

بررسی ارزش تشخیصی کشت در رده‌های سلولی و مقایسه آن با تست الایزا در عفونت‌های سیتومگالوویروس در موارد سقط جنین

محمدکریم رحیمی^۱، محبوبه دولتی^۲، امیر عباس ارشدی^۳، شهلا چایچیان^۴، لیدا موسوی^۵

^۱ استاد یار، متخصص میکروب شناسی، بخش میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

^۲ دانشجوی کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم

^۳ دانشجوی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

^۴ دانشیار، متخصص زنان و زایمان، بیمارستان جواهری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

^۵ مربی، کارشناس ارشد میکروب شناسی، بخش میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی

چکیده

سابقه و هدف: با وجودی که کشت گلبولهای سفید مادر در رده های سلولی و شناسایی انکلوژیون های ویروس روش تشخیصی ارزشمندتری در بیماران مبتلا به سیتومگالوویروس است، اما برای تشخیص عفونت سیتومگالوویروس، از تست الایزا و سنجش آنتی‌بادی‌های ضد سیتومگالوویروس استفاده می‌شود. در این مطالعه، هدف ما بررسی ارزش تشخیصی این دو روش برای شناسایی موارد عفونت سیتومگالوویروس در مادر و نقش احتمالی آن در سقط جنین می‌باشد.

روش بررسی: در این پژوهش که از نوع ارزیابی آزمون‌های تشخیصی است، آنتی‌بادی‌های ضد سیتومگالوویروس به روش الایزا بررسی شد. هم‌چنین ۵ میلی‌لیتر خون سیتراسته مادر در فلاسک‌های کشت رده سلولی فیروبلاستی MRC5 تلقیح گردید و بعد از ۷۲ ساعت از نظر تشکیل اجسام انکلوژیون داخل سلولی بررسی شد. نمونه‌های مثبت انتخاب گردید و به روش PCR از نظر حضور اسیدنوکلیک سیتومگالوویروس تایید شد.

یافته‌ها: ۱۱۸ مادر با سابقه سقط جنین بررسی شدند. در ۶ مورد (۷/۱٪) تست الایزا و یا کشت سلول از نظر عفونت سیتومگالوویروس مثبت بود که همگی سقط بار اول بودند. در کشت سلولی، ۶ مورد انکلوژیون داخل سلولی مشاهده شد که فقط ۴ مورد آن در آزمون PCR از نظر وجود اسیدنوکلیک سیتومگالوویروس تایید شد. در تست الایزا، ۲ مورد افزایش تیتیر سرمی آنتی‌بادی کلاس IgM بر ضد سیتومگالوویروس یافت شد و در مجموع ۶ مورد ابتلا به عفونت سیتومگالوویروس تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: تست الایزا و روش کشت در رده‌های سلولی، هیچکدام به تنهایی برای تشخیص عفونت سیتومگالوویروس مادر کافی نیستند. احتمالاً عفونت سیتومگالوویروس با سقط جنین تکراری رابطه‌ای ندارد و ترجیحاً در سقط های بار اول دیده می‌شود.

واژگان کلیدی: کشت در رده‌های سلولی، تست الایزا، سیتومگالوویروس، سقط جنین.

مقدمه

عفونت اولیه سیتومگالوویروس معمولی‌ترین و رایج‌ترین عفونت در خلال حاملگی است (۱). از بین عفونت اولیه و عفونت راجعه

با سیتومگالوویروس، بیشترین میزان عفونت مادرزادی مربوط به مواردی است که مادر بطور اولیه دچار عفونت گردیده است (۲). سیتومگالوویروس، توانایی عبور از ورای جفت را دارد و موجب عفونت جفت و جنین می‌شود. در اغلب موارد این عفونت‌ها بدون علامت هستند و فقط در ۱۰ درصد موارد با

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی، دکتر محمدکریم رحیمی

(email: mkrahimi@iaut.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۶/۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۱/۲۹

علائم بالینی همراه می‌شوند. گاهی در اثر اندومتريت بالارونده سقط جنین اتفاق می‌افتد (۳).

سیتومگالوویروس در رده فیبروبلاستهای پره‌پوس انسان یا فیبروبلاست‌های ریه جنین انسان رشد می‌کند. این ویروس را می‌توان از نمونه‌های مختلف مانند گلبول‌های سفید خون، ادرار، بزاق، ملتحمه، اشک، شیر، منی، مدفوع و ترشحات سرویکوواژینال جدا کرد (۴).

روش PCR حساسیت بسیار بالایی برای شناسایی اسید نوکلئیک ویروس در نمونه‌هایی مانند ادرار، مایع مغزی-نخاعی، خون، پلاسما، بزاق و نمونه‌های بافتی دارد (۵). برای پی بردن به عفونت سیتومگالوویروس در جنین می‌توان از جداکردن ویروس از مایع آمنیوتیک (AF) و یا از خون جنین بهره گرفت که البته آزمایش مایع آمنیوتیک دقیق‌تر از آزمایش خون جنین است (۶).

تشخیص قطعی عفونت‌های سیتومگالوویروس براساس جداسازی ویروس است، اما در بسیاری از موارد بخصوص در آزمون‌های غربالگری انجام کشت به علت گران بودن و وقت‌گیر بودن امکان‌پذیر نیست (۷) و ضرورت ارزیابی آزمون‌های سنجش آنتی‌بادی به روش الایزا برای شناسایی موارد فوق و مقایسه آن با روش کشت احساس می‌گردد. لذا در این مطالعه ما بر آن شدیم تا بصورت مقایسه‌ای، ارزش تشخیصی کشت در رده‌های سلولی و آزمون الایزا را در مورد عفونت سیتومگالوویروس بررسی کنیم. علاوه بر این، مواردی از سقط‌های جنین که همراه با عفونت سیتومگالوویروس بودند را شناسایی کنیم.

مواد و روشها

در این پژوهش که از نوع ارزیابی آزمون‌های تشخیصی است، خانم‌هایی که به علت سقط جنین به طور مستمر به بیمارستان‌های تابعه واحد پزشکی دانشگاه آزاد تهران (بیمارستان جواهری، بیمارستان بوعلی و امیرالمومنین) مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. قبل از انجام مطالعه، از تمام بیماران رضایت شخصی گرفته شد. پرسش‌نامه‌ای شامل سن، شغل، سابقه بیماری قبلی، تعداد موارد حاملگی و زایمان‌های قبلی، زمان سقط و تعداد موارد سقط طراحی و اطلاعات بیمار توسط مصاحبه در آن وارد شد. ۱۰ میلی لیتر خون وریدی در دو لوله مجزا از مادران گرفته شد که ۵ میلی‌لیتر آن در لوله سیتراشه برای جداکردن بافی‌کوت و ۵ میلی لیتر دیگر در لوله آزمایش فاقد ماده

زدانعهاد برای جدا کردن سرم ریخته شد. ۲ میلی‌لیتر از فایکول برروی خون سیتراشه اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و لایه بافی‌کوت جداسازی شد. لایه بافی‌کوت در رده‌های کشت سلولی MRC5 تلقیح گردید (۸). مواردی که در زیر میکروسکوپ معکوس از نظر تشکیل انکلوژیون ویروس مثبت بودند، با استفاده از آزمون PCR و شناسایی اسید نوکلئیک ویروس مورد تأیید قرار گرفتند. لوله‌های آزمایش حاوی خون لخته برای جداسازی سرم مادر انتخاب شدند. برروی سرم مادر آزمون الایزا به روش غیرمستقیم برای شناسایی آنتی‌بادی‌ها از کلاس IgM و IgG بر ضد آنتی‌ژن سیتومگالوویروس انجام گردید.

دو گروه زیر به عنوان مبتلایان به عفونت سیتومگالوویروس در نظر گرفته شدند: گروه اول، مادرانی که در کشت سلولی از بافی‌کوت اثرات سیتوپاتیک را نشان دادند و در آزمون PCR آلودگی سلول‌ها به سیتومگالوویروس به اثبات رسید و در آنها DNA ویروس یافت گردید. گروه دوم، مادرانی که در آزمون الایزا، آنتی‌بادی کلاس IgM بر ضد سیتومگالوویروس داشتند. داده‌های به دست آمده در نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۳ وارد و با آزمون آماری کای‌دو مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

۱۱۸ مادری که به دلیل سقط جنین مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه اول (گروه کشت سلولی از بافی‌کوت) ۴ مورد و در گروه دوم (گروه آزمون الایزا) ۲ مورد و در مجموع ۶ مورد (۷/۱ درصد) عفونت سیتومگالوویروس یافت شد. نتایج آزمایشات کشت در رده‌های سلولی و آزمون الایزا در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- نتایج آزمایشات کشت در رده‌های سلولی و آزمون الایزا بر روی خون مادران

نتایج آزمایشات	موارد مثبت
تولید انکلوژیون در رده‌های سلولی	۶ (۵/۱)
نداشتن انکلوژیون در رده‌های سلولی	۱۱۲ (۹۴/۹)
حضور اسید نوکلئیک ویروس در آزمون PCR	۴ (۳/۴)
تولید انکلوژیون در رده‌های سلولی و آزمون PCR مثبت	۴ (۳/۴)
داشتن آنتی‌بادی کلاس IgM در آزمون کیفی الایزا	۲ (۱/۷)
نداشتن آنتی‌بادی کلاس IgM در آزمون کیفی الایزا	۱۱۶ (۹۸/۳)
تولید انکلوژیون در رده‌های سلولی آزمون الایزا مثبت	۰

* اعداد داخل پرانتز معرف درصد هستند.

در مطالعه ما، در مادرانی که از نظر کشت در رده های سلولی مثبت بودند، آنتی بادی بر ضد سیتومگالوویروس یافت نشد و در آنهایی که در آزمون الایزا آنتی بادی بر ضد ویروس از کلاس IgM داشتند، از نظر کشت در رده های سلولی اثرات سیتوپاتیک مشاهده نشد. در بررسی بالینی عفونت سیتومگالوویروس پدیده فوق قابل تفسیر است، به این ترتیب که در ۲ هفته اول بروز علائم و عفونت ویروس (اوایل دوره حاد) کشت از نمونه خون مثبت می باشد، اما هنوز مقدار آنتی بادی سرمی به آن اندازه افزایش پیدا نکرده است که بتواند آزمون الایزا را مثبت کند. از طرف دیگر، از هفته سوم به بعد کشت از نمونه خون ممکن است منفی باشد، اما مقدار آنتی بادی به میزانی افزایش پیدا کرده است که می تواند آزمون الایزا را مثبت کند. بعد از به پایان رسیدن دوره حاد بیماری (تقریباً از هفته هشتم به بعد) تیتراژ سرمی IgM کاهش می یابد و تا چندین سال مثبت باقی می ماند.

در یک نتیجه گیری کلی می توان گفت که عفونت سیتومگالوویروس می تواند در سقط جنین نقش داشته باشد و با توجه به اینکه بیمار ممکن است در مراحل مختلف بیماری قرار داشته باشد، برای تشخیص آن باید از هر دو روش کشت سلولی از بافی کوت و آزمون الایزا به همراه هم استفاده کرد و این دو روش می توانند به عنوان مکمل یکدیگر از کامل ترین روش های تشخیص عفونت سیتومگالوویروس باشند. احتمالاً علت تکراری نبودن سقط در موارد عفونت های سیتومگالوویروس به این دلیل است که این ویروس معمولاً به دنبال عفونت اولیه موجب سقط می شود.

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۶ توسط دکتر راضیه دهقانی فیروزآبادی در یزد انجام شد، ۱۶۵ مادری که سابقه سقط جنین داشتند از نظر آنتی بادی بر ضد سیتومگالوویروس به روش الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. بیشترین موارد سقط جنین از گروه سنی ۲۹-۲۵ سال بودند و آنتی بادی از کلاس IgM در ۴/۳ درصد سقطها یافت شد (۱۱). اما در مطالعه ما میانگین سن مادران در موارد عفونت اثبات شده سیتومگالوویروس ۳۱/۳ سال بود و ۷/۱ درصد مادرانی که سقط جنین داشتند، در آزمون الایزا و یا در کشت سلول از نظر عفونت سیتومگالوویروس مثبت بودند. مقایسه این دو مطالعه نشان می دهد که میانگین سنی مادران مبتلا به عفونت سیتومگالوویروس در مطالعه ما نسبت به مطالعه دکتر راضیه دهقانی بالاتر است و با توجه به اینکه در مطالعه ما از هر دو روش الایزا و کشت در رده های سلول استفاده شده است، موارد

ارتباط معنی داری بین عفونت سیتومگالوویروس و گروه خونی مادر مشاهده شد، به این ترتیب که ۴ مورد از ۶ مورد عفونت اثبات شده سیتومگالوویروس (۶۷ درصد)، گروه خونی O داشتند (۳ مورد گروه خونی O مثبت و ۱ مورد گروه خونی O منفی). اما از میان کسانی که نتیجه آنها از نظر عفونت سیتومگالوویروس منفی بود، فقط ۲۱ مورد از ۱۱۲ مورد (۱۹ درصد) دارای گروه خونی O بودند ($P < 0/05$).

در مورد سقط جنین قبلی و عفونت سیتومگالوویروس نیز ارتباط معنی داری بدست آمد، بدین صورت که در کل ۶ مورد (۱۰۰ درصد) عفونت اثبات شده، سقط جنین برای اولین بار اتفاق افتاده بود، ولی در بقیه افراد که از لحاظ عفونت منفی بودند، تنها در ۷۷ مورد (۶۹ درصد) سقط جنین برای اولین بار اتفاق افتاده بود ($P < 0/01$).

بین سن مادر و ابتلا به عفونت نیز ارتباط معنی داری یافت شد. میانگین سن مادر در افراد دچار عفونت، ۳۱/۳ سال و در مواردی که از لحاظ عفونت منفی بودند، ۲۸ سال بود ($P < 0/05$).

میانگین هموگلوبین در مادران مبتلا به عفونت سیتومگالوویروس ۱۲/۲ گرم در دسی لیتر و در در موارد عفونت منفی ۱۱/۲ گرم در دسی لیتر بود و ارتباط معنی داری بین ابتلای به عفونت سیتومگالوویروس و میزان هموگلوبین یافت نشد (NS).

کل مبتلایان به عفونت سیتومگالوویروس (۶ نفر، ۱۰۰ درصد موارد) خانه دار بودند، اما فقط ۷۲ درصد (۸۱ مورد) مادرانی که از نظر عفونت این ویروس منفی بودند، خانه دار بودند. ۲۸ درصد باقیمانده (۳۱ مورد) دانشجو یا کارمند بودند. به این ترتیب ارتباط معنی داری بین شغل و عفونت سیتومگالوویروس مشاهده شد ($P < 0/001$).

بحث

در بررسی مقالات هیچ پژوهشی یافت نشد که در آن روش کشت در رده های سلولی با آزمون الایزا مقایسه شده باشد. در سال ۲۰۰۲، Spano و همکاران آنتی بادی از کلاس IgM بر ضد سیتومگالوویروس را در مادرانی که سقط جنین داشتند، مورد بررسی قرار دادند. علاوه بر این، DNA و ویروس را به روش PCR در لئوسیت های خون محیطی جستجو کردند. در ۲/۵ درصد موارد، آنتی بادی از کلاس IgM یافت شد اما PCR در ۶ درصد موارد مثبت بود (۱۰). همانگونه که مشاهده می شود، در این مطالعه همانند مطالعه ما، نتایج آزمون های PCR و الایزا یکسان نبود.

بیشتری از عفونت‌های اولیه سیتومگالوویروس شناسایی شده‌اند.

در مطالعه Gree و همکارانش، ۲۰۸ نمونه از سلول‌های دهانه رحم که از دو گروه متفاوت (۱۶۵ زن غیرحامله و ۵۳ زن حامله) بودند، به روش PCR از نظر وجود اسید نوکلئیک سیتومگالوویروس مورد بررسی قرار گرفتند. در ۶ درصد موارد نتیجه آزمون PCR مثبت بود. نتایج این پژوهش با نتایج مطالعه ما که فراوانی ۷/۱ درصد را نشان داد، شباهت زیادی دارد (۱۲).

سید زکی و همکارانش شیوع عفونت‌های سیتومگالوویروس را در ارتباط با سقط‌های با علت ناشناخته بررسی کردند. در ۱۲ درصد از مادرانی که سقط تکراری داشتند، عفونت سیتومگالوویروس یافت شد (۱۳). نتایج این پژوهش نسبت به مطالعه ما میزان بالاتری از عفونت ویروس را در موارد سقط جنین نشان داد (۱۲ درصد در مقابل ۷/۱ درصد در مطالعه ما). در مطالعه Griffiths و همکارانش، شیوع عفونت سیتومگالوویروس و ویروس سرخجه در خانم‌های حامله بررسی شد. از دست دادن جنین در ۱۵ درصد خانم‌هایی که عفونت اولیه سیتومگالوویروس داشتند، مشاهده شد (۱۴). در این پژوهش نیز میزان درصد موارد عفونت اثبات شده سیتومگالوویروس از مطالعه ما بیشتر بود (۱۵ درصد در مقابل ۷/۱ درصد در مطالعه ما).

در مطالعه Ahmed MU در سال ۱۹۹۴ بر روی ۶۰۰ زن در سنین باروری، تمامی نمونه‌های سرم از نظر آنتی‌بادی‌های کلاس IgM و کلاس IgG اختصاصی بر ضد سیتومگالوویروس به روش آنزیم ایمنوآسی (Enzyme immunoassay: EIA) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در زنانی که سابقه سقط جنین داشتند، ۹/۶ درصد از نظر IgM و ۳۰/۸ درصد از نظر IgG

مثبت بودند. در عوض، در زنانی که سابقه سقط جنین نداشتند، ۳/۱ درصد از نظر IgM و ۱۳/۵ درصد از نظر IgG مثبت بودند (۱۵). با توجه به این که آنتی‌بادی از کلاس IgM، ابتدا به عفونت حاد سیتومگالوویروس رانشان می‌دهد، لذا درمقایسه این پژوهش با مطالعه ما مشاهده می‌شود که موارد ابتلا به عفونت حاد ویروس (۹/۶ درصد) نسبت به مطالعه ما (۷/۱ درصد) اندکی بالاتر است. در مطالعه Enders و همکاران در سال ۲۰۰۱ تشخیص قبل از زایمان عفونت سیتومگالوویروس مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌های جفت، مایع آمنیوتیک و خون به روش کشت از نظر وجود سیتومگالوویروس بررسی گردید. از میان ۱۸۹ جنینی که بعد از سقط درمانی یا سقط خود به خودی مورد ارزیابی قرار گرفتند، در ۵۷ مورد عفونت در مادر یافت شد و میزان انتقال داخل رحمی در حدود ۲۰/۶ درصد بود (۱۶). در این مطالعه، باتوجه به اینکه ۵۷ مورد از مادران به عفونت سیتومگالوویروس مبتلا بودند و ۲۰ درصد آنها (تقریباً ۱۱ درصد از تمامی موارد سقط جنین) عفونت خود را به جنین منتقل کرده بودند، لذا نتایج این پژوهش نیز نسبت به مطالعه ما (۷/۱ درصد) بیشتر است. در مطالعه Kaneko و همکارانش ۲۳۰۹ نوزاد در ۲۲ هفتهگی مورد بررسی قرار گرفتند. مایع آمنیوتیک، خون بند ناف و ادرار نوزادان به روش PCR از نظر وجود DNA سیتومگالوویروس بررسی شد. نتایج مثبت آزمون PCR با استفاده از کشت ویروس مورد تأیید قرار گرفت. از میان ۲۳۰۹ زایمان، ۲۸۷ مورد به عنوان گروه در معرض خطر بالا انتخاب شدند و عفونت داخل رحمی سیتومگالوویروس در ۱۰ درصد موارد یافت شد (۱۷). نتایج این پژوهش (۱۰ درصد) نیز نسبت به مطالعه ما (۷/۱ درصد) بالاتر بود.

REFERENCES

1. Nelson C, Demmler G. Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus and newborn infant. Clin Perinatol 1997;24:151-60.
2. Piper J, Wen T. Perinatal cytomegalovirus and toxoplasmosis: challenges of antepartum therapy. Clin Obstet Gynecol 1999;42:81-96.
3. Huang JC, Naylor B. Cytomegalovirus infection of the cervix detected by cytology and histology: a report of five cases. Cytopathol 1993;4:237-41.
4. Friedmann W, Schafer A, Kretschmer R, Lobeck H. Disseminated cytomegalovirus infection of the female genital tract. Gynecol obstet Invest 1991;31:56-57.
5. Wenckebach Gf, Curry B. Cytomegalovirus infection of the female genital tract. Histologic findings in three cases and review of the literature. Arch pathol Lab Med 1976;100:609-12.
6. Azam A, Vial Y, Fawer CL, Zufferey J, Hohlfield P. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. Obstet Gynecol 2001;97:443-48.
7. Adler S, Finney JW, Manganello AM, Best AM. Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus by changing behaviors: a randomized controlled trial. Pediatr Infect Dis J 1996;15:240-46.

8. Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* 1999;104:55-60.
9. Demmler G. Acquired cytomegalovirus infections. In: Feigin RD, Cherry JD (eds). *Textbook of pediatric infectious diseases*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992.
10. Spano LC, Varpas PR, Ribeiro FS. Cytomegalovirus in human abortion in Espirito Santo, Brazil. *J Clin Virol* 2002;25(Suppl 2): S173-S78.
11. Dehghani Firoozabadi R, Klantar SM. Cytogenetic analysis in couples with recurrent spontaneous abortion. *Iranian J Reprod Med* 2006;1:13-17 .
12. Gree M, Husnjak K, Matovina M, Milutin N, Magdic L, Husnjak O, et al. Human Papillomavirus, Cytomegalovirus and Adeno- associated virus infections in Pregnant and Nonpregnant women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol* 2004;42:1341-44.
13. Sayed Zaki M, Goda H. Prevalance 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;131:956-60.
14. Griffiths PD, Baboonian C. A prospective study of primary cytomegalovirus infection during pregnancy: final report. *Br J Obstet Gynaecol* 1984;91:307-15.
15. Ahmed MU. Role of cytomegalovirus in reproductive losses among women of child bearing age in our population. *Am J Reprod Immunol* 1994;22:1-3
16. Enders G, Bäder U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn* 2001;21:362-77.
17. Kaneko M, Sameshima H, IKeroue T, Minematsu T. A two-step strategy for detecting intrauterine cytomegalovirus infection with clinical manifestations in the mother, fetus and newborn. *Jpn J Infect Dis* 2006;59:363-66.