تشخیص سریع و بررسی میزان شیوع سیتومگالوویروس در نوزادان زیر ۳ هفته با روش PCR و Real Time PCR

رضا یاری*[۱]، علی جوادی[۲]، عباس مروتی[۳،۴]، طلایه سید شاکری[۳]

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران
۲) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳) گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران
۴) باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، قم، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۱ **تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۱۹**

چکیده

مقدمه: بیشتر بیماری های نوزادان از طریق مادر به آن ها انتقال می یابد و احتمال ابتلای نوزادان به برخی بیماری ها با آلودگی مادر ارتباط زیادی دارد. سایتومگالوویروس شایع ترین علت عفونت مادرزادی محسوب شده و به عنوان یکی از عوامل سقط مکرر در مادران به خوبی شناخته شده است، در حال حاضر، روش های مولکولی می تواند به صورت معمول در امر تشخیص بسیار موثر باشد و در این مطالعه هدف راه اندازی متد تشخیصی با استفاده از PCR و REAL TIME PCR برای شناسایی سایتومگالوویروس با تکنیک های مولکولی می باشد.

مواد و روش ها: از ۱۰۰ نوزاد دارای علائم بالینی زیر ۳ هفته مشکوک به آلودگی با سایتومگالوویروس مراجعه کننده به مراکز درمانی قم نمونه های ادراری جمع آوری شد. نمونه های ادرار جهت وجود ویروس CMV ابتدا استخراج و سپس با تکنیک های PCR و REAL TIME PCR و با استفاده از پرایمر های اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته های پژوهش: از ۱۰۰ نوزاد ۴۰ نوزاد سن زیر ۱۰ روز و بقیه سن بالای ۱۰ روز، تا ۳ هفته داشتند. از این تعداد ۵۸ نوزاد DNA سایتومگالوویروس را از نمونه ادرار خود دفع می کردند. که با هر دو تکنیک PCR و REAL TIME PCR نتایج یکسان و همدیگر را تایید کردند.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد تست های ملکولی بالاخص ردیابی DNA ویروسی به روش PCR و مخصوصاً REAL TIME PCR می تواند در شناسایی هر چه سریع تر در روزهای نخست این ویروس موثر واقع شود. هم چنین ارزیابی بیشتر این آزمون با استفاده از نمونه های کلینیکی بیشتر، کاربرد این متد را در مجموعه های تشخیصی تایید خواهد کرد.

واژه های کلیدی: سایتومگالوویروس، PCR، نوزادان، Real Time PCR

*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، بروجرد، ایران

Email: rezayari@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.5.175]

مقدمه

تامین حفظ و ارتقاء سلامت کودکان زیر یک سال به عنوان یک گروه آسیب پذیر در خدمات بهداشتی درمانی جایگاه ویژه ای دارد. میزان مرگ و میر کودکان زیر یک سال از گویاترین شاخص های توسعه جوامع مختلف می باشد. این شاخص آماری نه تنها کمیت و تعداد مرگ و میر را نشان می دهد بلکه به همان اندازه بیانگر کیفیت زندگی است. بر اساس آمار موجود از کل موالید سالیانه در دنیا بیش از ۱۴ میلیون نفر در اولین سال زندگی از بین می روند که حدود ۶۰ درصد مرگ های سال اول زندگی را مرگ های نوزادان تشکیل می دهد(۱). با توجه به پیشرفت های علمی بشر به خصوص تلاش پژوهشگران در ایران بیشتر نوزادان در صحت و سلامت متولد می شوند ولی گاهاً یک نوزاد هنگام تولد در تماس با یک عامل عفونی آلوده و بیمار می گردد که نیازمند درمان و رسیدگی پزشکی خواهد شد(۲،۳).

سایتومگالوویروس بزرگ ترین عضوخانواده هرپس ویروس ها و جزء زیرخانواده بتاهرپس ویروس ها به شمار می رود دارای DNA دو رشته ای و قابلیت کدگذاری بیش از ۲۰۰ فرآورده پروتئین اساسی است که عملکرد بسیاری از این پروتئین ها هنوز به خوبی شناخته نشده است. از نظر پاتولوژی روش کلاسیک شناخت CMV در بافت ها، وجود سلول های بزرگ (سیتومگالیک) و حاوی انکلوزیون های داخل هسته ای می باشد که مشاهده آن ها قویاً به نفع عفونت فعال CMV است. CMV تمایل به آلوده سازی سلول های منونوکلئر و لنفوسیت دارد و در انتشار بیماری شواهد عفونت را در اغلب ارگان ها می توان مشاهده نمود(۴). در کشورهای در حال توسعه اغلب کودکان در سال های کودکی با CMV تماس پیدا می کنند و تقریباً ۱۰۰ درصد بزرگسالان شواهد سرمی مثبت سابقه تماس با ویروس را نشان می دهند در حالی که در کشورهای توسعه یافته فقط ۵۰ درصد بزرگسالان شواهد سرمی آلودگی را نشان می دهند(۵). انتقال به صورت مادر به جنین(از طریق جفت یا حین زایمان) و شیر مادر، فرزند به والدین، انتشار در مهد کودک ها، پیوند بافت و عضو می باشد. انتقال خون مهم ترین مشکلی که در درگیری با CMV ایجاد می شود. در درجه اول آلودگی جنین در حین بارداری و سپس عفونت های فعال در مبتلایان به نقص ایمنی و پیوند عضو است(۶،۷).

در کشورهای در حال توسعه اغلب کودکان در سال های کودکی با CMV تماس پیدا می کنند و تقریباً ۱۰۰ درصد بزرگسالان شواهد سرمی مثبت سابقه تماس با ویروس را نشان می دهند. در حالی که در کشورهای توسعه یافته فقط ۵۰ درصد بزرگسالان شواهد سرمی آلودگی را نشان می دهند(۸). از جمله روش های تشخیص ویروس می توان به تکنیک های بافت شناسی، روش ایمنولوژیک و شناساگر DNA، کشت، تست های سرولوژی و مهم تر و سریع از همه استفاده از تکنیک های مولکولی اشاره کرد. هدف از این مطالعه با توجه به اهمیت این میکروارگانیسم و اثرات جانبی آن بررسی میزان شیوع آلودگی به خصوص در دوران نوزادی اهمیت فراوانی دارد که با استفاده از تکنیک های PCR و REAL TIME PCR که با دقت بالا، تکرارپذیری و تشخیص سریع این بیماری کمک به سزایی در درمان داشته باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه بر روی ۱۰۰ نمونه بیولوژیک ادراری از افراد مشکوک به سایتومگالوویروس مراجعه کننده به مراکز طبی و چندین مرکز خصوصی انجام شد.

استخراج DNA: استخراج DNA از نمونه ها با استفاده کیت RIBO-prep کمپانی AmpliSens کشور روسیه انجام شد.

توالی پرایمر های اختصاصی مورد استفاده در واکنش PCR: در این مطالعه از پرایمری استفاده شد که قطعه ای با طول ۲۵۴ bp تولید کرده و احتمال اتصال پرایمر در حضور مقادیر اندک DNA را افزایش می دهد. این جفت پرایمر توسط نرم افزار CLC sequence viewer و با استفاده از سکانس های ثبت شده از این ژن در بانک اطلاعاتی NCBI طراحی شده و برای سنتز به شرکت سیناکلون ارسال شد(جدول شماره ۱). واکنش PCR جهت ارزیابی ژن هدف Ul۵۵ با شرایط برقرارای واکنش در حجم استاندارد ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این حجم ۱/۵ میلی مولار از

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.5.175]

یون منیزیم، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۱۰۰ نانوگرم ژنوم باکتری، ۰/۵ میکرومولار از پرایمرهای عقبی و جلویی و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر با استفاده از برنامه مشخص برای ۳۵ سیکل در شرایط دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه سپس ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای اتصال ۶۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. هم چنین یک واکنش ۲۵ میکرولیتری با شرایط مشابه و استفاده از آب دیونیزه به جای ژنوم باکتری به عنوان کنترل منفی انجام شد. پس از اتمام واکنش، ۷ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر ۰/۵X TBE با ولتاژ ۱۰۰، الکتروفورز گردید. در نهایت به منظور رویت باند مورد نظر، ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با UV مشاهده شد.

جدول شماره ۱. توالی های پرایمر و پروب مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی	طول قطعه
UL۵۵-f	۵'-ATAGGAGGCGCCACGTATTCC-۳'	۲۵۴bp
Ul۵۵-r	۵'-GTACCCCTATCGCGTGTGTTC-۳'	
Ul۵۵-probe	(FAM)۵'- ATGGCCCAGGGTACGGATCTTATTC-۳'(BHQ۱)	

سنجش بر اساس Taq Man Real Time PCR: پروب بر اساس ناحیه حفاظت شده ژن UL۵۵ توسط نرم افزار Allel ID ۷ طراحی و ارزیابی گردید و در نهایت پروب طراحی شده در پایگاه NCBI بلاست گردید. در انتهای ´۵ پروب، رنگ FAM به عنوان گزارشگر و در انتهای ´۳ آن رنگ BHQ۱ به عنوان خاموش کننده متصل گردید و جهت سنتز به شرکت سیناکلون ارسال گردید. توالی ژنی پرایمر و پروب در جدول شماره ۱ مشخص گردید.

راه اندازی Taq Man Real Time PCR: شرایط راه اندازی واکنش Taq Man Real Time PCR در حجم کلی ۲۰ ماکرولیتر با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت هر کدام با غلظت ۱۰ ماکرومولار، پروب با غلظت ۱۰ ماکرومولار، مسترمیکس ۲x(Takara, Japan)، رنگ ROX ۵۰X و DNA نمونه کنترل مریض انجام شد. برنامه تکثیر(۴۵ سیکل) و تشخیص نور فلورسنت با استفاده از Roche Light cycler ۹۶ با توجه به شرایط دمایی در شکل شماره ۲ انجام گردید.

پس از اتمام واکنش، نتیجه بر اساس منحنی تکثیر ارزیابی گردید.

جدول شماره ۲. برنامه واکنش Real Time PCR

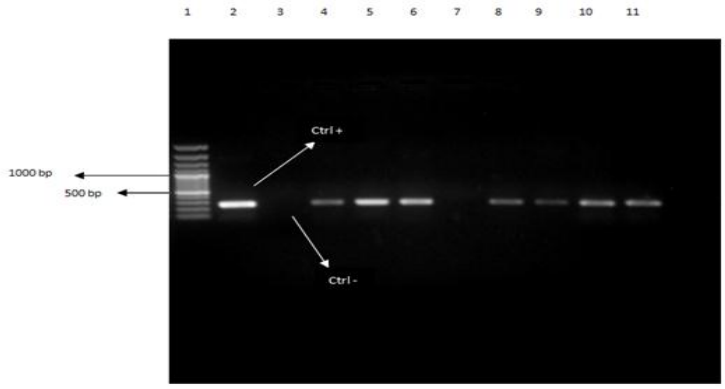
مرحله	دما و زمان	تعداد سیکل
دناتوراسیون اولیه	۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد	۱
دناتوراسیون ثانویه	۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد	۴۵
الحاق	۳۰ ثانیه در ۶۲ درجه سانتی گراد	

یافته های پژوهش

نتایج روش ملکولی با استفاده از ژل الکتروفورز: در این بررسی، نتایج الکتروفورز PCR بر روی نمونه ها انجام شد که براساس پرایمرهای طراحی شده برای ژن UL۵۵ باند ۲۵۴ باز برای نمونه های مثبت بررسی شد. از سویی نتیجه الکتروفورز محصول PCR تیوب کنترل منفی، هیچ گونه تکثیری را نشان نداد که تاییدکننده صحت واکنش PCR فوق بود. پس از انجام PCR بر روی ۱۰۰ نمونه نوزاد در ۵۸ نمونه این ویروس شناسایی شد که می توان نتایج بر روی ژل الکتروفورز مشاهده گردید(شکل شماره ۱).

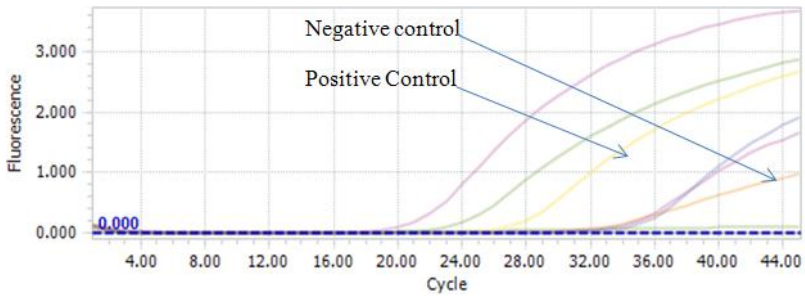
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.5.175]



شکل شماره ۱. نتیجه ژل الکتروفورز امپلیکون ژن UL۵۵ به طول bp ۲۵٦ که در تصویر ژل چاهک شماره ۱ سایز مارکر ۱۰۰ باز چاهک شماره ۲ کنترل مثبت، چاهک شماره ۳ کنترل منفی و از چاهک شکاره ٤ تا چاهک شماره ۱۱ نمونه بیمار نمی باشد.

بررسی نتایج Real-Time PCR : در این واکنش از نمونه کنترل مثبت ویروس به عنوان نمونه استاندارد استفاده شد. منحنی تکثیر مربوط به کنترل مثبت نشان داد که تکثیر از سیکل ۲۰ شروع شده است زیرا رشد ناشی از شکسته شدن پروب FAM، تاییدکننده تکثیر ژن Ul۵۵ است و عدم تکثیر مربوط به کنترل منفی نشان دهنده عدم آلودگی و تایید کننده صحت واکنش است.(شکل شماره ۲) پس از انجام تکنیک PCR Real Time برروی ۱۰۰ نمونه نوزاد مانند تکنیک PCR در ۵۸ نمونه CMV شناسایی گردید.



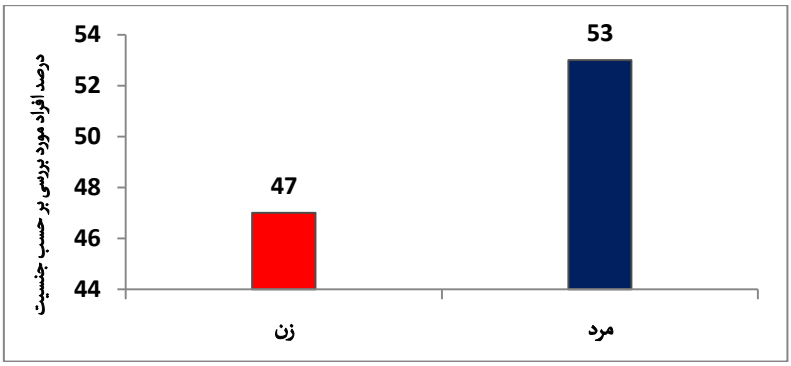
شکل شماره ۲. منحنی تکثیر توسط Real Time PCR برای تعدادی از نمونه های مثبت و منفی-سیگنال تکثیری نمونه کنترل مثبت در این پروسه نشان داد که به دلیل حضور پروب، تکثیر اختصاصی در نمونه کنترل مثبت انجام شد و در نمونه کنترل منفی هیچ گونه تکثیری مشاهده نشد.

در نمودارهای یک تا پنج، توزیع فراوانی جنسیت، سن و علایم بالینی مشاهده شده در افراد مورد بررسی به تفکیک ارائه شده است. نمودار شماره ۱ نشان دهنده درصد جنسیت مرد و زن در نمونه ها می باشد که ۵۳ درصد از نمونه ها مرد و ۴۷ درصد از نمونه ها را زنان شامل می شوند. هم چنین بر اساس سن نمونه های جمع آوری شده نمودار شماره ۲ و ۳ ترسیم شده است سن افراد مذکر و مونث مورد مطالعه را به تفکیک نشان می دهد. نمودار شماره ۲ و ۳ نشان دهنده سن کودکان مونث و مذکر را نشان می دهد که از نوزاد تا ۱۰ سال در بین نمونه های جمع آوری شده می باشد. نمودار های شماره ۴ و ۵ علائم بالینی ثبت شده برای هر یک از گروه های مونث و مذکر مورد مطالعه را نشان می دهد.

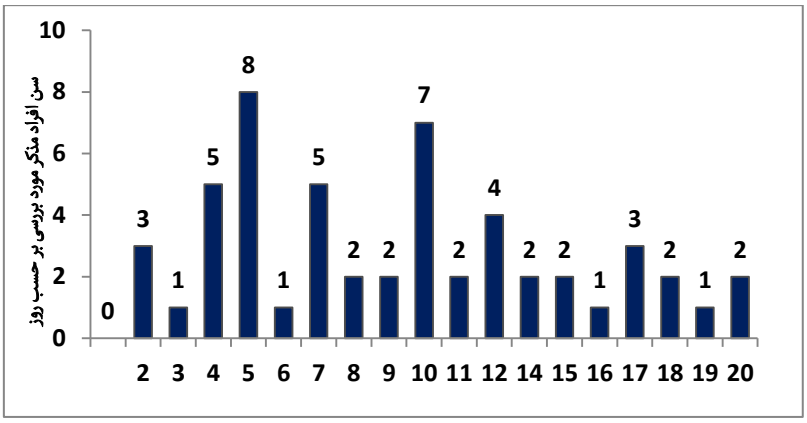
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.5.175]

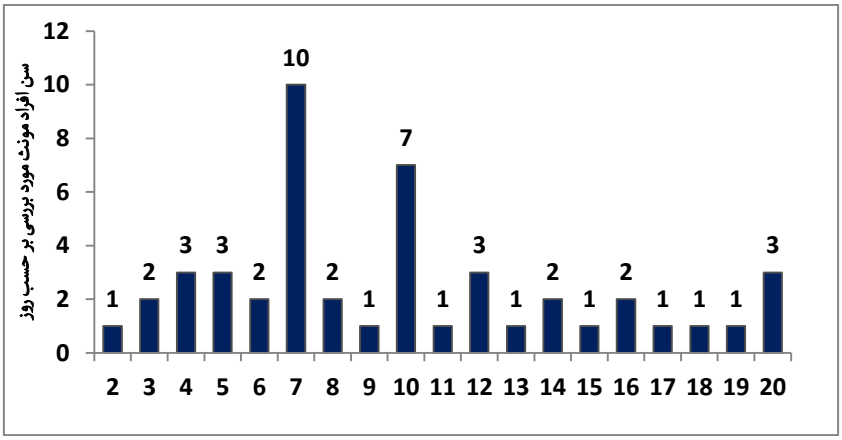
[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.5.175] [Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-10]



نمودار شماره ۱. تعداد افراد مونث و مذکر مورد مطالعه(۵۳ درصد از نمونه های مورد مطالعه جنس مذکر و ٤٧ درصد مونث می باشد)



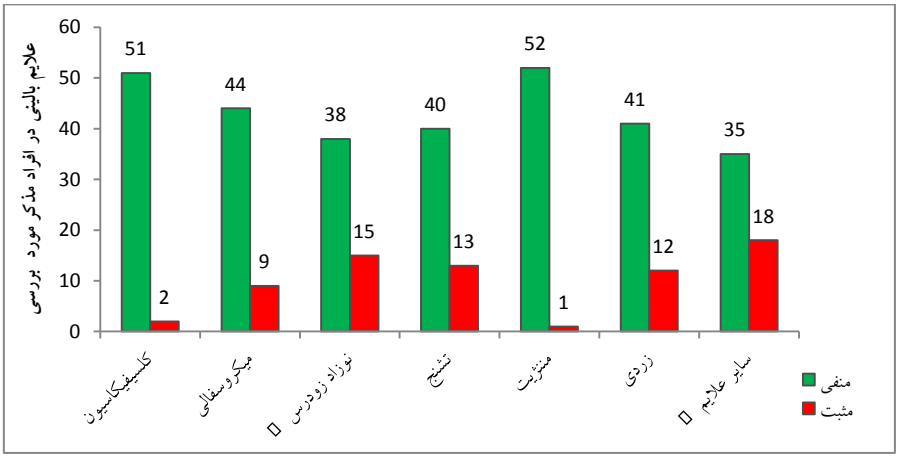
نمودار شماره ۲. سن افراد مذکر مورد مطالعه(میانگین سن افراد مورد مطالعه ۲/۹٤ سال می باشد)



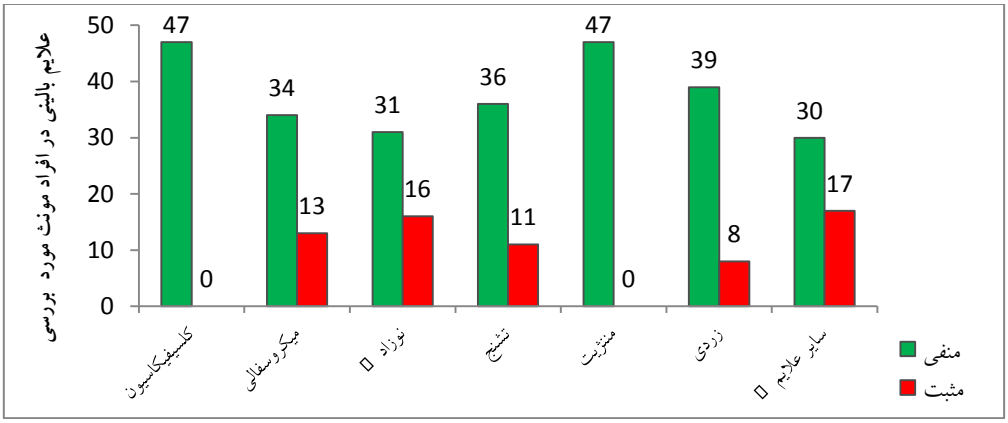
نمودار شماره ۳. سن افراد مونث مورد مطالعه(میانگین سن افراد مورد مطالعه ۲/۳۵ سال می باشد)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.5.175]



نمودار شماره ٤. علایم بالینی ثبت شده در افراد مذکر مورد مطالعه



نمودار شماره ٥. علایم بالینی ثبت شده در افراد مونث مورد مطالعه

بحث و نتیجه گیری

سایتومگالوویروس از علل مهم مرگ و میر در افراد با سیستم ایمنی پایین و یا بیماران سرکوب ایمنی است و می تواند در ایمنی افراد بد حال نیز تاثیر منفی بگذارد. هم چنین این ویروس می تواند با تشدید اختلال عملکرد ارگان ها همراه باشد(۹،۱۰). سایتومگالوویروس عامل غیر ژنتیکی پیشرو در ناهنجاری های مادرزادی در کشورهای توسعه یافته است. سایتومگالوویروس مادرزادی ممکن است در مرگ جنین و نوزاد نقش داشته باشد و به توسعه عوارض بالینی جدی منجر شود(۱۱). عفونت مادرزادی سایتومگالوویروس علت اصلی عوارض طولانی مدت است. سایتومگالوویروس اغلب از نوزاد نارس منتقل اما عفونت معمولاً بدون علامت است. ارتباط ژنوتیپی ویروس سایتومگالوویروس و تظاهرات بالینی در نوزادان به اثبات رسیده است(۱۲). عفونت مادرزادی سایتومگالوویروس از علل مهم و شایع کم شنوایی و یا ناشنوایی حسی در کودکان است که این اختلال شنوایی می تواند دوطرف یا یک طرفه باشد با این حال تشخیص زود هنگام می تواند با غربالگری اولیه معمول از همه نوزادان برای اختلال شنوایی تا قبل از سه هفتگی کمک کننده باشد و اهمیت این بررسی را در نوزادان تازه متولد شده بیشتر نشان می دهد(۱۳،۱۴).

در این بررسی ۱۰۰ نمونه ادرار نوزادان زیر سه هفته مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج بررسی با توجه به متغیرهای سن بر حسب روز، جنس، علائم بالینی مختلف در نوزادان تازه متولد شده و دو روش متفاوت شامل روش PCR و روش Real Time ارزیابی شدند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.5.175]

از تعداد ۱۰۰ نمونه نوزاد به طور کلی ۵۳ نوزاد(۵۳ درصد) پسر و ۴۷ نوزاد(۴۷ درصد) دختر بودند. ۴۰ نوزاد(۴۰ درصد) سن زیر ۱۰ روز و بقیه سن بالای ۱۰ روز تا سه هفته داشتند. نتایج حاصل از انجام PCR به روش الکتروفورزیس برای سایتومگالوویروس بر روی ۱۰۰ نمونه ادرار نوزادان، ۵۸ نوزاد مثبت(۵۸ درصد) و ۴۲ نوزاد منفی(۴۲ درصد) را نشان دادند. تمامی ۱۰۰ نمونه با تکنیک Real Time مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج این همان نتایج PCR معمولی را تایید کردند(معادل ۵۸ درصد مثبت و ۴۲ درصد منفی برای سایتومگالوویروس). در با توجه به نتایج به دست آمده این نکته حائز اهمیت است که سایتومگالوویروس در نوزادان پسر فراوانی بیشتری از خود نشان داده است و در هیچ مرجعی ارجحیت ابتلا پسران نسبت به دختران و بالعکس برای سایتومگالوویروس گزارش نشده است. لازم به ذکر است نمونه ادرار سایتومگالوویروس مثبت نشانه بیماری فعال می باشد.

نمونه های بیماران برای تست های ملکولی شامل ۱۰۰ نمونه ادرار بود که با دو روش PCR و Real Time که هر دو روش جواب ها یکسان و همدیگر را تائید می کردند. می توان گفت احتمالاً ادرار از حساسیت و اختصاصیت کافی برای بررسی DNA ویروسی برخوردار است. در گزارشی که در اتریش و در سال ۲۰۱۴ انجام شده به این نکته اشاره شده که در مقایسه بین ادرار و بزاق برای پیگیری CMV DNA با روش PCR و با توجه به نرخ ۱۸ درصد مثبت از ادرار و ۱۶ درصد مثبت از بزاق، ادرار برتر از بزاق در غربالگری عفونت CMV پس از تولد در نوزادان زودرس است(۱۵).

هم چنین در مطالعه ای در آگوست ۲۰۱۴ روش تکثیر هوشمند و سریعی برای تشخیص CMV به نام (SMAP) در ادرار نوزادان گزارش شد که تنها ۶۰ دقیقه زمان می برد و فقط برای تشخیص از طریق ادرار نوزادان کارآمد است(۱۶). این تحقیق نشان داد از ۱۰۰ نوزاد زیر سه هفته مورد بررسی ۵۸ نوزاد برای CMV DNA مثبت شدند.

در مطالعه ای در سال ۲۰۱۴ در کالیفرنیا و پس از ۵ سال بر روی نوزادان NICU با روش PCR و کشت ۱۵۶ نوزاد مبتلا به CMV بودند(۱۷). در مطالعه ای در لهستان در سال ۲۰۱۰ که بر روی ادرار نوزادان زیر ۳ هفته انجام شده بود ۲۷ نفر از ۱۴۹۱ بیمار عفونت CMV را داشتند که از این ۲۷ نفر ۱۶ مورد معادل ۵۹ درصد طی ۳ هفته اول زندگی علائم عفونت را از خود نشان می دهند(۱۸).

فراوانی تشنج در جامعه مورد مطالعه ما ۲۴ درصد بود که نسبت به مطالعه ای در ایران که در سال ۸۳ انجام شده و فراوانی تشنج را ۵۳ درصد گزارش کرده است کمتر بود(۹).

فراوانی میکروسفالی در مطالعه دکتر دانشجو و همکاران ۳۹ درصد اعلام شده است و در همین مقاله که در سال ۸۳ منتشر شده ذکر شده است که در مطالعات دیگر این فراوانی ۵۰ تا ۸۰ درصد بوده است که بیشتر از آمار ۳۹ درصد مقاله فوق است. در حالی که در جمعیت مورد بررسی ما فراوانی میکروسفالی ۲۲ درصد است که نسبت به مطالعات اخیر کمتر است.

در بررسی حاضر فراوانی زردی ۲۰ درصد و کلسیفیکاسیون مغزی ۲ درصد بوده است. فراوانی کلسیفیکاسیون در مطالعه ای در سال ۲۰۰۰ حدود ۲۲ درصد گزارش شده است(۱۹) در مقاله دکتر دانشجو ۵۶ درصد گزارش شده است که شیوع بالای کلسیفیکاسیون مغزی را در بیماران مورد بررسی شان به این علت دانسته اند که از ۳۴ کودک مبتلا به علایم عصبی در ۱۸ نفر که علایم شدید تر و اختصاصی تر داشتند CT مغز به عمل آمده است. در همین مقاله CMV را به عنوان عامل شایع عفونت مادرزادی و مسئول ۶۵ درصد از زردی نوزادان تازه متولد شده دانسته است. با توجه به اهمیت بررسی های سرولوژیک به خصوص در نوزادان تازه متولد شده و اهمیت تیترهای مثبت منفی آنتی بادی سرمی و احتمالاً رابطه مستقیم آن با وجود بیماری یا عدم وجود آن، در این مطالعه به بررسی سرولوژیک تیترهای آنتی بادی علیه CMV نیز پرداخته است. البته عفونت اکتسابی پریناتال در شیر خواران علی رغم حضور آنتی بادی کسب شده از مادر بر علیه CMV می تواند اتفاق رخ دهد(۹،۱۹). در مقاله ای دیگر در سال ۲۰۱۴ بهترین نشانگرهای ویروسی نوزاد، سطح DNA

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.5.175]

ویروس CMV و البته شاخص IgM خاص ویروس CMV و نهایتاً علائم در هنگام تولد اعلام شده که به طور قابل توجهی با عوارض طولانی مدت ارتباط دارد(۲۰). در مطالعه به بررسی همبستگی های بین داده های به دست آمده در طول یک سال نیز پرداختیم. ابتدا همبستگی میان سن و نمونه ها محاسبه گردید. بین دو متغیر سن و سایتومگالوویروس مثبت در سطح P<۰.۰۱ همبستگی وجود دارد و از نوع مستقیم و ناقص است به این معنا که با افزایش سن ابتلاء به سایتومگالوویروس زیاد شده است. هم چنین به بررسی همبستگی بین جنسیت و تاثیر آن در ایجاد بیماری نیز مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به P<۰,۰۵ مشخص شد تاثیرگذار نبوده است. هم چنین بایستی به این موضوع توجه کرد که بر اساس نتایج ایجاد شده از تست های PCR و Real Time PCR پرایمـــــرها و پروب ها دارای حساسیت و اختصاصیت بسیار بالایی جهت شناسایی سریع ویروس بر اساس ژن UL۵۵ می باشد.

با نظر به این موضوع که استفاده از تکنیک های روتین برای شناسایی این ویروس می تواند سبب ایجاد نتایج منفی کاذب گردد لذا به کارگیری روش تشخیصی مولکولی PCR و Real Time PCR به عنوان تکنیک های تشخیصی سریع، حساس، بسیار دقیق با تکرارپذیری بالا به عنوان یک تست روتین در مراکز درمانی برای شناسایی این ویروس قابل ارزیابی می باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد جهت انجام این طرح پژوهشی، صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

Referenses

۱. Sharifzadeh GR, Namakin K. [Investigation of deaths of children under one year of relevant factors in birjand]. Med J Isfahan Uni۱۳۸۸;۱:۵۱-۸. (Persian)

۲.Yeager A, Grumet C, Hafleigh E, Arvin A, Bradley J, Prober C. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. J Pediatr۱۹۸۱;۹۸: ۲۸۱-۷.

۳.Valizadeh E. Cytomegalovirus infection in renal transplant patients receiving. Komesh۱۹۹۹;۱:۹-۱۵.

٤.Lanari M, Lazzarotto T. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. Pediatrics ۲۰۰٦;۱۱۷:۷٦-۸۳.

٥.Pignatelli S, Dalmonte P, Rossini G, Landini MP. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus wild type strains. Rev Med Virol۲۰۰٤;۱٤:۳۸۳-٤۱۰.

٦.Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The silent global burden of congenital cytomegalovirus. Clin Microbiol Rev۲۰۱۳;۲٦:۸٦-۱۰۲.

۷. Boppana A, Suresh F. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. Pediatrics ۱۹۹۷;۹۹:٤۰۹-۱٤.

۸. Pati SK, Pinninti S, Novak Z, Chowdhury N, Patro RK, Fowler K, et al. Genotypic diversity and mixed infection in newborn disease and hearing loss in congenital cytomegalovirus infection. Pediatr Infect Dis J ۲۰۱۳.۳۲:۱۰۵۰-٤.

۹.Golalipour G, Khodabakhshi E, Ghaeimi B. Prevalence of torch antibodies in newborns with congenital malformations and their mothers in Gorgan. J Gorgan Uni Med Sci۲۰۰۸;۱۰:٤٥-٥۰.

۱۰. Goudarzi E, Yousefi JV, Harzandi N. Survey of polymerase chain reaction efficiency in the detection of mycoplasma, listeria and brucella in culture negative samples obtained from women with abortion, Mazand university medical science۲۰۱۲; ۱٥:٦۱-۹.

۱۱. Gunkel J, Wolfs TF, Nijman J, Schuurman R, Verboonmaciolek MA, Vries LS. Urine is superior to saliva when screening for postnatal cmv infections in preterm infants. J Clin Virol۲۰۱٤; ٦۱: ٦۱-٤.

۱۲.Lorente AM, Castillo CL. Congenital cytomegalovirus infection in fraternal twins: a longitudinal case study examining neurocognitive and neurobehavioral correlates. Appl Neuropsychol Child۲۰۱۲;۱: ٦۳-۷۳.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.5.175]

۱۳. Boppana SB, Ross SA, Novak Z, Shimamura M, Tolan RW, Palmer AL, et al. Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. JAMA ۲۰۱۰;۳۰۳:۱۳۷۵-۸۲.

۱٤. Barbi M, Binda S, Primache V, et al. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. J Clin Virol ۲۰۰۰;۱۷:۱۵۹-٦۵.

۱۵.Kobayashi Y, Morioka I, Koda T, Nakamachi Y, Okazaki Y, Noguchi Y, et al. Low total IgM values and high cytomegalovirus loads in the blood of newborns with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. J Perinatal Med۲۰۱۵;٤۳:۲۳۹-٤۳.

۱٦. Toumpas CJ, Clark J, Harris A, Beswick R, Nourse CB. Congenital cytomegalovirus infection is a significant cause of moderate to profound sensorineural hearing loss in Queensland children. J Paediatr Child Health۲۰۱٤;۳۰:٥٤۱-٤.

۱۷.Levinson W, Jawetz E. Medical microbiology and immunology examination and board review.٤th ed. Appleton Lange Publication.۱۹۹٦;P.۲۳۲-٥.

۱۸. Suresh B, Shannon R, Zdenek N. Dried blood spot Real Time PCR assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. JAMA۲۰۱۰;۳۰۳:۱۳۷٥-۸۲.

۱۹. Toplu O, Epikmen A. Neuropathologic study of border disease virus in naturally infected fetal and neonatal small ruminants and its association with apoptosis. Vet Pathol J ۲۰۱۱;٤۸:٥۷٦-۸۳.

۲۰. Nijman J, Mandemaker FS, Verboonmaciolek MA, Aitken SC, Vanloon AM, Vries LS. Genotype distribution viral load and clinical characteristics of infants with postnatal or congenital cytomegalovirus infection. Plos One ۲۰۱٤;۹:۱۰۸-۱۸.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.5.175]

Rapid Detection and Prevalence of Cytomegalovirus in Infants under Three Weeks by PCR and Real Time PCR

Yari R [*۱], *Javadi A* [۲], *Morovvati A* [۳،٤], *Seyedshakeri T* [۳]

(Received: September ۱۱, ۲۰۱٦ Accepted: November ۹, ۲۰۱٦)

Abstract

Introduction: Most of the newborns' diseases transfer to them through their mothers. Cytomegalovirus (CMV) is the most prevalence infections which transfer from mother to embryo. CMV is the cause of congenital infection and is known as spontaneous abortion in mothers. This virus can cross the placenta and cause clinical signs in embryo and infant. The aim of this study was to develop a PCR and Real Time PCR for diagnosis of Cytomegalovirus using molecular tests.

Materials & methods: In this study, out of ۱۰۰ infants with clinical signs (under ۳ weeks) who referred to Qom and were suspected to infection with CMV. The urine samples were studied for existence of DNA for using PCR and Real Time PCR methods and using specialized primers and probe.

Findings: Out of ۱۰۰ newborn, DNA of CMV was excreted through urine. ۵۸ newborns have CMV DNA in their urines. The results with ۲ methods have similar PCR and Real Time PCR. The CMV DNA was not found in ۱۹ newborns.

Discussion & conclusions: The results show that the molecular tests are influential for fast diagnosis especially tracking viral DNA using PCR method. Also on the strength of this research, the importance of this study and submitting solutions for fast and accurate diagnosis of this Virus in newborns immediately after delivery is necessary for treatment and preventing this Virus.

Keywords: Cytomegalovirus, PCR, Real Time PCR, Urine

۱. *Dept of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Borujerd Branch, Borujerd, Iran*
۲. *Dept of Pathobiology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
۳. *Dept of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran*
٤. *Young Researchers and Elite Club, Qom, Iran*
**Corresponding author Email: rezayari@yahoo.com*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-09-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.5.175]