بسمه تعالی

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

پایان‌نامه دکتری عمومی دامپزشکی

**۸۹۵۸۷۰۱**

**عنوان**

# مطالعه‌ی سرولوژی متاپنوموویروس در جوجه‌های گوشتی به وسیله‌ی آزمایش الیزا


**نگارش**

## سید جمال غلامی سیدکلائی

**جناب آقای دکتر منصور میاحی** — **استاد راهنما**

(استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

**جناب آقای دکتر مسعودرضا صیفی‌آباد شاپوری** — **استاد مشاور**

(استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

**جناب آقای دکتر مسعود قربانپور** — **داور**

(استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

**جناب آقای دکتر رمضانعلی جعفری** — **داور**

(دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

**جناب آقای دکتر محمدرحیم حاجی حاجیکلایی** — **ناظر تحصیلات تکمیلی**

(استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)


**آبان ماه ۱۳۸۹**

# چکیده پایان نامه


| |
|---|
| **نام خانوادگی:** غلامی سیدکلائی **نام:** سید جمال |
| **عنوان پایان نامه:** مطالعه‌ی سرولوژی متاپنومو‌ویروس پرندگان در جوجه‌های گوشتی به وسیله ی آزمایش الیزا |
| **استاد راهنما:** دکتر منصور میاحی |
| **درجه تحصیلی:** دکتری عمومی **رشته:** دامپزشکی **گرایش:** دامپزشکی |
| **دانشگاه:** شهید چمران اهواز |
| **دانشکده:** دامپزشکی |
| **تاریخ فارغ التحصیلی:** آبان ۱۳۸۹ **تعداد صفحه:** ۹۶ |
| **کلید واژه‌ها:** عفونت متاپنومو‌ویروس پرندگان، جوجه‌های گوشتی، آزمایش الیزا. |
| عفونت‌های متاپنومو‌ویروس پرندگان موجب به هم خوردن آرامش پرندگان و خسارت اقتصادی شدید به خصوص در گله های بوقلمون تجاری می شود. بوقلمون‌ها و ماکیان در هر سنی به عنوان میزبان طبیعی ویروس متا پنومو‌ویروس پرندگان شناخته شد ه‌اند. بررسی حاضر به منظور مطالعه‌ی سرولوژیک عفونت متاپنومو‌ویروس پرندگان در جوجه‌های گوشتی کشتار شده در کشتارگاه اهواز انجام گرفت. بدین منظور ۱۸۴ نمونه سرم خون از ۱۸ گله‌ی جوجه‌ی گوشتی کشتار شده در کشتارگاه اهواز جمع‌آوری شد. پادتن ویژه عفونت متاپنومو‌ویروس پرندگان به روش الیزا و با استفاده از کیت شرکت ایدکس اندازه‌گیری شد. این مطالعه نشان داد ۱۰ گله (۵۵/۵۵٪) به عفونت متاپنومو‌ویروس پرندگان آلوده بودند. پادتن ویژه عفونت متاپنومو‌ویروس پرندگان به میزان متفاوتی در ۱۰۴ نمونه سرم خون از بین ۱۸۴ نمونه سرم خون جمع آوری شده وجود داشت . این بر رسی نشان داد . علیرغم عدم واکسیناسیون ضد متاپنومو‌ویروس در جوجه‌های گوشتی، ویروس متاپنومو‌ویروس بین گله‌های گوشتی حضور دارد و می‌تواند عملکرد گله‌های گوشتی را تحت تأثیر قرر دهد. |

# فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**


## فصل اول: مقدمه و هدف

مقدمه و هدف ..... ۲

## فصل دوم: مروری بر منابع

**الف- مروری بر متاپنوموویروس پرندگان** ..... ۳

الف-۱- تعریف و مترادف‌ها ..... ۳

الف-۲- اهمیت اقتصادی ..... ۴

الف-۳- اهمیت سلامت عمومی ..... ۴

الف-۴- تاریخچه ..... ۵

الف-۵- سبب شناسی ..... ۶

الف-۵-۱- طبقه بندی ..... ۶

الف-۵-۲- مرفولوژی (ریخت شناسی) ..... ۷

الف-۵-۳- ترکیب شیمیایی ..... ۷

الف-۵-۴- تکثیر ویروس ..... ۸

الف-۵-۵- حساسیت به عوامل شیمیایی و فیزیکی ..... ۹

الف-۵-۶- طبقه بندی سویه ..... ۱۰

الف-۵-۷- سیستم‌های میزبان آزمایشگاهی ..... ۱۱

الف-۵-۸- بیماری‌زایی ..... ۱۲

الف-۵-۹- سایر عوامل ..... ۱۴

الف-۶- پاتوبیولوژی و اپیدمیولوژی ..... ۱۵

الف-۶-۱- انتشار و پخش ..... ۱۵

الف-۶-۱-۱- توزیع جغرافیایی ..... ۱۶

الف-۶-۲- میزبان‌های طبیعی و تجربی ..... ۱۶

الف-۶-۲-۱- همه‌گیری‌های پنوموویروس پرندگان در بوقلمون‌ها ..... ۱۸

الف-۶-۲-۲- عفونت پنوموویروس پرندگان در سایر پرندگان ..... ۱۹

الف-۶-۳- انتقال ..... ۲۰
الف-۶-۴- علائم بالینی، شیوع و تلفات ..... ۲۲
الف-۶-۴-۱- در بوقلمون‌ها ..... ۲۲
الف-۶-۴-۲-در ماکیان ..... ۲۳
الف-۶-۴-۳- سندرم تورم سر ..... ۲۵
الف-۶-۵- آسیب شناسی ..... ۲۶
الف-۶-۵-۱- جراحات ماکروسکوپی ..... ۲۶
الف-۶-۵-۲- جراحات میکروسکوپی ..... ۲۷
الف-۶-۶- ایمنی ..... ۲۸
الف-۶-۶-۱- ایمنی فعال ..... ۲۸
الف-۶-۶-۱-۱- ایمنی سلولی ..... ۲۸
الف-۶-۶-۱-۲- ایمنی هومورال ..... ۲۹
الف-۶-۶-۲- ایمنی پاسیو ..... ۲۹
الف-۷- تشخیص ..... ۲۹
الف-۷-۱- ردیابی ویروس یا جداسازی ویروس؟ ..... ۲۹
الف-۷-۲- ردیابی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ..... ۳۰
الف-۷-۳- ردیابی آنتی‌ژن ..... ۳۱
الف-۷-۳-۱- آزمایش‌های ایمنوشیمی ..... ۳۱
الف-۷-۴- ردیابی ژنوم پنومویروس پرندگان ..... ۳۳
الف-۷-۴-۱- اطلاعات توالی برای پنومو‌ویروس‌های پرندگان ..... ۳۳
الف-۷-۴-۲- تفاوت‌های ژنتیکی بین تحت تیپ‌ها ..... ۳۴
الف-۷-۴-۳- تفاوت‌ها درون یک تحت تیپ ..... ۳۴
الف-۷-۴-۴- RT-PCRها برای ردیابی و تمایز پنومو‌ویروس‌های پرندگان ..... ۳۴
الف-۷-۴-۵- طبیعت (ذات) نمونه‌ها برای RT-PCR ..... ۳۵
الف-۷-۵- جداسازی و تعیین هویت پنومو‌ویروس پرندگان ..... ۳۶
الف-۷-۵-۱- نمونه‌های انتخابی و زمان نمونه‌گیری برای جداسازی ..... ۳۶
الف-۷-۵-۱-۱- زمان نمونه‌گیری ..... ۳۷
الف-۷-۵-۱-۲- جمع‌آوری و عمل‌آوری نمونه‌های فیلد ..... ۳۸
الف-۷-۵-۱-۳- اندازه (میزان) نمونه‌گیری ..... ۳۹
الف-۷-۵-۲- جداسازی ویروس و محدودیت‌های سیستم‌های موجود ..... ۴۰
الف-۷-۵-۲-۱- محیط‌کشت‌های اندام نای ..... ۴۱
الف-۷-۵-۲-۲- کشت در تخم‌های جنین‌دار ..... ۴۱

الف-۷-۵-۲-۳- محیط‌کشت‌های سلولی ..... ۴۲
الف-۷-۵-۳- مقایسه سودمندی ردیابی ویروس و جداسازی ویروس ..... ۴۲
الف-۷-۵-۴- تعیین هویت ویروس ..... ۴۳
الف-۷-۵-۵- ردیابی مستقیم آنتی‌ژن‌های ویروسی ..... ۴۳
الف-۷-۵-۶- تعیین هویت مولکولی ..... ۴۳
الف-۷-۶- ردیابی پادتن تولید شده علیه پنوموویروس پرندگان ..... ۴۴
الف-۷-۶-۱- سرولوژی ..... ۴۴
الف-۷-۶-۱-۱- الیزا ..... ۴۵
الف-۷-۶-۱-۲- آزمایش‌های خنثی‌سازی ..... ۵۰
الف-۷-۶-۱-۳- آزمون پادتن‌های درخشان ..... ۵۲
الف-۷-۶-۲- ردیابی تحت‌تیپ‌های جدید ..... ۵۳
الف-۷-۶-۳- مقایسه روش‌های سرولوژیکی مختلف ..... ۵۵
الف-۷-۷- تشخیص تفریقی ..... ۵۷
الف-۷-۷-۱- تغییرپذیری سویه ..... ۵۷
الف-۷-۷-۲- سایر ویروس‌ها ..... ۵۸
الف-۷-۷-۳- باکتری‌ها و مایکوپلاسماها ..... ۵۸
الف-۸- استراتژی‌های مداخله‌ای ..... ۵۸
الف-۸-۱- اقدامات مدیریتی ..... ۵۸
الف-۸-۲- استراتژی‌های واکسیناسیون (واکسن‌ها و روش‌های واکسیناسیون) ..... ۵۹
الف-۸-۳- اقدامات در حال انجام ..... ۶۵
الف-۸-۴- کنترل و پیشگیری ..... ۶۵
الف-۸-۵- اقدامات درمانی ..... ۶۶
**ب- آزمایش الیزا** ..... ۶۷
ب-۱- روش‌های نمونه‌گیری سرمی ..... ۶۹

## فصل سوم: مواد و روش کار

**الف- مواد و وسایل مورد استفاده** ..... ۷۱
الف-۱- مواد مصرفی ..... ۷۱
الف-۲- وسایل مورد استفاده ..... ۷۱
**ب- روش کار** ..... ۷۲
ب-۱- طرح آزمایش ..... ۷۲

ب-۲- روش خون‌گیری و جداکردن سرم ..... ۷۲
ب-۳- اندازه‌گیری عیار پادتن به روش الیزا ..... ۷۳
ب-۳-۱- مشخصات کیت ..... ۷۳
ب-۳-۲- نحوه‌ی انجام آزمایش الیزا ..... ۷۴
ب-۳-۳- روش تجزیه و تحلیل آماری ..... ۷۷

## فصل چهارم: نتایج

**نتایج** ..... ۷۸

## فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

**بحث و نتیجه گیری** ..... ۸۱
**پیشنهادات** ..... ۸۷
**منابع** ..... ۸۸
**چکیده انگلیسی** ..... ۹۶

# فهرست جداول

**عنوان** **صفحه**

جدول ۴-۱- تعداد کل نمونه، تعداد نمونه‌ی مثبت، درصد نمونه ی مثبت، میانگین عیار پادتن و محدوده‌ی عیار پادتن ویژه متاپنومو‌ویروس پرندگان در هر گله و در مجموع .....۷۸

# فهرست نمودارها

**عنوان** **صفحه**

نمودار ۴-۱- میانگین عیار پادتن در گله‌ها و میانگین عیار پادتن ویژه متاپنومو‌ویروس پرندگان کل نمونه‌ها ..... ۷۹

# فهرست تصاویر

**عنوان** **صفحه**

تصوی ۳-۱- میکروپلیت الیزا ..... ۷۴

## مقدمه و هدف

عفونت‌های حاد دستگاه تنفسی دارای شیوع بالا و اهمیت فراوانی در صنعت طیور هستند و خسارات اقتصادی زیادی به گله های طیور وارد می کنند. برخی از عوامل ایجادکننده شناسایی شده‌اند ولی برخی هنوز مشخص نشده‌اند. گام اول جهت شناسایی این عوامل بررسی سرولوژیک می‌باشد تا در صورت تایید بیماری، بتوان نسبت به جداسازی عامل اقدام نموده و راهکار مناسب جهت پیشگیری و کنترل بیماری ارائه داد.

متاپنومواویروس پرندگان[1] یا پنومواویروس پرندگان[2] بعنوان یکی از پاتوژن های مهم در صنعت طیور محسوب می شود. عفونت متاپنومواویروس پرندگان یک بیماری مسری است که عامل آن متاپنومواویروس می باشد که سبب بروز مشکلات تنفسی و کاهش عملکرد گله های طیور بخصوص بوقلمون‌ها و ماکیان می‌شود و در صورت بروز آلودگی همزمان یا ثانویه، حدت بیماری و جراحات ناشی از آن را افزایش می دهد. از نظر اقتصادی از بیماری های مهم در بوقلمون ها، مادران گوشتی و مرغان تخمگذار می‌باشد و ماکیان گوشتی نیز به عفونت پنومواویروس پرندگان حساس هستند.

بر این اساس، این م طالعه به منظور شناسایی سرولوژیک متاپنومواویروس پرندگان در ماکیان گوشتی به وسیله‌ی آزمایش الیزا انجام گرفت.

امید است نتایج حاصل از این پایان‌نامه در پیشگیری و کنترل این بیماری در صنعت پرورش طیور مورد استفاده قرار گیرد.

سید جمال غلامی سیدکلائی

اهواز - آبان ماه ۱۳۸۹

1- avian metapneumovirus (aMPV)
2- avian pneumovirus (APV)

## الف- مروری بر متاپنوموویروس پرندگان

### الف-۱- تعریف و مترادف‌ها

بیماری‌های بالینی که ممکن است در اثر عفونت های متاپنوموویروسی پرندگان [۱] (aMPV) در بوقلمون‌ها و ماکیان ایجاد شود، براساس علائم بالینی و جراحات شامل رینوتراکئیت بوقلمون [۲] (TRT)، سندرم تورم سر [۳] (SHS)، و رینوتراکئیت پرندگان [۴] (ART) می‌باشند. با این حال، این علائم بالینی و جراحات مختص عفونت‌های متاپنوموویروس پرندگان نیستند و می‌تواند با بیماری ایجاد شده در اثر عفونت با سایر ارگانیسم ها همچون *بوردتلوز پرندگان* [۵]، *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* [۶] (ORT)، *ویروس برونشیت عفونی* [۷] (IBV)، گونه‌های *مایکوپلاسما* و سایر عوامل بیماری زای تنفسی اشتباه شود. بنابراین، در حال حاضر ، مورد پذیرش جهانی قرار گرفته است که شرایط منتسب شده بعنوان TRT، SHS یا ART می‌تواند بعنوان نتیجه‌ی عفونت با متاپنوموویروس پرندگان باشد. شکل شدیدتر بیماری اح تمالاً از عفونت ثانویه با سایر ارگانیسم ها منتج می شود و در این رابطه ظاهر مشخصه «تورم سر» ناشی از عفونت با باکتری های نابجای ثانویه (معمولاً *اشریشیا کلای*[۸]) می‌باشد (۲۴).

1. Avian metapneumovirus
2. Turkey rhinotracheitis
3. Sowlen head syndrom
4. Avian rhinotracheitis
5. Bordetella avium
6. Ornithobacterium rhinotracheale
7. Infectious broncheitis virus
8. E.coli

### الف-۲- اهمیت اقتصادی

عفونت‌های متاپنومواویروسی در ماکیان با مشکلات اقتصادی جدی و آسایش حیوانات[1] بویژه در گله‌های تجاری بوقلمون همراه است. حتی در کشورهایی که واکسیناسیون علیه پنومواویروس پرندگان رایج می‌باشد، این بیماری هنوز بعنوان مهمترین بیماری تنفس ی در بوقلمون‌ها در نظر گرفته می‌شود(به استثناء آنفولانزای پرندگان ). از زمان اولین همه گیری‌های عفونت متاپنومواویروسی در بوقلمون‌ها در ایالات متحده آمریکا در طی سال ۱۹۹۷، افت تولید باعث مشکلات جدی اقتصادی شده است. تخمین زده شده است که افت تولید در صنعت بوقلمون مینسوتا بین سال های ۲۰۰۲-۱۹۹۷ به میزان ۱۵ میلیون دلار به ازای هر سال بود ه است. در ماکیان تجاری، بیماری خسارت‌های اقتصادی کمتری دارد، گرچه در کشورها یی که عفونت همراه با سندرم تورم سر و افت تولید تخم در اثر متاپنومواویروس پرندگان می‌باشد، دارای اهمیت اقتصادی جدی می‌باشد (۲۴).

### الف-۳- اهمیت سلامت عمومی

گرچه یک متاپنومواویروس مشابه با بیماری بخش فوقانی تنفس در انسان‌ها مرتبط بوده است (۲۴ و ۵۶)، پنومواویروس انسانی خویشاوندی نزدیکی با تحت تیپ C (نسبت به تحت تیپ های A و B یا D) دارد (۳۶)، اما عفونت‌های متاپنومواویروس پرندگان در طیور سلامت عمومی جامعه را تهدید نمی-کند (۲۴).

[1]. Animal welfare

### الف-۴- تاریخچه

متاپنومو‌ویروس پرندگان اولین بار بعنوان یک بیماری در بوقلمون ها در آفریقای جنوبی در اواخر دهه ۱۹۷۰ شرح داده شد. بیماری سپس از اروپا، فرانسه، انگلستان، آلمان، هلند، و کشورهایی همچون ژاپن، مکزیک، فلسطین اشغالی، مراکش، برزیل، آفریقای جنوبی و اخیرا در ایالات متحده گزارش شد (۵۷) و عامل مسبب همزمان در انگلستان و فرانسه جدا شد. دو سال طول کشید تا عامل ایجاد بیماری بعنوان یک ویروس عضو خانواده پارامیکسوویریده شناسایی شد و در ابتدا در جنس پنومو‌ویروس قرار گرفت (۲۴).

در همان زمانی که متاپنومو‌ویروس پرندگان در اروپا و خاورمیانه ظاهر شد، یک بیماری در ماکیان با علائم در قسمت فوقانی دستگاه تنفس در تعداد کمی از گله هایی که تورم سر را نشان می دادند، دیده شد. این بیماری بعنوان سندرم «تورم سر» (SHS) شناخته شد و معلوم شد همراه با همان پنومو‌ویروس است که از آن بعنوان ویروس رینوتراکئیت بوقلمون (TRT) استنباط می‌شود. در طی اوایل دهه ۱۹۹۰، واکسن‌ها برای استفاده در بوقلمون‌ها و ماکیان تولید شدند که از جدایه های اولیه بوقلمون منشأ می گرفتند. با این حال، تا سال ۱۹۹۴ مشخص شد دو تحت تیپ A و B متاپنومو‌ویروس پرندگان وجود دارد و متعاقباً نشان داده شد که واکسن های تولید شده از تحت‌تیپ A می‌تواند علیه ویروس‌های تحت تیپ B محافظت ایجاد کند. در اواسط دهه ۱۹۹۰ شواهد سرولوژیک متاپنومو‌ویروس پرندگان از خاور دور گزارش شد که اغلب همراه با سندرم تورم سر در ماکیان بود. ویروس‌های تحت‌تیپ A در ماکیان در سال ۱۹۹۵ در برزیل و در سال ۲۰۰۴ در بوقلمون‌ها شناسایی شد (۲۴). در سال ۱۹۹۷، متاپنومو‌ویروس پرندگان برای اولین بار در ایالات متحده در بوقلمون‌ها شرح داده شد (۶۶) و سپس نشان داده شد از نظر آنتی‌ژنیکی از تحت‌تیپ‌های A و B مجزا می‌باشد. تمام

جدایه‌های بدست آمده از بوقلمون‌ها در شمال آمریکا از نظر آنتی ژنتیکی مشابه بودند و بعنوان تحت تیپ C متاپنومو‌ویروس پرندگان طبقه‌بندی شدند. بعلاوه بیماری در ماکیان شمال آمریکا مشاهده نشد و گرچه موارد عفونت با متاپنومو‌ویروس پرندگان اولین بار درکانادو پدیدار شد، اما بر اساس نتایج سرولوژی الیزا در حال حاضر این عفونت منحصر به بوقلمون‌ها در ایالت‌های مینسوتا، آیووا، ویسکوزین و داکوتاس می‌باشد (۸ و ۲۴). همچنین ویروس‌هایی مشابه تحت تیپ C، اما متفاوت از نظر دودمان ژنتیکی[1]، در اردک های مسکووی دارای علائم تنفسی و مشکلات تولید تخم در فرانسه گزارش ش د (۷۳).

در گزارش اخیر از فرانسه، آنالیز مولکولی ویروس‌های جدا شده از بوقلمون‌ها در دهه ۱۹۸۰ تحت تیپ D را به عنوان تحت‌تیپ چهارم متاپنومو‌ویروس پرندگان، بیان نمود (۲۴). همچنین در انگلستان قرقاول‌های دارای بیماری تنفسی ویروس‌های تحت تیپ A شناسایی شدند (۲۶ و ۷۷).

## الف-۵- سبب شناسی

### الف-۵-۱- طبقه بندی

متاپنومو‌ویروس‌های پرندگان اعضای تحت خانواده پنومو‌ویرینه [2] هستند که در خانواده پارامیکسو‌ویریده[3] قرار دارند. این تحت خانواده دارای دو جنس است؛ جنس پنومو‌ویروس[4] که شامل ویروس‌های سرشیال تنفسی پستانداران و پنومو‌ویروس موش می‌باشد و جنس متاپنوویروس[5] که پنومو‌ویروس‌های پرندگان در آن قرار می گیرند (۲۴). تا این اواخر تصور می شد متاپنومو‌ویروس

[1]. Genetic lineage
[2]. pneumovirinae
[3]. paramyxoviridae
[4]. pneumovirus
[5]. metapneumovirus

پرندگان تنها عضو جنس متاپنومووویروس باشد اما گزارش های اخیر نشان می دهد که ویروس های مشابه در انسان ها همراه با عفونت های دستگاه تنفسی در چندین کشور شناسایی شد (۵۷ و ۷۵). متاپنومووویروس‌های پرندگان بر اساس اطلاعات توالی نوکلئوتیدی و توالی آمینواسیدی به ۴ تحت‌تیپ A، B، C و D طبقه‌بندی می‌شوند (۹ و ۲۴).

### الف-۵-۲- مرفولوژی (ریخت شناسی)

در بررسی متاپنومووویروس پرندگان با میکروسکوپ الکترونی کنتراست منفی، ذرات انگشتی چند شکلی دیده می شود که تقریباً کروی شکل و به قطر ۲۰۰-۸۰ نانومتر هستند، گرچه گاهی اوقات ذرات گرد با اندازه ۵۰۰ نانومتر یا بیشتر نیز دیده می شود. اشکال رشته‌ای انگشتی بین ۱۰۰-۸۰ نانومتر و همچنین ممکن است بالاتر تا ۱۰۰۰ نانومتر وجود داشته باشند. در مطالعه‌ای، در جداسازی ویروس به شیوه تکثیر کشت اندام ، برآمدگی‌های سطحی که ۱۴-۱۳ نانومتر طول دارند و نوکلئوکپسید حلقوی ۱۴ نانومتری همراه با یک پیچ ۷ نانومتری با ازای هر گردش، گزارش شد (۲۴).

### الف-۵-۳- ترکیب شیمیایی

ژنوم ویروس بدون قطعه است و از RNA تک رشته‌ای با مفهوم (جهت) منفی و به اندازه تقریبی ۱۴kb تشکیل شده است . در گرادیانت‌های سوکروز، چگالی bouyant یک جدایه ویروسی که جدا شده بوده است، از بوقلمون‌ها $1/21\ g/ml$ و وزن ملکولی تقریبی $500\times10^6$ داشته است. مشخص شده است این ویروس حدود ۸ پلی‌پپتید ساختاری، دو تا گلیکوزیلات و سه پروتئین غیرساختاری خاص

ویروس می‌باشد، دارد. این پلی‌پپتیدها، نوکلئوپروتئین[1] (N)، فسفوپروتئین[2] (P)، پروتئین ماتریکس[3] (M)، پروتئین الحاقی[4] (F)، پروتئین ماتریکس دوم[5] (M2)، پروتئین آب گریز کوچک[6] (SH)، گلیکوپروتئین سطحی[7] (G) و یک RNA پلی‌مراز بزرگ وابسته به RNA ویروسی[8] (L) می‌باشند که بترتیب با یک leader و trailer در انتهاهای ′۳ و ′۵ در کنار واقع شده‌اند (۲۴ و ۵۷).

**الف-۵-۴- تکثیر ویروس**

جزئیات کمی از مطالعات روی متاپنومووویروس پرندگان منتشر شده است اما تصور می شود مکانیسم‌های ویروس مشابه با ویروس های رشته ای منفی خویشاوند همچون ویروس سنسیشیال تنفس[9] (RSV) باشد. مطالعه‌ی RSV نشان می دهد تکثیر و رونوشت برداری ویروس از توالی leader انتهای ′۳ شروع می‌شوند. بخاطر تجزیه پلی‌مراز، ژن‌ها از سطوح کوتاه شده در حال پیشرفت از سمت leader به سمت trailer ژنوم رونوشت برداری و بیان می‌شوند. توسعه یک سیستم برگردان ژنتیکی برای متاپنومووویروس پرندگان تأیید کرده است که بعنوان مثال RSA، حداقل واحد تکثیری یعنی کمپلکس ریبونوکلئر[10] از نوکلئوکپسید، فسفو پروتئین، M2 همراه با پلی مراز ویروس تشکیل می‌شود. این مطالعه نشان داد حداقل در کشت بافت پروتئین SH و اتصالی برای زنده نگه داشتن

1. Nucleoprotein
2. Phosphoprotein
3. Matrix protein
4. Fusion protein
5. Second matrix protein
6. Small hydrophobic protein
7. Surface glycoprotein
8. A larg, viral RNA-dependent RNA polymerase
9. Respiratory syncytial virus
10. Ribonuclear complex

ویروس‌ها می‌تواند حذف شود، این مطالعه پیشنهاد می‌کند علاوه بر گلیکوپروتئین G، پروتئین الحاقی (F) نیز می‌تواند در اتصال ویروس نقش ایفا کند (۹ و ۲۴).

### الف-۵-۵- حساسیت به عوامل شیمیایی و فیزیکی

مطالعات اولیه روی یکی از اولین جدایه های اروپایی متاپنوموویروس پرندگان در بوقلمون نشان داد ویروس به حلال های چربی حساس، در اسیدیته (pH) ۳/۰-۹/۰ مقاوم و پایدار بود و در دمای $56^{\circ}C$ بعد از ۳۰ دقیقه غیر فعال می شود. اخیراً، مطالعات روی یک سویه از تحت تیپ C متاپنوموویروس پرندگان جدا شده از بوقلمون در مینسوتا مقاومت مشابه با اسیدتیه ۹-۵ بمدت یک ساعت را گزارش کرد. بعلاوه مطالعه ذکر شده گزارش کرده است جدایه قابلیت عفونی‌زایی خود را در $4^{\circ}C$ بعد از ۱۲ هفته، $20^{\circ}C$ بعد از ۴۴ هفته، $37^{\circ}C$ بعد از ۲ روز و $50^{\circ}C$ بعد از ۶ ساعت از دست می‌دهد. چند ضدعفونی کننده شامل ترکیبات چهار تایی آمونیوم، اتانول، یدو فور، مشتقات فنلی و هیپوکلریت سدیم سفید کننده برای کاهش قابلیت زنده ماند ن ویروس موثر بود ه‌اند. به طرز تعجب-آوری جدایه هفت روز پس از خشک شدن در دمای اتاق عفونی‌زا باقی می ماند. بقاء یک جدایه از تحت‌تیپ متاپنوموویروس پرندگان در پر بوقلمون درشرایط دمایی متفاوت نیز مطالعه شده است. نتایج آن مطالعه نشان داده است ویروس می‌تواند ۶۰ روز در دمای $12^{\circ}C$ عفونی‌زا بماند و RNA ویروس در بستر نگهداری شده در دمای $8^{\circ}C$ بعد از ۹۰ روز هنوز قابل شناسایی می‌باشد (۲۴).

### الف-۵-۶- طبقه بندی سویه

مطالعات اولیه با استفاده از خنثی سازی متقاطع، تکنیک های الیزا و تعیین پروفایل پلی پتیدی نشان می‌دهد که تفاوت کمی بین جدایه‌های اروپایی متاپنومو‌ویروس پرندگان وجود دارد. با این حال، مطالعات دقیق تر با استفاده از پادتن‌های مونوکلونال[1] (mAbs) تولیدشده برای جدایه های مختلف، تفاوت آنتی ژنتیکی قابل ملاحظه ای بین سویه ها را نشان داد . بدنبال آنالیز توالی نوکلوتیدی گلیکوپروتئین G (پروتئین اتصالی)، تفاوت بین تحت‌تیپ‌ها بیشتر نمایان شد که نشان داد تحت‌گروه A و B درون یک سروگروه وجود دارند. ویروس‌های تحت‌تیپ A و B از ماکیان و بوقلمون جدا شدند و می‌توانند آن‌ها را آلوده سازند (۲۴).

جدایه‌های اخیر متاپنومو‌ویروس پرندگان از بوقلمون در کلرادو و مینسوتا در ایالات متحد آمریکا هیچ رابطه سرولوژیکی معنی‌داری با سویه های تحت‌تیپ‌های A و B اروپایی که با استفاده از تست - های خنثی‌سازی با پادتن‌های مونوکلونال و mono-specific مشخص شده بودند، ندارند (۲۴).

آنالیزهای مولکولی دقیق‌تر ژن‌های پروتئین M2، F، M، P و N ویروس‌های اروپایی و جدایه-های ایالات متحده آمریکا آشکار ساخت که ویروس های تحت تیپ C بالای ۹۰٪ هویت توالی نوکلوتیدی دارند در حالیکه ویروس‌های تحت تیپ A و B هویت توالی بین ۴۰ تا ۷۰ درصدی دارند. آنالیزه‌ای فیلوژنیک سه تحت تیپ (A، B و C) نشان داد که ویروس های A و B خویشاوندی بیشتری نسبت به هم دارند (۳۲ و ۶۶). آنالیز دو ویروس جدا شده از فرانسه در سال ۱۹۸۵ آنها را در تحت‌تیپ D قرار داد و نسبت به جدایه های تحت‌تیپ‌های A، B و C تفاوت هایی در توالی ژن G

[1]. Monoclonal antibodies

نشان دادند. مقایسه فیلوژنیک چهار تحت‌تیپ نشان می‌دهد که ویروس های A، B و D نسبت به ویروس‌های تحت تیپ C بیشتر به یکدیگر شبیه اند و خویشاوند هستند (۲۴).

### الف-۵-۷- سیستم‌های میزبان آزمایشگاهی

مشکلات اولیه در تشخیص آزمایشگاهی و تعیین اتیولوژی متاپنومو‌ویروس پرندگان عمدتاً ناشی از فقدان سیستم تکثیر آزمایشگاهی مناسب بود. طبیعت عفونی بیماری با استفاده از علائم بالینی پدیدار شده در جوجه بوقلمون‌های حساس قرار داده شده در تماس با پرندگان بیمار مشخص و شناسایی شد (۲۴).

تلقیح موکوس عفونی به درون کیسه زرده جنین بوقلمون و جوجه منجر به مرگ جنین بعد از ۴ یا ۵ پاساژ می‌شود اما ویروس تیتر خیلی پایین می دهد. همچنین، تلقیح در م حیط کشت اندام نای [1] جوجه یا بوقلمون (TOCs) منجر به توقف حرکت مژه[2] می‌شود، اما باز هم ویروس با تیتر پایین تکثیر می‌کند. جدایه‌های خوگرفته به جنین بوقلمون و جوجه، سلول های پستانداران همچون سلول های VERO و BS–C-1 و MA104، اثر سیتوپاتیک[3] مشخص برای تشکیل سینسیشیوم و همراه با تیترهای ویروسی نسبتاً بالا را نشان دادند. همچنین سلول توموری بلدرچین (QT-۳۵) برای تکثیر ویروس بکار رفته است (۱۹ و ۲۴). تحت‌تیپ‌های A و B را می‌توان در محیط کشت اندام نای جدا کرد(۲۰، ۲۴، ۴۹ و ۷۸) اما ویروس‌های تحت‌تیپ C فقط در محیط کشت سلول یا تخم‌های نطفه‌دار جدا می‌شوند (۱۹و ۲۴).

[1]. Tracheal organ culture
[2]. Cilliostasis
[3]. Cytopathic effect