مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۳ شماره ۵ آذر و دی ۱۳۹۰ صفحات ۳۷-۳۳

مقایسه روش Real Time PCR با جدا سازی ویروس برای تشخیص ویروس انفلونزای نوع A (H1N1) درآذربایجان شرقی

سیروس جداری سیفی: گروه باکتری و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، نویسنده رابط:
E-mail: jedaryseifi@yahoo.com
دکتر رضا قوطاسلو: گروه باکتری و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
محمد آقازاده: گروه باکتری و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۸۹/۷/۱۷ **پذیرش**: ۸۹/۹/۲۷

چکیده

زمینه و اهداف: ویروسهای انفلونزا از مهمترین عوامل عفونتهای تنفسی بوده و باعث ایجاد آسیب هائی در راههای تنفسی تحتانی می‌شوند. این ویروسها در کودکان و سالمندان باعث عفونتهای جدی و خطرناک می‌شوند. ویروس انفلونزای نوع A (H1N1) باعث عفونتهای اپیدمیک شده و در نقاط مختلف دنیا باعث هزاران مرگ و میر می‌شوند. در این مطالعه روشهای جداسازی و Real-time PCR برای تشخیص ویروس انفلونزای نوع A در نمونه های بالینی بکار گرفته شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی از اسفند ۱۳۸۷ تا اسفند ۱۳۸۸ تعداد ۱۰۰ نمونه سواب گلو از بیماران مشکوک به عفونت انفلونزا از مراکز بهداشتی و درمانی آذربایجان شرقی در محیط کشت VTM جمع آوری شده و در آزمایشگاه ویروس شناسی دانشکده پزشکی با روش کشت در محیط کشت سلولی MDCK و روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: کلیه نمونه های سواب گلو با روش کشت ویروس و Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. با روش Real-time PCR تعداد ۱۹ نمونه مربوط به ویروس انفلونزا A (H1N1) و با روش کشت ۵ مورد ویروس جداسازی شد. به عبارت دیگر ۱۴ نمونه که با روش Real-time PCR نتیجه مثبت بدست آمده بود با روش کشت نتیجه منفی داد.

نتیجه گیری: روش Real-time PCR مقادیر جزئی از ژنوم ویروس را در این مطالعه مشخص می نماید. این روش نسبت به جداسازی (Isolation) بمراتب حساستر و اختصاصی تر می‌باشد.

کلید واژه‌ها: ویروس آنفلونزا (H1N1 A)، جداسازی، روش Real-time PCR

مقدمه

ویروسهای انفلونزا عضو خانواده Orthomyxoviridae، دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای، بصورت تکه تکه و لفافدار (enveloped) هستند (۱-۴). سه تیپ مختلف این ویروس بنام انفلونزای A، B و C که تفاوتهائی در آنتی ژنهای پروتئین M و نوکلئوپروتئین (NP) دارند در انسان ایجاد عفونت می‌کنند (۵ و ۶).

تیپ های مختلف ویروسهای انفلونزا تفاوتهای آنتی ژنیک در گلیکوپروتئین های خارجی هماگلوتینین (HA) ونورآمینیداز (NA) دارند. تا به امروز ۱۵ نوع هماگلوتینین (H1 تاH15) و ۹ نوع نورآمینیداز (N1 تا N9) برای این ویروسها معرفی شده است (۶ و۷). ویروسهای انفلونزا تیپ A و B می‌تواند طیف وسیعی از بیماریها شامل بیماریهای راههای تنفسی تحتانی، پنومونی و در بعضی مواقع بر اساس نوع ویروس انفلونزا انسفالوپاتی و انسفالیت ایجاد کند (۸-۱۰). کلیه ویروسهای انفلونزا حاوی انواع هماگلوتینین ها (HA) و نورآمینیدازها (NA) از پرندگان ایزوله شده اند، ولی سروتیپ هائی که با عفونتهای اپیدمیک انسانی در ارتباط هستند انفلونزا A (H1N1)، انفلونزاA (H2N2) و انفلونزا A (H3N2) می‌باشند (۸ و۹).

این ویروسها به دلیل تغییرات آنتی ژنیک باعث ایجاد اپیدمی های مختلف شده و عفونتهای ایجاد شده در سرتاسر دنیا بوجود می‌آیند و باعث ایجاد خسارتهای جانی و مالی می‌شوند. بنابراین با توجه به اهمیت بیماری و خصوصیات ویروس عامل آن ضروری است تمام مراکز بهداشتی و درمانی نسبت به کنترل بیماری تلاش نمایند. لذا جداسازی و تشخیص سریع سروتیپهای شایع شده در جامعه کاملا" الزامی است (۱۱).

مواد و روش ها

در این مطالعه از ۱۰۰ بیمار مشکوک به انفلونزا از مراکز بهداشتی و درمانی آذربایجان شرقی که دارای علائمی مثل تب شدید، سرفه خشک و دردهای عضلانی بودند با استفاده از سوابهای مخصوص (Dacron tipped)، از گلو نمونه برداری شده و در داخل محلول (VTM) به آزمایشگاه ویروس شناسی دانشکده پزشکی انتقال داده شدند. نمونه ها در آزمایشگاه ویروس شناسی به دو قسمت تقسیم شد. قسمتی برای کشت ویروس در سلولهای MDCK و قسمت دیگر برای استخراج RNA جهت تست Real-time PCR بکار گرفته شد.

جداسازی ویروس

برای این منظور سلولهای اختصاصی برای ویروس انفلونزا (MDCK) که در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی (FCS)، پنی سیلین به میزان ۱۰۰ IU/ml، استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ mg/ml و L-glutamine به مقدار ۲ میکرولیتر کاملا" رشد کرده و بحالت تک لایه (Monolayer) در آمده بودند استفاده شد.

از نمونه های آماده شده بیماران بمقدار ۱۰۰ میکرولیتر به سلولهای فوق تلقیح شده و این سلولها در درجه حرارت ۳۴ درجه سانتیگراد بمدت ۳ – ۷روز در انکوباسیون قرار داده شدند. تکثیر ویروسها بعد از انقضای مدت مذکور با استفاده از تست استاندارد هماگلوتیناسیون (HA) تشخیص داده شد (۱۳).

استخراج RNA ویروسی از نمونه های بیماران:

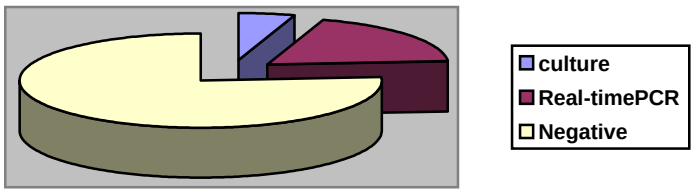
مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه های سواب گلوئی با استفاده از کیت Mini kit invitrogen برای استخراج RNA ویروسهای انفلونزا ی احتمالی موجود در نمونه های بیماران مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده مورد آزمایش قرار گرفت. محصول نهائی بعنوان RNA ویروس انفلونزا برای تبدیل به cDNA و تکثیر آن برای تست Real-time PCR بکار گرفته شد.

تست Real-time PCR: مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از RNA های استخراج شده مرحله قبل با استفاده از کیت تشخیصی Invitrogen برای تبدیل به cDNA (در درجات حرارت بین ۴۲ –۶۰ درجه سانتیگراد) و تکثیر آن مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده (۴۵ سیکل) تا آخرین مرحله مورد آزمایش قرار گرفت.

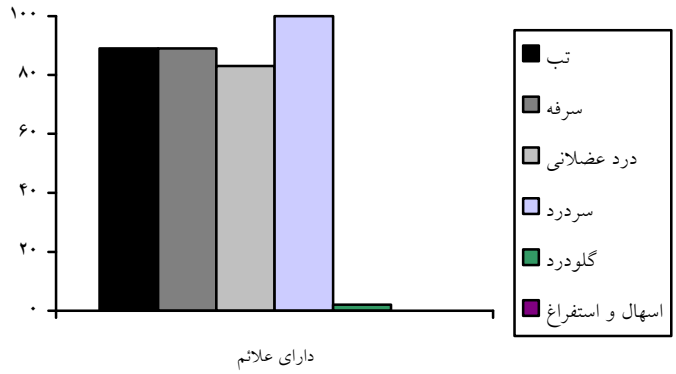
داده‌های حاصل از این بررسی با نرم افزار SPSS 16 و آزمونهای آماری Chi– Square وFishers Exact test و آمار توصیفی (فراوانی–درصدها) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در این مطالعه مقادیر **P**<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

از ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده تعداد ۴۶ نمونه افراد مذکر (۴۶٪) و ۵۴ نمونه افراد مونث (۵۴٪) بود. ۱۶ نمونه از بیمارستانهای مختلف تبریز و ۸۴ نمونه از شهرستانهای اطراف جمع آوری شده بود. میانگین سنی جمعیت مورد مطالعه ۲۳/۸۶±۳۳/۸۸ که کمترین آن یکسال و بیشترین ۸۵ سال بوده است. با بررسی این نمونه ها با روشReal-time PCR تعداد ۱۹ مورد از نظر انفلونزای نوع (H1N1A) مثبت بود، در صورتیکه با روش کشت و جداسازی در محیط کشت سلولی MDCK فقط ۵ مورد مثبت ویروس انفلونزا نوع A بدست آمد (شکل ۱). بعبارت دیگر با روش Real-time PCR تعداد ۱۴ نمونه بیشتر از روش کشت نتیجه مثبت بدست آمد که از نظر آماری ارتباط معنی داری را نشان می‌دهد (**P**<٪۵). از ۵ مورد نمونه ویروس انفلونزای جداسازی شده از بیماران ۴ مورد مربوط به نمونه های اخذ شده از افراد مذکر و ۱ مورد مربوط به افراد مونث بود که از نظر آماری ارتباط معنی داری نشان نداد (**P**=۰/۱). مطالعه موارد مثبت نمونه های بیماران نشان می‌دهد که اکثریت موارد مثبت انفلونزا در گروههای سنی ۱۰ – ۳۰ ساله می‌باشد و موارد جداسازی شده ویروس انفلونزا نیز در این محدوده سنی قرار دارند. اطلاعات کلی مربوطه در جدول ۱ نشان داده شده است. بررسی نتایج حاصله نشان داد که بیشترین علائم مشهود بیماران تب، سرفه و درد عضلانی بوده و سردرد در تمامی بیماران وجود داشته است ولی اسهال و استفراغ فقط در یک مورد و گلودرد در۲ نفر از بیماران مشاهده شده است که این نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱: نمایش درصد نتایج کشت و Real-time PCR در نمونه های انفلونزای نوع (H1N1A)



شکل ۲: نمودار فراوانی علائم بالینی در نمونه های جمع اوری شده از بیماران مشکوک به انفلونزا

جدول ۱: تعداد موارد مثبت نتایج کشت (جداسازی) و Real-time PCR درنمونه های مشکوک به انفلونزا نوع(H1N1A)

گروههای سنی سال	۰ – ۱۰	۱۱–۲۰	۲۱– ۳۰	۳۱– ۴۰	۴۱– ۵۰	۵۱– ۶۰	۶۱ – ۷۰	۷۰ سال ببالا
تعداد بیماران	۱۷	۱۶	۲۳	۱۱	۶	۹	۹	۹
تعداد Real-time PCR	۳	۶	۶	۱	–	۱	۱	-
تعداد موارد ایزولاسیون	۲	۱	۲	–	–	–	–	-

بحث

انفلونزا یک بیماری ویروسی شدید، مسری و حاد دستگاه تنفسی است که معمولا" در قسمت راههای تنفسی تحتانی باعث ایجاد آسیب های شدید می‌شود. این ویروس ایجاد علائم مشخصی مثل تب، سرفه و درد عضلانی می نماید که می‌تواند در افراد پر مخاطره مثل کودکان و سالمندان زمینه ایجاد عفونتهای ثانویه خطرناک و مشکلات جدی را فراهم نموده و سبب افزایش میزان بستری شدن و مرگ و میر در این گروههای سنی شود (۱۱و۱۲).

این بیماری توسط ویروس‌های انفلونزا (Influenza) از خانواده Orthomyxoviridae ایجاد شده و تمامی گروههای سنی را در بر گرفته و به دلیل تغییرات آنتی ژنیک باعث ایجاد اپیدمی های انفلونزا در سرتاسر جهان می‌شود. این اپیدمی ها سالیانه خسارات جانی و مالی فراوانی را ایجاد می نمایند و عفونتهای اپیدمیک انفلونزای پرندگان و انفلونزای خوکی اخیر بهترین مثال این قضیه می‌باشد. بنابراین با توجه به اهمیت بیماری و خصوصیات ویروس عامل آن ضروری است که تمامی مراکز بهداشتی و درمانی طی برنامه ای مشخص با تشخیص بموقع و سریع بیماری در جلوگیری از گسترش بیماری تلاش نمایند.

همچنین تعیین تیپ آنتی ژنیک ویروس در گردش در جامعه با استفاده از روشهای جداسازی (Isolation) و روشهای مولکولی از قبیل Real-time PCR، تهیه واکسن از سویه های شایع و بدنبال آن واکسیناسیون افراد پرمخاطره و اقدام برای درمان افراد آلوده جزو مسائلی است که باید در این موقعیت حساس مورد توجه قرار گیرد (۱۲).

برای این منظور جداسازی و تشخیص سریع این ویروسها از سایر ویروسهای تنفسی مثل سرماخوردگی های مختلف، انفلونزای فصلی (Seasonal flu) و سایر سروتیپ ها از نقطه نظر کنترل، مدیریت و پیشگیری تا تهیه واکسن مناسب از اهمیت ویژه ای بر خوردار است. تشخیص سریع و آزمایشگاهی این ویروس در درمان و کنترل بیماریها مخصوصا" در موارد اپیدمی و پاندمی ارزش فوق العاده ای دارد. در این مطالعه برای تشخیص و تائید ویروس ایجاد کننده بیماری از روش جداسازی در محیط کشت سلولی اختصاصی ویروس انفلونزا (MDCK) و روش Real-time PCR استفاده و نتایج مورد مقایسه قرار گرفته است. در این رابطه مطالعات زیادی در نقاط مختلف جهان انجام شده است. در یک بررسی انجام شده توسط Michael Carr و همکارانش (سال ۲۰۰۹) در ۵۳ نمونه بیمار روش Real-time PCR را برای تشخیص سروتیپ های ویروس انفلونزا بکار برده و این روش را برای تعیین تیپ ویروس انفلونزا SW(H1N1) یک روش اختصاصی و حساس ذکر نموده است (۱۴).

مطالعات انجام شده توسط Constance و همکارانش (سال ۲۰۰۹) بر روی ۵۰۰۰ نمونه سواب گلوئی در مبتلایان به عفونت انفلونزا روش Real-time PCR را بمراتب حساستر از تست های دیگر بیان نموده اند (۱۵). در یک مطالعه انجام شده در مرکز ملی

انفلونزای ایران توسط دکتر مختاری و همکاران (۲۰۰۷) در ۷۵ نمونه سواب گلوئی مبتلا به بیماری انفلونزا فقط ۲۶ مورد از نمونه ها از نقطه نظر جداسازی مثبت بوده در حالیکه در ۷۵ نفر از نمونه های فوق توسط روشReal-time PCR جواب مثبت بدست آورده اند که با نتایج این بررسی مطابقت می نماید (۱۶).

در یک بررسی انجام شده توسط Leo و همکارانش (سال ۲۰۰۹) در نمونه ترشحات نازوفارنگس (NAPs) بیماران مبتلا به انفلونزا نشانداده است که برای تشخیص سریع ویروس انفلونزا یH1N1 مخصوصا" در موارد عفونتهای پاندمی تست – Real time PCR ارزش فوق العاده ای داشته و کاربرد بیشتری نسبت به سایر روشها دارد (۱۷). در یک مطالعه دیگر روی ۳۶۱ نمونه بیمار مشکوک به عفونتهای راههای تنفسی (شامل ویروسهای انفلونزا، سین سیتیال تنفسی و انفلونزای فصلی) که توسطLiao و همکارانش (سال ۲۰۰۹) انجام شد میزان اختصاصی بودن تست Real-time PCR در تشخیص ان عفونتها رقمی بالای ۹۸ درصد بدست آورد که بیانگر ایده ال بودن این تست در تشخیص های سریع آزمایشگاهی مخصوصا" در موارد پاندمی است (۱۸).

نتیجه گیری

شیوع عفونت ویروس های انفلونزای پرندگان و انفلونزای خوکی در سالهای اخیر و خسارات مالی و جانی ایجاد شده در نقاط مختلف دنیا، اهمیت تشخیص سریع سروتیپ های شایع شده در جوامع بشری را نشان میدهد. تشخیص تیپ های آنتی ژنیک ویروس در گردش جهت تهیه واکسن و واکسیناسیون افراد پر مخاطره از اهمیت ویژه ای برخوردار است. لذا پیشنهاد میشود جهت شناسائی بموقع و تشخیص سریع افراد آلوده و تعیین سروتیپ ویروس عامل جهت تهیه واکسن از روش ملکولی مذکور در موارد بحرانی عفونت استفاده شود.

References

1. Katherine A, Poehling M, Marie R, Grifin Robert S, Dittus D, Wie Tang Y. Beside Diagnosis of Influenza virus infections in Hospitalized children . *Pediatrics J* 2008, **110**(1):83–88.
2. Constance T, Panchuki M, Aijaz Khurshid, Nawrocki J. Utility of Reverse Transcriptase PCR for Rapid Diagnosis of Influenza A virus Isolation and detection of Amantadine–Resistant Influenza A virus isolate. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; **34**(1):2796-2798.
3. Hindiyeh M, Levy V, Azar R, Varsano N, Regev L, Shalev Y, Grossman Z. Evaluation of a multiplex real-time reverse transcriptase PCR assay for detection and differentiation of influenza viruses A and B during the 2001 -2002 influenza season in Israel. *J clin Microbiol* 2004; **43**(2): 589-595.
4. Xie Z, Pang Y, Liu J, Deng X, Tang X, Sun J, Khan M. A multiplex RT-Pcr fordetection of type A influenza virus and differentiation of avian H5, H7 and H9 hemagglutinatinin subtypes. *Mol cell Probes* 2006; **20**(4): 245-249.
5. Poddar Sk. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tub multiplex reverse transcriptase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. *J Virol Methods* 2002; **99**(1): 63-70.
6. Van Elden L, Nijhuis M, Schipper P, Schurman R, Van Leon A. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time PCR. *JCM* 2001; **39**(1): 196-200.
7. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, Timm H, Pauli G. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *JCM* 2000; **38**(4): 1552-1558.
8. Atmar Robert L , Baxter A , Barbara D , Domingez Edward A , Taber Larry H. Comparison of Reverse Transcription- PCR with Tissue Culture and other Rapid Diagnostic Assays for Detection of type A influenza *Virus. JCM* 1996; **7**:.2604-2606.
9. Hermann B, Larsson Ch, Zweygberg Bentia W. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and by a nested reverse transcription – PCR: Comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OLA). *J Cli Microbiol* 2004; **39**(1): 134-138.
10. Templation Ke, Scheltinga Sa, Beersma M, Krose A, Claas E. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses. *J Med Virol* 2004; **56**(2): 168-173.
11. Glazen WP, Decker M, Perrota M. Survey of underlying conditions of persons hospitalized with acute respiratory disease during influenza epidemics in Houton 1978-1981. Am rev Respir; **136**; 550-555.
12. Geenberg SB, Atmar RL, Predia PA, Couch RB. Impact of respiratory Virus infection on persons with chronic underlying conditions. *JAMA;* **283**: 499 -505.
13. Grist NR, Constance A, Ross and Eleanor J. Bell. *Diagnostic Methods in Clinical Virology.* 2nd ed, , Oxford, Blackwell Scientific Pub, 1974; PP:104-107.
14. Michael Carr J, Rory Gunsen, Alasdair M, Suzie O, Margaret F, etal. Development of Real-time PCR for detection of swine –lineage Influenza A (H1N1) Virus infections. *Journal of Clinical Virology* 2009; **45**(3):196 -199.
15. Constance T, Panchuki M, Aijaz khurshid N. Utility of reverse transcriptase PCR for Rapid Diagnosis of influenza A virus isolation and detection of Amantadine – Resistant Influenza A virus Isolates. *Journal of clinical Microbiology* 2009; 2796 -2798.

16. Mokhtari-Azad T, Rezaie-khollari F, Nadji A, Salimi V, Noroozbabaie Z. Comparison of Multiplex Nested Rt – PCR with Virus Isolation for Detection of Influenza Viruses A and B. *Iranian J Publ Health* 2007; **36:** 1–7.
17. Leo LM, Chan KH, Smith GJ, Leung CS, Guan Y, Yeun KY. Molecular detection of a Human Influenza (H1N1) of pandemic potential by conventional and Real-time PCR Assays. *Clinical Chemistry* 2009; **55**: 1555 1558.
18. Liao RS, Tomalty LL, Majury A. Comparison of Viral isolation and Multiplex Real-time reverce transcription PCR for conformation of Respiratory Syncytial virus and influenza virus detection by Antigen Immunoassays. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 527-532.