بسم الله الرحمن الرحيم

۲۰۱۹۰_۲۰۳_۴_۱۴۰۰۰

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری عمومی دامپزشکی

عنوان

مطالعه تاثیر بیومین بر پاسخ ایمنی در برابر واکسن کشته آنفلوانزای تحت تیپ (H_9N_2)

نگارش

نسرین وکیلی

دکتر منصور میاحی — استاد راهنمای اول

(استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران)

دکتر عبدالکریم زمانی مقدم — استاد راهنمای دوم

(استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد)

دکتر رمضانعلی جعفری — داور

(دانشیاردانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران)

دکتر مسعود قربانپور — داور

(استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران)

آذر ماه ۱۳۸۹

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات ایران
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
IRANDOC

۱۶۰۰۰۴

۱۳۹۰/۳/۲۹

بسمه تعالی

دانشگاه شهید چمران اهواز

(نتیجه ارزشیابی پایان نامه دوره دکتری عمومی دامپزشکی)

بدین وسیله گواهی می شود پایان نامه خانم نسرین وکیلی دانشجوی رشته دکترای دامپزشکی از دانشکده دامپزشکی به شماره دانشجویی ۸۳۵۸۲۹ تحت عنوان:

مطالعه تاثیر بیومین بر پاسخ ایمنی در برابر واکسن کشته آنفلوانزای تحت تیپ (H_9N_2)

جهت کسب درجه دکترای عمومی دامپزشکی در تاریخ ۱۳۸۹/۹/۲۳ توسط داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و با درجه بسیار خوب تصویب گردید.

اعضا هیئت داوران	مرتبه علمی	امضاء
الف. استاد راهنما اول: دکتر منصور میاحی	استاد	
ب. استاد راهنما دوم: دکتر عبدالکریم زمانی مقدم	استادیار	
ج. داور: دکتر رمضانعلی جعفری	دانشیار	
د. داور: دکتر مسعود قربانپور	استاد	
و. نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر حسین حمیدی نجات	استادیار	
۲- مدیر گروه: دکتر علیرضا غدیری	دانشیار	
۳- معاون پژوهشی و نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده: دکتر سید رضا فاطمی طباطبائی	استادیار	
٤- مدیر کل تحصیلات تکمیلی دانشگاه: دکتر رحیم پیغان	استاد	

دانشگاه شهید چمران اهواز
مدیریت تحصیلات تکمیلی

تقدیم به

نگاه مهربان پدرم، او که سقف آرزوهایش در دنیای آرزوهای ما فرش شده است

مادرم، او که وجودش برایم زندگیست و زندگیم برایش رنج و زبانم در بیان ذره ای از محبت هایش عاجز است

و همراهان زندگیم، برادر و خواهر خوبم، که همه لحظات شاد و غمگین زندگیم با آنها گذشت

و تمام کسانیکه من را در دوران تحصیل کمک و یاری نمودند.

تقدیم به

همسرم و خانواده محترمش به پاس همراهیشان و کمک های فراوانشان. امیدوارم که شایستگی محبت هایشان را داشته باشم.

با سپاس و تشکر فراوان از

جناب آقای دکتر میاحی و دکتر زمانی مقدم که در به انجام رساندن این پایان نامه زحمات فراوانی کشیدند.

اساتید بزرگوارم دکتر جعفری و دکتر قربانپور که صادقانه و با حوصله در جهت هر چه بهتر شدن نتیجه، داوری پایان نامه را به عهده داشتند.

هم چنین استاد گرامی دکتر حمیدی نجات که نظارت بر جلسه دفاع از پایان نامه را به عهده گرفتند.

جناب آقای دکتر پور مهدی بروجنی که با دقت نظر و صبر فراوان در تجزیه و تحلیل نتایج آماری این پایان نامه مرا یاری نمودند.

هم چنین از کلیه کارکنان بخش طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه اهواز و شهرکرد که در طول دوره پرورش زحمات زیادی را متقبل شدند و تمام کسانیکه به نحوی اینجانب را در طی کردن مسیر یاری نمودند کمال تشکر را دارم.

عنوان	شماره صفحه

فصل اول/ مقدمه و هدف

مقدمه و هدف	۲

فصل دوم/ مروری بر منابع

الف- کلیاتی درباره بیماری آنفلوانزا	۵
الف-۱- تاریخچه بیماری	٦
ب- سبب شناسی	٦
ب-۱- طبقه بندی	٦
ب-۲- خصوصیات ریخت شناسی ویروس	۷
ب-۳- مقاومت به عوامل فیزیکی و شیمیایی	۸
ب-٤- نامگذاری ویروس های آنفلوانزا	۹
ج- بیماری زایی ویروس آنفلوانزا	۹
ج-۱- عوامل وابسته به ویروس	۱۰
ج-۲-عوامل وابسته به میزبان	۱۲
د-همه گیر شناسی	۱۲
ه-ابتلای انسان به آنفلوانزای پرنده	۱۳
و-سویه های جدید شناخته شده با قابلیت انتقال به انسان	۱٤
ز-انتقال بیماری	۱٦
ح-نشانه های بیماری	۱۷

ط-ایمنی در برابر ویروس آنفلوانزا ۱۸

ط-۱-ایمنی غیر اختصاصی ۱۸

ط-۲-ایمنی اختصاصی ۱۸

ی- تشخیص ۱۹

ی -۱-جداسازی ویروس ۱۹

ی-۲-تشخیص سرولوژیکی ۲۰

ی-۲-۱-آزمایش HI ۲۰

ی-۳-آزمایش های مولکولی ۲۱

ک-درمان ۲۱

ل-پیشگیری و کنترل ۲۲

ل-۱-رعایت ایمنی زیستی ۲۲

ل-۲-واکسیناسیون ۲۲

ل-۳-کنترل ۲۷

م-۱- تاریخچه پروبیوتیک ها ۲۷

م-۲-ترکیب و اجزای فراورده های پروبیوتیکی ۲۸

م-۳- مکانیسم عمل پروبیوتیک ها ۲۹

ن- ترکیبات بیومین ۳۰

فصل سوم/ مواد و روش کار

الف-مواد مورد استفاده ۳۳

ب-وسایل مورد استفاده ۳۳

ج-آماده سازی محل نگهداری جوجه ۳۳

د-طرح آزمایش ۳٤

ه-روش خون گیری و جدا کردن سرم ۳۵

و-تهیه گلبول قرمز ۳٦

و-۱-تهیه گلبول قرمز ۳٦

و-۲- آزمایش هماگلوتینین(HA) ۳۷

ز- آزمایش ممانعت از هماگلوتینین(HI) ۳۷

ز-۱-آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون به روش بتا ۳۸

ح- روش آماری ۳۹

فصل چهارم/ نتایج

الف-نتایج عیار سرمی پادتن ضد واکسن آنفلوانزا با روش HI ٤۱

فصل پنجم/ بحث و نتیجه گیری

بحث و نتیجه گیری ٤۵

پیشنهادات ٤۷

منابع ٤۸

فهرست جداول

جدول ۱-۳: گروه بندی ماکیان مورد مطالعه جهت بررسی اثر بیومین بر عیار پادتن ضد واکسن کشته آنفلوانزا تحت تیپ (H_9N_2) ۳۵

جدول ٤-۱ تاثیر بیومین بر میانگین و انحراف معیار پادتن (HI) در برابر واکسن آنفلوانزای کشته پرندگان در جوجه های گوشتی مورد مطالعه (بر مبنای لگاریتم ۲) ٤۱

فهرست نمودارها

نمودار ۱-٤: مقایسه عیار پادتن ویژه آنفلوانزا در ماکیان هر چهار گروه در روز صفر (قبل از واکسیناسیون) ٤٣

نمودار ۲-٤: مقایسه عیار پادتن ویژه آنفلوانزا در ماکیان هر چهار گروه در روز ١٤ بعد از واکسیناسیون ٤٣

نمودار ۳-٤: مقایسه عیار پادتن ویژه آنفلوانزا در ماکیان هر چهار گروه در روز ٢٤ بعد از واکسیناسیون ٤٣

نمودار ٤-٤: مقایسه عیار پادتن ویژه آنفلوانزا در ماکیان هر چهار گروه در روز ٣٤ بعد از واکسیناسیون ٤٣

چکیده پایان نامه

نام خانوادگی: وکیلی **نام: نسرین**

عنوان پایان نامه: مطالعه تاثیر بیومین بر پاسخ ایمنی در برابر واکسن کشته آنفلوانزای تحت تیپ (H_9N_2)

استاد راهنمای اول: دکتر منصور میاحی **استاد راهنمای دوم:** دکتر عبدالکریم زمانی مقدم

درجه تحصیلی: دکتری عمومی **رشته:** دامپزشکی **گرایش:** دامپزشکی

دانشگاه: شهید چمران اهواز **دانشکده:** دامپزشکی

تاریخ فارغ التحصیلی: آذر ۱۳۸۹ **تعداد صفحه : ۵۳**

کلید واژه ها: بیومین، پروبیوتیک، پری بیوتیک، پاسخ ایمنی، واکسن آنفلوانزا

هدف از این مطالعه ارزیابی اضافه کردن بیومین در جیره غذایی ماکیان گوشتی بر پاسخ ایمنی بر ضد واکسن کشته آنفلوانزا تحت تیپ (H_9N_2) می باشد. بدین منظور ۱۶۰ قطعه جوجه گوشتی سویه راس به طور تصادفی به ٤ گروه مساوی ٤۰ قطعه ای تقسیم شدند. ماکیان گروه اول و دوم با جیره ی پایه ی فاقد بیومین و ماکیان گروه سوم و چهارم به ترتیب جیره های دارای بیومین به میزان ۱ و ۲ کیلو در تن دریافت کردند. در روز نهم دوره پرورش به ماکیان گروه ۱ و ۳ و ٤ واکسن کشته آنفلوانزا تحت تیپ (H_9N_2) در زیرپوست گردن تزریق شد. به طور همزمان ماکیان گروه دوم ۲/ سی سی سرم فیزیولوژی در زیر پوست گردن دریافت کردند. در روزهای صفر (قبل از واکسیناسیون)، و ١٤ و ٢٤ و ٣٤ بعد از واکسیناسیون از ۱۵ قطعه از هر یک از چهار گروه خون گیری به عمل آمد و عیار پادتن ویژه واکسن آنفلوانزا کشته ی پرندگان به روش آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون تعیین گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که اضافه کردن بیومین به جیره غذایی ماکیان گوشتی تاثیری بر افزایش عیار پادتن اختصاصی در برابر واکسن آنفلوانزای کشته پرندگان تحت تیپ (H_9N_2) ندارد.

دانشگاه شهید چمران اهواز
مدیریت تحصیلات تکمیلی

فصل اول

مقدمه و هدف

افزایش جمعیت از یک سو و تامین پروتئین غذای جوامع از سوی دیگر موجب گشته تا برای رفع نیازهای تغذیه ای تلاش مستمری صورت بگیرد و دراین بین توجه به پرورش طیور به عنوان یکی از مهمترین منابع تامین کننده پروتئین مورد نیاز مد نظر کشورهای مختلف قرار گرفته است. در کشور ما نیز در سال های اخیر پرورش طیور از رشد بسیار بالایی برخوردار بوده، این رشد سریع، با مشکلات خاص خود همراه است که یکی از موارد نگران کننده مسئله ی بیماری های طیور است که بدون شک توجه خاص به آن هم از جنبه ی اقتصادی و جلوگیری از اتلاف سرمایه تخصص یافته و هم از لحاظ بهداشتی باید مورد نظر قرارگیرد.

بیماری آنفلوانزای پرندگان در زمره مشکلاتی است که زیان های سنگینی به طیور وارد ساخته است. عامل این بیماری ویروسی از خانواده ارتومیکسوویریده است. در ایران در سال ۱۳۷۷ بیماری آنفلوانزا ناشی از تحت تیپ (H۹N۲) در اطراف تهران شایع شد و به سرعت در اکثر نقاط کشور انتقال یافت. با توجه به خسارات زیادی که به واحدهای پرورش به خصوص ماکیان وارد نمود، بعد از واگیری اولیه آنفلوانزا تحت تیپ (H۹N۲) در کشور، واکسیناسیون به عنوان یک راهکار جهت کنترل بیماری مطرح و مورد استفاده قرار گرفت. واکسن کشته ی مصرفی عیار پادتن بالایی تولید نمی کند و به نظر می رسد عدم امکان تحریک اولیه سیستم ایمنی توسط واکسن زنده علت اصلی پایین بودن عیار پادتن می باشد. به طور کلی از آنجا که میزان عیار پادتن سرم خون ویژه آنفلوانزا و میزان محافظت در برابر این بیماری ارتباط مستقیمی وجود دارد، دانشمندان با استفاده از مواد تقویت کننده سیستم ایمنی همراه با واکسن سعی در افزایش عیار پادتن ضد ویروس دارند .

اخیرا نوع جدیدی از محرک های رشد با منشا گیاهی تحت عنوان بیومین به صنعت دام و طیور معرفی شده است و تاثیر این پروتئین گیاهی بر اعمال سیستم ایمنی می تواند از راه تغییر در ترکیب میکروفلور دستگاه گوارش و یا مستقیما از راه تاثیر مستقیم بر سیستم ایمنی وابسته به روده باشد. این بررسی بر آن است که تاثیر این ماده را بر پاسخ ایمنی در برابر واکسن کشته آنفلوانزا ارزیابی نماید.

فصل دوم

مروری بر منابع

الف – کلیاتی درباره بیماری آنفلوانزا

بیماری آنفلوانزای طیور یک بیماری ویروسی است که توسط ویروس آنفلونزای تیپ A از خانواده اورتومیکسوویریده ایجاد می گردد. این ویروس ها دارای ژنوم قطعه ای با پولاریته منفی هستند. تنها تیپ A می تواند ایجاد عفونت طبیعی در پرندگان نمایند. این تیپ از ویروس در طیور، انسان و دیگر پستانداران ایجاد بیماری می کند. دامنه وسیعی از شدت در ویروس های تیپ A آنفلوانزای طیور وجود دارد که از یک عفونت بدون علایم بالینی تا ظهور صد درصد تلفات در پرندگان حساس متغییر می باشد. این ویروس دستگاه تنفس و گوارش بسیاری گونه های پرندگان را درگیر می کند ولی بیماری زایی آن در گروه های مختلف پرندگان متفاوت است. گونه های پرندگان وحشی معمولاً علایم بالینی را نشان نمی دهند، اما برخی از ویروس های آنفلوانزا در ماکیان، بوقلمون و مرغ شاخدار سبب بیماری شدید و حتی مرگ و میر می شود. عموماً آلودگی ماکیان و بوقلمون با ویروس هایی با شدت کم منجر به ظهور علائم تنفسی، کاهش میزان تولید تخم و در برخی موارد تلفات می شود. این ویروس می تواند با حضور تداخل میکروارگانیسم ها با عوامل نامساعد محیطی موجب وخیم تر شدن بیماری و تلفات بالا شود ولی این ویروس به تنهایی در شرایط تجربی فقط قادر به ایجاد بیماری خفیف می باشد. ویروس آنفلونزای طیور دستگاه تنفس، گوارش، تولید مثل و اعصاب پرندگان را درگیر می کند. میزان ابتلا و مرگ و میر در بوقلمون و ماکیان بالا است ولی دارای بیماری زایی متفاوت در گونه های مختلف پرندگان می باشد. پرندگان وحشی معمولاً بیماری زایی را نشان نمی-دهند(۳).

الف – ۱- تاریخچه ی بیماری

نمونه هایی از واگیری آنفلوانزا در مناطق مختلف جهان در سالهای اخیر شامل شیوع آنفلوانزای تحت تیپ H_5N_2 در هنگ کنگ در سال ۹۸-۱۹۹۷ می باشد. از دسامبر ۱۹۹۹ تا آوریل ۲۰۰۰ در ایتالیا، ٤۱۳ مورد همه گیری آنفلوانزا اتفاق افتاد در این مدت ١٤ میلیون پرنده در اثر این بیماری تلف شدند.

در آغاز سال ۲۰۰٤ شیوع آنفلوانزای طیور با بیماری زایی بالا تحت تیپ H_5N_2 در کشورهای کامبوج، چین، اندونزی، ژاپن، لائوس، کره جنوبی، تایلند و ویتنام گزارش شد. در ایران در تیرماه ۱۳۷۷ یک نوع بیماری با نشانه هایی شبیه بیماری نیوکاسل در چندین واحد پرورش و نگهداری مرغ تخمگذار و مرغ مادر گوشتی باعث تلفات وافت تولید گردید. پس از نمونه برداری های لازم توسط سازمان دامپزشکی کشور و ارسال نمونه به مراکز تشخیص داخل و خارج کشور ویروس آنفلوانزا تحت تیپ $H_۹N_۲$ از نمونه های ارسالی جدا شده است. نام کامل ویروس $H_۹N_۲$ A/ماکیان/ایران/۲۵۹/۱۹۹۸ قرارداده شده و جزء ویروس های کم حدت طبقه بندی گردید. کانون اولیه بیماری استان های تهران و قزوین بودند اما به تدریج سایر استان ها هم آلوده شد.

امروزه در اکثر نقاط ایران این بیماری شایع است(۱). مطالعه ای که توسط عبد شاهیان (۱۳۷۹) بر روی ٤۰ گله ماکیان گوشتی در اطراف اهواز انجام گرفت نشان داد که ۱۰ گله دارای پادتن ضد هماگلوتینین ضد ویروس آنفلونزا H_5N_2 بودند(٦).

ب : سبب شناسی

ب-۱- طبقه بندی ویروس

ویروس آنفلوانزای طیور، در خانواده اورتومیکسوویریده و جنس آنفلونزای ویروس A قرار دارد. ویروس های آنفلوانزا را براساس خصوصیات پادگنی نوکلئوتیدی (NP) و پروتئین ماتریکس (MP) تحت تیپ های A ,B ,C نیز تقسیم شدند. ویروسهای آنفلوانزای تیپ A در پرندگان، خوک، خوک آبی، سگ، ببر، پلنگ، اسب و انسان بیماری زا می باشند.

این ویروس ها گاهی در سایر پستانداران نظیر راسو، خوک دریایی و نهنگ یافت می شوند. ویروس های تیپ B, C از انسان و به ندرت از خوک و خوک آبی جدا شده اند. ویروس های تیپ A براساس ویژگی های ۲ نوع پادتن سطحی شامل مولکول هماگلوتینین و مولکول نورآمینیداز به تحت تیپ هایی تقسیم می شوند. تاکنون ۱۶ نوع پادگن متمایز هماگلوتینین (HA) و ۹ پادگن متمایز نورآمینیداز (NA) شناسایی شده است(۱۸).

ب-۲- خصوصیات ریخت شناسی ویروس

ویروس آنفلوانزا به شکل کره نامنظم با قطر ۸۰-۱۲۰ نانومتر می باشد. با این حال شکل های رشته ای نیز با همان قطر و طول متفاوت وجود دارد. غشا ی ویریون با اجزای سوزنی شکل به طول ۱۰-۱۲ نانومتر پوشیده می شود که همان پادگن هماگلوتینین و نورآمینیداز هستند. این ویروس دارای یک نوکلئوتید مارپیچی متقارن است که توسط غشایی احاطه می گردد. مولکول HA سبب اتصال ویروس به گیرنده های سطح سلول می شود و عامل فعالیت هماگلوتینین ویروس می باشد. پادگن ضد هماگلوتینین در تعیین شدت ویروس نیز نقش دارند. آنزیم نورآمینیداز سبب آزاد شدن ویروس های جدید از سلول آلوده می شود. آنتی ژن های NA ,HA به همراه یک پروتئین کوچک به نام

M_2 در یک غلاف چربی از جنس غشأ پلاسمایی سلول میزبان فرورفته اند. زیر پوشش ویروسی پروتئین ساختمان اصلی وجود دارد که مولکول های RNA را به همراه نوکلئوپروتئین و سه پروتئین PB_1, PB_2, PA که مسئول تکثیر و نسخه برداری RNA هستند احاطه کرده است. ژنوم ویروس از ۸ قطعه RNA تک رشته ای می باشد. این ۸ قطعه کد کننده، مولد ۱۰ پروتئین ویروسی هستند که ۸ نوع آن (PB_1, M_1, M_2, NP, NA, HA, PA, PB_2) اجزا ساختمانی ویروس هستند و توسط الکتروفورز قابل تفکیک می باشند. قطعه ای از RNA با کمترین وزن مولکولی، دو پروتئین غیر ساختمانی NS۲ و NS۱ را کد می کند که در سلول آلوده قابل تشخیص هستند. به علت ماهیت قطعه قطعه بودن ژنوم ویروس هنگامیکه یک سلول به وسیله ی دو سلول متفاوت از یک نوع به طور همزمان آلوده می شود ممکن است مخلوطی از قطعات ژنی والد وارد ویریون های نسل بعدی شوند. این پدیده در بازآرایی ژنتیکی نامیده می شود ممکن است منجر به تغییرات ناگهانی در پادگن های سطحی ویروس شود. این پدیده ژنتیکی همه گیر شناسی آنفلوانزا را به خوبی توجیه کرده و هم چنین مشکلاتی را در راه تولید واکسن آنفلوانزا ایجاد نموده است.

ب-۳- مقاومت به عوامل فیزیکی و شیمیایی

ویروس های آنفلوانزا دارای غشأ می باشند و بدین لحاظ نسبتا حساس هستند و با حلال های لیپیدی نظیر پاک کننده ها حل می شوند. خاصیت عفونی زایی به سرعت توسط عواملی نظیر فرمالین، بتاپروپیولاکتون، عوامل اکسید کننده، اتر، هیدروکسیل آمین، سدیم دو دسیل سولفات و یون های