مقایسه دو روش الیزا و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نستد در تشخیص آلودگی به ویروس سیتومگال انسانی

زهرا هاشمی‌زاده *
دکترمحمد معتمدی‌فر **
دکترمازیار ضیائیان ***

* کارشناس ارشد میکرب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، بیمارستان نمازی، بخش آموزش
** دکترای میکرب‌شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه باکتری و ویروس‌شناسی
*** دکترای ویروس‌شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، بیمارستان نمازی، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی

تاریخ وصول: ۱۳۸۵/۱۰/٤
تاریخ پذیرش: ۱۳۸٦/٤/۱۱

مؤلف مسئول: دکتر محمد معتمدی‌فر
پست الکترونیک: motamedm@sums.ac.ir

چکیده:

مقدمه و هدف: عفونت ویروس سیتومگال انسانی در افراد عادی معمولاً بدون علامت و با نهفتگی مادام‌العمر است، اما نقصان در عملکرد سیستم ایمنی سبب فعال شدن ویروس می‌گردد. این ویروس عاملی مهم در مرگ و میر بعضی از بیماران نیازمند دریافت خون می‌باشد. هدف از این مطالعه مقایسه دو روش الیزا و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نستد در تشخیص آلودگی به ویروس سیتومگال انسانی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تحلیلی تعداد ۳٦٤ نمونه خون در طی یک دوره هشت ماهه از اردیبهشت ماه تا آذرماه ۱۳۸۳ از کلیه اهدا کنندگان خون مراجعه کننده به مرکز انتقال خون فارس مرکز شیراز جمع‌آوری وآنتی‌بادی‌های اختصاصی از نوع ایمنوگلوبولین جی و ایمنوگلوبولین ام در سرم آنها علیه ویروس سیتومگال به روش الیزا بررسی گردید. سپس به منظور تشخیص ویروس سیتومگال، دی ان آ استخراج شده از ۱۰٤ نمونه بافی‌کوت و۲۰ نمونه سرم با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نستد مورد آزمایش قرار گرفته و نتایج حاصله با نتایج الیزا مقایسه گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و شاخص‌های توصیفی و آزمون‌های آماری مجذور کای و ضریب کاپا تحلیل گردید.

یافته‌ها: از تعداد۳٦٤ نمونه سرم افراد اهدا کننده خون، ۳٦۰ نمونه (۹۸/۹درصد) دارای ایمنوگلوبولین جی (سرم مثبت) و تنها ۱٦ نمونه (٤/٤درصد) دارای هر دو نوع ایمنوگلوبولین جی و ایمنوگلوبولین ام اختصاصی ضد ویروس تشخیص داده شدند. در بافی‌کوت خون۱۰۰ بیمار سرم مثبت ٦٤ نمونه (٦٤ درصد) حاوی دی ان آ ویروس سیتومگال انسانی به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نستد تشخیص داده شد. تنها در ۸ نفر(٤۰درصد) از ۲۰ نفر اهدا کننده دارای ایمنوگلوبولین جی(سرم مثبت) که در بافی‌کوت آنها نیز ژنوم ویروس تشخیص داده شده بود، دی ان آ ویروس سیتومگال، در سرم آنان تشخیص داده شد. نمونه‌های بافی‌کوت و سرم ٤ اهدا کننده سرم منفی، عاری از ژنوم ویروس تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: اگرچه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نستد بر روی نمونه بافی‌کوت دارای ارزش تشخیصی در نمونه خونی است، اما در اهدا کنندگان خون روش سرولوژیک الیزا روش غربالگر مناسب‌تری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ویروس سیتومگال انسانی، اهداکنندگان خون، الیزا، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نستد

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ویروس سیتومگال انسانی یکی از اعضاء خانواده هرپس ویریده و زیر خانواده بتاهرپس ویرینه می‌باشد(۱) که عامل ایجاد سندرم‌های متنوعی در کودکان و افراد بالغ بوده و شایع‌ترین عامل عفونت ویروسی مادرزادی و نوزادی در تمام دنیا است(۲).

انتقال ویروس از طریق بزاق، ادرار، شیر، ترشحات واژن و مایع منی است(۳). آلودگی اولیه در افراد دارای سیستم ایمنی طبیعی خفیف و گاهی بدون علامت است(٤). پس از آن ویروس در سلول‌های میزبان و عمدتاً لکوسیت‌ها، نهفته شده و در صورت بروز اختلال در وضعیت ایمنی مثلاً تجویز داروی سرکوب‌گر ایمنی و یا مبتلایان به ایدز مشاهده می‌شود(٥ و ٤).

عفونت ثانویه از فعالیت مجدد ویروس نهفته ایجاد می‌گردد. شیوع این عفونت در جوامع انسانی بسته به شرایط اقتصادی و بهداشتی از ٤٠ تا ١٠٠ درصد در نوسان است(٧ و ٦).

این ویروس عامل عمده عفونت شدید در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی از جمله دریافت کنندگان پیوند بوده و از علل مهم مرگ و میر در بیماران پیوندی است. ذات‌الریه ناشی از این ویروس در گیرندگان پیوند مغز استخوان در ٨٥ درصد موارد کشنده است(٧و٦، ١). در مبتلایان به ایدز گاستروآنتریت و رتینیت از عواقب خطرناک عفونت با ویروس سیتومگال است(٧ و١). این ویروس قادر به انتقال از طریق جفت و ایجاد نقایص جنینی است (٨). در نوزادان نارس دچار ضعف سیستم ایمنی، ابتلا به ویروس سیتومگال انسانی به دنبال دریافت خون یا فراورده‌های خونی می‌تواند سبب ایجاد بیماری‌های شدید گشته و این درگیری با تعداد دفعات دریافت محصولات خونی و یا حجم آنها ارتباط دارد(٢).

با توجه به طیف وسیع بیماران دریافت کننده خون و محصولات آن، مانند بیماران پیوندی، مبتلایان به لوکمی و موارد کم خونی، آگاهی از شیوع عفونت با ویروس سیتومگال انسانی در اهدا کنندگان خون ضروری است. روش سرولوژیک الیزا با توجه به سهولت در تشخیص عفونت سیتومگال در اهدا کنندگان خون کاربرد داشته و دارد(١٠و٩)، اما در بعضی از مقالات نیز کاربرد روش‌های مولکولی مثل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به دلیل حساسیت بیشتر توصیه شده است(١٢ و ١١).

هدف از این مطالعه مقایسه دو روش الیزا و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نستد در تشخیص آلودگی به ویروس سیتومگال انسانی است.

مواد و روش‌ها

این یک مطالعه تحلیلی در طی هشت ماه از اردیبهشت ماه تا آذر ماه ١٣٨٣ می‌باشد که از کلیه ٣٦٤ داوطلب سالم اهدا کننده خون به مرکز انتقال خون فارس مرکز شیراز در دامنه سنی ١٨ تا ۶۴ سال، دو نمونه خونی یکی با استفاده از ضد انعقاد

Archive of SID

www.SID.ir

ای دی تی آ[1] جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و دیگری بدون ای دی تی آ برای تهیه سرم اخذ گردید.

نمونه‌گیری از افراد با اطلاع و کسب رضایت کتبی ایشان صورت گرفت.

با استفاده از کیت‌های الیزا مارک کاپیتا [2] با حساسیت ۹۹ درصد و ویژگی ۹۶ درصد، وجود آنتی‌بادی‌های اختصاصی از نوع ایمنوگلوبولین جی[3] و ایمنوگلوبولین ام[4] علیه سیتومگالوویروس در سرم‌ها به روش کیفی تعیین گردید. تشخیص نمونه‌های مثبت از منفی با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده کیت انجام گردید.

از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده با ضد انعقاد، بافی‌کوت جدا شد. به وسیله شمارش‌گر سلولی مخصوص خون‌شناسی شمارش تعداد سلول‌ها انجام و با استفاده از بافرفسفات(pH = ۷/۴) شمارش سلول‌ها به ۱×۱۰^{۷} سلول در هر میلی‌لیتر رسانده شد(۱۳).

دی ان آ[5] تعداد ۱۰۴ نمونه بافی‌کوت جدا شده از خون افراد سرم مثبت و سرم منفی و همچنین ۲۰ نمونه سرم افراد سرم مثبت به روش فنل کلروفرم (۱٤) استخراج و به کمک آزمایش زنجیره‌ای پلی‌مراز به روش نستد ژن UL55 در دو مرحله(۱۵) تکثیر شد. مواد لازم برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مرحله اول برای هر نمونه به این قرار بود. آنزیم پلی‌مراز پی اف یو [6] (۲/۵ واحد در میکرو لیتر، سیناژن، ایران) مقدار ۰/۴ میکرولیتر، بازهای دزوکسی نوکلئوتید ۱۰ میلی‌مول (سیناژن، ایران) مقدار ۰/۵ میکرولیتر، سولفات منیزیم ۲۵ میلی‌مول مقدار ۳ میکرولیتر، بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (سیناژن، ایران) ۲/۵ میکرولیتر و میزان ۵ میکرولیتر دی ان آ و ۱ میکرولیتر از آغازگرهای ´5-TGA GGA ATG TCA GCT TC-3´ و ´5-TCA TGA GGT CGT CCA GA-3´ با غلظت ۲۰ پیکومول در میلی‌لیتر برای هر نمونه استفاده گردید. سپس نمونه آماده شده در دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، برای تکثیر قطعه خالص دی ان آ با برنامه زیر قرار داده شده؛ ۱: دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۶۰ ثانیه در یک دور، ۲: دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه که برای ۳۰ بار تکرار گردید و ۳: دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه که یک بار تکرار گردید. از محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به دست آمده در مرحله اول برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مرحله دوم استفاده گردید که مواد به کار رفته از نظر مقادیر همانند مرحله نخست بوده و از محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مرحله نخست مقدار ۰/۵ میکرولیتر اضافه و آغازگرهای ´5-TCG TCC AGA CCC TTG AGGTA-3 و

1-EDTA
2-Capita™ Cytomegalovirus(Trinity biotech, Jamestown, USA)
3-IgG
4-IgM
5-DNA
6-Pfu polymerase

Archive of SID
www.SID.ir

5´-CCA GCC TCA AGA TCT TCA T-3 هر کدام به مقدار ۱ میکرولیتر اضافه و حجم نهایی به وسیله آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مرحله دوم شامل؛ ۱: دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰۰ ثانیه یک دور، ۲: دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه که ۳۰ بار تکرار شد و ۳: دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۲۰ ثانیه که یک دور تکرار شده است. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تکثیر دی ان آ در مرحله دوم، محصول حاصله بر روی ژل آگارز ۲ درصد در کنار کنترل مثبت(سیناژن، ایران) و شاخص وزنی ۱۰۰جفت بازی (سیناژن، ایران) الکتروفورز گردید و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید و سپس ژل مربوطه را بر روی دستگاه ایلومیناتور مشاهده و در صورت وجود باندهای دی ان آ عکس‌برداری شد. باند ۳۰۰ جفت بازی شاخص آلودگی با ویروس سیتومگال بود(۱۵).

داده‌های جمع آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS [1] و شاخص های توصیفی و آزمون مجذور کای[2] تحلیل گردید. همخوانی دو روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نستد و الیزا با ضریب کاپا[3] مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

از تعداد ۳٦٤ نمونه سرمی تعداد ۳٦۰ مورد (۹۸/۹درصد) دارای ایمنوگلوبولین جی اختصاصی علیه ویروس سیتومگال انسانی و ۱٦ مورد (٤/٤درصد) دارای ایمنوگلوبولین ام و ایمنوگلوبولین جی اختصاصی ضد ویروس بودند. ٤ نمونه (۱/۱درصد) از ۳٦۰ نمونه فوق فاقد هر گونه آنتی‌بادی اختصاصی از نوع ایمنوگلوبولین ام و ایمنوگلوبولین جی علیه ویروس سیتومگال در سرم خود (سرم منفی)بودند.

در نمونه‌های بافی‌کوت کلیه ۱٦ نفر از اهدا کنندگان واجد ایمنوگلوبولین ام و ایمنوگلوبولین جی اختصاصی ضد ویروس و٦٤ نفر(٦٤درصد) از ۱۰۰ نفر از اهدا کنندگان دارای ایمنوگلوبولین جی (سرم مثبت) که به صورت تصادفی انتخاب و بر روی لایه سلول‌های سفید خونی آنها واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نستد انجام شده، وجود ژنوم ویروس تشخیص داده شد(تصویر۱). از طرف دیگر با همین روش، تنها در ۸ نفر (٤۰ درصد) از ۲۰ نفر اهدا کننده واجد ایمنوگلوبولین جی (سرم مثبت) که در بافی‌کوت آنها نیز ژنوم ویروس تشخیص داده شده بود، دی ان آ ویروس سیتومگال در سرم این افراد نیز، تشخیص داده شد. نمونه‌های بافی‌کوت و سرم ٤ اهدا کننده سرم منفی، عاری از ژنوم ویروس تشخیص داده شد. در نهایت فقط ٦٤ درصد از افرادی که سرم آنها به روش الیزا از نظر ویروس سیتومگال مثبت تشخیص داده شد به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نستد نیز مثبت گردید و دو روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

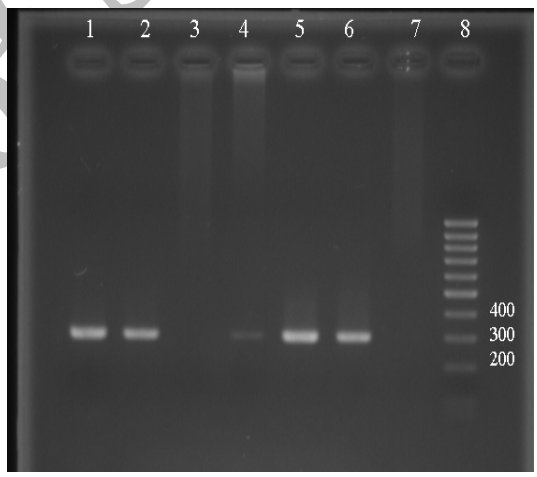
1-Statistical Package for Social Sciences
2-Chi-square Test
3-Kappa Coefficient

Archive of SID

www.SID.ir

نستد و الیزا با توجه به نتایج به دست آمده (۰/۱۲= ضریب کاپا) فاقد همخوانی کامل بودند.

از آنجا که از خلال ۱۰۰ نفر افراد الیزا مثبت ۶۴ نفر به روش نستد مثبت و۳۶ نفر منفی تشخیص داده شده است، تعداد موارد منفی کاذب۳۶ درصد و موارد مثبت کاذب صفر درصد می‌باشد. ویژگی روش پلی‌مراز نستد به نسبت روش استاندارد الیزا ۱۰۰ درصد و حساسیت آن ۶۸ درصد، ارزش اخباری مثبت ۱۰۰ درصد و ارزش اخباری منفی آن ۱۰ درصد محاسبه گردید.



تصویر۱ : نتایج الکتروفورز نمونه‌ها پس از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ، باند۳۰۰جفت باز در موارد مثبت قابل مشاهده است (۵ - ۱: نمونه بیمار، ۶: کنترل مثبت، ۷: کنترل منفی، ۸ : مارکر ۱۰۰ جفت بازی)

بحث و نتیجه گیری

ویروس سیتومگال انسانی عامل ایجاد سندرم‌های متنوعی در کودکان و بزرگسالان است که عامل مهمی در مرگ ومیر بعضی از بیماران نیازمند دریافت خون می‌باشد(۷ و۲). این مطالعه به منظور مقایسه دو روش الیزا و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نستد در تشخیص آلودگی ویروس سیتومگال انسانی در اهدا کنندکان خون انجام شده است.

نتایج این مطالعه نشان داد که ۳٦۰ نفر (۹۸/۹ درصد)، دارای پادتن اختصاصی ضد ویروس سیتومگال انسانی(سرم مثبت) بوده که ۱٦ نفر از آنان (٤/٤درصد) دارای ایمنوگلوبولین ام یا واجد عفونت فعال بودند.

این ویروس، یکی از ویروس‌های شایع آلوده کننده انسان بوده و نتایج حاصل از مطالعات انجام شده دیگر بیان‌گر آن است که اختلاف قابل توجهی در میزان شیوع آنتی‌بادی ضد این ویروس در نقاط مختلف دنیا وجود دارد، چنانچه در آمریکا و اروپای مرکزی این میزان ٤۰ تا ٦۰ درصد، ولی در کشورهای آسیایی و آفریقایی ۹۰ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است، دلیل این امر آن است که در کشورهای در حال توسعه به دلیل سطح بهداشتی پایین‌تر ابتلا به ویروس سیتومگال انسانی در سنین کودکی و در درصد بالایی از جمعیت اتفاق می‌افتد(۷و٦). در بررسی‌های انجام شده در شهر تهران میزان آلودگی ۸۹ درصد و عفونت فعال ٤ درصد گزارش شده است (۱٦) که با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی دارد.

در این مطالعه، در نمونه‌های بافی‌کوت کلیه اهداکنندگان سرم مثبت واجد ایمنوگلوبولین جی و نیز ایمنوگلوبولین ام (عفونت فعال) و درصدی از اهداکنندگان ایمنوگلوبولین جی (سرم مثبت) که به

Archive of SID

www.SID.ir

صورت تصادفی انتخاب گردیدند ، با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نستد، وجود ژنوم ویروس تشخیص داده شد. نتایج حاصل از این مطالعه به وسیله بعضی از مطالعات دیگر تأیید می‌گردد. بر اساس این مطالعات، روش‌های مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مقایسه با الیزا به منظور غربال‌گری کلیه اهداکنندگان خون روش مناسبی نبوده و تنها در تشخیص اهداکنندگان سرم منفی که درمرحله پنجره بوده است می‌تواند مفید باشد(۱۰). از طرفی در مطالعه‌ای، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به عنوان روش استاندارد طلایی در تشخیص عفونت فعال ویروس سیتومگال انسانی معرفی شده است(۱۷).

در مطالعه حاضر، تنها در ۸ نفر(۴۰ درصد) از ۲۰ نفر اهدا کننده دارای ایمنوگلوبولین جی(سرم مثبت) که در بافی‌کوت آنها ژنوم ویروس تشخیص داده شده بود، دی ان آ ویروس سیتومگال در سرم نیز تشخیص داده شد، اما در مطالعه‌ای دیگر، در سرم جمعیتی ۴۲۰ نفری از افراد سالم اهداکننده خون، وجود دی ان آ ویروس سیتومگال انسانی، در تمام افراد دارای پادتن اختصاصی علیه ویروس سیتومگال (سرم مثبت) و نیمی از جمعیت فاقد پادتن (سرم منفی) گزارش شده است که آن را به حساسیت بیشتر روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نسبت به روش‌های سرولوژیکی همچون الیزا نسبت داده‌اند(۱۹ و۱۸). بنابراین نتایج مطالعات فوق با مطالعه حاضر در تقابل است که این اختلاف به عوامل متعددی بستگی دارد.

اولین عامل انتخاب روش تشخیصی دقیق و مناسب جهت شناسایی دی ان آ است. در این تحقیق از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نستد در شناخت دی ان آ استفاده شده و این روش دارای حساسیت بسیار زیاد می‌باشد. در مقالات مختلف حساسیت این روش تا ۸۶ درصد و اختصاصیت آن تا ۹۴ درصد گزارش شده است (۱۲ و۱۱). همچنین، این روش قادر به شناسایی یک کپی از ژن ویروس سیتومگال انسانی در $۲×۱۰^{۶}$ سلول لوکوسیت خونی است (۱۹) که این تراکم سلولی، امکان دستیابی و تشخیص کپی‌های ویروس سیتومگال انسانی را تا ۵ برابر افزایش می‌دهد(۱۵). به همین دلایل، تعداد سلول‌های موجود در بافی‌کوت در تحقیق حاضر برابر با $۱×۱۰^{۷}$ تنظیم گردید (۱۳).

روش آماده‌سازی و استخراج دی ان آ از سلول‌های حاوی الگوی دی ان آ مورد نظر نیز از عوامل مهم در به دست آوردن پاسخ‌های دقیق است. روش استخراج دی ان آ در این بررسی، فنل‌کلروفرم بوده که قادر به جداسازی کامل دی ان آ موجود در لوکوسیت‌ها بوده و در تحقیقات مختلف نیز مورد استفاده و تأیید قرار گرفته است(۲۱ و۲۰، ۱۳).

عامل دیگر در دستیابی به جواب دقیق انتخاب آغازگر اختصاصی مناسب است، به گونه‌ای که فاقد واکنش متقاطع با سایر دی ان آ ویروسی یا سلولی باشد. آغازگرهای مصرفی توالی‌های خاصی می‌باشند که در مطالعات قبل در تشخیص دی ان آ ویروس سیتومگال انسانی در مایع مغزی نخاعی مورد استفاده قرار گرفته و نتایج مفید و قابل اطمینانی کسب شده است(۱۸ و۱۵).

Archive of SID

www.SID.ir

در مجموع با توجه به نکات فوق و نتایج حاصل از این مطالعه، گرچه از نظر تئوریک تشخیص دی ان آ ویروس سیتومگال انسانی به عنوان یک روش حساس تشخیصی بهتر مطرح بوده است، اما از آنجا که مخزن اصلی ویروس مونوسیت‌ها است(۲۲) و تعداد مونوسیت‌ها در خون محیطی کم است، به نظر می‌رسد این روش نمی‌تواند روش غربالگر مناسبی برای تشخیصی ویروس، به ویژه در حالت نهفته باشد. بنا به نتایج مطالعه حاضر ،دی ان آ ویروس سیتومگال انسانی در بافی‌کوت ۶۴ درصد از اهدا کنندگان سالم خون به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز قابل تشخیص است، لذا در اهدا کنندگان خون روش سرولوژیک الیزا روش غربالگرمناسب‌تری می‌باشد که این امر، در بعضی مطالعات دیگر نیز تأیید گردیده است(۱۰و۹). از طرفی روش جداسازی و تخلیص بافی‌کوت از عوامل دیگر مؤثر در افزایش بازدهی روش پلی‌مراز نستد می‌باشد که استفاده از روش مناسب‌تر، سبب دسترسی به تعداد نسخه‌های دی ان آ بیشتر و در نتیجه، دقت بالاتر تست خواهد بود که توصیه می‌شود در مطالعات بعدی استفاده از محلول فیکول جهت جداسازی و تخلیص بافی‌کوت استفاده گردد. البته با توجه به محدودیت تحقیق حاضر از نظر کمبود نمونه‌های سرم منفی در الیزا، در صورتی که نمونه‌های سرم منفی بیشتری در دسترس بود، شاید احتمال دسترسی به پاسخ مثبت پلی‌مراز نستد از نظر دی ان آ ویروس سیتومگال در بافی‌کوت این افراد افزایش می‌یافت که با توجه به شیوع بالای به دست آمده این امر در تحقیق حاضر منتفی گردید. بنابراین بر اساس نتایج سایر مطالعات(۱۰)، در صورت امکان بررسی کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در تشخیص افراد سرم منفی که در دوره پنجره به سر برده و هنوز فاقد آنتی‌بادی در سرم خود می‌باشند، در جهت تأیید این روش در این افراد مفید می‌باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و رئیس محترم انتقال خون شیراز دکتر سید اردشیر تراب جهرمی که ما را در انجام این پروژه یاری دادند قدردانی می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

The Comparison of ELISA Test and Nested-PCR for Detection of Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection

Hashemizadeh Z[*], Motamedifar M[**], Ziyaeyan M[***].

[*]MSc of Microbiology, Educational Department, Namazi Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[**]Assistant Professor of Microbiology, Department of Bacteriology and Virology, Medical School, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[***]Assistant Professor of Virology, Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Namazi Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

KEYWORDS:
HCMV,
Blood donors,
ELISA,
Nested- PCR

Received:4 /10/1385
Accepted:11/4/1386

Corresponding Author:Motamedifar M
E-mail: motamedm@sums.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Cytomegalovirus (CMV) infection is most often asymptomatic in immunocompetent individuals with lifelong latency. However, infection with CMV is a major cause of morbidity and mortality in immuno-compromised patients. Transfusion Transmitted HCMV (TT-CMV) can cause serious morbidity and mortality in certain at-risk patients. In this cross-sectional study, for evaluating the risk of TT-CMV infection, a seroprevalence survey by ELISA along with a comparison of the results of ELISA with those of a nested-PCR test was carried out.

Materials & Methods: In this comparative study during a period of eight months, blood samples were collected from 364 healthy blood donors referring to the blood bank organization of Fars, Shiraz, Iran. IgG and IgM antibodies to HCMV were measured by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) test. Also, DNA was extracted from 104 buffy coat and 20 serum samples. A nested-PCR was performed to detect HCMV- DNA, and the results were compared with those of ELISA test. The collected data were analyzed by X^2 test via SPSS software.

Results: Of 364 samples, IgG was detected in 360 sera (98.9%) samples and only 16 samples (4.4%) were both IgG and IgM positive. 64 (64%) of buffy coat samples and 8 (40%) of seropositive samples were positive for HCMV- DNA by the nested PCR. None of 4 seronegative samples was detected positive by PCR method.

Conclusion: Although PCR assays have diagnostic value in the detection of HCMV infection, ELISA is still more useful for screening blood donors.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES:

1.Knipe B, Howley PM. Field virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven publisher; 2001; 76-77: 2675-3685.
2.Sia IG, Patel R. New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipient. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 83-121.
3.Pas RF, Hutto C. Group day care and cytomegaloviral infections of mothers and children. Rev Infect Dis 1986; 8(4):599-605.
4.Grundy JE. Virologic and pathogenetic aspects of cytomegalovirus infection. Rev Infect Dis 1990; 12: 5711-9.
5.Diosi P, Kazanjian P. Transmission or recurrence?. Transmission or recurrence? A historical dilemma of iatrogenic infections due to cytomegalovirus. J Hist Med Allied Sci 2003 ;58:56-78.
6.Mustakangas P, Sarna S, Ammala P, Muttilainen M, Koskela P, Koskiniemi M. Human cytomegalovirus seroprevalence in three socioeconomically different urban areas during the first trimester: a population-based cohort study. Int J Epidemiol 2000; 29: 587-91.
7.Rawlinson W, Scott G. A common virus causing serious Disease. Australian Family Physician 2003; 32: 789-93.
8. Klein JO, Remingtom JS. Infectious Diseases of the Fetus and newborn infant. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 1990; 252-4
9.Roback JD, Drew WL, Laycock ME, Todd D, Hillyer CD, Busch MP. CMV DNA is rarely detected in healthy blood donors using validated PCR assays.Transfusion 2003; 43: 314-21.
10.Glock B, Schistal E, Mayr WR. CMV DNA in Blood donors with IgM and IgG CMV antibodies. Transfusion 2003; 43: 1492-3.
11.Piiparinen H, Hockerstedt K, Lappalainen M, Suni J, Lautenschlager I. Monitoring of viral load by quantitative plasma PCR during Active cytomegalovirus infection of Individual liver transplant patients. J Clin Microbiol 2002; 40:2945-52.
12.Toro AI, Ossa J. PCR activity of CMV in healthy CMV-seropositive inviduals: does latency need redefinition?. Res Virol 1996; 147: 233-8.
13.Schafer P, Tenschert W, Cremaschi L, Gutensohn K, Laufs R. Utility of major leukocyte subpopulation for monitoring secondary cytomegalovirus infection in Renal-Allograft recipient by PCR. J Clin Microbiol 1998; 36 1008-14.
14.Sambrook J. Russel DW. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold spring Harbor laboratory press;2001; 840-50.
15.Coyle PV, Wyatt DE, Ong GM, Maxwell AP, McCaughey C, O'Neill HJ. A Nested primer set targeting the cytomegalovirus glycoprotein B gene. J Clin Virol 2002; 25(1):95-6.
۱۶.آبادی فروغاعظم، آقایی‌پور مهناز، بابایی غلامرضا، چگینی آزیتا، شایگان مژگان(مؤلفین). بررسی شیوع سرولوژیک آنتی‌بادی IgM و IgG ضد سیتومگال ویروس در بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور و اهدا کنندگان خون . اولین کنگره ویروس شناسی ایران: ۳۰ بهمن لغایت ۲ اسفند ۱۳۸۰: تهران، ایران.
17.Priya K, Madhavan HN. Diagnostic value of enzyme linked Immuno-sorbent assay for cytomegalovirus disease. J Postgrad Med 2002;48 (3):176-8.
18.Bevan IS, Daw RA, Day PJ, Ala FA, Walker MR. Polymerase chain Reaction for Detection of human cytomegalovirus infection in a Blood donor population. Br J Haematol 1991; 78:94-9.
19.Larsson S, Soderberg-Naucler C, Wang FZ, Moller E. . Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time.Transfusion 1998; 38: 271-8.
20.Hamprecht K, Steinmassl M, Einsele H, Jahn G. Discordant detection of human cytomegalovirus DNA from peripheral blood mononuclear cells, granulocytes and plasma: correlation to viremia and HCMV infection. J Clin Virol 1998 20; 11:125-36.
21.Lesperance MM, Contopoulos-Ioannidis DG, Del Pilar Gutierrez M, Colberg-Poley AM. PCR detection of human cytomegalovirus DNA in clinical specimens using novel UL37 exon 3 and US3 primers. Clin Diagn Lab Immunol 1998;5: 256-8.
22.Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 23nd ed. Singapore: McGraw-Hill Company; 2004; 438-42.

Archive of SID

www.SID.ir