استفاده از روش خنثی سازی جهت جداسازی و تشخیص ویروسها از نمونه‌های بالینی گوارشی

محسن خاکی *

چکیده

ویروسهای مختلف موجود در دستگاه گوارش، بطریق مدفوعی. دهانی بین افراد مبتلا به عفونت و افراد حساس منتقل شده و بر حسب نوع ویروس و شرایط میزبان، موجب عفونتهای دستگاه گوارش مثل اسهال می‌شوند. در مواردی بعد از عفونت گوارشی، التهاب بافتها و اعضای دیگر ایجاد می‌شود.

در این پژوهش، ضمن کشت نمونهٔ مدفوع یا سوآب مقعد روی کشت سلولی هلا، ویروسهای تکثیر یافته توسط روش خنثی سازی (Neutralization) در کنار آنتی‌سرمهای اختصاصی ضد ویروس، شناسایی شد. نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که روش خنثی سازی برای جداسازی و تشخیص نوع ویروس، روش بسیار خوبی است و می‌توان از آن در جداسازی و تعیین هویت ویروسها از نمونه‌های مختلف بالینی برای اهداف بیماری شناسی، اپیدمیولوژی و واکسیناسیون استفاده کرد.

گل واژگان: ویروس، خنثی سازی، کشت سلولی هلا، آنتی سرم، مدفوعی دهانی

مقدمه

دستگاه گوارش انسان بخصوص روده، بطریق مدفوعی دهانی (Fecal - Oral) به ویروسهای مختلف آلوده می‌شود. این ویروسها متعلق به جنسها و خانواده‌های مختلف DNA یا RNA ویروس مثل پیکورنا، ادنو، رئو، انترو، روتا و غیره هستند. عواملی مثل روتاویروسها، که از عوامل شایع انتریت‌های ویروسی هستند، صرفاً در دستگاه گوارش عفونت زا هستند (۱) و عواملی مثل پولیوویروسها که از علل مننگوآنسفالیت و پولیومیلیت هستند علاوه بر دستگاه گوارش به ارگانهای هدف دیگر وارد شده و در آنها التهاب ایجاد می‌کنند(۳). جداسازی و شناسایی این عوامل از نمونه‌های مربوطه هم از نظر تشخیص عفونتهای گوارشی و هم التهاب اعضای دیگر حائز اهمیت است. همچنین جداسازی و تعیین نوع ویروس از نظر اپیدمیولوژی جهت تعیین فراوانی حضور ویروس وحشی و ویروس واکسن و بررسی روند واکسیناسیون حائز اهمیت فراوان است (۳). در این پژوهش از نمونه مدفوع یا سوآب مقعد استفاده شد. نمونه‌های مربوطه روی ردهٔ سلولی ماندگار

*عضو هیئت علمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک

Scanned with CamScanner

هلا(Hela Stablished Cell Line) کشت داده شد. نمونه‌هایی که روی این سلولها اثرات سایتوپاتیک CPE (Cyto pathic Effects) ایجاد کردند، بعنوان نمونهٔ حاوی ویروس تلقی شد. این نمونه‌ها با آنتی‌سرم اختصاصی ضد پولیو آزمایش شدند. نمونه‌هایی که با این آنتی‌سرم خنثی شدند و از ایجاد CPE روی یاخته ممانعت بعمل می‌آوردند بعنوان نمونه حاوی ویروس پولیو ثبت شد. این روش بنوعی در تحقیقات مشابه قبلی انجام شده است. از جمله در جداسازی ویروسهای آنفلوانزا از نمونه‌های تنفسی در سال ۱۳۷۳ در دانشگاه تهران توسط آقای مسعود صبوری‌قناد و جداسازی ویروس سرخجه از نمونه‌های تنفسی توسط آقای حامدیان.

تعریف واژه‌ها

حساسیت روش: توانایی روش در شناسایی موارد مثبت

ویژگی روش: توانایی روش در شناسایی موارد منفی

خنثی سازی: غیرفعال کردن ویروس و جلوگیری از تکثیر ویروس و بروز آثار تکثیر در کشت سلولی

مواد و روش کار

این طرح بعنوان یک مطالعه توصیفی جهت جداسازی ویروس از محتویات گوارشی وتشخیص نوع این ویروس‌ها به روش خنثی سازی مورد استفاده می‌باشد. با توجه به اینکه یکی از اهداف این طرح سنجش توانایی این روش در جداسازی و تشخیص نوع ویروس بود از نمونه‌هایی بیشتر استفاده شد که احتمال حضور ویروس پولیو در آن بسیار بالا باشد. مضافاً احتمال حضور ویروس دیگری هم در بعضی نمونه‌ها باشد. برای این منظور از کودکان واکسینه شده با واکسن خوراکی پولیو OPV[1] نمونه مدفوع یا سوآب مقعد تهیه شد. جمعیت مورد مطالعه کودکان سنین ۱/۵ تا ۱۵ ماهه بودند که ۳-۲ هفته قبل از نمونه‌گیری واکسن OPV دریافت کرده بودند.

با توجه به اینکه نمونه‌های گوارشی حاوی میکروارگانیسمهای متنوع و فراوان است که در روند جداسازی ویروس روی کشت یاخته مداخله می کنند. لذا بایستی این نمونه‌ها قبل از تلقیح به کشت یاخته از حضور این عوامل پاک شوند. برای حذف میکروبها از دو روش فیزیکی و شیمیایی استفاده شد. به این صورت که ۱۰-۵ گرم مدفوع یا دو نمونه سوآب مقعد را با 5^{cc} از محیط مایع مغذی و نگهدارنده به نام MEM[2] مخلوط گردید. این مخلوط از دو لایه گاز بعنوان صافی عبور داده شد. در این مرحله مواد غذایی هضم نشده و بسیاری از ذرات درشت از نمونه حذف می‌شود. سپس صاف شدهٔ حاصل با سرعت و دور ۲۵۰۰ در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. در این مرحله تخم انگلها، کیستها و بسیاری از باکتریهاحذف می‌شوند. سپس یک مرحله عمل شیمیایی روی بخش صاف شده مرحلهٔ قبل (فاز فوقانی نمونه سانتریفوژ شده) انجام شد و به ازاء هر میلی لیتر صاف شده ۲۰۰ میلیگرم از آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف کوتریموکسازول اضافه شد و مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال انکوبه شد. در مرحلهٔ بعد نمونه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه و زمان ۱۰ دقیقه با سانتریفوژ یخچالدار عمل شد. در این مرحله میکروارگانیسمهایی که با آنتی‌بیوتیک غیر فعال شده بودند به ته نشین نمونه منتقل شد و از فاز فوقانی بعنوان نمونه حاوی ویروس و عاری

1- Oral Polio Vaccine

2- Minimal Essential Medium

Scanned with CamScanner

از دیگر میکربها در فریزر نگهداری شد تا در مراحل بعد به کشت یاخته تلقیح شوند (۶).

در مرحلهٔ بعد از ذخیره‌های کشت سلولی هلا با پاساژهای مکرر بسترهای مختلف کشت یاخته در لوله و ظروف مخصوص کشت سلولی تهیه شد. سپس از نمونه‌های شفاف شده (Clarified) فوق ذوب کرده و به این بسترهای سلولی تلقیح شد. کشتها در انکوباتور Co_2 دار در دمای ۳۷°c انکوبه شد و از ۴۸ ساعت بعد توسط میکروسکوپ وازگون (Inverted) کشتها از نظر ایجاد CPE بررسی شدند.

کلیهٔ نمونه‌های CPE مثبت بعنوان نمونه‌های حاوی ویروس تلقی شد. در اینجا نکتهٔ قابل ذکر این است که با روش گفته شده در این طرح عملاً تا ۵ روز هیچگونه آثار آلودگی میکربی روی کشت یاخته دیده نشد و این زمان برای ایجاد CPE توسط ویروس کافی است (۱).

در این تحقیق آنتی سرم اختصاصی ضد پولیو ویروس در حیوان تهیه شد. روش کار به این صورت بود که از سه آنتی ژن ویروس پولیوی استاندارد تیپ‌های I، II، III با اجوانت کامل فروند (FCA= Froind Complete Adjuvant) واجوانت ناکامل فروند (FIA=F. Incomplete. A.) مخلوط کرده و طبق دستور کار استاندارد در طی ۴۶ روز چهار تزریق از آن آنتی ژنها روی حیوان انجام شد. سپس از حیوان خونگیری و سرم خون جدا شد. از مخلوط سه تیپ پولیو ویروس استاندارد، با این سرم مخلوط و قدرت خنثی سازی این سرم روی ویروسهای مذکور روی یاخته آزمایش شد. مشخص شد که مخلوط آنتی سرمهای اختصاصی[1] توان خنثی کردن سه تیپ پولیو ویروس را دارد (۱).

در مرحلهٔ بعد نمونه‌های CPE مثبت ذخیره شده توسط آنتی‌سرم مذکور با روش خنثی سازی جهت تشخیص نوع ویروس آزمایش گردید. آزمایش روی میکروپلیتهای ۹۶ خانه‌ای با گوده‌های تخت (Flat Wells) انجام شد. ابتدا اتمام ابزارها از جمله میکروپلیت، میکرودراپر و سرنگ اتوماتیک توسط اشعه UV و اتوکلاو استریل شد. در هر خانه میکروپلیت ۲۵ میکرولیتر از آنتی‌سرم مخلوط شده ریخته شد بعد روی آن ۲۵ میکرولیتر نمونه CPE مثبت اضافه شد. با بستن در میکروپلیت آنرا یک ساعت در انکوباتور ۳۷°c یا یک شب در دمای ۴°c قرار داده و سپس به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی هلا اضافه شد. مجدداً در میکروپلیت بسته شد و در انکوباتور ۳۷°c انکوبه گردید. از ۲۴ تا ۷۲ ساعت بعد با میکروسکوپ وازگون گوده‌های میکروپلیت بررسی شد. هر زمانی که در گوده‌های شاهد فاقد آنتی سرم، CPE مشاهده شد، گوده‌های نمونه‌های تست بررسی گردید. هر نمونه‌ای که توسط آنتی سرم ضد پولیوویروس خنثی شد و از ایجاد CPE در گودهٔ مربوطه ممانعت بعمل آمد بعنوان نمونه حاوی پولیوویروس ثبت شد. نمونه‌هایی که در حضور این آنتی سرم مجدداً CPE داشت بعنوان نمونه‌های حاوی ویروس غیر پولیو یا مخلوط پولیو ویروس با ویروس دیگر تلقی شد. با توجه به پدیدهٔ انترفرانس معمولاً حضور یک ویروس باعث جلوگیری ازتکثیر ویروس دیگر می‌شود که با این مکانیسم اگر ویروس نمونه پولیو نباشد یک انترویروس دیگر باعث CPE شده و به ندرت پولیوویروس و یک انترو ویروس دیگر عفونت توأم ایجاد می‌کنند (۶).

نتایج

در مرحلهٔ اول طرح از ۲۰۰ نمونه کشت شده

1- Specific Pooled Antisera

Scanned with CamScanner

روی یاخته، ۱۹۰ نمونه (۹۵٪) روی یاخته هلا CPE ایجاد کرد و حاوی ویروس تشخیص داده شد. در مرحلهٔ دوم آزمایش از ۱۹۰ نمونه مذکور در تست خنثی سازی، ۱۸۲ نمونه توسط آنتی سرم اختصاصی خنثی شد و بعنوان نمونه‌های حاوی پولیوویروس ثبت شد که شامل ۹۵/۸٪ از نمونه‌های CPE مثبت بود و ۴/۲٪ از نمونه‌های CPE مثبت بعنوان نمونه‌های حاوی ویروس غیرپولیو یا حاوی ویروس پولیو و ویروس یا ویروسهای دیگر تلقی شد. طبعاً برای شناسایی ویروس یا ویروسهای این نمونه‌ها بایستی آنتی‌سرمهای اختصاصی دیگر را در تست خنثی سازی بعدی آزمایش کرد که جزء برنامه و اهداف این پژوهش نبود.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش می‌توان از روش خنثی‌سازی برای شناسایی نوع ویروس یا ویروسهای موجود در نمونه‌های بالینی استفاده کرد. همچنین چون روش جداسازی در این طرح روی نمونه‌های گرفته شده از واکسینه شده‌ها انجام شد می‌توان این روش را در ارزیابی کارآیی واکسیناسیون براساس سنجش فراوانی حضور ویروس واکسن در نمونه‌های بالینی هم استفاده کرد.

در مقایسه این روش با روشهایی مثل الکترون-میکروسکوپی (EM)[1]، ایمیون الکترون میکروسکپی (Immune EM)، ایمنوفلورسانس (IF)[2] و ثبوت مکمل (Complement Fixation=CF) می‌توان برتری روش خنثی‌سازی را نسبت به این روشها از جهات مختلف زیر مطرح کرد:

روش الکترون میکروسکوپی نیاز به تجهیزات بیشتری دارد و تهیهٔ این تجهیزات از جمله میکروسکوپ الکترونی مستلزم صرف هزینهٔ بالایی است. مضافاً این روشها صرفاً جهت تشخیص ویروسهایی بکار می‌روند که مورفولوژی خاصی داشته باشند که بتوان به استناد این ساختار ظاهری آنها را از بقیهٔ ویروسها شناسایی کرد.

روشهایی از جمله ایمنوفلورسانس و ثبوت کمپلمان علاوه بر اینکه مثل روشهای EM و IEM عیوبی مثل گران بودن مواد را دارند، خطاهایی مثل غیرفعال شدن کمپلمان و یا کانژوگه فلورسانس را در شرایط آزمایشگاهی دارند. از طرفی برای ویروسهایی که آنتی‌ژن ویروسی قدرت فیکس کردن کمپلمان را بطور خودبخودی و بدون حضور آنتی‌بادی دارد ویا ویروسهایی که موجب هماگلوتیناسیون غیر ایمنی می‌شوند مثل ویروس سرخجه، نمی‌توان از روش CF استفاده کرد(۸،۷).

طبعاً روشهایی مثل PCR، EliSA و Electrophoresis دو بعدی، از حساسیت و ویژگی بالایی نسبت به روشهای نوترالیزیشن IF,IEM,IM و CF دارند منتها نیاز به تجهیزات و تکنولوژی بیشتر و پیشرفته‌تری است که در همه جا قابل انجام نیست درصورتی که روشی مثل نوترالیزیشن در هر واحد آزمایشگاهی قابل انجام است. تنها مشکل آن فراهم کردن امکانات کشت سلولی است که با داشتن تجربه کافی بخصوص مراقبت مستمر از سلولها و جلوگیری از آلودگی میکروبی کشت می‌توان این بستر سلولی را حفظ کرد(۹).

1- Electron Microscopy

2- Imunofluorescence

Scanned with CamScanner

REFERENCES

1- J.Henry; Sunders-London. Clinical Diagnosis and Managment by Laboratory, Methods, 1996, 1083-1090.

2- F,Landry, Diagnostic Virology; ,university press, New York; 1994, 32-40.

3- Topley and Wilsons;Microbiology and Microbial infections; London, 1998, 511-532.

4- R.K.Root, F.waldrogel Clinical infections Disease; , Oxford, 1999, 149-167

5- HW. Rodrigues, et al., Pediatrical gastroenteritis; J.clinical. Mic, 1996, 18-32

6- N.J. Sch midt; cell culture Techniques for diagnostic 1990, 94-98

7- A.J. Stagno et al; Improved detection of viruses by electron microscopic and Immune electron Microscopic virology, J.clin. Mic., 1995; 14, 210-220

8- S.Mcquillin; Rapid Virus diagnosis application of immunoflurescence, J. Med. Virology, 1996, 7:213-220

9- P. Zwadky; Nucleic acid probes in clinical microbiology, J clin Lab sci, 1995, 25; 71-90.

Scanned with CamScanner