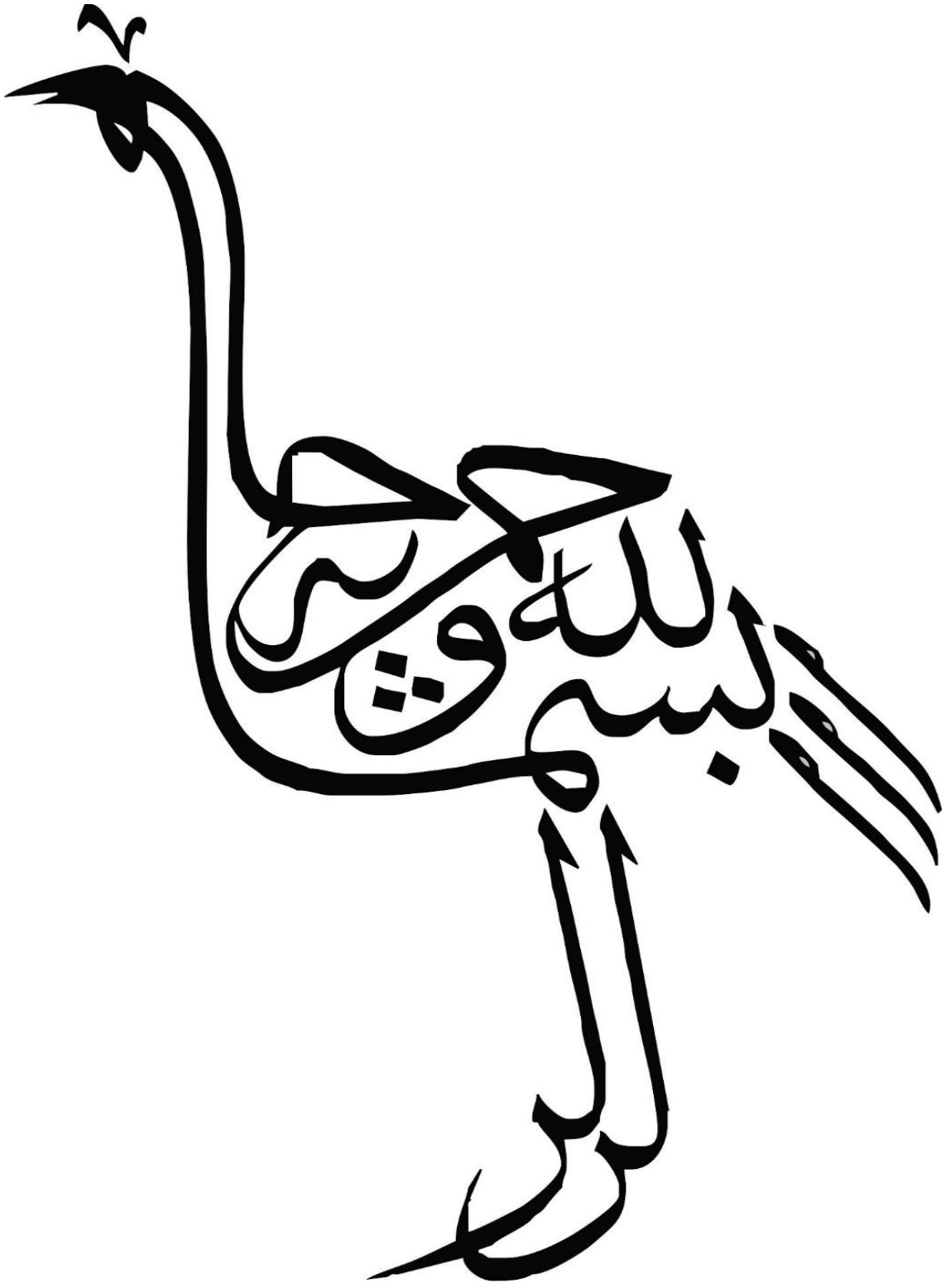

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه‌ی دکتری حرفه ای رشته‌ی دامپزشکی

جستجوی ویروس تب دره ریفت در گوسفند و بز در استان های اصفهان و چهارمحال و بختیاری

استاد راهنما:

دکتر محمدرضا محزونیه

استادان مشاور:

دکتر ایرج کریمی

دکتر ابوالفضل قلی پور

پژوهشگر:

احمد یوسفی

شهریور ماه ۱۳۹۲

دانشکده دامپزشکی

گروه پاتوبیولوژی

پایان نامه ی آقای احمد یوسفی جهت اخذ درجه دکتری رشته دامپزشکی با عنوان : **جستجوی ویروس تب دره ریفت در گوسفند و بز در استان های اصفهان و چهارمحال و بختیاری** در تاریخ **۹۲/۶/۳۱** با حضور هیئت داوران زیر بررسی و با نمره / رتبه ..... مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استاد راهنمای پایان نامه دکتر محمدرضا محزونیه با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۲. استاد مشاور اول پایان نامه دکتر ایرج کریمی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۳. استاد مشاور دوم پایان نامه دکتر ابوالفضل قلی پور با مرتبه علمی استادیار امضاء

۴. استاد داور داخلی گروه دکتر عزیزالله ابراهیمی با مرتبه علمی استادیار امضاء

۵. استاد داور خارجی گروه دکتر غلامعلی کجوری با مرتبه علمی دانشیار امضاء

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی‌نماید.

دکتر سعید حبیبیان دهکردی
معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی
دانشکده دامپزشکی

دکتر حسین نورانی
رئیس دانشکده دامپزشکی

کلیه حقوق مادی حاصل از نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است

سپاس

استاد گرانقدرم آقای **دکتر محمدرضا مخزومی**؛ از راهنمایی های بی بدیل و محبت بی دریغتان در پیشبرد اهداف این مطالعه و آموختن واژه تلاش و امید کمال قدردانی و سپاس را ابراز می دارم.

استاد بزرگوارم آقای **دکتر ایرج کابلی**؛ از همراهی تان در پایان بردن این مطالعه و آموختن نکاتی که هیچ گاه از یاد نخواهم برد بسیار تشکر می کنم.

استاد بزرگوار آقای **دکتر ابوالفضل دقی پور**؛ که در انجام امور مختلف پایان نامه ام همواره مرا پشتیبان بودید، سپاس از محبتتان.

از استاد ارزشمند آقای **دکتر عزیزاله ابراهیمی** به منظور قبول زحمت داوری پایان نامه ام و صبر و محبتی که در طول دوران تحصیلم به من آموختند سپاس گذارم.

از استاد ارزشمند آقای **دکتر غلامعلی کجوری** که نه تنها زحمت داوری پایان نامه ام را متقبل شده اند، همواره به عنوان استاد زندگی، منش و گفتارشان برایم چراغ روشن راه بوده بی نهایت سپاس گذارم.

از استاد گرامی آقای **دکتر سعید حسینیان** که همواره به من لطف داشتند و با صبر و کوششی بی نظیر در راستای پیشرفت امور پژوهشی دانشکده ی دامپزشکی هزینه می کنند سپاس گذارم.

از مسئولین محترم آزمایشگاه سرکار **خانم یکتنه** و **خانم صفرپور** که در به اتمام رساندن مراحل عملی این مطالعه نقش به سزایی داشتند تشکر می کنم.

از **خانم ستاره قاسمی** که همواره یاری ام کردند بی نهایت سپاس گذارم.

از دوست خوب سال های دور تاکنونم **ایمان** که خاطرات خوشی را در لحظات سخت برایم رقم زد صمیمانه تشکر می کنم.

تقدیم به:

استوارترین تکیه گاهم، دستان پر مهر **پدرم**

سبزترین نگاه زندگیم، نگاه سبز **مادرم**

که هرچه بکوشم قطره ای از دریای بی کران مهربانیتان را سپاس نتوانم گویم

بوسه بر دستان پر مهرتان

و برادرانم

که همواره تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات بودند، و وجودشان مایه دلگرمی ام می باشد.

چکیده

ویروس تب دره‌ی ریفت (RVFV) عضوی از خانواده‌ی بزرگ بانیا ویریده و جنس فلبو ویروس است و عامل بیماری - های مشترک مهمی میان انسان و دام بوده و موجب همه گیری‌های وسیعی از بیماری های وابسته به تب و گاهی کشنده در بین انسان ها و حیوانات اهلی در قاره ی آفریقا و شبه جزیره ی عربی شده است. RVFV توسط گونه‌های مختلف پشه‌ها بین حیوانات و انسان منتقل می شود. جا به جایی ساده ی پشه‌های ناقل در مسافت های طولانی توسط باد و همچنین صادرات حیوانات آلوده از کشورهای اندمیک به سایر کشور های فاقد سابقه ی درگیری به صورت قانونی یا غیر قانونی، موجب گسترش بسیار زیاد ویروس در نقاط مختلف جهان شده است . انتقال ساده‌ی پشه‌های ناقل از کشورهای اندمیک بیماری نظیر عربستان سعودی به ایران، توسط باد و اعزام سالانه ی تعداد زیادی زائر به این کشور جهت انجام مراسم مذهبی حج، خطر وجود این ویروس را در ایران بسیار محسوس می کند. هدف از این مطالعه جستجوی ویروس تب دره ی ریفت در گوسفند و بز در استان های اصفهان و چهارمحال و بختیاری است . تعداد ۴۳ نمونه کبد و محتویات شیردان از جنین های سقط شده‌ی گوسفندان و بزها اخذ شده و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت سه گانه‌ی ریمازول انجام پذیرفت. ساخت cDNA با استفاده از آزمایش RT-PCR صورت گرفت. نمونه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دو مرحله‌ای یا آشیانه‌ای (nested-PCR) و انجام الکتروفورز روی محصولات آن‌ها مورد آزمایش قرار گرفتند. تعداد ۲۳ نمونه از استان اصفهان و ۲۰ نمونه از استان چهارمحال و بختیاری اخذ شد که تعداد ۱۴ نمونه (۳۲/۵۵٪) از جنین‌های سقط شده از بزها و ۲۹ نمونه (۶۷/۴۵٪) از گوسفندان بوده است. هیچ کدام از نمونه ای مورد آزمایش از نظر حضور RVFV مثبت نبودند. اگرچه با این تعداد نمونه نمی توان با یقین عدم حضور ویروس را در این استان ها تأیید نمود و باید مطالعات گسترده تری جهت اظهار نظر قطعی در این مورد صورت گیرد اما می توان گفت حداقل در این نمونه ها حضور ویروس تأیید نشده و این طور نتیجه گرفت که اگر هم وجود داشته باشد عامل شایعی نیست.

واژگان کلیدی: ویروس، RVFV، اصفهان، چهارمحال و بختیاری، ایران.

فهرست مطالب

فصل اول- مقدمه ۵

فصل دوم- کلیات ۸

۲-۱- ویروس شناسی RVFV ۸
۲-۱-۱- ویژگی‌های فیزیکی و بیولوژی مولکولی RVFV ۹
۲-۱-۲- فیلوژنی (تکامل نژادی) RVFV ۱۱
۲-۱-۳- تاکسونومی RVFV ۱۲
۲-۲- بیماری RVF ۱۲
۲-۲-۱- تاریخچه RVF ۱۲
۲-۲-۲- اپیدمیولوژی RVFV ۱۳
۲-۲-۳- مکانیسم انتقال RVFV ۱۵
۲-۲-۴- ناقلین RVFV ۱۶
۲-۲-۵- بیماری‌زایی RVF در انسان ۱۷
۲-۲-۵-۱- بیماری خود محدود شونده وابسته به تب ۱۷
۲-۲-۵-۲- اختلالات عصبی ۱۸
۲-۲-۵-۳- از دست دادن بینایی ۱۸
۲-۲-۵-۴- تب خون‌ریزی دهنده ۱۹
۲-۲-۵-۵- ترومبوز ۱۹
۲-۲-۶- بیماری‌زایی RVFV در حیوانات ۲۰
۲-۲-۷- عوامل بیماری زایی وابسته به ویروس ۲۱
۲-۲-۷-۱- چرخه رونویسی و تکثیر (Replication) ۲۱
۲-۲-۷-۲- نقش پروتئین NSm در بیماری‌زایی ویروس ۲۲
۲-۲-۷-۳- نقش پروتئین NSs در بیماری‌زایی ویروس ۲۳
۲-۲-۷-۴- سایر فاکتورهای ویروسی مؤثر بر بیماری‌زایی ۲۴
۲-۲-۸- عوامل بیماری‌زایی وابسته به میزبان ۲۵
۲-۲-۸-۱- سیستم دفاعی در محل ورود عفونت ۲۵
۲-۲-۸-۲- عوامل مرتبط با حساسیت میزبان ۲۷
۲-۲-۹- ویژگی‌های درمانگاه ی و آزمایشگاهی شناسی RVF ۲۸
۲-۲-۹-۱- ویژگی‌های درمانگاه ی و آزمایشگاهی شناسی RVF در حیوانات ۲۸
۲-۲-۹-۲- ویژگی‌های درمانگاه ی و آزمایشگاهی شناسی RVF در انسان ۲۹
۲-۲-۱۰- تشخیص RVF ۳۰
۲-۲-۱۰-۱- روش‌های ویروس شناسی ۳۰
۲-۲-۱۰-۲- روش‌های سرولوژی ۳۱
۲-۲-۱۰-۳- روش‌های جداسازی اسید نوکلئیک ۳۲
۲-۲-۱۱- کنترل و پیشگیری بیماری ۳۵

۲-۲-۱۲- درمان بیماری در انسان ۳۶

فصل سوم- مواد و روش کار ۳۷

۳-۱- جمع آوری نمونه ۳۷
۳-۲- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ۳۷
۳-۲-۱- استخراج RNA ۳۷
۳-۲-۲- پرایمرها ۳۹
۳-۲-۳- رقیق کردن پرایمرها ۳۹
۳-۲-۴- آزمایش RT-PCR برای ساخت cDNA ۴۰
۳-۲-۵- آزمایش nested-PCR برای تشخیص ویروس تب دره رفت ۴۰
۳-۲-۶- الکتروفورز فرآورده های PCR ۴۲
۳-۲-۶-۱- بافر TBE ۴۲
۳-۲-۶-۲- تهیه بافر TBE 5X ۴۲
۳-۲-۶-۳- تهیه بافر TBE 0.5X ۴۲
۳-۲-۶-۴- طرز تهیه EDTA ۴۲
۳-۲-۶-۵- خصوصیات مارکر ۴۲
۳-۲-۶-۷- طرز ساخت ژل آگارز ۱/۵ درصد ۴۳
۳-۲-۶-۸- تهیه محلول اتیدیوم بروماید جهت رنگ آمیزی ژل ۴۳
۳-۲-۶-۹- الکتروفورز فرآورده‌های آزمایش nested-PCR ۴۳
۳-۲-۷- هیستوپاتولوژی ۴۳

فصل چهارم- نتایج ۴۴

فصل پنجم- بحث ۴۶

منابع ۴۹

فهرست شکل‌ها

شکل ۲-۱- ساختار ویریون ویروس تب دره رفت ۹
شکل ۲-۲- تصویر RVFV با میکروسکوپ الکترونی ۱۰
شکل ۲-۳- نقشه توزیع تب دره رفت در مناطق مختلف جغرافیایی جهان ۱۴
شکل ۲-۴- نمودار هندسی تغییرات IgM، IgG و ویرمی در حیوانات مبتلا به تب دره رفت ۲۹
شکل ۴-۱- تصویر ژل الکتروفورز تهیه شده از محصولات مرحله های اول و دوم nested-PCR ۴۵

فهرست جدول ها

جدول ۲-۱- بیشترین تفاوت توالی در مقایسه دو به دوی قطعات S، M و L در ۳۳ سویه متفاوت RVFV ۱۱
جدول ۳-۱- توالی پرایمرهای طراحی شده برای انجام آزمون RT-PCR و مرحله اول nested-PCR ۳۹
جدول ۳-۲- توالی پرایمرهای طراحی شده برای انجام مرحله دوم nested-PCR ۳۹
جدول ۳-۳- مواد مورد استفاده برای واکنش RT-PCR ۴۰
جدول ۳-۴- مواد مورد استفاده برای مرحله اول nested-PCR ۴۰
جدول ۳-۵- برنامه حرارتی مورد استفاده برای مرحله اول nested-PCR ۴۱
جدول ۳-۶- مواد مورد استفاده برای مرحله دوم nested-PCR ۴۱
جدول ۳-۷- برنامه حرارتی مورد استفاده برای مرحله دوم nested-PCR ۴۱
جدول ۴-۱- نمونه‌های مورد مطالعه به تفکیک استان ها و گونه حیوانات ۴۴

فصل اول

مقدمه

ویروس تب دره ی ریفت (Rift Valley fever virus) متعلق به جنس فلبوویروس (Phlebovirus) و از خانواده‌ی بانیاویریده (Bunyaviridae) می‌باشد. این ویروس واجد غشاء بوده و ژنوم آن از نوع RNA تک‌رشته‌ای و سه قطعه ای می باشد که به صورت سه ناحیه ی مجزای ریبو نوکلئوکپسیدی در ویروس قرار می‌گیرند [۲۵].

بیماری تب دره‌ی ریفت از مهم ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام می‌باشد. میزبان‌های حساس شامل گاو، گوسفند، بز، شتر، بعضی از جوندگان، نشخوارکنندگان وحشی، گاومیش، بزکوهی و انسان هستند [۴۵].

بیماری حاصل از عفونت با این ویروس در قاره‌ی آفریقا بومی است . دره‌ی ریفت در قلب آفریقا، در شمال از کشور سودان شروع شده و بعد از گذر از کشورهای اوگاندا و کنیا وارد کشور تانزانیا می شود و در آن خاتمه می‌یابد [۲۴]. همه‌گیری‌های بیماری از سال ۱۹۱۰ میلادی، به صورت دوره ای در دام ها و ساکنین این دره اتفاق افتاده است. با این حال همه‌گیری‌هایی نیز در خارج از نواحی اطراف دره‌ی ریفت، از جمله نواحی مرتعی شرق و جنوب آفریقا اتفاق افتاده است که همگی با بارندگی های شدید و مداوم یا تغییر در اکولوژی منطقه و در نتیجه، تکثیر و افزایش پشه های ناقل، ارتباط داشتند [۴۹]. بیماری تا سپتامبر سال ۲۰۰۰ از سایر قاره‌های جهان گزارش نشده بود، اما در سپتامبر سال ۲۰۰۰، همه‌گیری این بیماری در کشورهای عربستان سعودی و یمن به طور هم زمان گزارش شد که با مرگ و میر بالایی در انسان ها نیز همراه بود . همه‌گیری

بیماری در جنوب باختری عربستان و غرب یمن متمرکز بوده است [۳۸]. بنابراین خطر و احتمال انتقال بیماری به سایر کشورهای آسیایی از جمله ایران و قاره‌ی اروپا نیز وجود دارد.

بیماری تب دره ی ریفت، بیشتر توسط پشه‌ها، بخصوص پشه های گونه‌های مختلف آئدس (.Aedes Spp) و گونه‌ی کولکس پاپینز (*Culex pipiens*) منتقل می گردد. این پشه ها در همه ی نقاط جهان از جمله ایران یافت می‌شوند و می توانند توسط باد، ده‌ها کیلومتر جا به جا شوند. گاهی تماس مستقیم با خون، ترشحات و بافت‌های آلوده (از طریق زخم های پوستی یا افشانه ها) و همچنین خوردن شیر غیر پاستوریزه‌ی حیوانات آلوده نیز می تواند باعث انتقال ویروس به بدن انسان گردد . شیوع ناگهانی بیماری در بین حیوانات اهلی، می‌تواند متعاقباً با شیوع ناگهانی در انسان ها دنبال گردد که گاهی، منجر به مرگ و میر زیادی می شود. به عنوان مثال در سال ۱۹۷۷، یک مورد همه گیری بیماری در مصر، منجر به ابتلای ۱۸هزار نفر به بیماری تب دره‌ی ریفت و مرگ ۵۹۸ نفرگردید [۴۹].

از مشخصات ویژه ی بیماری تب دره ی ریفت، افزایش موارد سقط جنین در گله های دام، هم زمان با بروز بیماری در جمعیت های انسانی، متعاقب بارش طولانی مدت باران های سنگین در منطقه می باشد. موارد تک-گیر بیماری در حیوانات، معمولاً به خوبی تشخیص داده نمی شود. علائم بالینی در میان حیوانات اختصاصی نبوده و موجب می‌گردد تا تشخیص بالینی با مشکل مواجه گردد. تعداد حیوانات آلوده به ویروس و فاقد علائم بالینی، به مراتب بیشتر از حیواناتی است که علائم را بروز می دهند. حیواناتی نظیر گوسفند، بز، گاو، گاومیش و شتر در صورت ابتلا، در هر مرحله‌ای از آبستنی باشند، جنین خود را سقط نموده و در مواردی هضم (اتولیز) جنین‌های مرده نیز مشاهده می گردد. مهم‌ترین و حادترین واکنش های بیماری معمولاً در بره ها و بزغاله های تازه متولد شده دیده می شود، به طوری‌که میزان مرگ و میر در حیوانات با سن کمتر از یک هفته مع ادل ۹۰ درصد یا بیشتر است. علائم بیماری در گوساله ها شبیه بره‌ها بوده اما مرگ و میر در آن ها کمتر و حدود ۳۰ درصد می‌باشد [۹۷].

بیماری در انسان، معمولاً به فرم یک بیماری شبه آنفلوانزا تظاهر می یابد و با یک تب گذرا، احساس سرما، لرزش، سردرد، دردهای عضلانی و مفصلی، حساسیت به نور، بی اشتهایی و در مواردی استفراغ و خون دماغ همراه است. مهم‌ترین عارضه‌ی بیماری، التهاب شبکیه (Retinitis) یک طرفه است که حدود ۱ تا ۳ هفته پس از شروع علائم بالینی تظاهر می یابد. حدود ۵۰ درصد از افرادی که با عوارض بینایی درگیر می شوند، دچار کوری دائمی می‌شوند که می‌تواند به صورت یک طرفه یا دو طرفه رخ دهد. تعدادی از افراد مبتلا به تب دره‌ی ریفت، دچار انسفالیت (Encephalitis) همراه با علائمی نظیر گیجی، توهم، تشنج و کما می گردند. میزان تلفات ناشی از تب دره ی ریفت در انسان پایین است، با این وجود بهبودی کامل، نیازمند سپری شدن یک دوره‌ی زمانی طولانی است. در تعدادی از بیماران، هپاتیت همراه با خون ریزی وسیع در سطح مخاطات گزارش شده است. در این بیماران معمولاً ۳ تا ۶ روز پس از شروع علائم، مرگ رخ می‌دهد و تعداد اندکی پس از گذراندن یک دوره‌ی زمانی طولانی، بهبود می‌یابند [۴۹].

همه‌گیری این بیماری در دام ها، خسارت‌های اقتصادی سنگینی به صنعت دام داری وارد می کند، به طوری‌که تنها در کشور سومالی، خسارت وارد شده به صادرات دام در اثر تحریم دام های این کشور، توسط کشورهای عربی در سال های ۱۹۹۸ و ۱۹۹۹ معادل ۱۰۹میلیون دلار آمریکا و در سال های ۲۰۰۰ و ۲۰۰۱ معادل ۳۲۶

میلیون دلار آمریکا برآورد شده است [۳۱]. علاوه بر این هزینه‌های ناشی از پیش‌گیری، کنترل، درمان بیماری و اپیدمی‌های منجر به مرگ و میر حیوانات و هم‌چنین هزینه‌های درمان انسان، می‌تواند خسارت‌های شدیدی را به اقتصاد کشورها وارد کند.

فصل دوم

کلیات

۲-۱- ویروس شناسی RVFV

ویروس‌ها انگل‌های اجباری داخل سلولی هستند که برای تکثیر و بقای خود به طور کامل به سلول میزبان وابسته‌اند و هر ذره‌ی ویروسی در خارج از سلول و در محیط خارج از بدن هیچ فعالیتی ندا رد. این ذرات میکروبی بسیار کوچک از نوکلئوکپسید ساخته شده اند که احتمال دارد پوششی از غشای لیپیدی د و لایه، آن را احاطه کرده باشد . نوکلئوکپسیدها از ماده‌ی ژنتیکی (RNA یا DNA) و ملکول‌های پروتئینی که ماده ی ژنتیکی را محافظت می کنند، ساخته شده‌اند. به طور معمول ویروس ها بر اساس همین ویژگی های ساختاری خود، یعنی داشتن یا نداشتن پوشش، نوع ماده ی ژنتیکی (RNA یا DNA)، پولاریته‌ی ژنوم (مثبت یا منفی)، تک رشته‌ای یا دو رشته ای بودن ژنوم و نوع تقارن پروتئینی کپسید به خانواده های مختلف تقسیم می شوند [۶۰].

بانیاویریده یکی از بزرگترین خانواده های ویروس‌های پستانداران است که دیرتر از بسیاری ویروس ها شناخته شد. اکثر ویروس‌های این خانواده از طریق بندپایان منتقل می شوند. آن‌ها در بدن بندپا تکثیر یافته و پس از طی مرحله‌ی خاصی از چرخه‌ی زندگی خود در بدن میزبان مهره‌دار که از پستانداران یا پرندگان است، توسط ناقلینی نظیر پشه، کنه، پشه خاکی یا پشه ریزه (Culicoides) منتقل می شوند. ویروس‌های جنس هانتاویروس (Hantavirus) از این خانواده، از طریق ادرار و یا از طریق بزاق با گاز گرفتن، بین جوندگان منتقل می‌شود، به همین دلیل امکان سرایت بیماری ناشی از این ویروس به انسان هم وجود دارد [۵۴]. آژانس‌های

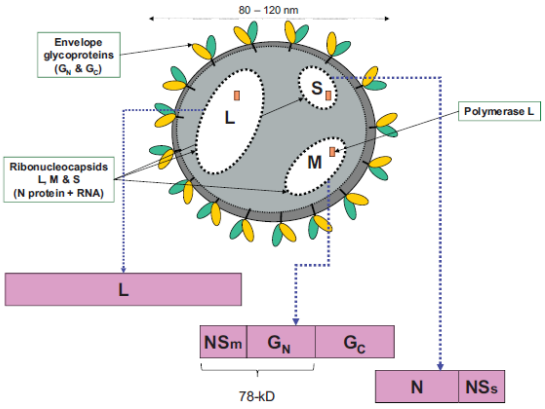
بین المللی کنترل بیماری ها، نسبت به دو ویروس مهم این خانواده که قابل سرایت به انسان هستند یعنی ویروس تب دره‌ی ریفت (RVFV) و ویروس تب خون‌ریزی دهنده‌ی کریمه‌ی کنگو (CCHFV) توجه خاصی دارند [۵۴].

خانواده‌ی بانیاویریده بر اساس نام محل شناسایی آن ها در آفریقا (بانیامورا) به این اسم، نام گذاری شده است [۵۴]. به طور کلی ویریون ها کروی یا چند شکلی هستند . قطر آن ها ۱۲۰-۸۰ نانومتر بوده و دارای زواید گلیکوپروتئینی به طول ۱۰-۵ nm می‌باشند که در یک غشای لیپیدی دو لایه با ضخامت تقریبی ۵ nm جای گرفته‌اند. پوشش ویریون‌ها به طور معمول از غشاهای دستگاه گلژی سلول و گاهی به طور تصادفی از غشاهای سطح سلول منشأ می گیرند. ریبونوکلئوکپسیدهای ویروسی دارای قطری معادل ۲/۵-۲ nm هستند و طول آن‌ها ۳۰۰-۲۰۰ nm می‌باشد. تقارن این ریبونوکلئوکپسیدها معمولاً (نه همیشه) به شکل مارپیچی می باشد [۱۵۰].

۲-۱-۱- ویژگی های فیزیکی و بیولوژی مولکولی RVFV

به طور کلی فلبوویروس‌ها به pH خارج از دامنه ۹-۷ حساسند و در اثر حرارت بالا (بیش از ۵۶ درجه سانتیگراد)، تابش اشعه فرابنفش و حلال‌های چربی به سرعت غیر فعال می‌شوند [۲۵].

ژنوم RVFV از سه قطعه RNA تک رشته‌ای تشکیل شده است که شامل قطعات کوچک (S)، متوسط (M) و بزرگ (L) هستند. ژنوم ویروس در ویریون در یک نوکلئوکپسید (N) جداگانه قرار دارد که حاوی دو گلیکوپروتئین (G_1 و G_2) و یک ترانس‌کریپتاز ویروسی یا پروتئین L دارد [۱۱۹]. ساختار ویریون ویروس تب دره‌ی ریفت در شکل ۲-۱ نشان داده شده است.



شکل ۲-۱- ساختار ویریون ویروس تب دره ریفت [۱۱۴]

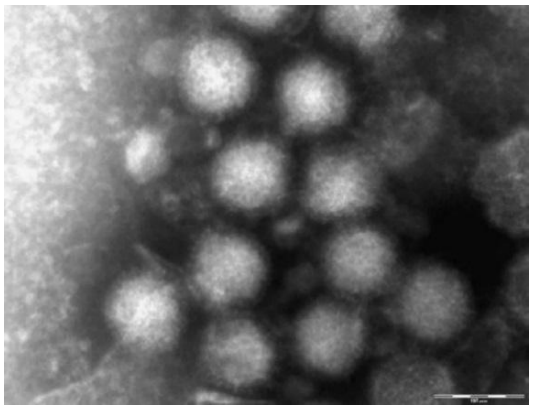
قسمت S (با وزن مولکولی $۰/۵-۰/۶\times۱۰^{۶}$ [۱۱۹]) از ۱۶۹۰ نوکلئوتید تشکیل شده است که دو قطبی (Ambisense) است [۷۲]. ژن مربوط به پروتئین N، سنس منفی دارد و در بخش سوم RNA ویروس قرار دارد و از روی آن یک mRNA کامل ویروسی، رونویسی می‌شود که در نهایت ترجمه و حاصل آن، پروتئین N است [۶۶].

هنگام همانندسازی از روی ژنوم ویروسی، RNA کامل ویروسی حاصل می شود. ژن پروتئین NSs، نیز سنس منفی دارد و در نیمه‌ی سوم RNA کامل ویروسی قرار دارد. این هم به mRNA رونویسی و به پروتئین مذکور ترجمه می‌شود [۶۶].

ناحیه‌ی ORF (Open Reading Frame) قطعه‌ی S با سنس منفی، پروتئین N با سنس مثبت را به همراه پروتئین‌های غیر ساختاری کد می کند [۱۲۷]. Billecocq و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که پروتئین NSs می‌تواند از تولید اینترفرون جلوگیری کند اما اشکالی در فعال شدن فاکتور های اختصاصی رونویسی اینترفرون ایجاد نمی‌کند. پروتئین NSs همچنین با جزء P44 فاکتور رونویسی ضروری برای RNA پلی‌مراز I و II ((Transcription Factor II H (TFIIH) تداخل دارد [۱۹,۸۸]. TFIIH مسئول رونویسی ژن های کد کننده‌ی پروتئین‌ها به وسیله RNA پلی‌مراز II است.

قطعه‌ی M (با وزن مولکولی $۱/۳-۱/۷\times۱۰^{۶}$ [۱۱۹]) از ۳۸۸۵ نوکلئوتید تشکیل شده و قطبیت منفی دارد، بدین معنی که برای تولید پروتئین ابتدا باید از روی ژنوم با سنس منفی، mRNA با سنس مثبت رونویسی شود. قسمت M حداقل ۴ پروتئین ویروسی را با یک ORF واحد کد می کند شامل: دو گلیکوپروتئین اصلی غشاء به نام G_1 به وزن ۶۵۰۰۰ دالتون و G_2 به وزن ۵۶۰۰۰ دالتون [۶۲,۱۱۹] که در سطح ویروس قرار می‌گیرند و در انتقال، عفونت زایی و ایمنی نقش دارند و هدف اصلی آنتی بادی‌های خنثی کننده هستند [۱۵,۱۶,۸۴,۱۳۴]. همچنین قبل از این ناحیه در ژنوم، بخشی وجود دارد که دو پروتئین غیر ساختاری را کد می‌کند که عبارتند از : NSm_1 (۷۸ kDa) [۱۴۱] و NSm_2 (۱۴ kDa) [۵۹]). مشخص شده است که این پروتئین‌ها در کشت سلول برای رشد ویروس ضروری نیستند [۲۳,۶۳,۱۵۶] و در واقع فاکتور حدت ویروسی هستند و اثر خود را از طریق مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در سلول هدف، اعمال می کنند [۱۵۷].

قسمتL (با وزن مولکولی $۲/۳-۲/۷\times۱۰^{۶}$ [۱۱۹]) از ۶۴۰۴ نوکلئوتید تشکیل شده که دارای قطبیت منفی است. این ناحیه یک ORF دارد و پروتئین L را کد می کند که در واقع آنزیم ترانس‌کریپتاز ویروسی است. این آنزیم یک RNA پلی‌مراز وابسته به RNA به وزن ۲۳۷۰۰۰ دالتون است (آنزیمی که RNA ژنوم را همانند سازی می‌کند و از روی آن یک RNA دیگر می‌سازد) [۳۴,۵۲,۱۰۷]. تصویر RVFV با میکروسکوپ الکترونی در شکل ۲-۲ نمایش داده شده است.



شکل ۲-۲- تصویر RVFV با میکروسکوپ الکترونی [۹۰]

۲-۱-۲- فیلوژنی (تکامل نژادی) RVFV

یکی از خواص ژنوم متشکل از RNA چند قطعه‌ای این است که اگر هم‌زمان چند ویروس در سلول تکثیر شوند، ممکن است قطعات ژنومی بین آن‌ها بازآرایی شوند و ویروس های جدیدی در اثر پدیده ی نوترتیبی شکل گیرند که خود باعث کسب ویژگی های ژنتیکی جدید می‌شود. بازآرایی در طبیعت زمانی رخ می دهد که دو سویه‌ی متفاوت به طور هم زمان یک میزبان را درگیر کنند [۱۲۵]. شواهدی مبنی بر بازآرایی ژنتیکی در بین اعضای خانواده ی بانیاویریده در شرایط *In Vitro*، *In Vivo* [۱۸,۲۶,۶۴] و نیز در بدن پشه ها وجود دارد [۱۷]. در خصوص RVFV، بازآرایی ژنتیکی در کشت بافت [۱۲۶] و نیز در بدن پشه ها دیده شده است [۱۴۸]. همچنین شواهدی مبنی بر بازآرایی ژنوم RVFV در طبیعت در سویه های مصری که در سال های ۱۹۷۷ تا ۱۹۹۳ جدا شده‌اند و در بین اجداد ویروسی با منشأ غرب آفریقا، مصر و آفریقای مرکزی به سمت شرق نیز وجود دارد. تکامل RVFV در طبیعت به دنبال جهش های نقطه‌ای در ژنوم آن و نیز بازآرایی ژنومی سویه‌های در گردش صورت گرفته و منجر به ایجاد خواص ویروسی جدیدی هم چون افزایش حدت شده است [۱۲۵].

به دلیل خطای زیاد RNA پلی‌مراز (که منجر به جهش های نقطه‌ای می‌شود) و بازآرایی قطعه ای ژنوم که از ویژگی‌های ویروس های RNA دار است، مطالعاتی جهت ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی بین گروه های Phlebotomus و Uukuniemi از خانواده‌ی بانیاویروس صورت گرفته است. آنالیز cDNA که روی قطعه ی S از RNA ویروس‌های RVFV، Sandfly fever Sicilian virus، Punto Toro virus، Tospovirus و Uukuniemi virus انجام شد، نشان داد که پروتئین N در همه‌ی این ویروس‌ها مشابه است [۶۶]. همچنین توالی‌های پروتئین L در ویروس‌های RVFV و Uukuniemi، ۵۸ درصد مشابه است [۵۲]. Bird و همکاران در سال ۲۰۰۸ نوکلئوتیدها و آمینواسیدهای توالی های ژنومی و نیز هر یک از قطعات S، M و L را در ۳۳ سویه‌ی RVFV که از نظر اکولوژیک و بیولوژیک متفاوت محسوب می شدند، مقایسه کرده اند. به طور کلی، تنوع ژنتیکی در بین این سویه ها کم گزارش شده و در قطعات S، M و L بیشترین میزان آن در سطح نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی به ترتیب ۵ و ۲ درصد بوده است [۲۳]. تفاوت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی در قطعات S، M و L به طور خلاصه در جدول ۲-۱ نشان داده شده است.

جدول ۲-۱- بیشترین تفاوت توالی در مقایسه دو به دوی قطعات S، M و L در ۳۳ سویه متفاوت RVFV [۲۳]

تفاوت در آمینواسیدها (٪)	تفاوت در نوکلئوتیدها (٪)	بیشترین تفاوت توالی در مقایسه دو به دو
۱	۴	قطعه S
۲	۵	قطعه M
۱	۴	قطعه L

تنوع زیاد قطعات M به دلیل نقش گلیکوپروتئین‌ها در اتصال به سلول هدف و نیز القای تولید آنتی بادی‌های خنثی کننده قابل انتظار است . با این وجود، Bird و همکاران نتیجه گیری کردند که در خصوص قطعه ی M نیز همانند قطعات S و L در سطح نوکلئوتید و آمینو اسید نظارت و مراقبت زیادی انجام می شود. در واقع، اثبات شده است که فعالیت RNA پلی‌مراز در همه‌ی ۳۳ سویه‌ی RVFV کاملاً دقیق است [۲۳,۱۰۷]. Bird و همکاران تست‌های دقیق زیادی روی ژنوم کامل قطعات L، M و S در ۳۳ سویه‌ی ویروس انجام دادند. این آزمایشات نشان داد که شواهد آماری معنی داری جهت اثبات نوترکیبی در قطعات L و M وجود ندارد. اما شواهدی مبنی بر نوترکیبی در قطعه ی S دیده شد، ولی از جهت بررسی آماری کافی نبودند و نیز آنقدر زیاد نبودند که بتوان گفت نوترکیبی می‌تواند کل فیلوژنی قطعه S را تغییر دهد.

در نتیجه، اگرچه ژنوم RVFV به صورت RNA چند قطعه‌ای است، اما از نظر ژنتیکی بسیار پایدار است و این ممکن است به دلیل عدم تحمل جهش و یا وجود اجداد مشترک باشد . آنالیز Bayesian که روی ژنوم کامل ۳۳ سویه‌ی RVFV انجام شد نشان داد که اجداد مشترک آنها به حدود تنها ۱۰۸ تا ۱۱۷ سال قبل از سال ۲۰۰۰ باز می‌گردند [۲۳].

۲-۱-۳- تاکسونومی RVFV

کمیته‌ی بین‌المللی طبقه بندی ویروس ها، خانواده‌ی بانیاویریده را در پنج جنس طبقه بندی نموده است که جنس‌های مهم آن از نظر دامپزشکی شامل: هانتا ویروس‌ها مانند هانتان‌ویروس، نایروویروس‌ها مانند ویروس تب خون‌ریزی دهنده‌ی کریمه‌ی کنگو (CCHFV) و Dugbe virus، ارتوبانیاویروس‌ها مانند ویروس آکابان (Akabane virus) و Bunyamwera virus و فلبوویروس‌ها مانند ویروس تب دره ی ریفت (RVFV) و Sandfly fever Naple virus می‌باشند [۱۵۰].

این طبقه بندی بر اساس سازمان دهی توالی نوکلئوتیدی بانیاویروس ها و همچنین توالی اسیدهای آمینه ای آن‌ها صورت گرفته است [۱۵۰].

۲-۲- بیماری RVF

۲-۲-۱- تاریخچه RVF

در سال ۱۹۱۰ میلادی پس از بارش‌های سنگین باران در دره‌ی بزرگ ریفت در کنیا، گزارشاتی مبنی بر نوعی بیماری در گوسفند و انسان ارا یئ شد که با مرگ و میر بره ها همراه بود . اما عامل اصلی بیماری (RVFV) در سال ۱۹۳۰، پس از مرگ و میر بسیار بالای بره های مرینوس (Merino) تازه متولد شده در دره ی ریفت و بخش‌های شمالی دریاچه‌ی Nivasha جداسازی گردید. این طغیان‌ها که با بارش سنگین باران در این نواحی هم‌زمان بود، باعث مرگ و میر کامل بره ها و تعداد زیادی از گوسفندان شده و به همان نسبت منجر به سقط جنین حیوانات آبستن گردید [۳۷].

RVFV در آفریقای جنوبی اولین بار در سال های ۱۹۵۱-۱۹۵۰ پس از همه گیری وسیع در گاو و گوسفند شناسایی شد. در طی این طغیان برای اولین بار وقوع عوارض چشمی (Ocular Sequelae) شدید در یک پاتولوژیست که در حین کار در آزمایشگاه به RVFV آلوده شده بود، گزارش شد [۵۸,۱۲۹]. دومین همه-گیری RVFV در آفریقای جنوبی در سال های ۱۹۷۶-۱۹۷۴ همراه با تلفات فراوان در نشخوارکنندگان اتفاق افتاد. در این همه گیری برای اولین بار مرگ ناشی از انسفالیت و تب خون ریزی دهنده همراه با هپاتیت نکروتیک گزارش شد [۹۱].

در سال‌های ۱۹۷۸-۱۹۷۷ یک همه‌گیری وسیع در طول رود نیل اتفاق افتاد که موجب مرگ و میر و سقط جنین در گوسفند، گاو، بز، بوفالوی آبی و شتر شد . در این همه‌گیری حدود ۱۸ هزار انسان به بیماری مبتلا شدند که از این تعداد، ۵۹۸ تن جان باختند [۴۹,۹۹]. در ماداگاسکار نیز RVFV برای نخستین بار در سال ۱۹۷۹ جداسازی گردید [۹۱].

طغیان وسیع RVFV در سال ۱۹۸۷، ۸۹ هزار نفر را در موریتانی و سنگال مبتلا کرد [۸۰]. شیوع بیماری در ناحیه‌ی گاریسا (Garissa) در کنیا و بخش‌هایی از سومالی در سال‌های ۱۹۸۸-۱۹۸۷ باعث مرگ ۱۷۰ انسان شد [۱۵۸].

نخستین بار در سال های ۲۰۰۱-۲۰۰۰ طغیان RVF در خارج از قاره ی آفریقا، در استان جیزون در جنوب غربی عربستان سعودی و یمن رخ داد که با تلفات فراوان در گوسفند و بز، درگیری حدود ۲ هزار انسان و مرگ ۲۴۵ تن همراه بود [۸۲,۱۳۳].

وقوع مجدد همه گیری RVF در سومالی، تانزانیا و کنیا پس از بارش های سنگین باران در سال های ۲۰۰۷-۲۰۰۶ موجب بیماری ۱۰۶۲ انسان، مرگ ۳۱۵ تن از این تعداد و تلفات فراوان در حیوانات شد [۹۱]. در طول سال‌های ۲۰۰۷ و ۲۰۰۸، انتقال RVFV به مجمع الجزایر کومور به اثبات رسید [۱۳۷].

۲-۲-۲- اپیدمیولوژی RVFV

RVFV سال‌های متمادی به صورت خاموش و یا از طریق یک چرخه ی اندمیک و با تظاهرات فوق‌العاده جزئی باقی مانده تا این که پس از بارندگی های شدید در این نواحی به صورت یک همه گیری پردامنه ظاهر شد [۵۴]، تا جایی که به عنوان علت همه‌گیری‌های وسیع در بین نشخوارکنندگان اهلی و انسان در آفریقا و اخیراً در شبه جزیره‌ی عربی و مجمع الجزایر کومور شناخته می شود. طغیان بیماری در نشخوارکنندگان با درجات بالایی از مرگ و میر و سقط جنین در حیوانات آبستن ، همراه با مرگ و میر تمامی حیوانات تازه متولد شده مشخص می‌شود [۳۵,۴۶,۱۲۰].

این بیماری در قاره ی آفریقا بومی می‌باشد. دره‌ی ریفت در قلب آفریقا، در شمال از کشور سودان شروع شده و بعد از گذر از کشورهای اوگاندا و کنیا وارد کشور تانزانیا می‌شود و در آن خاتمه می یابد [۲۴]. همه‌گیری‌های بیماری از سال ۱۹۱۰ میلادی، به صورت دوره‌ای در دام‌ها و ساکنین دره اتفاق افتاده است . با این حال همه-گیری‌هایی نیز در خارج از دره‌ی ریفت، از جمله نواحی مرتعی شرق و جنوب آفریقا اتفاق افتاده است که