حضور ویروس CMV مشاهده نگردید.

#### بحث

در مطالعه حاضر شیوع آنتی‌بادی‌های IgM ضد CMV در دریافت‌کنندگان پیوند کلیه ۱۶/۱٪ مثبت و ۱۱/۴٪ مشکوک بود، در صورتی‌که تمام ۶۲ بیمار قبل از پیوند از نظر آنتی‌بادی IgM ضد CMV منفی بودند. در یک مطالعه، گزارش شده‌است که ۷/۴٪ از بیماران دریافت‌کننده هنگام پیوند از نظر این آنتی‌بادی مثبت بوده‌اند. در این بررسی مطرح شده است که لازم نیست گیرندگان پیوند کلیه را، براساس آنتی‌بادی IgM علیه CMV انتخاب کنیم بلکه باید کنترل دقیق بعد از پیوند در زمان‌های مختلف انجام گیرد (۱۵). در مطالعه ما علی‌رغم مثبت بودن آزمایش CMV IgG در تمام بیماران مورد مطالعه، در ۲۳ نفر از بیماران، CMV آنتی‌ژن مثبت شده است، به عبارتی باوجود حضور آنتی‌بادی IgG در این بیماران، از بروز آنتی‌ژنمی که نمایانگر حضور ویروس در بیماران می‌باشد جلوگیری نشده است، شاید این امر ناشی از ابتلا به عفونت با سوش متفاوت ویروس باشد.

در بررسی سوسا و همکاران (۱۹۹۱) گزارش شده‌است که از لحاظ آماری شیوع CMV در گیرندگان سرم منفی و شدت بیماری در مقایسه با گیرندگان سرم مثبت تفاوت دارد (۱۶). شیوع بالای عفونت‌های CMV در بیماران دریافت‌کننده خون نظیر بیماران تالاسمی و نیز دریافت‌کنندگان اعضا می‌تواند به علت تغییرات زیرگروه‌های سلول‌های T باشد. CMV می‌تواند منجر به تأثیری در میزبان گردد، در واقع این ویروس سیستم ایمنی فرد مبتلا را مهار نموده، منجر به ترشح یک مهارکننده اینترلوکین از منوسیت‌ها می‌گردد و سلول‌های میزبان را به لیز توسط سلول‌های کشنده طبیعی (Natural killer cell) مستعدتر می‌نماید. به دنبال این تأثیرات بیماران مبتلا به CMV مستعد سایر عفونت‌های فرصت طلب می‌شوند که شیوع بالایی این عفونت‌ها در بیماران تالاسمیک با CMV مثبت و بیماران پیوند شده دیده می‌شود (۱۷).

منوکلونال ضد آنتی‌ژن pp65 و آنتی‌بادی دوم کنژوگه با ایزوتیوسیانات فلورسین - بررسی لام‌ها با میکروسکوپ فلورسنت و گزارش تعداد سلول‌های مثبت در کل تعداد پلی‌مورفونوکلئوهای فیکس شده بر روی لام

#### یافته‌ها

نتایج ما نشان دادند که همه ۶۲ بیمار دریافت‌کننده کلیه از نظر آنتی‌بادی CMV IgG مثبت بوده‌اند. ۱۰ بیمار (۱۶/۱٪) از نظر آنتی‌بادی CMV IgM مثبت، ۷ بیمار (۱۱/۴٪) مشکوک و بقیه بیماران منفی بوده‌اند. در بررسی از نظر CMV آنتی‌ژن، ۲۳ مورد از بیماران (۳۷/۱٪) مثبت شده بودند که از این تعداد فقط یک مورد CMV IgM مثبت دیده شد و ۴ مورد از بیماران CMV آنتی‌ژن مثبت، از نظر آنتی‌بادی CMV IgM مشکوک شدند. ۱۸ مورد از بیماران CMV آنتی‌ژن مثبت از نظر آنتی‌بادی CMV IgM منفی بودند (جدول ۱).

جدول ۱: فراوانی مطلق و نسبی موارد مثبت و منفی CMV Ag

برحسب موارد مثبت و منفی و مشکوک CMV IgM

در بیماران دریافت‌کننده پیوند کلیه

| جمع کل | CMV Antigen مثبت | CMV Antigen منفی |
|--------|------------------|------------------|
| ۱۰     | ۱                | ۹                |
| (۱۶/۱) | (۴/۳)            | (۲۳/۱)           |
| ۴۵     | ۱۸               | ۲۷               |
| (۷۲/۵) | (۷۸/۳)           | (۶۹/۲)           |
| ۷      | ۴                | ۳                |
| (۱۱/۴) | (۱۷/۴)           | (۷/۷)            |
| ۶۲     | ۲۳               | ۳۹               |
| (۱۰۰)  | (۱۰۰)            | (۱۰۰)            |

بررسی آماری توسط آزمون مجذور کای نشان داد که رابطه معنی‌داری بین آنتی‌بادی‌های ضد CMV و نتایج مثبت CMV آنتی‌ژن وجود نداشته است.

از ۶۲ بیمار دریافت‌کننده پیوند کلیه، ۵ بیمار در مرحله رد پیوند قرار داشتند که از این تعداد بیمار در این مرحله فقط یک بیمار از نظر CMV آنتی‌ژن مثبت و CMV IgM منفی و یک مورد از بیماران آنتی‌بادی CMV IgM مثبت و

۸ و ۲۳ روز قبل از مرگ دارای نتیجه منفی آنتی‌ژنمیای CMV بوده‌اند، لذا قطع درمان زودرس بر اساس نتیجه منفی آنتی‌ژنمیای مطمئن نمی‌باشد (۲۲).

### نتیجه‌گیری

مهم‌ترین اشکال در تشخیص عفونت سایتومگالوویروس (CMV) از روش سرولوژیکی، تأخیر تشخیص می‌باشد که در پی‌گیری بیماران تأثیر می‌گذارد و یکی از علل مهم پی‌گیری بیماران پیوندی، تشخیص سریع و به‌موقع CMV است که به کمک آزمایش‌های سرولوژیک، به روش الیزا امکان‌پذیر نمی‌باشد و در این مواقع آزمایش آنتی‌ژنمیای می‌تواند به تشخیص به‌موقع این ویروس کمک نماید.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از جناب آقای دکتر علی طالبیان، سرکار خانم دکتر آقایی‌پور، سرکار خانم دکتر مینو احمدی‌نژاد مراتب تشکر خود را ابراز می‌دارند.

در مطالعه دیگر گزارش شده وجود آنتی‌بادی CMV IgM در بیماران دریافت‌کننده پیوند با علائم بیماری در ارتباط می‌باشد ولی نمی‌تواند به‌طور قطع علت رد پیوند باشد (۱۸، ۱۹). روش‌های سرولوژی در تشخیص عفونت یا بیماری CMV در دریافت‌کنندگان پیوند می‌تواند کمک مؤثری در تشخیص سریع‌تر GVHD یا رد پیوند باشد و همچنین این روش‌ها برای ارزیابی پیش از پیوند جهت تشخیص احتمالی فعال شدن عفونت (در صورت مثبت بودن از نظر CMV) و یا آمادگی برای عفونت اولیه (در صورت منفی بودن) مناسب می‌باشند (۲۰).

بررسی آنتی‌ژن CMV نسبت به سایر روش‌های تشخیصی مستقیم، سریع‌تر می‌باشد اما نتایج کمی HCMV DNA و آنتی‌ژن pp65 حساسیت قابل مقایسه‌ای دارند و می‌توانند شروع علائم HCMV را در مرحله اولیه پیش‌گویی نمایند (۲۱).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۱ بر روی بیماران دریافت‌کننده پیوند کلیه مشخص شد که دو بیمار به‌ترتیب

## References :

- 1- Cedric M, Dockrell HM, Gorering RV, Roitt I. Medical Microbiology. 3<sup>rd</sup> edition, 2004.
- 2- Gomez E, Loures A, Smelon J, Baltar. Late CMV disease and / or pecurrence in renal transplant recipients with pronged oral garciclovirprophylanis. Transplantation smed-zin, 2003.
- 3- Vanson WJ, Thea TH. Cytomegalovirus infection after organ transplantation: an update with special emphasis on renal transplantation. Transpl. Int 1989; 2: 147-164.
- 4- Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 2nd edition. UK Wolfe, 1994:587-93.
- 5- Mollison M, Engelfriet A, Contrera J. Blood transfusion in clinical medicine. 10th edition, Blackwell Science, 1998: 538-42.
- 6- Rubin, RH. Infectious complications of renal transplantation. Kidney. Int 1993; 44: 221-36.
- 7- Thea TH, Van der B, Van den berg A. Cytomegalovirus antigenemia. Rev. inf. Dis, 1990; 12: 737-744.
- 8- Boeckh M, Bowden RA, Goodrich JM, Pettinger M, Meyers J. Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic narrow transplantation. Blood 1991; 80: 1358-1364.
- 9- Davenport RD, Synder EL. Cytokines in transfusion medicine: a primer. AABB Press 1997, Chp3.
- 10- Van derbij W, Sehirn J, Torensma R, *et al.* Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. J.Clin. Microbiology 1988; 26: 2531-2535.
- 11- Grefte J, Van der Gun B, Sehmlke S, *et al.* The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. J Gen. Virol 1992; 73: 2923-2932.
- 12- Gema G, Revello MG, Percivalle E, *et al.* Quantification of human cytomegalovirus viremia by using monoclonal antibodies to different viral proteins. J. Clin. Microbiology 1990;28:2681-2688.
- 13- Revello MG, percivalle E, Di Matteo A, *et al.* Nuclear expression of the lower matrix protein of human cyromegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viremic patients J. Gen. Virol 1992; 73: 437-442.
- 14- Gema G, Revello MG, Percivalle E, *et al.* Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia J. Clin. Microbiology 1992; 30: 1232-1237.
- 15- Incidence and prognostic value of cytomegalovirus-specific antibodies of the IgM class in kidney transplant recipients. Z.Urol-nephrol 1990; 83(8): 425-9
- 16- Sousa A, Magalhaes MM, Sampaio MJ *et al.* Cytomegalovirus infection in kidney transplantation. Acta. Med. Port 1991; 4(5): 231-5.
- 17- Gremenis A, Politis C. Thalassemic patients are at high risk for transfusion-transmitted cytomegalovirus infections. Acta. Haemat 1989; 82: 57-60.
- 18- Holmberg LA, Boeckh M, Hooper H. Increased incidence of cytomegalovirus disease after autologous CD34<sup>+</sup> selected peripheral blood stem cell transplantation. Blood 1999;194 (12):4029-35.
- 19- Grangeot-Keros L, Cointe D. Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection.J.Clin. Virol 2001; 2(3): 213-21.
- 20- Sherlock CH, Denegri JF, Ashlen RL. Serological responses to cytomegalovirus during renal transplant rejection. Transplantation 1991; 52: 272-275.
- 21- Gutierrez J, Piedrola G, Maroto C. Correlation between the presence of cytomegalovirus antibodies and antigen in blood leukocytes for the diagnosis of primary active infection. Rev Med Chil 1998; 126(5): 533-7.
- 22- Peggs SK, Makinnon S. Cytomegalovirus infection and disease after autologous pripheral blood stem cell transplantation. Bjh 2001;115: 1032-3.

## Comparison of prevalence of anti-CMV antibodies (IgM & IgG) and CMV Ag in renal transplant recipients

Tarabadi F.A.<sup>1</sup>(BS), Ghaledi J.<sup>1</sup>(DMT), Shaiegan M.<sup>1</sup>(PhD), Babae Gh.R.<sup>2</sup> (PhD)

<sup>1</sup>Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center

<sup>2</sup>Biostatistics Department of Tarbiat Modarres University

### Abstract

#### Background and Objectives

Human cytomegalovirus (HCMV) is a DNA virus, approximately 200nm in diameter, belonging to the herpes virus family. CMV infection in immunocompromised patients including organ transplantation recipients, patients with AIDS patients under immunosuppressive therapy, and in developing fetus may result in either localized or disseminated diseases. Patients are at risk of both primary CMV infection and reactivation of latent infection. CMV can be transmitted through blood transfusion and organ transplantation.

#### Materials and Methods

In this descriptive study, 62 recipients of kidney transplant (26 females, 41.9% and 36 males, 58.1%) ranging from 2-58 years of age (mean 34±15) were analysed to detect CMV antibodies by ELISA technique; CMV antigen was also evaluated by Indirect Immunofluorescence Technique.

#### Results

All patients were CMV IgG positive, 10 (16.1%) were CMV IgM positive and 7 (11.4%) were at borderline. 23 (37.1%) of recipients were CMV Ag positive. Statistical analysis showed no relation between CMV Ab and CMV Ag.

#### Conclusions

In spite of the presence of anti-CMV IgG and IgM antibodies, antigenemia appears in several patients. There is not a strong correlation between antibodies against cytomegalovirus and the detection of CMV antigen in patients with acute infections.

**Key words:** Cytomegalovirus (CMV), Renal transplantation, ELISA  
SJIBTO 2005; 2(5):145-150

Received: 9 Jun 2004

Accepted: 13 July 2005

Correspondence: Tarabadi F.A., BS of Chemistry, IBTO-Research Center  
P.O.Box: 14665-1157; Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601501; Fax : (+9821) 88601555  
E-mail: f\_tarabady@yahoo.com