تحقیقی

دارای رتبه علمی-پژوهشی
ازکمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

بهینه سازی روش تشخیصی PCR-ELISA برای شناسایی عفونت های *سایتومگالوویروس* انسانی

مجید تلخابی فرد
دانشجوی کارشناسی ارشد ویروس شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
ناعمه جاوید
کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
عبدالوهاب مرادی
استاد ویروس شناسی،گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
امیر قائمی
استادیار ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
علیجان تبرائی
استادیار ویروس شناسی،مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
نویسنده مسئول: علیجان تبرائی

پست الکترونیک: alijant@yahoo.com

تلفن : ۰۹۱۱۲۷۳۳۳۲۱

آدرس: مرکز تحقیقات بیماری های عفونی وگروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان،گرگان، ایران

دریافت: ۹۲/۲/۲۲
ویرایش پایانی: ۹۲/٤/۲۸
پذیرش: ۹۲/٤/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: *سایتومگالوویروس انسانی یک عامل شناخته شده مهم در ایجاد عفونت های مادرزادی می باشد که می تواند باعث ایجاد بیماری و عوارض جدی در نوزادان شود. بکارگیری روش های تشخیص سریع، حساس و اختصاصی این عفونت ویروسی در نمونه های بالینی نوزادان یک ضرورت می باشد. در این مطالعه روش تشخیصی بر پایه PCR و ELISA، برای شناسایی ژنوم سایتومگالوویروس انسانی در نمونه های ادرار نوزادان بهینه سازی گردید.*

روش بررسی: *برای راه اندازی سیستمPCR–ELISA، توالی آغازگرها و کاوشگر اختصاصی از ناحیه ژنی کد کننده گلیکوپروتئین B سایتومگالوویروس انسانی انتخاب شدند. ابتدا نمونه های مورد آزمایش (DNA استخراج شده از نمونه های ادرار و شاهد ها) طی مرحله تکثیر، توسط دیگوگزیژنین نشاندار شده، سپس این محصولات توسط کاوشگر بیوتینه شناسایی و ایجاد هیبرید می کنند. این مکمل توسط استرپتاویدین متصل شده به چاهک های الایزا، بی حرکت شده، در مرحله بعد توسط آنتی بادی ضد دیگوگزیژنین متصل به آنزیم پراکسیداز، ردیابی و رنگ ایجاد شده توسط سوبسترا مورد سنجش قرار گرفت.*

یافته ها: *سویه های بالینی جدا شده از نمونه های ادرار ۱۶ بیمار، توسط این روش شناسایی شدند.PCR-ELISA راه اندازی شده قادر است با حساسیت کمتر از حدود ۱۰۰ کپی از ژنوم سایتومگالوویروس، عفونت را در نمونه های بالینی تشخیص دهد. در این روش واکنش غیر اختصاصی تأثیر گذار دیده نشد.*

نتیجه گیری: *PCR-ELISA می تواند به عنوان روشی حساس، اختصاصی و قابل اعتماد برای شناسایی نیمه کمی عفونت سایتومگالوویروس در نمونه های بالینی مطرح باشد.*

واژه های کلیدی: *سایتومگالوویروس انسانی، گلیکوپروتئین B، PCR-ELISA، نیمه کمی*

آدرس مقاله
تلخابی فرد م، جاوید ن، مرادی ع، قائمی ا، تبرائی ع" بهینه سازی روش تشخیصی PCR-ELISA برای شناسایی عفونت های *سایتومگالوویروس* انسانی" مجله علوم آزمایشگاهی، دوره هشتم زمستان ۹۳ (شماره ۵):۱۴-۲۱

مقدمه

سایتومگالوویروس انسانی یک عامل بیماری زای فرصت طلب لنفوتروپیک از خانواده هرپس ویروس ها با شیوع جهانی می باشد که به سهولت از طریق مایعات و ترشحات آلوده بدن از جمله بزاق، ادرار، شیر و غیره قابل انتقال می باشد. در عدم حضور ایمنی کافی ایجاد بیماری کرده و در افراد با سیستم ایمنی سالم، معمولا ایجاد عفونت ملایم یا بدون علامت می نماید. در افراد با نارسایی سیستم ایمنی می تواند باعث درگیری اندام های مختلف بدن شده و به عنوان یک عامل بیماری زای خطرناک عمل کند. این عفونت به خصوص در دریافت کنندگان اعضاء پیوندی، بیماران دارای سندرم کمبود ایمنی اکتسابی و نیز در نوزادان که به عنوان یک عفونت مهم مادرزادی باعوارض بالینی وخیم محسوب می شود، دارای اهمیت می باشد. به همین دلیل تشخیص صحیح عفونت در نمونه های بالینی افراد در معرض خطر می تواند کمک شایانی برای درمان و تشخیص پیش آگهی بیماری نماید. اهمیت تشخیص عفونت به خصوص در نوزادان با عفونت مادرزادی *سایتومگالوویروس*، به دلیل ایجاد صدمات جبران ناپذیر، از جمله انسفالیت، کوریورتینیت، پنومونی، میکروسفالی، کاهش شنوایی، کری و عقب ماندگی ذهنی بسیار حائز اهمیت می باشد. عفونت با این ویروس در دوره نوزادی شایع بوده، به طوری که در حدود یک درصد تمام نوزادان به صورت مادرزادی و اغلب از طریق جفت، مبتلا به عفونت *سایتو مگالوویروس* می باشند که از طریق جستجوی ویروس در خون و ترشحات بدن، از جمله ادرار و بزاق قابل شناسایی خواهد بود (۱-۶). روش های تشخیصی امروزی برای شناسایی عفونت سایتومگالوویروس در افراد در معرض خطر، بیشتر بر پایه آزمایشات ملکولی مثل واکنش زنجیره ای پلیمراز به صوری کیفی و کمی، برای جستجوی توالی نوکلئوتیدی ویروس، همچنین جستجوی آنتی ژن های ویروسی مثل pp65 می باشد. PCR-ELISA[1] یک روش جستجوی توالیDNA هدف با استفاده از ترکیب دو روش PCR و ELISA می باشد که DNA محصول تکثیر یافته توسط کاوشگر نوکلئوتیدی اختصاصی خود شناسایی شده و با استفاده از فعالیت آنزیمی وتولید رنگ، توالی هدف شناسایی می شود. این روش با داشتن پتانسیل سنجش نیمه کمی، همچنین حساسیت و ویژگی مطلوب، می تواند روش ایده آلی برای شناسایی انواع مختلفی از جهش ها، عوامل بیماری زا و میکرو ارگانیسم ها به کار روند (۲،۴،۷-۱۰).

روش بررسی

ابتدا توالی های مختلف مربوط به ناحیه ژنی UL55 کد کننده گلیکوپروتئین B(gB) سایتومگالوویروس انسانی (چهار ژنوتیپ اصلی gB و واریانت های آنها)، از طریق پایگاه اینترنتی Gene bank استخراج، بررسی و با یکدیگر مقایسه شدند(Accession number:(GU365817- GU365824 (۱۱). یک جفت آغازگر که توانایی تکثیر همزمان تمام ژنوتیپ های شناخته شده گلیکوپروتئین B را در این ناحیه داشت، از نواحی مشترک توالی مورد نظر به کمک برنامه Gene Runer انتخاب گردید(۱۲). سپس ویژگی توالی های آغازگری به صورت آنلاین توسط برنامه(BLAST (Basic Local Alignment Search Tool برای ژن مورد نظر تأیید گردید.(آغازگر مستقیم 5-GAAAARTAYGGWAACGTGTC-3،آغازگر معکوس 5-CRTAGGTGAACTGCAGCTG-3). همچنین یک کاوشگر الیگونوکلئوتیدی به صورت مکمل با یک ناحیه مشترک از قطعه تکثیری، جهت شناسایی اختصاصی توالی تکثیر یافته، طبق مشخصات پیشنهاد شده شرکت سازنده کیت، انتخاب شد و توسط شرکت سازنده توالی، بصورت بیوتینه تهیه گردید-5) Biotin TGGCAAGGYATCAAGCAAA-3') (۴۳). جهت اطمینان از عدم تشکیل ساختارهای ثانویه کاوشگر انتخابی در دمای آزمایش، از نرم افزار Gene Runer استفاده گردید (۸،۱۳،۱۴).

جهت راه اندازی و بهینه سازیPCR-ELISA، توالی هر چهار ژنوتیپ اصلی گلیکوپروتئین B در ناحیه مورد تکثیر، به عنوان نمونه شاهد مثبت، به واسطه شرکت سازنده به صورت سنتز ژنی در داخل وکتور(پلاسمید) تکثیر یافته و به شکل لیوفیلیزه دریافت گردید. غلظت های مورد نیاز از پلاسمیدهای شاهد مثبت، با توجه به مشخصات آنها، باکمک

1- (Polymerase Chain Reaction-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

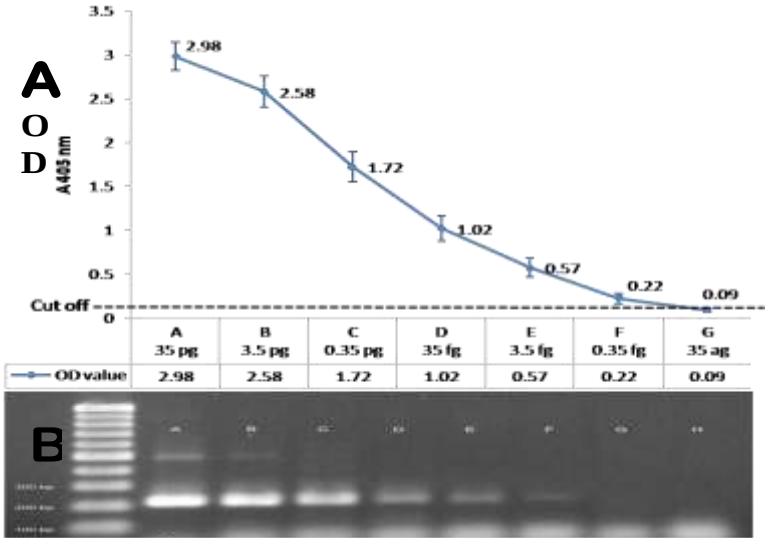
اسپکتروفتومتر(Biophotometr,ependoorf) تهیه گردید(۱۵). همچنین از نمونه های ادرار نوزادان مبتلا به عفونت مادرزادی سایتومگالوویروس به عنوان نمونه شاهد بالینی برای روش PCR-ELISA استفاده گردید. از نمونه های ادرار و پلاسمای انسانی HCMV منفی نیز به عنوان دیگر شاهد ها، برای بهینه سازی روش استفاده شد.

در آزمایش PCR ELISA(Roche, Germany)، در مرحله اول نمونه های استخراج شده DNAدر طی تکثیر، توسط دیگوگزیژنین نشاندار شدند. عمل نشاندار شدن محصولات تکثیر یافته،توسطdNTP mix حاوی digoxigenin-11-dUTP انجام شده و به جای dTTP در رشته در حال تکثیر قرار گرفت. مواد و غلظت به کار رفته در این نوع PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیترشامل؛ 1X PCR بافر، ۰/۲ میلی مولار dATP, dCTP, dGTP ، ۰/۱۹ میلی مولارmMdTTP ، ۰/۰۱ میلی مولار digoxigenin -11-dUTP،۳ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۴ میکرو مولار آغازگر مستقیم،۰/۴ میکرو مولار آغازگر معکوس، ۱/۲۵ واحد DNA پلیمراز Taq و ۵ میکرولیتر نمونه مورد آزمایش (توالی شاهد مثبت، شاهد منفی و نمونه های بالینی)به عنوان الگو، به محلول های ترکیب شده PCR اضافه گردید(۷،۱۶). برنامه زمانی و دمایی دستگاه ترموسایکلر(Peqlab) جهت انجام PCR، شامل؛ دمای ۹۴C° به مدت ۴ دقیقه برای مرحله اولیه واسرشت شدن رشته DNA، و در ادامه دمای $94^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه جهت واسرشت شدن رشته DNA، دمای $61^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه جهت اتصال آغازگرها به توالی مورد نظرو دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه جهت همانند سازی رشته هدف به تعداد ۳۵ سیکل، و در نهایت ۵ دقیقه دمای $72^{\circ}C$ برای تکثیر کامل رشته هدف انجام گرفت. همچنین دمای $4^{\circ}C$ جهت انکوباسیون در نظر گرفته شد. در آزمایش PCR ELISA بعد از انجامPCR، سپس محصول تکثیر یافته DNA نشاندار بصورت تک رشته ای با پروب بیوتینه اختصاصی خود ایجاد هیبرید می کند، این مکمل توسط استرپتاویدین تثبیت شده در درون چاهک بی حرکت می شود، سپس آنتی دیگوگزیژنین آنتی بادی متصل بـه آنزیم، به محـصول هیبـریدی اسیـد نوکلئیک متصل ودر حضور سوبسترا تولید رنگ می نماید که می تواند توسط اسپکتروفتومتر سنجش شود. لازم به ذکر است که آزمون ها در این مرحله به صورت سه تایی انجام گرفتند و میانگین سه عدد بدست آمده به عنوان نتیجه ثبت گردید. ابتدا ۲/۵ میکرولیتر از محصول نشاندار شدهPCR را در یک میکروتیوب ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر از محلول دناتوره کننده به هر تیوب اضافه شد، سپس آن رامخلوط کرده و به طور مختصر سانتریفیوژ نموده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس حجم ۱۱۲/۵ میکرولیتر از محلول کار هیبریداسیون حاوی غلظت ۲۰ پیکومول در هر میلی لیتر از پروب مورد نظر را به تیوب اضافه نموده تا حجم نهایی به ۱۲۵ میکرولیتر برسد، آن را با شیکر مخلوط کرده وسریعاً ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول ساخته شده را به میکروپلیت های حاوی استرپتاویدین کوت شده منتقل شد. سپس روی آن را پوشانده به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، روی شیکر با دور ۱۲۰ بار در دقیقه، انکوبه گردید. سپس محلول را از داخل چاهک ها خارج نموده و ۳ تا ۵ بار میکروپلیت ها با بافر شست شو شسته شد. در نهایت آخرین قطرات باقی مانده را با ضربه میکروپلیت بر روی یک سطح جاذب خارج گردید. حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی دیگوگزیژنین آنتی بادی متصل به آنزیم پراکسیداز(۱ میلی واحد) به چاهک ها اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه بر روی شیکر انکوبه شد. محلول میکروپلیت ها را خارج نموده و طبق مرحله قبل شستشو گردید. در مرحله آخرمیزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا(ABTS)، به چاهک ها اضافه کرده، در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. میزان جذب نوری بر اساس رنگ سبز ایجاد شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر خوانش گردید(۸،۱۶). ۰/۵ نانو گرم غلظت اولیه از توالی شاهد مثبت (پلاسمیدهای حاوی توالی مورد نظر)، برای بهینه سازی PCR-ELISA مورد استفاده قرار گرفت. همچنین برای شاهد منفی از آب مقطر استریل به جای الگو در آزمایش PCR استفاده شد، و محصول نشاندار شده آن، در سیستم الایزا به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. یک حد cutoff برای

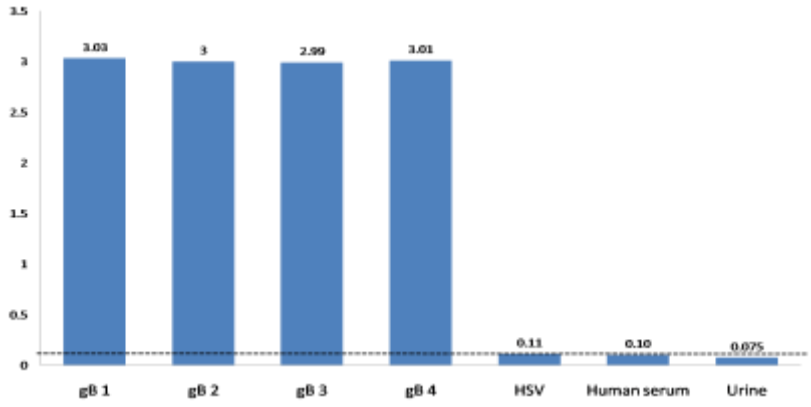
غربالگری صحیح عفونت در نمونه های بالینی ادرار تعیین گردید. بدین منظور ۲۰ نمونه ادرار منفی از نظر عفونت CMV بعد از استخراج DNA توسط روش جوشاندن (۱۷) به عنوان الگو توسط سیستم PCR ELISA مورد آزمایش قرار گرفت. سپس میانگین جذب های نوری بـدست آمـده با سه برابر انحراف معیار محاسبه شده، جمع گردید و عدد cut off تعیین شـد. طبق ایـن فرمول ۰/۱۱۲= (۰/۰۱۵× ۳)+ ۰/۰۶۷، که بر این اساس نمونه های مورد آزمایش با جذب های نوری پایینتر از ۰/۱۱۲، منفی و بالاتر از این حد، مثبت در نظر گرفته شدند (۱۸،۱۹). جهت سنجش میزان حساسیت روشPCR-ELISA، برای تشخیص ژنوم ویروس، یک رقت سریالی با $\log_{10}$ از شاهد مثبت gB2 (پلاسمید حاوی توالی مورد نظر)، با مقدار اولیه ۳۵ پیکوگرم تهیه و در سیستم PCR-ELISA مورد آزمایش قرار گرفت. همچنین ۷ میکرولیتر از محصولات PCR مذکور، توسط ژل آگارز ۲ درصد(Fermentase)، الکتروفورز شده و با اتدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید و نتایج به دست آمده بوسیله دستگاه ترانس لومیناتور، با نتایج حاصل ازPCR-ELISA، در رقت های مختلف شاهد مثبت با یکدیگر مقایسه شدند (۱۰،۲۰). برای بررسی ویژگی این روش، برای جستجوی ژنوم این ویروس، DNA استخراج شده از نمونه های سرم انسانی و ادرار منفی از نظر ویروس HCMV و یک نمونه بالینی HSV1 مثبت-HCMV منفی، در سیستم PCR-ELISA مـورد آزمایـش قرار گرفته میزان جذب های نوری به دست آمده با یکدیگر مقایسه شدند (۱۹-۲۰). پس از جمع آوری اطلاعات، رسم نمودارها و آنالیزهای مربوطه توسط برنامه Excel (Microsoft office 2007) انجام گرفت.

یافته ها

بعد از بهینه سازی PCR-ELISA، حساسیت این روش با انجام آزمایش بر روی رقت سریالی ساخته شده از پلاسمیدهای حاوی ژن gB2، با غلظت اولیه ۳۵ پیکوگرم (حدود 10^7 میلیون کپی پلاسمید)، بررسی گردید. حساسیت کمتر از ۰/۳۵ فمتوگرم (حدود کمتر از ۱۰۰ کپی) از پلاسمید مذکور برای تشخیص ژنوم ویروس توسط این روش تعیین گردید. همچنین نتایج بدست آمده، با نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR مقایسه شدند (نمودار ۱). برای بررسی ویژگی، جذب های نوری بدست آمده از انجام آزمایش بر روی نمونه های سرم انسانی وادرار منفی از نظر ویروس HCMV و یک نمونه بالینی HSV1 مثبت-HCMV منفی، در یک نمودار با توجه به حد Cutoff ، بررسی و با یکـدیگر مـقایسه شدند. نتایج نشان دهنده ناچیز بودن واکنش های غیر اختصاصی (جذب های نوری پایینتر از حدcut off)نمونه های ذکر شده می باشد (نمودار۲). همچنین از ۱۶ نمونه ادرار نوزاد دارای عفونت سایتومگالوویروس که بـا روش جـوشاندن اسـید نوکلئیک آنها استـخراج و توسـط روش ملکولی جداسازی شده بودند، تماماً توسط روش PCR-ELISA نیز مثبت تشخیص داده شدند .



نمودار ۱- مقایسه نتایج بدست آمده از انجام PCR-ELISA بر روی ۷ رقت ده برابری از پلاسمید شاهد حاوی توالی gB2، جهت تعیین حساسیت این روش (A)، و مقایسه آن با نتایج بدست آمده از الکتروفورز این محصولات بر روی ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی با اتدیوم بروماید(226 bp) (شکل B). نقطه چین رسم شده نشانگر حد Cutoff محاسبه شده می باشد، (H:Neg).



نمودار۲- بررسی ویژگی روش PCR-ELISA ، با مقایسه نتایج بدست آمده (جذب نوری) ازPCR-ELISA انجام شده بر روی ۰/۵ نانوگرم از پلاسمیدهای حاوی توالی gB ویروس HCMV و DNA نمونه های استخراج شده سرم انسانی، ادرار و نمونهHSV1 مثبت، که از نظر HCMV منفی می باشند. نقطه چین رسم شده نشانگر حد Cutoff محاسبه شده می باشد.

بحث

این روش تشخیصی قادر است بوسیله آغازگرها و پروب اختصاصی طراحی شده، حدود کمتر از ۱۰۰ کپی از ژنوم مورد نظر را در هر واکنش PCR-ELISA، برای شناسایی عفونت سایتومگالوویروس در نمونه های بالینی تشخیص دهد، که این میزان حساسیت تشخیصی، قابل مقایسه با نتایج مطالعات مشابه قبلی (بین ۱۰ تا ۲۰۰ کپی از ژن مورد نظر) انجام شده برای تشخیص عفونت سایتومگالوویروس می باشد(۲۰-۲۲). همچنین بررسی حساسیت این روش در مقایسه با نتایج به دست آمده از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتدیوم بروماید، نشانگر تقریباً یکسان بودن حساسیت این دو روش می باشد. نتایج نشانگر مطلوب بودن سیستمPCR-ELISA برای تشخیص 10^{2}-10^{7} کپی از ژنوم ویروسی می باشد. همچنین با توجه به نحوه تشخیصی این روش (الایزا) و با توجه به نتایج به دست آمده، این روش قابلیت بهینه سازی برای کمی نمودن نتایج را برای تشخیص عفونت دارا می باشد. با توجه به مطالعات انجام شده کمیت عفونت می تواند در پیش آگهی بیماری و وخامت آن نقش داشته باشد. همچنین سنجش کمی عفونت می تواند در جهت شاهد سیر عفونت و تأثیر درمان مورد استفاده قرار گیرد(۲۳). نتایج نشانگر عملکرد اختصاصی این روش و عدم وجود واکنش های غیر اختصاصی (عدم موارد مثبت کاذب)، بـا اسـتفاده از آغازگـرها و پروب طراحی شده بر روی نمونه های انجام شده می باشد (نمودار ۲). از دیگر روش های متداول برای تشخیص عفونت سایتومگالوویروس در نمونه های بالینی افراد در معرض خطر، روش آنتی ژنمی(pp65 Antigenemia Assays)PP65، PCR کیفی و Real-time PCR می باشد. با توجه به مطالعات قبلی انجام شده، حساسیت تشخیصی PCR کیفی به مراتب از روش آنتی ژنمی PP65 بیشتر می باشد. در حالی که این دو روش از نظر ویژگی در وضعیت تقریباً برابری قرار می گیرند(۲۴،۲۵). همچنین مطالعات نشان می دهند که روش PCR قادر است عفونت فعال سایتومگالوویروس را تا یک هفته زودتر از روش آنتی ژنمی PP65 در نمونه های خون افراد در معرض خطر شناسایی نماید(۲۴). به طوری که تشخیص سریع شروع عفونت فعال می تواند کمک شایانی در شروع به موقع درمان و مصرف داروهای ضد ویروسی پیشگیری کننده در افراد در معرض خطر نماید. از طرفی روش آنتی ژنمی PP65 به دلیل توانایی در شمارش و تخمین تعداد سلول های آلوده با سایتومگالوویروس، قابلیت سنجش کمی عفونت را دارا می باشد، که اهمیت فراوانی در پیش آگهی بیماری می تواند داشته باشد. این در حالی است که روش آنتی ژنمی PP65 تنها می تواند عفونت سایتومگالوویروس را به صورت مستقیم از طریق شناسایی سلول های سفید خون آلوده به ویروس تشخیص دهد و برای شناسایی ویروس در نمونه های ادرار، بزاق و دیگر ترشحات، که پارتیکل ویروسی، بیشتر به صورت خارج سلولی می باشد، به صورت مستقیم نمی توان از این

روش استفاده نمود. حتی انجام این روش بر روی نمونه های خون بیماران دچار لکوپنی کارایی کافی را نداشته و ممکن است منجر به کسب نتایج منفی کاذب گردد(۲۵،۲۴،۲۳). روش PCR-ELISA راه اندازی شده در این مطالعه، با حساسیتی مطلوب در مقایسه با PCR ژل الکتروفورز، توانایی در کمی سازی نتایج و نیز ویژگی بالایی که توسط آغازگر ها و پروب اختصاصی ایجاد می کند، با جبران و رفع نقایص دو روش ذکر شده (آنتی ژنمی PP65 و PCRکیفی) می تواند روش مناسبی برای شناسایی عفونت در نمونه های مختلف بالینی باشد.

نتیجه گیری

این روش با توجه به انجام ساده و سریع آزمایش(کمتر از ۸ ساعت)، و عدم نیاز به تجهیزات پیچیده و گران قیمت، و بدون استفاده از مواد خطرناک (مواد رادیو اکتیو، اتدیوم بروماید) می تواند به عنوان روشی با حساسیت و ویژگی مطلوب برای تشخیص نیمه کمی عفونت در نمونه های بالینی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

ایــن مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد ویروس شناسی پزشکی بوده که به صورت طرح تحقیقاتی در مــرکز تحقیقات بیماری های عفونی دانشگاه علوم پــزشکی گلستان به ثبت رسیده و پس از تصویب نهایی در معاونت تحقیقات و فناوری دانــشگاه علوم پزشکی گلستان، اجرا گردید.

References

1. Dolan A, Cunningham C, Hector RD. *Genetic content of wild-type human cytomegalovirus*. J Gen Virol. 2004; 85(5): 1301–1312.

2. Knipe D, Howley P. *Fields Virology*. 5th Ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins. Cytomegaloviruses. 2007; 2703-2756.

3.Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 5th ed. Philadelphia: Elesvier Mosby. 2005.

4. Puchhammer E, Görzer I. *Human Cytomegalovirus*. Future Virology. 2011; 6(2): 259-271.

5. Kotton C, Fishman J. *Viral Infection in the Renal Transplant Recipient.* J Am SocNephrol. 2005; 16(6): 1758-74.

6. Varga M. *Cytomegalovirus infection after kidney transplantation, susceptibility to CMV-infection in association with HLA-genotype – Doctoral dissertation summary*. Interventional Medicine & Applied Science. 2010; 2(3): 139-146.

7. Roche Applied Science. *PCR ELISA(DIG-Labeling)*. Germany: Roche Applied Science; 2008.

8. Roche Aoolied Science. PCR ELISA (DIG Detection). Germany: Roche Applied Science; 2005.

9. Hong K, Najjar H, Hawley M, Press R. *Quantitative Real-Time PCR with Automated Sample Preparation for Diagnosis and Monitoring of Cytomegalovirus Infection in Bone Marrow Transplant Patients*. Clinical Chemistry. 2004; 50(5): 846–856.

10. Hye K, Cho J. *Rapid and Sensitive Detection of Listeria monocytogenes Using a PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. J. Microbiol. Biotechnol 2008; 18(11):1858–1861.

11. Murthy S, Hayward GS, Wheelan S, Forman MS, Ahn JH, Pass RF, et al. *Detection of a Single Identical Cytomegalovirus (CMV) Strain in Recently Seroconverted Young Women*. PLoS ONE. 2011; 6(1): 949-956.

12. Chantaraarphonkun S, Bhattarakosol P. *Intra- and Intergenotypic Variations among Human Cytomegalovirus gB Genotypes*. Intervirology 2007; 50(2): 78–84.

13. Eckert K, Kunkel TA. *DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction.* Genome Res. 1991; 1: 17–24.

14. Williams J. *Optimization strategies for the polymerase chain reaction*. Biotechniques 1989; 7(7): 762–9.

15. Pang X, Humar A, Preiksaitis J. *Concurrent Genotyping and Quantitation of Cytomegalovirus gB Genotypes in Solid-Organ-Transplant Recipients by Use of a Real-Time PCR Assay*. Journal of Clinical Microbiology. 2008; 46(12): 4004–4010.

16. Gill P, Forouzandeh M, Eshraghi N, Ghalami M, Safa M, Noori-Daloii M. *Detection of four b-thalassemia point mutations in Iranians using a PCR-ELISA genotyping system*. Molecular and Cellular Probes. 2008; 22(2):103–109.

17. Bergallo M1, Costa C, Gribaudo G, Tarallo S, Baro S, Negro Ponzi A, et al. *Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples*. New Microbiologica. 2006; 29(2): 111-119.

18. Musiani M, Venturoli S, Gallinella G, Zerbini M. *Qualitative PCR–ELISA protocol for the detection and typing of viral genomes*. Nature Protocols. 2007; 2(10): 2502-2510.

19. Gomes L, Marques L, Enk M, Oliveira M, Coelho P, Rabello A. *Development and Evaluation of a Sensitive PCR-ELISA System for Detection of Schistosoma Infection in Feces*. PLoSNegl Trop Dis. 2010; 4(4): 664-671.

20. Smrz D, Draber P. *One-tube semi-nested PCR-ELISA for the detection of human cytomegalovirus DNA sequences; comparison with hybridization-based and semi-nested-based PCR-ELISA procedures.* Journal of Immunological Methods. 2003; 283(6): 163– 172.

21. Allen R, Pellett P, Stewart J, Koopmans M. *Nonradioactive Pcr–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method For Detection Of Human Cytomegalovirus Dna*. Journal of Clinical Microbiology. 1995; 33(3): 725-728.

22. BarberL, Egan J, Lomax J. *A Prospective Study of a Quantitative PCR ELISA Assay for the Diagnosis of CMV Pneumonia in Lung and Heart-Transplant Recipients.* J Heart Lung Transplant. 2000; 19(8): 771-780.

23. Pang X, Chui L, Fenton J, LeBlanc B, Preiksaitis J. *Comparison of LightCycler-Based PCR, COBAS Amplicor CMVMonitor, and pp65 Antigenemia Assays for Quantitative Measurementof Cytomegalovirus Viral Load in Peripheral Blood Specimens fromPatients after Solid Organ Transplantation.* Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41(7): 3167-3174.

24. Storch GA, Buller RS, Bailey TC, Ettinger NA, Langlois T, Gaudreault-Keener M, et al. *Comparison of PCR and pp65 Antigenemia Assay with Quantitative Shell Vial Culture for Detection of Cytomegalovirus in Blood Leukocytes from Solid-OrganTransplant Recipients*. J Clin Microbiol. 1994; 32(4): 997-1003.

25. Khansarinejad B, Soleimanjahi H, Hamidieh A, MirabSamiee S, Paryan M, Sanahmadi Y, et al. *Comparison of Qualitative PCR and pp65 Antigenemia for the Diagnosis of CMV Infection in Hematopoietic Stem Cell Transplanted Patients.* Modares Journal of Medical Sciences 2012; 15(1): 13-22.

Optimization of PCR-ELISA in Detection of Human *Cytomegalovirus* Infection

Talkhabifard, M. (BSc)
MSc Student of Virology, Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Javid, N. (MSc)
MSc of Microbiology, Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Moradi, A. (PhD)
Professor of Virology, Department of Microbiology, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran

Ghaemi, A. (PhD)
Assistant Professor of Virology, Infectious Diseases Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Tabarraei, A. (PhD)
Associate Professor of Virology, Infectious Diseases Research Center, Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Corresponding Author: Tabarraei, A.

Email: alijant@yahoo.com

Received: 12 May 2013
Revised: 19 July 2013
Accepted: 20 Jul 2013

Abstract

Background and Objective: Human *Cytomegalovirus* (CMV) is an important cause of congenital viral infection that can lead to serious diseases and complications in infants. Application of rapid, sensitive, and specific HCMV detection methods is necessary for congenital infection detection. We aimed to optimize the use of PCR and ELISA for detection of HCMV in infants.

Material and Methods: PCR–ELISA was performed by using specific primers and probe for detection of the HCMV glycoprotein B gene. First, the extracted DNA from urine samples and controls were labeled by digoxigenin during DIG-labeling PCR. After that, Biotin-labeled probe captured the DIG-labeled PCR products. The probe-PCR product hybrid is immobilized on a streptavidin-coated Microtiter plate, and detection was confirmed by proxidase-conjugated anti-digoxigenin antibody, and calorimetric substrate.

Results: The clinical Human CMV strains isolated from16 patients were detected by this method. The optimized PCR-ELISA method was able to detect less than100 copies of HCMV genome. There was no non-specific reaction.

Conclusion: PCR-ELISA can be applied as a sensitive, specific and reliable method for Semi-quantitative CMV detection in clinical samples.

Keywords: *Cytomegalovirus*, Glycoprotein B, PCR-ELISA, Semi-Quantitative

This paper should be cited as: Talkhabifard M, Javid N, Moradi A, Ghaemi A, Tabarraei A. [Optimization of PCR-ELISA in Detection of Human *Cytomegalovirus* Infection]. mljgoums. 2015; 8(5):14-21 [Article in Persian]