Archive of SID

مجلهٔ علوم پزشکی مدرس
دورهٔ ۷، شماره ۲: از ۱ تا ۹
پاییز و زمستان ۱۳۸۳

جداسازی ویروس پاراآنفلوآنزا تیپ ۳ از بیماران مبتلا به عوارض تنفسی و تعیین ویژگیهای تکثیری ویروس در کشت یاخته

اکرم آستانی[۱]، محمدحسن روستایی*[۲]، حوریه سلیمان‌جاهی[۳]
فریده ممیشی[٤]، طراوت بامداد[٥]، انوشیروان کاظم‌نژاد[٦]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲- استاد گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۳- استادیار گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
٤- استادیار دانشکدهٔ بهداشت، دانشگاه تهران
٥- استادیار گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
٦- دانشیار گروه آمار حیاتی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

هدف: در این پژوهش تلاش‌گردید تا حضور ویروس پاراآنفلونزا ۳ (PIV3)[۱] انسان در دستگاه تنفس مبتلایان به بیماریهای تنفسی، نشان داده شود. با توجه به اینکه مطمئن‌ترین روش برای ثابت نمودن حضور ویروس، جداسازی آن است بنابراین کارهای انجام شده در این پژوهش بر پایه تلقیح نمونه‌های تهیه شده از افراد بیمار به یاخته‌های حساس، جداسازی ویروس PI3 و تعیین ویژگیهای تکثیری آن استوار بود.

مواد و روشها: از ۲۲ آبان ماه تا ۲۰ اسفند ماه سال ۱۳۷۹ تعداد ۱۰۰ نمونه از ترشحات گلو و بینی بیماران مبتلا به علائم تنفسی که به مرکز طبی کودکان در بیمارستان امام خمینی مراجعه کرده بودند تهیه شد. نمونه‌ها پس از آماده سازی به یاخته‌های حساس تلقیح شدند و یاخته‌ها همه روزه از نظر ظهور آثار بیماریزایی یاخته‌ای (CPE)[۲] بررسی شدند. برای حصول اطمینان از وجود ویروس PI3 در یاخته‌های تلقیح شده از روش جذب گویچه‌های قرمز خوکچه هندی (Had) استفاده شد. تعداد پاسخ ٤۰ نمونه در روش همادسورپشن[۳] مثبت بود. با توجه به اینکه تعدادی از ویروسهای آلوده کننده دستگاه تنفس، باعث القاء ویژگی همادسورپشن در یاخته‌های آلوده می‌شوند. بنابراین از روش استاندارد خنثی‌سازی ویروس(VNT)[٤] برای تعیین هویت ویروسهای جدا شده استفاده شد. برای این کار ابتدا سرم اختصاصی در خرگوش تهیه شد و با بهره‌گیری از آن آزمایش خنثی سازی ویروس به کار گرفته شد.

نتایج: نتیجه این آزمایش نشان داد که فقط ۱۳ نمونه دارای ویروس PI3 بودند، که از این تعداد ٦ مورد مربوط به پسران و ۷ مورد مربوط به دختران بود. علائم شایع در این افراد شامل سرفه (۱۳٪)، سرفه خلط دار (۱۰٪)، تب (۱۸/۲٪)، آبریزش از بینی (۱٤٪) و عطسه (۲٥٪) بود. نوزده درصد از این بیماران قبل از

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی ، گروه ویروس‌شناسی E- mail: Rustaimh@yahoo.com

1. Parainfluenza Virus
2. Cytopathic effects
3 .Hemadsorption
4. Virus neutralization test

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه گیری دارو دریافت کرده بودند. نمونه‌ها از ۱ تا ٦ روز پس از ظهور علائم بیماری تهیه شد.

بحث و نتیجه گیری: ویروس PI3 در بین مبتلایان به بیماریهای تنفسی شایع است. بدیهی است که نمی‌توان فقط بر پایه جداسازی یک عامل بیماریزا، آن را علت اصلی دانست و برای این کار پژوهشهای بیشتر و متنوع‌تری لازم است.

کلید واژگان: ویروس پاراآنفلوآنزا ۳، جداسازی، آزمایش همادسورپشن، آزمایش، خنثی‌سازی ویروس.

۱- مقدمه

ویروس پاراآنفلوآنزا تیپ ۳ (PI3V) بر اساس آخرین طبقه‌بندی که در سال ۲۰۰۰ میلادی انجام شده یکی از اعضای جنس رسپیرو ویروس[1]، زیرخانواده پارامیکسو ویرینه[2]، و خانواده پارامیکسو ویریده[3] است[۱]. این ویروس هم‌چون دیگر اعضای خانواده پارامیکسو ویریده دارای ژنوم متشکل از RNA تک رشته‌ای ممتد با پلاریتی منفی است و دارای آنزیم ترانس کریپتاز[4] می‌باشد. ژنوم ویروس به وسیله یک کپسید[5] مارپیچی احاطه شده است، این مجموعه نوکلئوکپسید[6] را تشکیل‌می‌دهد که در داخل ماتریکس[7] ویروس قرار دارد. خارجی‌ترین لایه ویروس پوشینه یا یا آنولوپ[8] نام دارد که دارای گلیکوپروتئینهای سطحی به نام هماگلوتینین(HN)[9] و فیوژن(F)[10] است که برای اتصال ویروس به رسپتورهای موجود بر سطح یاخته میزبان و ورود به آن مورد استفاده قرارمی‌گیرد[۱]. گلیکوپروتئین هماگلوتینین فعالیت نورامینیدازی نیز دارد و اصلی‌ترین پروتئین ویروس برای اتصال به رسپتور یاخته ـ که گلیکوپروتئینهای حاوی اسید سیالیک[11] و یا گانگلیوزیدها[12] است ـ می‌باشد. یاخته‌های آلوده به ویروس پاراآنفلوآنزا ۳، دارای ویژگی همادسورپشن می‌باشند، یعنی می‌توانند گلبولهای قرمز گونه‌های مختلف، از جمله خوکچه هندی و جوجه را جذب کنند. از طرفی خود ویروس نیز به علت داشتن هماگلوتینین می‌تواند باعث هماگلوتیناسیون[13] گلبولهای فوق شود [۲].

۱ از ویژگیهای یاد شده می‌توان برای تشخیص ویروس PI3 استفاده کرد. برای جداسازی این ویروس، از نمونه‌های تهیه شده از بیماران مبتلا به بیماریهای تنفسی، می‌توان آنها را به یاخته‌های اولیه کلیه میمون یا انسان و یا یاخته‌های پایدار نظیر Vero یا هلا تلقیح‌کرد و با استفاده از روشهای همادسورپشن، هماگلوتیناسیون و پیشگیری از هماگلوتیناسیون به تشخیص هویت ویروس پرداخت[۲]. در این پژوهش علاوه بر جداسازی ویروس PI3 از نمونه‌های تهیه شده از بیماران، از آزمایشهای خنثی سازی ویروس و پیشگیری از هماگلوتیناسیون برای تعیین هویت ویروسهای جدا شده نیز استفاده شد.

1. Respirovirus
2. Paramyxovirinae
3. Paramyxoviridae
4. Transcriptase
5. Capsid
6. Nucleocapsid
7. Matrix
8. Envelope
9. Hemagglutinin
10. Fusion
11. Sialic acid – containing glycoproteins
12 .Gangliosides
13. Hemagglutination

www.SID.ir

Archive of SID

۲- مواد و روش کار

۲-۱- نمونه‌های بالینی

نمونه‌های بالینی که برای جداسازی ویروس PI3 مورد استفاده قرار گرفت شامل ۱۰۰ سواب حلقی یا بینی حلقی و یا شستشوی بینی و حلق بود که از بیماران مراجعه‌کننده به بخش اورژانس بیمارستان امام خمینی تهیه و در محیط انتقال ویروس به گروه ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس حمل شد. هر نمونه ابتدا با روش زیر مورد تیمار قرارگرفت. مقدار ml ۱۰۰ از بافر PBS که محتوی ۲۰۰unit/mlپنی‌سیلینG،۲۰۰µg/ml استرپتومایسین و ۲۰۰ کانامایسین بود [۳] به نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمایC ٤° قرار داده شدند و سپس در دور ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمایC ٤° سانتریفیوژ شدند. از مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ هر نمونه به آرامی برداشت شد و در شیشه استریل مجزا در فریزر C ۷۰°- تا زمان استفاده نگهداری شد.

۲-۲- تهیه ویروس PI3 گاوی

در این پژوهش به منظور راه‌اندازی آزمایش خنثی سازی ویروس (VNT) ابتدا برای تولید آنتی سرم اختصاصی در خرگوش اقدام شد. برای انجام این کار لازم بود تا ویروس PI3 به مقدار لازم در دسترس باشد. با توجه به عدم دستیابی به ویروس نوع انسانی، از ویروس نوع گاوی با علامت اختصاریBPI3 ویروس استفاده شد. این ویروس در سال ۱۳٥٤ به وسیله حضرتی در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی جدا شده و برخی آزمایشها توسط شهرآبادی و روستایی بر روی آن انجام گرفته بود. با توجه به قرابتی که از نظر آنتی ژنیکی بین ویروس پاراآنفلوانزا تیپ ۳ انسان و ویروس پاراآنفلوانزا تیپ ۳ گاو وجوددارد[٥،٤]. بنابراین برای راه‌اندازی VNT از ویروس نوع گاوی استفاده شد. به منظور زیادسازی این ویروس، ابتدا ml۲ از محیط کشت یاخته (فاقد سرم) بر روی ویروس لیوفیلزه ریخته و سوسپانسیون یکنواخت از آن تهیه شد. سپس مقدار µl ۲۰۰ از این سوسپانسیون به یک لوله حاوی کشت تک لایه یاخته‌های کلیه گوساله (که دو بار قبل از تلقیح ویروس به‌خوبی با PBS شستشو داده شده بود) تلقیح شد. جمعاً ۱۰ لوله کشت سلول تلقیح و به مدت ٦۰min در انکوباتور C۳۷-۳٥° قرار داده شد. سپس ml ۱/٥ محیط کشت سلول حاوی ۲٪ سرم جنین گاو به هر لوله اضافه شد و لوله‌ها به انکوباتور عودت داده شد. یاخته‌های تلقیح شده همه روزه با استفاده از میکروسکوپ واژگون بررسی‌شد و CPEهای ایجاد شده در آنها با روش همادسوپشن ارزیابی گردید.

۲-۳- کشت یاخته‌ها

در این پژوهش از کشت یاخته‌های ورو[1]، و یاخته‌های کلیه گوساله (BK)[2] به ترتیب برای تکثیر ویروس PI3 گاوی و جدا جدا نمودن ویروس از نمونه‌های بالینی استفاده شد. برای رشد و تکثیر این یاخته‌ها از محیط کشت DMEM[3] که حاوی ٥٪ سرم سرم حرارت دیده گوساله و۱۰۰unit/ml پنی‌سیلینG، µg/ml ۱۰۰ استرپتومایسین وµg/ml ۱۰۰ کانامایسین بود استفاده شد. برای نگهداری این یاخته‌ها میزان سرم گوساله به ۲٪ تقلیل داده شد، و به یاخته‌هایی که با ویروس PI3 گاوی یا نمونه‌های بالینی تلقیح شده بودند از ۲٪ سرم حرارت دیده جنین گاو اضافه شد.

۲-٤- تولید سرم ایمن[4]

برای تولید سرم حاوی آنتی بادی پولی کلونال علیه ویروس PI3، از خرگوش استفاده شد. برای این کار دو سر خرگوش نر ۲ ماهه نیوزیلندی ابتدا مدت دو هفته در حیوانخانه نگهداری شد تا با شرایط محیط جدید تطابق یابند. سپس با تزریق عضلانی مقدار ml/kg ۰/۱-۰/۳ کتامین، خرگوشها را بیهوش نموده و بعد از خونگیری از قلب مقدار یک میلی‌لیتر سوسپانسیون ویروس که حاوی $10^{5.75}$ $TCID_{50}$ همراه با ادجوانت کامل فروند به عضله کپل هر یک از خرگوشها به طور مجزا تزریق شد. به فاصله ١٤ روز بعد از تزریق اول تزریق دوم با همان مقدار ویروس و همراه با ادجوانت ناقص فروند انجام شد. تزریقهای سوم و چهارم نیز هر کدام به فاصله ١٤ روز انجام گرفت با این تفاوت که در تزریق سوم از مخلوط ویروس با ادجوانت ناقص و در تزریق

1. Vero
2. Bovine Kidney
3. Dulbecco's modified Eagle's medium
4. Immune serum

www.SID.ir

Archive of SID

چهارم فقط از تعلیق ویروس استفاده شد. نکته مهم اینکه قبل از هر تزریق یک نمونه خون به طور استریل از هر یک از خرگوشها تهیه شد. آخرین نمونه خون ۱٤ روز بعد از آخرین تزریق تهیه شد. نمونه‌های خون در شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال یافت و سرم آنها جدا و تا زمان مصرف در فریزر $-۲۰^{\circ}C$ نگهداری شد (جدول ۱).

۲-۵- آزمایش خنثی سازی ویروس

برای راه‌اندازی آزمایش خنثی سازی ویروس ابتدا سرم خرگوشها به مدت ۳۰ دقیقه در $٥٦^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد، سپس عیار ویروس با روش کاربر[1] تعیین شد[٦]. آنگاه مقدار $100\ TCID_{50}$ از ویروس با حجم مساوی از رقتهای دو برابر آنتی سرم تهیه شده در خرگوش مخلوط و مدت ٦۰ دقیقه در دمای $۳۷^{\circ}C$ قرار داده شد. سپس از هر یک از مخلوطهای فوق به کشت تک لایه سلولهای BK که قبلاً دو بار با PBS استریل شستشو داده شده بود تلقیح گردید.

۳

۳

1. Karber

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ روش تولید آنتی سرم ویروس PI3 گاوی، در خرگوش

شماره تزریق	ماده تزریق شده	زمان تزریق و راه تزریق
۱	$10^{5.75TCID_{50}}$ ویروس + ادجوانت کامل فروند	روز صفر، عضلانی
۲	$10^{5.75TCID_{50}}$ ویروس + ادجوانت ناقص فروند	۱٤ روز بعد از تزریق دوم، عضلانی
۳	$10^{5.75TCID_{50}}$ ویروس + ادجوانت ناقص فروند	۱٤ روز بعد از تزریق دوم، عضلانی
٤	$10^{5.75TCID_{50}}$ ویروس	۱٤ روز بعد از تزریق سوم، عضلانی

جدول ۲ روند تولید آنتی‌بادیهای خنثی‌کننده ویروس و پیشگیری‌کننده از هماگلوتیناسیون و افزایش عیار آنها بعد از تزریقهای متوالی در خرگوش

عیار آنتی‌بادیها / سرم خرگوشها بر پایه‌زمان	آنتی‌بادیهای خنثی‌کننده ویروس	آنتی‌بادیهای پیشگیری‌کننده از هماگلوتیناسیون
سرم قبل از تزریق ویروس	–	–
۱٤ روز بعد از تزریق اول	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
۱٤ روز بعد از تزریق دوم	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{16}$
۱٤ روز بعد از تزریق سوم	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{32}$
۱٤ روز بعد از تزریق چهارم	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{32}$

www.SID.ir

Archive of SID

به کشت تک لایه سلولهای BK که قبلاً دو بار با PBS استریل شستشو داده شده بود تلقیح گردید.

۲-٦- تعیین هویت ویروسهای جدا شده از نمونه‌های بالینی

در این پژوهش از روشهای پیشگیری از هماگلوتیناسیون (HI) [1] و خنثی سازی ویروس برای تعیین هویت ویروسهایی که از نمونه‌های تهیه شده از بیماران جدا شده بود استفاده گردید.
آنتی سرم به کار گرفته شده در این آزمایشها، همانطور که در بخش قبل شرح داده شد در خرگوش تولید گردید.

۳- نتایج

۳-۱- تکثیر ویروس PI3 گاو در یاخته‌های BK

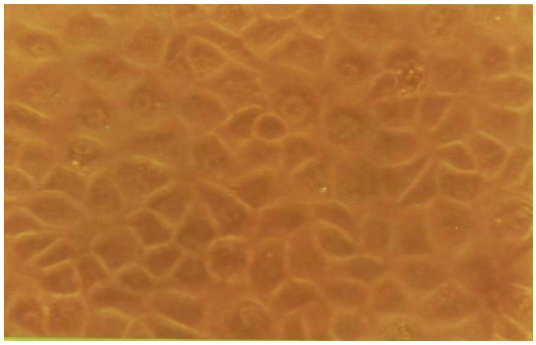
در شکلهای ۲ و ۱ به ترتیب یاخته‌های سالم کلیه گاو و همان

1. Haemagglutinatin- Inhibition Test

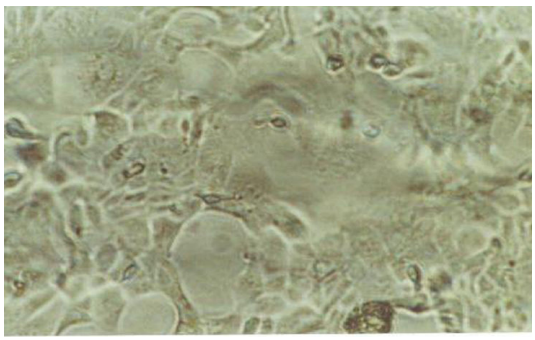
www.SID.ir

Archive of SID

یاخته‌ها ۷۲ ساعت بعد از تلقیح با ویروس PI3 مشاهده می‌شود. با توجه به اینکه تشخیص CPE ناشی از این ویروس و تمایز دادن آن از یاخته‌های مرده برای افراد کم‌تجربه مشکل است لذا برای حصول اطمینان از تکثیر ویروس در یاخته‌ها، اقدام به انجام آزمایش همادسورپشن شد که نتیجه آن مثبت بود شکل [۳].



شکل ۱ کشت تک لایه از یاخته‌های سالم کلیه گوساله



شکل ۲ CPE ناشی از ویروس PI3 در یاخته های کلیه گوساله

شکل ۳ اتصال گویچه‌های قرمز خوکچه هندی به یاخته‌های آلوده به ویروس PI3

۳-۲- تولید آنتی بادیهای اختصاصی در خرگوش

همچنان که در جدول شماره ۲ نشان داده شده است روش به‌کار رفته در این پژوهش منجر به تولید آنتی‌بادیهای خنثی‌کننده ویروس PI3 و پیشگیری‌کننده از هماگلوتیناسیون شده است. این آنتی‌بادیها در سرم خرگوشها قبل از تزریق وجود نداشت اما از چهاردهمین روز بعد از تزریق اول ظاهر شد و تا دو هفته بعد از تزریق چهارم رو به فزونی نهاده و دارای عیار در رقت $\frac{1}{32}$ در هر کدام از سرمها بود.

۳-۳- آزمایشهای خنثی سازی ویروس و پیشگیری از هماگلوتیناسیون

در این پژوهش با بهره‌گیری از ویروس تکثیر یافته در یاخته‌های BK و سرمهای تهیه شده در خرگوش اقدام به راه‌اندازی روشهای VNT و HI و استفاده از آنها برای تعیین هویت ویروسهای جدا شده گردید که نتایج به‌دست آمده بسیار موفقیت‌آمیز بود.

۳-٤- ویروسهای جدا شده از نمونه‌های بالینی

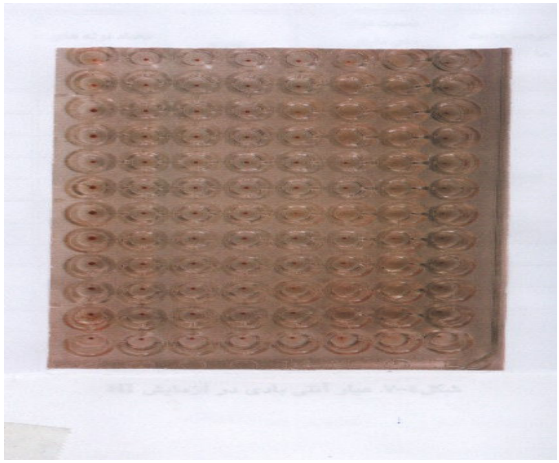
هر کدام از ۱۰۰ نمونه بالینی که به یاخته‌های ورو تلقیح شد تا ۳ بار پاساژ کور[1] داده شد. تمام یاخته‌های تلقیح شده با میکروسکوپ واژگون بررسی‌گردید و با یاخته‌های شاهد مقایسه شد. ضمناً روش همادسورپشن در مورد تمام آنها اعمال شد.

1. Blind passage

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه نشان داد که ٤٠ نمونه دارای ویروس بودند و باعث ایجاد پدیده همادسورپشن در یاخته‌های میزبان شدند. این نمونه با سرم هیپرایمن تهیه شده در خرگوش آزمایش شد که نتیجه آزمایشهای خنثی سازی ویروس و پیشگیری از هماگلوتیناسیون، منجر به تأیید فقط ۱۳ مورد به عنوان ویروس PI3 شد. (شکلهای۳ و٤).



شکل ٤ نتیجه آزمایش پیشگیری از هماگلوتیناسیون. همانطور که دیده می‌شود در گودهایی که سرم دارای آنتی بادی بوده است از آگلوتیناسیون گویچه‌های قرمز خوکچه هندی توسط ویروس PI3 جلوگیری کرده و در نتیجه گویچه‌ها تشکیل دگمه‌های کوچک داده‌اند.

٤- بحث

ویروسهای پاراآنفلوانزا در پزشکی اهمیت زیادی دارند، زیرا پس از ویروس سنسیتیال تنفسی مهمترین عوامل بیماریزای دستگاه تنفس انسان می‌باشند. از چهار سروتیپ شناخته شده از ویروس پاراآنفلوانزای انسان، ویروس شماره ۳(HPIV3) بیشتر از ویروسهای شماره ۱، ۲ و ٤ با بیماریهای سخت بخش تحتانی دستگاه تنفس انسان همراه است [۷]، زیرا باعث ایجاد کروب و ذات‌الریه در نوزادان و کودکان کم‌سن می‌شود[۸].

علی رغم اهمیت PI3V به عنوان یک عامل بیماریزای مهم دستگاه تنفس، به علت عدم وجود روشهای مطمئن برای تشخیص این ویروس، اغلب بیماریهای سختی که به وسیله آن ایجاد می‌شود بدون تشخیص باقی می‌مانند. جداسازی ویروس پاراآنفلوآنزا تیپ ۳ در کشت یاخته، روش استاندارد برای تشخیص عفونت است [۸].

در این پژوهش سعی شد تا با راه‌اندازی تستهای خنثی سازی ویروس و پیشگیری از هماگلوتیناسیون ویروس PI3 در ترشحات بینی و حلق بیماران مبتلا به عفونتهای بخش فوقانی و تحتانی دستگاه تنفس جستجوشود. به همین منظور و به دلیل عدم

www.SID.ir

Archive of SID

دسترسی به ویروس وحشی PI3 انسان در ایران، به زیادسازی ویروس PI3 نوع گاوی، که شباهت آنتی‌ژنتیکی زیادی با نوع انسانی دارد، اقدام شد. برای این کار از یاخته‌های کلیه گاو برای تکثیر ویروس استفاده شد و پس از تهیه مقدار کافی از ویروس با عیار مناسب، آنتی‌سرم اختصاصی آن در خرگوش تهیه و روشهای خنثی سازی ویروس و پیشگیری از هماگلوتیناسیون راه‌اندازی شد.

تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی که در این پژوهش از ترشحات بینی و حلق مبتلایان به بیماریهای تنفسی تهیه و به یاخته‌های ورو تلقیح گردید تا سه پاساژ داده شد و وجود CPE ایجاد شده ـ در یاخته‌های میزبان ـ با آزمایش همادسورپشن تأییدشد؛ در نهایت ۴۰ مورد ویروس از این نمونه‌ها جدا شد. با استفاده از آنتی سرم اختصاصی ویروس PI3 گاوی که در خرگوش تهیه شد، آزمایشهای خنثی سازی ویروس و پیشگیری از هماگلوتیناسیون بر روی ویروسهای جدا شده انجام و ۱۳ مورد به عنوان ویروس PI3 تأیید شد. همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است.

از مجموع۱۳ مورد ویروس، ۷ مورد مربوط به دختران و بقیه مربوط به پسران است، که از اینها دو نمونه از بینی و ۱۱ نمونه از گلو تهیه شده بود. از این نمونه‌ها ۵۴٪ مربوط به اطفال کمتر از ۵ سال و بقیه مربوط به سنین ۷ تا ۲۹ سال بود. مهمترین علائم بیماری در این افراد شامل فارنژیت، ریزش بینی، سرفه،تب، سردرد، لرز و عطسه بود.

نکته مهم اینکه تمام نمونه‌های فوق در ماههای پاییز و زمستان تهیه شده بودند و علائم بیماری در کسانی که آنتی‌بیوتیک مصرف کرده بودند تفاوتی با بیماران فاقد درمان نداشت. نتیجه حاصل از آزمایش نشان داد که یکی از ویروسهای شایع که همراه با بیماریهای تنفسی دیده می‌شود ویروس PI3 است. بنابراین در زمان شیوع بیماریهای تنفسی لازم است این ویروس را همراه با مهمترین ویروسهایی که باعث بروز این بیماریها می‌شوند مورد توجه قرار داد. مطالعاتی که در سایر کشورها انجام شده است نشان می‌دهد که ویروسهای سنسیتال تنفسی، آنفلوآنزا، پاراآنفلوآنزا، آدنو و راینو در زمره مهمترین عوامل ابتلای کودکان و افراد دارای نقص ایمنی به بیماریهای تنفسی است که گاهگاهی

جدول ۳ اطلاعات مربوط به ویژگی‌های ۱۳ نفر که از آنها ویروس PI3 جدا و تعیین هویت شد

شماره	جنس	سن	تاریخ تهیه نمونه	محل تهیه نمونه	مصرف ٦ بیوتیک	دوره تب	نشانیهای بیماری
۱	دختر	۱۲ سال	۷۹/۹/۱۱	بینی	خیر	۲ روز	فارنژیت، ریزش بینی، سرفه، تب، ضعف
۲	دختر	۳ سال	۷۹/۹/۱٤	گلو	بله	۱ روز	سرفه، خلط، تب
۳	دختر	۲ سال	۷۹/۹/۲٤	گلو	بله	۳ روز	ریزش بینی، تب، سرفه، عطسه، خلط
٤	دختر	۷ سال	۷۹/۸/۳۰	گلو	بله	٦ روز	سرفه خشک، تب، لرز
٥	دختر	۷ سال	۷۹/۹/۷	گلو	بله	٥ روز	سرفه، تب، خلط
٦	دختر	۱۱ سال	۷۹/۹/٥	گلو	بله	٤ روز	سرفه، تب، ریزش بینی، عطسه
۷	دختر	۳ سال	۷۹/۱۰/٥	گلو	خیر	۲ روز	تب، ریزش بینی، سرفه
۸	پسر	۳/٥سال	۷۹/۹/۹	گلو	خیر	۲ روز	سرفه خشک، خس‌خس
۹	پسر	۱ سال	۷۹/۹/۹	گلو	خیر	۱ روز	ریزش بینی، سرفه، گلودرد
۱۰	پسر	٤ سال	۷۹/۸/۳۰	گلو	بله	۱ روز	سرفه، خلط، ریزش بینی، تب
۱۱	پسر	۱٤ سال	۷۹/۹/۱٤	گلو	بله	٥ روز	سرفه، سردرد، عطسه
۱۲	پسر	۲ سال	۷۹/۱۱/۱۰	گلو	خیر	۲ روز	سرفه خشک، ریزش بینی، عطسه

www.SID.ir

Archive of SID

۱۳	پسر	۲۹ سال	۷۹/۹/٤	بینی	بله	۵ روز	سرفه خشک، ریزش بینی، عطسه

سبب مرگ می‌شود [۱۱-۹]. متأسفانه تا قبل از انجام این پژوهش، مطالعه‌ای در مورد حضور ویروس PI3 در بین کودکان ایران و شیوع آن انجام نشده بود، اما در تحقیقات دیگر حضور ویروسهای آنفلوانزا و آدنو در ایران نشان داده شده است. بنابراین شناسایی سریع و صحیح ویروسهای بیماریزای دستگاه تنفس می‌تواند به برنامه‌ریزان بهداشت کشور کمکهای شایان توجهی بنماید. اگر چه متأسفانه مصرف آنتی‌بیوتیکها هیچگونه تأثیری بر روی این ویروسها ندارد اما تشخیص سریع بیماریهای ناشی از آنها به پزشکان اطفال کمک می‌نماید تا با تجویز درمانهای علائمی،نگهدارنده و اختصاصی از وخیم‌تر شدن بیماری که ممکن است در مواردی به مرگ منجر شود پیشگیری نماید [۱۲-۱۳]. ضمن اینکه برای ویروسهایی مانند آنفلوانزا واکسن و دارو وجود دارد که لازم است تا در موارد شیوع بیماری از آنها استفاده شود.

اگر چه روش جداسازی ویروس و تعیین هویت آن احتیاج به زمان و تخصص دارد اما هنوز هم یک روش استاندارد طلایی در ویروس‌شناسی محسوب می‌شود و با توجه به تجارب به‌دست آمده از سالها کار در ویروس‌شناسی، توصیه می‌شود که از این روش برای ثبوت قطعی حضور ویروس در کشور به ویژه در فصول خاص شیوع آن استفاده شود. بدیهی است که برای کارهای جاری آزمایشگاهی می‌توان از روشهای بسیار سریعتر نظیر RT-PCR. ELISA[1]، S-RT-PCR[2] [۱٤] RT-PCR. [۱۵] و MRT-PCR[3] استفاده کرد. با استفاده از این روشها می‌توان به سرعت ویروسهای تنفسی نظیر ویروس سنسیتیال تنفسی و ویروسهای پاراآنفلوانزای ۱-٤ را تشخیص داد. درضمن این روشها برای تشخیص عوامل باکتریایی که سبب بروز

1. Reverse Transription - PCR - Enzyme Immunoassay
2. Single Reverse Transcription – PCR
3. Multiplex RT - PCR

www.SID.ir

Archive of SID

بیماریهای تنفسی می‌شوند کاربرد وسیعی دارند[۱۶]. در پایان قابل ذکر است که برای پیشگیری از پیدایش جوابهای مثبت کاذب، تعداد ۱۰۰ نمونه سرم ابتدا با ویروس اوریون جذب و سپس عیار آنتی‌بادیهای خنثی‌کننده ویروس PI3 در آنها اندازه‌گیری شد که نتایج به‌دست آمده نشان داد تفاوت قابل ملاحظه‌ای با نمونه‌های شاهد ندارد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ویروس PI3 در ایران وجود دارد و در گردش است، لذا با به‌کارگیری روشهای تشخیصی باید در زمان لازم وجود آن را در بین بیماران تشخیص داد و به پزشکان مربوط گزارش کرد تا اقدامهای لازم را انجام دهند.

۵-منابع

[1]Lamb RA,Kolakofsky D.Paramyxoviridae: The viruses and their replication In: Fundamental virology Knipe DM Howley PM, eds. 4th Ed; Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins;2001. p. 689.

[2]Chanock RM, Murphy BR, Collins PL. Parainfluenza viruses. In Fields virology Knipe DM, Howley PM, eds. 4th Ed; Philadelphia; Lippincott Williams and Wilkins, 2001; p.1341.

[3]Doyle A griffiths JB. Cell and tissue culture: Laboratory procedures in biotechnology. New York; John Wiley & Sons, 1998; pp. 50-52.

[4]Fedova D,Novotni J,Kubinova I. Serological diagnosis of parainfluenza virus infections: verification of the sensityvity and specificity of the haemagglutination inhibition (HI), comple- ment-fixation(CF), immunofluores- cence (IFA) tests and enzyme immunoassay (ELISA). Acta Virol 1992; 36: 304-312.

[5]Lee MS, Mendelman PM, Sangli C, Cho I, Mathie SL, August MJ. Half life of human parainfluenza virus type 3 (hPIV3) maternal antibody and cumulative proportion of hPIV3 infecton in young infants. J Infect Dis 2001; 183: 1281-4.

[6]Grist NR, Bell EJ, Follett EAC, Urquhart GED.Diagnostic Methods in clinical virology. 3rd Ed. Oxford, Blackwell Scient- ific Publications 1979; pp: 81-94.

[7]Echevarria JE, Erdman DD, Swierkosz EM, Holloway BP, Anderson LJ. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1998; 36: 1388-91;

[8]Karron RA, Froehlich JL, Bobo L, Belshe RB, Yolken RH. Rapid detection of parainfluenza virus type 3 RNA in respiratory specimens: Use of reverse transcription PCR enzyme immunoassay. Virology 1994 ; 32: 484- 88.

[9]Cortez KJ, Erdman DD, Peret TCT, Gill V J, Childs R, Barret AJ, Bennett JE. Outbreak of human parainfluenza virus 3 infection in a hematopoietic stem cell transplant population. J Infect Dis 2001; 184: 1093-7.

[10]Freymuth F, Vabert A, Galateau – Salle F, Ferey J, Eugene G, Petitjean J, Gennetay E, Brouard J, Jokik M, Duhamel JF, Guillois B. Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza 3, adenovirus and rhinovirus sequences

www.SID.ir

Archive of SID

in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. Clin Diagnos Virol 1997; 8: 31-40.

[11]Osiowy C. Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex RT-PCR assay. J Clin Microbiol 1998; 36: 3149-54.

[12]Adcock PM, stout GG, Hauck MA, Marshall GS. Effect of rapid viral diagnosis on the management of children hospitalized with lower respiratory tract infection. J Pediatr Infect Dis 1997; 16: 842.

[13]Marx A, Torok TJ, Holman RC, Clarke MJ, Anderson LJ. Pediatric hospitalization for croup (laryngotracheo- bronchtis): biennial increases associtated with human parainfluenzal epidemics. J Infect Dis 1991; 176 : 1423-27.

[14]Eugene-Ruellan G, Freymuth F, Bahoul C, Badrane H, Vabret A,Tordo N. Detecton of respiratory syncytial virus A and B and parainfluenza 3 sequences in respiratory tracts of infants by a single PCR with primers targeted to the L polymerase gene and differential hybridization. J Clin Microbiol 1998; 36: 796-801.

[15]Gilbert LL, Dakhama A, Bone BM, Thomas EE, Hegele RG. Diagnosis of viral respiratory tract infections in children by using a reverse transcription-PCR panel. J Clin Microbiol 1996; 34: 140-143.

[16]Grondahl B, Puppe W, Hoppe A, Kuhne I, Weigl J AI, Schmitt HJ. Rapid identification of nine micro organisms causing acute respiratory tract infections by single tube multiplex reverse transcription-PCR: Feasibility study. J Clin Microbiol 1999; 37:1-12.

www.SID.ir