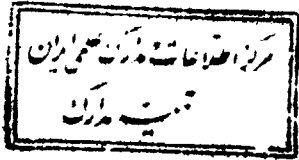
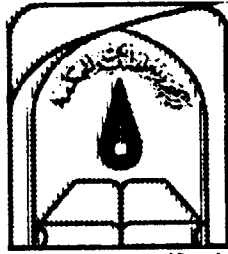




۲۷۰۹۹



۱۳۷۸ / ۸ / ۲۰



دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

## پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ویروس شناسی

موضوع :

راه اندازی و به کارگیری روش الیزابه منظور نشان دادن و تعیین عیار

*IgM* ضد ویروس هرپس انسانی تیپ ۱

نگارنده :

مهرداد روانشاد

استاد راهنما :

دکتر محمد حسن روستایی

استاد مشاور :

دکتر علی مصطفایی

تابستان ۱۳۷۸

۱۴۳۲۳

۲۷۰۴۹

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

بدینوسیله پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای مهرداد روانشاد  
تحت عنوان راه اندازی و به کارگیری روش الیزا به منظور نشان دادن و تعیین عیار Igm ضد ویروس هرپس انسانی  
تیپ یک

قدیم 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:

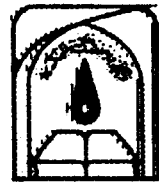
دکتر آقای دکتر محمد حسن روستایی (استاد راهنما) فرزند حسن

آقای دکتر علی مطصفایی (استاد مشاور)

سرکار خانم حوریه سلیمانجاهی (استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی)

آقای دکتر زهیر محمد حسن (استاد ناظر)

آقای دکتر فروزنده مقدم (استاد ناظر)



## باسمه تعالی

### 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، مبین بخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (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 پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته وپروس شناسی است که در سال ۱۳۷۸ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر محمد حسن روستایی، مشاوره جناب آقای دکتر علی مصطفایی و مشاوره سرکار خانم دکتر حوریه سلیمانجاهی 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 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، تأدیه کند.

ماده ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای 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 مهرداد روانشاد دانشجوی رشته وپروس شناسی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی:

تاریخ و امضا:

تحفہ ای نثار  
رنجہای خاموش مادرم  
و فداکاریهای پنهانی پدرم،  
برادرم که همواره حامی و یاور من است.

با تشکر و سپاس از :

جناب آقای دکتر محمد حسن روستایی، استاد عالیقدر و مدیر محترم گروه ویروس‌شناسی که راهنمایی اینجانب را در طول مدت انجام این پایان‌نامه و مدت تحصیل بر عهده داشته‌اند.

جناب آقای دکتر علی مصطفایی، استاد مشاور، که در طی اجرای پایان‌نامه از راهنماییها و تجربیات بسیار ارزشمند و همچنین از حمایت‌های بی دریغشان بهره‌مند بودم.

سرکار خانم دکتر حوریه سلیمانجاهی، استاد مشاور، که با کمکها و راهنمایی‌های دلسوزانه، مرا در انجام پایان‌نامه یاری نمودند.

سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی، که در پیش‌برد این پایان‌نامه صمیمانه همکاری نمودند.

با تشکر و سپاس فراوان از دوستان و همکاران عزیز آقای محمدرضا میرزازاد و سرکار خانم فاطمه رودباری.

## خلاصه فارسی

ویروس هرپس انسانی تیپ یک (HHV-1) از اعضای زیر خانواده آلفا هرپس ویرینه و خانواده هرپس ویریده می‌باشد. این ویروس قادر به ایجاد عفونت در انسان می‌باشد. ویروس HHV-1 در همه نقاط دنیا وجود دارد و انتقال آن از طریق تماس مستقیم با ترشحات عفونی صورت می‌گیرد. ضایعات ایجاد می‌تواند توسط این ویروس به شدت عفونت‌زا هستند و فرد آلوده خود می‌تواند عفونت را به نقاط دیگر بدن خود انتقال دهد. ممکن است اطفال در زمان تولد در کانال زایمان در معرض ویروس قرار گرفته و عفونت به آنها انتقال یابد. عفونتهای اولیه دارای طیف وسیعی، از عفونتهای بدون علامت تا عفونتهای کشنده می‌باشند، اما در اغلب موارد، عفونت خفیف و خود به خود بهبودی می‌یابند. عفونتهای هرپسی دارای اهمیت ویژه‌ای در بیماران با نقص سیستم ایمنی می‌باشد و در آنها ایجاد عفونتهای مزمن و یا شدید می‌کند. میزان شیوع این عفونتها در جوامع مختلف ریشه در وضعیت اقتصادی و اجتماعی جامعه مورد مطالعه دارد.

در این پژوهش، از روش الیزا برای اندازه‌گیری Igm بر ضد HHV-1 در عفونتهای اولیه استفاده شد. در مرحله اول، بخش ثابت (Fc) ملکول Igm انسانی در مراحل مختلف تهیه و خالص سازی شد و سپس آنتی سرم آن در خرگوش تهیه گشت. پس از خالص سازی، آنتی سرم با آنزیم پراکسیداز کونژوگه شد. همچنین HHV-1 در ردههای سلولی و روکشت و خالص سازی شد و به عنوان آنتی ژن در تست الیزا به کار گرفته شد. برای تهیه آنتی سرم خرگوش بر ضد HHV-1 ابتدا ویروس بر روی رده سلولی هلاکشت داده شد و آنتی سرم آن در خرگوش تهیه شد. به وسیله این محصولات روش Capture ELISA طراحی شد و بیش از ۴۰۰ نمونه سرمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**واژه‌های کلیدی: ویروس هرپس، آزمون الیزا، ایمونوگلوبولین M**

## فهرست مطالب

۱	فصل اول، مقدمه
۵	فصل دوم، مروری بر مطالعات انجام گرفته
۶	۱-۲ تاریخچه
۷	۱-۲ طبقه بندی
۸	۳-۲ ساختمان
۹	۱-۳-۲ ساختمان ژنوم
۱۰	۲-۳-۲ کپسید و پوشینه ویروس
۱۱	۴-۲ تکثیر ویروس
۱۳	۵-۲ خصوصیات آنتی ژنتیک
۱۴	۶-۲ اپیدمیولوژی
۱۶	۷-۲ ایمونولوژی
۱۷	۸-۲ پاتوژنز
۱۹	۹-۲ نشانه های بالینی
۱۹	۱-۹-۲ عفونت مادرزادی
۱۹	۲-۹-۲ عفونت دوران نوزادی و طفولیت
۲۱	۳-۹-۲ عفونت در بالغین و بزرگسالان
۲۲	۴-۹-۲ آنسفالیت ویروس هرپس سیمپلکس انسانی
۲۳	۱۰-۲ درمان
۲۴	۱۱-۲ پیشگیری



۲۶	فصل سوم، مواد و روشها
۲۷	۱-۳ اهداف کلی تحقیق
۲۷	۲-۳ اهداف جزئی تحقیق
۲۷	۳-۳ فرضیات
۲۸	۴-۳ آماده سازی وسایل و مواد مورد نیاز کشت یاخته
۲۸	۱-۴-۳ شستشوی وسایل
۲۹	۲-۴-۳ استریل کردن و بیرون سازی
۳۰	۵-۳ کشت یاخته
۳۰	۱-۵-۳ محیط کشت یاخته
۳۱	۲-۵-۳ نحوه کشت یاخته و نگهداری آن
۳۳	۶-۳ تهیه و تکثیر ویروس جهت تست خنثی سازی ویروس
۳۵	۷-۳ تعیین عیار ویروس
۳۷	۸-۳ آزمایش خنثی کنندگی ویروس
۳۹	۹-۳ تهیه آنتی سرم ضد IGM انسانی در خرگوش
۳۹	۱-۹-۳ تهیه سرم انسان از پلاسما
۴۰	۲-۹-۳ مراحل تخلیص IGM از سرم انسان
۴۰	۱-۲-۹-۳ تهیه بخش غنی از IGM سرم انسان با روش رسوب دهی توسط پلی اتیلن گلیکول
۴۲	۲-۲-۹-۳ خالص سازی IGM با کمک کروماتوگرافی ستونی
۴۳	۳-۲-۹-۳ خالص سازی IGM با روش کروماتوگرافی جذبی
۴۵	۴-۲-۹-۳ شکستن ملکول IGM با استفاده از آنزیم تریپسین
۴۷	۵-۲-۹-۳ خالص سازی بخش ثابت ملکول IGM انسانی با کمک کروماتوگرافی ستونی

- ۴۸ ..... ۳-۹-۳ رسوب دادن بخش ثابت ملکول IgM انسانی با استفاده از سولفات آمونیم اشباع.
- ۴۹ ..... ۳-۹-۴ جداسازی نمک سولفات آمونیم از رسوبات.
- ۵۱ ..... ۳-۱۰-۱ تست انتشار شعاعی یگانه و دوگانه.
- ۵۳ ..... ۳-۱۱-۱ الکتروفورز پلی اکریل آمید در حضور سدیم دو سیل سولفات.
- ۵۶ ..... ۳-۱۲-۲ ایمن سازی خرگوش با استفاده از IgM انسانی.
- ۵۷ ..... ۳-۱۳-۱ خالص سازی آنتی بادی ضد IgM انسانی از سرم خرگوش.
- ۵۸ ..... ۳-۱۳-۱ رسوب دادن گاما گلوبولین های خرگوش با استفاده از سولفات آمونیم.
- ۵۹ ..... ۳-۱۳-۲ خالص سازی IgG خرگوش (ضد IgM انسانی) با روش کروماتوگرافی تعویض یونی.
- ۶۰ ..... ۳-۱۳-۳ خالص سازی IgG خرگوش (علیه IgM انسانی) با کمک ستون کروماتوگرافی جذبی.
- ۶۲ ..... ۳-۱۴-۱ تهیه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک جهت آزمایش الیزا.
- ۶۳ ..... ۳-۱۵-۱ خالص سازی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک جهت آزمایش الیزا.
- ۶۴ ..... ۳-۱۶-۱ تهیه آنتی سرم ضد ویروس هرپس سیمپلکس انسانی تیپ یک در خرگوش.
- ۶۶ ..... ۳-۱۷-۱ راه اندازی تست الیزا.
- ۶۹ ..... ۳-۱۷-۱ فاز جامد الیزا.
- ۶۹ ..... ۳-۱۷-۲ اتصال آنتی بادی به سطح جامد پلیت الیزا.
- ۷۰ ..... ۳-۱۷-۳ شستشو.
- ۷۱ ..... ۳-۱۸-۱ کونژوگه نمودن آنزیم پراکسیداز و آنتی بادی ضد IgM انسانی.
- ۷۳ ..... ۳-۱۹-۱ تعیین عیار کونژوگه علیه آنتی بادی IgM انسانی.
- ۷۴ ..... ۳-۲۰-۱ تعیین عیار آنتی بادی IgM انسانی ضد ویروس هرپس سیمپلکس انسانی تیپ یک در سرم افراد مورد مطالعه، با استفاده از روش الیزا.

۷۷	فصل چهارم، نتایج
۷۸	(۱-۴) نتایج تعیین عیار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی به روش ماکرو
۷۹	(۲-۴) نتایج تعیین عیار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی به روش میکرو
۸۲	(۳-۴) نتایج تست خنثی‌کنندگی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی به روش میکرو
۸۳	(۴-۴) نتیجه جداسازی IgM انسانی از رسوبات، با کروماتوگرافی ستونی
۸۶	(۵-۴) نتایج به دست آمده از خالص‌سازی IgM انسانی با کمک ستون کروماتوگرافی جذبی
۸۷	(۶-۴) نتیجه به دست آمده از درجه خلوص IgM با روش پلی‌اکریل‌آمید
۸۸	(۷-۴) نتایج به دست آمده از شکستن ایمنوگلوبولین IgM انسانی
۸۸	(۸-۴) نتایج به دست آمده از ایمن‌سازی خرگوش با کمک IgM انسانی
۸۹	(۹-۴) نتایج خالص‌سازی IgG خرگوش (ضد IgM انسانی) با ستون کروماتوگرافی تعویض یونی
۸۹	(۱۰-۴) نتایج خالص‌سازی IgG خرگوش (ضد IgM انسانی) با ستون کروماتوگرافی جذبی
۹۰	(۱۱-۴) نتایج به دست آمده از تهیه آنتی‌سرم علیه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در خرگوش
۹۱	(۱۲-۴) نتایج به دست آمده از تعیین عیار کونزوگه ضد IgM انسانی
۹۱	(۱۳-۴) نتایج تعیین عیار آنتی‌بادی IgM انسانی علیه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در سرم افراد مورد مطالعه با استفاده از روش الیزا
۹۳	فصل پنجم، بحث و پیشنهادها
۹۴	(۱-۵) بحث و نتیجه‌گیری
۹۹	(۲-۵) پیشنهادها
۱۰۱	منابع

## فهرست جدولها

- جدول ۱-۲) انسیدانس عفونت هرپس سیمپلکس تیپ یک بر اساس سن و محلّ گرفتاری طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۹۸..... ۱۴
- جدول ۱-۳) غلظتهای مورد استفاده برای ژل جداکننده الکتروفورز پلی اکریل آمید..... ۵۴
- جدول ۲-۳) غلظتهای مورد استفاده برای ژل متراکم کننده الکتروفورز پلی اکریل آمید..... ۵۵
- جدول ۱-۴) نتایج تعیین عیار ویروس هرپس سیمپلکس انسانی تیپ یک با روش ماکرو..... ۷۸
- جدول ۲-۴) نتایج تعیین عیار ویروس هرپس سیمپلکس انسانی تیپ یک با روش ماکرو..... ۸۰
- جدول ۳-۴) نتایج ژل فیلتراسیون بخش غنی از IGM، (مرحله اول) در رزین سفاروز سی ال ۶ بی..... ۸۳
- جدول ۴-۴) نتایج جذب فراکسیونهای جمع آوری شده از ستون کروماتوگرافی در مرحله دوم..... ۸۵

## فهرست شکلها و نمودارها

- شکل ۱-۲) شکل میکروسکپ الکترونی ویروس هرپس سیمپلکس انسانی ..... ۸
- شکل ۲-۲) چهار ایزومر ژنوم ویروس هرپس سیمپلکس انسانی تیپ یک ..... ۱۰
- شکل ۱-۳) شکل شماتیک ملکول پتامر IGM و محل اثر آنزیم تریپسین ..... ۴۶
- شکل ۲-۳) مقایسه شماتیک انواع معمول روش الیزا ..... ۶۸
- شکل ۱-۴) منولایر رده سلولی پایدار هیلا ..... ۸۰
- شکل ۲-۴) CPE ویروس هرپس سیمپلکس انسانی تیپ یک بر روی یاخته هیلا ..... ۸۱
- شکل ۳-۴) CPE ویروس هرپس سیمپلکس انسانی تیپ یک بر روی یاخته ورو ..... ۸۱
- نمودار ۱-۴) درصد عیار آنتیبادیهای خشی کننده ضد ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک ..... ۸۲
- نمودار ۲-۴) نمودار ژل فیلتراسیون بخش غنی از IGM، مرحله اول در رزین سفاروز سی ال ۶ بی ..... ۸۴
- نمودار ۳-۴) نمودار مرحله دوم ژل فیلتراسیون بخش غنی از IGM، در رزین سفاروز سی ال ۶ بی ..... ۸۶
- نمودار ۴-۴) نتایج جذب فراکسیونهای جمع آوری شده از ستون کروماتوگرافی جذبی ..... ۸۶
- شکل ۴-۴) نتیجه به دست آمده از الکتروفورز (پلی اکریل آمید) IGM خالص شده ..... ۸۷
- نمودار ۵-۴) نتایج ژل فیلتراسیون مربوط به خالص سازی بخش ثابت IGM ..... ۸۸
- نمودار ۶-۴) نتایج جذب فراکسیونهای ستون کروماتوگرافی تعویض یونی جهت خالص سازی IgG خرگوش ..... ۸۹
- ضد IGM انسانی ..... ۸۹
- نمودار ۷-۴) نتایج جذب فراکسیونهای ستون کروماتوگرافی جذبی جهت خالص سازی IgG خرگوش ضد IGM ..... ۹۰
- انسانی ..... ۹۰
- نمودار ۸-۴) افزایش میزان آنتیبادی علیه ویروس هرپس انسانی تیپ یک در خرگوش ..... ۹۱
- نمودار ۹-۴) نتایج تعیین عیار IGM انسانی در سرم افراد مورد مطالعه ..... ۹۲

# فصل اوّل

## مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی<sup>۱</sup>، از جمله شایعترین و مسریترین ویروسهای بیماریزا در انسان می باشد. این ویروس از راه دهان، دستگاه تنفس، تماس مستقیم شخص به شخص، در زمان عبور نوزاد از کانال زایمان و تماس جنسی انتقال می یابد و وارد بدن فرد مستعد می گردد. عفونت اولیه معمولاً به شکل تاولهای مجتمع و دسته‌ای بر روی پوست و یا غشاء مخاطی ظاهر می شود. این تاولها به سرعت به زخم و سپس به کبیره تبدیل می شوند و در آخر بهبود می یابند. البته عفونت اولیه را به شکل تورم دهان، تورم لثه‌ها<sup>۲</sup> و تورم حلق<sup>۳</sup> نیز می توان مشاهده نمود.

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی در نوزادان و افراد دارای نقص سیستم ایمنی می تواند باعث آلودگی و عفونت کبد، غدد آدرنال و چشم‌ها و به دنبال آن کوری گردد و نیز با هجوم به سیستم اعصاب مرکزی و مغز باعث بروز آنسفالیت (تورم مغز)، مننژیت و مرگ شود (۵۴).

---

۱- *Herpes simplex virus type 1*

۲- *Gingivostomatitis*

۳- *Pharyngitis*