مقایسه تشخیص عفونت سیتومگالوویروس در سقط های خودبخودی به روش کشت سلولی و روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلمیراز (PCR)

دکتر علی کاظمی[1*]، دکتر حسین نوروزی[2]، دکتر سیما نظرپور[3]

۱. استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین، ورامین، ایران.
۲. استادیار گروه قارچ شناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳. مربی گروه مامایی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین، ورامین، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۱۹ **تاریخ پذیرش مقاله:** ۱۳۹۲/۳/۱۸

خلاصه

مقدمه: عفونت سیتومگالوویروس، رایج ترین عفونت ویروسی در دوران بارداری می باشد. روش های متداول شناسایی این عفونت شامل: روش کشت ویروس، آزمون PCR و الایزا می باشد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی و مقایسه روش کشت سلولی و روش مولکولی PCR در تشخیص عفونت های سیتومگالوویروس در سقط های خودبخودی انجام شد.

روش‌کار: این مطالعه مقطعی در سال ۹۱-۱۳۹۰ بر روی ۱۱۰ زن با سابقه سقط غیر عمد در بیمارستان های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. برای کشت، ۱۵ سی سی از خون مادران در لوله های حاوی سیترات ریخته شد و ۵ سی سی فایکول اضافه شد و نمونه با دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از جدا شدن لایه بافی کت، این لایه با محیط کشت DMEM مخلوط و در رده سلولی MRC-5 تلقیح شد و پس از ۷۲ ساعت از لحاظ انکلوزیون سلولی بررسی شد. نمونه ها همچنین به روش PCR از لحاظ حضور اسیدنوکلئیک ویروسی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از دو روش با استفاده از آزمون کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: از ۱۱۰ مادر مورد مطالعه، ۵ نفر (۴/۵٪) از لحاظ کشت، در رده های سلولی MRC-5 (سلول های فیبروبلاست ریوی انسان) مثبت بودند در حالی که در آزمون PCR، ۶ مورد (۵/۴٪) مثبت بودند. حساسیت و ویژگی کشت به ترتیب ۸۳/۳ و ۱۰۰ درصد بود در حالی که حساسیت و ویژگی آزمون PCR، ۱۰۰ درصد به دست آمد.

نتیجه‌گیری: روش کشت در رده های سلولی، احتمالاً به تنهایی برای تشخیص عفونت کفایت نمی کند. روش های تشخیصی PCR و الایزا به منظور ارزیابی دقیق عفونت ضروری می باشد و PCR می تواند جایگزین روش کشت شود.

کلمات کلیدی: سقط جنین، سیتومگالوویروس، کشت، واکنش زنجیره ای پلیمراز

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر علی کاظمی؛ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، باشگاه پژوهشگران و نخبگان، تهران، ایران. **تلفن:** ۰۲۱-۸۶۷۰۴۷۳۸؛ **پست الکترونیک:** dr_ali_kazemi@Yahoo.com

مقدمه

سیتومگالوویروس (CMV)[1]، یک عامل بیماری زای مهم در بیماران مختلف نظیر بیماران ایدزی، دریافت کنندگان پیوند و نوزادان دارای مادران آلوده می باشد. اغلب عفونت های ناشی از سیتومگالوویروس، به صورت مخفی می باشد و فقط در ۱۰ درصد موارد، عفونت با علائم بالینی همراه است (۱). ویروس حتی ممکن است برای مدت طولانی از ادرار و بزاق فرد بیمار به محیط دفع شود. در دوران بارداری رایج ترین عفونت، عفونت اولیه سیتومگالوویروس می باشد که این ویروس در ۴۰ درصد موارد از طریق جفت و یا در هنگام زایمان، از مادران فاقد آنتی بادی سیتومگالوویروس به جنین منتقل می شود (۲، ۳). این عفونت، یکی از دلایل عمده سقط جنین، ناهنجاری های مادرزادی و کاهش شنوایی در نوزادان می باشد که منجر به زیان اقتصادی و روانی در جامعه و خانواده فرد بیمار می شود. بر اساس مطالعات مختلف، ۲۵ درصد نوزادان متولد شده از مادران با عفونت اولیه سیتومگالوویروس، به عقب ماندگی ذهنی و ناتوانی در سیستم عصبی مبتلا هستند (۴، ۵).

بر اساس نتایج مطالعات مختلف، روش های متداول شناسایی عفونت سیتومگالوویروس شامل: کشت ویروس (استاندارد طلایی تشخیص)، تست سنجش آنتی بادی (الایزا) و روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلمیراز (PCR)[2] می باشد (۱). امروزه در کشورهای پیشرفته، به خصوص در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی، روش تشخیصی PCR در حال جایگزین شدن با روش کشت سلول خونی می باشد (۶). روش PCR، حساسیت بالایی جهت شناسایی ویروس در نمونه های ادرار، خون، پلاسما و مایع مغزی نخاعی دارد که انجام کشت، به دلیل زمان بر بودن مقدور نیست.

در ایران، نقش ویروس سیتومگالوویروس در سقط جنین مادران از نظر اپیدمیولوژیکی، به طور جامع ارزیابی نشده است. در مطالعه رحیمی و همکاران (۲۰۰۸) در تهران، شیوع عفونت سیتومگالوویروس در مادران سقطی، ۷/۱ درصد اعلام شد (۷)، لذا با توجه به اهمیت ویروس و تشخیص عفونت، مطالعه حاضر با هدف مقایسه روش کشت سلولی و روش مولکولی PCR در تشخیص عفونت های سیتومگالوویروس در سقط های خودبخودی انجام شد.

روش کار

این مطالعه مقطعی طی یک سال (از شهریور سال ۱۳۹۰ تا شهریور سال ۱۳۹۱) بر روی ۱۱۰ زنی که سقط غیر عمدی داشتند، در بیمارستان های آموزشی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. این مطالعه به صورت آینده نگر در مدت ۱۲ ماه انجام شد و تمام مراجعین مورد ارزیابی قرار گرفتند. از لحاظ آماری، شاخص های (p=۰/۵، q=۰/۵، $p1$=۰/۹۵، $p2$=۰/۰۵، β=۰/۵) مشخص و حداکثر حجم نمونه، ۶۹ نفر برآورد شد که برای بالا بردن دقت آماری، حجم نمونه معادل ۱۱۰ نفر در نظر گرفته شد. از تمام بیماران، رضایت نامه کتبی گرفته شد و پرسشنامه ای که شامل مشخصات افراد شامل: سن، شغل، سابقه بیماری، تعداد زایمان های قبلی و تعداد موارد سقط بود، تکمیل شد. به منظور نمونه برداری از بیماران، ۱۵ سی سی خون در شرایط استریل گرفته شد، بلافاصله پس از آن، ۵ سی سی از خون تهیه شده در لوله های حاوی سیترات (ماده ضد انقعاد) ریخته و ۵ سی سی فایکول[3] با پیپ استریل به آرامی اضافه شد تا حداقل اخلاط بین خون و فایکول ایجاد شود.

نمونه با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و لایه بافی کت جدا شده به لوله استریل دیگری منتقل شد. بافی کت با محیط کشت DMEM[4] (شرکت بهار افشان، ایران) مخلوط و روی فلاسک حاوی کشت سلولی رده MRC-5 (سلول های فیبروبلاست ریوی انسان) (بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور، تهران) تلقیح شد. سپس ۱ میلی لیتر تریپسین روی سلول ها ریخته شد و به محض کنده شدن اولین لایه سلولی، تریپسین تخلیه شد. ۳ میلی لیتر از محیط کشت DMEM به فلاسک افزوده و به ازای هر میلی لیتر محتویات، ۱۰ میلی گرم استرپتومایسین[1] و پنی سیلین

[1] Cytomegalovirus
[2] polymerase chain reaction
[3] Ficoll
[4] Dulbecco's Modified Eagle Medium

اضافه و pH محتویات با بی کربنات سدیم به ۷ رسانده شد و به مدت ۳ تا ۴ روز در انکوباتور CO_2 دار (۵ درصد) در حرارت ۳۷ درجه انکوبه شود تا رشد سلول کامل شود. تمام نمونه های مورد مطالعه از لحاظ کشت سلولی و آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

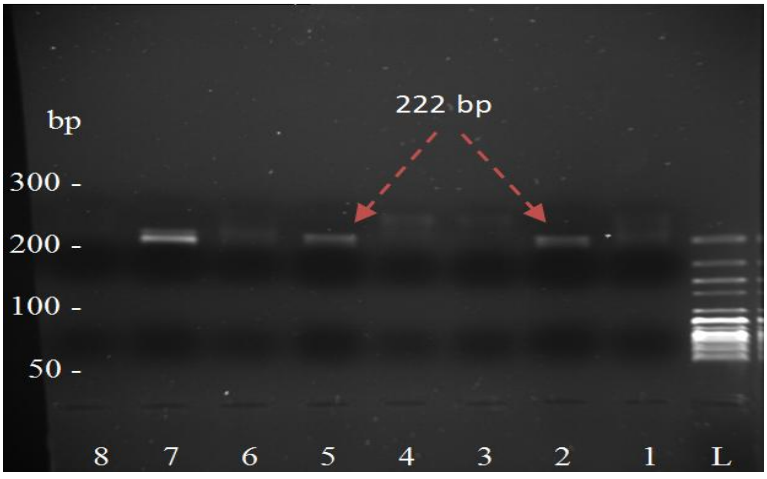
به منظور انجام تست PCR، ابتدا دئوکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) نمونه ها بر اساس دستورالعمل کیت (سیناژن PR7836C، نمایندگی ایران) استخراج شد، آنزیم تگ پلیمراز[2] و کلرید منیزیوم (۱/۵ میلی مول) در دستگاه ترموسایکلر وارد شد و از DNA به همراه پرایمر (۲۰۰ میکرومول) شامل ۱۴۷ زوج باز از چهارمین اگزون سیتومگالوویروس انسانی شامل بازهای [آدنین (A)، سیتوزین (C)، گوانین (G) و تیمین (T)] استفاده شد. در ادامه، محصول روی ژل آگارز ۳ درصد برده شد و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. در این بررسی، کنترل منفی، آب مقطر و کنترل مثبت، نمونه تأیید شده بیماری انتخاب شد. تعداد کنترل منفی و مثبت در هر سری یک عدد بود. نتایج حاصل از دو روش با استفاده از آزمون کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

میانگین سنی افراد مورد مطالعه ۴±۲۸ سال با محدوده ۴۶-۱۸ سال بود. از ۱۱۰ مادر دارای سقط غیر عمد، ۵ نفر (۴/۵٪) از لحاظ کشت، در رده های سلولی MRC-5 (سلول های فیبروبلاست ریوی انسان) مثبت بودند. وجود آلودگی در محیط کشت به عنوان معیار خروج نمونه از مطالعه بود (جدول ۱)، در حالی که در آزمون PCR، ۶ مورد (۵/۴٪) مثبت تلقی شدند (شکل ۱).

جدول ۱- مقایسه نتایج حاصل از آزمون کشت و PCR

نتایج کشت				PCR			
مثبت		منفی		مثبت		منفی	
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۵	۴/۵	۱۰۵	۹۵/۵	۶	۵/۴	۱۰۴	۹۴/۶



شکل ۱- تصویر حرکت نمونه و کنترل مثبت و منفی روی ژل در PCR
(شماره ۲ و ۵ نمونه مثبت، شماره ۷ کنترل مثبت، شماره ۸ کنترل منفی)

[1] Streptomycin
[2] Thermus aquaticus (Taq)

موارد مثبت کشت نیز در PCR مثبت بود. ضریب توافقی کاپا ۰/۸۹ به دست آمد و میزان توافق تشخیصی بین دو روش ۰/۹۰۲ بود.

سقط جنین در تمام افرادی که از لحاظ عفونت مثبت بودند و در ۷۳ نفر (۶۶/۳٪) از افرادی که از لحاظ عفونت با سیتومگالوویروس منفی بودند، برای اولین بار رخ داده بود. تمام افراد دارای عفونت سیتومگالوویروس و ۵۶ نفر (۵۰/۹٪) از افراد فاقد عفونت، خانه‌دار بودند، لذا بین عفونت و شغل افراد دارای عفونت سیتومگالوویروس ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) اما در افراد فاقد عفونت، ارتباط معنی‌داری بین سقط و شغل مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

از نظر گروه خونی، ۴ نفر از ۶ نفر دارای عفونت سیتومگالوویروس (۶۶/۶۰٪)، گروه خونی O داشتند اما از ۱۰۴ نفر فاقد عفونت، ۴۶ فرد (۴۴/۲٪) دارای گروه خونی O بودند (جدول ۲).

جدول۲- فراوانی گروه خونی در افراد بیمار و سالم

افراد مورد مطالعه / گروه خونی	افراد بیمار (تعداد)	درصد	افراد سالم (تعداد)	درصد
A	۱	۱۶/۷	۲۰	۱۹/۲۰
B	۱	۱۶/۷	۳۰	۲۸/۸۰
AB	۰۰/۰۰	۰۰/۰۰	۸	۷/۸۰
O	۴	۶۶/۶۰	۴۶	۴۴/۲۰

در این مطالعه، حساسیت تست کشت ۸۳/۳ و ویژگی آن ۱۰۰ درصد به دست آمد در حالی که حساسیت آزمون PCR، ۱۰۰ درصد به دست آمد. میانگین سنی افراد مبتلا به عفونت ۲۷/۴ سال و میانگین سنی افراد فاقد عفونت، ۲۹/۱ سال تعیین شد.

بحث

عفونت سیتومگالوویروس، یک دلیل عمده نقص جسمی (نقص شنوایی، نقص عصبی) در هنگام تولد در نوزادان به شمار می‌رود و میزان بروز آن به طور متوسط ۲ درصد گزارش شده است (۸). در مطالعه رحیمی و همکاران (۲۰۰۸)، شیوع عفونت سیتومگالوویروس، ۷/۱ درصد گزارش شد (۷)، در حالی که در مطالعه حاضر، در مجموع ۶ نفر (۵/۴) به این عفونت آلوده بودند. در مطالعه عبادی و همکاران (۲۰۱۱) در جهرم، میزان عفونت سیتومگالوویروس در موارد سقط مکرر، ۴۰ مورد (۴۲/۵٪) گزارش شد (۹) که میزان شیوع عفونت، بیشتر از مطالعه حاضر بود. در مطالعه سید زکی و همکاران (۲۰۰۷)، ۱۲ درصد از مادرانی که سقط جنین کرده بودند، عفونت سیتومگالوویروس داشتند (۱۰) که بیشتر از مطالعه حاضر بود. در مطالعه الخواجا و همکاران (۲۰۱۲)، شیوع عفونت در گروه‌های مختلف نوزادان، ۳ درصد گزارش شد (۱۱) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی نداشت. در مطالعه یاماموتو و همکاران (۲۰۰۱) و وائودری و همکاران (۲۰۱۰)، حساسیت و ویژگی کشت ویروس، ۱۰۰ درصد اعلام شد (۱۲، ۱۳) که با مطالعه حاضر همخوانی نداشت. در مطالعه سید زکی و همکاران (۲۰۰۷)، بیشترین موارد سقط جنین در گروه سنی ۲۹-۲۵ سال بود (۱۰)، در حالی که در مطالعه حاضر، میانگین سنی افراد دارای سقط جنین ، ۲۷/۴ سال بود. در مطالعه حاضر، نتایج آزمون PCR و کشت ویروس یکسان نبود و حساسیت و ویژگی آزمون PCR، ۱۰۰ درصد بود که با نتایج مطالعات پیکسائو (۲۰۰۵، ۲۰۱۲) همخوانی داشت (۱۴، ۱۵). در مطالعه دی‌ورایز و همکاران (۲۰۱۲)، در مقایسه بین دو روش زمان واقعی واکنش زنجیره ای پلمیراز[1] و کشت نمونه‌های ادرار، از ۲۸ مورد مثبت عفونت سیتومگالوویروس، ۲۵ مورد (۸/۲٪) در روش کشت مثبت و ۳ مورد به عنوان منفی کاذب تلقی شد (۱۶). جنبه های مثبت و منفی آزمون های به کار رفته در مطالعه حاضر حاکی از آن است که اختلاف نتیجه بین تست‌های به کار رفته در این مطالعه، یا ناشی از منفی کاذب کشت سلولی و یا ناشی از مثبت کاذب در آزمون PCR می باشد. منفی کاذب در کشت

[1] Real- time PCR

احتمالاً ناشی از انتقال نمونه در دمای اتاق و یا درمان ضد ویروس می باشد که در مطالعه حاضر، درمان ضد ویروسی انجام نشده بود. مثبت کاذب در PCR نیز می‌تواند ناشی از آلودگی نمونه ها در حین کار باشد که ایجاد گروه کنترل منفی در این مطالعه از احتمال بروز این امر کاست و احتمال منفی کاذب در کشت قوی‌تر به نظر می‌رسید. تست الایزا نیز در دو هفته اول بروز علائم بیماری منفی بود زیرا آنتی بادی سرمی آنقدر افزایش پیدا نکرده بود که بتواند تست الایزا را مثبت کند که این امر از جنبه های منفی الایزا بود.

نتیجه گیری

با توجه به بالاتر بودن حساسیت و ویژگی آزمون PCR نسبت به روش کشت سلولی، کاربرد آزمون PCR در تشخیص سریع عفونت های سیتومگالوویروس پیشنهاد می شود.

تشکر و قدردانی

امتیازات این مجموعه تحقیقاتی، متعلق به معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران موضوع طرح تحقیقاتی شماره ۱۸۳ م ت می باشد، بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه، مدیر محترم پژوهشی و کارشناسان محترم و همچنین از کلیه همکاران، متخصصین، مدیران و مسئولین محترم بیمارستان های آموزشی دانشگاه و دانشجویان محترمی که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. Rev Med Virol 2007 Jul-Aug;17(4):253-76. Review.
2. Demmler-Harison GJ. Congenital cytomegalovirus: Public health action towards awareness, prevention, and treatment. J Clin Virol 2009 Dec;46 Suppl 4:S1-5.
3. Cheeran MC, Lokensgard JR, Schlesis MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. Clin Microbiol Rev 2009 Jan;22(1):99-126.
4. Lazzarotto T, Guerr B, Gabrielli L, Lanari M, Landini MP. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. Clin Microbiol Infec 2011 Sep;17(9):1285-93.
5. Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM: Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. N Eng J Med 2005 Sep 29;353(13):1350-62.
6. Pass RF, Zhang C, Evans A, Simpson T, Andrews W, Huang W, et al. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. N Eng J Med 2009 Mar 19;360(12):1191-9.
7. Rahimi MK, Dolati M, Arshadi AA, Chaichan SH, Moosavi L. [Comparative study of tissue culture and ELISA methods for cytomegalovirus infection diagnosis in abortion] [Article in Persian]. Med J Islam Azad Univ Tehran Med Branch 2008;18(2):107-111.
8. Revello MG, Gerna G. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. J Clin Virol 2004 Feb;29(2):71-83. Review.
9. Ebadi P, Yaghobi R, Eftekhar F, Bagheri K. [Seroprevalence of CMV and rubella in women with recurrent spontaneous abortion in comparison] [Article in Persian]. J Fasa Univ Med Sci 2011 Dec;3(1):80-5.
10. el-Sayed Zaki M, Goda H. Relevance of parvovirus B19, herpes simplex virus 2, and cytomegalovirus virologic markers in maternal serum for diagnosis of unexplained recurrent abortions. Arch Pathol Lab Med 2007 Jun;131(6): 956-60.
11. AlKhawaja S, Ismaeel A, Botta G, Senok AC. The prevalence of congenital and perinatal cytomegalovirus infections among newborns of seropositive mothers. J Infect Dev Ctries 2012 May 14;6(5):410-5.
12. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Pinto PC, Figueiredo LT, Jorge SM. Usefulness of blood and urine samples collected on filter paper in detecting cytomegalovirus by the polymerase chain reaction technique. J Virol Methods 2001 Sep;97(2):159-64.
13. Vaudry W, Rosychuk RJ, Lee BE, Cheung PY, Pang XL, Preiksaitis JK. Congenital cytomegalovirus infection in high-risk Canadian infants: Report of a pilot screening study. Can J Infect Dis Med Microbiol 2010 Spring;21(1):e12-9.
14. Paixão P, Almeida S, Gouveia P, Binda S, Caroppo S, Barbi M. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools . J Virol Methods 2005 Sep;128(1-2):1-5.
15. Paixão P, Almeida S, Videira PA, Ligeiro D, Marques T. Screening of congenital cytomegalovirus infection by real-time PCR in urine pools. Eur J Pediatr 2012 Jan;171(1):125-9.

16. de Vries JJ, van der Eijkb AA, Wolthersc KC, Rusmana LG , Pas SD, Molenkamp R, et al. Real-time PCR versus viral culture on urine as a gold standard in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. J ClinVirol 2012 Feb;53(2):167-70.
17. Barbi M, Binda S, Primache V, Caroppo S, Dido P, Guidotti P, et al. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. J Clin Virol 2000 Sep 1;17(3):159-65.
18. Naessens A, Casteels A, Decatte L, Foulon W. A serologic strategy for detecting neonates at risk for congenital cytomegalovirus infection. J Pediatr 2005 Feb;146(2):194-7.
19. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Calvario A, Germinario C, Bozzi A, et al. Multicity Italian study of congenital cytomegalovirus infection. Pediatr Infect Dis J 2006 Feb;25(2):156-9.