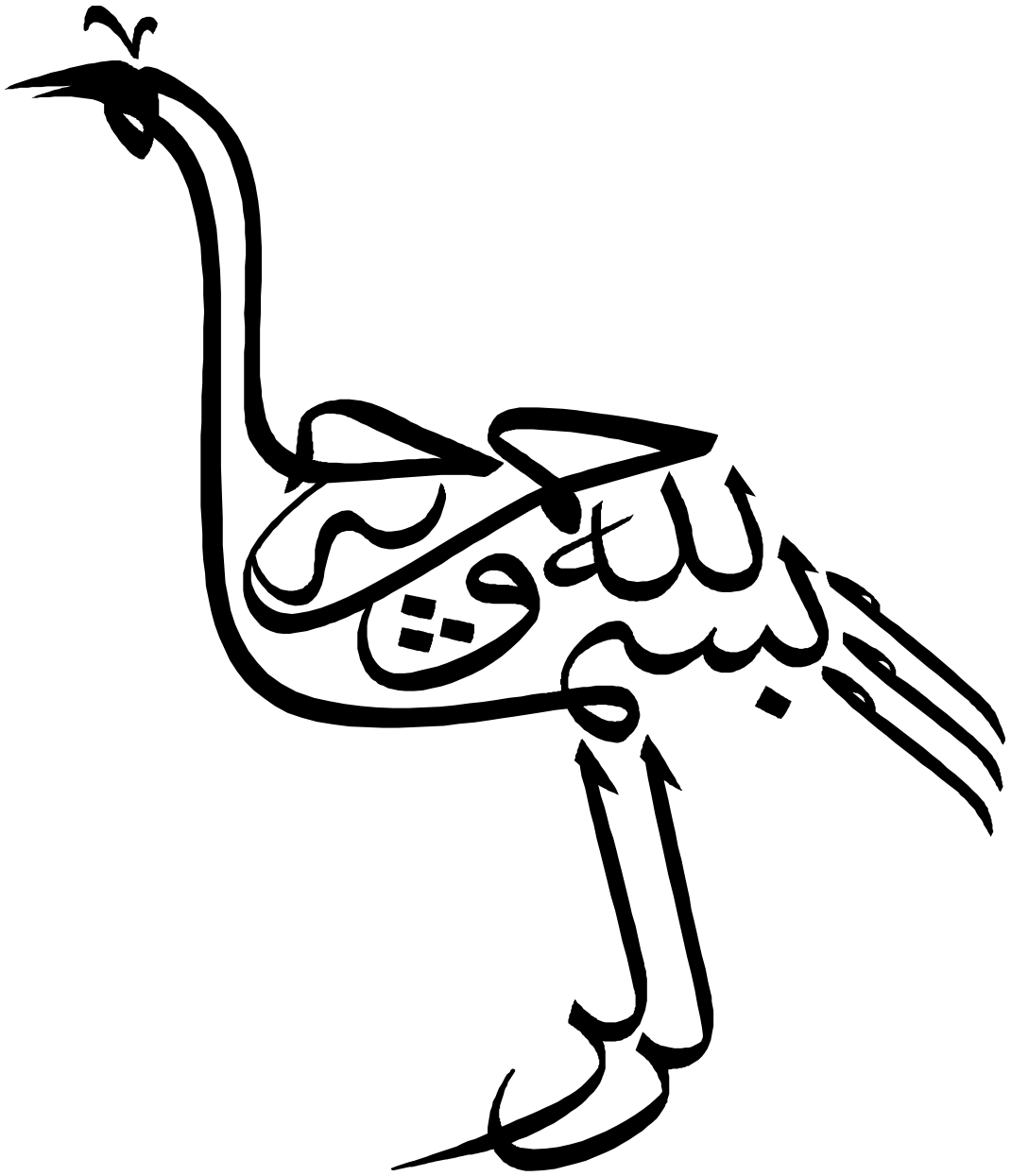
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تبریز

دانشکده دامپزشکی

گروه علوم درمانگاهی

پایان نامه

برای دریافت مدرک دکترای حرفه ای در رشته دامپزشکی

عنوان پایان نامه:

تاثیر نانوذرات سلنیوم و عصاره میوه انجیر و زیتون بر ایمنی زایی ویروس غیرفعال شده آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2

استاد راهنما :

دکتر ذوالفقار رجبی

اساتید مشاور :

دکتر مهدی وصفی مرندی

دکتر غلامرضا دهقان

پژوهشگر :

امیرحسین اصل نجاری

۱۹ شهریور ۱۳۹۰

به نام آنکه آدمی را فکرت آموخت

و سپاس خداوندی را که شکر او گرچه خارج از توان است اما امید آنکه به لطف و رحمت خویش ما را خارج از جرقه غافلان و ناسپاسان قرار دهد.

خدا را شاکریم که توانستیم به حول و قوه او، مطالعه حاضر را به اتمام برسانیم، و این ممکن نبود مگر بوجود الطاف بی کرانش که مددهای خویش را در قالب بندگان عزیزش برما ارسال نمود. پدرم و مادرم بندگان عزیزی بودند که خداوند تبارک و تعالی بر بنده حقیرش ارزانی داشت و با بخشیدن خواهری مهربان این حقیر را مسرور ساخت.

جا دارد که در این میان فرصت را غنیمت شمرده و از استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر ذوالفقار رجبی که راهنمایی این مطالعه را بر عهده داشتند و همچنین در طول دوره تحصیل دانشگاهی از زحمات ایشان بهره مند بودیم، کمال تشکر و قدر دانی را داشته باشم. از استادان گرامیم جناب آقای دکتر مهدی وصفی مرندی و جناب آقای دکتر غلامرضا دهقان، مشاوران عالم و خیرخواه این مطالعه بسیار سپاسگزارم، همچنین از جناب آقای دکتر محمدصادق مددی که داور دقیق و نکته سنج مطالعه حاضر بودند و در دوران تحصیل از زحمات ایشان بهره مند بودیم کمال تشکر و قدر دانی را دارم و از خداوند متعال برای همگی ایشان سعادت دنیا و آخرت را خواهانم.

و اما برادرم عدنان مرادپور که در طول مطالعه نه تنها زحمات زیادی را متحمل شد بلکه همیشه یار و مددکار هم بودیم و از باری تعالی توفیقات روز افزون را بر او و خانواده عزیزش مسئلت دارم، همچنین از آقای اباذر صادقی که در ایستگاه خلعت پوشان زحمات زیادی را کشیدند و نیز سایر دست اندرکاران دانشکده دامپزشکی که در اجرای این مطالعه زحمات زیادی را متقبل شدند، سپاسگزارم.

امیرحسین اصل نجاری

شهریور ۱۳۹۰

نام خانوادگی دانشجو: اصل نجاری **نام:** امیرحسین

عنوان پایان نامه:

تاثیر نانوذرات سلنیوم و عصاره میوه انجیر و زیتون بر ایمنی زایی ویروس غیرفعال شده آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2

استاد راهنما : دکتر ذوالفقار رجبی

استادان مشاور: دکتر مهدی وصفی مرندی و دکتر غلامرضا دهقان

مقطع تحصیلی : دکترای حرفه ای **رشته** : دامپزشکی **دانشگاه:** تبریز

دانشکده : دامپزشکی تاریخ فارغ التحصیلی :۱۳۹۰/۶/۱۹ تعداد صفحات :۱۱۲

کلید واژه : ویروس آنفلوانزا، نانوسلنیوم، انجیر، زیتون، ادجوانت، واکسن

چکیده :

آنفلوانزا یک بیماری بسیار واگیر ویروسی است که در پرندگان، انسان و سایر پستانداران مشاهده می شودو لذا کنترل این بیماری دارای اهمیت خاصی می باشد. واکسیناسیون علیه ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 یکی از این راهکارهای کنترلی می باشد و برای این منظور واکسن های متعددی ساخته شده است و واکسیناسیون طیور با واکسن های روغنی غیر فعال برای کنترل ویروس های آنفلوانزای پرندگان بخصوص ویروس های با بیماریزایی ملایم در سال های اخیر در حال افزایش است. در حال حاضر روغن هایی که در واکسن های تجاری بعنوان ادجوانت استفاده می شوند روغن های معدنی هستند و اینها اغلب با رها سازی تدریجی آنتی ژن واکسن عمل می کنند و نقشی در ایمنی زایی ندارند و در عین حال مضراتی نیز دارند از جمله، باقی ماندن در بافت که ممکن است باعث واکنش های شدید بافتی شود، همینطور به نظر می رسد سرطان زا

باشند و همچنین ٤٢ روز طول می کشد تا جذب شوند. لذا محققان در تلاش هستند روغن های گیاهی را که قابل سوخت و ساز است و مضرات فوق را ندارند جایگزین روغن های معدنی در واکسن ها نمایند. با در نظر گرفتن آنچه که گفته شد، در مطالعه حاضر، ایمنی زایی مخلوط عصاره میوه های انجیر و زیتون و نیز مخلوط این ها با نانوسلنیوم به همراه ویروس غیرفعال آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 بررسی شد. عصاره های متانولی و هگزانی هر دو میوه استخراج شده و بررسی ها در طی دو مطالعه بر روی ۱۳۰ قطعه جوجه گوشتی انجام شد. گروه های مورد ارزیابی در این مطالعه عبارت بودند از: ۱)انجیر، زیتون و ویروس غیرفعال ۲)انجیر، زیتون، نانوسلنیوم و ویروس غیرفعال ۳)ویروس غیرفعال به همراه محلولPBS ٤)گروه واکسن تجاری ۵)گروهی که هیچ ماده ای دریافت نکرد. اگرچه مخلوط ها و امولسیون های تهیه شده تا حدودی توانستند که موجب ایجاد ایمنی شوند، ولی نتوانستند مانع از عفونت و پاسخ آنامنستیک در پرنده شوند و این درحالی بود که واکسن تجاری ایمنی مناسب تری را ایجاد نمود. با توجه به نتایج به نظر می رسد نتوان از مخلوط عصاره های متانولی و هگزانی حاصل از میوه های انجیر و زیتون به عنوان ادجوانت در تهیه واکسن آنفلوانزای طیور استفاده کرد ولی در این میان نانوسلنیوم شاید بتواند به عنوان یک عنصر موثر فرعی در ترکیب ادجوانت ها مطرح باشد.

فهرست

چکیده فارسی..... ٤

فصل اول..... ۱۲

مقدمه و بررسی منابع..... ۱۲

۱-۱- مقدمه..... ۱۲

۱-۲- تعریف بیماری آنفلوانزای پرندگان..... ۱۳

۱-۳- بیماری آنفلوانزای پرندگان به عنوان یک بیماری مشترک..... ١٤

۱-٤- بیماری آنفلوانزا در طیور ایران..... ١٦

۱-۵- خانواده ارتومیکسوویریده..... ۱۷

۱-٦- ورود و همانندسازی ویروس آنفلوانزا..... ۲۱

۱-۷- پاتوتیپ ویروس های آنفلوانزای طیور..... ۲۱

۱-۸- تفاوت HPAI و LPAI..... ۲۲

۱-۹- ویژگی های ویروس های آنفلوانزای طیور..... ۲۲

۱-۱۰- اپیدمیولوژی ویروس های آنفلوانزای طیور..... ۲۳

۱-۱۱- کنترل آنفلوانزای پرندگان..... ۲۵

۱-۱۲- آسیب شناسی فرایند عفونت..... ۲۷

۱-۱۳- نشانه های درمانگاهی..... ۲۸

۱-۱٤- ضایعات کالبدگشایی..... ۳۰

۱-۱۵- ضایعات میکروسکوپی..... ۳۳

۱-۱٦- تشخیص تفریقی..... ۳۵

۱-۱۷- نقش سیستم ایمنی در آنفلوانزای پرندگان..... ۳۵

۱-۱۸- تشخیص..... ۳۸

۱-۱۹- واکسیناسیون علیه آنفلوانزای پرندگان..... ٤۰

۱-۱۹-۱- کارایی واکسن..... ٤۳

۱-۱۹-۲- قدرت واکسن..... ٤٤

۱-۲۰- تاریخچه واکسن های آنفلوانزای پرندگان..... ٤٤

۱-۲۱- اساس تهیه واکسن های غیرفعال..... ٤۷

۱-۲۲- ادجوانت ها..... ٤۸

۱-۲۳- برخی از خصوصیات انجیر..... ۵۳

۱-۲٤- برخی از خصوصیات زیتون..... ۵٦

۱-۲۵- برخی از خصوصیات سلنیوم..... ۵۸

۱-۲٦- هدف از مطالعه..... ۵۹

فصل دوم..... ٦۰

مواد و روشها..... ٦۰

۲-۱- مواد اصلی استفاده شده در مطالعه ٦٠
۲-۲- وسایل اصلی استفاده شده در مطالعه ٦٠
۲-۳- انجیر شیرازی ٦١
۲-۳-۱- عصاره متانولی انجیر ٦١
۲-۳-۲- عصاره هگزانی انجیر ٦١
۲-٤- زیتون سبز ایرانی ٦٢
۲-٤-۱- عصاره متانولی زیتون تر ٦٢
۲-٤-۲- عصاره متانولی زیتون خشک ٦٢
۲-٤-۳- عصاره هگزانی زیتون خشک ٦٣
۲-٥- تهیه گلبول قرمز(RBC)۱٪ ٦٣
۲-٦- طریقه انجام آزمایش HA ٦٤
۲-۷- تهیه آنتی ژن ٤ واحد ٦٤
۲-۸- طریقه انجام آزمایش HI ٦٥
۲-۹- تکثیر ویروس H9N2 ..... ٦٥
۲-۱۰- غیر فعال سازی ویروس H9N2 ..... ٦٦
۲-۱۱- تعیین EID50 ویروس H9N2 ..... ٦٨
۲-۱۲- بررسی آلودگی میکروبی عصاره ها و نانوسلنیوم ٦٩

۲-۱۳- مخلوط کردن عصاره ها با ویروس غیر فعال H9N2 در مطالعه اول..... ٦٩
۲-۱۳-۱- مخلوط انجیر، زیتون و ویروس غیرفعال H9N2..... ٦٩
۲-۱۳-۲- مخلوط انجیر، زیتون، نانوسلنیوم و ویروس غیرفعال H9N2..... ۷۰
۲-۱۳-۳- مخلوط PBS و ویروس غیرفعال H9N2..... ۷۰
۲-۱۳-٤- کشت از مخلوط ها و امولسیون های تهیه شده..... ۷۱
۲-۱۳-۵- آزمایش بیولوژیکی بر روی جوجه ها در مطالعه اول..... ۷۱
۲-۱۳-٦- تزریق امولسیون های تهیه شده و واکسن تجاری آنفلوآنزا..... ۷۲
۲-۱۳-۷- خون گیری قبل از چالش..... ۷۳
۲-۱۳-۸- چالش پرنده ها با ویروس زنده..... ۷۳
۲-۱۳-۹- ارزیابی چالش و کارایی واکسن..... ۷۳
۲-۱٤- مخلوط کردن عصاره ها با ویروس غیر فعال در مطالعه دوم..... ۷٤
۲-۱٤-۱- مخلوط انجیر، زیتون و ویروس غیرفعال H9N2..... ۷٤
۲-۱٤-۲- مخلوط انجیر، زیتون، نانوسلنیوم و ویروس غیرفعال H9N2..... ۷٤
۲-۱٤-۳- مخلوط PBS و ویروس غیرفعال H9N2..... ۷۵
۲-۱٤-٤- کشت از مخلوط ها و امولسیون های تهیه شده..... ۷۷
۲-۱٤-۵- آزمایش بیولوژیکی بر روی جوجه ها در مطالعه دوم..... ۷۷
۲-۱٤-٦- تزریق امولسیون های تهیه شده و واکسن تجاری آنفلوانزا..... ۷۸

۲-۱٤-۷- خون گیری قبل از چالش..... ۷۹

۲-۱٤-۸- چالش پرنده ها با ویروس زنده..... ۷۹

۲-۱٤-۹- ارزیابی چالش و کارایی واکسن..... ۸۰

فصل سوم..... ۸۱

نتایج..... ۸۱

۳-۱- میزان EID50..... ۸۱

۳-۲- غیر فعال سازی ویروس..... ۸۲

۳-۳- بررسی آلودگی میکروبی عصاره ها و نانو سلنیوم..... ۸۲

۳-٤- نتایج آزمایش HI در مطالعه اول..... ۸۲

۳-۵- نتایج آزمایش HI در مطالعه دوم..... ۸۵

۳-٦- نشانه های درمانگاهی پس از چالش در مطالعه اول و دوم..... ۸۸

فصل چهارم..... ۹۲

بحث و نتیجه گیری..... ۹۲

پیشنهادات..... ۹۹

منابع..... ۱۰۱

چکیده انگلیسی..... ۱۱۰

فهرست تصاویر، جداول و نمودارها

جدول ۱: برنامه واکسیناسیون جوجه ها در مطالعه اول ۷۲

شکل ۱ : عمل هموژنیزاسیون با دستگاه هموژنایزر ۷۶

شکل ۲ : لوله های آزمایش حاوی امولسیون های تهیه شده ۷۶

جدول ۲ : برنامه واکسیناسیون جوجه ها در مطالعه دوم ۷۸

شکل ۳ : چالش پرنده با ویروس زنده از طریق قطره چشمی ۷۹

نمودار ۱ : نتایج حاصل از کشت ویروس با رقت های مختلف ۸۱

جدول ۳ : میانگین نتایج آزمایش HI در مطالعه اول ۸٤

نمودار ۲ : میانگین نتایج آزمایش HI در مطالعه اول ۸۵

جدول ٤ : میانگین نتایج آزمایش HI در مطالعه دوم ۸۷

نمودار ۳ : میانگین نتایج آزمایش HI در مطالعه دوم ۸۸

شکل ٤ : التهاب ملتحمه چشم و سینوزیت به همراه پرهای ژولیده ۹۰

شکل ۵ : مدفوع سبز رنگ که نشان از کاهش اشتها می باشد ۹۰

شکل ٦ : ترشحات منخرینی به همراه کسالت پرنده ۹۱

شکل ۷ : تنفس دهانی به همراه التهاب ملتحمه چشم ۹۱

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- مقدمه

نام آنفلوانزا در حقیقت از تلاش اولیه ای که برای تعریف این ویروس صورت گرفته مشتق شده است. در قرن چهاردهم میلادی در شهر فلورانس ایتالیا در یک گردهمایی تاثیر ستارگان بر بیماری مورد بحث و بررسی قرار گرفت و معنای کلمه influence به معنای تاثیر، برتری و یا تفوق می باشد؛ این بیماری به همین نام اسم گذاری شد که در قرن حاضر هم به تلفظ ایتالیایی به آن آنفلوانزا (influenza) می گویند[رفیعی سیدعلیرضا، ۱۳۷۸، آنفلوانزای طیور، انتشارات نوربخش]. این بیماری را قبلا با نام طاعون پرندگان می شناختند.

آنفلوانزا یک بیماری بسیار واگیر ویروسی است که در پرندگان، انسان و سایر پستانداران مشاهده می شود. عامل بیماری متعلق به خانواده ارتومیکسوویریده است که اولین بار در سال۱۹۳۳ جدا و شناسایی شد[۱-۲]. تحت تیپ H9N2 آنفلوانزای پرندگان که ویروسی با بیماریزایی ملایم است طی سالهای ۱۹۹۹-۱۹۹٤ در دنیا منتشر شد[۳]. در ایران اولین بار در سال ۱۳۷۷ هجری شمسی از منطقه تهران و قزوین و در سال بعد آن از کلیه استان های کشور بجز گیلان، مازندران، گلستان و اردبیل گزارش گردید. تکامل سروتیپ H9N2، ارتباط ژنتیکی با تحت تیپ H5N1 ویروس آنفلوانزای پرندگان[٤]، که

مـــی توانـــد طیـــور و انســـان را آلـــوده کنـــد و همچنـــین جداســـازی ویـــروس هـــای H9N2 از انسان[۵-۶]، بر اهمیت کنترل ویروس های H9N2 در طیور تاکید می کنند.

بـرای کنتـرل بیمـاری آنفلـوانزا واکسـن هـای متعـددی سـاخته شـده اسـت و واکسیناسـیون طیـور در سـال هـای اخیـر بـا واکسـن هـای روغنـی غیـر فعـال بـرای کنتـرل ویـروس هـای آنفلوانزای پرنـدگان بخصـوص ویـروس هـای بـا بیمـاریزایی ملایـم در حـال افـزایش اسـت و در ایـران نیـز از سـال ۱۳۷۸ بـدنبال شـیوع بیمـاری آنفلـوانزا تحـت تیـپ H9N2 از واکسـن هـای روغنـی غیـر فعـال(هومولـوگ) اسـتفاده مـی شـود؛ ولـی اکثـر واکسـن هـای تجـاری آنفلـوانزای پرندگان تنها از بـروز علائـم کلینیکـی و بـروز تلفـات جلـوگیری مـی کننـد و مـانع عفونـت نمـی شوند[۷]. کنترل ناقص ویـروس هـای آنفلـوانزای بـا بیمـاریزایی ملایـم و گـردش ویـروس هـا در مرغـداری ممکـن اسـت زمینـه را بـرای تغییـرات آنتـی ژنیـک فـراهم کنـد و احتمـالا منجـر بـه افزایش بیماریزایی آنها شود.

با توجـه بـه اهمیـت کیفیـت واکسـن هـای آنفلـوانزا، در ایـن مطالعـه تـاثیر نـانوذره سـلنیوم و مخلوط عصـاره هـای انجیـر و زیتـون بـر ایمنـی زایـی ویـروس غیـر فعـال آنفلـوانزای پرنـدگان تحت تیپ H9N2 مورد بررسی قرار می گیرد.

۱-۲- تعریف بیماری آنفلوانزای پرندگان

آنفلوانزا یک بیماری بسیار واگیر ویروسی است که در پرندگان، انسان و سایر پستانداران مشاهده می شود. عامل بیماری متعلق به خانواده ارتومیکسوویریده است که اولین بار در سال۱۹۳۳ جدا و شناسایی شد[۱-۲]. ویروس های آنفلوانزای پرندگان در خانواده ارتومیکسوویریده، با جنس آنفلوانزا ویروس تیپ A طبقه بندی می شوند. ویروس های تیپ BوC تنها انسان را عفونی می کنند اما تیپ

A ویروس آنفلوانزا انسان، اسب، خوک، سایر پستانداران، وگستره وسیعی از پرندگان اهلی و وحشی را در گیر می کند. با این وجود پرندگان آبزی وحشی[1]، مرغ نوروزی(یاعو)[2]، و پرستوها[3] به عنوان میزبان های طبیعی این ویروس مطرح هستند. پرندگان گالی فرم(عمدتا جوجه ها وبوقلمون ها) و گونه های پستان دار میزبان غیر طبیعی برای عفونت آنفلوانزا محسوب می شوند[۸]. به عبارت دیگر پرندگان آبزی با زندگی آزاد میزبان های طبیعی و مخازن تحت تیپ های ویروس آنفلوانزا تیپ A می باشند[۹]، و تطابق ویروس به این میزبان ها موجب عدم حدت آن شده است که با ایجاد حالت مخزن، تکثیر ویروس را تقویت می کند[۱۰].

۱-۳- بیماری آنفلوانزای پرندگان به عنوان یک بیماری مشترک

امروزه باور بر این است که آنفلوانزا یک بیماری مشترک بوده و ویروس های آنفلوانزای پرندگان در پیدایش آن نقش دارند[۱۱]. آنفلوانزای مرغی که در سال ۱۹۹۷ در هنگ کنگ رخ داد، اولین باری بود که بیماری شدید انسانی از یک ویروس خالص پرنده ای ثبت شد[۱۱]. عفونت های شدید و اغلب کشنده در انسان های عفونی شده با برخی از ویروس های آنفلوانزای پرندگان با بیماری زایی بالا با تحت تیپ H5N1 آسیایی گزارش شده است و التهاب ملتحمه چشم(کانجکتیویت)، نشانه های شبه آنفلوانزا و موارد نادر کشنده بعد از عفونت با برخی ویروس های H7 گزارش شده است. همچنین عفونت های H9 در انسان ها گزارش شده است که این عفونت ها عموما بدون علائم یا از نظر بالینی

[1] Wild waterfowl
[2] gulls
[3] shorebirds

غیرقابل تشخیص از آنفلوانزای انسانی ظاهر می شوند[۱۲]. در سال ۱۹۹۹ در هنگ کنگ تحت تیپH9N2 ویروس از دو بچه با علائم بیماری تنفسی جدا سازی شد[٦].

از آنجایی که دو تحت تیپ پاندمی اول (یعنی H2N2 در سال ۱۹۵۷ و H3N2 در سال ۱۹٦۸) از ویروس های LPAI[1] مشتق شده بودند[۱۳]، لذا در آینده ویروس با بیماری زایی پایین با تحت تیپ H9N2 می تواند کاندیدای مهمی برای پاندمی آنفلوانزای انسانی باشد[۱٤]. امروزه ویروس های آنفلوانزای A تحت تیپ H9N2 در طیور آسیا بومی است و بیماری شبه آنفلوانزای ملایم انسانی گزارش شده است[۱۱]. ویروس های H9N2 که اخیرا در کره جداسازی شده اند بدلیل بازآرایی و دریفت آنتی ژنی بطور بالقوه قادرند در پستانداران عفونت ایجاد کنند[۱۵]. تکامل سروتیپ H9N2، ارتباط ژنتیکی با تحت تیپ H5N1 ویروس آنفلوانزای پرندگان[٤]، که می تواند طیور و انسان را آلوده کند و همچنین جداسازی ویروس های H9N2 از انسان[۵-٦]، بر اهمیت کنترل ویروس های H9N2 در طیور تاکید می کنند[۱٦]. شواهد ژنتیکی نشان داده که چهار همه گیری انسانی آنفلوانزا که در قرن گذشته رخ داده و موجب ابتلا و مرگ و میر های قابل توجهی شده، سویه های ویروسی آنها به طور کامل و یا بخشی از آنها از ویروس های آنفلوانزای پرندگان مشتق شده اند[۱۷-۱۹] و به نظر می رسد اکثر عفونت های انسانی حاصل تماس مستقیم با طیور مریض ویا مرده باشد، اما از طریق سایر راه های انتقال هم امکان پذیر است[۱۲].

[1] Low pathogenic avian influenza

۱-٤- بیماری آنفلوانزا در طیور ایران

آنفلوانزای پرندگان یکی از مخرب ترین بیماری های ویروسی در صنعت طیور می باشد و پخش جهانی دارد که اکثر گونه های پرندگان اعم از اهلی و وحشی می توانند با این ویروس آلوده گردند[۲۰]. تحت تیپ H9N2 آنفلوانزای پرندگان که ویروسی با بیماریزایی ملایم است طی سالهای ۱۹۹۹-۱۹۹٤ در دنیا منتشر شد[۳]. در ایران اولین بار در سال ۱۳۷۷ هجری شمسی(۱۹۹۸میلادی) از منطقه تهران و قزوین و در سال بعد آن از کلیه استان های کشور بجز گیلان، مازندران، گلستان و اردبیل گزارش گردید. اپیدمی آنفلوانزای پرندگان را که دکتر نیلی و همکاران در مزارع جوجه گوشتی کشور ایران در سال ۱۹۹۸ گزارش کردند، مرگ ومیر در مزارع درگیر ۲۰-٦۰٪ گزارش شد که تصور می شود عفونت های مخلوط با ویروس برونشیت عفونی و مایکوپلاسما گالی سپتیکوم عامل این میزان بالایی از مرگ ومیر باشد[۲۱]. بعد از اولین طغیان آنفلوانزای پرندگان در ایران در اواخر۱۹۹۷ مقادیر مختلفی از مرگ ومیر(۰-۳۰٪) گزارش شده است[۲۲]. تحت تیپ H9N2 برای اولین بار توسط وصفی مرندی و بزرگمهری فر جداسازی شد که این تحت تیپ باعث خسارات زیادی در صنعت طیور گشت و همچنین نشان دادند که سویه های موجود در ایران آنفلوانزای پرندگان با بیماری زایی پایین یا non-HPAI[1] هستند[۲۳-۲٤].

[1] Non-highly pathogenic avian influenza

۱-۵- خانواده ارتومیکسوویریده

ویروس های این خانواده واجد RNA ، پوشش دار با ژنوم تک رشته ای با مفهوم منفی بوده و هشت قطعه ای می باشند[۲۵]. ویریون ها به صورت تیپیک کروی تا چند شکلی هستند اما به فرم رشته ای نیز دیده می شوند. سطح این ویروس توسط دو نوع زائده گلیکوپروتئینی پوشیده شده است: ۱)ترایمرهای میله ای شکل هماگلوتینین(HA)[1] و ۲)ترامرهای قارچی شکل نورآمینیداز(NA)[2]. لیپیدها هم در پوشش ویروس حضور دارند که از سلول میزبان مشتق شده اند[۲۶].

ویروس های آنفلوانزا ده تا پروتئین ویروسی تولید می کنند که به سه دسته اصلی تقسیم می شوند: پروتئین های سطحی، پروتئین های داخلی و پروتئین های غیرساختاری که در داخل ویروس بسته بندی نمی شوند. پروتئین های سطحی شامل پروتئین های هماگلوتینین(HA)، نورآمینیداز(NA)، و ماتریکس۲(M2) میباشند. پروتئین های داخلی شامل سه پروتئین پلی مراز (PA,PB1,PB2)، نوکلئوپروتئین، ماتریکس۱(M1)، و پروتئین غیرساختاری۲(NS2) می باشند. پروتئین غیرساختاری۱(NS1) تنها پروتئینی است که در داخل ذره ویروسی بسته بندی نمی شود[۸، ۱۰]. در حال حاضر خانواده ارتومیکسوویریده بر اساس واکنش های سرولوژیکی پروتئین های داخلی ویروس، پنج جنس یا تیپ دارد که عبارتند از: ۱)آنفلوانزا ویروس A ۲)آنفلوانزا ویروس B ۳)آنفلوانزا ویروس C ٤)توگوتوویروس ۵)ایزاویروس[۲۵]. در این میان آنفلوانزا ویروس A بر اساس واکنش

[1] Hemagglutinin
[2] Neuraminidase

هـای سـرولوژیک گلیکـوپروتئین هـای سـطحی HA و NA بـه تحـت تیـپ هـای مختلفـی طبقـه بنـدی مـی شـود کـه ۱۶ تحـت تیـپ از همـاگلوتینین و ۹ تحـت تیـپ از نورآمینیـداز مشـخص شده اند[۲۶-۲۷]. بـر اسـاس آنتـی بـادی هـای خنثـی کننـده تولیـد شـده علیـه یـک ویـروس کـه قادر به خنثـی سـازی پـروتئین هـای همـاگلوتینین و نورآمینیـداز همـان نـوع ویـروس مـی باشـند، تحت تیپ های مختلف ویـروس را شناسـایی مـی کننـد کـه در ایـن میـان واکـنش متقـاطع وجـود ندارد[۸].

پـروتئین همـاگلوتینین دو عملکـرد اصـلی دارد، یکـی اینکـه محـل اتصـال گیرنـده ویـروس مـی باشـد و دیگـر اینکـه دارای دُمـین[1] اتصـالی مـی باشـد کـه بـرای رهاسـازی RNA ویروسـی بـداخل سـلول میزبـان ضـروری مـی باشـد. پـروتئین همـاگلوتینین یـک پـروتئین انتگـرال غشـایی گلیکوزیلـه مـی باشـد کـه یـک هومـوتریمر را در سـطح ویـروس تشـکیل مـی دهـد[۸]. حـداقل پنج محل آنتـی ژنـی بـرای ویـروس هـای آنفلـوانزای انسـانی شـناخته شـده اسـت کـه هـر محـل قـادر بـه تولیـد آنتـی بـادی هـای خنثـی کننـده مـی باشـد[۲۸] ، مشـابه ایـن مشـاهدات در مـورد ویـروس H5 آنفلـوانزای پرنـدگان دیـده شـده اسـت[۲۹]. آنتـی بـادی هـای تولیـد شـده علیـه پـروتئین همـاگلوتینین شـاخص اصـلی محافظـت میزبـان در برابـر بیمـاری مـی باشـد[۳۰] و در مـورد طیـور، واکسیناسـیون علیـه آنفلـوانزا اساسـا تحـت تیـپ همـاگلوتینین را مـورد هـدف قـرار مـی دهـد. محافظـت پرنـدگان بـا واکسـن هـای تحـت واحـد[2] کـه تنهـا حـاوی پـروتئین همـاگلوتینین مـی باشـند، اهمیـت پـروتئین همـاگلوتینین در امـر محافظـت را بیشـتر ثابـت مـی کنـد. تیترهـای آنتـی بـادی علیـه پـروتئین همـاگلوتینین عمومـا بـا تسـت غیرمسـتقیم آنتـی بـادی

[1] Domain
[2] Subunit vaccines

یعنی ممانعت از هماگلوتیناسیون(HI) اندازه گیری می شود. تست HI یک تست اختصاصی تحت تیپ می باشد که توانایی سرم مورد آزمایش را در بلوکه کردن هماگلوتیناسیون مقدار ثابتی از ویروس را اندازه گیری می کند. حضور تیتر HI در طیور با محافظت علیه چالش حاد با ویروس های همان تحت تیپ HA در ارتباط است[۸].

پروتئین نورآمینیداز از لحاظ آنزیمی پروتئینی فعال می باشد که تصور می شود در شکافتن اسید سیالیک مهم بوده و امکان رهاسازی ویروس از سطح سلول را فراهم می کند[۸]. همچنین پروتئین نورآمینیداز موجب تولید آنتی بادی خنثی کننده در جوجه ها می شود و واکسن های اختصاصی نورآمینیداز می توانند در برابر چالش با HPAI محافظت کننده باشند[۸, ۳۱-۳۲]. گمان می رود که آنتی بادی علیه پروتئین نورآمینیداز کم اهمیت تر از پروتئین هماگلوتینین باشد، اما به هرحال در موش واکسیناسیون با واکسن DNA که هر دو ژن هماگلوتینین و نورآمینیداز را القا می کرد، موجب محافظت بیشتری شد[۳۳]. واکسیناسیون موش با پروتئین نورآمینیداز مقدار دفع ویروس را کاهش می دهد ولی واکسیناسیون با پروتئین هماگلوتینین دفع ویروس را کاملا متوقف می کند[۳۰].

پروتئین M2 یک پروتئین انتگرال غشایی می باشد که به عنوان یک کانال یونی برای ذره ویروسی عمل می کند. زمانی که ذره ویروس به گیرنده سلول میزبان متصل و اندوسیتوز می شود، بدلیل وجود کانال یونی M2، کاهش PH اندوزوم موجب کاهش PH داخل ذره ویروسی هم می گردد و این فعالیت اتصالی پروتئین هماگلوتینین را به راه می اندازد[۸]. در موش ها آنتی بادی تولید شده علیه پروتئین M2 بطور کامل محافظت ایجاد نمی کند ولی دفع ویروس را کم کرده و تا اندازه ای محافظت از بیماری را فراهم می کند[۳٤-۳٦]. پروتئین M2 به عنوان یک ایمنوژن می تواند مورد

توجه قرار گیرد، چرا که این پروتئین در بین تمام ویروس های آنفلوانزای A محفوظ مانده و یک هدف در معرض را برای سلول های ایمنی[1] فراهم می کند[۳۷-۳۹] و بطور بالقوه می تواند باعث ایجاد محافظت در برابر تمام تحت تیپ های HA و NA بشود[۳٤]. اما به هر حال هیچ کاری دال بر اینکه آنتی بادی علیه پروتئین M2 در طیور محافظت ایجاد می کند، منتشر نشده است[۸].

تغییر مداوم و سریع ویروس آنفلوانزا دریفت آنتی ژنی نامیده می شود و این پدیده موجب توانایی ویروس آنفلوانزا در عفونت مجدد موجود زنده شده و اپیدمی های سالیانه بیماری را ایجاد می کند. فرآیند بازآرایی ژنتیکی که منتهی به ایجاد واریانت آنتی ژنی کاملا جدید می شود، شیفت آنتی ژنی نام دارد[٤۰]. همه گیری های آنفلوانزا که گهگاهی در جمعیت انسانی رخ می دهد حاصل این پدیده شیفت آنتی ژنی می باشد[۹]. بدلیل ویژگی قطعه ای بودن ژنوم ویروس، وقتی که عفونتی از دو ویروس در یک سلول رخ می دهد، آن دو ویروس با یکدیگر ترکیب شده و یک سویه ای جدید که دارای ژنومی بازآرایی شده از قطعات RNA ویروس های قبلی است، ایجاد می شود و این موجب ایجاد ویروسی با تغییرات اساسی در آنتی ژن و بطور بالقوه پاتوژن می گردد که این امر نمونه ای از ایجاد شیفت آنتی ژنی به شمار می رود. تجمع موتاسیون های نقطه ای بدلیل ناپایداری های محیطی منجر به خطای پلی مراز در طی تکثیر ویروس شده وعامل تغییرات جزئی در ویروس یا همان دریفت آنتی ژنی است[۱۰].

[1] Immune competent cells