



اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی



دانشکده دامپزشکی

عنوان طرح پژوهشی:

راه اندازی و بکارگیری تست تشخیصی ایمونوهیستوپاتولوژی در

پایش وضعیت بیماری جنون گاوی

دستگاه سفارش دهنده (کارفرما):

اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی

مجری طرح پژوهشی:

دکتر زهرا موسوی

استادیار دانشکده دامپزشکی فردوسی مشهد

سال ۱۳۹۸

بهر حرم



اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی

عنوان طرح پژوهشی:

راه اندازی و بکار گیری تست تشخیصی ایمونوهیستوپاتولوژی در

پایش وضعیت بیماری جنون گاوی

دستگاه سفارش دهنده (کارفرما):

اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی

مجری طرح پژوهشی:

دکتر زهرا موسوی

استادیار دانشکده دامپزشکی فردوسی مشهد

همکاران: دکتر مجتبی عاشوری، دکتر ناصر مرگان ازغدی، دکتر علی فنایی نوکار،

دکتر محمد باغبان گل آبادی، مهندس علی زواری، مهندس امیر نوروزی

سال ۱۳۹۸

برنام آفرنده

که به قلم و آنچه می نویسد گویند یاد کرد.

علم و تحقیق کلید قطعی پیشرفت کشور است . ((مقام معظم رهبری))

پژوهش، فرآیند تولید علم است و تولید فناوری به کارگیری یافته های پژوهشی است و تاثیرگذاری پژوهش و فناوری در تمدن کنونی دنیا و در آینده ی آن بسیار روشن و بدیهی است. ارتقای جایگاه پژوهش با افزایش اعتماد به نفس ، اراده ی مستقل و پذیرش خطر تجربه ، در بوجود آمدن ساختارهای دانایی محور و تقویت این مهم نقش محوری دارد.

نظر به اسناد بالا دستی توسعه علمی کشور و نیز به جهت رفع نیازهای واقعی جامعه، با استعانت از خداوند متعال طرح پژوهشی

*** راه اندازی و بکار گیری تست تشخیصی ایمونوهیستوپاتولوژی در پایش وضعیت بیماری جنون گاوی ***

در راستای اجرای دستورالعمل انجام طرح های پژوهشی تکالیف قانون بودجه سال ۱۳۹۸ و پس از تایید موضوع فوق در کارگروه تخصصی آموزش و فن آوری و نوآوری استان خراسان رضوی به انجام رسیده است .

بدین وسیله از کلیه دست اندرکاران اجرای طرح شامل مجری گرامی ، دستگاههای اجرایی از جمله کمیته آموزش و پژوهش دامپزشکی استان ، دبیرخانه محترم کارگروه آموزش و پژوهش و فناوری و نوآوری خراسان رضوی، دانشگاه محترم فردوسی مشهد، سازمان مدیریت و برنامه ریزی خراسان رضوی و استانداری محترم خراسان رضوی و نیز همکاران عزیز اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی که به هر نحوی در مراحل مختلف بررسی ، تصویب ، نمونه برداری، آزمون ، پردازش ، تحلیل ، نتیجه گیری و در نهایت تدوین کتابچه حاصل تلاش و پشتیبانی نموده اند ، تقدیر و تشکر می گردد.

امید است اجرای تحقیقات کاربردی دستمایه مناسبی در راستای کنترل و پیشگیری از بیماریهای مشترک بین انسان و دام ، بیماریهای واگیر دامی و تامین امنیت غذایی از راه کنترل فرآورده های خام دامی، به منظور اجرای بهتر خدمت رسانی به مردم مهربان کشور عزیزمان جمهوری اسلامی ایران ایجاد کند .

دکتر احمد شریقی

مدیرکل دامپزشکی خراسان رضوی

چکیده

بیماری های با منشأ غذایی از مهمترین مشکلات جوامع بین المللی در ارتباط با سلامت عمومی و همچنین از دلایل اصلی کاهش رشد اقتصادی می باشند.

جنون گاوی یا آنسفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی بیماری کشنده و دژنراتیو سیستم اعصاب مرکزی قابل انتقال گاو می باشد. این بیماری یک هفته تا چند ماه پس از بروز نشانه های بالینی سبب مرگ گاو می شود. میانگین دوره کمون بیماری ۴ تا ۵ سال است. این بیماری در دام های بالغ در هر دو جنس نر و ماده مشاهده شده و حساسیت تمامی نژادها در برابر ابتلاء به بیماری یکسان است. از آنجا که استفاده از بافت های مخاطره آمیز دام بیمار می تواند بیماری را منتقل نماید، اهمیت فوق العاده ای از نظر بهداشت عمومی پیدا نمود و همچنین از نظر تجارت دام و تولیدات دامی محدودیت هایی را ایجاد نموده است.

در نتیجه روش ایمونوهیستوشیمی می تواند علاوه بر ارائه مدارک و مستندات ضروری و مورد قبول جوامع جهانی جهت تعیین جایگاه کشور از لحاظ سطح آلودگی، در زمینه کنترل و ریشه کنی این بیماری در کشورهایی که احتمالاً با بیماری درگیر می باشند، نقش بسزایی داشته باشد.

در این پژوهش از تعداد یکصد راس گاو کشتار شده در کشتارگاه صنعتی مشهد که واجد حداقل یک علامت مشابه با علائم جنون گاوی بودند، نمونه مغز و ایلئوم جمع آوری و با استفاده از آنتی بادی اولیه مونوکلونال و آنتی بادی ثانویه به روش ایمونوهیستوشیمی غیر مستقیم رنگ آمیزی انجام شد و نتایج با کنترل مثبت مقایسه گردید. نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که تمامی نمونه ها از نظر جنون گاوی منفی می باشند.

کلمات کلیدی: جنون گاوی، ایمونوهیستوشیمی.

فهرست مطالب

۱	کلیات..... ۱۳
۱-۱	آنسفالوپاتی اسفنجی گاو..... ۱۳
۱-۱-۱	مقدمه..... ۱۳
۲-۱-۱	عامل بیماری جنون گاوی..... ۱۴
۳-۱-۱	پروتئین پریون سلولی PrP ^C ۱۴
۴-۱-۱	عملکرد فیزیولوژیک پروتئین پریون..... ۱۵
۵-۱-۱	ساختار پروتئین پریون PrP ^C و PrP ^{Sc} :..... ۱۵
۶-۱-۱	پاتوژنز بیماری های پریونی :..... ۱۷
۷-۱-۱	منشا بیماری جنون گاوی :..... ۱۸
۸-۱-۱	علائم بالینی بیماری جنون گاوی :..... ۱۹
۹-۱-۱	پیشگیری از بیماری جنون گاوی :..... ۱۹
۲-۱	تشخیص بیماری جنون گاوی :..... ۲۰
۱-۲-۱	ایمونوهیستوشیمی :..... ۲۰
۱-۱-۲-۱	تکنیک ایمونوآنزیمی..... ۲۱
۲-۱-۲-۱	رنگ آمیزی ایمونوآنزیمی مستقیم..... ۲۱
۳-۱-۲-۱	روش پلی '..... ۲۲
۴-۱-۲-۱	رنگ آمیزی ایمونوآنزیمی غیرمستقیم..... ۲۲
۵-۱-۲-۱	تکنیک آنزیم ضد آنزیم..... ۲۲
۶-۱-۲-۱	تکنیک آویدین-بیوتین..... ۲۳

۲۳.....	کروموژن ها	۷-۱-۲-۱
۲۴.....	روش های تشدید واکنش	۸-۱-۲-۱
۲۴.....	تشدید رنگ آمیزی توسط ایمیدازول	۹-۱-۲-۱
۲۴.....	تشدید رنگ آمیزی با استفاده مکرر از آنتی بادی اولیه	۱۰-۱-۲-۱
۲۵.....	سوابق پژوهش	۳-۱
۲۸.....	مواد و روش کار	۲
۲۸.....	هدف:	۱-۲
۲۸.....	دامنه و حوزه کاربرد:	2-2
۲۸.....	حد تشخیص :	۳-۲
۲۸.....	شرایط دام های قابل نمونه گیری:	۴-۲
۲۹.....	نمونه های لازم :	۵-۲
۲۹.....	نمونه مغز	۱-۵-۲
۲۹.....	نمونه روده :	۲-۵-۲
۲۹.....	شرایط ارسال نمونه ها	۳-۵-۲
۳۰.....	تعداد نمونه	۴-۵-۲
۳۰.....	اصول ایمنی و شرح عوامل خطر ساز:	۶-۲
۳۰.....	پوشیدن روپوش و استفاده از ماسک در زمان نمونه گیری و آزمایش الزامی بود.	۱-۶-۲
۳۰.....	جهت نمونه برداری از اسکالپل ، چاقو ، پنس و کیسه های استریل استفاده شد.	۲-۶-۲
۳۰.....	نمونه برداری در شرایط کاملا استریل انجام گرفت.	۳-۶-۲
۳۰.....	تجهیزات مورد نیاز تست:	۷-۲

مواد مورد نیاز تست: ۳۱.....	۸-۲
تهیه فرمالین بافر ۱۰ درصد ۳۳.....	۱-۸-۲
تهیه محلول Peroxidase Blocking Solution ۳۳.....	۲-۸-۲
تهیه محلول Phosphate Buffered Saline (PBS) 10X ۳۴.....	۳-۸-۲
تهیه محلول 10X PBS-Tween 20 ۳۴.....	۴-۸-۲
تهیه محلول Tris Buffered Saline (TBS) 10X ۳۵.....	۵-۸-۲
تهیه محلول DAB Peroxidase Substrate Solution – Brown ۳۵.....	۶-۸-۲
روش کار: ۳۶.....	۹-۲
آماده کردن بافت در آزمایشگاه ۳۶.....	۱-۹-۲
آغشتگی یا Impregnation ۳۷.....	۲-۹-۲
قالب گیری Embedding : ۳۸.....	۳-۹-۲
برش گیری Cutting : ۳۸.....	۴-۹-۲
دستگاه (واتر بس) یا دستگاه حمام آب گرم: ۳۹.....	۵-۹-۲
رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی: ۴۰.....	۶-۹-۲
روش انجام کار: ۴۰.....	۱-۶-۹-۲
نتایج ۴۵.....	۳
نتایج ایمونوهیستوشیمی در مغز: ۴۵.....	۱-۳
نتایج ایمونوهیستوشیمی در روده: ۴۵.....	۲-۳
بحث ۴۹.....	۳-۳

فهرست شکل ها

- شکل شماره ۱- محل نمونه گیری از مغز ۲۹
- شکل شماره ۲- نمونه کنترل مثبت BSE در مغز گاو ۴۶
- شکل شماره ۳- نمونه مغز در گاو ۴۷
- شکل شماره ۴- نمونه مغز در گاو ۴۸
- شکل شماره ۵- نمونه ایلئوم در گاو ۴۹

﴿مقدم﴾

جنون گاوی یا آنسفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی بیماری کشنده و دژنراتیو سیستم اعصاب مرکزی قابل انتقال گاوی می باشد. این بیماری یک هفته تا چند ماه پس از بروز نشانه های بالینی سبب مرگ گاوی می شود. میانگین دوره کمون بیماری ۴ تا ۵ سال است. این بیماری در دام های بالغ در هر دو جنس نر و ماده مشاهده شده وحساسیت تمامی نژادها در برابر ابتلاء به بیماری یکسان است. مهمترین نشانه های بیماری جنون گاوی ، دوره کمون طولانی (معمولاً ۴ تا ۵ سال)، اختلالات حرکتی ، تغییر در رفتار و ایجاد حالات غیرمعمول ، حساسیت زیاد نسبت به صدا ، ملامسه و نور ناگهانی ، کاهش وزن علی رغم وجود اشتها ، علائم عصبی ، لگد زدن هنگام شیر دوشی ، کاهش تولید شیر ، تغییرات رفتاری مانند تشویش ، حرکت با سرافتاده به پایین ، حرکات زیاد گوش ها ، بی میلی در عبور از درها و از یک سطح به سطح دیگر و میل به حمله می باشد. در سال ۱۹۹۶ شواهدی دال بر انتقال بیماری از گاو به انسان بدست آمد که متعاقباً تأیید شد. از آنجا که استفاده از بافت های مخاطره آمیز دام بیمار می تواند بیماری را منتقل نماید ، اهمیت فوق العاده ای از نظر بهداشت عمومی پیدا نمود و همچنین از نظرتجارت دام و تولیدات دامی محدودیت هائی را ایجاد کرده است. در ابتدا تصور می شد که عامل جنون گاوی در انسان باعث بیماری کروتز فیلد- جاکوب می گردد، ولی مطالعات بعدی نشان داد که انتقال جنون گاوی به انسان منجر به بیماری جدیدی گردیده است که واریانت جدید کروتز فیلد - جاکوب نامیده می شود.

با توجه به اهمیت بیماری و نقش مهم و حیاتی آن در بهداشت عمومی و تجارت جهانی ، در حال حاضر تجارت گوشت و تولیدات دامی از کشورهای نامشخص توسط مراجع بین المللی با محدودیت های جدی مواجه گردیده است. این مراجع ، کشورها را از نظر انجام اقدامات مراقبتی و مبارزه ای ، طبقه بندی می نمایند که در صورت وجود احتمال آلودگی ، کشورها را با دشواری های زیادی در زمینه تجارت روبرو خواهد نمود. در این ارتباط لازم است که مدارک و مستندات ضروری جهت تعیین جایگاه کشور ارائه گردد.

فصل اول

مروری بر تحقیقات انجام شده

۱ کلیات

۱-۱ آنسفالوپاتی اسفنجی گاو

۱-۱-۱ مقدمه

آنسفالوپاتی اسفنجی گاو^۱ BSE یک بیماری عفونی، کشنده و دژنراتیو در سیستم عصبی گاو می باشد. جنون گاوی اولین بار در انگلستان در سال ۱۹۸۶ شناسایی شد. این بیماری در گاو های بومی در قاره آسیا و امریکا و اروپا مشاهده شده است. به دنبال گسترش این بیماری در سایر نقاط دنیا و همچنین شناسایی وارسته های بیماری زای مشابه در انسان، سبب شد که این بیماری به عنوان یک بیماری مشترک بین انسان و دام بیش از گذشته مورد توجه قرار بگیرد. این بیماری به دو شکل کلاسیک^۲ (C-BSE) و آتیپیک^۳ (L-BSE) گزارش شده است. براساس مطالعات اپیدمیولوژیک و الگوی انتقال بیماری BSE، به عنوان یک بیماری تحت حاد در نظر گرفته می شود. بیماری جنون گاوی یک بیماری نوظهور بوده و جز بیماری های منتقله از غذا به شمار می آید. اهمیت و خسارات زیان بار ناشی از بیماری های منتقله از غذا در جهان سبب شده است که اقدامات موثری در سطح بین المللی برای کنترل و پایش سلامت غذایی در جهان وضع شده است. در خصوص بیماری انسفالوپاتی اسفنجی شکل جنون گاوی در فاصله سال های ۱۹۹۸-۱۹۹۰ در بریتانیا حدود ۹ میلیارد دلار خسارت بر کشور تحمیل گردید. لذا اهمیت مطالعات اپیدمیولوژیک و تشخیص و پایش این بیماری حائز اهمیت است.

^۱ Bovine Spongiform Encephalopathy

^۲ Classical- BSE

^۳ Atypical- BSE

سطح گوشت، محیط کاملی برای رشد گروه بزرگی از میکروارگانیسمها است زیرا دارای رطوبت بالا و سرشار از مواد غذایی نیتروژن دار بوده و به اندازه کافی دارای مواد معدنی و کربوهیدراتهای قابل تخمیر است.

۲-۱-۱ عامل بیماری جنون گاوی

از عوامل عفونی ایجاد کننده بیماری در طبیعت می توان به پروتوزوئر یا تک یاخته، ویروس ها، باکتری ها و پریون ها اشاره کرد. پریون اولین بار توسط پرو سینر در سال ۱۹۸۲ شنا سایی گردید پریون ها پاتوژن هایی از جنس پروتئین هستند که قادرند در موجودات مختلف بیماری ایجاد کنند. عامل ایجاد کننده بیماری BSE پریون غیر طبیعی PrP^{sc} است که ایزوفرم پاتولوژیک پریون طبیعی PrP^c می باشد (۲۰۱).

۳-۱-۱ پروتئین پریون سلولی PrP^c

از جنس PrP^c گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۳۳ الی ۳۵ کیلودالتون می باشد. ژن PrP توسط DNA کروموزومی میزبان رمزدهی می شود و PRNP نام دارد. این ژن دارای ۲۶۷ جفت باز بوده، بین PRNP دوزیستان و پستانداران حدود ۸۱٪ همسانی توالی ژنی وجود دارد. ژن PNRP عمدتاً در سیستم عصبی مرکزی و محیطی، سیستم لنفاوی و گوارشی و سیستم ایمنی وجود دارد. بیان ژن بیشتر در سلول های عصبی پیش سیناپسی و پس سیناپسی و سلول های گلیال مشاهده می شود. ژن PRNP در کروموزوم شماره ۱۳ گاو و گوسفند واقع است (۴۰۳).

۴-۱-۱ عملکرد فیزیولوژیک پروتئین پریون

وظیفه دقیق پروتئین PrP^c مشخص نیست، از نقش های فیزیولوژیک این پروتئین می توان به

موارد زیر اشاره نمود(۵).

- ۱- نقش در حافظه و یادگیری.
- ۲- تنظیم چرخه شبانه روزی خواب و بیداری.
- ۳- شرکت در پوشش میلین اطراف نورون ها.
- ۴- نقش تنظیم و تعدیل استرس های اکسیداتیو در اعصاب به علت دارا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی.
- ۵- تنظیم عنصر مس در داخل سلول های بدن و حفظ سلول های عصبی از اثرات سمی این یون ها.
- ۶- موثر در اتصالات بین سلولی و پیام رسانی سلول ها.

۵-۱-۱ ساختار پروتئین پریون PrP^c و PrP^{sc} :

پروتئین پریون به طور کلی در بین گونه های مختلف توالی اسید آمینه مشابه دارد و از لحاظ تکاملی

بسیار حفظ شده است. PrP^c در گاو واجد ۲۶۴ اسید آمینه با ساختار سه بعدی آلفا هلیکس می باشد. پریون

PrP^c از انتهای کربوکسیل خود به واسطه گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول به سطح غشای سلول های عصبی

و سایر سلول ها متصل می شود و از طریق انتهای آمینی خود با نواحی غنی از کلسترول و اسفنگولیپید و

کائولین ها موجود در غشای پلاسمایی ترکیب می شود. عملکرد پریون ها ناشناخته بوده اما اتصال این پروتئین

با غشای پلاسمایی نشانه ای از نقش آنها در تردد غشایی در داخل سلول ها و انتقال پیام های سلول می

باشد. انتهای آمینی ناحیه انعطاف پذیری بوده که گلیکوز آمینوگلیکان ها به این قسمت متصل می شود و

فاقد ساختار دوم پروتئینی مشخص است. توالی تکراری اکتاپپتیدی موجود در انتهای آمینی غنی از گوانین

بوده تمایل زیادی برای یون های مس، منگنز و روی دارد. انتهای کربوکسیل دارای ساختار ثانویه مارپیچ آلفا و صفحات بتا است. پیوند دی سولفیدی و دو ناحیه گلیکوزیله در انتهای کربوکسیل سبب پایداری PrP^c در این ناحیه می شود. عمدتاً پلی مورفیسیم در انتهای کربوکسیل اتفاق می افتد که مخزن جهش های نقطه ای می باشد. پلی مورفیسیم ژن PRNP می تواند فرم پاتولوژیک این پروتئین را ایجاد نماید. برای اولین بار ساندر و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مطالعه ای که روی پلئومورفیسیم حذف و درج ۱۲ و ۲۳ جفت بازی انجام دادند، اعلام کردند که این دو جایگاه روی حساسیت گاوها به جنون گاوی مؤثر است. تحقیقات نشان داد عملکرد ژن PRNP گاوی تحت تأثیر چند نوع پلئومورفیسیم واقع در اینترون (حذف و درج ۱۲ جفت بازی) و ناحیه بالای^۱ اگزون (حذف و درج ۲۳ جفت بازی) است. پلئومورفیسیم حذف و درج ۱۲ جفت بازی شامل محل اتصال فاکتور ترجمه SP1^2 (ناحیه ۳۰۰+) و پلئومورفیسیم حذف و درج ۲۳ جفت بازی شامل محل اتصال RP58^3 ، (پروتئین مانع شونده ۵۸۴ ناحیه ۱۵۹۴-) است. درج این دو پلئومورفیسیم باعث کاهش میزان بیان ژن PRNP و حذف آنها باعث افزایش میزان بیان این ژن می شود. درج این دو جایگاه باعث کاهش حساسیت و حذف این دو جایگاه باعث افزایش حساسیت گاوها به جنون گاوی می شود (۶-۸).

^۱ Upstream

^۲ Specific protein

^۳ Repressor Protein 58

برخلاف فرم طبیعی پریون ، PrP^{Sc} واجد صفحات بتا در ساختار خود بوده و نسبت به پروتئین کیناز K مقاوم می باشد. این ویژگی ها PrP^{Sc} سبب تجمع رشته های آمیلوئیدی در بافت عصبی، از دست رفتن و کاهش تعداد نورون ها در سیستم اعصاب مرکزی شده و با مرگ و آپوپتوز سلول های عصبی همراه است. عمدتاً ضایعات عصبی فرم کلاسیک این بیماری در ساقه مغز، نخاع ، عصب سه قلو و قسمت خاکستری مغز میانی ایجاد می شود (۹).

۱-۱-۶ پاتوزنز بیماری های پریونی :

حضور پریون های تغییر شکل یافته باعث تغییر در پریون های طبیعی شده که این روند ساز و کار ناشناخته ای دارد. روند تکثیر با سرعت به صورت واکنش های زنجیره ای اتفاق می افتد. تفاوت در ویژگی های پریون PrP^{Sc} از جمله افزایش تمایل این پروتئین ها برای اتصال به یکدیگر و کاهش حلالیت آنها، منجر به تشکیل رسوب در بافت ها می گردد. از آن جاییکه سیستم ایمنی قادر به تفکیک و شناسایی فرم PrP^{Sc} و PrP^C از یکدیگر نمی باشد، پاسخ ایمنی مناسب رخ نداده لذا تجمع و رسوب رشته های آمیلوئیدی در فضای بین سلولی مرگ سلول ها را رقم می زند و منجر به تشکیل واکوئل در مغز مبتلایان می شود. مهمترین بیماری های پریونی در حیوانات شامل انسفالو پاتی اسفنجی شکل (BSE) ، اسکرابی و بیماری تحلیل برنده مزمن^۱ در انسان شامل بیماری کروتزفلد- جاکوب^۲ ، بیماری خواب کشنده خانوادگی^۳ ، نشانگان

^۱ Chronic Wasting Disease (CWD)

^۲ Creutzfeldt-Jakob Disease

^۳ Fatal familial insomnia (FFI)

گرستمن – اشتراسلر-شنکر^۱ و بیماری کورو^۲ می باشد (۱۱۰ و ۱۱۱).

۷-۱-۱ منشا بیماری جنون گاوی :

منشا این بیماری همچنان ناشناخته است و تصور بر این است پودر گوشت و پودر استخوان دام های آلوده به جنون گاوی که برای افزایش بهره وری در غذای دام استفاده می شد، باعث انتقال این بیماری شده است. طبق نظریه دیگری این بیماری یک بیماری تک گیر و ژنتیکی بوده که بدنبال مصرف رژیم غذایی الوده (بازیافت گوشت و استخوان دام آلوده) گسترش یافته است. دوره کمون این بیماری ۲ تا ۵ سال می باشد و عمدتاً این بیماری در دام های نژاد شیری و ماده رخ می دهد و سن دام های مبتلا از چهار سال بیشتر است. به علت اینکه دام های نر در ۲ یا ۳ سالگی کشتار می شوند رخ داد بالینی بیماری در دام های نر مشاهده نشده است. از آن جایی که در دام های نر پیش از کشتار بیماری فاقد علامت است لذا احتمال انتقال عامل BSE به انسان افزایش می یابد. عامل بیماری BSE یک بیماری زئونوز بوده که در انسان بیماری کروتزفولد- جاکوب (vCJD) ایجاد می نماید. انتقال این بیماری می تواند در اثر تماس با لاشه دام های آلوده و از طریق زخمهای پوستی، مخاطات و ملتحمه چشم به انسان صورت پذیرد. انتقال این بیماری از طریق مصرف محصولات دامی آلوده در انسان نیز تاثیرات نامطلوبی در اقتصاد صنعت دامپروری و صنایع لبنی دارد و یکی از مهمترین نگرانی های بهداشت عمومی است. از این رو تشخیص سریع و دقیق BSE از اهمیت حیاتی در انجام اقدامات برای حفاظت از سلامتی انسان و حیوانات و همچنین کنترل این بیماری برخوردار

^۱ Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS)

^۲ kuru Disease

است (۱۳و۱۲و۱۳).

۸-۱-۱ علایم بالینی بیماری جنون گاوی :

از شایع ترین علایم بالینی می توان به کاهش وزن و کاهش تولید شیر اشاره کرد در حالیکه دام اشتهاى مناسبى دارد. از اولین علایم عصبی در دام می توان به جدا ماندن دام از گله، عدم تمایل ورود به سالن شیردوشی و لگد زدن در هنگام شیردوشی اشاره کرد. سایر علایم عصبی این بیماری شامل دیوانگی دام، عدم تعادل اندام های تحتانی ، لرزش، حساسیت بیش از حد به صدا و نور اشاره کرد. بعد از بروز علایم بالینی طی چند هفته علایم وخیم تر شده و باعث مرگ یا ذبح دام می شود (۱۴).

۹-۱-۱ پیشگیری از بیماری جنون گاوی :

نخستین قدم در پیشگیری از این بیماری ، ممانعت از ورود دام های آلوده به داخل گله است ، و در صورت تشخیص بیماری در گله می بایست کل دام ها یا حداقل آنهایی که علایم بالینی را نشان می دهند حذف و معدوم سازی نمود. می توان جایگاه دام ها را ضدعفونی نمود. از مکمل های پروتئینی تهیه شده از دام های نشخوارکننده استفاده نشود. به علت طولانی بودن دوره کمون این بیماری و از آنجایی که اطلاعات دقیقی از انتقال عمودی این بیماری در دسترس نیست بهتر است گوساله ای که از دام های مبتلا به دنیا می آید ذبح و معدوم شود. درمانی برای این بیماری وجود ندارد از این رو تشخیص این بیماری بسیار حائز اهمیت است. اما در در حال حاضر تستی که بتواند در زمان زنده بودن حیوان این بیماری را شناسایی کند وجود ندارد. تشخیص قطعی و قابل اعتماد BSE تنها از طریق تهیه نمونه از بافت عصبی پس از مرگ ممکن می باشد (۱۵).

۲-۱ تشخیص بیماری جنون گاوی :

مشاهده تغییرات هیستوپاتولوژیک مهمترین راه تشخیص بیماری می باشد. وجود واکوئل های متعدد در بافت خاکستری مغز (منظره اسفنجی) تشکیل پلاکت ، آستروسیتوز و از بین رفتن هسته های بافت عصبی می تواند در تشخیص بیماری ما را یاری نماید. با وجود اینکه تهیه نمونه هیستوپاتولوژیک از بافت مغز تنها روش با حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص مثبت قطعی این بیماری بشمار می آید اما اتولیز بافت ها و آماده سازی نامناسب نمونه ها کارایی این تست تشخیصی را کاهش می دهد. شناسایی ایزوفرم غیر طبیعی پروتئین پریون (PrP^{Sc}) به عنوان نشانگر خاص این بیماری و مقاومت آن در برابر تخریب، منجر به توسعه تست های تشخیصی ELISA ، وسترن بلات ۱ و تست ایمونوهیستوشیمیایی ۲ گردید. تکنیک وسترن بلات یکی از اولین متد های تشخیصی بیماری BSE بوده که در بافت های فیکس نشده حتی در صورت اتولیز شدن بافت نیز می تواند موفقیت آمیز باشد. تست SAF ایمونوبلات/ تکنیک وسترن بلات که حساسیت مشابهی با تست IHC داشته و به همراه تست ایمونوهیستوشیمیایی در تایید تشخیص BSE نقش موثری دارد. این روش ها کم هزینه بوده و جایگزین روش های وقت گیر است (۶).

۱-۲-۱ ایمونوهیستوشیمی:

کاربرد ایمونوپراکسیداز و تکنیک های هیبریدوما از مهم ترین پیشرفت های تکنیکی در پاتولوژی تشریحی به شمار می روند. روش های درمانی پیچیده سرطان لزوم تشخیص دقیق مرفولوژیک قبل از انتخاب روش های درمانی مناسب را اجباری نموده است. از تکنیک ایمونوهیستوشیمی به حق به عنوان

^۱ Western immunoblot Methods

^۲ Immunohistochemistry

شاخص جادویی نام برده می شود، باید به خاطر داشت که همانند سایر روش ها این روش هم دارای معضلات اجرایی و تفسیری است. به خصوص مسائلی که مربوط به پردازش اولیه نمونه است، مثل نوع و زمان فیکساسیون. در این فصل به صورت خلاصه تکنیک های رایج ایمونوهیستوشیمی بررسی خواهد شد (۱۶-۱۸).

۱-۱-۲-۱ تکنیک ایمونوآنزیمی^۱

اساس این تکنیک بر پایه اتصال یک آنزیم به یک آنتی بادی اختصاصی استوار است. فعالیت آنزیم باعث ایجاد تغییر رنگ قابل رویت در محل کمپلکس آنتی بادی و آنزیم و آنتی ژن در بافت می شود. سر دسته این آنزیم ها هورسردیش پراکسیداز^۲ است. از سایر آنزیم ها می توان از آلکالاین فسفاتاز^۳ را نام برد (۱۶-۱۸).

۲-۱-۲-۱ رنگ آمیزی ایمونوآنزیمی مستقیم^۴

در این روش از یک آنتی بادی کانژوگه با آنزیم جهت ترکیب با آنتی ژن بافتی مورد نظر استفاده می شود، سپس برش بافتی با سوبسترای مناسب همانند پراکسید هیدروژن و یک کروموژن مثل (DAB)

^۱ Immunoenzyme Technique

^۲ Horseradish peroxidase

^۳ Alkaline phosphatase

^۴ Direct Immunoenzyme Staining

انکوبه می شود تا رنگ قهوه ای به وجود آید که با میکروسکوپ نوری قابل رویت است. این تکنیک ساده بوده ولی حساسیت آن کم است و به همین جهت برای استفاده روزانه مناسب نیست. (۱۶-۱۸).

۳-۱-۲-۱ روش پلی^۱

در این روش حساسیت افزایش می یابد و یک آنتی بادی کانژوگه با آنزیم را می توان برای آنتی بادی های اولیه مختلف به کاربرد و دیگر لازم نیست تمام آنتی بادی های اولیه را با آنزیم کانژوگه کرد. (۱۶-۱۸).

۴-۱-۲-۱ رنگ آمیزی ایمونوآنزیمی غیرمستقیم^۲

در این روش ابتدا برش بافتی را با آنتی بادی اولیه مورد نظر انکوبه می کنیم، سپس برش بافتی را شستشو داده و با آنتی بادی ثانویه کانژوگه با آنزیمی که برای ایمونوگلوبولین گونه ای که منشا تهیه آنتی بادی اولیه است انکوبه می کنیم. مزیت این روش این است که می توان از یک آنتی بادی کانژوگه برای آنتی بادی های اولیه زیادی استفاده کرد. (۱۶-۱۸).

۵-۱-۲-۱ تکنیک آنزیم ضد آنزیم

در این روش آنتی بادی با آنزیم کانژوگه نمی شود بلکه از آنتی بادی علیه آنزیم استفاده می شود

^۱ Poly assay

^۲ Indirect Immunoenzyme Staining

تا پلی بین آنتی بادی اولیه و آنزیم بسازد. به این طریق دیگر به کانژوگه کردن آنتی بادی با آنزیم نیازی نیست. فرایندی که علاوه بر اینکه از نقطه نظر تکنیکی مشکل است در عین حال تمایل اتصال آنتی بادی به آنتی ژن را کاهش می دهد. این تکنیک برای اولین بار توسط استرنبرگر^۲ و همکارانش در سال ۱۹۷۰ معرفی شد. (۱۶-۱۸).

۶-۱-۲-۱ تکنیک آویدین-بیوتین^۱

بیوتین، یک ویتامین با وزن مولکولی پایین را می توان با پیوندهای کووالانت به آنتی بادی اولیه متصل کرد و یک کانژوگه بیوتین-آنتی بادی ایجاد کرد که وقتی به برش بافتی اضافه می شود به آنتی ژن مورد نظر متصل می شود. آویدین گلیکوپروتئین سفید مرغ، ۴ محل اتصال برای بیوتین دارد. بنابراین آویدین را می توان به عنوان پلی برای رنگ آمیزی ایمونوآنزیمی چند لایه به کار برد. سیستم آویدین-بیوتین توسط هسو و همکارانش تحول یافت و به صورت آویدین-بیوتین پروکسیداز کمپلکس به اختصار ABC در آمد. در این روش از کمپلکس آویدین با مولکول پراکسیدازی که متصل به بیوتین است استفاده می شود. در این روش آنتی بادی اولیه به آنتی بادی ثانویه که با بیوتین کانژوگه شده متصل می شود (۱۶-۱۸).

۷-۱-۲-۱ کروموژن ها

کروموژن های گوناگونی برای سیستم های آنزیمی مختلف وجود دارد. DAB رایج ترین کروموژنی است که امروزه استفاده می شود. رنگ قهوه ای واکنش به سهولت قابل رویت بوده، مقاومت آن

^۱ Avidin-Biotin Technique

نسبت به الکل، آن را برای طیف وسیعی از رنگ آمیزی های افتراقی و چسب ها مناسب می سازد. (۱۶-۱۸).

۱-۲-۱-۸ روش های تشدید واکنش

یون های فلزات یا ترکیبات آلی را می توان به منظور تشدید رنگ محصولات کروموژن به کار برد. غوطه ور کردن برش های رنگ شده در محلول ۰/۵ درصد سولفات مس، شدت رنگ را افزایش داده و رنگ واکنش نیز بسته به اینکه از چه محلولی استفاده شده باشد تغییر می کند ولی اغلب آزمایشگاه ها از این روش ها استفاده نکرده و رنگ قهوه ای-طلایی DAB را ترجیح می دهند، چون حتی وقتی شدت رنگ بسیار کم است می توان آن را تشخیص داد (۱۶-۱۸).

۱-۲-۱-۹ تشدید رنگ آمیزی توسط ایمیدازول^۱

ایمیدازول سرعت اکسیداسیون DAB را در pH خنثی چندین برابر کرده و علاوه بر آن فعالیت پراکسیدازی کاذب هموگلوبین را مهار می کند. افزودن ۰.۰۱ مول ایمیدازول به مخلوط-DAB peroxidase باعث تشدید رنگ آمیزی گیرنده استروژن و برخی دیگر از آنتی ژن ها می شود. (۱۶-۱۸).

۱-۲-۱-۱۰ تشدید رنگ آمیزی با استفاده مکرر از آنتی بادی اولیه^۲

این روش زمانی که میزان آنتی ژن کم است، مورد استفاده قرار می گیرد. بدین صورت که

^۱ Imidazole Enhancement

^۲ Enhancement by repeated application of reagents

ابتدا آنتی بادی اولیه را ریخته و ۱ تا ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه می کنیم. سپس با PBS شسته و آنگاه آنتی بادی اولیه را می ریزیم و یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه می کنیم (۱۶-).

(۱۸).

۳-۱ سوابق پژوهش

متأسفانه در ایران داده های مدون و مستندی در خصوص پایش این بیماری وجود ندارد. لذا برای کنترل این بیماری مشترک می بایست در جهت تشخیص این بیماری به کمک روش ها و تست هایی با حساسیت و ویژگی بالا اقدام نمود که تست IHC یک آزمون استاندارد می باشد. ایمونوهیستوشیمی نام خودش را از دو واژه ی (Immuno) که به آنتی بادی های مورد استفاده برمی گردد و (histo) به معنی بافت گرفته است. در سال ۱۹۴۱ این روش توسط Albert Coons ابداع گردید. این تکنیک فرایند شناسایی انتخابی آنتی ژن های داخل سلولی به کمک آنتی بادی های اختصاصی منوکلونال و پلی کلونال می باشد. بیومارکرها در این تست می تواند روند تکثیر و مرگ سلولی را قابل درک می نماید (۶).

در حال حاضر روشهای ایمونوهیستوشیمیایی با استفاده از آنتی بادی های پلی کلونال یا منوکلونال رویکردهای استانداردی در تشخیص بیماری می باشد و در بافتهای اتولیزه که ارزیابی مورفولوژیکی دیگر امکان پذیر نیست، به خوبی کارایی دارد. مقاوم بودن PrP^{sc} در برابر تخریب، تشخیص بیماری را در ضایعات خفیف ممکن می سازد. مشاهده شده است، بررسی نمونه های فیکس شده در فرمالین از بافت های آلوده در این تکنیک تنها راه تشخیصی با حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص مثبت قطعی این بیماری صرف نظر از کیفیت بافت و در مقادیر اندک PrP^{sc} بشمار می آید. جهت انجام این تکنیک نمونه برداری و تهیه بیوپسی از بافت ها مورد نیاز است. سپس نمونه ها توسط فرمالین یا روش های دیگری فیکس می شود تا بتوان مورفولوژی مناسب بافتی را به منظور بررسی دقیق تر فراهم نمود. پس از تهیه بلوکه های پارافینی نمونه ها با میکروتوم برش داده شده سپس با یک آنتی بادی های اولیه و ثانویه مناسب انکوبه می شود. استفاده از آنتی بادی اولیه روش ساده ای بوده که حساسیت چندانی ندارد لذا به منظور ارزیابی دقیق تر از آنتی بادی های

ثانویه نیز استفاده می نماییم. آنتی بادی اولیه روی آنتی ژن مورد نظر سوار شده و آنتی بادی های ثانویه بر روی ایمنوگلوبولین های آنتی بادی های اولیه سوار می شود که این روش حساسیت بیشتری دارد. نتایج حاصل از این تست علاوه بر اینکه حضور PrP^{sc} را نشان می دهد، می تواند پراکندگی و بیان پروتئین های مختلف را در بافت ها نشان دهد که در درک فرایند فیزیولوژیک درگیر در بیماری BSE موثر است (۱۹-۲۱).

در مطالعات انجام شده در دام هایی که به طور تجربی به این بیماری مبتلا شده اند مشخص شده است که تست IHC قادر به تشخیص PrP^{sc} پیش از گسترش تظاهرات پاتولوژیک بیماری می باشد. از آنجایی که امروزه تست IHC در کنترل کیفی مواد غذایی فراوری شده با منشاء دامی در سطح جهانی کاربرد زیادی یافته و یکی از مهمترین تستهای تشخیصی است لذا ما بران شدیم تا کاربرد این تست را در تشخیص بیماری جنون گاوی بررسی نماییم.

«فصل دوم»

مواد و روش ها

۲- مواد و روش کار

۱-۲ هدف:

این آزمایش جهت جستجوی پریون جنون گاوی در نمونه های مغز و روده (انتهای ایلئوم) است.

۲-۲ دامنه و حوزه کاربرد:

این روش اجرایی در آزمایشگاه اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی (آزمایشگاه تخصصی

هیستوپاتولوژی بخش مرضی) بر روی نمونه های مغز و روده (انتهای ایلئوم) اجرا شد.

۳-۲ حد تشخیص:

وجود و یا عدم وجود آنتی ژن BSE می باشد.

۴-۲ شرایط دام های قابل نمونه گیری:

۱- گاوهای دارای نشانه های مشکوک عصبی درمانگاهی.

۲- گاوهای زمین گیر و یا با ناهنجاری های حرکتی ناشی از شکستگی ها.

۳- گاوهایی که بصورت اضطراری به کشتارگاه اعزام می شوند یا کشتار اضطراری.

۴- گاوهای تلف شده که در حین حمل و نقل و یا در کشتارگاه تلف شوند.

۵- گاوهایی که در بازرسی قبل از کشتار حذفی اعلام می گردند.

۶- گاوهای با نشانه های عصبی که نسبت به درمان های متداول مقاوم هستند.

۵-۲ نمونه های لازم :

از تمامی گاوهای فوق باید نمونه برداری به شرح ذیل صورت گیرد :

۲-۵-۱ نمونه مغز

مطابق شکل ذیل بخصوص دقت شود ناحیه obex گاو همراه مغز باشد.

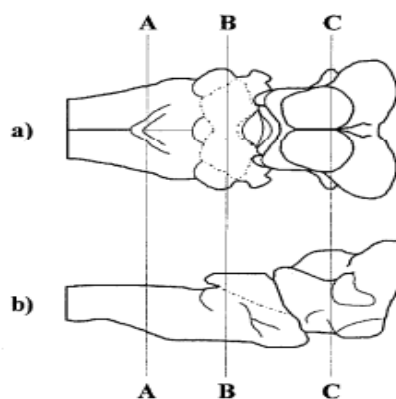


Fig 1. Brainstem after the removal of the cerebellum, from a) dorsal, and b) lateral aspects.
Recommended levels at which sections should be taken:
A-A = medulla, at the obex; B-B = medulla through caudal cerebellar peduncles;
C-C = midbrain through rostral colliculi.

شکل شماره ۱- محل نمونه گیری از مغز

۲-۵-۲ نمونه روده :

به طول ۵-۱۰ cm از بخش انتهایی روده کوچک (انتهای ایلئوم) ترجیحا ایلئوسیکال

۲-۵-۳ شرایط ارسال نمونه ها

نمونه ها باید در اسرع وقت در فرمالین بافر ۱۰ درصد قرارداده شود.

۲-۵-۴ تعداد نمونه

در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه مغز و ۱۰۰ نمونه روده (انتهای ایلئوم) از تعداد ۱۰۰ راس گاو واجد

شرایط جمع آوری شد.

۲-۶ اصول ایمنی و شرح عوامل خطر ساز:

۲-۶-۱ پوشیدن روپوش و استفاده از ماسک در زمان نمونه گیری و آزمایش

الزامی بود.

۲-۶-۲ جهت نمونه برداری از اسکالپل ، چاقو ، پنس و کیسه های استریل

استفاده شد.

۲-۶-۳ نمونه برداری در شرایط کاملاً استریل انجام گرفت.

۲-۶-۴ اجرای مراحل کشت زیر هود لامینار و یا در کنار شعله بود.

۲-۶-۵ جهت جلوگیری از آلودگی پس از پایان کار تمامی سطوح و وسایل با مواد

ضد عفونی کاملاً تمیز شد.

۲-۷ تجهیزات مورد نیاز تست:

○ دستگاه Tissue Processor

○ دستگاه میکروتوم

○ دستگاه تیغه تیز کن

○ دستگاه Water bath

○ فور و اتوکلاو

○ انکوباتور

○ دستگاه Parafin bath

○ میکروسکوپ نوری

۸-۲ مواد مورد نیاز تست:

○ دستکش

○ مداد مخصوص

○ تخته مخصوص برش

○ قیچی

○ کارد مخصوص برش بافت

○ تیغه بیستوری همراه با دسته آن

○ پنس

○ کاست بافت شناسی

○ قالب (دو قطعه آلومینیوم L شکل)

○ قلم الماس

○ لام

○ تیغه میکروتوم

- لامل
- قلم مو
- چسب مونتاژ
- لام پلی ال لیزه
- الکلهای ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۵ و الکل مطلق
- زیلل
- پارافین مخصوص پاتولوژی
- فرمالین ۱۰ درصد
- سدیم فسفات مونو بازیک
- سدیم فسفات دی بازیک
- NaCl
- Trypsin
- PBS
- Tween 20
- primary antibody
- secondary antibody
- H₂O₂
- Methanol
- goat serum
- BSA

cold fish skin gelatin ○

Triton X-100 ○

sodium azide ○

DAB ○

هماتوکسیلین مایر ○

۲-۸-۱ تهیه فرمالین بافر ۱۰ درصد

○ نمونه ها باید در فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شوند برای تهیه محلول مذکور باید از فرمالین

۱۰ درصد و ترکیب زیر استفاده نموده :

➤ Formaldehyde (37-40%) ----- 200 ml

➤ Distilled water ----- 800 ml

➤ NaH₂PO₄ ----- 4.0 g

➤ Na₂HPO₄ (anhydrous) ----- 6.5 g

○ پس از حل کردن سدیم فسفات مونوبازیک و سدیم فسفات دی بازیک در آب مقطر آن را به

خوبی با فرمالین تجاری مخلوط و مخلوط آماده شده را برای فیکس کردن نمونه ها استفاده می

نماییم.

۲-۸-۲ Peroxidase Blocking Solution تهیه محلول

○ این محلول برای بلاک پراکسیدها استفاده می شود برای تهیه این محلول :

➤ 30% H₂O₂ ----- 10 ml

➤ 1X PBS ----- 90 ml

محلول فوق تهیه که در دمای ۴ درجه سانتیگراد بمدت ۳ ماه قابل نگهداری می باشد.

۳-۸-۲ تهیه محلول Phosphate Buffered Saline (PBS) 10X

این محلول برای شستشو در مراحل مختلف بکار می رود برای تهیه این محلول از فرمول زیر :

- Na₂HPO₄ (anhydrous) ----- 10.9 g
- NaH₂PO₄ (anhydrous) ----- 3.2 g
- NaCl ----- 90 g
- Distilled water ----- 1000 ml

پس از تهیه محلول فوق pH به ۷.۴ رسانده و قبل از استفاده با آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ رقیق شده و

مورد استفاده قرار می گیرد.

۴-۸-۲ تهیه محلول 10X PBS-Tween 20

این محلول برای شستشو در مراحل مختلف بکار می رود برای تهیه این محلول از فرمول زیر :

- Na₂HPO₄ (anhydrous) ----- 10.9 g
- NaH₂PO₄ (anhydrous) ----- 3.2 g
- NaCl ----- 90 g
- Distilled water ----- 1000 ml

پس از تهیه محلول فوق pH به ۷/۴ رسانده سپس به آن 5 ml Tween 20 اضافه شده و قبل از

استفاده با آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ رقیق شده و مورد استفاده قرار می گیرد.

۵-۸-۲ تهیه محلول Tris Buffered Saline (TBS) 10X

این محلول برای شستشو در مراحل مختلف بکار می رود برای تهیه این محلول از فرمول زیر :

- Trizma base----- ۶۱ g
- NaCl----- ۹۰ g
- Distilled water ----- 1000 ml

پس از تهیه محلول فوق pH به کمک HCL به ۸/۴ رسانده و قبل از استفاده با آب مقطر به

نسبت ۱:۱۰ رقیق شده و مورد استفاده قرار می گیرد.

۶-۸-۲ تهیه محلول DAB Peroxidase Substrate Solution

– Brown

ابتدا برای تهیه محلول استوک شماره ۱ : به ۰,۱ گرم DAB در ۱۰ سی سی آب مقطر حل نموده

سپس ۳ تا ۵ قطره اسید کلریدریک به آن اضافه می نماییم. بمدت ۱۰ دقیقه آن را در شیکر قرارداده تا

DAB بطور کامل حل شود ، سپس آن را در درمای ۲۰- درجه نگهداری می نماییم. برای تهیه محلول

استوک شماره ۲: به میزان ۱۰۰ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد در ۱۰ سی سی آب مقطر حل نموده و

بخوبی مخلوط می نماییم. این محلول نیز تا زمان استفاده در ۲۰- نگهداری می نماییم.

برای تهیه محلول کار: ۵ قطره از استوک شماره ۱ را در ۵ سی سی PBS (pH) حل نموده

سپس ۵ قطره از استوک شماره ۲ به آن اضافه و بخوبی مخلوط می نماییم.

۹-۲ روش کار:

۱-۹-۲ آماده کردن بافت در آزمایشگاه

ابتدا نمونه های مغز و روده برش داده می شود. سپس یک قسمت کوچک به ابعاد (1mm x 1mm x 1 mm) از بافت انتخاب می گردد. ضخامت بافت انتخابی حدود 3mm می باشد. زیرا در ضخامت های زیاد بافت خوب فیکس نمی شود. (کد) نمونه با مداد گرافیت یا به وسیله مرکب چین روی مقوا نوشته می شود تا در مراحل کار محفوظ بماند. نمونه همراه با (کد) نمونه داخل کاست قرار داده می شود.

کاست حاوی بافت توسط تکنولوژیست داخل زنبیل مخصوص قرارداده می شود. سپس زنبیل را به حلقه دستگاه Tissue Processor قرار داده به طوریکه زنبیل در لیوان شماره ۱ فرود آید. این دستگاه دو حرکت دارد :

- حرکت انتقالی یا حرکت ظرف به ظرف

- حرکت نوسانی

این دستگاه دارای دوازده لیوان مخصوص است. که به ترتیب در لیوان های شماره ۱ و ۲ محلول

فرمالین بافر ۱۰٪ ریخته اند ، لیوان های شماره ۳ حاوی الکل ۷۰ درجه، شماره ۴ الکل ۸۰ درجه ، شماره ۵

دارای الکل ۹۰ ، شماره ۶ و ۷ دارای الکل ۹۵ درجه می باشد لیوان شماره ۸ حاوی الکل مطلق است. لیوان

های ۹ و ۱۰ حاوی زیلول و در نهایت داخل دو لیوان آخر پارافین وجود دارد. این غلظت ها به تناسب کار ممکن

است در آزمایشگاه ها کمی متفاوت باشد.

بعد از گذشت یک ساعت سر (Head) دستگاه به طور اتوماتیک بالا می آید و حدود ۳۰ درجه

موافق عقربه ساعت چرخش می کند. به این ترتیب زنبیل در بالای لیوان شماره ۲ قرار گرفته سپس سر

(Head) دستگاه به طور اتوماتیک پایین آمده به طوریکه زنبیل در داخل لیوان شماره ۲ فرود می آید. بعد از

گذشت یک ساعت مرحله فیکساسیون یا Fixation با موفقیت به پایان می رسد. در مرحله آگیری از الکل

با درجه صعودی استفاده شده تا آگیری از بافت به خوبی انجام گیرد.

۱- هر نوع تغییرات سریع روی بافت موجب تغییر فرم هسته و سیتوپلاسم سلول های بافت می گردد.

۲- الکل مطلق (۱۰۰درجه) موجب انقباض شدید بافت و چروکیدگی و سختی آن می شود. در نتیجه در

مراحل کاراز نفوذ مواد به داخل بافت جلوگیری به عمل می آید.

گردش کار دستگاه تیشو پروسسور به طور اتوماتیک پیش می رود. تا اینکه در مرحله شفاف کردن یا

Clearing چشمه ها و منافذ بافت توسط زایلل باز می گردد.

۲-۹-۲ آغستگی یا Impregnation

در این مرحله بتدریج پارافین مذاب (۵۲ - ۵۶ درجه سلسیوس) به داخل منافذ و چشمه های بافت

نفوذ می کند در پایان باعث استحکام و قوام بافت می شود. تمام مراحل فوق توسط دستگاه تیشوپروسسور به

طور اتوماتیک انجام می گیرد. تا اینجا بافت قوام یافته است. ولی چون شکل هندسی ندارد باز نمی توان آن

را داخل دهانه دستگاه میکروتوم قرار داده و از آن برش های میکرونی تهیه کنیم. لازم است به بافت شکل

هندسی بدهیم. زنبیل را از داخل ظرف پارافین دستگاه تیشو پروسسور بیرون آورده، سپس کاست حاوی بافت

از داخل زنبیل خارج کرده آن را به داخل دستگاه اتو ۵۸ درجه انتقال می دهیم.

۳-۹-۲ قالب گیری Embeding:

روی سطح صاف (شیشه ای) قالب را با قرار دادن دو قطعه آلومینیوم L شکل در کنار هم ایجاد می کنیم. درب کاست را باز کرده و قطعه بافت را به وسیله پنس بر داشته و در ته قالب می کاریم. داخل قالب را با پارافین مذاب پر می کنیم. حالا (کد) نمونه را روی سطح پارافین قرار داده با دم پنس کمی روی آن فشار می دهیم تا خوب جا گیر شود. قالب را به یخچال انتقال می دهیم. حدود ۲۰ دقیقه بعد پارافین خوب منجمد می شود. و شکل قالب را به خود می گیرد و به راحتی از قالب آلومینیومی جدا می شود. بلوک پارافینه حاوی بافتی آماده گردید. بلوک پارافینی بافت را در داخل خود نگه داشته و به شکل هندسی مکعب مستطیل در می آید.

۴-۹-۲ برش گیری Cutting :

تهیه برش های بسیار نازک ۴ تا ۷ میکرونی از بلوک پارافینی توسط دستگاه میکروتوم انجام می شود. تهیه برش های خوب به تمرین و تجربه زیادی نیاز دارد. ابتدا بلوک پارافینی را در جایگاه خود روی میکروتوم قرار داده و پیچ نگهدارنده بلوک را محکم می کنیم. زاویه تیغه میکروتوم را با بلوک را تنظیم می کنیم. با چرخاندن دسته میکروتوم ابتدا برش های ضخیم گرفته می شود تا پارافین روی سطح بلوک برداشته شده و بافت آشکار گردد. سپس درجه میکرون دستگاه را روی عدد ۴ میکرون تنظیم می کنیم و با چرخاندن منظم دسته میکروتوم برش های پی در پی تولید می شود.

۲-۹-۵ دستگاه (واتر بس) یا دستگاه حمام آب گرم:

این دستگاه ساده دارای یک ظرف گرد یا مستطیل است ، که داخل آن را با ماده تفلون سیاه پوشانده اند، در زیر این ظرف یک هیتر یا گرمکن برقی قرار داده اند، این دستگاه مجهز به ترموستات و یک دکمه تنظیم درجه حرارت است. مقدار مشخصی آب در داخل ظرف دستگاه می ریزیم دو شاخه دستگاه را به برق وصل می کنیم درجه دستگاه را روی ۴۵ درجه تنظیم می کنیم وقتی دمای آب به ۴۵ درجه سانتی گراد رسید ترموستات جریان برق را به طور خود کارقطع می کند بدین ترتیب آب با گرما حدود ۴۵ درجه سانتی گرد حاصل می گردد. وقتی برش های بافت به صورت پیاپی به شکل نواری در آمد انگشت میانی دست راست را خیس کرده سرنوار را با این انگشت و انتهای نوار را با نوک باریک یک قلم مواز جا برداشته و آنرا به آرامی روی سطح آب گرم ۴۵ درجه دستگاه (واتر بس) انتقال می دهیم. نوار روی سطح آب شناور می شود آب گرم باعث باز شدن چین وچروک های برش های بافت می گردد. یک اسلاید شیشه ای تمیز را بطور عمودی داخل آب (واتر بس) فرو می بریم به کمک انگشت نشانه سه تا چهار برش صاف و سالم را روی سطح اسلاید هدایت می کنیم. بطوریکه برش ها در حول و حوش مرکز اسلاید قرار گیرد. به این ترتیب چند برش از سطح آب گرفته می شود. اضافه نوار را با نوک قلم مواز دور می کنیم. برش ها روی سطح اسلاید می چسبند. تهیه برش های میکروسکوپی ، انتقال برش ها به سطح آب گرم، بر داشت برش ها از سطح آب و... کاری دقیق و ظریف است که نیازمند دقت، تمرین و در نهایت کسب تجربه دارد که به مرور حاصل می شود. اسلاید را در جای مخصوص به طور عمودی قرار می دهیم تا خوب خشک شود. (برای رنگ آمیزی های ایمنونوهیستوشیمی بهتر است از لام پلی ال لیزه استفاده شود) اسلاید را در زنبیل رنگ آمیزی قرار داده، زنبیل را در داخل دستگاه اتو با دمای ۶۰ درجه قرار می دهیم. حدود ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در اتو بماند. با این کار برش ها خوب خشک شده

و به سختی روی سطح لام می چسبند.

۲-۹-۶ رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی:

خلاصه مراحل کار به شرح زیر می باشد:

۱- پاک کردن پارافین با زایلل

۲- برداشتن زایلل با الکل مطلق

۳- رنگ آمیزی

۴- دهیدراتاسیون از طریق درجات مختلف الکل

۵- شفاف کردن در زایلل

۶- چسباندن لامل

۲-۹-۶-۱ روش انجام کار:

لام های تهیه شده از نمونه ها در دو گروه اول مایکوباکتریوم بویس و دوم مایکوباکتریوم

توبرکولوزیس دسته بندی شده و برای هر گروه کنترل مثبت و منفی مربوطه قرار داده شده سپس به روش

زیر به آب رسانده شدند:

۱- زایلل اول ۳-۵ دقیقه

۲- زایلل دوم ۳-۵ دقیقه

۳- زایلل + الکل ۱۰۰ درجه ۳-۵ دقیقه

۴- الکل ۱۰۰ درجه ۳-۵ دقیقه

۵- الکل ۱۰۰ درجه	۳-۵ دقیقه
۶- الکل ۹۵ درجه	۳-۵ دقیقه
۷- الکل ۹۵ درجه	۳-۵ دقیقه
۸- الکل ۸۰ درجه	۳-۵ دقیقه
۹- الکل ۷۰ درجه	۳-۵ دقیقه
۱۰- الکل ۵۰ درجه	۳-۵ دقیقه
۱۱- آب مقطر	۳-۵ دقیقه

بازیابی آنتی ژن با استفاده از سدیم سیترات به شرح ذیل انجام شد (طبق پروتکل شرکت سازنده آنتی

بادی اولیه).

۱. اسلایدها را در یک نگهدارنده اسلاید شیشه ای قرار داده شد.

۲. قفسه را در ۶۰۰ میلی لیتر از ۱۰ میلی مولار سدیم سیترات در یک بیکر ۲ لیتری شیشه ای قرار

داده شد. بر روی بیکر شیشه ای خطی نشان دهنده سطح آب علامت گذاری شد.

۳. بمدت مدت ۲۰ دقیقه در مایکروویو قرار داده شد ، هر ۱۰ دقیقه آب تبخیر شده را جایگزین شد.

۴- سپس اسلایدها به مدت ۲۰ دقیقه خنک شد.

۵- چهار بار در آب مقطر و یک بار در PBS شسته و پس از آن Serum Blocking به مدت ۳۰

دقیقه انجام شد. پس از دو مرحله شستشوی مجدد اینکوباسیون نمونه ها با آنتی بادی اولیه رقیق شده به

نسبت ۱/۲۰۰ در دمای اتاق و بمدت یک شبانه روز انجام گرفت (Hycult HM5011 Prion PrP^{SC} ,

mAb 1.5D7). پس از دو بار شستشو مرحله بلاک Proxidase بمدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس نمونه

ها با محلول شستشو دو بار شستشو داده شده از آنتی بادی ثانویه (Abcam Ab97023 1mg Goat)

(Anti-Mouse IgG H&L (HRP) رقیق شده به نسبت ۱/۲۰۰ در دمای اتاق و به مدت ۳۰ دقیقه

صورت گرفت. پس از دو بار شستشوی نمونه ها از محلول کار آماده شده DAB به مدت ۳ دقیقه استفاده

شد. پس از دو بار شستشوی مجدد نمونه ها مراحل زیر انجام شد:

- ۱- هماتوکسیلین مایر ۱۵-۵ دقیقه
- ۲- شستشو با آب جاری فقط با چند حرکت
- ۳- اسید الکل چند حرکت
- ۴- شستشو با آب جاری فقط با چند حرکت
- ۵- کربنات لیتیوم چند حرکت
- ۶- شستشو با آب جاری فقط با چند حرکت
- ۷- الکل ۹۵ درجه چند حرکت
- ۸- الکل ۹۵ درجه چند حرکت
- ۹- الکل ۱۰۰ درجه چند حرکت
- ۱۰- الکل ۱۰۰ درجه چند حرکت
- ۱۱- زایلل + الکل ۱۰۰ درجه ۵-۳ دقیقه
- ۱۲- زایلل دوم ۵-۳ دقیقه
- ۱۳- زایلل سوم ۵-۳ دقیقه

۱۵- خروج از زایل و چسباندن لامل

لام ها پس از آماده شدن توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج با کنترل مثبت

مقایسه شد.

فصل سوم

نتائج

وبحث

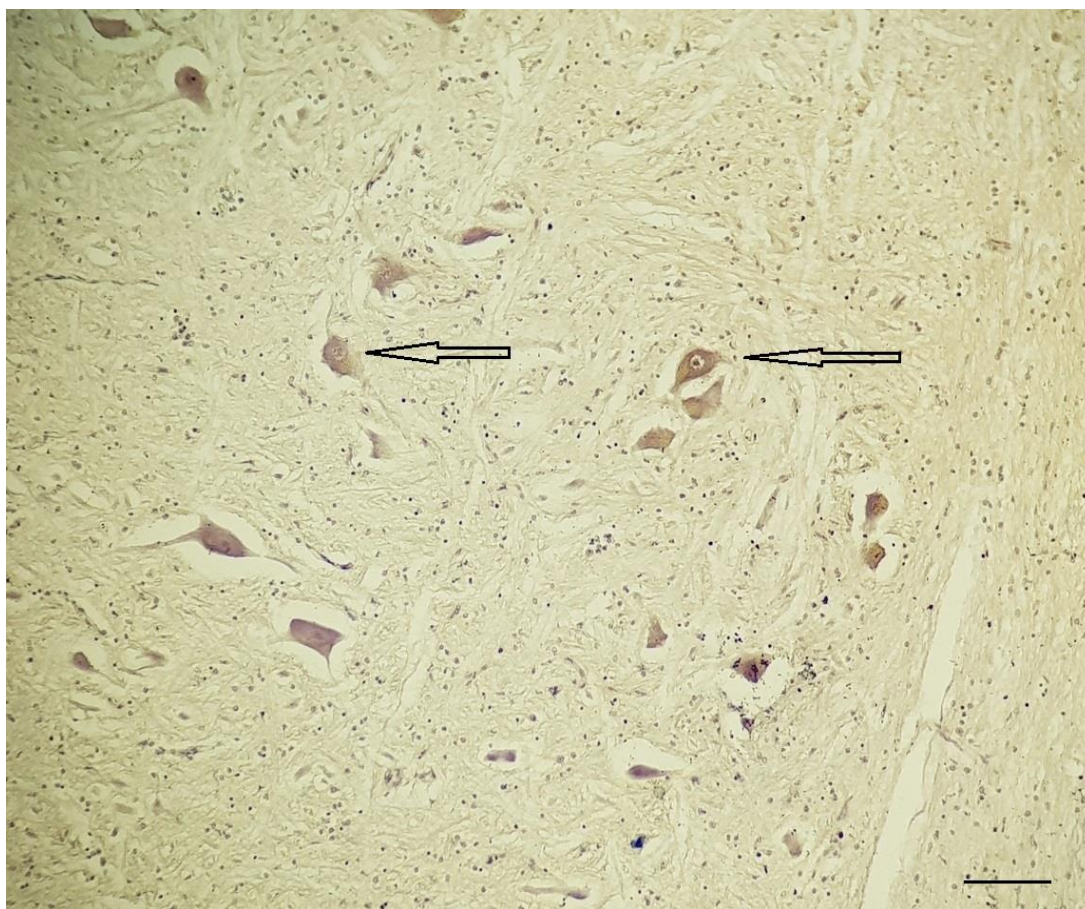
۳ نتایج

۱-۳ نتایج ایمونوهیستوشیمی در مغز:

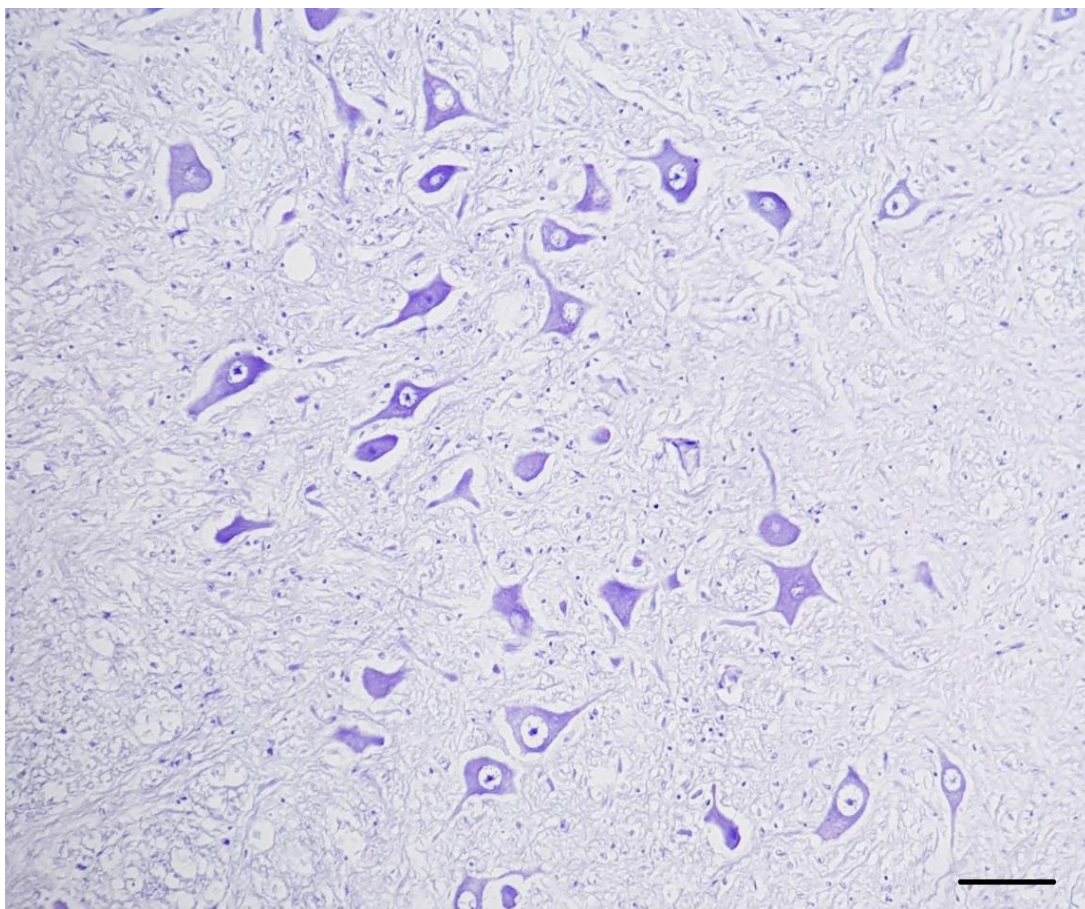
از تعداد ۱۰۰ نمونه مغز کار شده تمامی نمونه ها از نظر آلودگی به آنتی ژن BSE منفی تشخیص داده شدند. بدلیل استفاده از آنتی بادی ثانویه (HRP) و کروموژن قهوه ای رنگ DAB در نواحی که آنتی ژن BSE حضور داشته باشد، کروموژن در سطح سلول رسوب و بدلیل استفاده از کروموژن قهوه ای رنگ، رسوب در زیر میکروسکوپ نوری به رنگ قهوه ای دیده می شود. همانطور که در تصاویر ۱ تا ۲ ملاحظه می شود در هیچکدام از نمونه ها رسوب قهوه ای رنگ DAB مشاهده نشد. بنابراین می توان نتیجه گیری نمود که نمونه های مغز از لحاظ BSE منفی می باشند.

۲-۳ نتایج ایمونوهیستوشیمی در روده:

از تعداد ۱۰۰ نمونه روده کار شده تمامی نمونه ها از نظر آلودگی به آنتی ژن BSE منفی تشخیص داده شدند. بدلیل استفاده از آنتی بادی ثانویه (HRP) و کروموژن قهوه ای رنگ DAB در نواحی که آنتی ژن BSE حضور داشته باشد، کروموژن در سطح سلول رسوب و بدلیل استفاده از کروموژن قهوه ای رنگ، رسوب در زیر میکروسکوپ نوری به رنگ قهوه ای دیده می شود. همانطور که در تصاویر ۱ تا ۲ ملاحظه می شود در هیچکدام از نمونه ها رسوب قهوه ای رنگ DAB مشاهده نشد. بنابراین می توان نتیجه گیری نمود که نمونه های روده از لحاظ BSE منفی می باشند.

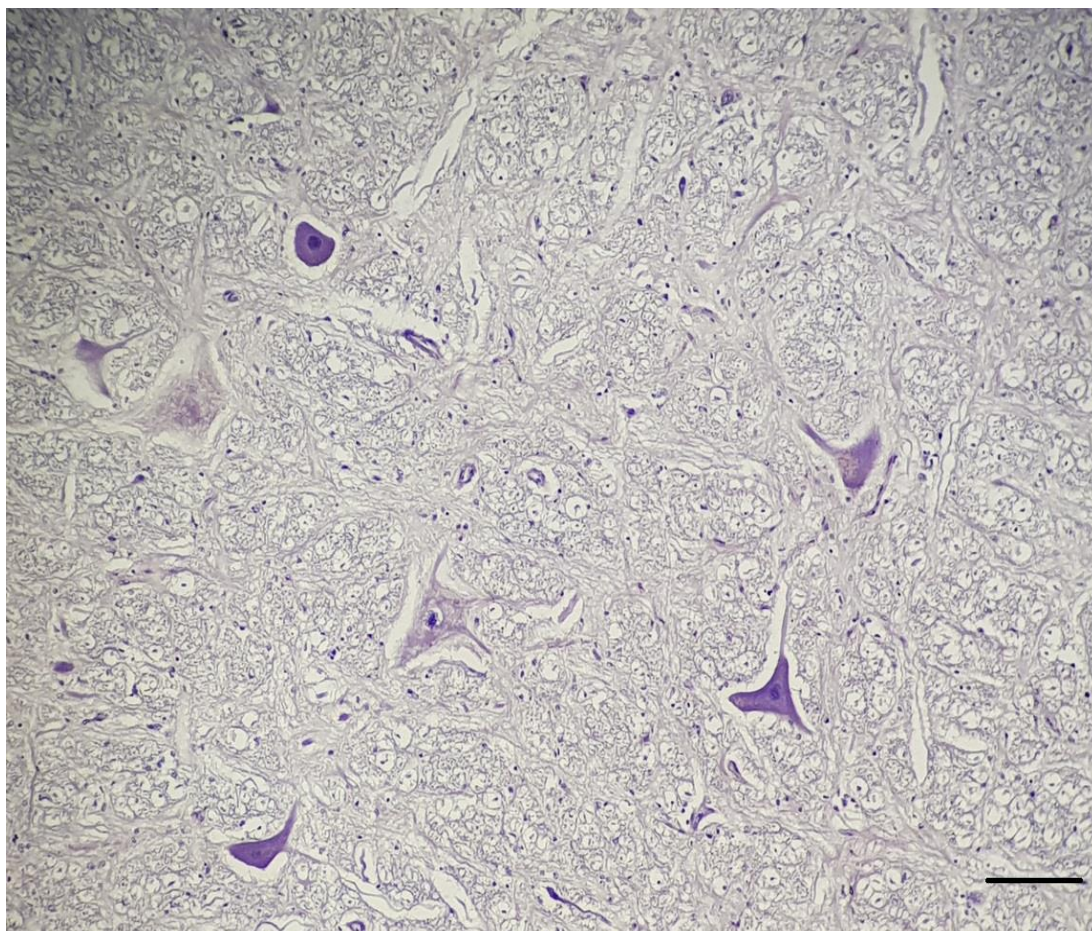


شکل شماره ۲- نمونه کنترل مثبت BSE در مغز گاو. در تصویر رسوب کروموژن دای آمینو بنزیدین به رنگ قهوه ای رنگ در سلول های عصبی (فلش های نشان داده شده در تصویر) مشاهده می شود. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی. بزرگنمایی ۴۰۰ (میله افقی به طول ۵۰ میکرون)

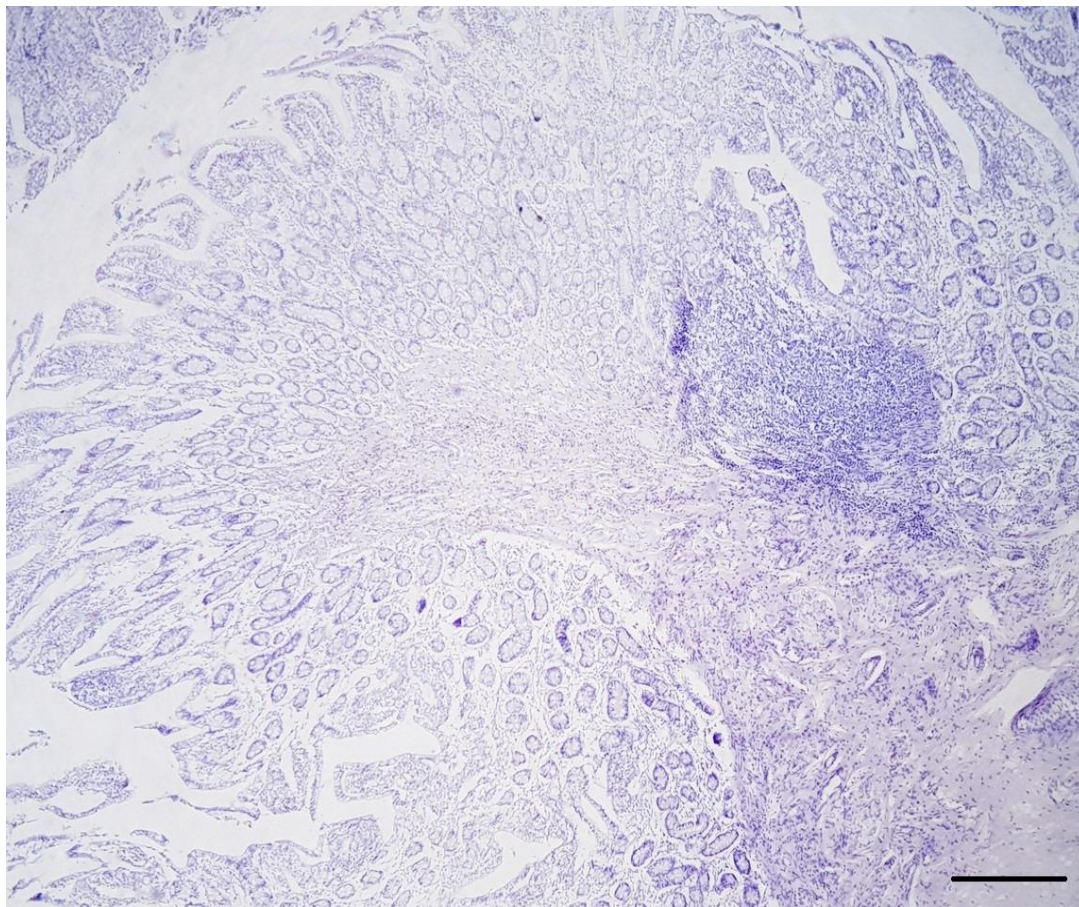


شکل شماره ۳- نمونه مغز در گاو. در تصویر رسوب کروموژن قهوه ای رنگ در سلول های عصبی

مشاهده نشد. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی. بزرگنمایی ۴۰۰ (میله افقی به طول ۵۰ میکرون)



شکل شماره ۴- نمونه مغز در گاو. در تصویر رسوب کروموژن قهوه ای رنگ در سلول های عصبی مشاهده نشد. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی. بزرگنمایی ۴۰۰ (میله افقی به طول ۵۰ میکرون)



شکل شماره ۵- نمونه ایلئوم در گاو. در تصویر رسوب کروموژن قهوه ای رنگ مشاهده نشد. رنگ

آمیزی ایمونوهیستوشیمی. بزرگنمایی ۲۰۰ (میلۀ افقی به طول ۲۰۰ میکرون)

۳-۳ بحث

جنون گاوی یا آنسفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی بیماری کشنده و دژنراتیو سیستم

اعصاب مرکزی قابل انتقال گاو می باشد. این بیماری یک هفته تا چند ماه پس از بروز

نشانه های بالینی سبب مرگ گاو می شود. میانگین دوره کمون بیماری ۴ تا ۵ سال است. این بیماری در دام های بالغ در هر دو جنس نر و ماده م - مشاهده شد - و حساسیت تمامی نژادها در برابر ابتلاء به بیماری یکسان است. مهم ترین نشانه های بیماری جنون گاوی، دوره کمون طولانی و معم - ۲ تا ۸ سال، اختلالات حرکتی، تغییر در رفتار و ایجاد حالات غیرمعمول، حساسیت زیاد نسبت به صدا، ملامسه و نور ناگهانی، کاهش وزن علی رغم وجود اشتها، علائم عصبی، لگد زدن هنگام شیردوشی، کاهش تولید شیر، تغییرات رفتاری مانند تشویش، حرکت با سرافتاده به پایین، حرکات زیاد گوش ها، بی میلی در عبور از درها و از یک سطح به سطح دیگر و میل به حمله می باشد (۷۶). در سال ۱۹۹۶ شواهدی دال بر انتقال بیماری از گاو به انسان بدست آمد که متعاقباً تأیید شد (۹ و ۱۰). از آنجا که استفاده از بافت های مخاطره آمیز دام بیمار می تواند بیماری را منتقل نماید، اهمیت فوق العاده ای از نظر بهداشت عمومی و همچنین از نظر تجارت دام و تولیدات دامی محدودیت هایی را ایجاد نموده است. لذا با توجه به ضرورت ذکر شده، در این طرح با هدف راه اندازی این تست تشخیصی مهم در کشور، که مورد تایید مراجع ذیصلاح بین المللی نظیر OIE و FAO است، می باشد. برای این منظور از آنتی بادی مونوکلونال HM5011 Prion PrP^{SC}, mAb 1.5D7 شرکت Hycult استفاده شد، این آنتی بادی (IgG2b) مونوکلونال و جهت شناسایی ایمونوژن -BoPrP153- 165 در نمونه های انسان، گاوسانان و موش قابل استفاده می باشد. در این طرح به منظور بررسی دقیق، از تعداد ۱۰۰ نمونه روده (انتهای ایلمئوم) استفاده شد تا آلودگی نواحی Peyer's Patches در عفونت خوراکی دام مورد بررسی قرار گیرد و همانطور که نتایج نشان داده است تمامی نمونه ها منفی بودند. مطابق با تحقیق مشابهی که توسط Bergstrom و همکاران در سال ۲۰۰۶ با آنتی بادی

مونوکلونال مذکور صورت گرفت آن ها نشان دادند که در آلودگی خوراکی همسترهای آلوده شده با اسکرایی در مدت بسیار کوتاهی پس از آلودگی نواحی Peyer's Patches روده آلودگی با پریون را در روش ایمونوهیستوشیمی به خوبی نشان می دهند (۲۳). همچنین در این تحقیق تعداد ۱۰۰ نمونه مغز از گاوهای مشکوک کشتار شده در کشتارگاه صنعتی مشهد اخذ و با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال مذکور به روش ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت، نتایج این بررسی نشان داد، تمامی نمونه های فوق از لحاظ آلودگی با پریون جنون گاوی منفی می باشند. Cordes و همکاران در سال ۲۰۰۸ در یک تحقیق مشابه بر روی نمونه های مغز گاو، گوسفند و همستر آنتی بادی مونوکلونال مذکور را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که استفاده از این آنتی بادی با روش ایمونوهیستوشیمی نتایج بسیار مطلوب و واکنش قوی در رنگ آمیزی به همراه داشت (۲۴).

در نتیجه با توجه به اهمیت بیماری جنون گاوی و نقش مهم و حیاتی آن در بهداشت عمومی و تجارت جهانی، در حال حاضر تجارت گوشت و تولیدات دامی از کشورهای نامشخص توسط مراجع بین المللی با محدودیت های جدی مواجه گردیده است. این مراجع، کشورها را از نظر انجام اقدامات مراقبتی و مبارزه ای، طبقه بندی نموده و در صورت وجود احتمال آلودگی، با دشواری های زیادی در زمینه تجارت روبرو خواهند شد. روش ایمونوهیستوشیمی می تواند علاوه بر ارائه مدارک و مستندات ضروری و مورد قبول جوامع جهانی جهت تعیین جایگاه کشور از لحاظ سطح آلودگی، در زمینه کنترل و ریشه کنی این بیماری در کشورهایی که احتمالاً با بیماری درگیر می باشند، نقش بسزایی داشته باشد.

منابع

منابع

1. Yin S, Pham N, Yu S, Li C, Wong P, Chang B, et al. Human prion proteins with pathogenic mutations share common conformational changes resulting in enhanced binding to glycosaminoglycans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(18):7546-51.
2. Sakudo A, Onodera T. Bovine Spongiform Encephalopathy. 2016. p. 901-12.
3. Ryan AM, Womack JE. Somatic cell mapping of the bovine prion protein gene and restriction fragment length polymorphism studies in cattle and sheep. *Animal genetics*. 1993;24(1):23-6.
4. Murdoch BM, Murdoch GK. Genetics of Prion Disease in Cattle. *Bioinformatics and Biology Insights*. 2015;9S4:BBI.S29678.
5. Grassmann A, Wolf H, Hofmann J, Graham J, Vorberg I. Cellular aspects of prion replication in vitro. *Viruses*. 2013;5(1):374-405.
6. Gavier-Widén D, Stack MJ, Baron T, Balachandran A, Simmons M. Diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathies in Animals: A Review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2005;17(6):509-27.
7. Sander P, Hamann H, Drogemuller C, Kashkevich K, Schiebel K, Leeb T. Bovine prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms modulate PRNP expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(45):37408-14.
8. Kashkevich K, Humeny A, Ziegler U, Groschup MH, Nicken P, Leeb T, et al. Functional relevance of DNA polymorphisms within the promoter

- region of the prion protein gene and their association to BSE infection. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2007;21(7):1547-55.
9. Zachary JF, McGavin MD, editors. Pathologic Basis of Veterinary Disease 5. Elsevier Health Sciences; 2012: 810-813.
 10. Kovacs GG, Budka H. Molecular pathology of human prion diseases. Int J Mol Sci. 2009;10(3):976-99.
 11. Moore RA, Taubner LM, Priola SA. Prion protein misfolding and disease. Current opinion in structural biology. 2009;19(1):14-22.
 12. Porcario C, Hall SM, Martucci F, Corona C, Iulini B, Perazzini AZ, et al. Evaluation of two sets of immunohistochemical and Western blot confirmatory methods in the detection of typical and atypical BSE cases. BMC research notes. 2011;4:376.
 13. Manning L, O'Rourke KI, Knowles DP, Marsh SA, Spencer YI, Moffat E, et al. A collaborative Canadian-United Kingdom evaluation of an immunohistochemistry protocol to diagnose bovine spongiform encephalopathy. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc. 2008;20(4):504-8.
 14. Keulen LJM, Langeveld JPM, Garssen GJ, Jacobs JG, Schreuder BEC, Smits M. Diagnosis of bovine spongiform encephalopathy: A review. The Veterinary quarterly. 2000;22:197-200.
 15. E V, Roels S. BSE: diagnosis and control, the consequences for human health and geographical BSE risk. Le Médecin Vétérinaire du Québec. 2004;34:94-5.
 16. Rodríguez F, Castro P, Poveda JB, Afonso AM, Fernandez A. Immunohistochemical labelling of cytokines in calves infected experimentally with Mycoplasma bovis. Journal of Comparative Pathology. 2015 Feb 1;152(2-3):243-7.

17. Rodriguez F, Ball HJ, Suárez-Bonnet A, Ramirez AS, Fernández A. Immunohistochemical labelling of cyclooxygenase-2 in lung lesions of calves infected with *Mycoplasma bovis*. *Journal of Comparative Pathology*. 2015 Feb 1;152(2-3):106-9.
18. Une Y, Mori T. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2007 Sep 1;30(5-6):415-25.
19. Debeer SOS, Baron TGM, Bencsik AA. Immunohistochemistry of PrP^{Sc} Within Bovine Spongiform Encephalopathy Brain Samples with Graded Autolysis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2001;49(12):1519-24.
20. Farías R GA. Differential Diagnosis of Scrapie in Post Mortem Goats by immunohistochemistry. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*. 2017;5.
21. Koo HC, Park YH, Lee BC, Chae C, O'Rourke KI, Baszler TV. Immunohistochemical detection of Prion protein (PrP^{Sc}) and epidemiological study of BSE in Korea. *Journal of veterinary science*. 2001;2(1):25-31.
22. Vallino Costassa E, D'Angelo A, Mazza M, Meloni D, Baioni E, Maurella C, et al. Clinical, pathological, and molecular features of classical and L-type atypical-BSE in goats. *PLoS One*. 2018;13(5):e0198037-e.
23. Bergström AL, Jensen TK, Heegaard PM, Cordes H, Hansen VB, Laursen H, Lind P. Short-term study of the uptake of PrP^{Sc} by the Peyer's patches in hamsters after oral exposure to scrapie. *Journal of comparative pathology*. 2006 Feb 1;134(2-3):126-33.
24. Cordes H, Bergström AL, Ohm J, Laursen H, Heegaard PM. Characterisation of new monoclonal antibodies reacting with prions from

both human and animal brain tissues. Journal of immunological methods.
2008 Sep 15;337(2):106-20.



**School of Veterinary Medicine
Ferdowsi University of
Mashhad**



**Veterinary Organization of
Khorasan Razavi**

Title:

**Implementation of Immunohistochemical Diagnostic Test for
Monitoring of Bovine Spongiform Encephalopathy**

Executive:

**Dr. Zahra Moosavi, DVM, DVSc.
Accicent professor, Faculty of Veterinary Medicine**

Ordered by:

Veterinary Organization of Khorasan Razavi

2019