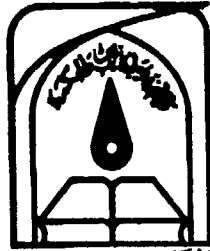


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ویروس شناسی

موضوع

به کارگیری آزمایش خنثی‌کنندگی ویروس‌های پولیو تیپ ۱، ۲، ۳ به
روش ماکرو و میکرو به منظور بررسی عیار آنتی‌بادی‌ها در خون بندناف

نگارنده:

حوریه - سلیمان جاهی

استاد راهنما:

دکتر محمد حسن روستایی

استاد مشاور:

دکتر شهرزاد مدرس کیلانی

زمستان ۱۳۷۳

حمد ثنای خداوند عالمیان را که تنها او منشأ همه خیرات و همه علوم است.
درود بی‌کران به بهترین مخلوق او پیامبر گرامی اسلام و عترت پاکش.

این نوشتار را تقدیم می‌کنم به:

پیشگاه حضرت مهدی (عج) امام زمان و روح پر فتوح و ملکوتی امام
خمینی(ره) به روح پاک مادرم، او که اولین معلم من بود و بذر صبر در مقابل
مشکلات را در وجودم به ودیعه گذاشت، تقدیم به تمامی پویندگان راه حق و
حقیقت و دانش که با اتکال به خدا و خود باوری در مقابل استحقار مقاومت
می‌کنند.

تقدیم به خانواده محترم خصوصاً همسر و فرزندان دلبندم که با تحمل
مشکلات تحمیل شده بر آنها مرا همراهی کردند.
تقدیم به خواهرم که از نوجوانی صبور و شکیباً بود و شعله‌ور کننده پرتو امید
در وجودمان .

اینجانب وظیفه خود می‌دانم که به مصداق

« من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق »

از کلیه اساتید خصوصاً

- دکتر محمدحسن روستایی که همواره در طول تحصیل مرا یاری نموده و با راهنماییهای ارزنده خود بر من منت گذاشتند.
- دکتر شهرزاد مدرس گیلانی که با ارائه نظرات دقیق و برخوردی خواهرانه و صمیمی مرا همراهی نمودند.
- دکتر حسن، دکتر مزدارانی، دکتر زواران، دکتر فقیه‌زاده و تمامی اساتیدی که از محضرشان فیض برده‌ام.
- از دوستان گرانقدر و همکاران و اعضاء هیئت علمی محترم دانشکده که همواره از حمایت‌های آنان بهره‌جسته‌ام.
- از دانشجویان گروه ویروس شناسی خصوصاً دانشجویان دوره یازدهم.
- از کارمندان محترم حوزه‌های مختلف آموزشی، پژوهشی و اداری دانشکده پزشکی و آموزش دانشگاه.
- از پرسنل محترم بیمارستانهای شریعتی، میرزا کوچک و امام خمینی.

تشکر و قدردانی می‌نمایم.

دنیا دریایی است عمیق، که دانشمندان بسیار در آن
هلاک شدند و چون چنین است تو کشتی خود را در
این دریا از ایمن بساز و بادبان آن را از توکل قرار ده و
توشه‌ای از تقوی بردار که اگر نجات یافتی به رحمت
خدا یافته‌ای و اگر هلاک شدی به انبوه گناهانت در
این راه افتاده‌ای.

از نصایح لقمان حکیم به فرزندش

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
فصل اول: کلیات	
بخش اول	
۲	۱-۱-۱- مقدمه
۳	۲-۱-۱- تاریخچه
۸	۳-۱-۱- ساختار ویروس
۸	۴-۱-۱- طبقه بندی ویروسهای پیکورنا
۱۲	۵-۱-۱- ژنوم
۱۳	۶-۱-۱- میزبانهای ویروس
۱۴	۷-۱-۱- تکثیر ویروسهای انترو
۱۷	۸-۱-۱- اپیدمیولوژی
۱۹	۹-۱-۱- پاتوژنز
۲۲	۱۰-۱-۱- تشخیص آزمایشگاهی
بخش دوم - پاسخ ایمنی و پیشگیری و کنترل	
۲۴	۱-۳-۱- پاسخ ایمنی بدن در مقابله با عفونت پولیو
۲۵	۲-۲-۱- پیشگیری و کنترل
بخش سوم	
۳۱	۱-۳-۱- سابقه تحقیق در ایران
۳۳	۲-۳-۱- اهداف و سئوالات پژوهش
۳۴	۳-۳-۱- اهمیت پژوهش

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
فصل دوم: مواد و روشها	
۳۶	۱-۲- وسایل مورد نیاز.....
۳۷	۲-۲- مواد مورد نیاز.....
۳۸	۳-۲- شستشو و استریل کردن وسایل مورد نیاز.....
۳۹	۴-۲- آماده سازی مواد.....
۳۹	۱-۴-۲- تهیه محیط کشت.....
۳۹	۲-۴-۲- تهیه آنتی بیوتیکها.....
۴۰	۳-۴-۲- تهیه سرم.....
۴۰	۴-۴-۲- تهیه بی کرینات سدیم.....
۴۱	۵-۴-۲- تهیه تریپسین.....
۴۱	۶-۴-۲- تهیه محلول نمکی PBS.....
۴۱	۷-۴-۲- تهیه سلولها.....
۴۳	۸-۴-۲- تهیه و آماده کردن ویروسهای پولیو تیپ ۱، ۲، ۳.....
۴۶	۹-۴-۲- تهیه آنتی سرمهای اختصاصی علیه ویروسهای پولیو تیپ ۱، ۲، ۳ در خرگوش.....
	۱۰-۴-۲- آزمایش خنثی کنندگی ویروسهای پولیو تیپ ۱، ۲، ۳ به روش
۵۰	ماکرونوترالیزاسیون.....
۵۶	۱۱-۴-۲- نمونه گیری.....
	۱۲-۴-۲- آزمایش خنثی کنندگی ویروس و تعیین تیترا آنتی سرم موجود در نمونه های
۵۶	سرمی به روش میکرونوترالیزاسیون.....

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل سوم: نتایج و بحث
۶۱.....	۳-۱- نتایج
۶۳.....	۳-۲- یافته‌های پژوهش (نمودارها و جدول)
۷۲.....	۳-۳- بحث
۷۶.....	۳-۴- پیشنهادها
۷۷.....	خلاصه فارسی
۷۹.....	خلاصه انگلیسی
۸۱.....	منابع و مأخذ

فهرست نمودارها

عنوان	صفحه
نمودار شماره ۱-۳: تعداد و درصد نمونه‌های متعلق به هر یک از بیمارستانهای	
مورد مطالعه	۶۷
نمودار شماره ۲-۳: توزیع فراوانی مربوط به تیتراژ آنتی‌بادی علیه ویروس پولیو تیپ ۱	۶۸
نمودار شماره ۳-۳: توزیع فراوانی مربوط به تیتراژ آنتی‌بادی علیه ویروس پولیو تیپ ۲	۶۹
نمودار شماره ۴-۳: توزیع فراوانی مربوط به تیتراژ آنتی‌بادی علیه ویروس پولیو تیپ ۳	۷۰
نمودار شماره ۵-۳: درصد موارد ایمن در تست کنترل معادل $\frac{1}{10}$	۷۱
فهرست جداول	
جدول شماره ۱-۲: نتایج حاصل از آزمایش خنثی‌کنندگی در لوله‌های کشت به منظور	
تعیین عیار آنتی‌سرم علیه پولیو تیپ یک	۵۳
جدول شماره ۲-۲: نتایج حاصل از آزمایش خنثی‌کنندگی در لوله‌های کشت به منظور	
تعیین عیار آنتی‌سرم علیه پولیو تیپ دو	۵۴
جدول شماره ۳-۲: نتایج حاصل از آزمایش خنثی‌کنندگی در لوله‌های کشت به منظور	
تعیین عیار آنتی‌سرم علیه پولیو تیپ سه	۵۵
جدول شماره ۱-۳: توزیع فراوانی عیار آنتی‌بادیهای خنثی‌کننده علیه ویروس	
پولیو تیپ ۱	۶۳
جدول شماره ۲-۳: توزیع فراوانی عیار آنتی‌بادیهای خنثی‌کننده علیه ویروس	
پولیو تیپ ۲	۶۵
جدول شماره ۳-۳: توزیع فراوانی عیار آنتی‌بادیهای خنثی‌کننده علیه ویروس	
پولیو تیپ ۳	۶۶

فصل اول

کلیات

بخش اول: کلیات

۱-۱ - مقدمه

پولیومیلیت^۱ که بیماری فلج اطفال یا بیماری هاین مدین^۲ نیز به آن گفته میشود یک سندرم بالینی-پاتولوژیکی است که توسط انتروویروسها^۳ ایجاد می شود. جاکوب هین^۴ در سال ۱۸۴۰ میلادی علائم بالینی و پاتولوژیکی آن را شرح داد. [۲،۱] ویروسهای عامل مولد بیماری از اعضای خانواده پیکورناویروسها^۵ هستند که ۲۷ نانومتر قطر دارند. در مواجهه با این ویروس ممکن است افراد با یک عفونت بدون علائم بالینی، بیماری خفیف عمومی، مننژیت غیر باکتریائی^۶ یا پولیومیلیت فلج کننده^۷ روبرو گردند. فقط یک تا دو درصد عفونتها منجر به بیماریهای شدید می شوند. [۳]

تنها میزان طبیعی ویروسهای پولیو انسان است. ویروسهای پولیو قدرت تخریبی بالایی در سلولهای آلوده داشته که آثار این تخریب را به صورت CPE^۸ نشان میدهند. پولیومیلیت فلج کننده عفونت حادی است که آثار جبران ناپذیری روی سیستم اعصاب مرکزی می گذارد و باعث تخریب نرونها حرکتی شده و میتواند علاوه بر نخاع و مننژ، مغز را نیز آلوده نماید. بیماری مدتهای طولانی

1-Poliomyelitis

2-Hein Medin

3-Enteroviruses

4-Jacob Hein

5-Picornaviruses

6-Aseptic Meningitis

7-Paralytic Poliomyelitis

8-Cytopatic effect

قربانیان زیادی خصوصاً از بین بچه ها می گرفته است، تشخیص آزمایشگاهی بیماری به طریقه جدا کردن ویروس پولیومیلیت از نمونه مدفوع، سواب رکتال، ترشحات حلق بیماران به وسیله تلقیح نمونه ها به کشت سلولی حساس عملی می باشد.

اولین مطالعه مقدماتی در مورد پولیومیلیت در ایران در سال ۱۳۳۳ هجری - شمسی در انستیتوپاستور ایران انجام گردید نتایج بررسی نشان داد که پولیومیلیت، بیماری بومی در ایران است. در سالهای اخیر در کشورهایی مثل آمریکا و اروپا و دیگر کشورهای صنعتی و پیشرفته به علت پوشش واکسیناسیون مناسب و شرایط اقتصادی - اجتماعی، اکولوژیکی مناسب سن ابتلا در آن جوامع بالا رفته بود و بیشتر، افراد بزرگسال به آن مبتلا می شدند که نتیجه آن بروز فلجیهای حاد در سنین بالا بود. [۴]

بر اساس آمار گزارش شده پولیو از سراسر جهان در طی سالهای ۱۹۸۸-۱۹۸۶ میلادی و مشاهده پیشرفت برنامه های وسیع ایمن سازی، در سال ۱۹۸۸ چهل و یکمین مجمع بهداشت جهانی، WHO^۱ را مأمور ریشه کنی پولیومیلیت تا سال ۲۰۰۰ میلادی در سراسر جهان نمود. بدین معنا که تا سال ۲۰۰۰ میلادی هیچ موردی از پولیومیلیت بالینی مربوط به ویروس پولیو وحشی مشاهده نگردد و نیز هیچ ویروس پولیو وحشی از نمونه های افراد در سراسر جهان جدا نگردد. [۵] در راستای برنامه ریشه کنی پولیومیلیت برنامه واکسیناسیون وسیعی در کشورهای در حال توسعه در منطقه آغاز شده و در ایران با دو نوبت واکسیناسیون عمومی در سال ۷۳ طرح ریشه کنی پولیومیلیت به مرحله اجرا در آمد.

۱-۱-۲- تاریخچه

انتروویروسها یکی از جنسهای ویروسی از خانواده پیکورناویریده هستند که در انسان و حیوانات تولید بیماریهایی با علائم یا بدون علائم کلینکی^۲، فلج، هرپ آنژین^۳، تورم و درد عضلات بین

1-WHO

2-Asymptomatic infections

دنده‌ای^۴ و غیره می‌کنند. انتروویروسها انتشار جهانی دارند در مناطق حاره‌ای و گرمسیری در تمام طول سال آلودگی ایجاد کرده و در صورت عدم پوشش واکسیناسیون مناسب آندمی ایجاد می‌نمایند. این ویروسها در مناطق معتدل در طول تابستان شایع بوده و قبل از مصرف و تولید واکسنهای موجود اپیدمیهای مرگباری را در این مناطق سبب شده‌اند.[۳] با توجه به شدت عفونتزایی این ویروسها و مرگ و میر فراوان ناشی از آنها در بین کودکان تحقیقات زیادی در قرن‌های اخیر انجام گرفته که ذیلاً شرح داده می‌شوند.

پولیومیلیت، بیماری حاد عفونی است که حتی قبل از آنکه عامل بیماری معلوم باشد شناخته شده بود. اصولاً بسیاری از بیماریها که امروزه انتروویروسها به عنوان عوامل بیماریزا در آنها مشخص شده‌اند از قدیم الایام شناخته شده بود. مطالعات انجام شده در مورد استخوانهای اسکلت مصریان قدیم بیانگر این واقعیت است که از ۳۷۰۰ سال قبل از میلاد مسیح تغییراتی ناشی از عوامل فلج کننده روی بقایای اسکلتها وجود داشته است.[۱] گزارشهایی وجود دارند که حاکی از وقوع اپیدمی فلج در ایرلند در سال ۷۰۸ بعد از میلاد است.[۱]

در طی قرون گذشته بیماریهایی به صورت فلج دائمی، فلج ناقص^۵، مننژیت، بیماری پا و دهان حیوانات^۶ (تب برفکی) و تورم ملتحمه چشم^۷ در تمام دنیا مشاهده شده است بدون آنکه عوامل بیماریزای آنها معلوم باشد و گزارشهایی مربوط به مطالعاتی که برای شناخت این بیماریها انجام گرفته موجود می‌باشند. در سال ۱۸۳۵ میلادی شیوع ناگهانی پولیومیلیت دانشمندان را بر آن داشت تا در پی یافتن عامل بیماری اقدامات وسیعی را آغاز نمایند.

مطالعات اپیدمیولوژیک و کلینیکی در بیماران نشان میداد که احتمالاً عامل مولد آنها از یک

3-Herpangina

4-Pleurodynia

5-Abortive Poliomyelitis

6-Hand-foot and mouth disease

7-Acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC)

خانواده غیر باکتریایی باشد. در سال ۱۸۹۸ میلادی لوفلروفروش^۱ عامل بیماری دست و پا را شناسایی کردند و مشخص شد که عامل بیماری بسیار کوچکتر از میکروارگانسیم‌های شناخته شده تا آن زمان بود. [۱] با توجه به همه گیر شدن بیماری فلج و مرگ و میر ناشی از آن در بین اطفال، دانشمندان آمریکایی با حمایت و پشتیبانی ملت و دولت آمریکا تحقیقات وسیعی را جهت جدا کردن عوامل بیماریزا شروع کردند. اغلب آمریکاییهای مسن اپیدمیهای خانمان برانداز پولیو را به خاطر دارند که باعث گردید تا مادران از رفتن بچه‌های خردسال خود به استخر شنا جلوگیری کرده و کودکان را از بازیهای دسته جمعی منع نمایند چرا که در آن موقع میزان مرگ و میر ناشی از پولیو در اولین اپیدمی گزارش شده حدود ۱۳/۵ درصد بود و بیش از ۲۵ درصد افراد مبتلا، دچار فلج کامل و دائمی می شدند. [۱] در سال ۱۹۰۹ میلادی لنداشتاینر و پوپر^۲ با تلقیح نمونه‌ای از مایع نخاعی^۳ مریض پولیومیلتی به داخل مغز^۴ میمون موفق شدند که پولیومیلت را انتقال دهند و نشان دادند که مسئول انتقال بیماری، ویروس است. [۴] در کنار مطالعات بیولوژیک و اپیدمیولوژیک از سال ۱۹۱۰ میلادی مطالعاتی برای پیشگیری و کنترل پولیومیلت شروع گردید. در سالهای ۱۹۱۴-۱۹۱۰ میلادی عصاره ویروس پولیو را که با فنل و فرمالین غیر فعال شده بود به حیوانات تزریق کردند که با موفقیت قابل قبول همراه نبود. [۱] گزارشها حاکی از آن است که در تابستان ۱۹۳۵ میلادی کولمر^۵ اولین واکسن تخفیف حدت یافته^۶ را به میمون و خودش و سپس به دو فرزند خود و ۲۳ نفر داوطلب تلقیح نمود که آثار سوئی مشاهده نگردید. [۱] در سال ۱۹۴۵ میلادی اندرز، ولرو رابینس^۷ موفق به تکثیر ویروس پولیو در روی بافتهای جنینی انسان شدند و جایزه نوبل دریافت کردند این امر

1-Loefer and Frosch

2-Land steiner & popper

3-Spinal cord filtrate

4-Intracerebral

5-Kolmer

6-Attenuated Vaccine

7-Enders, Weller & Robbins

راهگشای خوبی برای تهیه واکسن علیه پولیومیلیت گردید. [۱] در سال ۱۹۵۰ میلادی بیست و یک هزار پولیومیلیت در آمریکا گزارش گردید که اغلب در بین اطفال ۹-۵ ساله بود. [۶] سالک^۱ در سال ۱۹۵۰ میلادی بعد از تجربیاتی که در ساختن واکسن تخفیف حدت یافته ویروس انفلوانزا^۲ کسب کرده بود کار روی واکسن تخفیف حدت یافته پولیو را شروع کرد و در سال ۱۹۵۳ میلادی اولین نتایج تجربیات خود روی ۱۶۱ نفر داوطلب را ارائه نمود. [۱] در سال ۱۹۵۳ میلادی سابین و ملنیک^۳ مطالعه روی واکسنهای تخفیف حدت یافته را آغاز کردند و سرانجام در سال ۱۹۵۷ میلادی سابین کارآیی واکسن تخفیف حدت یافته پولیومیلیت در میمونها را گزارش نمود. همزمان کوپروفسکی^۴ کفایت و بی خطری واکسن خوراکی تخفیف حدت یافته پولیو را در روی ۱۵۰ داوطلب گزارش کرد. [۱] کاهش فزاینده در بروز اپیدمیها بعد از تولید واکسنهای کشته در سال ۱۹۵۵ میلادی گزارش شده است به طوری که در سالهای ۱۹۵۵-۱۹۵۱ موارد ابتلا به بیماری پولیو ۳۸ هزار نفر بود و این میزان در سالهای ۱۹۶۵-۱۹۶۱ میلادی به ۵۷۰ مورد کاهش یافت. [۶] بعد از شروع واکسیناسیون عمومی میزان شیوع بیماری و متعاقب آن میزان مرگ و میر به طور چشمگیری کاهش یافت. امروزه در بعضی از کشورهای در حال توسعه هنوز موارد قابل ملاحظه ای از بیماری مشاهده می شود. در این کشورها سالیانه بیش از ده مورد گزارش شده و احياناً بعضی موارد گزارش نشده وجود دارد. در این کشورها حدود ۵۰ درصد یا کمتر افراد حساس تحت پوشش واکسیناسیون قرار می گیرند. بنا به تصمیم سازمان بهداشت جهانی تا سال ۲۰۰۰ میلادی می بایست بیماری پولیو در کلیه کشورهای ریشه کن شود لذا هر کشوری لازم است با توجه به وضعیت اقلیمی، فرهنگی، اجتماعی، اقتصادی و بر اساس میزان بروز سالیانه بیماری، پوشش واکسیناسیون مناسب و برنامه ریزی مطلوبی را تدارک ببینند. برای حصول اطمینان از موفقیت برنامه واکسیناسیون لازمست به بررسی نتایج حاصل از آن

1-Salk

2-Influenza

3-Sabin & Melnick

4-Koprowski