

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT ELISA XÁC ĐỊNH IGM, IGG CỦA EBV VÀ CMV VÀ BƯỚC ĐẦU SÀNG LỌC BỆNH NHÂN GHEP THẬN

HỒ QUANG HUY, PHẠM ĐĂNG KHOA,
NGUYỄN VĂN TUẤT, PHAN MAI HOA, ĐỖ THỊ NGA
Trường Đại học Y Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ghép tạng, đặc biệt là ghép thận, là một trong những thành tựu khoa học lớn của nền y học thế giới, là phương pháp điều trị thay thế mang lại hiệu quả điều trị cao. Ở Việt Nam, ghép tạng đã được thực hiện từ những năm 60 của thế kỷ XX [2]. Tuy nhiên để thực hiện một ca ghép thận thành công thì còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố sàng lọc trước ghép bởi thận là một tạng có tính sinh miễn dịch cao.

EBV và CMV là hai virus thuộc họ Herpesviridae, chúng có đặc tính tiềm ẩn trong cơ thể trong một thời gian dài gây nên hiện tượng nhiễm trùng không triệu chứng và có thể tái hoạt động trong điều kiện thuận lợi, đặc biệt là trên bệnh nhân ghép tạng, bệnh nhân suy giảm miễn dịch do dùng thuốc ức chế miễn dịch. Do đó, trên người hiến và nhận thận thì việc xác định có tình trạng nhiễm cấp hay tái nhiễm EBV và CMV là rất quan trọng, nó ảnh hưởng trực tiếp kết quả ghép tạng. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về việc xác định kháng thể IgM, IgG chống EBV, CMV trên bệnh nhân ghép tạng bằng kỹ thuật ELISA hay kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang... Ở Việt Nam cũng có những nghiên cứu về lĩnh vực này, nhưng chưa có nghiên cứu nào về kháng thể chống EBV, CMV trên ghép thận.

Vì vậy chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm xác định IgM, IgG chống EBV, CMV trên người cho và nhận thận bằng kỹ thuật ELISA để bước đầu sàng lọc bệnh nhân trước ghép thận.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng nghiên cứu:

Đối tượng là bệnh nhân được xác định theo tiêu chuẩn sau:

- Người hiến và nhận thận.
- Có chỉ định làm kỹ thuật ELISA để xác định kháng thể IgM, IgG chống EBV, CMV tại bộ môn Miễn dịch - Sinh lý bệnh Trường Đại học Y Hà Nội.

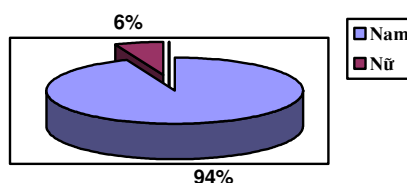
2. Phương pháp nghiên cứu: sử dụng kỹ thuật ELISA để xác định nồng độ các kháng thể với qui trình như sau:

- Pha loãng mẫu thử (1:101)
- 1000 μ L Sample Diluent và 10 μ L huyết thanh thử.
- Trộn đều hỗn hợp bằng máy trộn
- Nhỏ vào mỗi giếng thử:
- Cabibrators: 100 μ L
- Control serum: 100 μ L
- Mẫu thử: 100 μ L
- > Dán miêng giếng.
- Ủ ở 37 độ C trong 60 phút
- Rửa 5 lần
- Nhỏ enzyme conjugate: 100 μ L
- Ủ ở 37 độ C trong 60 phút

- Rửa 5 lần
- Nhỏ TMB (Chromogen/Substrate): 100 μ L
- > Để nhiệt độ phòng: 20 phút
- Nhỏ sulfuric acid (dừng phản ứng): 100 μ L
- Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 450nm.

KẾT QUẢ

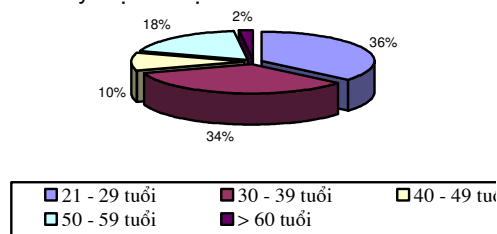
1. Phân bố tuổi, giới:



Biểu đồ 1: Biểu đồ về tỷ lệ giới

Về giới tính, theo biểu đồ 1, trong số 50 bệnh nhân có chỉ định làm kháng thể IgM, IgG chống EBV, CMV tại bộ môn Miễn dịch – Sinh lý bệnh Đại học Y Hà Nội thì có 94% nam và chỉ có 6% nữ.

Như vậy, tỷ lệ bệnh nhân hiến và nhận thận là nam cao hơn nữ. Theo Martin Zeier [7], chức năng thận ghép ở người nhận là nam với người hiến là nữ sẽ thấp hơn ở người hiến là nam, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê khi người nhận là nữ giới. Thật vậy, cũng có một tỷ lệ cao đáng kể bệnh nhân đã phải tăng liều thuốc chống thải ghép sau khi ghép thận từ các nhà hiến thận nữ vào người nhận nam, so với thận từ người hiến nam vào người nhận nam. Nghiên cứu của Vereerstraten [11] đã cho thấy một tỷ lệ cao các ca thải ghép cấp tính của người nhận nam từ thận của người cho là nữ. Do vậy khi tỷ lệ nam cao (94%) sẽ tạo thuận lợi cho kết quả ghép thận sau này, làm cho chức năng thận sau khi ghép tốt và nguy cơ thải ghép cũng thấp đi. Và kết quả này cũng phù hợp với thực tế tại Việt Nam, khi mà các bệnh nhân hiến thận đa phần là nam giới. Trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ có 3 bệnh nhân hiến thận là nữ, chiếm 6%, có thể đây là mẹ cho con hay chị em ruột cho nhau.



Biểu đồ 2: Biểu đồ về tỷ lệ các nhóm tuổi

Về tuổi, tuổi trung bình của 50 bệnh nhân là 36.2 ± 12.5 . Theo nghiên cứu của J.I.Roodnat [10] thì tuổi trung bình của người hiến thận là 48.4 ± 12.5 , còn người nhận thận là 38.5 ± 16.7 . Theo đó, tuổi trung bình của người hiến và nhận thận ở nghiên cứu này thấp hơn nghiên cứu của J.I.Roodnat [10]. Do trên thế giới tình trạng thiếu tạng để ghép đang ngày càng gia tăng, nên việc sử dụng các nhà hiến thận lớn tuổi đang ngày càng phổ biến. Mặt khác do nghiên cứu này tiến hành trên số lượng bệnh nhân ít nên tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu không thật chính xác. Mặt khác, do nước ta là một nước đang phát triển nên tỷ lệ người hiến thận ở lứa tuổi thanh niên sẽ cao hơn ở các nước phát triển. Điều này cũng có giúp cho chức năng của thận sau khi ghép sẽ tốt hơn khi nhận thận từ một người lớn tuổi. Nước ta cũng là một nước đang phát triển, kinh tế còn nghèo nhưng chi phí cho một ca phẫu thuật ghép thận tương đối đắt nên đa số tiến hành trên những bệnh nhân trẻ tuổi.

Từ biểu đồ 2 cho thấy: Trong số 50 bệnh nhân nghiên cứu có 98% bệnh nhân dưới 60 tuổi, chỉ có 2% bệnh nhân trên 60 tuổi. Theo công bố trong nghiên cứu của Federico Oppenheimer [11], tỷ lệ người cho lớn tuổi (cụ thể là lớn hơn 60 tuổi) ngày càng chiếm tỷ lệ cao 4.8% (1990); 14.1% (1994) và 20.8% (1998). Như vậy, tỷ lệ người cho thận lớn tuổi của nước ta thấp hơn. Đây cũng là một điều thuận lợi cho kết quả ghép tạng sau này. Cũng theo nghiên cứu của Federico Oppenheimer [11], tuổi của người cho ảnh hưởng rõ rệt lên sự phát triển của bệnh thận cấp ghép mạn tính (chronic allograft nephropathy), trên sự tồn tại của thận ghép, sự sống của bệnh nhân và nguy cơ tử vong do bệnh tim mạch. Theo nghiên cứu của Drugs Aging [5], hai vấn đề đã được xác định khi sử dụng người hiến thận lớn tuổi (>50 tuổi) đó là có sự gia tăng của hiện tượng loại bỏ tổ chức kẽ cấp tính và khi bị thải ghép thì suy giảm khả năng sửa chữa tế bào. Ngoài ra, nhu mô ghép cũng trải qua quá trình thoái hóa sớm hoặc thoái hóa là kết quả của nhiều thương tích và sửa chữa.

Ngoài ra, tuổi của người nhận cũng ảnh hưởng đến kết quả ghép thận theo như nghiên cứu của Meier-Kriesche [8] trên người da trắng, người Mỹ gốc Phi và một số dân tộc khác. Theo đó, thời gian sống 8 năm của thận ghép giảm đi ở nhóm người nhận trên 65 tuổi: tỷ lệ sống 8 năm của thận ghép ở nhóm người nhận từ 18 - 49 tuổi là 67%, nhóm 50 - 64 tuổi là 61.8%, còn nhóm người nhận trên 65 tuổi thì giảm xuống còn 50.7%.

2. Tỷ lệ dương tính của kháng thể IgM, IgG chống EBV, CMV.

Bảng 1: Tỷ lệ dương tính của kháng thể IgM, IgG chống EBV.

Kháng thể	Dương tính	Âm tính
IgM	11 (22%)	39 (78%)
IgG	46 (92%)	4 (8%)

Qua bảng 1 ta thấy tỷ lệ dương tính của kháng thể IgM chống EBV là 22%, còn tỷ lệ dương tính của kháng thể IgG là 92%. Theo nghiên cứu của Lê Hồng Hình thì tỷ lệ xuất hiện kháng thể IgG trong quần thể người Việt

Nam là 99.3%, trong quần thể người châu Phi là 100%, quần thể người Tiệp Khắc là 60% [1]. Như vậy, tỷ lệ dương tính của kháng thể IgG trong nhóm nghiên cứu thấp hơn trong cộng đồng. Có thể giải thích do các bệnh nhân hiến và nhận thận này trước khi tiến hành phẫu thuật đã được làm một số xét nghiệm để sàng lọc bệnh tật trước đó. Mặt khác, kết quả của nghiên cứu cũng phù hợp với nghiên cứu của Lê Hồng Hình khi tỷ lệ xuất hiện kháng thể IgG chống EBV trong các quần thể khác nhau là khác nhau, tỷ lệ xuất hiện kháng thể IgG chống EBV khác nhau ở các vùng địa lý khác nhau.

Còn tỷ lệ dương tính của kháng thể IgM chống EBV là 22%, trong số những bệnh nhân dương tính đó, nồng độ trung bình của kháng thể IgM là 19.64 ± 12.39 arbU/ml và ngưỡng dương tính là 10 arbU/ml. Qua đây ta thấy rằng các bệnh nhân có nồng độ kháng thể khác nhau chứng tỏ họ có đáp ứng miễn dịch khác nhau. Thật vậy đáp ứng miễn dịch khác nhau tùy từng cá thể, tùy kích thích của kháng nguyên và thời gian nhiễm bệnh. Những bệnh nhân dương tính này sau một tuần được chúng tôi làm lại xét nghiệm để sàng lọc trước khi thực hiện ghép thận thì thấy rằng 18.2% vẫn dương tính, 72.7% âm tính, chỉ có 1 bệnh nhân không đến làm lại xét nghiệm theo hẹn, chiếm 9.1%. Kết quả này có thể được lý giải như sau: số bệnh nhân xét nghiệm lại lần hai vẫn dương tính có thể do nồng độ kháng thể khi xét nghiệm lần một đang trong giai đoạn tăng lên và khi xét nghiệm lại lần 2 thì nồng độ kháng thể đang trong giai đoạn đi xuống nhưng vẫn chưa âm tính, bởi IgM chống EBV phát hiện được sau khi nhiễm bệnh 1 - 6 tuần, và sau đó giảm dần trong 3 - 6 tuần. Còn những bệnh nhân còn lại có thể do điều trị hoặc xét nghiệm lần 2 khi nồng độ kháng thể đã giảm xuống âm tính.

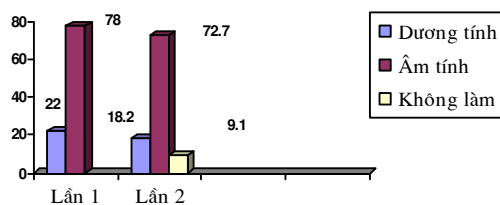
Bảng 2: Tỷ lệ dương tính của kháng thể IgM, IgG chống CMV.

Kháng thể	Dương tính	Âm tính
IgM	1 (2%)	49 (98%)
IgG	50 (100%)	0 (0%)

Theo bảng 2 ta thấy rằng tỷ lệ dương tính của kháng thể IgM chống CMV là 2%, tỷ lệ dương tính của kháng thể IgG là 98%. Tỷ lệ dương tính của kháng thể IgM trong nhóm nghiên cứu thấp hơn trong nghiên cứu của Chery A. McMahon [4] là 28.3% (17 trong số 60 bệnh nhân). Tỷ lệ nhiễm CMV trong nghiên cứu của Solbjorg Sagedal [9] là 64%. Trong nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ nhiễm CMV mạn tính là 98%, còn tỷ lệ tải nhiễm hay nhiễm cấp tính 2%, điều này cũng hoàn toàn phù hợp với yêu cầu của ghép thận. Đáng vậy nếu người hiến có IgM (+) thì khi thực hiện ghép sẽ nhiều khả năng gây nhiễm trùng sang người nhận thận. Theo nghiên cứu của McGee J: trong tổng cộng 31 bệnh nhân Mỹ gốc Phi phát triển bệnh CMV sau ghép thận, nhóm người hiến (+) và người nhận (-) có tỷ lệ tích lũy bệnh CMV trong 3 năm cao nhất 16.9% so với 6.3% trong nhóm cả người hiến và người nhận (+) hay 4.9% trong nhóm người hiến (-) và người nhận (+) hay 2.4% ở nhóm cả người hiến và người nhận (-). Và nhóm người hiến (+) và người nhận (-) cũng có sự sống

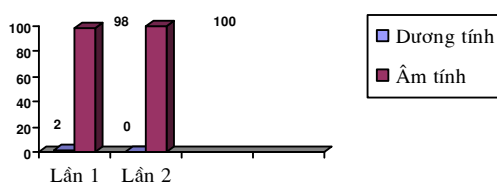
còn của thận sau ghép 3 năm có tiên lượng xấu nhất, mặc dù đã điều trị dự phòng 3 tháng.

3. Tỷ lệ dương tính của kháng thể IgM chống EBV sau một tuần:



Biểu đồ 3: Động học của kháng thể IgM chống EBV trên sau 1 tuần

4. Tỷ lệ dương tính của kháng thể IgM chống CMV sau một tuần:



Biểu đồ 4: Động học của kháng thể IgM chống CMV trên sau 1 tuần

Một bệnh nhân có IgM dương tính chống CMV lần xét nghiệm thứ nhất sau một tuần xét nghiệm lại thì đã âm tính, đáp ứng được yêu cầu sàng lọc bệnh nhân trước khi ghép thận.

Những bệnh nhân sau khi ghép thận phải dùng thuốc ức chế miễn dịch nên hệ miễn dịch bị suy giảm nghiêm trọng, có nguy cơ cao nhiễm trùng mắc phải tại cộng đồng, nhiễm trùng mắc phải tại bệnh viện và nhiễm trùng cơ hội. Do đó những người hiến và nhận thận cần được sàng lọc một cách kỹ lưỡng trước khi cấy ghép. Bên cạnh các virus như varicella zoster virus (VZV), viêm gan B và C và virus suy giảm miễn dịch HIV thì EBV và CMV cũng hay được sàng lọc. Do tỷ lệ người lành nhiễm EBV, CMV không triệu chứng khá cao (>95%) nên trước khi cấy ghép phải xét nghiệm để xác định xem người cho và người nhận có đang trong tình trạng nhiễm cấp hay tái nhiễm EBV, CMV hay không, một trong các yếu tố giúp sàng lọc bệnh nhân trước ghép, nó ảnh hưởng rất nhiều đến kết quả cấy ghép như đã trình bày ở trên.

Rối loạn lympho sau ghép (post-transplant lymphoproliferative disorder - PTLD) là một biến chứng hiếm gặp nhưng nghiêm trọng sau khi cấy ghép nội tạng. Hầu hết PLTD được phát triển từ tế bào lympho của người hiến, gây ra bởi số lượng của ức chế miễn dịch liên quan đến EBV. Chúng có thể thoái hóa sau khi giảm ức chế miễn dịch và phục hồi phản ứng gây độc tế bào, dẫn đến tiên lượng tốt. Một số yếu tố nguy cơ cho sự phát triển của PLTD là huyết thanh âm tính (seronegativity) với EBV, kích thích kháng nguyên mạn

tính, mức độ suy giảm miễn dịch, và nhiễm virus HCV và CMV là hay gặp nhất, theo nghiên cứu của S. Caillard [3]. Do vậy, vai trò sàng lọc nhiễm EBV, CMV lại càng quan trọng để phòng bệnh PLTD.

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu đề tài chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Kết quả xác định tỷ lệ dương tính của kháng thể IgM, IgG chống EBV, CMV như sau: tỷ lệ dương tính của kháng thể IgM chống EBV là 22%, của IgG là 92%; tỷ lệ dương tính của kháng thể IgM chống CMV là 2%, của IgG là 100%.

Bước đầu sàng lọc được 47 trên tổng số 50 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn về chỉ tiêu EBV, CMV tham gia vào ghép thận.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Hồng Hình, V.Mayer và cs. *Tìm hiểu sự lưu hành kháng thể VCA (IgG) kháng EBV ở người khỏe mạnh trong các quần thể người Tiệp, người Việt và người Phi*. Trường Đại học Y khoa Hà Nội, Viện Virus Bratislava, Slovakia.
2. Phạm Gia Khánh và cs. *Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật tiên tiến phục vụ ghép tạng ở Việt Nam*. Trường Đại học Y Hà Nội, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức, Bệnh viện Bạch Mai, Bệnh viện Nhi Thụy Điển, Bệnh viện Chợ Rẫy Thành phố Hồ Chí Minh. 2000
3. S. Caillard, C. Lelong, F. Pesione, B. Moulin, French PLTD Working Group (2006). *Post-transplant lymphoproliferative disorders occurring after renal transplantation in adults: Report of 230 cases from the French Registry. Volume 6, Issue 11, pages 2735-2742.*
4. Cheryl A. McMahon, Ellyn B. Lentz, Nancy L. Lamberson, Betty A. Forbes, Nancy L. Dock, Harold V. Lamberson, Emanuel R. Reinitz (2000). *Detection of Cytomegalovirus-specific IgM in renal transplant recipient.*
5. Drugs Aging (2005). *The impact of age on rejection in kidney transplantation.* 22(5):433-49
6. Federico Oppenheimer, Pedro Aljama, Concepcion Asensio Peinado, Jesus Bustamante, Jose Francisco Crespo Albiach, Luis Guirado Perich (2004). *The impact of donor age on result transplantation.* Nephrol Dial Transplant.
7. Martin Zeier, Bernd Dohler, Gerhard Opelz, Eberhard Ritz (2002). *The effect of donor gender on graft survival*
8. Meier-Kriesche, Herwig-Ulf, Ojo, Akinlolu O, Diane M, Hanson, Julie A., Leichtman, Alan B, Magee, John C, FriedrichK., Kaplan, Bruce (2000). *Relationship of recipient age and development of chronic allograft failure.* Volume 70 - Issue 2- pp 306-310.
9. Soldjorg Sagedal, Knut P. Hartmann, Stale Sund, Helge Scott, Miklos Degre, Aksel Foss, Torbjorn Leivestad, Kare Osnes, Per Fauchald, Halvor Rollag (2002). *The impact of Cytomegalovirus infectious and disease on rejection episodes in renal allograft recipients.*
10. Roodnat JI, Zeitse R, Mulder PG, Rischen-Vos J, van Gelder T, IJzermans JN, Weimar W (1999). *The vanishing importance of age in renal transplantation.* 67(4): 576-80.
11. Vereerstraeten P, Wissing M, De Pauw W L, Abramowicz D, Kinnaert (1999). *Male recipients of kidneys from female donors are at increased risk of graft loss from rejection and technical failure.* Clin Transplant 13: 181-186.