Name: Forogh	Surname: Talazade
Title: Specific ELISA test design on the basis of NS1 protein of influenza type A virus to differentiate vaccinated from infected birds	
Super advisor: Dr. M. Mayahi and Dr M . R . Seyfi Abad Shapouri Advisor: Dr. M. Pourmehdi Brojeni	
University: Shahid Chamran	
Faculty: Faculty of Veterinary Medicine.	
Key words: Avian influenza virus subtype H9N2, H9N2 killed vaccine, ELISA test , NS1 protein ,DIVA strategy	

The aim of research was to design ELISA test on the basis of NS1 protein of influenza type A virus to distinguish chicken infected with influenza viruses from those immunized with inactivated vaccine. For this purpose, the ELISA test was developed using a recombinant NS1 protein isolated from a local isolate of AIV subtype H9N2 and was expressed in *E.coli* . A total of 315 day-old broiler chicks (Ross 308) were procured and fifteen chicks at 7 days of age were bled for determining specific maternal antibody against avian influenza A subtype H9N2. Remaining chicks were divided randomly into 3 equal groups. The chicks of groups 1 were vaccinated with killed AIV subtype H9N2 vaccine at 21 days of age subcutaneously of neck back. The chicks of groups 2 were infected at 21 days of age with 0.2ml of allantoic fluid infected by AIV subtype H9N2 and free from bacteria by intranasal route. The chicks of groups 3 were kept as unvaccinated and uninfected control group. All chicks of 3 groups were bled by wing vein at 42 days of age and collected sera were used in designed ELISA test. The results of present study showed specific antibody against AIV subtype H9N2 only detected in the sera of chicks experimentally infected with AIV subtype H9N2. Also designed ELISA test for detection of antibody against influenza NS1 could distinguish chicks experimentally infected with AIV subtype H9N2 from chicks immunized with killed influenza vaccine with 100 % specificity and 93.3% sensitivity .

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و هدف

مقدمه و هدف.....۲

فصل دوم: مروری بر منابع موجود

الف - کلیاتی درباره بیماری آنفلوانزا.....٦

الف - ۱ - تعریف بیماری ٦

الف-۲ - تاریخچه‌ی بیماری آنفلوانزا.....٦

الف -۳ - تحت‌تیپ H_9N_2 .....۷

الف -٤ – سبب‌شناسی ۹

الف -٤ -۱- طبقه‌بندی ویروس.....۹

الف - ٤ -۲- خصوصیات ریخت‌شناسی ویروس.....۱۰

الف -٤ -۳ - پروتئین NS1.....۱۱

الف-٤-٤- ترکیبات شیمیایی ۱٤

الف -٤-۵ - مقاومت به عوامل فیزیکی و شیمیایی.....۱٤

الف-۵- نشانه‌های بیماری ۱۵
الف-۵-۱- ویروس‌های آنفلوانزا با بیماری‌زایی کم (LPAI) ۱۵
الف-۵-۲- ویروس‌های آنفلوانزا با بیماری‌زایی زیاد (HPAI) ۱۶
الف-۶- جراحات کالبدگشایی ۱۷
الف-۶-۱- ویروس‌های آنفلوانزا با بیماری‌زایی کم (LPAI) ۱۷
الف-۶-۲- ویروس‌های آنفلوانزا با بیماری‌زایی زیاد (HPAI) ۱۸
الف-۷- یافته‌های هیستوپاتولوژی ۱۹
الف - ۸ - نام‌گذاری سویه‌های ویروس آنفلوانزا ۲۱
الف - ۹ - بیماری‌زایی ویروس آنفلوانزا ۲۱
الف - ۹-۱- عوامل وابسته به ویروس ۲۳
الف - ۹-۲- عوامل وابسته به میزبان ۲۵
الف - ۱۰- خصوصیات پادگنی ویروس ۲۵
الف -۱۰-۱- پادگن‌های داخلی ۲۵
الف -۱۰-۲- پادگن‌های خارجی یا سطحی ۲۵
الف -۱۰-۳- تغییرات پادگنی ۲۶
الف -۱۰-۳-۱- تغییرات جزئی پادگنی ۲۶
الف -۱۰-۳-۲- تغییرات اساسی پادگنی ۲۷
الف -۱۱- انتقال بیماری ۲۸

الف -۱۱-۱- خطر انتقال آنفلوانزای پرندگان به انسان..... ۲۹

الف-۱۱-۲- دوره کمون..... ۳۳

الف-۱۲- ایمنی‌زایی..... ۳۳

الف -۱۲-۱- ایمنی در برابر ویروس آنفلوانزا..... ۳٤

الف -۱۲-۱-۱- ایمنی فعال ۳٤

الف -۱۲-۱-۲- ایمنی غیرفعال ۳٦

الف -۱۳ - تشخیص..... ۳٦

الف -۱۳-۱ - جداسازی ویروس..... ۳٦

الف -۱۳- ۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳۷

الف -۱۳—۳ – آزمایش‌های شناسایی تیپ ۳۸

الف -۱۳—۳ – ۱- آزمایش ایمونودیفوزیون در ژل آگار..... ۳۸

الف -۱۳—۳ – ۲- آزمایش الیزا..... ۳۸

الف -۱۳—۳ – ۳- آزمایش پادتن درخشان مستقیم و غیرمستقیم..... ۳۹

الف -۱۳—٤ – آزمایش‌های شناسایی تحت‌تیپ ۳۹

الف -۱۳—٤ -۱- آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون(HI) ۳۹

الف -۱۳—٤ -۲- آزمایش ممانعت از نورآمینداز(NI) ٤۰

الف -۱٤ - تشخیص تفریقی ٤۰

الف - ۱۵- درمان..... ٤۰

الف – ۱۶– پیشگیری و کنترل ۴۲
الف – ۱۶–۱– رعایت ایمنی زیستی..... ۴۲
الف – ۱۶–۲– واکسیناسیون..... ۴۲
الف – ۱۷– کنترل..... ۴۸
ب– سیستم DIVA درمورد آنفلوانزای پرندگان..... ۴۸
ب –۱– استراتژی‌های مختلف سیستم DIVA ۵۲
ب– ۱ – ۱– پرندگان نگهبان..... ۵۲
ب– ۱ – ۲– واکسن‌های تحت‌واحد ۵۳
ب– ۱ – ۳ – استراتژی نورآمینیداز هترولوگ..... ۵۴
ب– ۱ – ۴ – استراتژی DIVA براساس پروتئین NS1 ..... ۵۷

فصل سوم: مواد و روش کار

الف– مواد و وسایل ۶۰
الف–۱– مواد مصرفی..... ۶۰
الف –۲– وسایل مورد نیاز ۶۱
الف–۳– واکسن‌های مورد استفاده..... ۶۳
الف –۴– کیت‌های مورد استفاده..... ۶۳
الف –۵– سویه‌ی باکتریایی ۶۳

الف-٦ – آنتی‌بیوتیک‌ها..... ٦٣

ب- طرز تهیه بافرها و محلول‌های مورد استفاده و مواد تشکیل‌دهنده‌ی آن‌ها ٦٤

ب-١- محیط LB ٦٤

ب-٢- محلول استوک ٠/١ مولار IPTG ٦٤

ب-٣- محلول‌های لازم برای SDS-PAGE ٦٤

ب-٣-١- آکریل آمید ٣٠ درصد..... ٦٤

ب-٣-٢- محلول‌های تریس..... ٦٥

ب-٣-٣- محلول ١٠ درصد SDS ٦٥

ب-٣-٤- بافر حرکت‌دهنده ٦٥

ب-٣-٥- بافر نمونه..... ..... ٦٥

ب-٣-٦- محلول رنگ کوماسی..... ٦٦

ب-٣-٧- محلول رنگ‌بر..... ٦٦

ب-٣-٨- تهیه ژل جداکننده SDS-PAGE ٦٦

ب-٣-٩- تهیه ژل متراکم کننده SDS-PAGE ٦٧

ب-٤- طرز تهیه بافرستون..... ٦٧

ب-٥- بافر ستون رزین آمیلوز ٦٧

ب-٦- طرز تهیه استوک گلوکز ١٠ درصد..... ٦٨

ب-٧- بافر انتقال برای وسترن بلاتینگ..... ٦٨

ب- ۸- طرز تهیه PBS (1x) ٦٨
ب-۹- طرز تهیه PBS-T ٦٨
ب-۱۰- طرز تهیه(PBS-T – skim milk (%5 ..... ٦٨
ب-۱۱- طرز تهیه Coating Buffer ٦٩
ب-۱۲- طرز تهیه بافر استات سدیم ٦٩
ب-۱۳- طرز تهیه استوک آب اکسیژنه ۳٪ ٦٩
ب-١٤- طرز تهیه استوک TMB (۱ درصد) ٦٩
ب-۱۵- طرز تهیه کروموژن – سوبسترا برای الیزا ٦٩
ج - پرورش طیور به منظور تهیه آنتی‌سرم ۷۰
ج -۱- آماده‌سازی محل نگهداری جوجه‌ها ۷۰
ج-۲- طرح آزمایش ۷۰
د- تکثیر ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت‌تیپ H9N2 ..... ۷۲
هـ - اندازه‌گیری عیار پادتن به روش ممانعت از هماگلوتیناسیون(HI) ۷۳
هـ -۱- تهیه سوسپانسیون ۰/۵ درصد گلبول قرمز ماکیان ۷۳
هـ -۲- آزمایش هماگلوتیناسیون (HA) ۷۳
هـ -۳- آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون(HI) ٧٤
و - بیان پروتئین NS1 ویروس آنفلوانزا تحت‌تیپ H9N2 در *E. coli* ۷۵
و- ۱- القا بیان پروتئین با IPTG ٧٦

و -۲- SDS-PAGE ۷۷
و -۲-۱- آماده‌سازی قالب..... ۷۷
و -۲-۲- تهیه ژل پلی آکریل‌آمید ۷۸
و -۲-۳- آماده‌سازی نمونه‌ها و مارکر وزن مولکولی..... ۷۹
و -۲-٤ – آماده‌سازی تانک الکتروفورز و بارگذاری نمونه‌ها..... ۸۰
و -۲-۵- رنگ‌آمیزی پروتئین‌های الکتروفورز شده با آبی کوماسی..... ۸۱
و -۳- وسترن بلاتینگ ۸۱
و -٤- خالص‌سازی پروتئین..... ۸۳
و -۵- آزمایش الیزا با کیت تجاری..... ۸۵
و-٦- طراحی آزمایش الیزا با استفاده از پروتئین فیوژن MBP-NS1 ..... ۸۵
و-٦-۱- به دست آوردن رقت‌های مناسب آنتی‌ژن ، سرم و کونژوگه در آزمایش الیزا..... ۸٦
و-٦-۲- روش آزمایش الیزای استاندارد شده برای نمونه‌های مورد بررسی..... ۸۷
و-٦-۳- روش تعیین نقطه برش..... ۸۸
ز- آنالیز آماری ۸۹

فصل چهارم: نتایج

الف – بررسی بیان پروتئین NS1 ..... ۹۲
الف –۱- القاء بیان پروتئین با IPTG و انجام آزمایش SDS-PAGE ۹۲
الف –۲- وسترن بلات ۹٤

الف-۳- خالص سازی پروتئین NS1 نوترکیب با ستون کروماتوگرافی..... ۹۶

ب- آزمایش HI و نتایج حاصل از آن.....۹۷

ج - استاندارد نمودن الیزا با پروتئین NS1 نوترکیب ۹۸

د – مقایسه نتایج سرم‌ها درالیزای تجاری، rNS1-ELISA و روش HI در ٤٢ روزگی.....۹۹

هـ - تجزیه وتحلیل آماری دادهای حاصل از rNS1-ELISA و کیت IDEXX.....۱۰۱

هـ -۱- تجزیه وتحلیل نتایج کیفی ۱۰۱

هـ -۲- تجزیه وتحلیل نتایج کمی ۱۰٤

فصل پنجم : بحث و نتیجه‌گیری

بحث و نتیجه‌گیری.....۱۰۹

پیشنهادات.....۱۱۹

منابع.....۱۲۱

فهرست تصاویر

تصویر ۳-۱ : نقشه وکتورpMal-c2X و خصوصیات آن.....۷٦

تصویر٤-۱: القاء بیان پروتئین NS1 نوترکیب به صورت متصل به پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP)، با وزن ملکولی حدود ٦٦٧٤ کیلودالتون ۹۳

تصویر٤-۲: واکنش وسترن بلات پروتئینNS1 نوترکیب با سرم مثبت دارای پادتن ضد

آنفلوانزا..... ۹۵

تصویر٤-۳: نتایج SDS-PAGE پس از انجام کروماتوگرافی برای تایید خالص‌سازی پروتئین NS1 نوترکیب با وزن ملکولی حدود ٦٦٧٤ کیلودالتون ۹۷

فهرست جداول

جدول ۳-۱: مواد ومقادیر لازم برای تهیه ژل جداکننده..... ٦٦

جدول ۳-۲: مواد و مقادیر لازم برای تهیه ژل متراکم‌کننده..... ٦٧

جدول۳-۳: وزن مولکولی پروتئین‌های موجود در مارکر وزنی مولکولی به همراه الگوی الکتروفورتیک آن‌ها بر روی ژل پلی آکریل‌آمید ۱۲ درصد..... ۷۹

جدول٤-۱: مقادیر میانگین، انحراف معیار و فاصله‌ی اطمینان ۹۵٪ برای میانگین و فراوانی موارد مثبت به تفکیک نوع آزمایش در ٤۲ روزگی ۱۰۰

جدول٤-۲: نتایج حاصل از آزمایش سرم‌های شاهد وچالش یافته با روش rNS1-ELISA..... ۱۰۲

جدول٤-۳: نتایج حاصل از آزمایش سرم‌های شاهد و چالش یافته با کیت تجاریIDEXX ۱۰۲

جدول٤-٤: توزیع فراوانی موارد مثبت و منفی آنفلوانزا در سرم های شاهد و چالش یافته به تفکیک rNS1-ELISA و IDEXX..... ۱۰۲

جدول٤-۵: نتایج حاصل از آزمایش سرم‌های واکیسنه و شاهد با rNS1-ELISA ۱۰۳

جدول٤-٦: نتایج حاصل از آزمایش سرم‌های واکیسنه و شاهد با کیت IDEXX ۱۰۳

جدول٤-۷: توزیع فراوانی موارد مثبت و منفی آنفلوانزا در سرم های واکیسنه و شاهد به تفکیک

rNS1-ELISA و IDEXX..... ۱۰٤

جدول٤-۸: مقادیرمیانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات دانسیته نوری به تفکیک نوع آزمایش و سرم ۱۰۵

فهرست نمودارها

نمودار ٤-۱: مقادیر میانگین و خطای معیار تیتر HI به تفکیک روز و گروه..... ۹۸

نمودار٤-۲: توزیع دانسیته نوری سرم پرندگان سالم(شاهد منفی)درrNS1-ELISA..... ۹۹

نمودار ٤-۳: توزیع مقادیر دانسیته نوری سرمهای چالش یافته و واکسینه در rNS1-ELISA..... ۱۰٦

نمودار ٤-٤: توزیع مقادیر دانسیته نوری سرم های منفی و مثبت در کیت تجاری(IDEXX)..... ۱۰٦

نمودار ٤-۵ : مقادیر میانگین و خطای معیار دانسیته نوری به تفکیک نوع آزمایش..... ۱۰۷

مقدمه و هدف

یکی از ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان که‌در میان ماکیان پراکندگی جهانی‌دارد و در مواردی به انسان نیز قابل انتقال‌است تحت‌تیپ H9N2 می‌باشد. از اواخر دهه‌ی ۱۹۹۰ میلادی این تحت‌تیپ در میان ماکیان اهلی در کشورهای آسیایی و خاورمیانه انتشار بسیار وسیع‌یافته است. براساس مطالعات تجربی و استاندارد، این ویروس در گروه ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان با بیماری زایی کم[1] قرار دارد، اما توانایی آن در ایجاد بیماری تنفسی شدید همراه با واگیری و تلفات بالا نیز کاهش تولید تخم‌مرغ گزارش شده است. برای جلوگیری از شیوع بیماری آنفلوانزای پرندگان‌تحت‌تیپ H9N2 در گله‌های طیور از واکسیناسیون استفاده می شود. واکسن‌های آنفلوانزا بر حسب سویه‌ی ویروس و درگیری هر منطقه یا کشور با آن سویه ساخته شده و به صورت کشته و غیرفعال شده مصرف می‌گردند. این واکسن‌ها سبب افزایش مقاومت پرنده در رویارویی با سویه ی مزرعه می‌گردند، همچنین میزان دفع ویروس را کاهش داده متع اقبا باعث کاهش انتشار بیماری می شوند اما ممکن است باعث پیش‌گیری از عفونت نشوند (۳۱ و ۵۷).

واکسن‌های تجاری آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 از امولسیون خالص نشده ی مایع آلانتوئیک در یک ادجوانت روغنی تهیه می‌شوند. علی‌رغم سودمند بودن واکسن های کشته ی آنفلوانزای پرندگان در جلوگیری از بروز نشانه‌های بالینی و تلفات، واکسیناسیون به دلایل زیر به طور معمول به‌عنوان بخشی از برنامه‌های کنترل ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان با بیماری‌زائی کم و ویروس‌ه ای آنفلوانزای پرندگان با بیماری‌زائی زیاد[2] محسوب نمی‌شود(۹۹) :

1- Low Pathogenic Avian Influenza (LPAI)
2- Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI)

۱ - نگرانی مربوط به تحریم تجارت طیور و محصولات آنها

۲ - قرنطینه و ریشه‌کنی گله‌های آلوده (۹۹).

۳ - بیشتر واکسن‌های متداول آنفلوانزای پرندگان شامل ویروس کامل کشته شده همراه با اجوانت می‌باشند که می توانند با بررسی های سرولوژیکی متداول تداخل کنند زیرا این واکسن ها پادتن هایی را القاء می‌نمایند که با آزمایش‌هائی نظیر آزمایش رسوب در ژل آگار، آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون و آزمایش الیزای تجاری از پادتن‌های القاء شده توسط عفونت طبیعی با ویروس زنده قابل تمایز نیستند(۸٦).

بنابراین برنامه‌های واکسیناسیون برای کنترل آنفلوانزای طیور در مرغ داری‌ها به علت مشکل تمایز پرندگان واکسینه از پرندگان آلوده به ویروس با محدودیت‌هایی مواجه است. به همین دلیل تلاش‌هایی به منظور گسترش ابزارهای سرولوژیکی جدید جهت تشخیص پرندگان واکسینه از پرندگان آلوده[1] صورت گرفته است تا تفکیک پرندگان واکسینه از پرندگان آلوده شده به‌طور طبیعی امکان‌پذیر گردد. یکی از راهکارهای سیستم DIVA که در این تحقیق استفاده گردید ردیابی پادتن‌های ضد پروتئین غیرساختمانی[2](NS1) می‌باشد. پروتئینNS1 آنفلوانزای تیپ A یک پروتئین غیرساختمانی است که در سلول های آلوده به ویروس تولید می شود. بنابراین پرندگان فقط در شرایط عفونت طبیعی، پادتن ضدNS1 تولید می کنند(۹۹). واکسن‌های کشته به علت فرآیند غیرفعال شدن، فاقد پروتئینNS1 می‌باشند و در نتیجه پادتن بر ضد این پروتئین در سرم گله‌های واکسینه شده یافت نمی‌شود و یا به میزان بسیار کم تولید می‌شود. بنابراین استفاده از یک

1- Differentiating Infected from Vaccinated Animals (DIVA)
2- Non Structural 1 (NS1)

آزمایش الیزا برای ردیابی پادتن‌های ضد پروتئینNS1 که می‌تواند ارزش تشخیصی برای صنعت طیور داشته باشد بسیار سودمند خواهد بود(۹۹).

هدف اصلی این مطالعه طراحی الیزای اختصاصی بر اساس پروتئینNS1 ویروس آنفلوانزای تیپ A وردیابی پادتن تولید شده علیه این پروتئین در سرم پرندگان عفونی شده با ویروس زنده می‌باشد و به این ترتیب می‌توان پرندگان عفونی شده با ویروس زنده AI را از پرندگان واکسینه شده با واکسن آنفلوانزای پرندگان متمایز نمود. با توجه به این‌که در ایران تاکنون راهکاری برای تفریق پرندگان واکسینه از پرندگان آلوده‌ی طبیعی مورد استفاده قرار نگرفته است با طراحی این آزمایش، می‌توان امید آن را داشت که در صورت شیوع آنفلوانزای فوق‌حاد در ایران بتوان پرندگان آلوده را از پرندگان واکسینه تفریق نمود. زیرا در شرایط کنونی کشتار تمام پرندگانی که در آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون مثبت هستند خسارات زیادی به صنعت طیور وارد می‌سازد. از طرفی با استفاده از این راهکار می‌توان از واکسن کشته‌ی آنفلوانزا به‌عنوان بخشی از برنامه‌های کنترل و ریشه‌کنی بیماری آنفلوانزای پرندگان در کشورمان استفاده نمود.

الف - کلیاتی درباره بیماری آنفلوانزا

الف – ۱ - تعریف بیماری

بیماری آنفلوانزای طیور یک بیماری ویروسی است که به وسیله‌ی ویروس آنفلوانزای تیپA ایجاد می‌شود. این تیپ علاوه بر طیور، در انسان و دیگر پستانداران نیز ایجاد بیماری می‌کند. این ویروس‌ها دستگاه تنفس و گوارش بسیاری از گونه‌های پرندگان را درگیر می‌کنند، ولی بیماریزایی آن‌ها در گونه های مختلف پرندگان متفاوت می باشد. گونه‌های پرندگان وحشی معمولاً بیماری بالینی را نشان نمی دهند، در حالی که برخی از این ویروس ها در جوجه ها، بوقلمون ها و مرغ شاخدار سبب بیماری شدید و حتی مرگ و میر می‌شوند(۵۱).

الف – ۲ – تاریخچه‌ی بیماری آنفلوانزا

کلمه‌ی influentia در زبان لاتین به معنی همه گیر است. اولین بار در سال ۱۸۷۸ بیماری آنفلوانزای طیور تحت عنوان طاعون مرغی[1] توسط پرونسیتو[2] توصیف گردید(۷۶). در سال ۱۹۷۲ طی برنامه پایش[3] بیماری نیوکاسل از اردک‌های مهاجر، ویروس‌های آنفلوانزا به وفور جدا گردید (۸۱). از آن زمان مشخص شده است که پرندگان وحشی ظاهرا سالم مخزن اصلی ویروس آنفلوانزا در طبیعت اند(۸۳). در اولین سمپوزیوم بین المللی آنفلوانزای پرندگان در سال ۱۹۸۱ اصطلاح Highly Pathogenic Avian influenza (HPAI) برای شکل بسیار حاد بیماری آنفلوانزا و Low Pathogenic Avian influenza (LPAI) برای شکل کم حدت بیماری وضع شد(۸۹).

1-Fowl plaque
2- Perron cito
3- surveillance

الف -۳ – تحت‌تیپ H_9N_2

بیماری آنفلوانزا چه به شکل بسیار حاد چه به شکل کم حدت در کشورهای دارای صنعت طیور توسعه یافته به شکل آندمیک حضور ندارد . تحت‌تیپ H9 ویروس آنفلوانزا باعث ایجاد بیماری خفیف تنفسی می گردد(۱۵). ویروس‌های H9N2 در مطالعات آزمایشگاهی در ماکیان بدون حضور پاتوژن‌های ثانویه تلفات ایجاد نمی‌کنند(۲٤ و ٥٦). اما در حضور عفونت‌های ثانویه باعث تلفات بالا در مزارع پرورش‌طیور و در شرایط آزمایشگاه می‌گردند (۲۸، ۷۱ و ۷۲) .

البته استثناهایی هم وجود دارد مثلاً ویروس آنفلوانزا (H9N2) Ck/Bj/1/94 که جزء اولین جدایه‌های کشور چین محسوب می گردد، باعث تلفات تا ٤۰٪ در مزارع پرورش طیور و در شرایط آزمایشگاهی می‌شود(٤٥). تحت‌تیپ H9N2 اولین بار از بوقلمون در سال ۱۹٦٦ جدا شد که باعث بیماری خفیف تنفسی شده بود (٤۸). در گونه های پرندگان اهلی در آمریکای شمالی، ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 عمدتاً از بوقلمون و در درجه‌ی بعدی از بلدرچین و به ندرت از ماکیان جدا شده است(٤۳). ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 در طول ۱۵ سال گذشته از کشورهای آسیایی به عنوان رایج‌ترین تحت تیپ جدا شده اند(٥۹، ٦۹و ۹٤). به نظر می رسد ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 در آسیا به صورت آنزوتیک درآمده باشند(۱۸، ٤٦، ۷٦ و ٦۹).

اولین گزارش‌های جداسازی تحت تیپ H9N2 از ماکیان در آسیا مربوط به منطقه گو انگ دونگ[1] چین در سال ۱۹۹٤ و ۱۹۹۲ است(۳۳).

شیوع ویروس‌های H9N2 در طی سال‌های ۱۹۹۹– ۱۹۹٤ از کشورهای اروپایی شامل ایتالیا و سال‌های ۱۹۹٤ و ۱۹۹٦ در ماکیان(٤۰ و ۷٤)، ایرلند در سال ۱۹۹۷ در قرقاول(۳۰)، انگلستان و

1- Guangdong

مجارستان، کشورهای خاورمیانه شامل ایران، پاکستان، عربستان سعودی و امارات متحده عربی، کشورهای آسیای جنوب شرقی شامل کره در سال ۱۹۹٦ در ماکیان(٦٨)، چین (تحت‌تیپ‌های H9N2 و H9N3) در سال ۱۹۹٤(١٦)، آفریقای جنوبی در سال ۱۹۹۵ در شترمرغ آفریقایی(١٦) و ایالات متحده در سال‌های ۱۹۹۵ و ۱۹۹٦ در بوقلمون(٤٥) گزارش شده است(١٦ و ١٨). به نظر می‌رسد که تحت‌تیپ H9N2 در کشورهای خاورمیانه آندمیک شده باشد .

در کشور ما گزارش‌هایی از وقوع یک بیماری با واگیری و تلفات بالا در مزارع پرورش طیور در سال ۱۳۳۳ وجود دارد که بعنوان «طاعون مرغی» تشخیص داده شد. البته در آن زمان امکانات آزمایشگاهی کافی برای تشخیص قطعی و جداسازی عاملی بیماری وجود نداشت (شیمی، احمد مشاهدات شخصی). در سال ۱۳۷۷ بیماری آنفلوانزا ناشی از تحت تیپ H9N2 با تلفات بالا و کاهش متوسط تا شدید تولید تخم در مزارع پرورش طیور بروز کرد(۷۱ ، ۷۲ و ۱۰۰).

متأسفانه بیماری به سرعت به سایر نقاط کشور گسترش یافت، بدون این‌که هیچ برنامه‌ای برای ریشه‌کنی یا کنترل و محدود کردن آن اجرا شود . از آن زمان تا کنون بیماری به شکل آندمیک حضور داشته و خسارات فراوانی را به صنعت طیور کشور وارد ساخته است که شاید چندین برابر هزینه‌ی اجرای برنامه‌ی ریشه‌کنی در ابتدای بروز بیماری باشد . خسارات ناشی از بیماری آنفلوانزا به صنعت پرورش طیور بسیار بیشتر از آنچه به نظر می‌رسد می‌باشد. این خسارات شامل کاهش رشد و وزن‌گیری در گله‌های گوشتی و کاهش تولید تخم و جوجه درآوری در گله‌های تخم‌گذار و مادر، افزایش تلفات، حذف لاشه‌ها در کشتارگاه، درمان عفونت‌های ثانویه، ضدعفونی و تمیز کردن مرغداری‌ها و ... می باشد.

ضمن آن‌که خسارات قابل توجهی به دلیل افزایش قیمت پایه‌ی تولید گوشت، تخم مرغ و سایر محصولات طیور به مصرف کنندگان وارد می‌شود. به همین دلیل است که در کشورهای توسعه یافته با اجرای برنامه های ریشه‌کنی، اجازه آندمیک شدن بیماری آنفلوانزای طیور چه به شکل بسیار حاد و چه به شکل کم حدت را نمی‌دهند.

الف – ٤ – سبب‌شناسی

الف – ٤ – ١– طبقه‌بندی ویروس

ویروس آنفلوانزای پرندگان، در خانواده‌ی ارتومیکسوویریده و جنس آنفلوانزا ویروس A قرار دارد(١٩). ویروس‌های آنفلوانزا بر اساس خصوصیات پادگنی نوکلئوپروتئین (NP)[1] و پروتئین ماتریکس(MP) به تیپ‌های A، B و C تقسیم شده‌اند. ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A در پرندگان، خوک، سگ، ببر، پلنگ، اسب و انسان بیماری‌زا می‌باشند. این ویروس‌ها گاهی در سایر پستانداران نظیر راسو[2]، خوک دریایی[3] و نهنگ یافت می‌شوند. ویروس‌های تیپ B و C از انسان و به ندرت از خوک و خوک دریایی جدا شده اند. همه‌ی ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان به عنوان تیپ A دسته‌بندی شده اند. ویروس‌های تیپ A براساس ویژگی‌های دو نوع پادگن سطحی، شامل مولکول هماگلوتینین[4] (HA) و نورآمینیداز[5] (NA) به تحت‌تیپ‌های متفاوتی تقسیم می‌شوند. براساس اطلاعات فعلی، ویروس‌های آنفلوانزای A براساس آنتی‌ژن H به ١٦ تحت‌تیپ تقسیم شده‌اند. علاوه بر آنتی‌ژن H، هر ویروس آنفلوانزا دارای یکی از ٩ آنتی‌ژن N نیز می‌باشد(١٠، ٣٨، ٩٢ و ١٠٥).

1- Nucleo protein (NP)
2- Mink
3- Seal
4- Hemagglutinin (HA)
5- Neuraminidase (NA)

الف – ٤ – ٢– خصوصیات ریخت‌شناسی ویروس

ویروس‌های آنفلوانزا دارای پوشش، و ژنومی از نوع RNAی تک‌رشته‌ای منفی می‌باشند. ژنوم این ویروس‌ها قطعه قطعه است و از ۸ ژن (NS، MA، NA، NP، HA، PA، PB1، PB2) تشکیل می‌شود. از نظر شکل شناسی، ذرات ویروس ممکن ا ست چندشکلی باشند اما، معمولاً گرد و اندازه‌ی آن‌ها ۱۸۰– ۱۲۰ نانومتر است. این ویروس‌ها گاهی به شکل رشته ای نیز دیده می‌شوند. غشای ویروس در برگیرنده‌ی هماگلوتینین (HA) به صورت ترایمر و پروتئین‌های نورآمینیداز و M_2 به صورت تترامر، می باشد. پروتئین ماتریکس(M_1) دقیقاً در زیر غشا قرار دارد و هسته ی ویروس شامل کمپلکسRNP (ریبو نوکلئو پروتئین) می‌باشد که خود دربرگیرنده‌ی قطعاتRNA ویروسی، پروتئین های پلیمراز (PA[1]، PB1[2]، PB2[3]) و نوکلئو پروتئین(NP) است. پروتئین غیرساختمانی NS2 (NEP) نیز در ویروس خالص شده حضور دارد(۵۷). برجستگی‌های میله‌ای شکل بر سطح ویروس شامل NA وHA با طول حدودا ۱۰ تا ١٤ نانومتر و نسبت تقریبیHA به NA به ترتیب ٤ به ۱ می‌باشند(۵۷).

هر کدام از هشت قطعه ی ژنوم ویروس شامل نواحی غیر کد کننده در انتهاها می باشند. هر قطعه‌ی ژنومی یک یا چند پروتئین ویروسی را کد می‌کند. سه قطعه‌ی بزرگتر ژنوم پروتئین‌های پلیمراز را بیان می کنند، قطعه‌ی چهارم HA، قطعات پنجم و ششم پروتئین های NA وNP ، قطعه‌ی هفتم پروتئین‌های M_2 وM_1 و قطعه‌ی هشتم پروتئین‌های NS_1 و NS_2 را بیان می‌کند.

1- Polymerase acid
2- Polymerase basic 1
3- Polymerase basic 2

پروتئین ماتریکس (M1) و پروتئین‌های NS2 و NP ، بخشی از ذرات ویروس کامل هستند، در حالی که پروتئینNS1 که به میزان بسیار زیادی در سلول های آلوده ساخته می‌شود در ذرات ویروس وارد نمی‌شود(۵۷).

الف -٤ -۳ - پروتئین NS1

پروتئین‌های PB1، PB2، PA، HA، NA و NS1 در پاتوژنیسیته‌ی ویروس آنفلوانزا دخالت دارند. پروتئین NS1 توسط کوچک‌ترین قطعه‌ی ژنی ویروس آنفلوانزا(قطعه‌ی ۸) کد می‌شود و به دلیل توانائیش در توقف مسیر اینترفرون سلولی بعنوان یک عامل حدت محسوب می‌شود(۲۲، ۲۷، ۹۹ و ۱۰۱) .

NS1 یک پروتئین غیرساختمانی است که توسط همه ی ویروس‌های آنفلوانزا بیان می شود. قطعه‌ی ژنی که NS1 را کد می کند کوچک ترین قطعه‌ی ژنی می‌باشد که دارای ۸۹۰ نوکلئوتید بوده و دو پروتئین NS1 و NEP[1] را کد می‌کند. پروتئینNEP بعنوان یک پروتئین غیرساختمانی تلقی می‌شد که قبلا تحت عنوان NS2 شناخته می شد اما اخیرا مشخص شده است که این پروتئین همراه با ریبونوکلئوپروتئین به مقدار کمی در ویریون ظاهر می‌شود.

در بیشتر ویروس‌ها، پروتئین NS1 شامل ۲۳۰ اسیدآمینه است و پروتئینNEP شامل ۱۲۱ اسید آمینه می‌باشد. پروتئین NS1 در پیشگیری از القاء اینترفرون یک نقش محوری ایفا می‌کند تا بدین وسیله به ویروس اجازه دهد که به میزان کافی تکثیر نماید. زمانی که‌ویروس یک سلول را آلوده می‌کند، باید با پاسخ ایمنی داخلی و سریع میزبان مقابله نماید. این پاسخ شامل ایجاد یک پایگاه ضد ویروس در داخل سلول و جلوگیری از تکثیر ویروس می‌باشد(۲۲، ۲۷، ۹۹ و ۱۰۱).

1- Nuclear Export Protein