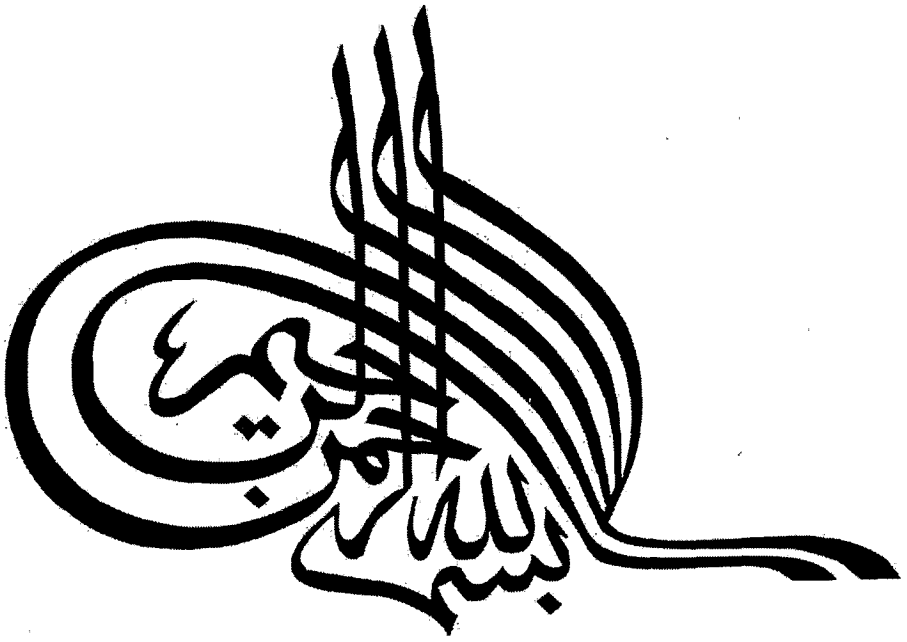


١٩٣٧

۸۷/۱/۱-۹۲۳
۸۷/۱۰/۲۲

پایان‌نامه جهت دریافت درجهٔ کارشناسی ارشد
میکروبیولوژی

عنوان: **بررسی شیوع پارووویروس B19 انسانی در اهداکنندگان خون به روش ELISA و PCR**

اساتید راهنما:
جناب آقای دکتر مسعود حسینی
جناب آقای دکتر محمود محمودیان شوشتری

استاد مشاور:
سرکار خانم دکتر زهره شریفی

نگارش:
فاطمه محمودی

بهمن‌ماه ۱۳۸۶

۱۳۸۷ /۱۰/ ۲

۱۰۹۰۳۷

تقدیم به:

پدرم، نخستین آموزگارم

مادرم، نخستین عشقم

برادرم، نخستین راهنمایم

خواهرانم، نخستین دوستانم

همسرم، تنها همراهم

به‌نام پروردگار اندیشه‌مندان

جناب آقای دکتر سید مسعود حسینی، استادیار محترم دانشکدهٔ زیست‌شناسی دانشگاه شهید بهشتی،

جناب آقای دکتر محمود محمودیان شوشتری، استادیار محترم مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران،

سرکار خانم دکتر زهره شریفی، استادیار محترم مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران،

شایسته است و بر خود می‌دانم مراتب سپاس و قدردانی خود را از شما اساتید گرانمایه به جای آورم؛ با این‌که می‌دانم چند سطر مجالی بس کوتاه است برای ادای این مهم. مقام شامختان را می‌ستایم و سعادت، سلامت و بهروزی‌تان را از دادار خواهانم. صمیمانه از راهنمایی‌ها و نظرات ارزشمندتان سپاسگزارم. امید آن دارم که شایستگی شاگردی‌تان را داشته باشم .

از محبت و همراهی دوست و همکلاسی عزیزم سرکار خانم آمنه الیکایی تشکر و قدردانی می‌نمایم. آرزومندم در طلب دانش هماره ثابت قدم و کامیاب باشند.

از زحمات بی‌شایبهٔ جنابان آقای یحیی معروفی و آقای قاسم حسن‌نژاد، اعضای بخش ویروس‌شناسی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، کمال امتنان دارم؛ چراکه اگر همکاری‌ها و محبت‌هایشان نبود، قطعا" انجام این طرح مقدور نمی‌شد.

بار خدایا، منت تو راست که کار جهان چنان راست گردانیدی که طلبه‌ای باشم و مردمان نیک روزگار دستم گیرند و راه چشمهٔ دانش را نشانم دهند.

بار الها، چنان مقدر فرما که در پی آب نباشم؛ بل تشنگی جویم. سینه‌ای فراخ و توفیقی نصیبم گردان تا نشانه‌هایت را دریابم و چنان کن که تا آخرین لحظهٔ حیات دمی از آموختن بازنمانم.

بررسی شیوع پارووویروس B19 انسانی در اهداکنندگان خون به روش ELISA و PCR

پارووویروس B19 انسانی ویروس بسیار کوچک با DNA تک‌رشته، بدون پوشش و عضو خانوادهٔ پارووویریده می‌باشد. این ویروس موجب بروز تعدادی از بیماری‌های بالینی شامل اریتمای عفونی (بیماری پنجم)، هیدروپس فتالیس، بحران آپلاستیک گذرا، آرتروپاتی و کم‌خونی مادرزادی می‌شود. انتقال ویروس از طریق تنفس، انتقال خون و فراورده‌های خونی است. DNAی B19 از طریق روش‌های حساس PCR قابل تشخیص است. بررسی‌های قبلی نشانگر آن است که افرادی که ایمونوگلوبولین از نوع IgG ضد ویروس در خونشان ظاهر شده، از نظر وجود ویروس منفی هستند. آنتی‌بادی‌های کلاس IgM پارووویروس B19 انسانی به طور معمول برای چندین ماه و آنتی‌بادی کلاس IgG پارووویروس B19 برای چندین سال و حتی تا پایان عمر دوام دارند. هدف این مطالعه تعیین شیوع پارووویروس B19 انسانی در بین اهداکنندگان خون در تهران بود.

سرم ۳۶۵ اهداکنندهٔ خون که از نظر HIV و HBsAg وHCV منفی بودند، از نظر حضور IgM و IgG علیه پارووویروس B19 ابتدا به روش ELISA، سپس تمام سرم‌ها برای حضور DNA ویروس با روش semi-nested PCR مورد بررسی قرار گرفت.

از میان ۳۶۵ اهداکنندهٔ خون، ۲ نفر (۰/۵٪) آنتی‌بادی IgM علیه ویروس را دارا بودند و سرم این افراد برای IgM anti B19 مثبت گزارش شد و از میان این تعداد اهداکننده، ۱۶۹نفر (۴۶٪) آنتی‌بادی IgG علیه ویروس مثبت بودند. DNAی پارووویروس B19 در هیچ یک از سرم اهداکنندگان یافت نشد (0٪).

با این‌که عفونت B19 در برخی دریافت‌کننده‌های خون می‌تواند عوارض جدی به همراه داشته باشد، هنوز غربالگری اهداکنندگان برای این ویروس در مصرف‌کنندگان اجباری نیست. در این مطالعه، شیوع IgG در میان اهداکنندگان بالا بود و در هیچ یک از نمونه‌ها DNAی ویروس تشخیص داده نشد. مطالعات بیشتر بر روی تعداد زیادی اهداکننده و همچنین گروه‌های پرخطر لازم است.

کلمات کلیدی: پارووویروس B19؛ اهداکنندگان خون؛ شیوع؛ nested PCR

AAV: Associated Adeno Virus

CFA: Chronic Fatigue Syndrome

dNTP: deoxy Nucleotides Three Phosphate

DNA: Deoxy Nucleic Acid

EBV: Epstain Barr Virus

EIA: Enzyme Immuno- assay

ELISA: Enzyme Linked Immuno- Sorbent Assay

Gb4: Globoside, P Ag

G6PD: Glucose 6 Phosphate

HPB19V: Human Parvovirus B19 Virus

HIV: Human Immuno- deficient Virus

IDA: Immuno- Diffusion Assay

IFA: Immuno fluorescence Assay

IgG: Immunoglobulin G

IgM: Immunoglobulin M

ISH: In- Situ Hybridization

ITP: Idiopathic Thrombocytopenic Purpura

MVM: Minute Virus of Mice

NIHF: Non Immune Hydrops Fetalis

NS: Non Structural protein of B19

ORF: Open Reading Frame

P Ag: P Antigen, receptor of B19 on erythroid cells

PCR: Polymerase Chain Reaction

PRCA: Pure Red Cell Aplasia

RA: Romatoid Arthritis

RF: Romatoid Factor

RIA: Radio Immuno- assay

RBC: Red Blood Cell

RHA: Receptor Mediated Haemagllutination Assay

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

TAC: Transient Aplastic Crisis

VAHSA: Virus Associated Hemophagocytic Syndrome

VP: structural protein of B19

UV: Ultra Violet

عنوان.....صفحه

فهرست مطالب.....د

فهرست جدول‌ها.....ز

فهرست شکل‌ها.....ط

۱- فصل اول: کلیات.....۱

۱-۱- مقدمه.....۲

۱-۲- تاریخچه.....۵

۱-۳- ویروس.....۶

۱-۳-۱- ساختار.....۶

۱-۳-۲- ژنوم.....۶

۱-۳-۳- خصوصیت‌های فیزیکوشیمیایی.....۹

۱-۳-۴- طبقه‌بندی.....۹

۱-۳-۵- چرخهٔ زندگی.....۱۲

۱-۴- بررسی‌های بالینی.....۱۴

۱-۴-۱- شیوع.....۱۴

۱-۴-۲- انتقال.....۱۵

۱-۴-۳ اهمیت بالینی.....۱۶

۱-۴-۴- تظاهرات بالینی.....۱۷

۱-۴-۴-۱- در افراد سالم.....۱۷

۱-۴-۴-۲- در میزبان با ایمنی سرکوب‌شده.....۲۱

۱-۴-۴-۳- در دوران بارداری.....۲۴

۱-۴-۵- پاسخ ایمنی و سرولوژی بیماری.....۲۹

۱-۴-۵-۱- پاسخ هومورال.....۲۹

۱-۴-۵-۲- پاسخ سلولی.....۳۱

۱-۵- تشخیص آزمایشگاهی.....۳۲

۱-۵-۱- آسیب‌شناسی سلولی.....۳۲

۲-۵-۱- کشت B19 ..... ۳۳
۳-۵-۱- هیستولوژی ۳۳
۴-۵-۱- آزمایش‌های سرولوژی ۳۳
۱-۴-۵-۱- ELISA ۳۵
۵-۵-۱- آزمایش‌های مولکولی ۳۹
۱-۵-۵-۱- استخراج DNA ۴۱
۲-۵-۵-۱- PCR ۴۱
۳-۵-۵-۱- ژل الکتروفورز ۴۴
۶-۱- کنترل، پیشگیری و درمان ۴۵
۱-۶-۱- کنترل و پیشگیری ۴۵
۲-۶-۱- درمان ۴۶
۷-۱- بیان مسئله ۴۷
۲- فصل دوم: مواد و روش‌ها ۴۹
۱-۲- روش اجرا ۵۰
۱-۱-۲- نوع مطالعه، جامعهٔ مورد مطالعه و نمونه‌گیری ۵۰
۲-۱-۲- شاخص آماری و سنجش فرم اطلاعاتی ۵۱
۲-۲- مواد و وسایل مورد نیاز ۵۱
۳-۲- آزمون‌ها ۵۳
۱-۳-۲- آزمون سرولوژی ۵۳
۲-۲-۲- آزمون مولکولی ۶۱
۱-۲-۲-۲- استخراج DNA ۶۱
۲-۲-۲-۲- PCR ۶۵
۳-۲-۲-۲- ژل الکتروفورز ۶۷
۳- فصل سوم: نتایج ۶۹
۱-۳- بررسی متغیرهای زمینه‌ای ۷۰
۱-۱-۳- جنسیت ۷۰

۲-۱-۳- سن ۷۱
۳-۱-۳- مسافرت به خارج از کشور ۷۲
۴-۱-۳- سابقهٔ اهدای خون ۷۳
۲-۳- بررسی شیوع B19 در بین اهداکنندگان خون ۷۴
۱-۲-۳- یافته‌های آزمون ELISA ۷۴
۱-۱-۲-۳- شیوع آنتی‌بادی IgG anti B19 در بین اهداکنندگان خون ۷۴
۲-۱-۲-۳- شیوع آنتی‌بادی IgM anti B19 در بین اهداکنندگان خون ۷۵
۲-۲-۳- یافتهٔ آزمون semi-nested PCR ۷۶
۳-۳- بررسی ارتباط بین شیوع B19 با متغیرهای زمینه‌ای ۷۷
۱-۳-۳- بررسی رابطهٔ جنسیت و شیوع B19 ..... ۷۷
۲-۳-۳- بررسی رابطهٔ سن و شیوع B19 ..... ۷۸
۳-۳-۳- بررسی رابطهٔ مسافرت به خارج از کشور و شیوع B19 ..... ۷۹
۴-۴-۳- بررسی رابطهٔ سابقهٔ اهدای خون و شیوع B19 ..... ۸۰
۴- فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری ۸۱
۵- پیشنهاد ۸۷
۶-منابع ۸۹

فهرست جدول‌ها.....صفحه

جدول۱-۱: ویروس‌های بیماری‌زای مهره‌داران از خانوادهٔ پارووویرینهآ و بی‌مهرگان از خانوادهٔ دنزووویرینهآ.....۱۲

جدول۲-۱: تظاهرات عفونت حاد B19 در میزبان.....۲۱

جدول۳-۱: تظاهرات عفونت مزمن B19 در میزبان.....۲۳

جدول ۴-۱: عوارض بالینی عفونت B19.....۲۷

جدول۵-۱: حساسیت روش‌های تشخیصی عفونت B19 در ۳ حالت حاد، مزمن و گذشته.....۳۹

جدول ۶-۱: درمان بیماری‌های ناشی از عفونت B19.....۴۷

جدول ۱-۲: معرف‌های موجود در کیت IgG...۵۴

جدول ۲-۲: معرف‌های موجود در کیت IgM...۵۵

جدول ۳-۲: آماده‌سازی محتویات کیت ELISA...۵۶

جدول ۴-۲: جدول تفسیر نتایج حاصل از ELISA...۵۹

جدول ۵-۲: کارایی کیت ELISAی IgM پارووویروس B19.....۶۰

جدول ۶-۲: کارایی کیت ELISAی IgG پارووویروس B19.....۶۱

جدول ۷-۲: معرف‌های موجود در کیت استخراج اسید نوکلئیک High pure nucleic acid kit.....۶۲

جدول ۸-۲: آماده‌سازی محلول‌های موجود در کیت استخراج اسید نوکلئیک High pure nucleic acid kit ۶۳

جدول ۹-۲: مواد مورد نیاز در انجام مرحلهٔ اول semi-nested PCR.....۶۵

جدول ۱۰-۲: مواد مورد نیاز در انجام مرحلهٔدوم semi-nested PCR.....۶۵

جدول ۱۱-۲: چرخهٔ دمایی در مرحلهٔ اول semi-nested PCR.....۶۶

جدول ۱۲-۲: چرخهٔ دمایی در مرحلهٔ دوم semi-nested PCR.....۶۶

جدول ۱-۳: توزیع فراوانی اهداکنندگان خون بر اساس جنسیت.....۷۰

جدول۲ – ۳: توزیع فراوانی سنی اهداکنندگان خون.....۷۱

جدول ۳-۳: توزیع فراوانی اهداکنندگان خون با سابقهٔ مسافرت به خارج و بدون آن.....۷۲

جدول۴-۳: توزیع فراوانی اهداکنندگان خون با سابقهٔ اهدای خون و بدون آن.....۷۳

جدول۵-۳: توزیع فراوانی شیوع IgG anti B19 در بین اهداکنندگان خون.....۷۴

جدول۶-۳: توزیع فراوانی شیوع آنتی‌بادی IgM anti B19 در بین اهداکنندگان خون.....۷۵

جدول ۷-۳: توزیع فراوانی آنتی‌بادی IgG anti B19 در زن و مرد..... ۷۷

جدول ۸-۳: توزیع فراوانی آنتی‌بادی IgG anti B19 در گروه‌های سنی مختلف..... ۷۸

جدول ۹-۳: توزیع فراوانی آنتی‌بادی IgG anti B19 در بین افراد با سابقهٔ مسافرت به خارج از کشور و بدون آن ۷۹

جدول ۱۰-۳: توزیع فراوانی آنتی‌بادی IgG anti B19 در بین افراد با سابقهٔ اهدای خون و بدون آن..... ۸۰

فهرست شکل‌ها.....صفحه

شکل ۱-۱: ساختار ژنوم B19.....۷

شکل ۲-۱: نمایش دو مسیر منجر به مرگ سلولی در اثر عفونت با B19 .....۸

شکل۳-۱: شمای طبقه‌بندی خانوادهٔ پارووویریده.....۱۰

شکل ۴-۱: نحوهٔ تکثیر B19.....۱۳

شکل ۵-۱: شمای چرخهٔ تکثیرB19.....۱۶

نمودار ۱-۱: مدیریت تشخیصی عفونت B19 در زنان باردار در معرض عفونت B19 و مقایسهٔ پاسخ ایمنی در افراد سالم و گروه‌های پرخطر.....۲۵

شکل ۶-۱: نحوهٔ عملکرد عفونت B19 در کودکان و افراد بالغ و جنین.....۲۸

شکل ۷-۱: عفونت B19 و علایم بالینی، تغییرات هماتولوژیک، ویرمی و پاسخ ایمنی در میزبان.....۳۰

شکل ۸-۱: رابطهٔ تیتر ویروس و آنتی‌بادی‌های موجود در بدن با مدت زمان در معرض ویروس بودن و ارزیابی‌های تشخیص ویروس در زمان عفونت B19.....۳۲

شکل ۹-۱: اساس عملکرد PCR.....۴۳

نمودار ۱-۳: نمودار درصد فراوانی اهداکنندگان خون به تفکیک جنسیت.....۷۰

نمودار ۲- ۳: نمودار درصد فراوانی توزیع سنی در بین اهداکنندگان خون.....۷۱

نمودار ۳-۳: نمودار درصد فراوانی اهداکنندگان خون با سابقهٔ مسافرت به خارج و بدون آن.....۷۲

نمودار۴-۳: نمودار درصد فراوانی اهداکنندگان خون با سابقهٔ اهدای خون و بدون آن.....۷۳

نمودار ۵-۳: درصد فراوانی شیوع IgG anti-B19 در بین اهداکنندگان خون.....۷۴

نمودار ۶-۳: درصد فراوانی شیوع آنتی‌بادی IgM anti-B19 در بین اهداکنندگان خون.....۷۵

شکل ۱-۳: الکترفورز محصول semi-nested-PCR.....۷۶

نمودار ۷-۳: مقایسهٔ فراوانی آنتی‌بادی IgG anti B19 در زن و مرد.....۷۷

نمودار ۸-۳: مقایسهٔ فراوانی آنتی‌بادی IgG anti B19 در گروه‌های سنی مختلف.....۷۸

نمودار ۹-۳: مقایسهٔ فراوانی آنتی‌بادی IgG anti B19 در بین افراد با سابقهٔ مسافرت به خارج از کشور و بدون آن ۷۹

نمودار۱۰-۳: مقایسهٔ فراوانی آنتی‌بادی IgG anti B19 در بین افراد با سابقهٔ اهدای خون و بدون آن ۸۰

فصل اول: کلیات

۱-۱- مقدمه

پارووویرس‌ها[1] به عنوان موضوعی برای مطالعه، برای گروه‌های مختلفی مورد توجه هستند. پارووویروس‌ها از این جهت برای دامپزشک‌ها مهم هستند که مسئول تعدادی از بیماری‌های جدی در حیوانات محسوب می‌شوند. برخی عفونت‌های پارووویروسی مانند پان‌لوکوپنیای[2] گربه‌سانان و بیماری Aleutian در نوعی سمور به عنوان الگویی از بیماری انسان مورد توجه می‌باشند. همچنین اهمیت بالای آن‌ها برای زیست‌شناسان مولکولی به دلیل ژنوم محدودشان است که آن‌ها را برای بررسی تنظیم ژن مناسب ساخته است. با کشف اولین پارووویروس بیماری‌زای انسانی، HPB19V[3] (که از این پس در این مطالعه جهت اختصار B19 نامیده خواهد شد)، به عنوان عامل بیماری‌زای انسانی وارد فهرست درس‌های پزشکی شد (Fields *et al.*, 1996). B19 در نیمهٔ دههٔ ۱۹۷۰م، کشف گردید (Cossart *et al.*, 1975). مادهٔ ژنتیکی ذرات موجود در مرحلهٔ حاد سرمی به صورت DNAی تک‌رشته است که طبقه‌بندی این ذرات ویروسی را به عنوان یک عضو مناسب از خانوادهٔ پارووویریده[4] امکان‌پذیر می‌سازد (Clewley 1984; Summers 1983). B19 تنها عضو از این خانواده است که در انسان بیماری‌زا می‌باشد (Cossart *et al.*, 1975). اعضای خانوادهٔ بزرگ پارووویریده که به‌طور معمول برای حشرات و حیوانات بیماری‌زا هستند، کوچک‌ترین ویروس‌های DNAدار محسوب می‌شوند که قادرند، سلول‌های پستانداران را در مراحل نهایی تمایز آلوده کنند (Biagini 2004).

در انسان، عفونت B19 بسیار شایع است و می‌تواند با طیف وسیعی از ناهنجاری‌های بالینی همراه شود که این ناهنجاری‌ها تحت تأثیر سن و وضعیت ایمنی میزبان می‌باشد. عوارض ناشی از B19 عبارت است از: بیماری پنجم (اریتمای عفونی) هیدروپس فتالیس، بحران آپلاستیک گذرا، آرتروپاتی و آپلازی مادرزادی می‌شود (Mahmoodian Shooshtari *et al.*, 2005).

---

[1] Parvoviruses
[2] Panleucopenia
[3] Human Parvovirus B19 Virus
[4] Parvovirdae

یکی از راه‌های انتقال ویروس به میزبان انسانی از طریق قطرات آئروسلی حاوی ویروس B19 است. ویرمی یک هفته بعد از تماس با ویروس رخ می‌دهد و از طریق آنتی‌ژن P یا گلوبوساید (Gb4) منجر به عفونت گلبول‌های قرمز می‌شود (Brown *et al.*, 1993). یکی دیگر از راه‌های انتقال B19 انتقال از طریق خون و فراورده‌های خونی است. در بیماران HIV- مثبت، B19 عامل مهمی در کم‌خونی درمان‌پذیر محسوب می‌شود (Koduri *et al.*, 2002).

در کودکان، شایع‌ترین ظهور بالینی عفونت B19 بیماری پنجم یا اریتمای عفونی است (White *et al.*, 1985). هنگامی که بیماران مبتلا به پلی‌آرترالژیا[1] / پلی‌آرتریت برای نخستین بار به لحاظ بالینی تشخیص داده می‌شوند، باید از نظر حضور عفونت B19 مورد توجه واقع شوند (Naides *et al.*, 1990). مسئول بودن B19 در هیدروپیک شدن جنین (Anderson 1988) و هم شباهت بالینی بیماری پنجم با سرخک و هم گرایش پارووویروس‌ها به سقط جنین منجر به کاوش سودمند و موفق در زمینهٔ هیدروپس فتالیس در انسان گردید (Hall 1990).

B19 به منظور همانندسازی نیازمند سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی در مغز استخوان است و در طی همانندسازی این سلول‌ها را تخریب می‌کند (Henriques *et al.*, 2005). معمولا" برای بررسی حضور B19 با استفاده از روش‌های ELISA[2] و PCR[3]، نمونه‌ها از خون محیطی افراد و خون بند ناف در نوزادان (Ziyaeyan *et al.*, 2005) و مایع آمنیوتیکی جنین (Crane *et al.*, 2002) به دست می‌آید.

B19 به دلیل مقاوم بودن به راحتی حذف نمی‌شود و در خون و فراورده‌های خونی باقی می‌ماند. در صورتی که مصرف‌کنندگان فراورده‌های خونی یکی از افراد گروه‌های پرخطر مانند:

- کودکان، به ویژه در سنین دبستان (B19 موجب بیماری پنجم می‌شود.)
- والدین کودکان مبتلا به عفونت با B19
- زنان باردار (که B19 موجب عفونت جنین و بیماری می‌گردد.)

---

[1] Poly Arthralsia
[2] Enzyme Linked Immuno- assay
[3] Polymerase Chain Reaction

- افراد مبتلا به کم‌خونی (موجب بحران آپلازی در این افراد می شود.) (Morray 2002)
- مبتلایان به لوسمی یا سرطان
- افراد دارای نقص ایمنی
- افرادی که عضوی پیوند کرده‌اند
- افراد HIV مثبت (Mahmoodian Shooshtari *et al.*, 2005;**) باشند، ممکن است عواقب جدی در این افراد به وجود آورد و در نهایت هزینه‌های درمانی ـ روانی را به جامعه تحمیل نماید (در این مطالعه، از این پس هر کجا که سخن از گروه‌های پرخطر به میان آید، منظور گروه‌های ذکرشده در بالاست.).

امروزه با وجود خطر باقی مانده از انتقال ویروس‌ها از راه خون، نگرانی تأمین خون سالم به طور چشمگیری کاهش یافته است. تأمین خون سالم برای بانک‌های خون بسیار مهم است. اخیرا" انجام روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک برای تشخیص ویروس HIV تیپ ۱، ویروس هپاتیت C و ویروس هپاتیت B توسعه یافته است که با کاهش دورهٔ پنجره، ایمنی را افزایش می‌دهد (Thomas *et al.*, 2002). در کنار HIV، HCV و HBV، ویروس‌های کمتر خطرناکی وجود دارد که البته این ویروس‌های کمتر خطرناک در گروه‌های پرخطر عوارضی در پی دارد؛ به همین دلیل توجه به تأمین خون سالم اهمیت می‌یابد. B19 مثالی از این دسته ویروس‌هاست. به نظر می‌رسد، این ویروس در افراد سالم اهمیتی نداشته باشد، اما در گروه‌های پرخطر، موجب عوارض بالینی جدی می‌شود.

با بررسی و تعیین میزان شیوع B19 در بین جمعیت اهداکنندگان خون می‌توان به یافته‌های آماری‌ای دست یافت که پیش درآمدی باشد بر مطالعات بعدی که به هنگام تفسیر داده‌های اپیدمیولوژی، پیوند مغز استخوان یا بررسی عوارض بالینی ناشی از عفونت B19 مفید واقع شود.

۲-۱- تاریخچه:

پارووویروس از کلمهٔ یونانی *parvum* به معنای کوچک مشتق شده است (Henriques *et al.*, 2005; Ergaz *et al.*, 2006). B19 در ۱۹۷۵م، در انگلستان و در مطالعه‌ای که بر روی هپاتیت B در نمونه‌های سرمی اهداکنندگان سالم خون انجام می‌گرفت، کشف شد (Cossart *et al.*, 1975). در طی الکتروفورز نمونه‌ها، یک باند غیرعادی در نمونهٔ شمارهٔ ۱۹در پانل B مشاهده شد؛ به همین دلیل ویروس تازه‌کشف شده B19 و در ادامه پارووویروس نامیده شد (Ergaz *et al.*, 2006; van Gessel *et al.*, 2006). در دههٔ ۱۹۸۰م، ژنوم B19 کلون و تعیین توالی شد (Cotmore *et al.*, 1984; Shade *et al.*, 1986). در ۱۹۸۵م، B19 به عنوان عضوی از خانوادهٔ پارووویریده طبقه‌بندی شد (Peterlana *et al.*, 2006).

در ۱۹۸۲م، سنجش رادیوایمونو (RIA) [1] برای تعیین آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه B19 پایه‌ریزی شد (Anderson *et al.*, 1982). سپس ارزیابی آنزیمی با استفاده از مواد واکنش ایمنی متصل به آنزیم (ELISA) برای این منظور طراحی شد (Anderson *et al.*, 1986). در این سنجش، ویروس از بیماران مرحلهٔ ویرمی (به عنوان منبع آنتی‌ژن) به دست آمد. در همین زمان، B19 برای اولین‌بار در شرایط آزمایشگاه[2] با استفاده ازسلول‌های مغز استخوان انسان کشت داده شد (Ozawa 1986).

حساسیت و اختصاصی بودن ELISA مورد تأیید واقع شد و مشخص گردید که واکنش‌های غیراختصاصی می‌توانند تا ۲۰هفته پس از ویرمی بررسی شوند (Schwarz *et al.*, 1988).

[1] Radio Immuno Assay
[2] In vitro

۳-۱- ویروس

۱-۳-۱- ساختار

پارووویروس‌ها ذراتی با کپسید بیست وجهی، بدون پوشش، و دارای قطر ۱۸-۲۶ نانومتر هستند (Bdour 2006;Brooks 2001; Henriques *et al.*, 2005; Melnick *et al.*, 1993; Morray2002). وزن مولکولی آن‌ها $۵/۵-۶\times۱۰^{۶}$ دالتون، چگالی شناوری آن‌ها $g/cm^{۳}$ ۱/۳۹-۱/۴۹ است. پارووویروس‌ها بسیار مقاوم هستند؛ pH بین ۳- ۹ و یا حرارت $۵۶^{\circ}c$ را به مدت ۶۰ دقیقه تحمل می‌کنند (Melnick *et al.*, 1993).

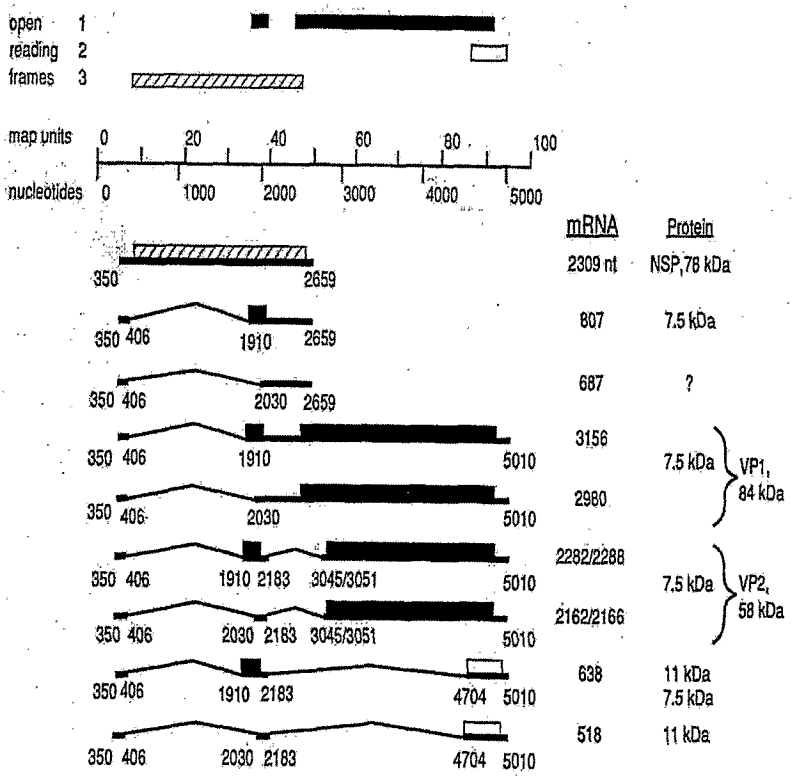
۲-۳-۱- ژنوم

ژنوم پارووویروس‌ها زنجیر تک‌رشتهٔ DNA خطی به اندازهٔ 5kbp و وزن مولکولی $۱/۵-۲\times۱۰^{۶}$دالتون است (Brooks 2001).

ژنوم B19 شامل یک DNAی تک‌رشته با ۵۵۹۶ نوکلئوتید است که از یک ناحیهٔ کدکنندهٔ داخلی به طول ۴۸۳۰ نوکلئوتید در مجاورت توالی پالیندروم انتهایی، به طول ۳۸۳ نوکلئوتید، تشکیل شده است. پالیندروم‌ها می‌توانند آرایش فضایی سنجاق سر مانند را به خود بگیرند و از پرایمرها در ساخت رشتهٔ مکمل محافظت کنند. ژنوم پارووویروس دو قالب خواندن[1] دارد که دو پروتئین ساختاری را کد می‌کند: VP_1 و VP_2 که در ناحیهٔ راست ژنوم قرار دارند؛ و همچنین یک پروتئین غیرساختاری مهم: NS_1 که در ناحیهٔ چپ ژنوم واقع است (Ergaz *et al.*, 2006; a: Ozawa *et al.*, 1987; b: 1988 Shade *et al.*, 1986). B19 می‌تواند تحت تأثیر آنزیم‌های محدودگر نوکلئازی، پلی‌مرفیسم را در محصولات PCR نشان دهد که به این معناست: B19 دستخوش تغییرات توالی‌های نوکلئوتیدی است (Umene *et al.*, 1993). نواحی VP_1 و VP_2 یک توالی بسیار متغیر را نشان می‌دهند؛ در مقابل، ناحیهٔ NS_1 بسیار حفاظت شده است

[1] Open Reading Frame (ORF)

(Erdman *et al.*,1996). در مطالعه‌ای که بر روی افرادی با عفونت مزمن صورت گرفت، این تغییرات ۴ تا ۸ درصد در سطح DNA و آمینواسید نشان داده شد (Hemauer *et al.*, 1996). این مطلب به ویژه برای ناحیهٔ شاخص VP_1 صحت دارد و جالب این که تغییرات تأثیری بر روی خاصیت ایمونولوژیک یا تظاهرات بالینی B19 ندارد (Heegaard *et al.*, 2002).



Genome structure of B19 parvovirus. Nonstructural protein is encoded by the only unspliced RNA species from the left side of the genome. Unusual polyadenylation signals are utilized in the middle of the genome. Structural protein transcripts are located on the right side of the genome and encoded by overlapping RNAs in the same reading frame. Transcription map redrawn from Luo and Astell (122), with permission.

شکل ۱-۱: ساختار ژنوم B19 (Fields 1996)

یکی از دو رشتهٔ مثبت یا منفی DNA در درون کپسید جای دارند (Ergaz *et al.*, 2006). پروتئین‌های کپسید با تقارن بیست وجهی آرایش یافته‌اند و شامل ۶۰ کپسومرند که محصول ناحیهٔ VP_2 می‌باشند (Ozawa *et al.*, 1987). سایر پروتئین‌های VP_1 ساختاری ویروس، ۵ درصد باقی‌ماندهٔ پروتئین ویروس را تشکیل می‌دهند. پروتئین VP_2 وزن ملکولی ۵۸ کیلودالتونی دارد که