بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری حرفه‌ای رشته‌ی دامپزشکی

ارزیابی توالی اسیدهای نوکلئیک ژن M2 ویروس‌های آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 با استفاده از تکنیک RT-PCR

استاد راهنما:

دکتر عبدالکریم زمانی مقدم

استاد مشاور:

دکتر فرهید همت زاده

پژوهشگر:

محمد رفیعی دولت آبادی

دی ماه ۱۳۹۰

دانشکده دامپزشکی

گروه علوم درمانگاهی

پایان نامه آقای **محمد رفیعی دولت آبادی** جهت اخذ درجه دکتری رشته دامپزشکی با عنوان **ارزیابی توالی اسیدهای نوکلئیک ژن M2 ویروس‌های آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 با استفاده از تکنیک RT-PCR** در تاریخ **۱۳۹۰/۱۰/۱۳** با حضور هیأت داوران زیر مورد بررسی و با رتبه‌ی ..... مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر عبدالکریم زمانی مقدم با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۲- استاد مشاور پایان نامه دکتر فرهید همت زاده با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۳- استاد داور دکتر شهاب بهادران با مرتبه علمی استادیار امضاء

۴- استاد داور دکتر مرتضی حسینی نژاد با مرتبه علمی استادیار امضاء

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ گونه مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی‌نماید.

دکتر سعید حبیبیان

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی

دانشکده دامپزشکی

دکتر حسین نورانی

رییس دانشکده دامپزشکی

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

با تقدیر و تشکر از:

خانواده‌ی عزیز، دلسوز و مهربانم که آرامش روحی و آسایش فکری من را فراهم نمودند تا با حمایت های همه جانبه، مقاطع گذشته تحصیلی و نیز پایان نامه ام را به اتمام برسانم . پدر و مادر بزرگوار و دلسوزم، همسر مهربانم، برادر و خواهر عزیزم.

جناب آقای دکتر زمانی مقدم، استادی فرزانه و بزرگوار که در تمامی مراحل انجام پایان نامه خالصانه و با صبر و حوصله ی قابل تقدیرشان مرا راهنمایی و یاری کردند و همچنین در طول دوران تحصیلم، مرا مرهون محبت‌های بیکران خود نمودند.

جناب آقای دکتر همت زاده، مشاور محترم که در راه تکمیل این پایان‌نامه از هیچ کوششی فرو گذار ننمودند و مرا از گنجینه‌ی علمیشان، خصوصاً تجربه‌ی کار بر روی ویروس آنفلوانزا بهره مند نمودند.

جناب آقای دکتر بهادران و جناب آقای دکتر حسینی نژاد ، که با قبول داوری این پایان نامه مرا مرهون الطاف خود نمودند.

جناب آقای مهندس کیانی، دوست گرامیم جناب آقای حسین طهماسبی ، سرکار خانم مهندس صفرپور، سرکار خانم مهندس یکتنه، جناب آقای دکتر دوستی و سایر کارشناسان و کارکنان دانشکده که بنده را در انجام مراحل پایان‌نامه یاری کردند.

اساتید بزرگوارم که از محضر علمی و تجربیات گرانبهای این بزرگواران بهره فراوان بردم.

دوستان پرمهرم در دانشگاه شهرکرد، به خصوص ورودی ۸۴ دانشکده‌ی دامپزشکی، که در این مدت شش سال بهترین خاطرات زندگیم در کنارشان رقم خورد و به خاطر محبت های فراوانی که در طول دوران تحصیل به من داشتند، از آن‌ها تشکر می‌کنم.

«اثری» کوچک است، خیلی کوچک و شاید هیچ!

اما به رسم ادب

تقدیم می‌شود به:

« شهیدان گمنام هشت سال دفاع مقدس »

جوانمردانی که بی‌ادعا بودند و حتی نه در پی این که یاد و اثری از آن‌ها باقی بماند.

چکیده

ویروس آنفلوانزا متعلق به خانواده ی *Orthomyxoviridae* است که دارای ژنوم RNA تک‌رشته‌ای ۸ قطعه‌ای و با سنس منفی می‌باشد. قطعه ماتریکس (M) دو پروتئین M1 و M2 را کد می کند. مطالعات پیشین آشکار کرده اند که پروتئین M2 عملکرد کانال یونی را داشته که تقریباً در میان تمام تحت تیپ های ویروس A آنفلوانزا، بخصوص H5N1 و H9N2 حفاظت‌شده است و به‌عنوان گزینه‌ای نویددهنده جهت توسعه ی واکسن نوترکیب وسیع الطیف علیه آنفلوانزای A تلقی می‌گردد. هدف از این پژوهش ارزیابی توالی اسید های نوکلئیک ژن M2 در ویروس های آنفلوانزای H9N2 جداشده در شهرکرد و به دنبال آن بررسی میزان حفاظت شدگی ژن M2 در نمونه های اخذ شده است. بدین منظور استخراج کامل RNA از مایع آلانتوئیک تخم مرغ جنین‌دار آلوده شده به ویروس صورت گرفت. سپس RT-PCR بر روی نمونه‌های مذکور انجام شد. پس از تأیید محصول اختصاصی PCR روی ژل آگارز یک درصد، توالی اسیدهای نوکلیئک محصول به دست آمده تعیین و ارزیابی گردید. نتایج حاصل از مقایسه ی ردیف نوکلئوتیدی تعیین شده در این مطالعه با تعدادی از سکانس - های شناخته شده‌ی ژن M2 در کشورمان و سایر نقاط جهان (موجود در بانک ژن) نشانگر وجود ۹۲ تا ۹۹ درصد شباهت ژنتیکی بود. این نتایج نشان می دهد که ژن M2 تاحدود زیادی حفاظت شده است و می تواند آنتی ژن مناسبی برای تولید واکسن جهانی علیه آنفلوانزا باشد.

واژگان کلیدی: آنفلوانزای طیور، H9N2، ژن M2، RT-PCR، توالی اسیدهای نوکلئیک

فهرست مطالب

عنوان	شماره صفحه
فصل اوّل: مقدمه	۶
فصل دوّم: کلیات	۸
۲-۱- تاریخچه	۸
۲-۲- اتیولوژی	۹
۲-۲-۱- رده بندی انواع ویروس آنفلوانزا	۹
۲-۲-۱-۱- ویروس آنفلوانزا تیپ A	۹
۲-۲-۱-۲- ویروس آنفلوانزا تیپB	۱۰
۲-۲-۱-۳- ویروس آنفلوانزا تیپ C	۱۰
۲-۳- مورفولوژی	۱۰
۲-۳-۱- پروتئین‌های ویروسی	۱۱
۲-۳-۱-۱- پروتئین PB2	۱۲
۲-۳-۱-۲- پروتئین PB1	۱۲
۲-۳-۱-۳- پروتئینPA	۱۲
۲-۳-۱-۴- گلیکوپروتئین هماگلوتینین (HA)	۱۲
۲-۳-۱-۵- پروتئین NP	۱۳
۲-۳-۱-۶- گلیکوپروتئین نورآمینیداز (NA)	۱۳
۲-۳-۱-۷- پروتئین‌های M1 و M2	۱۳
۲-۳-۱-۸- پروتئین‌های NS1 و NS2	۱۶
۲-۳-۲- ترکیبات شیمیایی ویروس	۱۶
۲-۴- تکثیر ویروس آنفلوانزا	۱۷
۲-۵- ژنتیک ویروس‌های آنفلوانزا	۱۸
۲-۵-۱- آنتی ژنیک دریفت	۱۸
۲-۵-۲- آنتی ژنیک شیفت	۱۸
۲-۶- داروهای ضد ویروس آنفلوانزا	۱۹
۲-۶-۱- آدامانتان‌ها	۱۹
۲-۶-۱-۱- مقاومت به آدامانتان‌ها	۲۰
۲-۶-۲- مهار کننده‌های نورآمینیداز	۲۰
۲-۶-۲-۱- مقاومت به مهار کننده‌های نورآمینیداز	۲۱
۲-۷- پاتوژن ویروس‌های آنفلوانزا	۲۱
۲-۸- ویروس‌های آنفلوانزای طیور	۲۳

۲-۸-۱- میزبان‌های طبیعی و تجربی ۲۴
۲-۸-۲- مقاومت به عوامل فیزیکی و شیمیایی ۲۵
۲-۸-۳- خصوصیات حدت ویروس ۲۵
۲-۸-۴- بیماری‌زایی بیماری آنفلوانزای پرندگان ۲۶
۲-۸-۵- انتقال بیماری و ناقلین ۲۷
۲-۸-۶- دوره کمون بیماری و میزان ابتلا و مرگ و میر ۲۸
۲-۸-۷- ایمنی ۲۸
۲-۸-۹- علائم کالبدگشایی ۲۹
۲-۸-۱۰- علائم هیستوپاتولوژی ۲۹
۲-۸-۱۱- جداسازی و شناسایی عامل ایجادکننده ۳۰
۲-۸-۱۱-۱- جداسازی ویروس ۳۰
۲-۸-۱۱-۲- تسخیر Ag ویروسی در روش ELISA ۳۱
۲-۸-۱۱-۳- روش‌های تشخیص مولکولی ۳۱
۲-۸-۱۲- درمان ۳۲
۲-۸-۱۳- پیشگیری و کنترل ۳۲
۲-۸-۱۳-۱- پیشگیری ۳۲
۲-۸-۱۳-۲- کنترل ۳۳
۲-۹- واکسیناسیون ۳۴
۲-۹-۱- تاریخچه ۳۴
۲-۹-۲- واکسیناسیون در انسان ۳۶
۲-۹-۳- واکسیناسیون در پرندگان ۳۶
۲-۱۰- نفوذ آنفلوانزای طیور به ایران ۳۸
۲-۱۱- انجام تحقیقات بیشتر روی آنفلوانزا ۳۸

فصل سوّم: مواد و روش کار ۳۹

۳-۱- نمونه گیری ۳۹
۳-۱-۱- پرسشنامه فارم‌های مورد بررسی ۴۰
۳-۲- کشت ویروس ۴۱
۳-۳- تهیه گلبول قرمز ۱٪ ۴۱
۳-۴- آزمایش فعالیت هماگلوتیناسیون (HA) ۴۲
۳-۵- آزمایش مهار هماگلوتیناسیون (HI) ۴۲
۳-۶- استخراج RNA ۴۳
۳-۷- ارزیابی کیفی و کمی RNA ۴۳
۳-۸- ساخت cDNA ۴۴

۳-۹- آزمایش PCR ۴۴
۳-۹-۱- روش کار ۴۵
۳-۹-۱-۱- مرحله اول: ساخت Master mix ۴۵
۳-۹-۱-۲- مرحله دوم: انجام PCR و الکتروفورز ۴۶
۳-۹-۱-۳- مرحله سوم: بهینه سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR ۴۷
۳-۱۰- تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک محصول RT-PCR (ژن M2) و تفسیر نتایج ۴۷

فصل چهارم: نتایج ۴۸

۴-۱- نتایج آزمایش فعالیت هماگلوتیناسیون (HA) ۴۸
۴-۲- نتایج آزمایش مهار هماگلوتیناسیون (HI) ۴۸
۴-۳- استخراج RNA و ساخت cDNA ۴۸
۴-۴- PCR و تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک ۴۹
۴-۵- ارزیابی توالی‌ها ۴۹

فصل پنجم: بحث و پیشنهادات ۵۵

۵-۱- بحث ۵۵
۵-۲- پیشنهادات ۵۸

منابع ۵۹

فهرست شکل‌ها

عنوان شماره صفحه

شکل ۲-۱: ساختار ویریون آنفلوانزا ۱۱
شکل ۲-۲: قطعات ژنومی کد کننده پروتئین‌های ویروس آنفلوانزا ۱۱
شکل ۲-۳: سکانس کامل ژن M که از دو ژن با نام‌های M1 و M2 تشکیل شده است. ۱۵
شکل ۴-۱: تصویر الکتروفورز ژل آگارز مربوط به کنترل کیفی cDNA ساخته شده از ژن M2 ویروس آنفلوانزا ۴۹
شکل ۴-۲: تصویر الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR مربوط به تکثیر cDNA ژن M2 ویروس آنفلوانزا ۴۹
شکل ۴-۳: نتایج Aignment نتایج سکانس با سویه‌های منتخب از بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Clustal X ۵۰

فهرست جدول‌ها

عنوان شماره صفحه

جدول ۳-۱ سایر دستگاه‌های مورد استفاده در آزمایش PCR ۴۵
جدول ۳-۲ مواد مورد نیاز جهت ساخت Master mix و مقدار آن‌ها ۴۶
جدول ۳-۳ برنامه حرارتی مورد استفاده در آزمایش PCR ۴۶
جدول ۴-۱ میزان تشابه نمونه‌های سکانس شده با برخی سویه‌های موجود در بانک ژن ۵۳

فصل اول

مقدمه

پرورش طیور به صورت اهلی از دیرباز مورد توجه انسان قرار داشته است. همزمان با پیشرفت حرفه‌ای و عملی این رشته و کاربرد فناوری در توسعه آن امروزه به عنوان یک صنعت پیشرفته در مورد های مختلف پا به میدان نهاده است. صنعت پیشرفته‌ی طیور با چالش های مختلفی همراه بوده است ؛ از جمله بیماری های مختلفی که آن را در معرض خطر قرار داده و خسارت های فراوانی را به آن وارد ساخته است که بیماری آنفلوانزا یکی از مهمترین این بیماری‌هاست.

آنفلوانزای طیور (Avian Influenza) یکی از مهمترین بیماری های ویروسی طیور می باشد که در تمام دنیا گسترش دارد. عامل این بیماری ویروسی از خانواده ی ارتومیکسوویریده (Orthomyxoviridae family) می‌باشد. این خانواده دارای ژنوم ۸ قطعه‌ای و ۳ تیپ A، B و C است. تیپ های B و C عامل آنفلوانزای انسانی هستند. تیپ A در انسان و سایر پستانداران و پرندگان ایجاد بیماری می کند. گونه‌های مختلف پرندگان وحشی و عمدتاً طیور آبزی مخازن مهم ویروس هستند . گسترش ویروس آنفلوانزای طیور در انواع پرندگان اهلی و وحشی گزارش شد ه است. بوقلمون (Turkey) حساس‌ترین پرنده به این ویروس است.

در ماکیان بیماری از حالت تحت بالینی با عفونت خفیف دستگاه تنفس فوقانی و با کاهش مختصر در تولید تخم مرغ، تا بیماری حاد و کشنده و کاهش تولید تخم مرغ تا حد صفر و درگیری عصبی، گوارشی ، ضایعات دستگاه اداراری، دستگاه تولد مثل، قلب و عروق و عضلات ، به صورت متغیر می‌باشد. با توجه به افزایش نیاز به صنعت پرورش مرغ، تراکم بیش از حد واحدهای مرغداری، مدیریت نامناسب و عدم قرنطینه ی کافی در واحدهای درگیر، این بیماری شیوع پیدا کرده است [۴۹،۳۵].

این بیماری از نظر اقتصادی بسیار با اهمیت است و علاوه بر خسارات مستقیم ناشی از خود بیماری و تلفات شدید آن، خطر آلودگی انسان هم وجود دارد . در اکثر موار د تلفات و خسارات ناشی از یک واگیری آنفلوانزا قابل پیشگیری نمی باشد؛ زیرا عوامل متعددی همچون اختلاف در خواص بیولوژیک ویروس، عفونت های همزمان، استرس‌های محیطی، سن و جنس پرنده نتیجه عفونت را تحت تاثیر قرار می دهد؛ در نتیجه در یک واگیری بیماری آنفلوانزا میزان واگیری و مرگ و میر از مقادیر ناچیز تا نزدیک ب ه صد در صد ممکن است متغیر باشد . ویروس‌های آنفلوانزا قابلیت تغییرات ژنتیکی بسیار زیادی دارند و دارای خاصیت جهش زایی شیفت (Shift) و دریفت (Drift) فراوانی هستند. شواهدی در دست است که این ویروس ها با تغییراتی قابل انتقال به پستانداران بوده و یا می توانند از پستانداران به پرندگان منتقل شوند . بیماری آنفلوانزا خصوصاً توسط پرندگان آبزی مهاجر قابل انتشار بوده و در سراسر دنیا ایجاد مشکل نموده است؛ لذا آنفلوانزا یک مشکل جهانی است و راه حل‌ها نیاز به همکاری، تلاش و کوشش بین المللی خواهد داشت . مخزن این ویروس پرندگان وحشی و آبزی است و تاکنون تحت تیپ‌های بسیاری از ویروس آنفلوانزا که از نظر آنتی ژن‌های هماگلوتینین (Hemmaglutinin) و نورآمینیداز (Neuraminidase) متفاوت می‌باشند، در پرندگان اهلی و وحشی در سراسر جهان به دست آمده است [۳۶،۳۵].

بیماری آنفلوانزا اولین بار در ایران در خرداد ماه سال ۱۳۷۷ در مرغداری های گوشتی، تخمگذار و مادر اطراف تهران و قزوین شیوع پیدا کرد و پس از جداسازی تحت تیپ آن، H9N2 شناسایی شد و سپس در اکثر نقاط کشور شایع گردید [۱۳۹،۱۳۸].

پیشگیری از آنفلوانزا عمدتاً بر اساس واکسیناسیون می باشد. گرچه واکسن‌های زنده‌ی تخفیف حدت یافته نیز در بعضی از کشورها مورد استفاده قرار می گیرند، اما در حال حاضر اکثر واکسن های آنفلوانزا که در کلینیک ها مورد استفاده قرار می‌گیرند غیرفعال و ناکارآمد شده‌اند [۶۵،۱۰۱].

قطعه‌ی ماتریکس (Matrix) ویروس آنفلوانزا که بر روی قطعه‌ی هفتم ژنوم این ویروس قرار گرفته است، پروتئین-های M1 و M2 را کد می کند. مطالعات پیشین آشکار کرده اند که پروتئین M2 یک پروتئین غشایی است که عملکرد کانال یونی را داشته و در نفوذ به سلول میزبان و در پوشش‌برداری (uncoating) RNA ویروسی نقش

دارد [۵۵،۱۰۸،۱۱۰]. پهنه‌ی وسیع پروتئین M2 آنفلوانزا که تقریباً در میان تمام تحت تیپ های ویروس A آنفلوانزا، به خصوص H5N1 و H9N2 حفاظت شده است، به عنوان گزینه‌ای نوید دهنده جهت توسعه ی واکسن-های نوترکیب وسیع الطیف آنفلوانزای A تلقی می‌گردد [۲۷]. قبلاً چندین واکسن بنا نهاده شده بر M2 علیه چالش با ویروس های آنفلوانزای همولوگ و غیر همولوگ شامل تحت تیپ H5N1 با محافظت موفقیت آمیز تأیید شده است و در میان آن ها شواهدی برای اهمیت نقش محافظتی آنتی بادی‌های اختصاصی M2e (بخش خارجی پروتئین M2) وجود دارد [۳۴،۹۳،۱۱۷،۱۳۴].

توضیحات فوق بر ضرورت بررسی و تحقیق بیشتر روی ویروس H9N2 که در سرتاسر جهان در حال گردش است، تأکید می کند. در این تحقیق سعی بر آن بوده است که با ارزیابی توالی اسید های نوکلئیک ژن M2 ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 در ایران با استفاده از روش RT-PCR و توالی یابی اسیدهای نوکلئیک ژن مورد نظر، میزان شباهت سویه‌های ایرانی نمونه‌های اخذ شده از نظر توالی اسید های نوکلئیک با دیگر سویه ها تعیین گردد. بدین وسیله میزان حفاظت شدگی این ژن در سویه های جداشده ایرانی مشخص گردیده که در آینده می -توان از آن برای تولید واکسن نوترکیب مناسب و با حفاظت‌کنندگی بالا و طولانی مدت استفاده نمود.

فصل دوم

کلیات

۲-۱- تاریخچه

بیماری آنفلوانزا (Influenza)، یک بیماری عفونی است که بوسیله ویروس های RNA از خانواده ی ارتومیکسوویریده ایجاد شده و پرندگان و پستانداران را مبتلا می کند [۶۲،۵۵]. نام آنفلوانزا در حقیقت از تلاش اولیه‌ای که برای تعریف این ویروس صورت گرفته مشتق شده است . در قرن چهارم میلادی در شهر فلورانس ایتالیا در یک گردهمایی تاثیر ستارگان بر این بیماری مورد بحث و بررسی قرار گرفت و معنای کلمه ی Influence به معنای تاثیر، برتری و یا توفیق می باشد. این بیماری به همین اسم، نام گذاری شد که در قرن حاضر هم به تلفظ ایتالیایی به آن آنفلوانزا می گویند [۳۵،۴۹]. بیماری آنفلوانزا یکی از مهمترین بیماری های مشترک بین انسان و طیور می باشد. آنفلوانزا هر ساله بین انسان ها شیوع یافته و باعث سرفه، عطسه، سردرد، تب شدید و دردهای عفونی و موضعی در بدن می شود. علیرغم خسارت‌های صدها میلیارد دلاری بر صنعت طیور جهان، در پاندمی‌های (Pandemies) اسپانیا (۱۹۱۹-۱۹۱۸)، آسیا (۱۹۵۷) و هنگ کنگ (۱۹۶۸)، به ترتیب تلفات ۵۰ میلیون، یک میلیون و ۲۰ میلیون انسان را در جهان باعث شده است [۶۶،۲۰]. هرکدام از این پاندمی‌ها بوسیله‌ی تظاهر گونه‌ی جدیدی از این ویروس در انسان ها ظاهر می شد. اغلب این گونه های جدید وقتی نمایان می شوند که یک ویروس آنفلوانزا از گونه‌های حیوانی دیگر به انسان ها منتقل می شود، یا وقتی که یک گونه ی انسانی ژن‌های جدیدی را از یک ویروس عامل عفونت در پرندگان یا خوک ها دریافت می کند. اخیراً بروز سویه‌ی جدید H5N1 و ایجاد سویه - های نوترکیب جدید از تیپ A آنفلوانزا باعث وحشت جامعه ی بین‌المللی شده است [۴۶،۳۸]. تاکنون گزارش انتقال این ویروس از پرنده به انسان ثابت شده است ، ولی در مورد انتقال انسان به انسان گزارش های موثقی در دست نیست؛ درعین حال انتقال انسان به انسان این ویروس قابل پیش بینی و میسر است که درنتیجه ی آن فاجعه‌ی جهانی رخ خواهد داد [۸۱].

در آپریل ۲۰۰۹ یک گونه‌ی جدید آنفلوانزا پدیدار شد که ترکیبی از ژن های ویروسی آنفلوانزای پرندگان، خوک و انسان را با خود داشت . این گونه که در ابتدا لقب آنفلوانزای خوکی (Swine Flu) را گرفت با نام آنفلوانزای A/H1N1، برای اولین بار در مکزیک، ایالات متحده امریکا و چند کشوردیگر پدیدار شد که سازمان بهداشت جهانی، وقوع یک پاندمی را در ۱۱ ژوئن ۲۰۰۹ به طور رسمی اعلام کرد [۶۸].

معمول‌ترین واکسن انسانی، واکسن آنفلوانزای سه گانه (TIV) یا Influenza Trivalent Inactivated است، که حاوی مواد غیر فعال و تخلیص شده از سه گونه ی ویروسی است. به عنوان نمونه این واکسن شامل موادی از دو گونه‌ی ویروسی آنفلوانزای نوع A و یک گونه آنفلوانزا ی نوع B است [۱۴۸،۴۲]. TIV هیچ گونه خطر انتقال بیماری نداشته و فعالیت ضعیفی دارد [۱۴۸،۱۴۲]. واکسن‌های ساخته شده در هر سال ممکن ا ست برای سال بعد بی‌اثر باشند؛ چون ویروس آنفلوانزا به سرعت تغییر پیدا می‌کند و گونه‌های جدید به سرعت جایگزین گونه‌های قبلی می شوند [۱۴۸،۳۰]. داروهای ضد ویروسی را به همراه مهارکننده های نورآمینیداز می توان برای معالجه ی آنفلوانزا بکار برد که البته برای برخی گونه ها به طور جزئی مؤثر و یا حتی بی اثر هستند [۷۷،۷۱]. ویروس‌های آنفلوانزا بوسیله‌ی نور خورشید، ضدعفونی کننده‌ها و دترجنت‌ها (Detergents) غیرفعال می‌شوند [۱۰۳].

آنفلوانزای پرندگان در بوقلمون شدیدتر از ماکیان است و در اکثر پرندگان دیده می شود. آنفلوانزای طیور یک بیماری بسیار واگیر است که عامل آن در دستگاه های تنفس و گوارش جایگزین شده، گاهی مرگ و میر بسیار شدیدی در بین پرندگان آلوده ایجاد می کند. اولین بار در سال ۱۸۷۸ در ایتالیا توسط Perroncito به عنوان یک

بیماری خطرناک ماکیان تحت نام طاعون ماکیان (Avian Plague) تعریف شد. در سال ۱۹۰۱ عامل بیماری توسط Centanni و Savunozzi یک عامل پالایش‌پذیر توصیف شد و اعلام شد که این عامل احتمالاً یک ویروس می‌باشد [۵۳].

۲-۲- اتیولوژی

ویروس آنفلوانزا متعلق به خانواده Orthomyxoviridae است که دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای ۸ قطعه‌ای و با سنس منفی (Negative Sense) می‌باشد.

۲-۲-۱- رده‌بندی انواع ویروس آنفلوانزا

سویه‌های انسانی و طیوری ۳ جنس از میان ۵ جنس در خانواده‌ی اورتومیکسوویریده را به خود اختصاص می‌دهند و عبارتند از:

آنفلوانزای A

آنفلوانزای B

آنفلوانزای C

۲-۲-۱-۱- ویروس آنفلوانزا تیپ A

این جنس یک گونه دارد ؛ ویروس آنفلوانزای A. پرندگان آبزی وحشی میزبان‌های طبیعی برای انواع تحت تیپ-های ویروس آنفلوانزای A هستند. گاهی اوقات ویروس‌ها به گونه‌های دیگر منتقل شده و ممکن است پس از آن باعث طغیان بیماری در پرندگان خانگی و بومی یا پاندمی های آنفلوانزای انسانی شوند . ویروس‌های نوع A بیشترین بیماری زایی را در میان سه تیپ ویروس آنفلوانزا داشته و سخت ترین نوع بیماری را ایجاد می کنند [۱۴۰]. این ویروس را می‌توان بر اساس پاسخ آنتی‌بادی‌ها به ویروس‌ها، به سروتیپ‌های مختلفی تقسیم‌بندی کرد. این سروتیپ‌ها که در انسان ها تأیید شده و بر اساس تعدادی از مرگ و میرهای پاندمیک انسانی مرتب شده اند عبارتند از:

H1N1، Spanish Flu، که موجب پاندمی‌های ۱۹۱۸ و ۲۰۰۹ شد.

H2N2، Asian Flu در ۱۹۵۷

H3N2، Hung Kong Flu در ۱۹۶۸

H5N1، پاندمی کنونی و قابل تهدید درپرندگان و انسان

H7N7، که پتانسیل Zoonotic غیر معمولی دارد [۱۰۵].

H1N2، اندمیک (Endemic) در انسان‌ها و خوک‌ها

H9N2، اندمیک در پرندگان و انسان

H7N2

H7N3

.[۸۰] H10N7

۲-۲-۱-۲- ویروس آنفلوانزا تیپ B

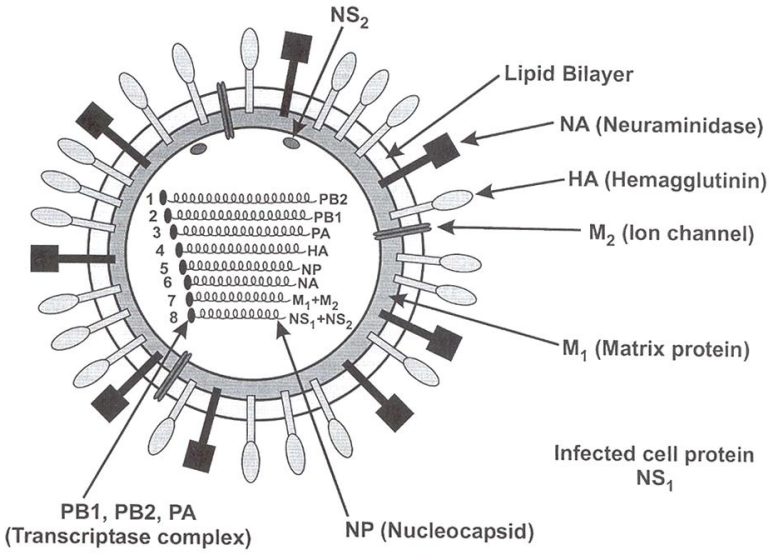
این جنس یک گونه دارد ؛ ویروس B آنفلوانزا. آنفلوانزای B تقریباً فقط انسان ها را مبتلا می کند [۱۰۵] و شیوع کمتری نسبت به آنفلوانزای A دارد. تنها حیوانات شناسایی شده که مستعد عفونت آنفلوانزا B هستند، خوک آبی (Seal) و راسو (Ferret) هستند [۱۰۳]. این نوع آنفلوانزا به میزان ۲ تا ۳ برابر کندتر از نوع A تغییر پیدا می‌کند و در نتیجه از نظر ژنتیکی کمتر دچار تغییر شده و فقط یک نوع سروتیپ دارد [۹۰]. ولی به هر حال آنفلوانزای B نیز دچار تغییر می شود و ایمنی پایدار با آن ممکن نیست [۹]. کاهش میزان تغییر آنتی ژنی، با تعداد میزبان محدود آن ارتباط دارد و این اطمینان را می‌دهد که پاندمی‌های آنفلوانزای B احتمالاً اتفاق نخواهد افتاد [۱۰۳].

۲-۲-۱-۳- ویروس آنفلوانزا تیپ C

این جنس هم یک گونه دارد ؛ ویروس C آنفلوانزا، که انسان ها، سگ‌ها و خوک ها را بیمار می کند.گاهی اوقات هم علاوه بر بیماری سخت، اپیدمی‌های محلی را نیز ایجاد می‌کند [۸۹]. به هر حال آنفلوانزای C، کمتر از انواع دیگر شیوع دارد و معمولاً فقط بیماری ملایمی را در کودکان ایجاد می کند [۱۲۴].

۲-۳- مورفولوژی

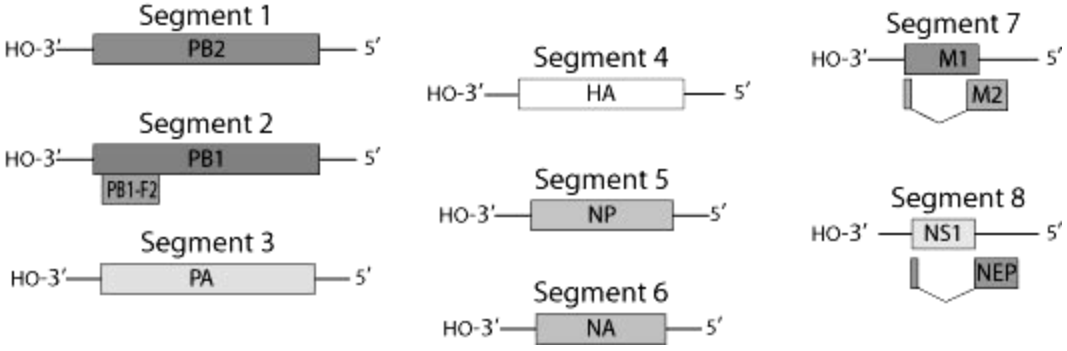
ویروس‌های آنفلوانزای A، B و C از نظر ساختمان عمومی خیلی شبیه هستند [۹۳،۱۲]. قطر این ذرات ویروسی ۱۲۰-۸۰ نانومتر بوده و معمولاً به شکل کروی با سطح ناهموار است؛ اگرچه اشکال رشته‌ای (Fillament) نیز در میان آن‌ها دیده می شود. این اشکال رشته‌ای بیشتر در آنفلوانزای C رایج بوده و ساختمان های طناب مانندی با طول بیش از ۵۰۰ میکرومتر هستند که روی سطح سلول‌های آلوده شده قرار می‌گیرند [۱۲]. به هر حال علی رغم این شکل های متنوع، ذرات ویروسی در هر سه مورد، ترکیب مشابهی دارند [۱۴۹]. این ذرات از یک پوشش ویروسی حاوی دو نوع گلیکوپروتئین ساخته شده اند که اطراف بخش مرکزی را در بر می گیرند. این بخش مرکزی حاوی ژنوم RNA ویروسی و پروتئین های ویروسی دیگری است که RNA را در بر گرفته و از آن محافظت می - کنند. RNA به صورت تک رشته‌ای می‌باشد؛ مگر در انواع خاص که دو رشته‌ای هستند [۱۴۹،۸۵]. معمولاً در یک ویروس ژنوم به صورت یک قطعه‌ی منفرد از اسید نوکلئیک نیست ؛ درعوض حاوی ۷ یا ۸ قطعه RNA به صورت قطعه قطعه شده است که هر قطعه از RNA حاوی یک یا دو ژن است (شکل ۲-۱) [۲۳].



شکل ۲-۱: ساختار ویریون (Virion) آنفلوانزا: هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) بر روی سطح ویروس قرار گرفته‌اند. RNA ویروس توسط پروتئین‌های ریبونوکلئاز (RNPs) احاطه شده‌اند [۲۳].

۲-۳-۱- پروتئین‌های ویروسی

از ۸ قطعه ژن ویروس آنفلوانزا، ۱۰ پروتئین ساخته می شود (شکل ۲-۲) که در مورد برخی از پروتئین های مهم بحث خواه د شد؛ هماگلوتینین (HA)، نورآمینیداز (NA)، نوکلئوپروتئین (NP)، M1، M2، NS1، NS2 (NEP)، PA، PB1، PB1-F2 و PB2 [۷۰].



شکل ۲-۲: قطعات ژنومی کد کننده پروتئین‌های ویروس آنفلوانزا [۷۰].

۲-۳-۱-۱- پروتئین PB2

از اولین قطعه‌ی ژنوم ویروس به طول ۲۳۴۱ نوکلئوتید، پروتئین PB2 به طول ۷۵۹ اسیدآمینه ساخته می‌شود که یک جزء مهم کمپلکس تکثیر می باشد. این پروتئین نقش مهمی در شروع رونویسی دارد ؛ چرا که محل اتصال pre-mRNA CAPهای سلولی است. البته علاوه بر رونویسی در تکثیر هم نقش دارد. PB2 یک جزء مهم در حدت و تعیین میزبان ویروس می‌باشد [۱۲۲،۶].

۲-۳-۱-۲- پروتئین PB1

از دومین قطعه ی ژنوم ویروس به طول ۲۳۴۱ نوکلئوتید، پروتئین PB1 به طول تقریبی ۷۵۷ اسیدآمینه که جزء کمپلکس پلیمراز (Polymerase Complex) ویروسی است، ساخته می‌شود. این پروتئین در حین طویل شدن RNA، اضافه شدن نوکلئوتیدها را کاتالیز می کند [۱۳].

۲-۳-۱-۳- پروتئین PA

در مورد پروتئین PA به طول ۷۱۶ اسیدآمینه که از قطعه ی سوم ژنوم ویروس به طول ۲۲۳۳ نوکلئوتید کد می شود، عملکرد خاصی شناس ایی نشده است . البته مطالعات نشان داده اند که PA خاصیت پروتئولیتیکی (Proteolytic) داشته و در تکثیر و رونویسی نقش دارد ولی جزئیات عمل آن مشخص نشده است [۱۱۳،۵۹].

۲-۳-۱-۴- گلیکوپروتئین هماگلوتینین (HA)

گلیکوپروتئین HA به طول ۵۵۶ اسیدآمینه از قطعه ی چهارم ژنوم به طول ۱۷۷۸ نوکلئوتید کد می شود. این گلیکوپروتئین فراوان‌ترین گلیکوپروتئین سطحی ویروس بوده که معرف ۳۰٪ کل پروتئین‌های ویروس است. در هر ویریون ۵۰۰ گلیکوپروتئین HA وجود دارد. وزن مولکولی HA ۶۰ کیلو دالتون است که ممکن است به دو مولکول HA2 و HA1 تقسیم شود. عمل اصلی آن اتصال به رسپتور و فعالیت فیوژن می باشد. این گلیکوپروتئین به صورت استوانه‌ای شکل می باشد. انتهای کربوکسی آن در داخل غشای ویروسی قرار گرفته و انتهای هیدروفیلیک (hydrophilic) N-terminal آن از غشاء بیرون زده است.

اولین عملکرد مهم HA اتصال به رسپتور (receptor) است که محل اتصال به رسپتور در سر گلبولی مولکول می‌باشد. در تحت تیپ H3 در طول پاکت اتصال به رسپتور در ویروس های پرندگان، در جایگاه ۲۲۶ یک گلوتامین (Glutamine) قرار دارد که ترجیحاً به رسپتور ۳-۲ α متصل می شود. در حالی که قرار گیری یک لوسین (Leucine) در این جایگاه در مورد ویروس‌های انسانی باعث اتصال به رسپتور ۶-۲ α می‌شود.

دومین عملکرد HA، فیوژن (fusion) وابسته به اسید است که جهت روند پوشش برداری لازم است. pH پایین باعث ایجاد تغییراتی در ساختار HA شده که باعث می شود مولکول به برش توسط پروتئاز (protease) حساس شود. مهم‌ترین تغییر این است که پپتید فیو ژن (Fusion Peptid) در معرض قرار گرفته و باعث ادغام غشای اندوزومی و غشای ویروسی شده و لذا باعث ورود RNP (RiboNucleoProtein) به داخل سیتوپلاسم می گردد. علاوه بر این مشخصات، HA یک determinant آنتی‌ژنی می‌باشد که آنتی بادی های تغییر دهنده علیه آن تولید شده و تغییرات اسیدآمینه‌ای در این نواحی آنتی ژنیک باعث ایجاد آنتی‌ژنیک دریفت می‌شوند [۱۵۱].