بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده دامپزشکی

گروه علوم درمانگاهی

پایان نامه

برای دریافت درجه دکتری حرفه ای در رشته دامپزشکی

عنوان

مطالعه حضور بیماری زبان آبی (Bluetongue) در نشخوارکنندگان کوچک برخی مناطق مرزی ایران به روش Nested- PCR

استاد راهنما

دکتر فریدون رضازاده

اساتید مشاور

دکتر امید مددگار

دکتر کریم مردانی

پژوهشگر

مجتبی ورمقانی

تابستان ۱۳۹۱

از صمیم قلب این پایان نامه را تقدیم می کنم به

روح پاک، آزاده و آسمانی پدر عزیزم شهید حاج هوشنگ ورمقانی

مادر فداکارم؛ مظهر صبر و مهربانی، وجود مقدسی که موهایش سپیدی گرفت تا من سپید روی شوم.

همسر مهربان و فداکارم؛ که بی شک بی حمایت او، حرکت نه تنها در این مسیر که در هیچ یک از فراز و نشیب های زندگی برایم میسر نبوده و نیست و با اوست که عزم ساختن زندگی سعادتمندانه برایم فراهم شد.

خانواده محترم همسرم؛ که با عشق و محبت همراه زندگیم را پروریدند و از دعای خیر خود مرا بهره مند ساختند.

برادران و خواهر عزیزم؛ به پاس حمایت ها و محبت های بی دریغشان که هیچگاه فروکش نمی کند.

«من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق»

تقدیر و تشکر:

پروردگار حکیم و علیم را سپاسگزارم؛ که بر بنده ناتوانش منت نهاد و او را از تاریکی جهل و نادانی به نور علم هدایت نمود تا در دریای بی‌کران علم و دانش گام نهد و قطره‌ای از آن را گوارای وجودش گرداند. حضرت حق را شاکرم که این توفیق را ارزانی داشت تا پس از گذراندن فراز و نشیب‌های بسیار در رشته دامپزشکی مقطع دکتری عمومی تحصیل نمایم. اکنون که کار پایاننامه حاضر پس از نزدیک به دو سال فعالیت پژوهشی- آزمایشگاهی، نگارش و اصلاح برخی مطالب به سامان رسیده؛ جای دارد که از زحمات و تلاش‌های اساتید معزز و دوستان بزرگوار سپاسگزاری نمایم. در تدوین این پایاننامه بیش از همه مدیون ارشادات عالمانه و حکیمانه استاد گرانقدر جناب آقای دکتر فریدون رضازاده هستم که مرا همیشه رهین الطاف بی‌شائبه و اخلاق نیکو و بی مانندشان قرار داده‌اند. برخود فرض می‌دانم که نهایت تقدیر و تشکر خویش را از تلاش‌های اساتید ارجمند جناب آقایان دکتر امید مددگار از دانشگاه تهران و دکتر کریم مردانی از دانشگاه ارومیه که مشاوره این پایاننامه را قبول نموده‌اند، اعلام دارم. همچنین کمال تشکر و قدردانی را زحمات استاد محترم جناب آقای دکتر محمد طلوعی به جهت داوری این پایاننامه ابراز می دارم.

بر خود بسیار واجب می دانم از حمایت های همه عزیزان در به ثمر نشستن این رساله از جمله حاج آقا سلیمانی مدیر کل بنیاد شهید کردستان، سردار رجبی فرماندهی محترم سپاه بیت المقدس، دکتر علوی ریاست محترم دانشگاه تبریز، دکتر هادی باقری، برادران عزیزم روح الله ورمقانی و امیر فرهنگ پورعینی، تشکر و قدردانی نمایم.

در پایان، قدرنشناسی است اگر نامی از دوستان ارجمندم که در دوران تحصیلی مرا همراهی کرده‌اند، به میان نیاورم. عزیزانی که درس نوع دوستی را از آنان یاد گرفته‌ام. آقایان: دکتر حامد پناه پور، وحید مظفری، دکتر محمد سعید حسین زاده، غلامرضا قلی پور، دکتر محمد عباسی ، مهندس ایرج اشرافی، حاج سعید رمضانی و سایر عزیزانی که دوست و یار مهربان ما در دوران دانشجویی بودند و سعادت آشنایی با آنان را کسب کرده‌ام. تندرستی، سعادت و توفیقات روز افزون همه عزیزان را در ذیل توجهات حضرت ولی عصر (عج) از خدای متعال مسئلت دارم.

آنکه جانب اهل وفا نگه دارد　　خداش در همه حال از بلا نگه دارد.

حدیث دوست نگویم مگر به حضرت دوست　　که آشنا سخن آشنا نگه دارد.

والسلام- دکتر مجتبی ورمقانی- تابستان ۱۳۹۱- دانشگاه تبریز

نام خانوادگی:ورمقانی **نام: مجتبی**

عنوان پایان نامه: مطالعه حضور بیماری زبان آبی (Bluetongue) در نشخوارکنندگان کوچک برخی مناطق مرزی ایران به روش Nested- PCR

استاد راهنما: دکتر فریدون رضازاده

اساتید مشاور: دکتر کریم مردانی – دکتر امید مددگار

مقطع تحصیلی: دکتری حرفه ای **رشته: دکتری حرفه ای دامپزشکی** **گرایش: علوم درمانگاهی**

دانشگاه: تبریز **دانشکده: دامپزشکی** **تاریخ فارغ التحصیلی: شهریور۹۱** **تعداد صفحات:۱۰۰**

کلید واژه: گوسفند، بز، ایران، زبان آبی

چکیده:

زبان آبی یک بیماری عفونی است که عمدتاً گوسفند را مبتلا می سازد. ولی با توجه به اهمیت زیادی که دارد جزو لیست A سازمانهایی مانند OIE قرار گرفته است. ویروس زبان آبی در خانواده رئوویریده و در جنس اوربی ویروس قرار دارد. انتقال ویروس توسط گونه‌های خاصی از پشه کولیکوئیدس انجام می‌گردد. منقطع بودن ژنوم ویروس زبان آبی و انتقال آن توسط پشه، منجر به تغییرات شدید ژنومی و تنوع سروتیپی این ویروس گردیده است. به طوری که تاکنون ۲۴ سروتیپ از آن در سراسر دنیا شناسایی شده است. بیماری در گوسفندان با نژاد خاص نشانه های درمانگاهی ویژه ای داشته و در گاو بصورت بدون علامت مشاهده می شود. ویروس بیماری زبان آبی در سلولهای آندوتلیال و فاگوسیت های تک هسته ای، لنفوسیتها و احتمالاً سایر سلولهای بافت لنفوئیدی مانند ریه ها، پوست و سایر بافتها تکثیر می یابد.. در مطالعه حاضر تعداد ۷۰ نمونه خون کامل گوسفند و بز از شهرهای کامیاران، پیرانشهر، لاهیجان، قروه و بیله سوار جمع آوری گردید. از تعداد ۷۰ نمونه، ۲۸ نمونه خون بز و ۴۲ نمونه متعلق به گوسفند بود که در مجموع شامل ۴۵ دام ماده و ۲۵ دام نر بود. فراونی نمونه ها در شهر قروه ۱۳، لاهیجان ۱۰، بیله سوار ۱۸، کامیاران ۱۳ و پیرانشهر ۱۶ نمونه بود. نمونه های خون از ورید وداج دام‌های اشاره شده توسط ونوجکت حاوی EDTA اخذ گردیده و در مجاورت یخ بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌گیری از دام‌های مشکوک و به ظاهر سالم به شکل تصادفی

انجام گرفت. نمونه‌های خون سانتریفوژ شده و به دو قسمت جدا شد، بحش زیرین که حاوی گلبول قرمز بوده و جهت استخراج RNA ویروس زبان آبی استفاده شد. RT- PCR با افزوده سازی قطعه bp ۱۱۵۶ اختصاصی ژن s7 و سپس Nested- PCR با روش‌های اشاره شده در منابع و پرایمرهای داخلی ژن s7، صورت پذیرفت. نتایج با روش های آماری SPSS و آنالیزهای واریانس تجزیه و تحلیل خواهد شد. آلودگی درتمامی نمونه های مورد مطالعه بز و گوسفند، ۵ مورد (۷٪) بود. در این مطالعه درصد آلودگی در بز۰٪ و در گوسفند ۱۲٪ بود. درصد آلودگی در سنین زیر یک سال، یک تا دو سال، دو تا سه سال و بالای سه سال گوسفندان مورد مطالعه به ترتیب ۸٪، ۱۳٪، ۱۶٪ و۱۳٪ تشخیص داده شد اما ارتباط معناداری از نظرگروه های سنی مورد مطالعه و میزان آلودگی یافت نشد (p>۰/۰۵). ضمناً درصد آلودگی در شهرهای قروه، لاهیجان، بیله سوار، کامیاران و پیرانشهر نیز به ترتیب۴۰٪، ۰٪، ۴۰٪، ۰ و۲۰٪مشخص شد و هیچ ارتباط معناداری نیز از نظر منطقه مورد مطالعه و میزان آلودگی یافت نشد (P>۰/۰۵). پیشنهاد می شود جهت تکمیل شدن اطلاعات حاصل از این طرح، مطالعاتی جهت بررسی سرواپیدمیولوژی ویروس زبان آبی در استان های مختلف به منظور تعیین وضعیت پراکندگی ویروس در کل کشور انجام گیرد.

فهرست مطالب

۱-کلیات.....۱

۱-۱- مقدمه.....۱

۱-۲- تاریخچه بیماری زبان آبی.....۲

۱-۳- طبقه بندی ویروس زبان آبی.....۳

۱-۴- ساختمان ویروس.....۴

۱-۴-۱- خصوصیات فیزیکو شیمیایی ویروس.....۵

۱-۴-۲- کپسید خارجی ویروس.....۵

۱-۴-۳- کپسید داخلی ویروس.....۶

۱-۴-۴- پروتئین های ساختمان جزئی.....۷

۱-۴-۴-۱- آنزیم پلی مراز.....۸

۱ -۴-۴-۲- آنزیم کلاهک گذاری.....۸

۱-۴-۴-۳- آنزیم هلیکاز.....۹

۱-۴-۵- پروتئین های غیر ساختمانی.....۹

۱-۴-۶- ساختمان ژنوم ویروس ۹

۱-۵- روش تکثیر ویروس.....۱۱

۱-۵-۱- مراحل اتصال، نفوذ و پوشش گذاری.....۱۱

۱-۵-۲- مراحل تکثیر و رونوشت برداری.....۱۳

۱-۵- ۳- مرحله سرهم شدن ویروس.....۱۶

۱-۵-۴- مرحله رها شدن ویروس.....۱۷

۱-۶- خواص آنتی ژنی پروتئین های ویروس.....۱۸

۱-۶-۱- پروتئین های Vp5 و Vp2 .....۱۸

۱-۶-۲- پروتئین Vp7.....۱۹

۱-۷- اپیدمیولوژی ویروس زبان آبی.....۲۰

۱-۷-۱- پشه کولیکوئیدس.....۲۳

۱-۷-۱-۱- چرخه زندگی پشه کولیکوئیدس ۲۴

۱-۷-۱-۲- تکثیر ویروس در بدن پشه.....۲۷

۱-۷-۲- میزبان های مهره دار ویروس.....۲۸

۱-۷-۳- راه های انتقال بیماری.....۲۹

۱-۸- نشانه های بالینی بیماری.....۳۱

۱-۸-۱- نشانه های بالینی بیماری در گوسفند.....۳۱

۱-۸-۲- نشانه های بالینی بیماری در گاو.....۳۳

۱-۹- بیماری زایی ویروس زبان آبی.....۳۵

۱-۱۰- پاسخ سیستم دفاعی در بیماری ۳۷

۱-۱۱- کنترل بیماری زبان آبی.....۳۸

۱-۱۱- ۱- واکسیناسیون.....۳۹

۱-۱۱-۱-۱- واکسن های تحت حدت یافته.....۴۰

۱-۱۱-۱-۲- واکسن کشته.....۴۱

۱-۱۱-۱-۳- ذرات شبه ویروس.....۴۱

۱-۱۱-۱-۴- حاملین نوترکیب.....۴۱

۱-۱۱-۲- کنترل ناقلین.....۴۲

۱-۱۲- تشخیص ویروس زبان آبی.....۴۳

۱-۱۲-۱- تزریق به تخم مرغ جنین دار.....۴۳

۱-۱۲-۲- کشت سلولی.....۴۴

۱-۱۲-۳- تزریق به گوسفند.....۴۵

۱-۱۲-۴- تزریق به حیوانات آزمایشگاهی.....۴۵

۱-۱۲-۵- روش Antigen Capture ELISA.....۴۶

۱-۱۲-۶- روش AGID ۴۶

۱-۱۲-۷- الیزای رقابتی..... ۴۶

۱-۱۲-۸- تست خنثی سازی ویروس..... ۴۷

۱-۱۲-۹- روش های مولکولی..... ۴۷

۲- مواد و روش‌ها..... ۵۰

۲-۱- انتخاب کانون های مورد مطالعه..... ۵۰

۲-۲- اخذ نمونه..... ۵۱

۲-۳- استخراج RNA ۵۱

۲-۴- واکنش RT-PCR ۵۲

۲-۵- آزمایش Nested-PCR ۵۴

۲-۶- ارزیابی محصول PCR ۵۶

۲-۷- آنالیز آماری داده ها..... ۵۶

۳- نتایج..... ۵۷

۴- بحث..... ۶۵

۵- پیشنهادات..... ۷۳

۶- منابع..... ۷

کلیات

۱-۱ مقدمه

بیماری زبان آبی[1] یک بیماری عفونی غیر مسری است. عامل بیماری جز آربوویروس‌های[2] دامی می-باشد. در انتقال بیماری منحصراً پشه‌های کولیکوئیدس[3] دخالت دارند. متأسفانه در سال‌های اخیر به علت افزایش نسبی دما، فعالیت ناقلین این ویروس گسترش یافته است. این موضوع منجر به وقوع اپیدمی‌های گسترده و متعدد در سراسر دنیا شده است. همین امر می‌تواند هشداری جدی در خصوص فراهم شدن زمینه‌های گسترش سایر آربوویروس‌های دامی و حتی انسانی باشد. اهمیت زبان آبی از نظر سازمان‌های بین‌المللی نظیر OIE[4] و FAO[5] بسیار زیاد است. به نحوی که این بیماری را در بیماری‌های لیست A قرار داده‌اند. به طور کلی بیماری‌هایی در این گروه دسته‌بندی می‌شوند که از مرزهای جغرافیایی کشورها و قاره‌ها عبور نموده و خسارتهای شدید اقتصادی به جای گذارند. به همین دلیل این بیماری از سال ۱۹۴۳ به لیست A افزوده شده، یعنی از زمانی که از زادگاه خود در آفریقای جنوبی به قبرس در قاره اروپا سرایت نمود. خسارت‌های زبان آبی در دنیا بسیار زیاد است، در یک بررسی در سال ۱۹۹۹ این میزان حدود ۳ میلیارد دلار برآورد گردید. این خسارت‌ها علاوه بر هزینه‌های درمانی و کنترل، شامل تلفات دام، کاهش تولید و کاهش کیفیت محصولات دامی، کاهش باروری، محدودیت‌های تجارت بین‌المللی دام و فرآورده‌های بیولوژیک آن‌ها می‌باشد (۸۱).

۱-۲ تاریخچه بیماری زبان آبی

1- Bluetongue disease(BTD)
2- Arboviruses
3-Culicoieds
4- Office International des Epizooties
5-Food and Agriculture Organization

اولین توصیف از بیماری زبان آبی در اواخر قرن ۱۹ زمانی که گوسفندان مرینوس از اروپا به آفریقای جنوبی آورده شدند، گزارش شده است. در واقع بیماری با نشانه‌های بالینی واضح، پس از ورود نژادهای غیربومی و حساس به آفریقا مشاهده شد. در سال ۱۹۰۲ برای اولین بار نام Malarial Catarrhal Fever در منابع علمی به کار برده شده است. اولین بار Spreull در سال ۱۹۰۵ از نام BlueTongue استفاده نمود. تا دهه ۵۰ میلادی بیماری زبان آبی منحصرا در آفریقا و در بین نشخوارکنندگان این قاره مشاهده می‌شد. اولین شیوع بیماری در خارج آفریقا در سال ۱۹۴۳ در قبرس اتفاق افتاد. در این اپیدمی بیش از ۲۵۰۰ رأس گوسفند تلف شد. در سال ۱۹۴۵ زبان آبی از ترکیه، فلسطین و در سال ۱۹۵۰ از فلسطین اشغالی گزارش گردید. در سال ۱۹۴۸ بیماری به صورت زخم پوزه گوسفندان در تگزاس مشاهده شد. به همین دلیل آن را Sore muzzle نامیدند. بعدها مشخص شد عامل بیماری ویروس زبان آبی بوده است. اولین بار در سال ۱۹۵۲ سروتیپ ۱۰ ویروس زبان آبی در کالیفرنیا جداسازی شد. سپس سروتیپ‌های ۱۷، ۱۱، ۱۳، ۲ و ۳ به ترتیب در نیومکزیکو(۱۹۵۵)، وامینگ(۱۹۶۲)، ایداهو(۱۹۶۷)، فلوریدا(۱۹۸۳) و لویزیانا(۲۰۰۴) جدا شدند. ابتدا تصور می‌شد که استرالیا عاری از بیماری زبان آبی است. اما از سال ۱۹۷۶ به تدریج سروتیپ های مختلف مانند ۳، ۱، ۹، ۱۵، ۱۶، ۲۰، ۲۱ و ۲۳ شناسایی و جداسازی شدند. در آسیا نیز در سال ۱۹۵۶ برای اولین بار سروتیپ ۱۰ از غرب پاکستان و در سال ۱۹۶۱ در شبه قاره هند جدا شد. در اروپا تهاجم ویروس غیرمنظم و گذرا بوده است. بعد از شروع بیماری در قبرس در سال ۱۹۵۶ در ایبریا شیوع یافت، در سال ۱۹۷۷ مجدداً در قبرس مشاهده گردید، در سال ۱۹۷۹ در یونان و سایر مناطق مشاهده شد (۲۴،۱۹). اما از سال ۱۹۹۸ در اپیدمی‌های مختلفی که در اروپا اتفاق افتاده است،

چند سروتیپ به طور همزمان شناسایی شده‌اند، در مجموع این اپیدمی‌ها خسارت‌های سنگینی در این قاره بر جای گذارده‌اند (۸۰).

در ایران از سال ۱۹۷۲ احتمال می‌دادند که بیماری وجود داشته است. این موضوع به طور غیر رسمی و با توجه به نشانه‌های بالینی اعلام شده است. اما تائید رسمی و قطعی وجود BTV در کشور به سال ۱۹۷۴ باز می‌گردد. افشار و کیوانفر در این سال با آزمایشات سرولوژیک ایمنودیفوزیون وجود ویروس زبان آبی را در استان‌های تهران و فارس اثبات نمودند (۴).

۱-۳-طبقه‌بندی[1] ویروس زبان آبی

BTV در خانواده Reoviridae و در گروه RNA ویروس‌ها قرار دارد. این خانواده از بزرگترین خانواده‌های ویروس می‌باشد. اعضا خانواده رئوویریده واجد ژنوم قطعه قطعه و دو رشته‌ایی هستند و در طیف وسیعی از موجودات شامل حشرات، خزندگان، ماهی‌ها، سخت‌پوستان، پستانداران، گیاهان و قارچ‌ها بیماری‌زایی دارند. تعدادی از بیماری‌های حاصله توسط این ویروس‌ها، خسارت‌های شدید اقتصادی به همراه داشته و از نظر پزشکی و دامپزشکی بسیار حائز اهمیت می‌باشند. طبق آخرین گزارش ارائه شده توسط کمیته بین المللی طبقه بندی ویروس [2] که در سال ۲۰۰۸ انتشار یافته است، ۱۲ جنس در خانواده رئوویریده طبقه‌بندی شده و در آینده نزدیک نیز سه جنس دیگر به آن افزوده خواهد شد(۶۳، ۶۵).

1-Taxonomy
2-International committee of taxonomy of viruses(ICTV)

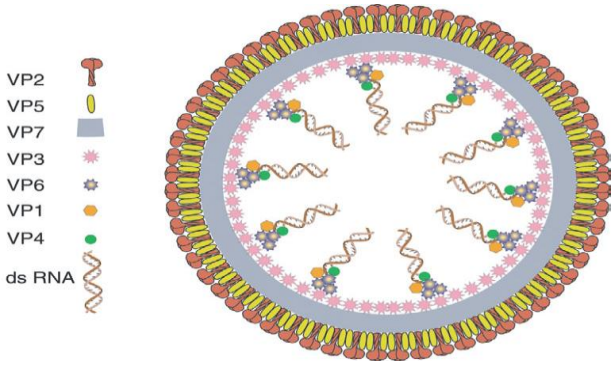
Orbivirus بزرگترین جنس موجود در خانواده رئوویریده است، اعضا این جنس در مهره‌داران و بی-مهره‌گان تکثیر یافته و توسط طیف وسیعی از بندپایان شامل پشه‌ها، کنه‌ها و سایر حشرات انتقال می‌یابند. Bordern و همکاران در سال ۱۹۷۱ اربی ویروس‌ها را از جنس Reovirus جدا نموده و تحت عنوان یک جنس مستقل طبقه‌بندی نموده‌اند. در جنس اربی ویروس ۲۱ گونه و ۱۲ ویروس طبقه‌بندی نشده وجود دارد که از نظر خصوصیات مرفولوژیک و استراتژی تکثیر، شباهت‌های فراوانی به یکدیگر دارند. ویروس زبان آبی تحت عنوان گروه سرمی زبان آبی[۱] یا گونه شاخص[۲] از جنس اربی ویروس معرفی شده است. بین گونه BTV و سایر گونه‌ها مانند EHDV [۳] واکنش متقاطع سرولوژیک وجود دارد در حال حاضر ۲۴ سروتیپ[۴] در BTV شناسایی شده است (۵۳).

۱-۴ ساختار ویروس زبان آبی

ویریون کامل زبان آبی با قطر ۹۰ nm – ۸۵ و ضریب رسوبی S ۵۵۰ از ساختاری پیچیده برخودار است. BTV به طور کلی، ویروسی فاقد غشا می‌باشد. اما بعضی اوقات به دلیل جوانه زدن از غشا سلول میزبان ممکن است یک غشای موقتی و ناپایدار در اطراف ویروس وجود داشته باشد. ساختمان ویروس زبان آبی از دو لایه کپسید تو در تو با تقارن بیست وجهی شکل گرفته است. کپسید خارجی از دو پروتئین VP_2 و VP_5 بوجود آمده است. کپسید داخلی[۵] از دو لایه تشکیل شده است. لایه خارجی توسط پروتئین VP_7 و لایه داخلی از پروتئین VP_3 حاصل شده است. ژنوم ۱۰ قطعه‌ایی ویروس از جنس ds

[1] -BTV Serogroup
[2] -Prototype
[3] -Epidemic hemorrhagic disease virus
[4] -Serotype
[5] -core

RNA بوده و با پروتئین‌های ساختمانی فرعی VP_1 و VP_4 و VP_6 در کپسید داخلی تجمع یافته-اند(۶۵،۷۸). شکل ۱ به طور شماتیک ساختمان و اجزا ویروس زبان آبی را به نمایش گذاشته است.



شکل ۱-۱: ساختمان ویروس زبان آبی و اجزای آن (۷۸)

۱-۴-۱ خصوصیات فیزیکو شیمیایی BTV

وزن مولکولی ویریون کامل $۱۰/۸\times۱۰^{۷}$، کپسید داخلی $۶/۷\times۱۰^{۷}$ می‌باشد. چگالی ویروس در کلرید سزیم $۱/۳۶\ g/cm^3$ است. قدرت عفونت‌زایی ویروس در pH ۸ الی ۹ محفوظ است. اما خارج از طیف ۱۰/۲ – ۶/۵ عفونت‌زایی آن به سرعت از بین می‌رود. در pH زیر ۵ ویریون و کپسید داخلی به سرعت متلاشی می‌شوند. به طور کلی اربی ویروس‌ها نسبت به روتا ویروس‌ها و ارتورئو ویروس‌ها بسیار شکننده و حساس هستند (۶۵).

BTV در خون، سرم و آلبومین با دمای ۵ درجه سانتیگراد چند سال فعال می‌ماند. حتی مشاهده شده است که ویروس خالص در دمای ۴ درجه سانتیگراد در محلول ۰/۱ M تریس و کلرید سدیم (pH = ۸) بعد از یک سال عفونت‌زایی خود را حفظ کرده است. دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به سرعت این ویروس را

تخریب می‌کند. به طور کلی اربی ویروس‌ها نسبت به حلال‌ها و دترجنت‌ها (به غیر از SDS[1]) مقاوم‌اند. انجماد عفونت‌زایی BTV را تا ۹۰٪ کاهش می‌دهد. البته چنانچه از شرایط انجماد زیر ۷۰- درجه سانتیگراد استفاده شود قدرت عفونی ویروس به طور قابل ملاحظه حفظ خواهد شد. اما در ۲۰- درجه سانتیگراد پایداری ویروس طولانی مدت نیست. انجماد و ذوب شدن‌های مداوم قدرت عفونت‌زایی ویروس را زایل می‌کند.

۱-۴-۲ کپسید خارجی

ساختمان BTV حاوی ۸۸ – ۸۰/۵٪ پروتئین است. کپسید خارجی از ۱۸۰ مولکول VP_2 با وزن مولکولی KD_a ۱۱۱ و ۳۶۰ مولکولی VP_5 با وزن KD_a ۵۹ حاصل شده است. پروتئین‌های VP_2 در ۶۰ دسته سه‌تایی و به شکل پروانه[2] در خارجی‌ترین بخش کپسید دیده می‌شوند. مولکول‌های VP_5 نیز در ۱۲۰ شکل تریمری سازمان یافته و فضاهای بین و زیرین پروتئین‌های VP_2 را اشغال نموده‌اند. مولکول-های VP_2 و VP_5 به طور مستقل از یکدیگر بر روی سطح کپسید داخلی گردهم آمده‌اند (۷۸،۶۵). VP_2 از متغیرترین پروتئین‌های موجود در ساختمان BTV بوده و عمده‌ترین محرک سیستم ایمنی و مسؤل تولید آنتی‌بادی‌های تعیین کننده سروتیپ ۲۴ گانه و خنثی کننده ویروس است. با توجه به دخالت VP_2 در اتصال ویروس به سلول‌های میزبان مهره‌دار، منجر به تغییرات مستمر آن و ایجاد سویه‌های جدید گردیده است (۶۵). این پروتئین در اتصال به گلبول‌های قرمز و ایجاد پدیده هماگلوتیناسیون شرکت دارد (۷۸). VP_5 نیز در تعیین سروتیپ ویروس و تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ویروس نقش دارد اما

[1] -Sodium dodecyl sulfate
[2] -Trimer

اهمیت آن به مراتب کمتر از VP_2 می‌باشد (۳۴، ۷۸). تریمرهای VP_5 درست بر روی روزنه‌های سطح کپسید داخلی قرار دارند و سطح تماس آنها با این بخش کمتر از سطح تماس VP_2 است (۷۹).

۱-۴-۳ کپسید داخلی

قطر کپسید داخلی حدود ۷۳ nm بوده و دارای ضریب رسوبی S ۴۷۰ می‌باشد. کپسید داخلی بر خلاف ویریون کامل BTV از ساختمان بسیار محکم و استوار برخوردار است. این موضوع به دلیل وظیفه بیولوژیک آن است. کپسید داخلی از دو لایه پروتئینی با تقارن بیست وجهی (T^{1} = ۱۳) تشکیل شده است. لایه سطحی از ۷۸۰ مولکول VP_7 در ۳۶۰ عدد تریمر ایجاد شده است. تریمرها به صورت حلقه-های هگزامری و پنتامری آرایش یافته‌اند. نام جنس اربی ویروس از همین ساختمان حلقه مانند[۲] که در میکروسکوپ الکترونی مشاهده می‌شود اخذ گردیده است. تریمرهای VP_7 در پنج موقعیت مکانی T , S , R , P , Q نسبت به محور تقارن پنج‌گانه قرار گرفته‌اند. هر مولکول VP_7 از دو ناحیه[۳] تشکیل شده است. ناحیه فوقانی ساختمان β-barrel دارد. ناحیه تحتانی که با لایه زیرین ارتباط دارد از مارپیچ α شکل گرفته است (۷۶). تریمرهای VP_7 که به شکل مثلث هستند اطراف ۱۳۲ روزنه به قطر ۸ آنگستروم با نام‌های III , II , I را فرا گرفته‌اند. روزنه‌های نوع III , II توسط مولکول‌های VP_5 کپسید خارجی مسدود شده‌اند (۴۱). شایان ذکر است کپسید داخلی ویروس زبان آبی چنانچه به صورت خالص تهیه شود، خاصیت کریستالیزه شدن دارد. کریستال کپسید داخلی در دمای ۲۹ درجه سانتیگراد به مدت طولانی سالم می‌ماند.

---
[1]- Triangulation number
[2] -Orbis
[3] -Domain

در برخی از گونه‌های اربی ویروس مانند ویروس طاعون اسبی[1] کریستال‌های VP_7 در سیتوپلاسم سلول-های آلوده ایجاد می‌گردد. لایه زیرین کپسید داخلی[2] از تقارن بیست وجهی شبه متقارن[3] (T = ۲) برخوردار است. این لایه قطری حدود ۵۹ nm و ضریب رسوبی ۳۹۰ S دارد. این بخش از BTV ، از ۱۲۰ مولکول VP_3 با وزن مولکولی ۱۰۳ KD_a شکل گرفته است. در ایجاد لایه زیرین دو نوع مولکول VP_3 با نام‌های A , B شرکت دارند. VP_3B و VP_3A از نظر توالی اسیدهای آمینه به طور کامل یکسان هستند. تنها تفاوت آن‌ها شکل فضایی آن‌ها است. به بیان دیگر لایه زیرین از ۱۲ عدد دکامر[4] به وجود آمده است. در هر دکامر ۵ عدد مولکول VP_3A و ۵ عدد مولکول VP_3B وجود دارد. پروتئین VP_3A اطراف یک روزنه در محور تقارن ۵ طرفه را اشتغال نموده‌اند. این روزنه‌ها توسط تریمرهای نوع T در لایه VP_7 مسدود شده‌اند (۹۷). فضای بین مولکول‌های A توسط ۵ عدد VP_3B مفروش شده‌اند، که از محور تقارن دورتر می‌باشند. لبه‌های خارجی دکامرها به صورت زیکزاگ با یکدیگر اتصال می‌یابند (۷۸، ۶۵، ۶۴).

۱-۴-۴ پروتئین‌های جزئی ساختمانی[5]

فضای داخلی کپسید داخلی، قطری در حدود ۴۲ nm حجمی معادل $۶۰/۶\times۱۰^{۶}\ A^{\circ 3}$ دارد. در این فضا ژنوم ۱۰ قطعه‌ایی ویروس همراه با سه پروتئین، VP_1 یا آنزیم پلی‌مراز[1]، VP_4 یا آنزیم کلاهک گذاری[2] و VP_6 یا آنزیم هلیکاز[3] قرار گرفته‌اند (۷۸).

---
[1]- African Horse Sickness
[2]-Subcore
[3] -Pseudo symmetry
[4]- Decamer
[5]- Minor structural protein

مطالعات کریستالوگرافی با اشعه X ساختارهای متراکم الکترونی به شکل گل رز در داخل لایه VP_3 را نشان می‌دهد. در درون کپسید داخلی ویروس زبان آبی۱۲ – ۱۰ عدد از این ساختمان‌ها مشاهده می‌شود. این مجموعه را اصطلاحاً کمپلکس رونوشت‌برداری[۴] یا TC می‌نامند. در ترکیب TCها سه مولکول پروتئین ساختمانی VP_1 و VP_4 و VP_6 شرکت دارد. هر TC منحصراً با یکی از قطعات ژنومی ویروس ارتباط دارد. محل استقرار کمپلکس‌ها درست در سطح زیرین روزنه‌های موجود در محور تقارن ۵ گانه و لایه VP_3 می‌باشد (۷۹). در ساختار کمپلکس‌های رونوشت‌برداری توده مرکزی مربوط به VP_1 است و ساختارهای حاشیه‌ای که به VP_3 نزدیک است مربوط به VP_4 می‌باشد. شایان ذکر است که محل قرار گرفتن VP_6 هنوز به طور دقیق مشخص نیست (۷۹).

۱-۴-۴-۱ آنزیم پلی‌مراز (VP_1)

VP_1 بزرگترین (۱۰۰۰ KDa) و در عین حال کم غلظت‌ترین پروتئین ساختمانی BTV است. بررسی ساختمانی مولکولی VP_1 شکل منحصربفرد RdRP را که در کلیه رئوویروس‌ها یکسان می‌باشد، اثبات نموده است. این ساختمان شامل ناحیه‌ای مانند انگشت شصت، کف دست و سایر انگشتان می‌باشد. وظیفه این پروتئین تولید mRNA از dsRNA و همچنین تولید ssRNA منفی از روی رشته‌های ssRNA مثبت می‌باشد. این آنزیم در حضور یون منیزیم فعال شده و تا زمانی که ساختمان کپسید داخلی سالم باشد فعال است. اوج فعالیت پلی‌مراز BTV در دمای ۳۷ – ۲۷ درجه سانتیگراد است. لذا هم در سلول حشرات و هم پستانداران فعال می‌باشد (۷۸).

---

[1]- RNA dependent RNA polymerase or RdRP
[2] -Capping enzyme
[3] -Helicase
[4] -Transcription Complex (TC)s