قریش امدادی، دانشکده علوم و فناوری های نوین،واحد علوم دارویی تهران
طاهره ناجی، هیأت علمی گروه علوم سلولی مولکولی

پیشرفت های اخیر در تشخیص هاری انسان

هاری یک بیماری پیشرونده و کشنده سیستم عصبی است که از راه گزش جانوران هار منتقل می شود. سالانه باعث مرگ ٦١٠٠٠ انسان می شود. خسارت ناشی از این بیماری در سیستم بهداشت عمومی و از نظر مالی به علت نبود روش های آزمایشگاهی دقیق، نامعلوم است. تشخیص سریع هاری می تواند در اقدامات کنترلی و بهداشتی مؤثر واقع شود. واکسیناسیون و پیشگیری پیش و پس از گزش مفید است. تشخیص پیش از مرگ هاری در انسان، به خصوص پس از زنده ماندن چند مورد از افراد مبتلا به هاری، انگیزه ای برای محققان شده است تا به دنبال روش های درمانی باشند. روش های موجود برای تشخیص پیش و پس از مرگ هاری، دارای معایبی است. پیشرفت های تکنولوژیکی تازه باعث امیدواری در یافتن چندین روش در زمینه تشخیص آنتی ژن و آنتی بادی ویروس و نیز یافتن اسید نوکلییک ویروسی و نیز بیومارکرهای(biomarkers) اختصاصی شده است. این آزمایش ها که مکمل روش های قدیمی است، می تواند انقلابی در زمینه تشخیص هاری در آینده انجام دهد.

هاری یکی از قدیمی ترین بیماری های مشترک شناخته شده برای بشر است. در میان روش های انتقال این بیماری، روش گزش با حیوانات هار در صدر موارد منجر به مرگ است. این بیماری در سال ۲۰۱۰ باعث مرگ ٦١٠٠٠ هزار نفر در جهان شده که ٨٤٪ آن مربوط به روستاها بوده است. هزینه این بیماری در آمریکا سالانه ٣,٦ میلیارد دلار است که از این مقدار ١,٦ میلیارد دلار صرف مراقبت پس از تماس با ویروس می شود.(١)

تشخیص آزمایشگاهی و مراقبت از انسان ها و دام های مبتلا به هاری در اکثر کشورهای در حال پیشرفت با محدودیت پولی مواجه است. چون روش های آزمایشگاهی برای تشخیص هاری، گران و پیچیده است، در نتیجه خسارات ناشی از این بیماری در کشورهای در حال پیشرفت قابل تخمین نیست(٢-٣).

تشخیص آزمایشگاهی هاری در موارد انسانی

دو فرم مشخص بیماری در انسان وجود دارد: فرم خشن و فرم فلجی. فرم کلاسیک یا همان فرم خشن، ٨٠٪ موارد را تشکیل می دهد و دارای نشانه های کاملا مشخص است. در مواردی که نشانه ها بالینی نظیر ترس از هوا(آیروفوبیا) و یا ترس آب(هیدروفوبیا)نباشد. آن موقع روش تشخیص آزمایشگاهی نیاز خواهد بود. فرم دیگر بیماری که همان فرم فلجی یا نا مشخص است، حدود ٢٠٪ نمونه های انسانی را تشکیل می دهد و نیاز به تشخیص آزمایشگاهی دارد. این فرم از نظر بالینی بایستی از سندروم گیلیان-بار (Guillain– Barre) و عوارض فلجی-عصبی ناشی از واکسن ضد هاری نوع سمپل (Semple– type، برگرفته از نام دکتر دیوید سمپل) که هنوز در برخی کشور ها از جمله مغولستان، میانمار و پاکستان استفاده می شود(٤-٥) تفریق داده شود. بایستی یادآوری کنیم که روش قطعی تشخیص GBS (سندروم گیلیان – بار) وجود ندارد و در بعضی نمونه ها نیز پیشینه ی از گزیدن حیوان نیست و یا در برخی نمونه ها نشانه روانی مشابه فرم پارالیتیک (فلجی) وجود دارد که مربوط به سایر بیماری هااست.

در نتیجه تشخیص سریع هاری برای انجام اقدامات مراقبتی و کنترل بیماری بسیار حیاتی است و در مواردی نیز که با سابقه گزش حیوان وجود ندارد می توان با تشخیص آزمایشگاهی هاری به علت آلودگی و کانون آن پی برد و اقدامات کنترلی دیگر را انجام داد.

مواردی نیز از انتقال هاری به واسطه پیوند اعضاء وجود دارد که (٦-٧) اهمیت غربالگری را در اهدا کنندگان عضو

به ویژه در هنگامی با نشانه های مشابه هاری و یا با عمل نامشخص، نشان می دهد.

مورد دیگری که با اهمیت تشخیص زود هنگام هاری می افزاید. این است که هر چند که بیماری هاری در انسان ۱۰۰٪ کشنده است ولی گزارش منتشره (۸) در خصوص زنده ماندن (هاری باخفاش) در سال ۲۰۰۵ پس از درمان با پروتکل میلواکی(Milwaukee) این امید را در پزشکان زنده کرده است که شاید برای هاری درمان دارویی پیدا کنند.

مراقبت مداوم و کارایی آزمایشگاه در نمونه های بالینی مشکوک به هاری در کشورهایی مثل سریلانکا و تایلند، که در کاهش موارد هاری انسانی موفق بوده اند و به سمت ریشه کنی در حرکتند، نقش بسیار مهمی ایفا می کند. مرزهای جغرافیایی به دلیل وجود ویروس در حیات وحش و تجارت جهانی این حیوانات قادر به محدود کردن ویروس نیست.

روش های تشخیص موجود برای هاری از نظر مزایا و معایب

روش آزمایشگاهی هاری از اوایل قرن ۱۸۰۰ پیش از میلاد، هنگامی که زینک (zinke) برای اولین بار نشان داد عفونت برای یک حیوان سالم پس از تلقیح بزاق حیوان هار منتقل می شود، بنیان گذاری شد. امّا مهم ترین کشف آزمایشگاهی مربوط به شناسایی اجسام نگری (Negri bodies) توسط آدلهی نگری (Adelhi negri) در سال ۱۹۰۳ و سپس پی بردن به اهمیت تشخیصی این اجسام توسط همسرش نگری- لوزانی (Negri– Luzzani) در سال ۱۹۱۳ بود که مسیر تأیید آزمایشگاهی را هموار کرد.

➤ **روش اول:** بررسی مستقیم ضایعات سلولی در بافت ها با استفاده از میکروسکوپ و دیدن گنجیدگی های داخل سیتوپلاسمی موسوم به اجسام نگری(Negri bodie) در سلول های آلوده، که با استفاده از آزمایش بافتی " سلر" (Sehher's Technique) در نمونه های مغز قابل رویت است. اندازه این گنجیدگی ها از ۳ میکرومتر تا ۳۰ میکرومتر است و اشکال گرد و بیضوی دارد و بسیار ایوزینوفیلیک با دانه های بازوفیلی بوده که این اجسام به شکل یک گل رز در داخل ماتریکس ایوزینوفیلیک چیده شده است.

– **مزیت این روش** : ساده و سریع است.

– **محدودیت این روش** : برای نمونه های تازه مغز خوب است و خاصیت خیلی کمی در مقاطع بافتی تثبیت شده دارد.

روش های بافتی نسبت به روش های ایمونولوژیکی به ویژه در نمونه های لیز شده حساسیت کم تری داشته و نه در موارد انسانی و نه در موارد حیوانی توصیه نمی شود.

➤ **نشان دادن آنتی ژن ویروس**

✓ روش آنتی بادی درخشان (FAT):

بیشترین روش مورد استفاده برای تشخیص پس از مرگ این روش است که هم توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO) و هم توسط سازمان بهداشت دام (OZE) توصیه می شود.از سال ۱۹۵۷ مورد استفاده و هنوز هم روش طلایی استاندارد برای تشخیص هاری است (۹-۱۰). در این روش با استفاده از تکنیک ایمونوفلورسانس، آنتی ژن موسوم به N یا همان آنتی ژن نوکلیوپروتیین ویروس نشان داده می شود.

الف- مزیت این روش : اختصاصیت و حساسیت این روش در صورت وجود داشتن یک آزمایشگاه متغیر تا ۹۹٪ است و نتیجه آزمایش ظرف چند ساعت مشخص می شود.

ب- محدودیت های این روش: بافت مغز باید تازه باشد و در مغز متلاشی شده قابل استفاده نیست، تهیه نمونه تازه مغز به دلایل مذهبی، فرهنگی و غیره شکل است، نیاز به یک دستگاه میکروسکوپ فلورسنس است که گران است و نیز نگهداری آن پر هزینه است و نیاز به پرسنل آموزش دیده دارد.

✓**روش تشخیص ایمونولوژیکی سریع آنزیم هاری(RREID)**

(RREID)Rapid Rabies Enzyme immynodiagnosis

می توان آنتی ژن N هاری را نیز همچون روش ایمنی- آنزیمی با تکنیک ایمنی – بافتی – شیمیایی شناسایی کرد. روش RREID یک تکنیک متکی به الایز است که توسط پرین (perrin) و همکارانش در سال ۱۹۸٦ پایه گذاری شده است. اساس این روش بر به دام انداختن پروتیین N توسط یک آنتی بادی مونوکلونال یا پلی کلونال قند N در مخلوط هموژن مغز است که متعاقباً آنتی ژن به دام انداخته شده توسط آنتی بادی مونوکلونال یا پلی کلونال حاوی پراکیداز تهیه شده در گونه های مختلف یا حتی بهتر از آن توسط اضافه کردن آنتی بادی که حاوی بیوتینیلات شناسایی می شود.

الف- مزایای این روش: در بررسی های مختلف ، این روش از حساسیت و ویژگی کافی همچون FAT(۱۱-۱۲) برخوردار است، مزیت دیگر این است که تجزیه شدن مغز تأثیری در نتیجه ندارد.

ب- محدودیت این روش: نیاز به نمونه بافت مغز است،که مانع از استفاده این روش پیش از مرگ است. جداسازی ویروس برای تایید تشخیص ضروری است، به ویژه هنگامی که روش FAT نتایج نامطمئنی بدهد و به خصوص در تعیین خصوصیات مولکولی و ویروس هایی که از مناطق تهی از هاری آمده باشند. در این مواقع از دو روش زیر استفاده می شود :

- MIT(Mice inoculation Technique): روش تلقیح در موش
- RTCT(Rapid tissue culture infection test) : روش کشت بافتی سریع

✓ **روش تلقیح در موش :**

در این روش ۳ تا ده توله موش با سن ٤-۳ هفتگی و وزن ١٤-١٢ گرم یا یک توله دو روزه از راه داخل مغز مورد تلقیح با محلول حاوی مغز آلوده قرار می گیرند. تا ۲۸روز پس موش ها را هرروز معاینه می کنند . دراین موش ها، پس از روز های ۵ تا ۷،هر لحظه بسته به دوره (نکویاسیون یا نهفتگی) نشانه های بیماری هاری را نشان می دهند. این نشانه ها شامل ژولیدگی موها و گوژپشتی و سپس کشیدن پای عقبی و سپس فلجی اندام خلفی و اندام قدامی است. برای تایید حضور ویروس می توان عصاره مغز موش های بیمار را در معرض FAT قرار داد.

معایب این روش: فاصله زمانی طولانی مدت پیش از تشخیص است چون موش ها بایستی ۲۸ روز تحت نظر باشند زیرا برخی سویه های وحشی ویروس دوره نهفتگی بیشتری دارند. البته اگر امکانات کشت سلولی باشد می توان جایگزین کرد که دیگر نیازی به موش زنده نیست و ارزان تر هم است.

مزیت این روش: می توان از یک موش مقدار زیادی ویروس برای بررسی های پسی به دست آورد.

✓ **تست عفونی کردن سریع کشت بافتی:**

(RTCT)Rapid Tissue Culture infection Test

جدا کردن ویروس در کشت بافتی در مقایسه با روش MIT سریع تر بوده و نتایج در ٤٨-٢٤ ساعت به دست می آید. لاین های سلولی مناسب برای جداسازی ویروس، منشا عصبی دارند از آن جمله Neuro-۲a که یک لاین سلولی نور و بلاستومای موشی است. از سایر لاین های قابل استفاده می توان به CER(Chicken- embryo-relat-ed)یا لاین سلولی جنینی جوجه یا کلیه نوزاد همستر (baby Hamster kidney = BHK-۲۱) اشاره کرد.

در این روش نمونه ی مشکوک بالینی یا هموژن مغز به سلول های رشد کرده در یک پلیت ۹٦ چاهکی یا داخل ویال تلقیح می شود و پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون و تثبیت با استون با FAT رنگ آنزیمی می گردند. به تازگی یک لاین سلولی جدید از کلیه جنینی انسان (Human Embryonic Kidney= HEK ۲۹۳) ارزیابی شده که همان اختصاصیت و حساسیت لاین سلولی Neuro-۲a را دارند .(۱۳)

مزیت این روش: سریع و ارزان است.

محدودیت: نیاز به امکانات کشت سلولی و نیز میکروسکوپ فلورسنت

➤ **نشان دادن آنتی بادی ها:**

حضور آنتی بادی هاری در سرم یا در مایع مغزی نخاعی به جزء در موارد واکسیناسیون دلیل ابتلا به هاری است. روش های سرولوژیکی در تشخیص پیش از مرگ کاربردی نیست. زیرا مرگ ناشی از ابتلا به هاری سریع و سرعت تبدیل سرمی پایین است و می تواند در تشخیص هاری فلجی کمک کننده باشد، چون در این فرم مدت زنده ماندن طولانی است. موارد استفاده روش های سرولوژیکی در بررسی های اپیدیولوژیکی پس از واکسیناسیون است.

برخی از روش های سرولوژیک به قرار زیر است:

- VN(Virus Neutralization): روش خنثی سازی ویروس که بیشتر در بررسی پاسخ های متعاقب واکسیناسیون استفاده می شود.
- RFFIT(Rapicl Flourscent Focus Inhibition Test) (روش تست مهار سریع کانونی فلورسانت):

یک روش سریع است که در ۲۰ ساعت به پایان می رسد. در تشخیص آنتی بادی های خنثی کننده ویروس کاربرد دارد و در بررسی های سرمی پس از واکسیناسیون استفاده می شود. این روش یک روش استاندارد طلایی بوده و سال ها برای تخمین آنتی بادی های خنثی کننده ویروس هاری مورد استفاده قرار گرفته است. امّا نیاز به دقت بیشتر، میکروسکوپ فلورسنت، پرسنل آموزش دیده و مراقبت از انتشار ویروس به افراد دارد.

تست های تشخیصی جدید برای هاری

➤ **نشان دادن آنتی ژن ویروسی :**

✓ **تست سریع و مستقیم ایمنوهیستوشیمی: (DRIT)Direct Rapid Immunohistochemical test**

یکی از مهم ترین پیشرفت های سال های واپسین، طراحی همین روش است که در آمریکا انجام شده است. در این روش، آنتی ژن N ویروس هاری را در نمونه مغز مشکوک پیدا می کنند. آنتی ژن N ویروس اگر موجود باشد به صورت خوشه قرمز قهوه ای در داخل سلول عصبی، آکسون و در کل سلول های مغزی دیده می شود. آزمایش در کمتر از یک ساعت طول می کشد و می شود به صورت سرپایی انجام داد و نیاز به میکروسکوپ و فلورسنت نیست. در بررسی های میدانی این تست حساسیت صد در صدی و ویژگی معادل FAT برخوردار بوده است. با این که معرف این روش بایستی در یخچال نگهداری شود، ولی یکی از مهم ترین مزایای این روش ، امکان تفسیر آن با یک میکروسکوپ نوری معمولی است. این تست آسان برای کشور های در حال پیشرفت برای بررسی های اپیدیولوژیک به علت هزینه پایین بسیار مناسب است. WHO این روش را به عنوان جایگزین FAT معرفی می کند. تا در برنامه های مراقبتی میدانی مورد استفاده قرار گیرد.

✓ **تست ایمنوهیستوشیمی سریع غیر مستقیم IRIT(Indirect Rapid Immunohistochemistry Test) :**

به تازگی از این روش برای تشخیص و تفریق واریانت های ویروس هاری با استفاده از میکروسکوپ های قدیمی نوری استفاده می شود. این روش نیاز به تجهیزات پیشرفته ندارد و در فیلد قابل انجام است. این روش ارزان قیمت است که می توان در مطالعه شیوع، توزیع و انتقال ویروس بین میزبان های مخزن در مناطق آنزیوتیک استفاده کرد.

✓ **روش ایمنوکروماتوگرافیک:**

این روش جدید نیز برای تشخیص آنتی ژن ویروس در نمونه های پس از مرگ استفاده می شود که یک آزمایش ایمونولوژیکی سریع و بدون نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی است. هر چندین این تست حساسیت بالایی دارد، ولی در مورد هاری انسانی، اختصاصیت پایینی دارد و از این رو برای تشخیص هاری انسانی مناسب نیست و برای تشخیص هاری حیوانی مناسب است.

✓ **سایر تست های تشخیص آنتی ژن:**

یکی از این تست ها، روش ساده، مطمئن و سریع الایزای ساندویچی است که می تواند هر هفت ژنوتیپ در حال گردش در اروپا، آفریقا و آسیا و اقیانوسیه را شناسایی کند. از سایر روش ها می توان به تست ایمنی نقطه رنگی (dot–blot immunoassay) برای بافت های مغزی (١٤)، تست ایمنی آنزیمی برای تشخیص سریع هاری در انسان و دام اشاره کرد.

➤**روش های تشخیص اسید نوکلییک:**

روش های مبتنی بر تشخیص اسید نوکلییک انقلابی در تشخیص پیش از مرگ هاری در سال های اخیر ایجاد کرده است. بویژه روش PCR (واکنش زنجیره پلیمراز=polymerase Chain Reaction) در کنار روش های قدیمی بسیار مورد استفاده است.

✓ **PCR از نوع ترنس کریتپاز معکوس (RT–PCR):**

چندین روش برای این آزمایش وجود دارد (١٥–١٦–١٧). از تکه های ایجاد شده با این روش می توان در شناسایی خصوصیات مختلف ویروس و آزمایشات فیلوژنتیک استفاده کرد. محدودیت مهم این روش خطر است که مانع استفاده در تشخیص هاری انسانی و حیوانی است.

✓ **Real Time PCR :**

روش های مبتنی بر این تکنیک امکان شناسایی و تعیین کمی رو نوشت های ژنوم را فراهم کردهT و به دلیل اینکه داخل لوله هستند امکان آلودگی متقاطع کاهش می یابد. این روش اختصاصیت بالایی دارد و بایستی با دقت بیشتری انجام شود.

سایر روش های مولکولی:

♦ روشNASBA(Nacleic Acid Sequence–Bbased Amplifiction)

یا روش تغلیظ اسید نوکلییک بر اساس توالی آن، از ٣ آنزیم جهت تولید چندین رو نوشت RNA در شرایط هم دما استفاده می کند. این روش در تشخیص RNAهاری در نمونه هایی مایع مغزی نخاع و بزاق پیش از مرگ نسبت به روش های PCR موجود از حساسیت و سرعت بیشتری برخوردار است.

♦ روش-LAMP(Loop– Mediated Isothermal Am-plification) :

یا تغلیظ همدمایی با کمک قوس نیز روش دیگری از تغلیظ DNA با حساسیت و اختصاصیت بالا و بدون نیاز به چرخه دمایی است که در تشخیص هاری مورد استفاده است. به دلیل عدم نیاز به لوازم زیاد چرخه دمایی در RT–PCR، از این روش در شرایط میدان و در برنامه های مراقبتی استفاده کرد.

رویهمرفته می توان گفت که روش های مبتنی بر تشخیص اسید نوکلییک را می شود برروی نمونه های بیولوژیکی زیادی از قبیل مایع مغزی نخاعی (CSF) – بزاق – اشک – ادرار– عصاره فولیکول مو و مغز چه پس و چه پیش از مرگ در انسان برای تشخیص هاری به کار برد.

حتا از این روش می توان برای تشخیص هاری در نمونه های تجزیه شده یا آرشیوی بهره جست و نیز می توان در بررسی های اپیدیولوژیکی و گذشته نگر استفاده کرد. مهم ترین ایراد این روش ها نیاز به روش های کنترل کیفیت خیلی شدید است تا از نتایج نسبت کاذب خوراکی بود.

➤ **نشان دادن آنتی بادی ها:**

هر چند روش RFFTT یک روش استاندارد طلایی جهت تشخیص آنتی بادی های ویروس هاری هستند ولی با توجه به محدودیت های گفته شده برای آن در حال حاضر تلاش بر استفاده از روش ELISA به جای آن است. چون الایزا ساده، سالم تر و سریع تر است. روشی است که از ویروس زنده استفاده نمی شود و نتایج آن نیز به اعتبار RFFTT است.

پیشرفت‌های‌اخیردرژنتیک‌نیزباعث‌تقویت‌روش‌الایزاشده‌است.

➤ **پروتیومیکس (proteomics) و متابولومیکس (metabolomics):**

در یک بررسی که برروی آنالیز مقدار پروتیومیک بافت مغز انسان مبتلا به هاری با ضایعات فلجی و آفنمالیت انجام شد رد پای افزایش مقدار پروتیین هایی مثل (KPNA٤) یا کاریوفرین آلفا (Karryopherin Alpha ٤)٤ و کالمودولین کلسیم و البته به کینار ۲ آلفا (CAMK۲A) در نوع فلجی و لیگاز گلوتامات آمونیوم (GLOL) در هر دو نوع فلجی و استقامت دیده شده است (۱۸).

در مطالعه دیگری برروی متابولیک های مایع مغزی نخاعی انسان مبتلا به هاری نیز چنین نتیجه ای بدست آمده است.

بررسی های بیشتری در این زمینه نیاز است تا بتوان با استفاده از این آزمایش ها و مکانیسم های مربوطه پی به روند بیماریزایی هاری و از آن به درمان این بیماری پرداخت.

نتیجه گیری

✓ هاری یکی از بیماری های مشترک انسان و حیوان است که در جهان است کمتر مورد توجه قرار گرفته است.

✓ نبود اطلاعات جامع و دقیق در خصوص خسارت این بیمار، تشخیص اشتباه هاری و نبود هماهنگی بین بخشی از عوامل شکست کنترل هاری است.

✓روش های قدیمی تشخیص هاری با معایب زیادی روبرو هستند.

✓چند مورد انسانی از زنده ماندن افراد مبتلا به هاری، علیرغم کشنده بودن آن گزارش شده است.

✓تشخیص زود هنگام هاری می تواند در درمان آن تأثیر داشته باشد.

✓پیشرفت های مولکولی اخیر می توانند در تشخیص هاری انقلابی ایجاد کنند.

برگرفته از:

Laboratory Diagnosis of Human Rabies Recent Advances(Review Article)

منابع:

1.World Health Organization, "WHO Expert Consultation on Rabies. Second report," World Health Organization Technical Report Series 982, 2013

2. P. G. Coleman, E. M. Fèvre, and S. Cleaveland, "Estimating the public health impact of rabies," Emerging Infectious Diseases, vol. 10, no. 1, pp. 140–142, 2004

3. T. Lembo, M. Niezgoda, A. Velasco-Villa, S. Cleaveland, E. Ernest, and C. E. Rupprecht, "Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis," Emerging Infectious Diseases, vol. 12, no. 2, pp. 310–313, 2006

4. T. Hemachudha, S. Wacharapluesadee, E. Mitrabhakdi, H. Wilde, K. Morimoto, and R. A. Lewis, "Pathophysiology of human paralytic rabies," Journal of NeuroVirology, vol. 11, no. 1, pp. 93–100, 2005

5. K. A. Sheikh, M. Ramos-Alvarez, A. C. Jackson, C. Y. Li, A. K. Asbury, and J. W. Griffin, "Overlap of pathology in paralytic rabies and axonal Guillain-Barré syndrome," Annals of Neurology, vol. 57, no. 5, pp. 768–772, 2005