پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک
و زیست فناوری

مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد
دانشگاه علوم پزشکی تهران

رساله دکتری تخصصی

رشته ژنتیک مولکولی

بیان ژن هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا تحت حاد (H9N2) پرندگان درسیستم باکولوویروس و بررسی کاربرد آن در تشخیص

نگارش

شهلا شاهسوندی

استاد راهنما

دکتر علی‌هاتف سلمانیان

اساتید مشاور

دکتر شهین مسعودی - دکتر فاطمه فتوحی

۱۳۸۹

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک
و زیست فناوری

مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشگاه
علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی تهران

رساله جهت دریافت دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی با عنوان

بیان ژن هماگلوتینین ویروس آنفولانزا تحت حاد (H9N2) پرندگان در سیستم باکولوویروس و بررسی کاربرد آن در تشخیص

توسط: شهلا شاهسوندی

تصویب وارزشیابی توسط کمیته داوران بادرجه عالی

استاد راهنما: جناب آقای دکتر علی هاتف سلمانیان

استاد مشاور: سرکار خانم دکتر شهین مسعودی از طرف

استاد مشاور: سرکار خانم دکتر فاطمه فتوحی چاهوکی

داور خارجی: جناب آقای دکتر محمد حسن بزرگمهری فرد

داور خارجی: سرکار خانم دکتر معصومه توسطی خیری

داور داخلی: جناب آقای دکتر مهدی شمس آرا

داور داخلی: جناب آقای دکتر سید مهدی حسینی مزینانی

مدیر گروه زیست فناوری دام و آبزیان: جناب آقای دکتر مهدی شمس آرا

نماینده تحصیلات تکمیلی پژوهشگاه: جناب آقای دکتر حسین شهبانی ظهیری

بهمن ماه ۱۳۸۹

تقدیم به دو عاشق مادر و پدرم

روانشان شاد باد

سپاس ایزد یگانه را سزاست که فصلی دیگر از آموختن را گشود، و پس از آن:

- **از جناب آقای دکتر محمدحسین صنعتی و جناب آقای دکتر محمدعلی اخویزادگان روسای وقت پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی برای برگزاری این دوره تحصیلی،**
- **جناب آقای دکتر عبدالحسین دلیمی اصل ریاست محترم موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی**
- **اساتید دوره تحصیل به ویژه استاد محترم راهنما جناب آقای دکتر علی هاتف سلمانیان و اساتید مشاور سرکار خانم ها دکتر شهین مسعودی و دکتر فاطمه فتوحی،**
- **مدیریت گروه و کارکنان محترم آزمایشگاه زیست فناوری دام و آبزیان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری،**
- **معاونت محترم پژوهش، مدیر و کارکنان محترم اداره آموزش پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی،**
- **مدیر و کارکنان محترم واحد کتابخانه و اطلاع رسانی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی،**
- **خانواده ام به ویژه همسر و دخترم برای شکیبایی شان، سپاسگزارم.**

خلاصه

ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان تهدید جدی برای سلامت انسان و حیوان به‌شمار می‌روند. تحت تیپ‌های ویروس‌های تیپ A براساس خاصیت آنتی‌ژنی دو گلیکوپروتئین سطحی، هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) تعیین می‌شوند. تاکنون ۱۶ زیرواحد HA و ۹ زیرواحد NA در این ویروس‌ها شناسایی شده‌اند. آزمایش‌های سرمی متداول برای تعیین آنتی‌بادی علیه ویروس آنفلوانزای پرندگان، آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) و الایزا هستند. آزمایش HI روش استاندارد برای تعیین تحت تیپ ویروس آنفلوانزا در تمام گونه‌های پرندگان است اما تولید آنتی‌سرم به‌ویژه زمانی که ویروس فوق حاد است بسیار خطرناک خواهد بود. با استفاده از کیت‌های الایزا آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین‌های داخلی NP و M که در همه ویروس‌های آنفلوانزا به شدت حفاظت شده‌اند، بدون تعیین تحت تیپ قابل تشخیص هستند. آنتی‌سرم مورد استفاده در آزمایش HI ممکن است دارای آنتی‌بادی‌های همسان NA یک جدایه نامعلوم ویروس آنفلوانزا باشد. در این صورت آنتی‌بادی علیه NA به‌طور غیراختصاصی با HA مداخله می‌کند. این مساله می تواند به بازدارندگی غیراختصاصی و تعیین هویت اشتباه جدایه منجر شود. بهینه سازی تشخیص سولوژی تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا، ژن کامل HA و زیر واحد HA_1 جدایه اخیر تحت تیپ H9N2 در وکتور باکولوویروس بیان شده و مقادیر مناسبی پروتین نوترکیب طی کشت شناور سلول‌های *Sf9* بدست آمد. پروتئین‌های نوترکیب به عنوان آنتی‌ژن در طراحی آزمایش الایزا برای تشخیص

تحت تیپ H9N2 و تفکیک آن از سایر تحت تیپ‌های ویروس آنفلـوانزای پرنـدگان، و نیـز ایمن‌سازی جوجه‌های SPF برای تهیه آنتی‌سرم اختصاصی استفاده شدند. حساسیت و ویژگی سیستم‌های طراحی شده با آزمایش ۹۲ نمونه سرم طیور و مقایسه نتایج با آزمایش HI و کیت تجاری الایزا بررسی شدند. داده‌های حاصل نشان داد که آزمایش‌های طراحی شده هم‌خوانی نزدیکی با هم دارند اما rHA1-ELISA حساسیت بیش‌تری نسبت به HI دارد. مزیت سیـستم rHA1-ELISA، عدم واکنش متقاطع با سایر تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا است.

کلید واژه: ویروس آنفلوانزا پرندگان، همـاگلوتینین، بـاکولوویروس، آزمـایش ممانعـت از هماگلوتیناسیون، الایزا

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول- مقدمه	
۱- آنفلوانزای طیور	۲
۱-۱- تاریخچه بیماری آنفلوانزای طیور	۲
۱-۲- طبقه‌بندی	٤
۱-۳- خواص بیولوژیک	٥
۱-۳-۱- ساختار و ژنوم	٥
۱-۳-۲- چرخه آلودگی میزبان و تکثیر ویروس	۷
۱-٤- تغییرات آنتی‌ژنیک ویروس	۱۳
۱-٤-۱- ویروس آنفلوانزای طیور	۱٤
۱-٤-۲- محدودیت میزبان، مخازن و مسیرهای تطور ویروس آنفلوانزا	۱۸
۱-٤-۳- ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان تهدیدی برای سلامت جامعه انسانی	۲۰
۱-٤-٤- واکسیناسیون علیه آنفلوانزای پرندگان	۲٤
۱-٤-٥- وضعیت آنفلوانزای پرندگان در ایران	۲٦
۱-٥- تشخیص بیماری آنفلوانزای پرندگان	۲٦
۱-٥-۱- جداسازی ویروس	۲٦
۱-٥-۲- آزماشهای سرمی	۲۷
۱-٥-۳- روشهای مولکولی	۲۹

۲- باکولوویروس ۲۹
۲-۱- تاکسونومی باکولوویروس ۳۰
۲-۲- چرخه آلودگی باکولوویروس ۳۲
۲-۳- سیستم یوکاریوتی بیانی باکولوویروس ۳۷
۲-٤- تولید پروتئین‌های نوترکیب در سیستم بیانی باکولوویروس ٤۰
۲-۵-رده سلولی حشره میزبان ٤۳
۳- مروری بر روش‌های سرولوژی در تشخیص آنفلوانزا ٤٦
۳-۱- آزمایش الایزا ٤٦
۳-۲- آزمایش HI ٤۸
۳-۳- تهیه پروتئین‌های ویروسی برای آزمایش‌های سرلوژی ٤۹
۳-٤- انتخاب پروتئین‌های نوترکیب برای طراحی روش‌های سرولوژی ٤۹
٤- اهداف ۵۱

فصل دوم- مواد و روش ها

۱- ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 ۵٦
۱-۱- ویروس استاندارد ۵٦
۱-۲- جمع آوری نمونه‌های مشکوک به آنفلوانزای طیور ۵٦
۱-۲-۱- محیط مورد نیاز ۵٦
۲- آزمایش‌های مولکولی برای تعیین ویروس H9N2 و قطعات ژن هماگلوتینین ۵۷
۲-۱- استخراج RNA ۵۷

۲-۲- طراحی پرایمر برای تعیین تحت تیپ H9 و N2 ۵۷
۲-۳- طراحی پرایمر برای قطعه‌ی کامل ژن HA و زیرواحد HA1 ۵۸
۲-٤- تایید کیفیت پرایمرهای ساخته شده بر روی ژل پلی آکریل آمید ٦۰
۲-۵- آزمایش Multiplex-PCR برای تعیین تحت تیپ H9 و N2 ٦۰
۲-٦- واکنش PCR برای تکثیر قطعه‌ی کامل ژن HA ٦۲
۲-۷- تایید محصول واکنش PCR قطعه‌ی کامل ژن HA با پرایمر قطعه‌ی کوچک ٦۳
۲-۸- کلون سازی قطعه کامل ژن HA در وکتور pTZ57R/T ٦٤
۲-۸-۱- وکتور pTZ57R/T ٦٤
۲-۸-۲- تهیه سلول های مستعد ٦۵
۲-۸-۳- کلون سازی قطعه کامل ژن HA در وکتور pTZ57R/T به روش شوک حرارتی ٦۵
۲-۸-٤- محیط‌ها و محلول‌های مورد نیاز ٦۸
۲-۹- استخراج پلاسمید ٦۹
۲-۹-۱- محلول‌های مورد نیاز ۷۰
۲-۱۰- تایید قطعه‌های ژن با هضم آنزیمی و واکنش PCR ۷۰
۲-۱۱- تهیه ذخیره از پلاسمیدهای کلون شده ۷۱
۲-۱۲- تعیین توالی ۷۱
۲-۱۳- مطالعه ارتباط فیلوژنی ژن HA جدایه های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۸ ایران با سایر ویروس‌های H9N2 آسیا و ارزیابی تطور آن‌ها ۷۲
۲-۱٤- طراحی پرایمر رفت برای بیان ژن HA و زیرواحد HA_1 ۷٤

۲-۱۵- تهیه ژن HA_1 ۷٤
۲-۱۵- تهیه پلاسمید نوترکیب در مقیاس انبوه (Maxiprep) ۷۵
۳- آزمایش‌های مولکولی برای وکتور باکولوویروسی pFastBac HT ۷۷
۳-۱- تهیه وکتور و تایید آن با واکنش هضم آنزیمی ۷۷
۳-۲-خطی کردن وکتور pFastBac HTB با آنزیم‌های *Xho*I و *Hind*III ۷۹
۳-۳-کلون سازی ژن HA و قطعه HA_1 در وکتورpFastBac HTB به روش شوک حرارتی ۸۰
۳-۳-۱- محلول مورد نیاز ۸۲
۳-٤-ساخت بکمید نوترکیب ۸۲
۳-٤-۱- محیط کشت مورد نیاز ۸۳
۳-۵-استخراج DNA بکمید ۸٤
۳-۵-۱- محلول‌های مورد نیاز ۸۵
۳-٦-تایید بکمید نوترکیب ۸۵
۳-٦-۱- تایید بکمیدهای نوترکیب با الکتروفورز روی ژل آگارز ۸۵
۳-٦-۲- تایید بکمیدهای نوترکیب با واکنش PCR ۸۵
٤- تولید باکولوویروس‌های نوترکیب در سلول حشره ۸۷
٤-۱- سلول حشره ۸۸
٤-۲- محیط کشت سلول حشره ۸۸
٤-۲-۱- آماده‌سازی محیط کشت ۸۸
٤-۲-۲- آماده‌سازی سرم جنین گاو ۸۸

٤-٢-٣- محلول آنتی‌بیوتیک ٨٩
٤-٣- کشت تک‌لایه و پاساژ سلول *Sf*9 ٨٩
٤-٣-١- شمارش سلول‌های زنده ٩٠
٤-٤- آلوده‌سازی سلول‌های *Sf*9 برای تولید باکوویروس‌های نوترکیب ٩٠
٤-٤-١- تهیه بذر باکوویروس‌های نوترکیب ٩٢
٤-٤-٢- ارزیابی بذر باکوویروس‌های نوترکیب ٩٢
٤-٤-٣- تکثیر بذر اولیه و افزایش عیار باکوویروس‌های نوترکیب ٩٣
٤-٤-٤- تعیین عیار باکوویروس‌های نوترکیب با روش ارزیابی پلاک ٩٣
٤-٤-٤-١- محیط و محلول مورد نیاز برای ارزیابی پلاک ٩٥
٥- بیان پروتئین‌های نوترکیب ٩٥
٥-١- بهینه سازی شرایط بیان پروتئین‌های نوترکیب ٩٥
٥-٢- تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های نوترکیب بیان شده ٩٦
٥-٢-١- محلول‌های مورد نیاز برای SDS-PAGE ٩٨
٥-٢-١-١- بافرهای الکتروفورز ٩٨
٥-٢-١-٢- محلول رنگ کوماسی بلو ٩٩
٥-٣- تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب HAF و HA1 ٩٩
٥-٣-١- کشت شناور سلول‌های حشره ١٠٠
٥-٣-١-١- تهیه محلول لیز سلولی ١٠١
٥-٣-٢- خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب ١٠٢
٥-٣-٢-١- محلول‌های مورد نیاز ١٠٢

۵-٤- اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌های نوترکیب ۱۰۲
۵-٤-۱- محلول‌های مورد نیاز ۱۰۳
۵-۵- شناسایی پروتئین‌های نوترکیب بیان شده با روش وسترن بلاتینگ ۱۰۳
۵-۵-۱- محلول‌های مورد نیاز ۱۰٤
٦- بررسی امکان استفاده از پروتئین‌های بیان شده در تشخیص تحت‌تیپ H9N2 ۱۰۵
٦-۱- استفاده از پروتئین‌های بیان شده در طراحی سیستم الایزا ۱۰۵
٦-۱-۱- تعیین مقدار بهینه پروتئین‌های نوترکیب و آنتی‌بادی ۱۰۵
٦-۱-۲- محلول‌های مورد نیاز ۱۰٦
٦-۱-۳- برآورد آستانه مثبت و منفی ۱۰٦
٦-۱-٤- برآورد ویژگی سیستم‌های الایزا طراحی شده ۱۰۷
٦-۱-۵- محاسبه عیار آنتی‌بادی و تعیین تک رقت در الایزای طراحی شده ۱۰۷
٦-۲- استفاده از پروتئین‌های بیان شده برای تهیه آنتی‌سرم در آزمایش HI ۱۰۸
٦-۲-۱- تهیه آنتی‌سرم اختصاصی ۱۰۸
٦-۲-۲- آزمایش HI ۱۰۹
٦-۲-۳- محلول مورد نیاز ۱۱۰
٦-۲-٤- برآورد ویژگی آنتی‌سرم‌های تولید شده ۱۱۰
٦-۳- برآورد حساسیت روش‌های طراحی شده با ارزیابی نمونه‌های سرمی طیور ۱۱۱

فصل سوم- نتایج

استخراج RNA برای تعیین ویروس H9N2 ۱۱۳

تایید کیفیت پرایمرهای ساخته شده بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۱٤
واکنش Multiplex-PCR برای تعیین تحت تیپ H9 و N2 ۱۱٤
واکنش PCR برای تکثیر قطعه‌ی کامل ژن HA ۱۱۵
تایید محصول واکنش PCR قطعه‌ی کامل ژن HA با پرایمر قطعه‌ی کوچک ۱۱۵
کلون سازی قطعه کامل ژن HA در وکتور pTZ57R/T به روش شوک حرارتی ۱۱۷
تعیین توالی و ارتباط فیلوژنی ژن HA و ارزیابی تطور آن ۱۱۸
تهیه قطعه‌ی بیانی ژن HA و زیرواحد HA_1 ۱۲٦
واکنش هضم آنزیمی برای تایید وکتور باکولوویروسی pFastBac HTB ۱۲۸
آماده کردن وکتور pFastBacHT B با آنزیم های *Xho*I و *Hind*III ۱۲۸
کلون سازی قطعه‌های ژنی HAF و HA1 در وکتور pFastBacHT B ۱۲۹
ساخت بکمید نوترکیب ۱۳۰
تولید باکولوویروس‌های نوترکیب در سلول حشره ۱۳۲
ارزیابی بیان و تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های نوترکیب ۱۳٤
تولید انبوه و خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب HAF و HA1 ۱۳٤
استفاده از پروتئین‌های بیان شده در تشخیص و تفریق ویروس H9N2 در روش الایز ۱۳٦
محاسبه عیار آنتی‌بادی و تعیین تک رقت در الایزای طراحی شده ۱۳۸
استفاده از پروتئین‌های بیان شده در تشخیص و تفریق ویروس H9N2 در روش HI ۱٤۱

فصل چهارم- بحث و پیشنهادها ۱٤۸

فصل پنجم- منابع ۱٦۷

فهرست جدول‌ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱: مشخصات ژنوم ویروس آنفلوانزا A و عملکرد پروتئین‌های آن	٦
جدول ۱-۳. اسیدهای آمینه در پاکت اتصال گیرنده و جایگاه‌های آنتی‌ژنی هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا H9N2 زیردودمان G1	۱۲۲
جدول ۲-۳. اپی‌توپ‌های خطی سلول B پیش‌بینی شده در توالی پروتئینی هماگلوتینین ویروس‌های آنفلوانزای طیور H9N2	۱۲٦
جدول ۳-۳. محدوده‌ی جذب نوری ثبت شده و میزان S/P برآورد شده برای سرم‌های مثبت و منفی استاندارد با استفاده از الایزاهای نوترکیب	۱۳۹
جدول ٤-۳. پیش‌آمد ۲ × ۲ برای مقایسه نتایج rHA1-ELISA و rHAF-ELISA، و محاسبه ویژگی	۱٤۰
جدول ٥-۳. مقادیر ثابت خط همبستگی در سه رقت ۱:٤۰۰، ۱:۸۰۰ و ۱:۱٦۰۰ سرم‌های مورد آزمایش	۱٤۰
جدول ٦-۳. پیش‌آمد ۲ × ۲ برای مقایسه نتایج آزمایش‌های rHA1-ELISA، HI با استفاده از rHA1-s و الایزای تجاری با HI، و محاسبه حساسیت و هم‌خوانی بین آن‌ها	۱٤٦
جدول ۷-۳. محاسبه عیار آنتی‌بادی نمونه‌های مورد آزمایش با الایزای طراحی شده و الایزای تجاری	۱٤۷

فهرست نمودارها و شکل‌ها

عنوان	صفحه
تصویر ۱-۱. چرخه‌ی آلودگی باکولوویروس	۳٤
تصویر ۲-۱. جزییات مراحل تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از وکتور بیانی باکولوویروس در سلول حشره	٤٤
تصویر ۱-۲. وکتور pTZ57R/T	٦٤
تصویر ۲-۲. وکتور pFastBac HT B و توالی MCS آن	۷۸
تصویر ۳-۲. جایگاه اتصال پرایمرهای رفت و برگشت M13 روی DNA بکمید	۸٦
تصویر ۳-۱. RNAهای استخراج شده ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N	۱۱۳
تصویر ۳-۲. تایید کیفیت پرایمرها بر روی ژل پلی آکریل آمید	۱۱٤
تصویر ۳-۳. واکنش Multiplex-PCR برای تعیین تحت تیپ H9 و N2 ویروس آنفلوانزا	۱۱۵
تصویر ٤-۳. تکثیر قطعه‌ی کامل ژن HA	۱۱٦
تصویر ۵-۳. واکنش nested-PCR برای تکثیر قطعه‌ی ژن HA_1	۱۱٦
تصویر ٦-۳. کلون سازی قطعه کامل ژن HA در وکتور pTZ57R/T	۱۱۷
تصویر ۷-۳. درخت فیلوژنی بی‌ریشه براساس توالی ژن هماگلوتینین ویروس‌های آنفلوانزای طیور H9N2	۱۱۹
تصویر ۸-۳. تعداد و جایگاه‌های N–گلیکوزیله در توالی HA	۱۲۰
تصویر ۹-۳. نقشه انتروپی توالی ژن HA ویروس‌های آنفلوانزا H9N2 زیردودمان G1	۱۲٦

تصویر ۱۰-۳. تولید انبوه پلاسمید حاوی ژن HA_1 و تایید آن با هضم آنزیمی ۱۲۷
تصویر ۱۱-۳. محصول هضم پلاسمید باکولوویروسی pFastBacHT B ۱۲۸
تصویر ۱۲-۳. خطی شدن پلاسمید باکولوویروسی pFastBacHT B ۱۲۹
تصویر ۱۳-۳. کلون شدن قطعه‌های ژنی HAF و HA_1 در وکتور pFastBacHT B ۱۳۰
تصویر ١٤-۳. تایید بکمیدهای نوترکیب با الکتروفورز ۱۳۱
تصویر ۱۵-۳. تایید بکمیدهای نوترکیب با واکنش PCR ۱۳۱
تصویر ١٦-۳. تولید باکولوویروس‌های نوترکیب در سلول حشره ۱۳۲
تصویر ۱۷-۳. پدیده جذب گلبول‌های قرمز توسط هماگلوتینین بیان شده ۱۳۳
تصویر ۱۸-۳. تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های نوترکیب ۱۳۵
تصویر ۱۹-۳. تشخیص پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از روش وسترن بلاتینگ ۱۳٦
تصویر ۲۰-۳. بهینه‌سازی غلظت آنتی‌ژن نوترکیب HA_1 و رقت آنتی‌بادی تک دودمانی مرجع ۱۳۷
تصویر ۲۱-۳. رابطه بین عیار آنتی‌بادی مشاهده شده نمونه‌های سرم در الایزای طراحی شده ۱٤۱
تصویر ۲۲-۳. میانگین عیار HI (log_2) گروه‌های جوجه‌های SPF ایمن شده ۱٤۲
تصویر ۲۳-۳. مقایسه توالی پروتئینی HA تحت تیپ‌های H1N1، H2N3، H5N1 و H9N2 ویروس آنفلوانزا ۱٤٤

National Institute of Genetic Engineering
and Biotechnology

Digestive Disease Research Center
Tehran University of Medical Sciences

Ph.D. Thesis
In Molecular Genetics

Expression of low pathogenic avian influenza virus (H9N2) hemagglutinin gene in baculovirus system and its application in diagnosis

By
Shahla Shahsavandi

Supervisor
Dr Ali-Hatef Salmanian

Advisors
Dr Shahin Masoudi – Dr Fatemeh Foutohi

2011

فصل اول

مقدمه

۱- آنفلوانزای طیور

۱-۱- تاریخچه بیماری آنفلوانزای طیور

آنفلوانزا بیماری ویروسی تنفسی واگیردار انسان و حیوان است که سایر دستگاه‌های بدن را به درجات مختلف درگیر می‌کند. نام آنفلوانزا از موضوع یک گردهمایی در قرن چهاردهم میلادی در شهر فلورانس ایتالیا گرفته شده است که در آن تاثیر ستارگان بر این بیماری مورد بحث قرار گرفت. پس از آن، این بیماری با تلفظ ایتالیایی[1] آن آنفلوانزا نامیده شد (۱). ویروس عامل آنفلوانزا برای نخستین بار در سال ۱۹۰۲ از طیور مبتلا، و در سال ۱۹۳۳ از انسان جدا شد (۲). این بیماری توسط RNA ویروسی از خانواده ارتومیکسوویریده[2] ایجاد می‌شود. عامل بیماری آنفلوانزای پرندگان ویروس‌های تیپ A هستند که از زیرواحدهای آن فقط سویه‌های H5N1 و H7N3 موجب بیماری فوق حاد بسیار مسری و کشنده در پرندگان

[1] Influentia
[2] *Orthomyxoviridae*