دانشور پزشكي

تشخيص همزمان ويروس‌هاي انتروويروس و اوريون در نمونه‌هاي مايع مغزي نخاعي مشكوك به منژيت توسط تست RT-PCR

نويسندگان: معصومه كرمانيان[1]، دكتر طراوت بامداد*[2]، دكتر حوريه سليمانجاهي[2]، و دكتر شهرام سميعي[3]

1. دانشجوي كارشناسي ارشد ويروس‌شناسي دانشكده علوم پزشكي دانشگاه تربيت مدرس
2. استاديار گروه ويروس‌شناسي دانشكده علوم پزشكي دانشگاه تربيت مدرس
3. استاديار سازمان انتقال خون ايران

* نويسنده مسئول:
Email: Bamdad_T@modares.ac.ir

دوماهنامه علمي - پژوهشي دانشگاه شاهد
سال پانزدهم - شماره 76
شهريور 1387

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

چكيده

مقدمه و هدف: از مهم‌ترين عوامل ايجادكننده منژيت‌هاي آسپتيك ويروسي، انتروويروس و ويروس اوريون است. براي اجتناب از درمان‌هاي غيرضروري، وجود يك تست تشخيصي سريع و حساس لازم است.

مواد و روش‌ها: RT-PCR چندگانه (Multiplex) يك روش سريع و حساس براي تشخيص به‌موقع عفونت‌هاي ويروسي سيستم اعصاب مركزي است. از اين روش براي شناسايي همزمان دو ويروس اوريون و انتروويروس استفاده شد. ابتدا تست PCR براي هر يك به طور جداگانه بهينه‌سازي و سپس براي جداسازي همزمان دو ويروس استفاده گرديد. از ژن بتا دو ميكرو گلوبولين به‌عنوان كنترل داخلي استفاده شد.

يافته‌ها: **100** نمونه CSF (مايع مغزي - نخاعي) بيمار مشكوك به منژيت جمع‌آوري و تست RT-PCR چندگانه بر روي آن‌ها انجام شد. تمام نمونه‌هاي جمع‌آوري شده از نظر كشت باكتريايي منفي بودند و از نوزادان و كودكان كم‌تر از 7 سال جمع‌آوري شده بود. **35** درصد موارد از نظر انتروويروس مثبت بودند و يك مورد نيز به طور همزمان از نظر هر دو ويروس مثبت بود.

نتيجه‌گيري: اين تست يك روش حساس و سريع (در كم‌تر از 3 ساعت) براي تشخيص همزمان منژيت‌هاي آسپتيك است كه مي‌توان از آن براي مطالعات اپيدميولوژيك نيز استفاده كرد.

كلمات كليدي: انتروويروس، اوريون، منژيت، PCR چندگانه، مايع مغزي - نخاعي

مقدمه

از شايع‌ترين بيماري‌هاي سيستم اعصاب مركزي بخصوص در كودكان و نوزادان، منژيت است كه توسط عوامل مختلف ويروسي، باكتريايي، انگلي و قارچي ايجاد مي‌شود. از شايع‌ترين عوامل ويروسي ايجادكننده منژيت نيز مي‌توان انتروويروس‌ها و ويروس اوريون و هرپس سيمپلكس را نام برد [1].

تشخيص به‌موقع منژيت‌هاي ويروسي بسيار حائز اهميت است. با توجه به اين‌كه روش روتين در آزمايشگاه‌ها و بيمارستان‌هاي

کشور ما آنالیز بیوشیمیایی مایع مغزي نخاعي از نظر اندازه‌گیري قند و پروتین و شمارش سلولي است، این روش، روش حساسي نیست و استفاده از تکنیکي سریع‌تر با حساسیت بالا ضرورت دارد.

گرچه کشت سلول به‌عنوان یک روش کاملاً قابل اعتماد شناخته شده، اما چون تیپ‌هاي مختلف انتروویروس‌ها نسبت به سلول‌هاي مختلف، حساسیت متفاوت دارند، باید از چندین رده سلولي استفاده کرد تا طیف جداسازي ویروس وسیع شود. در مورد ویروس اوریون هم تمام ویروس‌هاي جدا شده تأثیر CPE خاص را نشان نمي‌دهند و بنابراین، روش‌هایي مانند همابزوربشن براي نمونه‌هاي کشت داده شده، باید در نظر گرفته شود [2].

مهم‌ترین امتیاز روش‌هاي مولکولي، سرعت بالاي آن‌ها در ردیابي ویروس است که باعث جایگزیني روش‌هاي قدیمي با این تکنیك مي‌شود [3].

در ایران، روش‌هاي تشخیص بیماري‌هاي سیستم اعصاب مرکزي بخصوص منشأیت از طریق کشت مایع مغزي نخاعي یا انجام تست‌هاي بیوشیمیایي بر روي آن است که این روش‌ها غیراختصاصي هستند و حساسیت پاییني دارند.

در این پژوهش PCRاي طراحي و اپیتمایز مي‌شود که در حداقل زمان و با حساسیت بالا تشخیص انجام شود. با این روش PCR، در یک لوله دو ویروس از ویروس‌هاي مهم RNAدار دخیل در عفونت‌هاي سیستم اعصاب مرکزي شناسایي مي‌شود و از آن‌جا که از این روش به‌عنوان روش تشخیصي استفاده خواهد شد، یکي از اهداف، به حداقل رساندن تعداد پرایمرها و مواد دیگر PCR به منظور کاهش قیمت و صرفه‌جویي در وقت است.

مواد و روش‌ها

طراحي پرایمر

با توجه به این‌که ژنوم انتروویروس‌ها در ناحیه NTR 5 داراي توالي‌هاي بسیار حفاظت شده است[4و5] با طراحي پرایمر مناسب از این ناحیه مي‌توان تمام ویروس‌هاي جنس انتروویروس را که حدود 70 سروتیپ مختلف است رد یابي کرد. ژنوم ویروس اوریون نیز در ناحیه 5 ژن NP داراي توالي بسیار حفاظت شده است که با طراحي پرایمر مناسب قابل ردیابي است (جدول 1).

چون هدف طراحي PCR چندگانه، شناسایي دو ویروس (انتروویروس و اوریون) 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 نرم‌افزار Gene Runner چک شد که لوپ سنجاق سري و یا لوپ‌هاي داخلي با خود و یا با یکدیگر تشکیل ندهند.

همچنین از ژن بتا دو میکرو گلوبولین به‌عنوان کنترل داخلي استفاده شد که پرایمرهاي طراحي شده براي کنترل داخلي نیز مورد بررسي قرار گرفتند.

2-2 استخراج نمونه‌هاي مایع مغزي-نخاعي

RNA نمونه‌هاي CSF جمع‌آوري شده توسط کیت استخراج RNA RNX-Plus محصول شرکت سیناژن و بر اساس روش کاري ارائه شده، استخراج شد و چون ممکن است مقدار و تیتر ویروس در نمونه CSF کم باشد براي استخراج بهتر و داشتن RNA بیشتر در مرحله ایزوپروپانل، به همه نمونه‌هاي CSF مقدار 5 میکرولیتر گلیکوژن اضافه شد.

تست RT-PCR چندگانه

در این پژوهش براي انجام RT-PCR که به صورت چندگانه انجام مي‌شود باید PCR هر دو ژن ویروسي در یک تیوپ انجام گیرد. به این منظور باید ابتدا دو PCR براي دو ژن به طور جداگانه بهینه گردد، ضمن این‌که همین شرایط باید براي کنترل داخلي در نظر گرفته شود و سپس PCR چندگانه براي دوژن ویروسي بهینه گردد.

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

1- محلول 10x بافر PCR،
2- 1/5 میلي‌مولار $MgCl_2$،
3- 0/5 میلي‌مولار dNTp،
4- 0/7 میکرولیتر ازهر پرایمر با غلظت 10 میکرومولار،
5- 0/625 واحد DNA Taq پلیمراز

(0/125 میکرولیتر در 25 میکرولیتر واکنش)،
6- 2/5 میکرولیتر از cDNAهای 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 جداشدن دو رشته 95 درجه سانتیگراد به مدت 4 دقیقه
2- دمای جدا شدن دو رشته 95 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه
3- دمای هیبریدشدن 54 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه
4- دمای پیشروی 72 درجه سانتیگراد به‌مدت 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 فتوداکیومنت بررسی و عکس‌برداری شدند.

تعیین حساسیت تست RT-PCR چندگانه
برای به‌دست آوردن حساسیت این تست در جداسازی دو ویروس، رقت‌های متفاوتی از دو ویروس تهیه شد. نمونه انتروویروس، کوکساکی ویروس B3 سویه نانسی (Nancy) بود که از مرکز آموزش علوم و فناوری زیستی تهیه شد و نمونه اوریون 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 الگویی که عیار اولیه آن تعیین شده بود در نظر گرفته شد و ازآن رقت‌های 10^{-1} – 10^{-10} تهیه و RT- PCR چندگانه بر روی آن انجام شد.

کشت نمونه هایCSF
نمونه‌های CSF به‌طور مستقیم بر 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 bp 264 خواهیم داشت (شکل 1).
تیتر ویروس کوکساکی B3 برابر با $10^{4/75}$ در میلی‌لیتر بود. برای ویروس انترو 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 bp 141 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 انتروویروس و یک نمونه به طور همزمان از نظر اوریون و انتروویروس مثبت بود. نتایج PCR در شکل 3 مشاهده می‌شود. RNA انتروویروسی 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 منتژیت ویروسی به کار گرفته شد[6] و بعد از آن، تعداد گزارش‌های علمی در این زمینه به‌سرعت افزایش پیدا کرد تا جا که امروزه این تکنیک به

صورت روتین در بیشتر آزمایشگاه‌های دنیا اجرا می‌شود [7و8].

در این تحقیق، انتروویروس و ویروس اوریون از مایع مغزی نخاعی جدا شده که از مهم‌ترین ویروس‌های ایجادکننده مننژیت هستند. انتروویروس‌ها گستردگی 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 اوریون نیز در یک سال اول تولد به دلیل وجود آنتی‌بادی‌های مادری بسیار کم است؛ ولی استفاده از واکسن تخفیف حدت یافته که در حال حاضر در ایران هم تولید می‌شود باعث کاهش بیماری تا حدود 86-95 درصد شده است[4].

در این پژوهش پس از بهینه‌سازی PCR بر روی ویروس کوکساکیB3 و اوریون 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 واکنش گرها و دستگاه PCR استفاده شد. به دلیل غلظت بالای پروتیینی که در CSF وجود دارد، ممکن است هنگام استخراج، مقداری پروتین باقی بماند و در نتیجه، پروتین‌ها 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 دو میکروگلوبولین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. در طی مراحل استخراج از گلیکوژن استفاده شد. گلیکوژن برای افزایش رسوب مقدار 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 این پژوهش35 نمونه در تست RT-PCR چندگانه از نظر انتروویروس مثبت بودند (35 درصد). یک نمونه به‌طور همزمان، هم از نظر انتروویروس و هم از نظر ویروس اوریون 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 اوریون در این افراد ایجاد آلودگی کرده و به دلیل ضعف سیستم ایمنی در طی بیماری‌های ویروسی و شیوع انتروویروس‌ها به‌عنوان یک عفونت بیمارستانی در طی بستری شدن فرد در بیمارستان، عفونت انتروویروسی 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 تیتر 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 مناسبی 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].

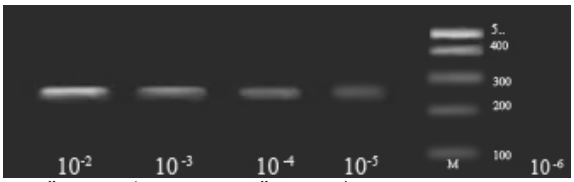
با توجه به مشکلات ذکر شده جهت جداسازی ویروس از نمونه‌های CSF، مانند تیتر پایین ویروس در CSF ضرورت به‌کارگیری تکنیک‌های مولکولی هرچه بیشتر احساس می‌شود. این تحقیق در مورد بررسی دو ویروس شایع از خانواده ویروس‌های RNAدار در ایجاد عفونت‌های ویروسی CNS صورت گرفت. به‌کارگیری این تکنیک، علاوه بر سرعت بخشیدن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

تعداد موارد انتروویروس جدا شده این احتمال وجود دارد که در ایران نیز شیوع فصلي این ویروس وجود داشته باشد و جداسازي تنها یک مورد ویروس اوریون مي‌تواند تا حدودي نشان‌دهنده واکسیناسیون مؤثر واکسن اوریون در کشورمان باشد.

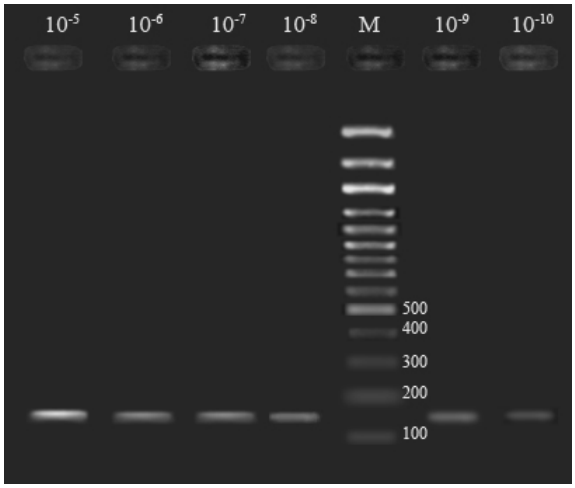
آنچه مسلم است اینکه ویروس‌هاي DNAدار نیز در ایجاد عفونت‌هاي ویروسي CNS نقش مهمي دارند که از مهم‌ترین آن‌ها مي‌توان به ویروس‌هاي خانواده هرپس اشاره کرد. به‌طور کلي HSV دامنه وسیعي از عفونت‌هاي سیستم عصبي مرکزي را در نوزادان و بالغین ایجاد مي‌کند[11].

ویروس HSV_1 به‌تنهایي 10-20 درصد از کل آنسفالیت‌هاي ویروسي را به خود اختصاص داده و مي‌تواند عامل بیماري منتژیت آسپتیک نیز باشد.

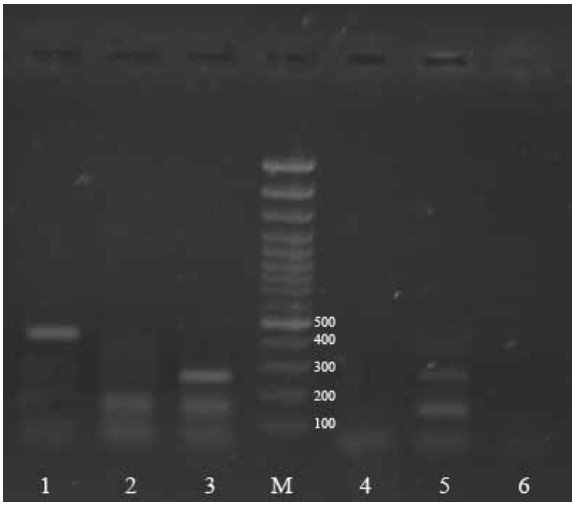
در ایران همواره مواردي از منتژیت وآنسفالیت گاهي به صورت تک گیر و یا اپیدمي‌هاي محدود صورت مي‌گیرد که مطالعات زیادي بر روي عوامل ایجادکننده آن‌ها انجام نگرفته‌است و ضرورت دارد در سال‌هاي آتي هر چه بیشتر نقش ویروس‌هاي نوروتروپ در ایجاد این بیماري‌ها که روزبه‌روز در حال افزایش است مشخص گردد. مطالعه حاضر، تلاشي 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.



تصویر 2 مربوط به تعیین حساسیت تست RT-PCRچندگانه براي ویروس انترو است.



تصویر 3 نشان‌دهنده یك نمونه CSF مثبت از نظر هر دو ویروس به همراه کنترل‌هاي مختلف است.
1=کنترل داخلي، **2**=نمونه CSF مثبت از نظر انتروویروس، **3**=کنترل مثبت، **4**=نمونه CSF منفي، **5**=نمونه CSF مثبت از نظر ویروس اوریون و انتروویروس، **6**=کنترل منفي M=مارکر

جدول 1- مشخصات توالي پرایمرها

پرایمرها	توالي $(5' \rightarrow 3')$	$Tm^{\circ}C$	طول (bp)	موقعیت
Entrovirus(sense) Entrovirus(antisens)	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)	TCTGGGTTTCATCCATCC TACCTGTGGAGCAACCTG	**58/5** **57/2**	**443**	**158-176** **591-573**

منابع

1. **Vincent, R.,Picornaviridae: The Viruses and Their replication; Field's Virology. 2001; Knipe D. Howley M. 4th edition: 685-799.**
2. **Vincent, R.,Picornaviridae: The Viruses and Their replication; Field's Virology. 2001; Knipe D. Howley M. 4th edition: 685-799.**
3. **Paolacinque, Simona,B., Molecular analysis of CNS.J.Clin.Virol.2003;26:1-28.**
4. **Mitsuaki,H., Application of PCR for various neurotropic Viruses on the diagnosis of viral meningitis J. Clin. Virology. 1998; 117-124.**
5. **Cusi, M.G.,Bianchi, S., Rapid detection and typing of circulating mumps virus by RT-PCR-Res. Virol. 1996;147: 227-232.**
6. **Androleettil. Comparison of use of csf, serum and throat swab speciemens in diagnosis of enteroviral acute neurological infection by a rapid detection. J. Clin. Microbiol. 1993;36 (2): 589-591.**
7. **Rotbart,HA.Human enterovirus infections.American society for microbiology.Washington,DC.2005.**
8. **Berger,M,.Kopp,N,.Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinalcord of patients.Neurology.2000; 54:20-25.**
9. **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.**
10. **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.**
11. **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.**

معصومه کرمانیان و همکاران