

## ویروس مولد بیماری‌های، مخازن و ویروس تشخیص آزمایشگاهی

مجله علمی نظام پزشکی

سال سوم، شماره ۱، صفحه ۵۰، ۱۳۵۱

دکتر یونس کریمی - دکتر میرهوشنگ مجد تیموری - دکتر عزیزالله نابتی \*

میشود، دلیل قاطعی بر تشخیص مثبت‌های بحساب می‌آید. بالاخره در طی سالهای اخیر روش‌های دیگری برای ظاهر ساختن و رؤیت نمودن اجسام نگری که عبارت از آنتی‌ژن‌های است بکار بسته شده از قبیل ایمونوفلورسانس، ایمونوپراکسیداز و بموازات این روش‌ها آزمایشات سرولوژیکی نوینی از قبیل سرونوترال- لیزاسیون، هماگلو تیناسیون پاسیو، ایمونوفلورسانس غیرمستقیم، فیکساسیون کمپلمان وژل دیفوزیون برای پی‌بردن به وجود آنتی‌کود و آنتی‌ژن‌های مورد استفاده واقع شده است که مختصراً درباره آنها صحبت خواهیم کرد.

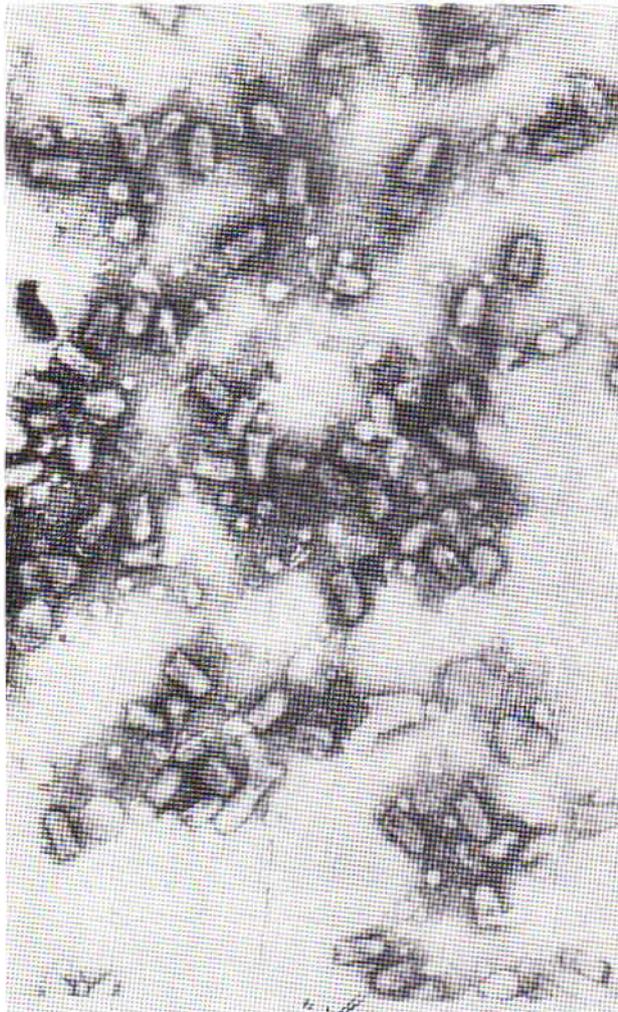
**شکل و صفات ویروس:** از زمانی که میکروسکپ الکترونیکی بخدمت محققین درآمده، قسمتی از مجهولات عمده‌ای که در شناختن فرم و شکل و ساختمان ظاهری ویروس‌ها وجود داشت از بین رفته است. بویژه که در همین ایام کشت و تکثیر سلول در آزمایشگاه ممکن گردیده و این خود کمک شایان و تسهیلات فراوانی برای مطالعه در احوال ویروس‌ها فراهم آورد. ویروس‌های نیز در زمره ویروس‌هاییست که وسایل و اسباب کشت و رشد و نمو آن در آزمایشگاه فراهم گردیده است و توانسته‌اند مراحل مختلف رشد و تکامل آنرا مورد دقت و بررسی قرار دهند، اما بازم نکات بسیاری هست که همچنان مبهم و ناشناخته مانده است. از لحاظ شکل (۱) ویروس‌های شبیه گلوله تفنگ است که یک سر آن گرد و انتهای دیگر بریده است، قطر آن در حدود ۷۵ الی ۸۰ میلی‌میکرون و طول آن بطور متوسط ۱۸۰ میلی‌میکرون است. ویروس‌های دارای هسته‌ایست بقطر تقریباً ۴۰ میلی‌میکرون که حاوی جدار متراکم است، ولی از تراکم

مقدمه: با وجود اینکه تاریخ بیماری‌های بسیار کهن و مربوط به عهد ارسطو و شاگردانش میباشد که هاری سگ را می‌شناختند معذک مباحث مختلف این بیماری در طی قرون متمادی در پرده ابهام و تئوریک بوده و در اواخر قرن هیجده زنگ تجربه‌های ذی‌قیمتی را درباره هاری حیوانات انجام داده و بسال ۱۸۰۴، توانسته بزاق حیوان هاری را در زخم حیوان سالمی وارد و بدین ترتیب هاری تجربی ایجاد نماید. در این راه گالیته گام‌های بلندتری برداشته و هم‌اوست که توانسته بیماری هاری را بخرگوش منتقل نموده و بسال ۱۸۷۹، انتقال هاری را از طریق آب دهان اعلام کند. کشف طریقه انتشار ویروس هاری نیز از آن این دانشمند است زیرا تزریق ویروس در عصب سیاتیک خرگوش و مبتلا نمودن آن به‌هاری از کارهای اوست.

پس از گذشت قریب یک قرن، در دوران طلایی پاستور در پرتو تحقیقات پرشکوه این دانشمند پرده‌های ابهام یکی پس از دیگری کنار زده شد و در سال ۱۸۸۵، واکسن ضد هاری توسط پاستور کشف و بجهانیان عرضه گردید که امروزه نیز با تغییراتی که در تهیه آن داده شده، برای مصون نمودن اشخاص و حیوانات در برابر بیماری هاری و پیش‌گیری از بروز بیماری در نزد کسانی که مورد گزش حیوانات هار واقع شده و ویروس بیماری وارد بدن آنها گردیده است بکار میرود.

کشف نگری دانشمند ایتالیائی بسال ۱۹۰۳، راه تازه‌ای برای تشخیص هاری گشود و از آن پس وجود انکلوژیونهای که به‌اسم کاشف آن بنام جسم نگری نامیده شده و در سیتوپلاسم نرونها دیده

\* تهران - انستیتو پاستور ایران.

شکل ۱- ویروس هاری بزرگ نمایی  $\times 47800$ .

نمونه ویروس و مقدار آن بستگی دارد. ویروس‌هایی که در اثر پاساژهای متعدد در داخل سلسله اعصاب خرد گوش، خواص و دوران کمون نابتی پیدا کرده‌اند، ایجاد انتر فرون نمی‌کنند. هم‌چنین در مغز هامستر چه در مرحله تحریکی و چه در مرحله فلجی که در اثر تزریق ویروس کوچک (ویروسی که بطور طبیعی در حیوانات ایجاد بیماری می‌کنند و دوره کمون آن بیشتر است) ایجاد شده باشد، انتر فرون ندیده‌اند (۱). بنظر می‌رسد که انتر فرون در جریان عفونت هاری پیدا می‌شود ولی مر بوط به مکانیسم دفاع مؤثر حیوان علیه ویروس نیست. تزریق انتر فرون به موش (سوری) در زمان‌های مختلف آلودگی تجربی، آنرا در برابر ویروس‌های محافظت نمی‌کند (۲).

نکته دیگری که بکمک کشت ویروس در روی کشت سلول مشاهده شده و قابل ذکر است همزیستی ویروس و سلول می‌باشد (۲). وجه بسا که همین پدیده علت و سبب دوره‌های طولانی کمون بیماری باشد. برای این دوره‌های طولانی کمون مواردی ذکر شده

آن در قسمتی که در مقابل انتهای مسطح ویروس است کاسته می‌شود. این جدار از برجستگی‌های سطحی بطول ۶۰ تا ۷۰ آنگسترم که دارای انتهای محدبی می‌باشند پوشیده شده است. در انتهای مسطح ویروس شکافی شبیه  $\gamma$  که زاویه آن بخارج است دیده می‌شود. سطح ویروس از شش ضلعی‌هایی که بشکل لانه زنبور قرار گرفته‌اند پوشیده می‌باشد.

درباره ساختمان شیمیایی ویروس هاری اطلاعات دقیق و جامعی در دست نیست. در انستیتو Wistar، موفق بجدا کردن RNA (اسید ریبونوکلئیک) خالص از ویروس هاری شده و وزن مولکولی آنرا  $1.06 \times 10^6$  ذکر کرده‌اند. این RNA فقط دارای یک زنجیر است. ویروس هاری با حلال‌ها یا امولسیفیکان‌های مواد چربی از بین می‌رود و این نشان می‌دهد که چربی در ساختمان آن وجود دارد. اشکال ۱ تا ۴ نمایاننده مطالب فوق می‌باشند.

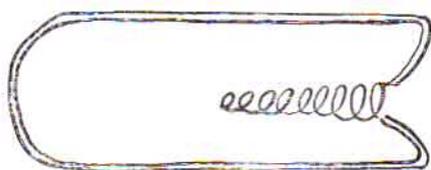
با وجود تحقیقاتی که درباره ویروس هاری شده و در اینجا احتمالاً بدانها اشاره شده، معذالک توافق قطعی در اینکه این ویروس در چه طبقه‌ای قرار گیرد حاصل نشده برخی آنرا جزء آربو ویروس‌ها و عده‌ای در ردیف میگزو ویروس‌ها قرار می‌دهند.

کشت ویروس: امروزه ویروس هاری را در روی کشت سلول‌های انساج مختلف از جمله نسج کلیه هامستر کشت می‌دهند و این خود وسیله‌ایست که بکمک آن توانسته‌اند مسائل مختلفی را مورد مطالعه قرار دهند و پدیده‌های مختلفی را توجیه نمایند. در اینجا اشاره بمسائلی می‌کنیم که In Vitro در محیط‌های کشت تحقیق شده است. اگر بمحیط مواد شیمیایی که مانع ساخته شدن DNA (اسید دکسی ریبونوکلئیک) میشوند از قبیل Actinomycine D و Mitomycine C و Fluorodesoxyuridine اضافه کنیم باز هم ویروس هاری بر شد و تکثیر خود ادامه می‌دهد و این نشان می‌دهد که ویروس هاری حاوی RNA است.

هم‌چنین بکمک کشت سلولی مطالعات فراوانی درباره ماده‌ای که به انتر فرون معروف گشته است نموده‌اند. در انستیتوی Wistar فیلا دلفیا نشان داده‌اند، که کشت ویروس در سلول کلیه هامستر بعد از اعلای خود میرسد و سپس سرعت پائین می‌آید و این عمل در انتر فرون ماده‌ایست که در محیط کشت ایجاد می‌شود و مانع رشد و تکثیر ویروس می‌گردد. اگر چه این ماده می‌تواند مانع رشد ویروس (In Vitro) گردد ولی بر اساس تجربیاتی که بطور In Vivo انجام شده، بنظر می‌رسد که پیدایش آن در نزد حیوان مبتلا به هاری دیررس بوده و نمی‌تواند نقش پیش گیری را داشته باشد. طبق تجربیاتی که در انستیتوی Wistar فیلا دلفیا صورت گرفته انتر فرون حاصله از تزریق داخل مغزی ویروس به هامستر با عواملی از قبیل سن،

(۳ و ۴) که اهم آنها بقرار زیر میباشد:

۶۰ روز، ۱۴۸ روز، ۳۶۸ روز، ۴ سال و سه ماه و بالاخره ۱۹ سال و شش ماه.



شکل ۴ - نمایش جدار و کانالیکول مرکزی ویروس که به شکل هلیکزی است.

خاصیت آنتی ژنیک ویروس هاری: ویروس هاری قدرت آنتی ژنیک خوبی دارد و به عبارت دیگر ویروس هاری بعنوان آنتی ژن سبب پیدایش آنتی کور بمعیار قابل ملاحظه ای میگردد. با بکار بستن طریقه ها و روش های مختلف، توانسته اند پی بوجود دستجات مختلف آنتی کور ببرند و امروزه پنج نوع از آن را میشناسند که عبارتند از آنتی کورهای خنثی کننده، ثابت کننده که پلیمان، راسب شونده، جلو گیری کننده درهما گلو تیناسیون و آنتی کور سیتو لیتیک، ولی نقش هیچیک از این آنتی کورها در برقراری مصونیت، شخص نیست. بطوریکه برخی از بیماران هارگزیده که تحت درمان پیش گیری بوده اند دارای آنتی کور بعداعلی بوده و چندین هفته پس از سنجش عیار آنتی کور از بیماری هاری فوت نموده اند (۵). و برخی دیگر از بیماران هارگزیده در پایان دوره درمان پیش گیری از لحاظ آنتی کور ضد هاری فقیر بوده، ولی مبتلا به هاری نشده و جان سلامت برده اند.

سر نوشت آنتی ژن: سر نوشت ویروسی که بعنوان آنتی ژن وارد ارگانیسم حیوانی میشود در تمام موارد یکسان نبوده، گاهی نامشخص است. مشاهداتی که قبلاً بدانها اشاره شد از قبیل طولانی بودن دوره کمون، و وجود آنتی کور ضد هاری در نزد حیوانات بظاهر سالم نیز مؤید این مسئله هستند. هم چنین در سالهای اخیر شرح حال بیمارانی که دوره بیماری آنها فوق العاده طولانی بوده و منتشر شده از آن جمله است شرح حال بیماری که ۶۴ روز پس از بروز علائم زنده بوده (۶) و عیار آنتی کور باروش های مختلف سنجش بقرار زیر بوده است:

تاریخ جدا کردن سرم	آنتی کور خنثی کننده	فلورسانس غیر مستقیم	آنتی کور ثابت کننده کمپلمان
۸/۸/۶۸	< ۱:۵	۲+	< ۱:۴
۳۰/۹/۶۸	> ۱:۵۰۰۰	۴+	۱:۴
۱۰/۱۰/۶۸	۱:۲۴۰۰	انجام نشده	۱:۶۴
۱۱/۱۰/۶۸	۱:۱۷۵۰	انجام نشده	۱:۱۲۸

مورد دیگری نیز از دوران بیماری هاری بمدت ۱۳۳ روز گزارش شده است.



شکل ۳ - ویروس هاری - بزرگ نمایی  $\times 123800$



شکل ۳ - ویروس هاری و منظره لانه زنبوری سطح آن بزرگ نمایی  $\times 400000$

عامل نگهداری و انتشار ویروس هاری در ایران میباشند بعمل نیامده و آنچه که در این باره گفته و نوشته شده مبنی بر مشاهده بوده، نه تحقیق و تجربه بعبارت دیگر تکیه بر تعداد حیوانات شده و آنکه رقم بزرگتری را در آمار حیوانات هار نشان میداده مورد توجه قرار گرفته و چون گرگ و سگ واجد این شرط بوده اند، لذا آنها را بعنوان مخزن ویروس و عامل انتقال و انتشار بیماری شناخته اند. حال آنکه ممکن است نقش حیوان دیگری چون روباه و باشغال در بقاء و انتشار ویروس در طبیعت مهمتر باشد ولی بخاطر اینکه خوی تهاجم و گزندگی ندارند رقم کوچکی را در ارقام آمار حیوانات گزنده تشکیل داده و مورد توجه قرار نگرفته باشند. کثرت روباه و شغال در کشور ایران در برابر گرگ و سگ های ولگرد بسیار زیاد است، لذا این دو حیوان میتوانند نقش مهمتری در اشاعه و انتشار و نگهداری (از حیوان به حیوان) ویروس در طبیعت داشته باشند و بطوریکه نشان داده شده است ۷۵٪ رو باه های منطقه قطبی در شمال روسیه در مواقع همه گیری ۳٪ آنها در فاصله دو همه گیری آلودگی بویروس هاری را داشته اند (۸). و همچنین توانستند از مغز روباهی که بظاهر سالم بوده ویروس هاری را جدا کنند (۸).

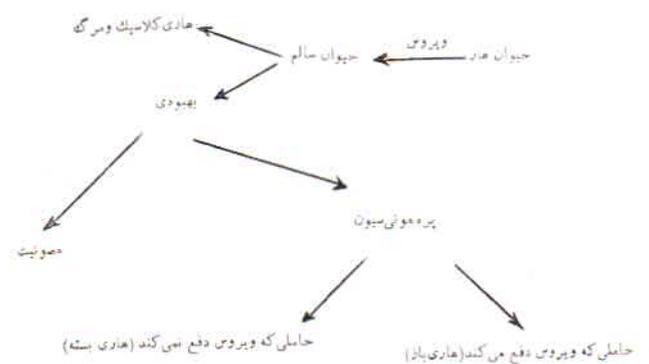
نویسندگان این مقاله در سال ۱۳۴۹، موفق بجدا کردن ویروس هاری از مغز و غدد بزاقی دو روباه از ۸۸ روباه شکار شده در منطقه اکینلو واقع بین همدان و بیجار گردیدند (۹). و نسبت آلودگی نشان میدهد، که احتمالاً مطالعه در زمان آرایش بین دو همه گیری انجام شده است.

یکی از محققین موفق به نشان دادن آنتی کور خنثی کننده ویروس هاری در ۵٪ رو باه های سالم و ۱۴٪ راسو های سالم (نوعی راسو که بفرانسه Mouffette و بانگلیسی Skunk گویند) گردیده است (۱۰). هم چنین وجود آنتی کور خنثی کننده را در نزد ۱۴٪ سگ های واکسینه نشده آدیس آبابا پیدا کرده اند (۱۱). و این نشان میدهد که بیماری هاری در نزد این سگ ها بصورت خفیف و نامرئی بوده است.

نگارنده و همکاران همین حالت را نزد رو باه های ایران نشان داده و آنتی کور خنثی کننده را در ۱۴٪ از آنها پیدا نموده ایم. (مدارک منتشر نشده)

اگر مطالب فوق تا اندازه ای روشنگر وضع مخازن ویروس هاری در قاره اروپا و آسیا باشد، تبعات و تحقیقات دیگری در آنسوی اقیانوس ها بعمل آمده و نمایشگر صحنه های دیگری از وضع مخازن ویروس هاری در قاره آمریکا میباشند که به اجمال اشاره نموده و میگذریم.

برای توجیه این حالات، دلائل محکم و قابل قبولی ارائه نشده و آنچه که بیان شده بصورت فرضیه است از قبیل پیدایش حالت Auto-sterilisation، نقش ماده تخفیف دهنده هاری Rabies Inhibiting Substance (RIS) که برخی آنرا معادل آنتی کور خنثی کننده می دانند. بر اساس همین مشاهدات و پدیده های مختلف دیگر سعی شده است سر نوشت ویروس هاری را که بعنوان آنتی ژن وارد بدن حیوان میشود در شمای زیر منعکس سازند (۷).



مخازن ویروس در طبیعت: قبلاً باید متذکر شد که حوزه انتشار جغرافیای ویروس هاری بسیار وسیع بوده و در قریب ۷۵ کشور آلودگی به ویروس هاری دیده شده و در سالهای اخیر انتشار بیشتری یافته و در ممالکی که از سالها قبل از وجود بیماری پاک شده بوده اند، مجدداً رسوخ نموده و شایع شده است. بهمان نسبت که انتشار و پراکندگی حیوانات وحشی در مناطق مختلف کره زمین متفاوت است، مخازن ویروس هاری نیز از قاره ای بقاره دیگر و از منطقه ای به منطقه دیگر جغرافیائی متفاوت بوده و در حال حاضر انتشار جغرافیائی آنها بقرا در زیر میباشد: شغال در آسیا و آفریقا - روباه در اروپا و کانادا - روباه، شغال، گرگ در کشورهای خاور میانه - موش خرما در هندوستان و آفریقای جنوبی و بالاخره خفاش حشره خوار در آمریکای شمالی و خفاش خونخوار در مکزیک و آمریکای جنوبی. البته این بدان معنی نیست که مثلاً در آمریکای شمالی فقط خفاش مخزن ویروس میباشد بلکه در کنار آن، مخازن ویروس دیگری نیز میباشد، منتها در اکثر موارد خفاش است و با اینکه در ممالک خاور میانه گاهی روباه، زمانی شغال و یا گرگ مسئول نگهداری ویروس در طبیعت میباشند و حتی در ایران که بیماری هاری در اکثر نقاط آن دیده شده در برخی از مناطق روباه و در برخی شغال و شاید در نقاطی هم گرگ مخزن ویروس باشد. متأسفانه تحقیق کافی برای شناختن حیواناتی که

بامحیط خارج کاملاً قطع بوده و سرایت بیماری هاری جز از طریق هوا از راه دیگری امکان پذیر نبوده است. با وجود این تمام حیوانات فوق الذکر مبتلا به هاری میشوند و بدین وسیله طریق سرایت هاری را به کارگرانی که در این غار کار میکردند و بدون سابقه گزش دچار هاری شده بوده اند، نشان داده میشود و اعلام میدارند که ممکن است ویروس هاری همراه هوا و احتمالاً از طریق دستگاه تنفسی وارد بدن گشته و باعث بیماری گردد. تحقیقات بعدی نشان داده که نه تنها ویروس هاری قادر است از طریق هوا سبب ابتلاء حیوانات آزمایشگاهی به هاری گردد بلکه قابل تکثیر در نسج ریوی این حیوانات بوده و قبل از بروز علائم بیماری خود را به قصبه الریه رسانده و بصورت آزاد در آنجا دیده میشود (۱۶).

#### تشخیص آزمایشگاهی ویروس هاری

**رنگ آمیزی:** جهت رنگ آمیزی آنتی ژن هاری از روش های مختلفی استفاده میشود ولی روشی را که بهتر نتیجه میدهد و متداولتر است توضیح میدهیم.

رنگ آمیزی سلرز (۱۷) - تهیه رنگ سلرز:

محلولهای اصلی ۱- بلو دو متیلن ده گرم

متانول مقدار کافی برای یک لیتر

۲- فوشین قلیائی پنج گرم

متانول مقدار کافی برای نیم لیتر

محلولهای فوق را در شیشه های رنگی، در سمباده ای یا در پیچی نگهداری میکنیم. در موقع مصرف یک قسمت از محلول نمره ۲ و دو قسمت از محلول نمره ۱ را مخلوط نموده بکار می بریم.

**روش رنگ آمیزی:** قبل از اینکه گسترده خشک شود آنرا بمدت چند ثانیه در محلول رنگ قرار داده، بلافاصله با آب می شوئیم و میگذاریم تا خشک شود سپس یک قطره روغن میکروسکپ بر آن نهاده و بکمک ایمرسیون دنبال اجسام نگری میگردیم.

**اجسام نگری و تشخیص افتراقی (۱۷):** بارنگ آمیزی سلرز اجسام نگری باشکال گرد یا بیضی برنگ قرمز در اندازه های مختلف در سیتوپلاسم نرونها دیده میشود. نشانه مشخص این اجسام ساختمان داخلی آنهاست که عبارت از دانه های بازوفیل که رنگ آبی تند و یاسیاه بخود میگیرند و باندازه های ۰/۲ تا ۰/۵ میکرون میباشد.

جسم نگری با این رنگ دانه های داخلی اش گاهی بصورت غنچه دیده میشود ولی این منظره بوفور دیده نمیشود و معمولاً رنگ دانه های داخل جسم نگری نظم و ترتیب خاصی ندارند ولی بهر حال که باشند از نظر تشخیص اهمیت شایانی دارند.

در آمریکا جنوبی، محققین کشور برزیل از جمله Carini در سال ۱۹۱۱ در ایالت Sao Paulo توجه به بیماری هاری نموده و وجود آنرا بانسان دادن جسم نگری در مغز گاوهای تلف شده از این بیماری اعلام داشت. و همین محقق در یادداشت های خود خاطر نشان میسازد که در منطقه آلوده، سگ ها مبتلا به هاری نبوده و عامل انتقال بیماری به گاوها مشخص و معلوم نیست ولی باهوشمندی و دقت تمام متذکر میشود که در روز روشن تعدادی خفاش در اطراف گله های گاو مشاهده میشود و گاوهای که بوسیله این خفاش ها گزیده میشوند مدتها بعد دچار هاری میگردند. با وجودیکه دانشمند فوق موفق به جدا کردن ویروس هاری از خفاش های فوق نمی گردد، معذالک اشاره ای که بوجود خفاش ها میکند سبب میگردد که Haupt و Rehaag در سال ۱۹۲۱، توفیق یابند و اعلام نمایند که هاری گاوهای برزیل از نوع هاری فالج بوده و یک نوع خفاش بنام فیلوستوما سوپرسیلاتوم عامل انتقال ویروس میباشد. Torres, S. و Lima, E. de Oueiroz در سالهای ۱۹۳۴-۳۵ خفاشی حشره خوار با تمایل به خونخواری بنام وامپیر (Desmodus Rotundus R.) را بعنوان عامل انتقال ویروس هاری معرفی کرد. بالاخره در تر بنیداد (۱۲) مطالعات مفصلی درباره هاری وامپیر نموده و نشان داده که برخی از آنها دچار هاری فالج و برخی دچار هاری سرکش و عده ای دیگر بهبود یافته و در طی ماههای بعد قابلیت انتقال ویروس هاری را داشته اند. و این پدیده را نه تنها بطور طبیعی یعنی نزد خفاش های شکار شده مشاهده نموده اند، بلکه بطور تجربی نیز محقق شده است. پس از این تحقیقات و نتایج مقدماتی توجه محققین و اهل فن هر چه بیشتر معطوف خفاش ها گردید بطوریکه در سال ۱۹۵۴، اولین مورد هاری در نزد خفاش شرح داده شد (۱۳)، و دامنه تجسس بقدری گسترش یافت که امروزه وجود هاری در نزد خفاش های ۴۷ ایالت از ایالات متحده آمریکا نشان داده شده و از ۴۸ گونه مختلف خفاش ساکن این سرزمین ۲۶ گونه آلودگی به هاری داشته اند. البته تاکنون دیده نشده است که خفاشی تا آخر عمرش حامل سالم ویروس هاری باشد ولی ثابت شده است که خفاش حساسیت فوق العاده نسبت بویروسی که از حیوانی غیر از خفاش بدست آمده باشد دارد ولی در برابر ویروسی که از خفاش بویژه از خفاش هم گونه جدا شده باشد مقاومت بیشتری نشان می دهد (۱۴).

در جریان تحقیقات مربوط به هاری خفاش ها تجربه مهم دیگری در سال ۱۹۶۲، صورت گرفت (۱۵) و در یکی از غارهای ایالت تکزاس که پناهگاه میلیونها خفاش است تعدادی حیوان از قبیل روباه و گرگ را طوری در قفس ها قرار میدهند که ارتباط آنها

برنگ سبز (رنگ سبب نارس) یا زرد متمایل بسبز با فلورسانس درخشان خواهیم دید که اندازه آنها متفاوت است. بعضی هابتداری کوچک هستند که بزحمت دیده میشوند و برخی بزرگتر و گاهی بشکل رشته میباشند. برای اطمینان باید لامهای مورد آزمایش را بالام‌های شاعد مقایسه نمود.

**آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم:** این روش برای نشان دادن آنتی کور موجود در سرم و هم‌چنین برای تعیین مقدار آنتی کور بکار می‌رود. برای پی‌بردن بوجود آنتی‌ژن‌های نیز میتوان از این روش استفاده کرد ولی چون احتیاج به کنژوگه اختصاصی دارد عملاً کمتر بکار برده میشود.

**آزمایش سروئوترالیزاسیون (۱۹):** برای بررسی يك ویروس ناشناخته ویروس مزبور را همراه يك سرم طبیعی و يك ایمن سرم‌های هاری تیترائ می‌کنیم. وقتی ویروس مزبور توسط ایمن سرم‌های خنثی شد و سرم طبیعی تأثیری در خنثی کردن آن نداشت میتوان مطمئن شد که ویروس مورد آزمایش نمونه‌ای از ویروس‌های است. قضاوت در نتیجه این آزمایش بقرار زیر است: لوگاریتم تیتر LD 50 مخلوط مغز مورد آزمایش با سرم طبیعی را حساب کرده و آنرا بالوگاریتم تیتر LD 50 مخلوط مغز مورد آزمایش را با ایمن سرم مقایسه می‌کنیم چنانچه تفاوت این دو بالاتر از ۲ بود یعنی اگر ایمن سرم بیشتر از LD 50 ۱۰۰ ویروس را خنثی کرد میتوان گفت که نمونه مورد آزمایش دارای آنتی‌ژن‌های بوده است. ضمناً به توسط آزمایش سروئوترالیزاسیون میتوان تعیین عیار آنتی کور در سرم ناشناخته نمود و بدین منظور بجای استفاده نمودن از ایمن سرم از ویروس مشخص هاری (ویروس ثابت) استفاده می‌کنیم. استفاده از ویروس مشخص هاری و ایمن سرم با تیتر معین بعنوان شاهد در این آزمایشات ضرور است.

**رنگ آمیزی با ایمونوپراکسیداز (۲۰):** این طریقه مثل روش ایمونوفلورسانس است منتهی کنژوگه کردن آنتی کور بوسیله پراکسیداز انجام میشود و مزیت این تکنیک اینست که پس از تهیه گسترده‌ها و اضافه نمودن کنژوگه با آنها میتوان لام‌های مورد آزمایش را مستقیماً با میکروسکپ معمولی دید.

**هماکلوتیناسیون پاسیو (۲۱):** این روش اخیراً جهت تیترائ آنتی کور‌های در سرم بکار برده میشود، که مربوط به برخورد آنتی کور و آنتی‌ژن‌های است، که روی گلبول قرمز غاز بکمک کلرور کرم ثابت شده باشد. مزیت این روش به روش‌های دیگر از قبیل سروئوترالیزاسیون، فیکساسیون کمپلمان و غیره اینست که در همان روز دریافت سرم نتیجه آزمایش بدست می‌آید. وسایل مورد احتیاج ارزانتر تمام میشود و احتیاج به تجهیزات مخصوص جهت انجام کار نیست. عکس‌العمل‌های غیر اختصاصی کمتر بوده

گاهی از اوقات بانواع انکلوژیونها در مغز حیوانات برمیخوریم که در نظر اول شباهت زیادی با جسام نگری بچشم می‌خورد. این انکلوژیونها بعلت بیماری Jeune age یا Rubarth در نزد سگ و یارو باه پیدا میشوند که بیشتر در تالاموس و هسته بطنی دیده میشوند. در مغز گربه و موش سفید آزمایشگاهی نیز گاهی انکلوژیونهای اسیدوفیل غیر اختصاصی دیده میشود که تشخیص افتراقی آنها با اجسام نگری در تابلو زیر منعکس است:

انکلوژیونهای غیر هاری	جسم نگری
۱- فقدان رنگ دانه‌های داخلی	۱- وجود دانه‌های داخلی بازوفیل
۲- ماده اصلی یکنواخت است	۲- ماده اصلی یکنواخت نیست
۳- نور را بشدت منعکس می‌سازند	۳- نور را کمتر منعکس می‌سازند
۴- رنگ گلی تند	۴- رنگ قرمز تند

گاهی از اوقات انکلوژیونهای آتیبیک داخل سیتوپلاسم نزد حیواناتیکه در شروع بیماری هاری کشته شده‌اند دیده میشود، لذا توصیه می‌گردد که باید حیوان را بحال خود گذاشت تا بمیرد. بدین ترتیب فرصت مطالعه علائم بالینی را که خود برای تشخیص اهمیت فراوان دارد از دست نداده و در ضمن منظره میکروسکپی اجسام نگری کاملتر خواهد شد. تظاهر، اندازه، فراوانی اجسام نگری با مدت بالینی بیماری نسبت مستقیم دارد. بطوریکه اگر بیماری دوران کامل را طی کرده باشد امکان پیدا کردن اجسام نگری خیلی زیاد تر میشود. هم‌چنین اجسام نگری بزرگتر، فراوانتر و بارشد کامل ساختمان داخلی ظاهر می‌گردند.

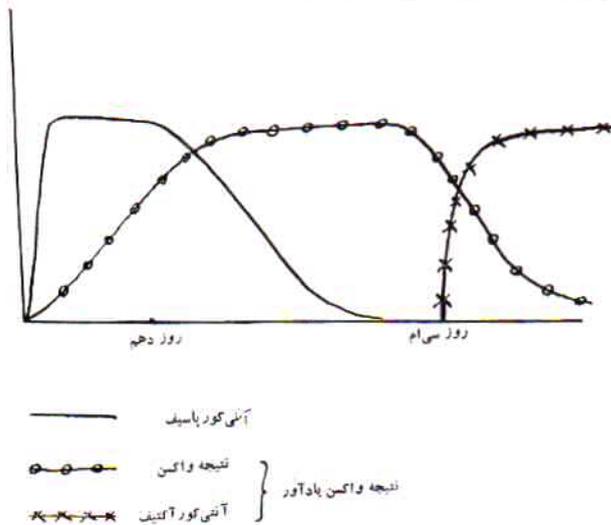
**آزمایش ایمونوفلورسانس (۱۸):** این آزمایش اگر بدقت انجام شود نتیجه‌اش سریع و نسبتاً کم‌خرج بوده و از طریق تلقیح به موش سفید آزمایشگاهی و تهیه گسترده با متدهای مختلف بهتر است. علاوه بر آن با این روش میتوانیم روی مغز تازه، یخ زده و یا نگهداری شده در گلیسرین عمل نمائیم. کیفیت نتیجه گیری از میکروسکپ فلورسان مربوط به کار بردن کنژوگه است (منظور از کنژوگه آنتی کور نشان گذارده شده میباشد). طرق مختلفی جهت تهیه کنژوگه وجود دارد ولی بهتر است که از کنژوگه‌ایکه سازمان بهداشتی کالیفرنیا توصیه کرده است استفاده گردد که از سرم هامستر مضمون شده استفاده میشود. در این طریقه میتوان مغز، غده بزاقی و کشت‌های نسجی را مورد آزمایش قرار داد. آزمایش در صورتی منفی تلقی میشود، که لااقل روی چهار نمونه (مغز یا غده بزاقی) انجام شده باشد. در مورد نسج مغزی بیبایست دوبرداشت از شاخ آمون و دوتای دیگر از مخچه یا تنه مغزی انجام شود.

چنانچه رنگ آمیزی خوب انجام شده باشد روی لام شاهد و لام مورد آزمایش که اگر دارای آنتی‌ژن‌های باشد قسمت‌هایی

در مورد درمان پیش گیری هاری از زمان پاستور تا کنون پیشرفت‌ها و موفقیت‌های چشم گیری حاصل شده است. اگر چه اساس این درمان همانست که توسط پاستور پیشنهاد و عرضه شده ولی در طی سالها تحقیقات مداوم دانشمندان تغییرات عمده و مهمی در نحوه تهیه و فراهم نمودن واکسن داده شده و امروزه واکسن‌هایی که قدرت آنتی ژنیکی بسیار خوبی دارند تهیه و برای مصون ساختن هار - گزیدگان مصرف میشود. باید اذعان کرد که درمان پیشگیری هاری فقط با واکسن موفقیت آمیز نبوده و موارد ناکامی در درمان انگیزه پژوهش‌هایی بود که منجر به توصیه استعمال توأم واکسن و سرم گردیده است.

برای اولین بار در سال ۱۸۸۹، استعمال سرم توسط Babes و Lepp و Cerchez انجام و توصیه شده است. در سال ۳۷-۱۹۳۶، نتایج استعمال سرم توسط Covell اعلام شد و بالاخره انستیتو پاستور ایران درمان مختلط «سرم - واکسن» را بکار برد و نتایج درخشان حاصل از آنرا اعلام داشت (۲۳). پس از آن سازمان جهانی بهداشت درمان مختلط را توصیه نمود (۲۴)، که امروزه در اکثر مراکز درمانی بکار برده میشود.

در ایران از سرمی استفاده میشود که در انستیتو رازی (حصارک) روی قاطر تهیه و پس از خالص و تغلیظ نمودن (۲۵ و ۲۶) بصورت خشک در اختیار انستیتو پاستور برای مصرف گذاشته میشود. بکار بستن درمان مختلط در ایران نتایج فوق العاده رضایت بخشی داشته (۲۷) بطوریکه در طی سیزده سال از ۲۰۲ هار گزیده که درمان پیشگیری با سرم، واکسن انجام شده فقط ۳ مورد مرگ مشاهده شده یعنی ۱/۵ درصد، در صورتیکه در همین مدت از ۳۷۰ هار گزیده که درمان پیشگیری فقط با واکسن بوده، در ۴۴ مورد یعنی ۱۲ درصد مرگ دیده شده است.



شکل ۵

و غیر فعال نمودن سرم با حرارت و جذب آن روی گلبولهای غیر حساس کافی میباشد. نتایج بدست آمده از این روش با طریقه سرو نو تر الیزاسیون پیش سوری مقایسه شده رضایت بخش بوده است. آزمایش بیولوژیکی: تلقیح به سوری سفید (۲۲): این طریقه با وجود اینکه روش ساده‌ای برای تشخیص میباشد ولی لازم است که دقت زیادی برای دریافت نتیجه صحیح از آن بکار برده شود و بهتر است از سوریهای بسن ۲۱ تا ۳۵ روز بوزن ۸ تا ۱۲ گرم که تزریق داخل مغزی با آنها ساده تر و کنترل و نگهداری آنها نیز آسان تر است استفاده شود. سوریهای انتخاب شده باید در کمال سلامت باشند. برای تلقیح سوریها از مغز یا غده بزاقی حیوان مشکوک به هاری استفاده میکنیم. چنانچه با دقت و وسائل برداشت نسج مغزی را استریل نموده و مغز برداشته شده را در يك ظرف کاملاً استریل قرار دهیم در صورتیکه مغز گندیده نشده باشد احتیاجی به اضافه کردن آنتی بیوتیک به محلول حاصل از مغز نیست. ولی اگر مغز مورد آزمایش تازه نبوده و آلودگی داشت از مخلوط پنی سیلین و استرپتومیسین به نسبت ۵۰۰ واحد پنی سیلین و ۲ میلی گرم استرپتومیسین در یک سانتیمتر مکعب آب به محلول مورد آزمایش اضافه می‌نماییم و پس از نیم ساعت تلقیح را انجام میدهیم. در مورد غده بزاقی افزودن آنتی بیوتیک ضروریست. مقدار مایعی که به مغز هر سوری تزریق میشود ۰.۳ سانتیمتر مکعب از محلول ۵ درصد مغز یا غده بزاقی است. این تزریق با سرنگ ۱/۴ سانتیمتر مکعب با سوزن نمرة ۲۶ یا ۲۷ بطول ۱ تا ۱/۵ سانتیمتر انجام میشود. برای تلقیح لازم است که سوریها را با اثر بی‌هوش نمود.

لازم است سوریهای تلقیح شده لا اقل ۲۱ روز تحت مراقبت باشند. مرگ و میر حاصل تا ۴۸ ساعت پس از تلقیح را نمیتوان بحساب هاری گذاشت. معمولاً سوریهایی که مبتلا به هاری شده باشند علائم بارزی دارند که عبارتند از نخوردن غذا، لاغری، سیخ شدن موها، لرزش و بالاخره ظهور فلج در پاهای خلفی که پیشرفت نموده و منجر بمرگ میشود.

مغز سوریهای مرده را جهت جستجوی آنتی ژن هاری با روش‌های آزمایشگاهی که قبلاً شرح داده شد بررسی میکنیم. یادآوری نکاتی چند درباره درمان و درمان پیشگیری هاری وقتی که بیماری هاری با علائم مثبت و مشخص بالینی تأیید گردد بیمار عاقبتی جز مرگ ندارد و متأسفانه در عالم پزشکی داری شفا بخشی برای اینگونه بیماران وجود ندارد. در سالهای اخیر کوشش فراوانی برای نجات بیماران بکمک رآنیماسیون مخصوصاً با حفظ اعمال تنفسی بکمک ریه‌های مصنوعی بعمل آمده، ولی بدبختانه نتایج حاصل از این تدابیر نیز جز طولانی کردن دوران بیماری نبوده است.

و اشغال جایگاههای مخصوص سلولی بوده و اهمیت مصون سازی آن بیشتر است.

اکنون باختصار اشاره به نکاتی چند میکنیم که در درمان پیشگیری هاری حائز اهمیت بسیار میباشد و شایسته است که مورد توجه عموم بزرگوار پزشکان و مسئولین درمانی باشد.

۱- **شستشوی زخم** - شستشو باید هر چه زودتر و هر چه کاملتر انجام گیرد آنچه که توصیه میشود عبارتست از آب صابون و بنا به عقیده کارشناسان سازمان جهانی بهداشت آب صابون ۲۰ درصد مناسبترین غلظت است و باید سعی نمود که آنرا به تمام زوایا و حفره های زخم رسانید و بدین منظور میشود از فرچه ریش تراشی استفاده نمود. در صورت نبودن صابون در دسترس میتوان شستشو را با مقدار فراوان آب انجام داد.

۲- **خودداری از دوختن زخم** - این نکته بسیار جالب بود و باید مورد توجه باشد چه اکثر مجروحین به پزشک مراجعه می کنند، تا مورد درمان واقع شوند. شاید نه بقصد درمان پیشگیری ها بلکه برای ترمیم جراحات و زخم و متأسفانه گاهی توجه باین نکته مهم نشده و با دقت تمام زخم دوخته میشود، در صورتیکه زخم میبایست باز نگه داشته شود، مگر در مورد زخم هایی که بشدت خونریزی می کنند و در این مورد کافی است که فقط رگ خون دهنده بسته شود. حتی بهتر است از پوشاندن زخم با گاز، پنبه و باندا، نیز خودداری شود.

۳- **واکسن یادآور** - با وجود اینکه قبلاً در مورد واکسن یادآور صحبت شده، معذک از لحاظ اهمیتی که دارد مجدداً یادآوری و تأکید میشود که واکسن یادآور میبایست در سه نوبت بقرار زیر انجام شود: اولین و دومین واکسن یادآور را به ترتیب ده و بیست روز پس از پایان دوره درمان پیشگیری تزریق کرد، و سومین واکسن میبایست در فاصله سه الی شش ماه تزریق گردد.

در شکل (۵) چگونگی تیمر آنتی کورها (پاسیف در اثر تزریق سرم و آنتی کور آکتیف ساخته شده توسط بدن در برابر واکسن) نشان داده شده و ملاحظه میشود که با تزریق سرم، واکسن، و واکسن یادآور سطح آنتی کور بالا بوده و زمانهای مختلف بعد از گزش را می پوشاند تا ویروس فرصتی برای رشد و تکثیر نیابد و این خود بظاهر بزرگترین حسن درمان مختلط میباشد.

با تمام موفقیت هایی که در درمان پیش گیری هاری بدست آمده معذک باز هم موارد شکست و ناکامی بچشم می خورد و همین مسأله باعث شده که محققین از پا نه نشسته و به بررسی و تجسسات پی گیر خود تا نبل بموفقیت کامل ادامه دهند. اخیراً نشان داده شده است که تزریق ایمن سرم همولوگ همزمان و حتی چندین روز قبل از تزریق واکسن بمقیاس قابل ملاحظه ای مانع بوجود آمدن آنتی کوراکتیف در نزد خرگوش می گردد (۲۸). نظیر این آزمایش در نزد انسان نیز صورت گرفته و نشان داده شده که ایمن سرم همولوگ با مقادیر مختلف اثرات تخفیف دهنده متفاوت بر عکس العمل بدن در جهت ساختن آنتی کور در برابر واکسن دارد و در مقدار معینی از سرم اثر تخفیفی آن بحد اقل می رسد (۲۹). هم چنین تحقیقات ارزنده ای درباره ایمونوگلوبولین ها بعمل آمده و نشان داده شده که نوع IgM (19S) ۷۹٪ در روز سیزدهم و ۴۷٪ در روز بیست و هفتم بعد از واکسیناسیون با واکسن تهیه شده روی جنین اردک از مجموع ایمونوگلوبولین ها را تشکیل میدهد. در صورتیکه IgG (7S) از روز سیزدهم بیعد ظاهر شده و در حدود روز چهل و یکم بحد اکثر مقدار می رسد (۳۰). چون IgM در جریان خون باقی مانده و در انساج آنجائی که بوجود آن احتیاج است وارد نمیشود، لذا باید چاره ای اندیشید و در نحوه واکسیناسیون تغییراتی داد تا IgG در فاصله کمی بعد از تزریق واکسن ظاهر شود. چون IgG برخلاف IgM قادر به نفوذ در انساج

#### REFERENCES:

- 1- CAMPBELL, T.B and al. Bull. O.M.S. Present Trends and the Future in Rabies Research. (1968) 38, 373-381.
- 2- CHRONIQUE O.M.S. Recherche sur La Rage à l'Institut Wistar, (1968): 22, 546-549.
- 3- GAVRILA, I et al. Ann. Inst. Pasteur La Rage chez l'homme, Observation personnelles sur la sero-prophylaxie, l'incubation prolongé et les essais thrapeutiques. (1967) 112, 504-515.
- 4- SABETI, A. et al. Ann. Inst. Pasteur: Echecs éloignés du Traitement Antirabique. (1964) 106, 307-310.
- 5- BALTAZARD M. Rereue d'Immunologie: Le Traitement Antirabique, Réflexion sur quelques Experiences Recentes (1956) XX, 4, 207-214.

- 6- RUBIN, R.H et al. The J. of Inf. Dis : A case of Human Rabies in Kansas; Epidemiologie. Clinical, and Laboratory Considerations. (1970) 122, No 4, 318-322.
- 7- ANDRAL, L. Ann Inst. Pasteur Ethiopie : Une maladie Comme les autres; la Rage. (1964) 1. 5, 58-65.
- 8- KANTROVIC. R.A. J. Hyg. Epid. Micro. Immunolo: Natural Foci of Rabies, Like Infection in The Far North. (1964). 7, 100-110.
- 9- KARIMI, Y. et TEYMOURI, H. Acta Medica Iranica: Contribution à l'étude de l'infection Rabique chez les Renards de l'Iran. (1971) Vol 14, 93-98.
- 10- TIERKEL E. S. Acad. Press. Inc. New\_York. Rabies in: Advances in Veterinary Sciences. (1959) 5, 183.
- 11- ANDRAL L et al. Ann. Inst. Pasteur. Etudes Expérimentales sur la Rage En Ethiopie (1957)93,475.
- 12- PAWAN J.L. Ann. Trop. Med. Parasit Rabies in the Vampire bat of Trinidad with special reference to the clinical course and Latency of Infection. (1936) 30, 401.
- 13- VENTERS H.D and al. American J. Publ. Health.: Rabies in bat in Florida (1954) 44, 182.
- 14- ATANASIU, P. Faisons le Point Q.S. BELLON: Etat actuel des reservoirs de Rage dans le monde et de l'Immunsation avant exposition chez l'homme. (1970) 43-48.
- 15- CONSTANTIN D.G. Pull. Hlth. Rep.: Rabies Transminion by non bite route. 1962 77, 287-289.
- 16- ATANASIU, P. Internat. Symp. on Rabies, Talloires.: Transmission de la rage par la voie aerienn aux animaux de laboratoire.
- 17- TIERKEL E.S. La rage, Technique de laboratoire, O.M.S. Genève: Préparation du Colorant de sellers, Les corps de Negri, diagnostic différentiel (1967) P.P. 35-40.
- 18- DEAND, J. La rage, Technique de laboratoire, O.M.S. Genève: Epreuve des Anticorps Fluorescents. (1967) PP. 61-71.
- 19- HARAD, N. & JOHNSON, B. La rage, Technique de laboratoire, O.M.S. Genève: Epreuve Seroneutralisation du reirus (1967) P.P. 85-88.
- 20- ATANASIU, P. et al. Ann. Inst. Pasteur: Immuno\_peroxydase. Nouvelle technique spécifique de mis en evidence de l'Antigène Rabique intra et extra\_cellulaire en Microscopie optique. (1971) 121, 247-250.
- 21- GOUGH, P.M. & DIERKS, R.E. Bull. OMS.: Passive Hemagglutination Test for Antibodies Against Rabies Virus. (1971) 45, 741-745.
- 22- KOPROWSKI, H. La rage, Technique de laboratoire, O.M.S. Genève: Epreuve d'Inoculation à la Souris. (1967), PP. 72-84.
- 23- BALTAZARD M. et al. Bull. O.M.S: Essai pratique du serum antirabique chez les mordus par loups enragés. (1655) 13, 747-772.
- 24- Comité O.M S., D'EXPERTS de la Rage 1966, 5e rapport.
- 25- MIRCHAMSI, H. Revue Immuuol. (Paris): Sur la préparation et la Concentration du serum Antirabique en Iran (1962) 26, 60-91.
- 26- MIRCHAMSI, H. et al. Arch. Inst. Razi: Contribution à l'etude de la Rage et du Traitement Antirabique en Iran. (1964) 16, 82-89.
- 27- SABETI A. et al. Ann. Inst. Pasteur.: Traitement des mordus par loups enragés en Iran, Situation actuelle. (1964) 106, 303-307.
- 28- WIKTOR, T.J. et al. Bull. O M.S : Inhibitory Effect. of Passive Antibody on Active Immunity Induced Against Rabies by Vaccination. (1971) 45, 747-753.
- 29- CABASSO, V.J. et al. Bull. O.M.S: Rabies Immune Globuline of Human Origin. Preparation and Dosage Determination in Non Exposed Volunteer Subjects. (1971) 45, 303-315.
- 30- RUBIN, R.H. & al. The Lancet: Immunoglobulin Response to Rabies Vaccine in man. (1971) 2, 625-628.