نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۰ بهار ۱۳۹۵
DOI:10.22034/vj.2016.105734

# بیماری آنفلوانزا: مروری بر مطالعات اپیدمیولوژیک، بیماریزایی و تغییرات ژنتیکی ویروس‌های آنفلوانزای در گردش در ایران در حوزه‌های دامپزشکی و پزشکی در دو دهه اخیر

• محمدحسن حبل الورید
موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی کرج
تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۴ تاریخ پذیرش: شهریور ۹۴
E-mail: hablolvarid@yahoo.com

**چکیده**

در طی دو دهه گذشته دو همگیری شـــدید بیماری آنفلوانزا در کشورمان بروز کرده است. در جریان اولین همگیری که در نیمه اول سال۱۳۷۷ (۱۹۹۸ میلادی) بصورت ناگهانی شایع گردید، بیماری آنفلوانزا ی طیور (ناشی از تحت تیپ $H^9N^2$ ) به سرعت در مرغداری‌های کشـــور گسترش یافت و منجر به تلفات بسیار زیاد و کاهش شدید تولید تخم مرغ و در نتیجه وارد آمدن خسارات اقتصادی بسیار به صنعت طیور کشور گردید. دومین همگیری آنفلوانزا در سال ۱۳۸۸ (۲۰۰۹ میلادی) در جریان همگیری جهانی (Pandemic) بیماری آنفلوانزا در کشورمان بوقوع پیوست که در طی آن آنفلوانزای خوکی (ناشی ازتحت تیپ $H^1N^1$) باعث ابتلاء تعداد کثیری از جمعیت کشـــورمان به بیماری آنفلوانزا گردید که در مواردی منجر به مرگ تعدادی از مبتلایان و همچنین صرف هزینه‌های سنگین درمان و بستری بیماران شد. گرچه این همگیری‌ها از ابعاد مختلفی فاجعه‌وار بود، ولی در عین حال ثمراتی هم دربر داشت! که از جمله آن‌ها می توان به فعال‌تر شدن مراکز مختلف تحقیقاتی کشور در زمینه اجرای مطالعات اپیدمیولوژیک، بیماریزایی و تعیین تغییرات ژنتیکی صورت پذیرفته در عامل بیماری، شناســـایی سویه های در گردش ویروس آنفلوانزا، بررسی نقش و اهمیت پرندگان وحشـــی و مهاجر در بروز همگیریها، راه‌های کنترل، پیشـــگیری و مراقبت از بیماری و همچنین تاسیس آزمایشـــگاه رفرانس آنفلوانزای طیور در موسسه رازی، اشـــاره نمود. این مقاله ضمن مروری بر ادبیات تحقیقات انجام یافته (در ایران) در زمینه بیماری آنفلوانزا در حوزه‌های دامپزشکی و پزشکی (در دو دهه اخیر)، سعی در روشن‌تر نمودن برخی نکات مبهم این بیماری دارد.

**کلمات کلیدی:** آنفلوانزا، همگیری، اپیدمیولوژی، بیماریزایی، تغییرات ژنتیکی

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 110 pp: 17-31

**Influenza disease: a review on epidemiological studies, pathogenesis and genetically alteration upon the avian influenza viruses circulating in Iran, on the field of veterinary medicine and medicine in two recent decades**

*By: Hablolvarid, M.H. (Corresponding Author), Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, IR Iran.*

**Received: April 2015 Accepted: August 2015**

E-mail:hablolvarid@yahoo.com

In two recent decades, two sever outbreak of influenza disease have been occurred in Iran. During first epidemic that was, suddenly, happened in summer 1998, subtype H9N2 Avian influenza virus infection rapidly distributed in chicken breeding farms. The infections caused sever mortality and reduction of egg production as well as huge economic losses. In the second epidemic of influenza, that was occurred following pandemic of pig subtype of H1N1influenza virus, considerable number of people became infected and sick, over the country, which was terminated to death of some of patients and consumption of huge cost due hospitalization and treatment. Although, these epidemics could be considered in different aspects as a disaster, however, they have had some benefits such as: to be activation of different research centers, all over the country, in the field of epidemiological studies, pathogenesis and the genetic alteration of influenza viruses; identifying circulating influenza viruses; studies on the role of wild migratory birds in occurrence of influenza epidemics; Identifying ways to control , treatment and surveillance of the disease; establishment of reference avian influenza virus laboratory in Razi institute.The current article is a review on the literatures of researches on influenza disease, in Iran, in the field of veterinary medicine and medicine in recent two decades. In this way, the author has tried to perform more discussion on some important dark points of influenza disease.

**Key words:** Influenza, Outbreak, Epidemiology, Pathogenesis, Genetic alteration

## مقدمه

بیماری آنفلوانزای طیور Avian influenza (AI) یکی از بیماری‌های مهم تنفسی و واگیر دار طیور است که دارای قدرت انتشار سریع می‌باشد. ویروس‌های آنفلوانزای طیور در خانواده ارتومیکسوویریده (Orthomyxoviridae) و جنس آنفلوانزا (Influenza virus) قرار داشته و دارای ژنوم هشت قطعه‌ای با پولاریته منفی هستند. این ویروس‌ها بر اساس شاخص‌های آنتی ژنیکی موجود در نوکلئوپروتئین Nucleoprotein (NP) و پروتئین ماتریکس Matrix protein (MP) به سه تیپ A ، B و C تقسیم‌بندی شده‌اند. ولی فقط ویروس‌های آنفلوانزا تیپ A هستند که می‌توانند ایجاد عفونت طبیعی در پرندگان نمایند. ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A بر اساس شاخص‌های آنتی ژنیکی موجود در دو گلیکو پروتئین سطحی یعنی هماگلوتینین Hemagglutinin (HA) و نورآمینیداز Neuraminidase (NA) به چندین تحت تیپ مختلف طبقه‌بندی شده‌اند. از نظر حدت و بیماری‌زایی در طیور اهلی، این ویروس‌ها به دو پاتوتیپ (Pathotype) تقسیم‌بندی شده‌اند. گروهی که قادر به ایجاد بیماری و تلفات شدید می‌باشند تحت عنوان ویروس‌های با بیماری‌زایی زیاد Highly pathogenic avian influenza virus (HPAI) و گروهی دیگر که چندان بیماری‌زا نبوده و باعث بروز تلفات زیادی نمی‌شوند، تحت عنوان ویروس‌های با بیماری‌زایی کم Non Highly pathogenic avian influenza virus (nHPAI) طبقه‌بندی می‌شوند (۶۳ و ۹). ویروس‌های با بیماری‌زای کم منجر به ظهور علائم خفیف تنفسی، کاهش تولید تخم مرغ و در بعضی موارد تلفات کم می‌شود. ولی در حضور و تداخل با سایر میکروارگانیسم‌ها و یا شرایط محیطی نا مناسب موجب وخیم‌تر شدن بیماری و تلفات بالا شوند.

## شرح همگیری آنفلوانزای طیور در سال ۱۳۷۷ و بازخوانی برخی از تحقیقات پیشین

در نیمه اول سال ۱۳۷۷ (۱۹۹۸ میلادی) صنعت طیور کشورمان با چالش عظیمی مواجه گردیدکه حاصل آن بروز خسارات اقتصادی بسیار زیاد در این صنعت بود. پیامدها و عواقب ناشی از آن درگیری مدت‌ها است که گریبانگیر صنعت طیور است. اقدامات اولیه در مواجه با همگیری سال ۱۳۷۷ نهایتا منجر به شناسایی عامل اصلی آن، یعنی AIV گردید. ولی همواره این سوال مطرح است که: آیا ویروس آنفلوانزا پیش از آن تاریخ (۱۳۷۷) هم در ایران وجود داشته است و یا اینکه این مهمان ناخوانده به یکباره (از طریق مرزها و یا راه‌های دیگری) به مرغداری‌های کشور هجوم آورده است؟ بازخوانی مقاله صمدیه و همکاران (۱۹۷۵میلادی) توصیف تحقیقی است که آنها بر روی تعداد ۱۰۰۰ نمونه سرم جوجه و ۳۷۵ نمونه سرم بوقلمون انجام دادند. آن محققین سرم‌های اخذ شده را با بکارگیری آنتی ژن محلول (S-antigen) مربوط به ویروس آنفلوانزای T/Ca-lif/5142/66 به روش ایمنو دیفیوژن (Immunodiffusion) آزمایش نموده و گزارش نمودند که ۸/۹٪ نمونه‌های سرم بوقلمون خطوط واضح رسوبی بر علیه آنتی ژن محلول ویروس آنفلوانزا ایجادکرده است. آن‌ها چنین نتیجه‌گیری نمودند که اطلاعات حاصل از مطالعه انجام یافته، تائیدی بر حضور ویروس آنفلوانزای طیور در ایران می‌باشد (۶۷). در گزارش دیگری آقاخان و همکاران (۱۹۹۴ میلادی) در طی مطالعه گسترده‌ای که بر روی

تعداد بسیار زیادی نمونه جمع‌آوری شده در بین سال‌های ۱۹۷۴ تا ۱۹۹۴ میلادی (که بمنظور تشخیص عفونت‌های ویروسی پرندگان در ایران ترتیب داده شده بود) تعداد بسیار زیادی نمونه سرم جوجه‌های تجاری را با بکارگیری سه نوع مختلف از آنتی ژن HA آزمایش مهار هماگلوتیناسیون (Hemaglutination inhibition (HI)) نموده و گزارش وجود تیتر پائین تا متوسط را نمودند ولی این پاسخ‌ها با تجویز آنزیم تخریب‌کننده گیرنده‌ها (Receptor destroying enzyme) بر روی نمونه‌های (سرم) مشابه منفی می‌گردید. بعلاوه آنها هیچ واکنش مثبتی در آزمایش رسوب در ژل آگار (Agar gel precipitation (AGP)) که با بکارگیری آنتی‌ژن نسبتا خالص شده آنفلوانزای تیپ A انجام گردید بود، ملاحظه ننمودند. گرچه در آن مقاله اشاره واضحی مبنی بر وجود یا عدم وجود آنفلوانزا به میان نیامده است. ولی به استناد نتایج بدست آمده می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که آنفلوانزا در ایران وجود نداشته است(۱۸).

## جداسازی و شناسایی عامل همگیری آنفلوانزای طیور در سال ۱۳۷۷

در مقاله حاضر بازخوانی گزارشات چاپ شده در خصوص جداسازی و شناسایی عامل همگیری خسارت‌بار مرغداری‌های ایران (در سال ۱۳۷۷) صرفا بر اساس تقدم و تاخر چاپ آنها در نشریات صورت پذیرفته است. پوربخش و همکاران (۲۰۰۰ میلادی) در طی مقاله‌ای گزارش جداسازی و تشخیص آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 از یک واحد مرغداری تخمگذار در استان تهران با علائم تنفسی، کاهش تخم مرغ و تلفات کم را کرده و آن را A/chicken/Iran/259/1998/H9N2 معرفی و ثبت نمودند. در آن گزارش به این مطلب اشاره گردیده است که مقاله آنها، اولین گزارش از جداسازی ویروس آنفلوانزا در ایران می باشد (۶۳). در گزارش دیگری وصفی مرندی و بزرگمهری فرد (۲۰۰۲ میلادی) شرح جداسازی سه سویه از ویروس آنفلوانزای طیور از نای، ریه و کلواک مرغ‌های تخم گذار، مادر و گوشتی (که با شماره‌های ۱۰۱، ۱۰۲، و ۱۰۳ مشخص شده بودند) در تخم مرغ جنین‌دار را نموده‌اند که در جریان همگیری آنفلوانزا در تابستان سال ۱۳۷۷(۱۹۹۸ میلادی) از گله‌های مرغ گوشتی، تخم‌گذار و مادر جدا شده بودند. آن‌ها با استفاده از یک آنتی بادی مونوکلونال (Monoclonal antibody) ضد نوکلئوپروتئین (Neucloprotein (NP)) ویروس آنفلوانزای تیپ A، حضور ویروس آنفلوانزای طیور در سلول‌های مایع آلانتوئیک را به روش ایمنوفلورسنت غیرمستقیم Indirect immunoflorocent (IF) تائید نمودند. این ویروس‌ها در تست‌های HI و مهار نورامینیداز (Neuraminidase inhibition (NI))، در تحت تیپ H۹N۲ طبقه‌بندی گردیدند. آن‌ها در آزمایشی که بمنظور سنجش بیماری‌زای ویروس‌های جدا شده که با تلقیح مایع آلانتوئیک به جوجه‌های ۴-۳ هفته انجام گردید، هیچ تلفاتی تا ده روز بعد از تلقیح مشاهده ننمودند. بنابراین سویه‌های جدا شده از مرغ‌های تخم گذار، مادر و گوشتی را تحت عنوان nHPAI طبقه بندی نموده و چنین نتیجه‌گیری کردند که جداشدن تحت تیپ و پاتوتیپ‌های مشابه از گله‌های دیگر دلالت بر این مطلب دارد که تحت تیپ H۹N۲ عامل پاتوژن رایجی است که در همگیری بیماری‌های تنفسی در صنعت طیور ایران نقش دارد (۷۳). در مطالعه دیگری وصفی مرندی و همکاران (۱۳۸۹) به بررسی بیماری آنفلوانزای طیور در سال‌های ۱۳۷۲-۱۳۸۳ در طیور صنعتی کشور پرداخته و گزارش نمودند که تمامی ۷۵۰ نمونه سرم اخذ شده (از ۵۵ گله) در سال‌های ۱۳۷۶-۱۳۷۲ فاقد پادتن بر علیه تحت تیپ های H۵، H۷ , H۹ بودند. مقایسه ۳۰۰ نمونه سرمی متعلق به سال‌های ۱۳۸۲-۱۳۷۷ نشان داد که تمامی آنها در آزمایش HI، فاقد پادتن بر علیه H۷N۷ و H۵N۱ و در مقابل ۲۱/۷ درصد سرم‌ها دارای پادتن H۵N۲ و H۹N۲ بودند. در مجموع، آنها چنین نتیجه گیری نمودند که در بین سال‌های ۱۳۸۲-۱۳۷۲ همگیری آنفلوانزای H۵ و H۷ در ایران رخ نداده است (۱۵). گرچه برخی از محققین منشاء اولیه همگیری ویروس آنفلوانزای H۹N۲ که در سال۱۳۷۷ در استان‌های تهران و قزوین بوقوع پیوست را نامعلوم اعلام نمودند (۷۸) ولی نتایج تحقیقات انجام یافته در سال‌های بعد، نشان دادکه سرایت آلودگی آنفلوانزای H۹N۲ به مرغداری‌های ایران به احتمال قوی از طریق کشور پاکستان صورت پذیرفته است (۲۹و ۴۶).

## مطالعات اپیدمیولوژیک علل گسترش سریع آنفلوانزای تحت تیپ H۹N۲، افزایش تلفات و کاهش تولید

گرچه مطالعات انجام یافته بر روی جدایه‌های اولیه ویروس آنفلوانزا H۹N۲ که در طی همگیری سال ۱۳۷۷ بدست آمده بودند دلالت بر کم بیماریزا بود آنها داشت، ولی در اغلب موارد عفونت با این ویروس با تلفات سنگین و کاهش شدید تولید همرا ه بوده است. وصفی مرندی و همکاران (۲۰۰۰ میلادی) در طی مطالعه‌ای به بررسی علل کاهش تولید تخم مرغ، متعاقب همگیری طبیعی آنفلوانزای طیور (۱۹۹۸ میلادی) در یک گله بزرگ مرغ تخمگذار (در سن ۱۲ هفتگی) که در آن سنین مختلف نگهداری می‌شد پرداخته و نتیجه‌گیری نموده اند که ابتلاء همزمان مرغ‌ها به بیماری لارنگوتراکئیت عفونی (Infectious laryngotrachitis (ILT)) و آنفلونزای طیور H۹N۲ می‌تواند تا حدود ۹٪ سبب افزایش تلفات بشود. بعلاوه کاهش تولید تخم‌مرغ در گله‌هایی که قبلا (بطور طبیعی) به بیماری مبتلا گردیده بودند می‌تواند بدلیل ظهور مجدد جدایه‌های مزرعه ویروس آنفلوانزای طیور باشد(۷۵). بمنظور پی بردن به منشاء و کانون‌های ویروس آنفلوانزای طیور H۹N۲ که در طی همگیری سندرم تنفسی در اواخر جولای ۱۹۹۸ میلادی(تیر ماه ۱۳۷۷)، از طیور استان‌های تهران و قزوین جداسازی گردیده بود، وصفی مرندی و همکاران(۲۰۰۲ میلادی) در طی مطالعه‌ای تعداد ۲۳۴۵۴ عدد نمونه خون اخذ شده از گله‌های مرغ گوشتی، تخم‌گذار و مادر را تحت آزمایش‌های HI و جداسازی ویروس قرار دادند. مطاله آن‌ها نشان داد که تعداد استان‌های آلوده از ۶ استان در ماه اگوست ۱۹۹۸میلادی (مرداد ماه ۱۳۷۷) به ۹ استان در سپتامبر (شهریور ماه) و سپس ۱۹ استان در فوریه ۱۹۹۹ (بهمن ماه) رسید. ایشان حمل و نقل غیر قانونی جوجه یک روزه، پولت و همچنین خروس را علت بروز همگیری در سایر استان‌ها اعلام نموده و نقش کامیون‌های حمل کود (که بین استان‌های تهران و قزوین و جنوب کشور فعالیت می‌نمودند) و همچنین حمل مواد غذایی توسط همان کامیون‌ها (بدون شستشو و ضد عفونی) را یکی دیگر از علل بروز همگیری‌های جدید در سایر استان‌ها اعلام نمودند. به اعتقاد این گروه از محققین، منبع اولیه آلودگی ویروس آنفلوانزای H۹N۲ در استان‌های تهران و قزوین نامعلوم می‌باشد. (۷۸) نیلی و اساسی (۲۰۰۳

میلادی) در طی گزارشی به توصیف همگیری آنفلوانزای طیور تحت تیپ ($H^{9}N^{2}$) در بین مرغداری‌های گوشتی ایران در طی سال‌های ۲۰۰۱-۱۹۹۸ پرداخته و میزان مرگ و میر ناشی از آن را ۶۰-۲۰٪ اعلام نموده اند. به اعتقاد آنها علت تلفات بسیار زیاد این همگیری‌ها، عفونت همزمان ویروس آنفلوانزا و عوامل پاتوژن دیگری همانند ویروس برونشیت عفونی (Infectious bronchitis virus (IBV)) و مایکوپلاسما (Mycoplasma) می‌باشد (۵۶). همان محققین (نیلی و اساسی (۲۰۰۲ میلادی)) در تحقیق دیگری به مطالعه و مقایسه علائم بالینی و ضایعات ناشی از ویروس آنفلوانزای $H^{9}N^{2}$ در عفونت‌های طبیعی و تجربی طیور گوشتی پرداخته، ضمن توصیف ضایعات ناشی از بیماری، علائم بالینی ناشی از بیماری (در عفونت‌های طبیعی و تجربی) را مشابه ولی میزان تلفات را در موارد ابتلاء طبیعی بمراتب بشتر از آلودگی تجربی اعلام نمودند. آن‌ها استفاده از واکسن غیرفعال آنفلوانزای $H^{9}N^{2}$ را، در پیشگیری از تلفات جوجه‌های که به طور تجربی با ویروس آلوده (چالش) شده بودند را موثر اعلام نموده‌اند (۵۷). کریمی مداب و همکاران (۲۰۱۰ میلادی) با بررسی وجود کست در نای پرندگان (Bronchial cast) آلوده به ویروس کم بیماریزای $H^{9}N^{2}$ در طی همگیری سال‌های ۲۰۰۶-۲۰۰۱، به بررسی نقش این یافته در بروز تلفات سنگین پرداختند. وی میانگین تلفات را بین ۱۸٪ (سال ۲۰۰۱) و ۱۱٪ (در سال ۲۰۰۶) و میانگین کلی تلفات را در طی ان سال‌ها ۱۳/۵۲٪ اعلام نموده. نتایج مطالعات آنها حاکی از ان است که سابقه واکسیناسیون بر علیه برونشیت عفونی، منطقه جغرافیایی پرورش و همچنین بزرگی گله، ارتباط معناداری با بروز کست در نای دارند. احتمال مشاهده کست در نای جوجه‌های گله‌های ۷ برابر گله‌های غیر واکسینه می‌باشد و در گله‌های کوچک نصف میزان آن در گله‌های بزرگ می‌باشد. آنها چنین نتیجه‌گیری نموده‌اند که واکسن برونشیت عفونی یکی از عوامل اصلی (Risk factor) در افزایش بیماریزایی ویروس کم بیماریزایی $H^{9}N^{2}$ در شرایط مزرعه می‌باشد (۴۷). بنانی و همکاران (۱۳۸۲) جداسازی همزمان باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (*Ornithobacterium rhinotracheal* (ORT)) و ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ $H^{9}N^{2}$ را از طیور صنعتی (برای اولین بار) گزارش نمودند. به اعتقاد آن‌ها همزمانی عفونت این دو عامل بیماریزا ممکن است تا حدودی زیادی توجیه کننده ضایعات و تلفات شدید گله‌های مبتلا به آنفلوانزای طیور نه چندان بیماریزا $H^{9}N^{2}$ باشد. (۲). طرقی و ممیز (۲۰۰۶ میلادی) حدت و بیماریزا بودن ۳ جدایه ویروس آنفلوانزای طیور $H^{9}N^{2}$ (در شرایط مزرعه) که در سال ۲۰۰۰ میلادی از مرغداری‌های شهرهای کرج و هشتگرد (با تاریخچه تلفات بالا و پائین) جداسازی شده بودند را بعلت عفونت همزمان آن‌ها با عوامل پاتوژن دیگر همانند مایکوپلاسما، اشریشیا کلی (*Echerichia coli*)، و باکتری ORT اعلام نمودند(۷۲). عزیزپور و همکاران (۱۳۹۱) در مطالعه‌ای تجربی، بیماریزایی عفونت همزمان ویروس A/chicken/Iran/m.1/2010(H9N2) و باکتری ORT و تمایل این عفونت به بافت‌های مختلف و انتشار آن در بدن جوجه‌های SPF (Specific pathogen free) نژاد لگهورن و همچنین علائم بالینی و ضایعات کالبدگشایی در پرندگان مبتلا را مورد ارزیابی قرار داده و ضمن گزارش علائم تنفسی شدید و بروز تلفات (بمیزان ۱۵٪)، اعلام نمودند که آلودگی همزمان ویروس $H^{9}N^{2}$ و ORT منجر به بروز علائم شدید بالینی و ضایعات کالبدگشایی در جوجه‌های دچار عفونت می‌گردد (۱۰). در مطالعات گودرزی و همکاران (۱۳۹۲) و عزیزپور و همکاران (۲۰۱۳ میلادی) اقدام به بررسی علائم بالینی، ضایعات کالبدگشایی و تیتر آنتی‌بادی بر ضد ویروس A/chicken/Iran/m.1/2010(H9N2) و باکتری ORT، در تلقیح تجربی بصورت همزمان و جداگانه در جوجه‌های گوشتی SPF بررسی نمودند. آن‌ها بمنظور تشخیص ویروس در ارگان‌های مختلف از روش PCR (Plymerase chain reaction) بهره‌برداری نمودند. نتایج تحقیق PCR آن‌ها نشان داد که تلقیح همزمان ویروس و باکتری باعث افزایش مرگ و میر و شدت یافتن علائم بالینی و ضایعات کالبدگشایی و همچنین افزایش تیتر HI می‌شود و چنین نتیجه‌گیری نمودند که باکتری ORT باعث افزایش توانایی تکثیر ویروس آنفلوانزای $H^{9}N^{2}$ و یا تحریک سیستم ایمنی می‌شود (۱۱و ۲۰). در تحقیق عزیزپور و همکاران (۲۰۱۳) مشخص گردید که در صورتی‌که جوجه‌های SPF ابتدا توسط باکتری ORT و پس از آن با ویروس $H^{9}N^{2}$ آلوده شوند هیچ تلفاتی بوقوع نپیوسته و تنها اندکی علائم بالینی و کالبدگشایی در جوجه‌های مبتلا دیده خواهد شد(۱۹). در طی مطاله دیگری وصفی مرندی و همکاران (۲۰۰۷ میلادی) دو گروه جوجه را که از نظر آلودگی به مایکوپلاسما گالی سپتیکوم (*Mycoplasma galisepticum* (Mg)) منفی و مثبت بودند ($Mg^{+}$,$Mg^{-}$) را به روش داخل وریدی و دو گروه مشابه دیگر را با ترکیبی از روش‌های داخل وریدی و داخل چشم و نای بصورت همزمان با سویه A/Chicken/Tehran/ ZMT-173/99(H9N2) (که از کلیه جوجه‌های گوشتی با ۴۰٪ تلفات جدا شده بود) آلوده کرده و اندیس بیماریزایی در تمام گروه‌ها را کمتر از ۱ گزارش نمودند که دلیلی بر کم بیماریزا بودن این ویروس برای جوجه می‌باشد. میزان مرگ و میر در بین گروهای $Mg^{+}$ بمیزان ۱۰ ٪ بیشتر از گروه‌های $Mg^{-}$ بود. آن‌ها وجود کست در نای (Bronchial cast) جوجه‌های تلف شده در روز ۵ بعد از تلقیح در گروه تلقیح شده با هر دو روش تلقیح (داخل وریدی و داخل نای و چشم) را گزارش نموده‌اند. در حالی‌که در جوجه‌های تلف شده در روز ۷ (فقط در گروهی که تزریق وریدی گردیده بودند) ابتلاء شدید کلیه و بافت‌های لنفاوی (بورس و تیموس) گزارش گردیده است. تمایل بافتی به ارگان‌های لنفاوی می‌تواند دلیلی بر خاصیت مهارکننده ایمنی (immunosuppressive effect) سویه $H^{9}N^{2}$ باشد. آن‌ها چنین نتیجه‌گیری نمودند که پیدایش کست در نای و نفریت حاد همراه با رسوب اورات عامل اصلی مرگ و میر در جوجه‌های $Mg^{+}$ است. اثر احتمالی مهار ایمنی ویروس $H^{9}N^{2}$ و همزمانی عفونت با باکتری‌های مایکوپلاسما و باکتری اشریشیا کلی می‌تواند سبب افزایش بیماریزایی بشود (۷۷).

در مجموع با توجه به تحقیقات انجام یافته شواهد کافی جهت این ادعا در دست است که ویروس آنفلوانزای تحت تیپ $H^{9}N^{2}$ به تنهایی قادر به ایجاد تلفات شدید و کاهش قابل توجه تولید تخم‌مرغ نمی‌باشد ولی در شرایط مزرعه همراهی آن با سایر عوامل بیماریزا (باکتریایی و ویروسی) این امکان را به آن می‌دهد که باعث بروز تلفات بسیار زیاد و کاهش شدید تولید تخم مرغ گردد.

## تحقیق در زمینه میزان شیوع آنفلوانزا در واحدهای پرورش طیور

وصفی مرندی و همکاران (۲۰۱۰ میلادی) در طی مطالعه‌ای، به بررسی

وضعیت بیماری آنفلوانزا در صنعت مرغداری ایران در طی سال‌های ۲۰۰۲- ۱۹۹۲پرداخته‌اند. آن‌ها ۱۰۵۰ نمونه سرم را به روش‌های HI و الایزا (Eliza) آزمایش کرده و چنین نتیجه‌گیری نمودند که در طی سال‌های ۲۰۰۲-۱۹۹۲ هیچ مورد همگیری ناشی از ویروس‌های H۷ و H۵ در ایران وجود نداشته است(۷۴). هادی‌پور و گلچین (۲۰۱۱ میلادی) در طی تحقیقی به مطالعه تیتر سرمی آلودگی به ویروس آنفلوانزای $H^{9}N^{2}$ (در جریان همگیری بیماری تنفسی در بین گله‌های جوجه گوشتی در شهرستان دزفول) پرداخته و گزارش نموده‌اند که: با انجام آزمایشHI بر روی ۱۶۰ نمونه سرم (که از تعداد ۸ گله با علائم تنفسی اخذ شده بود)، در ۷۵/۹۵٪ مورد تیتر آنتی‌بادی بمیزان ۷/۳ بر علیه ویروس آنفلوانزا $H^{9}N^{2}$ وجود داشته است(۴۳). در تحقیق دیگری هادی‌پور و همکاران (۲۰۱۱ میلادی) به مطالعه نقش ویروس‌های آنفلوانزا، نیوکاسل و برونشیت عفونی در طی همگیری‌های بیماری‌های تنفسی در گله‌های گوشتی ایران پرداخته و گزارش کرده‌اند که با آزمایش تعداد ۱۶۰ نمونه سرم (که از مجموع ۸ گله جوجه گوشتی (غیر واکسینه) جمع‌آوری گردیده بود) از نظر وجود آنتی بادی ضد ویروس‌های ذکر شده (به روش الایزا و HI)، میزان شیوع سرمی تحت تیپ $H^{9}N^{2}$، نیوکاسل و برنشیت عفونی را بترتیب ۳۱/۲٪، ۱۸/۴۷٪ و ۸۲/۴۳٪ تعیین نموده و چنین نتیجه‌گیری نمودند که ویروس برونشیت عفونی در همگیری بیماری‌های تنفسی گله‌های گوشتی نقش بسیار مهمی دارد(۴۲). در طی مطالعه‌ای که بین سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱ توسط کریمی‌نژاد و مهربانپور انجام گردید (۲۰۱۲ میلادی) آن‌ها با انجام آزمایشات سرمی (الایزا و HI) و ملکولی به روش Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) سعی در تشخیص آلودگی گله‌های مرغ گوشتی (با علائم تنفسی) به ویروس آنفلوانزای طیور در استان فارس نموده گزارش کرده‌اند که در آزمایش RT-PCR، ۲۴ گله مثبت ولی از بین ۳۰۰ نمونه سرم اخذ شده تعداد ۲۷۴ و ۲۶۴ مورد بترتیب در آزمایش الایزا و HI از نظر $H^{9}N^{2}$ مثبت بودند. ولی هیچ مورد مثبتی از تیتر آنتی بادی بر علیه ویروس‌های آنفلوانزای $H^{7}N^{7}$ و $H^{5}N^{1}$ مشاهده ننموده‌اند. نتایج تحقیق آن‌ها بیانگر نقش بسیار مهم ویروس آنفلوانزا $H^{9}N^{2}$ در همگیری بیماری‌های تنفسی در گله‌های طیور تجاری گوشتی استان فارس دارد. بعلاوه مشخص گردید که علیرغم وجود تیتر بالای آنتی بادی بر علیه ویروس آنفلوانزا در گله‌های آلوده (با تلفات بسیار بالا)، آن آنتی بادی‌ها تاثیری کمی در محافظت پرندگان در مقابل بیماری دارد(۴۸). قانعی و همکاران (۲۰۱۳ میلادی) در طی تحقیقی به مطالعه شیوع سرمی آنفلوانزای طیور $H^{9}N^{2}$ در شمال غرب ایران پرداخته و گزارش نمودند که از تعداد ۲۵ گله گوشتی (در کشتارگاه‌های استان آذربایجان غربی)، جمعا تعداد ۳۱۰ نمونه خون جمع‌آوری و آزمایشHI بعمل آوردند. که در نتیجه ۴۰/۶٪ مثبت تشخیص داده شدند. آن‌ها وجود تیتر نسبتا بالای آنتی بادی بر علیه ویروس آنفلوانز در بین گله‌های گوشتی را دلیلی بر نقش مهم این ویروس در کمپلکس بیماری‌های تنفسی در بین گله‌های گوشتی منطقه شمال غرب کشور و احتمالا کل ایران اعلام نموده اند (۳۳).

## تحقیق در زمینه میزان شیوع و نقش پرندگان خانگی در همگیری آنفلوانزای طیور

گرچه توسعه شهرنشینی و تغییر روش‌های زندگی (در سال‌های اخیر) باعث گردیده که پرورش طیور خانگی همانند گذشته‌های نه چندان دور، پررونق نباشد ولی در بسیاری از نقاط کشور و بویژه مناطق روستایی پرورش مرغ و خروس و سایر پرندگان کماکان رایج می‌باشد. به همین علت بررسی میزان شیوع آنفلوانزا در بین پرندگان خانگی، از جنبه‌های مختلف اپیدمیولوژیک و سرایت عفونت به طیور صنعتی اهمیت بسیار زیادی دارد.

هادی‌پور (۲۰۱۰ میلادی) با آزمایش HI ۷۰۰ نمونه سرم جوجه (که سابقه واکسناسیون نداشته و هیچ‌گونه علائم بیماری تنفس نشان نمی‌دادند) میزان تیتر سرمی آنتی بادی ضد ویروس آنفلوانزای $H^{9}N^{2}$ در جوجه‌های خانگی هفت روستای پیرامون دریاچه خزر را اندازه‌گیری کرده و میانگین کلی شیوع سرمی (seroprevalence) را ۷۲/۹۸٪ و حداکثر و حداقل آن را ۷۹/۵٪ و ۶۵٪ گزارش نموده. به اعتقاد وی پرندگان خانگی به علت تماس با پرندگان مهاجر آبزی و همچنین مجاورت با واحدهای پرورش طیور نقش مهمی در انتقال ویروس آنفلوانزا دارند (۳۸). همین محقق (هادی‌پور (۲۰۱۱ میلادی)) در مطالعه دیگری تعداد۲۰۰ نمونه سرم خون اردک و جوجه خانگی در ۴ منطقه شهر شیراز را آزمالش HI میزان شیوع سرمی آنفلوانزای طیور در بین اردک‌ها و جوجه‌ها را بترتیب ۷۸/۴٪ و ۶۲/۹٪ گزارش نموده است. وی چنین نتیجه‌گیری می‌کند که اردک میزبان طبیعی ویروس‌های آنفلوانزای طیور است و نقش مهمی در اپیدمیولوژی عفونت‌های ویروس آنفلوانزای طیور $H^{9}N^{2}$ دارد (۴۰). محمدی و همکاران (۲۰۱۰ میلادی) مطالعه‌ای را در منطقه کوار استان فارس انجام داده و اعلام نمودند که در آزمایش HI، از مجموع ۵۰ نمونه سرم اخذ شده از کبوترهای اهلی آن منطقه ۱۷ نمونه از سرم‌ها (۳۴٪) دارای تیتر آنتی بادی ضد ویروس آنفلوانزای طیور $H^{9}N^{2}$، بمیزان ۵-۲ و یا بالاتر از آن می‌باشند. ولی در آزمایش RT-PCR نمونه‌های مدفوع همان پرندگان، ژنوم ویروس تشخیص داده نشد. آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که علیرغم آلوده بودن درصد بالایی از این پرندگان به ویروس آنفلوانزا، شواهدی کافی مبنی بر انتقال ویروس (از این پرندگان) به مزارع پرورش طیوری که در مجاورت آن‌ها هستند، وجود ندارد (۵۴). در مقاله دیگری هادی‌پور و همکاران (۲۰۱۱) میزان شیوع سرمی تیتر آنتی بادی بر ضد ویروس آنفلوانزای $H^{9}N^{2}$ را در جوجه‌های خانگی (غیر واکسینه ) در اطراف دریاچه مهارلو (استان فارس) را ۸۱/۶٪ تعیین و گزارش نموده است (۴۱). پورصفر و همکاران (۱۳۹۱) در طی مطالعه‌ای به بررسی تحت تیپ‌های ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در اردک‌های بومی استان گیلان پرداخته و گزارش کرده‌اند که در بررسی ۵۵۰ نمونه سواب اخذ شده از کلواک اردک‌ها، RNA ویروس آنفلوانزای پرندگان در هیچ یک از نمونه‌های مورد آزمایش به روش RT-PCR ردیابی نشد. آن‌ها اینگونه نتیجه‌گیری نمودند که: اجرای دقیق برنامه‌های کنترل بیماری آنفلوانزای پرندگان) همراه با روش‌های آموزشی و اجرایی بکار گرفته شده توسط سازمان دامپزشکی کشور و همچنین رعایت مسایل امنیت زیستی در کنترل بیماری در گله‌های اردک در مناطق آلوده به ویروس آنفلوانزای پرندگان تاثیر بسیار خوبی داشته است (۳). در مطالعه سعادت و همکاران (۲۰۱۴ میلادی) که بمنظور تعیین تیتر آنتی‌بادی بر علیه ویروس‌های نیوکاسل و آنفلوانزای ($H^{9}N^{2}$) در بین ماکیان خانگی غیر واکسینه در استان بوشهر از طریق آزمایش۱۵۳۰ نمونه خون انجام گردید، مشخص شد که ۳۹٪ و ۴۰/۱۳٪ از این حیوانات بترتیب دارای تیتر آنتی‌بادی بر علیه ویروس‌های آنفلوانزا $H^{9}N^{2}$ و نیوکاسل می‌باشند که

بیانگر شیوع و گستردگی این دو بیماری در بین طیور خانگی استان بوشهر می‌باشد و با توجه به این واقعیت ضروری است که در استراتژی کنترل بیماری آنفلوانزای طیور خانگی مورد توجه خاص قرار گیرند (۶۴).
با توجه به گزارشات موجود در خصوص آلودگی طیور خانگی به ویروس آنفلوانزا و احتمال سرایت آلودگی از این پرندگان به طیور صنعتی و احتمالا انسان، اکثر محققین بر ضرورت اجرای برنامه‌های مراقبت بیماری آنفلوانزا در طیور خانگی توصیه نموده‌اند.

## تحقیق در زمینه میزان شیوع و نقش پرندگان وحشی در بروز همه‌گیری‌های آنفلوانزای طیور (پرندگان وحشی آزاد در طبیعت)

به منظور تعیین شیوع سرمی آنفلوانزای طیور در بین پرندگان مهاجر آبزی ایران، فریدونی و همکاران (۲۰۰۵ میلادی) با انجام تست الایزای رقابتی (Competitive Eliza) بر روی ۲۱۷ نمونه سرم تهیه شده از ۲۵ گونه پرنده آبزی (در طی سال‌های ۲۰۰۴-۲۰۰۳) اعلام نمودند که در آزمایشات انجام یافته، ۷۷ نمونه از ۱۴ گونه پرنده مختلف مثبت (۳۵/۵٪) تشخیص داده شده است. میزان شیوع در بین راسته غازسانان (Anseriforms) (۶۴٪) به شکل معنادار بیش از غیر غازسانان (۱۲٪) بود. آن‌ها با توجه به میزان بسیار بالای موارد مثبت(۸۷/۵٪) در بین اردک‌های وحشی (mallard) که به تعداد بسیار زیاد فصل زمستان را در ایران می‌گذرانند نتیجه‌گیری نمودند که این گونه احتمالا نقش بسیار مهمی در اپیدمیولوژی ویروس انفلوانزا در این منطقه ایفا می‌نمایند(۳۱). در جریان مطالعه دیگری که همین محققین (فریدونی و همکاران (۲۰۱۰ میلادی)) بمنظور آگاهی از میزان آلودگی پرندگان مهاجر آبزی زمستان گذران (در ایران) به ویروس‌های آنفلوانزای طیور انجام دادند، از تعداد ۱۱۴۶ پرنده (در طول سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۷) نمونه‌برداری کرده و اطلاعات مهمی در خصوص میزان شیوع ویروس‌های آنفلوانزای کم بیماریزا (LPAIV) در پرندگان وحشی و بویژه پرندگان آبزی ساکن در مرداب‌های اطراف دریاچه خزر بدست آوردند. آن‌ها میزان کلی آلودگی در این پرندگان را ۳/۴۹۶٪ و در برخی مناطق و نژادها تا ۸/۳٪ گزارش نموده‌اند. اردک‌های وحشی (Mallard) و تیل (Teal) بترتیب بالاترین میزان آلودگی را در آزمایشات ویروس‌شناسی (۴۳٪ و ۲۶٪) و سرمی (۲۴٪ و ۴۶٪) نشان دادند. بنظر می‌رسد که این دو گونه نقش بسیار مهمی در اکولوژی و تداوم ویروس‌های آنفلوانزا در این منطقه داشته باشند (۳۰).
بر طبق گزارشات موجود در سال‌های اخیر حیات وحش ایران حضور ویروس‌های آنفلوانزای بسیار بیماریزا در بین پرندگان وحشی آبزی را تجربه نموده است. خوشبختانه با اتخاذ تصمیمات به موقع از سرایت بیماری به واحدهای پرورش طیور جلوگیری بعمل آمده است. در همین ارتباط شوشتری و همکاران (۲۰۰۸ میلادی) عامل مرگ و میر قوهای وحشی در مناطق شمالی ایران (که در فوریه سال ۲۰۰۶ بوقوع پیوست) را با اجرای آزمایشات هیستوپاتولوژیک، ایمنوهیستوشیمیایی و ملکولی (RT-PCR) و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک (Phylogenetic Analysis) ابتلاء به آنفلوانزای فوق حاد H۵N۱ اعلام نمودند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک پروتئین‌های HA نشان داد که قرابت نزدیکی بین ویروس Z/101(H5N1) با ویروس‌های H۵ که از مناطق مختلف جغرافیایی از گربه، اردک وحشی، شتر مرغ، جوجه و بوقلمون جدا گردیده، وجود دارد. به اعتقاد آنان شباهت زیاد ردیف پروتئین HA در ویروس‌های آنفلوانزای H۵N۱ که از مناطق مختلف دنیا جدا شده‌اند بیانگر آن است که پرندگان وحشی آبزی نقش اساسی در گسترش این ویروس‌ها (در سراسر دنیا) را دارند (۶۹). کرد و همکاران (۲۰۱۳ میلادی) در طی مطالعه‌ای اقدام به تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ژن NA تحت تیپ H۵N۱ ویروس آنفلوانزا که در سال ۱۳۹۰ در ایران تشخیص داده شده بود نموده و چنین نتیجه‌گیری نمودند که: این ویروس شباهت بسیار زیادی به ویروس H۵N۱ دارد که در سال ۲۰۱۰ در مغولستان جدا گردیده بود. به اعتقاد این محققین این ویروس توسط پرندگان وحشی مهاجر از آن منطقه به ایران وارد شده است(۵۱). مهربانپور و همکاران (۲۰۱۲) در طی مطالعه‌ای به بررسی ویروس آنفلوانزا در بین پرندگان وحشی ساکن و مهاجر بوشهر، در فصل مهاجرت پرداخته و با ۴۴۳ مورد نمونه‌برداری از مدفوع این پرندگان و جستجوی نوکلئوپروتئین (NP) ویروس آنفلوانزای طیور از طریق آزمایش RT-PCR و در ادامه تعیین تحت تیپ‌های H۹ و H۷ و H۵ (بر روی موارد مثبت تشخیص داده شده) چنین نتیجه‌گیری نمودند که: ویروس‌های جدا شده؛ در آزمایش RT-PCR و جداسازی ویروس تحت تیپ کم بیماریزای H۹ تشخیص داده شده است ولی هیچ موردی از آلودگی به ویروس‌های بسیار بیماریزا دیده نشد. از سه مورد مثبت، دو مورد از مرغ نوروزی (slender-billed gulls) ساکن در تالاب هله و یک مورد از اردک وحشی (Mallard) شکار شده جدا گردیده بود (۵۳). در مطالعه دیگری که کرد و همکاران (۲۰۱۴ میلادی) بمنظور تعیین خصوصیات ملکولی ژن‌های گلیکوپروتئین سطحی دو جدایه ویروس آنفلوانزای طیور H۵N۱ بسیار بیماریزا (A/Chicken/Iran/271/2011 و A/Duck/Iran/178/2011) انجام دادند ضمن تعیین ردیف نوکلئوتیدهای (sequencing) ژن‌های HA و NA و رسم درخت فیلوژنتیک نشان دادند که این دو ویروس بسیار شبیه یکدیگر هستند و ارتباط بسیار نزدیکی به ویروس آنفلوانزای طیور H۵N۱ بسیار بیماریزای جدا شده در مغولستان دارند. آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که ورود ویروس آنفلوانزای بسیار بیماریزای H۵N۱ (جدا شده در مغولستان) به ایران، از طریق پرندگان وحشی آلوده به ویروس انجام گردیده است (۵۰).

## پرندگان وحشی (آزاد و محبوس) در مناطق شهری و پارک‌ها

مجیدزاده و همکاران (۲۰۱۲ میلادی) و قلیانچی لنگرودی و همکاران (۲۰۱۲ میلادی) در طی دو تحقیق که به منظور آگاهی از میزان آلودگی پرندگان وحشی (اردک، گنجشک، طوطی، کلاغ، قو و کبوتر) موجود در پارک‌های شهر تهران به ویروس آنفلوانزا ضمن آزمایش ۱۰۰ نمونه مدفوع (در سال ۲۰۰۹) به روش آزمایش RT- PCR، نشان دادند که ۱۴٪ نمونه‌های مدفوع مربوط به اردک‌ها و گنجشک‌ها مثبت می‌باشند. آن‌ها تاکید بسیار زیادی بر ادامه برنامه مراقبت ویروس آنفلوانزای طیور در بین پرندگان وحشی دارند تا بدین وسیله اطلاعات جدیدی در مورد تحت تیپ‌ها و اپیدمیولوژی (مطالعات فیلوژنتیک) ویروس‌های در گردش بدست بیاید (۵۲ و۳۲). ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۰ میلادی) در تحقیقی تجربی اقدام به آلوده کردن بلدرچین ژاپنی با سویه A/chicken/iran/339/02 (H9N2) (که از مزرعه جدا گردیده بود) نمودند. آن‌ها گزارش کرده‌اند که ۶ روز پس از تلقیح، علائم بالینی بیماری را مشاهده نموده‌اند ولی هیچ مرگ و میری بوقوع نپیوست. مطالعه آن‌ها نشان دادکه دستگاه‌های تنفس و گوارش

بیشتر از سایر اندام‌های بلدرچین درگیر بیماری آنفلوانزا می‌شوند. بعلت دفع ویروس از ارگان‌های بلدرچین، خطر سرایت آنفلوانزا به سایر پرندگان وجود دارد (۲۸).

## تحقیق در زمینه شیوع بیماری آنفلوانزا در دام‌های اهلی

بیش از چهار دهه از انتشار اولین گزارشات در خصوص وجود آنفلوانزا در بین دام‌های اهلی سپری گشته است ولی نویسنده مقاله پیش رو دسترسی چندانی به مقالات مرتبط در این خصوص نداشته است. یکی از معدود گزارشات موجود، مقاله صمدیه و همکاران (۱۹۷۳ میلادی) می‌باشد که در آن حضور ویروس آنفلوانزای (تیپ A) اسبی در ایران را اعلام نمودند (۶۶). در گزارش دیگری صمدیه و شاکری (۱۹۷۶ میلادی) وجود آنفلوانزای خوکی در ایران و ارتباط سرولوژیک آن با آنفلوانزای انسان را گزارش نموده است (۶۸). یکی از جدیدترین تحقیقات انجام یافته در این خصوص مربوط به بدیعی و همکاران (۲۰۱۳ میلادی) می‌باشد که در طی مطالعه‌ای به بررسی عوامل خطرزا و شیوع سرمی آنتی‌بادی ضد ویروس آنفلوانزای تک سمی‌ها ($H^{7}N^{7}$ و $H^{3}N^{8}$) دراستان فارس پرداخته و گزارش نموده‌اند که تعداد ۶۰۰ نمونه سرم اسب را به روش از نظر وجود آنتی‌بادی ضد ویروس به روش الیزای رقابتی مورد آزمایش قرار داده و در ۲/۵٪ موارد مثبت تشخیص داده شده است. این محققین چنین نتیجه‌گیری نمودند که شیوع سرمی آنفلوانزای تک سمی‌ها در جنوب ایران بسیار کم است. ولی با توجه به عدم پوشش واکسیناسیون اسب‌ها توصیه نموده‌اند که به برنامه مراقبت این بیماری توجه خاصی مبذول شود (۲۱).

در مجموع با توجه به اینکه تحقیقات کافی در زمینه شیوع آنفلوانزا در بین دام‌های اهلی صورت نپذیرفته و اطلاع کمی در این خصوص در دسترس می‌باشد، ضروری است که مطالعات بیشتری در این خصوص در سطح ملی انجام پذیرد.

## بررسی بیماریزایی و تمایل بافتی (Tissue tropism) آنفلوانزای تحت تیپ $H^{9}N^{2}$

بمنظور تعیین نوع، شدت و دامنه ضایعات ایجاد شده در جوجه‌های SPF تزریق شده (به روش داخل وریدی) توسط ویروس آنفلوانزای A/Chicken/Iran/259/1998(H9N2) و همچنین تعیین تمایل بافتی آن ویروس، حبل الورید و همکاران (۲۰۰۳ میلادی) در طی تحقیقی اعلام نمودند که نفریت لوله‌ای بینابینی (Tubolointerstitial nephritis) و تورم پانکراس (Pancratitis) مهم‌ترین ضایعات اختصاصی مشاهده شده بوده و آنها NP ویروس را به روش ایمنوهیستوشیمی (Immunohistochemistry (IHC)) در لوله‌های ادراری و همچنین پانکراس ردیابی گردیده است. یافته‌های تحقیق نشان داد که این ویروس در جوجه کم بیماریزا (Low pathogenic) می‌باشد و تمایل به بافت‌های پوششی (Epitheliotrope) دارد (۳۷). همان محققین در تحقیق دیگری (حبل الورید و همکاران (۲۰۰۴ میلادی)) به مطالعه هیستوپاتولوژیک ضایعات ناشی از تلقیح داخل نایی ویروس آنفلوانزای A/Chicken/Iran/259/1998 (H9N2) پرداخته و گزارش نمودند که این سویه کم بیماریزا می‌باشد و تمایل به بافت‌های پوششی دارد و در روش تلقیح داخل نایی تمایل به بافت‌های نای، ریه (Pneumotropic) و کلیه (Nephrotropic) داشته و در آن‌ها ایجاد ضایعه می‌نماید(۳۶). در مطالعات مشابه‌ای هادی پور و همکاران (۱۳۸۷ و ۲۰۱۰ میلادی) به بررسی جراحات هیستوپاتولوژیک و ردیابی آنتی ژن ویروسی در ماکیان گوشتی تلقیح شده با ویروس‌های آنفلوانزای تحت تیپ H9N2A/Chick-en/Iran/SH-110/99 و A/chicken/iran/772/99(H9N2) پرداخته و نتایج مشابه حبل‌الورید و همکاران (۲۰۰۳) را گزارش نمودند (۱۶ و ۳۹). دوستار و همکاران (۱۳۸۸) نشان دادند که ویروس آنفلوانزا (A/chicken/ Iran/ 772/ 2000) H9N2 توانایی القاء آسیب شدید بافتی در دستگاه تنفسی جوجه را دارا می‌باشد. (۵) همان محقیق (دوستار و همکاران (۱۳۸۸)) در طی مطالعه‌ای تجربی، بروز مرگ سلولی در بافت‌های لنفوئیدی جوجه‌های SPF بدنبال آلوده کردن آن‌ها با ویروس آنفلوانزای مرغی-A/chick) H9N2 en/Iran/772/2000) را گزارش نموده‌اند. آن‌ها نتیجه‌گیری کرده‌اند که ویروس آنفلوانزای مرغی سروتیپ $H^{9}N^{2}$ توانایی ایجاد آسیب در بافت‌های لنفوئیدی از طریق القاء آپوپتوز (Apoptosis) و نکروز را دارد (۶). پیش از این نیز همین محقق (دوستار و همکاران ۱۳۸۶) در تحقیق دیگری نشان داده بودند که آن ویروس (در روش تلقیح داخل وریدی) توانایی القاء آپوپتوز در سلول‌های لوله‌های ادراری کلیه جوجه‌های SPF را دارا می‌باشد (۷). بیژن‌زاد و همکاران (۲۰۱۳ میلادی) در طی تحقیقی تجربی از طریق آلوده کردن جوجه‌های SPF با سویه A/chicken/Iran/m.1/2010(H9N2) به روش داخل چشمی، اقدام به بررسی علائم و عوارض بالینی ایجاد شده در جوجه‌ها کرده و گزارش نمودند که هیچ تلفاتی بوقوع نپیوسته و تنها عوارض بالینی خفیفی در آن‌ها بروز کرده است آن‌ها چنین نتیجه‌گیری نمودند که تحت تیپ $H^{9}N^{2}$ یک ویروس کم بیماریزا (Low pathogenic) است و به احتمال قوی عفونت همزمان آن با سایر عوامل بیماریزا (در شرایط مزرعه) منجر به شدت یافتن علائم بالینی و مرگ و میر می‌گردد (۲۴). بروجردی و همکاران (۱۳۸۹) بروزضایعات پاتولوژیک موضعی (در ریه و نای موش‌های BALB/C تلقیح شده (به روش داخل بینی) با ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 (A/Chicken/Iran/B263/ 106) را گزارش نموده‌اند. یافته‌های آنان نشان داد که ویروس آنفلوانزا $H^{9}N^{2}$ می‌تواند در پستانداران بیماری ایجاد بنماید. آن‌ها چنین نتیجه‌گیری نمودند که آلودگی طبیعی انسان با ویروس‌های آنفلوانزای طیور و بروز پدیده نوترکیبی می‌تواند باعث وقوع یک پاندمی جدید بشود (۱).

در مجموع با توجه به مطالعات انجام یافته بنظر می‌رسدکه دلایل کافی جهت کم بیماریزا بودن جدایه‌های ویروس آنفلوانزای $H^{9}N^{2}$ وجود دارد. این ویروس در آلودگی طبیعی و تجربی (داخل نایی و یا داخل بینی) قادر به ایجاد ضایعه در دستگاه تنفس و کلیه جوجه‌ها می‌باشد.

## مطالعه تغییرات ژنتیکی ویروس آنفلوانزای تحت تیپ $H^{9}N^{2}$

### تغییرات ژن HA

طرقی و همکاران (۱۳۸۲) در طی مطالعه‌ای توالی اسیدهای آمینه در محل شکسته شدن(Cleavage site) ژن HA ۳ ویروس آنفلوانزای طیور $H^{9}N^{2}$ که در سال ۲۰۰۰ میلادی از مرغداری‌های شهرهای کرج و هشتگرد (با تاریخچه تلفات بالا و پائین) جداسازی شده بودند را مقایسه نموده و اعلام کردند که تجزیه و تحلیل نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه موید وجود سه ویروس بسیار مشابه ولی متمایز از همدیگر می‌باشد. تجزیه و تحلیل فیلوژنی (Phylogenetic analysis) ۴۵۳ جفت باز محصولات PCR این ویروس‌ها به همراه سایر ویروس‌های گزارش شده از سایر نقاط جهان

نشان داد، ویروس‌های آنفلوانزای طیور ایران رابطه بسیار نزدیکی با یکدیگر داشته و به احتمال فراوان دارای منشاء یکسانند. بیشترین قرابت ژنتیکی این ویروس‌ها به ترتیب با ویروس‌های آنفلوانزای طیور کشور عربستان سعودی، آلمان و پاکستان بود. به اعتقاد این محققین، علیرغم بروز تلفات زیاد در مزارع پرورش، ویروس‌های آنفلوانزای طیور ایران، شبیه به ویروس‌های غیر بیماریزای H۹N۲ گزارش شده از سایر کشورهای اروپائی و آسیائی (به جز کشور چین) بوده و تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در این ویروس‌ها منجر به افزایش حدت آنها نشده است (۹). در مطالعه‌ای که کریمی و همکاران (۲۰۰۴ میلادی) به منظور تعیین ردیف بازها و همچنین مطالعه فیلوژنتیک ژن HA مربوط به جدایه‌های ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H۹N۲ (جداسازی شده در بین سال‌های ۱۹۹۸ الی ۲۰۰۲ در استان تهران) انجام دادند گزارش نمودند که مقایسه ردیف نوکلئوتیدهای ژن HA جدایه‌های ایران در داخل گروه ۹۹-۹۷٪ مشابهت دارد و همچنین در حدود ۹۸٪ با دو جدایه بدست آمده از نوعی طوطی (parakeets) پاکستان که از ژاپن صادر شده بود شباهت (Homology) دارد. مطالعه فیلوژنتیک این محققین نشان داد که منشا آلودگی ویروس آنفلوانزای H۹N۲ در ایران از طریق کشور پاکستان می‌باشد و علت آن عدم وجود مقررات قرنطینه در مرزهای بین‌المللی است. بدلیل مشابهت این جدایه‌ها با جدایه ثبت شده در بانک ژنک (A/quail/HongKong/G1) و گزارش‌های موجود در خصوص مشابهت با سویه‌های آلوده کننده انسان (H۵N۱) آن‌ها توصیه نموده‌اند که به احتمال آلوده شدن انسان توسط جدایه‌های ایرانی ویروس توجه شود (۴۶). بمنظور تعیین قرابت ژنتیکی ویروس‌های جدا شده در ایران، همایونی مهر و همکاران (۲۰۱۰ میلادی) ردیف نوکلئوتیدها و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ژن HA، ۱۰ سویه ویروس آنفلوانزای H۹N۲ جدا شده از جوجه‌های تجاری (در طی سال‌های ۲۰۰۲-۱۹۹۸) را مطالعه نموده و با سویه‌های موجود ویروس H۹N۲ در بانک ژن مقایسه نمودند. تمامی ۱۰ سویه مورد مطالعه دارای ردیف مشابه پروتوتیپ (–R-S-S-R/G-L– ) در محل شکسته شدن هماگلوتیناسیون بودند. ردیف نوکلئوتیدهای ژن HA سویه‌های ایرانی ۹۹/۱٪- ۹۵/۲٪ با هم مشابهت داشتند. آنها بر اساس مطالعه فیلوژنتیک و خصوصیات سویه‌های ویروس H۹N۲ (که در بین سال‌های ۲۰۰۲-۱۹۹۸ در بین گله‌های تجاری ایران در گردش بودند) اعلام نموده‌اند که تمامی آنها از منشاء مشترکی می‌باشند و توانایی تبدیل شدن به سویه‌های بسیار بیماریزا را دارند. بعلاوه همولوگی این سویه‌ها با برخی سویه‌های ویروس H۹N۲ آلوده کننده انسان، خطر سرایت و آلودگی آن‌ها برای انسان را گوشزد می‌کند (۴۴). موسی خانی و همکاران (۲۰۱۰ میلادی) در طی تحقیقی اقدام به تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ژن HA مربوط به ۱۲ سویه از تحت تیپ H۹N۲ ویروس آنفلوانزا (که در طی سال‌های ۲۰۰۵-۲۰۰۳ از گله‌های جوجه در استان‌های مختلف جدا گردیده بود) نموده و اعلام کردندکه تمامی این جدایه‌ها دارای ردیف‌های مشابه در محل شکسته شدن هماگلوتینین می‌باشند. با توجه به اینکه ردیف‌های شناخته شده قابلیت اتصال به گیرنده‌های انسانی را دارا می‌باشد و همچنین وجود آنتی بادی ضد ویروس H۹N۲ در جمعیت‌های انسانی، امکان دارد که این ویروس‌ها توانایی ابتلاء انسان را داشته باشند. به همین دلیل تاکید بسیار بر اجرای برنامه مراقبت (Surveillance) بیماری آنفلوانزای تحت تیپ H۹N۲ نمودند (۵۵).

به استناد مطالعات انجام یافته بر روی ژن HA جدایه‌های ایرانی ویروس آنفلوانزای H۹N۲، بنظر می‌رسد که تمامی آنها از منشاء مشترکی هستند و شباهت زیادی بین آن‌ها و ویروس‌های H۹N۲ جدا شده در سایر نقاط دنیا (بجز کشور چین) وجود دارد. مطالعات ملکولی مبین آن است که تغییرات چشمگیری در آن‌ها و بویژه در ناحیه شکسته شدن پروتئین هماگلوتینین صورت نپذیرفته تا باعث افزایش حدت آنها بشود. ولی بعلت مشابهت این سویه‌ها با سویه‌های آلوده کننده انسان، لازم است که به احتمال آلوده شدن انسان توسط این ویروس‌ها توجه کافی مبذول شود.

## تغییرات ژن NA

به منظور آگاهی از تغییرات احتمالی صورت پذیرفته در ژن NA ویروس‌های آنفلوانزای در گردش در ایران، کیانی‌زاده و همکاران (۲۰۰۷ میلادی) در طی مطالعه‌ای که بر روی ۶ جدایه تحت تیپ H۹N۲ (که از مناطق مختلف جدا شده بودند) انجام دادند، ضمن تجزیه و تحلیل ژنتیکی ژن NA اعلام نمودند که ردیف اسیدهای آمینه در جدایه‌های محلی ویروس آنفلوانزا دچار برخی جابجایی‌ها (Substitution) گردیده ولی هیچ افزایش (Insertion) و یا حذفی (Delition) در آن‌ها بوجود نیامده است. آن‌ها چنین نتیجه‌گیری نموده‌اند که در طول مدت مطالعه، هیچ موتاسیون عمده و چشمگیری در ژن NA ویروس‌های جدا شده (در طول مدت مطالعه) صورت نپذیرفته و مطالعه آن‌ها در موافقت و تائید مطالعات قبلی بر روی ردیف اسیدهای آمینه منطقه شکسته شدن پروتئین HA و همچنین ایجاد عفونت‌های تجربی می‌باشد که در طی آن تحقیقات این ویروس‌ها تحت عنوان ویروس‌های کم بیماریزا (LPAI) تقسیم‌بندی شده بودند(۴۹). نوروزیان و همکاران (۲۰۱۰) در طی مطالعه‌ای ژن NA دو جدایه ویروس آنفلوانزا H۹N۲ که در سال‌های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۶ از مزارع پرورش آلوده جدا شده بودند را کلن کرده و ردیف بازهای آن را تعیین نمودند (Cloned and sequenced). آن‌ها اعلام نمودند که ردیف اسیدهای آمینه این دو جدایه، در ناحیه هم ادزوربینگ (Hemadsorbing(HB)) قدری با یکدیگر و همچنین با دیگر جدایه‌های ایران متفاوت است. هیچ اضافه شدن، حذف و یا کوتاه شدن در ناحیه ساقه ژن NA (NA-Stalk region) ین ویروس‌ها دیده نشد. مطاله فیلوژنتیک آنها نشان داد که ژن N۲ این ویروس‌ها به تحت دودمان (Sublineage) ویروس‌های مشابه ویروس A/Quail/HongKong/G1/97 تعلق دارد. ولی در عین حال در دو گروه مختلف جای گرفته‌اند. بعلاوه تحقیقات آنها نشان داد که ژن N۲ و ردیف (اسیدهای آمینه) پروتئین سویه تازه جدا شده(در سال ۲۰۰۶) تفاوت قابل توجه‌ای با سویه‌ای که قبلا (در سال ۱۹۹۸) جدا شده بود، دارند. آنها چنین نتیجه‌گیری نمودند که این تغییرات می‌تواند باعث بروز تغییرات بیولوژیک و ایمنولوژیک جدیدی در ویروس‌های آنفلوانزا، همانند کاهش اثربخشی (Efficacy) واکسن‌ها، در جوجه‌های ایمن شده گردیده باشد. به همین علت آن‌ها ارزیابی ژن‌های مهم و میزان اثربخشی واکسن‌های مورد استفاده بر علیه تحت تیپ H۹N۲ را توصیه نموده‌اند (۵۸). در مطالعه دیگری وطن‌پور و همکاران (۲۰۱۱ میلادی) اقدام به تعیین خصوصیات ملکولی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ژن NA ویروس‌های آنفلوانزا H۹N۲ (که در طی سال‌های ۱۹۹۸ لغایت ۲۰۰۷ در ایران جدا شده بودند) نموده و گزارش کرده‌اند که: در بررسی ۱۰ نمونه ویروس که در سال‌های فوق از جوجه‌های بیمار (در چندین

گله مختلف) جدا گردیده بودند، ژن گلیکوپروتئن سطحی در بیش از ۹۰٪ موارد مشابه A/Quail/Hongkong/G1/97 (H9N2) lineage می‌باشد و هیچ حذف، افزایش و یا کوتاه شدن در ناحیه پایه نورامینیداز (NA stalk region) آن ایجاد نگردیده است. ناحیه HB در ژن NA دارای ۳ جابجایی اسیدهای آمینه است و با سویه‌های که قبلا در ایران جدا شده بودند تفاوت دارد. همانند بیشتر ویروس‌های H۹N۲ این ده سویه دارای ۷ ناحیه گلیکولیزه می‌باشند. بعلاوه تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک نشان داد که این ویروس‌ها متعلق به تحت دودمان A/Quail/Hongkong/G1/97 (H9N2) lineage می‌باشند (۷۹). سلطانی الوار و همکاران ( ۲۰۱۲ میلادی) در طی مطالعه‌ای که بمنظور تعیین ردیف نوکلئوتیدها و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ژن NA ویروس‌های آنفلوانزای H۹N۲ (که در طی سال‌های ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹ از گله‌های طیور گوشتی جدا شده بودند) انجام گردیده بود، گزارش نموده‌اند که در سال‌های گذشته، ژن NA ویروس‌های آنفلوانزای در گردش در ایران کاملا محفوظ (conserved) بوده است. احتمالا چنین وضعیتی در اجداد سویه‌های اولیه جدا شده در ایران نیز وجود داشته است(۷۰) در تحقیق دیگری بزرگی و همکاران (۲۰۱۲ میلادی) به مطالعه خصوصیات ملکولی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ژن‌های NA و HA مربوط به ۶ سویه یروس آنفلوانزای H۹N۲ (جدا شده از گله‌های طیور گوشتی در ایران در طی سال‌های ۲۰۰۹-۱۹۹۹ میلادی پرداخته و اعلام نمودند که: در ناحیه پایه ژن NA این ویروس‌ها هیچ حذف یا اضافه و یا کوتاه شدن بوقوع نپیوسته. جابجای اسیدهای آمینه در ناحیه HB ویروس‌ها وجود داشته و تفاوت‌های بین این جدایه‌ها و ویروس‌های که در گذشته در ایران جدا شده بودند دیده می‌شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک این سویه‌ها نشان داد که جد (ancestor) مشترک آن‌ها سویه Qa/HK/G1/97 می‌باشد که دارای ژن داخلی ویروس H۵N۱ (virus contributed internal genes of H۵N۱) می‌باشد. آنها بدلیل وجود موتاسیون‌های سریع در ویروس آنفلوانزا H۹N۲ توصیه کرده‌اند که، ضمن اطلاع و پیگیری دائم از تغییرات ردیف اسیدهای آمینه، ضروری است که ارزیابی روش‌های پیشگیرانه و واکسن‌های تولیدی (از طریق آزمایش تغییراتی که می‌تواند سبب بازآرایی در بین ویروس‌های در گردش در بین گله‌های مرغ گوشتی و همچنین جوامع انسانی بشوند) صورت پذیرد(۲۵). نوروزیان و همکاران (۲۰۱۴ میلادی) ضمن مطالعه ملکولی ژن NA متعلق به سه جدایه ایرانی H۹N۲ (جداسازی شده در بین سال‌های ۲۰۱۱-۲۰۱۰) اعلام نموده‌اند یک محل جدید قابل گلیکولیزه شدن در محل اسید آمینه ۳۰۶ یکی از آن سه جدایه تشخیص داده‌اند. و محل‌های آنتی ژنیک سویه‌های ایرانی H۹N۲ در یک الگوی سالیانه تغییر یافته است. ردیف نوکلئوتیدها در سه جدایه مورد مطالعه مشابهت ۹۷-۹۴/۵٪ با جدایه اخیر H۹N۲ پاکستان دارد، در حالیکه این رقم در مورد سویه‌های قبلی جدا شده در ایران ۹۴-۸۹٪ بوده است. آن‌ها چنین نتیجه‌گیری می‌نمایند که جابجایی‌های بسیار انجام یافته در ژن NA سویه‌های که اخیرا جداسازی شده‌اند بر روی بیماریزایی آن‌ها تاثیرگذار است و در نتیجه بسیار ضروری است که بررسی خصوصیات ژنتیکی ویروس‌های آنفلوانزای H۹N۲ ایران در قالب برنامه مراقبت بیماری آنفلوانزای طیور ادامه یابد(۶۰).

مطالعاتی که در فوق به آن‌ها اشاره رفت نشان دهنده آن است که ژن NA در سال‌های اخیر دچار تغییراتی شده و اگر چه در ردیف اسیدهای آمینه پروتئین NA هیچ حذف و یا اضافه شدنی بوقوع نپیوسته ولی برخی جابجایی‌ها (بویژه) در محل HB آن صورت پذیرفته است. جابجایی‌های بسیار انجام یافته در سویه‌های که اخیرا جدا شده‌اند احتمالا می‌تواند بر بیماریزایی این ویروس‌ها اثر بگذارد. بنابراین ضروری است که برنامه ارزیابی روش‌های پیشگیری و آگاهی از میزان اثربخشی واکسن‌های تولیدی مرتبا صورت پذیرد.

## تغییرات ژن M۲

ردیف کامل نوکلئوتیدهای ژن M۲ ویروس آنفلوانزای A/Chicken/Iran/101/98 (H9N2) توسط ابراهیمی و همکاران (۲۰۰۸ میلادی) مورد مطالعه قرار گرفته و میزان همولوگی این سویه با سایر سویه‌های تحت تیپ‌های H۹ و H۵ (موجود در بانک ژن) که از میزبانان و مناطق جغرافیایی مختلف بدست آمده بودند مقایسه شد که در نتیجه ۹۸-۹۲ ٪ مشابهت بین آن‌ها مشاهده گردید. میزان همولوگی ردیف اسیدهای آمینه بین ۱۰۰-۹۷٪ گزارش گردیده (۲۶). آقا حسین فانی و همکاران (۲۰۱۲میلادی) در طی مطالعه‌ای به ارزیابی مقاومت جدایه‌های ویروس آنفلوانزا H۹N۲ (در طی سال‌های ۲۰۰۹-۱۹۹۸) به داروی آمانتادین (Amantadin) پرداخته و دو گروه ویروس، مشتمل بر ۵ نمونه ویروس تحت تیپ H۹N۲ که در محدوده زمانی ۲۰۰۶-۱۹۹۸ و ۲۰۰۹-۲۰۰۷ جداسازی شده بودند را از نظر خصوصیات ملکول پروتئین M۲ (که بیشترین تاثیر آمانتادین بر آن می‌باشد) را تحت آزمایش RT-PCR قرار دادند. به گزارش آن‌ها تمام سویه‌های مقاوم به آمانتادین دارای موتاسیون‌های نقطه‌ای می‌باشند که می‌تواند باعث ایجاد مقاومت به آمانتادین بشود. در آن مطالعه مقاومت دارویی در بین سویه‌های جدا شده در بین سال‌های ۲۰۰۹-۲۰۰۷ گزارش گردیده که به همین دلیل توصیه نموده‌اند که از مصرف خودسرانه داروی آمانتادین(در مزارع پرورش) جهت درمان و یا پیشگیری از تحت تیپ H۹N۲ آنفلوانزا پرهیز شود (۱۷). در طی مطالعه دیگری بشاشاتی و همکاران (۲۰۱۳میلادی) اقدام به بررسی تفاوت‌های ژنتیکی یکی از اولین جدایه‌های ویروس آنفلوانزای طیور H9N2 (Ck/IR/ZMT-101/98) و یکی از آخرین جدایه‌های آن (Ck/IR/EBGV-88/10) نموده و چنین اظهارنظر می‌نمایند که: ژن‌های M و NS جدایه اخیر شباهت بسیار زیادی به جدایه بسیار بیماریزای H۷N۳ (جدا شده در پاکستان) دارد. ولی ناحیه شکست پروتئین HA در این ویروس‌ها دارای دو موتیف (Motif RSSR and KSSR) است که مشابه ویروس‌های LPAIV می‌باشد. ردیف اسیدهای آمینه جدایه اخیر دارای موتاسیون Q۲۲۶L می‌باشد. که مشخصه محل اتصال گیرنده‌های سیالیک اسید در ویروس آنفلوانزای انسان می‌باشد (Human-type sialic acid influenza receptor binding). بعلاوه بروز موتاسیون دیگری منجر به تغییری در در ردیف اسیدهای آمینه پروتئین M۲ گردیده که باعث مقاومت دارویی نسبت به آمانتادین (Amantadin) گردیده است آن‌ها بمنظور آگاهی بیشتر از طبیعت و سیر تکامل (evolution) ویروس‌هائی که عامل همگیری جهانی آنفلوانزا می‌باشند، تاکید بسیار بر اجرای مستمر برنامه مراقبت ویروس H۹N۲ در انسان و طیور (در آینده) نموده‌اند (۲۲).

در مجموع بررسی‌های انجام یافته حاکی از بروز موتاسیون‌های نقطه‌ای در ژن M۲ می‌باشد که می‌تواند سبب القای مقاومت دارویی (ضد داروی

آمانتادین) گردیده باشد. بنابراین تحت هیچ شرایطی نباید خودسرانه از داروی آمانتادین بمنظور درمان و پیشگیری از عفونت آنفلوانزای H۹N۲ استفاده نمود.

## تغییرات کمپلکس ژن‌های ریبونوکلئوپروتئین (Ribonucleoprotein (RNP))

چندین اسید آمینه موجود در کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین ویروس مشتمل بر نوکلئو پروتئین (NP) و پروتئین‌های پلیمراز (PB۱, PB۲, PA) در تنوع میزبانان و همچنین بیماریزایی ویروس‌های آنفلوانزا موثر هستند و به این جهت تحقیقات مختلفی در زمینه این ژن‌ها صورت پذیرفته است. بشاشاتی و همکاران (۲۰۱۳) در طی مطالعه‌ای که به منظور تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی کمپلکس ژن‌های ریبو نوکلئوپروتئین (RNP) دوجدایه ویرس H۹N۲ آنفلوانزای طیور جدا شده از گله‌های طیور تجاری (Ck/IR/ZMT-101/98 و Ck/IR/EBGV-88/10) انجام داده‌اند، گزارش کرده‌اند که این دو سویه در دو تحت دودمان (sub-lineages) مختلف قرار گرفته‌اند ولی از نقطه نظر ژنتیکی شباهت زیادی بین ژن‌های PB۱ و PA و NP سویه Ck/IR/EBGV-88/10 و تحت تیپ H۷N۳ ویروس جدا شده در پاکستان وجود دارد. بیشترین جایگاه‌ها در پروتئین RNP حاوی اسیدهای آمینه میزبان‌های پرنده است. نتایج بدست آمده حاکی از ان است که کمپلکس ژن‌های RNP در سویه‌های ایرانی متحمل بازآرایی (Reasortment) گردیده‌اند (۲۳).

## تغییرات ژن NP

در مطالعه‌ی که جایدری و همکاران (۱۳۸۹) از طریق تعیین توالی و بررسی فیلوژنتیک ژن NP تحت تیپ H۹N۲ ویروس آنفلوانزای پرندگان جدا شده در شهر اهواز انجام دادند، چنین نتیجه‌گیری نموده‌اندکه ویروس‌های آنفلوانزای H۹N۲ از زمان ورود به ایران، یا دچار تحول ژنتیکی شده‌اند و یا اینکه تاکنون زیرگروه‌های مختلفی از این ویروس به کشور وارد شده است (۴).

## تغییرات ژن‌های کمپلکس پلیمراز (PA ,PB۲ ,PB۱)

پازانی و همکاران (۲۰۱۱ میلادی) در بررسی شجره‌شناسی ژن PB۲ جدایه ویروس آنفلوانزای H۹N۲ پرندگان جدا شده از طیور صنعتی استان تهران (طی سال‌های ۲۰۰۱ تا ۱۹۹۸)، گزارش نموده‌اند که منشاء ژن PB۲ جدایه‌های ایرانی متفاوت از جدایه‌های امارات متحده عربی، پاکستان، عربستان سعودی (کشورهای خاورمیانه) و هند می‌باشد. احتمال دارد که اجداد جدایه‌های H۹N۲ ایرانی دچار بازآرایی با سایر تحت تیپ‌ها شده باشند. ردیف نوکلئوتیدها در ژن PB۲ این جدایه‌ها به میزان زیادی به یکدیگر شباهت داشته‌اند (۹۷/۵- ۹۹/۶٪). تشابه بالای توالی نوکلئوتیدهای این پنج جدایه نشان دهنده عدم بروز موتاسیون در ژن‌های آنها در طی سال‌های ۲۰۰۱- ۱۹۹۸ می‌باشد (۶۲). بمنظور تعیین خصوصیات ژن‌های کمپلکس پلیمراز (PB۲ and PA, PB۱) ویروس‌های انفلوانزای طیور H۹N۲ جدا شده در ایران (در طی سال‌های ۲۰۰۹-۱۹۹۹) و همچنین ارتباط ژنتیکی این ویروس‌ها با ویروس‌های جدا شده از سایر نواحی آسیا، سلطانی الوار و همکاران (۲۰۱۲ میلادی) در طی مطالعه‌ای که بر روی ۷ جدایه ویروس (بین سال‌های ۲۰۰۹-۲۰۰۸) که از گله‌های تجاری طیور جداسازی شده بود، چنین نتیجه‌گیری نمودند که؛ جدایه‌های ایرانی ویروس آنفلوانزای H۹N۲ در ایران دچار بازآرایی قابل توجه‌ای (Striking reasortment) گردیده‌اند که در نتیجه آنها منجر به تولید ژنوتیپ‌های جدیدی از این ویروس تولید گردیده است (۷۱).

در مجموع نتایج بدست آمده از تحقیقات انجام یافته حاکی از آن است که ژن‌های کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین (PB۱, PB۲, PA و NP) جدایه‌های ایرانی ویروس آنفلوانزای H۹N۲ در طی زمان، دچار بازآرایی گردیده‌اند.

## تغییرات ژن‌های غیر ساختمانی (NS)

در مطالعه عمادی چاشمی و همکاران (۲۰۱۳ میلادی) ژن‌های غیر ساختمانی (Nonstructural (NS)) مربوط به ۵ سویه (که در طول سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۱۰ جدا شد بودند) کاملا ردیف‌یابی و تجزیه و تحلیل گردید. این ژن و پروتئین‌های آن به عنوان نشانگرهای تشخیصی (Diagnostic marker)، در چرخه زندگی و بیماریزایی مهم هستند. تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای ژن‌های NS جدایه‌های ایرانی نشان داد که به احتمال قوی منشاء آن‌ها (تا سال ۲۰۰۳) از سویه‌های پاکستانی H۷N۳ می‌باشد. در حالیکه از سال ۲۰۰۸ احتمالا از سویه‌های پاکستانی H۹N۲ منشاء گرفته‌اند. گرچه ویروس‌های کم بیماریزای H۹N۲ از سال ۱۹۹۸ تا کنون (در ایران) در چرخش هستند، ولی وجود تنوع اپیدمولوژیک می‌تواند بدنبال اجرای واکسیناسیون‌های گسترده و یا بازآرایی (reasortment) در ژن NS جوجه‌های خانگی و یا مناطق روستایی انجام گردیده باشد (۲۹). نوروزیان و همکاران (۲۰۱۴ میلادی) در طی تحقیقی اقدام به تعیین ردیف بازها و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ژن NS مربوط به ۹ سویه ویروس‌های آنفلوانزای H۹N۲ (که در طی سال‌های ۱۰۱۱-۲۰۰۷ از جوجه در ایران جدا گردیده بودند) نموده و آن‌ها را با سایر جدایه‌های ایرانی ویروس آنفلوانزای طیور موجود در بانک ژن مقایسه نمودند. شباهت بین اولین سویه جدا شده (A/chicken/Iran/ZMT/101/1998) با سویه‌هائی که اخیرا جدا گردیده بودند (۱۰۱۱ -۲۰۰۷) کم می‌باشد (۹۴٪). در مقابل شباهت زیادی بین این سویه‌ها و برخی سویه‌های جدا شده در پاکستان (از نظر ژن NS) وجود دارد. در مطالعه فیلوژنتیک سویه‌هائی را که اخیرا جدا شده بودند در خوشه‌ای مجزا از سویه‌های قبلی جدا شده در ایران قرار داده است و در مجاورت برخی سویه‌های جدا شده در پاکستان واقع گردیدند. پروتئین NS جدایه‌های ایرانی H۹N۲ با سویه بسیار بیماریزای H۵N۱ ایرانی تفاوت دارد. به اعتقاد این گروه از محققین، بدلیل وجود پدیده بازآرایی بین ژن‌های ویروس H۹N۲ و ویروس‌های بسیار بیماریزا و همچنین تغییرات ژنتیکی و جابجای اسیدهای آمینه ویروس‌های آنفلوانزا (که در بیماریزای و همچنین ایمنوژنیسیتی آن‌ها نقش دارند) ضروری است که ادامه دادن به برنامه مراقبت ویروس‌های آنفلوانزا مورد توجه خاص قرار گیرد (۶۱).

## تحقیق و توسعه روش‌های تشخیص، پیشگیری و درمان آنفلوانزای تحت تیپ H۹N۲

### تحقیق و توسعه روش‌های تشخیصی آنفلوانزای تحت تیپ H۹N۲

مرادی و همکاران (۱۳۸۴) ضمن تولید آنتی سرم اختصاصی بر علیه آنتی ژن NA ویروس آنفلوانزای A/chicken/Iran/259/1998/(H9N2) در

خرگوش، به امکان استفاده از آن در آزمایشات تشخیصی ابراز امیدواری نمودند(۱۲). نوروزیان و وصفی مرندی (۲۰۰۷ میلادی) در مطالعه‌ای با بکارگیری روش RT-PCR اقدام به ردیابی ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H۹ در مدفوع جوجه‌های (که بصورت تجربی آلوده شده بودند) نموده و چنین نتیجه‌گیری نموده‌اند که این روش بسیار قابل اعتماد و سریع بوده و می‌توان از آن بجای روش استاندارد (جداسازی ویروس)، برای تشخیص ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H۹ در نمونه‌های مدفوع بهره‌برداری نمود (۵۹). در تحقیق دیگری نوروزیان و همکاران (۱۳۸۷) به مقایسه روشهای RT-PCR و جداسازی ویروس در تشخیص تحت تیپ H۹N۲ آنفلوانزای طیور پرداخته و نتیجه‌گیری نمودند که برای تشخیص و تعیین تحت تیپ ویروس ویروس آنفلوانزای H۹N۲ می‌توان آزمایش RT-PCR را (با بکارگیری آغازگرهای (Primer) اختصاصی H۹) مستقیما بر روی نمونه‌های بافتی انجام داد. به اعتقاد آن‌ها این روش جایگزین مناسبی به جای روش استاندارد جداسازی ویروس بوده و می‌توان از آن در آزمایشگاه‌های تشخیصی و تحقیقی طیور استفاده نمود (۱۴) .صابرفر و همکاران (۲۰۰۷ میلادی) در طی تحقیقی از تکنیک Multiplex Reverse Transcriptase-PCR جهت تشخیص تیپ و تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا (H۵ و H۹) بهره‌برداری نموده و مفید بودن آن روش در تشخیص سریع ویروس‌های آنفلوانزای طیور و تعیین تحت تیپ‌های آن را گزارش کرده‌اند (۶۵). در یک مطالعه تجربی گلچین فر و همکاران (۲۰۱۴ میلادی) نشان دادند که تعیین تیتر آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین غیر ساختمانی (NS۱) به روش الیزا، در تشخیص تفریقی تیتر ناشی از آلودگی و واکسیناسیون ارزشمند است و می‌تواند از این روش در صنعت طیور بهره‌برداری نمود(۳۵).

## تحقیق و توسعه در زمینه واکسیناسیون و دارو درمانی در بیماری آنفلوانزای تحت تیپ H۹N۲

زمانی مقدم و همکاران (۱۳۸۰) در طی تحقیقی تجربی به بررسی ایمنی‌زایی چند نوع واکسن کشته آنفلوانزای تحت تیپ H۹N۲ در جوجه‌های گوشتی پرداخته و گزارش نمودند که در تمامی گروهای واکسینه شده با واکسن کشته آنفلوانزا (تحت تیپ H۹N۲)، دفع ویروسی کاهش یافته بود. واکسن‌های داخلی (ساخت موسسه رازی (RI)) و ساخت دانشکده دامپزشکی تهران (FVM) در مقایسه با واکسن‌های ساخت خارج موجب کاهش بیشتر دفع ویروس شده بودند. بعلاوه گروه‌هایی که با واکسن‌های داخلی آنفلوانزای طیور (FVM و RI) واکسینه شده بودند نسبت به گروه‌هایی که واکسن‌های خارجی آنفلوانزای طیور (Lohmman و Ivaz دریافت نموده بودند سطح بالاتری از آنتی‌بادی (در آزمایش HI) نشان دادند (۸). در تحقیق دیگری وصفی مرندی و همکاران (۲۰۰۲ میلادی) با تهیه واکسن امولسیون روغنی آنفلوانزای طیور، متشکل از ۴ قسمت یاور (Adjuvant) روغنی ISA-70 و یک قسمت آنتی‌ژن غیرفعال شده A/Chickne/Iran/ZMT-101(101)/98(H9N2) توسط فرمالین، جوجه‌های گوشتی و تخم‌گذار ۲ هفته‌ای را به شکل زیر جلدی (+ یک یادآور در پس از ده هفته در طیور تخم‌گذار) واکسینه و در ادامه پس از خونگیری هفتگی و انجام ازمایش HI به بررسی تیتر سرمی اقدام نمودند. نیمی از این جوجه‌ها در سنین ۸ هفتگی (جوجه‌های گوشتی) و ۲۷ هفتگی (جوجه‌های تخم‌گذار) توسط سویه H۹N۲ به روش داخل نایی و داخل وریدی آلوده گردیدند. دو هفته بعد از تلقیح در هر دو گروه آزمایش و همچنین گروه کنترل (غیر واکسنیه) تیتر بالایی ملاحظه گردید. در همین زمان میزان جداسازی ویروس از طریق سواب نای و کلواک (sheding) در جوجه‌های واکسینه کاهش یافته بود. در حالی‌که جوجه‌های غیر واکسینه ۳ روز بعد از چالش بیمار و میزان تخم‌گذاری آنها کاهش یافته بود. این محققین نتیجه‌گیری نمودند که واکسن غیرفعال (امولسیون) روغنی آنفلوانزای طیور H۹N۲ می‌تواند باعث کاهش دفع ویروس و تولید تخم‌مرغ در شرایط مزرعه بشوند(۷۶). در مطالعه دیگری مقدم پور و همکاران (۱۳۸۳) به ارزیابی سطح ایمنی حاصل از مصرف دو نوع واکسن کشته روغنی آنفلوانزای طیور داخلی و وارداتی در گله‌های مرغ مادر پرداختند و اعلام نمودند که اختلاف معناداری بین میانگین هندسی عیار آنتی بادی در بین دو گروه وجود دارد. بعلاوه واکسن تولید داخلی با میانگین هندسی ۳۸/۸ در آزمایش HI در مقایسه با میانگین ۱۴/۷ واکسن وارداتی اثر بخشی بیشتری دارد (۱۳). هوشمند و همکاران (۲۰۱۱ میلادی) در طی مطالعه‌ای به بررسی میزان اثربخش واکسن کشته روغنی آنفلوانزای طیور H۹N۲ ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی بر علیه جدایه‌های رایج در استان فارس پرداخته‌اند. آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که آن واکسن به شکل موثری مانع از نسخه برداری (Replication) و دفع ویروس در جوجه‌های گوشتی می‌گردد (۴۵). در طی تحقیقی ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۲) اعلام نمودند که با اتصال domain انتهای C از مایکوباکتریوم توبرکولوسیس HSP۷۰ به پروتئین ماتریکس آنفلوانزا (M۲e) و بیان آن در باکتری اشریشیا کولی *(E coli)* موفق به ساخت واکسن بسیار موثر نوترکیب (Recombinant) فیوژن پروتئین ۴xM۲e.HSP۷۰c گردیده‌اند که با یک نوبت تزریق داخل عضلانی آن (فرموله شده در بافر F۱۰۵) به موش Balb/C باعث محافظت کامل آن‌ها در مقابل دوز کشنده جدایه‌های ایرانی H۹N۲, H۳N۲, H۱N۱ آداپته شده در موش گردیده‌اند. ولی این واکسن قادر به جلوگیری از کاهش وزن در این حیوانات نبوده است (۲۷). به منظور آگاهی از تاثیر احتمالی واکسیناسیون آنفلوانزا (در جوجه‌های گوشتی) بر میزان بروز بیماری کم خونی عفونی جوجه‌ها ((Chicken infectious anemia (CA)، غلامی آهنگران و جهرمی (۲۰۱۲ میلادی) در طی مطالعه‌ای از تعداد ۲۵ گله واکسینه شده و ۲۵ گله غیرواکسینه و همچنین واکسن‌های مورد استفاده نمونه‌برداری کرده و به روش ملکولی به جستجوی ژن VP۲ ویروس کم خونی عفونی پرداختند. آن‌ها هیچ آلودگی در واکسن‌های مورد استفاد ه و همچنین هیچگونه ارتباط معناداری بین واکسیناسیون بر علیه آنفلوانزا و بروز بیماری کم خونی عفونی جوجه‌ها پیدا نکرده و چنین نتیجه‌گیری کردند که واکسیناسیون آنفلوانزا هیچ تاثیری در افزایش و یا کاهش بروز بیماری کم خونی عفونی جوجه‌ها ندارد (۳۴).

## نتیجه‌گیری

در یک جمع‌بندی کلی و به استناد منابع موجود، گرچه ردپایی از ویروس آنفلوانزای طیور در سال‌های دور در بین طیور کشور مشهود است ولی بنا به دلایلی نامعلومی در سال ۱۳۷۷ به ناگاه همگیری آنفلوانزای H۹N۲ در واحدهای صنعتی پرورش طیور دو استان تهران و قزوین بوقوع پیوست و به سرعت کل کشور را درگیر می‌نماید. شکی نیست که عدم رعایت مقررات قرنطینه (در مرزهای بین‌المللی و استانی) و نکات بهداشتی در

انتشار سریع بیماری نقش اساسی ایفا نموده است. بررسی‌های صورت پذیرفته در سال‌های بعد از آن مشخص نمود که به احتمال قوی منشاء سرایت آلودگی از طریق کشور پاکستان صورت پذیرفته است. علیرغم اینکه جدایه‌های ایرانی ویروس آنفلوانزای H۹N۲ جزء ویروس‌های با بیماریزایی کم طبقه‌بندی گردیده است ولی در شرایط مزرعه با همراهی سایر عوامل بیماریزا (باکتریایی و ویروسی) می‌تواند باعث بروز علائم بالینی شدید و ایجاد تلفات بسیار زیاد و کاهش شدید تولید تخم مرغ بشود. تحقیقات انجام یافته موید آن است که واکسیناسیون بر ضد ویروس آنفلوانزای H۹N۲ در کاهش دفع و یروس و کاهش شدید تولید تخم مرغ مفید می‌باشد. جدایه‌های ایرانی ویروس آنفلوانزای H۹N۲ با گذشت زمان در برخی ژن‌های خود دچار تغییرات ژنتیکی گردیده که می‌تواند باعث تغییر بیماریزای و اثربخشی واکسن‌ها و داروهای مورد استفاده در درمان و پیشگیری از عفونت بشود. ولی تغییرات عمده‌ای در محل شکسته شدن پروتئین هماگلوتینین آن‌ها، مطابق با مشخصه ویروس‌های بسیار بیماریزا صورت نپذیرفته است. پرندگان وحشی در انتشار آلودگی (به تحت تیپ‌های مختلف ویروس آنفلوانزا ) نقش بسیار مهمی ایفا می‌نمایند به همین جهت در اجرای برنامه‌های مراقبت بیماری توجه خاص به این پرندگان توصیه گردیده است. اجرای مداوم برنامه مراقبت بیماری آنفلوانزای طیور در کل کشور و در سطوح مختلف (واحدهای پرورش صنعتی، طیور خانگی و پرندگان وحشی) بمنظور آگاهی از تغییرات ایجاد شده در ویروس‌های در گردش و اتخاذ تصمیمات پیشگیرانه و درمانی مناسب، بسیار ضروری می باشد.

## منابع مورد استفاده


۱. بروجردی، فروزنده.، مرجانمهر، سید حسین.، شوشتری، عبدالحمید.، توسلی، عباس.، میرسلیمی، سید مهدی.، و بهمنی نژاد، محمد علی. (۱۳۸۹). بررسی تجربی تغییرات آسیب شناسی ناشی از ویروس آنفلوانزای H۹N۲ جدا شده از طیور صنعتی ایران در موش BALB/C . مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دوره ۶۵ شماره ۳ صفحه ۲۳۸-۲۳۱.

۲. بنانی، منصور.،ممیز، رضا.، پوربخش، سیدعلی.، گودرزی، حسین.، و بهمنی نژاد، محمدعلی. (۱۳۸۱). جداسازی همزمان اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال و ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H۹N۲ از طیور صنعتی. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران (دانشگاه شیراز). دوره ۳ شماره ۲ ، صفحه ۱۹۸-۱۹۰.

۳. پورصفر، فاطمه.، کریمی، وحید.، چرخکار، سعید.، قلیاچیری لنگرودی، آرش.، و مقصودلو، حسین. (۱۳۹۱). پایش مولکولی تحت تیپ‌های ویروس انفلوانزای پرندگان در اردک‌های بومی: یک مطالعه استانی. مجله تحقیقات دامپزشکی (دانشگاه تهران)، ۶۷ (۴)، صفحه ۳۵۱-۳۴۵.

۴. جایدری، امین.، صیفی آبادی شاپوری، مسعود رضا.، قربان پور نجف‌آبادی، مسعود.، و میاحی، منصور. (۱۳۸۹). تعیین توالی و بررسی فیلوژنتیک ژن NP در ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H۹N۲ جداشده در شهر اهواز. مجله دامپزشکی ایران، دوره ۶ ، شماره ۴، صفحه.

۵- دوستار، یوسف.، مهاجری، داریوش.، و فیضی زنگبار، عادل.(۱۳۸۸). مطالعه آسیب شناسی بافتی تاثیر ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H۹N۲ در دستگاه تنفسی جوجه‌های SPF. دامپزشکی، ۳(۷)، ۱۰-۱.

۶- دوستار، یوسف.، طرقی، رضا.، هاشمی، مهرداد.، و مهاجری، داریوش. (۱۳۸۸). مطالعه تجربی مرگ سلولی در بافت‌های لنفوئیدی جوجه‌های SPF متعاقب عفونت با ویروس انفلوانزای مرغی سروتیپ H۹N۲. فصلنامه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۹ (۲ (پی در پی ۵۶)، صفحه ۸۶-۸۱.

۷- دوستار، یوسف.، طرقی، رضا.، هاشمی، مهرداد.، آبالو، حاجی. (۱۳۸۶). مطالعه تجربی آپوپتوز سلول‌های توبولی کلیه جوجه‌های SPF معاقب عفونت با ویروس آنفلوانزا سروتیپ H۹N۲. مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. دوره ۱۷ شماره ۳، صفحه ۱۳۱-۱۲۷.

۸- زمانی مقدم، عبدالکریم.، بزرگمهری فرد، محمدحسن.، وصفی مرندی، مهدی.، حسنی طباطبایی، عبدالمحمد. (۱۳۸۰). بررسی تجربی ایمنی‌زایی چند نوع واکسن کشته آنفلوانزای طیور تحت تیپ H۹N۲ در جوجه‌ای گوشتی. مجله تحقیقات دامپزشکی ( دانشگاه تهران)، ۵۶ (۳)، ۱۰۷-۱۰۳.

۹- طرقی، رضا.، ممیز، رضا.، و پوربخش، سید علی. (۱۳۸۲). مقایسه توالی اسیدهای آمینه در محل شکسته شدن پروتئین هماگلوتینین سه ویروس انفلوانزای طیور H۹N۲. پژوهش و سازندگی، شماره ۶۰ ، بهار ۱۳۸۲، صفحه ۱۰۳-۹۵.

۱۰- عزیزپور، آیدین.، گودرزی، حسین.، چرخکار، سعید.، ممیز، رضا.، و حبل الورید، محمد حسن. (۱۳۹۱). مطالعه تجربی عفونت همزمان ویروس آنفلوانزای H۹N۲ و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در جوجه‌های SPF. پاتوبیولوژی مقایسه‌ای . سال نهم شماره ۴، صفحه ۸۱۷-۸۲۶.

۱۱- گودرزی، حسین.، عزیزپور، آیدین.، بنانی، منصور.، نوری، عباس.، چرخکار، سعید.، ممیز، رضا.، حبل الورید، محمد حسن.، بیژن زاد، پیمان.، میرضایی، سید غلامرضا.، عشرت آبادی، فاطمه.، و محمودزاده، محسن. (۱۳۹۲). مطالعه علائم بالینی و کالبد گشایی ناشی از آلودگی تجربی با ویروس آنفلوانزای H۹N۲ و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال به صورت انفرادی و همزمان در جوجه‌های SPF. پاتوبیولوژی مقایسه‌ای. سال دهم شماره ۴، ۱۰۸۶-۱۰۷۷.

۱۲- مرادی، مهران.، نظری، علی.، امینیان، مهدی.، و مدنی، رسول. (۱۳۸۴). تهیه آنتی سرم اختصاصی نورامینیداز تحت تیپ H۹N۲ ویروس انفلوانزای طیور. مجله علوم پایه پزشکی ایران. ۸(۳(پیاپی ۲۷)، ۲۱۴- ۲۰۸.

۱۳- مقدم پور، مسعود.، اخویزادگان، محمد علی.، طالب شوشتری، عبد المحمد.، قدسیان ، ناصر.، چرخکار، سعید.، و آقا علیخانی، محمد. (۱۳۸۳). ارزیابی سطح ایمنی حاصل از مصرف دو نوع واکسن کشته روغنی آنفلوانزای طیور داخلی و وارداتی در گله مرغ مادر. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران (دانشگاه شیراز). دوره ۵ شماره ۱ (مسلسل ۹) ، صفحه ۱۶۷-۱۶۳.

۱۴- نوروزیان، حسن ، مهدی وصفی مرندی و مهدی رزازیان. (۱۳۸۷). مقایسه RT-PCR با جداسازی ویروس در تشخیص ویروس‌های تحت تیپ H۹ آنفلوانزای طیور. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۳،شماره ۱، صفحه ۲۲-۱۷.

۱۵- وصفی مرندی، مهدی.، بزرگمهری فرد، محمد حسن.، و چرخکار، سعید. (۱۳۸۹). بررسی سرولوژیک آنفلوانزای طیور در گله های ماکیان ایران در طی سال های ۱۳۸۲-۱۳۷۲ . مجله دامپزشکی ایران (دانشگاه شهید چمران اهواز) . شماره ۶ ( ۱(مسلسل ۲۶))، صفحه ۷۸-۷۵ .

۱۶- هادی پور، محمد مهدی.، نیلی احمد آبادی، حسن.، اساسی، کرامت.، آزاد، فریبرز.، و فرجادیان، شیرین. (۱۳۸۷). بررسی جراحات

هیستوپاتولوژیک و ردیابی آنتی ژن ویروسی در ماکیان گوشتی تلقیح شده با ویروس آنفلوازای طیور H۹N۲. مجله دامپزشـــکی ایران( دانشگاه شهید چمران اهواز) . ۴ (۴ ( مسلسل ۲۱)، صفحه ۷۱-۶۱ .

17- Aghahossein Fanni, A., Barin, A., Moosakhani, F., and Ghalayanchi Langeroudi, A. (2012). Genetical evaluation of resistance to Amantaine in H9N2 influenza virus in Iran between 1998 to 2009. Veterinary Journal (Tabriz), 5(4(20)), 1387-1395

18- Aghakhan, S. M., Abshar, N., Rasoul Nejad Fereidouni, S., Marunesi, C., and Khodashenas, M. (1994). Studies on avian viral infections in Iran. Archive of Razi institute, 44/45, 1-10.

19- Azizpour, A., Goodarzi, H., Charkhkar, S., Momayez, R., and Hablolvarid, M. H. (2013). Study on clinical aspect of SPF chickens infected with *Ornithobacterium rhinotracheale* followed by avian influenza. Euro. J. Exp. Bio. 3(5), 186-189.

20- Azizpour, A., Goudarzi, H., Banani, M., Nouri, A., Hablolvarid, M. H., Abdoshah, M., and Bijanzad. (2013). Evaluation of sign, gross lesions and antibody response in experimental of individual and co-infection of H9N2 avian influenza and *Ornithobacterium rhinotracheal* in SPF chickens. Euro. J. Exp. Bio. 3(1), 503-507.

21- Badiei, K., Pourjafar, M., Samimi, A. S., Ansari-Lari, M., Mohammadi, A., and Ghane, M. (2013). Study on risk factors and serologic prevalence of antibodies against equine influenza virus in the south of Iran. Comp Clin Pathol, DOI 10.1007/s00580-013-1715-7.

22- Bashashati, M., Vasfi Marandi, M., and Saboury, F. (2013). Genetic diversity of early (1998) and recent (2010) avian influenza H9N2 virus strains isolated from poultry in Iran. Archives of Virology, 158(10), 2089-2100.

23- Bashashati, M., Vasfi Marandi, M., Bozorgmehri Fard, M.H., Hemmatzadeh, F., and Sabouri, F. (2013). Genetic and phylogenetic analysis of the ribonucleoprotein complex genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from commercial poultry in Iran. IJVM, 7(3):159-168.

24- Bijanzad, P., Momayes, R., Bozorgmehri Fard, M. H., Hablolvarid, M. H., Mohmoodzadeh, M., Jeyrani Moghaddam, A. R., Kaboli, K., Azizpour, A., and Eshratabadi, F. (2013). Study on clinical aspect of SPF chiken infected with H9N2 subtype of avian influenza. Annals of biological research. 4(3), 81-85.

25- Bozorgi, A., Keyvanfar, H., Shushtari, H., Bahmaninejad, B., and Eshratabadi, F. (2012). Molecular characterization and phylogenetic analysis of hemagglutinin and neuraminidase genes of H9N2 avian influenza viruses isolated in Iran in 1999 and 2009. African Journal of Microbiology Research 6(21), 4550-4556.

26- Ebrahimi, S. M., Aghaiypour, K., Nili, H. (2008). Sequence analysis of M2 gene of avian influenza virus strain (A/Chicken/Iran/101/98 (H9N2)) as an oil vaccine seed. Iranian Journal of biotechnology. 6(4), 238-235.

27- Ebrahimi, S. M., Dabaghian, M., Tebianian, M., Zabeh Jazi, M. H. (2012). In contrast to conventional inactivated influenza vaccines, 4xM2e.HSP70c fusion protein fully protected mice against lethal dose of H1, H3 and H9 influenza A isolates circulating in Iran. Virology, 430(1), 63–72.

28- Ebrahimi, S. M., Nili, H., and Sohrabi, N. (2010). Histopathological evaluation of A/chicken/iran/339/02 (H9N2), an Iranian field isolate of influenza virus, on Japanese quail. World Applied Sciences Journal 9 (2), 226-229.

29- Emadi Chashmi, H., Vasfi Marandi, M., Bozorgmehri Fard, M.H., Bashashati, M., and Barin, A. (2013). Molecular characterization of non-structural gene of H9N2 subtype of avian influenza viruses isolated from broiler chickens in Iran. IJVM, 7(1), 23-34

30- Fereidouni, S. R., Werner, O., Starick, E., Beer, M., Harder, T. C., Aghakhan, M., Modirrousta, H., Amini, H., Kharrazian Moghaddam, M., Bozorghmehrifard, M. H., Akhavizadegan, M. A., Gaidet, N., Newman, S. H., Hammoumi, S., Cattoli, G., Globig, A., Hoffmann, B., Sehati, M. E., Masoodi, S., Dodman, T., Hagemeijer, W., Mousakhani, S., Mettenleiter, T. C.(2010). Avian influenza virus monitoring in wintering waterbirds in Iran, 2003-2007. Virology Journal, 7:43, 1-14.

31- Fereydouni, S. R., Bozorg Mehrfard, M. H., Starick, E., Werner, O., Amini, H., Modir Rousta, H., and Aghakhan, M. (2005). Serological monitoring of avian influenza in migratory birds of Iran. Archive of Razi institute. 60 (1), 11-20.

32- Ghalyanchi-Langeroud, A., Soleimani, M., Karimi, V., Morovati, A.(2012). Molecular surveillance of avian influenza in bird parks of Tehran, Iran. Iranian Journal of veterinary medicine, 6( 3), 165-169

33- Ghaniei, A., Allymehr, M., Moradschend, A. (2013). Seroprevalence of avian influenza (H9N2) in broiler chickens in North West of Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 3(10), 822–824.

34- Gholami Ahangaran, M., and Zia-Jahromi, N. (2012). Chicken anemia virus infection in broiler chickens vaccinated and not vaccinated for avian influenza in Iran. J Appl P oult Res. 21 (2), 413-417.

35- Golchinfar , F., Madani, R., Emami, T., Pourbakhsh, S. A., and Shoushtary, A. H. (2014).Applying conserved peptides of NS1 Protein of avian influenza virus to differentiate infected from vaccinated chickens . Archievs of Razi institute, 69(1), 41-45.

36- Hablolvarid, M.H., Sohraby Haghdost, I., Pourbakhsh, S.A. and Gholami, M. R. (2004). Histopathological study of intratrache-

ally inoculated A/Chicken/Iran/259/1998 (H9N2) influenza virus in chicken. Arch. Razi ins. 58, 51-62.

37- Hablolvarid, M. H., Sohraby Haghdost, I., Pourbakhsh, S. A., and Gholami, M. R. (2003). A study on histopathologic changes in chicken following intravenous inoculation with avian influenza virus A/Chicken/Iran/259/1998(H9N2). Arch. Razi ins. 55, 41-54.

38- Hadipour M. M. Seroprevalence survey of H9N2 avian influenza virus in backyard chickens around the Caspian Sea in Iran. Rev. Bras. Cienc. Avic. 12 (1), 1-4.

39- Hadipour, M. M. (2010). Histopathological study of A/chicken/iran/772/99(H9N2) influenza virus in commercial broiler chicken. BJVM, 13( 1), 38-44

40- Hadipour, M. M. (2011). Serological Evidence of Inter-Species Transmission of H9N2 Avian Influenza Virus in Poultry, Iran. International Journal of Animal and Veterinary Advances, 3(1), 29-32.

41- Hadipour, M. M., Habibi, G. H., and Vosoughi, A. (2011). Prevalence of antibodies to H9N2 avian influenza virus in backyard chickens around Maharlou Lake in Iran. Pak vet J, 31(3), 192-194.

42- Hadipour, M.M., Habibi, G.H., Golchin, P., Hadipourfard M.R., and Shayanpour, N. (2011). The role of avian influenza, newcastle disease and infectious bronchitis viruses during the respiratory disease outbreak in commercial broiler farms of Iran. International Journal of Animal and Veterinary Advances 3(2): 69-72.

43- Hadipur, M. H., and Golchin. (2011). Serosurvey of H9N2 avian influenza virus during respiratory disease outbreak in broiler flock in Dezful, southern Iran. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 14(1), 62−65.

44- Homayunnimehr, A. R., Dadras, H., Shoushtari, A., Pourbakhsh, S. A. (2010). Sequence and phylogenetic analysis of the haemagglutinin genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from commercial chickens in Iran. Tropical Animal Health and Production. 42(6), 1291-1297.

45- Hooshmand, S., Mehrabanpour, M. J., Rahimian Abd, E. (2011). Evaluation of efficiency of killed avian influenza vaccine (produced in Razi vaccine and serum research institute) against current influenza virus isolate in Shiraz, Iran. Jounal of microbial world. 3(4(9)), 215-220.

46- Karimi. V., Bozorgmehri Fard. M. H., Shahbazzadeh, D., Esmaelizad, M., and Pourbakhsh, S. A. (2004). Sequence analysis and phylogenetic study of hemagglutinin gene of H9N2 subtype of avian influenza virus isolated during 1998-2002 In Iran. Iranian Biomedical Journal, 8 (4), 167-172.

47- Karimi-Madab, M., Ansari-Lari, M., Asasi, K., and Nili, H. (2010). Risk factors for detection of bronchial casts, most frequently seen in endemic H9N2 avian influenza infection, in poultry flocks in Iran. Preventive Veterinary Medicine. 95(3–4), 275–280.

48- Kariminejhad, E., Mehrabanpour, M. J. (2012). Serological and Molecular Assays for Detection of Avian Influenza Virus in Broiler Chickens Flocks of Fars Province-Iran. International Journal of Animal and Veterinary Advances. 4(2), 125-129.

49- Kianizadeh, M., Gohar, S. Z., Najafi, M., Toroghi, R., and Pourbakhsh, S. A. (2007). Neuraminidase gene sequence analysis of avian influenza H9N2 viruses isolated from Iran. Archives of Razi Institute, 62 (2), 69-74.

50- Kord, E., Kaffashi, A., Ghadakchi, H., Eshratabadi, F., Bameri, Z., and Shoushtari, A. (2014). Molecular characterization of the surface glycoprotein genes of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses detected in Iran in 2011. Trop Anim Health Prod. 46, 549-554.

51- Kord, E., Shoushtari, A., Ghadakchi, H., Mohammadi, R., and Hadinia, A. (2011). Phylogenetic analysis of neuraminidase gene of avian influenza H5N1 subtype detected in Iran in 1390. Armaghan danesh, 5(5 (77)), 380-388.

52- Majidzadeh-A, K., Ghalyanchi-Langeroudi, A., Soleimani, M., Karimi, V., and Morovati, A. (2012). Molecular Surveillance of Avian Influenza in Bird Parks of Tehran, Iran. IJVM, 6(3), 165-169.

53- Mehrabanpour, M. J., Rahimian, A., Shirazinezad, Al, Moein, H., and Shayanfar, M. A. (2012). Avian influenza virus in migratory and resident birds during migratory season in Boushehr, Iran. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 36, 446-450.

54- Mohammadi, A., Massoudian, M., Nemati, and Y., Seifi, S. (2010).Serological and molucular study of avian influenza subtype H9N2 in domestic pigeons in Kavar area of Fars province, Iran. Iranian veterinary journal. 6(2), 61-66.

55- Moosakhani, F., H. Shoshtari, A., Pourbakhsh, S. A., Keyvanfar, H., and Ghorbani, A. (2010). Phylogenetic analysis of the hemagglutinin genes of 12 H9N2 influenza viruses isolated from chickens in Iran from 2003 to 2005. Avian Diseases, 54(2), 870-874.

56- Nili, H and Asasi, K. (2003). Avian Influenza (H9N2) Outbreak in Iran. Avian Diseases, 47, s3, 828-831.

57- Nili, H., and Asasi, K. (2002). Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. Avian Pathology. 31(3), 247 -252.

58- Noroozian, H., Marandi, M. V., Ghorashi, S.A. (2010). Characterization and phylogenetic analysis of neuraminidase gene in isolated avian influenza viruses of H9N2 subtype from Iran. Journal of Veterinary Research, 65 (4), 311-318.

59- Noroozian, H., Vasfi Marandi, M. (2007). Detection of avian

influenza virus of H9 subtype in the feces of experimentally infected chickens by RT–PCR. Archives of Razi Institute, Vol. 62, No. 4, 181-189.

60- Norouzian, H., Bashashati, M., and Vasfi Marandi, M. (2014). Phylogenetic analysis of neuraminidase gene of H9N2 avian from chicken in Iran during 2010-2011. Iranian Journal of Microbiology, 6(2), 91-97.

61- Norouzian, H., Emadi Chashmi, H., Nazari, Z., and Vasfi Marandi, M. (2014). Phylogenetic analysis of NS gene of avian influenza viruses (H9N2) isolated from chicken in Iran during 2007-2011. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 38, 501-513.

62- Pazani, J., Karimi, V., Bozorgmehri Fard, M. H., Ghalyanchi Langeroudi, A. and Barin, A. (2011). Phylogenetic analysis of PB2 gene of H9N2 subtype of avian influenza viruses isolated from commercial chickens in Tehran province of Iran during 1998-2001. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, 12(4), 324-331.

63- Pourbakhsh, S. A., Khodashenas, M., Kianizade, M., and Goodarzi, H. (2000). Isolation and identification of avian influenza virus H9N2 subtype. Arch. Razi inst. 51, 27-38.

64- Saadat, Y., Ghafouri, S. A., Tehrani, F., and Ghalyanchi Langeroudi, A. (2014). An active serological survey of antibodies to newcastle disease and avian influenza (H9N2) viruses in the unvaccinated backyard poultry in Bushehr province,Iran, 2012–2013. Asian Pac J Trop Biomed. May 2014; 4(Suppl 1): S213–S216.doi: 10.12980/APJTB.4.2014C1293, 1-5.

65- Saberfar, E., Forghani-Fard, M. M., and Mosav, M. (2007). Multiplex reverse transcriptase-PCR assay for typing and subtyping of Influenza A (H5 & H9) virus in Iran. Iranian biomedical journal. 11(2), 69-74.

66- Samadieh, B., Keyvanfar, H., and Maghsoodloo, H. (1973). Presence of equine influenza-A viruses in Iran. Revue de la Faculte Veterinaire, Universite de Tehran. 29(2), 65-76.

67- Samadieh, B., Kargar-Moaakhar, R., Afnan, M. (1975). Demonstration of avian influenza-A virus in Iran by immunodiffusion technique. Avian Diseases, 19(4):689-691.

68- Samadieh, B., Shakeri, F. (1976). Swine influenza in Iran and its serological relationship with human influenza. In: Proc. of 4th International Pig Veterinary Society Congress, Ames, 1976.

69- Shoushtari , A., Hablolvarid, M.H., Vascellari, M., and Hedayati. A. (2008). Mortality of wild swans associated with naturally infection with highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in Iran. Archive Razi institute. 62(4), 207-213.

70- Soltanialvar, M., Shoushtary, H., Bozorgmehrifard, M. H., Charkhkar, S., Akbarnejad, F. (2012). Sequence and phylogenetic analysis of neuraminidase genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from commercial broiler chicken in Iran (2008 and 2009). Trop Anim Health Prod, 44(3), 419-425.

71- Soltanialvar, M., Goodarzib, R., and Akbarnejadad, F. (2012). Genetic analysis of polymerase complex (PA, PB1 and PB2) genes of H9N2 avian influenza viruses from Iran (1999 to 2009). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(11), 858–862.

72- Toroghi, R., Momayez, R. (2006). Biological and molecular characterization of avian influenza virus (H9N2) isolates from Iran. Acta Virologica, 50(3), 163-168.

73- Vasfi Marandi, M and Bozorgmehri Fard, M. H. (2002). Isolation of H9N2 subtype of avian Influenza viruses during an outbreak in chickens in Iran Iranian Biomedical Journal 6 (1), 13-17.

74- Vasfi Marandi, M., Bozorg Mehrifard, M. H., and Charkhkar, S. (2010). A serological study of avian influenza in chicken in Iran (1992-2002). Scientific-research Iranian veterinary journal. 6(1 (26)), 75-78.

75- Vasfi Marandi, M., Bozorg Mehrifard, M. H., Hasani Tabatabaei, A. A. M., Kerdabadi, M., Charkhkar, S., and Farahmandi, M. (2000). Serological monitoring of haemaglotination inhibition antibodies in a multi aged layer farmfollowing avian influenza outbreak due to H9N2 sub-serotype in 1998 in Iran. Jornal of veterinary research. 55(3), 73-81.

76- Vasfi Marandi, M., Bozorgmehri Fard, M.H., and Hashemzadeh, M. (2002). Efficacy of Inactivated H9N2 Avian Influenza Vaccine against Non-highly Pathogenic A/Chicken/Iran/ZMT-173/1999 Infection. Arch. Razi Ins. (53) 23-32 .

77- Vasfi Marandi, M., Pazani, J., Ashrafi, H., Marjanmehr, S. H., and Ghods, H. (2007). Evaluation of the patogenicity of A/Chicken/ZMT/- 173/99(H9N2) satín of avian influenza virus in serological mycoplasma galisepticum positive and negative broiler chicken. Iranian journal of virology. 1(2), 20-27.

78- Vasfi-Marandi, M., Bozorgmehrifard, M. H., Tabatabaei, S. M. (2002). A seroepidemiologic study of avian influenza (H9N2) in Iran. Scientific-research Iranian veterinary journal. 5(8), 23-31.

79- Vatandour, S., Bozorgmehrifard, M. H., Shoushtari, H. , Charkhkar, S., and Bakhtiari, S. (2011). Molecular characterization and phylogenetic analysis of neuraminidase gene of avian Influenza H9N2 viruses isolated from commercial broiler chicken in Iran during a period of 1998-2007. African Journal of Microbiology Research 5(24), 4182-4189.