اصول روش‌های تشخیص آزمایشگاهی در ویروس‌شناسی پزشکی

نگارندگان

دکتر طراوت بامداد

دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

دکتر مسعود پارسانیا

دانشیار دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران

۱۳۹۹

سرشناسه: بامداد، طراوت، ۱۳۵۰-
عنوان و نام پدیدآور: اصول روش‌های تشخیص آزمایشگاهی در ویروس‌شناسی پزشکی/ نگارندگان طراوت بامداد، مسعود پارسانیا.
مشخصات نشر: تهران: دانشگاه تربیت مدرس، مرکز نشر آثار علمی ، ۱۳۹۹.
مشخصات ظاهری: ۲۸۵ص.: مصور(رنگی)، جدول.
شابک: ۹۷۸-۶۲۲-۷۰۳٤-۲۱-۹
وضعیت فهرست نویسی: فیپا
یادداشت: واژه‌نامه.
یادداشت: کتابنامه:ص.۲٤٤-۲۵۰.
یادداشت: نمایه.
موضوع: ویروس‌شناسی پزشکی
موضوع: Medical virology
شناسه افزوده: پارسانیا، مسعود، ۱۳٤۵ -
شناسه افزوده: دانشگاه تربیت مدرس. مرکز نشر آثار علمی
شناسه افزوده: Tarbiat Modares University. TMU Press
رده بندی کنگره: RC۱۱٤/۵
رده بندی دیویی: ٦۱٦/۹۱۰۱
شماره کتابشناسی ملی: ۷۵٦۳۱۸۷

اصول روش‌های تشخیص آزمایشگاهی در ویروس‌شناسی پزشکی

نگارندگان: دکتر طراوت بامداد، دکتر مسعود پارسانیا
ویراستار ادبی و فنی: سید مصطفی فیض بخش
طراح جلد: ترنج
صفحه‌آرایی: سمیه زهانی
شماره انتشار: ۲۷۳
شماره پیاپی: ٤۱۸
تاریخ انتشار: ۱۳۹۹
شمارگان: ۵۰۰
شابک: ۹۷۸-۶۲۲-۷۰۳٤-۲۱-۹ **شابک الکترونیکی:** ۹۷۸-۶۲۲-۸۳۷٦-۲۱-۹
ناشر: انتشارات دانشگاه تربیت مدرس
نوبت چاپ: اول
کارشناس اجرایی: فاطمه طالبی
ناظر چاپ: مصطفی جانجانی
لیتوگرافی: ایران گرافیک
چاپ و صحافی: شمس
مرکز پخش: تقاطع بزرگراه‌های آل‌احمد و دکتر چمران، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: ۳۱۸-۱٤۱۱۵
تلفن: ۸۲۸۸۳۰۹٦
دورنگار: ۸۲۸۸۳۰۳۲
آدرس اینترنتی فروش: pub.modares.ac.ir

مسئولیت صحت مطالب کتاب برعهدهٔ مولفان است.

تمام حقوق این اثر برای مرکز نشر آثار علمی دانشگاه تربیت مدرس محفوظ است و تکثیر کتاب به هر روشی بدون اجازه کتبی ناشر موجب پیگرد قانونی می‌شود.

تقدیم به:

تمامی استادان فرزانه و فرهیخته ای که در راه کسب علم و معرفت چراغ راهمان بودند و دانشجویان و محققان عزیزی که امید است از این نوشتار در راه اعتلای علم استفاده کنند.

فهرست مطالب

پیشگفتار ..... **ز**

فصل اول روش‌های کشت و جداسازی ویروس‌ها **۱**

۱-۱ نمونه‌گیری و انتخاب نوع نمونه مناسب ۱

۱-۲ انتقال نمونه به آزمایشگاه ۳

۱-۳ آماده‌سازی نمونه برای تلقیح به کشت سلول ۵

۱-۳-۱ خون (با ماده ضدانعقاد) ٦

۱-۳-۲ سواب رکتال ۹

۱-۳-۳ مایع مغزی نخاعی و دیگر مایعات استریل بدن ۹

۱-۳-٤ خلط ۹

۱-۳-۵ مدفوع ۹

۱-۳-٦ بافت (اتوپسی یا بیوپسی) ۱۰

۱-۳-۷ ادرار ۱۰

۱-۳-۸ مایع حاصل از شستشوی حلق و بینی ۱۰

۱-٤ اجزای مختلف کشت سلول ۱۱

۱-٤-۱ محیط کشت سلولی ۱۱

۱-٤-۲ سرم ۱۳

۱-٤-۳ آنتی‌بیوتیک‌ها ۱٤

۱-٤-۵ موارد استفاده از کشت سلول در ویروس‌شناسی ۱۹

۱-٤-٦ دستورالعمل کشت سلول ۱۹

۱-٤-٦-۱ روش ساخت محیط کشت ۱۹

۱-٤-٦-۲ روش ساخت محلول CMF-PBS ۲۱
۱-٤-٦-۳ محلول تریپسین - ورسن ۲۲
۱-٤-٦-٤ روش ساخت محلول تریپسین —ورسن ۲۲
۱-٤-۷ روش آماده‌سازی سرم ۲۳
۱-٤-۸ کشت مجدد یا پاساژ سلولی ۲٤
۱-٤-۹ دستورالعمل پاساژ یا کشت مجدد سلول‌های تک لایه ۲۵
۱-٤-۱۰ روش شمارش سلول‌ها با استفاده از لام هموسیتومتر (لام نئوبار) ۲۸
۱-٤-۱۱ دستورالعمل کشت مجدد سلول‌های غیرچسبنده (سوسپانسیون سلولی) ۳۱
۱-٤-۱۲ دستورالعمل تعیین درصد سلول‌های زنده به‌روشMTT ۳۳
۱-٤-۱۳ بررسی وضعیت سلول‌ها با استفاده از روش فلوسایتومتری ۳٦
۱-٤-۱٤ استفاده از روش فلوسایتومتری بر پایه دو رنگ ,AnnexinV-FITC7-AAD برای القای آپوپتوز در سلول‌ها ۳۹
۱-٤-۱٤-۱ رنگ‌آمیزی سلول‌ها با رنگ‌های AnnexinV-FITC و PI ٤۰
۱-٤-۱۵ انجماد سلول‌ها ٤۲
۱-٤-۱۵-۱ دستورالعمل انجماد سلول‌ها ٤۲
۱-٤-۱۵-۲ روش ذوب کردن سلول‌های منجمدشده ٤٤
۱-٤-۱٦ آلودگی در کشت‌های سلولی ٤۵
۱-٤-۱۷ جداسازی ویروس در کشت سلول ٤۷
۱-٤-۱۷-۱ انتخاب رده سلولی مناسب ٤۸
۱-٤-۱۷-۲ تلقیح نمونه به سلول و روش نگهداری آن ٤۹
۱-٤-۱۷-۳ روش‌های بررسی اولیه به‌منظور تأیید حضور ویروس و تکثیر آن در کشت سلولی ۵۰
۱-٤-۱۷-٤ روش‌های تأیید ویروس جداسازی‌شده در کشت سلول ٦۲
۱-٤-۱۸ روش‌های تغییر یافته کشت برای افزایش کارایی جداسازی ویروس ٦۹
۱-٤-۱۸-۱ ویال‌های تیغه‌دار ٦۹
۱-٤-۱۸-۲ کشت توأم ۷۳
۱-٤-۱۸-۳ سلول‌های تغییر ژنتیکی یافته (سلول‌های تراریخته) ۷٤
۱-٤-۱۹ تعیین تیتر ویروس ۷۵

۱-٤-۱۹-۱ $TCID_{50}$ ۷۵
۱-٤-۱۹-۲ تیتراسیون ویروس با روش سنجش پلاک ۸۱
۱-٤-۱۹-۳ سنجش کانونی ایمونوفلورسانس (IFA) ۸٦
۱-٤-۱۹-٤ تیتراسیون ویروس به روش فلوسایتومتری ۸۷
منابع ۸۹
فصل دوم روش‌های ایمونوسرولوژیک ۹۳
۲-۱ اصول آزمون‌های ایمونوسرولوژیک ۹۳
۲-۲ انواع آزمون‌های ایمونوسرولوژیک ۹۷
۲-۲-۱ آزمون‌های مبتنی بر واکنش هماگلوتیناسیون ۹۸
۲-۲-۱-۱ آزمایش هماگلوتیناسیون ۹۹
۲-۲-۱-۲ آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) ۱۰۱
۲-۲-۲ آزمون‌های مبتنی بر واکنش ایمونوفلورسنس ۱۰٤
۲-۲-۲-۱ روش انجام کار برای تعیین آنتی‌بادی از کلاس IgG ۱۰٦
۲-۲-۲-۲ روش انجام کار برای تعیین آنتی‌بادی از کلاس IgM ۱۰۸
۲-۲-۳ آزمون فیکساسیون کمپلمان ۱۰۸
۲-۲-٤ آزمون خنثی‌سازی ۱۱۲
۲-۲-۵ آزمون الایزا ۱۱۵
۲-۲-۵-۱ آزمون اویدیتی IgG ۱۲۰
۲-۲-٦ آزمون رادیوایمونواسی ۱۲۱
۲-۲-۷ آزمون الکتروکمی‌لومینسانس ۱۲۲
۲-۲-۸ روش ایمونوبلات ۱۲۷
منابع ۱۲۹
فصل سوم روش‌های مولکولی ۱۳۱
۳-۱ آزمون‌های کنترلی در تشخیص‌های مولکولی ۱۳۱
۳-۱-۱ حساسیت، اختصاصیت و ارزش پیش‌گویی ۱۳۲
۳-۱-۲ آزمون‌های اعتبارسنجی و کنترل کیفی ۱۳٤
۳-۱-۲-۱ اعتباربخشی و تصدیق آزمون ۱۳۵

۳-۱-۲-۲ اجزای ضروری برای اعتباربخشی روش‌های آزمایشگاهی ۱۳۶
۳-۱-۲-۳ اجزای ضروری برای تصدیق روش‌های آزمایشگاه مولکولی ۱۴۰
۳-۱-۲-٤ ملزومات تصدیق برای روش‌های تجاری استاندارد ۱۴۰
۳-۱-۲-۵ ملزومات تصدیق برای روش‌های مولکولی راه‌اندازی شده یا تغییر یافته در آزمایشگاه ۱۴۳
۳-۲ نمونه‌گیری، انتقال و ذخیره‌سازی برای آزمون‌های مولکولی ۱۴۵
۳-۲-۱ جمع‌آوری، پایداری و آماده‌سازی نمونه پیش از استخراج اسید نوکلئیک ۱۴۶
۳-۲-۱-۱ خون، پلاسما، سرم ۱۴۶
۳-۲-۱-۲ ادرار ۱۴۷
۳-۲-۱-۳ بافت ۱۴۸
۳-۲-۱-٤ مدفوع ۱۴۸
۳-۲-۲ ممانعت از آلودگی هنگام نمونه‌گیری ۱۴۹
۳-۲-۳ اصول کار با DNA وشرایط نگهداری آن ۱۵۱
۳-۲-٤ اصول کار با RNA و شرایط نگهداری آن ۱۵۳
۳-۳ استخراج اسید نوکلئیک ۱۵۵
۳-۳-۱ اصول استخراج اسیدهای نوکلئیک ۱۵۶
۳-۳-۱-۱کیت‌های استخراج اسیدنوکلئیک ۱۵۷
۳-۳-۲ استخراج ژنوم ویروس ۱۶۱
۳-۳-۲-۱ جداسازی ویروس از اجزای کشت ۱۶۱
۳-۳-۲-۲ روش‌های استخراج ژنوم ویروس ۱۶۲
۳-٤ الکتروفورز اسیدهای نوکلئیک ۱۶۵
۳-٤-۱ الکتروفورز DNA ۱۶۵
۳-٤-۲ الکتروفورز RNA ۱۶۷
۳-۵ محاسبه غلظت اسیدهای نوکلئیک ۱۶۸
۳-۶ روش‌های تشخیص مولکولی ۱۶۹
۳-۶-۱ روش‌هایی بر پایه تکثیر ژن هدف ۱۶۹
۳-۶-۱-۱ واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) ۱۷۰

۳-۶-۱-۳ PCR آشیانه‌ای ۱۸۱
۳-۶-۱-٤ PCR چندگانه ۱۸۲
۳-۶-۱-۵ ریل –تایم PCR ۱۸۲
۳-۶-۱-۵-۱ ریل– تایم PCR با استفاده از نشانگر ۱۸۳
۳-۶-۱-۵-۱-۱ نشانگرهای هیدرولیزی ۱۸۳
۳-۶-۱-۶ روش‌های مبتنی بر نسخه‌برداری ژنی ۱۹۷
۳-۶-۱-۷ روش SDA یا تکثیر به‌واسطه جابه‌جایی در رشته ۱۹۹
۳-۶-۱-۸ تکثیر هم‌دما به واسطه لوپ (LAMP) ۲۰۱
۳-۶-۱-۹ تکثیر وابسته به هلیکار (HDA) ۲۰۵
۳-۶-۱-۱۰ تکثیر وابسته به پلیمراز– ریکامبیناز (RPA) ۲۰۷
۳-۶-۱-۱۱ PCR– ELISA ۲۰۸
۳-۶-۱-۱۲ PCR درجا ۲۰۹
۳-۶-۲ هیبریداسیون درجا ۲۰۹
۳-۶-۳ روش‌هایی بر پایه تکثیر سیگنال ۲۱۲
۳-۶-۳-۱ روش DNA شاخه‌ای (bDNA) ۲۱۲
۳-۶-۳-۲ تسخیر هیبرید ۲۱٤
۳-۶-٤ روش‌هایی بر پایه تکثیر نشانگر ۲۱۵
۳-۶-٤-۱ نشانگر مهاجم ۲۱٦
۳-۶-٤-۲ واکنش زنجیرهای لیگاز (LCR) ۲۱۷
۳-۶-٤-۳ نشانگر چرخه‌ای (CPT) ۲۱۹
۳-۶-٤-٤ تکثیر حلقه چرخان (RCA) ۲۲۰
۳-۶-٤-۵ تکثیر سیگنال وابسته به RNA (SMART) ۲۲۲
۳-۶-۵ میکروآری (ریزآرایه) ۲۲۲
۳-۶-۶ روش‌های تشخیصی «بر بالین» (POC) ۲۲۵
۳-۶-۶ روش‌های جریان جانبی (LFA) ۲۲۶
۳-۶-۶-۲ روش‌های تکثیر سریع اسید نوکلئیک ۲۲۷
۳-۷ توالی‌یابی و ژنوتایپینگ ویروس‌ها ۲۲۹

۳-۷-۱ تعیین توالی ۲۳۰
۳-۷-۲ RFLPج ۲۳۱
۳-۷-۳ AFLP ۲۳۱
۳-۷-۳-۱ کشف ویروس براساس AFLP (VIDISCA) ۲۳۳
۳-۷-٤ RFMP ۲۳۳
۳-۷-۵ استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنوتیپ ۲۳٤
۳-۷-٦ آرمز ۲۳۵
۳-۷-۷ هیبریداسیون معکوس ۲۳٦
۳-۷-۸ سنجش حرکت ناهمگون دو رشته DNA(HMA) ۲۳۷
۳-۷-۹ روش پلی مورفیسم وابسته به شکل فضایی تک رشته (SSCP) ۲۳۷
۳-۷-۱۰ ذوب با وضوح بالا (HRM) ۲۳۹
۳-۷-۱۱ نسل جدید تعیین توالی (NGS) ۲٤۰
۳-۷-۱۱-۱ پیروسکانسینگ ۲٤۱
۳-۷-۱۱-۲ پیروسکانسینگ عمیق ۲٤۳
منابع ۲٤٤
واژه‌نامه فارسی به انگلیسی ۲۵۱
واژه‌نامه انگلیسی به فارسی ۲۵۱
نمایه ۲٦۳

پیشگفتار

پیشرفت علم ویروس‌شناسی در دنیای امروز مستلزم شناسایی دقیق و سریع ویروس‌ها و بررسی آثار متقابل آنها در میزبان است. در قلمرو علوم پایه، استفاده از روش‌های تشخیص ویروس‌ها و بررسی آثار آنها در سلول و میزبان، به درک بهتر فرایندهای مربوط به بیماری‌زایی و طراحی روش‌های نوین درمان و پیشگیری کمک خواهند کرد. در حیطه تشخیص بالینی نیز شناسایی بیماری‌های ویروسی از جنبه‌های مختلف حائز اهمیت است. با تشخیص به‌موقع عفونت‌های ویروسی، علاوه‌بر امکان به‌کارگیری روش درمانی مناسب، برای ویروس‌هایی که داروهای ضدویروسی برای آنها وجود دارد، می‌توان از عوارض مختلف احتمالی عفونت در بیمار و پیشرفت بیماری، جلوگیری به‌عمل آورد. همچنین شناسایی عامل عفونت در بیمار می‌تواند در مواردی مانند انجام مطالعات اپیدمیولوژیک و اقدامات بهداشتی لازم برای جلوگیری از انتشار ویروس در محیط یا برنامه‌ریزی برای تهیه واکسن‌ها و برنامه‌های پیشگیری بیماری‌های ویروسی کمک کننده باشد.

تشخیص تعدادی از بیماری‌های ویروسی مثل سرخک براساس علائم بالینی تا حدودی امکان‌پذیر است، اما شناسایی بعضی از ویروس‌ها، به‌ویژه ویروس‌هایی که علائم بالینی مشابه ایجاد می‌کنند، از طریق علائم بالینی امکان‌پذیر نیست و باید با استفاده از روش‌های اختصاصی مناسب، به تشخیص آنها اقدام کرد.

روش‌های آزمایشگاهی مختلفی برای تشخیص عفونت‌های ویروسی وجود دارد. بعضی از این روش‌ها جنبه غربالگری دارد و برای شناسایی بیمار در بین جمعیتی خاص یا تشخیص اولیه بیماری، استفاده می‌شوند و برخی دیگر جنبه تأییدی دارد و اغلب پس از انجام روش‌های غربالگری و به‌منظور تأیید نهایی عامل عفونت، ضروری هستند.

انتخاب روش مناسب برای تشخیص نیز به عوامل مختلفی از جمله نوع بیماری ویروسی، بستگی دارد. برای مثال بعضی از ویروس‌ها مانند ویروس پاپیلومای انسانی که عامل زگیل‌های پوستی و مخاطی در انسان هستند، در کشت‌های سلولی تکثیر نمی‌شوند و استفاده از روش‌های مولکولی برای تشخیص آنها توصیه می‌شود.

از عوامل مهم دیگر در انتخاب نوع روش تشخیص، توجه به مراحل مختلف بیماری ویروسی است. برای مثال استفاده از روش‌های کشت، تشخیص آنتی‌ژن‌های ویروسی یا روش‌های مولکولی برای شناسایی ژنوم ویروس‌ها، در دوران حاد بیماری امکان‌پذیر است. بدیهی است درباره بسیاری از ویروس‌ها، تشخیص آنتی‌بادی‌های اختصاصی در دوره حاد بیماری، به‌علت عدم تولید آنتی‌بادی در حد قابل تشخیص، امکان‌پذیر نیست و برعکس، نمونه‌گیری از بیمار در دوره نقاهت بیماری زمان مناسبی برای استفاده از روش‌های تشخیصی مثل کشت، تشخیص آنتی‌ژن‌ها و روش‌های مولکولی نیست بلکه استفاده از روش‌های ایمونوسرولوژیک برای تشخیص آنتی‌بادهای اختصاصی می‌تواند کمک‌کننده باشد. از عوامل مؤثر دیگر در تشخیص، امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی و امکان دسترسی به آنها است.

به‌طورکلی روش‌های آزمایشگاهی برای تشخیص و شناسایی ویروس‌ها به سه گروه کلی تقسیم می‌شود که عبارتند از:

۱- روش‌های ردیابی ویروس که با جداسازی ویروس یا شناسایی آنتی‌ژن‌های ویروسی، عامل عفونت‌زا را به‌طور مستقیم شناسایی می‌کند.

۲- روش‌های ایمونوسرولوژیک که برای شناسایی آنتی‌بادی‌ها یا آنتی‌ژن‌های اختصاصی است و براساس واکنش آنتی‌بادی‌های تولیدشده در سرم با آنتی‌ژن‌های ویروسی انجام می‌گیرد.

۳- روش‌های مولکولی که به‌طور مستقیم به شناسایی ژنوم ویروس می‌پردازد.

هدف از نگارش این کتاب فراهم آوردن اطلاعات لازم برای محققان و کارشناسان آزمایشگاهی است که در زمینه تشخیص بیماری‌های ویروسی و تحقیقات پایه و بالینی مرتبط با ویروس‌ها فعالیت می‌کنند. بر این اساس سعی شده است در سه گروه روش‌های آزمایشگاهی فوق، به مهم‌ترین روش‌های پرکاربرد با جزئیات مربوط و توضیحات لازم

دربارهٔ اساس روش، کاربرد و همچنین چگونگی انجام روش‌ها و در بعضی از موارد لازم، تفسیر نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌ها به‌طور جداگانه، پرداخته شود. درباره آزمون‌هایی که تنها در موارد خاص کاربرد دارند و بسته به نوع نمونه ممکن است مقادیر اجزای آزمایش متغیر باشد، به ذکر اصول آزمایش بسنده شده است.