بسم الله الرحمن الرحیم
نور السموات والارض

دانشگاه اراک

دانشکده فنی مهندسی

کارشناسی ارشد مهندسی شیمی

بهینه سازی شرایط عملیاتی افزایش بیان پروتئین آنتی ژن سطحی هپاتیت B در فرآیند فرمانتاسیون FED BATCH با تغییر شرایط محیط کشت PICHIA PASTORIS

پژوهشگر

پیام مرادی

استاد راهنما

آقای دکتر علیرضا فضلعلی

آقای دکتر سید نظام الدین حسینی

استاد مشاور

آقای دکتر رضا جلالی راد

داور

آقای دکتر عبدالرضا مقدسی

تابستان۱۳۹۲

بسم ا... الرحمن الرحیم

بهینه سازی شرایط عملیاتی افزایش بیان پروتئین آنتی ژن سطحی هپاتیت B در فرآیند فرمانتاسیون FED BATCH با تغییر شرایط محیط کشت PICHIA PASTORIS

توسط:

پیام مرادی

پایان نامه

ارائه شده به مدیریت تحصیلات تکمیلی به عنوان بخشی از فعالیت های تحصیلی لازم برای اخذ درجه

کارشناسی ارشد

در رشته مهندسی شیمی

از

دانشگاه اراک

اراک-ایران

ارزیابی و تصویب شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: .....

آقای دکتر علیرضا فضلعلی(استاد راهنما) .....

آقای دکتر سید نظام الدین حسینی(استاد راهنما) .....

آقای دکتر رضا جلالی راد(استاد مشاور) .....

آقای دکتر عبدالرضا مقدسی(داور).....

تابستان ۱۳۹۲

تقدیم

به

همسرم.....

همسر مهربان و فرهیخته ام که از آغاز راه همواره مشوق، پشتیبان و همگام من بوده و کمک های شایانی در به ثمر رسیدن تلاشم داشته است.

تقدیم

به

فرزندم.....که

با آمدنش بهترین و زیبا ترین لحظات را وارد کلبه خوشبختیمان خواهد کرد و او را از خدایی خواستم که به رحمت بی کرانش ایمان دارم پس تا بی نهایت عاشقانه دوستش دارم.

تقدیم به

پدر زحمت کش و مادر محنت کشم

دو اسوه رادمردی و پایداری در عرصه پر تلاطم زندگیم , دو عزیزی که با تحملی عظیم و صبری جزیل سوسوی بی رمق زیستن و امیدوار بودن در زندگی را در ذره ذره وجودم شعله ور ساختن و خود در حرارت این شعله اندک اندک آب گشتند.

صبرو بردباریشان تکیه گاهم

وجود و ایمانشان افتخارم

تداوم سایشان آرزویم

دو روح بزرگ که به من هستی بخشیدن و دو اسم اعظمی که هرچه دارم از وجود ایشان دارم پس این بضاعت کم مایه را به حضور منیع شان تقدیم می دارم

سپاسگزاری

تشکر بی پایان از زحمات اساتید عزیزم آقای **دکتر علیرضا فضلعلی, آقای دکتر سید نظام الدین حسینی, آقای دکتر رضا جلالی راد**که بدون کمک ها و راهنمایی های این اساتید عزیزم انجام این پایان نامه ممکن نبود.

سپاس بی کران از جناب **آقای دکتر عبدالرضا مقدسی** نه تنها به خاطر قبول زحمت داوری پایان نامه بلکه به پاس راهنمایی های پدرانه ایشان در طول تحصیلم.

از اساتید محترم گروه مهندسی شیمی که برای پیشرفت روز افزون علم از هرگونه لطف و زحمتی دریغ نکرده اند بی نهایت سپاسگزارم.

از زحمات بی دریغ جناب آقای مهندس ایوب رحیمی نهایت تقدیر و تشکر را دارم.

از برادران عزیزم دکتر صیاد و یاسر و پوریا و پژمان برای تحمل و صبر در برابر همه کمی و کاستی هایم نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

چکیده

هپاتیت B که بوسیله ویروس هپاتیت B ایجاد می شود هنوز هم از زمره معضلات عمده بهداشتی در سراسر جهان به شمار می رود. در ژنوم مخمر *Pichia pastoris* دو کپی از ژن الکل اکسیداز (AOX) وجود دارد که AOX1و AOX2می باشند پروموتر AOX1 در سیستم های بیان Pichia جهت تولید پروتیینهای نوترکیب (با استفاده از متانول بعنوان inducer) استفاده می شود.و ما نیز به منظور بهینه سازی شرایط عملیاتی افزایش بیان پروتئین آنتی ژن سطحی هپاتیت B در فرآیند فرمانتاسیون FED BATCH با تغییر شرایط محیط کشت PICHIA PASTORIS ، محیط کشت با ترکیب تعریف شده را به داخل فرمانتور وارد شده و استریلیزاسیون در محل برای محیط کشت انجام گردید. ازسوش Pichia Pastoris که قبلا در ارلن کشت داده شده بود و جمعیت سلولی حدود ۱/۷ گرم بر لیتر رسیده بود به فرمانتورحاوی محیط کشت طراحی شده وارد شد. که نهایتا با تزریق به موقع متانول خالص به مقدار کافی در فواصل زمانی مشخص جهت تامین کربن لازم و کافی بعنوان خوراک و همچنین تزریق مرتب ویتامین های A و B هر کدام به مقدار ۱۲/۵سی سی و تریس المنت به مقدار ۴/۵سی سی در این فرمانتاسیون که حدودا ۱۰۹ساعت به طول انجامید و مقدار بیومس تولیدی به میزان مطلوب، تقریبا ۴۸۰ گرم بر لیتر و میزان HBsAg به ۰/۱۸۵ میلی گرم بر لیتر رسید.

فهرست

مقدمه و کلیات

۱-۱ هپاتیت ۱

۱-۱-۱ تاریخچه..... ۱

۱-۱-۲ اپیدمیولوژی..... ۱

۱-۱-۳ سرایت پذیری و راه های انتقال..... ۲

۱-۱-۴ تظاهرات بالینی..... ۴

۱-۲ انواع ویروس هپاتیت..... ۴

۱-۲-۱ ویروس هپاتیت A ۴

۱-۲-۱-۱ هپاتیت نوعA ۵

۱-۲-۲ ویروس هپاتیت C..... ۶

۱-۲-۲-۱ هپاتیت C ۶

۱-۲-۳ ویروس هپاتیت D ۷

۱-۲-۳-۱ هپاتیت D ۷

۱-۲-۴ هپاتیت B ۸

۱-۲-۴- ۱ بیماریزایی هپاتیت B..... ۸

۱-۲-۴- ۲ منشاء و تاریخچه ویروس هپاتیت B ۹

۱-۲-۴-۳چرخه زندگی ویروس هپاتیت B..... ۱۰

۱-۲-۴-۴ ساختمان ویروس هپاتیت B ۱۱

۱-۲-۴-۵ تشخیص سلولوژیک..... ۱۳

۱- ۳ واکسن هپاتیت B ۱۴

۱-۳-۱ تاریخچه ۱۴

۱-۳-۲ توسعه و پیشرفت در ساخت واکسن ۱۵

۱-۳-۳ پیشرفت در ساخت واکسن هپاتیت از طریق تکنولوژی نوترکیب..... ۱۷

۱-۴ سیاست اجرایی مبارزه با هپاتیت در ایران..... ۱۷

فصل دوم : پروتئین نوترکیب

۲-۱ مقدمه ای بر تولید پروتئین های نوترکیب..... ۲۰
۲-۱-۱ میزبان های مناسب برای استفاده در فناوری نوترکیب ۲۲
۲-۱-۱-۱ اشریشیاکلی..... ۲۲
۲-۱-۱-۲ساکارومیسس سرویزیه ۲۳
۲-۱-۱-۳ پیچیا پاستوریس ۲۴
۲-۲ متابولیسم و سیستم بیان پیچیا پاستوریس..... ۲۷
۲-۲-۱ چرخه مصرف گلیسرول..... ۲۷
۲-۲-۲ چرخه مصرف متانول..... ۲۹
۲-۳ بیان تحت ژن پروموتر الکل اکسیداز یک(AOX۱) ۳۱
۲-۴ تأثیر دما در رشد و تولید پروتئین نوترکیب درپیچیا پاستوریس ۳۲
۲-۵ راهبرد تولید واکسن در پیچیا پاستوریس تحت پروموترAOX1..... ۳۶
۲-۵-۱ فاز غیر مداوم گلیسرول ۳۷
۲-۵-۲ فاز انتقال ۳۸
۲-۵-۳ فاز القاء متانول ۳۸
۲-۶ روش های متداول خوراک دهی متانول در کشت غیر مداوم..... ۴۰
۲-۶-۱ خوراک دهی محدود متانول ۴۱
۲-۶-۲ خوراک دهی متانول با نرخ ثابت ۴۱
۲-۶-۳ خوراک دهی متانول با نرخ نمایی ۴۲
۲-۶-۴ خوراک دهی با مخلوط متانول و گلیسرول ۴۲
۲-۶-۵ خوراک دهی بر اساس میزان اکسیژن محلول ۴۲
۲-۶-۶ خوراک دهی بر اساس غلظت ثابت متانول ۴۳
۲-۶-۷ خوراک دهی بر اساس دمای محدود ۴۳

فصل سوم: ابزار و روش ها

۳-۱ مواد مورد استفاده..... ۴۶
۳-۱-۱ وسایل مورد نیاز..... ۴۷
۳-۲ آماده سازی معرف ها و محیط های کشت..... ۵۰
۳-۲-۱ سرم فیزیولوژی ۰.۹٪ درصد ۵۰
۳-۲-۲ تهیه محیط کشت مایع(YPGB)..... ۵۰
۳-۲-۳ روش تهیه ۴/۵ لیتر محیط کشت..... ۵۰
۳-۲-۴ روش تهیه ۵۰۰ میلی لیتر ویتامین 400 X ۵۱
۳-۲-۴-۱ روش تهیه ۵۰۰ میلی لیتر ویتامین 400 X..... ۵۲
۳-۲-۵ روش تهیه ۲۰۰ سی سی عناصر کم مقدار1000 X ۵۲
۳-۲-۶ بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار با PH=7.4..... ۵۳
۳-۲-۷ تهیه بافر شکست سلول..... ۵۳
۳-۳ فرمنتاسیون..... ۵۳

۳-۴ روش شکست سلول مخمر..... ۵۵
۳-۴-۱ نتایج رنگ آمیزی لام بعد از کشت مخمر..... ۵۷
۳-۴-۲نتیجه رنگ آمیزی لام بعد از شکست مخمر..... ۵۷
۳-۵ روش الایزا..... ۵۸
۳-۵-۱ مراحل یک آزمون الایزا..... ۵۹
۳-۵-۲ محلول های مورد نیاز برای آزمون الایزا..... ۶۱
۳-۵-۲-۱ محلول کوتینگ..... ۶۱
۳-۵-۲-۲ بافر سوبسترا..... ۶۱
۳-۵-۲-۳ بافر متوقف کننده..... ۶۱
۳-۵-۲-۴ محلول شستشو دهنده..... ۶۱
۳-۶ تعیین میزان وزن سلول خشک..... ۶۱
۳-۷ نحوه بدست آوردن پارامترهای سینتیکی..... ۶۲
۳-۷-۱ ضریب رشد ویژه..... ۶۲
فصل چهارم : آنالیز داده ها و تحلیل نتایج
۴-۱مقدمه..... ۶۵
۴-۲ تولید پروتئین و نتایج آزمایش ها..... ۶۶
۴-۳ فاز رشد (کشت غیر مداوم)..... ۶۶
۴-۳-۱ مراحل دوره رشد در کشت غیر مداوم..... ۶۶
۴-۳-۱-۱ مرحله تأخیر[1](الف) ۶۷
۴-۳-۱-۲ مرحله رشد لگاریتمی(ب)..... ۶۸
۴-۳-۱-۳ مرحله ساکن[2](ج) ۷۰
۴-۳-۱-۴ مرحله مرگ[3](د) ۷۰
۴-۴ کشت غیر مداوم همراه با خوراک دهی (فاز القاء)..... ۷۳
فصل پنجم : نتیجه گیری و پیشنهاد..... ۸۱
منابع..... ۸۸

فهرست جداول

جدول۱-۱ خلاصه ای از میزان تولید آنتی ژن سطحی هپاتیت B درمیزبانهای مختلف میکربی ۱۷

جدول۱-۲ دمای بهینه شده جهت بدست آوردن بیشینه برخی از پروتئین های نوترکیب در پیچیا پاستوریس.....۳۴

جدول۴-۱ حداکثر شدت رشد ویژه(μ_{max}) برای میکروارگانیسم های مختلف.....۶۹

جدول۵-۱ میزان مصرف متانول و مشخصات بیومس در انتهای فرمانتاسیون برای بچ های مختلف ۸۳

جدول ۵-۲ مقایسه ی نتایج بدست آمده ۸۵

فهرست اشکال

شکل ۱_۱ : چرخه زندگی ویروس هپاتیت B ۱۱

شکل ۱_۲ : آنتی ژن های رشته ای(Filamentous) و کروی(Spherical) ۱۳

شکل ۱-۳ چرخه متابولیسم پیچیا پاستوریس در گلیسرول..... ۲۷

شکل ۱-۴: چرخه متابولیسم پیچیا پاستوریس در متانول ۲۹

شکل ۱- ۵ : چرخه ساده شده متابولیسم پیچیا پاستوریس در متانول..... ۳۱

شکل ۲- ۱: دستگاه هموژنایزر فشار بالا ۵۵

شکل ۲ -۲ : فرمانتور در حال عملیات تخمیر..... ۵۶

شکل ۲-۳: پیچیا پاستوریس با رنگ آمیزی گرم ۵۷

شکل ۲-۴ پیچیا پاستوریس لیز شده با دانه های شیشه ای 0.5 میلی متری..... ۵۷

شکل۲-۵: خلاصه روش الایزا (ساندویچ)..... ۵۹

شکل ۲-۶ :دستگاه خواننده ELISA ۶۰

شکل۴-۱ نمودار رشد باکتری..... ۶۷

شکل۴-۲ : روند افزایشی رشد سلول در گلیسرول نشان داده شده اند. ۷۲

شکل ۴-۳ : میزان متانول مصرفی در طی فرمانتاسیون..... ۷۶

شکل ۴-۴ روند افزایش ضریب رشد ویژه (μ) ۷۷

شکل۴-۵:رابطه وزن تر به زمان فرانتاسیون..... ۷۸

شکل ۴-۶ رابطه OD نسبت به زمان فرمانتاسیون..... ۷۹

شکل۴-۷ مقایسه وزن تر با OD ۸۰

شکل۵-۱ میزان مصرف متانول برای بچ های مختلف قبل از بهینه سازی..... ۸۴

فصل اول

مقدمه

مقدمه و کلیات

۱-۱ هپاتیت

به التهاب و ورم کبد هپاتیت گفته می شود. عوامل مختلفی از جمله ابتلا به ویروس های هپاتیت (A ، B، C، D، Eو ...)، داروها، سموم، آنوکسی ، الکل و غیره باعث هپاتیت می شوند. هپاتیت ویرویسی یکی از عوامل مهم مرگ زودرس انسان می باشد براساس تخمین سازمان بهداشت جهانی ۳۸۵ میلیون ناقل هپاتیت B و ۱۷۰ میلیون ناقل هپاتیت C در جهان وجود دارد و سالانه بیش از یک میلیون مورد مرگ در اثر هپاتیت اتفاق می افتد[۱].

۱-۱-۱ تاریخچه

اولین موارد هپاتیت منتقله از طریق خون و ترشحات بدنبال تلقیح واکسن آبله حاوی لنف انسان در سال ۱۸۳۳ در برمه گزارش شد. در سال ۱۹۶۵ بلومبرگ آنتی ژن مشخص شد که این آلودگی انتشار جهانی دارد و در اواخر سالهای ۱۹۸۰ ویروس هپاتیت C کشف شد[۱].

۱-۱-۲ اپیدمیولوژی

از نظر شیوع آلودگی به HBV مناطق جهان را به سه دسته تقسیم می کنند:

کم شیوع (کمتر از ٪۲) مانند قسمتهای عمده ای از امریکا، استرالیا و نواحی شمالی اروپا.

شیوع متوسط (٪۷ – ٪۲) قسمت عمده آسیا، شمال افریقا و نواحی شرقی امریکای جنوبی.

شیوع بالا (بیش از ٪۸) آفریقا ، سواحل جنوب شرقی آسیا و آلاسکا در نواحی که شیوع بالاست اغلب موارد آلودگی در زمان تولد اتفاق می افتد. در سایر نواحی جهان اغلب آلودگی پس از بلوغ طی تماس جنسی، تماس با خون و یا سایر ترشحات آلوده اتفاق می افتد.

افرادی که بیشتر در معرض خطر هستند عبارتند از :

نوزادان مادران آلوده ، معتادین تزریقی ، افراد با شرکاء جنسی متعدد ، دریافت کنندگان مکرر خون و فرآورده های خونی ، بیماران تحت دیالیز و پرسنل بهداشتی درمانی حدود ٪۳ از جمعیت جهان به هپاتیت C آلوده اند که از این میان آفریقا با میزان شیوع ٪۳/۵ بیشترین و اروپا با ٪۰/۰۳ کمترین میزان شیوع آلودگی را بخود اختصاص داده اند.

آلودگی بیشتر در سنین ۲۰-۳۹ سالگی اتفاق می افتد ولی حداکثر شیوع مربوط به سنین ۳۰-۴۹ سال است. جنس مذکر غالب می باشد و در حال حاضر عمده ترین افراد در معرض خطر

شامل معتادین تزریقی، دریافت کنندگان مکرر خون و فراورده های خونی و بیماران دیالیزی می باشند[۲].

۱-۱-۳ سرایت پذیری و راه های انتقال

HBsAg بطور تجربی از بسیاری از مایعات بدن جدا شده ولی ویروس کامل و عفونت زا در تمام ترشحات بدن یافت نمی شود. احتمال انتقال هپاتیت B بشدت تحت تاثیر وضعیت فرد از نظر HbeAg می باشد بطوریکه احتمال ایجاد بیماری هپاتیت بدنبال یک تماس تصادفی شغلی با فرد HBeAg منفی ۱ تا ۶ درصد و در مقابل با فرد HBeAg مثبت ۲۲ تا ۳۱ درصد تخمین زده شده است.

۱ -انتقال از مادر به فرزند :

در مورد هپاتیت احتمال انتقال در طی حاملگی و زایمان بالاست بطوریکه در مادران بدون دریافت اقدامات پیشگیری احتمال انتقال حتی به ٪۹۰ می رسد. تنها ۵ تا ۱۰ درصد موارد انتقال از مادر به جنین در طی ۶ ماهه اول اتفاق افتاده و عمدتاً انتقال در سه ماهه آخر بارداری و زایمان اتفاق می افتد. احتمال انتقال هپاتیت C از این طریق حدود ٪۶ ذکر شده است که در مادرانی که HIV و HCV با هم دارند این نسبت به ٪۱۷ می رسد. شیردهی موجب افزایش سرایت هپاتیت C نمی شود .در مورد انتقال هپاتیت B از طریق شیردهی بحث بسیار زیاد است و گرچه HBsAg از شیر مادر جدا شده ولی بعلت تماس بسیار نزدیک مادر با نوزاد نمی توان الزاما انتقال آلودگی را به شیر مادر نسبت داد.

۲ -انتقال از طریق جنسی:

این راه اصلی ترین راه انتقال HBV در کشورهای پیشرفته می باشد. امکان انتقال هپاتیت C از این راه کمتر است و میزان انتقال برای همسران افراد آلوده که ریسک فاکتور دیگری نداشتند ۱/۵٪ ذکر شده است. میزان انتقال در بین مردانی که همسران HCV-Ab مثبت داشتند تفاوتی با مردانی که همسران HCV-Ab منفی داشته اند ندارد. در حالیکه برعکس در زنانی که همسران آلوده داشته اند این نسبت ۴ برابر حالت عکس بوده است. در بین افرادی که رفتارهای جنسی پر خطر داشته اند این رقم چند برابر سایر افراد جامعه است.

۳ -تزریق خون و فرآورده های خونی و پیوند اعضا

این راه قبل از سالهای ۱۹۸۹ اصلی ترین راه انتقال هپاتیت C محسوب می شد. خوشبختانه امروزه با برقراری سیاست های سلامت خون شامل غربالگری اهدا کنندگان، غربالگری خونهای اهدایی و تکنیک های غیر فعال سازی ویروس که بر روی فرآورده های خونی انجام می شود تا حد بسیار بالایی جلوی ایجاد آلودگی از این طریق گرفته شده است (گر چه به هر حال این احتمال هنوز وجود دارد بخصوص در افرادی که بطور مکرر نیاز به تزریق پیدا می کنند).

۴ -انتقال از طریق وسائل تیز، نافذ و تماسهای زیر پوستی

مهمترین روش انتقال در این گروه، استفاده معتادین تزریقی از وسایل تزریق بصورت اشتراکی است. سایر فعالیت های توام با انتقال ویروس که در این گروه قرار می‌گیرند عبارتند از خالکوبی، طب سوزنی، سوراخ کردن گوش، ختنه، تزریق و غیره.

۵ -انتقال در حین ارائه خدمات تشخیصی و درمانی

انتقال ویروس از طریق ابزارهای آلوده در دندانپزشکی، جراحی، دیالیز، اندوسکوپی و سایر اقدامات تشخیصی و درمانی صورت می گیرد. احتمال ایجاد Seroconversion بدنبال حوادث شغلی نظیر فرو رفتن سوزن در مورد هپاتیت B و E آنتی ژن مثبت ۳۷ تا ۶۲ درصد ذکر شده است در حالیکه این رقم در مورد هپاتیت C ٪ ۱/۸ است. احتمال انتقال HCV در حین ارائه خدمات بهداشتی درمانی از طریق تماسهای مخاطی بسیار نادر است.

۶ -سایر راه های انتقال

در مورد ویروس هپاتیت B بعلت مقاومت بالا، ویروس می تواند ۷ تا ۱۰ روز بر روی سطوح باقی بماند و باعث انتقال آلودگی شود لذا وسایل مشترک مثل مسواک، شیشه شیر بچه، اسباب بازی، ظروف غذاخوری، قیچی و غیره می توانند در انتقال نقش داشته باشند. درصد زیای از فرزندان مادران HBsAg مثبت که در طی حاملگی و زایمان آلوده نشده اند بعلت تماس های نزدیک با مادر یا خواهر و برادرهای آلوده طی ماهها یا سالهای اول زندگی، آلودگی را کسب خواهند نمود (Horizontal در مورد هپاتیت C حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد موارد عفونت خود بخود فروکش خواهد کرد ولی در ٪۸۰ موارد آلودگی بصورت مزمن در بدن باقی خواهد ماند) .[۳]

۱-۱-۴ تظاهرات بالینی

ابتلا به ویروس هپاتیت B و C می تواند منجر به عفونتهای حاد و یا مزمن شود. در مورد هپاتیت B تقریبا ٪۷۰ موارد آلودگی بصورت بدون علامت یا بدون یرقان است و در ٪۳۰ موارد علائم بالینی مشخصه هپاتیت حاد دیده می شود نحوه تظاهر بیماری با سن آلودگی ارتباط تنگاتنگ دارد بطوریکه آلودگی در دوره نوزادی ٪۹۰ منجر به عفونت مزمن خواهد شد در حالیکه پس از بلوغ تنها ۱۵ تا ۱۰ درصد موارد دچار عفونت مزمن می شوند و اغلب موارد خود بخود بهبود می یابند. احتمال بروز هپاتیت حاد و یرقان در هپاتیت C حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد می باشد و اغلب موارد آلودگی (٪۸۰) منجر به عفونت مزمن می شود[۲].

۱-۲ انواع ویروس هپاتیت

۱-۲-۱ ویروس هپاتیت A

از خانواده پیکورنا ویروسها و جنس هپاتویروس است که قبلا تحت عنوان آنتروویروس ۷۲ طبقه بندی شده است. اما کنون بنام هپاتیت عفونی نامیده می شود. این ویروس کروی شکل است و تقارن ۲۰ وجهی دارد. بدون پوشش است RNA آن مثبت است. توسط دهان - مدفوع انتقال می یابد. دوره کمون آن تقریبا ۱ ماهه است. بیماری مزمن کبدی ایجاد نمی کند و به ندرت کشنده است و هیچ تشابه آنتی ژنی با دیگر ویروسهای کبدی ندارد. انسان و میمون میزبانهای طبیعی این ویروس هستند. نوکلئوکسید آن در برابر اتر و اسید از سایر پیکورنا ویروسها مقاوم تر است و بعلت همین مقاومت باید در برخورد با بیماران مبتلا احتیاط کرد. با استفاده از گیرنده های سطح سلولهای کبدی وارد سلول می شود. جزئیات پاتوژنیسیته برای این ویروس مشخص نیست. از طریق دستگاه کوارش فرد را آلوده می کند. احنمالا در سلولهای اوروفارنکس و اپیتلیال روده تکثیر پیدا می کند. اگرچه انترفرون باعث محدوده شدن ویروس می شود اما سیستم ایمنی نیز در صدمه زدن به سلولهای کبدی آلوده به ویروس و حذف آنها از بدن بی تاثیر نیست. به دنبال ضایعات سلولهای کبدی، یرقان ظاهر می شود. این ویروس از طریق صفرا وارد روده و مدفوع می شود و از ۱۰ روز قبل از ظهور علایم و ایجاد آنتی بادی در مدفوع وجود دارد و از طریق مدفوع منتشر می شود. علایم بالینی آن شامل خستگی، بی اشتهای، ضعف، تهوع، شکم درد، یرقان و تیره شدن رنگ ادرار است. این بیماری در افراد بالغ شدید تر از از کودکان است. در کودکان اغلب بدون جلب توجه سپری می شود و در اکثر موارد بهبودی کامل حاصل می شود. حداکثر شیوع این بیماری بین سنین ۱۵ تا ۳۰ است. در اکثر

بیماران مبتلا به هپاتیت A تیتر Igm بالا است. لذا مهمترین تست مرولوژی بررسی Igm است که به روش رادیوایمنوسی و الیزا قابل اندازه گیری است و همچنین بررسی بیلی روبین هم جهت ارزیابی اختلال کبدی ارزشمند است. درمان برای این بیماران وجود ندارد و تزریق ایمنوگلوبین برای افراد در تماس با بیمار توصیه می شود که در دوره کمون باعث کاهش علایم بیماری می شود. روشهای پیشگیری شامل رعایت بهداشت در مراکز عمومی، کنترل بهداشتی آب و مواد غذای بخصوص شیر، شستن دستها بعد از رفتن دستشوی و قبل از صرف غذا و ضد عفونی کردن وسایل بیمار بسیار موثر است. واکسن نمونه کشته شده است که فقط برای مواقع ضروری استفاده می شود. این ویروس براحتی در جامعه منتشر می شود. محتمل ترین راه سرایت، راه مدفوعی- دهانی و از طریق تماس فردی می باشد. بعضی محصولات رودخانه ای مثل صدفها می توانند منبع آلودگی با ویروس باشند. آلودگی با ویروس هپاتیت A به ندرت از طریق سرنگ و سوزن آلوده یا انتقال خون پیش می آید. همودیالیز هیچ نقشی در انتشار آن ندارد. شیوع آنتی بادی در افراد دارای سطح اقتصادی و اجتماعی پایین بالاتر است. در کشورهای در حال توسعه و عقب مانده اکثر مبتلایان کودکان هستند، در حالی که در کشورهای پیشرفته ابتلا در سنین بالاتر است. تقریبا ۴۰ درصد موارد حاد هپاتیت توسط هپاتیت A ایجاد شده است[۲].

۱-۲-۱-۱ هپاتیت نوع A

این نوع هپاتیت توسط یک ویروس شدیدا آلوده کننده و مسری ایجاد می شود و از طریق تماس های نزدیک قابل انتقال است. عمده ترین انتقال آن از طریق دهانی- مدفوعی می باشد یعنی در مناطقی که بهداشت رعایت نشده و پس از دستشویی دستها با آب و صابون شسته نمی شود و با همان دست غذا خورده می شود این ویروس به راحتی انتقال می یابد. همچنین در اثر آب، غذاها، شیر آلوده و همچنین در اثر خوردن صدف و گوشت نپخته ماهی انتقال می یابد. در زمانی که علائم بیماری و زردی بروز کرد فرد فقط باید استراحت کند تا ویروس توسط دفاع سیستم ایمنی بدن مهار شود و به تدریج التهاب کبدی به وضعیت سابق برگردد. نکته قابل ذکر این است که هپاتیت A به هیچ نوع درمان دارویی احتیاج ندارد[۳].

۱-۲-۲ ویروس هپاتیت C

ویروسی است دارای پوشش با RNA مثبت که جزء فلاوی ویروس طبقه بندی می شود. دوره کمون بیماری ۳ تا ۴ روز در موارد طولانی ۳ تا ۴ ماه است. معمولا هپاتیت C از لحاظ بالینی خفیف بوده و نیاز به بستری شدن ندارد و اکثر بیمارن بدون علایم بالینی هستند. به رغم طبیعت ملایم بیماری ۳۰ تا ۵۰ در صد آنها به سمت مزمن شدن پیش می روند. مهمترین راه انتقال بیماری از طریق خون و فرآورده های خونی آلوده است. تزریق وریدی مواد مخدر، پیوند اعضا آلوده، مقاربتهای جنسی و دریافت کنندگان فاکتورهای خونی آلوده نیز از راه های انتقال این ویروس است. اکثر مبتلایان به هپاتیت C معتادین تزریق داخل وریدی هستند. فعلا واکسنی برای این بیماری وجود ندارد. ایمنی حاصل از عفونت با دوام و پیشگیری کننده نمی باشد. مصرف انترفرون آلفا تا حدودی در درمان بیماری موثر است. مصرف آنتی بادی ضد ویروس در میمون سبب طولانی شدن دروه کمون می شود. علایم بالینی در شکل حاد بیماری شبیه هپاتیت A و B است ولی خفیف تر. هپاتیت مزمن پایدار حاصله از ویروس هپاتیت C شایع تر از نوع B می باشد که حدود ۲۰ درصد آن به سیروز و نارسایی کبد منجر می شود. پاسخ ایمنی سلول عامل اصلی در تخریب سلول است. تشخیص آزمایشگاهی عمدتا بر مبنای مرولوژی به روش الیزا استوار می باشد. آنتی بادی ۳ تا ۷ هفته پس از ابتلا قابل شناسای است, اما آنتی بادی همیشه در خون وجود ندارد و لذا پیشنهاد می شود که بررسی آنتی بادی عمدتا در فاز مزمن صورت گیرد[۳].

۱-۲-۲-۱ هپاتیت C

راه انتقال این نوع ویروس به وسیله تزریق است. این بیماری غالبا در گیرندگان خون و فراورده های خونی و معتادان تزریقی بروز می کند. البته در کشور ما انتقال این نوع از هپاتیت از طریق فراورده های خونی بسیار کم شده است زیرا کنترل می شوند. پیشگیری از این نوع از هپاتیت این است که معتادان تزریقی یا اعتیاد خود را ترک کنند و یا از روش دیگری برای استفاده از مواد مخدر استفاده کنند. قانونمندی و عدم تجاوز به حریم خانواده و فعالیتهای جنسی سالم نیز از راههای پیشگیری است[۳].

۱-۲-۳ ویروس هپاتیت D

تقریبا ۱۵ میلیون نفر در دنیا آلوده به ویروس هپاتیت D هستند. ویروس هپاتیت D برای همانند سازی خود از ویروس هپاتیت B و امکانات سلول میزبان استفاده می کند. این ویروس ناقص است و از نظر اندازه و ساختمان ژنوم نیاز به کمک برای همانندسازی مانند ویروئیدهای گیاهی است. ژنوم این ویروس فقط یک پروئتین کپسیدی را کد می نماید. ویروس دارای ژنوم RNAمنفی، تک رشته ای، حلقوی و کوچک است. ویروس دارای پوشش است و احتمالا دارای ۳ فرم است. همانند هپاتیت B به سلولهای کبد متصل شده و وارد آن می شود. نسخه برداری و همانندسازی ویروس غیر متعارف است. این ویروس مانند هپاتیت B از طریق مایعات بدن انتشار می یابد. هر دو ویروس با یک روش مشترک به سلول میزبان متصل می شوند. یک فرد ممکن است به عفونت توام هپاتیت B و D مبتلا گردد. همانندسازی ویروس همراه با صدمه زدن به سلول میزبان (سلول کبد) است. صدمات حاصله از ویروس هپاتیت D به سلول کبد بر خلاف ویروس هپاتیت B منحصر به پاسخ ایمنی سلول میزبان نیست. احتمالا عفونت مزمن هپاتیت D در افراد مبتلا به هپاتیت مزمن B نیز بروز می کند[۳].

هپاتیت D در کودکان و افراد بالغ مبتلا به هپاتیت B ایجاد می شود. ویروس انتشار جهانی داشته و آندمیک جنوب ایتالیا، خاورمیانه، قسمتهایی از آفریقا و آمریکا لاتین می باشد. اساس تشخیص آزمایشگاهی بر مبنای افزایش آنزیمهای کبدی است. بررسی آنتی ژن و ژنوم در خون نیز مفید است. تا کنون درمان اختصاصی برای هپاتیت D پیشنهاد نشده است. اما چون همانند سازی ویروس به وجود هپاتیت B نیاز دارد لذا پیشگیری از هپاتیت B در پیشگیری از این ویروس موثر خواهد بود. با واکسیناسیون هپاتیت B حذف محصولات خونی آلوده، عدم مصرف مواد مخدر تزریقی و کنترل ناقلین ویروس از انتشار هپاتیت D جلوگیری خواهد کرد [۳] .

۱-۲-۳-۱ هپاتیت D

فقط در بیمارانی که به صورت طولانی ناقل ویروس هپاتیت B هستند بروز می کند. علائم این بیماری مشابه سایر هپاتیت های ویروسی است؛ با این تفاوت که سیر شدیدی دارد و گاهی سبب تخریب کامل کبد و مرگ می شود. از آنجایی که در قرن حاضر ایدز و هپاتیت B دو بیماری لاعلاج هستند باید به آنها توجه بیشتری کرد. زیرا ویروس ایدز در خارج از بدن تنها ۳۰ ثانیه زنده می ماند اما ویروس هپاتیتB در خارج از بدن ۲ الی ۳ ساعت زنده است. از این رو احتمال آلودگی به این ویروس بیشتر خواهد بود. اما نکته مهم اینجاست که اگر درمانی برای