

# دانشور پزشکی

## تشخیص همزمان ویروس‌های انترو و اورییون در نمونه‌های مایع مغزی نخاعی مشکوک به مننژیت توسط تست RT-PCR

نویسندگان: معصومه کرمانیان<sup>1</sup>، دکتر طراوت بامداد\*<sup>2</sup>،  
دکتر حوریه سلیمانجاهی<sup>2</sup>، و دکتر شهرام سمیعی<sup>3</sup>

1. دانشجوی کارشناسی ارشد ویروس‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
2. استادیار گروه ویروس‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
3. استادیار سازمان انتقال خون ایران

\* نویسنده مسنده \_\_\_\_\_ سئول: Email: Bamdad\_T@modares.ac.ir

### چکیده

مقدمه و هدف: از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده مننژیت‌های آسپتیک ویروسی، انتروویروس و ویروس اورییون است. برای اجتناب از درمان‌های غیرضروری، وجود یک تست تشخیصی سریع و حساس لازم است.

مواد و روش‌ها: RT-PCR چندگانه (Multiplex) یک روش سریع و حساس برای تشخیص به‌موقع عفونت‌های ویروسی سیستم اعصاب مرکزی است. از این روش برای شناسایی همزمان دو ویروس اورییون و انتروویروس استفاده شد. ابتدا تست PCR برای هر یک به‌طور جداگانه بهینه‌سازی و سپس برای جداسازی همزمان دو ویروس استفاده گردید. از ژن بتا دو میکرو گلوبولین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

یافته‌ها: 100 نمونه CSF (مایع مغزی - نخاعی) بیمار مشکوک به مننژیت جمع‌آوری و تست RT-PCR چندگانه بر روی آنها انجام شد. تمام نمونه‌های جمع‌آوری شده از نظر کشت باکتریایی منفی بودند و از نوزادان و کودکان کمتر از 7 سال جمع‌آوری شده بود. 35 درصد موارد از نظر انتروویروس مثبت بودند و یک مورد نیز به‌طور همزمان از نظر هر دو ویروس مثبت بود.

نتیجه‌گیری: این تست یک روش حساس و سریع (در کمتر از 3 ساعت) برای تشخیص همزمان مننژیت‌های آسپتیک است که می‌توان از آن برای مطالعات اپیدمیولوژیک نیز استفاده کرد.

کلمات کلیدی: انتروویروس، اورییون، مننژیت، PCR چندگانه، مایع مغزی - نخاعی

دوماهنامه علمی  
- پژوهشی  
دانشگاه شامد  
سال پانزدهم -  
شماره 76  
شهریور 1387

وصول:  
86/2/11  
ارسال اصلاحات:  
86/5/27  
دریافت اصلاحات:  
86/6/27

ایجادکننده مننژیت نیز می‌توان  
انتروویروس‌ها و ویروس اورییون و  
هرپس سیمپلکس را نام برد [1].  
تشخیص به‌موقع مننژیت‌های  
ویروسی بسیار حائز اهمیت است.  
با توجه به این‌که روش روتین در  
آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های

مقدمه  
از شایع‌ترین بیماری‌های سیستم  
اعصاب مرکزی مخصوص در کودکان و  
نوزادان، مننژیت است که توسط  
عوامل مختلف ویروسی، باکتریایی،  
انگلی و قارچی ایجاد می‌شود. از  
شایع‌ترین عوامل ویروسی

حدود 70 سروتیپ مختلف است رد یابی کرد. ژنوم ویروس اوربون نیز در ناحیه 5 ژن NP دارای توالی بسیار حفاظت شده است که با طراحی پرایمر مناسب قابل ردیابی است (جدول 1).

چون هدف طراحی PCR چندگانه، شناسایی دو ویروس (انزوویروس و اوربون) در یک لوله PCR است، بنابراین تا حد امکان پرایمرها باید دما (Tm) و درصد G+C تقریباً یکسان داشته باشند. در ضمن تمام پرایمرها در نرم افزار Gene Runner چک شد که لوپ سنجاق سری و یا لوپهای داخلی با خود و یا با یکدیگر تشکیل ندهند. همچنین از ژن بتا دو میکرو گلوبولین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد که پرایمرهای طراحی شده برای کنترل داخلی نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

2-2 استخراج نمونه های مایع مغزی- نخاعی

RNA نمونه های CSF جمع آوری شده توسط کیت استخراج RNA RNX-Plus محصول شرکت سیناژن و بر اساس روش کاری ارائه شده، استخراج شد و چون ممکن است مقدار و تیتر ویروس در نمونه CSF کم باشد برای استخراج بهتر و داشتن RNA بیشتر در مرحله ایزوپروپانل، به همه نمونه های CSF مقدار 5 میکرولیتر گلیکوژن اضافه شد. تست RT-PCR چندگانه

در این پژوهش برای انجام RT-PCR که به صورت چندگانه انجام می شود باید PCR هر دو ژن ویروسی در یک تیوپ انجام گیرد. به این منظور باید ابتدا دو PCR برای دو ژن به طور جداگانه بهینه گردد، ضمن این که همین شرایط باید برای کنترل داخلی در نظر گرفته شود و سپس PCR چندگانه برای دو ژن ویروسی بهینه گردد.

حجم تمام واکنش های PCR انجام شده در این پژوهش 25 میکرولیتر در نظر گرفته شد که برای شروع کار شامل موارد زیر بود:

- 1- محلول 10x بافر PCR،
- 2- 1/5 میلی مولار MgCl<sub>2</sub>،
- 3- 0/5 میلی مولار dNTP،
- 4- 0/7 میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت 10 میکرومولار،
- 5- 0/625 واحد DNA Taq پلیمرز

کشور ما آنالیز بیوشیمیایی مایع مغزی نخاعی از نظر اندازه گیری قند و پروتئین و شمارش سلولی است، این روش، روش حساسی نیست و استفاده از تکنیکی سریع تر با حساسیت بالا ضرورت دارد.

گرچه کشت سلول به عنوان یک روش کاملاً قابل اعتماد شناخته شده، اما چون تیپ های مختلف انزوویروسها نسبت به سلول های مختلف، حساسیت متفاوت دارند، باید از چندین رده سلولی استفاده کرد تا طیف جداسازی ویروس وسیع شود. در مورد ویروس اوربون هم تمام ویروس های جدا شده تاثیر CPE خاص را نشان نمی دهند و بنابراین، روش هایی مانند همبزرگش برای نمونه های کشت داده شده، باید در نظر گرفته شود [2].

مهم ترین امتیاز روش های مولکولی، سرعت بالای آنها در ردیابی ویروس است که باعث جایگزینی روش های قدیمی با این تکنیک می شود [3].

در ایران، روش های تشخیص بیماری های سیستم اعصاب مرکزی مخصوص مننژیت از طریق کشت مایع مغزی نخاعی یا انجام تست های بیوشیمیایی بر روی آن است که این روش ها غراختصاصی هستند و حساسیت پایینی دارند.

در این پژوهش PCR ای طراحی و اپتیمایز می شود که در حداقل زمان و با حساسیت بالا تشخیص انجام شود. با این روش PCR، در یک لوله دو ویروس از ویروس های مهم RNA دار دخیل در عفونت های سیستم اعصاب مرکزی شناسایی می شود و از آنجا که از این روش به عنوان روش تشخیصی استفاده خواهد شد، یکی از اهداف، به حداقل رساندن تعداد پرایمرها و مواد دیگر PCR به منظور کاهش قیمت و صرفه جویی در وقت است.

مواد و روشها

طراحی پرایمر

با توجه به این که ژنوم انزوویروسها در ناحیه NTR 5 دارای توالی های بسیار حفاظت شده است [4 و 5] با طراحی پرایمر مناسب از این ناحیه می توان تمام ویروس های جنس انزوویروس را که

روی سلول‌های تک لایه‌ای HeLa که در میکروپلیت 96 خانه‌ای تهیه شده بود تلقیح و برای یک هفته تا 10 روز آثار بروز CPE هر دو ویروس بررسی شد.

#### نتایج

در بررسی حساسیت تست بهینه شده مشاهده شد که اگر ویروس با عیار  $10^{3/8}$  در یک میلی‌لیتر تا  $10^5$  بار رقیق شود باند قابل مشاهده‌ای را در 264 bp خواهیم داشت (شکل 1).

تیترو ویروس کوکساکي B3 برابر با  $10^{4/75}$  در میلی‌لیتر بود. برای ویروس آنزو نیز شرایط را مانند نمونه CSF در نظر گرفتیم؛ یعنی از الگوی ویروس کوکسا کی B3 و هر دو پرایمر در یک تیوب استفاده کرده، تست RT-PCR را انجام دادیم. مشاهده شد که اگر ویروس با عیار  $10^{4/75}$  در یک میلی‌لیتر تا  $10^{10}$  بار رقیق شود و بر روی آن تست RT-PCR انجام گیرد، باند قابل مشاهده‌ای را در 141 bp خواهیم داشت (شکل 2).

پس از اپتیمایز کردن تست RCR چندگانه بر روی صد نمونه CSF که در طول نه ماه اول سال 83 جمع‌آوری شده بود این تست انجام شد که از تعداد 100 نمونه مورد بررسی 35 نمونه برای آنزو ویروس و یک نمونه به طور همزمان از نظر اوربون و آنزو ویروس مثبت بود. نتایج PCR در شکل 3 مشاهده می‌شود. RNA آنزو ویروسی در 35 نمونه CSF ردیابی شد که در کشت 14 نمونه منفی بود و به همین ترتیب از نمونه‌های منفی PCR تعداد 3 نمونه در کشت مثبت ارزیابی شد.

حساسیت و ویژگی در این مطالعه به ترتیب 87.5 و 84 درصد ارزیابی شد.

#### بحث

تکنیک PCR برای اولین بار در مورد نمونه‌های CSF در اوایل دهه 1990 جهت تشخیص انسفالیت هرپس ویروسی و مننژیت ویروسی به کار گرفته شد [6] و بعد از آن، تعداد گزارش‌های علمی در این زمینه به سرعت افزایش پیدا کرد تا جا که امروزه این تکنیک به

0/125) میکرولیتر در 25 میکرولیتر (واکنش)،

6- 2/5 میکرولیتر از cDNA های الگو،

حجم نهایی با آب مقطر دیونیزه به 25 میکرولیتر رسانیده شد و در دستگاه حرارتی PCR قرار گرفت و برنامه زیر اجرا گردید:

1- دمای ابتدایی جدا شدن دو رشته 95 درجه

سانتی‌گراد به

مدت 4 دقیقه

2- دمای جدا شدن دو رشته 95

درجه سانتی‌گراد

به مدت 30

ثانیه

3- دمای هیبرید شدن 54 درجه سانتی‌گراد

به مدت 30

ثانیه

4- دمای پیشروی 72 درجه سانتی‌گراد

به مدت 45

ثانیه

5- 30 سیکل از برنامه 2 تا 4

6- دمای پیشروی نهایی

7- نگهداشتن دما در 4 درجه سانتی‌گراد

سپس محصولات را بر روی ژل آگارز 1/5 درصد برده، ژل‌ها با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با دستگاه ژل فتوداکيومنت بررسی و عکس‌برداری شدند.

تعیین حساسیت تست RT-PCR چندگانه برای به دست آوردن حساسیت این تست در جداسازی دو ویروس، رقت‌های متفاوتی از دو ویروس تهیه شد. نمونه آنزو ویروس، کوکساکي ویروس B3 سویه نانسی (Nancy) بود که از مرکز آموزش علوم و فناوری زیستی تهیه شد و نمونه اوربون سویه هوشینو (Hoshino) بود که از مؤسسه رازی تهیه شد و بر روی کشت سلول تکثیر و عیار آن بر حسب TCID50 مشخص شده بود تهیه و آزمایش RT-PCR چندگانه بر روی آن انجام شد.

برای هر دو ویروس مقدار 1 میکرولیتر از الگوی که عیار اولیه آن تعیین شده بود در نظر گرفته شد و از آن رقت‌های  $10^{-1}$  -  $10^{-10}$  تهیه و RT-PCR چندگانه بر روی آن انجام شد.

کشت نمونه های CSF

نمونه‌های CSF به‌طور مستقیم بر

این پژوهش 35 نمونه در تست RT-PCR چندگانه از نظر آنزوویروس مثبت بودند (35 درصد). یک نمونه به‌طور همزمان، هم از نظر آنزوویروس و هم از نظر ویروس اوربون مثبت بود. آلودگی همزمان به دو ویروس مذکور نشان‌دهنده توانایی این تست در تشخیص همزمان این دو عفونت است. این احتمال وجود دارد که ابتدا ویروس اوربون در این افراد ایجاد آلودگی کرده و به دلیل ضعف سیستم ایمنی در طی بیماری‌های ویروسی و شیوع آنزوویروس‌ها به‌عنوان یک عفونت بیمارستانی در طی بستری شدن فرد در بیمارستان، عفونت آنزوویروسی به صورت عفونت ثانویه (super infection) بروز می‌کند.

حساسیت و ویژگی در این مطالعه به ترتیب 87.5 و 84 درصد ارزیابی شد. تعداد نمونه‌های منفی در کشت به دلیل تیتز پایین ویروس در نمونه‌ها است؛ به نحوی که با روش معمول کشت، قابل شناسایی نیست. از آنجا که RT-PCR بسیار حساس‌تر از کشت ویروس است استاندارد طلایی مناسب جهت تعیین حساسیت و ویژگی تست RT-PCR نیست و بنابراین، تعداد نمونه‌های مثبت کاذب PCR در حقیقت نمونه‌هایی هستند که به دلیل حساسیت کم کشت، در کشت شناسایی نشده‌اند.

مطالعات دیگر نیز که در آن‌ها حساسیت و ویژگی در مقایسه با کشت تعیین شده، داده‌هایی مشابه با داده‌های گزارش حاضر ارائه کرده‌اند. حساسیت و ویژگی‌های 89 و 66 درصد [9] و 72.6 و 57.4 درصد از جمله گزارش‌های موجود است [10].

با توجه به مشکلات ذکر شده جهت جداسازی ویروس از نمونه‌های CSF، مانند تیتز پایین ویروس در CSF ضرورت به‌کارگیری تکنیک‌های مولکولی هرچه بیشتر احساس می‌شود. این تحقیق در مورد بررسی دو ویروس شایع از خانواده ویروس‌های RNA در ایجاد عفونت‌های ویروسی CNS صورت گرفت. به‌کارگیری این تکنیک، علاوه بر سرعت بخشیدن به تشخیص، در ردیابی عفونت‌های همزمان ویروسی حائز اهمیت است. با توجه به

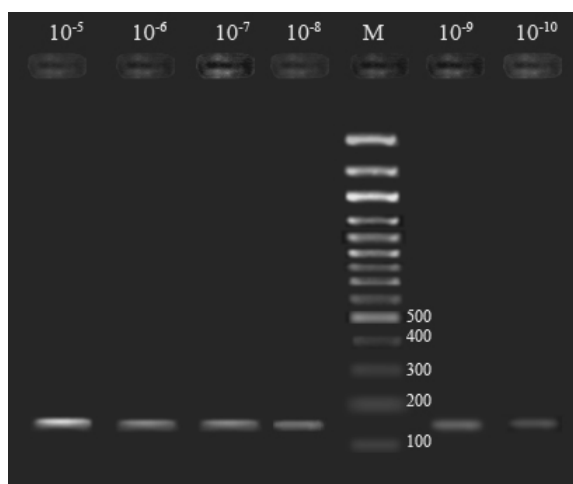
صورت روتین در بیش‌تر آزمایشگاه‌های دنیا اجرا می‌شود [7 و 8].

در این تحقیق، آنزوویروس و ویروس اوربون از مایع مغزی نخاعی جدا شده که از مهم‌ترین ویروس‌های ایجادکننده مننژیت هستند. آنزوویروس‌ها گسترده‌گی جهانی دارند و در مناطق معتدل انتشار فصلی دارند و اغلب در فصول تابستان و پاییز باعث ایجاد مننژیت در کودکان می‌شوند [1].

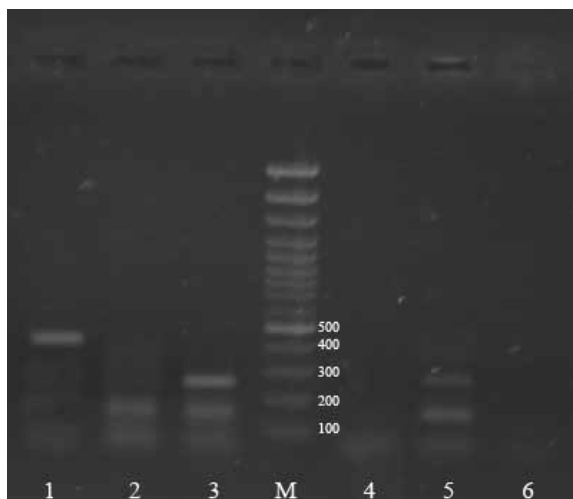
احتمال بیماری‌زایی ویروس اوربون نیز در یک سال اول تولد به دلیل وجود آنتی‌بادی‌های مادری بسیار کم است؛ ولی استفاده از واکنش تحفیف حدت یافته که در حال حاضر در ایران هم تولید می‌شود باعث کاهش بیماری‌زا تا حدود 86-95 درصد شده است [4].

در این پژوهش پس از بهینه‌سازی PCR بر روی ویروس کوکساکسی B3 و اوربون و بهینه‌سازی تست PCR چندگانه که شامل بهینه‌سازی از نظر غلظت بافر و  $MgCl_2$  بود، این تست بر روی نمونه‌های CSF انجام شد.

از کنترل مثبت، کنترل منفی و کنترل داخلی در طی انجام هر واکنش PCR استفاده شد. کنترل منفی برای تضمین عدم وجود آلودگی، کنترل مثبت برای تأیید درستی کارکرد هر یک از واکنش‌گرها و دستگاه PCR استفاده شد. به دلیل غلظت بالای پروتئینی که در CSF وجود دارد، ممکن است هنگام استخراج، مقداری پروتئین باقی‌مانند و در نتیجه، پروتئین‌ها باعث مهار PCR شوند. برای اطمینان از این که استخراج ژنوم به‌درستی صورت گرفته و مهارکننده‌ای در ژنوم استخراج شده وجود ندارد از کنترل داخلی استفاده شد. در این پژوهش از ژن بتا میکروگلوبولین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. در طی مراحل استخراج از گلیکوژن استفاده شد. گلیکوژن برای افزایش رسوب مقادار RNA در مرحله ایزوپروپانل اضافه شد تا مقدار رسوب RNA بیشتر باشد و حجم بالاتری از RNA استخراج گردد. از صد نمونه مورد بررسی در



تصویر 2 مربوط به تعیین حساسیت تست RT-PCR چندگانه برای ویروس انترو است.



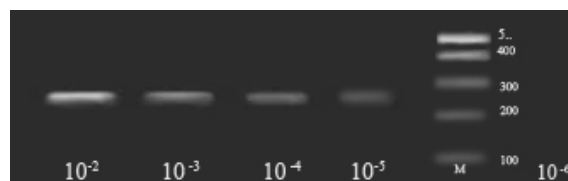
تصویر 3 نشان دهنده یک نمونه CSF مثبت از نظر هر دو ویروس به همراه کنترل‌های مختلف است. 1=کنترل داخلی، 2=نمونه CSF مثبت از نظر انتروویروس، 3=کنترل مثبت، 4=نمونه CSF منفی، 5=نمونه CSF مثبت از نظر ویروس اوریون و انتروویروس، 6=کنترل منفی M=مارکر

تعداد موارد انتروویروس جدا شده این احتمال وجود دارد که در ایران نیز شیوع فصلی این ویروس وجود داشته باشد و جداسازی تنها یک مورد ویروس اوریون می‌تواند تا حدودی نشان‌دهنده واکنش‌های مؤثر واکسن اوریون در کشورمان باشد.

آنچه مسلم است این‌که ویروس‌های DNA دار نیز در ایجاد عفونت‌های ویروسی CNS نقش مهمی دارند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ویروس‌های خانواده هرپس اشاره کرد. به‌طور کلی HSV دامنه وسیعی از عفونت‌های سیستم عصبی مرکزی را در نوزادان و بالغین ایجاد می‌کند [11].

ویروس HSV<sub>1</sub> به‌تنهایی 10-20 درصد از کل آنسفالیت‌های ویروسی را به خود اختصاص داده و می‌تواند عامل بیماری مننژیت آسپتیک نیز باشد.

در ایران همواره مواردی از مننژیت و آنسفالیت گاهی به صورت تک گیر و یا اپیدمی‌های محدود صورت می‌گیرد که مطالعات زیادی بر روی عوامل ایجادکننده آن‌ها انجام نگرفته است و ضرورت دارد در سال‌های آتی هر چه پیش‌تر نقش ویروس‌های نوروتروپ در ایجاد این بیماری‌ها که روزبه‌روز در حال افزایش است مشخص گردد. مطالعه حاضر، تلاشی در جهت نیل به اهداف فوق در این زمینه بوده است.



تصویر 1 مربوط به تعیین حساسیت تست RT-PCR چندگانه در مورد ویروس اوریون است.

جدول 1- مشخصات توالی پرایمرها

پرایمرها	توالی (5' → 3')	Tm °C	طول (bp)	موقعیت
Entrovirus(sense) Entrovirus(antisense)	CTGAATGCGGCTAATCC TGTCACCATAAGCAGCCA	57/5 58/7	141	457-473 598-581
Mumpsvirus (sense) Mumps virus (Antisense)	TGGAGGAATCAGACGACG CATCTTGTTGAGAATCACCA	59/7 56/9	264	1451-1469 1715-1696

b2M (sense) b2M(Atisense)	TCTGGGGTTTCATCCATCC TACCTGTGGAGCAACCTG	58/5 57/2	443	158-176 591-573
------------------------------	---	--------------	-----	--------------------

## منابع

- Vincent, R., Picornaviridae: The Viruses and Their replication; Field's Virology. 2001; Knipe D. Howley M. 4<sup>th</sup> edition: 685-799.
- Vincent, R., Picornaviridae: The Viruses and Their replication; Field's Virology. 2001; Knipe D. Howley M. 4<sup>th</sup> edition: 685-799.
- Paolacinqe, Simona, B., Molecular analysis of CNS. J. Clin. Virol. 2003; 26: 1-28.
- Mitsuaki, H., Application of PCR for various neurotropic Viruses on the diagnosis of viral meningitis J. Clin. Virology. 1998; 117-124.
- Cusi, M.G., Bianchi, S., Rapid detection and typing of circulating mumps virus by RT-PCR-Res. Virol. 1996; 147: 227-232.
- Androleettil. Comparison of use of csf, serum and throat swab specimens in diagnosis of enteroviral acute neurological infection by a rapid detection. J. Clin. Microbiol. 1993; 36 (2): 589-591.
- Rotbart, H.A. Human enterovirus infections. American society for microbiology. Washington, DC. 2005.
- Berger, M., Kopp, N., Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients. Neurology. 2000; 54: 20-25.
- Guneyc, O.Z., Kaya, E., Yapar, M., Gumus, I., Kobar, A., Laboratory diagnosis of enteroviral infections of the central nervous system by using a nestle RT-PCR assay. Diagn microbial infect Dis. 2003; 47(4): 557-62.
- Verstrepen, W. A., Bruynseels, P., & Mertens, A. H., Evaluation of a rapid real-time RT-PCR assay for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens. J clin. 2002; 25.
- Cases, I., Tenoria, A., Echevarria, J.M., Cleator, G.M., Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpes viruses by multiplex genome amplification, J. Virol. Meth. 1997; 66: 39-50.

