مقایسه چندشکلی های تک نوکلئوتیدی جایگاه ژنی Mx در سویه های مختلف مرغ

بیماری آنفلوانزای طیور یکی از بیماری های واگیر دار ویروسی موثر بر دستگاه تنفسی، گوارشی و عصبی گونه های متعدد پرندگان می باشدکه دارای قدرت انتشار سریع و از خانواده اورتومیکسوویروس ها می باشد. اینترفرون نوع ۱ اولین خط دفاعی قوی و تحریک کننده قوی برای بیان پروتئین های آنتی ویروسی می باشد که اثرات حفاظتی خود را با بیان ژن Mx نشان می دهند. یک جابجایی نوکلئوتیدی در جایگاه ۲۰۳۲، موجب تنوع پروتئین در جایگاه ۶۳۱ می شود که فعالیت مثبت و منفی پروتئین های Mx را تعیین می کند، به طوری که آلل A و G در جایگاه ۲۰۳۲ به ترتیب موجب فعالیت آنتی ویروسی مثبت و منفی می شود. برای شناسایی چند شکلی‌های آللی در جایگاه ژنی Mx در سویه‌های مرغ تجاری گوشتی، تخم‌گذار و مرغ‌های مولد از ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی مازندران، فارس و خراسان (۵۰ نمونه به ازای هر جمعیت) انجام گرفته است. نمونه‌های خون به طور تصادفی از ۲۵۰ قطعه مرغ از این سه جمعیت جمع‌آوری و استخراج DNA با روش نمکی بهینه یافته انجام شد. با استفاده از PCR و آغازگرهای ویژه Mx قطعه ای به طول ۲۹۹ جفت باز تکثیر شد. از روش PCR-RFLP برای شناسایی چند شکلی استفاده شد و محصولات PCR به دست آمده از اگزون ۱۳ ژن Mx تحت تیمار آنزیم‌های محدودگرHpy8I قرار گرفتند. در جمعیت مرغ های بومی ساری سه ژنوتیپ AA، AG و GG به ترتیب با فراوانی ۰/۱۸، ۰/۴۲۳و ۰/۹۷، مرغ بومی مشهد با فراوانی ۰/۴۳۷، ۰/۳۳و ۰/۲۳و در مرغ بومی شیراز با فراوانی ۰/۳۴۷، ۰/۴۶۱و ۰/۱۹۲ درصد محاسبه شد. همچنین در مرغ تخم گذار فراوانی ژنوتیپی AA و AG به ترتیب، ۰/۷۲ و ۰/۲۸ و در جمعیت مرغ گوشتی فراوانی ژنوتیپ های AA، AG و GG به ترتیب ۰/۳۲، ۰/۴۸ و ۰/۴ برآورد شد. فراوانی آللی در جمعیت مرغ های بومی ساری (۰/۶۹۲) A و (۰/۳۰۸) B، مرغ بومی شیراز (۰/۵۷۷) A و (۰/۴۲۳) B، مرغ بومی مشهد (۰/۶۰۴) A و (۰/۳۹۶) B، جمعیت مرغ گوشتی (۰/۴۶) A و (۰/۵۴) B و در جمعیت مرغ تخم گذار (۸۶) A و (۱۴) B محاسبه شد. برای مقایسه فراوانی ژنوتیپی و ژنی به ترتیب از آزمون کای اسکور و فیشر استفاده شد. در مقایسه فراوانی ژنوتیپی بین جمعیت های مورد مطالعه اختلاف معنی دار وجود داشت ($P<۰/۰۰۱$). بین سویه مرغ گوشتی و مرغ بومی ساری نیز اختلاف معنی داری وجود داشت. در مقایسه فراوانی ژنی جمعیت های مورد مطالعه، بین جمعیت های مرغ بومی ساری و مرغ تخم گذار، همچنین مرغ بومی مشهد و مرغ گوشتی اختلاف معنی داری وجود داشت ($P<۰/۰۰۵$). در این تحقیق به دلیل مشاهده چند شکلی در موقعیت ۶۳۱ پروتئین Mx و نقش مهم آن در برابر حساسیت بیماری آنفلوانزا و آبسه مخاط دهانی می توان در در برنامه های اصلاح نژاد نقش مهمی ایفا کند.

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

کلمات کلیدی: آنفلوانزا، چندشکلی، ژن Mx، مرغ بومی، مرغ گوشتی، مرغ تخمگذار

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

فصل اول

مقدمه

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

مقدمه

جمعیت جهان در آغاز هزاره جدید از مرز ۶ میلیارد نفر گذشته و در سال ۲۰۳۰ به ۱۰ میلیارد نفر خواهد رسید. امروزه بیش از ۷۰ درصد مردم جهان تولیدات کشاورزی خود را خودشان به مصرف می‌رسانند، یعنی تنها ۳۰ درصد از فرآورده های کشاورزی و غذایی مبادله می شود. بر اساس تخمین سازمان ملل متحد، در سال ۲۰۲۵ بیش از نیمی از مردم جهان در شهر ها زندگی خواهند کرد. این عده به تولیدات غذایی کشاورزان متکی خواهند بود. مطالعات مختلف نشان می دهد که تولیدات غذایی جهان تا سال ۲۰۲۵ باید دو برابر شود تا نیاز های جمعیت رو به رشد، در حد فعلی رفع شود. (نقوی و همکاران ۱۳۸۶).

جوامع بشری سعی می نمایند با استفاده از به کار گیری تکنولوژی مدرن نیازهای مختلف خود را که روز به روز با رشد جمعیت و کاهش منابع افزایش می یابد تامین نمایند. اگرچه طی دو قرن اخیر پژوهشگران بیش از ۳۰۰ نژاد و واریته مختلف طیور را به صورت خالص ایجاد کرده‌اند، اما تنها چند نژاد در صنعت پرورش طیور مورد استفاده قرار می گیرند. بعضی از این نژادها برای همیشه کنار گذاشته شده و برخی دیگر به منظور بهره برداری تجاری توسط مراکز اصلاح نژاد حفظ می شوند. این منابع ژنی ثروت های بسیار مهمی هستند که برای حفظ آن‌ها برای برنامه ریزی های اصلاح نژاد باید بیش از پیش مورد توجه قرار گیرند. مبانی برنامه های اصلاح نژادی حول محورهای مختلفی از جمله، افزایش کارآیی تولید مثل، تغذیه، رشد و مقاومت در مقابل بیماری ها انجام می پذیرد. مدیریت ژنتیکی بیماری ها به دلیل پیچیدگی آن از اهمیت ویژه ای برخوردار است. بیماری های زیادی در طیور وجود دارند که می توانند ضرر و زیان زیادی به مرغدار تحمیل نمایند. از جمله این بیماری ها که در صنعت طیور اهمیت زیادی دارد، آنفلوانزای طیور می باشد (فرخوی و همکاران ۱۳۸۷) .

اصلاح دام عمدتاً با مجموع اثرات همه ژن ها که موجب تنوع در صفات می شوند در ارتباط است. توصیف کامل جایگاه های ژنی کنترل کننده صفات کمی (QTL[1]) از روی خصوصیات فردی ژن های کوچک اثر شامل وفور، بزرگی اثر و چگونگی عمل ژن ها محاسبه می شود. در حالی که ژنتیک کلاسیک مندلی، ژنتیک جمعیت و ژنتیک کمی نمی توانند ویژگی های فردی QTL را به دلیل عدم دسترسی به جایگاه های ژنی تعیین کنند. ژنتیک مولکولی روش های جدیدی را برای کمک به شناسای QTL و ارزیابی اثرات آنها ایجاد کرده است. یکی از این روش ها، روش انتخاب مستقیم ژن است. دو معیار اساسی برای این روش وجود دارد. اول اطلاعات کافی در مورد عملکرد و ساختار ژن مربوطه وجود داشته باشد. دوم، ژن مورد نظر به طور بالقوه با صفت یا صفات مورد مطالعه در ارتباط باشد. شناسایی QTL، یکی از اهداف اصلی فن آوری مولکولی در برنامه های اصلاح نژاد و همراه شدن نشانگر های مولکولی با QTL فرصتی مناسب از انتخاب مستقیم بر اساس ژنوتیپ را فراهم آورده است. بنابراین به جای

1- Quantitative trait loci -

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

تکیه کردن به برآوردهای حاصل از داده های فنوتیپی مورد استفاده در ژنتیک کمی، ترکیب بین روش های ژنتیک سنتی و روش های مولکولی مدرن می تواند برای دست یابی اهداف اصلاح نژادی در دام های اهلی از جمله طیور مورد استفاده قرار گیرد (Yap و همکاران،۲۰۰۳).

آنفلوانزای طیور نوعی بیماری ویروسی است که در گونه های مختلف پرندگان باعث ابتلا دستگاه تنفسی، گوارشی و سیستم عصبی می شود. در موارد بسیار حاد بیماری باعث مرگ و میر فوق العاده زیادی خواهد شد. شیوع آنفلوانزای حاد، علاوه برعلایم تنفسی از جمله سرفه، صدای تنفسی، تورم سینوس ها، تولید تخم مرغ را کاهش داده و ممکن است اسهال نیز به همراه داشته باشد. خیز بافت های سر و صورت یا علایم عصبی نیز رخ می دهند. شیوع انواع حاد بیماری منجر به حدود ۹۰ درصد تلفات شده، کیفیت پوسته تخم مرغ و رنگ دانه های آن نیز ممکن است دچار اختلال شود. بنابراین اجرای پروژه های تحقیقاتی به منظور فهم هر چه بیشتر مکانیسم های مرتبط به بروز این بیماری بسیار دارای اهمیت می باشد (فرخوی و همکاران ۱۳۸۷).

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

فصل دوم

بـــررسی منابع

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

۲-۱-نشانگرهای ژنتیکی

هر صفتی که بین افراد متفاوت باشد، ناشی از تفاوت موجود بین ترتیب‌های نوکلئوتیدی DNA کروموزومی آن‌ها است که به نتاج نیز منتقل می شود. تفاوت های موجود در توالی های نوکلئوتیدی می توانند به عنوان نشانه یا نشانگر ژنتیکی به کار گرفته شوند. در مجموع برای آن که صفتی به عنوان نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد، باید دست کم دو ویژگی زیر را داشته باشد:

الف) در بین دو فرد متفاوت باشد (چند شکلی نشان دهد).

ب) به ارث برسد.

به طور کلی نشانگر های ژنتیکی را به چند دسته تقسیم می کنند. نشانگر های مورفولوژیکی، پروتئینی و مبتنی بر DNA و RNA. از نشانگر های DNA می توان در موارد زیر سود برد:

- تشخیص سریع پاتوژن ها و بیماری ژنتیکی دام،

- تشخیص چند شکلی های آللی ژن ها،

- شناسایی نشانگر های مرتبط به تولید و نشانگر های مرتبط به مقاومت به بیماری های دامی،

- استفاده از نشانگر های DNA برای تعیین شباهت ها و فواصل ژنتیکی بین نژاد ها و لاین ها و غیره،

- انتخاب دام ها به کمک نشانگر (MAS)

- تهیه نقشه های ژنتیکی (نصیری، ۱۳۸۱؛ نقوی و همکاران، ۱۳۸۴).

۲-۲- چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP)

تنوع و تفاوت هایی که به واسطه اختلاف در یک جایگاه نوکلئوتیدی (به علت جایگزینی، حذف یا اضافه) رخ می دهند، به عنوان تفاوت تک نوکلئوتیدی (SNP) شناخته می شوند. معمولاً SNP ها دو آللی می باشند؛ چرا که معمولاً نرخ فراوانی جایگزینی تک نوکلئوتیدی کم و بین ۱×۱۰^{-۹} تا ۵×۱۰^{-۹} به ازاء هر نوکلئوتید می باشد که می تواند در موقعیت های مکانی نامشخص در پستانداران رخ دهد. در نتیجه، احتمال این که دو باز مستقل در یک موقعیت مکانی تغییر کنند، بسیار کم می باشد.

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

دلیل دیگر به خاطر وجود اریب[2] در جهش ها است که منجر به ایجاد تنها دو نوع آلل SNP می شود. جهش ها باعث دو نوع جایگزینی می شوند:

- جایگزینی همجنس:[3] پورین ـ پورین (A ↔ G) یا پریمیدین- پریمیدین (C ↔ T)

- جایگزینی ناهمجنس:[4] که به صورت جابجایی پورین ـ پریمدین یا پریمیدین ـ پورین (G ↔ T, G ↔C A↔T, A ↔ C) می باشند.

اگر جهش ها روند تصادفی داشته باشند، باید نسبت جایگزینی همجنس و نا همجنس ۱/۲ باشد. اما برعکس، مشاهدات تفاوت واضحی را نسبت به جایگزینی های همجنس نشان می دهد. برای مثال، پژوهش مقایسه ای در ژنوم انسان و جوندگان، نشان داد که نسبت جایگزینی همجنس ۱/۴ برابر جایگزینی ناهمجنس می باشد. این نسبت در مرغ ها در مقایسه با پستانداران نیز بیشتر است و مقدار آن ۲/۳ یا ۴ می باشد (Kaminski و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین، بررسی که توسط(Vignal و همکاران، ۲۰۰۲)، روی ۱۳۸ تفاوت تک نوکلئوتیدی جوجه ها انجام گرفت مقدار این نسبت را ۲/۳۶ نشان داد. یکی از دلایل احتمالی برای توجیه این انحراف مقدار زیاد د آمیناسیون خود بخودی ۵- متیل سیتوزین به تیمیدین در دی نوکلئوتید های CpG می باشد که باعث تولید تعداد بیشتر SNP های (C↔T) ، SNP های (A↔G) روی رشته مقابل می شود (Viitala و همکاران، ۲۰۰۳).

ویروس آنفلوانزا جزء ویروس های RNA می باشد که آنزیم پلیمراز عمل تصحیح را به خوبی انجام نمی دهد و در هر ۱۰-۴ نوکلوئتید اشتباه رخ می دهد، در ویروس های RNA ، نرخ جهش زیاد، اندازه جمعیت بزرگ و طول مدت نسل ها کوتاه می باشد (Grenfell و همکاران، ۲۰۰۴).

۲-۳-تعریف ویروس

ویروس ها ذرات ریز میکروسکوپی و غیر زنده، متشکل از اسیدهای نوکلئیک با یک روکش پروتئینی می باشند که ارگانیسم های بیولوژیک را آلوده می کنند. از آنجایی که این ذرات مشابه پارازیت های داخل سلولی می باشند فاقد دستگاه تناسلی بوده و قابلیت

[2] -Bias
[3] -Transition
[4] -Transversion

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

تکثیر در بیرون از سلول های میزبان را ندارند (Brooks، ۲۰۰۶). در این بخش به اختصار ویروس آنفلوانزا را مورد بررسی قرار می دهیم.

۲-۴-سبب شناسی

در سال ۱۸۷۸ یک بیماری با تلفات بسیار زیاد در ماکیان مبتلا به نام طاعون ماکیان در ایتالیا شناخته شد و در همان سال، ذرات ریز ویروسی به عنوان ارگانیسم مسبب بیماری آنفلوانزا معرفی شد. اما تا سال ۱۹۵۵ ارتباطی بین این ویروس و دیگر ویروس های با بیماری زایی خفیف تر جدا شده از پرندگان با ویروس آنفلوانزا A تعیین نشده بود (Schafer و همکاران، ۱۹۵۵). پاتوژن آنفلوانزای مرغی اولین بار در سال ۱۹۲۴در ایالات متحده به رسمیت شناخته شد. سپس اپیدمی بزرگی از آنفلوانزای مرغی در سال ۱۹۸۳ در شمال شرقی ایالات متحده رخ داد (Alexander، ۲۰۰۰).

۲-۵-آنفلوانزای طیور

بیماری آنفلوانزای طیور [۵]یکی از بیماری های واگیر ویروسی، موثر بر دستگاه تنفسی، گوارشی و عصبی گونه های متعدد پرندگان می باشد که دارای قدرت انتشار سریع است و عامل آن از خانواده ارتومیکس ویروس ها [۶]می باشد. تیپ A این ویروس فزون بر طیور، حیوانات دیگر از جمله خوک، اسب و انسان را در گیر می نماید. میزان تلفات در فرم فوق حاد بیماری در حدود ۱۰۰ درصد و در فرم حاد آن در حدود ۳۰ الی ۴۰ درصد می باشد ولی در اشکال خفیف تلفات مشاهده نمی شود. در واگیری های آنفلوانزا در کشورهای کره و چین به سویه H۹ (مشابه سویه کشور ما)، میزان مرگ و میر در مرغداری حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد، ولی در شرایط آزمایشگاهی، کمتر از مرغداری بوده است. از این رو احتمال وجود سایر عفونت های ثانویه که موجب افزایش تلفات می شود مطرح می شود (Alexander، ۲۰۰۰).

۲-۶-طبقه بندی ویروس های آنفلوانزا:

---

[۵]-Avian influanza

[۶]-Orthomyxovirus

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

ویروس آنفلوانزا، RNA تک رشته ای می باشد که جزء خانواده ارتومیکس ویروس ها بوده و براساس تفاوت های آنتی ژنی بین نوکلئوکپسیدها [۷](NP) و پروتئین های ماتریکس [۸](M) غشاء به ۳ نوع (A، B و C) تقسیم می شوند (Lamb و Krug، ۱۹۹۶). ویروس های نوع A برخی از گونه ها که شامل واریته های وسیعی از پرندگان وحشی و اهلی می باشند را عفونی می کند در صورتی که تنها میزبان ویروس های نوع B و C انسان می باشد (Slemons و همکاران، ۱۹۷۳). طبقه بندی آنفلوانزای A مبتنی بر دو گلیکوپروتئین پوششی هماگلوتنین [۹](HA) و نئورامینیداز [۱۰](NA) می باشد.

از آنجایی که ماده ژنتیکی (RNA) ویروس نوع A دارای ۸ قطعه جداگانه می باشد، لذا خیلی سریع خاصیت پادتنی خود را تغییر داده و تبدیل به نوع جدیدی از ویروس آنفلوانزا شده که موجب بیماری در پرنده هایی شده که به تازگی بهبود یافته اند. دو نوع پروتئین اصلی HA و NA روی سطح این ویروس وجود دارد. پروتئین HA دارای ۱۶ و پروتئین NA دارای ۹ زیرمجموعه متفاوت می باشد (Alexander، ۲۰۰۰؛ Fouchier و همکاران، ۲۰۰۵).

پروتئین HA در خاصیت پادتنی و قدرت بیماری زایی ویروس آنفلوانزا، نقش اصلی را ایفا می کند. آنفلوانزایی که تا به امروز در ایران شناسایی شده متعلق به زیرمجموعه ۲N و ۹H بوده که جزء گروهی از ویروس های آنفلوانزایی است که قدرت بیماری زایی فوق حاد نبوده و به انسان سرایت نمی کند .

۲-۷-بیماری زایی

ویروس آنفلوانزا نوع A که آلوده کننده طیور می باشد بر اساس شدت ایجاد بیماری زایی به دوگروه HPAI و LPAI تقسیم می شود. HPAI[۱۱]شامل ویروس هایی است که شدیدا بیماریزا بوده و شامل گروه های H۵ وH۷ که درصد تلفات زیادی ایجاد می کند. LPAI[۱۲]شامل ویروس هایی با شدت بیماری زایی کمتر بوده و بیشتر باعث ایجاد بیماری های تنفسی می شود. با این وجود ممکن است به وسیله شرایط محیطی و یا عفونت های دیگر به بیماری های شدید تر تبدیل شود (Stieneke-Grobr و Vey، ۱۹۹۲؛ Steinhauer، ۱۹۹۹؛ Alexander، ۲۰۰۰)

---

[۷]–Nucleocapsid

[۸]–Matrix protein

[۹]–Hemagglutinin

[۱۰]–Neuraminidase

[۱۱]- Highly pathogenic avian influanza

[٤]- Low pathogenic avian influanza

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

گلیکوپروتئین هماگلوتنین (HA) برای ویروس آنفلونزا به عنوان پیش ماده تولید می شود که باعث تغییرات بعد ترجمه ای به وسیله پروتوآز های میزبان شده و ایجاد عفونت می کند (Rott ، ۱۹۹۲). پروتئین های پیش ساز HA ویروس آنفلونزا مرغی، قدرت بیماری زایی کمتر دارند و دارای یک اسید آمینه آرژینین در جایگاه برشی و دیگری در موقعیت ۴- هستند. ناحیه برشی این ویروس ها به وسیله پروتوآز های میزبان مانند آنزیم های شبه تریپسین محدود می شوند. از این رو در محل هایی که این آنزیم ها وجود داشته باشند (مجاری تنفسی و گوارشی) رونویسی جایگاه های برشی توسط میزبان محدود می شود. ویروس های HPAI درجایگاه های برشی HA چندآمینواسیدی هستند (آرژنین و لیزین) در نتیجه باعث اتصال یا جابجایی می شوند(Vey،۱۹۹۲؛ Wood و همکاران، ۱۹۹۳). این ویروس ها در کل بدن پرنده قادر به تکثیر بوده و به ارگان های زنده آسیب می رساند.

۲-۸-ویروس HPAI در مواد غذایی

ویروس HPAI باعث عفونت عضلات اسکلتی و اندام داخلی پرندگان آلوده می شود. تیتر H5N1 HPAI در گوشت ران و سینه مرغ بسیار زیاد گزارش شد. همچنین روی سطح تخم مرغ نیز مشاهده شد که شاید به علت آلودگی مدفوع پرنده عفونی باشد و ممکن است از سطح پوسته وارد تخم مرغ شود (Swayne و Beck، ۲۰۰۴)

۲-۹- شیوع ویروس HPAI

اولین بار شیوع ویروس HPAI از زیر مجموعه ویروس H۵ درسال ۱۹۵۹ گزارش شد (Pereira و همکاران، ۱۹۶۵). شیوع اولیه HPAI درماکیان هفده بار گزارش شد که پنج بار آن مربوط به بوقلمون و دوازده بار دیگر در طیور می باشد. از سال ۱۹۹۱، نه مورد از شیوع این ویروس آنفلوانزای A از زیرمجموعه H۷ و هشت مورد از زیر مجموعه H۵ گزارش شد. این بیماری بسیاری از گله ها در انگلستان، آمریکا (۱۹۹۱)، مکزیک (۱۹۸۳) و پاکستان (۱۹۹۵) درگیر و باعث ضررهای اقتصادی بسیاری شد (Alexander، ۲۰۰۰).

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

۲-۱۰-مخازن و میزبان های بیماری

مخزن طبیعی تمام ویروس های آنفلوانزا نوع A، پرندگان آبزی می باشد (Websterو همکاران، ۱۹۹۲). پرندگان وحشی و آبزی می توانند بدون ابتلاء، ویروس های آنفلوانزای طیور را منتقل کنند. از مخزن اصلی (پرندگان آبزی) ویروس ها به حیوانات دیگر، شامل پستانداران و مرغ های بومی انتقال می یابد. انتقال ویروس و شیوع آن ممکن است در میزبان های جدید، مانند بین انسان و خوک و یا طیور و انسان رخ دهد. خوک به طور گسترده ای به عنوان منبع سویه های جدید ویروس آنفلوانزا می باشد. همچنین میزبان واسط ویروس های آنفلوانزای پستانداران و پرندگان می باشد که با مخلوط کردن ویروس های انسانی و مرغی تیپی جدید ایجاد می کند (Jong و Hien، ۲۰۰۶).

۲-۱۱-توزیع جغرافیایی

۲-۱۱-۱-.پرندگان وحشی

اولین ویروس آنفلوانزا جدا شده از پرندگان شکاری زیرمجموعه ویروس HPAI H5N3 بود که درسال ۱۹۶۱ در آمریکای جنوبی از چلچله دریایی۱۳ گزارش شد (Becker ، ۱۹۶۶).

۲-۱۱-۲-.شترمرغ

درسال ۱۹۹۱ اولین ویروس آنفلوانزا از شترمرغ آفریقای جنوبی شناسایی و از زیر مجموعه H7N1 گزارش شد که بیشترین مرگ و میر را در پرندگان جوان ایجاد کرده بود (Allwright و همکاران، ۱۹۹۳).

۲-۱۱-۳-.پرندگان اهلی

در طی سال های ۱۹۹۹-۱۹۹۴ برای اولین بار در کشور آلمان شیوع سویه H9N2 در گله های اردک، مرغ و بوقلمون گزارش شد (Werner، ۱۹۹۸).

[1]- Sterna hirundo

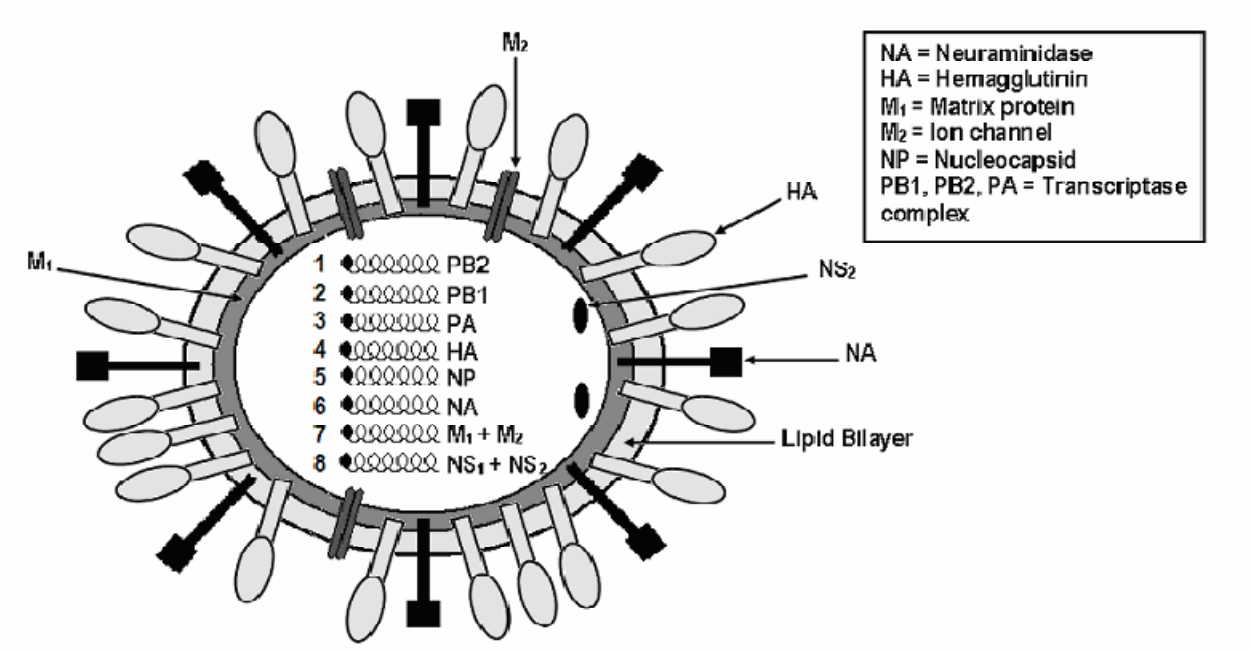
This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

۲-۱۱-۴-. ماکیان آبزی

ماکیان آبزی نقش مهمی در انتشار ویروس آنفلوانزا دارند. پرندگان آبزی شامل اردک و پرندگان ساحلی مستعد بیماری می باشد (Sharp و همکاران، ۱۹۹۷). ویروس های آنفلوانزا در دستگاه گوارش پرندگان آلوده پنهان شده و با مصرف آب آلوده انتقال می یابد، با این وجود پرندگان آبزی آلوده شده به ندرت علایم بیماری را نشان می دهند.

۲-۱۲-چرخه زندگی ویروس آنفلوانزا

هر کدام از ۸ بخش ژن ویروس (نگاره ۲-۱) نقش اختصاصی در چرخه زندگی ویروس دارند (نگاره ۲- ۲).



نگاره ۲-۱- بخش های مختلف ژنی ویروس آنفلوانزای مرغی (Brooks، ۲۰۰۶)

پروتئین های هماگلوتنین (HA) به رسپتور های اسید سیالیک روی سطح سلول متصل می شود و به طور اختصاصی اسیدسیالیک را روی دیواره سلولی ترشح می کنند. HA ورود ویروس به داخل سلول را آسان می کند. همچنین آنتی ژن مهم در تعیین آنتی بادی خنثی می باشد که از اجزای مهم در تهیه واکسن می باشد. هنگامی که ویروس توسط اندوسیتوز به گیرنده متصل شود، مکانیسم شروع می شود. pH کم در اندوزوم باعث تغییر ساختاری در هماگلوتنین و سپس انحلال غشا شروع می

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

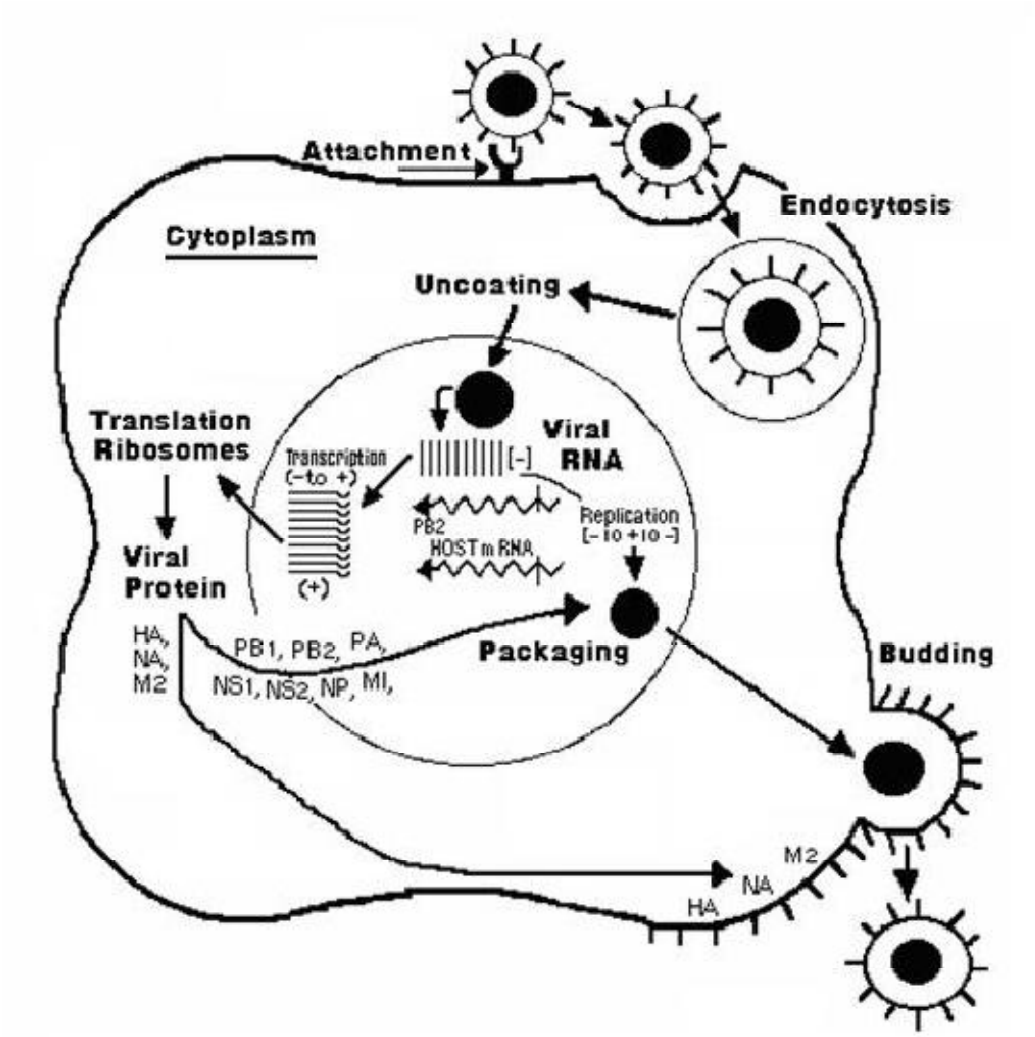
شود و سپس از اولین اندوسیتوز، پروتئین ماتریکس M2[۱۴] که یک پروتئین جدایی ناپذیر غشا می باشد، فعالیت هایی همانند کانال پروتئینی را برای اسیدی کردن داخل اندوزوم که موجب حذف پوشش ویروس می شود انجام می دهد (Pinto و همکاران، ۱۹۹۲). این مکانیسم باعث می شود RNA ازکمپلکس RNA پلیمراز یا کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین (RNP) که ترکیبی از ۴ پروتئین، ۳ پلیمراز ویروسی (PB1, PB2 وPA)، نوکلئوکپسید و قطعات RNA می باشد خارج شود. سپس برای رونویسی از سیتوزول وارد نوکلئاز می شود (Neumann و همکاران،1997؛ Mukaigawa و همکاران، ۱۹۹۱؛ Nath و همکاران،۱۹۹۰).

در رونویسی RNA ویروسی (vRNA)، ازکلاهک ۵ mRNAs استفاده می شود. در ناحیه پورین، اندونوکلئاز ویروسی همانند آغازگر های رونویسی شکاف ایجاد کرده و بیشتر بخش های ژن (NP، NA، HA، PA، PB1 و PB2) یک پروتئین را کد می کند. در صورتی که دو بخش باقیمانده (ماتریکس M و بخش غیر ساختاری NS) که شامل M۱، M۲، NS۱ و NS۲ می باشد به قطعه های mRNA ترجمه می شوند (Lamb و همکاران،۱۹۹۶). این RNAs ویروسی که به تازگی سنتز شده اند توسط نوکلئوپروتئین ها در داخل نوکلئاز کپسید دار می شوند (Lamb و Krug، ۱۹۹۶).

HA، NA و M۲ بخش های RNA ویروسی، به فرم پروتئین های ساختار غشایی ویروس ترجمه می شوند. HA، NA هر دو وارد شبکه آندوپلاسمی دانه دار شده و سپس وارد غشا سلولی می شود. در پایان برای خروج RNPs به خارج از هسته پروتئین M۱ باید دوباره به هسته انتقال یابد (Lamb و Krug، ۱۹۹۶).. پس از تجمع ذرات ویروسی و پروتئین ماتریکس در سیتوپلاسم به شکل زائده وارد غشا پلاسمایی می شوند. NA، دیگر گلیکوپروتئین سطحی روی ویروس آنفلوانزا می باشد که همانند سیالیداز، اسید سیالیک را برش می دهد و زائده های ویروس از سطح سلولی خارج می شود. در نتیجه ویروس انتشار می یابد. همچنین NA دومین آنتی ژن اصلی برای تعیین آنتی بادی می باشد (نگاره ۲-۲).

[۱۴]- Ion channel

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/



نگاره ۲-۲- چرخه زندگی ویروس آنفلوانزا (Brooks، ۲۰۰۶)

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

۲-۱۳-انتقال بیماری :

ویروس آنفلوانزا در انواع ماکیان، بوقلمون، بلدرچین، قرقاول، شترمرغ، مینا، طوطی، مرغابی، غاز و سایر پرندگان آبزی شناسایی شده ولی در ماکیان و بوقلمون بیشترین خسارت و تلفات را ایجاد می کند. پرندگان آبزی (همچون اردک، مرغابی و غیره به عنوان مخـــــــازن این بیماری در طبیعت معرفی شده و عقیده بر این است که مرغابی های اهلی نسبت به ابتلا به فرم درمانگاهی فوق حاد آنفلوانزا مقاوم می باشند. البته این پرنده ها به ویروس آنفلوانزا مبتلا می شوند و باعث پخش آن در محیط نیز می شوند. انواعی از پرندگان آبزی، مانند پرستو دریایی نسبت به فرم فوق حاد آنفلوانزا حساس هستند و در اثر ابتلا به آن تلف می شوند (Jong و Hien، ۲۰۰۶).

۲-۱۱۳-۱-راه های انتقال :

۲-۱۳-۱-۱ ـ انتقال مستقیم

ویروس از طریق مجاری تنفسی، ترشحات چشم و مدفوع از پرنده آلوده به پرنده حساس منتقل می شود. (Jong و Hien، ۲۰۰۶).

۲-۱۳-۱-۲ ـ انتقال غیر مستقیم

۱. دان مرغ که از منابع غیر مطمئن تهیه شده باشد.
۲. کود آلوده و پراکنده شدن آن در محیط اطراف.
۳. حشرات و جوندگان آلوده.
۴. وسایل و مواد آلوده مانند آب، خودرو، لباس و کفش آلوده.
۵.

۲-۱۴- شیوع بیماری آنفلوانزا

۲-۱۴-۱- شیوع آنفلوانزای مرغی در انسان

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

بیماری های همه گیر آنفلوانزای پیشین مسئول میلیون ها مرگ و میر در کره زمین بود. مخرب ترین آنفلوانزا در اسپانیا (۱۹۱۸) بود که بسیاری از انسان هاکشته شدند. در سال ۱۹۵۷ و ۱۹۶۸ بیماری آنفلوانزا توسط ویروس های هیبرید دارای ترکیبی از ژن های ویروسی انسانی و مرغی ایجاد شده بود که تایید کرد ویروس های آنفلوانزای مرغی در بیماری انسانی نقش مهمی دارد. اخیرا اثر سویه های HPAI روی بیماری های انسانی کاملا آشکار شد. در سال ۱۹۹۷، H5N1 مرغی، از یک پسر بچه ۳ ساله در هنگ کنگ جداسازی شد که سندرم حاد تنفسی، سندرم نای و پنومونی شدید منجر به مرگ او شد (Subbarao و همکاران، ۱۹۹۸). در دسامبر ۲۰۰۳ شیوع پاتوژن ویروس H5N1 در کره رخ داد (Lee و همکاران، ۲۰۰۵). پس از آن شیوع ویروس های مرتبط با این سویه در صنعت طیور نیوزلند، ویتنام، ژاپن، چین، کلمبیا، مالزی و اندونزی دیده شد که دلیل شیوع هم زمان این ویروس در بسیاری از کشورهای آسیایی نامشخص است. وجود ویروس H5N1 را در پرندگان مهاجر مرده شناسایی کردند که ممکن است یکی از علت های شیوع این بیماری باشد و نشان می دهد پرندگان وحشی نقش مهمی در انتشار این ویروس ها دارند (Chen و همکاران، ۲۰۰۵؛ Li و همکاران، ۲۰۰۴).

۲-۱۴-۲-شیوع آنفلوانزای مرغی

اولین بار سال ۱۹۸۷ در ایتالیا این بیماری ظاهر که عامل بیماری سویه H7N7 گزارش و سال ۱۹۰۲ برای اولین بار جداسازی شده است. مطالعات توالی یابی روی این ویروس نشان داد که ژن آن ها از یک ویروس غیر بیماری زا به غیر از سویه های بیماری زا H5 که مسئول بروز بیماری های آنفلوانزا قبلی بود مشتق شده اند (Eckroad و همکاران، ۱۹۸۶).

پژوهش هایی در باره ی ویروس های مرغی پنسیلوانیا نشان داد که جهش های نقطه ای در سایت های برشی هماگلوتنین مسئول ایجاد بیماری به وسیله سویه های غیر بیماری زا می باشد (Bean و Kawaoka، ۱۹۸۵). از آنجایی که ژن هماگلوتین از قبل به عنوان محدوده بیماری زا بحرانی شناسایی شده بود، مقایسه توالی آمینواسید هماگلوتنین ویروس های بیماری زا و غیر بیماری زا یک جابجایی را نشان داد که مسئول بیماری زایی بود. تصور می شود تغییر ترئونین به لیزین در زنجیره الیگوساکارید جایگاه برش در سویه های غیر بیماری، این سویه ها را تبدیل به سویه های بیماری زا می کند (Kawaoka و Naeve، ۱۹۸۴). سویه H5N2 که باعث شیوع در پنسیلوانیا در سال ۱۹۸۳شده بود دارای زنجیره کربوهیدراتی بود که آمینو اسیدهای سایت برشی را بلوکه می کرد.

۲-۱۵-نشانه های بالینی

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

نشانه های بالینی شامل، پرهای ژولیده، نرم شدن پوسته تخم مرغ، افسردگی، افت ناگهانی تولید تخم مرغ، ازدست دادن اشتها، ادم، تورم (سر، پلک ها وشانه ها)، اسهال، ترشحات آغشته به خون از سوراخ های بینی و افزایش تلفات در گله می باشد (Jong و Hien، ۲۰۰۶). آنفلوانزا طیور نوعی بیماری ویروسی است که در گونه های مختلف پرندگان باعث اختلال در دستگاه تنفسی، گوارشی و سیستم عصبی می شود. در موارد بسیار حاد بیماری باعث مرگ و میر فوق العاده زیادی خواهد شد. شیوع آنفلوانزای تحت حاد علاوه بر علایم تنفسی از جمله سرفه، صدای تنفسی، تورم سینوس ها، کاهش تولید تخم مرغ ممکن است اسهال نیز به همراه داشته باشد. خیز بافت های سر و صورت یا علایم عصبی نیز رخ می دهند. شیوع انواع حاد بیماری منجر به حدود ۹۰ درصد تلفات شده، کیفیت پوسته تخم مرغ و رنگ دانه های آن نیز ممکن است دچار اختلال شود (فرخوی و همکاران، ۱۳۸۷).

۲-۱۶-آزمون تشخیص بیماری

۲-۱۶-۱-تشخیص بیولوژی و مولکولی

آزمون های تشخیصی جدید با استفاده از تکنیک های بیولوژی مولکولی توسعه یافته است. این آزمایش ها مبتنی بر تکنیک های مولکولی می باشند. همانند RFLP[۱۵]، PCR[۱۶] و تعیین توالی اسید نوکلئیک. تشخیص سرولوژیکی آنتی بادی برای ویروس های آنفلوانزای مرغی در پرندگان برای پیشگیری و کنترل بیماری اهمیت زیادی دارد (Faraz و همکاران، ۲۰۱۰).

برای تشخیص بیماری در مواردی که سویه های فوق حاد ویروس آنفلوانزا مطرح هستند، ابتدا باید به میزان واگیری و تلفات جوجه ها و عوارضی کالبد گشایی آنها توجه نمود و سپس برای تایید تشخیص از آزمایشگاه کمک گرفت. طی ۷ الی ۱۰ روز پس از عفونت، پادتن های ضد ویروس آنفلوانزا را می توان در خون پرنده ها شناسایی کرد. در تشخیص سرولوژیک بیماری آنفلوانزا آنچه دارای اهمیت می باشد این است که خونگیری اول در زمان شروع بیماری و خونگیری بعدی ۱۴ تا ۲۸ روز پس از آن انجام شود تا بتوان با مقایسه نتایج آنها به تشخیص قطعی رسید. چنانچه بین دو آزمایش متوالی عیار پادتن ضد آنفلوانزا ۴ برابر شده باشد، عفونت با ویروس آنفوانزا تایید می شود.

---

[۱۵]-Restricton fragment length polymorphism

[۱۶] -Polymerase chain reaction

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

۲-۱۶-۲-تشخیص آزمایشگاهی

موثرترین و ساده ترین روش آزمایشگاهی برای تشخیص پادتن ضد ویروس آنفلوانزا استفاده از آزمایش AGP[۱۷] (آزمایش رسوبی در ژل) می باشد. روش این تست توسط Beard در سال ۱۹۹۸ شرح داده شد. از چند روز پس از عفونت تا ۳ ماه پس از آن آزمایش AGP برای آنفلوانزا مثبت می ماند. البته آزمایش های دیگری مانند آزمایش های الایزا نیز برای تشخیص بیماری آنفلوانزا وجود دارد (Faraz و همکاران،۲۰۱۰). برای جستجوی پادتن ویروس از کشت جنین تخم مرغ یا PCR نیز استفاده می شود. نکته مهم این است که همواره عوارض واضح درمانگاهی یا کالبد گشایی برای تشخیص بیماری آنفلوانزا وجود ندارد و در این موارد استفاده از آزمایشات سرمی اهمیت بیشتری پیدا می کند. برای تعیین آلودگی یک گله، ۱۵ تا ۲۰ نمونه خون برای آزمایش کافی می باشد. جهت جستجوی ویروس در پرندگان مبتلا می توان از ترشحات نای، ریه، کیسه های هوایی، سینوس ها، دستگاه گوارش (شامل روده، سکوم، تونسیل ها و مدفوع) و در مرحله درمانگاهی بیماری از کبد، طحال، مغز یا خون نمونه برداری کرد. برای پیشگیری و کنترل بیماری باید از برخورد پرنده های وحشی به خصوص پرندگان آبزی که به تناوب ویروس را در مدفوعشان دفع می کنند با پرنده های پرورشی جلوگیری نمود.

۲-۱۷-پیشگیری و کنترل بیماری

پرندگان آلوده به ویروس آنفلوانزا، مقادیر زیادی ویروس در مدفوع و ترشحات دیگر که ارتباط مستقیم با محیط زیست مانند گرد و غبار، خاک، آب، قفس ها، ابزار و موارد دیگر دارد، دفع می شود. ویروس آنفلوانزا بسته به دما و رطوبت ممکن است هفته ها و تا ماه ها در خاک، آب و یا وسایل آلوده باقی بماند. عفونت پرندگان با ویروس های HPAI موجب ورود ویروس به داخل تخم مرغ و بافت های پرندگان می شود. ویروس بین پرندگان به طور مستقیم و غیر مستقیم از طریق ذرات آلوده معلق در هوا، آب، غذا و مواد دیگر انتقال می یابد. به احتمال زیاد، انتقال ویروس از پرنده به انسان از همین راه یعنی، تماس مستقیم با پرندگان و وسایل آلوده رخ می دهد (Jong و Hien،۲۰۰۶).

بیشتر عفونت های انسانی با آنفلوانزای مرغی به علت حمل مرغ آلوده ویا در ارتباط مستقیم با مرغ در هفته های پیش از شروع بیماری می باشد (Koopmans و همکاران، ۲۰۰۴؛ Mounts و همکاران، ۱۹۹۹؛ Tran و همکاران، ۲۰۰۲). تعداد محدودی از

[۱۷]- Agar Gel Percipitation

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

انتقال انسان به انسان گزارش شده که به علت تماس نزدیک و طولانی مدت با انسان آلوده می باشد (Ungchusak و همکاران، ۲۰۰۵).

اولین راه کنترل بیماری حذف منبع عفونت یعنی پرندگان آلوده می باشد. حذف تمام مرغ های آلوده در کانادا و هنگ کنگ روش موفقی در کنترل عفونت بود (Chan، ۲۰۰۲؛ Koopmans و همکاران،۲۰۰۴). همچنین تولید کنندگان مرغ تجاری، واکسیناسیون در مقیاس بالا در بسیاری از کشور های تحت تاثیر برای کنترل بیماری معرفی کردند. در بسیاری از موارد واکسیناسیون منجر به افزایش مقاومت به ویروس، پیشگیری بیماری، کاهش نرخ مرگ ومیر و کاهش آلودگی محیط زیست می شود (Sims، ۲۰۰۷؛ Peyre و همکاران، ۲۰۰۹). ولی پرنده های ایمن شده در هنگام آلودگی با ویروس بیماریزای آنفلوانزا، دچار عفونت شده و بدون بروز عوارض درمانگاهی، ویروس بیماریزا را در محیط پخش می کنند (Liu و همکاران، ۲۰۰۳). این اقدامات در نهایت باعث کاهش انتقال بیماری، کاهش بروز ویروس H5N1 و خطر انتشار ویروس از پرندگان به انسان کاهش می دهد.

۲-۱۸-پاسخ سیستم ایمنی به آنفلوانزا

سیستم ایمنی نوعی سیستم دفاعی بسیار تخصصی می باشد که روش طبیعی مقاومت در برابر هجوم اولیه بیماری هایی است که به وسیله عوامل عفونی متفاوت نظیر باکتری ها، ویروس ها، قارچ ها و غیره ایجاد می شوند . به طور کلی در مهره داران دو سیستم دفاعی شامل ایمنی ذاتی و ایمنی اکتسابی علیه پاتوژن ها وجود دارد. سیستم ایمنی ذاتی اولین خط دفاعی می باشد که ظرف چند ساعت پس از عفونت پاسخ سریع خود را اعمال می کند (Lee و همکاران، ۲۰۰۲). مهمترین سلول های سیستم ایمنی لنفوسیت ها می باشند که به سلول های B و T دسته‌بندی می شوند. لنفوسیت ها، ماکروفاژها و فیبروبلاست ها اینترفرون تولید می کنند.

۲-۱۸-۱-اینترفرون ها

اینترفرون ها پروتئین های کد شده به وسیله ی میزبان هستند که روند همانند سازی ویروس ها را مهار کرده و توسط حیوانات یا سلول های کشت شده سالم در پاسخ به عفونت ویروسی یا عوامل القا کننده دیگر تولید می‌شوند. این ترکیبات رده نخست دفاع بدن علیه عفونت ویروسی هستند. اینترفرون ها ایمنی هومورال و سلولی را مدیریت کرده و اعمال تنظیمی مهمی را برای رشد سلول هاانجام می‌دهند (Seung و Vidal، ۲۰۰۲). اینترفرون ها درتمام گونه های مهره داران ساخته می شوند. سلول

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/