



Polymerase Chain Reaction (PCR) technique for rapid detection of *Cytomegalovirus* in idiopathic abortions

Paria Aghaei¹, Akram Sadat Tabatabaee Bafroee^{1*}, Mohammad Hasan Shahhosseini²

1. Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Microbiology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract:

Aim and Background: *Cytomegalovirus* (CMV) is a member of the herpesviridae family, which is a major cause of intrauterine viral infection. The aim of this study was to evaluate the diagnosis of CMV in women with idiopathic abortions by the polymerase chain reaction (PCR) technique.

Materials and Methods: 50 blood samples of women with idiopathic abortions were collected and viral genome was extracted using commercial kit DNG-Plus. The PCR technique was optimized using the standard CMV strain genome and then the Limit of Detection (LOD) and specificity of the test was evaluated using genomes other than CMV. The optimized PCR technique was performed on the samples and positive and negative controls and the results were analyzed by gel electrophoresis.

Results: using optimized PCR technique, 257bp product were observed in agarose gel. In the specificity test, positive results were obtained only with the CMV genome and a detection limit of 100 copies per reaction was obtained. Finally, out of 50 samples, two samples were positive for CMV.

Conclusion: Idiopathic abortions are abortions that do not seem to have a specific cause. But obviously many factors including infectious agents that can cause abortion are difficult to identify them. One of these factors could be CMV and the results of this study showed that it is best to search and identify CMV in this type of abortion by molecular tests such as PCR, quickly.

Keywords: *Cytomegalovirus*, Idiopathic abortion, polymerase chain reaction , Iau Science

Corresponding author:

Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email: akram_tabatabaee@yahoo.com





برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

برای تشخیص سریع سیتومگالوویروس در سقط‌های ایدیوپاتیک

پریا آقایی^۱، اکرم سادات طباطبایی بفرویی^{۱*}، محمد حسن شاه حسینی^۲

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سیتومگالوویروس (CMV) انسانی از اعضای خانواده هرپس ویروس‌ها است که از علل اصلی عفونت ویروسی داخل رحمی است. هدف این مطالعه بررسی تشخیص CMV در زنان با سقط‌های ایدیوپاتیک توسط تکنیک واکنش زنجیره پلی-مراز (PCR) است.

مواد و روش‌ها: ۵۰ نمونه خون از زنان مبتلا به سقط‌های ایدیوپاتیک جمع‌آوری و توسط کیت تجاری DNG-Plus ژنوم ویروسی استخراج گردید. تکنیک PCR با استفاده از ژنوم سویه استاندارد CMV بهینه سازی شد و سپس تعیین حد تشخیص (LOD) و اختصاصیت آزمایش با استفاده از ژنوم‌های غیر از CMV مورد ارزیابی قرار گرفت. تکنیک PCR بهینه شده بر روی نمونه‌ها و کنترل‌های مثبت و منفی انجام شد و نتایج توسط روش الکتروفورز ژل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: با استفاده از تکنیک PCR بهینه شده، محصول ۲۵۷ جفت بازی در ژل آگاروز مشاهده گردید. در آزمون تعیین اختصاصیت، نتایج مثبت فقط با ژنوم CMV حاصل شد و همین‌طور حد تشخیص ۱۰۰ کپی در هر واکنش به‌دست آمد. در نهایت، از ۵۰ نمونه مورد بررسی، دو نمونه از نظر وجود CMV مثبت گردید.

نتیجه‌گیری: سقط‌های ایدیوپاتیک، سقط‌هایی هستند که به‌ظاهر عامل مشخص ندارند. اما به‌طور مشخص عوامل متعددی از جمله عوامل عفونی که شناسایی آن‌ها مشکل است می‌توانند موجب سقط جنین گردند. یکی از این عوامل می‌تواند CMV باشد و نتایج این مطالعه مشخص کرد که بهتر است در این نوع سقط‌ها توسط آزمون‌های مولکولی مانند PCR به‌سرعت، CMV را جستجو و شناسایی نمود.

واژه‌های کلیدی: سیتومگالوویروس، سقط ایدیوپاتیک، واکنش زنجیره پلی‌مراز، Iau Science

مقدمه

خروج جنین از رحم قبل از رسیدن به مرحله تولد (در انسان‌ها، به‌طور معمول در حدود هفته بیستم بارداری) را سقط جنین می‌گویند. چنان‌چه دلیل سقط جنین ایجاد شده مشخص نباشد، آن را سقط ایدیوپاتیک یا خود-به-

نویسنده مسئول:

گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیکی: akram_tabatabaee@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۸

خودی می‌نامند. بنابراین، سقط با منشأ نامعلوم با نام سقط ایدیوپاتیک شناسایی می‌شود. یکی از علل سقط، عفونت‌ها هستند که در سقط خود به‌خودی اهمیت بیش‌تری پیدا می‌کنند. ویروس سیتومگالوویروس انسانی مهم‌ترین عامل و ایجاد کننده طیف وسیعی از عفونت‌های ویروسی شایع در بزرگسالان است که این عفونت‌ها به‌طور معمول بدون علامت بالینی یا همراه با علائم غیراختصاصی هستند. با این وجود هنگامی که زن باردار برای اولین بار با ویروس مواجه می‌شود، علاوه‌بر احتمال فعال شدن دوباره ویروس، خطر انتقال ویروس به جنین نیز در موارد نادر وجود دارد. پیشتر

دارای حساسیت بسیار بالا و در عین حال روشی آسان و سریع تر نسبت به کشت است، می باشد که برای تشخیص و پیشگیری از عفونت های *سایتومگالوویروس* در نمونه بارداری هایی که منجر به سقط های خود به خودی شده اند، انجام گرفت.

مواد و روش ها

۵۰ نمونه سرم خون از زنان با سقط های ایدیوپاتیک با دلیل نامشخص و ۵۰ نمونه از زنان سالم که همگی دارای رنج سنی ۲۱ تا ۴۳ سال بودند، از بیمارستانی در شهر تهران در سال ۲۰۱۹ تحت شرایط استریل جمع آوری شد و نمونه ها جهت استخراج ژنوم ویروسی به آزمایشگاه تخصصی ویروس شناسی کیوان منتقل شدند. سایر آزمایش ها در محل اصلی انجام تحقیق، آزمایشگاه تحقیقاتی ایرانیان ژن فناوری، انجام شد.

استخراج DNA از نمونه با تیترا مشخص ویروس CMV

به منظور بهینه نمودن تکنیک PCR جهت تشخیص ویروس CMV در نمونه بیماران، ابتدا سرم با تیترا مشخص CMV از آزمایشگاه ویروس شناسی کیوان تهیه شد. لازم به ذکر است، تعداد پارتیکل های ویروس در سرم با استفاده از دستگاه COBAS PCR و کیت COBAS Amplicon kit (شرکت هیتاچی ژاپن) در آزمایشگاه مذکور مشخص گردید. DNA های ویروسی با استفاده از کیت DNG-Plus سیناکلون (cat: DN8117C) استخراج گردید و کیفیت و کمیت آن ها با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی شد. نمونه های DNA با نسبت ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر، بالای ۱/۷ و نسبت ۲۳۰/۲۶۰ نانومتر، به مقدار ۲/۲ دارای خلوص قابل قبول از نظر کیفیت DNA هستند.

مراحل بهینه سازی واکنش زنجیره پلی مرز (PCR) جهت تشخیص *سایتومگالوویروس*

تکنیک PCR

جدول ۱، توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ناحیه ۲۵۷ جفت بازی ژن هدف، گلیکوپروتئین B، جهت بهینه سازی فرآیند تشخیص *سایتومگالوویروس* در نمونه های سرم را نمایش می دهد.

حضور آنتی بادی ویروس *سایتومگالوویروس* انسانی را در موارد ناهنجاری های جنینی و سقط های جنینی گزارش کرده اند و مطالعه های متعددی در مورد ارتباط این ویروس با موارد اختلال ها و سقط در مناطق مختلف ایران و جهان صورت گرفته است (۱). ویروس *سایتومگال* انسانی (HCMV) مثل تمام هرپس ویروس ها در میزبان عفونت مجدد ایجاد می کند. تنها سلول هایی که به طور کامل برای همانند سازی HCMV در موجود زنده مجازند، فیرو بلاست ها هستند (۲). HCMV یک ویروس پارادوکس است که می تواند به صورت بالقوه کشنده یا در تمام طول عمر همراه خاموش فرد باشد. نحوه عملکرد این ویروس به صورتی است که، تعداد بسیار کمی از ویروس ها از سلول آلوده رها می شوند و انتقال عفونت به طور عمده از طریق سلول به سلول انجام می گیرد. ممکن است چندین هفته وقت لازم باشد تا یک لایه سلول به طور کامل آلوده شود. *سایتومگالوویروس* ها، اثر سیتوپاتیک ایجاد می کنند. هم چنین، علاوه بر اینکلوژن های داخل هسته ای در این بیماری اینکلوژن های داخل سیتوپلاسمی اطراف هسته ای نیز ایجاد می شوند. سلول های چند هسته ای نیز مشاهده شده و تعداد زیادی از سلول های آلوده شده به شدت بزرگ می شوند (۳).

به دلیل شیوع بالای عفونت های مادرزادی با این ویروس، یک مشکل بزرگ بهداشت جهانی به شمار می رود. عفونت غیر آشکار در طی دوران کودکی و بلوغ شایع است. عفونت های شدید *سایتومگالوویروس* به طور غالب در بالغین دچار اختلال ایمنی، دیده می شود، مثل افراد با ضعف ایمنی، افراد دارای پیوند عضو به خصوص پیوند کلیه، افراد مبتلا به ایدز و هم چنین افراد مبتلا به تومورهای بدخیم که شیمی درمانی شده اند. شایع ترین علت عفونت مادرزادی، انتقال ویروس فعال شده در رحم است، هم چنین در جریان عبور جنین از کانال زایمان نیز عفونت ایجاد می گردد. عفونت مادرزادی ممکن است باعث مرگ جنین در رحم شود (۴).

سایتومگالوویروس یکی از مهم ترین عوامل سقط جنین مربوط به عفونت و به طور طبیعی پیامدهای ناخوشایند بعدی آن به ویژه در نوزادان است که سبب ایجاد ناهنجاری های اجتماعی- فردی در خانواده می گردد. در ایران نقش ویروس *سایتومگالوویروس* در سقط جنین مادران از نظر اپیدمیولوژیکی، به طور جامع ارزیابی نشده است (۵). لذا با توجه به اهمیت ویروس و تشخیص عفونت، هدف مطالعه حاضر، شناخت مولکولی CMV به روش PCR که

تکنیک PCR به روش گرادیانت قرار گرفتند تا بهترین دما برای اتصال پرایمرها به دست آید.

به منظور بهینه کردن پروفایل حرارتی، میانگین دماهای ذوب پرایمرها (۶۵°C) محاسبه شد. سپس مخلوط PCR در بازه دمایی ۵ ± ۶۵°C، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر تحت

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص سایتومگالوویروس

منبع	سایز محصول	توالی پرایمر	نام ژن
۵	۲۵۷bp	Forward 5'-CGG TGG AGA TAC TGC TGA GGT- 3' Reverse 5'- CAA GGT GCG TGA TAT GAA C- 3'	گلیکوپروتئین B

تهیه گردید. در نهایت تکنیک PCR برای هریک از رقت‌ها همراه با کنترل مثبت و کنترل منفی انجام شد (۶).

تعیین اختصاصیت تکنیک PCR جهت تشخیص سایتومگالوویروس

جهت تعیین اختصاصیت (آزمون ویژگی) پرایمرهای سایتومگالوویروس و تکنیک PCR بهینه شده، ژنوم‌های غیر از سایتومگالوویروس (از جمله، ژنوم انسان، موش، ویروس هرپس سیمپلکس I و II، آدنوویروس و ژنوم ساکارومیسس سروزیه) از بانک ژنتیکی آزمایشگاه تحقیقاتی ایرانیان ژن فناوری تهیه شد و با روش PCR بررسی شدند. همچنین سکنس پرایمرها در سایت NCBI وارد شد و پرایمرها را از لحاظ همولوژی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج بهینه‌سازی تکنیک PCR جهت تشخیص سایتومگالوویروس

پس از بهینه‌سازی واکنشگرهای PCR، مقادیر و غلظت‌های بهینه شده مطابق جدول ۲ به دست آمد. همچنین جدول ۴ برنامه زمانی و دمایی تکنیک PCR را پس از بهینه‌سازی پروفایل حرارتی نمایش می‌دهد. تصویر محصول PCR با سایز ۲۵۷ bp روی ژل آگارز ۱/۵٪ در شکل ۱ نشان داده شده است.

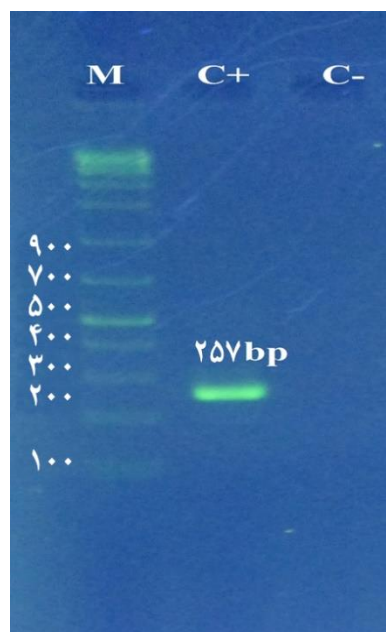
تعیین حد LOD آزمون PCR بهینه شده

به جهت تعیین حساسیت تست PCR بهینه شده، ابتدا غلظت یا جذب نوری (OD) کنترل مثبت با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد و سپس با استفاده از فرمول GCN (Genome copy number)، تعداد DNA در هر میکرولیتر از سوسپانسیون DNA اولیه محاسبه گردید. به منظور شناسایی حداقل میزان DNA ویروس، به روش کخ، رقت‌های متوالی از سوسپانسیون DNA سایتومگالوویروس

شکل ۲، اختصاصیت تکنیک PCR بهینه‌سازی شده در این تحقیق جهت تشخیص سایتومگالوویروس را نمایش می‌دهد. با توجه به شکل، پرایمرها به‌طور کامل اختصاصی فقط با DNA سایتومگالوویروس باند شده‌اند و با DNA غیر سایتومگالوویروس هیچ باند یا محصول ناخواسته‌ای ایجاد نکرده‌اند که نشان‌دهنده اختصاصیت بسیار بالای پرایمرها است.

جدول ۲. غلظت‌ها و حجم‌های بهینه شده واکنشگرهای PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر

مواد	غلظت (حجم)	غلظت نهایی در واکنش
کلرید منیزیم (MgCl ₂)	۵۰ mM (۰/۷۵ μl)	-
دئوکسی نوکلئوتید (dNTPs)	۱۰ mM (۰/۵ μl)	۰/۲mM
پرایمر فوروارد	۱۰ μM (۰/۵ μl)	۰/۲ μM
پرایمر ریورس	۱۰ μM (۰/۵ μl)	۰/۲ μM
Taq DNA پلیمرز	۵U/μl (۰/۳ μl)	۱/۵ U
بافر 10 X PCP	۱ X (۲/۵ μl)	-
رشته DNA الگو	۵ ng - ۱ (۵μl)	-
آب مقطر دیونیزه	۱۵μl	-



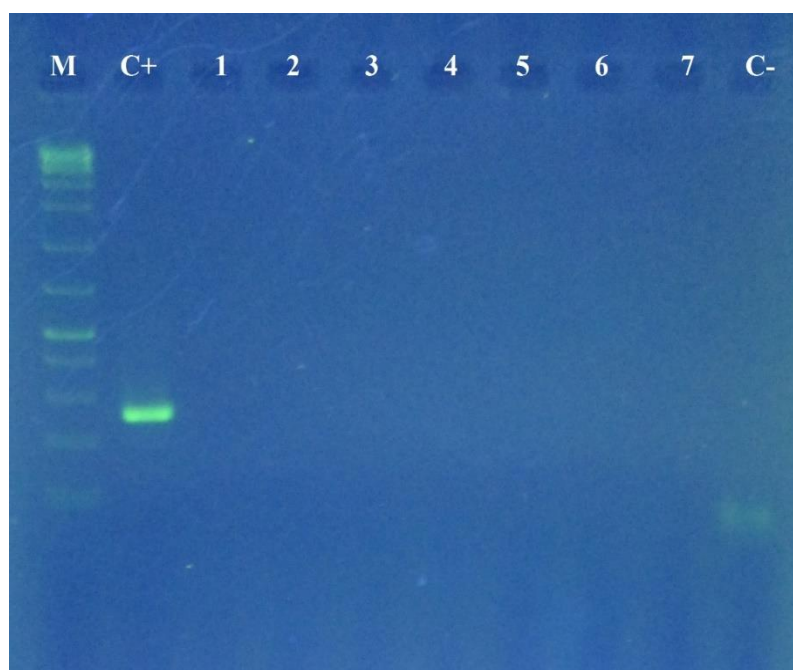
شکل ۱- تکنیک PCR بهینه شده برای تشخیص سائتومگا/وویروس

M: سایز مارکر ۱ kb (bioflux)

C+: کنترل مثبت (۲۵۷ bp)

C-: کنترل منفی

نتایج تعیین اختصاصیت پرایمرها و تکنیک PCR جهت تشخیص سائتومگا/وویروس



شکل ۲. تکنیک PCR جهت تشخیص اختصاصی سائتومگا/وویروس

M: سایز مارکر ۱ kb (bioflux)، C+: کنترل مثبت محصول PCR با اندازه محصول ۲۵۷ جفت بازی مربوط به سائتومگا/وویروس، ۱: DNA ی انسان، ۲: DNA ی موش، ۳: DNA ی هرپس سیمپلکس ویروس، ۴: DNA ی هرپس سیمپلکس ویروس، ۵: DNA ی ویروس هپاتیت B، ۶: DNA ی آدنوویروس، ۷: DNA ی ساکارومایسیس سرویزیه، C-: کنترل منفی

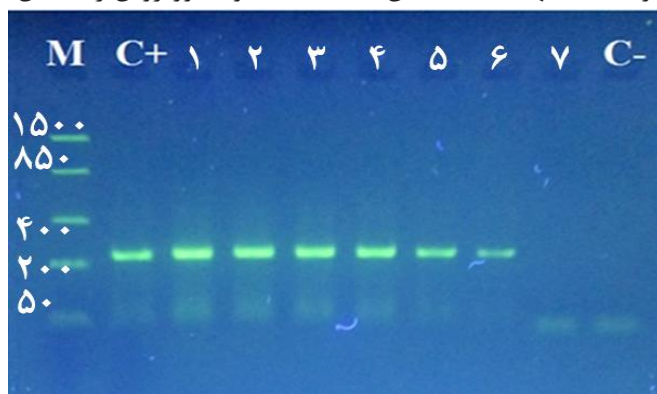
نتایج تکنیک PCR بهینه شده بر روی نمونه ها

از میان ۵۰ نمونه سرم خون، ۲ نمونه (۴/۵٪) آلوده به سائتومگا/وویروس بود. شکل ۴ (A-C) نتایج تکنیک PCR

حد تشخیص (LOD) تکنیک PCR بهینه شده

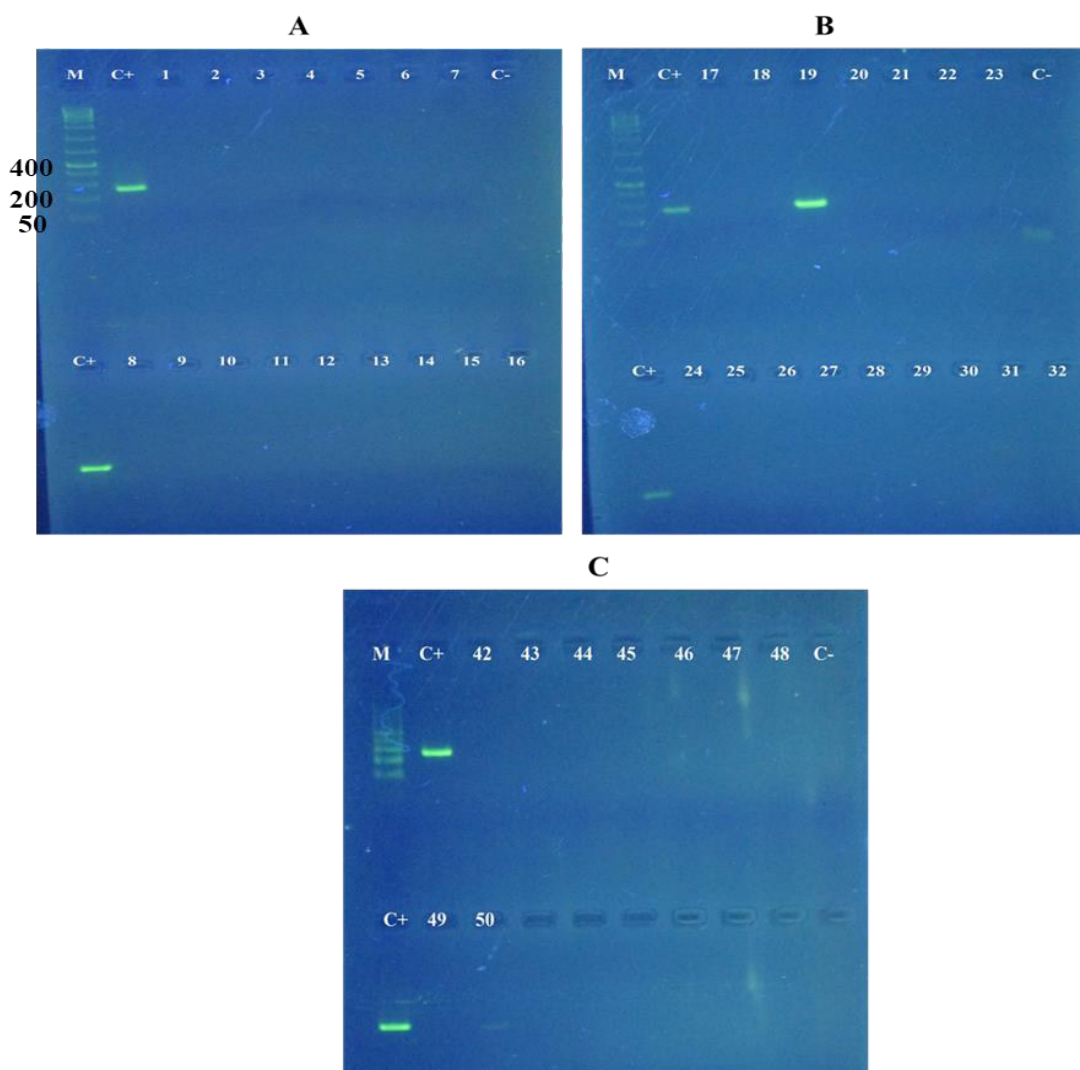
شکل ۳ نتایج این بررسی را نشان می دهد. حساسیت این تست ۱۰۰ copy/Reaction به دست آمد.

بهینه شده را روی نمونه‌ها جهت تشخیص سایتومگالوویروس را نمایش می‌دهد.



شکل ۳. حد تشخیص (LOD) تکنیک PCR بهینه شده

M: سایز مارکر (bioflux) ۱ kb، C+: کنترل مثبت محصول PCR با اندازه محصول ۲۵۷ جفت بازی مربوط به سایتومگالوویروس، ۱: ۱۰۰۰،۰۰۰ copy/reaction، ۲: ۱۰۰،۰۰۰ copy/reaction، ۳: ۱۰،۰۰۰ copy/reaction، ۴: ۱،۰۰۰ copy/reaction، ۵: ۱۰۰ copy/reaction، ۶: ۱۰ copy/reaction، ۷: ۱ copy/reaction، C-: کنترل منفی



شکل ۴ (A-C) - نتایج تکنیک PCR بهینه شده بر روی نمونه‌ها جهت تشخیص سایتومگالوویروس

M: سایز مارکر (bioflux) 100 bp، C+: کنترل مثبت محصول PCR با اندازه محصول ۲۵۷ جفت بازی مربوط به سایتومگالوویروس، C-: کنترل منفی، ۱۹: نمونه مثبت از نظر سایتومگالوویروس، و ۱۸-۱، ۵۰-۲۰: نمونه‌های منفی از نظر سایتومگالوویروس

بحث

سایتومگالوویروس انسانی (HCMV) عضو اصلی زیر خانواده β -هرپس ویروس مربوط به خانواده هرپس ویریده، جنس سایتومگالوویروس، گونه هرپس ویروس انسانی ۵ (HHV-5) است. سایتومگالوویروس (CMV) به عنوان یک ویروس فرصت طلب، می تواند در افراد با سیستم ایمنی پایین و یا سیستم ایمنی سرکوب شده، تأثیر منفی بگذارد (۷، ۸). علی رغم وجود داروهای ضد ویروسی مناسب (گان سیکلوویر، فوسکارنت) عفونت CMV هنوز به عنوان یک عامل مهم ایجاد بیماری و مرگ و میر در بیماران پیوندی است، که اغلب علت آن تأخیر در تشخیص و درمان مناسب است (۹). هم چنین مطالعه های مختلفی نشان داده است که، عفونت CMV یکی از دلایل عمده سقط جنین، نا هنجاری های مادرزادی و کاهش شنوایی در نوزادان است که به طور طبیعی منجر به زیان اقتصادی و روانی در جامعه و خانواده فرد بیمار می شود (۱۰). به طور کلی، CMV پس از یک دوره عفونت فعال در شکل نهفته باقی می ماند. این ویروس می تواند در یک فرصت مناسب مانند حاملگی، دوباره فعال شود و جنین نیز از طریق مادر، عفونت CMV را دریافت کند. عفونت اولیه CMV در ۴ تا ۷ درصد از کل موارد بارداری اتفاق می افتد و انتقال عفونت از مادر به جنین در حدود ۷۵-۲۴٪ است که به طور میانگین ۴۰٪ در نظر گرفته می شود، اما فقط ۱۰٪ از این موارد، علائم عفونت CMV مادرزادی را هنگام تولد از خود نشان می دهند و ۹۰٪ بقیه موارد بدون علائم بالینی هستند (۱۱). البته نکته قابل توجه در این است که از این ۹۰٪، در حدود ۱۵-۵ درصد، علائم و عوارض بلند مدت نشان می دهند (۱۲). با توجه به عواقب وخیم عفونت CMV دوران بارداری برای جنین، غربالگری آن در دوران بارداری می تواند مفید باشد. چون با غربالگری می توان عفونت احتمالی جنین را جست و جو نمود و در صورت مثبت بودن، با خاتمه انتخابی حاملگی، جلوی تولد یک نوزاد دارای نقایص جسمانی و روانی را گرفت. بنابراین، در مطالعه حاضر به ارزیابی مولکولی CMV در سقط های ایدیوپاتیک به روش PCR پرداخته شد و این نتیجه حاصل شد که با تکنیک هایی مانند PCR به سرعت می توان، CMV را شناسایی کرد و با توجه به مطالعه های پیشین نیز این موضوع تأیید می شود.

بر اساس نتایج مطالعه های مختلف، روش های متداول شناسایی عفونت CMV شامل: کشت ویروس (استاندارد

طلایی تشخیص)، تست سنجش آنتی بادی (الایزا) و روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) است. کشت CMV باید ۲۱ روز نگهداری شود تا نتیجه مثبت ایجاد شود. این زمان برای بیماران پیوندی مناسب نیست. تکنیک های آزمایشگاهی که بر اساس تشخیص سرولوژیکی هستند، (تشکیل آنتی بادی خاص) برای بیماران ضعیف به لحاظ سیستم ایمنی نامناسب هستند، زیرا این افراد نمی توانند آنتی بادی نرمال بسازند. بنابراین آزمایش هایی که برای تشخیص CMV در بیماران ضعیف به حاظ سیستم ایمنی استفاده می شود، باید در جهت تشخیص مستقیم ویروس، آنتی ژن های پروتئینی یا اسید نوکلئیک باشد تا عفونت مشخص شود (۱۳). تشخیص به روش آمینوسنتز گرچه ویژگی بالایی دارد ولی یک روش تهاجمی است که خودش خطر سقط را افزایش می دهد. امروزه در کشورهای پیشرفته، به خصوص در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی، روش تشخیصی PCR در حال جایگزینی با روش کشت سلول خونی است. روش PCR حساسیت بالایی جهت شناسایی ویروس در نمونه های ادرار، خون، پلاسما و مایع مغز- نخاعی دارد که انجام کشت، به دلیل زمان بر بودن مقدور نیست. PCR محتوای نمونه های کلینیکی را در یک روش غیر وابسته به کشت و در مدت زمان کوتاه و هم چنین با دقت، اختصاصیت و حساسیت بسیار بالا بررسی می کند که به میزان قابل توجهی باعث افزایش کیفیت اطلاعات به دست آمده از این نمونه ها می شود (۱۳). هم چنین، مطالعه های انجام شده حاکی از آن است که، نتایج مثبت با روش PCR به خوبی وجود ویروس سایتومگال را نشان می دهد (۹). در پژوهش حاضر نیز برای شناسایی DNA ویروس CMV از تکنیک PCR استفاده شد و مشخص شد که تکنیک PCR بهینه شده از اختصاصیت بسیار بالایی برخوردار است، به طوری که فقط با DNA ویروس CMV واکنش نشان داد و با DNA سایر موجودات زنده مورد مطالعه هیچ واکنشی صورت نگرفت. طبق مطالعه مقایسه ای که در سال ۲۰۱۷ بر روی نمونه سرم ۱۶۵ زن با سقط خود به خودی با عامل CMV به وسیله سه روش تشخیصی PCR، الایزا و ایمونواسی کروماتوگرافیک انجام گرفت، با تشخیص ۹۶٪ مثبت با PCR از نظر حضور CMV در نمونه ها، هم چنان روش تشخیصی PCR با اختلاف از سایر روش ها از نظر دقت حائز اهمیت بود (۱۴). مtrakم شدن ویروس ها در جنین که به بیماری شدید منجر می شود در هفته های ۱۲ تا ۱۶ بارداری رخ می دهد (۱۵) و قبل از آن ردیابی وجود DNA

در خون مادر می‌تواند جایگزین آمنیوسنتز شود (۱۶). در مطالعه‌ای 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 Real Time و PCR ارزیابی شدند. نتایج حاصل از انجام PCR به روش الکتروفورزیس برای *CMV* بر روی ۱۰۰ نمونه ادرار نوزادان، ۵۸ نوزاد مثبت (۵۸٪) و ۴۳ نوزاد منفی (۴۳٪) را نشان دادند. تمامی ۱۰۰ نمونه با تکنیک Real Time مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج آن، نتایج PCR معمولی را تأیید کردند (۱۷). در برخی موارد، تشخیص قطعی عفونت‌های *CMV* براساس جداسازی ویروس است، اما در بسیاری از موارد به-ویژه در تست‌های غربالگری، امکان کشت دادن ویروس (به-علت گران بودن و وقت گیر بودن) نیست (۱۸)، لذا وجود روش مولکولی در تشخیص این بیماری به‌عنوان تست سریع و صحیح بسیار حائز اهمیت است (۱۹).

Patrick Doof و همکاران جهت تأیید وجود یا عدم وجود عفونت *CMV* از روش PCR استفاده کردند. در آن مطالعه تعداد ۱۵۷ زن باردار به‌عنوان مبتلایان به عفونت اولیه *CMV* شناخته شدند. از این تعداد ۱۴۸ مورد بدون علامت بالینی و ۸ مورد دارای علائم بالینی بودند. در یک مورد هم وجود ناهنجاری‌های مادرزادی جنین مربوط به عفونت *CMV* در نظر گرفته شد. در مطالعه‌ای توسط Zaker و همکاران بر روی نمونه‌های مایع آمنیوتیک از ۶۰ زن باردار با سابقه سقط مشخص شد که نتایج PCR برای ۵ (۸/۲۷٪) نفر با یکبار سابقه سقط و ۴ (۸۰/۰٪) نفر با دوبار سابقه سقط مثبت بوده است. در گروه کنترل نتایج PCR منفی گزارش شد (۱۹). در مطالعه حاضر نیز، نتایج PCR برای ۲٪ از ۵۰ نمونه مورد بررسی مثبت شد و حد تشخیص ۱۰۰ copy/reaction به‌دست آمد. هم‌چنین، نتایج حاصل از تحقیق Kazemi و همکاران بر روی ۱۱۰ نمونه سرم خون از مادران با سابقه سقط خود به خودی مبنی بر مثبت شدن تست PCR برای ۶ مورد (۵/۶٪) بوده است که به نتایج این تحقیق نزدیک است. آن‌ها از سه روش PCR، کشت و الیزا برای تشخیص عفونت *CMV* استفاده کردند. با توجه به نتایج، دقت تست PCR از بقیه روش‌ها بیشتر گزارش شد و ثابت کردند تست الیزا برای تشخیص عفونت *CMV* کارایی چشم‌گیری ندارد زیرا، تست الیزا، در دو هفته اول بروز علائم بیماری منفی است، چون آنتی‌بادی

سرمی آنقدر افزایش پیدا نکرده است که بتواند تست الیزا را مثبت کند که این امر از جنبه‌های منفی یا ضعیف الیزا بشمار می‌رود (۴).

ارزیابی نتایج محققان نشان داد که اهمیت تشخیص سریع و به‌موقع در مورد عفونت‌های مرتبط با *CMV* از اهمیت بالایی برخوردار است و مقایسه روش‌های مختلف در تشخیص وجود این عامل در بدن این موضوع را روشن می‌نماید که به-احتمال روش تشخیص مولکولی در زمان و دقت شناسایی عامل مهمی در بهره برداری این روش است (۱۹). هم‌چنین روش‌های ایمونولوژی که امروزه صورت می‌گیرد، با توجه به خطای دستگاه و کارشناسان مرتبط و هم‌چنین زمان انجام آن معضلاتی را در گزارش‌های صحیح و سریع در بر دارد که روش مولکولی، جایگزین مناسبی در تشخیص است. هم-چنین با توجه به نتایج محققان دیگر کشورها این موضوع نمایان می‌شود که ویروس *CMV* امکان وارد کردن ضربه به خانواده و مادران با سقط‌های خود به‌خودی و مکرر، تولد نوزاد با ناهنجاری‌های شناخته شده و ضایعات جبران ناپذیر در نوزاد را دارد. بنابراین، به‌طوری ضروری در این نوع سقط-ها می‌توان به‌وسیله تکنیک‌هایی مانند PCR به‌سرعت، *CMV* را جستجو و شناسایی نمود.

نتیجه‌گیری

تشخیص سریع و به‌موقع در مورد عفونت‌های مرتبط با *CMV* از اهمیت بالایی برخوردار است چون با غربالگری می‌توان عفونت احتمالی جنین را جست و جو نمود و در صورت مثبت بودن، با خاتمه انتخابی حاملگی، جلوی تولد یک نوزاد دارای نقایص جسمانی و روانی را گرفت.

1. Neirukh T, Qaisi A, Saleh N, Rmaileh AA, Zahriyeh EA, Qurei L, Dajani F, Nusseibeh T, Khamash H, Baraghithi S, Azzeh M. Seroprevalence of Cytomegalovirus among pregnant women and hospitalized children in Palestine. *BMC infectious diseases*. 2013 Dec;13(1):1-7.
2. Lilleri D, Kabanova A, Lanzavecchia A, Gerna G. Antibodies against neutralization epitopes of human cytomegalovirus gH/gL/pUL128-130-131 complex and virus spreading may correlate with virus control in vivo. *Journal of clinical immunology*. 2012 Dec 1;32(6):1324-31.
3. Mercer DK, Stewart CS, Miller L, Robertson J, Duncan VM, O'Neil DA. Improved methods for assessing therapeutic potential of antifungal agents against dermatophytes and their application in the development of NP213, a novel onychomycosis therapy candidate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019 Apr 25;63(5):e02117-18.
4. Mercer DK, Stewart CS, Miller L, Robertson J, Duncan VM, O'Neil DA. Improved methods for assessing therapeutic potential of antifungal agents against dermatophytes and their application in the development of NP213, a novel onychomycosis therapy candidate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019 Apr 25;63(5):e02117-18.
5. Kazemi A, Norouzi H, Nazarpour S. Comparison the Diagnostic Value of Culture and Polymerase Chain Reaction Methods in Diagnosis of Cytomegalovirus Infections in Spontaneous Abortions. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*. 2013;16(53):1-6.
6. Kaandorp SP, Goddijn M, Van Der Post JA, Hutten BA, Verhoeve HR, Hamulyák K, Mol BW, Folkeringa N, Nahuis M, Papatsonis DN, Büller HR. Aspirin plus heparin or aspirin alone in women with recurrent miscarriage. *New England Journal of Medicine*. 2010 Apr 29;362(17):1586-96.
7. Bieniek R, Kirby JE, Cheng A, Eichelberger K, Qian Q. Effective use of PCR for the detection of cytomegalovirus viremia and monitoring therapy in immunocompromised patients. *Laboratory Medicine*. 2011 Jun 1;42(6):339-43.
8. Wang Y, Li S, Ma N, Zhang Q, Wang H, Cui J, Wang S. The association of ToRCH infection and congenital malformations: A prospective study in China. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2019 Sep 1;240:336-40.
9. 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. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2013 Oct 10;23(105):61-9.
10. Requião-Moura LR, Matos AC, Pacheco-Silva A. Cytomegalovirus infection in renal transplantation: clinical aspects, management and the perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015 Jan;13:142-8.
11. Ssentongo P, Hehnly C, Birungi P, Roach MA, Spady J, Fronterre C, Wang M, Murray-Kolb LE, Al-Shaar L, Chinchilli VM, Broach JR. Congenital Cytomegalovirus Infection Burden and Epidemiologic Risk Factors in Countries With Universal Screening: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA network open*. 2021 Aug 2;4(8):e2120736.
12. Gao YL, Gao Z, He M, Liao P. Infection status of human parvovirus B19, cytomegalovirus and herpes simplex Virus-1/2 in women with first-trimester spontaneous abortions in Chongqing, China. *Virology journal*. 2018 Dec;15(1):1-8.
13. Szkaradkiewicz A, Pieta P, Tułeczka T, Breborowicz G, Słomko Z, Strzyzowski P. The diagnostic value of anti-CMV and anti-HPV-B19 antiviral antibodies in studies on causes of recurrent abortions. *Ginekologia polska*. 1997;68(4):181-6.
14. Gerna G, Baldanti F. Brief molecular diagnostic criteria for human cytomegalovirus infection/disease. *Expert review of molecular diagnostics*. 2019 Sep 2; 19(9):773-5.

15. Ahmed R. Sofy , Khalid A. El-DougDoug , Adel A. Mousa , Mahmoud R. Sofy , Ahmed A. Hmed , Ahmed A. Abbas , Monitoring and Evaluation of Cytomegalovirus Detection and Risk Factors in Pregnant Women from Egypt, *International Journal of Virology and Molecular Biology*. 2017 Dec; 6 (1): 9-23.
16. Adler SP. Screening for cytomegalovirus during pregnancy. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. 2011 Aug 9; 2011.
17. Marsico C, Kimberlin DW. Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Italian journal of pediatrics*. 2017 Dec;43(1):1-8.
18. YARI R, Javadi A, MOROVVATI A, SEYEDSHAKERI T. Rapid Detection and Prevalence of Cytomegalovirus in Infants under Three Weeks by PCR and Real Time PCR. 2016.
19. Benoist G, Leruez-Ville M, Magny JF, Jacquemard F, Salomon LJ, Ville Y. Management of pregnancies with confirmed cytomegalovirus fetal infection. *Fetal diagnosis and therapy*. 2013;33(4):203-14.
20. Nigro G, Mazzocco M, Mattia E, Di Renzo GC, Carta G, Anceschi MM. Role of the infections in recurrent spontaneous abortion. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2011 Aug 1;24(8):983-9.