

## 27 Weeks Fetus with Cardiomegaly, Hydrocephaly and Pathological Diagnosis of Cytomegalovirus

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Case Report

#### Authors

Hassani M.\* MSc,  
Bagher K.<sup>1</sup> MD

#### How to cite this article

Hassani M, Bagher K. 27 Weeks Fetus with Cardiomegaly, Hydrocephaly and Pathological Diagnosis of Cytomegalovirus. Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2017;1(1):35-38.

### ABSTRACT

**Introduction** *Cytomegalovirus* (CMV) is a member of the  $\beta$ -Herpes family, which produces cytomegalic inclusions in infected cells. This virus produces a syndrome similar to infectious mononucleosis. Presence of specific antibodies against *Cytomegalovirus* in persons' serum shows that, people contact with CMV during their lifetime. The first encounter with this virus during pregnancy can cause abnormalities such as cardiomegaly, hydrocephalus, and even fetal death.

**Patient Information** This case report concerns a 27 weeks fetus from a 27 year old mother at Sarem Hospital. According to the pathologic findings of the samples stained with H&E and PAS methods, molecular tests were performed to detect *Cytomegalovirus*, and after DNA extraction from paraffin blocks obtained from different tissues of the fetus using Nested-PCR with two pairs of primers (CMTR1, CMTR2, CMTR3, and CMTR4), the presence of this virus was investigated in two stages.

**Conclusion** Regarding the healthy karyotype and the absence of genetic problems and molecular investigations, the main cause of the changes in the fetus, including cardiomegaly, hydrocephalus, and the cause of fetal death in the 27th week, is the presence of *Cytomegalovirus*.

**Keywords** *Cytomegalovirus*; Fetal Death; Cardiomegaly; Hydrocephalus

\*Sarem Cell Research Center (SCRC),  
Sarem Women's Hospital, Tehran,  
Iran

<sup>1</sup>General Sarem Lab, Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran

#### Correspondence

Address: Sarem Women's Hospital, Basij Square, Phase 3, Ekbatan Town, Tehran, Iran. Postal Code: 1396956111

Phone: +98 (21) 44670888

Fax: +98 (21) 44670432  
mha1353@gmail.com

#### Article History

Received: September 1, 2015

Accepted: December 26, 2015

ePublished: February 15, 2017

### CITATION LINKS

[1] Microbiology and immunology online [2] Medical Microbiology [3] Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection [4] Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase [5] Polymerase chain reaction [6] Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA [7] Localization of DNA sequence analysis of the transforming domain (mtrII) of human cytomegalovirus [8] Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection [9] Red Book: 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases [10] Congenital infection by human cytomegalovirus with a 65bp deletion in the morphological transforming region II [11] Sample preparation from paraffin-embedded tissues

## گزارش جنین 27 هفته‌ای با کاردیومگالی و هیدروسفالی و بررسی آسیب‌شناسی ویروس سایتومگال (CMV)

معصومه حسنی \* MSc

پژوهشکده سلولی- مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران

کیان باقر MD

آزمایشگاه جنرال، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران

### چکیده

**مشخصات بیمار:** سایتومگالوویروس (CMV) یکی از اعضای خانواده بتا- هرپس ویروس‌هاست که تولید انکلوژیون‌های سایتومگالیک در سلول‌های آلوده می‌کند. این ویروس، سندرومی شبیه به مونونوکلئوز عفونی تولید می‌نماید. در سرم بسیاری از افراد آنتی‌بادی اختصاصی علیه این ویروس، حاکی از برخورد افراد در طول زندگی با این ویروس است. اولین برخورد با این ویروس در دوران بارداری می‌تواند باعث ناهنجاری‌ها از جمله کاردیومگالی، هیدروسفالی و حتی مرگ جنین شود. این گزارش موردی مربوط به یک جنین ۲۷ هفته‌ای از مادر ۲۷ ساله در بیمارستان صارم است. بنابر تشخیص‌های پاتولوژیک حاصل از نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با روش H&E و PAS، آزمون‌های مولکولی برای تشخیص ویروس سایتومگال انجام شد و پس از استخراج DNA از بلوک‌های پارافینی حاصل از بافت‌های مختلف جنین به روش Nested-PCR با کمک دو جفت پرایمر (CMTR1، CMTR2، CMTR3 و CMTR4) در دو مرحله، حضور این ویروس بررسی شد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به کاربوتایپ سالم و نداشتن مشکلات ژنتیکی و بررسی‌های مولکولی، علت اصلی تغییرات حاصل در جنین از جمله کاردیومگالی و هیدروسفالی و همچنین علت مرگ در ۲۷ هفته‌گی جنین، وجود سایتومگالوویروس است.

**کلیدواژه‌ها:** سایتومگالوویروس، مرگ جنین، کاردیومگالی، هیدروسفالی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۰۵

\*نویسنده مسئول: mha1353@gmail.com

### مقدمه

سایتومگالوویروس (CMV)، ویروسی از خانواده هرپس‌ویروس‌هاست و زیرخانواده بتا- هرپس‌ویروس‌ها است که همه جا به شکل پراکنده یافت می‌شود<sup>[1]</sup>. نام این ویروس ریشه در عارضه انکلوژیون‌سیتومگالیک دارد که این عارضه با بزرگ شدن سلول‌های آلوده به ویروس شکل می‌گیرد. همچنین این بیماری (Cytomegalic Inclusion Disease) گونه‌ای از عفونت عمومی نوزادان است که نوزاد را در هنگام تولد به این ویروس آلوده می‌کند<sup>[2]</sup>. سایتومگالوویروس از نظر محتویات ژنتیکی غنی‌ترین ویروس از خانواده هرپس‌ویروس‌های انسانی، با سایز DNA ۲۴۰ کیلوباز است. این ویروس به وسیله FC، مانند یک گیرنده به گلیکوپروتئین‌های سطح سلول متصل می‌شود و به طور غیراختصاصی می‌تواند به FC ایمنوگلوبولین‌ها بچسبد. چرخه تکثیر آن نسبت به هرپس‌سیمپلکس I و II آهسته‌تر، ولی وابستگی ویروس به سلول عفونی بیشتر است<sup>[2]</sup>. این ویروس از فرد به فرد منتقل می‌شود و به تماس نزدیک با ماده حاوی ویروس نیاز دارد و انتقال آن از طریق مایعات بدن، ادرار، شیر مادر، خون، تماس جنسی و غیره است. دوره کمون در حدود ۴ تا ۸ هفته است و در نتیجه سندرومی شبیه به مونوکلئوز عفونی می‌دهد<sup>[1, 2]</sup>. CMV مشابه تمام هرپس‌ویروس‌ها دارای دو دوره زندگی مخفی (Latent) و لیتیک (Lytic) است<sup>[1]</sup>. در افرادی که نقص سیستم

ایمنی دارند (بیماران پیوندی سرطانی و ایدزی)، ویروس به مدت طولانی از بدن آنها دفع می‌شود و به شکل عفونت منتشر بروز می‌کند که شایع‌ترین عارضه پنومونی است. معمولاً پاسخ ایمنی میزبان سبب مخفی شدن ویروس در فرد آلوده می‌شود. معمولاً سلول‌های اپیتلیال داکتال بدن، بیشتر از فیبروبلاست‌ها آلوده می‌شوند، در حالی که در شرایط برون‌تنی، ویروس فقط در فیبروبلاست‌ها تکثیر می‌کند. نکته اینجاست که اغلب افراد با این ویروس در طول زندگی خود برخورد کرده‌اند و نسبت به آن آنتی‌بادی لازم را دارند، اما برخورد اولیه در دوران بارداری می‌تواند نتایج ناگواری برای جنین به وجود آورد. مکانیزم بیماری‌زایی CMV، تولید پروتئین‌هایی است که روی مسیر عرضه آنتی‌ژن (MHCI) و نیز عملکرد سلول‌های T سایتوتوکسیک، تولید اینترفرون و اینترکولین ۱۰ سیستم ایمنی، اثر می‌کند و اختلال ایمنی به وجود می‌آورد<sup>[2]</sup>.

HCMV سایتومگالوویروس انسانی، گونه‌ای از عفونت‌های ویروسی زمان تولد به حساب می‌آید که یکی از عوامل مهم مرگ جنین پیش از تولد است. این ویروس در طول بارداری یکی از علل اصلی بدشکلی و ناهنجاری‌های نوزادی است<sup>[3]</sup>. روش پیشرفته PCR، روش اصلی و مهم برای تشخیص انواع مختلفی از اختلالات ژنتیکی است که برای تشخیص بسیاری از ویروس‌های پنهان، همچون هرپس و ویروس HIV به کار می‌رود<sup>[4-6]</sup>. همچنین CMV معمول‌ترین عفونت در بیماران نقص ایمنی به شمار می‌آید و یکی از علل اصلی مرگ این بیماران است<sup>[7, 6]</sup>. CMV می‌تواند سبب میکروسفالی، مشکلات دید، هیدروسفالی، کاردیومگالی و سایر مشکلات شدید در جنین شود؛ همچنین در افراد دچار نقص ایمنی نیز سبب پنومونی، درگیری سیستم اعصاب مرکزی (CNS) و قلب و نیز التهاب شبکیه در چشم (Retinitis) شود.

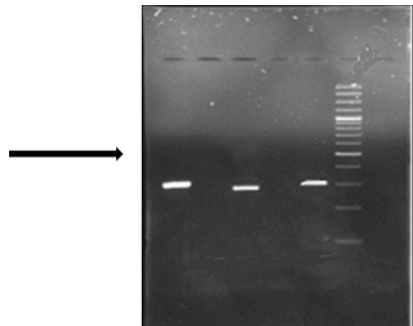
**علائم کلینیکی و عوارض CMV:** تقریباً ۱۰٪ نوزادان به دنیا آمده، آلوده به ویروس CMV هستند (شایع‌ترین عفونت مادرزادی در ایالات متحده). از این میان، ۱۰٪ علایمی هنگام تولد دارند و ۱۰٪ تا ۱۵٪ دیگر، علایم عصبی یا اختلالات تکاملی در طول سال اول زندگی پیدا می‌کنند<sup>[8, 9]</sup>. شایع‌ترین علایم این عفونت، بزرگی کبد و طحال، کلسیفیکاسیون مغز، زردی، کاهش وزن هنگام تولد، کوریوریتینیت، کاهش شنوایی، ترومبوسیتوپنی، راش‌های پوستی و تشنج است.

عوارض CMV در نوزادان بستگی به زمان درگیری عفونت دارد. در سه‌ماهه سوم بارداری امکان انتقال عفونت و شدت درگیری بیشتر است<sup>[8, 9]</sup>. آمنیوسنتز قطعی‌ترین روش برای تشخیص عفونت CMV هنگام بارداری است. شدت عفونت و عوارض ناشی از آن در سونوگرافی نمود می‌یابد که با میکروسفالی، بزرگ بودن بطن‌ها (ونتریکولومگالی)، کلسیفیکاسیون، TUGR و الیگوهدروآمیوس نمایان می‌شود. هر زن بارداری که اولین بار با CMV تماس پیدا کند و آلوده شود، با نسبت ۱ به ۳ امکان انتقال ویروس را به جنین دارد، ولی اگر ویروس در بدن مادر مجدداً عود کند (Recurrent infection)، تنها ۱٪، امکان ابتلای جنین وجود دارد.

### بیمار و روش‌ها

گزارش حاضر مربوط به یک جنین ۲۷ هفته‌ای از مادر ۲۷ ساله در بیمارستان صارم است که غربالگری پری‌ناتالوژی انجام نداده بود. در یافته‌های سونوگرافی پیشرفته جنین، حرکات منظم قلبی، حرکات اکتیو تنه و اندام‌ها مشاهده شد و نیز در ارزیابی محل و ضخامت

پس از به‌دست‌آوردن محصول مرحله اول، با استفاده از ۵λ این محصول و تهیه Master Mix، مانند مرحله قبل و با کمک جفت پرایمرهای CMTR3 و CMTR4 طبق پروتکل مرحله اول عمل کردیم، اما این‌بار با این تفاوت که مراحل آزمون با ۲۰ سیکل در ترموسایکلر اجرا شد و در نتیجه باند ۱۶۸bp حاصل شد که نشانه وجود CMV است (شکل ۲).



شکل ۲) مشاهده باند 168bp در نمونه‌های حاصل از بیمار در مقایسه با کنترل مثبت و منفی در دو طرف 50bp Ladder

### بحث

از پژوهش‌های پیشین روی علایم و عوارض حاصل از ویروس سایتومگالوویروس نتایج مشابهی حاصل شده است. از جمله می‌توان به گزارش یک مورد نوزاد ۳۱ هفته‌ای با هیپاتواسپلنومگالی و ترومبوسیتوپنی، بدون ناهنجاری‌های شکلی اشاره کرد که پس از تولد به دلیل مشکلات تنفسی در روز ۱۴ تولد از دنیا رفت. پس از انجام اتوپسی و بررسی‌های میکروسکوپی روی اعضای این نوزاد، نشان داده شده است که در کبد، طحال، آدرنال و غده تیروئید و نیز سلول‌های ائوزینوفیلی بزرگ در کلیه، سلول‌های سایتومگالیک وجود داشته است، اما تغییرات سلولی در ریه به‌دست نیامد [10]. در گزارش مذکور، روش کاربردی، واکنش زنجیره‌ای پلیمر مستقیم شده (Nested-PCR) روی بافت‌های نوزاد مرده بود که پس از استخراج DNA از بافت‌های پارافینی (FFPE) به‌کار گرفته شد [10].

### نتیجه‌گیری

با توجه به کاربوتایپ سالم و نداشتن مشکلات ژنتیکی و بررسی‌های مولکولی، علت اصلی تغییرات حاصل در جنین از جمله کاردیومگالی و هیدروسفالی و همچنین علت مرگ در ۲۷ هفته‌گی جنین، وجود سایتومگالوویروس است.

**تشکر و قدردانی:** موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

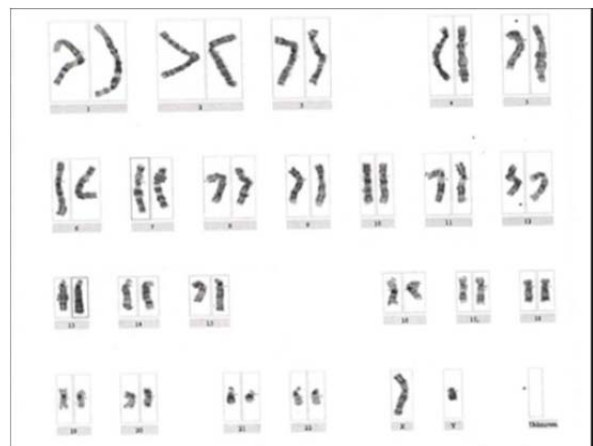
**تاییدیه اخلاقی:** موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

**تعارض منافع:** موردی وجود نداشته است.

**منابع مالی:** توسط مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم و پژوهشکده سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم تأمین شده است.

**سهم نویسندگان:** معصومه حسنی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۵۰٪)؛ کیان باقر (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/اروش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)

جفت، مشخصه‌ها طبیعی بود و در بررسی‌های دیگر، میزان مایع آمنیون هم طبیعی بود، اما نشانه‌هایی از آتروفی مغزی و ونتریکولومگالی دیده شد. آنومالی در ستون فقرات وجود نداشت و در سایر نواحی نیز مورد خاصی دیده نشد. در بررسی‌های سیتوژنیک در دپارتمان ژنتیک بیمارستان، یک جنین پسر با کاربوتایپ نرمال مشاهده شد، ولی در یافته‌های اتوپسی، جنین هیدروسفال و کاردیومگالی و همچنین در بررسی ریه، پنوموسیت‌های بزرگ و تجمع‌یافته در رنگ‌آمیزی PAS دیده شد. بنابر تشخیص‌های پاتولوژیک حاصل از نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با روش H&E و PAS، در بخش آسیب‌شناسی، انجام آزمون‌های مولکولی برای تشخیص سایتومگالوویروس، لازم دانسته شد و نمونه‌ها برای بررسی‌های مولکولی به دپارتمان مولکولار پاتولوژی ارسال شد (شکل ۱).



شکل ۱) کاربوتایپ مربوط به جنین ۲۷ هفته‌ای

سپس از بلوک پارافینی مربوط به اعضای جنین با کمک کیت DNA (QIAGEN DNA MiniKi)، استخراج DNA انجام شد. پس از پارافین‌زدایی از بلوک‌های پارافینی و تهیه DNA استخراج‌شده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به‌روش Nested با کمک پرایمرهای CMTR1، CMTR2، CMTR3 و CMTR4، ویروس CMV را طبق مراحل زیر، در دو مرحله بررسی کردیم. توالی پرایمرهای کاربردی به این صورت بود:

CMTR1:5-CTGTCGGTGATGGTCTCTTC-3  
 CMTR2:5-CCCACACCGCGAAAAGAAA-3  
 CMTR3:5-TCTCTGGTCCTGATCGTCTT-3  
 CMTR4:5-GTCACCTACCAACGTAGGTT-3

**شرح مراحل PCR:** در مرحله اول با جفت پرایمرهای CMTR1 و CMTR2، پس از تهیه Maste Mix (شامل: Taq DNA، dNTP، polymerase و mgcl2) و افزودن ۱۰λ از DNA استخراج‌شده از بافت‌های جنین، طبق پروتکل زیر، محصول واکنش به‌دست می‌آید که از آن در مرحله بعدی واکنش استفاده می‌شود (جدول ۱).

جدول ۱) برنامه PCR در ۲ مرحله

Pre-denaturation	95°C	5min
Cycle 30	94°C	1min
	60°C	2min
	72°C	2min
Extension	72°C	5min

- cytomegalovirus DNA. *J Clin Pathol.* 1991;44(5):360-5.
- 7- Razzaque A, Jahan N, MC Weeney D, et al. Localization of DNA sequence analysis of the transforming domain (mtrII) of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(15):5709-13.
- 8- Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection [Internet]. Atlanta: Centers for Disease control and prevent; 1946. [updated 2017 dec 5; cited 2008 jun 1]. Available from: <https://www.cdc.gov/cmV/overview.html>.
- 9- Pickring LK, Baker CF, Long SS, McMillan JA, editors. Red Book: 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases. Elk Grove Village: American Academy of Pediatrics. 2006.
- 10- Lo SK, Ip KW, Chan PK, Nicholls JM, Heath RB, Shiu SY. Congenital infection by human cytomegalovirus with a 65bp deletion in the morphological transforming region II. *Arch Virol.* 1993;129(1-4):295-9.
- 11- Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Inns MA, Gelfand DH, Srinsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols: A guide to method and applications. San Diego: Academic Press; 1990. pp. 153-8.
- 1- Hunt R. Microbiology and immunology online [Internet]. University of south Carolina school of Medicine:1801. Oncogenic viruses-DNA tumor viruses; [updated 2016 jun5; cited 2016 jul14]. Available from: <http://www.microbiologybook.org/book/virol-sta.htm>
- 2- Jawetz MA. Medical Microbiology. Norouzi J, Translator. Tehran: Hayyan Publishing Cultural Institute; 2000. [Persian]
- 3- Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Henderson RE, Moore EG, Walton PD, et al. Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primery and recurrent maternal infections. *N Engl J Med.* 1982;306(16):945-9.
- 4- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239(4839):487-91.
- 5- Schochetman G, Ou CY, Jones WK. Polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 1988;158(6):1154-7.
- 6- Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for