بسمه تعالی

دانشکده دامپزشکی

گروه میکروبیولوژی

پایان نامه جهت اخذ کارشناسی ارشد در رشته ایمنی شناسی

سال تحصیلی ۹۰-۹۱ **شماره ثبت : ۴۶۷-ک-۲**

عنوان:

بررسی آزمایشگاهی پاسخ سلول‌های تک هسته ای خون محیطی گاوهای دریافت کننده واکسن تتراوالان تب برفکی به میتوژن‌ها و آنتی ژن اختصاصی

اساتید راهنما :

دکتر نوروز دلیرژ ، استادیار ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

دکتر عباس آزادمهر، استادیار ایمنی شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

هیات محترم داوران:

دکتربهرام دلیر نقده ، دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

دکتر حبیب دستمالچی ، استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

تنظیم و نگارش :

رضا نوریان

شهریور ۹۱

حق چاپ برای دانشگاه ارومیه محفوظ است

بسم الله

تقدیم میکنم :

به پدرم

کوهی استوار و حامی من در طول تمام زندگی

به مادرم

سنگ صبوری که الفبای زندگی به من آموخت

به همسرم

که در سایه همیاری و همدلی او به این منظور نائل شدم

به دلبندم

امید بخش جانم که آسایش او آرامش من است

تشکر میکنم :

در ابتداء از زحمات بی دریغ استاد بسیار گرانقدرم جناب آقای دکتر نوروز دلیر تشکر و قدردانی می نمایم که با کوشش و راهنماییهای بسیار مرا در انجام این پایان نامه راهنمایی کردند و آنچه می خوانید بدون راهنمایی ایشان میسر نبود.

از استاد و برادر بزرگوارم جناب آقای دکتر عباس آزادمهر، که در تمامی مراحل انجام این پایان نامه صبورانه در کنار من بودند و با راهنماییهای ارزشمند خود چراغ هدایتگر مسیر بودند.

از اساتید بزرگوار جناب دکتر بهرام دلیر نقده و دکتر حبیب دستاچی که قبول زحمت فرموده ، داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند.

از کلیه همکاران سازمان دامپزشکی کشور که در کلیه مراحل این پایان نامه مشوق و راهنمای بنده بودند.

و در پایان از کلیه مسئولین ، همکاران ، دوستان و عزیزانی که در طول مدت انجام پایان نامه به بهانه های مختلف مزاحمشان شدم و با روی خوش پذیرای من بودند نیز از صمیم قلب تشکر و قدردانی می نمایم.

چکیده فارسی : پایان نامه شماره ۴۶۷-ک-۲ مقطع کارشناسی ارشد ایمنی شناسی

سال تحصیلی : ۹۲-۹۱

نگارنده : رضا نوریان

عنوان پایان نامه : **بررسی آزمایشگاهی پاسخ سلول‌های تک هسته ای خون محیطی گاوهای دریافت کننده واکسن تتراوالان تب برفکی به میتوژن‌ها و آنتی ژن اختصاصی**

در این مطالعه پاسخ سلول‌های تک هسته ای خون محیطی که قبلاً در شرایط In vivo توسط واکسن تحریک شده بودند در شرایط In vitro مجدداً با آنتی ژن اختصاصی واکسن و میتوژن تحریک شده و بعد از بررسی قدرت تکثیر لنفوسیتی ، با اندازه گیری غلظت سایتوکاین‌های مایع رویی نوع پاسخ ایمنی به واکسن مورد بررسی قرار گرفت.

بدین منظور ابتدا گوساله‌ها دوبار بفاصله یک ماه توسط واکسن تتراوالان تب برفکی واکسینه گردیدند و در این بین در روزهای صفر ، ۷ و ۱۴ بعد از واکسیناسیون اول و روز ۷ بعد از واکسیناسیون دوم (بوستر) از نظر میزان تولید آنتی بادی مورد سنجش قرار گرفتند و نمونه سرم هائی‌که از نظر پاسخ ایمنی هومورال دارای بالاترین میزان تیترآنتی بادی بودند(PI ≥70) به‌عنوان گروه Hi responder و نمونه سرم هائی‌که دارای تیترآنتی بادی پائین تری بودند(PI ≤70) به‌عنوان گروهLow responder انتخاب گردیدند. سلول های PBMC این گروه‌ها، ۲ هفته بعد از آخرین واکسیناسیون(بوستر) از خون محیطی جدا و درحضور میتوژن‌های PHA ، Con A و PW و آنتی ژن اختصاصی جهت بررسی قدرت تکثیر لنفوسیتی ، توسط تستMTT مورد ارزیابی قرار گرفتند . پس از محاسبه شاخص تحریک (SI) گروه‌ها ، مشخص گردید که گروه Hi responder نسبت به گروه Low responder و گروه کنترل میزان تکثیر بالاتری را نشان می دهد ($P<0.05$) که نشان دهنده تحریک و تکثیر مجدد لنفوسیت‌های فعال شده ناشی از واکسن در محیط کشت می‌باشد. مایع رویی حاصل از کشت در روز سوم جدا و جهت بررسی غلظت سایتوکاین‌های IFN-γ , 1L-17, IL-10 , IL-6 , IL-5 , IL-4 , IL-2 مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که گروه Hi responder از نظر , IL-5 , IL-4 , IL-2 IFN-γ و گروه Low responder از نظر IL-6 و IL-17 دارای بیشترین میزان بودند ($P<0.05$) این در حالی است که از نظر IL-10 اختلاف معنی داری بین گروه‌ها نبود. افزایش این نوع سایتوکاین ها در گروه Hi. responder بدان معناست که پاسخ ایمنی نسبت به آنتی ژن واکسن با تحریک سلول‌های Th2 ، به‌سمت ایمنی هومورال سوق می‌یابد در حالی‌که در گروهLow responder پاسخ ضعیف سلول‌های Th2 ، بنا به دلایل نامشخص توسط سلول‌های Th17 مهار شده و در نتیجه در مقابل آنتی ژن‌های واکسن پاسخ ضعیفی در بدن دام ایجاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی :FMDV ، پاسخ ایمنی ، آنتی بادی ، سایتوکاین ، واکسن ، میتوژن

فهرست مطالب

فصل اول:مقدمه..... ۲

فصل دوم : کلیات..... ۵

۱- بخش اول : بیماری تب برفکی..... ۶

۱-۱- اتیولوژی..... ۶

۱-۲- ماهیت بیماری تب برفکی..... ۱۰

۱-۳- پراکنش جهانی تب برفکی..... ۱۰

۱-۴- تکامل سریع و فراگیر آسیایی ، تیپ O ویروس تب برفکی..... ۱۰

۱-۵- وضعیت بیماری و پراکندگی جغرافیائی آن در ایران..... ۱۱

۱-۶- خصوصیات اپیدمیولوژیکی بیماری تب برفکی..... ۱۱

۱-۶-۱- دامهای حساس..... ۱۱

۱-۶-۲- بقاء ویروس..... ۱۱

۱-۷- انتقال بیماری..... ۱۳

۱-۸- الگوهای بیماری..... ۱۳

۱-۹-سیتوپاتولوژی..... ۱۴

۱-۱۰- تشخیص آزمایشگاهی..... ۱۴

۱-۱۱- کنترل بیماری..... ۱۴

۱-۱۲- مراقبت کلنیکی و سرولوژیکی به منظور شناخت تغییرات بیماری و ماهیت سویه‌های درگردش..... ۱۵

۲-بخش دوم : عملکرد سیستم ایمنی در پاسخ به ویروس‌ها و واکسن های ویروسی... ..... ۱۶

۲-۱- پاسخ‌های ایمنی در برابر عفونت ویروسی..... ۱۶

۲-۲-اجزای دستگاه ایمنی..... ۱۶

۲-۳-عملکرد سیستم ایمنی..... ۱۷

۲-۴-مفهوم اختصاصی بودن..... ۱۷

۲-۵-خاطره ایمنی..... ۱۸

۲-۶-نقش پادتن‌ها در ایمنی..... ۱۹

۲-۷-ایمنی در مقابل عفونت مجدد..... ۲۰

۲-۸- پاسخ ایمنی در مقابل ویروس عامل تب برفکی..... ۲۱

۲-۹-ایمن سازی بدن در برابر بیماری‌های ویروسی..... ۲۳

۲-۹-۱-واکسن‌های ساخته شده از ویروس زنده..... ۲۳

۲-۹-۲-ویروس‌های موجود در طبیعت که به صورت واکسن عمل می‌کنند..... ۲۳

۲-۹-۳-واکسن‌های تهیه شده از ویروس‌های تخفیف حدت یافته..... ۲۳

۲-۹-۴-واکسن‌های تهیه شده از ویروس‌های حامل پروتئین‌های ویروسی حاصل از ژن‌های کلون شده..... ۲۳

۲-۹-۵-واکسن‌های سنتزی..... ۲۳

۲-۹-۶-ایمن سازی غیرفعال..... ۲۳

۲-۹-۷-واکسن‌های حاصل از ویروس‌های غیرفعال و یا اجزای ویروسی ۲۳
۲-۱۱- انواع واکسن های موجود بر علیه بیماری تب برفکی ۲۶
۲-۱۱-۱- واکسن Decivac FMD ۲۶
۲-۱۱-۲- واکسن Decivac FMD DOE ۲۷
۲-۱۱-۳- واکسن ALSA Decivac FMD ۲۷
۲-۱۱-۴- واکسن تب برفکی تری والان (ضد تیپ های O ,A, Asia1) ۲۸
۲-۱۱-۵- واکسن تب برفکی تتراوالان (Opan , O2010 , A05 IR, Asia1) ۳۰
۳-بخش سوم : تکنیک های آزمایشگاهی در تشخیص بیماری تب برفکی ۳۱
۳-۱- آزمایشات ویروس شناسی ۳۱
۳-۱-۱- جداسازی ویروس ۳۱
۳-۱-۲- شناسائی ژنوم ویروس تب برفکی ۳۱
۳-۱-۳- تشخیص آنتی ژن ۳۱
۳-۲- آزمایشات سنجش سیستم ایمنی ۳۲
۳-۲-۱- اساس روش های سنجش ایمنی بروش الایزا ۳۲
۳-۲-۲- روش های کشت و سنجش تکثیر سلولی ۳۵
فصل سوم : روش کار ۴۰
۱-۱-امکانات و تجهیزات مورد نیاز ۴۰
۱-۱-۱-آزمایشگاه کشت سلول ۴۰
۱-۱-۲- سایر تجهیزات ۴۰
۱-۱-۳- لوازم مصرفی مورد نیاز ۴۱
۱-۱-۴- کیت و مواد شیمیایی مورد نیاز ۴۱
۱-۲- آماده سازی و تهیه محلولها و محیط‌های کشت ۴۲
۱-۲-۱- بافر فسفات (PBS) ۴۲
۱-۲-۲-معرف رنگی تریپان بلو ٪ ۰/۴ ..... ۴۳
۱-۲-۳- محیط کشت RPMI ۴۳
۱-۲-۴- ال-گلوتامین۲ mM ۴۳
۱-۲-۵-تهیه محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک ۴۳
۱-۲-۶- تهیه محیط کشت حاوی ٪۱۰ FCS ۴۳
۱-۲-۷-تهیه غلظت‌های مختلف میتوژن ها ۴۴
۱-۲-۸- تهیه رقت‌های مختلف واکسن ۴۴
۱-۲-۹- الکل ٪۷۰ ..... ۴۵
۱-۳- انتخاب جمعیت مورد مطالعه ۴۶
۱-۴- شناسایی گاوهای Hi. & Lo. Responder در پاسخ به آنتی ژنهای واکسن تب برفکی ۴۶
۱-۴-۱- خون گیری و واکسیناسیون گوساله‌ها بر ضد بیماری FMD ۴۶
۱-۴-۲- مراحل انجام واکسیناسیون و خون گیری ۴۶
۱-۵- اندازه گیری تیتر آنتی بادی تولید شده بر علیه آنتی ژنهای واکسن تب برفکی به روش الایزا ۴۷
۱-۵-۱- اساس کیت الایزای رقابتی (مهاری) تشخیص آنتی بادی بیماری تب برفکی ۴۷

۱-۵-۲- روش کار ۴۸
۱-۵-۳- محاسبه نتایج ۴۹
۱-۵-۴- تفسیر نتایج ۵۰
۱-۶- خون‌گیری از گاوهای High & Low responder و شاهد ۵۰
۱-۶-۱- روش کار ۵۰
۱-۷- جداسازی سلول‌های تک هسته ای خون محیطی (PBMCs) ۵۰
۱-۷-۱- روش کار ۵۱
۱-۸- شمارش کلی و تعیین درصد زنده بودن (Viability) سلول‌ها ۵۱
۱-۸-۱- روش کار ۵۱
۱-۹- بررسی پولاریزاسیون PBMCs به وسیله میتوژن‌های ConA, PWM و PHA و آنتی ژن اختصاصی ۵۲
۱-۹-۱- روش کلی کشت سلول و انجام تست MTT ۵۲
۱-۱۰- سنجش سایتوکاین‌های مایع رویی حاصل از کشت سلول در پاسخ به میتوژن‌ها و آنتی ژن اختصاصی ۵۴
۱-۱۰-۱- اساس تست Sandwich ELISA برای اندازه گیری سایتوکین ۵۴
۱-۱۰-۲- روش کار ۵۵
۱-۱۱-تحلیل آماری ۵۶
فصل چهارم : نتایج ۵۸
۱-۱-سنجش تیتر آنتی بادی مادری در گوساله‌های به‌دنیا آمده از مادران واکسینه ۵۸
۱-۲-سنجش تیتر آنتی تولید شده ناشی از واکسیناسیون اولیه ۵۸
۱-۳-سنجش تیتر آنتی تولید شده ناشی از واکسیناسیون یادآور (بوستر) ۵۸
۱-۴-انتخاب گروه‌های High & Low responder ۵۸
۱-۵- سنجش پولاریزاسیون PBMCs در پاسخ به میتوژن‌های PHA و PW و Con A و آنتی ژن اختصاصی ۶۴
۱-۵-۱- در پاسخ به آنتی ژن اختصاصی ۶۴
۱-۵-۲- در پاسخ به میتوژن PHA ۶۴
۱-۵-۳- در پاسخ به میتوژن Con A ۶۵
۱-۵-۴- در پاسخ به میتوژن PW ۶۵
۱-۶-سنجش سایتوکاین‌های تولید شده توسط لنفوسیت‌های تحریک شده با میتوژن ها و آنتی ژن اختصاصی ۶۸
۱-۶-۱- اندازه گیری میزان غلظت سایتوکاین ها درپاسخ به آنتی ژن اختصاصی : ۶۸
۱-۶-۲- اندازه گیری میزان غلظت سایتوکاین ها درپاسخ به میتوژن PHA : ۷۳
۱-۶-۳- اندازه گیری میزان غلظت سایتوکاین ها درپاسخ به میتوژن Con A : ۷۴
۱-۶-۴- اندازه گیری میزان غلظت سایتوکاین ها درپاسخ به میتوژن PW : ۷۶
فصل پنجم:بحث ، نتیجه گیری و پیشنهادات ۸۰
فصل ششم : منابع ۸۶
چکیده فارسی ۹۰
چکیده انگلیسی ۹۱

فصل اول

مقدمه

۱ـ مقدمه

بیماری تب برفکی (FMD)[1] یکی از مهمترین بیماریهای مسری و عفونی دام است که از مرزهای جغرافیائی عبور کرده و به سرعت منتشر می گردد و اصطلاحاً فرامرزی است. این قبیل بیماریهای دام در گروه TAD[2] و بیماریهای فرامرزی دسته بندی می گردند. بیماری تب برفکی یک بیماری ویروسی به شدت مسری است که با سرعت و به شکل غیر منتظره در سطح ملی و بین المللی منتشر می گردد. با وجود پائین بودن میزان تلفات حاصل از این بیماری در دامهای بالغ، عواقب اقتصادی و اجتماعی مربوطه شامل کاهش شدید تولیدات دامی و ایجاد موانع صادراتی و تجارتی وحشتناک و واقعاً فلج کننده است (Viliam et al.,2010).

سازمان بهداشت جهانی دام (OIE)در کتاب قانون بین المللی بهداشت دام، تب برفکی را جزء بیماریهای فهرست A قلمداد نموده است و تعریف زیر را از این بیماریها ارائه نموده است : بیماریهای مسری که از توان بالقوه گسترش سریع و شدید بدون توجه به مرزهای بین المللی و از اهمیت فراوان در زمینه اجتماعی ـ اقتصادی و بهداشت عمومی و عرصه تجارت بین المللی در زمینه دام و محصولات دامی برخوردارند (Viliam et al.,2010).

از طرفی کشور ما در منطقه جغرافیایی خاصی قرار دارد ، به طوریکه در همه کشورهای همسایه ما بیماری تب برفکی بومی است . از طرف دیگر ، به علت ورود و تردد مداوم دام در مرزهای شرقی و غربی و حتی شمالی کشورمان ، همیشه احتمال ورود بیماری از کشورهای همسایه وجود دارد. دفع مقدار زیادی ویروس به محیط توسط این دامها می تواند باعث افزایش ویروس در محیط گردد و با افزایش ویروس در محیط ، سد ایمنی در دام های بومی شکسته و دام های بومی نیز بیمار شوند هم چنین با افزایش رشد و تکثیر ویروس ، ممکن است تغییرات ژنتیکی در ویروس ایجاد شود و سویه‌های جدیدی از ویروس ظاهر گردد.

اگر چه در خیلی از موارد تزریق واکسن از همه گیریها جلوگیری کرده است اما مواردی نیز وجود دارد که به دلایل مختلف ویروس از سد ایمنی گذشته و باعث همه گیری‌های شدید گردیده است . به طور نمونه گزارشاتی از این نوع در عربستان گزارش شده است که با وجود تزریق واکسن ، حدود یک ماه بعد از واکسیناسیون ویروس وارد گله شده و درصد قابل توجهی از دامها ، مبتلا به بیماری شده اند و حتی تزریق واکسن دوباره نتوانسته است جلو بروز بیماری در گله‌های سالم را بگیرد . بررسی کنندگان چند دلیل برای آن ذکر نموده اند:

اول : مقدار ویروس در محیط زیاد بوده و توانسته است بر ایمنی غالب آید .

[1] Foot and Mouth Disease
[2] Trans boundary Animal Diseases

دوم:در هنگام تزریق واکسن تعداد زیادی دام با علایم تحت بالینی در گله وجود داشته اند و به آلودگی محیط ادامه داده اند و با افزایش ویروس در محیط در نهایت بیماری بالینی در دام‌ها ظاهر شده است.

سوم: مشکلات ناشی از تولید واکسن و عدم ایجاد یک ایمنی محافظت کننده در برابر ویروس زنده

چهارم : وجود سروتیپ‌ها و سویه‌های متفاوت در منطقه

در ایران و سایر کشورها نیز اتفاقات مشابه کم نبوده اند ، اما متاسفانه تا به حال علت آنها به دقت بررسی و تجزیه و تحلیل نشده است.

در این مطالعه با راهنمایی‌های اساتید گرانقدر و مقالات علمی منتشر شده برآن شدیم که به صورت کلی و بنیادی ، عملکرد و پاسخ‌های سیستم ایمنی گاو در ارتباط با واکسن تب برفکی را بررسی نماییم. چرا که در این زمینه به استناد مقالات علمی و معتبر در ایران ، تحقیق جامعی صورت نگرفته بلکه فقط به بررسی اثرات یک واکسن در بدن دام ، تعیین تیتر ایمنی زای یک واکسن ، قدرت خنثی کنندگی آنتی بادی در مواجهه با ویروس و یا به تکثیر و تعیین فنوتایپ سلول‌های ایمنی پرداخته اند.

بنابراین در این مطالعه ، در سه مرحله به بررسی عملکرد سیستم ایمنی در پاسخ به آنتی ژن‌های اختصاصی ویروس کشته شده تب برفکی پرداخته خواهد شد به طوریکه در **مرحله اول** ابتداء گروه تیمار دو بار با فاصله یکماه توسط واکسن تتراوالان تب برفکی مورد واکسیناسیون قرار خواهدگرفت و سپس با توجه به تیتر آنتی بادی بوجود آمده ناشی از واکسن ، گروه‌های پاسخ دهنده قوی (High responder) و پاسخ دهنده ضعیف (Low responder) از بین گله انتخاب خواهد گردید ، در **مرحله دوم** پولاریزاسیون لنفوسیت‌های خون محیطی در گروه‌های Hi. responder و Lo. responder در مجاورت با میتوژن‌های PW[1] , PHA[2] , Con A[3] و همچنین آنتی ژن اختصاصی مورد بررسی قرار خواهدگرفت و در **مرحله سوم** سایتوکاین‌های ترشح شده در مایع رویی کشت سلولی ناشی از تحریک سلولی توسط میتوژن و آنتی ژن اختصاصی مورد بررسی و مقایسه قرار خواهد گرفت.

از مهمترین اهداف این مطالعه می توان به موارد زیر اشاره کرد :

- ارزیابی کلی سیستم ایمنی بدن گاوان قبل و بعد از واکسیناسیون
- بررسی قدرت تکثیر سلول‌های ایمنی در پاسخ به آنتی ژن اختصاصی
- بررسی قدرت عرضه آنتی ژن در سلول‌های ایمنی
- بررسی قدرت ایمنی زایی واکسن ها
- بررسی علل کوتاه بودن دوره ایمنی واکسن
- بررسی عدم پاسخ سیستم ایمنی به آنتی ژن‌های واکسن

[1] Pokeweed
[2] Phytohemagglutinin
[3] Concanavalin A

- بررسی علل شکست واکسیناسیون

و از مهمترین کاربردهای این مطالعه می توان به موارد زیر را اشاره کرد :

- بهره وری در افزایش کیفیت واکسن
- تغییر سیاست‌های سازمانی در برنامه‌های کنترل و پیشگیری بیماری (واکسیناسیون)
- انتخاب واکسن مناسب از میان واکسن های موجود در ایجاد تیتر ایمنی موثر در مواجهه با ویروس زنده
- تعیین Baseline کشور در ارتباط با واکسن های موجود

فصل دوم

کلیات

۱- بخش اول : بیماری تب برفکی

۱-۱- اتیولوژي

ویروس تب برفکی از جنس آفتوویروس[۱] و از خانواده پیکورناویریده[۲] است. یا به عبارتی از گروه ویروسهای کوچکی هستند که پوشش لیپیدی ندارند و شکل آنها بیست وجهی و تقریباً کروی است. همچنین از یک مولکول ریبونوکلئیک اسید (RNA) تک رشته ای از نوع رشته مثبت[۳] و ۶۰ نسخه از چهار پلی پپتید ساختمانی تشکیل شده است.

قطر ویروس حدود ۳۰ نانومتر وژنوم آن دارای حدود ۸۳۰۰ نوکلئوتید و ۱۲ ژن برای تولید پروتئین است . از ۱۲ پروتئین که ژن آن در ژنوم ویروس وجود دارد ، چهار پروتئین در تشکیل کپسید (پوشش پروتئینی) ویروس نقش دارد که به این پروتئین ها ، پروتئین‌های ساختاری[۴] (SP) می گویند . هشت پروتئین دیگر که در ساختار پوشش پروتئینی ویروس شرکت نمی کنند و شامل آنزیم های مورد نیاز برای تکثیر و همانند سازی ویروس هستند، پروتئین‌های غیرساختاری[۵](NSP) گفته می شوند.

چهار ملکول پروتئینی که کپسید از آنها ساخته می‌شود و تحت عنوان پروتئین‌های ساختاری خوانده می شوند به نام پروتئین‌های ویروسی[۶] شماره ۱ تا ۴ (VP1 , VP2 , VP3 , VP4) نام گذاری شده اند . به ژن‌های این پروتئین ها به ترتیب 1A , 1B , 1C , 1D می گویند.

از میان آنها پلی پپتید VP1 شامل شاخص های آنتی ژنتیکی مهمی است که در تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی بادی خنثی کننده در دامهای حساس نقش بسزائی دارد و پلی پپتید ایمونوژن نامیده می‌شود(Viliam et al.,2010 , Rasouli beirami et al.,2010).

در حال حاضر ۷ سروتایپ مختلف ویروس تب برفکی وجود دارد که عبارتند از :

A , O , Asia 1 , C , SAT1 , SAT2 , SAT3 . تمام این سروتایپ های تب برفکی می‌توانند بیماری را بشکلی ایجاد نمایند که از نظر درمانگاهی غیر قابل تفکیک ولی از نظر ایمنی شناختی با یکدیگر متفاوت هستند. هیچ گونه ایمنی متقاطع بین سروتایپها وجود ندارد و در آزمایشات سرولوژیکی و تشخیصی سروتایپها توسط آزمایشات الایزا[۷](ELISA) و تثبیت کمپلمان[۸](CFT) و خنثی سازی ویروس[۹](VNT) قابل تفکیک هستند. در هر سروتیپ، طیفی از اختلافات آنتی ژنتیکی و در میان

[1] Aphtovirus
[2] Picornaviride
[3] Positive strand RNA(+RNA)
[4] Structural proteins
[5] Non Structural proteins
[6] Viral protein
[7] Enzyme linked immunosorbent assay
[8] Complement fixation test
[9] Viral neutralization test

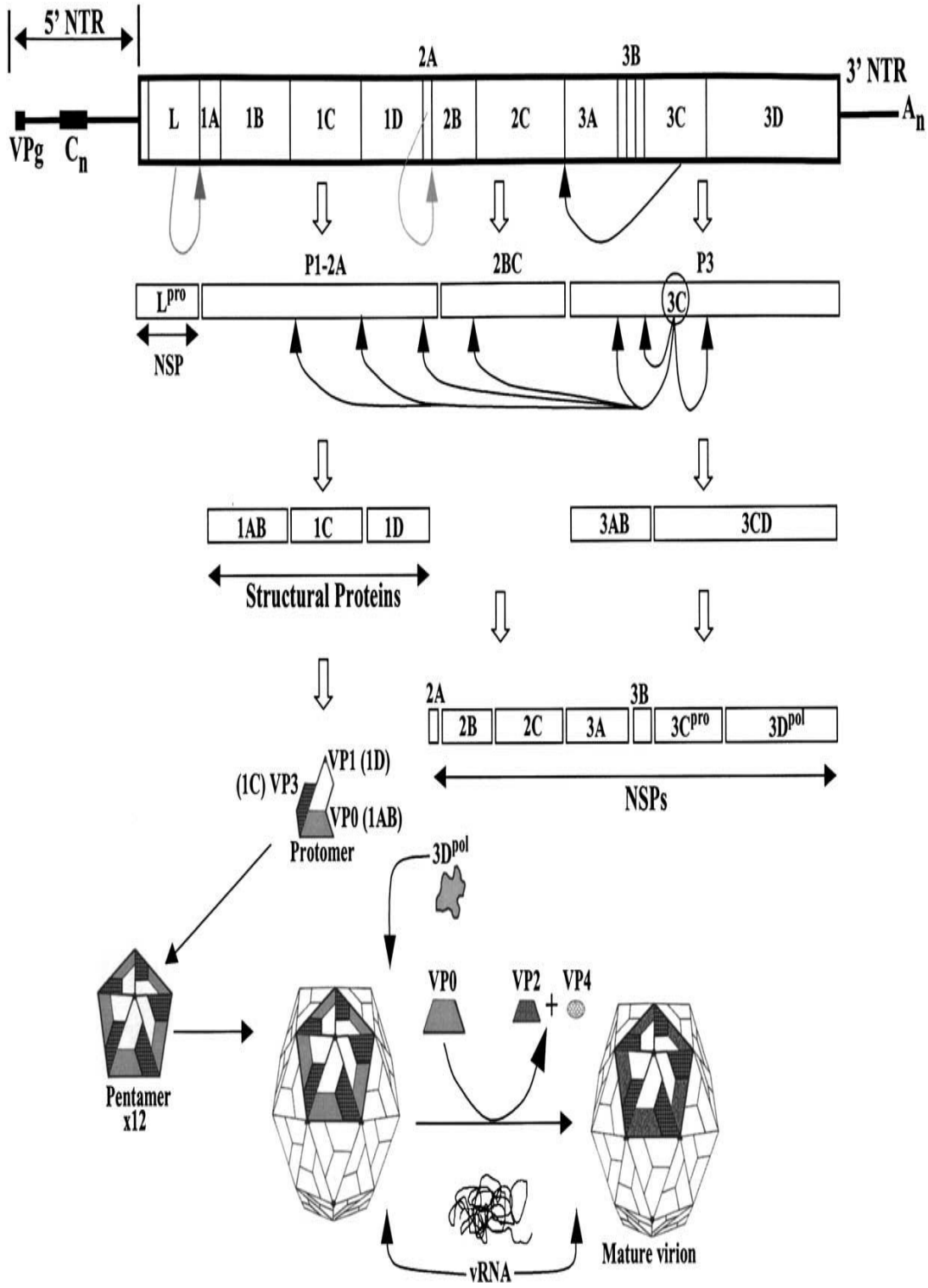
سویه‌های با ارتباط نزدیک و دور با یکدیگر وجود دارد. آنالیز سویه‌های ویروس تب برفکی با توجه به ویژگی‌های ژنتیکی و آنتی ژنتیکی ، در مطالعات اپیدمیولوژیکی برای انتخاب بهترین و مؤثرترین سویه‌های واکسن در کشورهائی که سیاست کنترل بیماری را با انجام واکسیناسیون پایه ریزی می نمایند، وجود دارد .

همان طور که گفته شد بیشترین تغییرات آنتی ژنتیکی در تیپ A ویروس تب برفکی دیده می‌شود. ویروس تب برفکی نسبت به محیطهای اسیدی و بازی حساس است و در pH های کمتر از ۴ و بیشتر از ۱۱ غیر فعال و کشته می شوند و در pH ۷/۴ تا ۷/۶ از پایداری بیشتری برخوردار است. اختلافات میان سویه ای در خصوص مقادیر متوسط و میانگین وجود دارد ولی مهمترین عامل تعیین کننده دما است. ویروسهای تب برفکی می‌توانند عفونت زائی خود را در pH بین ۹/۵ ـ ۶/۷ در ۴ درجه سانتیگراد یا پائینتر حفظ نمایند ولی با بالا رفتن درجه حرارت میزان عفونت زائی این طیف تغییر می یابد.

تأثیر درجه حرارت محیط بر عفونت زائی ویروس تب برفکی بستگی به ترکیب مواد موجود در محیط دارد به طوریکه ویروس تب برفکی می‌تواند در محیطهای حاوی مواد آلی به مدت زیادی دوام آورده و غیر فعال نشود. ویروس تب برفکی در درجه حرارت زیر صفر و شرایط انجماد به طور نامحدودی زنده باقی می ماند. حتی در شرایط ۴ درجه و در محیطهای ساده ویروس تب برفکی تا بیشتر از یک سال عفونت زائی خود را حفظ می‌نماید. سوسپانسیون تهیه شده ویروس در درجه حرارت معمولی محیط (درجه ۲۲) بین ۸ تا ۱۰ هفته و در درجه حرارت ۳۷ درجه تا ۱۰ روز خاصیت عفونت زائی خود را حفظ می کند و در درجه حرارتهای بالاتر به سرعت غیرفعال می شود. به طور مثال درجه حرارت ۵۶ درجه به مدت ۳۰ دقیقه جهت غیر فعال نمودن اکثر سویه‌های ویروس تب برفکی کافی می باشد.

نور خورشید تأثیر کمی در غیر فعال شدن ویروس دارد و به طور کلی غیر فعال شدن ویروس در شرایط محیطی بستگی به میزان رطوبت (رطوبت نسبی کمتر از٪۶۰) و درجه حرارت دارد. ترکیبات اسیدی و قلیایی مؤثرترین مواد برای ضدعفونی سازی هستند (Viliam et al.,2010).

در شکل زیر ساختار مرفولوژیک (کپسید) و ژنومی ویروس جهت مطالعات بیشتر ترسیم گشته است.


5' NTR
2A
3B
3' NTR
L
1A
1B
1C
1D
2B
2C
3A
3C
3D
VPg
C_n
A_n
P1-2A
2BC
P3
L^{pro}
3C
NSP
1AB
1C
1D
3AB
3CD
Structural Proteins
2A
3B
2B
2C
3A
$3C^{pro}$
$3D^{pol}$
NSPs
VP1 (1D)
(1C) VP3
VP0 (1AB)
Protomer
$3D^{pol}$
VP0
VP2
VP4
Pentamer
x12
vRNA
Mature virion

Functions of FMDV non-structural proteins

L Host protein synthesis shutoff
Protease cleavage
2A Protein cleavage (polypeptide)
2B Alteration of membrane permeability inhibition
of cellular exocytosis
Dissociation/rearrangement of endoplasmic
reticulum and Golgi
RNA amplification
2C Formation of vesicles
NTPase
Virus encapsidation
Direct replication complexes to cell membrane
RNA binding in RNA replication (as 2BC)
Increase membrane permeability (as 2BC)
3A Inhibition of MHC class I expression
Association with intracellular membranes
Inhibition of intracellular membrane transport
Inhibition of cellular protein secretion
Virus interaction with host cells and host range
3B Primer for RNA synthesis
Covalent linkage to 50 end of positive and
negative strands
Membrane association of replication complexes
(as 3AB)
Stimulation of 3Dpol (as 3AB)
Stimulation of 3CD autocleavage (as 3AB)
3C Viral protein processing
Host protein cleavage
Host protein synthesis shutoff
Transcription inhibition
RNA binding in RNA replication
Stimulation of VPg uridylylation
3D VPg uridylylation
RNA-dependent RNA polymerase
Stimulation of RNA synthesis
RNA binding

۱-۲- ماهیت بیماري تب برفکي

تب برفکی یک بیماری ویروسی به شدت مسری دامهای زوج سم است. اگرچه تلفات آن در دامهای بالغ کم است و بندرت اتفاق می افتد ولی در دامهای جوان بخصوص بره و بزغاله تلفات قابل توجهی دارد و از همه مهمتر خسارات بسیار شدید اقتصادی و اجتماعی ناشی از کاهش تولیدات دام و کاهش بهره‌وری دام را به همراه دارد و صادرات دام و فراورده‌های آن را متوقف می‌سازد (Viliam et al.,2010).

۱-۳- پراکنش جهاني تب برفکي[1]

تب برفکی با میزان شیوع متفاوت در بسیاری از کشورهای آفریقا، خاورمیانه، آسیا و بخشهائی از کشورهای آمریکای جنوبی ، بومی می باشد. و از طرفی اروپا، آمریکای شمالی و مرکزی، کشورهای اقیانوسیه و کارایئب از بیماری پاک شده اند. طی دهه گذشته پراکنش سروتایپ های مختلف که گزارش شده اند بشرح زیر می باشد :

- **تایپ O** : آسیا، بخشهائی از آفریقا و آمریکای لاتین (جنوبی) و اخیراً کشور انگلستان و بخشهائی از اروپای غربی (اپیدمی سال ۲۰۰۱ ـ ۲۰۰۰).
- **تایپ A** : آسیا، قسمتهائی از آمریکای جنوبی و آفریقا.
- **تایپ Asia** : آسیا و کشورهای جنوب شرقی اروپا (گرجستان، ارمنستان و .....).
- **تایپ SAT 1** : آفریقا و کشورهای غربی حوزه خلیج فارس.
- **تایپ SAT 2**: آفریقا و کشورهای حوزه خلیج فارس.
- **تایپ SAT 3** : کشورهای جنوب آفریقا.
- **تایپ C** : کشورهای جنوب آسیا و شرق آفریقا (Viliam et al.,2010).

۱-٤- تکامل سریع و فراگیر آسیایي ، تیپ O ویروس تب برفکي

تکامل سریع و فراگیر ویروس تیپ O در سالهای اخیر مثال خوبی است که بیانگر قدرت بیماریزائی و انتشار غیر منتظره و ناگهانی ویروس تب برفکی در سطح جهانی است. این تیپ ویروس تب برفکی ابتدا در سال ۱۹۹۰ در شمال هند شناسائی گردید و سپس در سال ۱۹۹۳ در نپال و در سال ۱۹۹۴ از عربستان سعودی جدا شد و در خلال همین مدت در اکثر کشورهای خاورمیانه پخش و منتشر گردید. سپس در سال ۱۹۹۶ در قسمتهای غربی ترکیه، بلغارستان و یونان و در سال ۲۰۰۰ پس از ده سال از روسیه، مغولستان، جمهوری کره و ژاپن جدا شد و نهایتاً در سال ۲۰۰۱ به کشورهای انگستان، فرانسه، ایرلند، هلند و (قاره اروپا) رسید و اپیدمی شدیدی همراه با خسارات اقتصادی هنگفتی را ایجاد نمود. (فقط در انگلستان ۱۱ میلیون پوند خسارات اقتصادی مستقیم همراه با توقف صادرات به صورت موقت را برجا گذاشت)(Rasouli Beirami et al.,2010).

[1] World Distribution

۱-۵- وضعیت بیماري و پراکندگي جغرافیائي آن در ایران

در ایران سه سوش Asia1 , O ,A عمده ترین ویروسهای مولد تب برفکی هستند و در بین آنها سوشهای A و O حدود ۵۰ سال در گردش بوده ولی سوش Asia 1 پایداری و ثبات کمتری داشته و در مواقعی از زمان محو و مجدداً بروز نموده است .سویه Asia 1 طی سالهای ۱۳۶۹ تا ۱۳۷۸ یعنی حدود ۱۰ سال در موارد بروز بیماری تب برفکی در کشور شناسائی و تشخیص داده نشد ولی از مرداد سال ۱۳۷۸ مجدداً ظهور و هم چنان جزء سه تیپ اصلی ویروسهای بیماری تب برفکی در کشور در حال چرخش می باشد.(Rasouli Beirami et al.,2010)

۱-٦- خصوصیات اپیدمیولوژیکي بیماری تب برفکي

۱-٦-۱- دامهاي حساس

حیوانات اهلی شامل گاو، گاومیش، گوسفند، بز، خوک و گوزن به بیماری تب برفکی حساس هستند. بیماری معمولاً با شدت وحدت بیشتری در گاو و خوک بروز می کند. خانواده شترسانان شامل شتر و لاما حساسیت کمی به این ویروس دارند زوج سمان وحشی به بیماری حساس هستند و موارد بیماری بطور نادر در فیل، خارپشت و برخی جوندگان ثبت گردیده است. گاومیش های آفریقائی (Sunce rus Caffer) معمولاً به سروتیپهای (SAT) مبتلا می شوند اگرچه بروز ضایعات کلینیکی در آنها نادر است.

بعضی از سویه‌های تب برفکی تمایل محسوسی برای برخی از گونه‌های دامی دارند و بطور مثال می توان از سروتایپ O خوکی (Porcinophilic) نام برد که در سالهای اخیر در قسمتهای شرقی آسیا در حال چرخش است . ابتلاء انسان به بیماری تب برفکی اگرچه گزارش شده است ولی بسیار نادر و خفیف می‌باشد. با این وجود فرد می تواند ویروس را برای بیش از ۲۴ ساعت بدون آنکه هیچگونه علایم بالینی را ظاهر سازد در دستگاه تنفس خود حفظ نماید (Viliam et al.,2010).

۱-٦-۲- بقاء ویروس[1]

ویروس تب برفکی در محیط به شرطی که دور از خشکی، حرارت و شرایط نامساعد pH باشد عفونت زائی خود را حفظ می نماید. مدت زمان بقاء و زنده ماندن ویروس در شرایط مختلف به شرح زیر است:

۱. ۵۰ روز در آب،
۲. ۷۴ روز در مرتع با دمای ۱۸-۸ درجه و رطوبت نسبی مناسب،
۳. ۴ هفته بر روی مو گاو آلوده به ترشحات و خون آلوده،
۴. ۱۳ هفته بر روی چکمه آلوده به ترشحات و خون،
۵. تا ۳۵۲ روز در پوست تازه نمک سود شده که در دمای ۴ درجه نگهداری می شود،

[1] In the Environed

۶. بمدت ۱۴ روز در فضولات خشک شده دام (پهن و کود)،
۷. بمدت ۶ ماه در لجن در فصل زمستان،
۸. بمدت ۲۸ روز در خاکهای سطحی در فصل پائیز،
۹. به مدت ۳ روز در خاکهای سطحی در فصل تابستان،
۱۰. ۳۹ روز در ادرار عفونت زائی خود را حفظ نماید،

این مشاهدات در کشورهائی انجام شده اند که دمای معتدلی دارند و طبیعی است که زمانهای اشاره شده در بالا در کشورهای گرم کوتاهتر خواهد بود. در بدن میزبان، دستگاه تنفس مهمترین راه ابتلاء نشخوارکنندگان است و تعداد اندک ویروس می‌تواند سبب آغاز عفونت گردد. ویروس تب برفکی هم چنین می‌تواند از راه خراشیدگی های جلدی یا مخاطات در نتیجه جراحات ناشی از مصرف دانه‌ها، علوفه خشبی، گندیدگی سم، ترومای ناشی از ماشین شیردوشی یا ناخنها هنگام مهار گاو به شیوه دماغ گیری انتقال یابد.

بعد از استنشاق ذرات بسیار کوچک حاوی ویروس تب برفکی ، بواسطه حرکات مژه‌ها به ناحیه حلقی وارد می شوند و متعاقب تکثیر و تزاید اولیه در این ناحیه وارد سیستم لنفاوی می گردند. در مرحله بعد ویروس از طریق جریان خون به بافتهای ثانویه شامل غدد لنفاوی غده‌ها، بافتهای اپی تلیوم اطراف دهان، پاها و پستانها در دام ماده وارد می شود. واژن و حشفه نیز ممکن است مورد حملهٔ ویروس قرار گیرد. در دامهای جوان نیز عضلات قلب به عنوان هدف ثانویه مورد هجوم ویروس قرار می گیرند.

ویروس تب برفکی به مقدار زیاد همراه هوای بازدمی در محیط اطراف دام پخش و منتشر می شود. همچنین در تمام ترشحات و مواد دفعی از جمله شیر و اسپرم و همچنین وزیکولهای ترکیده وجود دارد. خوک مقادیر بسیار زیادی ویروس تب برفکی را (۳۰۰۰ بار) بیشتر از گاو در هوا منتشر می کند.

دفع ویروس تب برفکی از ترشحات دام تا ۴ روز قبل از مشاهده شدن علائم درمانگاهی آغاز می شود که از نظر اپیدمیولوژیکی بسیار حائز اهمیت است. پخش و انتشار ویروس تب برفکی ۴ تا ۶ روز پس از پیدایش وزیکولها ادامه داشته و دامهای مبتلا مقادیر بسیار زیادی ویروس را به محیط اطراف پخش می نمایند. پخش ویروس تب برفکی در دامهای مبتلا پس از پیدایش آنتی بادی خنثی کننده متوقف می شود.

حضورویروس تب برفکی در بافت اپی تلیال دست و پا یک تا دو روز بیشتر از بافتهای دهان تداوم می یابد. بنابراین ضایعات و جراحات سم در مواردی که نمونه برداری دیر انجام می گیرد نمونهٔ بهتری را از جراحات دهان جهت تشخیص این بیماری بدست می دهد. ویروس تب برفکی از گاوهائیکه به روش تجربی آلوده شده بودند به مدت ۲۶ روز از شیر و ۵۶ روز از اسپرم جدا گردیده است.

بعد از بهبود علائم درمانگاهی، ٪۸۰ دامهای نشخوارکننده ممکن است بصورت حامل ویروس باقی بمانند. این وضعیت تحت عنوان حامل[1] نامیده می‌شود و به حمل ویروس بیش از ۲۸ روز بعد از ابتلاء

[1] Carrier