DOI: 10.22092/vj.2018.122074.1462
شماره ۱۲۱ زمستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

ردیابی ویروس آنفلوانزا جنس A در کبوترهای وحشی اطراف اهواز به روش RT-PCR

• منصور میاحی
استاد بهداشت و بیماری های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز
• زهرا برومند (نویسنده مسئول)
استادیار بهداشت و بیماری های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز
• محسن قربیانی
رزیدنت بهداشت و بیماری های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۳-۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۴-۱۷
Email: z.boroomand@scu.ac.ir

چکیده

بیماری آنفلوانزای پرندگان (AI) یک بیماری عفونی حاد با اهمیت جهانی است که موجب زیان‌های اقتصادی فراوانی در صنعت طیورمی‌شود. ویروس آنفلوانزای پرندگان (AI) در جنس A ویروس آنفلوانزا در خانواده Orthomyxoviridae طبقه‌بندی‌شده است. ویروس‌های AI از بیش از ۱۰۰ گونه از پرندگان آزاد زی جدا شده است. کبوتر پرنده‌ای است از خانواده Columbiforms که به دو صورت وحشی و اهلی یافت می‌شود که نژادهای مختلفی دارند و به دلیل پرواز آزاد، با پرندگان آبزی و ماکیان بومی و صنعتی در ارتباط هستند از این رو ممکن است به انتقال AIV و بقاء آن در طبیعت کمک کنند. این مطالعه به منظور بررسی نقش کبوتر در گسترش ویروس آنفلوانزای پرندگان در اطراف اهواز انجام گرفت. بر این اساس بافت روده و نای از صد کبوتر وحشی صید شده در اطراف اهواز در ماه‌های مختلف سال ۱۳۹۶ نمونه‌گیری شد، پس از استخراج RNA و ساختcDNA، ردیابی ژن پروتئین M جنس A ویروس آنفلوانزا با استفاده ازپرایمرهای اختصاصی ژن M انجام گرفت. در مجموع از صد کبوتر مورد بررسی، هیچ مورد مثبتی در ردیابی ژن M باند ۴۵۰ جفت بازی یافت نشد.می‌توان چنین نتیجه گرفت که یا تحت تیپ‌های حاد ویروس آنفلوانزا در این منطقه وجود ندارند و یا کبوتر احتمالاً نقشی در انتشار ویروس آنفلوانزای پرندگان ندارد.

کلمات کلیدی: آنفلوانزای پرندگان، کبوتر وحشی، RT- PCR، اهواز

● Veterinary Researches & Biological Products No 121 pp: 57-62

Detection of genus A avian influenza viruses in the wild pigeons around Ahwaz, southwest of Iran, by RT- PCR

By: Mayahi M., Profeessro of Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Boroomand, Z., (Corresponding Author) Assistant Professor of Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. and, Ghorbiani, M., Resident of Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Received: 2018-06-11 **Accepted: 2018-07-08**

Email: z.boroomand@scu.ac.ir

Avian influenza disease (AI) is an acute infectious disease with world-wide significance causing extensive economic losses in poultry industry. Avian influenza (AI) virus is classified in the genus influenza virus A within the family Orthomyxoviridae. AI viruses have been isolated from more than 90 species of free-living birds. The pigeon is from the family of Columbiforms, which are found in wild and domestic species of different races and With regard to free flying, they are associated with migratory birds, indigenous and industrial chickens, so it may help the transmission of AIV and its survival in nature.This study was conducted to investigate the role of wild pigeons in the spread of avian influenza viruses in the Ahvaz region, by RT-PCR.The tracheal and intestine samples were taken from the one hundred wild pigeon caught around Ahvaz in different months of the year. After extraction of RNA and cDNA production, detection of M gene of influenza A virus was performed using specific primers of M gene. In total, of these hundred pigeons examined, no positive finding was found in the M gene of 450 bp. It was concluded that pigeon approximately not play a role in spreading avian influenza viruses.

Key words: avian influenza virus, wild pigeons, RT- PCR, Ahvaz

مقدمه

کبوتر پرنده‌ای است از خانواده Columbiforms که به دو صورت وحشی و اهلی یافت می‌شود که نژادهای مختلفی دارند، معروف‌ترین نژاد آن‌ها کبوتر خانگی با نام علمی Columba domestica و کبوتر صحرایی *Columba livia* است. ویروس‌های خانواده اورتومیکسو و پریده در پنج جنس مجزا قرار دارند: Influenzavirus B، Influenzavirus A و Influenzavirus C (که این جنس ها را به ترتیب تحت عنوان تیپ‌های A، B و C نیز می نامند)، Togotovirus (ویروس‌های Tick born که گهگاه باعث عفونت پستانداران می‌شوند) و Isavirus، که عامل عفونت کم خونی آزاد ماهیان می‌باشد. فقط ویروس‌های جنس AInfluenzavirus باعث عفونت پرندگان می‌شوند (۱). این ویروس‌ها در چندین تحت تیپ بر اساس ویژگی‌های آنتی‌ژنتیکی گلیکو پروتئین‌های سطحی با هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) طبقه‌بندی می‌شود (۲، ۱۰) گروهی که قادر به ایجاد بیماری و تلفات شدید می‌باشند تحت عنوان ویروس‌های با بیماری‌زایی زیاد (HPAI) و گروهی دیگر که چندان بیماری‌زا نبوده و باعث بروز تلفات زیادی نمی‌شوند، تحت عنوان ویروس‌های بابیماری‌زایی کم (LPAI) طبقه‌بندی می‌شوند. تمامی پاندمی‌های ناشی از ویروس‌های با بیماریزایی بالا از تحت تیپ‌های H۵ و H۷ هستند (۴). ویروس‌های آنفلوانزای جنس A از پرندگان آبزی وحشی منشأ گرفته‌اند که به‌عنوان مخزن طبیعی عمل می‌کنند (۶،۱۳) با توجه به مدت زمان طولانی همزیستی، پرندگان آبزی به صورت پایدار و مقاوم میزبان این ویروس‌ها می‌باشند (۱۶،۱۸). شیوع بیماری فوق حاد HPAIباعث ایجاد یک نگرانی سلامت عمومی تنها در میان جمعیت‌های ماکیان می‌شود؛ زیرا اعتقاد بر این بوده است که میزبان‌های طبیعی یعنی پرندگان آبزی در بیماری HPAI مقاومت نشان می‌دهند (۵). از اواخر سال ۲۰۰۳، چندین همه‌گیری منطقه‌ای ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان H۵N۱ با پاتوژنسیتی بالا آشکار شد که در میان پرنده‌های آبزی و پرندگان وحشی هم بیماری‌زایی داشته که این مسئله نشان‌دهنده این است که این ویروس‌ها ویژگی‌های بیولوژیکی مجزایی در مقایسه با ویروس‌های اپیدمی HPAI قبلی داشتند. بر طبق مطالعات قبلی کبوترها علیه ویروس‌های HPAI مقاومت نشان می‌دادند بنابراین اکثر محققین عقیده داشتند که کبوترها نقش جزئی در شیوع ویروس‌های H۵ دارند (۸،۹،۱۱،۱۲). از سال ۲۰۰۲ مطالعات نشان‌دهنده درگیری کبوترها به‌صورت بالقوه بوده است و در طی شیوع‌های H۵N۱ پرندگان وحشی و اهلی از بین رفته‌اند؛ بنابراین توافقات عمومی از آن سال‌ها شروع به تغییر کرد و احتمال حساسیت کبوترها به HPAI افزایش پیدا کرد (۵). اعتقاد بر این است که کبوتر، اغلب در بازارهای پرنده فروشی در کشورهای آسیای شرقی فروخته می‌شود، در برابر ویروس‌های آنفلوانزا مقاوم است (۸،۹،۱۱،۱۲). بنابراین، اجماع عمومی بر این بوده که کبوترها در انتقال ویروس آنفلوانزا نقش کمی دارند. گزارش‌های بعدی در سال ۲۰۰۲ کبوترانی را نشان می‌دهد که به‌طور بالقوه در

شیوع H۵N۱ در پرندگان اهلی و وحشی دخیل بوده و از بین رفته‌اند، عقیده عمومی در مورد حساسیت احتمالی کبوتر به آنفلوانزا تغییر کرده است (۳،۱۷). حساسیت کبوتر به ویروس و نقش کبوتر در انتقال ویروس آنفلوانزای پرندگان به پرندگان اهلی و انسان همچنان بحث‌برانگیز است. بر این اساس، هدف از این مطالعه، ردیابی و یروس آنفلوانزا جنس A در کبوترهای وحشی اطراف اهواز به منظور تعیین نقش کبوترهای وحشی در گسترش این ویروس می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری از زمستان ۱۳۹۵ تا زمستان ۱۳۹۶ انجام گرفت. برای این هدف، نمونه‌های نای و روده (بخشی از روده که شامل لوزه‌های سکومی، ایلیوم و سکوم می‌شود حدود یک سانتی‌متر جدا شد، لوزه‌های سکومی محل مناسبی جهت ردیابی ویروس آنفلوانزا می‌باشد) صد کبوتر وحشی تازه شکار شده توسط مردم محلی از نقاط مختلف اهواز (مرکز استان خوزستان در جنوب غربی ایران) جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. لازم به ذکر است که در منطقه خوزستان مردم محلی با تور پرندگانی مثل کبوترهای وحشی، گنجشک و ... را شکار کرده و پس از جدا نمودن سر آنها در بازارهای محلی بفروش می‌رسانند. جهت انجام این تحقیق، این پرندگان از بازارهای محلی خریداری شدند.

ردیابی ویروس آنفلوانزا

استخراج RNA از نمونه‌های بافتی و مایع آلانتوئیک

استخراج RNA با استفاده از محلول استخراج RNX plus ساخت شرکت سیناژن و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. ابتدا پس از خروج نمونه‌ها از فریزر ۷۰- درجه سانتي‌گراد و ذوب شدن نمونه‌ها، بافت‌های نای و روده بصورت جداگانه هموژن شده و به ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های هموژن جهت استخراج RNA ۱۰۰۰ می‌کرولیتر RNX به‌منظور لیز سلول و اجزای آن و آزاد شدن اسید نوکلئیك، به هر لوله حاوی ۵۰-۱۰۰ میلی‌گرم بافت هموژن اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق باقی می‌ماند. سپس ۲۰۰ می‌کرولیتر از کلروفرم به لوله‌ها اضافه کرده و به مدت ۱۵ ثانیه لوله‌ها را به‌شدت تکان داده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتي‌گراد قرارداده شد.

در مرحله بعدی لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتي‌گراد در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رويي، که حاوی مولکول‌های اسید ریبونوکلئیك است، به‌طوری‌که با مایع در فاز می‌انی مخلوط نگردد برداشت شد و به لوله‌های جدید منتقل گردید. در مرحله بعد، هم‌حجم با این مایع، ایزوپروپانول برای نامحلول کردن ژنوماضافه‌شده، کاملاً مخلوط گردیده و ۱۵ دقیقه روی یخ نگه‌داری شد.

مجدداً لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتي‌گراد در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن مایع رویی و مشاهده پلت سفیدرنگ قطره اشکي در ته لوله، ۱ می‌لی لیتر اتانول ۷۵ درصد به لوله‌ها اضافه شده و کاملاً مخلوط گردید تا پلت‌ها حل گردد. در مرحله بعدي، لوله‌ها به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتي‌گراد در ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند.

در انتها مایع رویی را دور ریخته، اجازه داده شد تا در دمای اتاق تمام الکل تبخیر شود و رسوب خشك گردد. سپس ۵۰ می‌کرولیتر آب مقطر استریل به هر لوله اضافه شده و در فریزر ۷۰- تا زمان ساخت cDNA نگهداری شد.

ردیابی ژن پروتئین M ویروس آنفلوانزای A از نمونه‌های بافتی

ساخت cDNA از RNA استخراج شده با استفاده از کیت Takara (PrimeScriptTM RT reagent Kit, Japan) طبق دستور شرکت سازنده انجام شد. برای این کار از زوج آغازگرهای شناساگر ژن M (۱۰) استفاده گردید. مشخصا تزوج آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

برای انجام این واکنش ۵/۵ می‌کرولیتر از RNA استخراج شده همراه با ۰/۵ می‌کرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی ژن M با غلظت ۲۰ پیکومول در می‌کرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگرهای عمومی الیگودی‌تی با غلظت۵۰ میکرومول در ۱۰۰ می‌کرولیتر و ۰/۵ میکرولیتر رندم هگزامر با غلظت۱۰۰میکرومول در ۱۰۰ می‌کرولیتر مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه انکوبه شدند. cDNAهای ساخته شده بلافاصله تا زمان استفاده به فریزر ۲۰- منتقل شدند.

آزمون RT- PCR

جهت انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر استفاده شد. مواد و مقادیر مورد نیاز برای واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل: ۳ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها در غلظت ۲۰ پیکومول در میکرولیتر، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس آمپلیکون (دانمارک) با غلظت Mgcl۲ ۱/۵ میلی‌مولار و آب مقطر استریل ۶ میکرولیتر چرخه‌ی دمایی

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی وجایگاه آغازگرهای مورداستفاده در ردیابی ویروس آنفلوانزا

الیگونوکلئوتید	ژن	توالی	جایگاه
CN۱	M	GGGAAGAACACAGATCTTGAGG	۱۰۰-۱۲۱
CN۲	M	TGCTGGCTAGCACCATTCTC	۵۳۱-۵۵۰

واکنش در جدول ۲ درج شده است.

لازم به ذکر است که در تمامی مراحل واکنش PCR یک نمونه کنترل منفی (آب DEPC به جای DNA) و یک نمونه کنترل مثبت (RNAاستخراج شده از مایع آلانتوئیک حاوی ویروس H۹/A/chicken/Iran/AIa۲۰۱۲) قرار داده شد.

آنالیز محصول PCR

پس از پایان چرخه‌ی حرارتی PCR، محصول به دست آمده در ژل آگارز ۱ درصد حاوی رنگ ایمن الکتروفورز شد. پس از اتمام کار دستگاهها استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور حضور باند اختصاصی مورد نظر (۴۵۰ جفت بازی ژن M) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

تحقیق، در طی یک سال از زمستان ۱۳۹۵ تا زمستان ۱۳۹۶ انجام گرفت. تعداد صدکبوتر وحشی از نقاط مختلف جنوب، شمال، شرق و غرب اطراف شهر اهواز که دارای تراکم بالایی از نظر صنعت پرورش طیور بودند، صید شدند و پس از انتقال نمونه‌برداری از روده و نای آن‌ها به عمل آمد. از صد نمونه کبوتر اخذ شده هیچ مورد مثبتی از ردیابی ژن پروتئین M باند ۴۵۰ جفت بازی دیده نشد (شکل ۱).

بحث

آنفلوانزای پرندگان یک بیماری حاد و بسیار مسری است که در گونه‌های مختلف پرندگان منتشر می‌شود. انتشار ویروس‌های AI در سراسر جهان آفریقا، آسیا، استرالیا، اروپا و آمریکای شمالی و جنوبی گزارش شده است (۱۵). در این تحقیق حضور جنس A ویروس آنفلوانزای پرندگان در کبوترهای وحشی اطراف اهواز با ردیابی ژن M انجام گرفت و هیچ مورد مثبتی در نتایج مشاهده نگردید. این نتایج می‌تواند نشان‌دهنده نقش ضعیف کبوترها در انتشار ویروس آنفلوانزای پرندگان باشد. تحقیقات قبلی نیز نشان داده‌اند که کبوترها کاملاً مقاوم و یا کمترین حساسیت را به عفونت با ویروس‌های آنفلوانزا داشته‌اند (۸،۹،۱۴). گروه‌هایی از کبوترها با ویروس‌های حاد وغیر پاتوژن آنفلوانزا آلوده شدند در طول دوره مشاهدهٔ ۲۱ روز سالم باقیماندند، ویروس را دفع نکردند حتی بر علیه این پاتوژن‌ها پادتنی نیز تولید نشد (۱۱). تحقیقات بیشتری نشان داده است که کبوترها بیشتر مقاوم بوده واحتمالاً نقش اپیدمی و لوژیک ناچیزی در انتشار ویروس‌های حاد آنفلوانزا (H۵N۱) در مقایسه با ماکیان، بلدرچین و اردک‌ها داشته باشند(۱۲). برخلاف این یافته‌ها، الیس و همکاران (۳) دریافتند که ویروس H۵N۱، می‌تواند کبوتر را آلوده کرده و سبب ایجاد بیماری در آن‌ها شود. اگر چه اثربخشی عفونت در بین پرندگان متفاوت است، اما نتایج سرولوژیک تولید پادتن نشان می‌دهد که احتمال عفونی شدن کبوترها وجود دارد. یافته این محققین، چندین گزارش از حساسیت کبوتر به ویروس‌های آنفلوانزا تحت تیپH۵N۱ را تاییدکرد. به طور مثال، در طی شیوع آنفلوانزای پرندگان تحت تیپH۵N۱ در هنگ‌کنگ در سال ۲۰۰۲، یک کبوتر مرده یافت شد. علاوه بر این، یک ویروس H۵N۱ در اندونزی، بیماری‌زایی قابل توجهی را در کبوترهای آلوده نشان داد (۷)؛ بنابراین احتمال می‌رود ویروس‌های جدیدی در سراسر جهان از جمله چین توزیع شده باشند که نسبت به سویه‌هایH۵N۱ قبل از سال ۲۰۰۲ ، قادر به ایجاد حساسیت در کبوتر باشند (۵). چندین گزارش وجود دارد که بیانگر عدم انتقال یا انتقال کم از طریق تماس کبوتران آلوده به سایر حیوانات است. با این حال، در طول شیوع دوم آنفلوانزای پرندگان در اندونزی در سال ۲۰۰۶، حداقل یک مورد انسانی مرگبار از عفونت با ویروسH۵N۱ گزارش شد که در آن قربانی سابقه تماس با کبوتر را در خانه خود داشته است (۵).

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های ما عدم آلودگی کبوترهای وحشی اطراف اهواز، جنوب غربی ایران، به آنفلوانزای پرندگان (جنس A) را نشان داد می‌توان چنین نتیجه گرفت که یا تعداد نمونه‌های موردبررسی کم بوده و نیاز است که موارد بیشتری مورد بررسی قرار گیرند و یا اینکه به‌طورکلی تحت تیپ‌های حاد ویروس آنفلوانزا در منطقه وجود ندارند. می‌توان نتیجه گرفت که کبوتر احتمالاً نقشی در انتشار ویروس آنفلوانزای پرندگان ندارد.

جدول ۲- چرخه‌ی دمایی استفاده‌شده در ردیابی ژن M

دما (سانتی گراد)	دما (سانتی گراد)	دما (سانتی گراد)	زمان	دما (سانتی گراد)
اول	واسرشت‌سازی اولیه	۹۴	۲ دقیقه	۱
دوم	واسرشت‌سازی	۹۴	۳۵ ثانیه	۳۵
	اتصال آغازگرها	۵۴/۹	۴۵ ثانیه	
	سنتز	۷۲	۴۵ ثانیه	
سوم	سنتز نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

تشکر و قدردانی

نویسندگان وظیفه خود می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که پژوهش فوق را حمایت مالی نمودند، تشکر و قدردانی نمایند.

منابع مورد استفاده

1. Alexander, D.J. 2007. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa and Australia 2002 – 2006. *Avian Diseases* 51: 161-166.

2. Chen, H., Y. Li,Z. Li, J. Shi, , K. Shinya,G. Deng,Q. Qi,G. Tian,S. Fan,H. Zhao,Y. Sun andY.Kawaoka.2006. Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenzaoutbreak in migratory waterfowl in western China. *Journal of Virology* 80:5976–5983.

3. Ellis, T.M., R.B. Bousfield, L.A. Bissett, K.C. Dyrting,G.S. Luk,S.T. Tsim,K. Sturm-Ramirez,R.G. Webster,Y. Guan and J.S. Malik Peiris. 2004. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Patholgy* 33:492–505.

4. Hsiu Fang, T., Y. Yang Lien, M. Chu Cheng, H. Jung Tsai Source. 2006. Resistance of Immune-Suppressed Pigeons to Subtypes H5N2 and H6N1 Low Pathogenic Avian Influenza Virus. *Avian Diseases* 50(2):269-272.

5. Jia, B., J. Shi,Y. Li,K. Shinya,Y. Muramoto, X. Zeng, G. Tian,Y. Kawaoka and H. Chen. 2008.Pathogenicity of Chinese H5N1 highly pathogenic avian influenzaviruses in pigeons. *Archives of Virology* 153:1821–1826.

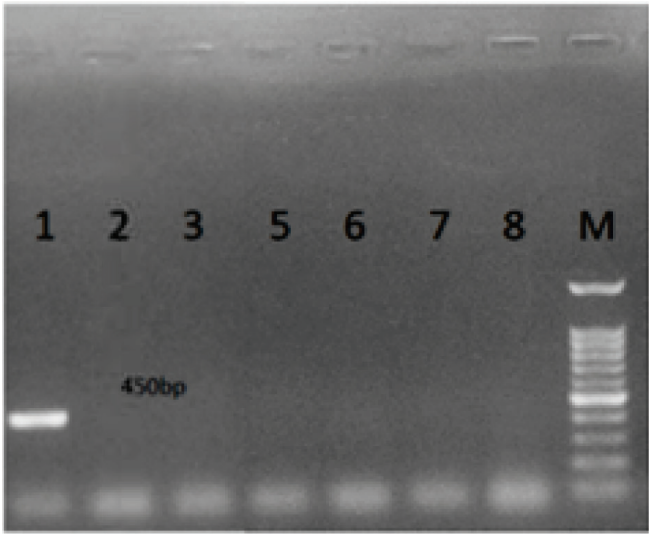
6. Kawaoka, Y., T.M. Chambers,W.L. Sladenand R. G. Webster. 1988. Isthe gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls differentfrom that in wild ducks? *Virology* 163:247–250.

7. Klopfleisch, R., O. Werner, E. Mundt, T. Harder and J. Teifke. 2006. Neurotropism of highly pathogenic avian influenza virusa/chicken/Indonesia/2003 (h5n1) in experimentally infectedpigeons (*Columbia livia f. domestica*). *Veterinary Pathology* 43:463–470.

8. Liu, M., Y. Guan, M. Peiris, S. He, R.J. Webby, D. Perez and R.G. Webster. 2003. The quest of influenza A viruses for new hosts. *Avian Diseases* 47:849–856.

9. Liu, Y., J. Zhou, H. Yang, W. Yao, W. Bu, B. Yang, W. Song, Y. Meng, J. Lin, C. Han, J. Zhu, Z. Ma,J. Zhao and X. Wang. 2007. Susceptibility and transmissibility of pigeons to Asian lineage highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1. *Avian Pathology* 36:461–465.

10. Mohammadi, M., M. Masoudian, Y. Nemati and S. Seifi. 2010. Serological and RT-PCR Assays f or detection of Avian influenza of domestic pigeons inkavar area (Fars province, Iran), *Bulgarian*



شکل ۱- محصول RT-PCR نمونه‌های کبوتر وحشی با آغازگرهای ژن پروتئین M آنفلوانزا، M: مارکر (bp ۱۰۰) شماره ۱: کنترل مثبت، شماره ۲: کنترل منفی، شماره‌های۳ تا ۸ نمونه‌های منفی.

Journal of Veterinary Medicine 13(2): 117−121.

11. Panigrahy, B., D. A. Senne, J. C. Pedersen, A. L. Shafer, J. E. Pearson.1996. Susceptibility of pigeons to avian influenza. *Avian Diseases* 40:600–604.

12. Perkins, L. E. and D. E. Swayne.2002. Pathogenicity of a Hong Kongorigin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Diseases* 46:53–63.

13. Slemons, R.D., D. C. Johnson,J. S. Osborn and F. Hayes. 1974. Type-Ainfluenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California. *Avian Diseases* 18:119–124.

14. Shortridge, K.F. 1999. Poultry and the influenza H5N1 outbreak inHong Kong, 1997: abridged chronology and virus isolation. *Vaccine* 17 (Suppl.1): S26–S29.

15. Swayne, D.E., D. L. Suarez and L. D. Sims. 2013. Influenza. Pp. 181-218, In: Diseases of Poultry. Swayne D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Nair, V. 13th ed. Blackwell Publishing, Ames, IA, U.S.A.

16. Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y.1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews* 5:152–179.

17. Werner, O.,E. Starick,J. Teifke, R. Klopfleisch, T. Y. Prajitno, M. Beer,B. Hoffmann, T. C. Harder. 2007. Minute excretion of highlypathogenic avian influenza virus A/chicken/Indonesia/2003 (H5N1) from experimentally infected domestic pigeons (*Columbia livia*) and lack of transmission to sentinel chickens. *Journal of General Virology* 88:3089–3093.

18. Wright, P.F., G. Neumann and Y.Kawaoka. 2006. Orthomyxoviruses. Pp. 1691–1740, In: Fields virology. Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A.(eds). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.