دانشگاه پیام نور

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در

رشته بیوشیمی

دانشکده علوم

عنوان پایان نامه

خالص سازی آنتی ژن S١٤٦ ویروس تب برفکی سروتیپ O

استاد راهنما

جناب آقای دکتر سعید زیبائی

استاد مشاور

جناب آقای دکتر مسعود صالح مقدم

نگارش

ملیحه زندی کریمخانی

مهرماه ١٣٨٩

تقدیم به :

پدر بزرگوارم

مادر زیبایم
از این که مادرم بودی و در به ثمر رسیدنم از هیچ کوششی دریغ نورزیدی .

یگانه برادرم علی
که قلبی به وسعت اقیانوس ها دارد و در تمام دوران زندگی ام از هیچ محبتی بی نصیبم نکرد .

خواهران مهربانم مریم و مینا
که در لحظه لحظه دوران تحصیلم مرا همراهی کردند .

جناب آقای علی شاهی
بخاطر لطف های بی دریغش که هرگز فراموش نمی کنم .

و تمامی کسانی که از صمیم قلب دوستشان دارم .

سپاس و قدردانی :

ستایش و سپاس آفریدگاری که بر تن نیستی خلعت هستی پوشاند و جان را به دانش و حکمت بیارائید . پروردگاری که دانه را شکافت و آسمان را ستارگان بیاراست . به اراده او صبا پرده گل بشکافاند و باد گیسوی شمشاد بجنباد و ماه بر زمین پرتو افشاند .

به رسم ادب

به رسم عاطفه

در اینجا بر خود واجب می دانم مراتب قدردانی خود را نسبت به اساتید ارجمندی که افتخار دانشجویی شان و دوستان عزیزی که افتخار آشنایی شان را داشتم ، ابراز نمایم :

بی شائبه ترین سپاس خویش را حضور جناب آقای دکتر سعید زیبائی که در تمام دوران کاری و تحصیل با زحمات فراوان و سخنان گرم شان مرا یاری دادند ، نثار می کنم .

از جناب آقای دکتر جعفر نویدمهر که داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند کمال تقدیر و تشکر دارم.

از جناب آقای دکتر مسعود صالح مقدم که مشاوره این پایان نامه را بر عهده گرفتند کمال تقدیر و تشکر دارم.

از جناب آقای دکتر محسن فتحی نجفی که از راهنمایی های ایشان در طی انجام این پایان نامه بهره بردم کمال تقدیر و تشکر دارم.

از دوست بسیار مهربانم سرکار خانم سمیه بهمن پور که در طی انجام این پایان نامه از هیچ کوششی دریغ ننمودند کمال تقدیر و تشکر دارم.

از جناب آقای علی اسحاقی و جناب آقای یاسر پیمان فر و سرکار خانم مجیدی بخاطر همکاری صمیمانه شان در انجام کار آزمایشگاهی کمال تشکر دارم .

چکیده

بیماری تب برفکی (FMD) یک بیماری حاد ویروسی و کاملاً مسری در میان حیوانات زوج سم است .

عامل مولد بیماری ویروسی تب برفکی یکی از اعضای خانواده بزرگ پیکورناویریده و جنس آفتوویروس که دارای هفت سروتیپ A ، O ، C ، Asia 1 ، SAT1 ، SAT2 ،SAT3 می باشد . ویروس عامل تب برفکی ویروسی کروی ، حامل ژنوم RNA مثبت تک رشته ای می باشد. .

تشخیص به موقع ویروس در مواقع شیوع بیماری از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است . یکی از را ههای تشخیص که هم اکنون در آزمایشگاهات رفرنس مورد استفاده قرار می گیرد آزمایش ساندویچ الیزای غیر مستقیم جهت شناسایی ویروس می باشد .

در این تحقیق از آنتی ژن S ١٤٦ (ویروس کامل) استفاده گردید که ذرات ١٤٦S حاوی یک مولکول RNA ویروسی و ٦٠ کپی از هر ٤ پروتئین ساختاری VP_{1-4} می باشد . به طوری که پروتئین VP4 به صورت درونی و پروتئین های VP_{1-3} در سطح کپسید قرار گرفته اند .

جهت خالص سازی ویروس تب برفکی سروتیپ O با استفاده از روش های گرادیان ساکارز (٢٠-٥٠٪) ، کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون G-100 و کروماتوگرافی تبادل یونیCM– Sephadex گردید . مراحل آماده سازی ویروس که شامل مرحله تغلیظ با استفاده از پلی اتیلن گلیکول ٦٠٠٠ ، مرحله چربی زدایی با استفاده از تری کلرو اتیلن ، مرحله سانتریفوژ اولیه و در نهایت شستشوی رسوب با استفاده از تریس ٠/٠٥ مولار صورت گرفت .

در این تحقیق اندازه گیری میزان پروتئین با استفاده از روش برادفورد و دستگاه نانودراپ و دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفته شده است .

جهت بررسی میزان خلوص نمونه های حاصل شده از روش های گرادیان ساکارز ، کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تبادل یونی از روش SDS-PAGE و همچنین جهت تأیید حضور آنتی ژن ١٤٦S در سرم حاوی آنتی بادی اختصاصی بر علیه آنتی ژن١٤٦S از روش Dot Blot استفاده گردید .

واژه های کلیدی : خالص سازی ، ویروس تب برفکی سروتیپ O ، آنتی ژن ١٤٦S

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول – کلیات

۱- کلیات ۱
۱-۱- مقدمه ۱
۱-۲- تاریخچه ٦
۱-۳- تاریخچه بیماری تب برفکی در ایران ۷
۱-٤- ویروس تب برفکی ۸
۱-٤-۱- طبقه بندی ویروس تب برفکی ۸
۱-٤-۲- خصوصیات خانواده پیکورنا ویریده ۸
۱-٤-۳- ساختمان شیمیایی ویروس تب برفکی ۱۱
۱-٤-۳-۱- ژنوم ویروس تب برفکی ۱۱
۱-٤-۳-۲- ساختار کپسید ویروس تب برفکی ۱٤
۱-٤-۳-۳- پروتئین های ساختمانی ویروس تب برفکی ۱۵
۱-٤-۳-۳-۱- خصوصیات پروتئین VP_1 ..... ۱۵
۱-٤-۳-۳-۲- خصوصیات پروتئین VP_2 ..... ۱۵
۱-٤-۳-۳-۳- خصوصیات پروتئین VP_3 ..... ۱٦
۱-٤-۳-۳-٤- خصوصیات پروتئین VP_4 ..... ۱٦
۱-٤-۳-٤- پروتئین های غیر ساختمانی ویروس تب برفکی ۱٦
۱-٤-٤- همانندسازی ویروس تب برفکی ۱۸
۱-٤-٤-۱- مرحله اتصال ۱۸
۱-٤-٤-۲- مرحله نفوذ ۱۸
۱-٤-٤-۳- مرحله بدون پوشینه شدن ۱۸
۱-٤-٤-٤- مرحله ترجمه RNA ویروس ۱۹
۱-٤-٤-۵- مرحله تکثیر ویروس ۲۰

۱-٤-٤-٦- مرحله گردهمایی ۲۱
۱-٤-٤-۷- مرحله جاسازی ژنوم داخل کپسید خالی ۲۲
۱-٤-٤-۸- مرحله آزاد شدن ویروس ۲۲
۱-٤-٥- طرز ایجاد بیماری تب برفکی ۲۲
۱-٤-٦- راههای انتقال بیماری تب برفکی ۲۳
۱-٤-۷- راههای گسترش بیماری تب برفکی ۲٤
۱-٤-۷-۱- دوره کمون بیماری تب برفکی ۲٤
۱-٤-۸- آسیب شناسی ۲٤
۱-٥- بقاء ویروس تب برفکی ۲٥
۱-٦- نشانی های بیماری تب برفکی ۲٥
۱-٦-۱- نشانی های بالینی در گاو ۲٥
۱-٦-۲- نشانی های بالینی در خوک ۲٦
۱-٦-۳- نشانی های بالینی در گوسفند و بز ۲٦
۱-٦-٤- تب برفکی در انسان ۲٦
۱-۷- ایمنی در تب برفکی ۲٦
۱-۸- حاملین در بیماری تب برفکی ۲۷
۱-۹- کنترل بیماری تب برفکی ۲۸
۱-۱۰- واکسیناسیون ۲۸
۱-۱۱- تشخیص ۲۸
۱-۱۱-۱- جداسازی ویروس ۲۹
۱-۱۱-۱-۱- کشت سلولی ۲۹
۱-۱۱-۱-۲- حیوانات آزمایشگاهی ۳۰
۱-۱۱-۲- آزمایش تثبیت عامل مکمل ۳۰
۱-۱۱-۳- آزمایش الایزا ۳۱
۱-۱۲- آنتی ژن ۳۱
۱-۱۲-۱- آنتی ژن های چند ظرفیتی یا پلی والان ۳۱
۱-۱۲-۲- ایمنی زایی ۳۱
۱-۱۲-۳- شاخص های آنتی ژنیک یا اپی توپ ها ۳۳

۱ -۱۲-٤- پاراتوپ ۳٤
۱-۱۲-٥- هاپتن ها ۳٤
۱-۱۲-٦- پروتئین حامل ۳٤
۱-۱۲-۷- واکنش متقاطع ۳٤
۱-۱۲-۸- تقسیم بندی آنتی ژن ها ۳٤
۱-۱۲-۸-۱- تقسیم بندی آنتی ژن ها بر اساس منشأ آنها ۳٤
۱-۱۲-۸-۲- تقسیم بندی آنتی ژن ها بر اساس ماهیت بیوشیمیایی ۳٥
۱-۱۲-۹- آنتی ژن های ویروس تب برفکی ۳۷
۱-۱۲-۹-۱- ذرات با ضریب سدیمانتاسیون ۱٤٦S ۳۷
۱-۱۲-۹-۲- ذرات با ضریب سدیمانتاسیون۷٥S ۳۸
۱-۱۲-۹-۳- ذرات با ضریب سدیمانتاسیون۱۲S ۳۸
۱-۱۲-۹-٤- ذرات با ضریب سدیمانتاسیون۳/۸S ۳۹
۱-۱۳- اولتراسانتریفوژ ۳۹
۱-۱۳-۱- سانتریفوژ ۳۹
۱-۱۳-۲- ته نشینی تحت گرادیان دانسیته ٤۱
۱-۱٤- کروماتوگرافی ٤۲
۱-۱٤-۱- پارامتر های دخیل در کروماتوگرافی ٤۲
۱-۱٤-۲- کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ٤٤
۱-۱٤-۳- کروماتوگرافی تمایلی ٤٦
۱-۱٤-٤- کروماتوگرافی تمرکزی ٤٦
۱-۱٤-٥- کروماتوگرافی تعویض یونی ٤۷
۱-۱٥- دیالیز ٤۷
۱-۱٦- الکتروفورز ٤۷
۱-۱٦-۱- الکتروفورز عمودی ٤۸
۱-۱٦-۲- الکتروفورز افقی ٤۸
۱-۱٦-۳- SDS-PAGE ٤۸
۱-۱٦-۳-۱- نقش سدیم دو دسیل سولفات ٤۹
۱-۱٦-۳-۲- کاتالیزورهای پلیمریزاسیون ٤۹

۱-۱٦-۳-۳- آماده سازی نمونه ٤٩
۱-۱۷- تعیین غلظت پروتئین ٥٠
۱-۱۷-۱- روش بیوره ٥٠
۱-۱۷-۲- روش میکروبیوره ٥١
۱-۱۷-۳- روش جذب UV ٥١
۱-۱۷-٤- روش لوری ٥١
۱-۱۷-٥- روش BSA ٥٢
۱-۱۷-٦- روش اتصال رنگ ٥٢
۱-۱۷-۷- روش برادفورد ٥٢

فصل دوم : مواد و روش ها

۲- مواد و روش ها ٥٥
۲-۱- منبع ویروس ٥٥
۲-۲- خالص سازی آنتی ژن ١٤٦S به روش گرادیان ساکارز ٥٥
۲-۲-۱- مراحل آماده سازی ویروس برای خالص سازی آنتی ژن١٤٦S ٥٥
۲-۲-۲- مرحله قرار گیری ویروس بر روی گرادیان ساکارز ٥٧
۲-۳- خالص سازی آنتی ژن ١٤٦S با استفاده از روش ژل فیلتراسیون ٥٨
۲-۳-۱- آماده سازی ژل و ستون ٥٨
۲-۳-۲- بسته بندی ستون ٥٨
۲-۳-۳- حجم بیرونی ٥٩
۲-۳-٤- اعمال نمونه ٦٠
۲-۳-٥- جمع آوری نمونه ٦٠
۲-٤- خالص سازی آنتی ژن ٤٦S با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی ٦٠
۲-٤-۱- آماده سازی ژل و ستون ٦٠
۲-٤-۲- آماده سازی نمونه و عبور آن از ستون ٦١
۲-٥- تعیین میزان خلوص آنتی ژن ١٤٦S به روش SDS-PAGE ٦٢
۲-٦- تهیه منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA)برای ارزیابی مقدار پروتئین ٦٦

۲-۷- روش سنجش غلظت پروتئین توسط روش برادفورد..... ٦٦
۲-۷-۱- طرز تهیه محلول برادفورد ٦٧
۲-۷-۲- نمودار استاندارد برا اندازه گیری پروتئین با استفاده از BSA..... ٦٧
۲-۸- آزمایش لکه گذاری آنتی ژن (دات بلات) برای تایید وجود آنتی بادی..... ٦٧
۲-۸-۱- مواد لازم جهت انجام آزمایش دات بلات ٦٨

فصل سوم : نتایج

۳- نتایج
۳-۱- نتایج حاصل از خالص سازی آنتی ژن ١٤٦S با استفاده از روش گرادیان ساکارز ۷۰
۳-۱-۱- نتایج حاصل از تشکیل رسوب بر روی گرادیان ساکارز..... ۷۰
۳-۱-۲- نتایج حاصل از جذب نمونه خالص شده به روش گرادیان ساکارز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر..... ۷۰
۳-۱-۳- نتایج حاصل از تعیین میزان پروتئین خالص شده به روش گرادیان ساکارز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۷۰
۳-۱-٤- نتایج حاصل از تعیین میزان پروتئین خالص شده به روش گرادیان ساکارز با استفاده از دستگاه نانودراپ ۷۰
۳-۱-۵- نتایج حاصل از جذب نمونه خالص شده (نمونه دیگری از ویروس تب برفکی سروتیپ O) ۷۰
۳-۱-٦- نتایج حاصل از تعیین میزان پروتئین خالص شده به روش گرادیان ساکارز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۷۱
۳-۲- نتایج حاصل از خالص سازی آنتی ژن ١٤٦S با استفاده از روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون..... ۷۱
۳-۲-۱- نتایج تعیین فراکسیون های حاوی آنتی ژن ١٤٦S با استفاده از ژل کروماتوگرافی فیلتراسیون..... ۷۱
۳-۲-۲- نتایج تأیید فراکسیون های آنتی ژن ١٤٦S با استفاده از روش برادفورد..... ۷۲
۳-۲-۳- نتایج حاصل ازتهیه منحنی استاندارد سرم گاوی (BSA) برا ی ارزیابی مقدار پروتئین ۷۳

۳-۲-٤- نتایج حاصل ازتعیین غلظت پروتئین در فراکسیون ها مختلف با استفاده از روش برادفورد ۷٤
۳-۲-٥- نتایج حاصل از جذب نمونه ذره ۱٤٦S ویروس تب برفکی سروتیپ O خالص شده به روش ژل فیلتراسیون ۷٤
۳-۲-٦- نتایج حاصل از تعیین میزان پروتئین خالص شده به روش ژل فیلتراسیون با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۷٥
۳-۲-۷- نتایج حاصل از تعیین میزان پروتئین خالص شده به روش ژل فیلتراسیون با استفاده از دستگاه نانودراپ ۷٥
۳-۲-۸- نتایج حاصل از جذب فراکسیون ها در طول موج ۲٤۰nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۷٥
۳-۲-۹- نتایج حاصل از جذب فراکسیون ها در طول موج ۲٥۹nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۷٦
۳-۲-۱۰- نتایج حاصل از جذب فراکسیون ها در طول موج ۲۸۰nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۷٦
۳-۲-۱۱- نتایج حاصل از تعیین آنتی ژن ۱٤٦S در فراکسیون ها در طول موج ۲٥۹/۲٤۰nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۷۷
۳-۲-۱۲- نتایج حاصل از تعیین آنتی ژن ۱٤٦S در فراکسیون ها در طول موج ۲٥۹/۲۸۰nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۷۷
۳-۳- نتایج حاصل از خالص سازی آنتی ژن ۱٤٦S با استفاده از روش کروماتوگرافی تبادل یونی ۷۸
۳-۳-۱- نتایج حاصل از جذب نمونه OUT و Wash خالص شده به روش تبادل یونی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۷۸
۳-۳-۲- نتایج حاصل از تعیین میزان پروتئین خالص شده به روش تبادل یونی بااستفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۷۹
۳-۳-۳- نتایج حاصل از بررسی میزان خلوص نمونه های تبادل یونی با استفاده از روش SDS-PAGE ۸۰
۳-٤- نتایج تعیین میزان خلوص آنتی ژن ۱٤٦S به روش SDS-PAGE ۸۰
۳-٥- نتایج حاصل از تأیید حضور آنتی ژن ۱٤٦S در سرم حاوی آنتی بادی اختصاصی

بر علیه آنتی ژن ۱٤٦S با استفاده از روش Dot-Blot..... ۸۱

فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری

٤-۱- بحث و و بررسی نتایج..... ۸۳
٤-۲- پیشنهادات..... ۸٦
منابع ۸۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- دستگاه ها و وسایل مورد نیاز ۵۳
جدول ۲-۲- مواد مورد نیاز..... ٥٤
جدول ۲-۳- مواد مورد نیاز برا ی ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪..... ٦٤
جدول ۳-۱-۵-۱- نتایج حاصل از میزان جذب ویروس تب برفکی سروتیپ O خالص
شده به روش گرادیان ساکارز در طول موج های مختلف..... ۷۱
جدول ۳-۱-٦-۱- نتایج حاصل از تعیین میزان پروتئین ذره ۱٤٦S ویروس تب برفکی
سروتیپ O خالص شده به روش گرادیان ساکارز ۷۱
جدول ۳-۲-۸-۱- نتایج حاصل از میزان جذب ویروس تب برفکی سروتیپ O به روش
ژل فیلتراسیون در طول موج ۲٤۰ نانومتر..... ۷۵
جدول ۳-۲-۹-۱- نتایج حاصل از میزان جذب ویروس تب برفکی سروتیپ O به روش
ژل فیلتراسیون در طول موج ۲۵۹ نانومتر ۷٦
جدول۳-۲-۱۰-۱- نتایج حاصل از میزان جذب ویروس تب برفکی سروتیپ O به روش
ژل فیلتراسیون در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۷٦
جدول ۳-۲-۱۱-۱- نتایج حاصل از تعیین میزان پروتئین ذره ۱٤٦S ویروس تب برفکی
سروتیپ O خالص شده به روش ژل فیلتراسیون در طول موج ۲۵۹/۲٤۰ نانومتر ۷۷
جدول ۳-۲-۱۲-۱- نتایج حاصل از تعیین میزان پروتئین ذره ۱٤٦S ویروس تب برفکی
سروتیپ O خالص شده به روش ژل فیلتراسیون در طول موج ۲۵۹/۲۸۰ نانومتر ۷۷
جدول ۳-۳-۱-۱- نتایج حاصل از میزان جذب ویروس تب برفکی سروتیپ O خالص
شده در نمونه OUT حاصل از تبادل یونی در طول موج های مختلف..... ۷۸
جدول ۳-۳-۱-۲- نتایج حاصل ازمیزان جذب ویروس تب برفکی سروتیپ O خالص
شده در نمونه Wash حاصل از تبادل یونی در طول موج های مختلف..... ۷۸
جدول ۳-۳-۲-۱- نتایج حاصل از تعیین میزان ذره ۱٤٦S ویروس تب برفکی سروتیپ
O خالص شده در نمونه OUT تبادل یونی در طول موج های مختلف..... ۷۹

جدول ۳-۳-۲-۲- نتایج حاصل از تعیین میزان ذره ۱٤٦S ویروس تب برفکی سروتیپ O
O خالص شده در نمونه Wash تبادل یونی در طول موج های مختلف ۷۹

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۲-۱-۱- نمودار حاصل از خالص سازی آنتی ژن ۱٤٦S ویروس تب برفکی با استفاده از ژل فیلتراسیون ۷۲
شکل ۳-۲-۲-۱- نمودار حاصل از اندازه گیری جذب فراکسیون های استخراج شده با استفاده از روش برادفورد..... ۷۳
شکل ۳-۲-۳-۱- منحنی استاندارد آلبومن سرم گاوی برا ی ارزیابی مقدار پروتئین..... ۷٤
شکل ۳-۳-۳-۱- ژل مربوط به ذره ۱٤٦S ویروس تب برفکی سروتیپ O خالص شده با استفاده روش تبادل یونی..... ۸۰
شکل ۳-٤-۱- ژل مربوط به ذره ۱٤٦S ویروس تب برفکی سروتیپ O خالص شده با استفاده از ژل فیلتراسیون و گرادیان ساکارز ۸۱
شکل۳-۵-۱- تأیید حضور آنتی ژن ۱٤٦S ویروس تب برفکی سروتیپ O خالص شده به روش گرادیان ساکارز با آزمایش دات بلات..... ۸۱

فصل اول

کلیات

۱-کلیات

۱-۱- مقدمه

بیماری تب برفکی (FMD)[1] یک بیماری حاد ویروسی و کاملاً مسری در حیوانات زوج سم است . بروز تب و ضعف عمومی ، ظهور بثورات وزیکولر (تاولی) درون و اطراف دهان ، بـر روی پاهـا ، نوک پستانها از علائم بارز این بیماری محسوب می شود . اگر چه میـزان مـرگ ومیـر ناشـی از تـب برفکی بجز در شیرخواران قابل توجه نیست ولی بدلیل گسترش و انتشار سریع بیماری و نیز کـاهش تولیدات (شیر، فراورده های گوشتی ، ...) در حیوانات مبتلا ، تب برفکی بصورت یکی از مهمتـرین بیماریهای دامی در جهان مطرح می باشد .

عامل مولد بیماری ویروسی تب برفکی یکی از اعضای خانواده بـزرگ پیکورنـا ویریـده [2] و جـنس آفتوویروس [3] کـه دارای هفـت سـروتیپ($A , O , C , SAT_1 SAT_2 , SAT_3 , Asia_1$) مـی باشـد . ویروس عامل تب برفکی ویروسی کروی ، حامل ژنـوم RNA مثبـت تـک رشـته ای شـامل حـدود ۸٤٥۰ باز، با کپسید ۳۰ – ۲۵ نانومتری و وزنی در حدود $۸ - ۹ \times ۱۰^{٦}$ دالتون می باشد . ایـن ویـروس فاقد پوسته ی لیپوپروتئینی است (٦-۹-۱۳-۱۷) .

برای این بیماری اسامی متعددی وجود دارد که عبارتند از :

Infectious aphthous stomatitis
Foot and mouth disease
Aphthous fever
Epizootic Aphthae

که معمولاً فرم اختصاری آن بصورت FMD و عامل مولد بیماری FMDV است .

تیپ O ویروس تب برفکی نسبت به سایر سروتیپها از شیوع و گسترش بیـشتری برخـوردار اسـت . تب برفکی از سال ۱۳۳۰ در ایران گزارش شده و در سال ۱۳۳۵ تیپ O تب برفکی بـرای اولـین بـار در ایران جدا گردید و از این زمان به بعد هراز گاهی همـه گیریهـایی ناشـی از تیـپ هـای O ، A و $Asia_1$ در کشور به وقوع می پیوندد (۱) .

خسارات اقتصادی بیماری تب برفکی :

با توجه به این امر که تاکنون مطالعه جامعـه بـر روی خـسارات اقتـصادی بیمـاری در سـطح کـشور صورت نگرفته است و برآورد آن با توجه به ماهیت بیماری چندان ساده نمی باشد . لذا به ارقام اعلام

---

[1] - Foot and mouth disease
[2] - Picorna viride
[3] - Aphto virus

شده از سوی دفتر بین المللی بیماری های واگیر دام OIE استفاده می شـود . برابـر اعـلام ایـن دفتـر خسارات این بیماری در کشورهایی که بیماری را بشکل بومی دارند به شرح ذیل می باشد :
۲۵٪- کاهش تولید شیر در گله های مبتلا ، ۲۵٪- کاهش تولید گوشـت در گلـه هـای مبـتلا ، ۲۵٪- کاهش تولید پشم در گله های مبتلا ، ۵٪- تلفات در دام های مبتلای جوان .
البته به این خسارات بایستی زیان های اقتصادی ناپیدای ناشی از حضور بیماری از قبیل هزینـه هـای درمان ، ناباروری و کاهش باروری ، محدودیت تجارت دام و فراورده هـای خـام دامـی را کـه قابـل محاسبه نیستند را نیز اضافه نمود .

سرعت شیوع بیماری تب برفکی :

راه های انتقال بیماری طیف وسیعی دارد اما به طور کلی این راه های انتقال به عواملی از قبیل گونـه حیوانی – تعداد حیوانات (تراکم) – وضعیت مدیریت – تغذیه و سطح ایمنی گله حساس – شرایط توپوگرافی و جغرافیایی مساعد – تماس بین گونه های مختلف میزبان های اهلی و وحشی ، بـستگی دارد(۷۲).
به طور کلی عمده ترین راه انتقال ویروس در نشخوارکنندگان تنفس قطرات آلوده و یا خوردن علوفه آلوده است .
بیماری تب برفکی می تواند از طرق مختلفی انتشار پیدا کند که عبارتند از :

۱- انتقال مستقیم :

مهمترین راه انتقال مستقیم از راه زخم ها ویا از راه مخاطی است . در این راه ایجاد خراش و آسـیب دیدگی در غشای مخاطی یا لایه کراتینی پوست می توانند سبب آلودگی شود (۵- ۱۶-۴۰).

۲- انتقال غیر مستقیم :

از راه های غیر مستقیم انتقال بیماری می توان به انتقال بیماری بشکل مکـانیکی توسـط انـسان (بـه هنگام آزمایش های بالینی یا گرفتن خون) ، حیوانات وحشی و موذی و وسـایل وتجهیـزات اشـاره کرد (۵-۳۸) .

تشخیص بیماری تب برفکی :

بیماری تب برفکی در لیست A دفتر بین المللی بیماریهای واگیر دام OIE[4] قرار دارد . تشخیص این بیماری از اهمیت بسیار زیاد برخوردار است و این اهمیت برای کشورهایی که بیمـاری را نداشـته یـا اعلام پاک بودن کرده اند بسیار بیشتر است . چرا که با توجه به تـوان ویـروس در گـسترش سـریع ،

[4] Interenational Of fice for Epizootics-

سرعت شناسایی برای اعمال برنامه های قرنطینه ای و ریشه کنی ، فوق العاده مهم است و می تـوان از صرف هزینه های هنگفت برا عدم گسترش و ریشه کنی بیماری ، جلوگیری نمـود (۱۷-٤٥-٥٥-٨٤) .

تشخیص اولیه بیماری بر اساس علائم بالینی و با توجه به تاریخچه تماس بین گله و حیوانات آلوده ، اپیدمیولوژی بیماری در منطقه و گزارش از وقوع تب برفکی در نزدیکی محـل اسـتوار اسـت (۳۵-۵۲-۵۵) .

روش های شناسایی عامل بیماری عبارتند از :

۱) جداسازی ویروس [۵] ، با استفاده از کشت سلولی یا حیوانات آزمایشگاهی

۲) روش های ایمنی شناسی ، شناسایی عامل شامل :

الف) آزمایش جذب آنتی بادی اتصال یافته به آنزیم [۶] (ELISA)

ب) آزمایش تثبیت عامل مکمل [۷]

۳) روش های شناسایی اسید نوکلئیک [۸] نظیر RT-PCR

جداسازی ویروس:

برای جداسازی ویروس می توان از دو روش کشت سلولی و حیوانات آزمایشگاهی استفاده نمود .

کشت سلولی:

نمونه اپی تلیوم را پس از شستشو و آماده سازی می توان به کشت سلولی تلقیح نمـود . بایـد توجـه داشت که گلیسرول برای سلول ها سمی است . سلول های تیروئید گوسـاله یکـی از حـساس تـرین سلول ها برای جداسازی ویروس تب برفکی می باشد . تلقیح در این سلول با حساسیت تلقیح داخل جلدی ویروس تب برفکی در گاو برابر است .

حیوانات آزمایشگاهی:

خوکچه هندی مدلی مناسب برای تحقیقات تب برفکی در آزمایشگاه می باشد . ویروس تب برفکـی را می توان به خوکچه هندی تلقیح نمود و بیماری مشابه آنچه در گاو دیده می شود ، مشاهده کـرد . همچنین از موش شیرخوار ۷-۲ روزه می توان جهت جداسازی ویروس استفاده نمود .

---

[5] - Virus Isolation

[6] - Enzyme-linked immunosorbent assy

[7] - Complement Fixation test

[8] - Nucleic acid recognition methods

آزمایش تثبیت عامل مکمل (CFT) [9]:

در آزمایش CF از دو خاصیت عامل مکمل استفاده می شود :

۱- عامل مکمل قادراست به مجتمع آنتی بادی – آنتی ژن اتصال یابد .

۲- عامل مکمل قادر است در واکنش های ایمونولیتیک (متلاشی شدن ناشی از ایمنی) شرکت نماید .

آزمایش CF بر دو پایه استوار است :

- دستگاه آزمایش
- دستگاه روشنگر

دستگاه آزمایش شامل آنتی ژن یا آنتی بادی شناخته شده می باشد .

آزمایش الایزا:

امروزه الایزا بعنوان یکی از قدرتمندترین روش های آزمایشگاهی – تحقیقاتی در جهان مطرح می باشد . این روش از حساسیت و اختصاصیت بسیار بالایی برخوردار است تا بدانجا که هم اکنون روش اصلی در زمینه های مختلف علوم حیاتی از شناسایی و تشخیص ویروس ها ، باکتریها و انگل های پروتوزوا و متازوا گرفته تا شناسایی و تشخیص بسیار کم هورمونها و مولکولهای حیاتی در پزشکی بالینی و آزمونهای تحقیقاتی می باشد(٤) .

بدلیل سرعت واگیری زیاد این بیماری تشخیص به موقع و سریع آن از اهمیت ویژه ای برخوردار است . آزمایش ساندویچ الیزای غیرمستقیم یکی از معتبرترین تست های تشخیصی است که در حال حاضر در مراکز رفرنس جهانی استفاده می شود . در ایران نیز در سازمان دامپزشکی کشور از این تست برای تشخیص ویروس تب برفکی استفاده می گردد . کیت الیزای مورد استفاده از انگلستان خریداری می گردد و بسیار گران می باشد . طرح حاضر سعی دارد تا در جهت انجام مراحل اولیه ساخت کیت الیزا در ابتدا آنتی ژنS١٤٦ ویروس تب برفکی سروتیپ O را خالص نماید .

اولین مرحله تهیه کیت الیزا عباتست از :

۱) خالص سازی آنتی ژنS١٤٦ ویروس تب برفکی سروتیپ O با روش های گرادیان ساکارز و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تبادل یونی

۲) بررسی میزان خلوص آنتی ژنS١٤٦ با استفاده از SDS-PAGE

۳) ارزیابی مقدار آنتی ژن

---

[9] - Complement Fixation Test