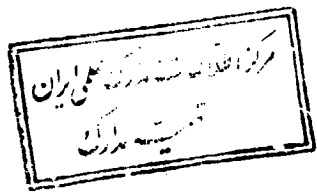
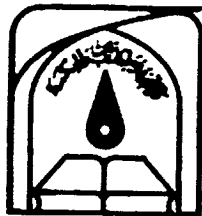


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

٣١٩٧٢



۱۳۷۹ / ۱۲ / ۲۰



دانشگاه تربیت مدرس

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته ویروس شناسی

عنوان موضوع:

**بکارگیری آزمایش الیزا به منظور نشان دادن IgG ضد ویروس
اوریون و مقایسه آن با آزمایش خنثی سازی سرم**

نگارش:

رزیتا عدالت

۹۳۶۸

استاد راهنما:

دکتر فرزانه صباحی

استاد مشاور:

دکتر محمد حسن روستائی

بائیز ۱۳۷۹

۳۱۹۷۲

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای رزیتا عدالت

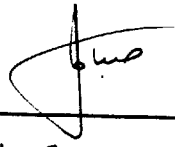
گرایش:

رشته: ویروس شناسی

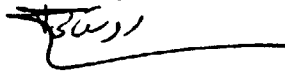
تقدیم می شود. اینجانبان نسخه نهائی این پایان نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی (استاد راهنما)



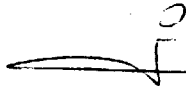
جناب آقای دکتر محمدحسن روستایی (استاد مشاور)



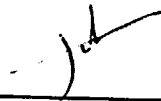
سرکار خانم حوریه سلیمانجاهی (نماینده تحصیلات تکمیلی)



جناب آقای دکتر عباس شفیعی (استاد ناظر)



جناب آقای دکتر زهیر حسن (استاد ناظر)





بسمه تعالی

آیین‌نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)‌های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)‌ی خود، مراتب را قبلاً 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 پایان‌نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده در رشته *دانش‌پژوهی* است که در سال ۱۳۷۹ در دانشکده علم *پژوهشی* دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم / جناب آقای دکتر *نریمان صباحی*، مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر *محمد حسن رسانی* و مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر *سیران زندی* از آن دفاع شده است.

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

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

ماده ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه‌شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶ اینجانب *رزیتا عدالت* دانشجوی رشته *دانش‌پژوهی* مقطع *کارشناسی ارشد* تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: 

تاریخ و امضا:

۷۹، ۸، ۱۸

به پدر و مادرم

بزرگ اندیشانی

که از ژرفای فضلشان کسب معرفت نمودم

و از بحر وجودشان، صداقت و راستی آموختم

و خواهر و برادرانم که خوب زیستن را در کنارشان آموختم

به پاس

زالل ترین محبت‌هایشان

با جوهری به رنگ تواضع

این برگ سپز تقدیم حضورشان باد

(مشعل تابناک جایشان همواره فروزان)

با سپاس بی‌کران از

استاد عزیز و ارجمند سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی که با راهنمایی‌ها و مساعدت‌هایشان در طول تحصیل و تحقیق همواره راهگشایم بودند.

استاد مشاور محترم و بزرگوار جناب آقای دکتر محمدحسن روستانی که همواره از مساعدت‌ها و توصیه‌های ارزشمندشان استفاده نموده‌ام.

استاد مشاور گرانقدر جناب آقای دکتر کیوان زندی که در انجام مراحل مختلف پایان‌نامه مرا یاری نمودند و بدون همکاری‌های بی‌دریغ ایشان انجام این تحقیق دشوار بود.

و

سرکار خانم دکتر سلیمانجاهی

و آقایان دکتر شفیعی و دکتر مصطفایی

آقایان صرامی و روانشاد و خانم‌ها جهانگیری، رودباری، شاهزمانی که در انجام این تحقیق یاریم نمودند.

گروه بیوشیمی و گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

آقای میر سعید تکنسین محترم گروه ویروس‌شناسی

و

کلیه دوستان عزیزی که مرا یاری نمودند.

چکیده

ویروس اوربیون عامل یک بیماری واگیردار می باشد که بیشتر در کودکان و نوجوانان دیده می شود. و معمولاً بی خطر است. این بیماری همراه با عوارض مختلف به ویژه در بزرگسالان می باشد. IgG اختصاص علیه ویروس اوربیون فرد را در برابر عفونت مجدد حفاظت می کند. کنترل انتقال ویروس به دلیل متغیر بودن دوره کمون، حضور ویروس در بزاق قبل از علائم بالینی توسعه یافته و تعداد زیاد افراد بدون علائم مشکل می باشد. بنابراین تقریباً تنها راه کنترل، استفاده از برنامه دقیق واکسیناسیون است. برای بررسی میزان بازدهی واکسن، تعیین گروه های سنی حساس، شناسایی دقیق افراد مبتلا به اوربیون، وجود روش های آزمایشگاهی با حساسیت و ویژگی مناسب ضروری می باشد. در این پژوهش به منظور بررسی عیار IgG تست ELISA, SN بکار گرفته شد. ابتدا تست خنثی سازی سرم بر روی ۴۰۰ نمونه سرم خون بند ناف انجام شد که ۹۲/۷ درصد نمونه ها مثبت بودند. آزمایش الیزا نیز طراحی و جهت تعیین عیار آنتی بادی بکار گرفته شد. بدین منظور ویروس اوربیون سوش هوشینو در سلول های Vero تکثیر و با استفاده از همادریزشن تایید گردید. تغلیظ و تخلیص ویروس با استفاده از PEG6000 و شیب سوکروز انجام شد و مقدار پروتئین در نمونه های مورد نظر تعیین شد. آنتی ژن ویروس بدست آمده در پلیت Coat شد و پس از آن مراحل مختلف روش الیزای غیرمستقیم انجام گرفت.

به منظور بررسی کارایی این روش، از SNT به عنوان تست استاندارد استفاده شد. نتایج حاصل از این دو تست تا حد مطلوبی با یکدیگر مطابقت داشت. حساسیت و ویژگی الیزای طراحی شده به ترتیب ۱۰۰ و ۹۷ درصد محاسبه شد. با توجه به این نتایج، آزمایش مذکور

می‌تواند روش مناسبی برای نشان دادن آنتی بادیهای ویروس اوریون در نمونه‌های
سرمی باشد.

واژگان کلیدی: آنتی بادی ضد ویروس اوریون / آزمایش خنثی سازی سرم / الیزا

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول
۲.....	مقدمه.....
	فصل دوم: کلیات و مروری بر مطالعات گذشته
۷.....	۱-۲- تاریخچه.....
۸.....	۲-۲- طبقه بندی.....
۹.....	۳-۲- ساختار ویروس.....
۱۲.....	۴-۲- پروتئین های ویروس.....
۱۵.....	۵-۲- حساسیت به عوامل فیزیکی و شیمیایی.....
۱۵.....	۶-۲- مراحل تکثیر ویروس.....
۱۷.....	۷-۲- تکثیر ویروس اوریون در کشت یاخته.....
۱۸.....	۸-۲- میزبانها و مدل های حیوانی ویروس.....
۱۹.....	۹-۲- بیماریزایی و علائم آن.....
۲۱.....	۱۰-۲- عوارض بیماری اوریون.....
۲۴.....	۱۱-۲- اپیدمیولوژی.....
۲۵.....	۱۲-۲- پاسخ ایمنی میزبان.....
۲۵.....	۱-۱۲-۲- پاسخ ایمنی هومورال.....
۲۷.....	۲-۱۲-۲- پاسخ ایمنی وابسته به سلول.....
۲۸.....	۱۳-۲- تشخیص آزمایشگاهی.....

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۲۸	۲-۱۳-۱- جمع آوری و تهیه نمونه های بالینی.....
۲۹	۲-۱۳-۲- جداسازی ویروس.....
۲۹	۲-۱۳-۳- تست های سرولوژیک.....
۳۱	۲-۱۴- پیشگیری و کنترل.....
۳۳	۲-۱۵- درمان.....
۳۴	۲-۱۶- مروری بر مطالعات انجام شده.....

فصل سوم: مواد و روشها

۳۷	۳-۱- اهداف پژوهش.....
۳۷	۳-۲- سؤالهای پژوهش.....
۳۸	۳-۳- وسایل مورد نیاز.....
۳۹	۳-۴- مواد مورد نیاز.....
۴۰	۳-۵- آماده کردن محلولها و بافرها.....
۴۰	۳-۵-۱- طرز تهیه اسید سولفوکرومیک.....
۴۱	۳-۵-۲- طرز تهیه محلول PBS.....
۴۱	۳-۵-۳- طرز تهیه محلول آلسیور.....
۴۲	۳-۵-۴- طرز تهیه بافر تریس.....
۴۲	۳-۵-۵- طرز تهیه بافر سیترات و فسفات.....

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۴۲	۶-۵-۳- طرز تهیه محیط کشت.....
۴۴	۶-۳- شستشو و استریل کردن وسایل مورد نیاز.....
۴۴	۷-۳- تهیه نمونه‌های سرم.....
۴۵	۸-۳- کشت یاخته.....
۴۶	۹-۳- تکثیر ویروس.....
۴۷	۱۰-۳- آزمایش جذب گویچه‌های قرمز.....
۴۷	۱-۱۰-۳- طرز تهیه گلبول قرمز خوکچه هندی.....
۴۷	۲-۱۰-۳- روش انجام آزمایش.....
۴۹	۱۱-۳- تعیین عیار ویروس اوربون به روش $TCID_{50}$
۵۰	۱۲-۳- آزمایش خنثی‌سازی ویروس.....
۵۳	۱۳-۳- تهیه آنتی‌ژن ویروس اوربون.....
۵۳	۱-۱۳-۳- تغلیظ ویروس.....
۵۴	۲-۱۳-۳- تخلیص ویروس.....
۵۵	۱۴-۳- تعیین غلظت نمونه با استفاده از روش برادفورد.....
۵۶	۱-۱۴-۳- تهیه معرف.....
۵۶	۲-۱۴-۳- انجام آزمایش برادفورد.....
۵۷	۱۵-۳- آزمایش EIA.....
۵۹	۱۶-۳- استاندارد کردن آزمایش الیزا.....

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۶۰	۱۷-۲-انجام آزمایش الیزا.....
فصل چهارم: نتایج	
۶۴	۱-۴- نتایج تعیین عیار ویروس اوربیون به روش $TCID_{50}$
۶۸	۲-۴- نتایج آزمون خنثی سازی ویروس اوربیون به روش میکرو (MNT).....
۷۰	۳-۴- بررسی پراکندگی نمونه ها نسبت به رقت سرم در SNT.....
۷۲	۴-۴- مراحل مختلف استاندارد سازی تست الیزا.....
۷۲	۱-۴-۴- روش برادفورد برای تعیین غلظت پروتئین.....
	۲-۴-۴- نتایج حاصل از آزمایش الیزا بر روی رسوب جمع آوری شده با PEG و آنتی ژن
۷۴ Crude
۷۵	۳-۴-۴- رابطه خطی بین SNT, ELISA.....
۷۷	۴-۴-۴- تعیین Cutpoint مناسب برای الیزا.....
	۵-۴- مقایسه توزیع متغیر ثابت شده الیزا در دو گروه مثبت و منفی براساس تست
۷۹ استاندارد
۸۱	۶-۴- محاسبه حساسیت و ویژگی ELISA در مقایسه با SNT.....
۸۲	۷-۴- مقایسه OD در سرمهای مورد مطالعه قبل و بعد از جذب با ویروس PI_3
فصل پنجم: بحث	
۸۵	۱-۵- نکاتی در مورد آزمایش خنثی سازی سرم.....

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۸۷	۲-۵- نکات عملی در آزمایش الیزا
۸۷	۱-۲-۵- آنتی ژن مورد استفاده
۸۸	۲-۲-۵- فاز جامد
۸۹	۲-۲-۵- اتصال آنتی ژن به فاز جامد
۹۰	۴-۲-۵- شستشو
۹۱	۵-۲-۵- اتصال آنتی بادی به آنتی ژن
۹۱	۶-۲-۵- کونژوگه آنزیم
۹۳	۳-۵- حساسیت و ویژگی الیزا
۹۵	پیشنهادهات
۹۷	منابع

فهرست اشکال

- شکل ۱-۲. نمای شماتیک ویروس اوریون ۱۱
- شکل ۲-۲. نمای میکروسکوپ الکترونی ویروس اوریون ۱۱
- شکل ۲-۳. پروتئینهای ویروس اوریون ۱۳
- شکل ۲-۴. چرخه تکثیر ویروس اوریون ۱۷
- شکل ۲-۵. مکانیزم انتشار ویروس اوریون در بدن ۲۰
- شکل ۴-۱. تک لایه سلولهای سالم هلا ۶۵
- شکل ۴-۲. CPE ویروس اوریون بر روی سلولهای هلا ۶۵
- شکل ۴-۳. تک لایه سلولهای سالم ورو ۶۶
- شکل ۴-۴. CPE ویروس اوریون بر روی سلولهای ورو ۶۶
- شکل ۴-۵. سلولهای سالم هلا در تست همادزرپشن ۶۷
- شکل ۴-۶. اتصال گلیکولهای قرمز به سلولهای آلوده، در تست همادزرپشن ۶۷

فهرست جداول

- جدول ۱-۲. خواص پروتئینهای ویروس اوریون ۱۴
- جدول ۲-۲. علائم بالینی، عوارض و پیش آگهی‌های ویروس اوریون در اعضای مختلف ۲۳
- جدول ۱-۴. پراکندگی نمونه‌ها نسبت به رقت سرم در SNT ۶۸
- جدول ۲-۴. پراکندگی نمونه‌ها نسبت به رقت سرم در SNT در بیمارستان سوم شعبان ۷۰
- جدول ۳-۴. پراکندگی نمونه‌ها نسبت به رقت سرم در SNT در بیمارستان اکبرآبادی ۷۱
- جدول ۴-۴. جذب نوری غلظتهای مختلف BSA در ۵۹۵ نانومتر ۷۲
- جدول ۵-۴. نتایج بدست آمده از روش برادفورد ۷۲
- جدول ۶-۴. نتایج حاصل از آزمایش الیزا بر روی رسوب جمع‌آوری شده با PEG ۷۴
- جدول ۷-۴. نتایج حاصل از آزمایش الیزا بر روی آنتی ژن Crude ۷۴
- جدول ۸-۴. حساسیت و ویژگی تست الیزا با Cutpoint مختلف ۷۷
- جدول ۹-۴. مقایسه OD در سرمهای مورد مطالعه قبل و بعد از جذب با ویروس PI₃ ۸۲