بسم الله الرحمن الرحیم
الحمد لله رب العالمین الرحمن الرحیم مالک یوم الدین
اهدنا الصراط المستقیم صراط الذین انعمت علیهم غیر المغضوب علیهم ولا الضالین

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده **علوم**

شماره پایان نامه :

پایان نامه کارشناسی ارشد **زیست‌شناسی**

گرایش **میکروبیولوژی**

عنوان :

طراحی آزمایش الیزای رقابتی برای ردیابی پادتن ضدنوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزای جنس A

اساتید راهنما:

دکتر محمدرعایایی اردکانی

دکترمسعودرضا صیفی آبادشاپوری

استاد مشاور:

دکترمنصورمیاحی

نگارنده :

هومان احسنی

بهمن ماه ۱۳۹۲

باسمه تعالی

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده **علوم**

(نتیجه ارزشیابی پایان نامه ارشد)

پایان نامه آقای **هومان احسنی** دانشجوی رشته: **زیست‌شناسی** گرایش **میکروبیولوژی** دانشکده **علوم** به شماره دانشجویی **۹۰۳٤۲۰۱** با عنوان : **طراحی آزمایش الیزای رقابتی برای ردیابی پادتن ضدنوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزای جنس A** جهت اخذ مدرک **کارشناسی ارشد** در تاریخ : ۹۲/۱۱/۱۲ توسط هیأت داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و با درجه **عالی** تصویب گردید.

۱.	اعضای هیأت داوران :	رتبه علمی	امضاء
	اساتید راهنما:		
	دکترمحمد رعایایی اردکانی	دانشیار	
	دکترمسعودرضا صیفی آبادشاپوری	استاد	
	استاد مشاور : دکترمنصورمیاحی	استاد	.....
	استاد داور :دکترسیده الهام رضا توفیقی	استادیار	.....
	استاد داور :دکترمنوچهرمکوندی	استاد	.....
	نماینده تحصیلات تکمیلی :دکتر حسین معتمدی	دانشیار	.....
۲.	مدیرگروه :دکترسیدمنصورسیدنژاد	دانشیار	.....
۳.	معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده :دکترطاهره صداقت	دانشیار	.....
٤.	مدیرتحصیلات تکمیلی دانشگاه : دکتر مسعود قربانپور	استاد	.....

سپاس خدای راکه سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او راگزاردن نتوانند. و سلام و درود بر محمّد و خاندان پاک

او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است؛ و نفرین پیوسته بر دشمنان ایشان تا روز رستاخیز. . .

تقدیم به :

ساحت مقدس آقا امام زمان (عج)

پدر و مادر عزیزم

به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گرایدو به پاس محبت های بی دریغشان که

هرگز فروکش نمی کند.

خواهران عزیزم

که وجودشان شادی بخش و صفایشان مایه آرامش من است.

اما از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می کند و سلامت امانت هایی را که به دستش سپرده اند، بر حسب وظیفه و ارباب "من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر الله عزوجل"

از آقای دکتر محمد رحایی اردکانی

که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند

از استاد صبور و با تقوا، جناب آقای دکتر مسعود رضا صینی آبادشاپوری

"که با شکوفه غنی علمیشان مرا در به ثمر رساندن این پایان نامه، صمیمانه همراهی نموده و افتخار بهره مندی از هر دو جنبه علمی و اخلاقی ایشان را داشته ام"

از زحمات استاد مشاور این پایان نامه جناب آقای دکتر منصور میاحی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

و با تشکر فراوان از حضور:

سرکار خانم دکتر سیده الهام رضا توفیقی و جناب آقای دکتر منوچهر مکوندی که قبول زحمت فرموده و این پایان نامه را به داوری نشستند

جناب آقای دکتر حسین معتمدی نماینده محترم تحصیلات تکمیلی که نظارت بر حسن ارائه این پایان نامه را به عهده گرفتند.

و در پایان از تمامی همکلاسی های خوبم، آقای تاج بخش و خانم ها: محمود صالح، رفیعی، جاسم پور صانعی، عالی وند، منادی، ابراهیمیان، مهرآور و همچنین از دانشجویان ارشد میکروبیولوژی ورودی ۸۸ و ۸۹ بخصوص آقایان مصطفی عمو پور و سید سهیل رحمت آبادی و از پرسنل محترم بخش میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی به ویژه سرخانم دانفری و آقای خلیم پور، دکتر رشنو و سایر عزیزانی که در انجام این تحقیق مساعدت کرده اند کمال تقدیر و تشکر را دارم

نام خانوادگی : احسنی	نام: هومان	شماره دانشجویی :۹۰۳٤۲۰۱
عنوان پایان نامه : طراحی آزمایش الیزای رقابتی برای ردیابی پادتن ضدنوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزای جنس A		
اساتیدراهنما: دکترمحمد رعایایی اردکانی، دکترمسعودرضا صیفی آبادشاپوری		
استاد مشاور: دکترمنصورمیاحی		
درجه تحصیلی:کارشناسی ارشد	رشته:زیست‌شناسی	گرایش:میکروبیولوژی
دانشگاه :شهیدچمران اهواز	دانشکده:علوم	گروه :زیست‌شناسی
تاریخ فارغ التحصیلی : ۹۲/۱۱/۱۲		تعداد صفحه:۱۱۵

کلید واژه ها : مرغ، ویروس آنفلوانزای جنس A ، الیزای رقابتی، نوکلئوپروتئین نوترکیب، آنتی بادی منوکلونال

آنفلوانزای پرندگان یک بیماری ویروسی مهم و با اهمیت جهانی است که باعث خسارات اقتصادی در صنعت طیور می‌شود. ویروس آنفلوانزای پرندگان در خانواده *ارتومیکسوویریده* جز ویروس آنفلوانزا جنس A طبقه‌بندی شده است. بر اساس گلیکوپروتئین‌های سطحی این ویروس دارای سروتیپ های متعددی می‌باشد. روش‌های تشخیص آزمایشگاهی عفونت ویروس آنفلوانزا بر اساس جداسازی و شناسایی ویروس، یافتن اسیدنوکلئیک ویروس و روش‌های سرولوژی می‌باشند. یک برنامه کنترلی مناسب مانند بررسی-های سرولوژیکی آنتی بادی‌های ویروس آنفلوانزا نقش مهمی در پیش‌گیری و کنترل آنفلوانزای پرندگان دارد. از آنجایی که گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس آنفلوانزا تغییرات آنتی ژنتیکی بالایی را نشان می‌دهد طراحی روش‌های تشخیصی فراگیر براساس آن‌ها مشکل می‌باشد. بررسی‌های آنتی‌ژنتیکی نشان داده است که نوکلئوپروتئین (NP)، پروتئینی است که در بین سویه‌های مختلف ویروس حفاظت شده است. بنابراین تشخیص سرولوژیکی بر اساس بررسی آنتی‌بادی علیه NP می‌تواند برای نشان دادن ایمنی ایجاد شده در برابر همه سروتیپ‌های ویروس آنفلوانزای جنس A استفاده گردد. هدف این مطالعه طراحی و ارزیابی الیزای رقابتی با استفاده از نوکلئوپروتئین نوترکیب و آنتی‌بادی مونوکلونال ویژه این نوکلئوپروتئین جهت تشخیص سرولوژیک آنفلوانزای پرندگان می‌باشد. جهت طراحی این آزمایش میزان مناسب آنتی ژن NP و رقت‌های آنتی‌بادی منوکلونال و کنژوگه پراکسیداز ضد IgG موش با آزمایش Cherkerboard تعیین گردیدند. سپس ۸۳ نمونه سرمی مرغ تهیه شده از پرندگان واکسینه، پرندگان مبتلا شده به عفونت آنفلوانزا و نیز از پرندگان غیرواکسینه و غیرآلوده به ویروس آنفلوآنزا با آزمایش HI و نیز الیزای طراحی شده مورد آزمایش قرار گرفتند. نقطه برش الیزای طراحی شده بر اساس درصد مهار هر نمونه سرمی در الیزا و نتایج آزمایش HI (به عنوان آزمایش استاندارد) با روش ROC[1] تعیین گردید. تجزیه و تحلیل نتایج نشان داد که الیزای طراحی شده در مقایسه با HI برای شناسایی حیوانات واکسینه و مبتلا به عفونت به ترتیب دارای حساسیت ٦٥ درصد و ۱۰۰ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد برای هردو گروه بود.

[1] - Receiver Operating Characteristic

فهرست مطالب

عنوان _____ **صفحه**

فصل اول: مقدمه و هدف ۱

۱-۱-مقدمه و هدف ۲

فصل دوم: مروری برمنابع ٦

۲-۱- تاریخچه بیماری آنفلوانزای طیور ۷

۲-۲- سبب‌شناسی ۷

۲-۲-۱-طبقه بندی ۷

۲-۲-۲- ساختارویریون ۸

۲-۲-۳- ساختارهماگلوتینین ۱۰

۲-۲-٤- نورآمینیداز ۱۲

۲-۳- تغییرات آنتی‌ژنی ویروس آنفلوآنزا ۱۳

۲-٤- نوکلئوپروتئین ۱٤

۲-٤-۱- اتصال NP به RNP ۱٦

۲-٤-۲- واکنش NP باکمپلکس پلیمرازی ویروس ۱۷

۲-٤-۳- واکنش NP با M1 ..... ۱۸

۲-٤-٤- نقش NP درچرخه تکثیرویروس ۱۸

۲-۵- کمپلکس RNA پلمیراز ۲۷
۲-۵-۱- پروتئین PB1 ..... ۲۷
۲-۵-۲- پروتئین PB2 ..... ۲۸
۲-۵-۳- پروتئین PA ۲۸
۲-٦- پروتئین ماتریکس ۲۹
۲-۷- پروتئین غیر ساختمانی ۳۰
۲-۸- تشخیص آزمایشگاهی ویروس آنفلوانزا ۳۱
۲-۸-۱- روش جدا سازی ویروس ۳۱
۲-۸-۲- روش‌های تشخیص آنتی‌ژن‌های ویروس ۳۵
۲-۸-۲-۱- روش‌های مشاهده‌ای ۳۵
۲-۸-۲-۲-Antigenic capture Enzyme Immunoassay(AC-EIC) ۳٦
۲-۸-۲-۳- روش‌های سرولوژی ۳۷
۲-۸-۲-٤-واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ٤۰
فصل سوم: مواد و روش‌ها ٤٦
۳-۱- مواد و وسایل مورد نیاز ٤۷
۳-۱-۱- مواد مصرفی ٤۷
۳-۱-۲- وسایل مورد نیاز ٤۸
۳-۲- طرز تهیه بافرها و محلول‌های مورد استفاده ٤۹
۳-۲-۱- طرزتهیه PBST ٤۹
۳-۲-۲- طرز تهیه PBS(1x) ۵۰

۳-۲-۳- طرز تهیه PBS-T-skim milk (5%). ۵۰
۳-۲-٤- طرز تهیه Coating Buffer ۵۱
۳-۲-۵- طرز تهیه بافر استات سدیم ۵۱
۳-۲-٦- تهیه استوک آب اکسیژنه ۳ درصد ۵۱
۳-۲-۷- تهیه استوک TMB (۱ درصد) ۵۲
۳-۲-۸- تهیه کروموژن سوبسترا برای الیزا ۵۲
۳-۲-۹- طرز تهیه بلوکر PBS-BSA (۰/۲٪) ۵۲
۳-۳-۱۲- نحوه آماده‌سازی محلول برادفورد ۵۳
۳-۳-- روش خون‌گیری و جدا کردن سرم ۵۳
۳-۳-۱- طرز تهیه سوسپانسیون ۵/ ۰درصد گلبول قرمز شسته شده ماکیان ۵۳
۳-٤- روش کار ۵۵
۳-٤-۱- مراحل انجام تحقیق ۵۵
۳-۵- سویه ویروسی ۵٦
۳-۵-۱- تکثیرویروس ۵٦
۳-۵-۲- آزمایش هماگلوتیناسیون کیفی (HA) ۵٦
۳-۵-۲-سرم‌های مورد آزمایش ۵۸
۳-۵-۳- آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) ۵۸
۳-٦- مراحل تولید نوکلئوپروتئین نوترکیب ۵۹
۳-۷- آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی NP ٦۰
۳-۷-۱- بررسی واکنش آنتی‌بادی مونوکلونال تولیدی با روش ایمونودات با سروتیپ‌های H5 و H7 ... ٦۰

۳-۸- طراحی آزمایش الیزای رقابتی با استفاده از NP نوترکیب و آنتی‌بادی مونوکلونال ٦١
۳-۸-۱- تعیین رقت‌های مناسب آنتی‌ژن، آنتی‌بادی مونوکلونال و کونژوگه در آزمایش الیزا ٦٢
۳-۸-۲- آزمایش نمونه‌های سرمی موردبررسی با روش الیزای استاندارد شده ٦٣
۳-۹- تعیین نقطه برش الیزای طراحی شده ٦٥
فصل چهارم: نتایج ٦٥
٤-١-تکثیر ویروس ٦٦
٤-٢-تعیین عیارویروس با آزمایش هماگلوتیناسیون (HA) ٦٦
٤-٣- آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) ٦٧
٤-٤- کشت سلول‌های هیبریدومای تولید کننده‌ی آنتی‌بادی مونوکلونالD'C4 ..... ٧٠
٤-٥- بررسی واکنش آنتی‌بادی مونوکلونال تولیدی با روش ایمونودات با سروتیپ‌های H5 وH7 ..... ٧١
٤-٦- تعیین غلظت نوکلئوپروتئین NP ٧١
٤-٧-استاندارد نمودن الیزای رقابتی با پروتئین نوترکیب NP و آنتی‌بادی مونوکلونال D'C4 ..... ٧٣
٤-٨-نتایج OD حاصل از الیزای استاندارد شده برای نمونه‌های سرمی ٧٤
٤-٩- درصد ممانعت (مهار) در الیزای رقابتی طراحی شده ٧٧
٤-١٠-تعیین نقطه برش الیزای رقابتی طراحی شده ٨٠
٤-١١-تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از الیزای زقابتی طراحی شده و تست HI ٨٢
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ٨٦
٥-١- بحث و نتیجه‌گیری ٨٧
پیشنهادات ٩٣

فهرست تصاویر

عنوان _____ **صفحه**

تصویر ۲-۱-تصویر شماتیک یک پارتیکل ویروسی آنفلوانزا..... ۱۰

تصویر ۲-۲-تصویرشماتیک نورآمینیداز آنفلوانزا..... ۱۳

تصویر ۲-۳-آرایش دمین NP..... ۱۵

تصویر ۲-٤-نواحی عملکردی NP..... ۱۷

تصویر ۲-۵-مدل سنتز زنجیره مثبت RNA ویروس آنفلوانزا (CRNA)..... ۲۰

تصویر ۲-٦- موقعیت نسبی سیگنال های استقرارهسته‌ای (NLSS)..... ۲۲

تصویر ۲-۷-نحوه ورود RNP ویروس به داخل هسته..... ۲۳

تصویر ۲-۸-نحوه خروج RNP ویروس از هسته به طرف سیتوپلاسم..... ۲۵

تصویر ٤-۱- تصویر انکوباتورجوجه کشی و اتاقک هوایی تخم مرغ..... ٦٦

تصویر ٤-۲- نمونه‌ای از پلیت HI..... ٦۸

تصویر٤-۳-سلول‌های هیبریدومای تولید کننده‌ی آنتی‌بادی مونوکلونالD'C4..... ۷۰

تصویر٤-٤-بررسی میزان اختصاصیت آنتی¬بادی مونوکلونال تولیدی با روش ایمونودات..... ۷۱

تصویر٤-۵- پلیت الیزا مربوط به سرم‌های واکسینه و غیرواکسینه..... ۷٦

تصویر٤-٦- پلیت الیزا مربوط به سرم¬های گله گوشتی آلوده..... ۷٦

فهرست جداول

جدول _____ صفحه

جدول۳-۱-فهرست مواد مصرفی ٤٧

جدول ۳-۲-فهرست وسایل مورد نیاز ٤٨

جدول ۳-۳-مواد لازم جهت تهیه PBS-T ٤٩

جدول ۳-٤-مواد لازم جهت تهیه PBS (1X)..... ٥٠

جدول ۳-٥-مواد لازم جهت تهیه PBS-T-skim milk (5%) ٥٠

جدول ۳-٦-مواد لازم جهت تهیه Coating Buffer ٥١

جدول ۳-۷-مواد لازم جهت تهیه بلوکر (۰/۲٪) PBS-BSA ٥٢

جدول ٤-۱- میانگین عیار HI برای نمونه‌های سرمی..... ٦٧

جدول ٤-۲- تهیه استانداردهای پروتئینی به منظور تعیین غلظت نمونه¬های مجهول ۷۲

جدول ٤-۳- نتایج آزمون شفه در مورد مقایسه میانگین درصد مهار دربین نمونه‌های سرمی..... ۷۸

جدول٤-٤- توزیع فروانی نمونه‌های سرمی به تفکیک تست HI و الیزای رقابتی ۸۲

جدول٤-٥- توزیع فروانی نمونه¬های سرمی واکسینه و منفی به تفکیک تست HI و الیزای رقابتی ۸۳

جدول٤-٦- توزیع فروانی نمونه¬های سرمی آلوده و منفی به تفکیک تست HI و الایزای رقابتی..... ۸۳

جدول ٤-۷-میزان حساسیت و ویژگی در تشخیص نمونه‌های سرمی آلوده و واکسینه ۸٤

نمودارها

عنوان _____ **صفحه**

نمودار٤-١- عیار (تیتر) آزمایش HI نمونه‌های سرمی..... ٦٩

نمودار٤-٢- منحنی استاندارد جهت محاسبه غلظت پروتئین مجهول..... ٧٣

نمودار ٤-٣- OD مربوط به نمونه‌های سرمی ٧٥

نمودار ٤-٤- درصد مهار ایجاد شده توسط نمونه‌های سرمی ٧٩

نمودار٤-٥-منحنی ROC .سطح زیر منحنی الیزای رقابتی با تست HI..... ٨١

نمودار ٤-٦- پراکنش سرم های مورد آزمایش درالیزای طراحی شده و تست HI..... ٨١

مقدمه و هدف

۱-۱- مقدمه و هدف

پرورش طیور به صورت اهلی از دیرباز مورد توجه انسان قرار داشته و امروزه به دلیل پیشرفت-های علمی و عملی به شکل یک صنعت پیشرفته در کشورهای مختلف تبدیل شده است. شیوع بیماری‌های واگیردار از عوامل محدودکننده گسترش وسیع این صنعت و کاهش تمایل سرمایه‌گذاری در آن بوده است. برای ایجاد امنیت سرمایه‌گذاری و بالا بردن بهره‌وری راهی به جز مبارزه دائمی و پیش‌گیری از بیماری‌های واگیر نمی‌باشد. بیماری‌های تنفسی در گله‌های طیور از جمله عوامل عمده کاهش رشد، بروز تلفات و خسارات اقتصادی هستند. عوامل مختلف ویروسی، باکتریایی و محیطی از جمله علل اصلی ایجاد کننده مشکلات تنفسی در مزارع پرورش طیور هستند که در این میان بیماری آنفلوانزا از جایگاه خاصی در میان عوامل ویروسی برخوردار است. آنفلوانزا یکی از بیماری‌های عفونی حاد ویروسی پرندگان و ماکیان است که موجب خسارات اقتصادی فراوانی در ماکیان گوشتی از جمله مرگ و میر بالا، افزایش وازدگی، کاهش رشد و مستعد شدن به عفونت‌های ثانویه باکتریایی می‌شود. این بیماری ویروسی توسط سروتیپ‌های مختلف ویروس جنس A از خانواده *ارتومیکسوویریده*[1] ایجاد می‌شود. گونه‌های بسیاری از پرندگان اهلی و وحشی در سراسر دنیا نسبت به ویروس‌های آنفلوانزا حساس هستند که از طریق آن‌ها آثار زیان‌بار بی‌شماری بر تجارت بین‌المللی پرندگان و فرآورده‌های آنان تحمیل می‌گردد(۷۷). ویروس آنفلوانزا به عنوان یک عامل خطرناک و تهدیدی برای سلامتی انسان‌ها نیز محسوب می‌شود. در طول قرن ۲۰ میلادی سه همه‌گیری جهانی

1-*Orthomyxoviridae*

آنفلوانزا در جمعیت انسانی رخ داده است که در هر سه مورد ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان، منشأ ویروس یا منشأ ژن‌های ویروس عامل همه‌گیری بوده‌اند(٦٢).

ویروس‌های آنفلوانزای جنس A دارای هشت قطعه RNA تک‌رشته‌ای منفی می‌باشند. این هشت قطعه، کدکننده و مولد ده پروتئین ویروسی شامل هشت پروتئین ساختاری HA، NA، NP، M1، PB1، PB2، PA و دو پروتئین غیر ساختاری NS1 و NS2 می‌باشند. ویژگی‌های آنتی‌ژنتیکی نوکلئوپروتئین (NP) و پروتئین ماتریکس (M)، موجب تمایز ویروس‌های آنفلوانزا در سه جنس A، B و C شده است. در ویروس‌های جنس A، نوکلئوپروتئین (NP) به وسیله قطعه شماره ۵ کد می‌شود و یکی از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های داخلی ویروس است. NP به عنوان پروتئین اصلی ویروس در ایجاد کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین نقش دارد و از اجزاء مهم فرایند رونوشت‌برداری و تکثیر ویروس است. این پلی‌پپتید ٤٩٨ اسیدآمینه‌ای، یک مولکول کلیدی برای تکثیر ویروس است و باعث سوئیچ سنتز mRNA ویروسی و سنتز RNA ویروسی می‌شود و برخلاف دو پروتئین ساختاری اصلی ویروس یعنی هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA)، درجات بالاتری از پایداری نوکلئوتیدی و اسیدآمنیه‌ای دارد(٦٨).

برای تشخیص بیماری‌های تنفسی طیور از جمله آنفلوانزا، تاکنون روش‌های مختلفی مورد استفاده قرار گرفته است(٨،٩،١١،١٢،٢٣،٤١،٦٦،٦٨).

اما روش‌های سرولوژی با توجه به هزینه اندک، سرعت عمل و سهولت اجرا در همه‌گیری‌ها و بررسی وضعیت گله‌های طیور از نظر آنفلوانزا جایگاه مهمی دارند. آزمایشات سرولوژی متعددی نظیر

AGPT[1]، HI[2] و ELISA[3] جهت بررسی آنتی‌بادی تولید شده بر ضد ویروس آنفلوانزا در دسترس است(٦٨،٦٠). از میان این روش‌ها AGPT و ELISA جهت تشخیص آلودگی به تمام سروتیپ‌های ویروس، قابل استفاده می‌باشند. AGPT آزمایشی با حساسیت پایین، وقت‌گیر و نیازمند مقادیر بالای آنتی‌ژن و آنتی‌بادی جهت تشکیل خط رسوبی است. از سوی دیگر ELISA روشی سریع و حساس برای شناسایی آنتی‌بادی‌های اختصاصی تولید شده بر ضد تمام سرو تیپ‌های ویروسی است. از میان آزمایشات الیزای استفاده شده رایج‌ترین آن‌ها استفاده از الیزای غیرمستقیم می‌باشد(٨٥)، با این حال با توجه به متفاوت بودن ایمونوگلوبولین‌ها در گونه‌های حیوانی مختلف در الیزای غیر مستقیم برای تشخیص آنتی‌بادی ضد آنفلوانزا در سرم هر گونه حیوانی معمولاً نیاز به آنتی‌بادی کنژوگه اختصاصی همان گونه می‌باشد که این مسئله باعث دشواری در بررسی‌های سرولوژیک آنفلوانزا در جمعیت‌های حیوانی مختلف می‌گردد، لذا محققین در تلاش بوده‌اند تا آزمایش‌هایی را طراحی کنند که برای تمام گونه‌های حیوانی قابل استفاده باشد، بدین منظور یکی از راهکارهای ارائه شده طراحی الیزای رقابتی با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال بر ضد پروتئین NP بوده است. علت استفاده از NP توالی حفاظت شده آن در میان سروتیپ‌های مختلف ویروس است. براساس مطالعات انجام شده حداکثر تفاوت اسیدآمینه‌ای NP در میان ویروس‌های جنس A، کمتر از ١١ درصد است(٦٥،٦٩). بنابراین می‌توان به عنوان آنتی‌ژن به سهولت از NP برای نشان دادن ایمنی ایجاد شده متعاقب آلودگی با تمام ویروس‌های جنس A استفاده کرد(٤٣).

---

1 - Agar Gel Precipitation Test
2 - Haemagglutination Inhibition
3 - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

در واقع هدف این تحقیق به کارگیری آنتی ژن NP نوترکیب و آنتی‌بادی منوکلونال ضد آن جهت طراحی آزمایش الیزای رقابتی برای اولین بار در ایران می‌باشد(۲،۳).

مروری بر منابع

۲-۱- تاریخچه بیماری آنفلوانزای طیور

ویروس آنفلوانزا از عوامل اصلی واگیری و مرگ و میر در سراسر جهان است و بخش اعظمی از جمعیت انسانی همه ساله تحت تاثیر آن می‌باشد. افزون بر این بسیاری از گونه‌های حیوانی نیز توسط این ویروس آلوده می‌شوند که گاهی این آلودگی همراه با پیامدهای فاجعه‌باری است. در پاندمی سال ۱۹۱۸ حدود ۵۰ میلیون انسان در سراسر جهان در اثر این ویروس تلف شدند که این تلفات حتی بیشتر از تلفات جنگ جهانی اول بوده است(٦٢). آنفلوانزای پرندگان اولین بار در سال ۱۸۷۸ تحت عنوان طاعون مرغی[1] توسط پرونستیو توصیف گردید.

۲-۲-سبب شناسی

۲-۲-۱-طبقه‌بندی

ویروس‌های آنفلوانزا در خانواده *ارتومیکسوویریده* قرار دارند. این خانواده دارای ویروس‌های با ژنوم RNA تک‌رشته‌ای[2]، قطعه‌قطعه و با سنس منفی[3] است و از ۵ جنس مختلف تشکیل شده است (٦٢).

۱-ویروس آنفلوانزای جنس A (ژنوم ۸ قطعه‌ای).

1- Fowl plague
1-Single strand
2- Negative-sense