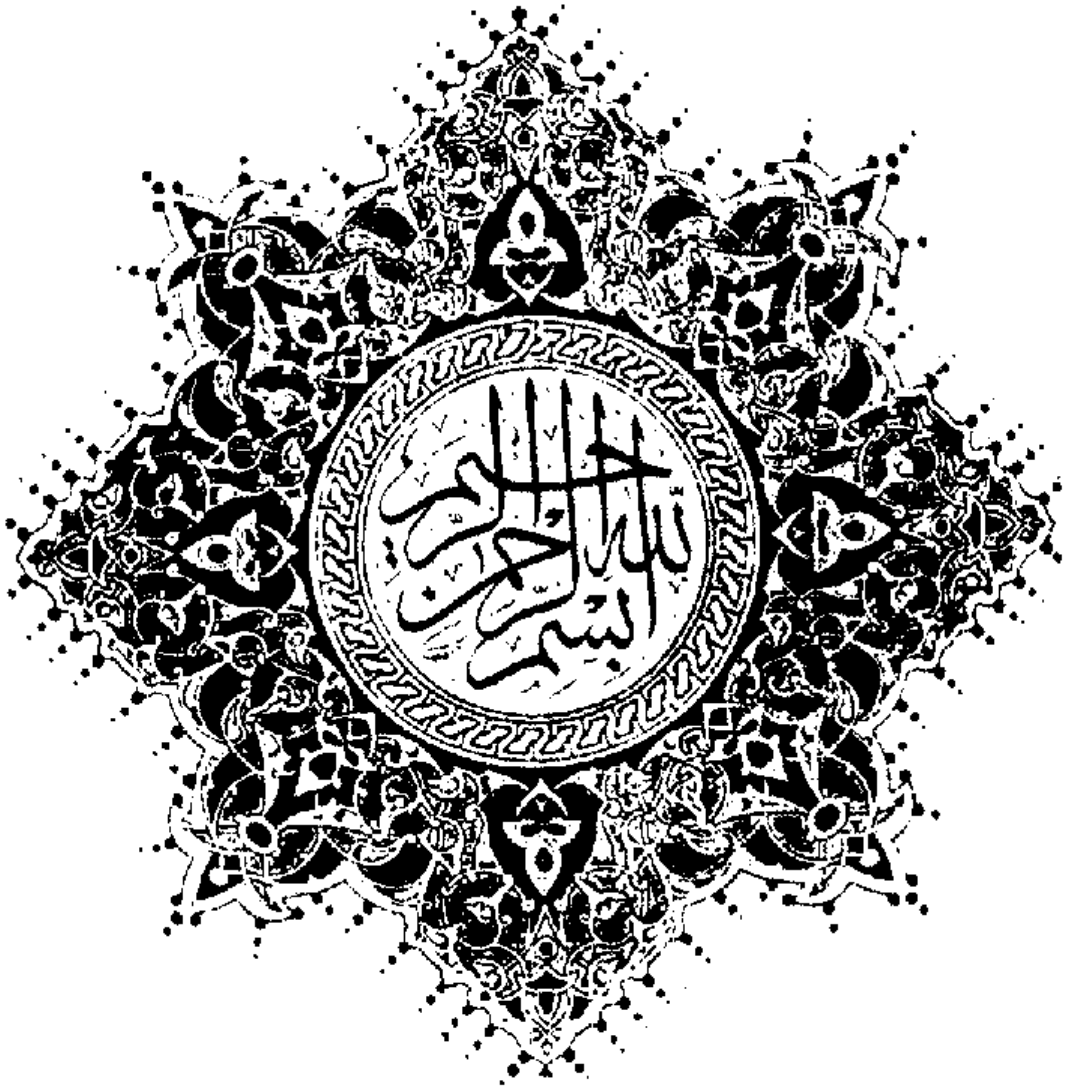
عنوان دوره آموزشی

روش های سرولوژیک تشخیص ویروس ها و تفسیر نتایج آنها

بهار ۱۴۰۰


بسم الله الرحمن الرحيم

گروه‌های هدف

تکنسین، کاردان و کارشناس آزمایشگاه تشخیص طبی

اهداف آموزشی

ویروس های عامل هپاتیت

ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان

هرپس ویروس ها

ویروس های تنفسی

مدت دوره آموزشی: ۱۰ ساعت

ارزشیابی

در پایان دوره بمنظور ارزیابی میزان حصول موفقیت و دستیابی به اهداف آموزشی و بررسی آگاهی، نگرش و عملکرد آموزش گیرندگان و بهبود مستمر فرایند، یک ارزشیابی از شرکت‌کنندگان به صورت تست‌های چهار گزینه‌ای بعمل خواهد آمد.

فهرست

فصل ۱: ۵

اصول تشخیص عفونت های ویروسی ۵

فصل ۲: ۱۸

پارووویروس ها ۱۸

فصل ۳: ۲۱

آدنوویروس ها ۲۱

فصل ۴: ۲۴

هرپس ویروس ها ۲۴

فصل ۵: ۳۳

ویروس های هپاتیت ۳۳

فصل ۶: ۴۰

پیکورناویروس ها ۴۰

فصل ۷: ۵۰

رئوویروس ها، روتاویروس ها و کالیسی ویروس ها ۵۰

فصل ۸: ۵۳

ویروس آنفلوانزا ۵۳

فصل ۹: ۵۶

پارامیکسوویروس ها و ویروس سرخجه ۵۶

فصل ۱۰: ۶۵

کروناویروس ها ۶۵

فصل ۱۱: ۶۸

رتروویروس ها (ویروس HIV) ۶۸

فصل ۱۲: ۷۳

پولیوماویروس ها (ویروس BK و ویروس JC) ۷۳

فصل ۱:

اصول تشخیص عفونت های ویروسی

ویروس ها، کوچکترین عوامل عفونی (دارای اندازه ی متغیری بین ۲۰ تا ۳۰۰ نانومتر) هستند و تنها دارای یک نوع اسید نوکلئیک (DNA یا RNA) به عنوان ژنوم هستند. اسید نوکلئیک در یک پوشش پروتئینی پوشیده شده است که این پوشش ممکن است توسط یک غشای لیپیدی احاطه شده باشد. واحد کامل عفونی، یک ویریون نامیده می شود. ویروس ها در محیط خارج سلولی غیر فعال هستند. آنها تنها در سلول های زنده همانند سازی کرده و انگل های ژنتیکی می باشند. اسید نوکلئیک ویروسی حاوی اطلاعات لازم جهت سنتز ماکرومولکول های اختصاصی ویروسی مورد نیاز برای تولید ویروس های نسل بعد در سلول های آلوده می باشد. در طی چرخه همانندسازی، تعداد زیادی از کپی های اسید های نوکلئیک و پروتئین های پوششی ساخته می شوند. پروتئین های پوششی با همدیگر تجمع یافته تا کپسید را تشکیل دهند. کپسید، اسید نوکلئیک ویروسی را پوشانده و آن را در برابر محیط خارج سلولی محافظت می کند و اتصال و نفوذ ویروس را به سلول های حساس جدید تسهیل می کند. عفونت ویروسی ممکن است بدون اثر یا دارای اثر کمی بر روی سلول میزبان باشد و یا ممکن است منجر به آسیب یا مرگ سلول میزبان شود.

دنیای ویروس ها بسیار متنوع است. ویروس ها در ساختار، سازمان بندی و بیان ژنوم و روش های تکثیر و انتقال، تفاوت زیادی با هم دارند. یک ویروس ممکن است دارای میزبان های وسیع یا خیلی محدود باشد. ویروس هایی شناخته شده اند که می توانند ارگانیسم های تک سلولی مثل مایکوپلاسما، باکتری ها، جلبک ها و گیاهان و جانوران عالی را نیز آلوده می کنند.

جداسازی ویروس مهم ترین روشی است که سایر بر آن استوار بوده و هنگامی که منافع مهم اقتصادی بستگی به تشخیص دقیق داشته باشد، جداسازی ویروس لازم خواهد بود. با این حال مشاهده مستقیم ویریون ها و یا اجزای ویروسی خصوصاً هنگامی که مقادیر فراوانی از نمونه ها آزمایش می گردند، سریع تر و ارزان تر می باشند.

انجام محاسبات همه گیرشناسی، برنامه های ریشه کنی و گواهی عاری بودن از عفونت های ویژه معمولاً بر اساس جستجوی آنتی بادی ها صورت می گیرد. مزایا و معایب روش های تشخیصی در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. فواید و معایب روش های مختلف تشخیص

۰	فواید	معایب
جداسازی ویروس	امکان بررسی بعدی عامل معمولاً بسیار حساس، قابل دسترسی	آهسته، زمان بر، می تواند مشکل باشد، غیقابل استفاده برای ویروس های غیرزنده، انتخاب نوع سلول و غیره ممکن است مشکل باشد.
مشاهدهٔ مستقیم توسط میکروسکوپ الکترونی شامل، میکروسکوپ ایمونوالکترون	سریع، تشخیص ویروس هایی که غیرقابل جداسازی هستند، تشخیص ویروس‌های غیرزنده	وسایل گران قیمت بنابراین غیرقابل دسترس، عدم حساسیت نسبی، محدود به چند عفونت ویروسی
تشخیص سرولوژیک ویروس یا آنتی ژن مثل الایزا	سریع و حساس، فراهم نمودن اطلاعات در رابطه با سروتیپ، قابل رؤیت اغلب به شکل کیت تشخیصی	برای همهٔ ویروس ها قابل انجام نیست، تفسیر آن ممکن است مشکل باشد.
کاوشگرهای (پروب) اسید نوکلیک (همراه یا بدون تکثیر ژن توسط PCR)	سریع و بسیار حساس به ویژه بعد از PCR، قابل انجام برای همهٔ ویروس‌ها را دارد.	ممکن است آمادهٔ استفاده نباشد، خطر آلودگی DNA در PCR وجود دارد.
تشخیص پاتولوژیک سلول توسط میکروسکوپ نوری	سریع، قابل دسترسی	محدود به چند عفونت ویروسی
تغییر آنتی بادی (سرم دورهٔ حاد و نقاهت)	مفید در سرم های مربوط به موارد رخداد بیماری ها	با تأخیر (گذشته نگر) تفسیر ممکن است مشکل باشد.

تشخیص مستقیم ویروس، آنتی بادی های ویروسی و اسید نوکلئیک ویروسی

روش های زیادی برای تشخیص، آنتی بادی های ویروسی و اسید نوکلئیک آن ها وجود دارد. آزمایشگاه های کوچک بر اساس پنج عامل (سرعت، راحتی کار، حساسیت، اختصاصیت و قیمت) کیت های مورد نیاز خود را اغلب بر اساس روش الایزا می باشند از چندین کارخانهٔ سازنده به راحتی تهیه می نمایند.

جستجوی ویریون‌ها به وسیلهٔ میکروسکوپ الکترونی

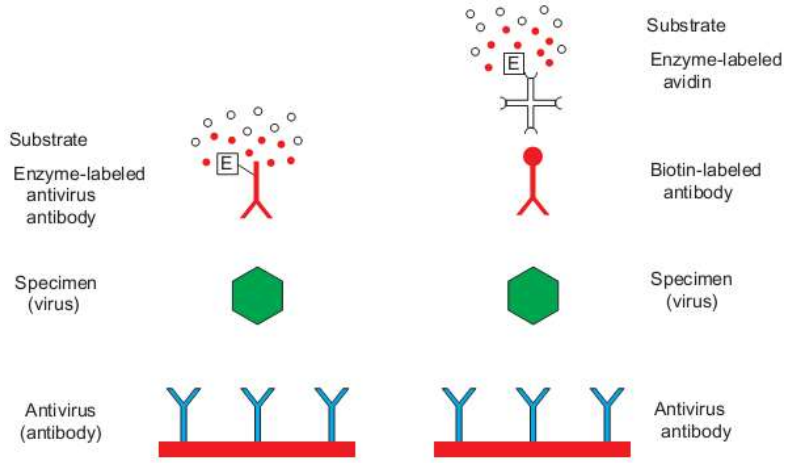
از آنجایی که در اکثر موارد میزان غلظت ویریون ها جهت رؤیت آن ها توسط میکروسکوپ الکترونی برای تشخیص سریع استفاده نمود در این مواقع پس از تهیهٔ سوسپانسیونی از مدفوع، آن را با سانتریفیوژ ابتدا با سرعت کم صاف کرده و سپس با سانتریفیوز کردن آن در سرعت های بالا محتویات را به صورت یک قرص (Pellet) در آورده و سپس از آن برای رنگ آمیزی منفی استفاده می کنند. از این

روش جهت شناسایی ویروس های جدیدی که منجر به اسهال های مهمی شده و گاه غیرقابل کشت می باشند (مثل برخی از آدنوویروس ها، آستروویروس ها، کالیسی ویروس ها، کروناویروس ها، پاروویروس ها و روتاویروس ها) استفاده می شود. حساسیت این روش را می توان با به کار بردن سرم حاوی آنتی بادی بالا برد. در این روش که به آن میکروسکوپ ایمونوالکترون (Immunoelecteron microscopy) می گویند. معمولاً در ابتدا نمونه را در دور کم، سانتریفیوژ کرده و پس از صاف شدن به آن آنتی بادی افزوده و پس از گذشت یک شب جهت انجام وکنش بین آنتی بادی و آنتی ژن (ویروس) محلول را در دور بالا سانتریفیوژ کرده و رسوب متراکم را رنگ آمیزی منفی می کنند.

- در تکنیک میکروسکوپ الکترونی از فلزات سنگین مثل مولیبدات آمونیوم، استات اورانیل، اورانیل فورمات، اسید فسفو تنگستات، اسمیوم تتراکسید، اوروگلوکوتیونات و ... برای رنگ آمیزی منفی استفاده می شود.

سنجش ایمنی متصل به آنزیم (الایزا) (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA)

روش الایزا، انقلابی در زمینهٔ تشخیص ویروس ها به وجود آورده استو روش الایزا حساس بوده و برای یافتن آنتی ژن به روش های گوناگون طراحی شده است (شکل ۱). در روش الایزا از آنزیم هایی مثل پراکسیداز، آلکالین فسفاتاز و بتاگالاکتوزیداز برای نشان دار کردن استفاده می شود: مثبت بودن آزمایش با تغییر رنگ سوبسترای آنزیم همراه است. از اسپکتروفتومتر برای نشان دادن تغییر رنگ استفاده می شود. در روش الایزا آنتی ژن را روی سطوح پلاستیکی، دانه ها یا فیلتر ثابت می کنند. پس از آن، ابتدا آنتی بادی اختصاصی آنتی ژن (دوم) و بعد آنتی ایمونوگلوبولین را که به طور کوالانت به آنزیم وصل شده است می افزایند. با اضافه کردن سوبسترای مناسب آنزیم واکنش آنتی ژن-آنتی بادی را با تغییر رنگ سوبسترا بررسی و تفسیر می کنند. با این روش نیز می توان حضور آنتی بادی و تیتر آن را تعیین کرد. تکنیک الایزا به دو روش مستقیم و غیر مستقیم به کار می رود.



شکل ۱. الایزا. جهت تشخیص ویروس و یا آنتی ژن ویروسی. سمت چپ: روش مستقیم؛ سمت راست: روش آویدین-بیوتین

رادیو ایمونواسی (Radioimmunoassay; RIA)

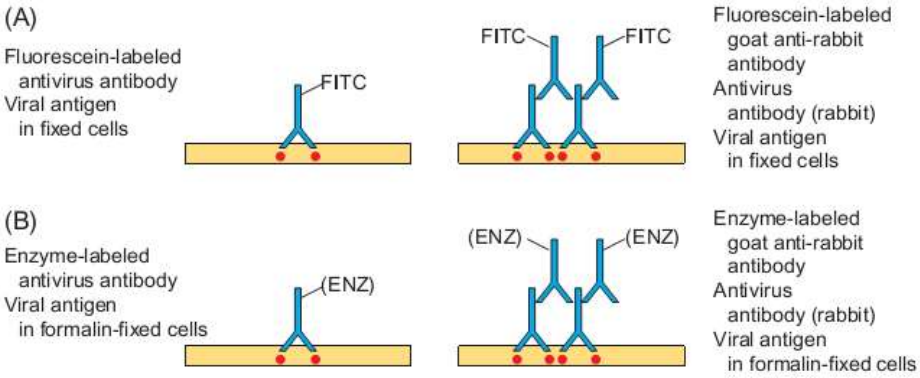
رادیوایمونواسی پیش از روش الایزا به وجود آمد، ولی از آن شدیداً با ابداع روش الایزا بیش از پیش محدود گردید. تنها اختلاف مهم این روش محدود گردید. تنها اختلاف مهم این روش با الایزا این است که در این روش مادۀ لازم جهت نشان دار کردن، به جای آنزیم یک مادۀ ایزوتوپ رادیواکتیو مانند ید- ۱۲۵ (I^{125}) بوده و دیگر اینکه آنتی بادی متصل شده، به وسیلۀ دستگاه شمارندۀ گاما (Gamma counter) اندازه گیری می شود. این روش بسیار حساس و قابل اعتماد بوده و روش کار با آن به صورت اتوماتیک در آمده استف اما گرانی وسائل و خطرات حاصل از رادیوایزوتوپ ها در هنگام کار، از معایب این روش محسوب می شوند.

ایمونوفلورسانس (Immunofluorescence; IF)

سرعت عمل، اختصاصیت و حساسیت بالا و در عین حال سادگی نسبی، این روش را در ردیف یکی از مهم ترین روش های تشخیص سریع آنتی بادی های ویروسی قرار داده است. اولین آزمایش انجام شده با این روش بیش از ۳۶ سال قبل برای تشخیص هاری صورت گرفت و امروزه برای طیف وسیعی از ویروس ها استفاده می گردد. با این روش می توان کشت های سلولی، گسترش ها و مقاطع منجمد شدۀ بافت ها و یا اندام ها را مورد استفاده قرار داد. نحوۀ استفاده از ایمونوفلورسانس به دو روش می باشد: ۱) ایمونوفلورسانس مستقیم (Direct Immunofluorescence; DIF): در این روش از آنتی بادی ضد ویروس متصل به یک رنگ فلورسانس به نام فلورسین (Fluorescin) استفاده می شود، ۲) ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (Indirect Immunofluorescence; IFA) یا ساندویچ (Sandwich): در این روش از آنتی بادی ضد آنتی بادی تولید شده علیه ویروس (Anti-antiviral atibody) متصل به فلورسین استفاده می شود (شکل ۲). برای مثال آنتی بادی ضد ویروسی خاص از یک حیوان (مثل خرگوش) بر روش گسترش (Smear) به وسیلۀ استون تثبیت شده و یا به یک مقطع منجمد شده بافت اضافه گشته و پس از شستشو، آنتی بادی دوم به نمونه افزوده می شود. آنتی بادی دوم با تزریق ایمونوگلوبولین خرگوش به بز به دست آمده و با فلورسین کونژوگه شده است. روش IFA نسبت به روش DIF دارای دو مزیت است:

۱) در صورت وجود آنتی بادی علیه انواع مختلف ویروس ها در یک گونۀ حیوانی مثل خرگوش، فقط یک آنتی بادی گونژوگه نیاز خواهد بود.

۲) به دلیل تجمع فراوان آنتی بادی های نشان دار، این روش بسیار حساس تر است. با وجود راحتی، کارایی این روش بستگی به دقت و اجنتاب از عوامل ایجاد کنندۀ پاسخ کاذب دارد.



شکل ۲. ایمونوفلورسانس. سمت چپ: روش مستقیم؛ سمت راست: روش غیر مستقیم

رنگ‌آمیزی ایمونوپراکسیداز (Immunoperooxidase)

یک روش جایگزین برای ردیابی آنتی بادی های ویروسی در سلول های آلوده، استفاده از آنتی بادی های نشان دار شده توسط آنزیم می باشد. این روش به تجهیزات ارزان تری نسبت به ایمونوفلورسانس نیاز داشته یک (میکروسکوپ نوری معمولی کافی است) و اسلایدهای تولید شده از نظر ظاهری واضح تر و پایدارتر است، اما روش کار و اصول آن شبیه به روش ایمونوفلورسانس می باشد. آنتی بادی کونژوگه به روش مستقیم یا غیرمستقیم به آنتی بادی متصل شده و سپس یک سوبسترای مناسب برای یک آنزیم خاص (مثلاً در مورد آنزیم پراکسیداز، از H_2O_2 همراه با مشتق بنزیدین) جهت ایجاد یک رسوب رنگی نامحلول در حضور آنزیم افزوده می شود. یکی از معایب این روش، وجود پاسخ مثبت کاذب به دلیل پراکسیداز طبیعی موجود در داخل سلول های بسیاری از بافت ها به ویژه گلبول های سفید می باشد. این مشکل را می توان با روش های دقیق تر و حل نمود.

پدیدهٔ هماگلوتیناسیون و ممانعت از هماگلوتیناسیون

پدیدهٔ هماگلوتیناسیون را اولین بار هیرست (Hirst) در سال ۱۹۴۱ مطرح کرد. به این نحو که بسیاری از ویروس ها و آنتی ژن های ویروسی قادرند به گیرنده های سطح گلبول های قرمز خون متصل و آن ها را آگلوتینه کنند. در این واکنش مولکول های هماگلوتینین،که در سطح برخی ویروس ها وجود دارندف شرکت دارند. هماگلوتینین در ویروس ها گلیکوپروتئینی (ویروس آنفلوانزا و پاراآنفلوآنزا) و لیپوپروتئینی (ویروس واکسینیا) می باشد.

- در مورد ویروس آنفلوانزا و پاراآنفلوآنزا از گلبول های قرمز انسان و خوکچهٔ هندی برای بررسی آگلوتیناسیون استفاده می کنند. ویروس سرخک و آدنوویروس گروه گلبول های قرمز میمون را آگلوتینه می کند. ویروس سرخجه نیز گلبول های قرمز کبوتر را آگلوتینه می نماید.
- آدنوویروس گروه A توانایی هماگلوتیناسیون ندارد. گروه B توانایی هماگلوتیناسیون به صورت کامل در میمون دارد. گروه C، E و F توانایی هماگلوتیناسیون به صورت ناقص در رت دارد. گروه D در رت به صورت کامل ایجاد هماگلوتیناسیون می نماید.

در آزمایش هماگلوتیناسیون رقت های سریال از ویروس تهیه گلبول قرمز شسته شده افزوده می شود. ویروس گلبول های قرمز را هماگلوتینه (لایه ای ژل مانند از گلبول های قرمز) می کند. عیار ویروس عکس بالاترین رقتی است که در هماگلوتیناسیون دیده می شود. در آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI)، ویروس با آنتی بادی ویژۀ ویروسی (سرم بیمار) خنثی می شود و دیگر قادر به آگلوتینه کردن گلبول قرمز نخواهد بود. در این آزمایش ابتدا رقت های سریال از سرم تهیه و به آن غلظت مساوی از ویروس افزوده می شود. در صورت وجود آنتی بادی اختصاصی ویروس هماگلوتیناسیون مشاهده نمی شود و گلبول های قرمز ته لوله تجمع خواهند کرد. عیار آنتی بادی آخرین لوله ای است که گلبول های قرمز در آن جمع می شوند. و در لوله های بعد از هماگلوتیناسیون دیده خواهد شد. با روش HI می توان عیار آنتی بادی ویروسی را تعیین کرد.

تست های خنثی سازی

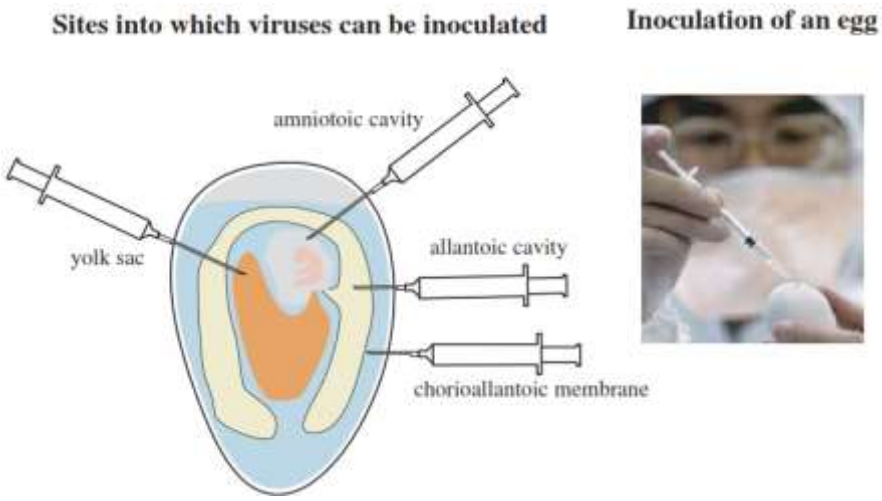
خنثی سازی (Neutralization) یکی از قدیمی ترین واکنش های سرولوژیکی است. ویروس ها به آنتی بادی اختصاصی متصل و خنثی می شوند. و قادر به تکثیر در محیط کشت ویروسی نخواهند بود. در حال حاضر از کشت سلولی به عنوان سیستم معرف استفاده می کنند و خنثی شدن را با اثرات سیتوپاتیک (CPE) بررسی می کنند. برای انجام آزمایش رقت های سریال از آنتی بادی اختصاصی (سرم بیمار) تهیه و ویروس را به آن اضافه می کنند و بعد از زمان مناسب CPE را بررسی می کنند. در صورتی که سرم حاوی آنتی بادی اختصاصی ویروس باشد، CPE در کشت سلول دیده نمی شود. با این روش عیار آنتی بادی اختصاصی ویروس تعیین می گردد. برای تعیین تیپ از ویروس ها (مثل ویروس پولیو و تب دانگ)، از تست خنثی سازی استفاده می کنند.

کشت ویروس در تخم مرغ جنین دار

تخم مرغ جنین دار را نخستین بار گود پاستور (Good Pasteur) و وود راف (Wood Ruff) برای کشت ویروس ها به کار بردند. و به این ترتیب، پیشرفت بزرگی در علم ویروس شناسی حاصل گردید. از سال ۱۹۳۱ تاکنون برای کشت تعدادی زیادی از ویروس های پستانداران و تهیۀ واکسن های ویروسی انسان و جانوران از تخم مرغ جنین دار استفاده می شود (شکل ۳).

اغلب ویروس ها نسبت به میزبان دارای اختصاصیت هستند و به سلول های تخصص یافته ای مثل بافت های عصبی و سلول های اپی تلیال تمایل نشان می دهند. ویروس ها به راحتی در سلول های هدف تکثیر می یابند، ولی قادر به تکثیر در سایر بافت ها نیستند. اما با توجه به این تمایل و تروپیسم شدید، با استفاده از روش های مختلف می توان ویروس ها را با میزبان های مختلف سازش داد و در نتیجه موجب ازدیاد و تکثیر آن ها شد. با اینکه غشاء و سلول های جنین جوجه اختصاصیت خاصی ندارند، اما حاوی ترکیباتی هستند که موجبات رشد ویروس ها را فراهم آورده و با سازش در این میزبان، قدرت تکثیر آن ها بسیار بیشتر از میزبان طبیعی مربوطه خواهد بود. افزون بر این، در تخم مرغ جنین‌دار هیچ گونه آنتی بادی وجود ندارند که مانع تکثیر ویروس گردد، مگر در مورد ویروس لکوز پرندگان که تخم مرغ آلوده مانع از تکثیر ویروس تزریق شده خواهد شد. تخ مرغ های مورد استفاده در آزمایشگاه ویروس شناسی باید

جنین دار باشند و بهتر است از نژاد مرغ لگهورن (Leghorn) به دست آیند که دارای سطح صاف و کاملاً سفید است و به این ترتیب امکان کنترل جنین در داخل تخم مرغ فراهم می شود. با قرار دادن تخم مرغ جنین دار در درون جعبه لامپ کوچکی می توان قسمت های مختلف قبیل صدف، غشای زیر صدف، اتاقک هوا، غشای کوریوآلانتوئیک، غشای آمنیوتیک، کیسهٔ زرده، حفرهٔ آمنیوتیک، سفیده و جنین تخم مرغ را مشاهده کرد. حساسیت قسمت های مختلف تخم مرغ جنین دار برای تکثیر انواع ویروس ها متفاوت است و بسته به نوع ویروس محل تزریق انتخاب می شود (جدول ۲).



شکل ۳. کشت ویروس ها در تخم مرغ جنین دار

جدول ۲. حساسیت قسمت های مختلف تخم مرغ جنین‌دار به انواع ویروس ها

قسمت های مختلف تخم مرغ جنین دار	ویروس	توضیحات
کیسهٔ زرده	آنفلوانزا، پاراآنفلوانزا، هرپس سیپملکس، هاری و برخی از آربوویروس‌ها	برای کشت ویروس در کیسهٔ زرده، تخم مرغ های جنین دار که به مدت ۷-۵ روز در انکوباتور قرار گرفته‌اند برای این منظور مناسب اند، زیرا در چنین حالتی کیسهٔ زرده نسبتاً بزرگ است.
کیسهٔ کوریوآلانتوئیک	آنفلوانزا، نیوکاسل و بسیاری از ویروس‌های دستگاه تنفسی	ویروس ها در سلول های اندودرمیک این کیسه تکثیر و در مایع آلانتوئیک آزاد می شوند. تخم مرغ های جنین دار ۱۱-۹ روزه برای این کار مناسب اند.
غشای کوریوآلانتوئیک	آبله، واکسینیا، آبله گاوی، آبله میمون، هرپس سیپملکس، سرخک، هاری، سرخجه	در این حالت ویروس در سلول های اکتودرمیک غشای کوریوآلانتوئیک تکثیر می شود و نتیجهٔ تکثیر به صورت ضایعاتی به نام پوک (Pock) قابل مشاهده است. تخم مرغ های جنین دار ۱۲-۹ روزه برای این کار مناسب اند. سرخک، هاری و سرخجه بدون ایجاد آسیب در سطح غشای کوریوآلانتوئیک تکثیر می یابند.
کیسهٔ آمنیوتیک	غالباً برای ویروس آنفلوانزا	در این روش مرغ های جنین دار ۱۵-۱۳ برای تزریق ویروس مناسب است. از مزایای کشت ویروس آنفلوانزا در کیسهٔ آمنیوتیک این است که ویروس خواص آنتی ژنی و ویرولانس خود را حفظ می کند.

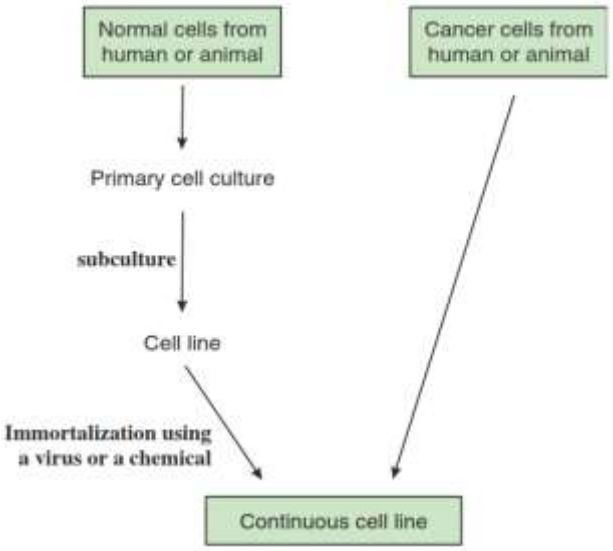
کشت سلول

اولین کار ثبت شده در زمینه کشت و نگه داری سلول های حیوانات متعلق به Ross Harrison می باشد که در سال ۱۹۰۷ تکنیک قطره معلق را ابداع کرد. او یک تکه از بافت عصبی را از جنین سمندر جدا کرده و درون مایع لنف قرار داد و از آن جا که مایع لنف لخته می شد اجازه می داد که به صورت یک قطره در زیر لام میکروسکوپ قرار گیرد. در سال ۱۹۱۲، کارل با استفاده از تجارب هاریسون قطعاتی از قلب جوجه را در پلاسمای اسب کشت داد. او به این نکته پی برد که عصارهٔ جنین تخم مرغ و پستانداران تأثیر شگفت آوری در رشد وتکثیر سلول ها دارد. کارل (Carrel) توانست قطعه ای از بافت جنین جوجه را به مدت ۳۳ سال در خارج از بدن نگه دارد. در دههٔ ۶۰ میلادی، ارل (Earl) با استفاده از تریپسین توانست سلول های قطعهٔ بافت را از هم جدا و یک سوسپانسیون سلولی تهیه کند و به این ترتیب، کشت بافت جای خود را به کشت سلول داد. پس از آن که استفاده از کشت سلول گسرش یافت، همزمان با توجه ویروس شناسان به کشت سلول برای تکثیر ویروس ها جلب شد.

برای تهیهٔ کشت سلولی از بافت های جنینی، بافت های بالغ و بافت های سرطانی می توان استفاده کرد. از بین بافت های جنینی بافت قسمت قشری کلیه جنین انسان، سلول های فیبروبلاستی جنین مرغ و موش مورد استفاده قرار می گیرد. از بافت های بالغ می توان از سلول های اپی تلیال کلیهٔ هامستر، خرگوش، میمون، و سلول های غشای آمنیوتیک جفت انسان استفاده نمود. برای تهیهٔ کشت سلول، بافت مورد نظر در بدن حیوان را در شرایط کاملاً استریل جدا می کنند و سپس آن را چندین بار در محلول ایزوتونیک از قبیل هنکس (Hunx)، ارل (Earl) یا بافر نمکی فسفات شستشو می دهند. این قطعات را در محلول‌های حاوی تریپسین قرار می دهند و در حرارت اتاق با همزن مغناطیسی مخلوط می کنند. به این ترتیب، تریپسین موجب قطع اتصالات بین سلولی شده و سلول ها به حالت منفرد در می آیند. در فواصل نیم ساعت بافت هضم شده را جدا می کنند و محلول تریپسین را که حاوی سلول های جدا شده است، در یخچال قرار می دهند و مجدداً با بافت تریپسین اضافه و عمل هم زدن را تکرار می کنند. این عمل چندین بار تکرار می شود تا همهٔ قطعات بافت کاملاً هضم و سلول ها جدا شوند. محلول تریپسین حاصل از خرد کردن بافت را که حاوی سلول ها می باشد، سانتریفیوژ کرده و سلول های ته نشین شده را جدا می کنند. پس از شستشوی این سلول ها شمارش سلولی صورت می گیرد و تعداد مشخصی از سلول ها را به شیشه های کشت حاوی محیط غذایی می افزایند. شکل ۴ برخی از فلاسک های کشت سلولی را نشان می دهد.

شکل ۴. فلاسک ها، ظروف و پلیت های کشت سلولی.

سه نوع کشت سلولی وجود دارد: ۱) کشت های سلولی اولیه (Primary culture) را می توان با پراکنده نمودن سلول هایی از نمونه های بافتی که به تازگی تهیه شده اند با یک آنزیم پروتئولیتیک مانند تریپسین فراهم نمود. مطلبی که پیش تر بحث شد روش تهیهٔ کشت سلولی اولیه بود. سلول ها به کف ظروف کشت ویروس چسبده و تکثیر می شوند و سرانجام یک تک لایهٔ سلولی ایجاد می کنند که این کشت سلولی را کشت سلولی اولیه می نامند (مانند سلول اولیهٔ کلیهٔ میمون [PMK]، سلول اولیهٔ هامستر [PHK]، سلول اولیل خرگوش [PRK])، ۲) کشت های سلولی دیپلوئیدی (Diploid cell lines)، کشت های سلولی ثانویه ای هستند که به علت تغییراتی که در ان ها ایجاد شده است قادرند تا ۵۰ بار هم کشت شوند، بدون اینکه طرح کروموزومی آن ها از حالت طبیعی خارج گردد (مثل رده های سلولی WI-۲۶، HDF، WI-۳۸)، ۳) رده های سلولی پیوسته (Continuous cell lines)، کشت های سلولی هستند که قادرند به دفعات بیشتر و احتمالاً نامحدود رشد نمایند (شکل ۵). این کشت های سلولی پیوسته از کشت های سلولی دیپلوئیدی یا از بافت های بدخیم حاصل می شوند. این سلول ها همواره دارای کروموزوم تغییریافته و نامنظم می باشند. نوع کشت سلولی مورد استفاده در کشت ویروس به حساسیت سلول ها نسبت به یک ویروس خاص بستگی دارد (مثل رده های سلولی Vero [سلول های کلیهٔ میمون سبز آفریقایی]، HEP-۲ [کارسینوم لارینکس]، PK-۱ [سلول های کلیهٔ بچه خرگوش]). اولین و معروف ترین ردهٔ سلولی پیوسته، ردهٔ سلولی هلا (Hela) است که اولین بار در سال ۱۹۵۲ گی (Gay) آن را از سرطان گردن رحم (به علت پاپیلوماویروس تیپ ۱۸) به دست آورد.



شکل ۵. ایجاد سلول های ردهٔ مداوم از سلول های انسانی و حیوانی. اکثر تیپ های سلولی که از بدن گرفته می شوند به خوبی در کشت سلولی رشد نمی کنند. با کشت مجدد این ویروس ها و مجاورت آن با برخی عوامل از قبیل ویروس ها (به عنوان مثال وارد کردن یک یک انکوژن ویروسی) یا مواد شیمیایی می توان سلول های نامیرا که می توانند به طور نامحدود کشت داده شوند، به وجود آورد. سلول های سرطانی قبلاً نامیرا شده، و سلول های ردهٔ مداوم می توانند بدون نیاز به تیمارهای بیشتر پایدار بمانند.

یکی از مزایای کشت سلولی ردهٔ پیوسته نسبت به کشت اولیه ممکن است به ویروس های بدن جانور یا انسان آلوده باشد و مجب اشتباه یا خطا شود، اما در مورد ردهٔ پیوسته ای امکان مطرح نیست. حساسیت ردهٔ سلولی پیوسته نسبت به ویروس ها بیشتر از دو نوع دیگر است (جدول ۳). سلول های ردهٔ پیوسته هتروپلوئید بوده و از نظر اندازه بزرگ تر از سلول مادری هستند. حجم هسته نسبت به سیتوپلاسم زیاد است، هستک بزرگ و نامنظم شده و در هسته حالت هیپرکرومازی دیده می شود. در کشت سلولی و کشت های دیپلوئید سلول هایی که در نتیجهٔ تقسیم میتوز به وجود آمده اند، به طور منظم در کنار هم قرار می گیرند و حتی حاشیل سلول ها نیز روی هم نمی لغزند که به این پدیده وقفهٔ تماس (Contact inhibition) می گویند، ولی در سلول های ردهٔ پیوسته، سلول ها به طور نامنظم روی هم قرار می گیرند و یک تودهٔ سلولی به وجود می آورند. ویژگی کشت های سلولی ترانسفورم شده با ویروس ها در شرایط آزمایشگاهی ذکر شده است.

جدول ۳. مشخصات سلول های ترانسفورم شده با ویروس ها در کشت های سلولی

۱- ردیف های DNA ویروسی به شکل ادغام شده در DNA سلولی یا به شکل اپی زوم (پلاسمیدی) دیده می شوند.
۲- ظرفیت زیادی جهت رشد در محیط آزمایشگاهی دارند.
A) تشکیل کلون های سه بعدی از سلول هایی که به شکل تک لایه دیده می شوند.
B) توان تقسیم نامحدود در کشت های متوالی
C) دارای قابلیت زیاد کلون شدن
D) قابلیت رشد در سوسپانسیون یا در آگار نیمه جامد (عدم وابستگی به تکیه گاه [Anchor indepence])
۳- تغییر مورفولوژی سلول
۴- تغییر در متابولیسم و تغییرات غشاء
۵- اختلال در تنظیم میکروتوبول ها
۶- ناهنجاری های کروموزومی
۷- عرضل آنتی ژن های اختصاصی همراه با تومور
A) برخی در سطح سلول ها، همانند آنتی ژن های پیوندی اختصاصی تومور رفتار می کنند.
B) برخی آنتی ژن های داخل سلولی جدید
۸- توان تولید سرطان های بدخیم به هنگام تلقیح به حیواناتی که به شکل شدید یا وابسته، از نظر توموری مشخص، دچار سرکوب ایمنی شده باشند.

هر یک از ویروس ها دارای روش کشت مخصوص به خود می باشند. برای مثال بتاهرپس ویروس ها و گاماهرپس ویروس ها ممکن است در محیط کشت سلولی تک لایهٔ به دست آمده از بافت های حیوان رد کرده ولی پس از تلقیح به کشت سلولی تک لایه که از پیش تهیه شده و فاقد هر گونه سلول است قادر به رشد نباشند. برخی از کروناویروس ها و رینوویروس ها که در کشت های سلولی تک لایه به خوبی قادر به رشد نیستد، ممکن است در بافت کشت شده (مانند قطعات کوچکی از بافت ریه یا روده) رشد کنند.

تشخیص رشد ویروس

کشت های سلولی معمولاً در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد نگه داری می شوند. محیط های کشت هر روز برای مشاهده اثرات آسیب زای ویروس (CPE) بررسی می شوند. سرعت ایجاد و طبیعت CPE ویروس ها کاملاً با یکدیگر فرق دارند. CPE ایجاد شده به خصوص در مورد ویروس هایی که طول دوره نهفته آن ها بیش از یک هفته می اشد، همیشه بر اساس مقایسه با کشت های سلولی تلقیح نشده ارزیابی می گردد. در صورتی که ایجاد CPE قطعی نبوده و یا اصلاً مشاهده نشود، انجام پاساژ دوم و حتی سوم (پاساژ کور یا Blind) معمول است.

در صورت مشاهده CPE:

۱) با توجه به سرعت و شکل ظاهری CPE همراه با تاریخچه بیماری می توان بلافاصله نوع ویروس را تشخیص داد.

۲) ضمن رعایت احتیاط، مواد حاصل از کشت های سلولی را می توان با میکروسکوپ الکترونی آزمایش نمود.

۳) سلول های تک لایه آلوده را بر روی ظروف شیشه ای و یا ظروف کشت صفحه ای ثابت کرده و پس از رنگ آمیزی سلول ها، اجسام انکلوزیونی، سین سی شیا و سایر تغییرات اختصاصی سلول مورد بررسی قرار می گیرند. بهترین روش رنگ آمیزی سلول ها استفاده از آنتی بادی های فلورسانس است. به وسیله این رنگ آمیزی می توان سریعاً به تشخیص دقیق دست یافت. بر اساس تجربیات و اطلاعات حاصل بهتر است ظروف محیط کشت را مدتی انکوبه نمود.

برخی از ویروس ها نسبتاً برای سلول های محیط کشت کشنده نیستند. رشد ویروس ها در محیط کشت تک لایه را گاهی می توان با استفاده از تست هماگلوتیناسیون تشخیص داد. بسیاری از ویروس ها که قادر به هپادسوپشن هستند قادر به همادسورپشن نیز هستد. رشد پارامیکسوویروس ها و تا حدی کمی نیز فلاوی ویروس ها و توگاویروس ها را با این روش می توان تشخیص داد.

فصل ۲:

پاروویروس ها

پارووویروس ها، کوچکترین ویروس های DNA دار حیوانی هستند. به علت توانایی کم کد کردن ژن ها، تکثیر ویروسی به کارکردهای تکثیری سلول های میزبان یا ویروس های کمک کننده دیگر وابسته است. پارووویروس B۱۹ برای انسان بیماری زا است و به سلول های پیش ساز اریتروئید گرایش دارد. این ویروس، علت اریتمای عفونی (بیماری پنجم) که یک اگزانتم شایع دوران کودکی است، سندرم درد چند مفصل در بالغین سالم، بحران آپلاستیک در بیماران با اختلالات همولیتیک، کم خونی مزمن در افراد با مهار سیستم ایمنی و مرگ جنین می باشد. بوکاویروس های انسانی در نمونه های تنفسی از کودکانی با بیماری حاد تنفسی و در نمونه های مدفوع شناسایی شده اند. اما نقش آن ها در بیماری تایید نشده است.

پارووویروس B۱۹ به طور تصادفی در طی غربالگری یک ویروس غیرمرتبط، ویروس هپاتیت B، کشف شد که بعدها به عنوان عامل بیماری انسانی شناخته شد. برای پارووویروس B۱۹ فقط یک سروتیپ شناخته شده وجود دارد. تقریباً ۶/۵ درصد از افراد بزرگسال تا سن ۴۰ سالگی به ویروس B۱۹ آلوده می شوند. اریتم عفونی در کودکان و نوجوانان ۴ تا ۱۵ ساله، که منبع سرایت هستند، شایع می باشد. آرترالژی (در مفصل) و آرتریت (ورم مفصل) احتمالاً در افراد بزرگسال روی می دهد.

به نظر می رسد که عفونت از طریق مجاری تنفسی انتقال می یابد. ویروس در محیط پایدار است و سطوح آلوده ممکن است در انتقال ویروس نقش داشته باشند. انتقال در بین افراد خانواده احتمالاً مسیر مهمی از انتقال این ویروس است و منبع عفونت مادرزادی در طی بارداری اغلب کودک بزرگتر مادر می باشد. اکثر عفونت ها تحت بالینی هستند و میزان سرایت به افراد حساس حدود ۲۰ تا ۵۰ درصد است.

انتقال پارووویروس B۱۹ از بیماران مبتلا به بحران آپلاستیک، به کارکنان بیمارستان گزارش شده است. این بیماران احتمالاً در طی دورهٔ بیماری، عفونی بوده و قادر به انتشار ویروس هستند. در صورتی که بیماران مبتلا به بیماری پنجم احتمالاً تا زمان ظهور راش، عفونی نمی باشند. اکثر بیماران مبتلا به بحران آپلازی، سابقه ای از عفونت مجرای تنفسی داشته اند.

برای این ویروس هیچ درمان ضدویروسی اختصاصی و یا روش کنترلی وجود ندارند. برای پارووویروس های سگ و گربه واکسن هایی وجود دارند. اگرچه دورنما و آینده برای تولید واکسن خوب است. واکسن های موثری علیه پارووویروس های حیوانی جهت استفاده در گربه ها، سگ ها و خوک ها وجود دارد. هیچ داروی ضد ویروسی نیز وجود ندارد. رعایت خوب مسایل بهداشتی مانند شستشوی دست ها و استفاده نکردن از لیوان مشترک به جلوگیری از انتشار پارووویروس B۱۹ از طریق ترشحات تنفسی، آئروسل ها و گرد و غبار کمک می کند. مراقبت از تماس با بیماران و تمیز کردن کامل اتاق بیماران جهت ممانعت از انتقال پارووویروس B۱۹ از بیماران مبتلا به بحران آپلاستیک گذرا و بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی با عفونت مزمن B۱۹ باید دنبال شود.

تشخیص آزمایشگاهی:

حساس ترین روش ها، DNA ویروسی را شناسایی می کنند. روش های موجود، PCR، پروب هیبریداسیون سرم یا ترشحات بافتی و هیبریداسیون In situ بافت فیکس شده می باشد. PCR، حساس ترین روش است. DNAی پارووویروس B۱۹ در سرم، سلول های خونی، نمونه های خونی و ترشحات تنفسی شناسایی شده است. در طول عفونت های حاد، میزان ویروس در خون تقریبا می تواند به $۱۰^{۱۱}$ کپی ژنوم در هر میلی لیتر برسد. روش های PCR ای که بر روی پارووویروس B۱۹ انجام می گیرد، به علت توالی های متفاوت ممکن است سویه های غیر B۱۹ را از دست بدهد. تنها روش رایج و در دسترس برای بوکاویروس انسانی، PCR می باشد. DNA بوکاویروس، در سرم، بزاق، نمونه های مدفوع و نمونه های تنفسی یافت شده است.

روش های سرولوژی برای تعیین مواجهه گذشته و اخیر با پارووویروس B۱۹ وجود دارند. شناسایی آنتی بادی IgM پارووویروس B۱۹ نشان دهنده عفونت اخیر است. این آنتی بادی در حدود ۳-۲ ماه بعد از عفونت حضور دارد. آنتی بادی IgG پارووویروس B۱۹ که علیه اپی توپ های کنفورماسیونی VP۱ و VP۲ می باشند، برای سال ها پایدار می مانند. اما پاسخ های آنتی بادی علیه اپی توپ های خطی، در ماه های بعد از عفونت کاهش می یابند. آنتی بادی ممکن است در بیماران با نقص سیستم ایمنی همراه با عفونت های مزمن B۱۹ یافت نشوند. در این بیماران، عفونت مزمن با شناسایی DNAی ویروسی مشخص می شود. روش های شناسایی آنتی ژن می توانند ویروس B۱۹ با تیتر بالا را در نمونه های بالینی شناسایی کنند. ایمونوهیستوشیمی جهت ردیابی آنتی ژن های B۱۹ در بافت های جنینی و مغز استخوان استفاده شود. B۱۹ و بوکاویروس انسانی سخت رشد هستند. از جداسازی ویروس جهت شناسایی عفونت استفاده نمی شود.

فصل ۳:

آدنوویروس ها

در سال ۱۹۵۳، Rowe و همکارانش با مشاهده کشت های آدنوئید انسانی که باعث از بین رفتن خود به خودی آن ها می شد، یک عامل عفونی جدیدی به نام آدنوویروس را جداسازی کردند. مدت ها پیش مشاهده شده بود که آدنوویروس ها نه تنها ممکن است سال ها به صورت نهفته در بافت‌های لنفاوی پایدار بمانند، همچنین عامل مهمی در بیماری های تنفسی و چشمی می باشند. بعدها نیز سروتیپ هایی که مجاری تناسلی را آلوده می کردند، شناخته شد و به دنبال آن آدنوویروس های مرتبط با گاستروانتریت و یا عفونت در بیماران مبتلا به نقص ایمنی (مثل بیماری ایدز)، شناسایی شدند. با مشخص شدن نقش آدنوویروس‌ها در ایجاد تومورهای بدخیم در نوزاد جوندگان، توجه بسیاری از زیست شناسان مولکولی را به بیوشیمی، تکثیر و سرطان زایی این ویروس ها جلب کرد.

آدنوویروس انسانی تیپ ۱۲ (Human adenovirus type ۱۲) می تواند باعث القای تومورهای بدخیم در هامستر گردد. این ویروس به عنوان اولین ویروس انسانی سرطان زای شناخته شده می باشد، اگرچه بعدهاً مشخص شد آدنوویروس با سرطان های انسانی ارتباط ندارد. مطالعات بر روی آدنوویروس ها، سهم مهمی بر دانسته های ما در مورد بیان ژن های پستانداران و ویروس ها داشت. ۳ مثال در این مورد وجود دارد: (۱) آدنوویرولوژیست ها، فرآیند پیرایش RNA (RNA splicing) را برای اولین بار در این ویروس کشف کردند، (۲) نقش پروتئین ها به عنوان پرایمر در شروع همانندسازی برای اولین بار در آدنوویروس ها مشاهده شد و (۳) آدنوویروس ها پیشگام شناخت مکانیسم برنامه تنظیم رونویسی در سلول های پستانداران بود.

ویریون های آدنوویروس ها به خشکی، شوینده ها (دترجنت ها)، ترشحات دستگاه گوارش (اسید، پروتئاز و صفرا) و حتی به تیمار با مقادیر کم کلر مقاوم می باشند. بنابراین، ویریون ها می توانند از راه دهانی- مدفوعی، توسط انگشتان دست، یا اشیاء (از جمله حوله و ابزار پزشکی) و آب استخرهای شنا که به مقدار کمی کلرزنی شده اند، منتقل شوند. آدنوویروس‌های انسانی بدون وجود مخازن حیوانی واضحی، عمدتاً از طریق تنفسی یا تماس دهانی- مدفوعی از فردی به فرد دیگر منتقل می شوند.

اگرچه آدنوویروس‌ها تنها ۲ تا ۵٪ از تمامی بیماری‌های تنفسی را در جامعه ایجاد می‌کنند، بیماری تنفسی ناشی از تایپ‌های ۳ و ۴ و ۷ در میان سربازان جدید شایع است. بیماری آدنوویروس می‌تواند میزبان ابتلای بالایی در میان سربازان جدید داشته باشد. با این وجود، بیماری آدنوویروس برای نظامیان ورزیده مشکلی ایجاد نمی‌کند. آدنوویروس های ۱ تا ۷، شایع ترین سروتیپ ها می باشند. ۵ تا ۱۰٪ موارد بیماری دستگاه تنفسی کودکان توسط آدنوویروس های تیپ ۱، ۲، ۵، و ۶ ایجاد می شود. کودکان آلوده، ویروس را ماه ها بعد از عفونت دفع می کنند. به نظر می رسد که سروتیپ های ۴ و ۷ قادرند به ویژه در بین سربازان به دلیل تماس های نزدیک و شرایط دشوار زندگی، انتشار پیدا کنند.

شستشوی کامل دست‌ها آسان‌ترین راه جلوگیری از عفونت است. سطوح محیطی را با استفاده از هیپوکلریت سدیم می‌توان ضدعفونی کرد. در شرایط گروهی، استفاده از دستمال کاغذی توصیه می‌شود، چون حوله‌های کثیف می‌توانند منبعی از عفونت در موارد شیوع باشند. خطر موارد شیوع التهاب ملتحمه منتقل‌شونده از طریق آب را با کلرزنی به استخر شنا و فاضلاب می‌توان کاهش داد. رعایت شرایط ضدعفونی سختگیرانه در هنگام معاینه چشم، بهمراه استریل کردن کافی ابزارها، برای کنترل کراتوکنژنکتیویت اپیدمیک لازم است. تلاش

برای کنترل عفونت آدنوویروس در ارتش، بر تهیه واکسن متمرکز بوده است. واکسن‌های زنده آدنوویروس حاوی تایپ‌های ۴و۷ که درون کپسول‌هایی پوشیده از ژلاتین قرار داشتند و بصورت خوراکی مصرف می‌شدند، در سال ۱۹۷۱ مورد استفاده قرار گرفتند. بدین ترتیب، ویروس از مجرای تنفسی که می‌تواند در آنجا ایجاد بیماری نماید، عبور می‌کند و در روده‌ها رها می‌شود، جاییکه تکثیر یافته و موجب تولید آنتی‌بادی خنثی‌کننده می‌شود. این ویروس‌ها از فرد دریافت‌کننده واکسن به اطرافیانش منتقل نمی‌شوند. این واکسن بسیار موثر بود، اما پس از سال ۱۹۹۹، از آنجا که ساخت آن متوقف شد، دیگر موجود نیست.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

الف) شناسایی، جداسازی و تعیین هویت ویروس (معمولاً در آزمایشگاه های رفرانس و برای مقاصد تحقیقاتی استفاده می شود)

برای جداسازی آدنوویروس ها نمونه‌ها باید در اوایل بیماری از نواحی درگیر شده جمع‌آوری شوند تا جداسازی ویروس به نحوی بهینه انجام گیرد. بسته به بیماری بالینی، ویروس ممکن است از مدفوع یا ادرار یا سوآبی از گلو، ملتحمه، یا مقعد حاصل شود. مدت زمان ترشح آدنوویروس در بیماری‌های مختلف، متفاوت است: ۱ تا ۳ روز از گلوی بالغین مبتلا به سرماخوردگی معمولی؛ ۳ تا ۵ روز از گلو، مدفوع و چشم مبتلایان به تب حلقی- ملتحمه‌ای؛ ۲ هفته از چشم مبتلایان به کراتوکنژنکتیویت؛ ۳ تا ۶ هفته از گلو و مدفوع کودکان مبتلا به بیماری‌های تنفسی؛ ۲ تا ۱۲ ماه از ادرار، گلو و مدفوع بیماران دچار نقص ایمنی.

ب) سرولوژی

عفونت انسان با هر یک از تایپ‌های آدنوویروس موجب افزایش آنتی‌بادی‌های فیکس‌کننده کمپلمان بر علیه آنتی‌ژن‌های گروه آدنوویروس می‌شود که در تمامی تایپ‌ها مشترک هستند. تست فیکساسیون کمپلمان (CF) یکی از روش‌های آسان برای شناسایی عفونت با هر یک از اعضای گروه آدنوویروس است، اما حساسیت آن پایین می‌باشد. افزایش چهار برابر یا بیشتر در تیتر آنتی‌بادی فیکس‌کننده کمپلمان بین سرم‌های فاز حاد و فاز نقاهت، نشانگر عفونتی اخیر با یک آدنوویروس است، اما تایپ اختصاصی درگیر را مشخص نمی‌کند .

در صورتیکه تعیین اختصاصی پاسخ سرولوژی یک بیمار مورد نیاز باشد، تست‌های خنثی‌سازی (Nt) یا مهار هماگلوتیناسیون (HI) را می‌توان به کار برد. تست خنثی‌سازی حساس‌ترین تست است. در اکثر موارد، تیتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده یک فرد افزایش چهار برابر یا بیشتر بر علیه تایپ آدنوویروس جدا شده از بیمار را نشان می‌دهد.

فصل ۴:

هرپس ویروس ها

خانواده هرپس ویروس حاوی چندین ویروس از مهمترین پاتوژن‌های انسانی است. از نظر بالینی، هرپس ویروس‌ها طیفی از بیماری‌ها را ایجاد می‌کنند. برخی طیف وسیعی از سلول‌های میزبان و برخی تعداد محدودی را آلوده می‌کنند. ویژگی برجسته هرپس‌ویروس‌ها، توانایی آنها در ایجاد عفونت پایدار مادام‌العمر در میزبان و دوره‌هایی از فعال شدن مجدد است. فعال شدن مجدد اغلب آنها در بیماران دچار سرکوب ایمنی موجب عوارض شدیدی برای سلامتی می‌گردد.

جالب اینجاست که عفونت فعال شده ممکن است از نظر بالینی کاملاً متفاوت از بیماری ناشی از عفونت اولیه باشد. هرپس ویروس‌ها ژن‌های زیادی دارند که برخی نسبت به شیمی‌درمانی ضد ویروسی حساس هستند .

هرپس ویروس‌هایی که به طور شایع انسان را آلوده می‌کنند، عبارتند از : هرپس سیمپلکس ویروس‌های تایپ ۱و۲(HSV-۱ و HSV-۲)، ویروس واریسلا-زوستر[VZV]، سایتومگالوویروس (CMV)، ویروس اپشتین-بار (EBV)، هرپس ویروس‌های ۶ و ۷، و هرپس ویروس ۸ (هرپس ویروس مرتبط با سارکوم‌کاپوزی[KSHV]). ویروس هرپس B میمون‌ها نیز ممکن است انسان را آلوده کند. حدود ۱۰۰ ویروس از گروه هرپس وجود دارد که بسیاری از گونه‌های مختلف حیوانی را آلوده می‌کنند.

هرپس سیمپلکس ویروس (HSV)

ویروس هرپس سیمپلکس از طریق مایع وزیکلی، بزاق و ترشحات واژینال منتقل می شود. اساساً اتصال و اختلاط ویروس به هر غشای مخاطی محل عفونت و در نتیجه محل بیماری را تعیین می کنند. هر دو تیپ می توانند ضایعات دهانی و ژنیتال ایجاد کنند.

HSV-۱ در بزاق وجود دارد و می تواند به طور مستقیم از طریق بوسه یا به صورت غیرمستقیم با آلودگی دست، ظروف و غیره منتقل شود. خودتلقیحی (Autoinfection) نیز ممکن است به عفونت چشم منجر شود. نوزادان تازه متولد شده در هنگام عبور از کانال زایمان در هنگام تولد و یا به ندرت از طریق جفت می توانند عفونی شوند.

بیشترین بروز عفونت HSV-۱ در بین کودکان ۶ ماهه تا سه ساله است. تا دوران بلوغ، حدود ۷۰ تا ۹۰ درصد از نوجوانان دارای آنتی بادی علیه HSV-۱ می باشند. میزان عود عفونت HSV-۱ در بین افراد متفاوت است. در هر دورهٔ زمانی، حدود ۱ تا ۵ درصد افراد بالغ طبیعی که بدون علائم ظاهری هستند، این ویروس را منتشر می کنند.

HSV-۲ معمولاً از راه تماس جنسی به انسان منتقل می شود. بنابراین، آنتی بادی در برابر این ویروس قبل از بلوغ به ندرت یافت می شود. تخمین زده شده است که حدود ۶۰-۴۰ میلیون افراد آلوده در آمریکا وجود دارد. بررسی میزان آنتی بادی، به علت واکنش متقاطع بین تیپ ۱ و ۲ هرپس سیمپلکس مشکل است. اخیراً با به کار بردن آنتی ژن های گلیکوپروتئینی اختصاصی تیپ، مشخص شده است که ۲۰ درصد افراد بزرگسال در آمریکا دارای آنتی بادی علیه HSV-۲ می باشند. وجود آنتی بادی در زنان بیشتر از از مردان و در سیاه پوستان بیشتر از سفیدپوستان می باشد. عفونت های عود کنندهٔ تناسلی ممکن است دارای علائم بالینی، یا فاقد علائم باشند که در هر دو حالت، مخزن انتقال ویروس به افراد حساس هستند.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

روش های متعددی برای تشخیص HSV وجود دارد که از آت جمله می توان بررسی مستقیم نمونه بالینی، جداسازی ویروس و روش PCR می باشد. در اینجا مختصری به روش سرولوژی تشخیص HSV اشاره می گردد:

سرولوژی:

آنتی بادی‌ها علیه HSV ۴ تا ۷ روز پس از عفونت ظاهر می‌شوند و ظرف ۲ تا یک هفته به حداکثر مقدار می‌رسند. این آنتی‌بادی‌ها با نوسان کمی برای تمام عمر باقی می‌مانند. روش‌های تشخیصی موجود شامل خنثی‌سازی، ایمنوفلوسانس و الایزا هستند.

لازم به ذکر است که ارزش تشخیصی روش های سرولوژی بخاطر آنتی‌ژن‌های متعدد مشابه بین HSV-۱ و HSV-۲ محدود است. همچنین، ممکن است مقداری پاسخ‌های غیرهم‌تیپی خاطره ای نسبت به ویروس واریسلا-زوستر در افراد آلوده با HSV یا بالعکس صورت گیرد. استفاده از آنتی بادی‌های اختصاصی تایپ HSV در بعضی از آزمایشگاه های تحقیقاتی، امکان انجام تست‌های سرولوژی معنی دارتری را فراهم کرده است.

ویروس واریسلا–زوستر (Varicella-Zoster Virus) یا آبله مرغان

بیماری واریسلا (آبله‌مرغان[chickenpox])، نوعی بیماری خفیف بسیار مسری عمدتاً در کودکان است که از نظر بالینی، بصورت وزیکول هایی منتشر در پوست و غشاهای مخاطی مشخص می‌شود. این بیماری ممکن است در بالغین و مبتلایان به نقص ایمنی، شدید باشد.

بیماری زونا (shingles)، نوعی بیماری تک‌گیر ناتوان‌کننده در سالمندان یا مبتلایان به نقص ایمنی است که با درد و راشی محدود به ناحیه‌ای از پوست که توسط یک گانگلیون حسی عصب دهی می‌شود، مشخص می‌گردد. این ضایعات شبیه ضایعات آبله مرغان هستند .

هر دو بیماری توسط یک ویروس ایجاد می شوند. در حالیکه آبله مرغان بیماری حادی متعاقب مواجهه اولیه با ویروس است، زونا پاسخ یک میزبان نسبتاً مصون به فعال شدن مجدد ویروس واریسلای نهفته در نورون های گانگلیون های حسی است.

VZV فوق العاده مسری است، به نحوی که میزان سرایت آن در بین افراد حساس خانواده به بیش از ۹۰٪ درصد می رسد. بیماری اصولاً از راه تنفس منتقل می گردد، اما ممکن است از طریق تماس با وزیکل های پوست هم منتقل شود. بیماران قبل و طی دورهٔ علائم مسری می باشند. بیش از ۹۰٪ افراد بزرگسال در کشورهای توسعه یافته آنتی بادی ضد VZV را دارند. زونای هرپسی ناشی از فعالیت مجدد ویروس نهفته در بیمار می باشد. بیماری در ۱۰ تا ۲۰ درصد از افراد آلوده به VZV ایجاد می شود و بروز آن با افزایش

سن بیشتر می شود. ضایعات زونای هرپسی حاوی ویروس زنده است و بنابراین ممکن است در افراد غیر ایمن (کودکان) منبع عفونت آبله مرغان باشد.

محدود کردن انتقال VZV، همانند سایر ویروس های تنفسی امر مشکلی است. چون عفونت VZV در کودکان معمولاً خفیف است و برای تمام عمر ایمنی را القاء می کند، اغلب از مواجهه کودکان در اوایل زندگی حمایت می گردد. با این حال، افراد در معرض خطر (مانند کودکانی که سیستم ایمنی آن ها سرکوب شده است) باید از مواجهه با VZV محافظت گردند.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

شیوه های تشخیص سریع ویروس واریسلا-زوستر از نظر بالینی مفید هستند. آزمون‌های PCR از نظر حساسیت، اختصاصیت و سرعت ترجیح داده می شوند. DNA ویروس واریسلا-زوستر را می‌توان در بزاق بسیاری از بیماران، از جمله مبتلایان به زونای بدون راش شناسایی کرد. DNA ویروس در مایع وزیکولی،تراشه های پوست و مواد بیوپسی قابل شناسایی است.

افزایش تیتر آنتی‌بادی اختصاصی در سرم بیمار را می توان با تست های مختلف، از جمله آنتی بادی فلورسانت و ایمنواسی آنزیم شناسایی کرد. انتخاب روش مورد استفاده بستگی به هدف تست و امکانات آزمایشگاهی موجود دارد. ایمنی سلولی اهمیت ویژه ای دارد، اما بررسی آن مشکل است.

سیتومگالوویروس (Cytomegalovirus; CMV)

سیتومگالوویروس در تمام نقاط دنیا باعث عفونت های تحت بالینی در دوران بچگی می شود، اما در بعضی جوامع مرفه تا مادامی که CMV بتواند موجب بیشترین آسیب شود به تأخیر می افتد. به میزان خاصی، عفونت های اولیه در طی بارداری می تواند به اختلالات شدید داخل رحمی جنین منتهی شود. در مبتلایان به ایدز عفونت های بیمارستانی که ممکن است در نتیجه انتقال خون، یا به علت سرکوب ایمنی متعاقب پیوند باشد، سیتومگالوویروس عامل عمدهٔ کوری و مرگ است. در میان تمامی هرپس ویروس ها، سیتومگالوویروس اولین عامل ایجاد مرگ و میر در بیماران مبتلا به نقص ایمنی است.

CMVدر تمام نقاط جهان اندمیک است، اما اپیدمی ایجاد نمی‌کند. این ویروس در سراسر طول سال وجود دارد و اختلافی در میزان عفونت فصلی مشاهده نمی‌شود .

شیوع عفونت به وضعیت اقتصادی-اجتماعی، شرایط زندگی و اقدامات بهداشتی بستگی دارد. شیوع آنتی بادی شیوع عفونت به وضعیت اقتصادی-اجتماعی، شرایط زندگی و اقدامات بهداشتی بستگی دارد. شیوع آنتی بادی ممکن است در بالغین گروه های سطح بالای اقتصادی-اجتماعی در کشورهای توسعه یافته متوسط(۴۰ تا ۷۰٪) باشد، برخلاف کودکان و بالغین کشورهای در حال توسعه و گروه‌های سطح پایین اقتصادی-اجتماعی در کشورهای توسعه یافته که شیوع ۹۰ درصدی نشان می دهند.

عفونت های جدید تقریباً همیشه بدون علایم هستند. پس از عفونت، ویروس از نواحی مختلفی دفع می شود. دفع ویروس ممکن است تا سال‌ها ادامه پیدا کند که اغلب به صورت متناوب هنگامی که ویروس نهفته فعال می شود، صورت می‌گیرد. بنابراین، مواجهه با CMV بسیار گسترده و شایع است.

انسان تنها میزبان شناخته شده CMVاست. انتقال مستلزم تماس نزدیک انسان با انسان است. ویروس در ادرار، بزاق، مایع منی، شیر مادر، ترشحات گردن رحم، دفع می‌شود و در گلبول های سفید در گردش حمل می شود. احتمالاً انتشار دهانی و تنفسی، راه های اصلی انتقال CMVمحسوب می‌شوندCMV . از طریق انتقال خون نیز می‌تواند منتقل شود. خطر محاسبه شده حدود ۱ تا ۵٪ در هر واحد خون کامل است. اما ممکن است بسیار متغیر باشد. دریافت‌کنندگان Seronegative پیوند بافت جامد در خطر ابتلا قرار دارند، چون بافت seropositive باعث انتقال ویروس در ۶۰ تا ۸۰٪ موارد می گردد.

عفونت داخل رحمی ممکن است بیماری شدیدی در نوزاد ایجاد کند. حدود ۱٪ نوزادان متولد شده در ایالات متحده با CMV آلوده هستند. اکثر این نوزادان به عفونت‌های تحت بالینی اما مزمن مبتلا می شوند؛ ۵ تا ۱۰٪ دچار بیماری انکلوزیون سایتومگالیک همراه با نقایص تکاملی و مرگ و میر بالا می‌شوند. عفونت‌های مادرزادی تحت بالینی یا آشکار، منجر به عفونت‌های مزمنی می شوند که دفع ویروس تا سال‌ها قابل شناسایی است. بسیاری از نوزادان در ماه های اول زندگی، اغلب از طریق شیر آلوده مادر یا شیرخوارگاه ها به عفونت CMV دچار می‌شوند. بیشتر این عفونت ها تحت بالینی و معمولاً مزمن هستند که با دفع دائمی ویروس همراه می باشند .

بسیاری از زنان سنین بارداری در ایالات متحده، در معرض خطر عفونت اولیه CMVدر زمان بارداری هستند. در حدود ۴۰٪ از عفونت های اولیه مادری، انتقال داخل رحمی اتفاق می افتد. چنین عفونت‌های اولیه مادری در زمان بارداری، مسئول اکثر موارد بیماری انکلوزیون سایتومگالیک هستند. نوزادان و کودکان مبتلا به عفونت های تحت بالینیCMV، منبع اصلی مواجهه هستند. سایر عفونت های مادرزادی ناشی از فعال شدن مجدد عفونت‌های نهفته مادری هستند. انتقال داخل رحمی در این موارد عود بیماری شایع نیست (حدود ۱٪).

عفونت هایCMV به طور قابل توجهی در جوامع مبتلایان به سرکوب ایمنی افزایش می یابد؛ دریافت‌کنندگان پیوند اغلب دچار عفونت هایی می‌شوند که بیشتر حاصل فعال شدن مجدد ویروس نهفته خود آن هاست.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

تشخیص آزمایشگاهی بیماری انکلوزیون سیتومگالیک (CID) در نوزادان تازه متولد شده به خاطر اهمیت آن در مدیریت آموزشی و درمانی کودک و سهولت مشاورۀ والدین بسیار مهم است. علاوه بر این، عفونت های CMV تهدید کنندۀ حیات در افراد مبتلا به سرکوب ایمنی به میزان زیادی گسترش یافته است، و برای به کارگیری درمان مناسب، تشخیص اولیه مورد نیاز است. شرایط بالینی ممکن است بسیار با اهمیت باشد، نه تنها به خاطر تشخیص CMV بلکه برای پی بردن به اینکه آیا بیمار یک عفونت حاد فعال را به جای یک عفونت

نهفته یا مزمن خفیف سپری می کند، و یا اینکه اگر فرد در دوره عفونت حاد است، منشأ آن یک عفونت اولیه اگزوژن است یا در اثر فعال شدن مجدد یک عفونت پایدار با منشأ اندوژن به وجود آمده است. به خاطر اینکه ویروس را می توان به صورت متناوب در ادرار و بزاق حاملین بدون نشانه پیدا کرد، این نمونه ها فقط برای تحقیقات اپیدمیولوژیک و یا برای تشخیص ویروس (آنتی ژن و یا DNA ویروسی) در نوزادان مشکوک به CID مناسب هستند. در سایر وضعیت های بالینی لکوسیت های خون نمونه های بهتری هستند، زیرا ویرمی وابسته به سلول است، به خصوص هنگامی که تیتر آن بالا بوده و با بیماری پیشرونده در ارتباط باشد. آزمایشات کمی بـرای تعیین بار ویـروسی (Viral load) درحال گسترش است و به خاطر نیاز به درمان ضدویروسی سریع به کار می رود. سایر نمونه های مناسب برای موارد بالینی خاص شامل Bronchoalveolar lavage و سایر ارگان ها که به وسیلهٔ بیوپسی یا اتوپسی تهیه می شوند، می باشد.

CMV از کشت سلول های فیبروبلاست انسانی ایزوله شده است. با سانتریفیوژ کردن نمونه در سرعت کم می توان حساسیت تست را افزایش داد. تکثیر ویروس بسیار آهسته است، به طوری که هر چرخهٔ تکثیر با دوره نهفتگی حدود ۳۶ تا ۴۸ ساعت همراه است. به علاوه، ویروس های جدید تمایل دارند که در ارتباط با سلول باقی بمانند، به طوری که انتشار آن ها به طور عمده به سلول های مجاور صورت می گیرد؛ در نتیجه CPE ممکن است برای ماه ها قابل مشاهده نباشد، اما سلول های غول پیکر همراه با گرانول های سیتوپلاسمی قابل تشخیص می باشند. در صورت رنگ آمیزی، این سلول ها به صورت چند هسته ای با اجسام بزرگ انکلوزیون داخل هسته ای پاتوگنومونیک و همچنین توده های گرد و صاف سیتوپلاسمیک اسیدوفیل دیده می شوند. از ۲۴ تا ۳۶ ساعت پس از تلقیح، می توان کشت تک لایه را با تکنیک های ایمونوفلورسانس یا ایمونوپراکسیداز با استفاده از از آنتی بادی منوکلونال بر ضد آنتی ژن هسته ای IE (IE nuclear antigen) رنگ آمیزی کرد. این کار تشخیص سریع را ممکن می کند، اما در هنگام گسترش CPE حساسیت چندانی ندارد. فقط یک سروتیپ از CMV انسانی وجود دارد، اما سویه های مختلف دیگر را را نیز می توان به وسیلهٔ خنثی سازی کینتیک (Kinetic neutralization) و نقشه برداری اندونوکلئازهای محدود کننده از هم تمییز داد. تکنیک اخیر را می توان برای شناسایی منبع ویروس به کار برد.

روش های تشدید کننده شامل PCR که برای شناسایی CMV DNA گسترش یافته اند، نه تنها حساسیت کمتری از کشت سلولی ندارند، بلکه بسیار سریع تر هستند. اطلاعات قابل خواندن را می توان به هر روشی از جمله رنگ آمیزی ساده اتیدیوم برماید محصول حاصل از جداسازی به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز یا دات بلات (Dotblot) و دیگر روش های مناسب هیبریدیزاسیون DNA (Hybridization DNA) به دست آورد. اگر دقت کار مدنظر باشد، PCR قابل تکرارتر از شناسایی آنتی ژن در خون به وسیله رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس و ایمونوپرواکسیداز لکوسیت های خون محیطی با آنتی بادی منوکلونال است.

- IgM اختصاصی CMV، تنها شاخص در دسترس است که می تواند به وسیلهٔ EIA با استفاده از کلون کردن ژنتیکی فسفوپروتئین ماتریکس pp۱۵۰ (Matrix phosphoprotein pp۱۵۰) به عنوان آنتی ژن، شناسایی شود. به دلیل اینکه IgM نمی تواند از جفت عبور کند، یافتن IgM اختصاصی CMV در نوزادان دلیل بر عفونت پریناتال است.

اهدا کنندگان خون و بافت را می توان برای یافتن عفونت نهفته CMV غربال گری کرد، و دریافت کنندگان را برای تعیین میزان حساسیت به وسیلهٔ تست وجود آنتی بادی بر علیه آنتی ژن ایمونودومینانت pp۱۵۰ با استفاده از تست آگلوتیناسیون لاتکس سریع (Rapid Latex agglutination) و یا بیشتر با تکیه بر EIA بررسی کرد.

ویروس اپشتین– بار (Epstein-Barr Virus)

EBV هرپس ویروس است که در همه جا حضور دارد و عامل ایجادکننده منونوکلئور عفونی حاد می‌باشد. این ویروس با ایجاد کارسینوم نازوفارنکس، لنفوم بورکیت، لنفوم‌های هوجکین (Hodgkin) و غیر هوجکین (non-Hodgkin)، اختلالات لنفوپرولیفراتیو دیگر در مبتلایان به نقص ایمنی، و کارسینوم معده ارتباط دارد.

EBV در تمام نقاط دنیا شایع است و بیش از ۹۰ درصد بالغین دارای آنتی بادی ضد EBV هستند. این ویروس عمدتاً از طریق تماس با ترشحات حلقی – دهانی منتقل می شود. در مناطق در حال توسعه، عفونت در اوایل زندگی رخ می دهد، به طوری که بیش از ۹۰ درصد کودکان تا ۶ سالگی آلوده می شوند. این عفونت ها در اوایل کودکی معمولاً بدون ایجاد بیماری قابل تشخیص ایجاد می شوند. عفونت های غیر آشکار منجر به ایجاد ایمنی دائمی نسبت به منونوکلئوز عفونی می شوند. در کشورهای صنعتی بیش از ۵۰ درصد عفونت های EBV تا اواخر نوجوانی و اوایل جوانی به تأخیر می افتد. تقریباً در نیمی از این موارد، عفونت به صورت منونوکلئوز عفونی خود را نشان می دهد. تخمین زده می شود که سالانه ۱۰۰۰۰۰ مورد از منونوکلئوز عفونی در ایالات متحده رخ می دهد.

هیچ واکسنی برای EBV وجود ندارد.

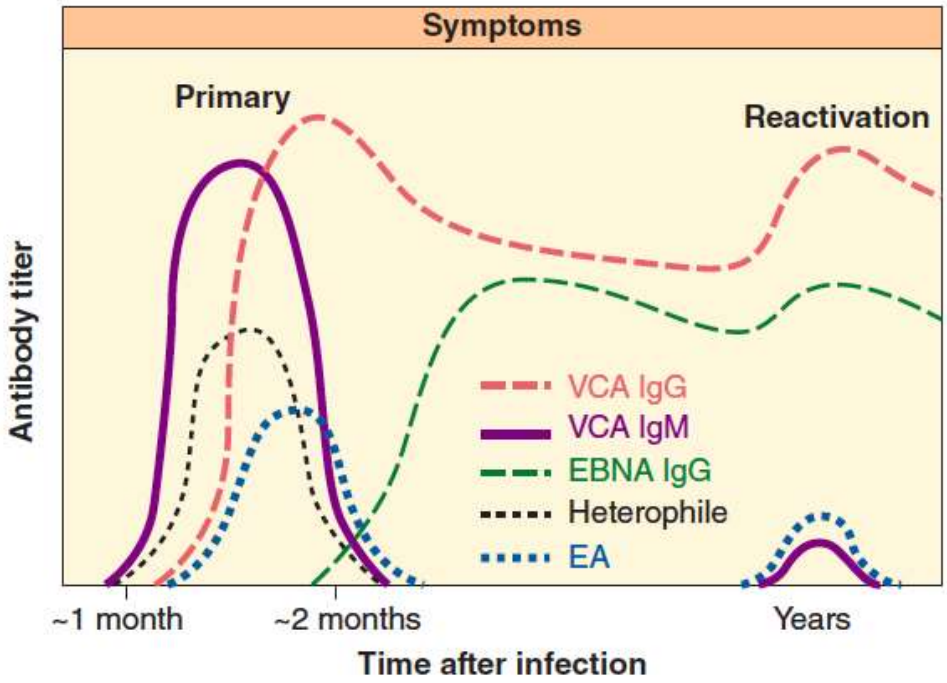
◄ تشخیص آزمایشگاهی

تصویر بالینی منونوکلئوز عفونی به حدی متنوع است که برای تشخیص به تأیید آزمایشگاهی نیاز دارد که بر اساس (۱) مقادیر متفاوت گلبول های سفید خون؛ (۲) آنتی بادی های هتروفیل و (۳) آنتی بادی اختصاصی EBV می باشد. در هفته دوم بیماری، تعداد گلبول های سفید خون، به ۱۰ تا ۲۰ هزار در میلی متر مکعب و یا حتی بیشتر می رسد. تعداد لنفوسیت ها و مونوسیت ها به ۶۰ تا ۸۰ درصد این مقدار می رسد. از این تعداد، حداقل ۱۰٪ تا حداکثر بیش از ۲۵٪ **لنفوسیت ها آتیپیک** (سلول های پلئومورفیک بزرگ، با واکوئل های سیتوپلاسمی بازوفیلیک و هسته لوبوله شده) هستند، که به مدت دو هفته تا چند ماه باقی می مانند.

سال ها پیش پائول و بونل (Paul and Bunnell) مشاهده کردند که سرم بیماران دچار تب گلاندولار، اریتروسیت های گوسفند را آگلوتینه می کند. اکنون مشخص شده است که مسئول ایجاد آگلوتیناسیون فقط یک نوع از آنتی بادی های IgM هتروفیل است که توسط عفونت EBV القاء شده است. هرچند **که تست پائول – بونل** (Paul and Bunnell test) هنوز هم یک هدف تشخیصی معتبر است. ابتدا از سرم به دست آمده از سلول های کلیه خوکچه برای جداسازی آنتی بادی فورسمن (و آنتی بادی بیماری سرم، که این روزها بسیار نادر است) استفاده شد. کیت های تجاری اسلاید آگلوتیناسیون اریتروسیت اسب، در دسترس است. اگرچه آنتی بادی

های هتروفیل در بدن فقط به مدت یک ماه ساخته می شوند، نتیجه آزمایش اغلب در بچه ها منفی است و همچنین اختصاصیت بالایی نیز ندارد. **ox red cell hemolysis Test**، تست دیگری برای تشخیص آنتی بادی هتروفیل می باشد، که نیاز به سرم ندارد و اختصاصی است اما برای یک تا دو ماه باقی می ماند.

آنتی بادی اختصاصی EBV به عنوان یک شاخص قابل اعتمادتر برای تشخیص عفونت پیشنهاد شده است در نتیجه EIA جایگزین ایمونوفورسانس (IF) که در گذشته به کار می رفت و بسیار پیچیده و دست و پاگیر بود، شد. الگوی تیپیک پاسخ آنتی بادی به آنتی‌ژن‌های اختصاصی EBVپس از عفونت اولیه در شکل ۱ نشان داده شده است. در اوایل بیماری حاد، افزایش موقتی در آنتی بادی IgMبر علیه آنتی‌ژن کپسید ویروس اتفاق می‌افتد که ظرف چند هفته با آنتی‌بادی IgG بر علیه این آنتی ژن جایگزین شده و برای تمام عمر باقی می ماند. کمی بعد، آنتی بادی بر علیه آنتی ژن های زودرس تولید می شود که تا ماه ها باقی می مانند. چندین هفته پس از عفونت حاد، آنتی بادی بر علیه EBNA و آنتی ژن غشایی افزایش می‌یابد و برای تمام عمر باقی می ماند.



شکل ۱. الگوی تیپیک تولید آنتی بادی بر علیه آنتی ژن های اختصاصی ویروس اپشتین – بار (EBV) پس از عفونت اولیه. افراد مبتلا به عفونت اخیر، آنتی بادی های IgM و IgG بر علیه آنتی ژن کسپید ویروسی (VCA IgG, VCA IgM) تولید می کنند؛ تنها آنتی بادی IgG سال ها باقی می ماند. آنتی بادی های هتروفیل موقتی که قادرند سلول های گوسفند را آگلوتینه کنند، تولید می شوند. آنتی بادی بر علیه آنتی ژن های زودرس (EA) در بسیاری از بیماران تولید شده و تا ماه ها باقی می ماند. چندین هفته پس از عفونت حاد، آنتی بادی بر علیه آنتی ژن های هسته ای EBV (EBNA) و آنتی ژن غشایی ظاهر می شود و برای تمام عمر باقی می ماند.

تست آگلوتیناسیون هتروفیل با اختصاصیت کمتر برای تشخیص عفونت های EBV قابل استفاده است. در دوره منونوکلئوز عفونی، اکثر بیماران به صورت موقتی آنتی بادی های هتروفیل تولید می کنند که سلول های گوسفند را آگلوتینه می کنند. تست های فوری (spot

test) تجاری به راحتی قابل انجامند. روابط آنتی ژنی تصادفی، اختصاصیت این واکنش هتروفیل را تأمین می کند.در اوایل بیماری میزان آنتی بادی IgM بر ضد آنتی ژن VCA کپسید EBV بالا می رود و به سرعت در طول سه ماه کاهش می یابد؛ بنابراین شاخص خوبی برای تشخیص عفونت اولیه است. هر چند که، به خاطر نتایج مثبت و منفی کاذب در تست IgM، بیشتر تمایل به سمت استفاده از آنتی ژن کلون شده EBV به روش ژنتیکی برای غربال کردن آنتی بادی های IgG و بررسی نتایج حاصل از آن است. به خاطر اینکه آنتی بادی بر علیه EBNA در ماه اول بعد از بیماری اولیه پدیدار می شود و سپس پایدار می ماند، افزایش تیتر آنتی بادی تشخیصی است (شایان ذکر است که، آنتی بادی بر علیه EBNA-۱ به طور خاص در بسیاری از بیماران دچار سرکوب ایمنی با عفونت شدید و فعال مزمن، ناپدید می شود). از سوی دیگر، آنتی بادی بر علیه آنتی ژن اولیه EA-D برای عفونت حاد، عفونت فعال شده مجدد، یا عفونت فعال مزمن تشخیصی است، و سریعاً کاهش می یابد و در حاملین بدون نشانه قابل شناسایی نیست. IgG و یا آنتی بادی تام (توتال) بر علیه VCA هدف خوبی را برای ارزیابی عفونت گذشته و وضعیت ایمنی ارائه می کنند.

به خاطر اینکه سلول های کاملاً مجاز برای تکثیر EBV هنوز شناخته نشده اند، ایزوله کردن ویروس برای اهداف تشخیصی به ندرت صورت می گیرد. تنها روش رشد EBV در محیط *in vitro* تلقیح ترشحات آلوده اوروفارنژیال یا لکوسیت های خون محیطی به لنفوسیت های بند ناف است و در نهایت برای نشان دادن نامیرایی و تولید رده سلولی لنفوبلاستوئید می توان آن ها را به طور موفقیت آمیزی به وسیلهٔ آنتی بادی های منوکلونال فلورسانس برضد EBNA رنگ آمیزی کرد. مسئله دیگر در ایزوله کردن ویروس (یا استفاده از PCR برای پیدا کردن DNA ویروسی در سلول های عفونی) در تشخیص روتین آزمایشگاهی بیماری القاء شده بر اثر EBV این است که نسبت بالایی از افراد بدون نشانه ژنوم ویروس را در حالت نهفته حمل می کنند و یا ویروس را برای تمام عمر به محیط پخش می کنند.

فصل ۵:

ویروس های هپاتیت

هپاتیت ویروسی یک بیماری سیستمیک که به طور عمده کبد را درگیر می کند. اکثر موارد هپاتیت حاد ویروسی کودکان و بالغین توسط یکی از این عوامل ایجاد می گردد: ویروس هپاتیت A (HAV)، عامل هپاتیت ویروسی نوع A (هپاتیت عفونی)، ویروس هپاتیت B (HBV)، مرتبط با هپاتیت ویروسی از نوع B (هپاتیت سرمی)، ویروس هپاتیت C (HCV) (عامل شایع هپاتیت در اثر انتقال خون)، و ویروس هپاتیت (D)، یک ویروس ناقص که وابسته به عفونت همزمان با HBV بوده یا ویروس هپاتیت E (HEV) که عامل هپاتیت از طریق گوارشی می باشد. ویروس های دیگری از قبیل ویروس تب زرد، سیتومگالوویروس، ویروس اپشتین بار، ویروس هرپس سیمپلکس، ویرو سرخجه و انتروویروس ها نیز شناخته شده اند که می توانند باعث هپاتیت تک گیر شوند که در فصل های دیگر مورد بحث قرار گرفته اند. ویروس های عامل هپاتیت، باعث التهاب حاد کبد شده و موجب بیماری بالینی می شوند که با تب، علائم گاستروانتریت از قبیل تهوع، استفراغ و یرقان همراه می باشند. صرفنظر از نوع ویروس، آسیب های هیستوپاتولوژیکی مشابه در زمان بیماری حاد مشاهده شده است. نام ویروس های هپاتیت، آنتی ژن ها و آنتی بادی های آن ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

شکل ۱. نام گذاری و تعاریف ویروس های هپاتیت، آنتی ژن ها و آنتی بادی ها

بیماری	اجزای سیستم	تعریف
هپاتیت A	HAV	ویروس هپاتیت A، عامل اتیولوژیک هپاتیت عفونی، یک پیکورناویروس، پروتوتیپ جنس هپاتوویروس
	Anti-HAV	آنتی بادی علیه HAV، قابل مشاهده در شروع بیماری، پایدار در تمام عمر
	IgM anti-HAV	آنتی بادی از نوع IgM علیه HAV، نشان دهنده عفونت اخیر با هپاتیت A؛ حداکثر به مدت ۶-۴ ماه پس از عفونت مثبت می باشد.
هپاتیت B	HBV	ویروس هپاتیت B، عامل اتیولوژیک هپاتیت سرمی، یک هپادناویروس
	HbsAg	آنتی ژن سطحی هپاتیت B، آنتی ژن(های) سطحی HBV که با مقادیر بالا در سرم قابل مشاهده می باشند؛ چندین زیرتیپ از این آنتی ژن شناسایی شده است.
	HbeAg	آنتی ژن e هپاتیت B، مرتبط با نوکلئوکپسید HBV؛ نشان دهنده همانندسازی ویروس، آنتی ژن در گردش در سرم
	HbcAg	آنتی ژن مرکزی هپاتیت B
	Anti-HBs	آنتی بادی علیه HbsAg، نشان دهنده عفونت قبلی و ایمنی علیه HBV، حضور آنتی بادی غیرفعال از HBIG یا پاسخ ایمنی از واکسن HBV
	Anti-Hbe	آنتی بادی علیه HbeAg، حضور آن در سرم فرد ناقل HbsAg نشان دهنده تیتر پایین HBV است.
	Anti-HBc	آنتی بادی علیه HbcAg، نشان دهنده عفونت با HBV در زمان نامشخصی در گذشته
	IgM anti-HBc	آنتی بادی از نوع IgM علیه بخش مرکزی HBV (Core)، نشان دهنده عفونت اخیر با HBV؛ به مدت ۶-۴ ماه پس از عفونت مثبت باقی می ماند.
هپاتیت C	HCV	ویروس هپاتیت C، عامل اتیولوژیک شایع هپاتیت پس از تزریق خون، یک فلاوی ویروس، جنس هپاسی ویروس
	Anti-HCV	آنتی بادی علیه HCV
هپاتیت D	HDV	ویروس هپاتیت D، عامل اتیولوژیک هپاتیت دلتا، تنها در حضور HBV باعث عفونت می شود.
	HDAg	آنتی ژن دلتا (Delta-Ag)، در اوائل عفونت حاد HDV قابل مشاهده است.

	Anti-HD	آنتی بادی علیه آنتی ژن دلتا (Anti-delt)، نشان دهنده عفونت گذشته یا فعلی با HDV
هپاتیت E	HEV	ویروس هپاتیت E، ویروس هپاتیت منتقله از راه گوارشی، اپیدمی های بزرگی در آسیا، شمال و جنوب آفریقا و مکزیک ایجاد می کند. انتقال از طریق آب یا مدفوعی–دهانی، یک هپه ویروس
ایمونوگلوبولین ها	IG	ایمونوگلوبولین USP، حاوی آنتی بادی علیه HAV؛ آنتی بادی علیه HbsAg، HCV یا ویروس نقص ایمنی انسان
	HBIG	ایمونوگلوبولین هپاتیت B، حاوی تیتر بالایی از آنتی بادی های علیه HBV

ویژگی های بالینی و اپیدمیولوژی هپاتیت های نوع A، B و C در شکل ۲ نشان داده شده است.

شکل ۲. ویژگی های بالینی و اپیدمیولوژی هپاتیت های نوع A، B و C

ویژگی	هپاتیت ویروسی نوع A	هپاتیت ویروسی نوع B	هپاتیت ویروسی نوع C
دوره کمون	۱۰-۵۰ روز (متوسط ۳۰-۲۵)	۵۰-۱۸۰ روز (متوسط ۹۰-۶۰)	۱۵-۱۶۰ روز (متوسط ۵۰)
انتشار در اکثر سنین	کودکان، بزرگسالان جوان	۱۵-۲۹ سال، نوزادان	بزرگسالان
شیوع فصلی	در تمام طول سال، اما اوج آن در پاییز	در تمام طول سال	در تمام طول سال
راه انتقال	عمدتاً مدفوعی-دهانی	عمدتاً تزریقی	عمدتاً تزریقی
وجود ویروس در خون			
خون	۲ هفته قبل تا کمتر از ۱ هفته پس از یرقان	ماه ها تا سال ها	ماه ها تا سال ها
مدفوع	۲ هفته قبل تا ۲ هفته پس از یرقان	وجود ندارد	احتمالاً وجود ندارد
ادرار	به ندرت	وجود ندارد	احتمالاً وجود ندارد
بزاق، منی	به ندرت (بزاق)	اکثراً وجود دارد	وجود دارد (بزاق)
ویژگی‌های بالینی و آزمایشگاهی			
شروع بیماری	ناگهانی	تدریجی	تدریجی
تب بیش از ۳۸°C (۱۰۰/۴°F)	شایع	شیوع کم	شیوع کم
مدت افزایش آمینوترانسفراز	۱-۳ هفته	۱-۶ ماه	۱-۶ ماه
ایمونوگلوبولین (سطح IgM)	بالا	طبیعی تا به طور خفیف بالا	طبیعی تا به طور خفیف بالا
عوارض	غیرشایع، بدون مزمن شدن	احتمال مزمن شدن ۱۰-۵٪ (۹۵٪ نوزادان)	احتمال مزمن شدن ۹۰-۷۰٪
میزان مرگ و میر (موارد یرقانی)	کمتر از ۰/۵٪	کمتر از ۲-۱٪	۱-۰/۵٪
HbsAg	وجود ندارد	وجود دارد	وجود ندارد
ایمنی			
همولوگ	دارد	دارد	احتمالاً ندارد
هترولوگ	ندارد	ندارد	ندارد
مدت زمان	احتمالاً در تمام طول عمر	احتمالاً در تمام طول عمر	؟

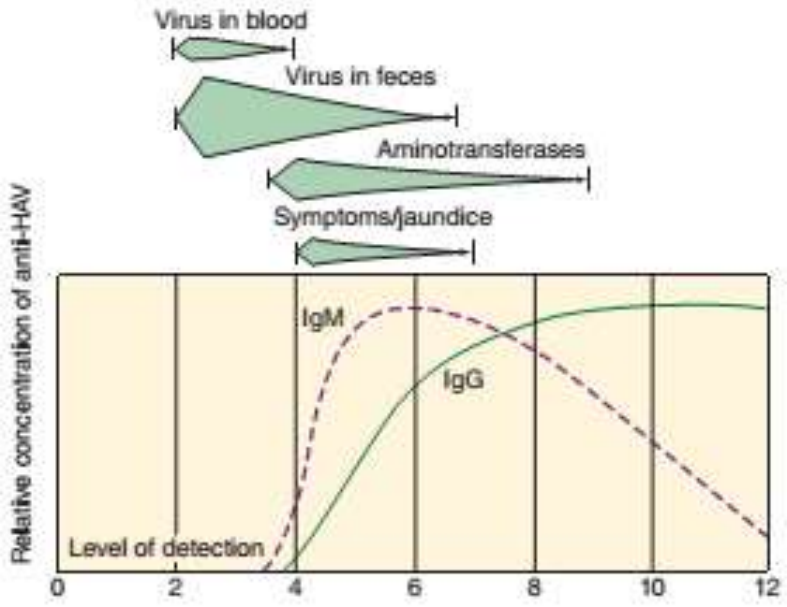
ایمنوگلوبولین داخل عضلانی	معمولاً مانع بروز یرقان می-شود	اگر ایمنوگلوبولین قدرت کافی علیه HBV را داشته باشد، از یرقان جلوگیری می کند	؟

◄ تشخیص سرولوژیک هپاتیت نوع A

رویدادهای بالینی، ویروس شناسی و سرولوژی پس از آلودگی با HAV در شکل ۱ و جدول ۳ نشان داده شده است. در بیمار مبتلا به هپاتیتA ، ذرات ویروس را می توان در مدفوع فیلتر شده از طریق میکروسکوپ ایمونوالکترون، مورد شناسایی قرار داد. این ویروس در اوائل بیماری در مدفوع وجود دارد و ۲ هفته پس از شروع یرقان ناپدید می گردد.

HAV را می توان در کبد، مدفوع، صفرا و خون افرادی که به طور طبیعی آلوده شده اند پریمات های غیرانسانی به طور تجربی آلوده شده اند، توسط آزمون های ایمونواسی، هیبریدیزاسیون اسید نوکلئیک یا PCR شناسایی نمود. بالاترین تیتر HAV در مدفوع بیمار، حدود ۲ هفته قبل از یرقان تا ۲ هفته بعد از آن مشاهده می شود.

Anti-HAV از نوع ایمنوگلوبولین M (IgM) در حالت حاد بیماری ظاهر می شود و مقدار آن حدود ۲ هفته بعد از افزایش آنزیم های کبدی به اوج خود می رسد. Anti-HAV از نوع IgM معمولاً در مدت ۶-۳ ماه به مقدار غیرقابل مشاهده کاهش می یابد. Anti-HAV از نوع IgG به محض بروز بیماری ظاهر شده و برای سال ها باقی می ماند. بنابراین، تشخیص هپاتیت A با تعیین Anti-HAV اختصاصی از نوع IgM، در خون فردی که مبتلا به عفونت حاد است، تأیید می شود. روش انتخابی برای اندازه گیری آنتی بادی های HAV معمولاً از طریق الایزا می باشد.



شکل ۱. رویدادهای ایمونولوژی و بیولوژی مرتبط با عفونت ویروس هپاتیت A. IgG: ایمنوگلوبولین G؛ IgM: ایمنوگلوبولین M.

جدول ۳. تفسیر مارکرهای سرولوژیک در در بیماران مبتلا به هپاتیت هپاتیت های A، B و C

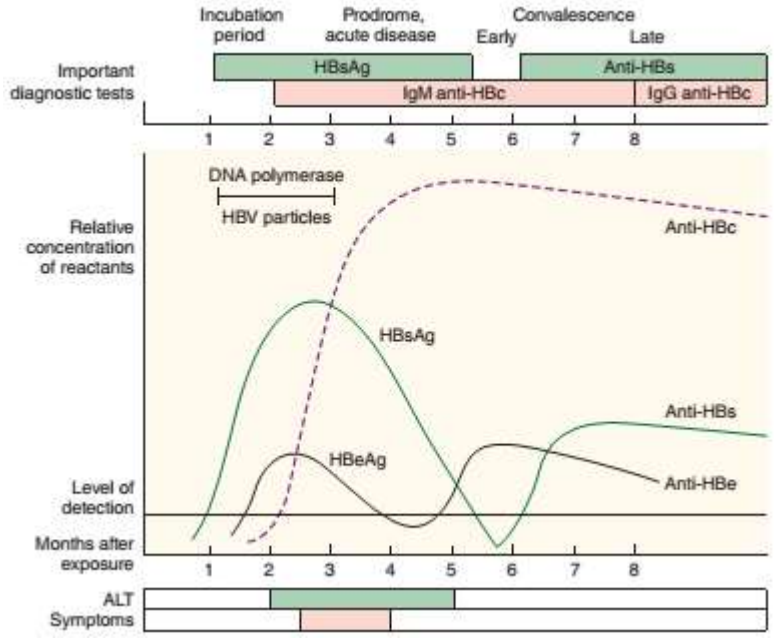
نتایج آزمون	تفسیر
Anti-HAV IgM مثبت	عفونت حاد با HAV
Anti-HAV IgG مثبت	عفونت گذشته با HAV
Anti-HCV مثبت	عفونت اخیر یا گذشته با HCV
Anti-HD و HbsAg مثبت	عفونت با HDV
Anti-HD و Anti-HBc IgM مثبت	عفونت همزمان با HDV و HBV
Anti-HD مثبت و Anti-HBc منفی	عفونت مضاعف HBV مزمن با HDV

◄ تشخیص سرولوژیک هپاتیت نوع B

رویدادهای بالینی و سرولوژی پس از آلودگی با HBV در شکل ۲ و جدول ۴ خلاصه شده است. فعالیت DNA پلیمراز، HBV DNAو HbeAgکه نشان دهنده مرحله ویرمی هپاتیت B می باشد، در اوائل دوره کمون بیماری به مدت کوتاهی پس از ظهور اولین HbsAg مشاهده می شود. مقدار زیادی از ذرات HBV (تا ۱۰۱۰ ذره در هر میلی لیتر) در خون در طول مرحله اولیه عفونت وجود دارد که قابلیت سرایت آن در این حالت، حداکثر است HbsAg . معمولاً ۶-۲ هفته قبل از بروز شواهد بالینی و بیوشیمیایی هپاتیت قابل شناسایی است و در سرتاسر دوره بالینی بیماری باقی می ماند، اما تا شش ماه بعد از آلودگی فرد با ویروس ناپدید می گردد.

مقدار زیادی Anti-HBc از نوع IgM اختصاصی معمولاً در هنگام شروع بیماری ظاهر می شود. چون این آنتی بادی علیه بخش داخلی HBV که ۲۷ نانومتر است، ساخته می شود، بنابراین، ظهور آن در سرم، نشان دهنده همانندسازی ویروس می باشد. در ابتدا آنتی بادی علیه HbsAg در دوره متغیر پس از ناپدید شدن HbsAg مشاهده می شود. قبل از ناپدید شدنHbsAg ، آنتی بادی علیه HbeAg جایگزین HbeAg می شود که نشانه شروع مرحله خفیف بیماری است. سطوح Anti-Hbe معمولاً پس از ۶ ماه قابل مشاهده نمی باشد.

با این تعریف، ناقلین مزمن HBV، افرادی هستند که HbsAg آن ها به مدت بیش از ۶ ماه با وجود HbeAg یا Anti-Hbe پایدار است. HbsAg ممکن است سال ها پس از ناپدید شدن HbeAg پایدار بماند. برخلاف آن که تیترهای بالای Anti-HBc از نوع IgM اختصاصی در سرم اکثر ناقلین مزمن HbsAg یافت می شود. مقدار کمی از HBV DNA معمولاً در سرم بیماران تا زمانی که HbsAg حضور دارد، قابل مشاهده است. مفیدترین روش ها شامل الایزا، برای مشاهده آنتی ژن ها و آنتی بادی های HBV و PCR برای DNA ویروسی می باشد.



شکل ۲. رویدادهای بالینی و سرولوژی بیمار مبتلا به عفونت ویروس هپاتیت B رخ می دهد. تست های تشخیصی رایج و تفسیر آن ها در جدول ۳ نشان داده شده است. ALT: آلانین آمینوترانسفراز؛ Anti-HBc: آنتی بادی علیه آنتی ژن هسته مرکزی هپاتیت B؛ Anti-Hbe: آنتی بادی علیه آنتی ژن e هپاتیت B؛ Anti-HBs: آنتی بادی علیه آنتی ژن سطحی هاتیت B؛ HbeAg: آنتی ژن e هپاتیت B؛ HbsAg: آنتی ژن سطحی هپاتیت B؛ HBV: ویروس هپاتیت B؛ IgG: ایمنوگلوبولین G؛ IgM: ایمنوگلوبولین M.

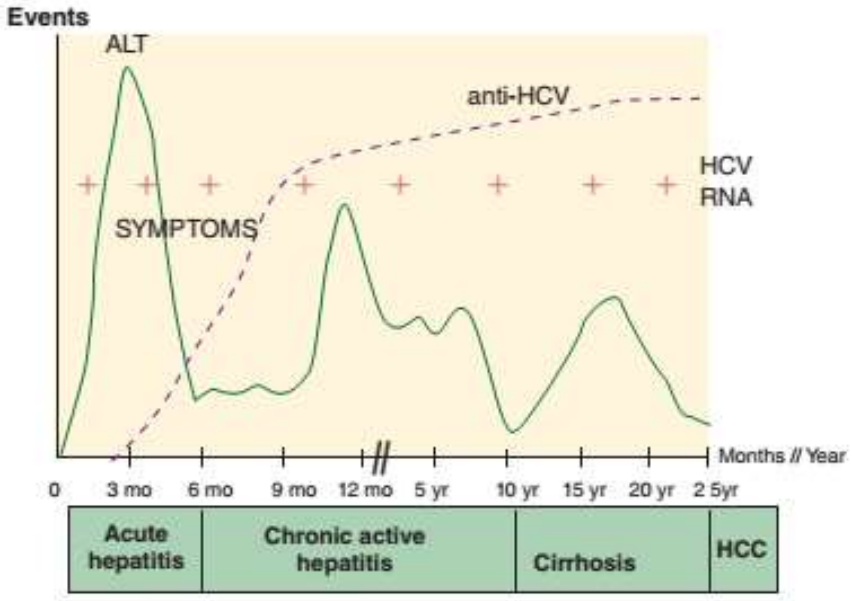
جدول ٤. تفسیر مارکرهای سرولوژی ویروس هپاتیت B در بیماران مبتلا به هپاتیت

نتایج آزماش ها			تفسیر
HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	
مثبت	منفی	منفی	اوائل عفونت HBV حاد، برای فقدان واکنش غیراختصاصی، اثبات آن ضروری است.
مثبت	(±)	مثبت	عفونت HBV، فعال یا مزمن، تفکیک با Anti-HBc از نوع IgM، تعیین مقدار فعالیت همانندسازی (عفونت زایی) با HbeAg یا HBV DNA
منفی	مثبت	مثبت	B و ایمنی به هپاتیت HBVنشان دهنده عفونت قبلی
منفی	منفی	مثبت	احتمالاً شامل: عفونت با HBV در زمان گذشته باشد؛ ناقل HBV با سطح کم "low level" باشد؛ در فاصله بین ناپدید شدن HbsAg و پیدایش Anti-HBs باشد؛ یا واکنش مثبت کاذب یا غیراختصاصی باشد. بررسی با Anti-HBc از نوع IgM با واکسینه شدن با HbsAg یا هر دو انجام گیرد. هنگامی که Anti-Hbe حضور دارد، نشان دهنده فعالیت Anti-HBc می باشد.
منفی	منفی	منفی	هرگز با HBV آلوده نشده است. احتمالاً شامل عامل عفونی دیگر، آسیب سمی به کبد، اختلال در ایمنی، بیماری ارثی کبد یا بیماری مجرای صفراوی
منفی	مثبت	منفی	پاسخ واکسن

◄ تشخیص سرولوژیک هپاتیت نوع C

رویدادهای بالینی و سرولوژی در شکل ۳ نشان داده شده است. بیشتر عفونت های اولیه بدون علامت یا از نظر بالینی خفیف هستند (۳۰-۲۰ درصد یرقان، تنها علائم غیراختصاصی نظیر بی اشتهایی، بی حالی و درد شکمی دارند). آزمون های سرولوژی برای شناسایی عفونت HCV موجود می باشد. آزمون آنزیم ایمونواسی معمولاً آنتی بادی ها در برابر HCV را مشخص کرده اما عفونت حاد، مزمن یا بهبود یافته را از هم تشخیص نمی دهد (جدول ۳). آنتی بادی های Anti-HCV در ۷۰-۵۰٪ بیماران در شروع علائم بیماری دیده می-شوند، در حالی که در بقیه، بروز آنتی بادی ها تا ۶-۳ هفته به تأخیر می افتد. آنتی بادی هایی نیز علیه هسته (Core)، پوشینه و پروتئین های NS۳ و NS۴ به وجود می آیند و تیتر نسبتاً پایینی دارند. روش هایی که بر اساس اسید نوکلئیک هستند (به عنوان مثال، PCR با استفاده از رونویسی معکوس)، وجود HCV RNA در گردش را برای پیگیری حال بیمارانی که درمان ضدویروسی دریافت می کنند، مفید می باشد. روش های اسید نوکلئیک ویروسی، جهت تعیین ژنوتیپ ایزوله های HCV به کار می روند.

عفونت های مخفی HBV (Occult HBV infection)، به طور فراوان (در حدود ۳۳٪) در بیماران مبتلا به بیماری مزمن کبدی ناشی از HCV رخ می دهند. عفونت های مخفی آن هایی هستند که بیماران، HBsAg قابل مشاهده بوده، اما HBV DNA را می توان در نمونه های کبد یا سرم شناسایی کرد. عفونت های همزمان غیرقابل تشخیص HBV ممکن است در پزشکی اهمیت داشته باشند.



شکل ۳. رویدادهای بالینی و سرولوژی در ارتباط با عفونت ویروس هپاتیت C (HCV). ALT: آلانین آمینوترانسفراز؛ Anti-HCV: آنتی بادی علیه HCV؛ HCC: کارسینوم هپاتوسلولار.

فصل ۶:

پیکورناویروس ها

پیکورناویروس ها یک خانواده بزرگی را تشکیل می دهند، که تعداد زیادی ویروس در این گروه قرار دارند اما در زمینه اندازه ویریون و پیچیدگی ژنتیکی، یکی از کوچک ترین ویروس ها محسوب می شود. این ویروس ها شامل دو گروه عمده انتروویروس ها و رینوویروس ها می باشند. انتروویروس ها ساکنین موقتی مجرای گوارشی بوده و از گلو و روده کوچک جدا شده اند. رینوویروس ها به طور عمده از بینی و گلو به دست می آیند.

بسیاری از پیکورناویروس ها، بیماری هایی در انسان ایجاد می کنند عبارتند از: فلج شدید تا مننژیت آسپتیک، پلورودینی، میوکاردیت، ضایعات پوستی اگزما و وزیکولار، ضایعات پوستی-مخاطی، بیماری های تنفسی و روده ای، بیماری تب دار نامشخص، التهاب ملتحمه چشم و بیماری شدید عمومی نوزادان. به هر حال، میزان عفونت های بدون علامت خیلی بیشتر از بیماری های بالینی است. ویروس های مختلف ممکن است سندروم بالینی مشابهی را ایجاد کنند و از طرف دیگر، یک پیکورناویروس ممکن است سبب چندین سندروم بالینی شود. به علاوه بعضی سندروم های بالینی ایجاد شده توسط انتروویروس ها را نمی توان از علائم بیماری که توسط ویروس های دیگر ایجاد می شوند، از یکدیگر تشخیص داد. شدیدترین بیماری که توسط انتروویروس ها ایجاد می شود، فلج اطفال می باشد.

خانواده پیکورناویریده دارای ۱۲ جنس می باشد که عبارتند از: *انتروویروس* (انتروویروس ها و رینوویروس ها)، *هپاتوویروس* (ویروس هپاتیت A)، *کوبوویروس* (ویروس Aichi)، *پاراکوویروس* (پاراکوویروس ها)، *آفتوویروس* (ویروس های بیماری پا و دهان) و *کاردیوویروس* (کاردیوویروس ها). چهار گروه اول، شامل پاتوژن های مهم انسانی می باشند. رینوویروس ها از لحاظ تاریخی در جنس مجزایی قرار می گرفتند، اما در حال حاضر به عنوان عضوی از جنس انتروویروس در نظر گرفته می شود (جدول ۱). طیف میزبان های پیکورناویروس های تیپ های مختلف، متفاوت است و حتی در بین سویه های یک تیپ، تفاوت های زیادی دیده می شود. اکثر انتروویروس ها (پولیوویروس ها، اکوویروس ها و برخی از کوکساکی ویروس ها) می توانند در کشت های سلول های کلیه میمون و انسان در C□۳۷ تکثیر یابند، در صورتی که اکثر سویه های رینویروس فقط در سلول هایی که منشأ انسانی دارند در C□۳۳ تکثیر می یابند. کوکساکی ویروس ها در نوزاد موش خاصیت بیماری زایی دارد.

جدول ۱- ۱۸. برخی از اعضای خانواده پیکورناویریده

جنس	اعضاء	خصوصیات
انتروویروس	پولیوویروس (۳ سروتیپ) کوکساکی ویروس (A و B) (۲۳ سروتیپ) اکوویروس انسانی (۲۸ سروتیپ)	**همانندسازی در دستگاه گاستروانتریک؛ می تواند باعث مننژیت، انسفالیت، راش، کاردیت و بیماری ماهیچه ای گردند**
رینوویروس	رینوویروس انسانی	**دارای بیش از ۱۰۰ سروتیپ؛ باعث سرماخوردگی می شود؛ به pH پایین حساس است**
کاردیوویروس	ویروس انسفالومیوکاردیت ویروس انسفالومیوکاردیت Theiler's murine	**موش و سایر پستانداران را آلوده می‌سازد؛ باعث کاردیت یا بیماری نورولوژیک می شود**
آفتوویروس	ویروس بیماری پا و دهان	**باعث اپیدمی در نشخوارکنندگان اهلی می شود؛ به pH پایین حساس است**
هپاتویروس	ویروس هپاتیت A	**باعث هپاتیت حاد در انسان می‌گردد**

ویروس پولیو (فلج اطفال)

ویروس فلج اطفال ساکن روده بوده و به مدت چندین هفته از مدفوع دفع می گردد. پولیوویروس ها، عمدتاً از طریق مسیر مدفوعی- دهانی دفع می شوند. آلوده شدن مستقیم دست ها با مدفوع و آلودگی غذا و ظروف احتمالاً در اکثر موارد باعث انتشار فرد به فرد می شود که این مسئله به خصوص در مکان های پرجمعیت و در شرایط عدم رعایت بهداشت دیده می شود. به طور غیرمعمول، اپیدمی های ناگهانی در نتیجه آلوده شدن مخازن آب با مدفوع و فاضلاب به وجود می آید. انتشار تنفسی از فارنکس ممکن است اتفاق بیافتد. دو پیشرفت عمده به شدت اپیدمیولوژی پولیومیلیت را در طول چندین سال تغییر داده است. اول معرفی استانداردهای جدید بهداشت و بهسازی در بیشتر کشورهای پیشرفته جهان بر میزان پولیومیلیت در فلجی در نوجوانان و افراد بزرگسال تأثیرگذاشته است. کاهش انتشار ویروس ها از طریق مدفوعی= دهانی، انتشار پولیومیلیت و بروز عفونت را در کل جمعیت کاهش می دهد، در نتیجه اکثر افراد ایمنی اکتسابی طولانی مدت و تا زمان بلوغ ندارند.

پولیوویروس پس از هضم، ابتدا در فارنکس و سپس در رودۀ کوچک تکثیر می یابد. مشخص نیست که آیا فقط مخاط درگیر می شود یا قسمت های دیگر راه هم درگیر می کند؟ اما یقیناً بافت لنفوئیدی (لوزه ها و پلاک پیر) را گرفتار می کند. انتشار ویروس به گره های لنفاوی یاعث ویرمی شده و ویروس به تمام بدن منتشر می گردد. سیستم عصبی تنها در بعضی مواقع درگیر می شود. ویروس از طریق جریان خون به سلول‌های شاخ قدامی طناب نخاعی و کورتکس حرکتی مغز منتقل شده و ضایعات به وجود آمده به طور وسیع در سرتاسر طناب نخاعی و قسمت هایی از مغز منتشر می شود. عوامل مختلفی باعث ایجاد طیفی از تظاهرات بالینی می شود که رایج ترین آن ها پولیومیلیت نخاعی می باشد. دورۀ کمون پولیومیلیت فلجی به طور متوسط ۱ تا ۲

هفته است، اما بین ۳ روز تا ۱ ماه نیز دیده می شود. ایمنی اکتسابی ایجاد شده علیه ویروس پولیو دائمی می باشد. بارداری، شیوع فلجی را افزایش می دهد، برداشتن لوزه ها باعث افزایش خطر فلج بصل النخاع (Bulbar) می شود، و تزریقات منجر به التهاب از قبیل واکسن دیفتری- کزاز- سیاه سرفه (DTP)، خطر فلجی را بعد از یک دورهٔ کمون معمولی در عضو تزریق شده افزایش می دهد.

کودکانی که با ویروس پولیو مواجه شده اند، تنها کمتر از ۱٪ آن ها به فلج مبتلا می شوند. به نظر می رسد دوز ویروس، نوروویرولانس بودن ویروس و شاخص های رشد و فاکتورهای ژنتیکی و تغذیه ای میزبان، وضعیت ایمنی ذاتی و سرعت پاسخ ایمنی هومورال در بروز بیماری اهمیت دارند. چگونگی اهمیت هر کدام از این عوامل مشخص نیست. پولیوویروس تیپ ۱، مسئول ۸۵٪ موارد فلج پولیومیلیت می باشد. پولیوویروس در افرادی که واکسینه نشده اند، بر حسب پیشرفت عفونت یکی از پنج پیامد زیر را ایجاد می کنند:

۱- **بیماری بدون علامت،** درصورتی ایجاد می شود که عفونت ویروسی به ناحیهٔ حلق دهانی و روده محدود باشد. حداقل ۹۰٪ عفونت ها پولیوویروس بدون علامت هستند.

۲- **پولیومیلیت ناقص** (Abortive poliomyelitis) یا **بیماری مینور،** بیماری تب دار غیراختصاصی است که تقریباً در ۵٪ افراد آلوده رخ می دهد. تب، سردرد، بی حالی، گلودرد و استفراغ در فاصلهٔ ۳ تا ۴ روز بعد از مواجهه روی می دهند.

۳- **پولیومیلیت غیرفلجی یا مننژیت آسپتیک،** در ۱ تا ۲ درصد بیماران مبتلا به عفونت پولیومیلیت رخ می دهد. در این بیماری، ویروس به داخل سیستم عصبی مرکزی و مننژها پیشروی نموده و علاوه بر علائم بیماری مینور باعث درد پشت و اسپاسم عضله می گردد.

۴- **پولیومیلیت فلجی با بیماری ماژور،** که در ۱ تا ۲ درصد افرادی که دچار عفونت پولیوویروس می شوند رخ می دهد و شدیدترین پیامد آن می باشد. این بیماری ۳ تا ۴ روز بعد از فروکش کردن بیماری مینور ظاهر می شود و لذا یک بیماری دو مرحله ای ایجاد می کند.

۵- **سندرم بعد از پولیو** (Postpolio syndrome; PPS)، مکانیسم دقیق این سندروم شناخته نشده است. به صور متوسط PPS ۳۰ تا ۳۵ سال پس از عفونت فلج اطفال ایجاد می شود. بعضی از تحقیقات نشان دهندهٔ عفونت پایدار پولیوویروس در مایع مغزی- نخاعی یا دستگاه عصبی مرکزی است، اما هنوز کاملاً تأیید نشده است. در تحقیقات دیگری، ژنوم انتروویروس در دستگاه عصبی مرکزی بیماران دچار اختلال ایمنی یافت شده است. سندروم بعد از پولیو در ۲۰ تا ۸۰

درصد از قربانیان اصلی بیماری رخ می دهد. بیمارانی که درگیر این سندروم می شوند، از تخریب عضلات درگیر رنج می برند. در این موارد پولیوویروسی وجود ندراد، اما تصور می شود که این سندروم به دلیل از دست دادن نورون های موجود در اعضایی باشد که در آغاز گرفتار شده بودند.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

ویروس به راحتی از مدفوع و گاهی اوقات از گلو جدا می شود، اما معمولاً از مایع مغزی- نخاعی به دست نمی آید. هر نوع کشت سلول انسانی یا میمون برای رشد ویروس سودمند است، چون ویروس به سرعت رشد می کند و تخریب سلولی معمولاً در طول چند روز اتفاق می افتد. رده سلولی $L^{20}B$ اختصاصی پولیو می باشد که انتروویروس های غیر پولیویی رشد نمی کنند. تغییرات اولیه شامل تخریب سلول، افزایش انکسار، گرانوله شدن سیتوپلاسم و کوچک شدن هستهٔ سلول (Pyknosis) می باشد. سروتیپ ویروس جدا شده **توسط تست های خنثی سازی (NT)** شناسایی می شود.

سویه های واکسن ضعیف شده در سراسر دنیا، آزمایش های تشخیصی را با مشکل مواجه کرده است. چون توالی های نوکلئوتیدی تمام سویه های واکسن و وحشی شایع، در حال حاضر شناخته شده است و این دو به راحتی می توانند توسط هیبریداسیون اسید نوکلئیک از یکدیگر تشخیص داده شوند. RNA را می توان از ویروس به دست آمده از سلول های کشت داده شده استخراج کرد یا اینکه مستقیماً با استفاده از PCR از نمونه ها تکثیر داد. برای انجام PCR پرایمر را برای قسمت $5'$NTR طراحی می کنند. مراکز کنترل بیماری (CDC)، بخش کوتاهی از کاوشگرهای (پروب) cDNA را تولید کرده اند. یک پروب، ناحیهٔ حفظ شدهٔ ژنوم را ارائه می دهد که به طور اولیه برای اهداف غربال گری و جهت شناسایی RNA استفاده می شود، سپس پروب ها که برای سه سویه واکسن و برای سویه های وحشی سه سروتیپ شایع، اختصاصی می باشند برای شناسایی ایزوله ها به روش هیبریداسیون دات- بلات (Dot-blot) به کار می روند. تأیید عفونت انتروویروس به وسیلهٔ تشخیص IgM یا افزایش ۴ برابر عیار آنتی بادی بین زمان بیماری حاد و مرحله نقاهت می باشد (این روش برای کوکساکی ویروس ها و اکوویروس ها عملی نمی باشد).

جفت نمونه های سرمی فاز حاد و نقاهت، جهت نشان دادن افزایش تیتر آنتی بادی مورد نیاز است. پاسخ اختصاصی تیپ فقط در اولین عفونت با پولیوویروس دیده می شود. عفونت های بعدی با پولیوویروس های هتروتیپ، باعث تحریک یا تولید مجدد آنتی بادی هایی می شوند که اغلب علیه آنتی ژن های مقاوم به گرما می باشند. این آنتی ژن در هر سه تیپ پولیوویروس وجود دارد.

بیماری های مرتبط با سایر انتروویروس ها

اکثر انتروویروس ها از طریق گوارش وارد بدن شده و در دهان و روده به خوبی رشد می کنند، اما از طریق مدفوع بیشتر از دستگاه تنفسی و تا مدت های طولانی دفع می شود. انتشار از طریق جریان خون، بدون تردید مسیر انتشار به تعداد زیادی از ارگان های هدف بوده که در مقابل حمله ویروس حساس می باشند. فاکتورهای تعیین کننده تروپیسم انتروویروس های مختلف، خیلی شناخته شده نیست. به عنوان مثال، ارجحیت ویروس های کوکساکی B، عضله و انتروویروس ۷۰، کونژکتیویت می باشد. در عفونت های انتروویروسی سیستمیک، دورهٔ کمون ۲-۱ هفته است، اما ممکن است کوتاه نیز باشد. به عنوان مثال، در بیماری تنفسی و کونژکتیویت دورهٔ ۲-۱ روز است.

ایمنی ایجاد شده مختص تیپ بوده و طولانی مدت می باشد. به نظر می رسد آنتی بادی ها در حفاظت و بهبودی از عفونت های پیکورناویروس نسبت به اکثر خانواده های ویروسی دیگر مهمتر باشند. عفونت های قبل از تولد منجر به بیماری نمی شود یا علائم گاستروانتریت و تنفسی خفیفی در نوزادان تازه متولد شده با آنتی بادی مادری به وجود می آورند، اما بیماری منتشره شدید ممکن است گاهی اوقات در افرادی که فاقد آنتی بادی هستند رخ دهد. به ویژه، در بچه هایی که نقایص مادرزادی سلول های B دارند ممکن است عفونت های انتروویروسی منتشر و مزمن ایجاد کنند.

اکثر عفونت های انتروویروسی به ویژه در بچه های کوچک، تحت بالینی می باشند. با این وجود می توانند طیف وسیعی از سندروم های بالینی را ایجاد کنند که بر روی بسیاری از قسمت های بدن تأثیر می گذارند. باید خاطر نشان کرد که هر سندرومی می تواند به وسیلهٔ چندین ویروس ایجاد شود و هر ویروسی قادر است در طی یک اپیدمی، چندین سندروم ایجاد کند. راش، عفونت های ناحیهٔ فوقانی تنفسی و بیماری تب دار تابستانی نامشخص، رایج هستند. علاوه بر این، انتروویروس ها رایج ترین علت مننژیت به صورت نسبتاً خفیف می باشند. به طور کلی، کوکساکی ویروس ها بیماری های بیشتری نسبت به اکوویروس ها ایجاد می کنند. برای مثال، کاردیت، پلورودینی (Pleurodynia)، هرپانژین (Herpangina)، بیماری دست- پا- دهان (Hand-foot-and-mouth disease) و گاهی اوقات فلجی ایجاد می کنند.

مننژیت آسپتیک

توسط تمام تیپ های کوکساکی ویروس های گروه B (B۱−B٦)، کوکساکی‌ویروس A۷ تا A۹، اکوویروس، پاراکوویروس ها، انتروویروس ۷۱

بیماری های قلبی و ماهیچه ای

۱- کوکساکی ویروس های گروه B (قلب) ← پری کاردیت و میوکاردیت

۲- کوکساکی ویروس های گروه B (عضله) ← پلورودینی (بیماری بورن هولم)

اگزانتم و انانتم

۱- راش ماکولوپاپولار غیرقابل تشخیص از سرخجه ← اکوویروس ۹

۲- راش (اگزانتم بوستون) ← اکوویروس ۱۶

۳- راش های وزیکولار زخمی شونده (Herpetiform) ← کوکساکی ویروس A۹، A۱٦ و انتروویروس ۷۱ (مشابه کوکساکی‌ویروس A)

۴- هرپانژین: وزیکول (فارنژیت وزیکولار)، نودول (فارنژیت لنفونودولار) به ویژه بر روی کام نرم و زبان کوچک ← کوکساکی A

بیماری های تنفسی

۱- کوکساکی ویروس های A۲۱، A۲٤ و اکوویروس های ۱۱ و ۲۰

۲- کوکساکی ویروس های B و اکوویروس‌های خاص که کمتر عامل بیماری های تنفسی می باشند.

بیماری های چشمی

۱- کونژکتیویت حاد خونریزی دهنده ← کوکساکی ویروس A۲٤ و انتروویروس ۷۰

بیماری های نوزادان تازه متولد شده

۱- سندرم انسفالومیوکاردیت، دیسپنی، تاکی کاردی، مننگوانسفالیت ← کوکساکی ویروس B و اکوویروس ۱۱

۲- سندرم هموراژیک (کودک دارای یرقان، هموراژی، نقص کلیه و کبد) ← اکوویروس ۱۱

۳- ناهنجاری های مادرزادی ← کوکساکی ویروس A و B (عبور از طریق جفت به جنین)

سایر بیماری های مرتبط

۱- سندرم اورمی همولیتیک (آنمی همولیتیک، اختلال عملکرد کلیه) ← کوکساکی ویروس A۲٤، انواع مختلف کوکساکی-ویروس های B و اکوویروس ۱۱

۲- دیابت ملیتوس وابسته به انسولین Juvenile onset (IDDM) ←کوکساکی B٤ و B٥، آنتی بادی IgM بر علیه کوکساکی ویروس ها، در بسیاری از موارد IDDM (Insulin-dependent diabetes mellitus) دیده می شود، و کوکساکی ویروس B٤ در یک مورد از دیابت کشنده در موش به دست آمد. بیماری به علت تشابه آنتی ژنیکی یک رشته از اسیدآمینه ها در پروتئین P۲-C در کوکساکی B و آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز است. پاسخ ایمنی بدن بر علیه ویروس باعث تخریب سلول های β پانکراس می گردد.

- دیابت ایجاد شده توسط کوکساکی ویروس با انواع HLA (DR۳ – DR٤) مرتبط می‌باشد.

۳- سندرم خستگی مزمن (نورومیاستنی اپیدمیک)، انسفالیت میالژی یا بیماری مزمن ماهیچه محیطی، التهاب بیضه (اورکیت) ← کوکساکی ویروس B

انتروویروس ها، عمدتاً به وسیلهٔ تماس نزدیک و از طریق مسیر مدفوعی- دهانی منتقل می شود و خیلی سریع و به طور مؤثر در بین خانواده منتشر می شوند. اکوویروس ها در دستگاه گوارشی اکثر کودکان در مدت کوتاهی پس از تولد ظاهر می شوند. در کشورهای توسعه نیافته با استانداردهای پایین بهداشت و بهسازی، انتروویروس ها را می توان همیشه از مدفوع اکثر بچه های کوچک به دست آورد. این مقدار در مطالعه‌ای در کراچی ۸۰٪ و برعکس در نیویورک ۴/۲٪ بوده است. این تفاوت ها منعکس کنندهٔ مقدار انتروویروس موجود در فاضلاب می باشد.

انتشار به صورت قطرات، بیشتر در مورد کوکساکی ویروس ها رخ می دهد و ممکن است منجر به کسب عفونت‌های ناحیهٔ فوقانی تنفسی گردد که غالباً عامل آن انترویروس ها می باشند. کونزکتیویت هموراژیک حاد، بسیار مسری است و از طریق تماس منتقل می شود و دورهٔ کمون آن تنها ۲۴ ساعت است و در بیش از نیم میلیون نفر از افراد در طی پاندمی ۱۹۷۱ بمبئی اتفاق افتاد.

رایج ترین و شایع ترین انتروویروس های سراسر جهان در طی سالیان سال، اکوویروس ۴-۶-۹-۱۱-۳۰، کوکساکی ویروس های A۹ و A۱٦ و کوکساکی ویروس های B۲ و B٥ بوده است. اوج شیوع این سروتیپ ها در کشورهای دارای آب و هوای معتدل

غالباً در اواخر تابستان و اوایل پاییز است. در سال بعد تیپ دیگری شایع است، چون ایمنی بر علیه تیپ قبلی ایجاد شده است. با این وجود، سروتیپهای متمایز به طور همزمان، عمدتاً در بین بچههای غیرایمن دیده می شود.

بچه های کم سن، هدف اصلی و مخزن انتروویروس ها می باشند. افزایش شیوع انتروویروس ها در بازگشت بچه ها از مسافرت و ورود به مدرسه بوده و کودکان پس از ابتلاء، ویروس را به اعضای خانوادهٔ خود منتقل می کنند. در بچه های کوچک، اکثر عفونت های انتروویروسی بدون علائم بوده یا علائم خفیفی ایجاد می کند که شامل تب، راش یا عفونت دستگاه تنفسی فوقانی (URTI) می باشد. بیماری شدید، کاردیت، مننژیت و آنسفالیت در بچه های بزرگتر و بالغین و در نوزادان تازه متولد شده دیده می شود.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

۱- نمونه برداری از مایع مغزی- نخاعی برخلاف پولیوویروس استفاده می شود.

۲- کشت سلولی برای اکثر انتروویروس‌ها و تعدادی از کوکساکی ویروس ها که معمولاً از کشت های دیپلوئید فیبروبلاست های ریه جنین انسانی (HDF or HEL) استفاده می شود. رده سلولی کلیه میمون BGM برای کوکساکی ویروس های B حساس می باشد. رده رابدوسارکومای انسانی (RD) برای رشد کوکساکی ویروس $A^{۷}$ و بسیاری از اکوویروس ها مناسب می باشد.

۳- انتروویروس ۷۰ سخت رشد است، اما می توان به سختی از کشت های قرنیه و کونژکتیویت انسانی یا HDF جدا کرد.

۴- اثرات سیتوپاتیک (CPE) ایجاد شده مشابه پولیوویروس بوده، اما به آهستگی پیشرفت می کند. سروتیپ های با شماره بالاتر آهسته تر رشد کرده یا صرفاً CPE ناقص ایجاد می کنند.

۵- نوترولیزاسیون (Nt)، تنها روش قابل اعتماد برای مشخص کردن تیپ ویروس می باشد.

۶- تلقیح به مغز نوزاد موش برای شناسایی کوکساکی ویروس های A (به خصوص تیپ ۱، ۱۹، ۲۲) مناسب است.

۷- آنتی بادی های منوکلونال برای تشخیص سروتیپ های به شدت محدود مثل انتروویروس ۷۰ و کوکساکی $A^{۲٤}$ استفاده می شود.

- در مورد کوکساکی ویروس ها، آنتی بادی های خنثی کننده در اوائل دوره عفونت ظاهر می شوند. این آنتی بادی ها برای ویروس عفونی، اختصاصی بوده و سال ها باقی می ماند. آنتی بادی های سرم را می توان همچنین از طریق سایر

روش ها نظیر ایونوفلورسانس مشاهده شوند. ارزیابی آزمون های سرولوژی (به علت فراوانی تیپ های ویروس) مشکل است، مگر این که آنتی ژن به کار رفته در آزمون، از بیمار خاصی یا در هنگام شیوع اپیدمی مشخصی، جدا شده باشد.

- بزرگسالان نسبت به کودکان، علیه اکثر تیپ های کوکساکی ویروس ها حاوی آنتی بادی می باشند، که نشان می دهد آلودگی های متعدد با این ویروس ها شلیع بوده و میزان آن با بالا رفتن سن، افزایش می یابد.
- بعضی از اکوویروس ها توانایی آگلوتیناسیون گلبول های قرمز O انسانی را دارند. بنابراین آنتی بادی های مهار کنندۀ هماگلوتیناسیون HI برای تیپ ویروس اختصاصی است و برای سال ها ممکن است باقی بماند. تعیین تیپ اکوویروس، با استفاده از آزمون های ایمونوفلورسانس (IF) و خنثی سازی (Nt) صورت می گیرد.

فصل ۷:

رئوویروس ها، روتاویروس ها و کالیسی ویروس ها

رئوویروس ها اندازه متوسطی داشته و حاوی RNA دو رشته‌ای قطعه قطعه می باشند. این خانواده شامل انواع روتاویروس های انسانی است که مهم ترین عامل گاستروانتریت نوزادان در جهان می باشد. گاستروانتریت حاد، بیماری بسیار شایعی بوده و تخمین زده شده است که در کشورهای در حال توسعه، سالیانه باعث مرگ حدود ۱/۵ میلیون کودک در سنین قبل از مدرسه می شود که در آن روتاویروس عامل مرگ ۶۰ هزار نفر از این تعداد می باشد. در آمریکا گاستروانتریت حاد بعد از عفونت تنفسی، عامل مهم بیماری در خانواده ها می باشد.

کالیسی ویروس ها ویروس های کوچکی با ژنوم RNA تک رشته ای هستند. این خانواده شامل ویروس نوراک، عامل گاستروانتریت اپیدمیک غیرباکتریال می باشند. آستروویروس ها نیز باعث گاستروانتریت می شوند.

◄ تشخیص آزمایشگاهی روتاویروس ها

تشخیص آزمایشگاهی با مشاهده ویروس در مدفوع در اوایل بیماری و افزایش تیتر آنتی بادی انجام می گیرد. ویروس موجود در مدفوع توسط آنزیم ایمونواسِی (EIA) و IEM شناسایی می شود. آزمون EIA حساسیت بیشتر نسبت به IEM دارد. تعیین ژنوتیپ اسید نوکلئیک روتاویروس که از نمونه مدفوع به دست آمده است، از طریق روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)، حساس ترین روش تشخیص است. آزمون های سرولوژیکی می توانند به ویژه الایزا برای مشاهده افزایش تیتر آنتی بادی به کار روند.

◄ تشخیص آزمایشگاهی کالیسی ویروس ها

واکنش زنجیره ای با استفاده از ترانس کریپتاز معکوس، شایع ترین روش برای مشاهده کالیسی ویروس انسانی در نمونه های بالینی (استفراغ، مدفوع) و محیطی (غذای آلوده، آب) می باشد. به دلیل تفاوت ژنتیکی میان سویه های در چرخش، انتخاب جفت پرایمر برای PCR، بسیار مهم است. حداکثر بیش از ۱۰۰ بیلیون نسخه ژنوم ویروسی در هر گرم مدفوع، پخش می شود (۵-۲ روز پس از عفونت).

اغلب از میکروسکوپ الکترونی به منظور مشاهده ذرات ویروس در نمونه های مدفوع استفاده می شود. به هر حال، ویروس های نورواک معمولاً در غلظت های پایین وجود دارند (به جزء نمونه هایی که در حداکثر انتشار ویروس جمع آوری) و تشخیص آن ها مشکل است و آن ها باید توسط IEM شناسایی شوند. از روش ایمنی سنجی الایزا بر اساس ذرات شبه ویروسی نوترکیب، می توان پاسخ های آنتی بادی را مشاهده نمود. افزایش چهار برابری آنتی بادی IgG نشان دهنده عفونت حاد و فاز سرمی نقاهت است. به هر

حال واکنش گرهای ضروری به صورت گسترده حضور ندارند و آنتی ژن ها قادر نیستند پاسخ هایی به تمام تیپ های آنتی ژنی ویروس نورواک را شناسایی کنند. با وجود این که به نظر می رسد آنتی ژن نسبتاً کمی در مدفوع باشد اما، از طریق EIA می توان آن را تشخیص داد و از طریق وسترن بلات تأیید نمود.

◄ تشخیص آزمایشگاهی آستروویروس ها

۱- **میکروسکوپ الکترونی** (EM)، با وجود اینکه آستروویروس ها به مقدار بیشتری ($۱۰^{۸}$) از کالیسی ویروس ها ($۱۰^{۷}>$) در هر گرم مدفوع وجود دارند، با این حال به تشخیص توسط IEM حساس نیست.

۲- **EIA**، مفیدترین روش تشخیص ویروس در مدفوع می باشد که از یک آنتی بادی منوکلونال استفاده می شود. آنتی بادی های منوکلونال برای تشخیص هر ۸ سروتیپ در دسترس می باشد.

۳- **هیبریداسیون دات-بلات**، که از یک ریبوپروب (Riboprobe) استفاده می شود. این روش از بقیه حساس تر بوده و برای غربال گری آب و همچنین مدفوع آلوده استفاده می شود. در این تست باید از تخریب RNA ممانعت شود.

۴- **جداسازی ویروس**، احتمالاً مناسب ترین رده سلولی که برای جداسازی اولیه آستروویروس ها (در حضور تریپسین) در دسترس است، رده سلولی کارسینومای کولون انسان (Caco-۲) می باشد. این سلول ها زمانی بیشترین حساسیت را دارند که بعد از رشد، یک تک لایه متلاقی (Confluent) تشکیل دهند. ایزوله ها را می توان با استفاده از ایمونوفلورسانس یا EIA تشخیص داد.

فصل ۸:

ویروس آنفلوانزا

بیماری های تنفسی، مسئول بیش از نیمی از بیماری های حادی هستند که هرساله در ایالات متحده رخ می دهند. ارتومیکسوویریده (ویروس های آنفلوانزا)، نقش اصلی را در مرگ و میر و ابتلا به بیماری های تنفسی دارند و گاهی اوقات، شیوع عفونت به صورت اپیدمی رخ می دهند. آنفلوآنزا، مسئول میلیون ها مرگ در سرتاسر جهان بوده است. خاصیت جهش زایی و فراوانی بالای نوترتیبی ژنتیکی و تغییرات آنتی ژنی حاصله در گلیکوپروتئین های سطحی ویروس، تلاش ها جهت کنترل این ویروس را با مشکل مواجه می کند. ویروس آنفلوانزای تیپ A، از لحاظ آنتی ژنی به شدت متغیر می باشد و مسئول بیشتر موارد اپیدمی آنفلوانزا است. ویروس آنفلوانزای تیپ B نیز ممکن است تغییرات آنتی ژنی را نشان دهد و گاهی اوقات، اپیدمی هایی را ایجاد می کند. ویروس آنفلوانزای تیپ C، از لحاظ آنتی ژنی پایدار بوده و تنها بیماری خفیفی را در افراد با نقص سیستم ایمنی ایجاد می کند.

سه تیپ ایمونولوژیک از ویروس های آنفلوانزا به نام هایA ، Bو C شناخته شده است. در حالی که تغییرات آنتی ژنیکی به طور مداوم در ویروس های آنفلوانزای تیپ A و به مقدار کمتر در ویروس های

آنفلوانزای تیپ B رخ می دهند، اما ظاهرا ویروس های آنفلوانزای تیپ C از لحاظ آنتی ژنیکی پایدار هستند. همچنین سویه های آنفلوانزای A از پرندگان آبی، مرغ ها، اردک ها، خوک ها، اسب ها و خوک آبی جدا شده است. بعضی از سویه هایی که از حیوانات جدا شده اند، از لحاظ آنتی ژنی، مشابه با سویه های درگردش در جمعیت انسانی هستند.

ویروس های آنفلوانزا به علت تغییرات آنتی ژنیک مکرر که در مولکول های HA و NA رخ می دهند، دارای اهمیت می باشند. واریانت های آنتی ژنیک ویروس آنفلوانزا یک مزیت انتخابی نسبت به ویروس والدی در حضور آنتی بادی که علیه سویه اولیه ایجاد می گردد، دارند. این پدیده، مسئول خصوصیات اپیدمیولوژیک ویروس آنفلوانزا است. عوامل دیگر مجرای تنفسی، تنوع آنتی ژنی قابل ملاحظه ای از خود نشان نمی دهند. دو آنتی ژن سطحی آنفلوانزا، دچار تغییرات آنتی ژنی مستقل از یکدیگر می شوند. تغییرات آنتی ژنیک خفیف در HA یا NA، Antigenic drift و تغییرات آنتی ژنیک عمده، Antigenic shift نامیده می شوند که منجر به ظهور یک زیر تیپ جدید می شوند. Antigenic shift به احتمال بیشتر باعث اپیدمی می شود. Antigenic drift توسط تجمع جهش های نقطه ای در ژن ایجاد شده و منجر به تغییرات اسید آمینه در پروتئین می شود. تغییرات توالی اسید آمینه می تواند نواحی آنتی ژنیک را بر روی مولکول تغییر دهد و ویریون می تواند از تشخیص توسط سیستم ایمنی میزبان فرار کند. سیستم ایمنی باعث تنوع آنتی ژنی نمی شود، اما به عنوان یک نیرویی عمل می کند که امکان گسترش واریانت های آنتی ژنی جدید را می دهد. یک واریانت برای این که از لحاظ اپیدمیولوژیکی به عنوان یک سویه مهم تلقی شود، باید دو یا بیش از دو جهش در آن رخ دهد.

◄ تشخیص آزمایشگاهی:

علایم بالینی عفونت های تنفسی ویروسی، می تواند توسط بسیاری از ویروس های مختلف ایجاد شود. متعاقبا، تشخیص آنفلوانزا به شناسایی آنتی ژن های ویروسی یا اسید نوکلئیک ویروسی در نمونه ها، جداسازی ویروس یا اثبات یک پاسخ ایمونولوژیکی اختصاصی در بیمار بستگی دارد. شستشوی بینی، نمونه غرغره با گلو و سوآب گلو بهترین نمونه ها برای تست تشخیصی هستند و این نمونه ها باید در سه روز بعد از شروع علایم جمع آوری شوند. استفاده از جداسازی ویروس در کشت سلولی، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و سرولوژی از جمله روش های تشخیصی آنفلوانزا می باشند. در اینجا به روش سرولوژی پرداخت می شود:

سرولوژی: آنتی بادی هایی علیه چندین پروتئین ویروسی (هماگلوتینین، نورآمینیداز، نوکلئوپروتئین و ماتریکس) در طول عفونت با ویروس های آنفلوانزا ایجاد می شوند. پاسخ ایمنی علیه گلیکوپروتئین HA با مقاومت میزبان نسبت به عفونت مرتبط است.

از تست های تشخیصی رایج می توان به الایزا و HI اشاره کرد. چون معمولا افراد سالم، آنتی بادی هایی علیه آنفلوانزا دارند، لذا بررسی سرم های دوره حاد و نقاهت ضروری است. افزایش ۴ برابری یا بیشتر در تیتر آنتی بادی جهت نشان دادن عفونت آنفلوانزا باید صورت گیرد. سرم های انسانی اغلب حاوی مهار کننده های پروتئین مخاطی (موکوپروتئین) غیر اختصاصی هستند که باید قبل از انجام تست HI ، آن ها را از بین برد .

اگر آنتی ژن مناسب جهت استفاده در دسترس باشد، تست HI می تواند سویه ویروس مسئول عفونت را مشخص کند. اختصاصی ترین و بهترین روش پیشگویی حساسیت فرد نسبت به عفونت، روش های خنثی سازی می باشند، اما دسترسی کمتری به آن ها وجود دارد و انجام آنها نسبت به تست های دیگر زمان بر تر است. تست الایزا نسبت به تست های دیگر حساسیت بیشتری دارد .

هنگام تلاش جهت شناسایی سویه ویروس آنفلوانزای عفونی در ارتباط با پاسخ آنتی بادی بیمار، به علت پاسخ های مکرر سیستم ایمنی با مشکلاتی مواجه خواهیم شد.

فصل ۹:

پارامیکسوویروس ها و ویروس سرخجه

پارامیکسوویروس ها عامل خیلی مهم عفونت های تنفسی نوزادان و کودکان کم سن (ویروس سن سی شیال تنفسی [ویروس سن سی شیال تنفسی] و ویروس پاراانفلوانزا) و عامل دو بیماری مسری شایع در دوران کودکی(اوریون و سرخک) می باشند.سازمان بهداشت-جهانی مرگ ومیر ناشی از عفونت های حاد تنفسی و پنومونی درکودکان بالاتر از ۵ سال را ۴ میلیون در هر سال تخمین زده است. پارامیگزوویروس ها مهمترین پاتوژن های تنفسی در این گروه سنی می باشند .

شروع عفونت توسط اعضای خانواده پارامیگزویروس ها از طریق مجاری تنفسی می باشد.از اینرو تکثیر پاتوژن های تنفسی محدود به سلول های اپیتلیال تنفسی می باشد.سرخک و اوریون در سرتاسر بدن پخش می شوند وبیماری عمومی ایجاد می کنند.

روبلا (سرخجه) به خاطر ویژگی های فیزیکی و شیمیایی به عنوان توگاویروس طبقه بندی شده است و ازنظراپیدمیولوژی مشابه پارامیگسوویروس ها در نظر گرفته می شود.

ویروس سرخک

سرخک بیماری حاد و فوق العاده مسری است که با تب علایم تنفسی و راش های ماکوپاپولار مشخص می شود.عوارض شایع و کاملا جدی می باشند.معرفی واکسن زنده ضعیف شده بطور آشکار بروز بیماری را در ایالات متحده کاهش داده است اما هنوز سرخک یکی از عوامل مرگ و میر در کودکان کم سن در کشورهای در حال توسعه می باشد.

تنها یک سویه آنتی ژنیک ویروس سرخک وجود دارد آلودگی ایمنی در تمام طول سال می دهد. بیشترافرادی که برای بار دوم مبتلا می شوند، اغلب به دلیل اشتباه در تشخیص در مراحل اولیه یا ثانویه بیماری می باشد.

وجود آنتی بادی سرمی بیان کننده مصونیت می باشد. ایمنی محافظت کننده در ارتباط با آنتی بادی خنثی کننده علیه پروتئین H می باشد. بنظرمی رسد ایمنی سلولی برای پاکساری ویروس و دوام طولانی مدت محافظت ضروری باشد. بیماران دارای نقص در ایمنوگلوبولین از بیماری بهبود می یابند و نسبت به عفونت مجدد مصون می باشند، اما بیمارانی که نقص ایمنی سلولی دارند وقتی که با سرخک آلوده می شوند خیلی ضعیف بهبود می یابند.نقش ایمنی مخاطی در مقاومت به بیماری سرخک مشخص نشده است.

پاسخ ایمنی سرخک در بیماری زایی سرخک دخالت دارد. التهاب موضعی باعث ایجاد علایم اولیه می شودو پاسخ ایمنی سلولی در ایجاد بثورات دخالت دارد.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

سرخک علامت دار از روی علایم بالینی بطور مطمئن تشخیص داده می شود. استفاده از تست های آزمایشگاهی در موارد سرخک معتدل و یا سرخک های غیر معمول لازم می شود.

الف)شناسایی آنتی ژن و اسید نوکلئیک

آنتی ژن سرخک را می توان به طور مستقیم از روی سلول های اپی تلیال موجود در ترشحات مجاری تنفسی نازوفارنگس ,ملتحمه ,چشم و ادرار شناسایی کرد. آنتی بادی علیه نوکلئوپروتئین مفید است چراکه بیشترین پروتئین ویروسی در سلول های آلوده می باشد. شناسایی RNA ویروسی به روش RT-PCR یک روش حساس می باشد که بر روی انواعی از نمونه های کلینیکی برای تشخیص سرخک بکار گرفته شود.

ب) جدا سازی و شناسایی ویروس

سواب های بینی نازوفارنگس, ملتحمه چشم ,نمونه های خون و نمونه های ادرار گرفته شده از بیماران هنگامی که تب دارند منابع مناسبی جهت جداسازی ویروس می باشند.

<u>ج) سرولوژی</u>

اثبات سرولوژیک وجود بیماری سرخک به افزایش ۴ برابری تیتر آنتی بادی در سرم بین فاز حاد و دوره نقاهت بستگی دارد یا وجود آنتی بادی اختصاصی IgM علیه سرخک در یک نمونه سرمی که ۲-۱ هفته بعد از ایجاد بثورات پوستی گرفته شده باشد. در اندازه گیری انتی بادی های سرخک تست های الایزا، HI و تست های خنثی سازی (Nt) ممکن است کاربرد داشته باشندهرچند الایزا کاربردی ترین روش می باشد.

در نواحی که نمونه های سرمی برای گرفتن و منتقل کردن سخت می باشد برای تشخیص آنتی بادی های سرخک لکه خون خشک شده و مایعات دهانی جایگزین مناسبی برای سرم می باشند.

بیماری های ویروس پاراانفلوانزا

ویروس های پاراانفلوانزا در همه جا وجود دارند و باعث بیماری های تنفسی شایع در تمامی رده های سنی می شوند. آن ها عامل مهم بیماری زای بیماری شدید مجاری تنفسی می شوند در نوزادان و کودکان کم سن می شوند. ویروس سن سی شیال تنفسی به تنهایی و احتمالا متاپنومو‌ویروس بیشترین علت بیماری های جدی تنفسی در بچه ها می باشند. عفونت مجدد با پارا انفلوانزا شایع می باشد.

ویروس های تیپ ۱ و ۲ و ۳ سروتیپ های متمایزی می باشند و فاقد واکنش های خنثی سازی متقاطع می باشند .تمامی نوزادان دارای آنتی بادی با منشا مادری در سرم خود می باشند. هرچند این آنتی بادی ها از ایجاد بیماری ممانعت نمی کنند. با وجود آنتی بادی هایی که در عفونت قبلی ایجاد شده اند عفونت مجدد در کودکان بزرگتر و بالغین دیده می شودهرچند آن آنتی بادی ها سیر بیماری را تعدیل می نمایند.در موارد عفونت مجدد بیماری بصورت عفونت تنفسی فوقانی بدون تب ظاهر می شود(سرماخوردگی).عفونت طبیعی باعث ایجاد ایمنوگلوبین IgA می شود وحضور آنتی بادی IgA در ترشحات بینی بطور همزمان باعث مقاومت به عفونت مجدد می شود. آنتی بادی IgA ترشحی در ایجاد مقاومت در برابر عفونت مجدد اهمیت زیادی دارد اما در طی چند ماه از بین می رود از اینرو عفونت مجدد حتی در بالغین شایع می باشد.

آنتی بادی های سرمی بر علیه پروتئین های سطحی F و H ایجاد می شوند.هرچند نقش نسبی آنها در ایجاد مقاومت مشخص نشده است.

به غلت ایجاد عفونت های مجدد اختصاصیت آنتی بادی های ایجاد شده کمتر می شود به خاطر شاخص های آنتی ژنیتکی مشترک در بین ویروس های پاراآنفلوانزا و ویروس اوریون می باشد از اینرو تشخیص دقیق نوع پارامیکسوویروس در عفونت ایجاد شده به روش سرولوژیک دشوار می باشد.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

برای تشخیص عفونت پاراآنفلوانزا روش های سنجش اسید نوکلئیک و جداسازی ویروس کاربرد دارند. روش های مبتنی بر سرولوژی نیز در تشخیص و مطالعات اپیدمیولوژی ارزشمند می باشند.

سنجش آنتی ژن: شناسایی مستقیم آنتی ژن های ویروسی در نمونه ها بطور معمول انجام می شودآنتی ژن ها ممکن است در پوسته های جداشده سلول های نازوفارنژیال به روش ایمنوفلورسانس مستقیم یا غیر مستقیم سنجش شوند. این روش ها ساده و

سریع انجام می شوند اما بخاطر حساسیت پایین و تعداد ویروس هایی که با این روش شناسایی می شوند محدود می باشند و در صورتی که قصد شناسایی سروتیپ خاصی مورد نظر باشد استفاده از معرف های ایمنی با ویژگی بالا مورد نیاز است. در برخی موارد این روش تنها متد شناسایی ویروس در دسترس می باشد.

سرولوژی: تشخیص سرولوژی بایستی براساس جفت نمونه های سرمی باشد.پاسخ آنتی بادی با استفاده از روش های خنثی سازی یا ممانعت از آگلوتیناسیون و یا تست های الیزا قابل اندازه گیری است.۴ برابر افزایش تیتر بیان کننده عفونت با ویروس پاراانفلوانزا و وجود آنتی بادی اختصاصیIgM می باشد هرچند این مشکل وجود دارد که بخاطر آنتی ژن های مشترک نمی توان از تیپ ویروس عامل بیماری مطمئن شد.

عفونت ویروس سن سیشیال تنفسی (RSV)

ویروس سن سیشیال تنفسی عامل بسیار مهم بیماری مجاری تنفسی تحتانی در نوزادان و کودکان کم سن است.معمولا سردسته تمام پاتوژن های میکروبی عامل برونشیولیت و پنومونی نوزادان کمتر از سن یک سال می باشد. در ایالات متحده برآورد شده تا ۲۵ درصد مواردبستری شدن در بیمارستان ها به علت بیماری های تنفسی می باشد.

وجود سطح بالایی از آنتی بادی های خنثی کننده با منشا مادری در طی اولین ماه های زندگی برای ایجاد مصونیت علیه بیماری های مجاری تنفسی تحتانی بسیار حیاتی می باشد. بیماری سن سی شیال تنفسی شدید در نوزادان با سن ۴-۲ ماهگی زمانی که آنتی بادی های مادری کاهش می یابد ایجاد می شود.هرچند عفونت اولیه و عفونت مجدد در حضور آنتی بادی های ویروسی اتفاق می افتد. به نظر می رسد آنتی بادی های خنثی کننده سرمی با ایمنی علیه بیماری مجاری تنفسی تحتانی و نه مجاری تنفسی فوقانی مرتبط باشد.

ویروس سن سی شیال تنفسی القا کننده موثرتولید اینتر فرون نمی باشد برخلاف عفونت های آنفلوانزا و پاراانفلوانزاکه تیتر اینترفرون بالااست و با ناپدیدشدن ویروس مرتبط است.هردو آنتی بادی ترشحی و سرمی در پاسخ به عفونت ویروس سن سی شیال تنفسی ایجاد می شوند.عفونت اولیه با یک زیرگروه باعث ایجاد آنتی بادی متقاطع با ویروس دیگر زیر گروه ها خواهد شد. نوزادان کم سن تر سطح پایین تری از آنتی بادی IgG و IgA ترشحی در پاسخ به ویروس سن سی شیال تنفسی دارند, پاسخ ایمنی سلولی در بهبود از عفونت اهمیت دارد.

بین آنتی بادی IgE اختصاصی ویروس و شدت بیماری ارتباط وجود دارد. آنتی بادی IgE ویروس با ایجاد برونشیولیت مرتبط است.واضح است که مصونیت علیه ویروس بطور نسبی موثر است و تحت شرایط طبیعی ویروس بر این ایمنی با غلبه می کند.عفونت مجدد شایع است اما شدت بیماری ایجاد شده کمتر می باشد.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

روش هایی که برای تشخیص پاراانفلوانزا گفته شد در مورد ویروس سن سی شیال تنفسی کاربرد دارد. اثبات حضور ویروس سن سی شیال تنفسی دلیل مناسبی است مبنی بر اینکه که ویروس عامل بیماری فعلی می باشد چراکه ویروس در افراد سالم یافت نمی شود.سنجش RNA ویروس یا آنتی ژن ویروسی در ترشحات تنفسی روش انتخابی می باشد.

مقدار زیادی از ویروس در مایعات ناشی از شستشوی بینی کودکان کم سن وجود دارد. در خیلی از بالغین سنجش آنتی ژن روش حساسی نیست.

RSV تنفسی را می توان از ترشحات بینی جدا کرد.ویروس فوق العاده حساس است و نمونه ها بایستی فورا به محیط کشت سلولی تلقیح شوند. ویروس سن سی شیال تنفسی به خاطر اینکه هماگلوتینین ندارد از دیگر پاراانفلوانزاها متفاوت می باشد بنابراین برای تشخیص نمی توان از روش هماگلوتیناسیون وهمابزوربشن استفاده کرد.

آنتی بادی های سرمی را می توان به روش های متعددی بررسی کرد.گرچه اندازه گیری آنتی بادی های سرمی از لحاظ مطالعات اپیدمیولوژی اهمیت دارند ولی نقش محدودی در تصمیم گیری های بالینی دارند.

ویروس اوریون

اوریون بیماری حاد مسری است با ویژگی بزرگ شدن غیر چرکی یک یا هردو غدد بزاقی. ویروس اوریون بیماری خفیف دوران کودکی است. اما در بزرگسالان مننژیت و اورکیئت به ندرت شایع است.بیش از یک سوم موارد بیماری بدون علامت می باشند.

بعد از یک بار بیماری ایمنی پایدار ایجاد می شودفقط یک سویه آنتی ژنی ویروس اوریون وجود دارد و این سویه تنوع آنتی ژنتیکی مشخص و بارز ندارد. آنتی بادی علیه گلیکوپروتئین HN گلیکوپروتئین F و پروتئین های نوکلئوکپسید داخلی NP بعد از بیماری طبیعی در سرم افزایش می یابند. آنتی بادی علیه NP زودتر از بقیه ایجاد می شود (۷-۳ روز بعداز شروع علایم بالینی) اما موقتی است و در عرض ۶ ماه ازبین می روند. آنتی بادی علیه HN به آرامی ایجاد می شود (۴هفته بعد از شروع) اما برای سال ها می ماند.

آنتی بادی علیه HN بخوبی با مصونیت مرتبط می باشد حتی عفونت های که علایم بالینی ندارند ایمنی در طول تمام عمر ایجاد می کنند. همچنین پاسخ ایمنی سلولی هم ایجاد می شود در بیماری اوریون تولید اینترفرون القا می شود. در افراد مصون آنتی بادی IgA که در فارنگس ترشح می شودفعالیت خنثی کنندگی نشان می دهند. مصونیت غیرفعال از مادر به نوزاد منتقل می شود از اینرو دیدن اوریون در کودکان زیر ۶ ماه نادر است.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

تشخیص موارد تیپیک معمولا بر اساس یافته های بالینی است هرچند دیگر عوامل عفونی داروها شرایط محیطی علایم مشابه ایی ایجاد می کنند.در مواردی که تورم غدد بزاقی وجود ندارد تست های آزمایشگاهی می توانند در تشخیص مفید باشند. تست ها شامل اندازه گیری اسید نوکلئیک ویروس به روش RT-PCR جداسازی ویروس عفونی و سرولوژی می باشند. روش RT-PCR خیلی حساس است و قابلیت اندازه گیری توالی ژنوم اوریون در نمونه های بالینی را دارد. قابلیت شناسایی ویروس در خیلی از نمونه های بالینی که تلاش برای جدا کردن ویروس موفق نبوده را دارد. با RT- PCR می توان سویه ویروس را تشخیص داده و در مطالعات اپیدمیولوژی اطلاعات مفیدی فراهم کرد.

سرولوژی: سنجش آنتی بادی به تنهایی برای تشخیص عفونت اوریون کافی نمی باشد هرچند افزایش آنتی بادی با استفاده از جفت نمونه های سرمی افزایش چهار برابری یا بیشتر در تیتر آنتی بادی شاهد عفونت ویروس اوریون می باشد. از روش الایزا یا HI بطور شایع استفاده می شودآنتی بادی علیه پروتئین HN خنثی کننده می باشند.

تکنیک الایزا را می توان طراحی کرد برای سنجش آنتی بادی های IgM یا IgG اختصاصی اوریون.IgM اختصاصی در اوایل بیماری ایجاد می شود و به ندرت بیشتر از ۶۰ روز اندازه گیری می شود. بنابراین حضور IgM اختصاصی اوریون در اوایل بیماری قویاً آلودگی با اوریون را پیشتهاد می دهد. آنتی بادی های هترو تیپیکی که علیه آنفلوانزا ایجاد می شود با آنتی بادی IgM اختصاصی اوریون واکنش متقاطع ندارد.

ویروس سرخجه

روبلا (سرخک آلمانی، سرخک سه روزه) بیماری حاد تب دار می باشد که بچه ها و بالغین جوان را درگیر می کند و مشخصه آن بثورات پوستی و لنفآدنوپاتی می باشد. خفیف ترین اگزانتم شایع ویروسی می باشد. هرچند آلودگی در ابتدای حاملگی باعث ناهنجاری

های شدید جنین شامل ناهنجاری های مادرزادی وعقب ماندگی ذهنی می شود. عواقب عفونت سرخجه در رحم به عنوان سندروم مادرزادی سرخجه شناخته می شود.

آنتی بادی های سرخجه در سرم افراد بیمار به محض ناپدید شدن بثورات پوستی زیاد می شود و تیتر آنتی بادی در در ۳-۱ هفته آینده به شدت زیاد می شود. بیشتر آنتی بادی های اولیه شامل آنتی بادی های IgM می باشندکه غالبا شش هفته بعد از بروز بیماری باقی نمی مانند. یافتن آنتی بادی IgM در نمونه سرم تک که ۲ هفته بعد از ایجاد بثورات پوستی گواهی است بر عفونت اخیر با ویروس سرخجه. آتی بادی های IgG علیه سرخجه در تمام طول عمر می مانند.یک بار بیمار شدن باعث مصونیت مادام العمر می شود، به علت اینکه تنها یک تیپ آنتی ژنیک ویروس وجود دارد. به دلیل اینکه بثورات پوستی ایجاد شده مشخص کننده بیماری نمی باشد از اینرو وجود بثورات پوستی شاخص قابل اطمینان برای مصونیت به بیماری سرخجه نمی باشد. مادران مصون آنتی بادی را به فرزندان خود منتقل می کنند از اینرو به مدت ۶-۴ ماه از آن ها محافظت می کند.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

تشخیص بالینی سرخجه خیلی قابل اطمینان نمی باشدخیلی از بیماری های ویروسی علایم شبیه به سرخجه ایجاد می کنند.تشخیص اختصاصی براساس نتایج آزمایشگاهی تخصصی می باشد (جدا سازی ویروس، اندازه گیری RNA ویروسی شواهد وارونگی سرمی). از روش های مولکولی می توان برای تعیین ژنوتیپ و زیر گونه های ویروس در مطالعات دیده وری استفاده کرد. سوآپ های گلو بهترین نمونه ها برای روش های مولکولی می باشند.

سرولوژی: تست ممانعت از هماگلوتینین (HI) یک تست استاندارد سرولوژی برای تشخیص سرخجه می باشد. هرچند سرم بایستی از نظر برطرف کردن ممانعت کننده ها ی غیراختصاصی آماده شود. تست الایزا ترجیح داده می شود بخاطر اینکه نیازی به آماده سازی سرم نیست و می توان آن را برای اندازه گیریIgM اختصاصی طراحی کرد.

تشخیص آنتی بادی IgG دلیل بر مصونیت است بخاطر اینکه تنها یک سروتیپ ویروس وجود دارد. برای اینکه عفونت اخیر سرخجه بطور دقیق تایید شود (خیلی مهم است در مواردی که خانم باردار باشد) می توان از افزایش تیتر آنتی بادی بین دو نمونه سرمی با فاصله حداقل ده روز یا تشخیص اختصاصی آنتی بادی IgM در یک نمونه سرمی استفاده کرد.

تست های سرولوژیک دقیق برای آنتی بادی های سرخجه آنقدر اهمیت دارد که کیت های تشخیص متعددی برای تشخیص بطور تجاری در دسترس می باشند.اغلب افراد قادر نمی باشند که به مصونیت خود علیه سرخجه پی ببرند بخاطر اینکه عفونت های بدون علایم بالینی شایع می باشدو بثورات پوستی ایجاد شده توسط دیگر ویروسها با بثورات پوستی سرخجه اشتباه گرفته می شوند.

فصل ۱۰:

کروناویروس ها

کروناویروس ها، ویروس های بزرگ انول دار حاوی RNA می باشند. کروناویروس های انسانی موجب سرماخوردگی شده و در گاستروانتریت نوزادان دخالت دارند. یک کوروناویروس باعث شیوع جهانی سندروم تنفسی حاد شدید (SARS) در سال ۲۰۰۳ گردید. نوع نوع مشابهی نیز در اواخر دسامبر ۲۰۱۹ در شهر ووهان چین شروع شد و به کل دنیا گسترش یافت. کروناویروس های حیوانات باعث بیماری در حیوانات اهلی می شوند که از نظر اقتصادی اهمیت دارند و در حیوانات پست موجب عفونت های پایدار در میزبان های طبیعی خود می شوند. به علت این که کشت کروناویروس های انسانی مشکل است، ویژگی های آن ها به خوبی شناخته نشده است.

کروناویروس ها در تمام جهان پراکنده هستند. در ماه های زمستان که موارد سرماخوردگی بالا می باشد اما جداسازی رینوویروس ها یا سایر ویروس های تنفسی پایین است، کروناویروس ها عامل عمده ای از بیماری های تنفسی در بزرگسالان می باشند. جداسازی رینوویروس و سایر طغیان های مشخص ظاهر می شوند.

تخمین زده شده است که حدود ۳۰-۱۵ درصد از تمام سرماخوردگی ها توسط کروناویروس ها ایجاد می شود. موارد عفونت های کروناویروس سال به سال به طور قابل توجهی متفاوت است. میزان آن در یک مطالعه ۳ ساله ۱٪ تا ۳۵٪ متفاوت بود.

آنتی بادی در برابر کروناویروس های تنفسی در اوائل کودکی ظاهر شده و با بالا رفتن سن، افزایش می یابد و در بیش از ۹۰٪ بزرگسالان مشاهده می شود. به نظر می رسد که ابتلای مجدد به همراه بروز علائم در یک دوره ۱ ساله رخ دهد. به هر حال، آنتی بادی علیه کروناویروس SARS شایع نبوده و نشان می دهد که به طور گسترده در انسان ها پخش نشده است.

کوروناویروس معمولاً در افراد مسن به همراه رینوویروس ها، ویروس آنفلوانزا و ویروس سین سی شیال تنفسی، بیماری حاد تنفسی ایجاد می کنند. تخیمن زده شده است که فراوانی عفونت کوروناویروس ها در حدود نصف موارد رینوویروسی بوده و با عفونت¬های ویروس آنفلوانزا و سین سی شیال تنفسی برابر است.

مانند سایر عفونت های تنفسی، ایمنی به علت عفونت طبیعی ایجاد می شود، اما کامل نمی باشد. ایمنی در برابر آنتی ژن های سطحی احتمالاً در محافظت انسان، اهمیت بیشتری دارد. مقاومت به عفونت مجدد ممکن است چندین سال ادامه یابد اما عفونت مجدد با سویه های مشابه، اغلب مشاهده می شود. اکثر بیماران (بیش از ۹۵٪) آلوده به SARS، پاسخ آنتی بادی به آنتی ژن های ویروسی می دهند که از طریق آزمون آنتی بادی فلورسانت یا الایزا قابل مشاهده است.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

الف) مشاهده آنتی ژن و اسید نوکلئیک

آنتی ژن های کوروناویروس موجود در سلول های ترشحات تنفسی را هنگامی که مقدار زیادی آنتی سرم در اختیار باشد، می توان از طریق آزمون الایزا مشاهده نمود. کروناویروس های موجود در مدفوع را می توان به وسیله میکروسکوپ الکترونی تشخیص داد. آزمون های واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در مشاهده اسید نوکلئیک کوروناویروس در نمونه های تنفسی و مدفوعی مفید می باشد.

ب) جداسازی و شناسایی ویروس

جداسازی کروناویروس در کشت سلولی مشکل است. با این حال می توان ویروس SARS را از نمونه های بینی و گلو با استفاده از سلول های کلیه میمون Vero به دست آورد.

ج) سرولوژی

به دلیل مشکل بودن جداسازی ویروس، تشخیص سرولوژی با استفاده از افزایش قابل ملاحظه تیتر آنتی بادی در سرم های حاد و نقاهت، روش عملی جهت تأیید عفونت کوروناویروس می باشد. از الایزا، آزمون های ایمونوفلورسانس غیرمستقیم آزمون های هماگلوتیناسیون نیز می توانند به منظور تشخیص استفاده شوند. تشخیص سرولوژی عفونت با سویه ۲۲۹E با استفاده از آزمون هماگلوتیناسیون غیرفعال (Passive hemagglutination)، امکان پذیر می باشد. گلبول های قرمز پوشیده شده با آنتی ژن کوروناویروس، با سرم های حاوی آنتی بادیی آگلوتینه می شوند.

فصل ۱۱:

رتروویروس ها (ویروس HIV)

ویروس های ایجاد کننده نقص ایمنی انسان از لنتی ویروس های پریمات های غیرانسانی مشتق شده اند و مسبب ایدز (سندروم نقص ایمنی اکتسابی) می باشند. بیماری اولین بار در سال ۱۹۸۳ شرح داده شد و در اواخر سال ۱۹۸۳ ویروس نقص ایمنی تایپ ۱ جدا شد. از آن به بعد گسترش و اهمیت ایدز بصورت اپیدمی در سرتاسر جهان افزایش یافت و عفونت HIV نواحی جغرافیایی و جمعیت های مختلفی را تحت تاثیر قرار داد. در حال حاضر میلیون ها نفر در دنیا به HIV مبتلا می باشند در صورت آلوده شدن فرد برای تمامی طول عمر آلوده باقی می ماند. طی ده سال اگر فرد آلوده درمان نگیرد غالبا به علت نقصی که ویروس در سیستم ایمنی ایجاد می کند دچار عفونت های فرصت طلب مرگ بارمی شود. در آغاز قرن ۲۱ ایدز از مهم ترین معضلات بهداشت عمومی در جهان می باشد. ایجاد درمان ضد ویروسی بسیار موثر (HAART) برای سرکوب همانندسازی مزمن HIV و ممانعت از ایجاد ایدز دست آورد بسیار مهم طب در HIV می باشد.

در افراد مبتلا به HIV بر علیه آنتی ژن های مربوط به HIV پاسخ های ایمنی با واسطه سلولی و هومورال ایجاد می شود.آنتی بادی هایی علیه تعدادی از آنتی ژن های ویروس به زودی بعد از آلودگی ایجاد می شود.

اغلب افراد آلوده شده علیه گلیکوپروتئین های پوششHIV آنتی بادی های خنثی کننده ایجاد می کنند هر چند سطح فعالیت آنتی بادی های خنثی کننده کم می باشد: خیلی از آنتی بادی های ایجادشده علیه انولپ خنثی کننده نمی باشند.عقیده بر این است گلیکوزیلاسیون فشرده مانع از اتصال آنتی بادی های خنثی کننده به پروتئین های انولوپ می شوند.گلیکوپروتئین های انولپ از نظر توالی تنوع زیادی دارند این تنوع طبیعی ممکن است اجازه دهد که باعث ازدیاد جمعیتی از ویروس¬هایی بشوند که توسط آنتی بادی های خنثی کننده شناسایی نشوند.

آنتی بادی های خنثی کننده را می توان در شرایط آزمایشگاه با ممانعت از آلوده شدن لنفوسیت های حساس سنجید. عفونت های ویروسی اندازه گیری می شوند با (۱) روش ترانس کریپتاز معکوس که فعالیت انزیم ذرات HIV رها شده را اندازه گیری می کند (۲) روش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم که درصد سلول های آلوده شده را اندازه می گیرد و) RT-PCR ۳ (یا bDNA که اسیدنوکلئیک ویروس را ارزیابی می کنند.

پاسخ ایمنی سلولی علیه پروتئین های HIV ایجاد می شوند,لنفوسیت های T سیتوتوکسیک فراورده های ژن های env, pol, gag, nef را شناسایی می کنند. این واکنش به کمک لنفوسیت های محدود به کمپلکس سازگاری بافتی CD۳-CD۸ انجام می

شود. تقریبا در تمام افراد آلوده واکنش اختصاصی علیه env ایجاد می شود و با پیشرفت بیماری کاهش می یابد. فعالیت سلول های کشنده طبیعی (NK) علیه گلیکوپروتئین HIV-gp۱۲۰ اندازه گیری شده است.

مشخص نیست که کدام پاسخ ایمنی میزبان در فراهم کردن محافظت علیه عفونت HIV یا به وجود آمدن بیماری اهمیت دارد. مشکلی که تحقیقات در خصوص تهیه واکسن ایدز را درگیر کرده است این است که ارتباط پاسخ های ایمنی محافظت کننده مثل اهمیت نسبی پاسخ های ایمنی با واسطه سلولی و هومورال نامشخص می باشد.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

شواهد عفونت با HIV از سه طریق قابل ارزیابی است (۱) جداسازی ویروس (۲) تعیین سرولوژیک آنتی بادی های ضد ویروسی (۳) اندازه گیری اسیدنوکلئیک ویروس یا آنتی ژن‌های ویروس.

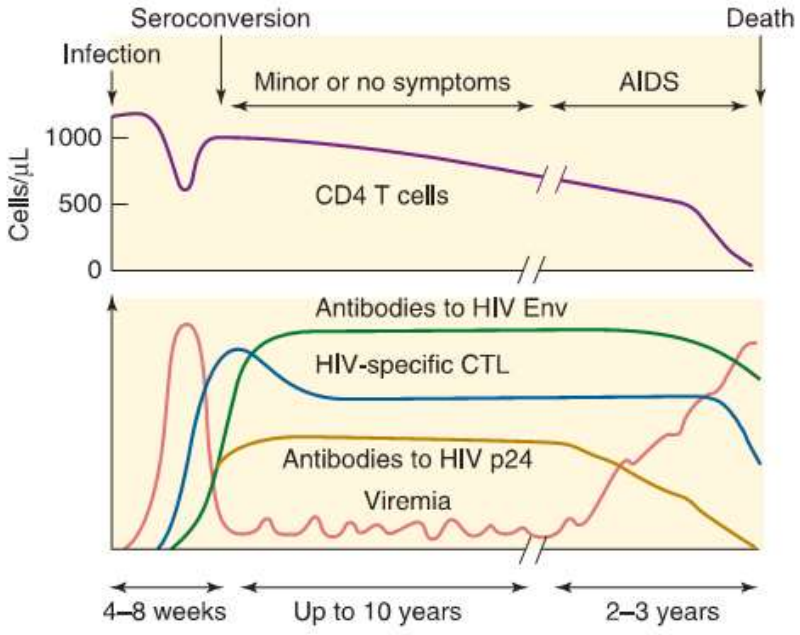
الف) جداسازی ویروس

می توان HIV را از لنفوسیت های خون محیطی (وگاهی از نمونه های دیگرنقاط بدن) کشت داد. تعداد سلول های آلوده در گردش با توجه به مرحله بیماری فرق می کند. در مقایسه با افراد بدون علایم تیتر های بالاتری از ویروس در پلاسما و سلول های خون محیطی بیماران مبتلا به ایدز وجود دارد. تعداد ویروس در پلاسما نسبت به حضورهر نوع آنتی بادی بیشتر با علایم بالینی بیماری HIV هماهنگ می باشد (شکل ۱). حساس ترین تکنیک جداسازی ویروس کشت همزمان نمونه مورد آزمایش با مونوسیت های خون محیطی غیر آلوده که با میتوژن تحریک شده اند می باشد. ویروس های جدا شده اولیه در مقایسه با سویه هایی که با شرایط آزمایشگاهی تطابق یافته اند خیلی کند رشد می کنند. رشد ویروس قابل ارزیابی است با آزمایش مایع فوقانی محیط کشت بعد از ۱۴-۷ روز با اندازه گیری فعالیت ترانس کریپتاز معکوس ویروس یا بررسی آنتی ژن های اختصاصی ویروس (P۲۴).

در بیشتر افرادی که از نظر HIV-۱ مثبت می باشند می توان ویروس را از سلول های خونی آنها کشت داد. هرچند تکنیک جداسازی ویروس زمان بر و پر زحمت می باشد و محدودبه تحقیقات می باشد. تکنیک PCR بطور شایع برای سنجش ویروس در نمونه های بالینی استفاده می شود.

ب) سرولوژی

کیت هایی برای اندازه گیری آنتی بادی ها به روش الایزا (EIA) بطور تجاری موجود می باشد. این تست ها اگر بطور مناسب انجام شوند از حساسیت و ویژگی بیش از ۹۸ ٪ برخوردار می باشند. هنگامی که از آزمایشاتی مانند الایزا برای غربالگری جمعیت با شیوع پایین عفونت HIV (مثل اهداکنندگان خون) استفاده می شود نتیجه مثبت آزمایش به وسیله تکرار آزمایش بایستی تایید شود اگر نتیجه تکرار نیز مثبت شد برای حذف نتایج مثبت کاذب الایزا بایستی تست تاییدی انجام شود.بیشترین تست تاییدی که انجام می شود تست وسترن بلات می باشد که در آن پروتئین های HIV با وزن مولکولی مخصوص قابل اندازه گیری می باشند به طورشایع آنتی بادی علیه پروتئین مرکزی P۲۴ یا گلیکوپروتئین های انولوپ ,gp۱۲۰gp۴۱یا gp۱۶۰ اندازه گیری می شود.



شکل ۱. الگوی پاسخ آنتی بادی HIV در ارتباط به مرحله بالینی بیماری

الگوی پاسخ به آنتی ژن های اختصاصی ویروس در طول زمانی که بیمار به سمت ایدز پیشرفت می کند تغییر می کند آنتی بادی علیه گلکوپروتئین های انولپ (gp۴۱,gp۱۲۰,gp۱۶۰) باقی می مانند، اما آن هایی که علیه پروتئین Gag ایجاد می شوند (P۱۷,P۲۴,P۵۵) کاهش می یابند کاهش آنتی P۲۴ پیشگو کننده شروع علایم بالینی و دیگر مارکرهای پیشرفت بیماری می باشد (شکل ۱).

برای انجام تست های الایزا و آماده شدن نتایج با کمترین تاخیردر آزمایشگاه هایی که تجهیزات کمی دارند تست های ساده و سریع برای سنجش آنتی بادی های HIV موجود می باشد. تست های ساده بر روی نمونه خون یا بزاق می توانند انجام بشوند و بر اساس واکنش های آگلوتیناسیون یا ایمنودات می باشند تست های سریعی وجود دارد که می توانند آنتی بادی های HIV را در نمونه خون کامل تشخیص دهند و نیازی به مراحل آماده سازی وجود ندارند از این تست ها می توان در خارج از مراکز آزمایشگاهی استفاده نمود.

تست های خانگی موجود می باشند. روش کار شامل قرار دادن یک قطره خون از نوک انگشت بر روی کارت های مخصوص می باشد سپس کارت برای انجام آزمایش به آزمایشگاه های دارای مجوز ارسال می شود.

میانگین زمان برای انجام وارونگی سرمی بعد از آلودگی ۴-۳ هفته می باشد اغلب افراد در طی ۱۲-۶ هفته شود. روش RT-PCR یک روش آنزیماتیک برای تکثیر ژنوم HIV می باشد. روش bDNA در طی مراحل هیبریداسیون تدریجی اولیگونوکلئوتید ژنوم HIV تکثیر می ابد. تست های مبتنی بر روش های مولکولی خیلی حساس می باشند و برای تعیین بار ویروسی پلاسما پایه می باشند. هتروژنسیته ژنوم HIV ممکن است حساسیت این روش ها برای تشخیص عفونت HIV را محدود کند. سطح RNA ویروس شاخص پیشگویی کننده مهم پیشرفت بیماری و ابزار باارزش پایش تاثیر درمان ضد ویروسی می باشد.لکه های خون خشک شده به عنوان جایگزین نمونه پلاسما برای پایش ویروس در منابع محدود می باشد. تشخیص زود هنگام عفونت HIV در نوزادان متولد شده از مادران آلوده می تواند با انجام تست HIV-۱ RNA انجام می شود وجود آنتی بادی هایی با منشا مادری استفاده از روش های سرولوژیک را بلااستفاده می کند.

سطح پایین آنتی ژن HIV-۱ P۲۴ در پلاسما به روش الایزا مدت کمی بعد از عفونت قابل اندازه گیری است. بعد از تولید آنتی بادی این آنتی ژن غیر قابل اندازه گیری می شود (برای اینکه پروتئین P۲۴ با آنتی بادی P۲۴ کمپلکس ایجاد می کند). اما ممکن است در مراحل انتهایی بیماری مجدد نمایان شودکه بیان کننده پیش آگهی ضعیف می باشد.

فصل ۱۲:

پولیوماویروس ها (ویروس BK و ویروس JC)

خانواده پولیوماویریده از یک جنس به نام پولیوماویروس تشکیل شده است که قبلا بخشی از خانواده پاپوواویریده (Papovaviridae) بود (که دیگر وجود ندارد). پولیوما ویروس‌ها، ویروس‌های کوچک (با قطر ۴۵ نانومتر) با ژنوم DNA دو رشته ای حلقوی (۵ هزار جفت باز؛ وزن مولکولی ۳ میلیون) هستند؛ این ژنوم در یک کپسید فاقد انولپ که تقارن بیست وجهی دارد؛ محصور می‌شود. از هیستون های سلولی برای متراکم کردن DNA ویروسی درون پارتیکل ویروس استفاده می شود.

مثال هایی از این DNA ویروس‌های سرطانزای ساده که مقادیر محدودی از اطلاعات ژنتیکی (۶ یا ۷ ژن) دارند، عبارتند از: ویروس SV۴۰ در میمون‌ها و انسان؛HPyV۷, HPyV۶ , WU, KI, JC, BK و ویروس سلول merkel در انسان؛ و ویروس پولیومای موشی در موش ها. گونه‌های بسیاری از پستانداران و برخی از پرندگان، پولیوماویروس خاص گونه خود را حمل می کنند.

پولیوماویروس های انسانی (JC, BK) توزیع گسترده ای در جمعیت انسانی دارند، به طوری که ۷۰ تا ۸۰٪ بالغین دارای آنتی بادی اختصاصی در سرم هستند. عفونت معمولاً در اوایل کودکی اتفاق می افتد. هر دو ویروس، پس از عفونت اولیه ممکن است در کلیه ها و بافت لنفاوی افراد سالم پایدار شوند و هنگامی که پاسخ ایمنی میزبان دچار اختلال می شود، مثلا در اثر پیوند کلیه، بارداری یا افزایش سن، مجددا فعال شوند. فعال شدن مجدد ویروس و دفع آن در ادرار در افراد دارای ایمنی سالم، بدون علائم صورت می گیرد. بیماری ممکن است در مبتلایان به نقص ایمنی رخ دهد و ویروس ها اکثراً از این بیماران جداسازی می شوند. ویروس BK موجب التهاب مثانه (Cystitis) خونریزی دهنده در دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان می گردد. این ویروس عامل نفروپاتی مرتبط با پولیوماویروس در دریافت کنندگان پیوند کلیه است؛ یک بیماری شدید که در ۵٪ دریافت کنندگان اتفاق می افتد و در ۵۰٪ موارد بیماری منجر به رد پیوند می شود. ویروس JC عامل لکوانسفالوپاتی چندکانونی پیشرونده (PML , progressive multifocal leukoencephalopathy) می باشد؛ یک بیماری مغزی کشنده که در بعضی از مبتلایان به نقص ایمنی، به ویژه کسانی که ایمنی سلولی آن ها در اثر درمان های سرکوب کننده ایمنی یا عفونت با HIV مختل شده است، اتفاق می افتد. لکوانسفالوپاتی چندکانونی پیشرونده حدود ۵٪ از مبتلایان به ایدز را درگیر می‌کند. ویروس‌های BK و JC از نظر آنتی ژنی با یکدیگر تفاوت دارند، اما آنتی ژن T رمزشونده توسط هر دو ویروس، مشابه آنتی ژن SV۴۰ T است. این ویروس های انسانی می توانند سلول های جوندگان را ترانسفورم کنند و در نوزاد هامستر ایجاد تومور نمایند.

ویروس JC با تومورهای مغزی انسان ارتباط داده شده است، اما نقش سببی آن هنوز تأیید نشده است.

◄ تشخیص آزمایشگاهی

ویروس BK را می توان از کشت ادرار در فیبروبلاست های دیپلوئید انسان یا ویروس JC را از کشت ادرار یا مغز در سلول های گلیال جنین (Fetal glial cells) جدا کرد و این دو ویروس را می توان به وسیله ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) از یکدیگر تشخیص داد. به هر حال روش ساده تر، جستجوی مستقیم ژنوم ویروس به وسیله PCR و هیبریدیزاسیون نوکلئیک اسید (مثل، ساترن بلات) می باشد. DNA ویروس را می توان به دنبال بیوپسی یا اتوپسی مغز به وسیله هیبریدیزاسیون درجا(In situ hybridization) نشان داد. آنتی ژن های ویروس JC را می‌توان توسط ایمونوفلورسانس (IF) و ویریون ها را توسط میکروسکوپ الکترونی تشخیص داد.