مقاله پژوهشی

بررسی عفونت ویروس هپاتیت C در نوزادان مشکوک نگهداری شده در شیرخوارگاه به وسیله آزمایش کمی Real-Time PCR و تست HCV-Core Ag-Elisa

مرضیه جمالی دوست [۲،۱]، ماندانا نماینده[۱]، مریم زارع[۱]، مازیار ضیائیان[*۱]

۱- مرکز تحقیقات میکروب شناسی استاد البرزی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۲- گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۸/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۴/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: هرچند که میزان انتقال عفونت ویروسی هپاتیت C (HCV) از مادر به جنین به ندرت روی می‌دهد، ولی این راه مهمترین دلیل عفونت در دوران نوزادی و کودکی می‌باشد. احتمال انتقال عفونت HCV از مادر به جنین در مادران HIV مثبت نسبت به مادران HIV منفی بیشتر می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی کمی ژنوم ویروس هپاتیت C در نوزادانی که از نظر وجود HCV-Ab مثبت بوده‌اند و نیز روش الیزا برای پرو تئین هسته‌ای (Core-Ag) ویروس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: برای ۲۹ نوزاد که مشکوک به عفونت HCV بودند و در شیرخوارگاه نگهداری می‌شوند (سن ۷-۲ماه)، تست‌های تشخیصی شامل: تشخیص آنتی بادی‌های ضد HCV، آنتی بادی‌های ضد HCV- RNA-HIV در پلاسما و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی توسط تست کمی Real-Time PCR و در نهایت تشخیص آنتی ژن‌های هسته‌ای HCV یا (HCV-Core Ag) به کار برده شد.

نتایج : آنتی بادی‌های ضد HCV در تمام نوزادان تشخیص داده شد اما HCV-RNA در پلاسما و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی غیر قابل تشخیص بود. همچنین آنتی بادی‌های ضد ۲ و ۱ HIV در خون نوزادان وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: تعداد مطالعات کمی در زمینه انتقال عفونت HCV از مادر به نوزادان بی سرپرست انجام شده است. با توجه به مطالعه حاضر، استفاده از تست آنتی ژن هسته‌ای همراه با ارزیابی کمی ژنوم HCV در خون می‌تواند در پیش بینی و در نهایت ممانعت از انتقال این ویروس از مادر به جنین کمک کننده باشد.

کلمات کلیدی: **عفونت هپاتیت سی، Real-Time PCR، HCV Core-Ag Elisa، کودکان بی سرپرست**

مقدمه

عفونت با ویروس هپاتیت C (HCV) مهمترین علت ایجاد هپاتیت مزمن، سیروز کبدی و نیز سرطان کبد است. حدود ۱۷۰ میلیون نفر در سراسر دنیا به این ویروس آلوده می‌باشند. شیوع این ویروس برخلاف بسیاری از کشورهای منطقه در ایران حدود 0.5% گزارش شده است (۱)، این درحالی است که میزان ابتلا به این ویروس در قشر پر خطر مانند معتادان تزریقی و بیماران دیالیز و هموفیلی به طور مشخصی بالاتر گزارش شده است (۴-۲).

انتقال این ویروس از طریق جنسی و نیز از طریق شغلی پایین است و میزان انتقال از مادر به نوزاد نیز بسیار متغیر است (۹-۵). مادران مبتلا به عفونت هپاتیت C که از نظر وجود ژنوم ویروس منفی باشند به ندرت ویروس را به جنین خود منتقل می‌کنند (۱۰). مطالعات متفاوت نشان داده‌اند که هر چه میزان بار ویروس در مادر بیشتر باشد احتمال عفونت جنین با این ویروس افزایش می‌یابد (۱۱، ۱۲).

عفونت هم زمان HIV و HCV در مادران نیز می‌تواند خطر انتقال به جنین را افزایش دهد (۱۳). از طرفی نقش چندین ژن که در پاسخ ایمنی میزبان شرکت دارند و نیز پیشینه ژنتیکی فرد

*نویسنده مسئول: **مازیار ضیائیان**، مرکز تحقیقات میکروب شناسی استاد البرزی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. تلفن: ۰۷۱۳۶۴۷۴۳۰۴
Email: ziyaeyanm@sums.ac.ir

در انتقال افقی عفونت HCV حائز اهمیت است (۱۴). هیچ نشان‌های مبنی بر این که سزارین در مقایسه با زایمان طبیعی خطر انتقال افقی را کاهش دهد وجود ندارد به علاوه با توجه به سایر مطالعات تغذیه با شیرمادر باعث انتقال عفونت از مادر به نوزاد می‌شود (۱۵، ۱۶).

هدف از این مطالعه تعیین حضور عفونت HCV در نوزادان بی سرپرست واجد آنتی بادی ضد ویروس بود. برای پی بردن به وجود یا عدم وجود ژنوم ویروس در پلاسما و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) از تست کمی Real-Time PCR استفاده شد به علاوه حضور آنتی بادی‌های ضد HCV، ضد HIV و آنتی ژن‌های هسته‌ای HCV یا HCV-Core Ag نیز به روش الیزا مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های بیمار:

۲۹ نوزاد بی سرپرست (۶ دختر و ۱۳ پسر) که مادران آن‌ها آنتی بادی‌های ضد HCV داشتند از تاریخ دی ۱۳۸۸ تا آذرماه ۱۳۹۰ به مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز ارجاع داده شدند. این نوزادان در مرکز نگهداری کودکان بی سرپرست در شیراز که توسط وزارت بهداشت دولت جمهوری اسلامی ایران راه اندازی شده است، نگهداری می‌شدند سن این نوزادان در زمان نمونه گیری ۲ الی ۷ ماه بود و در زمینه جزئیات تولد آن‌ها اطلاعاتی در دسترس نبود. مطالعات مقدماتی، وجود آنتی بادی‌های ضد HCV در این نوزادان را تایید کرده بود.

از این بیماران ۵ میلی لیتر خون در ظرف‌های حاوی EDTA گرفته شد. اطلاعات به دست آمده از این مطالعه برای رد یا تائید حضور عفونت HCV در این نوزادان مورد استفاده قرار گرفت.

روسای این مرکز نگهداری نوزادان بی سرپرست تنها در صورت فاش نشدن هویت شرکت کننده‌ها در مطالعه اجازه چاپ اطلاعات حاصل از این مطالعه را دادند.

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و پلاسما:

۵ میلی لیتر از نمونه‌های خون محیطی که توسط EDTA تیمار شده بودند به ۵ میلی لیتر ficoll hypaque (Axis-sheild pox As,osli lymphoprep Norway) سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده از سانتریفیوژ (دور ۸۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه) جدا شدند سپس آنتی بادی‌های ضد HCV و آنتی بادی‌های ضد HIV 1,2 با استفاده از نسل سوم الیزا مورد ارزیابی قرار گرفتند سپس اطلاعات پردازش و تعیین Cut-off مطابق دستور العمل انجام شد. تست HCV-Core Ag نیز با استفاده از کیت‌های تجاری موجود و مطابق دستور العمل شرکت سازنده انجام شد.

استخراج و تلخیص RNA نمونه‌ها:

ژنوم RNAی ویروسی از نمونه‌های پلاسما و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده از فرم تغییر داده شده <<روش اسید گوانیدیوم تیوسیانات فنل کلروفرم>> استخراج شد (۱۷). به اختصار ۲۰۰ میکرولیتر سرم یا ۱×۱۰^{۶} سلول تک هسته‌ای خون محیطی (۴۰۰ میکرولیتر) با ۶۰۰ میکرولیتر از محلول RNX Solution مخلوط گردید سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه شد و مخلوط RNAی کل از فاز آبی با استفاده از ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول رسوب داده شد. در نهایت به دنبال سانتریفیوژ کردن نمونه در دور بالا رسوب به دست آمده در مجاورت هوا قرار گرفته و پس از خشک شدن در آب مقطر تیمار شده با diethyl pyrocarbonate حل گردید برای اطمینان از کارایی روند استخراج ژنوم عدم وجود ممانعت کننده‌های PCR و نیز پروسه روند سنتز cDNA، ۶ میکرولیتر از RNA کنترل موجود در کیت به هر نمونه اضافه شد.

Real –Time PCR

برای اندازه گیری بار ژنوم ویروس HCV از کیت تجاری Real-Time PCR استفاده شد و دستور العمل به کار رفته مطابق با کیت بوده است. در این روش منطقه بسیار حفاظت شده‌ایی در ناحیه غیر کد شونده انتهای ’۵ ژنوم هدف قرار گرفته و شناسایی می‌شود. فرایند تکثیر با استفاده از Master Mix تست Taq-man Real –Time PCR و به صورت تک مرحله‌ای انجام گردید. دستگاه Real-Time PCR مورد استفاده در این تحقیق 7500 Applied Biosystem و برنامه PCR به شرح زیر بوده است:

^{oC} ۴۸ برای ۳۰ دقیقه (نسخه برای معکوس)، ۹۵°c برای مدت ۱۰ دقیقه (فعالیت DNA پلیمراز)، ۴۵ دور ۹۵°c برای ۱۰ ثانیه (واسرشت DNA الگو) و ۶۰ °c برای مدت ۶۰ ثانیه (اتصال پرایمر و طویل شدن آن).

نتایج

آنتی بادی‌های ضد HCV در پلاسمای کل ۲۹ نوزاد مشاهده شد اما آنتی بادی‌های ضد HIV 1,2 در هیچکدام از نوزادان مشاهده نگردید. تمام نمونه‌های پلاسمای ذکر شده از نظر آنتی ژن هسته‌ای HCV منفی بودند. این نکته قابل ذکر است که تست‌های سرولوژی دو مرتبه در زمان‌های متفاوت انجام و نتایج در هر دو زمان کاملاً یکسان بود. ژنوم HCV در پلاسمای هیچ یک از نوزادان تشخیص داده نشد و نتایج HCV RNA Real-Time PCR در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی نیز منفی بود.

بحث و نتیجه‌گیری

در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که HCV می‌تواند لمفوسیت‌ها و سلول‌های مغز استخوان را آلوده کند. وجود ژنوم با حس مثبت ویروس در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی مادری به میزان بالایی با انتقال HCV به نوزاد همراه است (۱۸، ۱۹). به دلیل غیر قابل تشخیص بودن ژنوم ویروس در پلاسمای نوزادان از یک طرف و نیز نقش سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در عفونت HCV از طرف دیگر (۲۰، ۲۱) برای تشخیص ژنوم ویروس در این سلول‌ها و پی بردن به نقش آن‌ها در عفونت نوزادان تست Real- Time PCR برای سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی نوزادان انجام شد. همان طور که نتایج نشان داد ژنوم ویروس نه در پلاسما و نه در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی مشاهده نشد.

مرکز نگهداری از کودکان بی سرپرست یاد شده در شیراز به عنوان مهمترین مرکز نگهداری از نوزادان بی سرپرست در ایران می‌باشد. طبق اطلاعات این مرکز هیچ یک از نوزادان مشکلی در زمینه بدشکلی و یا نابالغی نداشته و وزن آن‌ها پس از تولد در محدوده نرمال بوده است با این حال هیچ اطلاعاتی در زمینه سن مادران وجود نداشت اما این موضوع که این مادران در بین قشر پر خطر باشند به نظر منطقی می‌آید. احتمال انتقال HCV در دوران شیردهی نیز وجود دارد که نوزادان شرکت کننده در این مطالعه از این دوران بی بهره بوده‌اند.

قابل ذکر است با توجه به پیشنهادات سایر مطالعات برای اطمینان از عدم ابتلا به عفونت پرستاران این کودکان با این ویروس، انجام تست آنتی بادی ضد HCV و PCR ضروری به نظر می‌رسد (۲۱، ۲۲).

با توجه به این موضوع که تمام نوزادان از نظر آنتی بادی ضد HCV مثبت بودند می‌توان نتیجه گرفت که مادران آن‌ها نیز از نظر آنتی بادی ضد HCV مثبت بودند اما به دلیل در دسترس نبودن این مادران هیچ تخمینی در مورد میزان بار ویروسی HCV در آن‌ها نمی‌توان زد.

از آنجایی که این نوزادان از نظر وجود ژنوم ویروس منفی بودند توسط خانواده‌هایی با شرایط زندگی مناسب به فرزندی پذیرفته شدند. بنابراین پیگیری‌های تخصصی این نوزادان پس از به فرزندی گرفته شدن به دلیل زندگی کردن دور از شیراز و یا ترجیح خانواده‌ها به پیگیری توسط خودشان امکان نداشت. همچنین امکان انجام تست‌های مجدد به منظور پیگیری حذف آنتی بادی‌های مادری از این نوزادان نیز وجود نداشت.

اهمیت آنتی ژن‌های هسته‌ای HCV در تشخیص‌های اولیه عفونت در بسیاری از مطالعات مشخص گردیده است. همچنین ردیابی این آنتی ژن در طول دوره درمان می‌تواند در پیش بینی پاسخ به درمان ضد ویروسی کمک کننده باشد (۲۵-۲۳). در مطالعه حاضر تست آنتی ژن هسته‌ای HCV برای تشخیص احتمالی عفونت در این نوزادان استفاده شد. بررسی این آنتی ژن می‌تواند به طور غیر مستقیم نشان دهنده رونوسی ویروس باشد (۲۶، ۲۷).

انجام تست RNA Real- Time PCR ویروسی همراه با تست تشخیص آنتی ژن هسته‌ای HCV می‌تواند نشانه قوی برای پیش بینی وجود یا عدم وجود عفونت HCV باشد. به علاوه با توجه به برخی مطالعات، آنتی ژن هسته‌ای HCV زودتر از آنتی بادی‌های ضد ویروس می‌تواند تشخیص داده شود (۲۸).

در نتیجه این مطالعه که از معدود مطالعات انجام شده در زمینه انتقال عفونت HCV از مادر به جنین در نوزادان بی سرپرست می‌باشد، استفاده از روش تشخیص آنتی ژن هسته‌ای HCV و ارزیابی ژنوم HCV در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی همراه با تست کمی تشخیص ژنوم ویروس در پلاسما به

عنوان روش نسبتاً قطعی در تشخیص عفونت HCV انتقال یافته از مادر به کودک قابل توجه است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Merat S, Rezvan H, Nouraie M, Jafari E, Abolghasemi H, Radmard AR, et al. Seroprevalence of hepatitis C virus: the first population-based study from Iran. Int J Infect Dis. 2010;14 (Suppl 3):e113-6.
2. Hassanshahi G, Arababadi MK, Assar S, Hakimi H, Karimabad MN, Abedinzadeh M, et al. Post-transfusion-transmitted hepatitis C virus infection: a study on thalassemia and hemodialysis patients in southeastern Iran. Arch Virol. 2011; 156(7): 1111-5.
3. Hosseini M, SeyedAlinaghi S, Kheirandish P, Esmaeli Javid G, Shirzad H, Karami N, et al. Prevalence and correlates of co-infection with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in male injection drug users in Iran. Arch Iran Med. 2010; 13(4): 318-23.
4. Zamani F, Ameli M, Razmjou S, Shakeri R, Amiri A, Darvish R. Incidence of hepatitis C infection in patients on hemodialysis: a multicenter study of northern part of Iran. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2010; 21(6): 1169-71.
5. Aziz S, Hossain N, Karim SA, Rajper J, Soomro N, Noorulain W, et al. Vertical transmission of hepatitis C virus in low to middle socio-economic pregnant population of Karachi. Hepatol Int. 2011; 5(2): 677-80.
6. Indolfi G, Resti M. Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. J Med Virol. 2009; 81(5): 836-43.
7. Mast EE, Hwang LY, Seto DS, Nolte FS, Nainan OV, Wurtzel H, et al. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. J Infect Dis. 2005; 192(11): 1880-9.
8. Passos EP, Silveira TR, Salazar CC, Facin AC, Souza CA, Guerin YL, et al. Hepatitis C virus infection and assisted reproduction. Hum Reprod. 2002; 17(8): 2085-8.
9. Ziyaeyan M, Alborzi A, Jamalidoust M, Badiee P, Moeini M, Kadivar A, Prevalence of hepatitis C virus genotypes in chronic infected patients, southern Iran. JJM. (2011); 4(3): 141-146.
10. Pembrey L, Newell ML, Tovo PA. EPHN Collaborators, The management of HCV infected pregnant women and their children European paediatric HCV network. J Hepatol. 2005; 43(3): 515-25.
11. European Paediatric Hepatitis C Virus Network. A significant sex--but not elective cesarean section--effect on mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. J Infect Dis. 2005; 192(11): 1872-9.
12. Resti M, Azzari C, Mannelli F, Moriondo M, Novembre E, de Martino M, et al. Mother to child transmission of hepatitis C virus: prospective study of risk factors and timing of infection in children born to women seronegative for HIV-1. Tuscany Study Group on Hepatitis C Virus Infection. BMJ. 1998; 317(7156): 437-41.
13.Pappalardo B.L. Influence of maternal human immunodeficiency virus (HIV) co-infection on vertical transmission of hepatitis C virus (HCV): a meta-analysis. Int J Epidemiol. 2003; 32(5): 727-34.
14. Bevilacqua E, Fabris A, Floreano P, Pembrey L, Newell ML, Tovo PA, et al., Genetic factors in mother-to-child transmission of HCV infection. Virology. 2009; 390(1): 64-70.
15. Resti M, Azzari C, Galli L, Zuin G, Giacchino R, Bortolotti F, et al., Maternal drug use is a preeminent risk factor for mother-to-child hepatitis C virus transmission: results from a multicenter study of 1372 mother-infant pairs. J Infect Dis. 2002; 185(5): 567-72.
16. Dal Molin G, D'Agaro P, Ansaldi F, Ciana G, Fertz C, Alberico S, et al., Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: rate of infection and assessment of viral load and IgM anti-HCV as risk factors. J Med Virol. 2002; 67(2): 137-42.
17. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987; 162(1): 156-9.
18. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. Science. 1998; 282(5390): 938-41.
19. Azzari C1, Resti M, Moriondo M, Ferrari R, Lionetti P, Vierucci A. Vertical transmission of HCV is related to maternal peripheral blood mononuclear cell infection. Blood. 2000; 96(6): 2045-8.
20. Cribier B, Uhl G, Schmitt C, Doffoël M, Vetter D, Kirn A, et al. Follow-up of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells during interferon therapy. Arch Virol. 1999; 144(2): 355-64.
21. Zayed RA, Rushdy E, Saleh DA. Detection of HCV RNA in the peripheral blood mononuclear cells of serum HCV RNA-negative Egyptian patients under interferon treatment. Am J Med Sci. 2010; 340(6): 435-8.

22. Polywka S, Pembrey L, Tovo PA, Newell ML. Accuracy of HCV-RNA PCR tests for diagnosis or exclusion of vertically acquired HCV infection. J Med Virol. 2006; 78(2): 305-10.
23. Fabrizi F, Lunghi G, Aucella F, Mangano S, Barbisoni F, Bisegna S, et al. Novel assay using total hepatitis C virus (HCV) core antigen quantification for diagnosis of HCV infection in dialysis patients. J Clin Microbiol. 2005; 43(1): 414-20.
24. Gaudy C, Thevenas C, Tichet J, Mariotte N, Goudeau A, Dubois F. Usefulness of the hepatitis C virus core antigen assay for screening of a population undergoing routine medical checkup. J Clin Microbiol. 2005; 43(4): 1722-6.
25. Laperche S, Le Marrec N, Girault A, Bouchardeau F, Servant-Delmas A, Maniez-Montreuil M, et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen and anti-HCV antibodies improves the early detection of HCV infection. J Clin Microbiol. 2005; 43(8): 3877-83.
26. Soffredini R, Rumi MG, Parravicini ML, Ronchi G, Del Ninno E, Russo A, et al. Serum levels of hepatitis C virus core antigen as a marker of infection and response to therapy. Am J Gastroenterol. 2004; 99(9): 1738-43.
27. Takahashi M, Saito H, Higashimoto M, Atsukawa K, Ishii H. Benefit of hepatitis C virus core antigen assay in prediction of therapeutic response to interferon and ribavirin combination therapy. J Clin Microbiol. 2005; 43(1): 186-91.
28. Morota K, Fujinami R, Kinukawa H, Machida T, Ohno K, Saegusa H, et al. A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen. J Virol Methods. 2009; 157(1):8-14.

Original Article

Assessment of HCV Infection in Suspected Orphans Newborns by Real-Time PCR and HCV-Core Ag-Elisa

Jamalidoust M[1, 2], Namayandeh M[1], Zare M[1], Ziyaeyan M[1*]

1- Prof. Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Nemazi Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
2- Department of Medical Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received: 15 Nov 2014 Accepted: 22 Jun 2015

Abstract

Background & Objective: HCV infection may be transmitted from an infected mother to her fetus in a low percentage; however, it is the most important route of infancy HCV infection. The chance of HCV transmission in HIV/HCV co-infected mothers is higher than that in HCV mono-infected ones. The aim of this study is to assess HCV infection status in orphan newborns in Shiraz, Iran by quantitative PCR assay and HCV core-Ag Elisa.

Materials & Methods: Twenty nine HCV suspected infants, 2-7 months old, were evaluated for HCV and HIV antibodies, HCV core antigen and quantitative genome viral load.

Results: Although HCV-Ab was detected in all the studied infants, HCV-RNA was not detected in plasma or Peripheral Blood Mono-Nuclear Cells (PBMCs). HIV 1, 2 Abs were not detected in none of them, either.

Conclusion: A few studies have been conducted on the HCV transmission from infected mothers to their infants. According to the present results, assessment of HCV viral load and HCV core-Ag can serve as reliable tests for the prediction or exclusion of HCV infection from mothers to infants.

Keywords: **HCV infection, Orphan newborn, Quantitative PCR, HCV-core Ag**

* **Corresponding author: Mazyar Ziyaeyan**, Prof. Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Nemazi Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
Tel: +98711 6474304
Email: ziyaeyanm@sums.ac.ir