عنوان دوره آموزشی

هپاتیت و تشخیص مولکولی

بهار ۱۳۹۷

بسم الله الرحمن الرحيم

فهرست

مقدمه ۲
بیماری هپاتیت **B** ۳
محل اصلی تمرکز ویروس در بدن ۳
اپیدمیولوژی ۴
پاتولوژی ۶
علائم ۸
سیر بیماری ۸
عفونت حاد ۸
عفونت مزمن ۹
هپاتیت برق‌آسا ۱۱
تشخیص بیماری ۱۱
عوارض بیماری ۱۳
درمان ۱۴
۱- اینترفرون ۱۴
۲- لامیوودین ۱۴
۳- آدفوویر ۱۴
۴- انتکاویر ۱۵
دوز داروها و مدت درمان ۱۵
عوامل خطرساز ۱۷
۱- سن ۱۷
۲- زندگی دسته‌جمعی ۱۷
۳- کادر بهداشتی درمانی ۱۸
پیشگیری و کنترل ۱۸
واکسن ۱۹
نحوه نگهداری واکسن ۲۰
نحوه تزریق واکسن ۲۰
عوارض واکسن ۲۱
ایجاد پاسخ ایمنی به واکسن ۲۱

تزریق (**HBIG (heapatitis B immunoglobulin** ۲۲
طبقه‌بندی و ساختمان و اشکال ویروس ۲۲
اجزاء تشکیل‌دهنده ویروس ۲۶
۱- **HBsAg** ۲۶
۲- **HBcAg** ۲۸
۳- **HBeAg** ۲۸
تکثیر ویروس ۲۹
چرخه همانندسازی ۳۰
نحوه اتصال ویروس به سلول‌ها ۳۱
محل اصلی ویروس در بدن ۳۲
سروتایپ و ژنوتایپ ویروس ۳۲
ژنوتایپ‌ها در ایران ۳۲
راه‌های انتقال ۳۳
پاتوژنز و ایمنی ۳۳
علائم بالینی ۳۵
افتراق بیماری از سایر عفونت‌ها ۳۵
ویژگی‌های انحصاری هپادناویروس‌ها ۳۶
مقاومت ویروس ۳۶
تفسیر تست‌های آزمایشگاهی هپاتیت **B** ۳۶
مروری بر تاریخچه هپاتیت ۳۸
روش‌های تشخیص بیماری هپاتیت **B** ۴۱
۱) تست الیزا برای جستجوی آنتی‌ژن ۴۲
فسفرسانس، فلوئورسانس، لومینسانس ۴۵
استفاده تجربی از فلوئورسانس و فسفرسانس (Phosphorescence & Fluorescence) ۴۸
نظریه فلوئورسانس ۴۹
اندازه‌گیری فلوئورسانس ۵۰
طیف فلوئورسانس سنج‌ها ۵۰
اجزا سازنده فلوئورسانس سنج‌ها و طیف فلوئورسانس سنج‌ها ۵۱
صافی‌ها و تک‌فام سازها ۵۱

آشکارسازها ۵۱
سلول‌ها و محفظه‌های سلول‌ها ۵۱
لومینانس ۵۲
کمی لومینسانس **(Chemi Luminescence)** ۵۴
۱) اندازه‌گیری غلظت به روش آنالوگ ۵۵
۲) اندازه‌گیری غلظت بر روش شمارش فوتون **(Photon Counting)** ۵۵
برتری‌های دستگاه کمی لومینسانس به الایزا ریدر ۵۶
استخراج **DNA** ۵۶
انواع روش استخراج **DNA** ۵۶
روش معمول ۵۷
استخراج فنل – کلروفرم ۵۸
استفاده از ستون تخلیص **DNA** ۵۸
موارد خاص ۵۹
بررسی **DNA** ۵۹
PCR ۶۰
واکنش زنجیرهٔ پلیمراز ۶۰
تئوری و مبانی ژل الکتروفورز ۶۴
انواع ژل ۶۷
ژلهای آگارز ۶۸
ژلهای پلی اکریل آمید (**PAGE**) ۶۸
نشاسته ۶۹
دناتوره نمودن ۶۹
ژل **Native** ۷۰
بافرها ۷۰
مشاهده باندهای جدا شده در سیستم الکتروفورز ۷۱
انواع **PCR** ۷۱
Asymmetric PCR (PCR نامتقارن) ۷۱
Amplification Refractory Mutation System (ARMS PCR) ۷۲
Hot-Start PCR ۷۲

RT-PCR ۷۳
Randomly amplification polymorfic DNA(RAPD-PCR) ۷۴
Nested PCR (PCR داخلی یا لانه‌ای) ۷۵
PCR Inverse(PCR معکوس) ۷۶
Multiplex PCR (PCR چندتایی) ۷۷
انواع Multiplex PCR ۷۷
Real time PCR ۷۸
روش‌های سنجش با Real time PCR ۷۸
ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-PCR) ۷۹
Allele-specific PCR ۷۹
Assembly PCR ۷۹
Asymmetric PCR ۸۰
Helicase-dependentamplification ۸۰
Hot-start PCR ۸۰
PCR specific-Intersequence ۸۰
Inverse PCR ۸۰
PCR Ligation-mediated ۸۰
PCR Methylation-specific ۸۰
Multiplex PCR ۸۱
Nested PCR ۸۱
Quantitative PCR ۸۱
RT-PCR ۸۱
TAIL-PCR ۸۱
Touchdown PCR ۸۲
PAN-AC ۸۲
منابع ۸۳

گروه‌های هدف:

تکنسین کاردان و کارشناس آزمایشگاه تشخیص طبی

اهداف آموزشی

هدف کلی: افزایش دانش و آگاهی پرسنل درخصوص بیماری هپاتیت و تشخیص مولکولی

روش و نحوه اجرای آموزشی

با توجه این‌که هدف این مجموعه آموزش افزایش دانش و آگاهی در مورد بیماری هپاتیت و تشخیص مولکولی می‌باشد. می‌تواند جهت ارائه مطالب به روش‌های عملی ارائه شود و یا جهت پوشش تعداد بیشتری از آموزش گیرندگان بصورت غیرحضوری و در قالب کتاب‌خوانی انجام گیرد.

مدت دوره آموزشی: ۱۸ ساعت

ارزشیابی

در پایان دوره به منظور ارزیابی میزان حصول موفقیت و دستیابی به اهداف آموزشی و بررسی آگاهی، نگرش و عملکرد آموزش گیرندگان و بهبود مستمر فرایند یک ارزشیابی از شرکت کنندگان به صورت تست‌های چهارگزینه‌ای به عمل خواهد آمد.

مقدمه

بیماری هپاتیت B یکی از مشکلات عمده سلامت در دنیا و کشور ایران بوده و این عفونت یکی از شدیدترین عفونت‌های ویروسی کبدی در جهان می‌باشد. این ویروس از علل اصلی بروز سیروز و سرطان کبد بوده و به‌عنوان دهمین عامل مرگ و میر در جهان اعلام شده است. تخمین زده می‌شود که بیش از ۲ بیلیون انسان در دنیا سابقه برخورد با این ویروس را داشته و تقریبا ۳۵۰ میلیون نفر از این بیماران (۵٪) دچار هپاتیت باشند. سالانه نزدیک به یک میلیون نفر از این بیماران دچار سیروز، هپاتیت مزمن و سرطان کبد شده و ۱٪ از این افراد مبتلا به عفونت جان خود را از دست می‌دهند. تقریباً ۱۵-۵٪ از بزرگ‌سالان و حدود ۹۵-۸۵٪ از نوزادان در صورت برخورد با ویروس دچار عفونت مزمن می‌شوند. در کشور ایران حدود ۲ میلیون نفر سابقه آلودگی به این ویروس را داشته و حدود ۱/۷٪ از جمعیت کشور ایران ناقل مزمن این بیماری می‌باشند. راه اصلی انتقال ویروس از طریق تزریق خون و فرآورده‌های خونی بوده و در اثر تماس با ترشحات آلوده مانند مایع منی، ترشحات واژن، بزاق نیز ویروس منتقل می‌گردد. شروع بیماری معمولاً آرام و تدریجی بوده و در ۸۵-۶۵٪ موارد عفونت در بزرگ‌سالان پنهانی می‌باشد. تقریباً ۹۵-۹۰٪ از این بیماران به‌طور خودبه‌خودی بهبود یافته و افرادی که توانایی پاک‌سازی ویروس را به هر علتی ندارد، به‌فرم مزمن عفونت مبتلا می‌شوند. این افراد به‌عنوان ناقل بیماری دارای علائم بالینی مشخص نبوده و به‌تدریج مبتلا به سیروز و سرطان کبد می‌گردند.

بررسی سطح آنزیم‌های کبدی، و تعیین HBsAg و HBeAg در تشخیص اولیه بیماری مهم می‌باشد. با به‌کارگیری روش اندازه‌گیری HBV DNA می‌توان ۲ تا ۳ هفته قبل از ظهور HBsAg در گردش خون ویروس را تشخیص داد. به‌دلیل حساسیت و اختصاصیت بسیار بالای روش PCR، بهداشت جهانی به‌کارگیری روش‌های مولکولی را جهت تشخیص عفونت‌های مزمن و پی‌گیری درمان توصیه می‌کند

بیماری هپاتیت B

اصطلاح هپاتیت به هر گونه التهاب و تورم سلول‌های کبدی گفته می‌شود. هپاتیت ویروسی به بیماری‌هایی اطلاق می‌گردد که ویروس‌های مولد آن‌ها گرایش tropismشدیدی به سلول‌های کبدی داشته و باعث آماس کبد و اختلال در اعمال آنزیماتیک آن می‌شوند.

هپاتیت ویروسی یک بیماری سیستمیک است، که عمدتاً کبد را درگیر کرده و باعث التهاب کبد، تب، تهوع، استفراغ و در نهایت یرقان می‌شود. این بیماری توسط ویروس‌های هپاتیت A، B، C، D و E ایجاد می‌شود.

بیماری هپاتیت B یکی از مشکلات عمده سلامت در دنیا و کشور ایران بوده و عامل یکی از شدیدترین عفونت‌های ویروسی کبدی در جهان می‌باشد. این ویروس عامل اصلی سرطان کبد بوده و به عنوان دهمین عامل مرگ و میر در جهان اعلام شده است. در حال حاضر این بیماری به‌عنوان معضل بهداشتی در جهان تلقی می‌شود. این ویروس از طریق انتقال خون و فرآورده‌های خونی و تماس مخاط با ترشحات فرد آلوده همانند بزاق، مایع منی، ترشحات واژن و غیره وارد بدن می‌شود . ویروس در عرض ۳ روز پس از ورود به بدن خود را به سلول‌های کبد می‌رساند. اتصال ویروس به هپاتوسیت‌ها از طریق گلیکوپروتئین‌های HBsAg صورت می‌گیرد، که پروتئین pre-S در این امر نقش مهمی دارد. گیرنده‌های مختلف سلول‌های کبدی از جمله گیرنده ترانسفرین، گیرنده آسیالو-گلیکوپروتئین و اندونکسین کبد انسان در اتصال ویروس به هپاتوسیت‌ها نقش دارند.

در اردک کربوکسی پپتیداز D به عنوان رسپتور برای ورود ویروس به سلول‌ها تایید شده است.

محل اصلی تمرکز ویروس در بدن

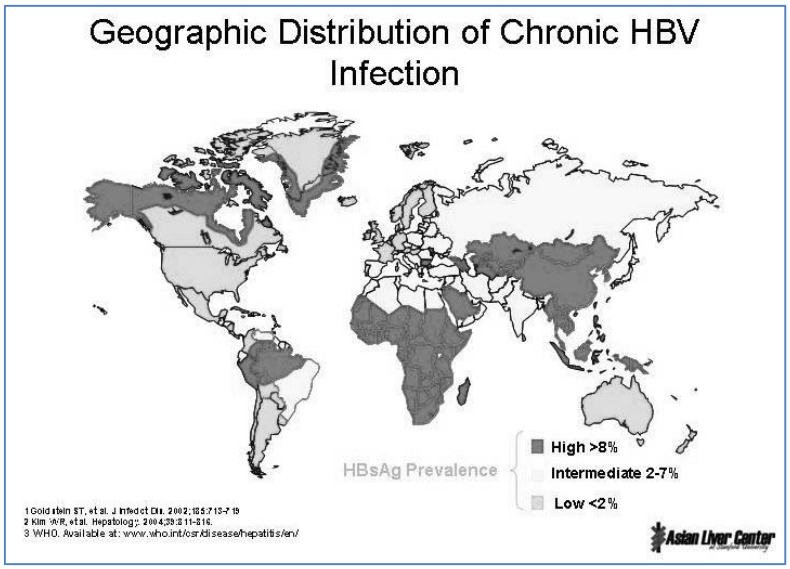
در انسان محل اصلی درگیری، کبد بوده ولی ویروس در سلول‌های خونی، مغز استخوان، کلیه و پانکراس، بافت و غدد لنفاوی، به خصوص سلول‌های مونونوکلئر و لنفوسیت‌های خون محیطی بیمارانی که HBsAg مثبت یا منفی هستند، یافت می‌شود. ویروس پس از ورود به بدن در سلول‌های کبدی شروع به تکثیر نموده، ولی علائم بیماری

معمولاً قبل از ۴۵ روز مشاهده نمی‌گردد. البته مقدار دوز عفونی وارده به بدن، راه ورود عفونت و ایمنی فرد نیز در ابتلا به بیماری مهم می‌باشد.

تحریک ایمنی سلولی و ایجاد التهاب موجب بروز علائم بیماری شده و در پاک‌سازی عفونت با حذف سلول‌های کبدی آلوده عمل می‌کنند. با ترشح اینترفرون و ایجاد پاسخ ایمنی بیان، آنتی‌ژن MHC آغاز می‌شود. در حالت کلی پاسخ ناکافی سلول‌های T در برابر عفونت موجب ایجاد علائم خفیف بیماری و ناتوانی در حذف عفونت و در نتیجه سیر بیماری به سمت هپاتیت مزمن می‌گردد. به دلیل وجود مقادیر زیادی از HBsAg در سرم که به آنتی‌بادی خنثی کننده متصل شده و عمل آنتی‌بادی خنثی کننده را متوقف می‌سازد. به این علت، توانایی آنتی‌بادی در حذف عفونت محدود می‌گردد.

اپیدمیولوژی

بیش از ۲ میلیارد نفر از جمعیت جهان در معرض آلودگی به این ویروس قرار گرفته و هم‌اکنون در جهان بیش از ۳۵۰ میلیون نفر ناقل این ویروس می‌باشند، که بیشتر این افراد در آسیای جنوب شرقی زندگی می‌کنند. فراوانی آلودگی به ویروس هپاتیت B در جهان در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت بوده و در تقسیم‌بندی سازمان بهداشت جهانی شامل مناطق با آلودگی کمتر از ۲٪ در کشورهای توسعه یافته مانند آمریکا، اروپای غربی، استرالیا، آلودگی متوسط ۸-۲٪ در کشورهایی مانند ایران، مصر، ترکیه و ژاپن و آلودگی بیشتر از ۸٪ در چین و کشورهای جنوب شرقی آسیا و کشورهای آفریقایی می‌باشد.



شکل ۱- شیوع آلودگی در جهان

این ویروس بیشتر از طریق ورود به زیر جلد یا تماس با سطوح مخاطی انتقال می‌یابد. در کشورهایی که آلودگی در آن‌ها زیاد است، انتقال معمولا به صورت انتقال عمودی vertical یعنی از مادر به نوزاد در هنگام تولد، شیرخوارگی و دوران کودکی در اثر تماس نزدیک با مادر صورت می‌گیرد. انتقال به صورت افقی horizontal از طریق تماس نزدیک در بین افراد خانواده و تماس جنسی صورت می‌گیرد.

در نواحی از جهان که بیماری به صورت آندمیک دیده می‌شود، ویروس در دوران کودکی یا نوزادی کسب شده و مهم‌ترین راه انتقال در این مناطق انتقال بیماری از مادر به نوزاد می‌باشد. میزان انتقال هپاتیت B از مادر به جنین در صورت مثبت بودن HBsAg مادر، بیش از ۹۰٪ است. در مناطق با شیوع متوسط انتقال عفونت از راه افقی و بیشتر از راه خراش‌های پوستی و مخاطی همانند تاتو کردن، سوراخ کردن گوش و تماس‌های بدنی نزدیک رخ داده و این حالت بیشتر در جوانان دیده می‌شود. به دلیل زنده ماندن طولانی مدت ویروس در خارج از بدن احتمال انتقال آلودگی از طریق تماس با وسایلی مانند مسواک، تیغ صورت تراش و حتی اسباب بازی‌های آلوده به خون و ترشحات بدن اتفاق می‌افتد. در مناطق با شیوع کم عفونت بیشتر در ارتباط با رفتارهای پر خطر جنسی مشکوک حفاظت نشده و اعتیاد تزریقی صورت می‌گیرد.

مخزن اصلی ویروس هپاتیت B ناقلین آنتی‌ژن HBsAg بوده و ناقلین این ویروس منبع اصلی آلودگی می‌باشند. این افراد به خصوص در میان اهداءکنندگان خون مشکل‌آفرین هستند. از سال ۱۹۷۲، سازمان غذا و دارو FDA انجام آزمایش HBsAg را بر روی تمام خون‌های اهدایی اجباری کرده است.

بیشترین موارد ناقلین را مبتلایان به بیماری جذام، لوسمی، بیماری هوچکین، معتادان به مواد مخدر داخل وریدی، مردان هم‌جنس باز و کادر پزشکی تشکیل می‌دهد (۱۳۶).

آنتی‌ژن تقریبا در تمامی ترشحات بدن مبتلایان به بیماری از قبیل بزاق، اشک، مایع منی، آسیت، شیر، مایع مفصلی، ترشحات معده، مایع جنب، ادرار و مدفوع وجود دارد. به دلیل نبودن شیوع فصلی خاص، بیماری در تمام طول سال دیده می‌شود.

هر چه سن ابتلا کمتر باشد احتمال پیشرفت بیماری به سمت مزمن شدن بیشتر بوده و احتمال بروز نارسایی کبد، سیروز و سرطان کبدی افزایش می‌یابد. در کودکان مبتلا به عفونت ۵-۱ ساله حدود ۳۰٪ و در نوزادان مبتلا به عفونت حتی تا ۹۰٪ خطر پیشرفت به سمت مزمن شدن بیماری وجود دارد. اگر مثبت بودن HBsAg بیش از ۶ ماه طول بکشد حالت مزمن بیماری ایجاد می‌گردد. سیر بیماری به عواملی همانند سن، جنس، پاسخ ایمنی فرد، وضعیت HLA و میزان ویروس وارد شده به بدن، بستگی دارد.

طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی این ویروس ۱۰۰-۵۰ برابر مسری‌تر از ویروس HIV می‌باشد.

این خانواده دارای تیپ‌های مختلفی است که انسان و برخی از حیوانات همانند شامپانزه، موش خرما، سنجاب و اردک را آلوده می‌کند.

پاتولوژی

ویروس ۳ روز پس از ورود به بدن در سلول‌های کبدی شروع به تکثیر نموده، ولی علائم بیماری معمولاً حدود ۴۵ روز بعد از آلودگی ظاهر می‌گردد. البته مقدار دوز عفونی وارده به بدن، راه ورود عفونت و ایمنی فرد در ابتلا به بیماری مهم است. ویروس در سلول‌های کبدی با ایجاد حداقل اثر سایتوپاتیک برای مدت طولانی بدون آسیب به کبد تکثیر می‌یابد. در این مدت آنزیم‌های کبدی مقداری افزایش نشان می‌دهد. در طی این مدت کپی‌هایی

از ژنوم ویروس به درون کروماتین سلول‌های کبدی وارد شده و بطور مخفی باقی می‌ماند. اشکال رشته‌ای یا فیلامنتی HBsAg در درون سلول ساخته شده و اثرات ساتیوپاتولوژی به صورت شیشه شفاف ground glass در سلول‌های کبدی آلوده بروز می‌کند. تحریک ایمنی سلولی و التهاب ایجاد شده به‌تدریج با حذف سلول‌های کبدی آلوده، شروع به پاک‌سازی عفونت می‌کند. با فعال شدن سیستم ایمنی و ترشح اینترفرون بیان آنتی‌ژن MHC نیز افزایش می‌شود.

پپتیدهای آنتی‌ژن‌های HBs، HBc، HBe در برابر فعالیت سلول‌های سایتوتوکسیک کشنده T آشکار می‌شوند. اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن HBc، آنتی‌ژن‌های برجسته برای سلول‌های T می‌باشند. آنتی‌بادی‌های تولید شده هم‌چنین آنتی‌بادی که بوسیله واکسیناسیون تولید می‌شود، می‌تواند فرد را در برابر عفونت محافظت نماید. کمپلکس‌های ایمنی بین HBsAg و anti- HBs تشکیل شده و در بروز واکنش‌های حساسیت شدید تیپ III دخالت می‌کند. در این حالت مشکلاتی همانند التهاب عروق، درد مفصل‌ها، راش، کهیر و آسیب کلیه می‌گردد. در کودکان پاسخ ایمنی سلولی ناکامل بوده و کمتر قادر به حذف عفونت می‌باشند. حدود ۹۰٪ اطفال که قبل از تولد آلوده شده‌اند، تکثیر ویروس در این افراد به مدت طولانی‌تری ادامه یافته و در این افراد فرم مزمن بیماری بیشتر ایجاد می‌گردد. در طی عفونت حاد، آسیب‌های تخریبی در پارانشیم کبد مانند تورم سلولی و نکروز به‌ویژه در سلول‌های اطراف سیاهرگ لوبول کبدی می‌گردد. تجمع سلول‌های التهابی به طور عمده از نوع لنفوسیت‌ها می‌باشد. بهبودی از عفونت موجب تولید مجدد بافت پارانشیم کبد می‌گردد.

عفونت فولمینانت، عفونت‌های مزمن فعال شده یا عفونت مشترک با عامل دلتا HDV می‌تواند به آسیب دائمی و غیرقابل برگشت کبد و سیروز منجر گردد.

هپاتیت B ممکن است سرطان اولیه سلول کبدی را با افزایش ترمیم ممتد بافت کبد و رشد سلولی در پاسخ به آسیب بافت یا با اتصال به کروموزوم میزبان و تحریک مستقیم رشد سلولی را القاء نماید. این اتصال می‌تواند ترتیب مجدد ژنتیکی rearengment را تحریک نموده یا پروموتورهای ویروسی را مجاور ژن‌های کنترل کننده رشد سلولی قرار دهد. هم‌چنین وجود نوعی پروتئین که بوسیله ژن HBVx کد می‌شود، را در ایجاد سرطان کبد

دخیل می‌دانند (۱۰۰). این ژن احتمالاً رونویسی پروتئین‌های سلولی را فعال نموده و رشد سلولی را تحریک می‌کند. وجود ژن x احتمالاً با ایجاد جهش خاصیت سرطان‌زایی را در بافت کبد افزایش می‌دهد. دوره مخفی بودن بین عفونت هپاتیت B و سرطان اولیه کبد PHC حدود ۹ سال و حتی به مدت طولانی، در مواردی حتی تا ۳۵ سال نیز گزارش شده است .

علائم

علائم بیماری مشابه با سایر هپاتیت‌های ویروسی است. بیماری بیشتر اوقات علائمی مانند سرماخوردگی و گاهاً علائمی شبیه بیماری انفولانزا دارد. علائم بیماری بیشتر به‌صورت بی‌اشتهایی، بی‌قراری، تهوع و استفراغ، درد بدن، درد در مفصل‌ها، تب، ادرار پر رنگ و تیره، یرقان، خارش پوست دیده شده، گاهی خستگی و درد شکم نیز مشاهده می‌گردد.

سیر بیماری

آلودگی به این ویروس می‌تواند به دو صورت حاد و مزمن تظاهر نماید. عفونت حاد acute infection به مرور زمان به حذف ویروس و بروز ایمنی می‌انجامد. در حالی‌که در عفونت مزمن تکثیر و فعالیت ویروس به مدت طولانی ادامه داشته و حتی ممکن است آلودگی در تمام طول عمر در بدن باقی بماند. عفونت‌های مزمن معمولاً منجر به ایجاد عوارضی مانند سیروز کبد و سرطان سلول‌های کبدی می‌شوند. در ایران هپاتیت B به‌عنوان یکی از عوامل اصلی بیماری‌های کبدی در نظر گرفته شده و تحقیقات نشان‌گر آن است که در ۶۸٪ از بیماران مبتلا به بیماری‌های مزمن کبدی یکی از نشانه‌های سرولوژیکی ابتلا به هپاتیت B دیده می‌شود. در حالیکه این شاخص‌های سرولوژیکی در ۸۲/۵٪ از بیماران مبتلا به سرطان کبد مشاهده می‌گردد.

عفونت حاد

اولین شاخص قابل ردیابی در عفونت حاد HBsAg است که مقدار آن در آغاز افزایش یافته و به مرور زمان کاهش می‌یابد. مدت زمان حضور HBsAg در گردش خون معمولاً ۱۲-۲ هفته است. سپس HBeAg در خون ظاهر شده و معمولاً قبل از کاهش HBsAg منفی می‌شود.

anti-HBc تقریباً زمانی ظاهر می‌شود که مقدار HBsAg در اوج است. ابتدا نوع IgM ظاهر شده و آنتی‌بادی anti - HBc - IgM - مهم‌ترین شاخص عفونت حاد می‌باشد. در طول ۱۶-۲ هفته این آنتی‌بادی کاهش یافته، در حالی‌که آنتی‌بادی از نوع IgG برای مدت‌های طولانی و غالباً در تمام طول عمر در خون باقی می‌ماند. هنگامی که HBeAg منفی می‌شود، anti - HBe ظاهر شده و حتی به مدت‌های طولانی و گاها برای تمام طول عمر باقی می‌ماند. در نهایت به فاصله کوتاهی پس از منفی شدن HBsAg، anti - HBs که در واقع تنها آنتی‌بادی خنثی کننده در گردش خون بوده و نشان دهنده ایمنی کامل می‌باشد. افرادی که از نظر anti - HBc مثبت بوده و از نظر سایر شاخص‌های هپاتیت B منفی هستند، در صورت اهداء خون احتمالاً ویروس را به فرد گیرنده خون انتقال می‌دهند. عفونت‌های حاد معمولاً خود محدود شونده self limiting بوده ولی عفونت‌های مزمن پایداری بیشتری دارند. در عفونت حاد پاک شدن ویروس در عرض چند هفته تا چند ماه دیده می‌شود. مبتلایان به هپاتیت ویروسی حاد با علائم بالینی، نسبت به افرادی که بدون علامت هستند کمتر دچار حالت ناقلی مزمن می‌شوند. هپاتیت حاد به صورت سیستمیک بوده و علائمی همانند بی‌اشتهایی، تهوع و استفراغ، سردرد، درد عضلات و تب مشاهده می‌شود. تب معمولاً خفیف بوده و با بروز زردی، تیره شدن رنگ ادرار و کم‌رنگ یا بی‌رنگ شدن مدفوع هم‌راه است. به علت بزرگی کبد درد در ناحیه فوقانی راست شکم ایجاد شده که در برخی بیماران بزرگی غدد لنفاوی و بزرگی طحال نیز دیده می‌شود.

عفونت مزمن

سیر معمول عفونت مزمن chronic hepatitis براساس رابطه بین تکثیر ویروس و پاسخ ایمنی میزبان تعیین می‌گردد. اثرات نهایی عفونت مزمن بستگی به شدت بیماری کبدی در زمان تکثیر ویروس دارد. در حالت کلی عفونت مزمن شامل دو مرحله می‌باشد.

ابتدا ویروس پس از ورود به بدن در کبد تکثیر شده و بیماری فعال کبدی دیده می‌شود. در مرحله انتهایی که تکثیر ویروس متوقف شده و بیماری کبدی وارد فاز پس‌رفت می‌گردد.

اگر در دوره نوزادی عفونت کسب شود یک مرحله تکثیر ویروسی وجود دارد، که اصطلاحاً این مرحله را فاز تحمل ایمنی immune toleranc گویند. در حالت تکثیر تعداد ویروس زیاد بوده ولی شواهدی از بیماری فعال کبدی، مانند افزایش آنزیم‌های کبدی یا علائم بالینی بیماری دیده نمی‌شود. این حالت می‌تواند از ۱۰ تا ۳۰ سال نیز ادامه یابد. نکته حائز اهمیت در این مرحله میزان بسیار کم پاک شدن HBeAg است. گذر از فاز تحمل ایمنی به فاز پاک‌سازی ایمنی immune clearance احتمال پاک‌سازی خودبه‌خودی HBeAg افزایش می‌یابد، که بیماری با بروز علائم شدید و هپاتیت حاد ظاهر گردد. علت بروز علائم، تهاجم سیستم ایمنی به سلول‌های کبدی آلوده می‌باشد.

حدود ۱۰-۵٪ از مبتلایان به هپاتیت B به حالت مزمن مبتلا شده که این افراد ناقل مزمن آنتی‌ژن HBsAg می‌باشند. این افراد علائم بالینی آشکاری مبنی بر گرفتاری کبد را نداشته و فقط میزان آنزیم‌های کبدی افزایش نشان می‌دهد. حدود $\frac{۱}{۳}$ از بیماران به شکل مزمن فعال بیماری مبتلا شده که در آنها سیروز و نارسایی کبد مشاهده می‌شود. این بیماران اگر با HDV نیز آلوده گردند، با خطر بروز بیماری به فرم برق‌آسا روبه‌رو هستند. در $\frac{۲}{۳}$ باقی‌مانده از این بیماران هپاتیت مزمن غیرفعال دیده می‌شود که مشکل خاصی نداشته و فقط آنزیم‌های کبدی مقداری افزایش می‌یابد. افراد مبتلا به هپاتیت مزمن اصلی‌ترین منبع پخش و انتشار ویروس می‌باشند. در هپاتیت مزمن فعال chronic active hepatitis آماس و نکروز سلول‌های کبدی حتی کولاپس شبکه رتیکولار بافت کبد دیده می‌شود. در این شرایط بیمار پیش‌آگهی خوبی نداشته و سیروز کبد و ندول‌های بزرگ کبدی ایجاد می‌شود. در عفونت مزمن پس از ظهور HBsAg و HBeAg، این شاخص‌ها در گردش خون باقی مانده و پس از مدتی فقط anti – HBc قابل ردیابی است. تا زمانی‌که HBeAg در خون وجود دارد، فرد آلوده دوران هپاتیت مزمن فعال را می‌گذراند. سپس anti – HBeظاهر می‌گردد. بیشتر مبتلایان به هپاتیت مزمن بدون علامت بوده و در صورت پیش‌رفت بیماری به علت بروز سیروز علائمی همانند زردی، بزرگی طحال، آسیت، ادم محیطی دیده می‌شود. تست‌های کبدی یا آنزیم‌های کبدی مانند AST و ALT به‌طور خفیف تا متوسط افزایش نشان می‌دهد. با پیش‌رفت بیماری سیروز دیده شده که کاهش آلبومین سرم و افزایش زمان PT و کاهش تعداد

گلبول‌های سفید و قرمز، حتی پلاکت به دلیل هیپراسپلنیسم مشاهده می‌گردد، که سطح AST بیشتر از ALT می‌گردد.

هپاتیت برق‌آسا

مرگ در فاز حاد هپاتیت B معمولاً به علت هپاتیت برق‌آسا fulminate hepatitis می‌باشد. علائم اولیه به صورت زردی، خواب آلودگی و علائم تیرگی شعور و آنسفالوپاتی می‌باشد. طولانی شدن زمان انعقاد یک نشانه بسیار مهم هپاتیت می‌باشد، که به علت نقص در سنتز فاکتورهای انعقادی در اثر نارسایی کبد می‌باشد. گاها حالت هیپوگلیسمی هم مشاهده می‌گردد. احتمال بروز نارسایی کلیه به همراه کاهش حجم ادرار و افزایش کراتینین وجود دارد. هپاتیت برق‌آسا در ۲-۱٪ از مبتلایان به بیماری دیده شده که موجب آسیب شدید و وسیع بافت کبد شده که فرصت ترمیم و بازسازی سلول‌های کبد وجود ندارد. در این شرایط نکروز وسیع سلول‌های کبدی مشاهده می‌گردد. که در ۶۰ حتی تا حدود ۹۰٪ از موارد کشنده را شامل می‌شود. علائم بالینی شدیدتر و نشانه‌هایی از آسیب شدید کبد مانند، آب آوردن شکم ascites دیده می‌شود. گاهاً واکنش حساسیت شدید به علت ایجاد کمپلکس‌های ناشی از HBsAg و آنتی‌بادی‌های تولید شده، مشاهده می‌شود. در این شرایط راش، التهاب مفصل‌ها، تب، التهاب عروق نکروز دهنده و گلومرولونفریت ایجاد می‌شود.

تشخیص بیماری

روش‌های متعدد سرولوژیکی جهت تشخیص شاخص‌های ویروس هپاتیت B در دسترس است که از میان آن‌ها، روش‌های رادیو ایمونواسی RIA، آنزیم ایمونواسی EIA، روش‌هایی حساس با بیشترین کاربرد در آزمایشگاه‌ها جهت تشخیص به‌کار می‌روند.

این روش‌ها قابلیت تشخیص ۰/۷-۰/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر، HBsAg را دارند. امروزه روش‌های تشخیصی جدید با استفاده از فن‌آوری‌های مولکولی جهت تشخیص HBV DNA در دسترس بوده که حساسیت تشخیص به‌مراتب بالاتری دارند. در این روش حتی قادر به تشخیص ۱۰copy/ml-۱ در نمونه می‌باشد. با به‌کارگیری این روش‌ها قادر به تشخیص آلودگی هپاتیت B را ۲ تا ۳ هفته قبل از ظهور HBsAg در گردش خون را امکان پذیر می‌سازد.

پیش‌رفت در علم بیولوژی ملکولی، مطالعه ویروس هپاتیت B با وجود میزبان محدود ویروس و فقدان کشت سلولی برای رشد ویروس را مقدور می‌سازد. تشخیص اولیه هپاتیت براساس علائم کلنیکی و افزایش در آنزیم‌های کبدی در خون انجام می‌گیرد، در عفونت‌های حاد و مزمن HBsAg و HBeAg در سرم وجود داشته و الگوی آنتی‌بادی‌ها در برابر آنتی‌ژن‌های ویروس در تشخیص نقش دارند.

HBsAg و HBeAg در هنگام تکثیر ویروس به خون ترشح می‌شوند. تشخیص HBeAg بهترین شاخص برای وجود ویروس عفونی است. در عفونت مزمن HBsAg و HBeAg و یا هر دو آن‌ها بدون این‌که آنتی‌بادی علیه آنها ظاهر شود، مشاهده می‌گردد. در طول دوره بدون علائم بالینی، تشخیص آنتی‌بادی ضد HBsAg و HBeAg آسان نمی‌باشد. بهترین راه تشخیص عفونت حاد، خصوصاً اگر HBsAg و anti - HBs قابل تشخیص نباشد، در مرحله پنجره window اندازه‌گیری anti - HBc – IgM مفید است.

روش PCR یک روش بسیار حساس برای سنجش و اندازه‌گیری میزان DNA ویروس می‌باشد. این روش یک روش مناسب برای پی بردن به فعال یا غیرفعال بودن ویروس می‌باشد. در دوره کمون تعداد ویروس بسیار کم بوده ولی در دوره حاد بیماری حتی به چندین میلیون ذره در هر میلی‌لیتر خون نیز می‌رسد.

از روش‌های هیبریداسیون نیز برای تشخیص استفاده می‌گردد، که حساسیت آن کمتر از روش PCR است. در این روش آمپلی‌فیکاسیون صورت نگرفته و فقط در حالتی که ذرات ویروس در خون بسیار زیاد باشد، قابل شناسایی می‌باشد.

حساسیت و اختصاصیت روش PCR بسیار بالا بوده و بهداشت جهانی به‌کارگیری این روش را برای پی‌گیری درمان، نه برای تشخیص اولیه بیماری توصیه می‌کند.

از روش‌های تشخیص ایمونولوژیکی، روش الایزا و روش لومینسانس بوده که به‌طور معمول در آزمایشگاه‌ها جهت تشخیص HBsAg، HBeAg، HBsAb، HBcAb و HBeAb استفاده می‌گردد.

از روش ایمونوفلورسانس نیز در برخی موارد استفاده می‌گردد. هم‌چنین از تست‌های نواری نیز استفاده شده که جهت تایید موارد مثبت باید از روش‌های تشخیص تاییدی، مانند روش الایزا استفاده گردد.

عوارض بیماری

آلودگی به این ویروس می‌تواند به دو صورت حاد و مزمن تظاهر نماید. عفونت حاد به مرور زمان به حذف ویروس و بروز ایمنی می‌انجامد. در حالی‌که در عفونت مزمن تکثیر و فعالیت ویروس به مدت طولانی ادامه داشته و حتی ممکن است برای تمام طول عمر در بدن باقی بماند. عفونت‌های حاد معمولاً بطور خودبه‌خودی بهبود یافته و در موارد کمی نیاز به درمان دارویی دیده می‌شود. در عفونت‌های مزمن بهبود خودبه‌خودی کمتر بوده و به‌تدریج پاسخ ایمنی ظاهر می‌شود. در موارد عفونت مزمن دوباره فعال شده به صورت عفونت حاد تظاهر می‌کند، عفونت‌های مزمن معمولاً منجر به ایجاد عوارضی مانند سیروز کبد و کارسینوم سلول‌های کبدی شده، ولی باید به خاطر داشت که اکثر افراد مبتلا بهبود یافته و در مقابل ویروس ایمن می‌شوند.

طبق آمار سازمان بهداشت جهانی حدود ۸۰٪ از موارد سرطان اولیه سلول‌های کبدی را می‌توان به عفونت‌های مزمن هپاتیت B نسبت داد. ژنوم ویروس به ژنوم سلول‌های کبدی الحاق شده و این سلول‌ها، آنتی‌ژن‌های ویروس را بیان می‌کنند. این بیماری یکی از ۳ عامل اصلی مرگ ناشی از سرطان‌ها در جهان می‌باشد. به‌عنوان مثال در کشور تایوان حداقل ۱۵٪ از افراد ناقل ویروس هپاتیت B بوده و حدود نیمی از آنها در اثر ابتلا به سیروزو سرطان کبد جان خود را از دست می‌دهند. سرطان کبد با عامل این ویروس شاید اولین سرطان انسانی است که با واکسن قابل پیش‌گیری است.

ویروس با افزایش روند ترمیم سلول‌های کبد، رشد این سلول‌ها در پاسخ به آسیب یا الحاق ویروس به کروموزوم میزبان و با تحریک مستقیم رشد سلولی، منجر به ایجاد سرطان اولیه کبد می‌گردد. مخفی شدن DNA ویروس در ژنوم سلول‌های مونونوکلئر محیطی یکی از دلایل فعال شدن ویروس هپاتیت B پس از پیوند عضو بوده که به‌عنوان یک مخزن مخفی برای ویروس عمل می‌نماید.

درمان

در عفونت حاد نیاز به مصرف دارو نبوده و در افراد بالغ معمولاً عفونت خودبه‌خود پاک می‌شود. درمان در موارد هپاتیت نوع برق‌آسا و در مواردی که سیستم ایمنی فرد به دلایلی دچار نقص باشد، صورت می‌گیرد. در موارد مزمن نیازی به درمان دارویی نبوده مگر این که خطر بروز نارسایی کبد و سیروز دیده شود.

داروهای مورد استفاده شامل، اینترفرون آلفا Interferon alpha، لامیوودین Lamivudine، آدفوویر Adefuvir، انتکاویر Entecavir می‌باشد.

۱- اینترفرون

پایداری این دارو بیشتر بوده و سبب ایجاد فرم‌های جهش یافته و مقاوم ویروس نمی‌شود. در بیماران با اختلالات کبدی اینترفرون مصرف نشده و بیشتر در افراد جوان دارو تجویز می‌شود. این دارو به‌عنوان یک ایمنومودولاتور عمل می‌کند. اینترفرون از رونویسی و سنتز پروتئین ممانعت کرده و مانع از اتصال mRNA به ریبوزوم می‌گردد.

۲- لامیوودین

عوارض جانبی این دارو کم بوده و قیمت آن نیز پایین است. لامیوودین نسبت به آدفوویر داروی قوی‌تری بوده ولی از انتکاویر ضعیف‌تر است. لامیوودین (۲'-داکسی-۳'- تیاسیتیدین) دارای قند تغییر یافته‌ای است، که به باز نوکلئوزیدی متصل شده و مانع از طویل شدن زنجیر DNA می‌شود. عیب اصلی آن مقاومت دارویی نسبت به آن است. بیشتر در افرادی که هم‌زمان آلوده به HIV و HBV باشند، تجویز می‌گردد. هم‌چنین این دارو به عنوان پروفیلاکسی در حین درمان به‌عنوان داروی کوتاه مدت استفاده می‌گردد. این دارو به صورت رقابتی ترانس کریپتاز معکوس ویروس را مهار می‌کند.

۳- آدفوویر

مزیت اصلی این دارو مقاومت پایین آن و تأثیر بر روی انواع مقاوم ویروس به داروی لامیوودین است. این دارو عمل رپلیکاسیون را بلوکه کرده و آنالوگ آدنوزین می‌باشد. عیب اصلی آن اثر آهسته و کند دارو در سرکوب ویروس

بوده، دوز بالای آن اثرات سمی بر روی کلیه دارد. مقاومت دارویی آن در طول درمان یک ساله دیده نشده ولی مصرف آن در طی چهار سال مقاومتی حدود ۱۸٪ نشان داده است. نقش اصلی این دارو در فرم‌های مقاوم به لامیوودین می‌باشد.

۴- انتکاویر

مزیت اصلی آن قدرت ضد ویروسی بالای آن و مقاومت دارویی پایین آن می‌باشد. عارضه کلیوی در اثر مصرف، تا حال گزارش نشده است. در بیماران مبتلا به نارسایی کلیه مصرف انتکاویر و آدفویر ارجحیت دارد. در بیماران مبتلا به سیروز جبران نشده، جهت درمان باید از آنالوگ‌های نوکلئوزیدی استفاده گردد. مصرف اینترفرون در این گروه از بیماران به دلیل اثرات سمی آن روی کبد توصیه نمی‌شود. مصرف لامیوودین به دلیل مصرف طولانی مدت دارو نیز به‌کار نمی‌رود. آنالوگ نوکلئوزیدی به‌طور انتخابی مانع از عمل‌کرد پلیمراز ویروس می‌شوند، اثرات دارویی اتصال یک آنالوگ نوکلئوزیدی به باز، یا قند تغییر یافته یا هر دو، ۱۰۰ برابر بیشتر از نوکلئوزید معمولی است. به علت نداشتن OH□۳ روی قند مانع از طویل شدن زنجیره شده، هم‌چنین دارو به DNA پلیمراز ویروس بهتر از DNA پلیمراز سلول انسان متصل می‌شود.

در صورت مصرف آدفویر به‌عنوان تک دارویی باید مرتباً سطح آنزیم‌های کبدی و HBV DNA حداقل ماهانه اندازه‌گیری گردد. تا اگر سرکوب ویروس صورت نگرفته باشد، میزان دوز لامیوودین اضافه شود. در بیماران مبتلا به سیروز جبران نشده کبدی، انتکاویر درمان مناسب‌تری است.

دوز داروها و مدت درمان

اینترفرون آلفا Interferon alpha - 2a

بالغین: ۵ میلیون واحد روزانه و یا ۱۰ میلیون واحد ۳ بار در هفته زیر جلدی

کودکان: ۶ میلیون واحد به ازای هر مترمربع سطح بدن ۳ بار در هفته (حداکثر ۱۰ میلیون واحد) زیر جلدی

مدت زمان درمان در بیماران HBeAg مثبت ۱۶ تا ۳۲ هفته

مدت زمان درمان در بیماران HBeAg منفی ۱۲ تا ۲۴ هفته

پگاسیس PEGylated intedrferon alpha - 2a

بالغین: ۱۸۰ میلی گرم در هفته

کودکان: مصرف آن در کودکان هنوز تأیید نشده

مدت زمان درمان در بیماران HBeAg مثبت و HBeAg منفی ۴۸ هفته

لامیوودین Lamivudine

بالغین: با وضعیت کلیوی مناسب بدون عفونت HIV دوز روزانه ۱۰۰ میلی گرم

کودکان: دوز ۳ میلی گرم بر کیلوگرم تا حداکثر دوز ۱۰۰ میلی گرم

در افراد مبتلا به عفونت با HBeAg مثبت، مدت درمان حداقل ۱ سال

در بیماران که فرم‌های مقاوم بیماری را دارند، سطح آنزیم‌های کبدی AST و ALT مرتبا اندازه‌گیری شده و سطح DNA HBVمواید تاثیر دارو و مناسب بودن درمان است.

آدفوویر Adefovir

دوز دارو ۱۰ میلی گرم در روز بوده که در بیماران مبتلا به نارسایی کلیه فواصل تجویز دارو باید تنظیم گردد. در بیماران HBeAg مثبت مدت درمان حداقل ۱ سال می‌باشد. در بیماران با HBeAg منفی، مدت مصرف دارو باید بیشتر باشد، زیرا بیشتر از ۹۰٪ از این بیماران پس از قطع درمان در حدود ۱ سال بعد دچار عود بیماری می‌شوند.

انتکاویر Entecavir

دوز مصرف آن ۰/۵ میلی گرم در روز بوده و رعایت موارد زیر در طی دوره درمان تأکید می‌شود.

در طول دوره درمان مصرف الکل با افزایش خطر بروز سیروز و سرطان کبد همراه خواهد بود. در حین درمان واکسیناسیون افراد خانواده باید صورت گیرد. در بیماران ناقل غیرفعال inactive carrier باید تست‌های کبد هر ۶ تا ۱۲ ماه بررسی گردد. زیرا همیشه احتمال فعال شدن بیماری وجود دارد. تست‌ها شامل اندازه‌گیری AST، ALT،

تست PT، الکالن فسفاتاز بوده، که در صورت افزایش مقادیر این تست‌ها آزمایش CEA و fpα باید انجام گیرد. اندازه‌گیری سطح HBV DNA جهت پی‌گیری درمان نیز توصیه می‌گردد.

داروهای استفاده شده توانایی پاک‌سازی کامل ویروس را نداشته و بیشتر از رپلیکاسیون ویروس جلوگیری می‌نمایند. انتخاب نوع دارو مهم بوده، زیرا پاسخ به درمان در ژنوتایپ‌های مختلف، متفاوت است. مثلاً اینتروفرون در ژنوتایپ A حدود ۳٪ مؤثر بوده، در مقابل ژنوتایپ C حدود ۱۵٪ مؤثر است. اما در مقابل ژنوتایپ D فقط ۶٪ اثر دارد.

عوامل خطرساز

۱- سن

سیر طبیعی عفونت ناشی از ویروس هپاتیت B ارتباط مستقیمی با سن ابتلاء نشان می‌دهد. در نواحی از جهان که بیماری به صورت آندمیک دیده می‌شود، حدود ۹۰٪ از نوزادان نوع مزمن عفونت را کسب نموده و به ازای افزایش هر ۱۰ سال سن احتمال ابتلا به سیروز و سرطان کبد، افزایش چشم‌گیری به‌خصوص از دهه چهارم زندگی به بعد مشاهده می‌گردد.

دربزرگ‌سالان معمولاً ۰/۵ تا ۵٪ از بیماران به شکل مزمن عفونت مزمن مبتلا شده و بیشتر موارد بیماری در این افراد به‌صورت حاد و بدون علائم بالینی دیده می‌شود.

۲- زندگی دسته‌جمعی

زندگی در مکان‌های پرجمعیت و خانواده‌های شلوغ و عدم رعایت اصول بهداشتی عامل مهمی در انتقال عفونت می‌باشد. استفاده از وسایل آلوده مشترک مانند مسواک، تیغ صورت‌تراشی، آلوده به خون و ترشحات بدن و تماس‌های بدنی نزدیک انتقال عفونت را افزایش می‌دهد.

۳- کادر بهداشتی درمانی

افرادی که در معرض تماس‌های شغلی، مانند افرادی که در تماس با بیماران همودیالیزی، افراد دریافت‌کننده خون و فرآورده‌های خونی، زندانیان، افرادی که از نظر ذهنی یا جسمی دچار ناتوانی‌اند و در موسسات بازتوانی بستری‌اند، بیشتر در معرض خطر ابتلا به عفونت می‌باشند.

پیش‌گیری و کنترل

۱- هیچ‌گونه درمان خاص و قطعی برای عفونت با ویروس هپاتیت B وجود ندارد. تزریق ایمونوگلوبولین هپاتیت BHIG B به نوزادانی که از مادران آلوده متولد شده‌اند، در بدو تولد و حداکثر تا ۴۸ ساعت اول تولد مهم می‌باشد.

۲- غربال‌گری خون و فرآورده‌های خونی در خون‌های اهداء شده موجب کاهش انتقال آلودگی می‌گردد(۴۵).

۳- اجتناب از تماس نزدیک با ناقلین این ویروس در پیش‌گیری بسیار مهم است.

۴- واکسیناسیون نوزادان، کودکان و گروه‌های پرخطر مانند افراد همودیالیزی، دریافت کنندگان پیوند عضو، افراد هموفیلی، کارکنان مراکز بهداشتی و درمانی بسیار موثر می‌باشد.

۵- پرهیز از رفتارهای پر خطر و استفاده از وسایل حفاظتی در تماس‌های جنسی مشکوک، پوشیدن دستکش و عینک در هنگام کار با خون و مایعات بدن تأکید می‌گردد. دقت لازم در هنگام کار کردن با وسایل نوک تیز و سوزن به عمل آورده شود.

۶- استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ جهت ضدعفونی کردن وسائل آلوده و ترشحات افراد آلوده به ویروس، محلول بسیار مناسبی می‌باشد.

۷- واکسیناسیون در نوزادان متولد شده از مادران HBsAg مثبت و افرادی که به طور تصادفی در معرض آلودگی پوستی یا مخاطی با خون یا ترشحات افراد HBsAg مثبت قرار گرفته‌اند، می‌تواند موثر باشد.

۸- هر چه فاز تکثیر ویروس طولانی‌تر و سطح سرمی HBV DNA بالا باشد، احتمال بروز سیروز افزایش می‌یابد. از طرفی احتمال بروز سرطان کبد در بیماران با HBeAg مثبت بیشتر از افراد HBeAg منفی است.

۹- عوامل متعددی مانند مصرف الکل، عفونت هم‌زمان با HCV و یا HDV، کبد چرب و بیماری‌های متابولیک کبد، مصرف داروهای کورتیکواستروئید، مصرف مواد حاوی آفلاتوکسین مثل پسته و آجیل انباری، چاقی و پرخوری عوارض کبدی عفونت مزمن را تشدید می‌نماید.

واکسن

واکسن‌های مورد استفاده کاملاً بدون خطر بوده و در بیش از ۹۵٪ موارد کاملاً مؤثر می‌باشد. هدف از انجام واکسیناسیون پیش‌گیری از ایجاد عفونت مزمن هپاتیت B و در نتیجه جلوگیری از عوارض عفونت مزمن یعنی سیروز و سرطان کبد می‌باشد. اولین واکسن هپاتیت B از پلاسمای بیماران ناقل بیماری توسط Dohme و Merck Sharp در سال ۱۹۸۱ تهیه گردید. در تهیه این واکسن ویروس را در اثر مجاورت با فرمالین، پپسین و اوره یا حرارت غیرفعال می‌نمودند.

در حال حاضر واکسن‌های هپاتیت B از نوع نوترکیبی recombinant بوده و از بیان ژن S هپاتیت B در مخمر ساکارومایسیس سرویسیه *Sacchromyces cerevisiae* تهیه می‌گردد. دو نوع واکسن مهم تولید شده به این روش به نام‌های Engrix B و Recombivax HB می‌باشد. در تهیه هر دو نوع واکسن از هیدرواکسید آلومینیم استفاده شده و از تیومرسال به عنوان ماده نگهدارنده واکسن، استفاده می‌گردد.

نوع دیگر واکسن نوترکیب Gen Hepvax بوده، که دارای آنتی‌ژن pre-S2 و S می‌باشد. اخیراً واکسن دیگری به نام Hep care به مرحله تولید رسیده که در این واکسن از آنتی‌ژن S و pre-S2 و pre-S1 استفاده شده است، که ایمنی‌زایی بیشتری را می‌تواند ایجاد نماید. واکسن هپاتیت B اولین واکسن در مقابل سرطان می‌باشد.

واکسن‌های حاوی HBsAg قابلیت ترکیب با سایر واکسن‌ها نظیر BCG، سرخک، اوریون، سرخجه، MMR، هموفیلوس آنفولانزای b، دیفتری، کزاز، سیاه سرفه، پولیو و هپاتیت A را دارند. در نوزادانی که از مادران HBsAg مثبت متولد شده‌اند، باید در ۶ ساعت اول و حداکثر ۵۴ ساعت بعد از تولد واکسن به همراه HBIG تزریق گردد .تزریق واکسن از بدو تولد هم خطر آلودگی به عفونت را کاهش داده، هم‌چنین ابتلا به سرطان کبد را کاهش می‌دهد.

در ایران از سال ۱۳۷۱ در دو استان زنجان و سمنان به‌طور آزمایشی واکسیناسیون هپاتیت B در نوزدان شروع گردید.

از سال ۱۳۷۲ به بعد تمام نوزادان متولد شده از بدو تولد واکسن هپاتیت B را دریافت می‌کنند. تا سال ۱۳۸۴ حدود ۹۴٪ از جمعیت جوان کشور واکسینه شده‌اند. ایمنی‌زایی واکسن به طور مستقیم به میزان پیدایش anti - HBs بستگی دارد.

کسانی که تیتر anti - HBs آنها بعد از واکسیناسیون بیش از ۱۰۰ میلی‌اینترناشنال‌یونیت بر میلی‌لیتر باشد، صددرصد در مقابل بیماری ایمن خواهند بود. در افراد مسن‌تر از ۶۰ سال حدود ۷۵٪ موارد واکسن مؤثر خواهد بود.

استعمال دخانیات، چاقی، ابتلا به HIV، ابتلا به بیماری‌های مزمن و یخ‌زدگی واکسن و همودیالیز سبب کاهش پاسخ به واکسن می‌شود.

به دلیل باقی‌ماندن خاطره ایمنی پس از واکسیناسیون به دنبال برخورد مجدد با عفونت، تیتر آنتی‌بادی افزایش خواهد یافت. در حال حاضر تزریق واکسن یادآوری در جمعیت عمومی توصیه نمی‌شود.

نحوه نگهداری واکسن

واکسن باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شده و از یخ‌زدگی آن جلوگیری گردد. زیرا یخ زدن سبب از بین رفتن اثر بخشی واکسن می‌شود.

نحوه تزریق واکسن

تزریق واکسن در بزرگ‌سالان و نوزدان در ماه‌های ۰، ۱، ۶ بعد از اولین تزریق صورت می‌گیرد. واکسن در بالغین داخل عضله دلتوئید و در نوزادان در عضله قدامی کناری ران تزریق می‌شود. تزریق در سایر محل‌ها سبب واکنش ایمنی کمتری می‌گردد.

تزریق واکسن سبب القاء سلول‌های لنفوسیت T هلپر اختصاصی HbsAg، T و B لنفوسیت‌های dependent شده، سبب تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده علیه شاخص آنتی‌ژن a در HBsAg می‌گردد. دو هفته پس از اولین تزریق واکسن،

تولید آنتی‌بادی شروع می‌شود. از آن‌جایی که واکسن هپاتیت B حاوی قسمت‌هایی از ژنوم HBsAg است، آنتی‌بادی تولید شده نیز از نوع anti - HBs می‌باشد.

عوارض واکسن

عوارض جانبی معمولاً کوتاه و خفیف بوده و گاهاً علائمی مانند تب خفیف و درد در محل تزریق ۱ تا ۲ روز بعد از تزریق دیده می‌شود. در افرادی که واکنش‌های شدید به آنتی‌ژن‌های مخمر داشته باشند، واکنش‌های شدید آلرژیکی ظاهر گردد. مشکل احتمالی که به‌ندرت در واکسن‌های هپاتیت B ایجاد می‌شود، جهش‌هایی است که به‌طور طبیعی در ترکیب واکسن روی داده و ویژگی HBsAg را تغییر می‌دهد. علی‌رغم ظاهر شدن HBsAb باعث عدم ایجاد پاسخ ایمنی مناسب به واکسن می‌گردد. در این حالت اتصال HBsAg و anti - HBs کاهش یافته و ایمنی در مقابل عفونت کاهش می‌یابد.

ایجاد پاسخ ایمنی به واکسن

اندازه‌گیری میزان آنتی‌بادی حدود ۴-۱ ماه پس از اولین تزریق صورت گرفته و میزان آنتی‌بادی ۱۰۰ میلی-اینترنشنال یونیت بر میلی‌لیتر نشان دهنده ایمنی فرد بوده و در ۹۰٪ افراد پاسخ ایمنی مناسب ایجاد می‌گردد. میزان آنتی‌بادی بین ۱۰۰-۱۰ میلی‌اینترنشنال‌یونیت بر میلی‌لیتر نشان‌گر پاسخ کم ایمنی فرد در برابر واکسن بوده و باید یک دوز یادآوری booster تزریق گردد. در افرادی که میزان آنتی‌بادی زیر ۱۰ میلی‌اینترنشنال‌یونیت بر میلی‌لیتر باشد، باید از نظر ابتلای قبلی به عفونت ویروس بررسی شده و واکسیناسیون ۳ نوبته مجدداً انجام گیرد. تیتر آنتی‌بادی در فاصله ۴-۱ ماه دوباره اندازه‌گیری شده و اگر پاسخ ایمنی مناسب ایجاد نگردد، دوز تزریقی واکسن را زیاد کرده یا تزریق داخل جلدی intradermal توصیه می‌گردد. در افرادی که عدم پاسخ ایمنی داشته باشند، باید از HBIG استفاده گردد. پاسخ‌های ضعیف ایمنی معمولاً در افراد بالای ۴۰ سال، چاق، سیگاری، الکیک و نارسایی‌های پیشرفته کبدی مشاهده می‌شود.

در افراد دیالیزی، نیاز به تکرار واکسیناسیون برای چندین بار و افزایش دوز واکسن وجود دارد. هم‌چنین در افراد آلوده به HIV اثرات واکسن هپاتیت B بسیار کم می‌باشد. اثر حفاظتی واکسن‌های اولیه حدود ۷-۵ سال اعلام شده، ولی با بهبود روش‌های تهیه واکسن اثر حفاظتی آن را تا ۲۵ سال نیز گزارش نموده‌اند.

تزریق دوز یادآوری در کارکنان مراکز بهداشتی توصیه می‌گردد، به‌عنوان مثال تزریق دوز یادآوری به فاصله هر ۵ سال در کشور انگلستان صورت می‌گیرد.

تزریق HBIG (heapatitis B immunoglobulin)

در سال ۱۹۷۴ نوع خاصی از ایمونوگلوبولین انسانی با تیتر بالا، به‌نام HBIG به بازار آمد. این ایمونوگلوبولین از پلاسما، با تیتر بالای anti-HBs تهیه گردید. HBIG با روش ایمنی غیرفعال، موجب حفاظت فرد از ابتلا به عفونت شده و اثر آن فقط برای ۳ تا ۶ ماه باقی می‌ماند. از این ایمونوگلوبولین به عنوان پروفیلاکسی، قبل از قرار گرفتن در معرض آلودگی نیز استفاده می‌گرددد. بعد از تماس جنسی با فرد آلوده، فرو رفتن سر سوزن آلوده یا بریدن بدن توسط اشیاء تیز، آلوده به خون و برخی ترشحات آلوده، مصرف HBIG به همراه واکسن توصیه می‌شود. مصرف آن در صورت گذشت بیش از ۷ روز پس از تماس تأثیری ندارد. هم‌چنین در افرادی که به هر دلیلی نقص سیستم ایمنی داشته و پاسخ کافی ایمنی تولید نمی‌کنند، تزریق HBIG توصیه می‌شود. تزریق سریع بعد از تولد نوزادان متولد شده از مادران آلوده به ویروس به‌خصوص اگر HBeAg مادر مثبت باشد، تأکید می‌گردد. دوز تزریقی HBIG، ۰/۰۷-۰/۰۴ میلی‌لیتر بر کیلوگرم بوده و باید در عرض ۱۲ ساعت تزریق گردد.

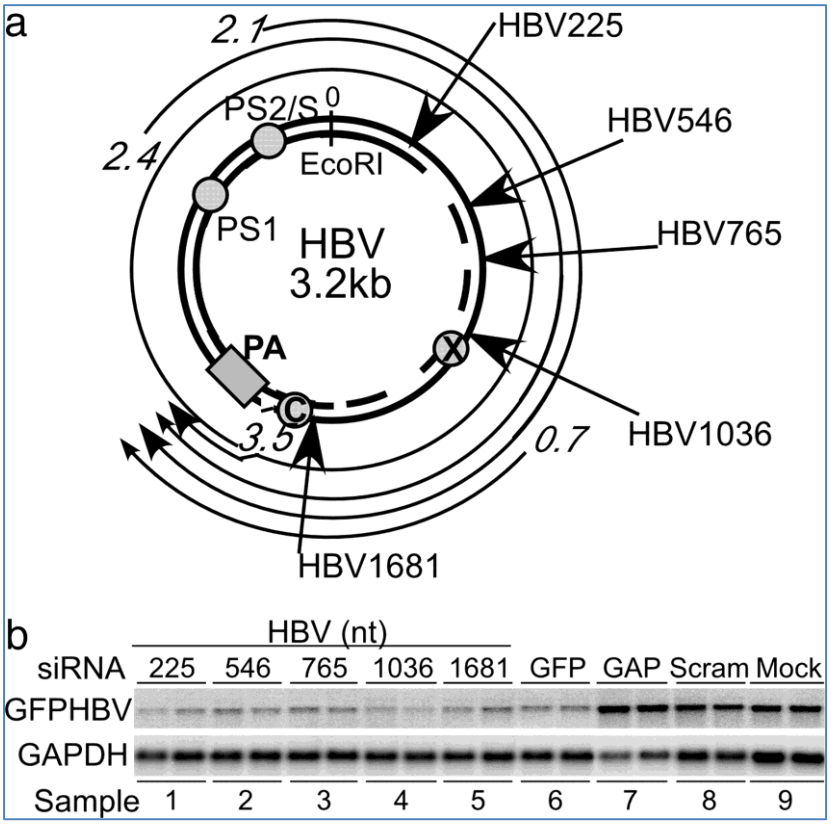
طبقه‌بندی و ساختمان و اشکال ویروس

ویروس هپاتیت B ویروسی از خانواده هپادناویریده Hepadnaviride با ژنوم DNA حلقوی دو رشته‌ای کوچک پوشش‌دار بوده که با رونویسی معکوس از طریق یک RNA واسطه تکثیر می‌یابد. هپاتیت B حاوی یکی از کوچک‌ترین ژنوم‌ها در میان ویروس‌های انسانی است. ژنوم حاوی ۳۲۰۰ جفت باز بوده و وزن ملکولی آن تقریباً ۲×۱۰^{۶} می‌باشد. گونه‌های مختلف هپاتیت B هومولوژی توالی نوکلئوتیدی ۹۰ تا ۹۸٪ را دارد. رشته منفی یا رشته بلند L رشته کامل بوده، رشته مثبت یا رشته کوتاهS رشته ناقص می‌باشد.

ویروس حاوی آنزیم DNA پلیمراز و ترانس کریتپاز معکوس می‌باشد. قطر ویروس حدود ۴۲ نانومتر بوده که به این ذره ویروس ذرات دان Dane partical نیز گویند. از مشخصات مهم هپادناویروس‌ها تولید مازاد بر نیاز پروتئین سطحی آن‌ها بوده، که در مورد هپاتیت B همان HBsAg می‌باشد. این پروتئین مازاد به صورت ذرات کروی به قطر ۲۲ نانومتر یا رشته‌ای به قطر ۲۰ و طول ۴۰۰-۲۰۰ نانومتر در گردش خون فرد آلوده به همراه ذرات دان در بررسی با میکروسکوپ الکترونی قابل رویت می‌باشد. مقدار ذرات دان تا میزان $۱۰^{۱۰}$-$۱۰^{۸}$ ذره در هر میلی‌لیتر خون گزارش شده، در حالی‌که مقدار HBsAg تا میزان $۱۰^{۱۳}$ ذره در هر میلی‌لیتر خون نیز مشاهده می‌گردد.

در یک میلی‌لیتر از سرم‌های HBsAg مثبت اگر حاوی ذرات دان باشد حتی در رقت $۱۰^{۸}$ ذره نیز آلوده کننده می‌باشد.

ویروس حاوی نوکلئوکپسید بیست وجهی Icosahedral با پوشش لیپو پروتئینی Envelope بوده، دو پلی‌پپتید بزرگ گلیکوزیله موجود در ویروس در HBsAg، دیگری در HBcAg مشاهده می‌گردد.



شکل ۲- ژنوم ویروس هپاتیت B

چهار قالب رونویسی open frame وجود دارد، که تعداد ۷ پلی‌پپتید را کد برداری می‌نمایند. این قالب‌ها شامل پروتئین‌های ساختمانی سطح ویریون و هسته، یک ترانس اکتیوتیور نسخه بردار کوچک x و پروتئین پلیمراز بزرگ P که عبارت است از DNA پلیمراز، نسخه بردار معکوس و فعالیت‌های H RNAase می‌باشد. ژن S سه کدون آغاز کننده داخل قالب داشته که HBsAg عمده‌ترین آنهاست و توالی‌های pre-S2 یا pre-S1 یا pre-S را کد برداری می‌کند.

ژن C کدکننده پروتئین core بوده و این ژن دو کدون آغاز کننده، داخل قالب داشته و HBcAg و پروتئین HBeAg را کد برداری می‌کند. نتیجه عمل این ژن تولید HBeAg محلول می‌باشد. شروع کدون در بالادست قالب AUG بوده، که پروتئین pre core را تولید می‌کند.

ویروس از داخل به خارج حاوی قسمت مرکزی core به قطر ۲۷ نانومتر که حاوی DNA ویروس بوده، به آن HBcAg گویند و حاوی آنزیم DNA پلیمراز می‌باشد. قسمت سطحی که قسمت مرکزی را می‌پوشاند، به اندازه ۲۲ نانومتر از جنس لیپو پروتئین بوده که به آن HBsAg گویند. که توسط ژن S تولید می‌شود. ژن S دارای ۳ قالب شروع ATG و حاوی ۳ قسمت pre-S1، pre-S2، S بوده و پلی‌پپتیدها با اندازه بزرگ pre-S1+pre-S2+S، اندازه متوسط pre-S2+S و اندازه کوچک S را تولید می‌کند. ژن S حاوی ۳ کدون شروع در قالب in frame iniation codons بوده که آنتی‌ژن بزرگ HBsAg major و پلی‌پپتیدها را کد می‌کند. ژن دارای ژنوتایپ D و ساب‌ژنوتایپ D1 می‌باشد. موتاسیون در ژن S موجب شکست در عمل واکسیناسیون می‌شود. ژن C حاوی ۲ کدون شروع در قالب بوده که آنتی‌ژن HBcAg را کد می‌کند. ویروس هپاتیت B به دلیل داشتن ساختار انحصاری خود و به‌دلیل داشتن آنزیم reverse transcriptase از توان ویرایش proof reading ضعیفی برخوردار بوده که قابلیت ایجاد موتاسیون در این ویروس را بالا می‌برد.

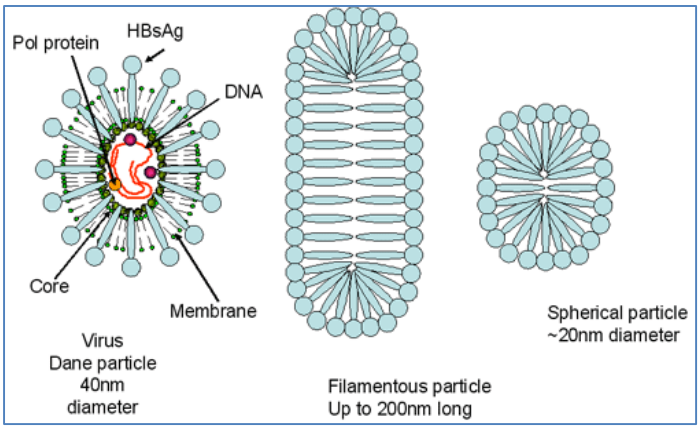
پروتئین هسته مرکزی یا HBcAg محصول ژن C، پروتئین پوشش خارجی یا HBsAg محصول ژن S و پلیمراز ویروس محصول ژن P می‌باشد. ژن x که عمل‌کرد این ژن کاملاً شناخته نشده ولی در موارد سرطان کبد با علت هپاتیت B این ژن بیشتر دیده می‌شود. وجود این ژن را یک عامل تحریک کننده در بروز سرطان دخیل می‌دانند. در حال حاضر انواع جهش یافته متعددی از ویروس هپاتیت B شناخته شده است. از دو دسته اصلی، یکی از موتان‌ها مربوط به قسمت pre core ژنوم بوده که در این گروه HBsAg به صورت عادی بیان شده ولی HBeAg اصلا بیان نشده یا به شکل تغییر یافته‌ای بیان می‌شود.

جهش نوع دوم مربوط به قسمت S ژنوم ویروس بوده که در بیان ژن HBsAg اختلال ایجاد می‌کند و HBsAg در آن‌ها تغییر می‌یابد. بسیاری از کیت‌های تشخیصی برای HBsAg ممکن است توانایی تشخیص، این نوع ویروس‌ها را نداشته باشند. این مشکل در صورت استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی کلونال با توجه به وسعت شناسایی اپی توپ‌های مختلف، کمتر با این مشکل روبه‌رو می‌باشد. ولی در موارد نادری از جهش‌های مربوط به اپی‌توپ a توسط برخی از کیت‌های معتبر تجاری نیز قابل شناسایی نمی‌باشد.

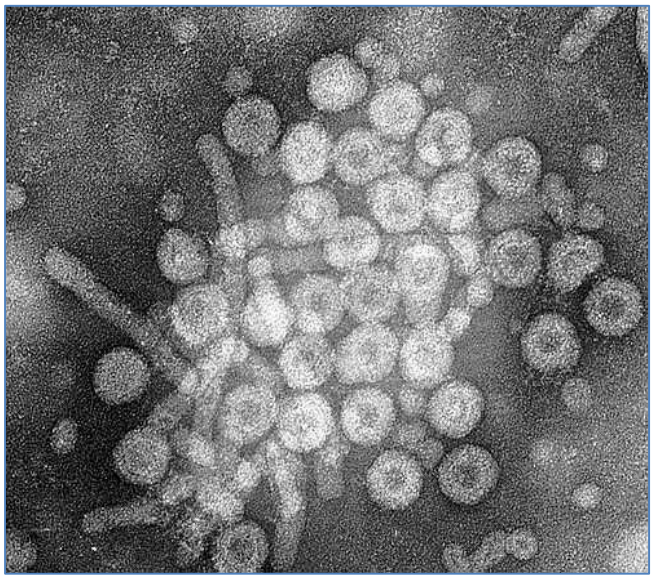
در طی یک بررسی در ایران نشان داده شده که در ۵۸٪ از عفونت‌های هپاتیت B موتاسیون در آنتی‌ژن HBsAg از نوع pre-core در ژن S می‌باشد.

در زیر میکروسکوپ الکترونی ویروس به ۳ شکل در سرم بیماران مبتلا به آنتی‌ژن HBsAg دیده می‌شود. عمده‌ترین شکل ویروس، ذرات کروی کوچک small spherical با قطری حدود ۲۲ نانومتر بوده، که این ذرات کوچک منحصراً از آنتی‌ژن HBsAg ساخته شده‌اند. شکل لوله‌ای tublular یا رشته‌ای filamentous از آنتی‌ژن HBsAg منشا گرفته، که قطری تقریبا مشابه داشته ولی ممکن است بیش از ۲۰۰ نانومتر طول داشته باشند. این ذرات به علت تولید بیش از اندازه آنتی‌ژن HBsAg ایجاد می‌شوند. ذرات کروی بزرگ large spherical به اندازه ۴۲ نانومتر که به تعداد کم وجود داشته و به نام ذرات دان نیز نامیده می‌شوند. این ذرات تنها شکل مرفولوژیک ویروس هپاتیت B می‌باشند، که حاوی اسید نوکلئیک DNA دو رشته‌ای می‌باشند. سطح خارجی یا پوشش ویروس حاوی آنتی‌ژن سطحی HBsAg بوده که جسم مرکزی به قطر ۲۷ نانومتر را احاطه نموده، این

جسم مرکزی حاوی HBcAg می‌باشد. آنتی‌ژن دیگری به حالت پنهان در هسته مرکزی به‌نام HBeAg نیز وجود دارد.



شکل ۳- شکل‌های ویروس



شکل ۴- شکل میکروسکوپ الکترونی ویروس هپاتیت B

اجزاء تشکیل‌دهنده ویروس

HBsAg -۱

جز پوشش خارجی ویروس Envelope بوده و محصول ژن S می‌باشد. HBsAg دارای ساب‌تایپ‌های مختلفی می‌باشد. این آنتی‌ژن در ۹۵٪ از موارد حاد قابل شناسایی بوده و آنتی‌بادی تولید شده علیه آن نقش محافظتی

دارد. مهم‌ترین جز آن ۲۵-۱۷ نانومتر طول داشته و به صورت بیضی شکل یا رشته‌های بلند قابل تشخیص است. این قسمت بیشترین قسمت تولید شده توسط ویروس بوده و گاهی تا ۱۰۰۰ برابر سایر اجزاء ویروس تولید می‌گردد.

HBsAg آنتی‌ژن سطحی ویروس بوده و قسمت مرکزی را می‌پوشاند، و واقعی‌ترین شاخص عفونت ویروس بوده که در طول دوره حاد بیماری پایدار مانده و در دوران نقاهت کاهش می‌یابد. پایداری آن بیش از ۶ ماه بیان‌گر ایجاد وضعیت carrier یا ناقل بیماری بوده و سیر بیماری به طرف مرحله مزمن می‌باشد. از اولین شاخص‌های سرولوژیکی عفونت بوده که ۴۱-۲۷ روز پس از آلودگی به عفونت ظاهر می‌شود. این آنتی‌ژن در تشخیص بیماری و تشخیص افتراقی آن از سایر عوامل ایجاد کننده هپاتیت به‌کار می‌رود. HBsAg شامل ۳ گلیکوپروتئین L و M و S بوده که به وسیله ژن مشابهی کد شده و به روش مشابهی خوانده می‌شوند. اما به پروتئین‌های متفاوتی با کدون‌های آغاز AUG متفاوت ترجمه می‌گردند. گلیکوپروتئین ۲۷S (۲۴ تا ۲۷ کیلودالتون) به‌طور کامل در گلیکوپروتئین ۳۶M (۳۳ تا ۳۶ کیلو دالتون) قرار داشته و خود گلیکوپروتئین M نیز در گلیکوپروتئین ۴۲L (۳۹ تا ۴۲ کیلو دالتون) قرار می‌گیرد. همه این گلیکوپروتئین‌ها توالی اسیدآمینه، c ترمینال یک‌سان دارند. این ۳ شکل از آنتی‌ژن HBsAg در ویریون یافت می‌شوند. گلیکوپروتئین S بخش عمده ذرات HBsAg بوده و با ذرات کروی ۲۲ نانومتری که از سلول آزاد می‌شوند، مرتبط می‌باشد.

ذرات رشته‌ای HBsAg موجود در سرم بیشتر گلیکوپروتئین S را داشته و البته میزان کمی هم گلیکوپروتئین L و M و پروتئین و لیپیدهای دیگر را به همراه دارد. گلیکوپروتئین L، بخش اصلی در تجمع ویریون می‌باشد و شکل‌گیری فیلامنت را افزایش داده و ترشح این ساختارها را از سلول کاهش می‌دهد. گلیکوپروتئین‌های HBsAg، شامل شاخص‌های اختصاصی گروه به‌نام a و اختصاص تیپ به‌نام d و y و w یا r می‌باشند. ترکیب این آنتی‌ژن‌ها مانند ady، adw منجر به تولید ۸ سروتایپ و ۲۴ ساب‌تایپ از هپاتیت B شده که از مارکرهای مفید در بررسی اپیدمیولوژی می‌باشند. چهار فنوتیپ از آنتی‌ژن HBsAg با عناوین adw و ayw و ayr و adr وجود دارد.

پایداری آنتی‌ژن HBsAg همیشه با عامل عفونت‌زا مطابقت ندارد، ولی هر دو در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای بیش از ۲۰ سال پایدار بوده و در برابر انجماد و ذوب مکرر مقاوم می‌باشند.

HBcAg -۲

ویریون با قطر ۴۲ نانومتری شامل یک نوکلئوکپسید ۲۷ نانومتری بوده و آنتی‌ژن ظاهر شده بر روی هسته نوکلئوکپسید HBcAg نامیده می‌شود، که توسط ژن C کد می‌گردد. از آنجایی که آنتی‌ژن بر روی هسته نوکلئوکپسید قرار گرفته، در گردش خون قابل تشخیص نمی‌باشد، ولی آنتی‌بادی تولید شده علیه آن، anti-HBc قابل تشخیص بوده و گاهی تنها مشخصه ابتلا به عفونت این آنتی‌بادی است. این آنتی‌ژن یکی آنتی‌ژن داخل سلولی بوده و بیان‌گر عفونت هپاتوسیت‌ها می‌باشد، که به صورت آزاد در هپاتوسیت‌ها وجود دارد. وجود مقدار زیادی از HBcAg در سلول‌های کبدی نشان‌گر تکثیر و فعال بودن ویروس می‌باشد. anti-HBc شاخص مفیدی است که پس از ظهور HBsAg و HBeAg در خون ظاهر می‌شود و ممکن است، تا آخر عمر باقی بماند. در ابتدا anti-HBc-IgM و سپس نوع anti-HBc-IgG افزایش می‌یابد. به‌تدریج نوع IgM کاهش یافته، ولی نوع IgG مدت‌ها در خون باقی می‌ماند. در نهایت anti-HBs که در واقع آنتی‌بادی خنثی کننده و ایمن کننده است، در خون مشاهده می‌گردد.

HBeAg -۳

یک پروتئین محلول نوکلئوکپسیدی، که توسط ژن C کد می‌شود. HBeAg پروتئین غیر ساختمانی بوده که عمل‌کرد آن کاملا مشخص نیست. وجود HBeAg با بیماری‌زایی رابطه مستقیم دارد. درصدی از ویروس‌های هپاتیت B به علت تغییر در ماده ژنتیکی قادر به تولید HBeAg نمی‌باشند.

این آنتی‌ژن نشان دهنده همانند سازی و تکثیر شدید ویروس و شاخص عفونت‌زایی بالای خونی فرد آلوده است. حدود یک هفته پس از ظهور HBsAg، HBeAg در خون ظاهر می‌شود. پایداری این آنتی‌ژن به مدت طولانی در هپاتیت B مزمن، خطر بروز سیروز و سرطان کبد را افزایش می‌دهد. در مادران باردار وجود آن نشان‌گر

احتمال انتقال عفونت به جنین را حتی بیش از ۹۰٪ افزایش می‌دهد. ناپدید شدن آن در سرم نشان دهنده بهبود بالینی و برطرف شدن عفونت می‌باشد. معمولا در فاصله زمانی که HBeAg قابل ردیابی است، HBV DNA نیز در گردش خون مشاهده می‌شود. به‌طور کلی HBeAg قبل از منفی شدن HBsAg کاهش یافته و ظاهر شدن anti-HBe اولین نشانه احتمال بهبودی از یک عفونت حاد می‌باشد.

در مطالعات ایمونوفلورسانس نشان داده شده، که در زمان عفونت با ویروس هپاتیت B، HBcAgدر هسته‌ها دیده شده در حالی‌که HBsAg در سیتوپلاسم قرار دارد. آنتی‌ژن HBc و HBs به‌ندرت با هم در یک سلول دیده می‌شود.

تکثیر ویروس

در هنگام نفوذ ویروس به درون سلول زنجیر DNA ناکامل ژنوم، با تشکیل یک زنجیر حلقوی مضاعف DNA، کامل شده و ژنوم به درون هسته وارد می‌شود. رونویسی ژنوم به‌وسیله عناصر رونویسی در سلول‌های کبد کنترل می‌گردد. DNA به ۳ گروه عمده (۲۱۰۰ و ۲۴۰۰ و ۳۵۰۰ باز) و ۲ گروه کوچکتر (۹۰۰ باز) از mRNA رونویسی می‌شود. mRNA با ۳۵۰۰ باز، اندازه‌ای بزرگ‌تر از ژنوم ویروس داشته، و آنتی‌ژن‌های HBc و HBe، پلیمراز و پرایمر پروتئینی به عنوان الگو را برای تکثیر DNA را کد می‌کند. HBc و HBe پروتئین‌های مشابهی بوده و از مناطق متفاوت در شروع کدون‌های مشابه، به mRNA ترجمه می‌شوند. این امر موجب ایجاد تفاوت در پروسه، ساختمان و توزیع آن‌ها در سلول ویریون می‌شود. به هم‌این نحو، mRNA با ۲۱۰۰ باز، گلیکوپروتئین‌های کوچک و متوسط را از کدون‌های شروع متفاوت کد می‌کند. mRNA با ۲۴۰۰ باز، گلیکوپروتئین بزرگتر از mRNA با ۲۱۰۰ باز را کد می‌نماید. mRNA با ۹۰۰ باز، پروتئین x را کد می‌کند. این پروتئین به عنوان transactivator رونویسی و به‌عنوان یک پروتئین کیناز، تکثیر ویروس را افزایش می‌دهد. تکثیر ژنوم با تولید mRNA با ۳۵۰۰ باز که بزرگ‌تر از ژنوم ویریون است، شروع می‌گردد. این mRNA به درون هسته مرکزی نوکلئوکپسید که حاوی پلیمراز DNA وابسته به RNA است، بسته‌بندی می‌شود. این پلیمراز، فعالیت ترانس کریپتازی معکوس و ریبونوکلئاز H داشته، اما فاقد فعالیت آنزیم اینتگراز رتروویروس است.

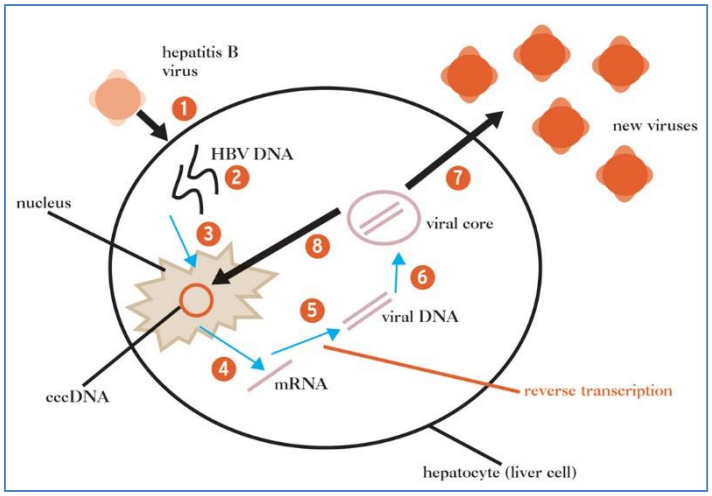
RNA با ۳۵۰۰ باز به‌عنوان الگو عمل کرده و زنجیر منفی DNA ساخته می‌شود. در هر حال این روند با پوشش‌دار شدن نوکلئوکپسید در غشاهای حاوی HBsAg از آندوپلاسمیک رتیکولوم یا دستگاه گلژی متوقف می‌شود و بدین وسیله ژنوم‌های تسخیر شده دارای RNA-DNA با طول‌های متفاوت از RNA حلقوی می‌باشد. با ادامه تخریب باقی‌مانده RNA در درون ویریون موجب تشکیل زنجیر مضاعف ناکامل ژنوم می‌شود. سپس ویریون با روش اگزوستیوز از سلول‌های کبدی رها شده ولی سلول کبد را متلاشی نمی‌کند. ژنوم کامل ویروس می‌تواند دوباره به کروماتین سلول میزبان متصل گردد. در این حالت فقط HBsAg را می‌توان در سیتوپلاسم سلول دارای DNA از ویروس هپاتیت B مشاهده نمود. اهمیت DNA متصل شده به کروموزوم سلول در تکثیر ویروس کاملاً شناخته نشده است، اما DNA ویروس متصل شده به کروموزوم سلول کبد در هنگام بروز سرطان یافت شده است. ویروس به دلیل گرایش شدید به تکثیر در سلول‌های کبدی و لزوم برآورده شدن نیازهای ویروس با توجه به اندازه کوچک ژنوم آن، دخالت یک RNA واسط در تکثیر آن، کاملا انحصاری است.

چرخه همانندسازی

ویروس هپاتیت B به یک گیرنده بر روی سلول‌های کبدی از طریق یک بخش از ناحیه pre-S از آنتی‌ژن HBsAg متصل می‌شود. بعد از کپسیدبرداری ویروس، آنزیم‌های ناشناخته سلول، DNA دو رشته‌ای ناقص را به DNA حلقوی بسته شده با پیوند کووالانسی تبدیل می‌کند، که در هسته سلول قابل شناسایی می‌باشد. DNA حلقوی بسته شده با پیوند کووالانس cccDNA به عنوان الگو برای تولید ملکول‌های mRNA ویروس هپاتیت B و پیش ژنوم RNA به وزن ۳۵۰۰ باز عمل می‌کند. پیش ژنوم به توسط یک علامت بسته‌بندی کنندگی packaging signal در نزدیک به انتهای '۵ از مولکول RNA به درون ذرات سنتز شده جدید جسم مرکزی به توسط کپسید، پوشیده می‌گردد. پیش ژنوم به عنوان الگویی برای آنزیم نسخه‌برداری معکوس ویروس عمل کرده و این آنزیم در درون ژن پلیمراز کد می‌گردد. با شروع فعالیت آنزیم RNAase H از آنزیم پلیمراز، RNA به عنوان الگو برای DNA با رشته منفی عمل می‌کند. سنتز DNA با رشته مثبت در درون جسم مرکزی کامل می‌شود که در نتیجه

آن، واسطه‌های همانندسازی حاوی DNA با رشته منفی با طول کامل به علاوه DNA با رشته مثبت با طول متغیر خواهند بود.

ذرات جسم مرکزی که حاوی این واسطه‌های همانندسازی DNA هستند، از غشاهای پیش گلژی Pre-Golgi membranes پس از کسب آنتی‌ژن HBsAg جوانه زده و ممکن است از سلول خارج شده یا این‌که مجدداً در چرخه عفونت داخل سلولی وارد شود.



شکل ۵- تکثیر ویروس

نحوه اتصال ویروس به سلول‌ها

اتصال ویروس به هپاتوسیت‌ها از طریق گلیکوپروتئین‌های HBsAg صورت می‌گیرد. به نظر می‌رسد، پروتئین‌های pre-S در این امر نقش عمده داشته باشند. گیرنده‌های مختلف سلول‌های کبدی از جمله گیرنده ترانسفرین، گیرنده آسیالوگلیکوپروتئین و اندونکسین کبد انسان در اتصال ویروس به هپاتوسیت‌ها نقش دارند. ویروس به روش آندوسیتوز وارد سلول‌های کبدی می‌شود. HBsAg به آلبومین پلی‌مریزه شده سرم انسان و دیگر پروتئین‌های سرم متصل شده و این واکنش ممکن است سبب سهولت اتصال و دریافت ویروس توسط کبد گردد. در اردک کربوکسی پپتیداز D به عنوان رسپتور برای ورود ویروس به سلول‌ها تایید شده است.

محل اصلی ویروس در بدن

در انسان محل اصلی درگیری، کبد بوده ولی ویروس در سلول‌های خونی، مغز استخوان، کلیه و پانکراس، بافت و غدد لنفاوی، به خصوص سلول‌های مونونوکلئر و لنفوسیت‌های خون محیطی بیمارانی که HBsAg مثبت یا منفی هستند، یافت می‌شود.

سروتایپ و ژنوتایپ ویروس

ویروس دارای ۴ سروتایپ ayw، ayr، adw، adr بوده، که به صورت اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیکی روی پروتئین‌های پوششی عرضه می‌شود. براساس این اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیکی ویروس دارای ۸ ژنوتایپ A-H بوده، که در توالی نوکلئوتیدهای ژنوم دیده می‌شود. ژنوتایپ‌ها انتشار جغرافیایی متفاوتی داشته و ژنوتایپ‌های مختلف در انتشار، ایجاد پاسخ ایمنی، هم‌چنین پاسخ به واکسن موثر می‌باشد.

در سال ۱۹۸۸ ژنوتایپ‌های A تا F با تفاوت حدود ۸٪ توالی در آن‌ها مطرح شد، اخیرا دو ژنوتایپ جدید G و H نیز به آن‌ها اضافه گردید. ژنوتایپ D در ترکیه، حاشیه دریای مدیترانه، مصر و ایران بیشتر دیده می‌شود.

ژنوتایپ‌ها در ایران

در طی یک بررسی توسط زالی در سال ۱۹۹۸ در استان خراسان ژنوتایپ D از بیماران مبتلا به HBsAg مثبت گزارش گردید. در این مطالعه ساب‌ژنوتایپ D_1 با ساب‌تایپ ayw_2 مشاهده گردید.

در مطالعه‌ای دیگر توسط علویان در سال ۲۰۰۴ در تهران از بیماران ژنوتایپ D به‌دست آمد. ژنوتایپ D۱ در ۹۸/۵۲٪، ژنوتایپ D۲ در ۰/۷۴٪ و ژنوتایپ D۳ ۰/۷۴ ٪افراد دیده شد(۱۱). ساب‌تایپ ۲ aywبا ۹۴/۴٪، ساب‌تایپ ayw۱ با ۲/۸٪، ساب‌تایپ ayw۳ و ساب‌تایپ ayw۴ با ۰/۴٪ مشاهده گردید. تفاوت بین ژنوتایپ‌ها در ایجاد شدت بیماری، درگیر نمودن کبد، پاسخ به درمان و عمل‌کرد واکسیناسیون دخالت دارد.

راه‌های انتقال

۱- راه اصلی انتقال ویروس از طریق تزریق خون و فرآورده‌های خونی بوده و وسایل دندانپزشکی آلوده، سرنگ و سرسوزن آلوده، تماس جنسی حفاظت نشده، استفاده از وسایل اصلاح و تیغ صورت تراشی، انتقال از مادر به جنین، تماس با ترشحات بدن مانند مایع منی، ترشحات واژن و بزاق آلوده، شیر مادر آلوده، هم‌چنین خال‌کوبی و سوراخ کردن گوش صورت می‌گیرد. از طریق دستگاه گوارش در مواردی که تعداد زیادی ویروس خورده شود، بیماری ایجاد می‌گردد.

۲- بیماری در مصرف کنندگان مواد مخدر داخل وریدی به جهت استفاده از سرنگ و سرسوزن‌های مشترک آلوده، بیماران دریافت کننده خون و فرآورده‌های خونی، کارکنان مراکز بهداشتی بخصوص کادر مراکز همودیالیز، دریافت کنندگان عضو، افراد همودیالیزی، شیرخوارانی که از مادران آلوده به‌دنیا آمده‌اند، بیشتر دیده می‌شود.

۳- بیماری در افراد هم‌جنس باز نیز بیشتر مشاهده می‌شود.

۴- انتقال مدفوعی-دهانی و انتقال عفونت از راه تماس با ادرار آلوده گزارش نشده است.

۵- انتقال ویروس از طریق اعضا پیوند شده از فرد اهداء کننده عضو که از نظر HBsAg مثبت باشد، حتی در پیوند قرینه نیز موجب انتقال عفونت ویروس می‌گردد.

۶- عفونت از طریق گاز گرفتن در کودکان، تماس با ترشحات زخم‌های باز نیز امکان‌پذیر می‌باشد.

۷- احتمال آلوده شدن در اثر فرو رفتن سوزن اگر بیمار HBeAg منفی باشد، ۵-۲٪ و در صورت مثبت بودن HBeAg فرد ۴۰-۲۷٪ ذکر شده است.

پاتوژنز و ایمنی

ویروس هپاتیت B می‌تواند بیماری مزمن را با علائم بالینی و یا بدون علائم بالینی خاصی ایجاد نماید، که به سطح پاسخ ایمنی فرد نسبت به عفونت بستگی دارد. وجود HBsAg و HBeAg در خون نشان دهنده وجود عفونت فعال می‌باشد. ذرات HBsAg حتی بعد از پایان یافتن رهایی ویریون، حتی تا رفع عفونت به درون خون وارد می‌شود. تحریک ایمنی سلولی و ایجاد التهاب موجب بروز علائم بیماری شده و پاک‌سازی عفونت با حذف

سلول‌های کبد آلوده آغاز می‌شود. با آغاز ترشح اینترفرون پاسخ ایمنی، با افزایش بیان آنتی‌ژن MHC آغاز می‌شود. سلول‌های سایتوتوکسیک کشنده T در مقابل پپتیدهای آنتی‌ژن‌های HBs، HBc، HBe آشکار می‌شوند. اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن HBc، آنتی‌ژن‌های برجسته برای سلول‌های T می‌باشند. در حالت کلی پاسخ ناکافی سلول T در برابر عفونت موجب ایجاد علائم خفیف بیماری و ناتوانی در حذف عفونت و در نتیجه سیر بیماری به سمت هپاتیت مزمن می‌گردد.

وجود مقادیر زیادی از HBsAg در سرم به آنتی‌بادی خنثی کننده متصل شده و عمل آنتی‌بادی خنثی کننده را متوقف می‌سازد بدین ترتیب، توانایی آنتی‌بادی در حذف عفونت محدود می‌گردد. کمپلکس‌های ایمنی بین HBsAg و anti- HBs تشکیل شده و در بروز واکنش‌های حساسیت شدید تیپ III دخالت می‌کند. این حالت منجر به بروز مشکلاتی همانند التهاب عروق، درد مفصل‌ها، راش، کهیر و آسیب کلیه می‌گردد. در کودکان به دلیل ناکامل بودن پاسخ ایمنی سلولی کمتر قادر به حذف عفونت نمی‌باشند. حدود ۹۰٪ اطفال که قبل از تولد آلوده شده‌اند، ناقل مزمن خواهند شد و تکثیر ویروس در این افراد به مدت طولانی‌تری ادامه می‌یابد. عفونت فولمینانت، عفونت‌های مزمن فعال شده یا عفونت مشترک با عامل دلتا HDV می‌تواند به آسیب همیشگی و غیرقابل برگشت کبد و سیروز منجر گردد.

سرطان کبد با منشا هپاتیت B موجب مرگ حدود ۲۵۰ هزار تا ۱ میلیون نفر در هر سال در سراسر جهان می‌شود. هپاتیت B ممکن است سرطان اولیه سلول کبدی را با افزایش ترمیم ممتد بافت کبد و رشد سلولی در پاسخ به آسیب بافت یا با اتصال به کروموزوم میزبان و تحریک مستقیم رشد سلولی را القاء نماید. این اتصال می‌تواند ترتیب مجدد ژنتیکی را تحریک نموده یا پروموتورهای ویروسی را مجاور ژن‌های کنترل کننده رشد سلولی قرار دهد. روش دیگر وجود نوعی پروتئین بوده که به‌وسیله ژن HBVx کد می‌شود. این ژن احتمالاً رونویسی پروتئین‌های سلولی را فعال نموده و رشد سلولی را تحریک کند. وجود ژنوم وجود ژن x احتمالاً با ایجاد جهش خاصیت سرطان‌زایی را در بافت کبد افزایش دهد.

علائم بالینی

علائم بالینی بعد از ۱۸۰-۵۰ روز شروع می‌شود. به‌دلیل طولانی بودن دوره کمون بیماری هپاتیت B، به این بیماری هپاتیت با دوره نهفتگی طولانی و هپاتیت سرمی نیز گفته می‌شود. علائم بیماری مشابه با هپاتیت A و سایر هپاتیت‌های ویروسی است، که بوسیله انجام آزمایشات سرولوژیکی همانند الایزا می‌توان نوع ویروس را تشخیص داد.

علائم بیماری به صورت بی‌اشتهایی، بی‌قراری، تهوع و استفراغ، درد بدن، درد در مفصل‌ها، تب، ادرار پر رنگ و تیره، یرقان، خارش پوست، گاهی خستگی و درد شکم نیز وجود داشته و در مواردی لرز نیز مشاهده می‌گردد. پلی‌آرتریت نودوزا polyarterities nodosa در این افراد نیز شایع می‌باشد. علائم کلنیکی یرقان به علت آسیب کبد به صورت زردی، ادرار تیره و سیاه رنگ و مدفوع کم رنگ حتی بی‌رنگ ایجاد می‌گردد. در برخی موارد یک بیماری زود گذر مانند بیماری سرم، با علائمی مانند کهیر و راش، پلی‌آرترالژی و آرتریت غیرمهاجر، پلی‌آرتریت‌ندوزا و گلومرولونفریت مشاهده می‌شود. کمپلکس‌های ایمنی در حال گردش به عنوان عامل ایجاد این علائم می‌دانند. در موارد بسیار نادر سرفه و آبریزش بینی دیده شده، در حالت ایجاد هپاتیت حاد تهوع و استفراغ و بی‌اشتهایی همراه با تغییر در حسن بویایی و چشایی دیده می‌شود.

افتراق بیماری از سایر عفونت‌ها

به دلیل شباهت علائم بالینی بیماری هپاتیت B با سایر بیماری‌های ویروسی که ممکن است باعث هپاتیت شوند مانند، مونونوکلئوز عفونی، تب زرد، سرخجه، لپتوسپیروز، سیتومگال، اپشتین بار، سرخک، هرپس، تب Qو آمیبیازیس، سایر علل مانند انسداد مجاری صفراوی، سیروز صفراوی اولیه، بیماری ویلسون، مسمومیت‌های دارویی مانند مسمومیت با آسپرین، استامینوفن، ایزونیازید و واکنش‌های افزایش حساسیتی نسبت به برخی مواد مانند الکل، تتراکلرید کربن افتراق داده شود.

ویژگی‌های انحصاری هپادناویروس‌ها

- ویریون دارای پوشش بوده و برخلاف سایر ویروس‌های پوشش‌دار در برابر عوامل مختلف محیطی پایدار می‌باشد، که این حالت برای این ویروس‌ها غیرمعمول است. ویروس هپاتیت B در برابر اتر، pH پایین، انجماد، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مقاوم بوده و به عوامل ضدعفونی کننده مانند الکل مقاوم می‌باشد.
- تکثیر از طریق یک mRNA حلقوی انجام می‌گیرد.
- ویروس حاوی یک ترانس کریپتاز معکوس می‌باشد.
- توانایی کد کردن چند پروتئین را داشته مانند (HBc / HBe [L, M, S] HBsAg) که توالی‌های ژنتیکی مشترکی داشته اما کدون‌های شروع آنها متفاوت است.
- سلول‌های آلوده با ویروس هپاتیت B، مقادیر زیادی از ذرات HBsAg فاقد DNA را تولید و آزاد می‌کنند.
- ویروس حاوی ژنوم DNA حلقوی، با زنجیره مضاعف ناقص است.
- ژنوم ویروس توانایی ورود به کروموزوم ژنوم میزبان را دارد.

مقاومت ویروس

ویروس به عوامل محیطی بسیار مقاوم بوده در مقابل ذوب و یخ‌زدگی‌های مکرر مقاوم می‌باشد. به حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه مقاوم بوده و در مقابل خشکی و حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته پایدار می‌ماند، ولی به دمای بالاتر حساس بوده و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در عرض یک دقیقه از بین می‌رود. ویروس pH حدود ۲ تا ۶ را به راحتی تحمل کرده و در مقابل اشعه ماوراء بنفش در داخل پلاسما و محصولات خونی از بین نمی‌رود. محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ می‌تواند ویروس را در مدت ۳ دقیقه از بین ببرد. ویروس حتی ۱۵ سال پس از نگه‌داری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد هنوز عفونت‌زایی خود را در سرم حفظ می‌نماید.

تفسیر تست‌های آزمایشگاهی هپاتیت B

HBsAg: در تشخیص عفونت مزمن یا حاد به کار می‌رود. اولین آنتی‌ژن ظاهر شده در جریان خون در طی عفونت فعال و حاد می‌باشد. این آنتی‌ژن در مرحله بهبودی از عفونت ناپدید می‌شود. پایداری آن به مدت بیش از ۶ ماه دلیل

بر مزمن شدن عفونت است. در موارد حاد همراه با سطوح بالایی از آنتی‌بادی‌های anti - HBc از نوع IgM دیده می‌شود. این آنتی‌ژن در مدت ۴۱-۲۷ روز بعد از ورود عفونت به بدن ظاهر می‌شود. از این آنتی‌ژن جهت تشخیص بیماری هپاتیت B و تشخیص افتراقی با سایر عوامل هپاتیت به‌کار می‌رود.

HBsAb: وجود این آنتی‌بادی بدون وجود HBsAg نشانه بهبودی از عفونت یا واکسیناسیون فرد می‌باشد. حدود ۳ ماه پس از واکسیناسیون ۹۰٪ افراد مصئونیت یافته و در موارد نادری در اثر موتاسیون ویروس حتی با وجود آنتی‌بادی مثبت، فرد به هپاتیت B مبتلا می‌شود. میزان این آنتی‌بادی با گذشت زمان کاهش می‌یابد. در موارد نادری از عفونت مزمن هم آنتی‌بادی HBsAb و هم آنتی‌ژن HBsAg دیده می‌شود.

HBeAg: وجود این آنتی‌ژن نشان‌گر همانندسازی شدید ویروس و شاخص عفونت‌زایی بالای خونی فرد آلوده است. تقریباً یک هفته بعد از ظهور HBsAg این آنتی‌ژن نیز در خون ظاهر می‌شود. این آنتی‌ژن، آنتی‌ژن پوشش ویروس بوده که آنتی‌ژن پروتئین نوکلئوکپسیدی محلول را تولید کرده و محصول ژن C می‌باشد. پایداری این آنتی‌ژن به مدت طولانی در هپاتیت B مزمن خطر بروز سیروز و سرطان کبد را افزایش می‌دهد. در مادران باردار وجود آن نشان‌گر احتمال انتقال عفوونت به جنین را حتی حدود ۹۰٪ افزایش می‌دهد. عدم وجود این آنتی‌ژن در افراد مثبت از نظر HBsAg دلیل نبودن عفونت نمی‌باشد. اندازه‌گیری آن برای پی‌گیری درمان در عفونت‌های مزمن به‌کار می‌رود. موتاسیون در ناحیه pre core مانع از بروز HBeAg شده، که با وجود منفی بودن HBeAg فرد شدیداً عفونت‌زاست.

HBeAb: بعد از حذف HBeAg در بدن ظاهر شده و شاخص کاهش عفونت‌زایی ویروس است.

HBcAg: یک آنتی‌ژن داخل سلولی است که بیان‌گر عفونت هپاتوسیت‌ها بوده و در سرم قابل جستجو نمی‌باشد. وجود مقادیر زیادی از HBcAg در سلول‌های کبدی نشانه تکثیر و فعال بودن ویروس می‌باشد. این آنتی‌ژن در جریان خون وارد نمی‌شود.

HBcAb: اولین آنتی‌بادی اختصاصی است که ۲ هفته پس از ظهور HBsAg قابل ردیابی است. این آنتی‌بادی شاخص مرحله window می‌باشد. پاسخ ایمنی میزبان را یک نقش کلیدی، در پاک‌سازی عفونت می‌دانند(۳۸).

در مرحله اولیه عفونت آنتی‌بادی تولید شده از نوع IgM بوده و وجود آنتی‌بادی از نوع IgG دلیل یک عفونت قدیمی است، که حتی مدت‌ها پس از عفونت نیز باقی می‌ماند.

HBV DNA: از این تست جهت پی بردن به تکثیر ویروس در کبد استفاده شده که یک مارکر بسیار اختصاصی می‌باشد. یک هفته پس از آلودگی، عفونت با این روش قابل ردیابی است. وجود مقادیر بالایی از DNA ویروس نشانه فعالیت شدید و تکثیر ویروس می‌باشد. این تست معمولاً در تشخیص اولیه عفونت به‌کار نمی‌رود و بیشتر در مراحل اولیه درمان عفونت و اطمینان از موفقیت‌آمیز بودن درمان استفاده می‌شود. در فاز غیرفعال ویروس مقادیر آن بسیار پایین آمده و حتی در برخی موارد قابل شناسایی و اندازه‌گیری نمی‌باشد. روش PCR یک روش بسیار حساس برای اندازه‌گیری میزان HBV DNA می‌باشد. این روش مناسب برای پی بردن به فعال یا غیرفعال بودن ویروس می‌باشد. در دوره کمون بیماری حدود یک میلیون ذره ویروس در هر میلی‌لیتر خون وجود داشته و در حالت فعال بیماری یا دوره حاد چندین میلیون ذره ویروس در هر میلی‌لیتر خون یافت می‌شود.

وجود anti - HBc مثبت به همراه HBeAg منفی و HBV DNA منفی دال بر بهبودی عفونت است. وجود HBcAg و HBV DNA در بافت کبدی دلیل بر فعالیت و تکثیر شدید ویروس است.

مروری بر تاریخچه هپاتیت

برای اولین بار در قرن پنجم قبل از میلاد بقراط یرقان اپیدمیک را شرح داد.

از اولین اپیدمی‌های هپاتیتی گزارش شده توسط لورمان در سال ۱۸۸۵ به‌دنبال تلقیح واکسن آبله حاوی لنف انسانی بوده است.

در فواصل سال‌های ۱۹۳۵ تا ۱۹۴۵ تقریباً هم‌زمان با شروع جنگ جهانی دوم شیوع بالایی از هپاتیت، پس از واکسیناسیون سرخک و تب زرد مشاهده شده است.

از اوایل دهه ۱۹۴۰ نظریه انتقال بیماری از طریق خون، به دلیل ایجاد بیماری پس از تزریق خون به افراد سالم مطرح گردید.

در سال ۱۹۴۷، مک کالوم هپاتیت را به دو نوع هپاتیت عفونی (هپاتیت A) و هپاتیت سرمی (هپاتیت B) تقسیم‌بندی نمود.

طراحی اولین الایزا در سال ۱۹۶۰ توسط روزالین ساسمن یالو و سولومون برسون جهت اندازه‌گیری انسولین در پلاسما ابداع شد، و در سال ۱۹۶۶ این روش توسط جرکرپورت تکمیل گردید. در سال ۱۹۷۱ پیتر پرمنن و اوا اینگوال در دانشگاه استکهلم سوئد به دانش کامل ساخت الایزا دست یافتند. با به کارگیری این روش جهت تشخیص انواع عفونت‌ها، از این روش برای تشخیص عفونت هپاتیت نوع B نیز به‌تدریج استفاده گردید.

در سال ۱۹۶۵ اولین آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B توسط باروچ بلومبرگ در خون افراد هموفیلی و بیماران لوسمیک به‌دست آمد. بلومبرگ به‌دلیل کشف این آنتی‌ژن، جایزه نوبل پزشکی را در آن سال دریافت کرد. بلومبرگ از اولین افرادی، که جهت تشخیص بیماری استفاده از روش‌های آزمایشگاهی را مطرح نمود.

ویروس هپاتیت B، به‌نام آنتی‌ژن استرالیایی نیز نامیده می‌شود. دلیل این امر واکنش نمونه‌های حاوی این آنتی‌ژن با آنتی‌بادی‌های موجود در سرم بیماران هموفیلی بومیان استرالیا می‌باشد.

در سال ۱۹۶۵ سازمان بهداشت جهانی برای اولین بار عامل ایجاد بیماری هپاتیت B را یک DNA ویروس از خانواده هپادناویریده اعلام کرد.

طرح ساخت اولین واکسن توسط بلومبرگ در سال ۱۹۶۹، با حرارت دادن نمونه‌های سرم آغاز گردید.

در سال ۱۹۷۰ ذره کامل ویروسی Dane partical توسط دان در زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده گردید. در این سال بیماری را با استفاده از تزریق سرم آلوده انسانی در شامپانزه‌ها ایجاد کردند.

از سال ۱۹۷۱ بررسی خون‌های اهدایی در مراکز انتقال خون، از نظر وجود ویروس هپاتیت B شروع گردید.

اولین مطالعه جهت بررسی شیوع عفونت هپاتیت B در ایران از سال ۱۹۷۲ توسط علویان آغاز شد که میزان شروع را ۲/۱-۱٪ در بین افراد گزارش کردند و میزان عفونت در خون‌های اهدایی را ۳/۵-۲/۴۹٪ اعلام نمودند.

در سال ۱۹۷۵ اولین کیت الایزا جهت شناسایی HBsAg به نام HEPANOSTIKA توسط Organo Teknika در هلند ساخته شد، و درسال ۱۹۷۶ اولین غربال‌گری بیماری هپاتیت B توسط سوبس لاواسکی به روش الایزا انجام گرفت.

از سال ۱۹۷۶ برنامه‌ای از طرف بهداشت جهانی جهت تشخیص و پیش‌گیری بیماری هپاتیت ارائه شد.

توالی ژن ویروس هپاتیت B در سال ۱۹۸۰ به‌دست آمد، هم‌چنین در این سال ویروس هپاتیت C نیز کشف گردید.

در سال ۱۹۸۱ اولین واکسن به نام Heptavax که از پلاسمای انسانی تهیه شده بود و به‌نام واکسن پلاسمایی نامیده می‌شد، از طرف FDA جهت مصرف تایید گردید. این واکسن به دلیل تهیه شدن از پلاسمای افراد آلوده موجب آلودگی در افراد سالم پس از تزریق شد. از اوایل دهه ۱۹۹۰ این واکسن منسوخ گردید.

در سال ۱۹۸۶ اندازه‌گیری HBcAb با روش‌های آزمایشگاهی مقدور گردید.

از اوایل سال ۱۹۸۶ ساخت واکسن‌های نوترکیب آغاز گردید و در ۲۳ جولای ۱۹۸۶ اولین واکسن نوترکیب، در مرکز تحقیقات دارویی مرک در آلمان مجوز تولید و مصرف گرفت. این واکسن از وارد کردن ژن per-S در مخمر ساکارومایسیس سرویسیه به‌دست آمد.

در سال ۱۹۸۸ اوکاموتو وجود ساب‌تایپ را در ویروس مطرح کرد.

از سال ۱۹۹۰ غربال‌گری خون‌های اهدایی از نظر هپاتیت B اجباری گردید.

از اوایل سال ۱۹۹۰ در مرکز غربال‌گری بیماری‌های اندمیک کشور سویس برای اولین بار توسط لووریک بر روی خون‌های اهدایی، روش PCR جهت تشخیص و شناسایی عفونت هپاتیت B مورد استفاده قرار گرفت.

از سال ۱۹۹۳ واکسیناسیون تمام نوزادان بدو تولد در ایران شروع گردید.

از سال ۲۰۰۰ به بعد کلونینگ و بیان آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس توسط روش‌های بیولوژی ملکولی به‌خصوص انواع روش‌های PCR ابداع گردید.

از سال ۲۰۰۲ تشخیص بیماری به روش PCR توسط هولینگر ابداع شد.

در سال ۲۰۰۴ تعیین ژنوتایپ هپاتیت B در تهران در مرکز هپاتیت ایران شروع و استخراج DNA به روش فنل - کلروفرم صورت گرفت. در این سال استخراج DNA و تعیین ژنوتایپ در استان گلستان نیز با این روش انجام گرفت. در این بررسی از ۶۷۹ بیمار مبتلا به هپاتیت B، ۶۹٪ ژنوتایپ D به‌دست آمد .

در دسامبر سال ۲۰۰۷ کلونینگ و بیان آنتی‌ژن سطحی ویروس به روش PCR در مرکز تحقیقات بین‌المللی و مهندسی بیوتکنولوژی در تهران توسط مژگان بندرپور و مهوش خدابنده صورت گرفت.

تعیین ساب تایپ‌های ویروس هپاتیت B در دانشگاه شهید بهشتی در سال ۲۰۰۸ توسط سعید رضامحبی، صمد امینی، نرگس زالی به روش PCR انجام پذیرفت. ژنوتایپ D، ژنوتایپ غالب بوده و از ۵۳۹ نمونه مورد بررسی ساب‌تایپ ayw۱ در ۷۱/۲٪ موارد به‌دست آمد .

در سال ۲۰۰۸ استخراج DNA و تعیین ساب‌تایپ‌ها در دانشگاه شهید بهشتی توسط سعیدرضا محبی، صمد امینی به روش PCR انجام یافت. ژنوتایپ غالب نوع D اعلام گردید.

از اوایل سال ۲۰۰۹ تست‌های تشخیصی بر مبنای استفاده از اسید نوکلئیک ویروس ابداع گردید.

روش‌های تشخیص بیماری هپاتیت B

الایزا ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

تست الایزا در حالت معمول برای ردیابی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی بکار می‌رود. بدین ترتیب که یکی از این دو ماده در بستر جامد ثابت می‌شود و برای ردیابی آنتی ژن یا آنتی بادی بکار گرفته می‌شود، اما اساسا برای ردیابی هر جفت ماده‌ای که مثل جفت آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به هم گرایش داشته و قدرت اتصال مناسبی نسبت به هم دارند نیز می‌تواند بکار گرفته شود (مثلا لکتین به لیگاند مربوطه‌اش یا مولکول به گیرنده اختصاصی اش) البته این پدیده یعنی اتصال بین دو ماده‌ای که آنتی‌بادی و آنتی‌ژن نیستند، اما گرایش به هم دارند اغلب اوقات مشکل آفرین است و برای بالا بردن حساسیت و اختصاصیت اتصال بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن در الایزا باید این اتصالات ناخواسته را به طریقی مهار کرده و یا کارهای جبرانی لازم را در نظر گرفت.

۱) تست الیزا برای جستجوی آنتی‌ژن

ELISA روش بسیار حساسی است که (معمولا) برای جستجوی آنتی‌ژن یا آنتی بادی بکار میرود در تحت شرایط تنظیم شده (از نظر غلظت یونی و pH) پروتئین‌ها (آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی) به طور خودبخود تمایل دارند که به بستر جامد (در این تست plate هایی از جنس پلی استیرن) متصل شوند، ماهیت این اتصال بخوبی معلوم نشده است اما برگشت پذیر بوده و با استفاده از pHهای بالاتر یا پایین‌تر و استفاده از غلظت‌های یونی بالا اتصال قطع می‌شود این نوع اتصال خودبخودی اگر چه ظرفیت محدودی دارد ولی با بکارگیری سیستم‌های تقویتی مناسبی مثل سیستم آنزیم-سوبسترا این اتصالات وسیله بسیار خوبی برای طراحی سیستم الایزا گردیده است.

برای انجام الایزا:

۱) ابتدا باید پروتئین مورد نظر را به کف پلیت چسباند.

۲) نقاط اتصال باقی مانده را باید با محلول پروتئینی مناسب مسدود کرد.

۳) محلول مورد آزمایش را اضافه کرد تا دو ماده همدیگر را پیدا کرده و متصل شوند.

۴) سیستم‌های تقویتی اولیه را برای افزایش حساسیت آزمایش را بکار گرفت.

۵) سیستم آنزیمی نهایی را به راه انداخته و رنگ نهایی تولید شده را اندازه گرفت.

حال این **۵** مرحله به تفکیک توضیح داده می‌شوند:

۱) اتصال پروتئین به کف پلیت (Coating):

آنتی‌ژن (یا آنتی بادی) در مقادیری در حدود میکروگرم به داخل چاهک پلیت الایزا اضافه شده و فرصت داده می‌شود تا به مقدار کافی به کف چاهک (well) متصل شود، برای اینکار بسته به نوع پروتئین بافرهای مختلفی به کار گرفته می‌شود و غلظت پروتئین نیز باید مناسب‌سازی شود. در مقادیر بسیار پایین حساسیت ردیابی پایین می‌آید و در مقادیر بالای آنتی‌ژن اتصالات سستی برقرار می‌شود که در مراحل بعدی کنده شده و هنگام شستشو آنتی‌ژن همراه با آنتی‌بادی اختصاصی دفع می‌شوند و لذا حساسیت تست مجددا پایین می‌آید.

بطور کلی این مرحله اساسی بوده و نقش زیادی در نتیجه نهایی دارد ایده‌آل‌های مورد انتظار برای این مرحله شامل موترد زیر می‌باشد:

الف) مقدار آنتی‌ژن متصل شده به کف همه چاهک‌های یک پلیت باید یکنواخت باشند و کمترین واریانس را در نتیجه ایجاد کنند، بدین معنی که وقتی یک نمونه واحد را در چند چاهک مختلف منتقل نموده و آزمایش کنیم باید نتایج بدست آمده به هم نزدیک بوده و حداقل خطا را نشان دهند. همچنین اگر آزمایش مورد نظر در حجم بالا انجام می‌گیرد و چند پلیت را هم زمان کوت نموده و استفاده می‌کنیم باید جنس پلیت‌ها یکسان باشد تا از خطای مربوط به تفاوت در قدرت اتصال پلیت‌ها جلوگیری شود و ترجیحا بافر کوتینگ و زمان کوتینگ و محلول آنتی‌ژنی آماده شده برای کوتینگ بهتر است یکسان باشند.

ب) اتصالات برقرار شده بین آنتی‌ژن و بستر جامد باید به اندازه کافی محکم و قوی باشند تا در مراحل شستشوی بعدی کنده نشوند، معمولا برای آنتی‌ژن‌های عادی، اتصال دهنده اضافی لازم نیست ولی اگر آنتی‌ژنی استثنائاً با روش معمول به کف پلیت نچسبید یا اتصالات سستی برقرار کرد از مواد و روش‌های خاصی برای اتصال آنتی‌ژن به کف بستر استفاده می‌شود (مثلاً استفاده از گلوتارآلدئید یا اشعه ایکس یا ...).

ج) پروتئین متصل شده نباید آنقدر کم باشد که نتواند مقادیر بالای آنتی‌بادی را جذب کند در این صورت غلظت‌های بالای آنتی‌بادی قابل تشخیص نخواهد بود از طرفی پروتئین متصل شده نباید آنقدر زیاد باشد که اتصالات غیراختصاصی از اتصالات اختصاصی بیشتر شوند که در این صورت جواب آزمایش قابل اعتماد نخواهد بود.

۲) مرحله مسدود سازی یا بلوکینگ (blocking):

نقاطی از کف پلیت که با پروتئین اختصاصی پوشانده نشده‌اند با استفاده از محلول‌های پروتئینی خنثی پوشانده می‌شوند محلول‌های پروتئینی برای این منظور حاوی شیر کم چربی یا آلبومین گاوی یا ژلاتین و یا کازئین می‌باشند. علاوه بر پروتئین از دترژانت‌های غیریونی خاصی نظیر Tween 20 یا Tween 80 نیز به عنوان مواد کمکی استفاده می‌شوند، نوع این مواد و مقادیر بکار برده شده به صورت تجربی تعیین می‌شوند و با توجه به

تجربیات دیگران می‌توان محدوده خاصی را برای کار مورد نظر امتحان کرد و بهترین غلظت را بدست آورد (چون پروتئین‌ها از ریشه‌های جانبی متفاوتی برخوردارند لذا برای پروتئین‌های بسیار خالص مثل پروتئین‌های ریکامبینانت مناسب‌سازی این ترکیبات در بالا بردن اعتبار نتایج بسیار کمک کننده خواهد بود). علاوه بر پروتئین و دترژانت، غلظت یونی بافر بلوک کننده نیز اهمیت زیادی دارد و برای اتصال انتخابی پروتئین مورد نظر (از میان مخلوط پروتئینی) می‌توان بافرهای مختلف و غلظت یونی متفاوت را ارزیابی کرده و بهترین بافر را برای آزمایش مورد نظر بدست آورد.

۳) اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی:

محلول مورد آزمایش که احتمال می‌رود حاوی مقادیر قابل ردیابی از آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن اختصاصی موجود در کف پلیت می‌باشد در این مرحله در بافر مناسبی تهیه و اضافه می‌شود. آنتی‌بادی شناور در محلول، آنتی‌ژن متصل به بستر را پیدا کرده و به آن متصل می‌شود بندرت این آنتی‌بادی متصل به آنزیم است. اما در اغلب اوقات کونژوگه آنزیم دار در مرحله بعدی بکار گرفته می‌شود.

آنتی‌بادی‌های متصل نشده با عمل شستشو از محیط حذف می‌شوند و بافر شستشو معمولا دارای پروتئین خنثی در یک محلول بلوکان است. دترژانت از نظر قدرت و pH بافری مناسب برای اتصال آنتی‌ژن با آنتی‌بادی است. آنتی‌بادی‌ها، سرم، و محلول‌های بکار گرفته شده در مراحل مختلف الایزا معمولا در بافر شستشو رقیق می‌شوند.

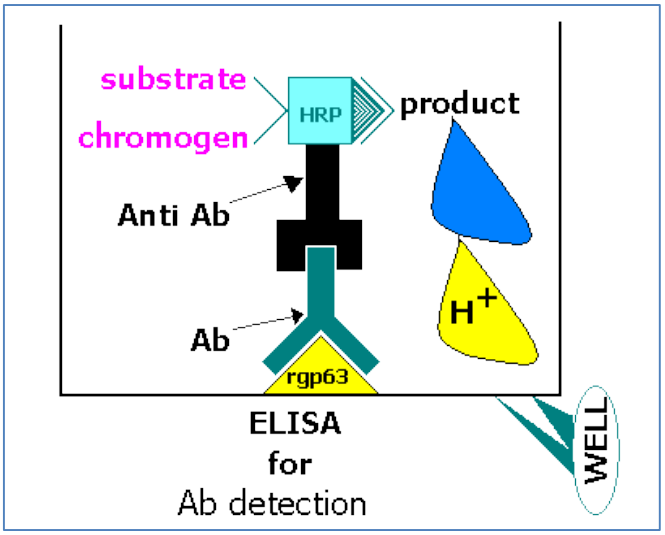
۴) سیستم‌های تقویتی اولیه:

سیستم تقویتی اولیه قبل از سیستم تقویتی اصلی (که همانا بکار گرفتن خصوصیت آنزیم‌هاست) می‌باشد در این مرحله واکنش‌های اضافه‌تری به کار می‌گیریم تا قدرت اندازه‌گیری تست (حساسیت و اختصاصیت) بالا برده شود.

بدین منظور از قدرت تقویت‌کنندگی بیوتین-آویدین، بیوتین-استرپتاویدین، لکتین-لیگاند و ... استفاده می‌شود.

۵) تقویت آنزیمی:

هر آنزیمی بر روی سوبسترای اختصاصی خود اثر کرده و آنرا به محصول تبدیل می‌کند این واکنش در طی زمان منجر به جمع شدن مقدار متنابهی از محصول در محیط می‌شود بدین معنی که با گذشت زمان معینی یک مولکول آنزیم می‌تواند مولکول‌های سوبسترای بسیاری را به محصول تبدیل کند این اثر افزایشی در حقیقت اساس الایزا را تشکیل می‌دهد. بدین ترتیب که آنتی‌بادی نهایی باقی مانده پس از شستشوی نهایی با مولکول آنزیم متصل است و افزودن سوبسترا در طی زمان معینی (مثلاً یک ساعت) منجر به آزاد سازی مقادیر متنابهی سوبسترا می‌گردد که یا خود رنگی می‌باشد یا در واکنش با ماده دیگری (کروموژن یا رنگزا) که به محیط اضافه شده است رنگ تولید می‌کند. در نهایت رنگ تولید شده توسط دستگاه قرائت کننده مخصوصی خوانده شده و محاسبات لازم بر روی داده‌های بدست آمده انجام می‌گیرد.



شکل ۶

فسفرسانس، فلوئورسانس، لومینسانس

پدیده هایی هستند که در آنها یک ماده خاص که بطور عام به آن فسفر گفته می‌شود که پس از قرار گرفتن در مقابل نور مریی یا غیرمریی یا حرارت (تحریک شده) این انرژی را در خود ذخیره می‌کند، و سپس آن انرژی را بصورت طیفی از امواج مرئی در طول مدت زمانی منتشر می‌کند.

اگر زمان تحریک کمتر از ۱۰ به توان ۸- ثانیه باشد، این پدیده را Fluorescent می‌نامیم و اگر زمان تحریک بیش از ۱۰ به توان ۸- ثانیه باشد آن را Phosphorescent می‌نامیم.

به عبارتی در فسفرسنس تحریک طولانی‌تر و تشعشع طولانی‌تری داریم و در فلوئورسنس تحریک کوتاهترتر و تشعشع کوتاهتری داریم.

در فلوئورسانس که نمونه آن نور مهتابی یا صفحه تلویزیون است تابش آنی است و تقریبا بلافاصله بعد از قطع نور تمام می‌شود. در حالی که در فسفرسانس ماده بعد از قطع نور نیز تا مدتی به تابش ادامه می‌دهد که مقدار آن بسته به ماده مورد استفاده می‌تواند از چند ثانیه تا چند روز طول بکشد. در فلوئورسانس برانگیختگی میان دو تراز اصلی با انرژی‌های E1,E2 اتفاق می‌افتد که جابجایی بین أنها کاملا آزاد است. الکترون با دریافت انرژی بر انگیخته شده وبه تراز E2 می‌رود وپس از ۸تا ۱۰ ثانیه دوباره به تراز اول بر می‌گردد و فتونی با انرژی E2-E1 تابش می‌کند اما در فسفرسانس بدلیل وجود یک تراز میانی کمی پیچیده‌تر است. این تراز که مابین تراز پایه و برانگیخته قرار دارد تراز نیمه پایدار می‌باشد و مانند یک دام برای الکترون‌ها عمل می‌کند به خاطر شرایط خاص این تراز انتقال الکترون از أن به سایر ترازها بسیار کم است، بنابراین چنانچه الکترونی پس از برانگیختگی از تراز E2 در دام تراز نیمه پایدار بیافتد، در آن ترازباقی می‌ماند تا زمانی که به طریقی دیگر مجددا برانگیخته شود و به تراز E2 برگرددااین اتفاق می‌تواند تحت تاثیر جنبش‌های گرمایی اتم‌ها یا مولکول‌های مجاور ویا برانگیختگی نوری روی دهد. اما احتمال وقوع آن نیز بسیار کم است به همین دلیل چنین الکترون‌هایی تا مدت‌ها در تراز میانی می‌مانند. (بسته به ساختار اتمی ماده و شرایط محیطی) و همین عامل تاخیر در باز تابش بخشی از انرژی دریافت شده است.

تحریک این ماده‌ها به گونه‌های مختلف انجام می‌شوند مانند: بمباران فوتونی، الکترون‌ها، یون‌های مثبت، واکنش‌های شیمیایی، گرما و گاهی اوقات (مخصوصاً در جانداران) تنش‌های مکانیکی... راز کرم‌های شب تاب در فسفرسانس است.

برای ساختن مواد درخشنده در تاریکی باید فسفری وجود داشته باشد که با استفاده از نور معمولی انرژی گرفته و طول تابش آن زیاد باشد.

برای مثال دو فسفری که این ویژگی‌ها را دارند مثل (Zinc Sulfide) و (Strontium Aluminate) که (Strontium Aluminate) به دلیل طول تابش بیشتر مناسب‌تر است.

این مواد را با پلاستیک مخلوط نموده و مواد درخشنده در تاریکی را تولید می‌کنند. بعضی مواقع ممکن است شما موادی را ببینید که می‌درخشند ولی به انرژی احتیاجی ندارند! یکی ازآن مثال‌ها بروی عقربه‌های ساعت‌های گران قیمت است.

در آنها فسفر با یک عنصر رادیو اکتیو مانند رادیوم- radium مخلوط نموده که این عنصر با انتشار رادیواکتیو فسفر را مرتبا به انرژی تبدیل می‌کند.

در لامپ‌ها یک تخلیه‌ی الکتریکی در محیطی از بخار جیوه و یک گاز خنثی (مانند آرگون) انجام می‌شود. بخار جیوه بر اثر این تخلیه انرژ و جذب این انرژی، شروع به تشعشع می‌کند و طول موج این تشعشع ۲۵۳۷ آنگستروم است که در محدوده‌ی طیف UV (فرا بنفش) است.

از دیگر سوی، دیواره داخلی لامپ را با مواد فسفرسنتی پوشش می‌دهند و این مواد توسط اشعه UV تحریک شده، نور مریی تابش می‌کنند.

در دهه‌ی ۱۹۴۰ این پوشش Zn_2SiO_4 (سیلیکات زیرکونیم) بود و از Mn بعنوان Activator استفاده می‌کردند. بعدها یک محلول فسفاتی به صورت $Ca_5.(PO_4)_3.(Cl, F).Sb_3+ion.Mn_2+ion$ - که Sb_3+ion یعنی یون ۳ بار مثبت آنتیموان - استفاده شد که Activator ان، Sb (آنتیموان) بود. چه موادی این گونه هستند (نام عنصرها) و رنگ نور آنها به چه بستگی دارد؟

شماره- ماده‌ی زمینه- Activator- رنگ تشعشع- کاربرد

(زمان عملکرد کوتاه)

۱ - $CaWO_4$ - بدون Activator - آبی - لامپ آبی

۲ - $CaWO_4$ - Pb - آبی کم رنگ - لامپ آبی

۳ - $BaSi_2O_5$ - Pb - فرا بنفش - لامپ تشعشع طولانی مدت فرابنفش

۴- Zn_2SiO_4 - Mn - سبز - لامپ سبز

۵ - $CaSiO_3$ - Pb_3Mn - بین زرد و نارنجی - لامپ رنگی با کیفیت بالا

۶ - $Cd_2B_2O_5$ - Mn - نارنجی / زرد - لامپ ترنر

(زمان عملکرد طولانی)

۱ - Zn_2SiO_4 - Mn - زرد سبز - رادار و اسیلوگراف

۲ - $CaSiO_3$ - Pb_3Mn - نارنجی – رادار

۳ - $(Zn,Be).SiO_4$ - Mn - سفید - تلویزیون‌های دقیق

بسیاری از سیستم‌های شیمیایی، فوتولومینسانس هستند، یعنی این سیستم‌ها می‌توانند توسط تابش الکترومغناطیسی برانگیخته شوند و متعاقب آن، تابشی یا با همان طول موج یا با طول موج دیگر، مجددا نشر کنند.

دو نوع از متداول‌ترین وجوه فوتولومینسانس «فلوئورسانس» و «فسفرسانس» هستند.

این دو تابش، توسط فرایندهای مکانیکی متفاوتی تولید می‌شوند. این دو پدیده را می‌توان بطور تجربی با مشاهده طول عمر حالت برانگیخته، از یکدیگر تمیز داد. در مورد فلوئورسانس، فرآیند لومینسانس تقریبا بلافاصله پس از قطع تابش، متوقف می‌شود، اما فسفرسانس معمولا برای مدت زمانی که به آسانی قابل آشکارسازی است، دوام می‌آورد. با طیف‌سنجی فلوئورسانس (spectrophotometry fluorescence) آشنا می‌شویم.

استفاده تجربی از فلوئورسانس و فسفرسانس (Phosphorescence & Fluorescence)

اندازه‌گیری شدت فلوئورسان، تعیین کمی مقدار بسیار کم تعداد زیادی از گونه‌های معدنی و آلی را امکان‌پذیر می‌سازد. تعداد زیادی روش‌های فلوئورسانس سنجی مفید، بخصوص برای سیستم‌های زیستی، موجود است. یکی از جالب‌ترین وجوه فلوئورسانس سنجی، حساسیت ذاتی آن است. حد پایین اندازه‌گیری توسط این روش

اغلب با ضریب۰/۱ یا بهتر، کمتر از حد پایین اندازه‌گیری توسط یک روش جذبی است و این حد در گستره بین چند هزارم تا شاید یک دهم یک قسمت در میلیون (۰/۱ از ppm) قرار گیرد.

بعلاوه، گزینش‌پذیری این روش حداقل بخوبی و احتمالا بهتر از سایر روش‌ها است. با وجود این، فلوئورسانس سنجی کمتر از روش‌های جذبی مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا تعداد نسبتا محدودی سیستم‌های شیمیایی وجود دارند که می‌توانند فلوئورسانس تولید کنند. فسفرسانس نیز تنها در حد بسیار محدودی در مسائل تجزیه‌ای بکار گرفته است.

نظریه فلوئورسانس

مثال‌هایی از رفتار فلوئورسانس را می‌توان در سیستم‌های ساده و همچنین در سیستم‌های پیچیده شیمیایی، در حالت گازی، مایع و جامد مشاهده کرد. ساده‌ترین نوع فلوئورسانس، توسط بخارات اتمی رقیق به نمایش گذارده می‌شود. بعنوان مثال، الکترون‌های s۳ اتمهای سدیم بخار شده، می‌توانند با جذب تابش ۵۸۹۵ و ۵۷۹۰ آنگستروم به حالت p۳ برانگیخته شوند. پس از سپری شدن بطور متوسط ۸-۱۰ ثانیه، الکترون‌ها به حالت عادی بر می‌گردند و در ضمن این عمل، تابش با همان دو طول موج را در کلیه جهات منتشر می‌کنند.

این نوع فلوئورسانس که در آن تابش جذب شده بدون تغییر دوباره منتشر می‌شود، به تابش رزونانسی یا فلوئورسانس رزونانسی مشهور است. در مورد مولکول‌ها یا یون‌های چند اتمی نیز تابش رزونانسی به وقوع می‌پیوندد. بعلاوه اینکه تابش مشخصه با طول موج‌های طولانی‌تر نشر می‌شود. این پدیده به نام جابجایی استوکس معروف است.

تقریبا تمام سیستم‌های فلوئورسانس که برای تجزیه مفیدند، ترکیبات پیچیده آلی هستند که حاوی یک یا چند گروه عاملی آروماتیک می‌باشند.

اندازه‌گیری فلوئورسانس

اجزاء سازنده مختلف دستگاه‌های اندازه‌گیری فلوئورسانس، مشابه اجزاء سازنده نورسنج‌ها می‌باشند. تابش یک منبع مناسب از درون یک تک‌فام ساز یا صافی می‌گذرد که وظیفه آن عبور بخشی از پرتو است که فلوئورسانس را بر می‌انگیزد و طول موج‌هایی را که متعاقبا توسط نمونه نور داده شده تولید می‌شوند، حذف می‌کند. تابش فلوئورسان توسط نمونه در تمام جهات نشر می‌شود، اما مناسب‌ترین زاویه مشاهده آن، زاویه قائمه نسبت به تابش تحریک است. در بقیه زوایا، افزایش پراکندگی توسط محلول و دیواره‌های سلول احتمالا منجر به خطاهای بزرگی در اندازه‌گیری شدت فلوئورسان می‌شود.

تابش منتشره پس از عبور از درون یک سیستم صافی یا تک‌فام‌ساز دوم که پیک فلوئورسان را مجزا می‌کند، به یک آشکارساز فتوالکتریک می‌رسد. خروجی آشکارساز تقویت می‌شود و بر روی یک «ثبات» یا یک «نوسان نما» نمایش داده می‌شود. فلوئورسان سنج‌ها در این مورد با نورسنج‌ها وجه اشتراک دارند که در آنها نیز برای محدود کردن طول موجهای پرتو تحریک و نشر، صافی بکار گرفته می‌شود.

طیف فلوئورسانس سنج‌ها

طیف فلوئورسانس سنج‌ها، بر دو نوعند: نوع اول یک صافی مناسب را برای محدود کردن تابش تحریک و یک تک‌فام‌ساز شبکه‌ای یا منشوری را برای مجزا کردن یک پیک نشری فلوئورسان بکار می‌گیرد. چندین طیف نورسنج تجارتی را با دستگاه‌های رابطی که امکان استفاده از آنها بدین منظور میسر می‌سازد، می‌توان خریداری کرد. طیف فلوئورسانس‌سنج‌های واقعی دستگاه‌هایی اختصاصی هستند که مجهز به دو تک‌فام ساز می‌باشند. یکی از این تک‌فام سازها تابش تحریک را به یک نوار باریک محدود می‌سازد؛ تک‌فام ساز دیگر امکان مجزا کردن یک طول موج فلوئورسان بخصوص را فراهم می‌کند.

گزینش‌پذیری فراهم شده توسط این دستگاه‌ها در تحقیقات مربوط به مشخصات الکترونی و ساختمانی مولکول‌ها اهمیت زیادی دارد و در کارهای تجزیه‌ای نیز ارزشمند است. با این همه، برای بیشتر مقاصد تجزیه‌ای، اطلاعات حاصل از دستگاه‌های ساده‌تر، کاملا رضایت بخش است. در حقیقت، فلوئورسان‌سنج‌های به نسبت ارزان قیمتی

اختصاصا برای رفع مشکلات سنجشی خاص تجزیه‌های فلوئورسان طراحی شده‌اند که اغلب همان ویژگی و گزینش‌پذیری طیف نورسنج‌های پیشرفته را دارند.

اجزا سازنده فلوئورسانس سنج‌ها و طیف فلوئورسانس سنج‌ها

در بیشتر کاربردها، به منبعی نیاز است که نسبت به لامپ‌های تنگستن یا هیدروژن که در اندازه‌گیری‌های جذبی مورد استفاده قرار می‌گیرند، دارای شدت بیشتری باشد. معمولا یک لامپ کمان جیوه‌ای یا گزنونی بکار گرفته می‌شود.

صافی‌ها و تک‌فام سازها

صافی‌های تداخلی و جذبی هر دو، در فلوئورسانس سنج‌ها بکار برده شده‌اند. بیشتر طیف فلوئورسانس سنج‌ها به تک‌فام سازهای شبکه‌ای مجهزند.

آشکارسازها

علامت فلوئورسان نوعی، دارای شدت کمی است و بنابراین برای اندازه‌گیری آن به ضرایب تقویتی بزرگی نیاز داریم. در دستگاه‌های فلوئورسانس حساس، از لوله‌های فوتو تکثیر کننده‌ها بعنوان آشکارساز در مقیاس وسیعی استفاده می‌شود.

سلول‌ها و محفظه‌های سلول‌ها

سلول‌های استوانه‌ای و مستطیلی ساخته شده از شیشه و سیلیس هر دو در اندازه‌گیری‌های فلوئورسانس بکار گرفته می‌شوند. باید نهایت دقت در طرح محفظه سلول به عمل آید تا مقدار تابش پراکنده‌ای که به آشکارساز می‌رسد، کم شود. برای این منظور، اغلب تیغه‌هایی در داخل محفظه گذاشته می‌شود.

لومینانس

لومینسانس به معنای تابش نور از ترکیبات خاصی می‌باشد که با تهییج و برانگیخته شدن به حالت پر انرژی در آمده و پس از بازگشت به حالت پایه، انرژی دریافتی را به صورت نور آزاد می‌کنند.

اگر لومینسانس یک ماده بر اثر تابش الکترومغناطیسی اولیه‌ای که ما به آن تابانده‌ایم ایجاد شود، بسته به نوع حالت برانگیختگی (براساس اسپین الکترونی جفت شده یا جفت نشده)، پدیده‌های فلورسانس و فسفرسانس را خواهیم داشت .اما اگر لومینسانس یک ماده بر اثر انرژی تحریکی یک واکنش شیمیایی یا الکتروشیمیایی (نه یک تابش الکترومغناطیسی) ایجاد شود واژه جدیدی به نام « کمی لومینسانس » مطرح می‌شود؛ یعنی مولکول در اثر یک واکنش شیمیایی برانگیخته شده است.

از آنجا که در پدیده کمی لومینسانس نیز اسپین الکترونیِ الکترونِ تحریک شده در ماده مورد نظرمان به صورت جفت شده با حالت پایه باقی می‌ماند، از این نظر می‌توان آن را از نظر شکل تهییجی مولکول، به فلورسانس شباهت داد.

در طبیعت نیز پدیده لومینسانس به طور طبیعی اتفاق می‌افتد؛ مانند آنچه در کرم شب تاب یا برخی گونه‌های عروس دریایی دیده می‌شود. این نوع پرتوافکنی موجودات زنده را بیولومینسانس گویند.

این حیوانات با استفاده از آنزیمی به نام لوسی فراز، ترکیبی در بدن خود به اسم لوسی فرین را در حضور ATP و اکسیژن تجزیه می‌کنند و درواقع با انجام یک واکنش بیوشیمیایی، لوسی فرین را تهییج کرده و به شکل ماده واسط ناپایداری مبدل می‌نمایند که این ماده واسط با برگشت به حالت پایه انرژی، به ترکیبی به نام اکسی لوسی فرین مبدل شده و انرژی حاصل از تهییج را به صورت نور آزاد می‌نماید.

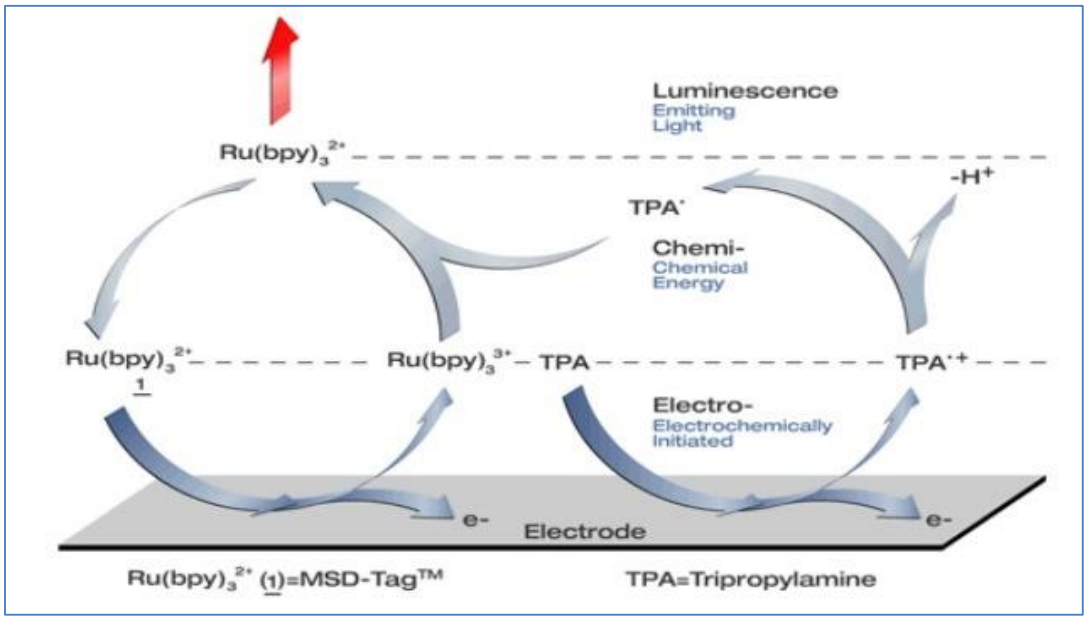
پدیده کمی لومینسانس، حاصل اکسیداسیون یک فراورده آلی (مثل لومینول، ایزولومینول، استرهای آکریدیوم و لوسی فرین) به وسیله اکسیدان‌هایی (نظیر H_2O_2، هیپوکلریت یا اکسیژن) می‌باشد. این اکسیداسیون درحضور کاتالیست‌هایی چون آنزیم‌ها (مثل آلکالین فسفاتاز، پراکسیداز ریشه خردل، پراکسیدازهای میکروبی)، یون‌های فلزی (چون فتالوسیانین، کمپلکس‌های آهن و مس) و همین صورت می‌پذیرد.

فراورده‌هایی برانگیخته شده ناشی از واکنش اکسیداسیون پس از بازگشت به حالت پایه انرژی، کمی لومینسانس ایجاد می‌کنند. البته معمولاً در واکنش‌های کمی لومینسانس از یک بهبود دهنده (Enhancer) مانند مشتقات فنلی و فراورده‌های آروماتیک نیز استفاده می‌کنند. مثلاً p - یدوفنل قادر است در مورد لومینول پراکسیداز، میزان نور ساتع شده از لومینول را تا ۲۸۰۰ برابر افزایش دهد. مشهورترین ماده مورد استفاده در کمی لومینسانس، لومینول است. لومینول برای اینکه خاصیت کمی لومینسانس از خود نشان دهد، ابتدا باید توسط یک اکسیدان فعال شود.

معمولاً از یک محلول H_2O_2 و یک نمک هیدروکسیدی در آب، به عنوان فعال کننده استفاده می‌گردد. در حضور کاتالیستی همچون فراورده‌های آهن‌دار، H_2O_2 به آب و اکسیژن تجزیه می‌شود (این کار توسط پراکسیداز نیز انجام می‌شود). از طرف دیگر لومینول با نمک هیدروکسیدی واکنش داده و یک دی آنیون ایجاد می‌کند.

واکنش اکسیژن تولید شده از H_2O_2 با دی آنیون مربوطه سبب تشکیل یک پراکسید آلی می‌گردد که بسیار ناپایدار است و بلافاصله با از دست دادن نیتروژن به ۵- آمینوفتالات مبدل می‌شود که دارای الکترون‌های تهییج شده است.این ماده نیز پس از بازگشت به حالت پایه انرژی (Ground State)، انرژی خود را به صورت نور آزاد می‌کند که ما آن را می‌بینیم. از لومینول و فرایند کمی لومینسانس آن در پزشکی قانونی (برای تشخیص لکه‌های خون – حتی اگر پاک شده باشند – به دلیل حضور آهن در هِم) و نیز در سنجش‌های آزمایشگاهی برای بررسی میزان مس، آهن و سیانیدها در سلول استفاده می‌شود.

استرهای آکریدیوم هم با واکنشی شبیه به لومینول می‌توانند نور ساتع کنند ولی سرعت تولید نور حاصل از آنها بسیار قابل توجه و بیشتر از لومینول است (بین ۵ تا ۱۰ ثانیه پس از آغاز واکنش اکسیداسیون). این ترکیبات قادرند به طور مستقیم به پروتئینها باند شوند.



شکل ۷

ترکیب جدیدی که در سال‌های اخیر کشف شده و به طور قابل توجهی با دیگر ترکیبات کمی لومینسانس تفاوت دارد، AMPPD (آدامانتیل ۱و۲- دی اکستان فنیل فسفات) است که نیاز به هیچ مولکول افزودنی برای تابش نور ندارد (برخلاف لومینول که نیاز به فراورده‌های اکسیداتیو داشت).

این ترکیب در حضور آنزیم ALP، ترکیب حد واسطی با الکترون‌های برانگیخته شده (Excited) ایجاد می‌کند که برگشت آن به حالت پایه، می‌تواند سبب تابش نور گردد.

کمی لومینسانس (Chemi Luminescence)

لغت کمی لومینسانس(Chemi Luminescence) همانطور که از اسمش مشخص است "پرتاب نور طی واکنش‌های شیمیایی" می‌باشد. شدت این نورها (فوتون‌ها) به قدری ضعیف است که نه تنها نمی‌توان با چشم غیر مسلح دید یا با هر تجهیزاتی نمی‌توان آن‌ها را اندازه‌گیری کرد. بنابراین دستگاه کمی لومینسانس دستگاهی بسیار حساس و دقیقی می‌باشد، که می‌تواند چنین فوتون‌هایی را اندازه‌گیری کند.

روش دستگاه کمی لومینسانس در اندازه‌گیری غلظت نمونه‌ها، کاملاً با دستگاه الایزا ریدر متفاوت است. تفاوت عمده این دستگاه با دستگاه الایزا ریدر، نداشتن لامپ یا منبع نور خارجی و فیلتر است که به جای این منبع نور، از فوتون‌های پرتاب شده طی واکنش‌های شیمیایی استفاده می‌کند. این دستگاه دارای قطعه ایی به نام PMT(Photo Multiplier) است که می‌تواند این فوتون‌های ضعیف را اندازه‌گیری کند. قابل ذکر است چندین نوع PMT وجود دارد که همگی در یک طول موج و برای کارایی خاصی تولید شده‌اند.

اساس کار کمی لومینسانس بر دو نوع است:

۱) اندازه‌گیری غلظت به روش آنالوگ

در این روش تمامی فوتون‌های پرتاب شده از یک نمونه را به صورت یک ولتاژ آنالوگ می‌سنجد و همان ولتاژ را به غلظت نسبت می‌دهد. یکی از معایب این روش حساس نبودن به تعداد فوتون‌های پرتاب شده است یعنی به طور مثال تعداد ۱۰۰۰ عدد فوتون با ۱۰۵۶ فوتون را با یک ولتاژی اندازه‌گیری می‌کند. درنتیجه این روش از حساسیت بالایی برخوردار نیست. از مزایا این روش آسان بودن تولید و کالیبراسیون و هزینه نسبتا پایین آن برای تولید کننده می‌باشد.

۲) اندازه‌گیری غلظت بر روش شمارش فوتون (Photon Counting)

در این روش تک تک فوتون‌های ساطع شده با استفاده یک دتکتور پیشرفته شمارش می‌شود. در نتیجه این روش برخلاف روش فوق از حساسیت بالایی برخوردار است یعنی می‌تواند فرق بین ۱۰۰۰ عدد فوتون و ۱۰۵۶ عدد فوتون را احساس کند. دستگاه LUMEX و بیشتر دستگاه‌های کمی لومینسانس از این روش پیروی می‌کنند و در آینده نیز تمامی تجهیزات به سمت همین روش روی می‌آورند. از معایب این روش می‌توان به بالا بودن هزینه و دقت کالیبراسیون است.

برتری‌های دستگاه کمی لومینسانس به الایزا ریدر

در کشورهایی همچون آمریکا، ژاپن و اکثر کشورهای اروپایی روش الایزا به طور کامل کنار گذاشته شده و کمتر جایی از این روش استفاده می‌کنند، جایگاه روش الایزا در دنیا کم رنگ شده که به دلایل زیر می‌باشد.

پایداری تست‌های کمی لومینسانس نسبت به الایزا بسیار بالا است.

زمان انجام تست‌های کمی لومینسانس بسیار پایین‌تر از زمان انجام تست الایزا است.

حساسیت روش الایزا آنقدر نیست که بتواند به تمامی محدوده‌ها دسترسی داشته باشد در حالیکه در روش کمی لومینسانس به دلیل ماهیت شمارش فوتون‌های پرتاب شده می‌تواند به هر کدام محدوده‌های جوابدهی دسترسی داشته باشد. به عبارت دیگر محدوده دینامیکی خطی کمی لومینسانس در این دستگاه ۱۰ به توان ۶ می‌باشد ولی جذب نور الایزا بسیار پایین‌تر است.

تکرارپذیری در روش کمی لومینسانس بسیار بالاتر از روش الایزا است.

استخراج DNA

استخراج DNA فرایندی است که طی آن DNA با کمک ترکیبی از روش‌های فیزیکی و شیمیایی از نمونه جداسازی می‌شود. DNA اولین بار توسط Miescher Friedrich در سال ۱۸۶۹ استخراج گردید.امروزه استخراج DNA یک روش مرسوم در بیولوژی مولکولی و آنالیزهای جرم‌شناسی است. در استخراج به روش شیمیایی، انواع مختلفی کیت وجود دارد که در زمان کمتر، امکان استخراج و انتخاب صحیح DNA را فراهم می‌کند.

انواع روش استخراج DNA

- روش معمول
- استخراج فنل – کلروفرم
- استفاده از ستون تخلیص دی‌ان‌ای
- موارد خاص

- بررسی دی‌ان‌ای

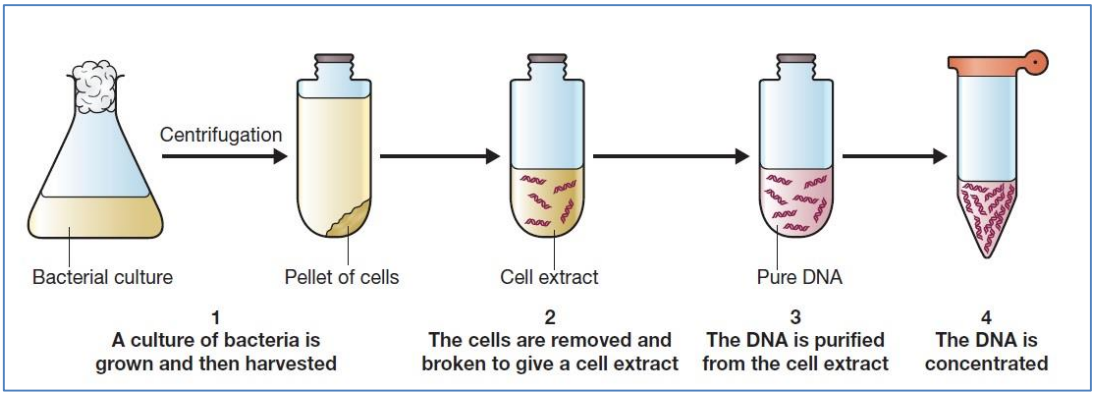
روش معمول

مراحل استخراج DNA، به ترتیب در زیر آمده‌است:

- در مرحله اول سلول‌های مورد نظر باید جمع‌آوری شوند. - سپس غشای سلولی باید شکسته شود تا DNA سلول در دسترس قرار گیرد.

- لیپیدها باید از غشای سلولی و هسته جدا شوند که این کار با استفاده از شوینده‌ها و سورفاکتانت‌ها انجام می‌گیرد.
- شکستن پروتئین‌ها از طریق پروتئازها انجام می‌شود (این مرحله غیرضروری است).
- شکستن RNA نیز از طریق اضافه کردن RNAse انجام می‌شود (این مرحله نیز غیرضروری است).

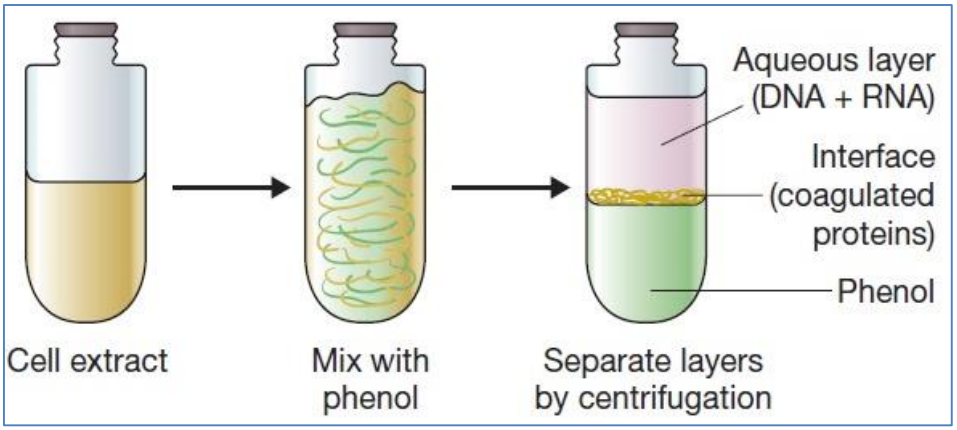
- سپس با یک محلول نمکی غلیظ تیمار انجام می‌شود تا بقایای سلولی مانند پروتئین‌های شکسته شده، لیپیدها و RNA به یکدیگر بچسبند و یک جسم توده مانند تشکیل دهند. در مرحله بعد سانتریفیوژ انجام می‌شود که این باعث جدا شدن توده بقایای سلولی از DNA می‌گردد. متداول‌ترین روش‌ها به منظور جداسازی DNA از دترجنت‌ها، پروتئینها، نمک‌ها و معرف‌های استفاده شده طی مراحل لیز سلول به شرح زیر است: رسوب‌دهی توسط ایزوپروپانل یا اتانل سرد: از آنجایی که DNA در این الکل‌ها نامحلول است، به یکدیگر چسبیده و پس از سانتریفیوژ به صورت یک توده (pellet) در می‌آید.



شکل ۸

استخراج فنل – کلروفرم

فنل پروتئین‌های موجود در نمونه را دناتوره می‌کند. پس از سانتریفیوژ، پروتئین‌های دناتوره شده (denaturated proteins) در فاز آلی باقی می‌مانند. در حالی که اسید نوکلئیک به همراه کلروفرمی که به منظور حذف بقایای فنلی استفاده شده بود، در فاز آبی قرار دارند.



شکل ۹

استفاده از ستون تخلیص DNA

اساس این روش، تمایل جذب DNA به فاز جامد (مانند سیلیکا) بسته به میزان pH و غلظت نمکی بافر است.

پروتئین‌های سلولی و هیستونی متصل به DNA را می‌توان از ۳ طریق حذف کرد:

۱. با اضافه کردن پروتئاز

۲. از طریق رسوب دهی پروتئین‌ها با سدیم یا آمونیوم سولفات

۳. یا خارج سازی آن‌ها از طریق یک ترکیب فنل- کلروفرم که این کار باید قبل از رسوب دادن DNA انجام گیرد.

پس از استخراج، DNAرا به آرامی در یک بافر قلیایی (معمولاً در بافر TE) یا در آب خالص حل می‌کنند.

موارد خاص

DNA برخی از نمونه‌ها را نمی‌توان با روش‌های معمول جداسازی کرد. نمونه‌های باستانی که DNA یشان در بخش‌هایی تخریب شده، نمونه‌هایی که در آنها موانعی برای آنالیز وجود دارد (به عنوان مثال نمونه‌های گرفته شده از خاک) یا استخراجDNA از میکروارگانیسم‌هایی که دیواره سلولی ضخیم دارند (مانند مخمرها) نیازمند روش‌های اختصاصی‌تر است. استخراج DNA خارج کروموزومی خصوصاً پلاسمید نیز آسان است و می‌تواند براحتی توسط لیز سلولی و رسوب پروتئین‌ها انجام گیرد. DNA کروموزومی در جزء نامحلول به دام افتاده و پس از سانتریفیوژ، DNA پلاسمیدی را می‌توان از جزء محلول تخلیص کرد.

بررسی DNA

با استفاده از شناساگر دی فنیل آمین(DPA)، می‌توان وجود DNA را تأیید کرد. همچنین غلظت DNA را می‌توان با اندازه‌گیری میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر و مقایسه آن با منحنی استاندارد، محاسبه نمود. به منظور اندازه‌گیری خلوص DNA میزان جذب محلول حاوی DNA در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. دی‌ان‌ای، نور UV را در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر جذب می‌کند. این در حالی است که پروتئین‌های آروماتیک، نور یو وی را در ۲۸۰ نانومتر جذب می‌کند. نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در یک نمونه خالص DNA، ۱:۸ (۱برای طول موج ۲۶۰ و ۸ برای طول موج ۲۸۰) است. اگر این نسبت برقرار بود می‌توانیم بگوییم نمونه ما فاقد آلودگی پروتئینی است. نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ در نمونه DNA واجد آلودگی، کمتر از ۱:۸ است. مقادیر DNA را می‌توان کمّی کرد. به این منظور ابتدا از طریق آنزیم محدودکننده برش ایجاد می‌شود. سپس نمونه وارد ژل آگارز می‌گردد. پس از رنگ‌آمیزی آن با اتیدیوم بروماید یا رنگ‌های دیگر و مقایسه شدت باند DNA با یک DNA با غلظت معلوم می‌توان به مقدار کمی DNA دست یافت. با استفاده از تکنیک ساترن بلات، این DNA کمی شده می‌تواند استخراج شود و از طریق PCR و آنالیز RFLP مورد آزمایش قرار گیرد. این روش‌ها به ما کمک می‌کند تا توالی‌های تکرار شونده موجود

در ژنوم را از یکدیگر تمیز دهیم. دانشمندان پزشکی قانونی و جرم‌شناسی نیز از همین تکنیک‌ها جهت مقایسه، شناسایی و آنالیز استفاده می‌کنند.

PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمرایز Polymerase Chain Reaction یا PCR اولین بار در اواسط دهه ۱۹۸۰ توسط Kary Mullis ابداع گردید. PCR مجموعه‌ای از واکنش‌های بیوشیمیایی است که در طی آن قطعه مشخصی از DNA به طور اختصاصی و با حساسیت فوق‌العاده به تعداد زیادی تکثیر می‌گردد. به این ترتیب می‌توان قطعه کوچکی از یک ژنوم بزرگ را که قابل دست‌یابی نمی‌باشد، به صورت انبوه تولید نمود. این فرآیند، کاربردهای فراوانی در تحقیقات بیولوژیکی دارد که از آن جمله می‌توان به شناسائی ژنوم ویروس‌های گیاهی و جانوری، ردیابی مجرمان، تشخیص سریع عوامل بیماری‌های عفونی، تشخیص قبل از تولد امراض ژنتیکی، تجزیه و تحلیل مولکولی نمونه‌های تاریخی، تعیین جنسیت جنین، تشخیص سرطان‌ها و موارد دیگر اشاره نمود. ابداع و توسعه این روش و روش‌هائی که از PCR مشتق شده‌اند، در شناسایی بسیاری از بیماری‌ها مفید می‌باشد.

واکنش زنجیرهٔ پلیمراز

واکنش زنجیرهٔ پلیمراز(Polymerase Chain Reaction) که مخفف آن (PCR) می‌باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکنیکی در زیست‌شناسی مولکولی است و به منظور تکثیر یک نسخه منفرد یا نسخه‌های کمی از یک قطعه DNA با توالی خاص به تعداد هزار یا میلیون‌ها نسخه به کار می‌رود. این تکنیک ابزاری آسان و ارزان قیمت برای تکثیر یک قطعه خاص از DNAاست و برای یک بخش هدف از DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد. هم اکنون PCR یک تکنیک متداول و اغلب ضروری در آزمایشگاه‌های بالینی و آزمایشگاه‌های تحقیقاتی است و در موارد گوناگونی کاربرد دارد. این کاربردها شامل **کلونینگ DNA** برای توالی یابی، **فیلوژنی بر پایه DNA، آنالیز عملکرد ژن‌ها، تشخیص بیماری‌های ارثی، شناسایی اثر انگشت ژنتیکی** (مورد استفاده در علم پزشکی قانونی) و تشخیص عوامل بیماری‌زا در تست‌های نوکلئیک اسید برای تشخیص بیماری‌های عفونی است. در سال ۱۹۹۳ مولیس همراه با مایکل اسمیت جایزه نوبل شیمی را برای کار روی PCR دریافت کردند.

اساس تکنیک PCR چرخه‌های حرارتی است. این چرخه‌ها شامل چرخه‌های گرمایی و سرمایی تکراری، ذوب DNA و تکثیر آنزیمی DNA است. پرایمرها (قطعات کوتاه DNA) که حاوی توالی مکمل ناحیه هدف‌اند به همراه یک DNA پلیمراز، اجزای اصلی واکنش PCR برای انتخاب و تکثیر قطعه مورد نظر را تشکیل می‌دهند. طی فرآیند PCR الگوی DNA به صورت لگاریتمی تکثیر می‌شود و DNA تکثیر شده خود به عنوان الگویی برای همانندسازی استفاده می‌شود. PCR می‌تواند به شکل گسترده‌ای برای انجام مراحل مختلف در دستکاری‌های ژنتیکی استفاده شود.

تقریبا در تمام کاربردهای PCR از یک DNA پلیمراز مقاوم به حرارت مانند تک پلیمراز (آنزیمی که از باکتری *Thermus aquaticus* جداسازی شده) استفاده می‌شود. این DNA پلیمراز از یک DNAی تک رشته‌ای به عنوان الگو استفاده کرده و با کمک پرایمرها و با بکارگیری نوکلئوتیدها که بلوک‌های ساختاری DNA هستند، یک رشته DNA ی جدید می‌سازد. در اغلب روش‌های PCR از چرخه‌های حرارتی یعنی گرم و سرد کردن متناوب نمونه‌های PCR طبق مراحل دمایی مشخص استفاده می‌شود.

در مرحله اول، دو رشته‌ی مارپیچ DNA دورشته‌ای در یک دمای بالا، در فرآیندی که ذوب DNA نامیده می‌شود از یکدیگر جدا می‌شوند. در مرحله دوم، دما پایین آورده شده و هریک از دورشته DNA به عنوان الگو عمل می‌کنند. ساخته شدن رشته جدید از روی الگو توسط DNA پلیمراز انجام می‌شود. پرایمرها بر اساس توالی قطعه‌ای از DNA که مورد نظر ماست طراحی می‌شوند.

PCR یک ناحیه خاص از رشته DNA هدف را تکثیر می‌کند. به‌طور معمول اکثر روش‌های PCR این قابلیت را دارند تا قطعات DNA بین ۰/۱ و ۱۰ کیلوجفت باز (kbp) را تکثیر کنند. هرچند تکنیک‌های دیگر می‌توانند قطعاتی با اندازه‌های بالاتر از ۴۰ کیلوجفت باز را نیز تکثیر کنند. مقدار تکثیر محصول بوسیله سوبسترای موجود در واکنش که پیشرفت واکنش را محدود می‌کند تعیین می‌شود.

یک واکنش PCR پایه‌ای نیازمند چندین جزء است، این اجزاء شامل موارد زیر است:

- دی ان‌ای الگو که حاوی ناحیه DNA ی هدف برای تکثیر است.

- تگ پلیمراز که یک DNA پلیمراز مقاوم به حرارت است.
- دو پرایمر DNA که مکمل انتهای ۳’ رشته‌های سنس و آنتی سنس DNA ی الگو هستند (بدون پرایمرها، جایگاه آغاز دورشته‌ای که DNA پلیمراز بتواند به آن متصل شود شناخته نمی‌شود). پرایمرهای خاصی که مکمل DNA هدف هستند از قبل انتخاب شده و به شکل سفارشی در آزمایشگاه ساخته یا از تأمین کنندگان خریداری می‌شوند.
- دزوکسی نوکلئوتیدهای سه فسفاته یا dNTPs بلوک‌های ساختاری هستند که DNA پلیمراز با استفاده از آن‌ها رشته‌های جدید را می‌سازد.
- یک محلول بافری که محیط شیمیایی مناسبی برای بهبود فعالیت و پایداری DNA پلیمراز فراهم می‌کند.
- کاتیون‌های دوظرفیتی مانند منیزیوم (Mg) یا منگنز (Mn)؛ کاتیون Mg2+ متداول‌تر است. همچنین کاتیون Mn^{2+} می‌تواند برای جهش‌زایی DNAی حاصل از PCR استفاده شود و غلظت بالای این یون میزان خطا را در طول سنتز افزایش می‌دهد.
- کاتیون‌های تک ظرفیتی، معمولاً یون‌های پتاسیم (K)
- بافر $X_{۱۰}$

واکنش معمولاً در حجم ۱۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر در لوله‌های کوچک واکنش (با حجم ۰/۲-۰/۵ میلی لیتر) و در یک چرخه حرارتی انجام می‌شود. چرخه‌های حرارتی لوله‌های واکنش را به منظور فراهم کردن دمای لازم در هر مرحله سرد و گرم می‌کنند. بسیاری از چرخه‌های حرارتی پیشرفته از اثر پلتیر Peltier effect که اجازه گرم و سرد کردن لوله‌های PCR را بوسیله معکوس کردن جریان الکتریکی می‌دهد استفاده می‌کنند.

به‌طور کلی PCR شامل مجموعه‌ای از ۴۰-۲۰ بار تغییر دمایی تکرارشونده به نام سیکل است که هر سیکل متداولاً از دو یا سه مرحله دمایی مستقل تشکیل شده‌است. مراحل مشترک اغلب روش‌های PCR عبارت است از:

۱. آغاز: این مرحله برای DNA پلیمرازی که نیازمند فعالسازی گرمایی بوسیله Hot-start PCR است، لازم می‌باشد و شامل گرم کردن محفظه واکنش تا دمای ۹۶-۹۴ درجه سانتی گراد (۲۰۵-۲۰۱ درجه فارنهایت) یا

۹۸ درجه سانتی گراد (۲۰۸ درجه فارنهایت) برای پلیمرازهای بسیار مقاوم به حرارت است. این مرحله ۱۰-۱ دقیقه به طول می‌انجامد.

۲. دناتوراسیون: این مرحله اولین مرحله سیکل است و شامل گرم کردن محفظه واکنش تا ۹۸-۹۴ درجه سانتی گراد (۲۰۸-۲۰۱ درجه فارنهایت) به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه می‌شود که بوسیله شکستن پیوندهای دورشته‌ای بین بازهای مکمل باعث ذوب شدن یا دناتوراسیون DNA الگوی دورشته‌ای شده و به این ترتیب دو مولکول DNA تک رشته‌ای حاصل می‌شود.

۳. اتصال: در این مرحله دمای واکنش به مدت ۴۰-۲۰ ثانیه به ۶۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد که باعث می‌شود پرایمرها به هریک از الگوهای تک رشته DNA متصل شوند. اتصال معمولاً حدود ۵-۳ درجه سانتی گراد زیر دمای ذوب Tm پرایمرها انجام می‌شود. در طول این فرآیند DNA پلیمراز به ترکیبی از الگو و پرایمر متصل و شروع به ایجاد رشته‌های جدید می‌کند.

۴. گسترش/ طویل شدن: در این مرحله دما برای عملکرد DNA پلیمراز لازم است؛ دمای بهینه یک DNA پلیمراز ۸۰-۷۵ درجه سانتی‌گراد است. با این وجود معمولاً دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای این آنزیم استفاده می‌شود. در این مرحله DNA پلیمراز یک رشته DNA ی جدید که مکمل رشته الگو است را در جهت ’۵ به ’۳ سنتز می‌کند. زمان لازم برای افزایش طول بستگی به DNA پلیمراز استفاده شده و طول ناحیه DNAی هدف برای تکثیر دارد.

فرآیندهای دناتوراسیون، اتصال و طویل شدن یک سیکل را تشکیل می‌دهند. برای تکثیر DNA هدف تا میلیون‌ها نسخه، سیکل‌های متعددی نیاز است.

۱. طویل شدن نهایی: این تک مرحله اختیاری است و پس از آخرین سیکل PCR برای اطمینان از طویل شدن کامل هر تک رشته DNA در یک دمای ۷۴- ۷۰ درجه سانتی‌گراد (۱۶۵-۱۵۸ درجه فارنهایت) به مدت ۱۵-۵ دقیقه انجام می‌شود.

۲. نگهداری نهایی: مرحله نهایی سرد کردن محفظه واکنش تا ۱۵-۴ درجه سانتی‌گراد برای یک زمان نامحدود است و ممکن است این مرحله برای ذخیره‌سازی کوتاه مدت محصولات PCR استفاده شود.

در طراحی پرایمربرای واکنش PCR باید نکات خاصی در نظر گرفته شود مثلاً حتماً قسمت ۳پریم از پرایمر می‌بایست مکمل بخش هدف باشد که این برای بخش ۵ پریم الزامی نمی‌باشد، همچنین باید در نظر گرفته شود که دو پرایمر حداقل توالی مکمل یکدیگر را داشته باشند و توالی‌های مستعد تشکیل سنجاق سری هم در آن‌ها تا حد معمول استفاده نشود.معمولاً از گرم کردن و سرد کردن مخلوط واکنش برای جدا شدن دو رشته DNA و چسبیدن آغازگرها یا Annealing استفاده می‌شود. در نتیجه این چرخه‌ها میلیون‌ها نسخه از قطعه کوتاهی از DNA تولید می‌شود

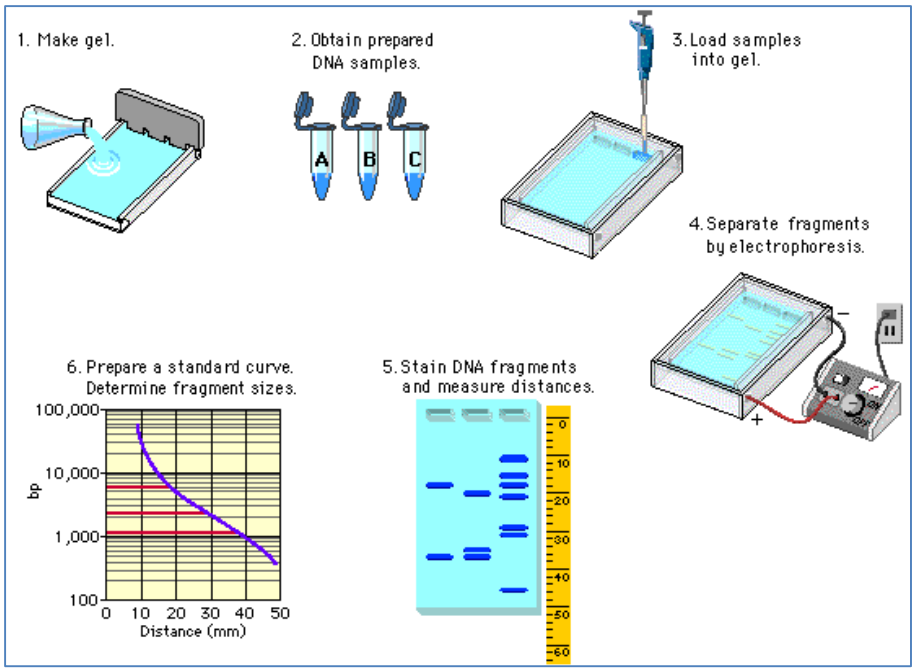
به منظور بررسی میزان موفقیت PCR انجام شده از الکتروفورز بر روی **ژل** به منظور جداسازی محصولات PCR و بررسی اندازه قطعات استفاده می‌شود.

تئوری و مبانی ژل الکتروفورز

روفورز یک روش جداسازی و آنالیز ماکرومولکول‌های زیستی (و پروتئین‌ها) و قطعات آنها بر اساس اندازه و بار می‌باشد. این تکنیک در آزمایشگاه‌های تشخیصی جهت جداسازی پروتئین‌ها با استفاده از بار و یا اندازه شان مورد استفاده قرار می‌گیرد و در بیوشیمی و دیگر گرایش‌های علوم سلولی و مولکولی به منظور جداسازی قطعات دارای اندازه‌های مختلف DNA و RNA و مولکول‌های پروتئینی بر اساس سایز می‌باشد. مولکول‌های اسید نوکلئیکی با اعمال یک میدان الکتریکی در ژل آگارز و گاها ژل اکریل آمید حرکت می‌کنند و بر اساس اندازه جدا می‌شوند. مولکول‌های کوچک‌تر سریعتر از مولکول‌های بزرگتر حرکت می‌کنند؛ این امر به دلیل مهاجرت راحت‌تر آنها در منافذ ژل می‌باشد. اما پروتئین‌ها بر اساس بارشان در آگارز جدا می‌شوند زیرا منافذ ژل بسیار بزرگ‌تر از آن هستند که بتوانند پروتئین‌ها را غربال نمایند. همچنین تکنیک ژل الکتروفورز می‌تواند به منظور جداسازی نانوذرات مورد استفاده قرار بگیرد.

از جمله کاربردهایی که ژل‌ها در هنگام الکتروفورز بر عهده دارند، مهار نمودن کنوکسیون دمایی ایجاد شده در اثر میدان الکتریکی، غربال‌گری و نیز ایجاد تاخیر در حرکت مولکول‌ها می‌باشد. ژل الکتروفورز DNA معمولا به منظور تجزیه و تحلیل بعد از تکثیر DNA با استفاده از تکنیک PCR به کار می‌رود، اما ممکن است به عنوان یک تکنیک جهت آماده سازی برای تکنیک‌های دیگر مانند اسپکترومتری جرمی، RFLP، PCR، کلون‌سازی، تعیین توالی DNA و یا ساترن بلاتینگ مورد استفاده قرار بگیرد.

در میدان الکتریکی ایجاد شده توسط منبع تغذیه (Power-Supply) مواد دارای بار خالص مثبت به سمت قطب منفی و مواد دارای بار خالط منفی به سمت قطب مثبت حرکت می‌نمایند.



شکل ۱۰

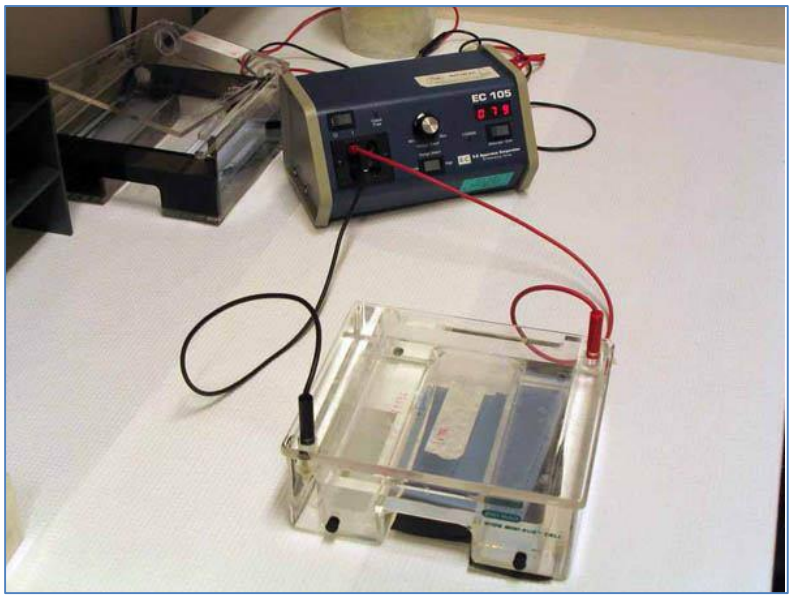
در ژل الکتروفورز آگارز پس از اعمال ولتاژ و جریان مورد نظر، مولکول‌های با اندازه بزرگ‌تر دارای حرکت کندتری در خلل و فرج ژل آگارز می‌باشند. همین اندازه مختلف مولکول‌ها موجب ایجاد باندهای مجزا و متفاوتی خواهد شد. معمولا ژل‌های انتخاب شده جهت عمل الکتروفورز، از جنس پلی‌مرهای دارای قدرت ایجاد پیوند متقاطع

(crosslinked polymer) می‌باشند که نوع این پلی‌مر و نیز میزان نفوذپذیری آن بر اساس نوع ترکیب و وزن خاصی که قرار است جدا گردد، انتخاب می‌شود. هنگامی که قرار است پروتئین‌ها و یا اسیدهای نوکلئیک کوچک از جنس DNA یا RNA جدا شوند، معمولا از غلظت‌های متفاوتی ژل اکریل امید و کراس‌لینکر استفاده می‌شود که ایجاد شبکه‌های پلی اکریل آمیدی با اندازه منافذ مختلف ایجاد می‌گردند. اکریل آمید نوعی نوروتوکسین می‌باشد که باید بسیار با احتیاط استفاده شود. اما زمانی که اندازه اسیدهای نوکلئیک از چندصد جفت باز بیشتر گردد، بهتر است از ژل آگارز جهت جداسازی استفاده گردد. آگارز متشکل از زنجیرهای بودن شاخه و بلند و بدون بار کربوهیدرات می‌باشد که کراس لینک نیز ندارند؛ همین امر موجب ایجاد ژل با اندازه منافذ بزرگ برای جداسازی ماکرومولکول‌ها می‌گردد.

در هنگام عمل الکتروفورز بسته به اندازه و اختلاف وزنی که جمعیت مولکول‌ها با هم دارند و نیز میزان ولتاژی که اعمال می‌گردد، زمان الکتروفورز متفاوت خواهد بود. در صورتی که مدت زمان عمل الکتروفورز کم باشد روی هم افتادن باندها و نیز اسمیرهای غیر قابل تمایز قابل مشاهده خواهند بود. اما اگر مدت زمان این عمل زیاد باشد ممکن است مولکول‌ها از ژل خارج گردند.

به منظور تشخیص وزن مولکول‌های جداشده معمولا مارکرهای وزنی معینی وجود دارند که همگام با Run نمودن نمونه‌ها Run می‌گردند. این مارکر که به Ladder نیز معروف می‌باشند، حاوی مخلوطی از مولکول‌های دارای وزن مشخص می‌باشند. معمولا نکته‌های که در مورد ladderها ضروری می‌باشد، این است که متناسب با جمعیت مولکولی که قرار است جدا شود، ladder را انتخاب نمود. این ladder باید حاوی مارکرهای دارای وزن کمتر و نیز بیشتر از مولکولی هدفی که قرار است جدا گردد، باشند. فاصله‌ای که یک باند طی می‌نماید متناسب است با لگاریتم اندازه مولکول.

عمل الکتروفورز در بافر صورت می‌گیرد تا از تغییرات pH جلوگیری بعمل آورد. در واقع pH فاکتوری بسیار اساسی و مهم در عمل الکتروفورز می‌باشد. همان‌گونه که پیش‌تر گفته شد، الکتروفورز تکنیکی بر اساس بار خالص و وزن مولکول‌می‌باشد.



شکل ۱۱

انواع ژل

مهمترین انواع ژل مورد استفاده در عمل الکتروفورز ژل آگارز و اکریل آمید می‌باشند. هر نوع ژل می‌تواند به خوبی برای انواع اندازه‌ها و گونه‌های آنالیت مورد استفاده قرار بگیرد. ژل‌های پلی اکریل آمید معمولا برای پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند و نیز دارای قدرت تفکیک خیلی بالایی برای قطعات DNA با اندازه بین ۵-۵۰۰ جفت باز می‌باشند. از طرف دیگر ژل‌های آگارز دارای قدرت تفکیک کمتری برای DNA می‌باشند ولی دارای طیف وسیع‌تری از جداسازی می‌باشند و بنابراین برای قطعاتی DNA بین ۵۰ تا ۲۰۰۰۰ جفت باز مناسب می‌باشند. اما باید این نکته در نظر گرفته شود که برای قطعات DNA بزرگتر از ۶مگاباز باید با دستگاه الکتروفورز PFGE(PULSED GEL ELECTROPHORESIS FIELD) قطعات را جدا نمود.

نحوه تهیه این ژل‌ها نیز با هم متفاوت می‌باشد. برای تهیه آگارز باید آن را به صورت محلول حرارت داد، اما برای تهیه پلی اکریل آمید باید آن را به طریق پلیمریزاسیون با استفاده از ماده شیمیایی تهیه نمود.

ژل‌های آگارز

دارای منافذ با اندازه‌های متفاوت می‌باشند ولی برای جداسازی پروتئین‌های با اندازه بیشتر از ۲۰۰ کیلودالتون می‌توانند مورد استفاده قرار بگیرند. فاصله بین باندهای DNA دارای طول متفاوت متاثر از میزان درصد آگارز می‌باشد. اغلب ژل‌های آگارز از درصد ژل بین ۰,۷ درصد (برای جداسازی قطعات DNA بین۵ تا ۱۰ کیلو باز) و ۲٪ (برای جداسازی قطعات بین ۰,۲ تا ۱ کیلو باز) می‌باشند. ژل‌های با درصد آگارز بالاتر از ۳ ٪ را می‌توان برای جداسازی قطعات خیلی کوچک استفاده نمود؛ اما برای این قطعات بهتر است از ژل پلی اکریل آمید به صورت عمودی برای جداسازی آنها استفاده شود. برای بسیاری از جداسازی‌ها ژل ۱ ٪ آگارز بهترین مورد می‌باشد.

ژل آگارز تهیه شده و آماده برای بارگذاری نمونه. پس از حرارت دادن آگارز تا دمای ذوب کامل، آن را در همان حالت مذاب به داخل ژل تری (Gel-Tray) می‌ریزند. قبل از ریختن ژل، شانه را در محل تعبیه شده در ژل تری قرار می‌دهند، تا پس از سرد شدن و بسته شدن ژل آگارز چاهک‌ها به صورت مشخصی تشکیل شوند.

ژل‌های پلی اکریل آمید (PAGE)

به دلیل اندازه منافذ یکنواختی که درست کرده‌اند، برای جداسازی پروتئین‌های با اندازه بین ۵ تا ۲۰۰۰ کیلودالتون مناسب می‌باشند. اندازه منفذ با تغییر میزان پودر اکریل آمید و بیس اکریل آمید بکار رفته در تهیه ژل تغییر می‌کند. این نوع ژل به دلیل ماهیت مواد اولیه خود که خطر آفرین می‌باشند کاربری کمتری نسبت به قبل دارد و بیشتر جهت جداسازی پروتئین‌ها مورد استفاد قرار می‌گیرد.

در هنگام تهیه ژل اکریل آمید دو نوع ژل تهیه می‌شود: ژل Stacking و ژل Resolving.

ژل Stacking بر روی ژل Resolving ریخته می‌شود و درصد آن ۵٪ می‌باشد. ولی ژل Resolving بین ۶ تا ۱۵ درصد تهیه می‌گردد. درصد انتخاب شده در این نوع ژل به اندازه پروتئین هدف بستگی دارد. هرچه که وزن آن کمتر باشد درصد اکریل آمید بکار برده بیشتر خواهد بود.

نشاسته

نشاسته بدست آمده از سیب زمینی که به صورت نیمه هیدرولیز گردیده است نیز می‌تواند محیطی مناسب و غیر سمی جهت جداسازی پروتئین‌ها ایجاد نماید. در این نوع ژل پروتئین‌های غیردناتوره می‌توانند بر اساس بار و وزن جدا شوند. ژل نشاسته معمولا بین ۵ تا ۱۰ درصد می‌باشد.

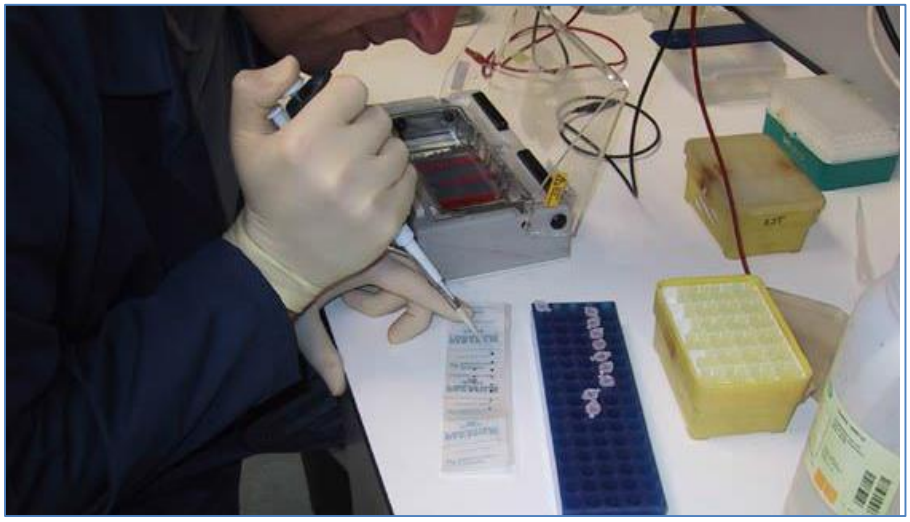
دناتوره نمودن

دناتوره نمودن ژل‌ها معمولا در شرایطی که ساختار طبیعی آنالیت به هم ریخته می‌شود و به صورت خطی در می‌آید، ایجاد می‌شوند. هنگامی که ماکرو مولکول‌ها دناتوره می‌گردند، حرکت آنها بر روی ژل تنها به اندازه خطی و نیز نسبت جرم به بارشان بستگی خواهد داشت. بنابراین ساختارهای دوم، سوم و چهارم آنها از بین خواهد رفت که تنها ساختار اولیه جهت آنالیز باقی خواهد ماند. اسیدهای نوکلئیک اغلب با افزودن اوره در بافر دناتور می‌گردند، اما پروتئین‌ها با استفاده از سدیم دودسیل سولفات (SDS) دناتوره می‌گردند که این در واقع قسمتی از ژل SDS-PAGE خواهد شد. به منظور دناتوراسیون کامل پروتئین‌ها، لازم است باندهای دی‌سولفید آنها که ایجاد پیوند کوالان کرده‌اند و ساختار سوم و چهارم آنها را پایدار نموده است توسط یک روش به نام Reducing PAGE از بین برود. معمولا با استفاده از بتا مرکاپتو اتانول و یا دی‌تیوتریتول این باندها شکسته می‌شوند. Reducing PAGE معمول‌ترین شیوه رایج الکتروفورز پروتئین می‌باشد.

در اسیدهای نوکلئیک شرایط دناتوره برای تخمین دقیق وزن مولکولی RNA ضروری می‌باشد. مولکول‌های RNA قادراند برهمکنش‌های درون مولکولی بیشتری نسبت به DNA ایجاد کنند که این امر بر روی تحرک الکتروفورزی آنها تاثیر بسزایی خواهد داشت. اوره، DMSO و گلای اکسال معمولترین عوامل دناتوره کننده برای تخریب ساختار RNA می‌باشند.

ژل Native

ژل‌های native در شرایطی غیر-دناتوره کننده Run می‌شوند، بنا براین ساختار طبیعی آنالیت حفظ می‌شود. این امر موجب تاثیر گذاری شکل مولکول در تحرک آن خواهد شد و بنابراین هر چهار سطح پروتئین قابل بررسی خواهند بود. از آنجایی که در این نوع ژل‌ها ساختار طبیعی پروتئین‌ها حفظ می‌شود، نتنها می‌توان آنها را استفاده از روش‌های رنگ آمیزی معمول بررسی نمود، بلکه همچنین می‌توان با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی ویژه enzyme-linked آنها را بررسی نمود. ژل الکتروفورز native معمولا برای تحقیقات پروتئومیکس و متالومیکس مورد استفاده قرار می‌گیرد. اگرچه، native-PAGE نیز می‌تواند برای اسکن ژل‌های حاوی جهش‌های ناشناخته مانند تکنیک SSCP مورد استفاده قرار بگیرند.



شکل ۱۲

بافرها

نقش بافرها در الکتروفورز فراهم نمودن یون‌های حامل جریان بین دو قطب و نیز حفظ نمودن pH محیط انجام الکتروفورز می‌باشد. بافر تریس- استات- و بافر تریس- بورات به هماه EDTA از جمله مهمترین بافرهای مورد استفاده برای اسیدهای نوکلئیک می‌باشند. بافر TAE دارای ظرفیت بافری پایینی می‌باشد، اما کیفیت نتایج آن

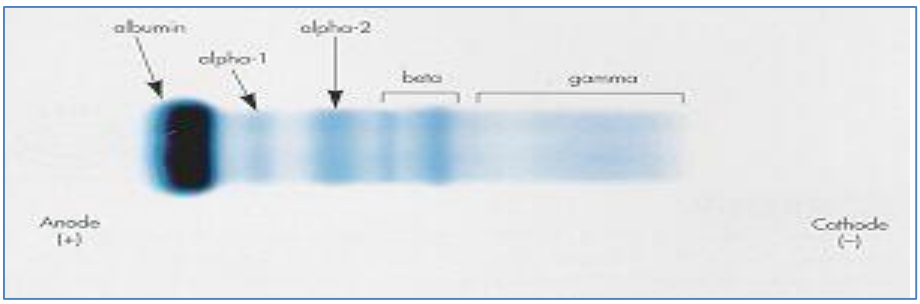
برای توالی‌های DNA با طول بلند بسیار خوب می‌باشد. بافرهای دیگری نیز برای الکتروفورز آگارز استفاده می‌شود که از عمومیت کمتری برخوردارند.

اما اغلب جداسازی‌های پروتئینی تکنیک SDS-PAGE با استفاده از سیستم DISC بافر صورت می‌گیرند که به طرو قابل ملاحظه‌ای کیفیت باندهای بدست آماده را افزایش می‌دهد.

مشاهده باندهای جدا شده در سیستم الکتروفورز

بعد از اتمام عمل الکتروفورز، باید جهت مشاهده مولکول‌های موجود در ژل، آنها را رنگ‌امیزی نمود. DNA را می‌توان با استفاده از اتیدیوم برماید رنگ آمیزی نمود. این رنگ هنگامی که بین دو رشته DNA قرار می‌گیرد، تحت نور فرابنفش، فلوئورسانس ساتع می‌کند.

رنگ‌های نقره و کماسی برلیانت بلو جهت مشاهده پروتئین‌ها استفاده می‌شوند. روش‌های دیگری ممکن است جهت مشاهده جداسازی اجزای موجود در ژل استفاده گردد.



شکل ۱۳

انواع PCR

Asymmetric PCR (PCR نامتقارن)

هدف از بکارگیری این روش تولید DNA تک رشته‌ای است.در این روش یکی از پرایمرها به تعداد کمتر و پرایمر دیگر به تعداد بیشتر به محیط واکنش اضافه می‌شودتا جایی که این نسبت ۱:۵۰ یا ۱:۱۰۰ برسد. در حدود ۲۰ چرخه ابتدایی PCR محصول دو رشته‌ای به صورت فاز نمایی تولید می‌گردد. اما پس از ۲۰ چرخه که غلظت

پرایمر کمتر در واکنش قابل چشم پوشی است وبه عبارت عامیانه‌تر به دلیل تمام شدن پرایمر با غلظت کمتر در چرخه‌های بعدی PCR فقط یک رشته از الگو به صورت خطی تکثیر می‌شود. پس از پایان PCRچند نسخه DNA دو رشته‌ای و تعداد زیادی DNA تک رشته‌ای از ژن مورد نظر ایجاد خواهد شد.

(ARMS PCR) Amplification Refractory Mutation System

این روش تحت عنوان تکثیر اختصاصی الل‌ها با PCR نیز نامیده می‌شود. این روش برای تشخیص موتاسیون‌های نقطه‌ای به کار می‌رود و جهت تشخیص الل‌های طبیعی و جهش یافته طراحی شده است. این روش بر پایه تفاوت نوکلئوتید انتهای ´۳ پرایمرهایی است که برای الل‌های مختلف طراحی شده است. دو واکنش PCR با استفاده از یک DNA الگودر۲ لوله جداگانه انجام می‌شود که یکی از آنها حاوی پرایمرهای جهش یافته و دیگری حاوی پرایمر طبیعی می‌باشد. در هرواکنش پرایمر مشترک به همراه یکی از ۲ پرایمر اختصاصی الل مورد استفاده قرار می‌گیرد. حالت اختصاصی پرایمرها برای هریک از الل‌ها ناشی از نوکلئوتید انتهای ´۳ آنهاست که با هم متفاوت بوده، چنانچه پلیمریزاسیون در لوله حاوی پرایمر طبیعی انجام شود نشان دهنده نبود جهش نقطه‌ای در باز مورد نظراست واگر پلیمریزاسیون در لوله حاوی پرایمر جهش یافته انجام شود نشان دهنده حضور جهش نقطه‌ای در باز مورد نظر است. نکته مهم این است که از DNAپلیمرازی که فاقد خاصیت تصحیح کنندگی اگزونوکلئازی ´۵ à 3 ´۵ است، استفاده شود زیرا استفاده از یک آنزیم اصلاحگر باعث برداشتن باز جفت نشده انتهای ´۳ می‌گردد و در واقع توانایی متمایز کردن دو الل از بین می‌رود. از این روش در تشخیص موتاسیون‌های مولد مقاومت دارویی در باکتری‌ها استفاده می‌شود.

Hot-Start PCR

زمانیکه بهترین شرایط اتصال فراهم شود باندهای غیر اختصاصی ممکن است قبل از انجام اولین چرخه PCR ایجاد شود حتی تا وقتی که دمای لوله‌ها ۶۵ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد اتصالات غیر اختصاصی پرایمر/پرایمر و پرایمر/ الگو ممکن است بوجود آید و بعنوان سوبسترای اولیه برای DNA پلیمراز عمل کند. ساده‌ترین روش برای جلوگیری از چنین اتصالات اولیه غیراختصاصی و بهترکردن شرایط اتصال صحیح پرایمر،

استفاده از روش Hot start است که اساس این روش بر جدا کردن فیزیکی مواد واکنش تا زمان رسیدن به دمای بالا می‌باشد. یک یا چندماده قبل از رسیدن به دمای بالاتر از ۷۰ درجه سانتی‌گراد از واکنش جدا می‌شود و پس از رسیدن به دمای بالا در واکنش وارد می‌کنند. ارزان‌ترین روش اضافه کردن تمامی مواد واکنش به جز DNA پلیمراز است. این روش برای تعداد زیاد نمونه‌ها به دلایل زیرامکان‌پذیر نیست:

۱- زمان مورد نیاز برای اضافه کردن آنزیم به هرلوله زیاد است

۲- اشتباه‌های ناشی از عدم تمرکز حواس که باعث اضافه نکردن آنزیم به یک یا چند لوله می‌شود

۳- احتمال آلودگی لوله‌ها به دلیل باز شدن در آنها

برای حل این مشکل و تسهیل انجام PCR گرم آغاز یک سری محصولات تجاری عرضه شده است، مثل Ampliwax Gems که گلوله‌های مومی با فرمول خاص می‌باشند. یک عدد از آن را در لوله‌های حاوی پرایمر، dNTPs (دئوکسی نوکلئوتیدتری فسفات)، Mg^{2+} اضافه کرده و واکنش در یک ترموسایکلر در دمای ۷۵ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰-۵ دقیقه نگهداری می‌شود تا موم ذوب شود. سپس لوله‌ها تا زیر ۳۵ درجه سانتی‌گراد سرد می‌شود تا موم مجددا جامد شود و یک لایه محافظ بر روی مواداولیه واکنش تشکیل شود. مواد دیگر واکنش از قبیل DNA الگو، DNA پلیمراز و بافر را می‌توان بر روی لایه موم ریخت و سپس PCR را آغاز کرد. در هنگام بالا رفتن دما موم ذوب می‌شود و مواد جامد موجود در لایه رویی موم با مواد پایین مخلوط می‌شوند تا PCR آغاز شود و موم به روی فاز آبی قرار می‌گیرد. لایه موم هم یک سد در برابر تبخیر آب درحین چرخه‌های دمایی است وهم بصورت یک مانع فیزیکی، برای جلوگیری از آلودگی عمل می‌کند.

RT-PCR

الگوی اولیه دراین روش مولکول RNA تک زنجیره‌ای است. ازآنجایی که DNA پلیمراز قادربه استفاده از RNAبعنوان الگو نمی‌باشد، مرحله دیگری به PCR اضافه شده است. طی این مرحله با استفاده از آنزیم Reverse Transcriptaseاز الگویRNA ،مکملش یعنی cDNA سنتز می‌شود و سپس بوسیله تکنیک PCR تکثیر می‌یابد. آنزیم نسخه‌بردار معکوس در این روش از ویروس میلوبلاستومای مرغ (AMV) بدست می‌آید. کاربرد این آنزیم

به دلیل حساس بودنش به حرارت پایین بوده ولی با کشف باکتری به نام ترموس ترموفیلوس این روش بهبود یافت. این باکتری DNA پلیمراز مقاوم به حرارت به نام Tth تولید می‌کند و در حضور یون منگنز دارای فعالیت نسخه‌برداری معکوس است و در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد توسط این آنزیم از روی RNA، DNA ساخته می‌شود. سپس منگنز اضافی توسط اتیلن گلیکول تتراستیک اسید EGTA حذف می‌شود و این آنزیم از DNAای که خود ساخته استفاده و آن را تکثیر می‌کند. برای تکثیر ماده ژنتیکی ویروس‌های RNAدار مثل HIV از این روش استفاده می‌شود.

Randomly amplification polymorfic DNA(RAPD-PCR)

این روش تحت عنوان PCR با پرایمرهای متزلزلArbitrarily primed PCR نیز نامیده می‌شود. یک روش سریع برای انگشت نگاری ژنومی می‌باشد و انگشت نگاری ژنومی در تحقیقات جنایی، جرم شناسی، پزشکی قانونی در تعیین والدین و روابط پدر فرزندی و تعیین روابط خویشاوندی نقش تعیین کننده دارد. دراین روش تنها از یک پرایمر چند نوکلئوئیدی کوتاه (۱۰-۹ نوکلئوئیدی محتوی GC٪۵۰) که بطور تصادفی از توالی‌های بازی انتخاب شده است برای ساخت DNA از روی ناحیه‌ای از DNA الگو که پرایمر تا حدی متصل شده، استفاده می‌شود. RAPD-PCR براساس تکثیر تصادفی در دمای پایین انجام می‌شود، نواحی مختلف ژنومی به طور همزمان در یک واکنش PCR قابل تکثیر می‌باشد. چرخه‌های ابتدایی باید در دمای پایین ۳۷ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد معمولا برای ۵ چرخه اولیه انجام شود تا پرایمر به جایگاه‌های تصادفی در داخل ژنوم متصل شوند. سپس دما تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد، واکنش برای ۳۵-۳۰ چرخه دیگر ادامه می‌یابد، در واقع تنها جایگاه‌های مناسب‌تر از بین جایگاه‌های تصادفی اولیه تکثیرخواهند شد. البته اگر مکان‌های اتصال پرایمر روی دو رشته الگو در فاصله مناسبی قرار گرفته باشند، و جهت‌گیری مناسبی نیز نسبت به هم داشته باشند،DNA پلیمراز قادر به طی کردن فاصله بین ۲ پرایمر اتصال یافته خواهد بود. با بهینه‌سازی دقیق می‌توان در حدود ۵۰ تا ۱۰۰ قطعه DNA مختلف بدست آورد. این چند شکلی‌های DNA یا از اختلافات موجود در توالی DNA در مکان‌های اتصال پرایمر یا از دگرگونی‌هایی که در اثر اضافه شدن، حذف و واژگونی در نواحی تکثیر شده روی داده است، منشا

می‌گیرد. باندهای مشاهده شده بازتابی از ساختمان کل مولکول DNA استفاده شده به عنوان الگو می‌باشند. این روش تکنیکی عالی در فیلوژنتیک یا شجره‌شناسی می‌باشد، انتظار می‌رود که دو موجود زنده خویشاوند دارای الگوی باندی مشابه‌تری نسبت به۲ موجودی باشند که از نظر تکاملی دورتر هستند.

Nested PCR (PCR داخلی یا لانه‌ای)

راه‌حلی برای افزایش حساسیت و دقت PCR است و جداسازی محصول اختصاصی مورد نظر را از بین انبوه محصولات غیر اختصاصی میسر می‌سازد. د در این روش بمنظور افزایش حساسیت PCR از دو جفت پرایمر استفاده می‌شود. ابتدا با یک جفت پرایمر اول در طول ۳۰-۱۵ چرخه، قطعات مشخصی از DNA هدف تکثیر می‌یابند. سپس محصول PCR حاصل به لوله دیگری منتقل شده و بعنوان الگو استفاده می‌شود. در این روش از دو جفت پرایمر استفاده می‌شود طوریکه جفت دوم در بین جفت اول جای می‌گیرد ابتدا پرایمراول (پرایمربیرونی) اضافه می‌شود و باعث تکثیر قطعاتی از DNA می‌شود که احتمالا تعدادی از آنها محصولات غیراختصاصی‌اند. محصول PCR واکنش اول به عنوان DNA الگو برای PCR دوم در حضور پرایمرهای داخلی (پرایمردوم) که مکمل قسمت داخلی‌تر قطعه DNA موردنظر است، مورد استفاده قرار می‌گیرد. احتمال بسیار ضعیفی وجوددارد که محصولات غیراختصاصی برای جفت پرایمر داخلی اختصاصی دیگر نیز دارای محل شناسایی باشند نتیجاً این امر باعث افزایش نسبت محصول واقعی به محصول غیراختصاصی خواهدشد. اگر طراحی ۲پرایمر داخلی به دلیل عدم دسترسی به توالی کامل ممکن نباشد می‌توان با استفاده از توالی پرایمر اولیه با افزودن ۲ یا ۳ نوکلئوتید به انتهای ´۳ پرایمر دوم را طراحی کرد با اینکه پرایمرهای داخلی همپوشانی قابل توجهی با پرایمرهای اولیه دارد اما باعث تکثیر اختصاصی توالی هدف و حذف محصولات غیراختصاصی می‌شود. البته در این حالت نباید از آنزیم‌های دارای فعالیت تصحیح خطا ´۳ اگزونوکلئازی استفاده کرد تا انتهای ´۳تعیین کننده حفظ شود.

در واقع در این روش تکثیر مجدد بخشی از محصول PCR با استفاده از پرایمرهایی که نسبت به پرایمرهای PCR اول درونی‌تر هستند، صورت می‌گیرد. در این روش از دو سری پرایمر استفاده می‌شود، که یک جفت از آنها پرایمرهای خارجی و یک جفت دیگر پرایمرهای داخلی بوده و PCR نیز در دو مرحله انجام می‌گیرد. ابتدا یک

قطعه بزرگتر توسط پرایمرهای خارجی در دوره اول PCR از روی DNA الگو تولید می‌شود، سپس محصول PCR اول به عنوان الگو برای دور دوم PCR با استفاده از پرایمرهای داخلی استفاده می‌شود. حساسیت و اختصاصیت تکثیر DNA و RNA با استفاده از این روش بسیار بالا بوده و معمولاً محصولات غیراختصاصی در دور دوم PCR وجود ندارد. در این روش بعد از انجام PCR اولیه اگر محصول غیراختصاصی تولید شده باشد، بسیار بعید است که توالی نوکلئوتیدی این محصول برای پرایمرهای داخلی قابل شناسایی باشد، تا بتواند در مرحله دوم PCR تکثیر شود و به همین دلیل اختصاصیت این روش به طور قابل توجهی بالا می‌باشد. البته بالا بودن آلودگی می‌تواند باعث کاهش حساسیت بالای این روش گردد، بنابراین در انجام این روش باید دقت فراوانی صورت گیرد.

PCR Inverse (PCR معکوس)

در این روش هدف تکثیر قطعه‌ای ازDNA است که هیچ اطلاعی در مورد توالی پایانه‌های آن در دست نیست ولی در عوض توالی قسمتی از یک ناحیه درونی آن در دست است. برای این هدف DNA ژنومی با یک آنزیم محدوداالاثر مناسب هضم می‌شود و سپس اتصال مجدد مولکول‌ها جهت بدست آوردن قطعات DNA حلقوی، بعد از حلقوی شدن توالی هدف شناخته شده با یک آنزیم محدوداالاثر دیگر هضم می‌شود که این امر باعث قرارگیری نواحی ناشناخته بین ۲ ناحیه شناخته شده حاصل از هضم آنزیمی می‌شود. حال با طراحی پرایمر مناسب برای توالی شناخته شده می‌توان نواحی ناشناخته را تکثیر کرد. این روش برای شناسایی جایگاه‌های الحاق ویروس‌ها و ترانسپوزونهایی که بطور تصادفی در ژنوم ادغام می‌شود مفید است.

الگوی اولیه در RT-PCR، مولکول RNA تک زنجیره‌ای است. از آنجائیکه DNA پلیمراز قادر به استفاده از RNA بعنوان الگو نمی‌باشد، مرحله دیگری به PCR اضافه شده است. طی این مرحله، با استفاده از آنزیم رورس ترانس کریپتاز RT (Reverse Transcriptase)، از الگوی RNA، مکمل آن DNAC (complementary DNA) سنتز می‌شود و بوسیله تکنیک PCR تکثیر می‌یابد. بمنظور تعیین گونه و حساسیت دارویی در ویروس‌شناسی و مایکوباکتریولوژی، از این روش برای تکثیر RNA ریبوزومی استفاده می‌شود.

Multiplex PCR (PCR چندتایی)

در این تکنیک از چندین جفت پرایمر اختصاصی دریک محلول PCR جهت تکثیر چندین توالی هدف در یک زمان استفاده می‌شود. بنابرین می‌توان با آزمایشات کمتر و زمان کوتاه‌تر اطلاعات بیشتری جمع‌آوری کرد. در میکروب‌شناسی بالینی، با استفاده از این روش امکان شناسایی چندین عامل بیماری در یک نمونه بطور هم زمان وجود دارد و می‌توان عفونت‌های مخلوط را تشخیص داد.

انواع Multiplex PCR

۱- واکنش PCR با یک الگو: که دراین روش یکDNA الگودر طولش با چندین جفت پرایمر جهت تکثیر نواحی مخصوص جفت می‌شود. با توجه به این که محصولات بدست آمده اندازه متفاوت دارند، بخش‌های بزرگی از یک DNA هدف جهت جستجوی تغییرات می‌توان بررسی شود.

۲- واکنش PCR با چند الگو: در میکروب شناسی بالینی با استفاده ازاین روش در عفونتهای مخلوط امکان شناسایی چندین عامل بیماری در یک نمونه بطورهم زمان وجوددارد. با پرایمرهای مختلف و ویژه به جستجوی عوامل مختلف پرداخته می‌شود پی به منشا عفونت می‌برند. چون که دراین تکنیکها از چندین پرایمراستفاده می‌شود رعایت نکات زیرضروری است:

۱- باید پرایمرهارا به گونه‌ای طراحی کرد که Tmدمای ذوب یکسانی داشته باشند و یااختلاف دمای ذوب پرایمرها بیش از ۳ تا ۵ درجه سانتی گراد نباشد

۲- اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده برای توالی هدف مهم است

۳- پرایمرهای طراحی شده باید برای تشکیل دایمرپرایم با همه پرایمرهای حاضر در مخلوط واکنش بررسی شود. چون دیمر شدن منجر به تکثیر محصولات غیر اختصاصی می‌شود.

Real time PCR

در این سیستم تشخیصی یک ماده فلورسانت در طی واکنش متناسب با میزان محصولات هرسیکل آزاد می‌شود و میزان فلورسانت آن توسط دتکتورشناسایی و ثبت می‌گردد و بدین ترتیب میزان *DNA* تکثیر شده طی یک چرخه تا چرخه بعدی را می‌توان اندازه گیری کرد. بنابراین میزان محصول در هر چرخه قابل ردیابی است در حالیکه محصول روش‌های سنتی پس از پایان واکنش و الکتروفورز مشخص می‌شود.

روش‌های سنجش با Real time PCR

۱- استفاده از رنگ‌های فلورسنت مثل سایبرگرین: هم زمان با دورشته‌ای شدن DNA سایبرگرین به شیارکوچک DNA متصل می‌شود و با جذب طول موج۴۹۸ نانومتری، نور۵۲۲ نانومتری را ساطع می‌کند. با افزایش مقدار محصول PCR رنگ بیشتری متصل می‌شود و میزان فلورسانس افزایش می‌یابد، پس میزان فلورسانس متناسب با مقدار DNA دورشته‌ای در واکنش است اما مهمترین عیب آن اتصال به دو رشته هایی مثل پرایمردایمر و دیگر باندهای غیراختصاصی است که باعث می‌شود نتایج بیشتر از غلظت اصلی برآورد شود.

۲- استفاده از پروب‌های فلورسنت: پروب‌ها برخلاف سایبرگرین براساس تشخیص اختصاصی توالی محصول کار می‌کنند. پروب‌ها معمولا یک رنگ فلورسنس‌زا درانتهای ´۵ (Reporter) و یک رنگ خاموش کننده در انتهای ´۳ (Quencher) دارند و وقتی در فاصله مولکولی نزدیکی قرار دارند بازتابشی در دستگاه ثبت نمی‌شود اما پس از جدایی نور ساطع شده از Reporter توسط Quencher قابل جذب نیست و توسط دستگاه بصورت فلورسانس قابل اندازه‌گیری است. مثلا استفاده از پروب Taq Man که اساس آن اگزونوکلئازی DNA پلیمراز Taq است. یک پروب ۳۰-۲۰ نوکلئوتیدی که در انتهای ´۵ به یک رنگ فلورسانس متصل است و در انتهای ´۳ به یک عامل خاموش کننده. پروب حدود چندباز بعداز انتهای ´۳ یکی ازپرایمرها طراحی می‌شود آنزیم پس از نزدیک شدن به پروب با استفاده از فعالیت ´۳ à 5 اگزونوکلئازی خود پروب را لیز می‌کند و در نتیجه رنگ فلورسانس از عامل خاموش کننده جدا می‌شود و باعث ایجاد فلورسانس می‌گردد.

روش Real-time PCR در سال‌های اخیر به عنوان روشی انتخابی جهت تشخیص بسیاری از بیماری‌های عفونی در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. با استفاده از این فن آوری، واکنش زنجیره پلیمراز توسط مولکول‌های گزارش گر فلورسنت انجام و از این طریق، تولید فرآورده‌های تکثیری طی هر چرخه واکنش PCR گزارش می‌شود. بدین ترتیب مجموعه‌ای از خصوصیات از جمله؛ حساسیت و اختصاصیت بالا، داده‌های قابل اعتماد و خطر پایین آلودگی، فن آوری Real-time PCR را به جایگزینی مناسب برای PCR معمولی تبدیل کرده است. این روش اغلب در تعیین کمیت سطوح بیان ژن نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آنجایی که تمامی مراحل Real-time PCR در داخل یک لوله دربسته انجام می‌شود، خطر ایجاد آلودگی در آن در مقایسه با PCR معمولی بسیار کاهش یافته و در نتیجه از حصول نتایج مثبت کاذب جلوگیری می‌شود.

ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-PCR)

(ARMS-PCR) برای تشخیص موتاسیون‌های نقطه‌ای بکار می‌رود و از دو جفت پرایمر استفاده می‌شود. در این روش، واکنش در دو لوله جداگانه انجام می‌شود که یکی از آنها حاوی پرایمرهای نوع موتاسیون یافته و دیگری حاوی پرایمرهای نوع معمولی است. لوله حاوی پرایمر موتاسیون یافته انجام شود، در DNA هدف، موتاسیون اتفاق افتاده است و تکثیر در لوله حاوی پرایمر معمولی، نشان دهنده آن است که موتاسیونی اتفاق نیفتاده است. از این متد می‌توان در تشخیص موتاسیون‌های مولد مقاومت دارویی در باکتری‌ها استفاده کرد.

Allele-specific PCR

به منظور بررسی تغییر فقط دریک نوکلئوتید (single-nucleotidepolymorphisms) در تشخیص بیماری‌ها و کلونینگ DNA بکار می‌رود.

Assembly PCR

یک روش آزمایشگاهی برای سنتز مولکول‌های DNA بزرگ است. بدین منظور از الیگونوکلئوتیدهایی استفاده می‌شود که هم پوشانی دارند.

Asymmetric PCR

در این روش فقط یکی از دو رشته DNA تکثیر می‌شود. پلی نوکلئوتیدهای حاصل بمنظورتعیین توالی یا تولید شاخص‌های دو رگه مورد استفاده قرار می‌گیرند.

Helicase-dependentamplification

در این تکنیک برای جدا کردن دو رشته DNA، بجای حرارت از آنزیم هلیکاز (Helicase DNA) استفاده می‌شود.

Hot-start PCR

برای جلوگیری از تکثیر DNAهای ناخواسته مخصوصا در مراحل اولیه PCR استفاده می‌شود. بدین منظور قبل از افزودن پلیمراز، دمای محلول به نقطه ذوب (مثلا ۹۵ درجه) رسانده می‌شود.

PCR specific–Intersequence

برای انگشت‌نگاری DNA از طریق تکثیر مناطق بین سکانس‌های تکراری بکار می‌رود.

Inverse PCR

کاربرد این تکنیک زمانی است که فقط یک سکانس داخلی شناسایی شده است.

PCR Ligation-mediated

در این روش از DNAهای رابط کوچک (linkers smallDNA) که به DNA موردنظر متصل شده‌اند، استفاده می‌شود. کاربرد این روش در تعیین توالی DNA (sequencing DNA)، walking genome و DNA footprinting است.

PCR Methylation-specific

این تکنیک توسط StephenBaylin وJim Herman در دانشکده پزشکی دانشگاه جان هاپکینز ابداع شده است و بمنظور بررسی متیلاسیون در قطعات CpG در DNAی ژنوم یک بکار می‌رود.

Multiplex PCR

در این روش با استفاده از یک جفت پرایمر، می‌توان چند نوع DNA مختلف را تکثیر کرد. در این تکنیک از چند پرایمر در یک محلول PCR استفاده می‌شود و آمپلیکون‌هایی (amplicons) تهیه می‌شود که اندازه‌های متفاوتی دارند ومختص DNAهای مختلفی هستند. با هدف قرار دادن چندین ژن در یک محلول PCR، می‌توان با آزمایشات کمتر و زمان کوتاه‌تر، اطلاعات بیشتری جمع‌آوری کرد.

Nested PCR

این روش از تکثیر DNAی ناخواسته جلوگیری شده اثرات زمینه‌ای کم می‌شود. بدین ترتیب در فرآیند تکثیر DNA هدف، اختصاصی بودن (specificity) افزایش می‌یابد.

Quantitative PCR

این تکنیک برای بررسی وجود DNA، cDNA یا RNA و همچنین تعیین غلظت آنها بکار می‌رود. یکی از شاخه‌های مهم این تکنیک PCR Quantitative real-time است که از نظر صحت (accuracy) در بالاترین سطح قرار دارد و در آزمایشگاه‌های تشخیص بالین کاربرد وسیعی یافته است. در روش Q-PCR برای تعیین غلظت DNA از رنگهای فلورسانس (نظیر SybrGreen) یا شاخص‌های DNA فلورسانس (نظیر TaqMan) استفاده می‌شود.

RT-PCR

این نوع از PCR بمنظور شناسایی، استخراج یا تکثیر RNA از نمونه‌های سلول یا بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تکنیک از ترانس کریپتاز معکوس (transcriptase reverse) برای تبدیل RNA به cDNA استفاده می‌شود.

TAIL-PCR

برای جداسازی سکانس‌های ناشناخته‌ای بکار می‌رود که متصل به یک سکانس شناخته شده‌اند.

Touchdown PCR

یک نوع تغییر یافته از PCR است که موجب کاهش اثرات زمینه‌ای و غیراختصاصی می‌شود. در این روش برنامه PCR به گونه‌ای طراحی می‌گردد که در طی سیکل‌های متوالی، بتدریج دمای مرحله اتصال (step Annealing) کاهش می‌یابد. بدین ترتیب که در سیکل‌های ابتدایی، دما در حدود ۳الی ۵ درجه بالاتر از Tm پرایمر و در سیکل‌های انتهایی در حدود ۳ تا ۵ درجه پائین‌تر از Tm پرایمر تنظیم می‌شود.

PAN-AC

در این تکنیک، سلول‌های زنده مورد مطالعه قرار می‌گیرند. به همین دلیل تکثیر DNA در دمای ثابت انجام می‌شود.

منابع

۱- رضوان، حوری، ۱۳۸۳، **ویروس‌ها و انتقال خون و روش‌های نوین کاهش خطر**، سازمان انتقال خون ایران، انتشارات امین، ۴۱-۲۷.

۲- علویان، سیدموید، ۱۳۸۳، **هپاتیت B ویژه پزشکان و متخصصین**، انتشارات ما و شما.

۳- کوشا، احمد، ۱۳۸۳، برنامه و راهنمای ایمن‌سازی، مصوب کمیته ایمن‌سازی، انتشارات اختر، ۱۴-۱۱.

۴- کوشا، احمد، ۱۳۸۵، **راهنمای مراقبت هپاتیت B در کشور، وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی (معاونت سلامت)**، مرکز مدیریت بیماری‌ها، انتشارات مرکز مدیریت بیماری‌ها.

۵- مورایی، روزنتال، فالر، ۱۳۸۷، ترجمه: اسلامی، گیتا، فلاح، فاطمه، ۱۳۸۷، **میکروب‌شناسی پزشکی**، انتشارات آییژ، ویراش پنجم، ۸۲۴-۸۰۷.

6- Alavian SM, Mostajabi P, Malekzadeh R. Evaluation of hepatitis B transmission risk factors in Tehran blood donors. Govaresh, 2004; 9: 169-175.

7- Abe A, Tanaka A. Quantitation of HBV Genomic DNA by Real PCR, Journal Microbiology, 1999; 37: 2899-2903.

8- Alavian SM, Fallahian F, Lankavani KB. The Chaning epidemiology of viral hepatitis B in Iran, Gastronitestrial Liver Disease, 2007; 16: 403-406.

9- Alavian SM, Hajarizadeh B, Kabir A. Hepatitis B virus Infection in Iran, Hepatiti Monthy, 2008; 8: 281-294.

10- Alavian SM, Keyvani H, Rezai M, Ashayeri N. Preliminary report of hepatitis B virus genotype prevalence in Iran, World Journal Gastroenterol, 2006; 12: 5211-5213.

11- Al-Awaidy S, Abu-Elyazeed R, Al Hosani H. Seroepidemiology of hepatitis B infection in pregnant women in Oman, Qatar and United Arab Emirates, Journal Infection, 2006; 52: 202-206.

12- Ali HY. Hepatitis B infection among Iraqi Children: the impact of sanctions. East Mediterr Health Journal, 2004; 10: 6-11.

13- Alizadeh AH, Ranjbar M, Ansari S. Seroprevalance of hepatitis B in Nahavand, Islamic Republic of Iran, East Mediterr Health Journal, 2006; 12: 528-537.

14- Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implication in transfusion, Pub Med, 2004; 86: 83-91.

15- Almedia JD, Kulatilake AE, Mackay DH. Possible airborne spread of serum- hepatitis virus within a haemodialysis unit, Lancet, 1971; 2: 849-850.

16- Almeida PA, Cardoso D.D.P. Detection of HBV DNA by Nested-PCR in a HBsAg and anti-HBc negative blood bank donor, Journal of clinical Virology, 2006; 36: 231-234.

17- Alrowaily M, Abolfo M, Touhi M. Hepatitis B Virous sero-prevalence among pregnant femails in Saudi Arabi, Virology, 2008; 14: 70-72.

18- Al-Shamahy H. Prevalence of Hepatitis B surface antigen and risk factors of HBV infection sample of healthy mothers and their infants in Sana'a Yemen, Ann Saudi Medical, 2000; 20: 5-6.

19- Altaf A, Shah SA, Zaidi NA. High risk behaviors of injection drug users registered with harm reduction program in Karachi, Pakistan Harm Reduct Journal. 2007; 4: 704-707.

20- Alter MJ, Ahton J, Weisfuse I. Hepatitis B transmission between heterosexuals, Lancet, 1986; 256: 1307-1310.

21- Ameen R, Sanad N, Al-Shemmavi S. Prevalence of viral markers among first-time Arab blood donors in Kuwait, Transfusion, 2005; 45: 1973-1980.

22- Amini-Bavil-Olyaee S, Sarrami-Forosshani R, Adeli A. Complete genomic sequence and phylogenetic relatehess of hepatitis B virus isolates from Iran, Journal Viology1998; 76: 318-326.

23- Amini-Bavil-Olyaee, N. Zali, An Extermely Aberrant Subtype of Hepatitis B Virus Genotype D in Iran, Hepatitis Monthly, 2009; 2: 73-75.

24- Andre F. Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa, Vaccine, 2000; 18, 20-22.

25- Andrew A, Henry B, Gbagho F. Prevalence of HBV, HCV in Ghana, Journal of Microbiology, 2005; 7, 74-76.

26- Arrieta J, Pardo M, Manzarbeitia F. Detection of hepatitis B and C virus in salivery glands, Lancet, 2001; 158: 259-264.

27- Barlet V, Zarski JP, Thelu MA, Seigneurin JM. Advantage of PCR fordetecting low amounts of HBV DNA in patient' sera, Virology, 1999; 42: 373-379.