Archive of SID

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۳: از ۳۱-۳۹
پاییز ۱۳۸۹

مقایسه حساسیت سلول‌های RD، L20، Hep2 به ویروس پولیوی استاندارد و واکسن خوراکی پولیو

زهرا شوکتی‌اشکیکی[۱]، شهره شاه‌محمودی[۲*]، محمدرضا اشراقیان[۳]، زهرا محرابی[۱]، طلعت مختاری‌آزاد[۴]، سعیدرضا پاکزاد[۵]، مرتضی پیرعلی‌همدانی[۵]، حمیده طباطبایی[۶]، رخشنده ناطق[۴]

۱- کارشناس ارشد، بخش ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲- استادیار، بخش ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- استاد، بخش ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵- استادیار، بخش پوتنسی واکسن، آزمایشگاه‌های کل کنترل غذا و دارو، تهران، ایران
۶- دکتری تخصصی، بخش ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۹/۰۲/۲۸ پذیرش مقاله: ۸۹/۰۶/۲۹

چکیده

هدف: همچنان‌که به ریشه‌کنی جهانی پولیوویروس وحشی نزدیک می‌شویم، پایش آزمایشگاهی ویروس پولیو، توسط روش استاندارد طلایی کشت سلولی، اهمیتی صد چندان می‌یابد. با توجه به نگرانی‌های موجود در زمینه شناسایی دقیق و حساس ویروس‌های وحشی وارداتی و پولیوویروس‌های مشتق از واکسن در کشورهایی که ویروس پولیوی وحشی را ریشه‌کن کرده‌اند، در این مطالعه حساسیت رده‌های سلولی مورد استفاده در آزمایشگاه پولیو به‌طور همزمان نسبت به ویروس استاندارد و ویروس موجود در واکسن خوراکی پولیو سنجیده و با یکدیگر مقایسه شد تا از حساسیت سلول‌ها برای شناسایی دقیق پولیوویروس‌های در گردش در جامعه و نیز ویروس‌های وارداتی اطمینان حاصل شود.

مواد و روش‌ها: آزمون حساسیت سلولی با استفاده از دستورالعمل استاندارد سازمان بهداشت جهانی برای سه رده سلولی RD، L20B و Hep2 با استفاده از سه سروتیپ ویروس‌های یک‌ظرفیتی استاندارد و واکسن خوراکی پولیو انجام گرفت. آزمایش هر چهار پاساژ یک‌بار تکرار شد.

نتایج: حساسیت رده‌های سلولی L20B و Hep2 نسبت به پولیو ۱ و پولیو ۲ استاندارد بیش از پولیو ۱ و ۲ واکسن خوراکی پولیو است و در مورد پولیو ۳ این وضعیت برعکس است. همچنین رده سلولی RD در هر سه نوع ویروس پولیو، نسبت به ویروس واکسن خوراکی پولیو حساس‌تر است و نیز میزان حساسیت همگی رده‌های سلولی، با افزایش شماره پاساژ کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: استفاده همزمان از دو رده سلولی RD و L20B (با شماره پاساژ کمتر) ما را از دقت و حساسیت سلول‌ها برای ردیابی انواع ویروس‌های در گردش در جامعه و نیز ویروس‌های وارداتی مطمئن می‌سازد.

کلیدواژگان: حساسیت سلولی، ویروس پولیو، RD، L20B، Hep2

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، بخش ویروس‌شناسی، کدپستی: ۱۴۷۱۶۱۳۱۵۱
Email: Shahmahmoodi@sina.tums.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

ریشه‌کنی جهانی فلج اطفال در سال‌های اخیر پیشرفت فزاینده‌ای داشته است به‌طوری که در حال حاضر ویروس پولیوی (Polio Virus) وحشی تنها در معدودی از کشورهای آفریقایی و آسیایی در حال گردش است [۱]. با این حال، طی سال‌های اخیر ویروس پولیوی وحشی توانسته است از کشورهای آلوده به برخی از کشورهای عاری از این ویروس (Polio-Free) انتقال یابد و اپیدمی‌های جدیدی از پولیومیلیت (Poliomyelitis) را در این مناطق ایجاد کند. علاوه بر این، یکی دیگر از نگرانی‌های کشورهای عاری از این ویروس، ظهور ویروس‌های پولیوی مشتق از واکسن (Vaccine Derived Polio Viruses: VDPV) و به گردش افتادن آن‌ها در جامعه است که در این صورت نیز اپیدمی پولیومیلیت را در جامعه سبب خواهد شد. VDPV در نتیجه تکثیر بیش از یک سال ویروس واکسن در بدن افرادی که نارسایی ایمنی هومورال دارند یا گردش حداقل یک ساله ویروس واکسن در جامعه‌ای که پوشش واکسیناسیون خوبی ندارد، حاصل می‌شود و دلیل ایجاد آن جهش‌های پی در پی در ژنوم ویروس در نتیجه تکثیر طولانی مدت آن و برگشت ویرولانس (Virulence) عصبی است به‌طوری که این ویروس می‌تواند مانند ویروس پولیوی وحشی موجب بیماری فلج شود [۲]. از این رو در سال‌های انتهایی ریشه‌کنی فلج اطفال، آزمایشگاه‌های تشخیصی پولیو مسئولیت سنگین‌تری را برعهده دارند زیرا ردیابی ویروس‌های پولیوی وحشی وارداتی، ویروس‌های واکسن و VDPV باید با حساسیت و دقت بالا انجام گیرد.

ردیابی پولیوویروس‌ها در نمونه‌های بیماران فلج شل حاد به‌وسیله کشت سلولی انجام می‌شود که روش استاندارد طلایی برای جداسازی ویروس پولیو محسوب می‌شود [۳]. در سال‌های گذشته از دو رده سلولی RD [رابدومیوسارکوما (Rhabdomyosarcoma)] و Hep2 (رده سلولی مشتق از سرطان حنجره انسان) برای جداسازی ویروس پولیو استفاده می‌شد [٤]؛ ولی امروزه سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization: WHO) توصیه کرده است که از رده‌های سلولی RD و L20B (سلول پوششی نوترکیب موش) برای ردیابی ویروس پولیو درنمونه‌های بیماران فلج شل حاد استفاده شود [٥] و سلول‌های مورد استفاده باید از حساسیت لازم و کافی برای جداسازی ویروس پولیو برخوردار باشند. برای سنجیدن حساسیت سلول‌های مورد استفاده در آزمایشگاه‌های پولیو، از رقت‌های مختلف ویروس پولیوی استاندارد (که توسط WHO ارسال می‌شود) استفاده می‌شود ولی این ویروس ممکن است تفاوتی جزئی با ویروس موجود در واکسن خوراکی پولیو (Oral Polio Vaccine: OPV) که در کشور ما، ایران، استفاده می‌شود داشته باشد؛ به‌طوری که حساسیت سلول‌ها نسبت به ویروس استاندارد برابر با حساسیت نسبت به ویروسOPV نباشد. از آنجا که در حقیقت ویروس OPV است که از افراد واکسینه دفع می‌شود و در جامعه به گردش می‌افتد و منشا بالقوه ایجاد VDPV در جامعه ما است و باید با دقت بالا شناسایی شود، سنجیدن حساسیت سلول‌ها نسبت به ویروس OPV همزمان با ویروس استاندارد ضروری است. از این رو مطالعه حاضر به منظور مقایسه حساسیت سلول‌های سه رده RD، Hep2 و L20B نسبت به هر سه سروتیپ ویروس پولیوی استاندارد با حساسیت این سلول‌ها نسبت به سه سروتیپ ویروس OPV و همچنین تعیین حساس‌ترین سلول نسبت به ویروس پولیوی استاندارد و OPV انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون آماری تجزیه و تحلیل واریانس سه طرفه استفاده شد.

۲- مواد و روش‌ها

آزمون حساسیت سلولی مطابق با دستورالعمل WHO برای هر سه رده سلولی با استفاده از ویروس‌های یک‌ظرفیتی (Monovalent) استاندارد و OPV انجام شد [٦]. از آنجا که OPV حاوی هر سه سروتیپ ویروس پولیو است و به‌صورت سه‌ظرفیتی (Trivalent) تهیه می‌شود، ویروس یک‌ظرفیتی به

www.SID.ir

Archive of SID

کمک جذب توسط مخلوط آنتی‌سرمی از واکسن سه‌ظرفیتی حاصل شد بدین صورت که واکسن سه‌ظرفیتی به‌طور جداگانه با حجم‌های مساوی از آنتی‌سرم‌های پولیو ۱+۲ ، پولیو ۱+۳ و پولیو ۲+۳ مخلوط شده و یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا به‌ترتیب ویروس OPV یک‌ظرفیتی سروتیپ ۳، سروتیپ ۲ و سروتیپ ۱ به‌دست آید. سپس ویروس یک‌ظرفیتی به کشت سلولی مناسب تلقیح شد تا تغییرات و مرگ سلولی (Cytopathic Effect: CPE) چهار مثبت دیده شود و مایع رویی این کشت سلولی برای آزمون به‌کار برده شد.

روش انجام آزمون حساسیت سلولی طبق دستورالعمل WHO به‌طور خلاصه به شرح زیر است:

۱- رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-9} از هر سه سروتیپ ویروس‌های استاندارد و یک‌ظرفیتی OPV تهیه شد.

۲- در میکروپلیت‌های (Microplate) مخصوص کشت سلولی، ۲۰ چاهک برای هر رقت اختصاص داده شد و از رقت مربوط به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در آن‌ها ریخته شد. دو ردیف برای کنترل سلول در نظر گرفته شد که فقط ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت در آن ریخته شد.

۳- سلول مربوط (RD یا L20B یا Hep2) با رقت 2×10^{5}-۱ به تمامی چاهک‌ها اضافه شد.

٤- میکروپلیت‌ها با ورقه چسب مخصوص پوشانده شد و به‌مدت ۵ تا ۷ روز در انکوباتور ۳٦ درجه قرار گرفت.

۵- پلیت‌ها به‌طور روزانه با میکروسکوپ معکوس برای مشاهده CPE کنترل شد.

٦- حساسیت سلول (لگاریتم تیتر ویروس که توسط سلول شناسایی می‌شود) بر طبق فرمول کاربر (Karber) تعیین شد:

$$\text{Log CCID}_{50}=L-d(S-0.5)$$

L: لگاریتم کمترین رقتی که ۱۰۰ درصد CPE داده است؛

d: تفاوت لگاریتم رقت‌ها؛

S: جمع نسبت چاهک‌های مثبت به کل چاهک‌های استفاده شده در هر رقت.

از آن‌جا که این مطالعه به منظور مقایسه حساسیت سه رده سلولی L20، RD و Hep2 در شناسایی انواع مختلف ویروس پولیو انجام شد، برای اعتبار (Validity) آزمون می‌بایست به دفعات تکرار می‌شد. تعداد دفعات تکرار بر این اساس تعیین شد که چه تعداد نمونه انتخاب شود تا اگر یکی از رده‌های سلولی مورد مطالعه در تشخیص یکی از انواع ویروس پولیو به‌طور معنی‌داری از دو رده دیگر مناسب‌تر باشد ($d=\mu_1-\mu_2$)، بتوان فرضیه یکسان بودن حساسیت تمامی سلول‌ها را در سطح احتمال خطای نوع اول $\alpha=0/05$ و با توان $1-\beta=0/80$ رد نمود. مقادیر اولیه حساسیت سلول‌ها و انحراف معیار آن‌ها براساس یک مطالعه اولیه (Pilot) تعیین شد و تعداد دفعات تکرار ۸ با استفاده از فرمول $n=[(Z_{1-\alpha/2}+Z_{1-\beta})/d]^2$ به‌دست آمد. در نتیجه آزمون برای هر رده سلولی و هر نوع ویروس ۸ بار تکرار شد. همچنین آزمون هر ٤ پاساژ یک‌بار برای هر سه رده سلولی انجام گرفت تا تأثیر شماره پاساژ (سن سلول) نیز بر حساسیت آن بررسی شود.

۳- نتایج

با انجام آزمون حساسیت سلولی با استفاده از ویروس‌های پولیو ۱، پولیو۲ و پولیو۳ استاندارد و OPV روی هر سه رده سلولی Hep2 و L20B و RD و آزمون تجزیه و تحلیل واریانس سه طرفه مشاهده شد که حساسیت رده‌های سلولی L20B و Hep2 نسبت به پولیو ۱ و پولیو ۲ استاندارد بیش از پولیو ۱ و ۲ OPV است (جدول‌های ۱ و ۲)؛ اما در مورد پولیو ۳ این وضعیت برعکس است یعنی این دو رده سلولی پولیو ۳ OPV را بهتر از پولیو ۳ استاندارد شناسایی می‌کنند (جدول ۳). همچنین دیده شد که رده سلولی RD در هر سه نوع ویروس پولیو، ویروس OPV را بهتر شناسایی می‌کند. آزمون آماری نشان داد که حساسیت رده سلولی Hep2 نسبت به ویروس پولیو از دو رده سلولی دیگر بسیار کمتر است. همچنین میزان حساسیت همگی رده‌های سلولی نسبت به ویروس پولیو، با افزایش شماره پاساژ کاهش می‌یابد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ نتیجه آزمون حساسیت سلولی برای هر سه رده سلولی با استفاده از ویروس پولیو ۱ استاندارد و OPV یک‌ظرفیتی؛ اعداد منفی، میانگین ۸ بار تکرار آزمـون و نشان دهنده لگاریتم تیتری از ویروس است که توسط سلول شناسایی شده است (با استفاده از فرمول کاربر). اعداد منفی سه ردیف سمت راست جدول از بالا به پـایین، نشان دهنده کاهش حساسیت سلول‌ها با افزایش شماره پاساژ سلول (افزایش سن سلول) است.

رده سلولی	RD		L20B		Hep2				
ویروس	استاندارد پولیو ۱	OPV پولیو ۱	استاندارد پولیو ۱	OPV پولیو ۱	استاندارد پولیو ۱	OPV پولیو ۱	میانگین استاندارد	میانگین OPV	میانگین کل
شماره پاساژ سلول									
۳	-۷/۴۱	-۷/۴۴	-۷/۵۹	-۷/۵۱	-۶/۵۴	-۶/۷۵	-۷/۱۸	-۷/۲۳	-۷/۲۰
۷	-۷/۳۸	-۷/۴۲	-۷/۵۱	-۷/۳۷	-۶/۴۴	-۶/۲۷	-۷/۱۱	-۷/۰۲	-۷/۱۰
۱۱	-۷/۱۳	-۷/۳۹	-۷/۴۷	-۷/۳۴	-۶/۲۷	-۶/۱۸	-۶/۹۵	-۶/۹۷	-۷/۰۰
۱۵	-۷/۱۱	-۷/۱۲	-۷/۳۳	-۷/۰۵	-۶/۱۹	-۶/۰۸	-۶/۸۷	-۶/۷۵	-۶/۸۰
۱۹	-۶/۹۴	-۶/۹۲	-۷/۱۶	-۶/۹۷	-۶/۰۰	-۵/۹۶	-۶/۷۰	-۶/۶۰	-۶/۶۵
میانگین بر حسب ویروس استاندارد یا OPV	-۷/۱۹	-۷/۲۶*	-۷/۴۱*	-۷/۲۵	-۶/۲۹*	-۶/۲۴			
میانگین کل برای رده سلولی	-۷/۲۲**		-۷/۳۳**		-۶/۲۶				

*: نشان دهنده بیشتر بودن حساسیت رده سلولی نسبت به ویروس استاندارد یا OPV است.

**: نشان دهنده حساس‌ترین رده‌های سلولی نسبت به ویروس پولیو ۱ است.

جدول ۲ نتیجه آزمون حساسیت سلولی برای هر سه رده سلولی با استفاده از ویروس پولیو ۲ استاندارد و OPV یک‌ظرفیتی؛ اعداد منفی، میانگین ۸ بار تکرار آزمـون و نشان دهنده لگاریتم تیتری از ویروس است که توسط سلول شناسایی شده است (با استفاده از فرمول کاربر). اعداد منفی سه ردیف سمت راست جدول از بالا به پـایین، نشان دهنده کاهش حساسیت سلول‌ها با افزایش شماره پاساژ سلول (افزایش سن سلول) است.

رده سلولی	RD		L20B		Hep2				
ویروس	استاندارد پولیو ۲	OPV پولیو ۲	استاندارد پولیو ۲	OPV پولیو ۲	استاندارد پولیو ۲	OPV پولیو ۲	میانگین استاندارد	میانگین OPV	میانگین کل
شماره پاساژ سلول									
۳	-۷/۳۵	-۷/۴۹	-۷/۳۸	-۷/۳۲	-۶/۵۴	-۶/۴۷	-۷/۰۹	-۷/۰۹	-۷/۱۰
۷	-۷/۰۶	-۷/۴۶	-۷/۱۲	-۷/۱۵	-۶/۵۱	-۶/۱۸	-۶/۹۰	-۶/۹۳	-۶/۹۰
۱۱	-۷/۰۴	-۷/۳۶	-۷/۰۸	-۷/۰۹	-۶/۳۳	-۶/۰۶	-۶/۸۴	-۶/۸۴	-۶/۸۰
۱۵	-۷/۰۱	-۷/۲۴	-۷/۰۵	-۷/۰۶	-۶/۰۱	-۶/۰۱	-۶/۶۹	-۶/۷۷	-۶/۷۰
۱۹	-۶/۹۱	-۷/۰۲	-۷/۰۲	-۷/۰۱	-۵/۸۱	-۵/۹۱	-۶/۵۹	-۶/۵۶	-۶/۶۰
میانگین بر حسب ویروس استاندارد یا OPV	-۷/۰۹	-۷/۳۲*	-۷/۱۴*	-۷/۱۳	-۶/۲۴*	-۶/۱۳			
میانگین کل برای رده سلولی	-۷/۲۰**		-۷/۱۳**		-۶/۱۸				

*: نشان دهنده بیشتر بودن حساسیت رده سلولی نسبت به ویروس استاندارد یا OPV است.

**: نشان دهنده حساس‌ترین رده‌های سلولی نسبت به ویروس پولیو ۲ است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳ نتیجه آزمون حساسیت سلولی برای هر سه رده سلولی با استفاده از ویروس پولیو ۳ استاندارد و OPV یک‌ظرفیتی؛ اعداد منفی، میانگین ۸ بار تکرار آزمون و نشان دهنده لگاریتم تیتری از ویروس است که توسط سلول شناسایی شده است (با استفاده از فرمول کاربر). اعداد منفی سه ردیف سمت راست جدول از بالا به پایین، نشان دهنده کاهش حساسیت سلول‌ها با افزایش شماره پاساژ سلول (افزایش سن سلول) است.

رده سلولی	RD		L20B		Hep2			
ویروس	استاندارد پولیو ۳	OPV پولیو ۳	استاندارد پولیو ۳	OPV پولیو ۳	استاندارد پولیو ۳	OPV پولیو ۳	میانگین استاندارد	میانگین OPV	میانگین کل
شماره پاساژ سلول									
۳	−٦/٩٣	−٧/٤٥	−٦/٩١	−٧/١٨	−٥/٧٩	−٦/٣٢	−٦/٨٠	−٦/٥٤	−٦/٩٨
٧	−٦/٩١	−٧/٢٨	−٦/٩٠	−٧/٠٧	−٥/٧١	−٦/٠٤	−٦/٦٠	−٦/٥١	−٦/٧٩
١١	−٦/٩١	−٧/١٣	−٦/٨٨	−٧/٠٢	−٥/٦٣	−٥/٩٩	−٦/٦٠	−٦/٤٨	−٦/٧١
١٥	−٦/٥٥	−٧/٠٩	−٦/٨٦	−٦/٨٨	−٥/٥١	−٥/٨٤	−٦/٥٠	−٦/٣١	−٦/٦٠
١٩	−٦/٤١	−٧/٠٧	−٦/٨٦	−٦/٨٠	−٥/٤٦	−٥/٨٣	−٦/٤٠	−٦/٢٤	−٦/٥٧
میانگین بر حسب ویروس استاندارد یا OPV	−٦/٧٤	−٧/١٩*	−٦/٨٩	−٦/٩٩*	−٥/٦٢	−٦/٠١*			
میانگین کل برای رده سلولی	−٦/٩٧**		−٦/٩٤**		−٥/٨٢				

*: نشان دهنده بیشتر بودن حساسیت رده سلولی نسبت به ویروس استاندارد یا OPV است.

**: نشان دهنده حساس‌ترین رده‌های سلولی نسبت به ویروس پولیو ۳ است.

٤- بحث

سال ۱۹۸۸ که WHO ریشه‌کنی ویروس پولیوی وحشی تا سال ۲۰۰۰ را در دستور کار خود قرار داد، تعداد موارد پولیومیلیت از ۳۵۰۰۰۰ مورد در سال ۱۹۸۸ به ۱۳۱۵ مورد در سال ۲۰۰۷ رسید [۷] و در سال ۲۰۰۸ تعداد کشورهایی که ویروس پولیوی وحشی بومی در آن‌ها گردش داشت به ٤ کشور افغانستان، پاکستان، نیجریه و هند محدود شد [۷]. در ایران نیز فعالیت برای ریشه‌کنی فلج اطفال از سال ۱۹۹٤ شروع شد و از سال ۲۰۰۱ میلادی تا به امروز با وجودی که کشورهای همسایه شرقی ما همچنان آلوده است، ویروس پولیوی وحشی از ایران ریشه‌کن شده و آخرین موارد ویروس وحشی شناسایی شده در ایران در سال ۲۰۰۰ ویروس‌های وارداتی از کشور پاکستان بوده است [۱].

باید توجه داشت که ردیابی و مراقبت موارد فلج شل حاد تنها به کشورهایی که ویروس وحشی در آن‌ها در حال گردش است محدود نمی‌شود، بلکه حتی کشورهایی که سال‌هاست ویروس پولیوی وحشی را ریشه‌کن کرده‌اند، نیز هنوز باید به پایش بیماران فلج شل حاد و حتی پایش محیط (فاضلاب‌ها و آب‌های سطحی) ادامه دهند [۸-۱۱] زیرا نگرانی عمده این کشورها، ورود ویروس وحشی وارداتی و همچنین ظهور VDPV و به گردش افتادن آن در جامعه است [۱۲]. از این‌رو لازم است برنامه‌های پایش که شامل ردیابی موارد فلج شل حاد و آزمون‌های آزمایشگاهی برای شناسایی ویروس پولیو در مدفوع بیماران فلج شل حاد است به‌صورت خیلی دقیق و حساس انجام شود تا ردیابی ویروس پولیو به بهترین نحو ممکن صورت گیرد.

کشت سلول نقش بسیار مهمی در ردیابی ویروس پولیو دارد و روش استاندارد طلایی برای جداسازی ویروس پولیو محسوب می‌شود [۳]. سه رده سلولی که در دهه اخیر برای جداسازی ویروس پولیو در آزمایشگاه‌های پولیو، که زیر نظر

www.SID.ir

Archive of SID

WHO فعالیت می‌کنند، استفاده شده‌اند، عبارتند از رده سلولی RD (سلول رابدومیوسارکومای انسانی)، رده سلولی L20B (سلول پوششی نوترکیب موش که گیرنده ویروس پولیو به‌وسیله مهندسی ژنتیک روی آن سوار شده و اختصاصی ویروس پولیو است) و رده سلولی Hep2 (رده سلولی مشتق از سرطان حنجره انسان). از زمانی که سلول L20B در آزمایشگاه‌های پولیو استفاده شد، به‌تدریج استفاده از سلول Hep2 کاهش یافت. سلول‌های مورد استفاده در آزمایشگاه‌های پولیو می‌بایست حساسیت لازم و کافی را برای جداسازی ویروس پولیو داشته باشند و دائماً از نظر حساس بودن کنترل شوند.کنترل حساسیت به‌طور معمول توسط رقت‌های مختلف ویروس پولیوی استاندارد انجام می‌گیرد ولی حساسیت سلول‌ها نسبت به ویروس استاندارد ممکن است نشان دهنده حساسیت به ویروس موجود در OPV نباشد.

از آن‌جا که تاکنون مطالعه‌ای برای سنجش حساسیت سلول‌های مورد استفاده در آزمایشگاه پولیو نسبت به ویروس موجود در OPV کشورمان انجام نگرفته و همیشه برای آزمون حساسیت سلولی از ویروس استاندارد استفاده شده است، در این بررسی حساسیت رده‌های سلولی RD، L20B و Hep2 از طریق تیتراژ سروتیپ‌های یک‌ظرفیتی استاندارد ویروس پولیو و نیز سروتیپ‌های سه‌ظرفیتی شده موجود در واکسن خوراکی پولیو ارزیابی شد. در این مطالعه سعی شد که شرایط آزمایش (از نظر دما، pH، مواد مورد استفاده در محیط کشت) حتی‌المقدور ثابت نگه داشته شود تا اثر تغییرات تیتر ویروس در حساسیت سلول به دقت ارزیابی شود.

نکته قابل توجه در زمینه مطالعه انجام شده این است که تاکنون در مطالعات قبلی حساسیت سلول‌ها بدین نحو و با این جزئیات بررسی شده است؛ به‌طوری که در مطالعات بسیار محدود قبلی بررسی حساسیت رده‌های سلولی، به دستورالعمل اکید WHO در رابطه با استفاده از ویروس استاندارد عمل نشده و یکسان بودن شرایط، شماره پاساژ سلول‌ها و رقت‌های مختلف ویروس و حتی انواع سه‌گانه پولیو مورد توجه قرار نگرفته است. همچنین در سایر تحقیقات انجام شده برای بررسی حساسیت سلول‌ها، اکثراً از نمونه‌های بالینی که حضور یا عدم حضور ویروس در آن‌ها قطعی نبوده، استفاده شده است [۵]. در مطالعات تقریباً مشابه خارجی که از نمونه‌های بالینی استفاده کرده‌اند، مطرح شده است که علیرغم حساسیت هر سه رده سلولی به ویروس پولیو، حساسیت رده سلولی L20B نسبت به این ویروس به مراتب بیش از دو رده سلولی دیگر است [۵، ۱۳]. از طرفی در مطالعات مشابه دیگری، رده سلولی L20B از اختصاصی‌ترین رده‌های سلولی برای ویروس پولیو معرفی شده است که امکان جداسازی این ویروس را در نمونه‌هایی که شامل مخلوطی از انتروویروس‌های غیرپولیویی (Non-Polio Enteroviruses) نیز بوده‌اند، فراهم آورده است [۱٤، ۱۵]. البته در برخی از این بررسی‌ها نیز رده سلولی RD به‌عنوان حساس‌ترین رده سلولی نسبت به ویروس پولیو معرفی شده است [۱٦، ٤].

معدودی از مطالعات داخلی درباره تعیین حساسیت سلول‌های رده‌های مختلف نسبت به ویروس پولیو انجام شده که در این مطالعات نیز شرایط استاندارد برای تعیین حساسیت سلولی در نظر گرفته نشده است و در نهایت نیز حساسیت سه رده سلولی RD، L20B، Hep2 در جداسازی ویروس پولیو در یک حد گزارش شده‌اند [۱۷، ۱۸]. مطالعات دیگری نیز در زمینه مقایسه حساسیت رده‌های سلولی مختلف برای پولیوویروس‌ها انجام شده که در این مطالعات از سایر سلول‌ها (علاوه بر سه رده سلولی مذکور) نظیر رده سلولی پوششی تمایز یافته مشتق از سرطان روده انسان SKCO-1، HT-29، HRT-18 وسلول‌های اولیه کلیه میمون (Primary Cultures of Cynomolgus Monkey Kidney: PMK) استفاده شده است. در این بررسی با وجود این‌که حساسیت تمامی این ۵ نوع سلول برای پولیو ویروس یکسان گزارش شده، گفته شده است که سه رده سلولی SKCO-1، HT-29، HRT-18 در مقایسه با RD و PMK به‌صورت قابل توجهی نسبت به انتروویروس‌ها حساس‌ترند [۱۹]. بررسی متفاوت دیگری نیز

www.SID.ir

Archive of SID

روی ویروس‌های روده‌ای سخت رشد انسانی، نظیر پولیوویروس و انتروویروس ۷۰، با استفاده از رده سلولی سرطان روده Caco-2 انجام شد. در این مطالعه گزارش شد که رده سلولی مذکور حساسیت به مراتب بیشتری برای جداسازی ویروس‌های ذکر شده در مقایسه با رده‌های سلولی انسانی، که به‌صورت معمول برای جداسازی این ویروس‌ها به‌کار می‌روند، نشان می‌دهد [۲۰]. نکته حایز اهمیت این است که در این مطالعات نیز غلظت ویروس موجود در نمونه‌ها در نظر گرفته نشده است، در حالی که هدف از آزمون حساسیت سلولی برآورد کردن حساسیت سلول‌ها در مقابل تیتر معینی از ویروس است. بنابراین همان‌طور که مشخص است در هیچ‌یک از این مطالعات از ویروس استاندارد و دستورالعمل استاندارد آزمون حساسیت سلولی استفاده نشده و تنها به درصد جداسازی ویروس پولیو از نمونه‌های بالینی اکتفا شده است و این در حالیست که معلوم نبوده واقعاً چند درصد نمونه‌ها از نظر ویروس پولیو مثبت بوده‌اند و میزان تیتر ویروس در نمونه‌ها چقدر بوده است.

نتایج مطالعه حاضر و آزمون آماری تجزیه و تحلیل واریانس سه طرفه نشان داد که حساسیت رده سلولی Hep2 نسبت به ویروس پولیوی استاندارد و نیز OPV بسیار پایین‌تر از دو رده سلولی دیگر است و بهتر است در آزمایشگاه پولیو از آن استفاده نشود.

همچنین مشاهده شد که رده سلولی RD حساس‌ترین سلول نسبت به ویروس OPV (همان ویروس پولیوی در گردش در جامعه ما و منشا بالقوه ایجاد VDPV) است، ضمن این که حساسیت قابل توجهی نسبت به ویروس استاندارد نیز دارد. این یافته ما را از ردیابی حساس و دقیق ویروس‌های واکسن و VDPV توسط سلول RD مورد استفاده در آزمایشگاه مطمئن می‌سازد.

از طرفی سلول L20B حساسیت بالاتری نسبت به ویروس استاندارد نشان داد که این امر ما را از ردیابی ویروس‌های وارداتی توسط سلول L20B مورد استفاده در آزمایشگاه مطمئن می‌سازد. به دلیل این‌که سلول L20B برای ویروس پولیو اختصاصی است و علاوه بر حساسیت نسبت به ویروس استاندارد، حساسیت قابل توجهی نیز نسبت به ویروس‌های OPV دارد، می‌توان گفت که استفاده همزمان از دو رده سلولی RD و L20B در آزمایشگاه پولیو ما را از دقت و حساسیت سلول‌های مورد استفاده برای ردیابی انواع ویروس‌های در گردش در جامعه (اعم از ویروس‌های واکسن، VDPV و ویروس‌های وارداتی) مطمئن می‌سازد.

نتیجه تحقیق حاضر نشان داد که حساسیت هر سه رده سلولی با افزایش شماره پاساژ (افزایش سن سلول) کاهش می‌یابد، به‌طوری که بهتر است از شماره پاساژ ۱۵ به بعد استفاده نشود و این امر ضرورت استفاده از سلول‌های جوان‌تر و با شماره پاساژ کمتر را نشان می‌دهد تا حساسیت سلول‌ها به حداکثر برسد.

تفاوت مشاهده شده در نتیجه آزمون حساسیت سلولی با استفاده از ویروس استاندارد و ویروس OPV این امر را خاطر نشان می‌سازد که بهتر است برای آزمون حساسیت سلولی تنها به استفاده از ویروس استاندارد اکتفا نشود و هر کشوری به همراه آن از ویروس OPV مورد استفاده خود نیز استفاده کند تا از دقت ردیابی ویروس‌های در گردش در جامعه اطمینان حاصل نماید. این امر می‌تواند ما را در پیشبرد هر چه بهتر مراحل نهایی ریشه‌کنی ویروس فلج اطفال یاری دهد و اطمینان کافی را در زمینه شناسایی حساس و دقیق ویروس‌های پولیوی وحشی، واکسن و VDPV موجود در نمونه‌های بیماران فلج شل حاد حاصل نماید.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان از پرسنل آزمایشگاه تشخیص کشوری فلج اطفال برای کمک در کار عملی این تحقیق قدردانی می‌نمایند. این مطالعه در قالب پایان‌نامه دانشجویی و با پشتیبانی مالی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران در بخش ویروس‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

٦- منابع

[1] Wild Poliovirus 2000-2010. http://www.polioeradication.org/content/general/casecount.pdf

[2] Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. Annu Rev Microbiol 2005; 59: 587-635.

[3] Sutter RW, Kew OM, Cochi SL. Poliovirus vaccine-live. In: Plotkin S, Orenstein W, (Editors). Vaccines. 4th ed, Philadelphia (PA): WB Saunders, 2003; p: 631-86.

[4] World Health Organization. Report of third meeting on laboratory surveillance for poliomyelitis eradication in the western pacific region. Wkly Epidemiol Rec 2000; 75(49): 397-408.

[5] Wood DJ, Hull B. L20B cells simplify culture of polioviruses from clinical samples. J Med Virol 1999; 58(2):188-92.

[6] World Health Organization. Polio Laboratory Manual. 2004; http://www.whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_IVB_04 .10.

[7] http://www.polioeradication.org/Infectedcountries.aspx

[8] Saraswathy TS, Khairullah NS, Sinniah M, Fauziah MK, Apandi MY, Shamsuddin M. Laboratory acute flaccid paralysis surveillance in Malaysia: a decade of commitment to the WHO global polio eradication initiative. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2004; 35(2): 421-4.

[9] Stambos V, Brussen KA, Thorley BR.. Annual report of the Australian National Poliovirus Reference Laboratory, 2004. Commun Dis Intell 2005; 29(3): 263-8.

[10] Kelly H, Brussen KA, Lawrence A, Elliot E, Pearn J, Thorley B. Polioviruses and other enteroviruses isolated from faecal samples of patients with acute flaccid paralysis in Australia, 1996-2004 J Paediatr Child Health 2006; 42(6): 370-6.

[11] Brussen KA, Roberts J, Ibrahim A, Stambos V, Thorley BR. Annual report of the Australian National Poliovirus Reference Laboratory 2005. Commun Dis Intell 2006; 30(3): 334-40.

[12] Durrheim DN, Massey IP, Kelly H. Re-emerging poliomyelitis--is Australia's surveillance adequate? Commun Dis Intell 2006; 30(3): 275-7.

[13] Ozkaya E, Korukluoğlu G, Yalçinkaya T, Türkeri A, Atak T, Kubar A. Sensitivities of various cell cultures for the isolation of enteroviruses. Mikrobiyol Bul 2002t; 36(3-4): 301-8.

[14] Wood DJ, Hull B. L20 cells simplify culture of poliviruses from clinical samples. J Med Virol 1999; 58(2): 188-92.

[15] Abey Singhe M.R.N. Laboratory diagnosis in Eradication of poliomyelitis: A comprehensive guide for medical officers. 2nd edition Epidemiology Unit, Ministry of Healthcare & Nutrition, Colombo, Printed by Gunaratna Offset Limited 2005; p: 21-5.

[16] Dowdle W. Eradication progress brings greater laboratory challenges. Polio Lab Nnetwork Qquarterly Update 1998; IV(4): 1-4.

[17] Abasian F, Tabatabaii H, Nategh R. Sensitivities of various cell cultures for the isolation of enteroviruses in acute flaccid paralysis patients. Journal of School of Public

www.SID.ir

Archive of SID

Health and Institute of Public Health Research 2004; 4: 61-68. (Persian)

[18] Shoja Z, Tabatabaii H, Nategh R. The isolation of enteroviruses in acute flaccid paralysis patients in West Azarbijan. Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research 1989; 2: 79-86. (Persian)

[19] Patel JR, Daniel J, Mathan VI. A comparison of the susceptibility of three human gut tumour-derived differentiated epithelial cell lines, primary monkey kidney cells and human rhabdomyosarcoma cell line to 66-prototype strains of human enteroviruses. J Virol Methods 1985; 12(3-4): 209-16.

[20] Pintó RM, Diez JM, Bosch A. Use of the colonic carcinoma cell line CaCo-2 for in vivo amplification and detection of enteric viruses. J Med Virol 1994; 44(3): 310-5.

www.SID.ir