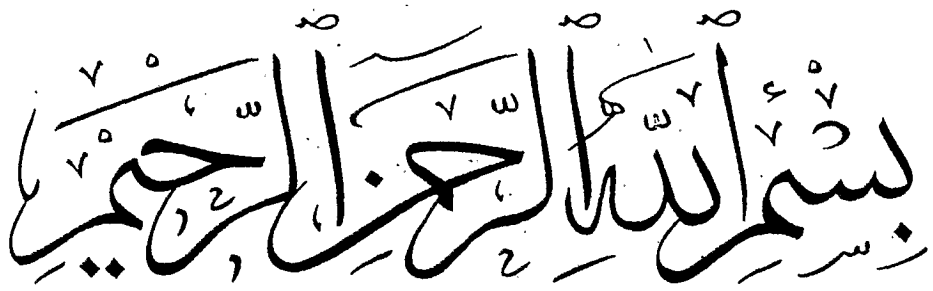

١١١٦٤٦

دانشکده دامپزشکی

جستجو و تعیین توالی ژنوم ویروس کم خونی عفونی جوجه (CIAV) در گله های گوشتی منطقه شهرکرد

پایان نامه دکترای عمومی دامپزشکی

۱۳۸۸/۲/۱۲

جعفر براتی

استاد راهنما

دکتر ایرج کریمی

۱۳۸۶

۱۱۱۶۴۶

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکترای آقای جعفر براتی

تحت عنوان

جستجو وتعیین توالی ژنوم ویروس کم خونی عفونی جوجه (CIAV) در گله های گوشتی منطقه شهرکرد

در تاریخ ۸۰/۴/۱۰ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و با رتبه ..... مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استاد راهنمای پایان نامه	دکتر ایرج کریمی
۲. استاد مشاور پایان نامه	دکتر محمد رضا محزونیه
۳. استاد داور	دکتر عبدالکریم زمانی مقدم
۴. استاد داور	دکتر مجتبی بنیادیان

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده دکتر پژمان میرشکرایی

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

دکتر عبدالکریم زمانی مقدم
رئیس دانشکده دامپزشکی

از دست و زبان که برآید کز عهده شکرش بدر آید (شیخ اجل)

با سپاس فراوان از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر ایرج کریمی

تقدیر و تشکر از اساتید بزرگوار:

جناب آقای دکتر محمد رضا محزونیه

جناب آقای دکتر عبدالکریم زمانی مقدم

جناب آقای دکتر مجتبی بنیادیان

کلیه حقوق ما دی مترتب بر نتایج مطالعات ،

ابتکارات ونوآوری های ناشی ازتحقیق مو ضوع

این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهر کرد است.

تقدیم به گرامیان عزیز:

پدر و مادرم

مهندس داریوش باباأحمدی

دکتر فرید براتی

دکتر فرهاد براتی

مهندس محمد براتی

فاطمه براتی

فهرست مطالب

صفحه

- **فصل اول**

مقدمه و تعریف:

۱-۱پیشگفتار.....۱

فصل دوم

کلیات

۲-۱ عفونت های سیرکو ویروسی.....۳

۲-۱-۲ کم خونی عفونی جوجه.....۳

۲-۱-۳ اهمیت اقتصادی.....۴

. ۲-۲ اتیو لوژی.....۴.

۲-۲-۱ طبقه بندی .....۴.

۲-۲-۲مورفولوژی. .....۴.

۲-۲-۳ ترکیب شیمیایی. ۵

۲-۲-۴ پروتئین های ویروسی.....۶

۲-۲-۵تکثیر ویروس.....۷

۲-۲-۶ مقاومت به عوامل فیزیکی و شیمیایی.....۸

۲-۳ طبقه بندی سویه ها.....۸

۲-۳-۱ خواص آنتی زنی.....۸

۲-۳-۲ تفاوت های ملکولی.....۸

۲-۳-۳ پاتوژنیسیته. ۹

۲-۳-۴ تخفیف حدت یافتن.....۹

۲-۴ میزبان های آزمایشگاهی ۹

۲-۴-۱ کشت سلولی.....۱۰

۲-۴-۲ جوجه.....۱۰

۲-۴-۳ جنین جوجه.....۱۰

۲-۵ پاتولوژی و اپیزو تیو لوژی.....۱۱

۲-۵-۱ بروز و انتشار جهانی.....۱۱

۲-۵-۲ میزبان های طبیعی و تجربی ۱۱

۲-۵-۳ انتقال ۱۱

۲-۵-۴ دوره نهفتگی ۱۲

۲-۵-۵ نشانه های کلینیکی.....۱۲

۲-۵-۶ هماتو لوژی ۱۲

۲-۵-۷ میزان ابتلا و مرگ میر ۱۳

۲-۶ پاتولوژی ۱۳
۲-۶-۱ ضایعات ماکروسکوپی ۱۳
۲-۶-۲ سندروم کم خونی خونریزی دهنده اپلاستیک ۱۴
۲-۶-۳ هیستو پاتولوژی ۱۴
۲-۶-۴ جراحات فوق ساختمانی ۱۴
۲-۷ بیماری زایی ۱۴
۲-۷-۱ مقاومت سنی ۱۵
۲-۷-۲ آنتی بادی های مادری ۱۵
۲-۷-۳ مقاومت ژنتیکی ۱۵
۲-۸ سیستم ایمنی ۱۵
۲-۸-۱ ایمنی فعال ۱۵
۲-۸-۲ ایمنی غیر فعال ۱۶
۲-۸-۳ تضعیف ایمنی ۱۶
۲-۹ تشخیص ۱۶
۲-۹-۱ جداسازی و تعیین هویت CIAV ۱۶
۲-۹-۲ جستجوی CAIV به کمک PCR ۱۷
۲-۹-۳ سرولوژی ۱۷
۲-۱۰ کنترل و پیش گیری ۱۸
۲-۱۰-۱ روند مدیریت ۱۸
۲-۱۰-۲ واکسیناسیون ۱۹
۲-۱۱ آزمایش PCR ۱۹
۲-۱۱-۱مقدمه ۱۹
۲-۱۱-۲ همانند سازی اسید نوکلئیک در آزمایشگاه ۱۹
۲-۱۱-۳ انتخاب آنزیم ۲۱
۲-۱۲دیگر واکنش گرهایPCR ۲۱
۲-۱۲-۱ داکسی نوکلئوزید تری فسفات ۲۱
۲-۱۲-۲بافرها و $MgCl_2$ ۲۱
۲-۱۲-۳ پرایمر ها ۲۲
۲-۱۳ آشکار سازی وتجزیه تحلیل محصول PCR ۲۲
۲-۱۴ طرح کلی تعیین توالی ۲۳
۲-۱۴-۱ روش اختتام زنجیره ۲۳
۲-۱۴-۲ روش شیمیایی تعیین توالی ۲۳
• **فصل سوم**
روش کار

۳-۱ استخراج DNA ۲۴
۳-۲آزمایش PCR ۲۵
۳-۲-۱ پرایمر ها ۲۵
۳-۲-۲طرز رقیق کردن پرایمر ها ۲۵
۳-۲-۳ برنامه سیکل حرارتی جهت تکثیر ژن CAIV ۲۵
۳-۲-۴ آماده کردن مخلوط اصلی ۲۶
۳-۲-۵ نحوه الکتروفورز فرآورده های PCR ۲۷
۳-۳ روش تعیین توالی مستقیم ۲۸
• فصل چهارم
نتایج ۲۹
۴-۱ نتایج حاصل از انجام آزمایشات ۲۹
۴-۲ تعیین توالی ۳۰
۴-۳ مقایسه توالی به دست آمده با سایر توالی های موجود از ویروس کم خونی عفونی ۳۳
• فصل پنجم
بحث ۳۹
منابع ۴۱

چکیده:

عامل بیماری کم خونی عفونی جوجه ویروسی با ژنوم DNA تک رشته ای حلقوی از خانواده سیرکو ویریده می باشد که اولین بار در سال ۱۹۷۹در ژاپن جدا سازی شد.علائم این بیماری شامل کم خونی شدید همراه با هماتوکریت پایین ، آتروفی بورس، طحال، تیموس، مغز استخوان ، سرکوب ایمنی و افزایش حساسیت نسبت به سایر بیماری های باکتریایی ویروسی انگلی و قارچی می باشد.همچنین عفونت با این ویروس به صورت تحت کلینیکی موجب بروز خسارت اقتصادی فراوانی در گله های جوجه گوشتی می باشد.راههای تشخیص این بیماری شامل جستجوی ژنوم این ویروس با آزمایش PCR جداسازی ویروس و آزمایشهای سرولوژی می باشد.در این مطالعه ژنوم ویروس به کمک آزمایش PCR جدا سازی شد از میان ۷۷ نمونه کار شده ۵ نمونه مثبت به وسیله پرایمر های CA۱NF و CAN۲R ثبت شد که درصدی معادل ۶/۲٪ را به خود اختصاص می دهد. در ادامه به وسیله روش تعیین توالی مستقیم تعیین توالی شدو به کمک نرم افزار Bio editو برنامه Blast میزان شباهت آن با سویه های هاریانا و ماهاراشترا ۹۸٪ به دست آمد.موارد مثبت در تعیین توالی کاملا شبیه به یکدیگر بوده ومکان مشباهت نوکلئوتیدها از شماره ۶ جدایه ناحیه شهرکرد با نوکلئوتید شماره ۱۶۴ از جدایه های هاریانا و ماهاراشترا می باشد.با توجه به شباهت فیلوژنیک به نظر می رسد که جدایه شهرکرد و هاریانا و ماهاراشترا خاستگاه یکسانی دارند.

فصل اول

مقدمه و تعریف :

۱-۱)پیشگفتار:

ویروس CAV اولین بار در سال ۱۹۷۹ در ژاپن از واکسن های آلوده جدا و به نام chicken anemia agent نامگذاری شد. لغت agent برای باراول زمانی استفاده شد که پس ازاولین واگیری،مشاهدات میکروسکوپ الکترونی برای ردیابی ذرات ویروسی با شکست مواجه شد و هیچگونه اسید هسته ای مشاهده نگردید و زمانی این عنوان به کار برده شد که مشاهده گردید CAA تلقیح شده به جوجه ها یSPF[1] یک روزه موجب آنمی آپلاستیک می شود . اکنون مشخص شده است این عامل یک ویروس است و نام آن chicken anemia virus می باشد.

خسارت اقتصادی ناشی از CAV شامل افزایش مرگ و میر و رشد کم و نامنظم و هزینه مصرف آنتی بیوتیک برای کنترل عفونت های ثانویه است. عده ای معتقدند که این عامل در اتیولوژی چندین سندرم از جمله سندرم هموراژیک، سندرم آنمی آپلاستیک هموازیک،سندرم آنمی درماتیت و بیماری بال آبی نقش دارد.

این ویروس از اکثر کشورها جدا شده است و از طریق مادر به جوجه و نیز استفاده از واکسن های آلوده منتقل می شود. در ایران شواهد سرولوژیک آن به اثبات رسیده و نیز به وسیله آزمایش PCR وجود ژنوم آن تایید شده است(۳). این عامل در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی غیر فعال کننده ویروس بسیار مقاوم است و همین مقاومت زیاد، حذف ویروس را از محیط های آزمایشگاهی و طبیعی مشکل می سازد.

بیماری حاصل از آن دو شکل کلینکی و تحت کلینیکی دارد. با توجه به ضررهای اقتصادی زیادی که در پی دارد نمی شود از آن چشم پوشی کرد. بنا بر اهمیت موضوع فعالیت بیشتر پژوهشگران ایران جهت شناسایی بیماری یا جداسازی عامل به روش های نوین برای غیر فعال نمودن عامل مولد بیماری ضروری است. مدارک فراوانی وجود دارد که نشان می دهند CAA پاتوژن جدیدی نیست اما ویروس بیماری زایی است که سالها نا شناخته بوده است. این عامل از طریق مادر به جوجه و نیز استفاده از واکسن های آلوده منتقل می شود وبه احتمال بسیار زیاد در ایران وجود دارد.

در مطالعه محزونیه و همکاران میزان شیوع از نظر سرولوژیکی همواره از ۲۰درصد بالاتر بوده است و به طور متوسط ۷۸/۷ درصد تخمین زده می شود.این اولین گزارش در مورد وجود CIAV در ایران است.از آنجایی که شهر کرد

---

[1] -specific pathogen free

در وسط ایران واقع شده است و جوجه یک روزه از سایر استان ها در یافت می کند،به نظر می رسد که سایر مناطق هم آلوده هستند(۴۳).در مطالعه عمادی درصد موارد مثبت از نظر تیتر ۷۷/۳٪ گزارش شد و در آزمایش PCR ۱۹ تای آنها مثبت بودند(۳).

ویروس کم خونی عفونی جوجه فقط در جوجه ها شناسایی شده،اما سیرکو ویروس ها یا ویروسهای شبیه سیرکو در سایر گونه های پرندگان و پستاندارن یافت می شوند.نتایج تست های سرولوژیکی بیانگر این است که این بیماری هیچ اهمیتی در بهداشت عمومی ندارد (۳). با توجه به سویه های مختلف جدا شده ویروس در نقاط مختلف دنیا ،هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان شباهت این سویه با سایر سویه های موجود می باشد که در نهایت خاستگاه ویروس را مشخص می کند(۶۴).

فصل دوم

کلیات :

۲-۱) عفونتهای سیرکو ویروسی:

خانواده سیرکو ویروس اخیرا شناسایی شده است و شامل ویروس هایی در پستانداران و پرندگان است.سیرکوویروس PCV ازاین خانواده است که این ویروس در سال ۱۹۷۴ به عنوان آلودگی شبه پیکورنا ویروسی در سلول pk۱۵ (کلیه خوک)، بدون ایجاد بیماری شناسایی شد. از آنجایی که ژنوم این ویروس DNA تک رشته ای است، این ذره را سیرکوویروس نامیدند.

این ویروس با خصوصیات فیزیکوشیمیایی مشابه در جوجه ها و تعدادی از گونه های طوطی وجود دارد و در طوطی عامل بیماری پر و منقار طوطی PBfDV[۲] نام دارد.

اگر چه این خانواده با ویروس های حیوانی خصوصیات مشابهی دارند، ولی در کل تفاوت اساسی بین CIAV و PBFDV و PCV وجود دارد. به خاطر عدم شباهت رشته DNA یا اپی توپ های مشترک آنتی ژنی واستراتژی تکثیر و تفاوت های مورفولوژیکی پیشنهاد شد که CIAV متعلق به گروه جداگانه ای است.

گفته می شود که سیرکوویروس هااز نتیجه ترکیب ژنوم نانو ویروس ها (ویروس گیاهان) و ویروس های شبیه پیکورنا ایجاد شده است.

علاوه بر CIAV ، PCV، تعدادی جرم شبیه سیرکوویروس در پرندگانی که زندگی آزاد دارند هم وجود دارد(۶۴).

۲-۱-۲) کم خونی عفونی جوجه ها

کم خونی عفونی جوجه اولین بار توسط یواسا (Yuasa) در سال ۱۹۷۹ به عنوان یک بیماری جدید که توسط ذره ویروسی نوظهورایجاد می شود،در جوجه های جوان گزارش شد (۸۳).

علائم بیماری، کم خونی آپلاستیک و آتروفی بافت های لنفوئیدی عمومی توام با سرکوب ایمنی بود که با دخالت سایر عفونت های ویروسی، باکتریال، یا قارچی به وخامت می گرایید. مطالعات بعدی نشان دادکه ویروس نقش مهمی در ایجاد بیماری های چند فاکتوری که با سندرم خونریزی دهنده و کم خونی آپلاستیک ظاهر می شود ایفا می کند. پس از اولین شناسایی این بیماری و جدا سازی ویروس عامل آن در ژاپن، ویروس از سایر کشورهایی که صنعت مرغداری داشتند، جدا شد (۶۴).

---

[۲] -Psittacine beak and feather disease virus

این عامل در ابتدا عامل کم خونی جوجه chicken anemia agent یاCAA نامیده شد. (۸۳) اما بعد از مطالعه مشخصات مورفولوژی و بیوشیمیایی عامل ویروس کم خونی جوجه به (CAV) یاchicken anemia virus تغییر نام پیدا کرد.

عنوان CAV توسط کمیته بین المللی برای نام گذاری این ویروس پذیرفته شد. اما از آنجا که بیماری عموما به کم خونی جوجه معروف است، بهتر است ویروس را ویروس کم خونی عفونی جوجه (CIAV) بنامیم(۶۴).

۲-۱-۳) اهمیت اقتصادی:

عفونت ایجاد شده توسط این ویروس در جوجه های با سن ۴-۲ هفته با سندرم کم خونی مشخص می شود .(۸۲،۶۲،۶۵). دراین گله ها، رشد کند شده و مرگ و میر معمولا بین ۱۰ تا ۲۰٪ است. اما گاهی تا ۶۰٪ هم می رسد. در جوجه های با سن ۶ هفته به بالا، علائم ناشی از عفونت CIAV که نشان دهنده سندرم کم خونی هموراژیک آپلاستیک باشند به طو قاطع دیده نشده است. آنچه در برخورد با عفونت CIAV پیش بینی می شود این است که به علت عفونت تحت کلینیکی تعداد لنفوسیت های T کاهش می یابد (۶۴).

۲-۲) اتیولوژی

۲-۲-۱) طبقه بندی: اخیرااین ویروس به عنوان تنها عضو از جنس ژیرو ویروس از خانواده سیرکوویریده طبقه بندی شده است(۶۴).

۲-۲-۲) مورفولوژی:

ویروس کم خونی عفونی جوجه، ۲۰ وجهی با متوسط قطر ۲۶/۵-۲۵ نانومتر است (۶۴). ۲ نوع از این جرم معمولا دیده می شود. جرم تیپ I به شکل حفره مرکزی است که توسط ۶ حفره جانبی احاطه شده و فاصله مرکز به مرکز هر کدام ۷/۵ نانومتر است، و یک شبکه سطحی منظم را تشکیل می دهد. این آرایش بیانگر ویروس ۲۰ وجهی است و ۳۲ زیر واحد مورفولوژیک دارد.

جرم تیپ II دارای ۱۰ سطح برآمده فضایی است که اثری از ساختار چرخ دنده را نشان می دهد. مقاطع تهیه شده از سلول های MSB۱ آلوده به CIAV که با آنتی بادی های منوکلونال اختصاصی ضد CIAV واکنش داده اند، حضور جرم در داخل سلول را اثبات می کند و هر ۳ پروتئین ویروسی در اجسام آپوپتیک که به شکل ساختارهای تراکم الکترونی دیده می شوند حضور دارند.

در تعداد کمی از سلولها، ذرات ویروسی در سیتوپلاسم در ارتباط با میکروتوبول ها دیده می شوند .مقادیر متفاوتی از چگالی ویریون ها در گرادیان کلرید سزیم گزارش شده است.برای این ویروس $\frac{g}{ml}$ ۱/۳۴-۱/۳۳ حد پایین

و $\frac{g}{ml}$ ۱/۳۷۵ -۱/۳۵حد بالاگفته شده است. ضریب ته نشین شدن CIAV در سوکروز حدودا S ۹۱ بر آورد شده است (۶۴).

۲-۲-۳) ترکیب شیمیایی ویروس:

DNA ویروس:

CIAV دارای ژنوم تک رشته ای، حلقوی و دارای سنس منفی است (۱۰ و ۲).آنالیز توسط ژل الکتروفورز بیانگر این است که شاخه تکی DNA (mr۶۷۵) در زمان آلودگی سلول های MDCC-MSB۱ با هر ۱۴ سویه از ویروس ایجاد می شود.این شاخه ۶۷۵ جفت بازی در بر دارنده بخشی از ژن است که پروتئین های کپسید ویروس را کد می کند (۷۱). ژنوم قابل تکثیر ویروس شامل ۲۲۹۸ یا ۲۳۱۹ زوج بازی است که اختلاف به ترتیب به حضور ۴ یا ۵ تکرار مستقیم از یک ردیف ۲۱ زوج بازی مربوط است. اکثر سویه های CIAV دارای ۴ تکرار مستقیم و یک ردیف جایگزین ۱۲ زوج بازی در بین آنها هستند (۷۲). در سلولهای عفونی هر ۲ نوع DNA تک رشته ای و ۲رشته ای وجود دارد، اما در ویریون ها یک DNA تک رشته ای حلقوی با سنس منفی وجود دارد.تبدیل فرم تک رشته ای به دو رشته ای برای رونویسی مورد نیاز است. در کل گرچه جدایه که تا به حال آنالیز شده اند خیلی شبیه یکدیگرند، لیکن اختلافاتی در توالی DNA بین سویه ها دیده شده است (۶۱).

تاد و همکاران به وسیله آنزیم های محدود کننده روی قطعات ۶۷۵ زوج بازی که نیمه N انتهایی چهار چوب باز شماره ۳ یا ORF۳ را کد می کند و باروش PCR تکثیر شدند، ویروس های جدا شده را به ۷ رده تقسیم نمودند. اگرچه روشن نبود که آیا این گروه ها از نظر بیولوژیکی با هم اختلاف دارند یا خیر(۷۱).

رنشا و همکاران حضور یک منطقه بسیار متغیر را در ناحیه ای که VP۱ را در اسید های آمینه ۱۵۱- ۱۳۹ کد می کند، گزارش نمودند که در نتیجه این تغییرات در ترکیبات اسید آمینه ساختار پروتین تولید شده، تغییراتی دیده می شود.

ساختارهای کایمری که در آنها یک تکه Nehl Bamh۱ از VP۱ بین گونه های CIA-۱و CUX-۱ جابجا شده بود نشان داد که این تغییرات روی تکثیر ویروس در سلولهای MSB۱ اثر می گذارد (۶۰). تغییرات مشابهی برای جدایه های برزیل و استرالیا در این ناحیه VP۲ گزارش شده است(۳).

تا به حال همه سویه هایی که تعیین توالی شده اند به استثنای یک مورد دارای ORF۳ بودند که پروتئین های ۲۵(ORF۱) ، ۲۴(ORF۲)، ۱۳(ORF۳) کیلو دالتونی را کد می کند. این قسمت ها کمی روی هم قرار دارند. علاوه بر اینها یک ناحیه پروموتور و یک سیگنال پلی آدنیلاسیون نیز وجود دارد. از آنجا که ORF ها روی زنجیره مکمل ژنوم قرار دارند آنها را به ترتیب C۱ ، C۲ و C۳ می نامند. ORF۳ درون ORF۲ قرار گرفته است و ORF۲ کمی روی ORF۱ همپوشانی دارد.

سویه ژاپنی CAA۸۲-۲ حاوی یک ORF چهارمی نیز هست (ORF۴) که در پایین ORF۱ بین نوکلوتید های ۱۹۴۱-۲۲۸۹ قرار گرفته است. تفاوت بین CAA۸۲-۲ و cux-۱ و دیگر سویه های متفاوت این است که CAA۸۲-۲ یک جایگاه آغازین ترجمه دارد که در دیگر نمونه ها وجود ندارد(۶۴).

اینکه ORF۴ در CAA۸۲-۲ ترجمه شود روشن نیست اما احتمالا بر پایه دنباله غنی از CG که به طور مستقیم بعد از کد انتهایی ORF۱ قرار دارد و توسط تعدادی ساختار سنجاق مویی و ۴ تکرار از ۱۸ نوکلئوتید دنبال می شود نیست. اهمیت این ساختار هاهنوزشناخته نشده است.

واحدهای تکرار شونده و ردیف های جایگزین ۱۲ زوج بازی به فاکتورهای ترجمه ای متفاوت باند می شود. ترجمه خوب نیازمند بازشدن فاکتورهای ترجمه به DR[۳] و ردیف های جایگزینی ۱۲ زوج بازی است.

تکثیر زیاد در آزمایشات in vitro فعالیت ترجمه را افزایش می دهد و حذف اولیه DR۲ فعالیت ترجمه را ۴۰-۵٪ کاهش می دهد (۵۹). DNA ویروس شامل۳ عدد DR است اما با حذف ردیف جایگزینی ۱۲ زوج بازی قادر نخواهد بود که اجرام زنده ویروس تولید کند.

موتاسیون در ردیف جایگزینی ۱۲ زوج بازی باعث کاهش سیتوپاتوژنیسته می شود.این در حالی است که اپی توپ خنثی ویروس هنوز تولید می شود (۶۴). تنها یک mRNA پلی سیسترونیک[۴] از ۲۱۰۰ باز آلی برای ORF ۳ کد شده تولید می شود.

استفاده کدهای آغازین AVG میانی برای سنتز پروتئین های ۵۱ و ۱۳ کیلو دالتونی برای ویروس های DNA دار منحصر به فرد است. در ضمن یک رونوشت کوچک ۴ کیلو بازی گزارش شده است (۵۹).

۲-۲-٤)پروتئین های ویروسی

پروتئین ویروسی ۵۰ کیلو دالتنی (VP۱) تنها پروتئین جدا شده از اجرام ویروسی تخلیص شده است. ۴۰ اسید آمینه N – انتهایی که یک شباهت محدود به پروتئین های هیستونی را نشان می دهد نقش باند شدن DNA به کپسید ویروس را دارا است (۱۵).

پروتئین ۳۰ کیلو دالتونی VP۲ غیر ساختاری احتمالا به عنوان یک پروتئین سکو در حین اجتماع ویریون عمل می کندو بنابراین VP۱ در مسیر صحیح می پیچد (۳۹).

سومین پروتئین ویروسی به وزن ۱۶ کیلو دالتون همراه با هسته سلولهای عفونی است ولی در اجرام ویروسی تخلیص شده وجود ندارد (۶۴).

---

[۳] -Direct repeat
[٤] - polysisitronic

داگلاس و همکاران با استفاد از آنتی بادی های مونوکلونال نحوه بیان ۳ پروتئین در سلولهای عفونی MSB۱ را نشان دادند. VP۲ و VP۳ ظرف ۱۲ ساعت قابل تشخیص اند ولی VP۱ تا ۳۰ ساعت بعد از عفونت آشکار نمی شود (۱۸).

پروتئین VP۳ ویروس که آپوپتین [۵] نامیده می شود یک محرک قوی برای مرگ سلول های تیموس جوجه و رده های سلولی لمفوبلاستوئید جوجه است. آپوپتین کوچک شده که ۱۱ اسیدآمینه آخر آن حذف شده باشد قادر به تحریک مرگ نخواهد بود.

VP۳ سالم برای تکثیر ویروس لازم است. در تحقیقات گسترده ای نشان داده شد، آپوپتین ویروس، مرگ را در تعدادی از رده های سلول لنفوبلاستوئیدانسانی و سلول استئوسارکومای انسانی تحریک می کند، ولی اثری روی سلول های انسانی نرمال ندارد.

برقراری مرگ در سلول های توموری انسان از P۵۳ مستقل است ولی با Bcl۳۹ تسریع می شود. فعالیت های آپوپتین caspas۳ سلولی و یکی از caspas های پایینی برای انجام مرگ سلولی برنامه ریزی شده ضروری است. آزمایشات حیوانی که با استفاد از آدنوویروس های حامل ژن آپوپتین انجام شده پیشنهاد کرده است که آپوپتین برای درمان انسان های مبتلا به سرطان می تواند بکار رود.

مطالعاتی که با استفاده از آنتی بادی منو کلونال خنثی کننده در وسترن بلاتینگ انجام شده، بیانگر این است که احتمالا اپی توپ های خنثی کننده، قطعات VP۱ و VP۲ هستند (۶۴).

این تئوری در مطالعات داگلاس و همکارن تائید شده است. آنها نشان دادند که VP۱ و VP۲ در همان ساختارهای هسته ای در سلول عفونی حضور دارند (۱۸).

آنتی بادی های خنثی کننده بعد از تلقیح جوجه ها با سلول های حشره حاوی VP۱ و VP۲ ایجاد می شود، اما با سلول های که شامل تنها VP۱ و VP۲ بودند ،بوجود نمی آید. آنتی بادی های منوکلونال خنثی سازی ویروس با تولیدات Baculvirus حاوی VP۱ تنها در صورتی ایجاد می شود که همزمان VP۲ هم تولید شوند، اما در کپسیدهای ویروسی که تنها VP۱ داشته باشند آنتی بادی های منوکلونال خنثی کننده ویروس با VP۱ اصلی باند می شود اما با پروتئین ها دناتوره شده باند نمی شود. این امر نقش VP۱ را به عنوان یک پروتئین پایه تقویت می کند (۶۴).

۲-۲-۵) تکثیر سلول :

ویریون ها احتمالا به روش جذب و نفوذ معمولی داخل سلول می شوند. مقدار کمی از رونوشت DNA ویروس پلی سیسترونیک ۲ کیلو بازی، ۸ ساعت بعد از عفونت در سلول های MSB۱ ظاهر شده و حداکثر در ظرف ۴۸ ساعت حاصل می گردد(۶۵).

---

[۵] -Apoptin

VP۳ شش ساعت و VP۲ دوازده ساعت بعد از عفونت حضور دارند. پروتئین کپسید VP۱ تا ۳۰ ساعت بعد از عفونت قابل جدا سازی نیست. تکثیر DNA با مدل rolling cycle اتفاق می افتد. جایگاه شروع واقعی برای تکثیر DAN مشخص نشده است گرچه با سامی و همکاران نشان دادند که شروع همانند سازی DNA از یک جایگاه ۹ نوکلئوتیدی است (۷). تاد پیشنهاد می کند که VP۱ ممکن است نقشی در تکثیر DNA داشته باشد (۷۲). فقط یک ناحیه توانایی رونویسی را دارد.این توالی بین ۱۵۰ -۳۵۰ قرار دارد.مکان Cap در این توالی بین ۳۵۲-۳۵۶ است.سیگنال پلی آدنیلاسیون در توالی ۲۲۸۷ قرار دارد که برای کل ژنوم است.ناحیه پروموتور CAV حاوی یک جعبه TATA است که DNA poly merase رونویسی را از آنجا شروع می کند (۶۱).

تکثیر ویروس کم خونی در جوجه به طور اولیه درهما سیتو بلاست های مغز استخوان و پیش لنفوسیت های T در قشر تیموس رخ می دهد. اگرچه ویروس در سایر ارگان ها نیز جدا شده است. همچنین تکثیر ویروس باعث مرگ سلولی می شود که عامل آن VP۳ است.

۲-۲ -٦) مقاومت به عوامل فیزیکی و شیمیایی:ویروس کم خونی عفونی جوجه نسبت به اغلب ضد عفونی کننده ها مقاومت زیادی دارد. ضد عفونی کردن ویروس موجود در شیرابه کبد با فنل ۵۰٪ به مدت ۵ دقیقه ویروس را غیر فعال کرده است .همچنین مطالعات بیانگر این نکته است که این ویروس به اثرات ضد عفونی کننده اتیل اتر ۵۰٪ و کلرو فرم به ترتیب ۱۸ ساعت و ۱۵ دقیقه مقاوم بوده است . ضد عفونی کردن شیرابه کبد با سود ۱/ نرمال برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق ، بتا پروپیونولاکتون ۴/٪ به مدت ۲۴ ساعت در ۴درجه سانتی گراد یا فرمالدهید ۵٪ به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت اتاق ویروس را به طور ناقص غیر فعال کرده است .ضد عفونی با گلوتار آلدهاید برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق ، بتا پروپیو لاکتون ۴/٪ به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه ساتنی گراد یا فرم آلدهاید ۵٪ برای ۲۴ ساعت در درجه حرارت اتاق ویروس را کاملا غیر فعال کره است (۶۴).

۲-۳) طبقه بندی سویه ها:

۲-۳-۱)خواص آنتی ژنی: با استفاده از آنتی بادی های پلی کلونال هیچ تفاوت آنتی ژنی در بین ویروس ها CIAV جدا شده ژاپنی، اروپایی و آمریکایی مشخص نشده است(۱۱)، در نتیجه می توان پذیرفت که تمام سویه ها متعلق به یک سروتیپ هستند(۵۵) ،اما براساس تفاوت در الگوهایی واکنش با آنتی بادی های منوکلونال و تفاوت های توالی DNA می توان تغییراتی در الگوهای پروتئین پیشگویی کرد و انتظار داشت که بیماری زایی سویه ها احتمالا متفاوت باشد (۶۴).

۲-۳-۲) تفاوت های ملکولی

توالی اسید آمینه سویه های مختلف جدا شده از نقاط مختلف دنیا معین شده است. به تفاوت های کوچک در توالی اسیدهای آمینه، مخصوصا برای اسید آمینه ۱۵۱-۱۳۹ از VP۱ و همچنین انتهای کربوکسی VP۲ و VP۳ توجه شده است (۶۰).

مقایسه سویه های جدا شده از اروپا و آمریکا،ژاپن و استرالیا نشان می دهد که ۲ سویه استرالیایی بیشتر از سویه های اروپایی و امریکایی به هم وابسته اند این۲ سویه از استرالیا در ناحیه بسیار متغیر از VP۱ تفاوت دارند (۱۰).

مطالعه بیماری زایی روی تعدادی از ویروس های chimeric که با دستکاری دچار تغییرات متعدد شده بودند، نظیر ناحیه بسیار متغیر، نتیجه دادکه این تغییرات در بیماری زایی مشارکت نسبی ندارند.اما مطالعات با سویه های تغییر یافته ای که تنها در این منطقه دستکاری شدند ،گزارش نشده است و جواب پرسش اهمیت ناحیه متغیر در پاتوژنیسته ویروسی را حل نشده باقی گذارده است(۶۴). گرچه معمولا پذیرفته شده که سویه های جدا شده از سراسر جهان اساسا در پاتوژنسیته تفاوتی ندارند، لیکن در مطالعات خیلی کمی سویه های مختلف را تحت شرایط تجربی مقایسه کرده اند.

۲-۳ -۳) پاتوژنسیته: اگرچه پذیرفته شده است که سویه های جدا شده در سراسر جها ن ازلحاظ پاتوژنسیته فرقی با هم ندارند ، Yuasa و Imai د جدایه را که دوازده بار در سلول های MSB۱ پاساژ داده شده بودند مقایسه کر دند و تفاوت های کمی در حدت سویه ها به دست آمد . این داده ها مربوط به سن هفت روز گی است و تلقیح در سن دو هفتگی آسیبی ایجاد نکرده است(۸۰) .

۲-۳-٤) تخفیف حدت یافتن:

تخفیف حدت CIAV بعد از ۱۲ پاساژ در سلول های MSB۱ توسط بولو و فوجیس گزارش گردید. اما گریو و همکاران و یواسا دریافتند که تفاوتی در پاتوژنیسته بین پاساژ ۱۰ و ۴۰ وجود ندارد(۲۵).

تاد و همکاران گزارش کردند که سویه CUX-۱ بعد از ۱۷۳ پاساژ در سلول های MSB۱ از لحاظ بیماری زایی دارای حدت کمتری شد. تخفیف حدت در اثر تغییرات ژنتیکی جمعیت ویروس ایجاد می شود (۷۲).

سویه های اصلی حدت کمتری داشتند ولی نتیجه این تحقیقات ممکن است پایدار نباشد چرا که بیماری زایی یک سویه بعد از ۱۰ پاساژ در جوجه های جوان برگشت می کند.پاساژهای اضافه به P۳۲۰ در سلول های MSB۱ به تخفیف حدت منجر می شود.

۹ سویه کلون شده ملکولی از CUX،P۳۱۰ از نظر آنتی ژنیسته و پاتوژنیسته بیشتر آنالیز شدند. بیشتر ملکول ها اگر چه به طور کامل تخفیف حدت یافتند.ولی تعدادی از جوجه هادرجات مختلف کم خونی پیشرفته از ۰-۳۳٪را نشان دادندو ۱ کلون باعث کم خونی در ۶۷٪ از پرندگان شد. در حالیکه ۸۳٪ با ویروس کم پاساژ داده شده کم خونی را نشان دادند.اماتفاوت میان کلون ها درالگوهای واکنش با آنتی بادی های منوکلونال گزارش گردیده است (۶۴).

۲-٤)میزبانهای آزمایشگاهی:

ویروس کم خونی عفونی جوجه می تواند در جوجه ۱ روزه، کشت سلولی یا در جنین جوجه (ماکیان) تکثیر و آزمایش شود.

۲-٤-۱) کشت سلولی : استفاده از کشت سلولی یک روش کامل برای جداسازی و انتشار ویروس است . تعدادی از رده های سلولی نظیر MDCC-MSB۱ و MDCC- JP۲ و رده سلول های B نظیر ۱B۱۱۰۴- LSCC ، برای تکثیر و آزمایش CIAV مناسب اند.

رده های سلول لمفوبلاستوئیدی سلول B و سلول T یه گونه ای تغییر کردند تا مقاوم به CIAV باشند. اخیرا کشت سلول های MSB۱ برای کشت آزمایشگاهی ویروس برتری دارند اگرچه بعضی از زیر رده هایی از MSB۱ حساسیت متفاوتی به عفونت دارند (۶۴).

تعدادی از گونه های CIAV نظیر ۱-CIAV به طور کلی در یک زیر رده از MSB۱ (MSB۱-L) تکثیر داده می شوند و به سختی در زیر رده های دیگری از MSB۱ (MSB۱-S) تکثیرمی شوند. در حالیکه هر دو زیر رده به عفونت به ۱-CUX حساس هستند (۶۰).

اخیرا رده سلولی (C۱۴۷) MDCC – CU۱۴۷ به نظر می رسد بهترین رده سلولی برای CIAV سویه ۱-CIA باشد.در آزمایشات مقایسه ای۳ روز بعد از عفونت سلولCU۱۴۷ با ۱-CIA، VP۳ یافت می شود.ولی در سلولهای MSB۱ تا ۵ روز بعد از عفونت مثبت نمی شوند. علاوه بر این در آن زمان درصد سلول های مثبت به طور معنی داری در سلول های MSB۱ پایین تر از سلول های CU۱۴۷ بود.

تیتراسیون ویروس نیازمند این است که سلولهای تلقیح شده هر ۲-۴ روز تجدید شوند تا بارقت نهایی ویروس تخریب شوند. متناوبا تعریف رقت نهایی با آزمایشPCR می تواند انجام شود .

۲-٤-۲) جوجه: برای جداسازی و تکثیر CIAV می توان در موارد مشکوک از نظر علائم کلینیکی، نمونه رابه جوجه یک روزه عاری از آنتی بادی های مادری تلقیح کرد.

در مواردی که جداسازی ویروس در آزمایشگاه و یا آزمایشات PCR منفی است نیز این روش به کار می رود. جوجه های مثبت بعد از ۱۲-۱۶ روز علائمی مانند کم خونی و جراحات مشخصی در بافت های لنفوئیدی و مغز استخوان را نشان می دهند (۷۲). مرگ و میر ممکن است بین ۲۸ – ۱۲ روز بعد از تلقیح رخ دهد، اما معمولا پایین باقی می ماند و به سختی به ۳۰٪ می رسد.جوجه هایی که در زمان جنینی بورس آنها برداشته شده می توانند برای افزایش حساسیت جداسازی مخصوصا نمونه هایی باتیترهای پایین بکار روند.جوجه های دارای آنتی بادی مادری ضد CIAV به عفونت CIAV مقاوم بوده و نمی توانند برای جداسازی یا تکثیر CIAV بکار برده شوند (۶۴).

۲-٤-۳) جنین جوجه ماکیان؛

تکثیر CIAV در جنین جوجه به دنبال تلقیح در کیسه زرده توسط بلو و ویت گزارش شده است. محصول ویروس به طور متوسط از تمام قسمت های جنین به جز زرده و غشا کوریوآلانتوئیک بعد از ۱۴ روز بدست می آید(۱).