###### 28

###### azad

###### دانشگاه آزاد اسلامي

###### واحد تهران مرکز

**موضوع:**

مروري بر روشهاي ويروس شناسي

«تخم مرغ جنين دار، كشت سلول، Elisa، HI، PCR»

# مقدمه

تعداد زيادي از بيماريهاي انسان، حيوان و گياه با وجود اينكه واگير و قابل انتقالند توسط باكتريها، قارچها، پروتزوئرها و به طور كلي توسط عواملي ايجاد مي شود كه نمي توان آنها را با ميكروسكوپ عادي ديد، و عفوني بودن اينگونه بيماريها را مي‌توان با تزريق مواد آلوده ويا پاليده آنها به دامهاي حساس به اثبات رسانيد.

ويروسها ازجمله كوچكترين عوامل عفوني مي باشند كه به علت دارا بودن خصوصيات مختص خود با ساير موجودات زنده تفاوت دارند. ويروسها را نمي توان درمحيطهاي مصنوعي آزمايشگاهي به راحتي تشخيص داد و بمنظور كشت، جداسازي و نهايتاَ شناسائي آنها از حيوانات حساس، تخم مرغ جنين دار و كشت سلول استفاده مي شود. در اثر استفاده از تخم مرغ جنين دار براي كشت ويروسها پيشرفت قابل ملاحظه اي درراه شناسايي و جداسازي اين عوامل عفوني حاصل شده است.

بيشتر ويروسها به ميزبان ويژه اي اختصاص دارند به نحوي كه دربدن ميزبان اختصاصي نيز، بافت و يا سلولهاي ويژه اي را جهت تكثير و بقاي خود انتخاب مي‌كنند. با توجه به دارا بودن چنين شرايط انحصاري دراين دسته ازميكروارگانيسمهاي عفوني مي توان بااستفاده از روشهاي مخصوص و تكنيكهاي مناسب تعداد زيادي از ويروسها را به رشد دربافت ميزبان ديگر عادت داد.

نظر به اينكه ياخته ها و پرده هاي غشائي اطراف جنين مرغ مانند بيشتر بافتهاي جنين فعاليتهاي اختصاصي دقيقي ندارند رشد و تكثير تعداد زيادي از ويروسها درآنها امكان پذير مي باشد.

تخم‌هاي مرغ‌هاي جنين دار كه درمراحل گوناگون رشد مي باشند با بكارگيري روشهاي مختلفي مي توان درآنها تلقيح نمود بعد از تلقيح تخم مرغها را درشرايط مناسب نگهداري نموده و هر روز بررسي مي نمايند. روشهاي استانداردي جهت تلقيح ويروسهاي مختلف به غشاء كوريوآلانتوئيك، كيسه آمنيوتيك، كيسه آلانتوئيك، كيسه زرده يا جنين، داخل مغز جنين و داخل عضلاني موجود است. مايع يا بافتهاي آنها را پس مدت زمان برداشته و تكثير ويروس يا آسيب‌هاي ناشي از آن رابررسي مي‌كنند.

واكنش بين ويروس وميزبان خيلي اختصاصي بوده و از نظر بيولوژي ويروسها، بازتاب تنوع سلولهاي ميزبان آنها مي باشد. تنوع دربين ويروسها به روشهاي گوناگوني كه ويروسها براي تكثير و باقي ماندن ازخود نشان مي دهند بستگي دارد.

درزمينه كشت ويروسها نيز قدمهاي مهم و با ارزشي برداشته شده است تلقيح به تخم مرغ يا استفاده از كشت سلول كه به ترتيب توسط ودروف (Woodruff) و پاركر (Parker) انجام پذيرفت ازمفيدترين روشهاست كه براي رشد ويروسها به كاررفته است و درحال حاضر در آزمايشگاههاي ويروس شناسي مورد استفاده مي باشد پيشرفتهايي كه درزمينه علوم بيوفيزيك، بيوشيمي، ايمني شناسي و ژنتيك حاصل شده، به شناخت ماهيت ويروسها كمك قابل توجهي كرده است. استفاده از دستگاههايي نظير ميكروسكوپ الكتروني، اولتراسانتريفوژ، ميكروسكوپ فلورسنت و اولترافيلتر درپيشبرد ويروس شناسي بسيار موثربوده است.

### روشهاي مختلف تشخيص آزمايشگاهي بيماريهاي ويروسي برسه اصل استوار است

1. جداسازي ويروس
2. روشهاي سرمي
3. روشهاي ملكولي

## 1-1 جداسازي ويروس

براي كشت و جداكردن ويروسها معمولاً ازحيوانات حساس، تخم مرغ جنين دار ويا كشت سلول استفاده مي شود. نمونه هاي مايع را كه عاري از باكتري باشند مي توان مستقيماً و يا پس از رقيق كردن به محيط زنده تلقيح نمود. نمونه هاي جامد را بايد درمحلول تامپون به نسبت 20-10 درصد به صورت تعليق درآورد. سپس توسط سانتريفوژبا دوركم ذرات معلق راجدا ساخت و مايع را دوباره سانتريفوژ كرده و سپس اقدام به كشت نمود.

## 1- ا- الف-كشت درتخم مرغ جنين دار

دراثر استفاده از تخم مرغ جنين دار براي كشت ويروسها پيشرفت قابل ملاحظه اي درراه شناسايي و جداسازي اين عوامل بوجود آمده است. نظر به اينكه بافت ها و پرده هاي غشايي اطراف جنين مرغ مانند بيشتر بافتهاي جنين فعاليتهاي اختصاصي دقيقي ندارند، رشد تعداد زيادي از ويروسها درآنها امكان پذير مي باشد.

**1-1- ب - جداكردن دركشت سلول**

پيشرفتهاي حاصل دركشت سلول وسيله با ارزشي براي جداسازي و تكثير ويروسها در اختيار ويروس شناسان قرارداده است. ازدياد ويروس دركشت سلول را مي توان به روشهاي مختلف ازقبيل اثر بيماري زائي درسلول(CPE) تداخل ويروسها(Interference)، جذب گلبولهاي قرمز به ياخته هاي حاوي ويروس (Hemadsorption) هماگلوتنيشن(HA)، جستجوي آنتي ژن توسط ايمونوفلورسنت و يا ثبوت مكمل (CFT) تشخيص داد.

**1-1-ج - كشت و جداكردن ويروس درحيوانات**

انتخاب حيوان حساس براي جداكردن ويروس نكته اصلي دراين روش است كه دراين رابطه فاكتورهاي ضروري زيررا مي بايست درنظر گرفت.

1-سن حيوان

2-ميزبان طبيعي ويروس

3-منشأ حيوان

درحال حاضر ازاين روش به ندرت استفاده مي شود و بيشتر دربررسيهاي ويروس شناسي كاربرد دارد.

### 2-1- تشخيص بيماريهاي ويروسي توسط آزمايشهاي سرمي

عفونتهاي ويروسي معمولاً با واكنشهاي ايمني هومورال و سلولي همراه است، بنابراين سنجش هر يك ازآنها وسيله اي براي تشخيص بيماري مي باشد.

ازجمله آزمايشات سرمي متداول مي توان به موارد زير اشاره كرد:

1-آزمايشهاي خنثي سازي(NT)

2-واكنش ثبوت مكمل (CFT)

3-واكنش جلوگيري از جمع شدن گلبولهاي قرمز(HI)

4-واكنش ايموديفوژن (I D)

5-واكنش ايمونوفلورسنس (FA)

6-آزمايش ELLSA