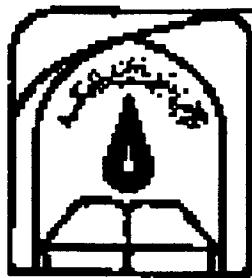
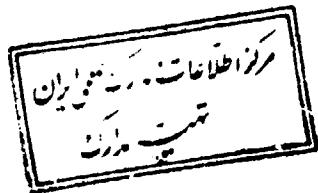


بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِيْمِ

۲۰۱۴

۱۳۷۹ / ۴ / ۱۶



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ویروس شناسی

موضوع:

بکارگیری روش الیزا و مقایسه آن با روش خنثی سازی ویروس به منظور اندازه گیری عیار IgM ضد ویروس سرخ

نگارنده:

فاطمه رودباری

۱۷۲۸۹

استاد راهنما:

دکتر محمد حسن روستایی

استاد مشاور:

دکتر علی مصطفایی

زمستان ۷۸

۳۱۶۸۳

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایاننامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایاننامه کارشناسی ارشد خانم آقای فاطمه رودباری رشته: ویروس‌شناسی
تحت عنوان بکارگیری روش الیزا و مقایسه آن با روش ختنی‌سازی ویروس به منظور اندازه‌گیری عیار IgM
ضد ویروس سرخ

تقدیم می‌شود. اینجانب نسخه نهشی این پایاننامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تائید کرده و پذیرش آنرا برای
تمکیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

آقای دکتر محمدحسن روستایی (استاد راهنما)

فرزاد صباغی

آقای دکتر علی مصطفایی (استاد مشاور)

ح

سرکارخانم حوریه سلیمان‌جاهی نهاینده تحصیلات تکمیلی و استاد ناظر

ح

سرکارخانم دکتر ناطق (استاد نظر)

ح

سرکارخانم دکتر مختاری آزاد (استاد ناظر)

ح

آقای دکتر حسن (استاد ناظر)



آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، میتوان بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل تعهد می شوند:

ماده ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) خود، مراتب را قبل "به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند.
«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد /بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِيْمِ/ نگارنده در رشتۀ ویروس شناسی است
که در سال ۱۳۷۸ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار احمد آقای دکتر محمدحسن رستایی، مشاوره مهرکار احمد /جناب آقای دکتر علی مصطفایی و مشاوره سرکار خانم /جناب آقای دکتر سوریه سلیمان جاهی از آن دفاع شده است.»

ماده ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأمین کند.

ماده ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای حسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفاده حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶ اینجانب فاطمه رودباری دانشجوی رشته ویروس شناسی ارشد تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: فاطمه رودباری

تاریخ و امضا:

برگ سبزی به:

یکانه خالق هستی، او که مهربانترین است

عشق و فداکاری مادر و پدر عزیزم

و محبتها و حمایتهای بیکران خواهر و

برادران خوبم

باتشکر و سپاس فراوان از:

استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمدحسن روستایی، استاد راهنمای و مدیرگروه محترم گروه ویروس شناسی که در طول تحصیل از راهنمایی‌های بی دریغ ایشان برخوردار بوده‌ام.

استاد محترم سرکار خانم دکتر فرزانه صباغی، که در غیاب استاد محترم راهنمای، زحمت راهنمایی این پژوهش را به عهده داشته و دلسوزانه همراهیم نمودند.

استاد گرانقدر جناب آقای دکتر علی مصطفایی، استاد مشاور، که در تمام مراحل پایان نامه راهنمایی‌های موثر و ارزشمند ایشان، چراغ راهم بود.

استاد محترم سرکار خانم دکتر حوریه سلیمان‌جاهی، استاد مشاور، که در طول تحصیل از حمایتهاي صمیمانه ایشان بهره‌مند بوده‌ام.

برادر خویم آقای دکتر مصطفی رودباری که در مراحل نمونه‌گیری، سختیها و مشقات بسیاری را متحمل شدند.

دوستان عزیز و خویم خانم‌ها: عدالت، جهانشیری، فیاض منش که حضور سبزشان قوت قلب بود.

همکاران گرامی خانم یاری و آقایان: روانشاد، نیازمند، حاج موسی و بویژه آقای صرامی که در پیشبرد این پایان نامه یاریم کردند.

مسئولین محترم مراکز سه‌گانه، بهداشت و درمان شهرستان نکاء و روستاهای آلوکنده، حاجی محله، زرنده‌ی علیا، زرنده‌ی سفلی، کوهسارکنده، چاله پل و بویژه آقایان: دکتر جمشیدی، دکتر حیدری و آقای احمدی و خانم دکتر طبیبی که از کمکهای بی دریغشان برخوردار بوده‌ام.

خانم پرویزی، مسئول محترم آزمایشگاه دانشکده پرستاری و مامائی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، که همواره در طول تحصیل، شرایط مطلوبی را برای انجام مسئولیتهايم فراهم نمودند.

گروه ویروس شناسی و ایمنی شناسی
و همه آنانکه مهر بانانه یاریم دادند.

چکیده:

۷) ویروس سرخک از اعضاء جنس موربیلی ویروس در خانواده پارامیکسو ویریده است. این ویروس عامل بیماری سرخک در انسان است و هیچ مخزن حیوانی ندارد. بیماری سرخک یکی از واگیردارترین بیماری ویروسی است که ویروس آن معمولاً "باعث آلودگی اطفال می‌شود. ویروس از طریق ذرات معلق در هوا پخش شده و راه اصلی ورود به بدن، پخش فوقانی دستگاه تنفس است. این بیماری معمولاً " بصورت حاد رخ می‌دهد و باعث ابتلاء دستگاه تنفس، چشم و حتی CNS می‌گردد. دوره بیماری حدود یک هفته است و علائم آن معمولاً " سخت می‌باشد. هرچند بیماری سرخک به تنهایی کشنده نیست اما به علت ایجاد عوارض متعدد بویژه برونشیت و انواع انسفالیت یکی از عوامل مرگ و میر کودکان است. علی‌رغم تجویز گستردگی واکسن ضد این بیماری در جهان. هنوز هم در صد ابتلاء افراد حساس و مرگ ناشی از این بیماری قابل توجه است. کشور جمهوری اسلامی ایران نزدیک به دو دهه است که بطور مستمر این واکسن را در اطفال حدود یکسال مصرف می‌نماید، ولی با کمال تاسف موارد بیماری در چند سال اخیر قابل توجه بوده است. به همین منظور بررسی وجود IgM ضد ویروس می‌تواند معیار درستی برای تشخیص بیماری و کارائی واکسن باشد. لذا در این پژوهش روش الیزا برای اندازه‌گیری IgM اختصاصی ویروس سرخک راه اندازی شد. برای انجام این روش، ابتدا ملکول IgM انسانی در مراحل مختلف تهیه و خالص سازی شد و سپس آنتی سرم در خرگوش تهیه گشت. با استفاده از روش‌های مختلف، آنتی سرم خالص و با آنزیم پراکسیداز کونژوگه شد. برای تهیه آنتی زن نیز از تلقیح ویروس سرخک به رده سلولی ورو و خالص سازی نسبی آن استفاده و بوسیله این محصولات، روش الیزا غیرمستقیم طراحی شد و ۱۰۰ نمونه سرم اطفال ۹-۱۸ ماهه که واکسن سرخک را دریافت نموده بودند، مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین روش SN نیز برای این تعداد نمونه اعمال شد. با مقایسه روش الیزا طراحی شده در این پژوهش و SN مشخص گردید، این دو آزمایش ارتباط قوی و مناسبی با هم ندارند. از طرفی با مقایسه الیزا طراحی شده در این پژوهش و کیت الیزا وارداتی، میزان حساسیت و ویژگی آذ به ترتیب ۹۸/۹ و ۱۰۰ درصد بوده است.)→

واژگان کلیدی: ویروس سرخک، آزمون الیزا، ایمنوگلوبولین M

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه
۱	مقدمه
	فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده
۷	۱-۲- تاریخچه
۱۰	۲-۲- نامگذاری ویروس سرخک
۱۰	۳-۲- طبقه بندی
۱۱	۴-۲- شکل‌شناسی ساختار ویریون
۱۲	۵-۲- ساختمان ژنوم
۱۳	۶-۲- پروتئینهای ویروس سرخک
۱۵	۷-۲- چرخه تکثیر
۱۸	۸-۲- حساسیت به عوامل فیزیکی و شیمیایی
۱۸	۹-۲- محدوده میزان
۱۸	۱۰-۲- تکثیر ویروس در کشت سلولی و اثرات ویروس بر آن
۲۰	۱۱-۲- آسیب زایی و آسیب شناسی
۲۱	۱۲-۲- ایمنی
۲۲	۱۲-۲-۱- پاسخهای غیر اختصاصی زود هنگام
۲۲	۱۲-۲-۲- پاسخهای ایمنی ویژه ویروس سرخک
۲۳	۱۲-۲-۳- نقش ایمنی وابسته به سلول
۲۴	۱۲-۲-۴- ایمنی مخاطی
۲۴	۱۲-۲-۵- ایمنوپاتولوژی سرخک
۲۵	۱۲-۲-۶- اتو ایمنی
۲۵	۱۲-۲-۷- سرخک غیر معمول
۲۵	۱۴-۲- سرخک در حاملگی
۲۶	۱۵-۲- عوارض سرخک

عنوان

صفحته

۱۶-۲- میزان مرگ و میر.....	۲۸
۱۷-۲- روش‌های تشخیص.....	۲۸
۱۷-۲-۱- تشخیص بالینی.....	۲۸
۱۷-۲-۲- تشخیص آزمایشگاهی.....	۲۹
۱۸-۲- همه‌گیری شناسی	۳۱
۱۹-۲- پیشگیری و کنترل و درمان	۳۳
۱۹-۲-۱- واکسن‌های سرخک	۳۴
۱۹-۲-۲- زمان تجویز واکسن	۳۵
۱۹-۲-۳- موارد احتیاط در تجویز واکسن	۳۶
۱۹-۲-۴- درمان	۳۶
۲۰-۲- ریشه کنی	۳۷

فصل سوم: مواد و روشها

۱-۳-۱- کشت یاخته	۳۹
۱-۳-۱-۱- وسایل مورد نیاز :	۳۹
۱-۳-۱-۲- مواد مورد نیاز :	۴۰
۱-۳-۱-۳- آماده کردن محلولها و بافرها	۴۱
۱-۳-۱-۳-۱- طرز تهیه اسید سولفوکرومیک	۴۱
۱-۳-۱-۳-۲- طرز تهیه بافرنمکی فسفات (PBS) ده میلی مولار، ۷/۴-۷/V (PH)	۴۱
۱-۳-۱-۳-۳- طرز تهیه محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد W/V	۴۲
۱-۳-۱-۳-۴- تهیه محیط کشت یاخته	۴۲
۱-۳-۱-۴-۱- شستشو و استریل کردن وسایل	۴۳
۱-۳-۱-۴-۵- طریقه کشت سلول و نگهداری آن	۴۴
۱-۳-۲-۱- تهیه آنتی ژن مورد نیاز	۴۶
۱-۳-۲-۲-۱- ویروس سرخک و افزایش عیار آن	۴۶
۱-۳-۲-۲-۲- تهیه ویروس به مقدار موردنیاز	۴۷
۱-۳-۲-۳-۲- تهیه آنتی ژن شاهد	۴۷

عنوان

صفحه

۳-۳-۱-۱-۶-۳	تعیین عیار ویروس به روش TCID 50
۴۸	
۳-۴-۳	نمونه گیری
۴۹	
۳-۵-۳	تعیین عیار آنتی بادی ضدسرخک به روش خنثی سازی به روش ویروس
۴۹	
۳-۶-۳	تهیه آنتی سرم ضد IgM انسانی درخرگوش
۵۱	
۳-۶-۳	تهیه سرم انسان ازپلاسما
۵۱	
۳-۶-۳	مراحل تخلیص IgM از سرم انسان
۵۲	
۳-۶-۳	تهیه بخش غنی از IgM سرم انسان با روش رسوب دهنده پلی اتیلن گلیکول
۵۲	
۳-۶-۳	خلاص سازی IgM با کمک کروماتوگرافی ستونی
۵۳	
۳-۶-۳	ایمن سازی خرگوش با IgM انسانی
۵۴	
۳-۶-۳	خونگیری
۵۵	
۳-۷-۳	خلاص سازی آنتی بادی ضد IgM انسانی از سرم خرگوش
۵۵	
۳-۷-۳	رسوب دادن گاما گلوبولین خرگوش با استفاده از سولفات آمونیوم
۵۵	
۳-۷-۳	جدا سازی نمک سولفات آمونیوم از رسوبات
۵۶	
۳-۷-۳	خلاص سازی IgG خرگوش با کمک کروماتوگرافی تعویض یونی
۵۷	
۳-۷-۳	خلاص سازی IgG خرگوش (ضد IgM انسانی) با روش کروماتوگرافی جذبی
۵۹	
۳-۸-۳	کونژوگه کردن پراکسیداز با IgG خرگوشی
۶۱	
۳-۹-۳	تعیین عیار کونژوگه به روش الیزای مستقیم
۶۲	
۳-۱۰-۳	آزمایش انتشار شعاعی یگانه و دوگانه
۶۴	
۳-۱۱-۳	رنگ آمیزی ژل آگارز
۶۶	
۳-۱۲-۳	آزمایش الیزا
۶۷	
۳-۱۲-۳	تعیین عیار آنتی بادی IgM انسانی ضد ویروس سرخک در سرم افراد موردمطالعه
با استفاده از روش الیزای غیر مستقیم:	
۷۰	

فصل چهارم: نتایج

۴-۱	نتایج تعیین عیار ویروس سرخک به روش ماکرو
۷۳	
۴-۲	نتایج تست خنثی کنندگی ویروس سرخک به روش میکرو:
۷۷	

عنوان

صفحه

۴-۳- سنجش پروتئین	۷۷
۴-۴- نتایج جداسازی IgM انسانی از رسوبات، با استفاده از کروماتوگرافی ستونی	۷۸
۴-۵- نتایج خالص سازی IgG خرگوش با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعریض یونی ...	۸۰
۴-۶- نتایج خالص سازی IgG خرگوش (ضد IgM انسان) با کمک ستون کروماتوگرافی جذبی:	۸۱
۴-۷- نتایج خالص سازی IgG خرگوش (ضد IgM انسان) با کمک اتصال دو ستون کروماتوگرافی تعریض یونی و جذبی:	۸۵
۴-۸- نتیجه حاصل از انتشار دوگانه از سرم خرگوش (حاوی IgG ضد IgM انسانی) قبل از مراحل خالص سازی	۸۶
۴-۹- نتیجه حاصل از انتشار دوگانه از سرم خرگوش (حاوی IgG ضد IgM انسانی) بعد از مراحل خالص سازی	۸۷
۴-۱۰- نتیجه بدست آمده از آزمایش الکتروفورز (پلی آکریل امید) از سرم خرگوش حاوی آنتی بادی ضد IgM انسان قبل از مراحل تخلیص:	۸۷
۴-۱۱- نتیجه بدست آمده از درجه خلوص IgG خرگوش (ضد IgM انسان) با روش پلی آکریل امید:	۸۸
۴-۱۲- تعیین Cutpoint مناسب برای الیزا	۸۹
۴-۱۳- تعیین حساسیت و ویژگی تست الیزا	۹۰
۴-۱۴- نتایج حاصل از مقایسه تست الیزا طراحی شده با کیت الیزای وارداتی	۹۰
۴-۱۵- رابطه آزمایش های الیزا و SN	۹۱

فصل پنجم: بحث و پیشنهاد ها

بحث	۹۴
انتخاب لیگاند ستون جذبی به منظور تخلیص IgG خرگوش ضد IgM انسان	۱۰۱
پیشنهادها:	۱۰۴

فهرست منابع

فهرست جداول

عنوان	صفحة
جدول (۱-۲)، مثالهایی از اعضای خانواده پارامیکسوویریده	۱۱
جدول (۱-۴)، تعیین نتایج اندازه‌گیری عبار ویروس سرخک با روش ماقرو	۷۳
جدول (۲-۴)، نتایج جذب فراکشن‌های جمع آوری شده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی	۸۰
جدول (۳-۴)، نتایج جذب فراکشن‌های ستون کروماتوگرافی جذبی از فراکشن‌های حاوی جذب	
۴/۵ از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی	۸۲
جدول (۴-۴)، نتایج جذب فراکشن‌های ستون کروماتوگرافی جذبی در مرحله دوم	۸۳
جدول (۵-۴)، نتایج جذب فراکشن‌های ستون کروماتوگرافی جذبی مرحله سوم	۸۴
جدول (۶-۴)، نتایج حاصل از مقایسه تست الیزای طراحی شده با کیت الیزای وارداتی	۸۹
جدول (۷-۴)، مقایسه میزان عبار آنتی بادی در تست SN و میزان جذب در الیزا در تعدادی از جمیعت مورد مطالعه	۹۲
جدول (۸-۴)، نتایج حاصل از Correlation بین SN و الیزا	۹۳
جدول (۹-۴)، نتایج حاصل از رگرسیون بین SN و الیزا	۹۳

فهرست شکلها و نمودارها

شکل (۱-۲)، شکل شماتیک از ویروس سرخک و ژنوم و سازمان ژنومی	۱۲
شکل (۱-۳)، انواع روش‌های غیر رقابتی الیزا	۶۹
شکل (۱-۴)، تک لایه رده سلولی پایدار هلا	۷۵
شکل (۲-۴)، CPE ویروس سرخک بر روی سلول هلا	۷۵
شکل (۳-۴)، تک لایه سلولی پایدار سلول ورو	۷۶
شکل (۴-۴)، CPE ویروس سرخک بر روی سلول ورو	۷۶
نمودار (۱-۴)، درصد عبار آنتی بادی‌های خنثی کننده ضد ویروس سرخک	۷۷
نمودار (۲-۴)، نمودار کروماتوگرافی ستونی رسوبات غنی از IgM در روزین سفاروزسی ال عبی، به منظور خالص سازی IgM انسان	۷۹
نمودار (۳-۴)، نمودار مرحله دوم ژل فیلتراسیون رسوبات غنی از IgM در روزین سفاروزسی ال عبی	۷۹

عنوان

صفحه

نمودار (۴-۴)، نتایج جذب فراکشن‌های ستون کروماتوگرافی تعویض یونی به منظور خالص سازی خرگوش ضد IgM انسان ۸۱
نمودار (۴-۵)، نمودار حاصل از جذب فراکشن‌های ستون کروماتوگرافی جذبی از مرحله اول ۸۳
نمودار (۴-۶)، نمودار حاصل از جذب فراکشن‌های ستون کروماتوگرافی جذبی مرحله دوم ۸۴
نمودار (۷-۴)، نمودار حاصل از جذب فراکشن‌های ستون کروماتوگرافی جذبی مرحله سوم ۸۵
نمودار (۸-۴)، نمودار حاصل از جذب فراکشن‌های بدست آمده از اتصال دو ستون کروماتوگرافی تعویض یونی و جذبی ۸۵
نمودار (۱۳-۴)، نمودار مقادیر جذب ۱۰۰ نمونه سرمی و محل Cutpoint ۹۰

شکل (۹-۴)، انتشار دوگانه سرم خرگوش حاوی IgG ضد IgM انسانی قبل از مراحل خالص سازی ۸۶
شکل (۱۰-۴)، انتشار دوگانه سرم خرگوش (حاوی IgG ضد IgM انسانی) بعد از مراحل خالص سازی ۸۷
شکل (۱۱-۴)، نتیجه بدست آمده از الکتروفورز پلی آکریل امید سرم خرگوش قبل از مراحل خالص سازی ۸۷
شکل (۱۲-۴)، نتیجه بدست آمده از الکتروفورز پلی آکریل امید IgG خالص شده ۸۸
شکل (۱۴-۴)، نتایج تعیین عیار IgM انسانی در سرم افراد مورد مطالعه ۹۱

فصل
اول

مقدمة

سرخک یکی از بیماری‌های بسیار واگیردار است که با تب، عطسه، سرفه، ورم ملتحمه^(۱) [۲۳] و بروز دانه‌هایی در پوشش مخاطی دهان (لکه‌های کوپلیک) و متعاقب آن ظهور دانه‌های قرمز ماکولوپولر در صورت، تن و اعضای تحتانی بروز می‌نماید، مشخص می‌گردد [۲۴] آلدگی با سرخک باعث القای اینمی مادام عمر در برابر ویروس سرخک می‌شود اما عامل سرکوب اینمی نیز محسوب می‌گردد که افزایش حساسیت نسبت به سایر عفونتها را به همراه داشته و در موارد نادر باعث ایجاد عفونتها ماندگار در دستگاه عصبی می‌شود [۲۳] سرخک یک بیماری باشدت متوسط بوده و به تنها یی بندرت کشنه است [۲۵] اما عوارض ناشی از سرخک شایع بوده و در بعضی از موارد بسیار خطرناک هستند^(۱) شایع‌ترین عوارض سرخک: اسهال‌های مرتبط با سرخک، سینه پهلو، برونشیت، برونشیولیت و ورم‌گوش میانی است. اغلب اوقات علت مرگ در بیماران سرخکی سینه پهلو است، عوارض وخیم‌تر عبارتند از: ۱) انسفالت ۲) پن انسفالیت تحت حاد نکروزدهنده^(۲) (SSPE)، ۳) اسکروز متعدد^(۳) (MS) که می‌توانند سبب مرگ شوند [۲۶] در دو مورد اخیر عقیده بر این است که پاسخ اینمی علیه ویروس پاسخی غیرطبیعی بوده و نقش مهمی در بیماری زایی ویروس ایفا می‌کند [۲۷]

بطور کلی میزان مرگ و میراثی از سرخک در اشخاص خردسال و سالخورده بیشتر است [۲۸]

^(۱) Conjunctivitis

^(۲) Subacute sclerosing pan Encephalitis

^(۳) Multiple Sclerosis