

## 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 حبل‌الورید

موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج

تاریخ پذیرش: شهریور ۹۴

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۴

E-mail: hablolvarid@yahoo.com



### چکیده

در طی دو دهه گذشته دو همگیری شدید بیماری آنفلوانزا در کشورمان بروز کرده است. در جریان اولین همگیری که در نیمه اول سال ۱۳۷۷ (۱۹۹۸ میلادی) بصورت ناگهانی شایع گردید، بیماری آنفلوانزای طیور (ناشی از تحت تیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>) به سرعت در مرغداری‌های کشور 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 از تحت تیپ H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>) باعث ابتلاء تعداد کثیری از جمعیت کشورمان 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 می‌توان به فعال‌تر شدن مراکز مختلف تحقیقاتی کشور در زمینه اجرای مطالعات اپیدمیولوژیک، بیماری‌زایی و تعیین تغییرات ژنتیکی صورت پذیرفته در عامل بیماری، شناسایی سوبه‌های در گردش ویروس آنفلوانزا، بررسی نقش و اهمیت پرندگان وحشی و مهاجر در بروز همگیری‌ها، راه‌های کنترل، پیشگیری و مراقبت از بیماری و همچنین تاسیس آزمایشگاه رفرانس آنفلوانزای طیور در موسسه رازی، اشاره 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 H1N1 influenza 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

و یا شرایط محیطی نا مناسب موجب وخیم تر 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 گردید که 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 مواجهه با همگیری سال ۱۳۷۷ نهایتاً 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 (۱۹۷۵ میلادی) 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-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 ایجاد کرده است. آن‌ها چنین نتیجه‌گیری نمودند که اطلاعات حاصل از مطالعه انجام یافته، تأییدی بر حضور ویروس آنفلوانزای طیور در ایران می‌باشد (۶۷). در گزارش دیگری آقاخان و همکاران (۱۹۹۴ میلادی) در طی مطالعه گسترده‌ای که بر روی

### مقدمه

بیماری آنفلوانزای طیور (AI) Avian influenza 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 (NP) و پروتئین ماتریکس (MP) Matrix protein 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 هم‌آگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) Neuraminidase به چندین 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

۱۳۸۳-۱۳۷۲ 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 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>9</sub> بودند. مقایسه ۳۰۰ نمونه سرمی متعلق به سال‌های ۱۳۸۲-۱۳۷۷ نشان داد که تمامی آنها در آزمایش HI، فاقد پادتن بر علیه H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> و H<sub>7</sub>N<sub>7</sub> و در مقابل ۲۱/۷ درصد سرم‌ها دارای پادتن H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> و H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> بودند. در مجموع، آنها چنین نتیجه گیری نمودند که در بین سال‌های ۱۳۸۲-۱۳۷۲ همگیری آنفلوآنزای H<sub>5</sub> و H<sub>7</sub> در ایران رخ نداده است (۱۵). گرچه برخی از محققین منشاء اولیه همگیری ویروس آنفلوآنزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> که در سال ۱۳۷۷ در استان‌های تهران و قزوین بوقوع پیوست را نامعلوم اعلام نمودند (۷۸) ولی نتایج تحقیقات انجام یافته در سال‌های بعد، نشان داد که سرایت آلودگی آنفلوآنزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> به مرغداری‌های ایران به احتمال قوی از طریق کشور پاکستان صورت پذیرفته است (۲۹ و ۴۶).

### مطالعات اپیدمیولوژیک

#### علل گسترش سریع آنفلوآنزای تحت تیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>

#### افزایش تلفات و کاهش تولید

گرچه مطالعات انجام یافته بر روی جدایه‌های اولیه ویروس آنفلوآنزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 همراه بوده است. وصفی مردندی و همکاران (۲۰۰۰ میلادی) در طی مطالعه‌ای به بررسی علل کاهش تولید تخم مرغ، متعاقب همگیری طبیعی آنفلوآنزای 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 laryngotracheitis (ILT) و آنفلوآنزای طیور H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> می‌تواند تا حدود ۹٪ سبب افزایش تلفات بشود. علاوه کاهش تولید تخم‌مرغ در گله‌هایی که قبلاً (بطور طبیعی) به بیماری مبتلا گردیده بودند می‌تواند بدلیل ظهور مجدد جدایه‌های مزرعه ویروس آنفلوآنزای طیور باشد (۷۵). بمنظور پی بردن به منشاء و کانون‌های ویروس آنفلوآنزای طیور H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> که در طی همگیری سندرم تنفسی در اواخر جولای ۱۹۹۸ میلادی (تیر ماه ۱۳۷۷)، از طیور استان‌های تهران و قزوین جداسازی گردیده بود، وصفی مردندی 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. مطالعه آن‌ها نشان داد که تعداد استان‌های آلوده از ۶ استان در ماه آگوست ۱۹۹۸ میلادی (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 آنفلوآنزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> در استان‌های تهران و قزوین نامعلوم می‌باشد. (۷۸) نیلی و اساسی (۲۰۰۳)

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 هم‌گلوکوتیناسیون (Hemagglutination inhibition (HI)) نموده و گزارش وجود تیترا پائین تا متوسط را نمودند ولی این پاسخ‌ها با تجویز آنزیم تخریب‌کننده گیرنده‌ها (Receptor destroying enzyme) بر روی نمونه‌های (سرم) مشابه منفی می‌گردید. علاوه آنها هیچ واکنش مثبتی در آزمایش رسوب در ژل آگار (Agar gel precipitation (AGP)) که با بکارگیری آنتی‌ژن نسبتاً خالص شده آنفلوآنزای تیپ A انجام گردید بود، ملاحظه نمودند. گرچه در آن مقاله اشاره واضحی مبنی بر وجود یا عدم وجود آنفلوآنزا به میان نیامده است. ولی به استناد نتایج بدست آمده می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که آنفلوآنزا در ایران وجود نداشته است (۱۸).

### جداسازی و شناسایی عامل همگیری آنفلوآنزای طیور در

#### سال ۱۳۷۷

در مقاله حاضر بازخوانی گزارشات چاپ شده در خصوص جداسازی و شناسایی عامل همگیری خسارت‌بار مرغداری‌های ایران (در سال ۱۳۷۷) صرفاً بر اساس تقدم و تاخر چاپ آنها در نشریات صورت پذیرفته است. پوربخش و همکاران (۲۰۰۰ میلادی) در طی مقاله‌ای گزارش جداسازی و تشخیص آنفلوآنزای طیور تحت تیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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/H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> معرفی و ثبت نمودند. در آن گزارش به این مطلب اشاره گردیده است که مقاله آنها، اولین گزارش از جداسازی ویروس آنفلوآنزا در ایران می‌باشد (۶۳). در گزارش دیگری وصفی مردندی و بزرگمهری فرد (۲۰۰۲ میلادی) شرح جداسازی سه سویه از ویروس آنفلوآنزای طیور از نای، ریه و کلوک مرغ‌های تخم‌گذار، مادر و گوشتی (که با شماره‌های ۱۰۱، ۱۰۲، و ۱۰۳ مشخص شده بودند) در تخم مرغ جین‌دار را نموده‌اند که در جریان همگیری آنفلوآنزا 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 (NP) (Neucloprotein) ویروس آنفلوآنزای تیپ A، حضور ویروس آنفلوآنزای طیور در سلول‌های مایع آلانتوئیک را به روش ایمنوفلورسنت غیرمستقیم Indirect immunoflorent (IF) تأیید نمودند. این ویروس‌ها در تست‌های HI و مهار نورامینیداز (NI) (Neuraminidase inhibition)، در تحت تیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> طبقه‌بندی گردیدند. آن‌ها در آزمایشی که بمنظور سنجش بیماری‌زای ویروس‌های جدا شده که با تلقیح مایع آلانتوئیک به جوجه‌های ۳-۴ هفته انجام گردید، هیچ تلفاتی تا ده روز بعد از تلقیح مشاهده نمودند. بنابراین سویه‌های جدا شده از مرغ‌های تخم‌گذار، مادر و گوشتی را تحت عنوان nHPAI طبقه بندی نموده و چنین نتیجه‌گیری کردند که جداسدن تحت تیپ و پاتوتیپ‌های مشابه از گله‌های دیگر دلالت بر این مطلب دارد که تحت تیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> عامل پاتوژن رایجی است که در همگیری بیماری‌های تنفسی در صنعت طیور ایران نقش دارد (۷۳). در مطالعه دیگری وصفی مردندی و همکاران (۱۳۸۹) به بررسی بیماری آنفلوآنزای طیور در سال‌های

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 تیتراژ 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 (Polymerase 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 تیتراژ HI می‌شود و چنین نتیجه‌گیری نمودند که باکتری ORT باعث افزایش توانایی تکثیر ویروس آنفلوانزای H<sup>9</sup>N<sup>2</sup> و یا تحریک سیستم ایمنی می‌شود (۱۱ و ۲۰). در تحقیق عزیزپور و همکاران (۲۰۱۳) مشخص گردید که در صورتی که جوجه‌های SPF ابتدا توسط باکتری ORT و پس از آن با ویروس H<sup>9</sup>N<sup>2</sup> آلوده شوند هیچ تلفاتی بوقوع نپیوسته و تنها اندکی علائم بالینی و کالبدگشایی در جوجه‌های مبتلا دیده خواهد شد (۱۹). در طی مطالعه دیگری وصفی مرندی و همکاران (۲۰۰۷) میلادی) دو گروه جوجه را که از نظر آلودگی به مایکوپلازما گالی سپتیکوم (*Mycoplasma galisepticum* (Mg)) منفی و مثبت بودند (Mg<sup>+</sup>, Mg<sup>-</sup>) 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 سوبه 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 کم‌بیماری بودن این ویروس برای جوجه می‌باشد. میزان مرگ و میر در بین گروه‌های Mg<sup>+</sup> بمیزان ۱۰٪ بیشتر از گروه‌های Mg<sup>-</sup> 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 حالی که در جوجه‌های تلف شده در روز ۷ (فقط در گروهی که تزریق وریدی گردیده بودند) ابتلاء شدید کلیه و بافت‌های لنفاوی (بوس و تیموس) گزارش گردیده است. تمایل بافتی به ارگان‌های لنفاوی می‌تواند دلیلی بر خاصیت مهارکننده ایمنی (immunosuppressive effect) سوبه H<sup>9</sup>N<sup>2</sup> باشد. آن‌ها چنین نتیجه‌گیری نمودند که پیدایش کست در نای و نفرت حاد همراه با رسوب اورات عامل اصلی مرگ و میر در جوجه‌های Mg<sup>+</sup> است. اثر احتمالی مهار ایمنی ویروس H<sup>9</sup>N<sup>2</sup> و همزمانی عفونت با باکتری‌های مایکوپلازما و باکتری اشیریشیا 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<sup>9</sup>N<sup>2</sup> به تنهایی قادر به ایجاد تلفات شدید و کاهش قابل توجه تولید تخم‌مرغ نمی‌باشد ولی در شرایط مزرعه همراهی آن با سایر عوامل بیماریزای (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

میلادی) در طی گزارشی به توصیف همگیری آنفلوانزای طیور تحت تیپ (H<sup>9</sup>N<sup>2</sup>) در بین مرغداری‌های گوشتی ایران در طی سال‌های ۲۰۰۱-۱۹۹۸ پرداخته و میزان مرگ و میر ناشی از آن را ۶۰-۲۰٪ اعلام نموده‌اند. 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 مایکوپلازما (*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<sup>9</sup>N<sup>2</sup> 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 بیشتر از آلودگی تجربی اعلام نمودند. آن‌ها استفاده از واکسن غیرفعال آنفلوانزای H<sup>9</sup>N<sup>2</sup> را، در پیشگیری از تلفات جوجه‌های که به طور تجربی با ویروس آلوده (چالشی) 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 کم‌بیماریزای H<sup>9</sup>N<sup>2</sup> 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 آن سال‌ها ۱۳/۵۲٪ اعلام نموده. نتایج مطالعات آنها حاکی از آن 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 کم‌بیماریزای H<sup>9</sup>N<sup>2</sup> در شرایط مزرعه می‌باشد (۴۷). بنانی و همکاران (۱۳۸۲) جداسازی همزمان باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (*Ornithobacterium rhinotracheal* (ORT)) و ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H<sup>9</sup>N<sup>2</sup> را از طیور صنعتی (برای اولین بار) گزارش نمودند. به اعتقاد آن‌ها همزمانی عفونت این دو عامل بیماریزای ممکن است تا حدودی زیادی توجیه‌کننده ضایعات و تلفات شدید گله‌های مبتلا به آنفلوانزای طیور نه‌چندان بیماریزای H<sup>9</sup>N<sup>2</sup> باشد. (۲). طرقي و ممیز (۲۰۰۶ میلادی) حدت و بیماریزای بودن ۳ جدایه ویروس آنفلوانزای طیور H<sup>9</sup>N<sup>2</sup> (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 مایکوپلازما، اشیریشیا 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<sup>9</sup>N<sup>2</sup> و ORT منجر به بروز علائم شدید



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 تیتراژ سرمی آنتی بادی ضد ویروس آنفلوانزای H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> 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 آبی و همچنین مجاورت با واحدهای پرورش طیور نقش مهمی در انتقال ویروس آنفلوانزا دارند (۳۸). همین محقق (هادی‌پور (۲۰۱۱ میلادی)) در مطالعه دیگری تعداد ۲۰۰ نمونه سرم خون اردک و جوجه خانگی در ۴ منطقه شهر شیراز را آزمایش 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<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> 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 کیوتراهای اهلی آن منطقه ۱۷ نمونه از سرم‌ها (۳۴٪) دارای تیتراژ آنتی بادی ضد ویروس آنفلوانزای طیور H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup>، 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 طیور که در مجاورت آن‌ها هستند، وجود ندارد (۵۴). در مقاله دیگری هادی‌پور و همکاران (۲۰۱۱) میزان شیوع سرمی تیتراژ آنتی بادی بر ضد ویروس آنفلوانزای H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> 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 کلاک 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 تیتراژ آنتی‌بادی بر علیه ویروس‌های نیوکاسل و آنفلوانزای (H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup>) در بین ماکیان خانگی غیر واکسینه در استان بوشهر از طریق آزمایش ۱۵۳۰ نمونه خون انجام گردید، مشخص شد که ۳۹٪ و ۴۰/۱۳٪ از این حیوانات بترتیب دارای تیتراژ آنتی‌بادی بر علیه ویروس‌های آنفلوانزا H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> و نیوکاسل می‌باشند که

وضعیت بیماری آنفلوانزا در صنعت مرغداری ایران در طی سال‌های ۲۰۰۲-۱۹۹۲ پرداخته‌اند. آن‌ها ۱۰۵۰ نمونه سرم را به روش‌های HI و الیزا (Eliza) آزمایش کرده و چنین نتیجه‌گیری نمودند که در طی سال‌های ۲۰۰۲-۱۹۹۲ هیچ مورد همگیری ناشی از ویروس‌های H<sup>۷</sup> و H<sup>۵</sup> در ایران وجود نداشته است (۷۴). هادی‌پور و گلچین (۲۰۱۱ میلادی) در طی تحقیقی به مطالعه تیتراژ سرمی آلودگی به ویروس آنفلوانزای H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> (در جریان همگیری بیماری تنفسی در بین گله‌های جوجه گوستی در شهرستان دزفول) پرداخته و گزارش نموده‌اند که: با انجام آزمایش HI بر روی ۱۶۰ نمونه سرم (که از تعداد ۸ گله با علائم تنفسی اخذ شده بود)، در ۷۵/۹۵٪ مورد تیتراژ آنتی‌بادی بمیزان ۷/۳ بر علیه ویروس آنفلوانزا H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> 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 گوستی ایران پرداخته و گزارش کرده‌اند که با آزمایش تعداد ۱۶۰ نمونه سرم (که از مجموع ۸ گله جوجه گوستی (غیر واکسینه) جمع‌آوری گردیده بود) از نظر وجود آنتی بادی ضد ویروس‌های ذکر شده (به روش الیزا و HI)، میزان شیوع سرمی تحت تیپ H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup>، نیوکاسل و برونشیت 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 گوستی 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 (الیزا و HI) و ملکولی به روش Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) در تشخیص آلودگی گله‌های مرغ گوستی (با علائم تنفسی) به ویروس آنفلوانزای طیور در استان فارس نمونه 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 الیزا و HI از نظر H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> مثبت بودند. ولی هیچ مورد مثبتی از تیتراژ آنتی بادی بر علیه ویروس‌های آنفلوانزای H<sup>۷</sup>N<sup>۷</sup> و H<sup>۵</sup>N<sup>۱</sup> مشاهده ننموده‌اند. نتایج تحقیق آن‌ها بیانگر نقش بسیار مهم ویروس آنفلوانزا H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> در همگیری بیماری‌های تنفسی در گله‌های طیور تجاری گوستی استان فارس دارد. بعلاوه مشخص گردید که علیرغم وجود تیتراژ 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<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> در شمال غرب ایران پرداخته و گزارش نمودند که از تعداد ۲۵ گله گوستی (در کشتارگاه‌های استان آذربایجان غربی)، جمعا تعداد ۳۱۰ نمونه خون جمع‌آوری و آزمایش HI بعمل آوردند. که در نتیجه ۴۰/۶٪ مثبت تشخیص داده شدند. آن‌ها وجود تیتراژ نسبتا بالای آنتی بادی بر علیه ویروس آنفلوانزا در بین گله‌های گوستی را دلیلی بر نقش مهم این ویروس در کمپلکس بیماری‌های تنفسی در بین گله‌های گوستی منطقه شمال غرب کشور و احتمالا کل ایران اعلام نموده‌اند (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

زیاد ردیف پروتئین HA در ویروس‌های آنفلوآنزای H5N1 که از مناطق مختلف دنیا جدا شده‌اند بیانگر آن است که پرندگان وحشی آبی 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 H5N1 ویروس آنفلوآنزا که در سال ۱۳۹۰ در ایران تشخیص داده شده بود نموده و چنین نتیجه‌گیری نمودند که: این ویروس شباهت بسیار زیادی به ویروس H5N1 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 آنفلوآنزا 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 آنفلوآنزای طیور از طریق آزمایش RT-PCR و در ادامه تعیین تحت تیپ‌های H9 و H7 و H5 (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 H9 تشخیص داده شده است ولی هیچ موردی از آلودگی به ویروس‌های بسیار بیماری‌زا دیده نشد. از سه مورد مثبت، دو مورد از مرغ نوزوی (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 آنفلوآنزای طیور H5N1 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 آنفلوآنزای طیور H5N1 بسیار بیماری‌زای جدا شده در مغولستان دارند. آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که ورود ویروس آنفلوآنزای بسیار بیماری‌زای H5N1 (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 آنفلوآنزا 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 آنفلوآنزای 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 و ۳۲). 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 داد که دستگاه‌های تنفس و گوارش

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 آنفلوآنزای طیور خانگی مورد توجه خاص قرار گیرند (۶۴). با توجه به گزارشات موجود در خصوص آلودگی طیور خانگی به ویروس آنفلوآنزا و احتمال سرایت آلودگی از این پرندگان به طیور صنعتی و احتمالاً انسان، اکثر محققین بر ضرورت اجرای برنامه‌های مراقبت بیماری آنفلوآنزا در طیور خانگی توصیه نموده‌اند.

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

به منظور تعیین شیوع سرمی آنفلوآنزای طیور در بین پرندگان مهاجر آبی ایران، فریدونی و همکاران (۲۰۰۵ میلادی) با انجام تست الایزای رقابتی (Competitive Eliza) بر روی ۲۱۷ نمونه سرم تهیه شده از ۲۵ گونه پرند آبی (در طی سال‌های ۲۰۰۳-۲۰۰۴) اعلام نمودند که در آزمایشات انجام یافته، ۷۷ نمونه از ۱۴ گونه پرند 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 احتمالاً نقش بسیار مهمی در اپیدمیولوژی ویروس آنفلوآنزا 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 آبی زمستان گذران (در ایران) به ویروس‌های آنفلوآنزای طیور انجام دادند، از تعداد ۱۱۴۶ پرند (در طول سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۷) نمونه‌برداری کرده و اطلاعات مهمی در خصوص میزان شیوع ویروس‌های آنفلوآنزای کم بیماری‌زا (LPAIV) در پرندگان وحشی و بویژه پرندگان آبی 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 آنفلوآنزا در این منطقه داشته باشند (۳۰).

بر طبق گزارشات موجود در سال‌های اخیر حیات وحش ایران حضور ویروس‌های آنفلوآنزای بسیار بیماری‌زا در بین پرندگان وحشی آبی 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) ابتداء به آنفلوآنزای فوق حاد H5N1 اعلام نمودند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک پروتئین‌های HA نشان داد که قرابت نزدیکی بین ویروس Z/101(H5N1) با ویروس‌های H5 که از مناطق مختلف جغرافیایی از گربه، اردک وحشی، شتر مرغ، جوجه و بوقلمون جدا گردیده، وجود دارد. به اعتقاد آنان شباهت

بررسی جراحات هیستوپاتولوژیک و ردیابی آنتی ژن ویروسی در ماکیان گوشتی تلقیح شده با ویروس‌های آنفلوآنزای 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 آنفلوآنزا (A/chicken/ Iran/ H9N2 772/ 2000) توانایی القاء آسیب شدید بافتی در دستگاه تنفسی جوجه را دارا می‌باشد. (۵) همان محقق (دوستار و همکاران (۱۳۸۸)) در طی مطالعه‌ای تجربی، بروز مرگ سلولی در بافت‌های لنفوئیدی جوجه‌های SPF بدنال‌آلوده کردن آن‌ها با ویروس آنفلوآنزای مرغی- مرغی H9N2 (A/chick- en/Iran/772/2000) را گزارش نموده‌اند. آن‌ها نتیجه‌گیری کرده‌اند که ویروس آنفلوآنزای مرغی سروتیپ H<sup>۹</sup>N<sub>۲</sub> 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 H9N2 (A/chicken/iran/m.1/2010(H9N2)) اقدام به بررسی علائم و عوارض بالینی ایجاد شده در جوجه‌ها کرده و گزارش نمودند که هیچ تلفاتی بوقوع نیبوسته و تنها عوارض بالینی خفیفی در آن‌ها بروز کرده است آن‌ها چنین نتیجه‌گیری نمودند که تحت تیپ H<sup>۹</sup>N<sub>۲</sub> 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) بروز ضایعات پاتولوژیک موضعی (در ریه و نای موش‌های BALB/C تلقیح شده (به روش داخل بینی) با ویروس آنفلوآنزای تحت تیپ H9N2 (A/Chicken/Iran/B263/ 106)) را گزارش نموده‌اند. یافته‌های آنان نشان داد که ویروس آنفلوآنزا H<sup>۹</sup>N<sub>۲</sub> می‌تواند در پستانداران بیماری ایجاد نماید. آن‌ها چنین نتیجه‌گیری نمودند که آلودگی طبیعی انسان با ویروس‌های آنفلوآنزای طیور و بروز پدیده نوترکیبی می‌تواند باعث وقوع یک پاندمی جدید بشود (۱).

در مجموع با توجه به مطالعات انجام یافته بنظر می‌رسد که دلایل کافی جهت کم بیماریزا بودن جدایه‌های ویروس آنفلوآنزای H<sup>۹</sup>N<sub>۲</sub> 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 آنفلوآنزای تحت تیپ H<sup>۹</sup>N<sub>۲</sub>

#### تغییرات ژن HA

طرقی و همکاران (۱۳۸۲) در طی مطالعه‌ای توالی اسیدهای آمینه در محل شکسته شدن (Cleavage site) ژن HA ۳ ویروس آنفلوآنزای طیور H<sup>۹</sup>N<sub>۲</sub> 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

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

### تحقیق در زمینه شیوع بیماری آنفلوآنزا در دام‌های اهلی

بیش از چهار دهه از انتشار اولین گزارشات در خصوص وجود آنفلوآنزا 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 آنفلوآنزای (تیپ A) اسبی در ایران را اعلام نمودند (۶۶). در گزارش دیگری صمدیه و شاکری (۱۹۷۶ میلادی) وجود آنفلوآنزای خوکی در ایران و ارتباط سرولوژیک آن با آنفلوآنزای 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 آنفلوآنزای تک سمی‌ها (H<sup>۳</sup>N<sup>۸</sup> و H<sup>۷</sup>N<sup>۷</sup>) در استان 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 آنفلوآنزای 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 آنفلوآنزا 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) آنفلوآنزای

#### تحت تیپ H<sup>۹</sup>N<sub>۲</sub>

بمنظور تعیین نوع، شدت و دامنه ضایعات ایجاد شده در جوجه‌های SPF تزریق شده (به روش داخل وریدی) توسط ویروس آنفلوآنزای H9N2 (A/Chicken/Iran/259/1998) و همچنین تعیین تمایل بافتی آن ویروس، حبل‌الورید و همکاران (۲۰۰۳ میلادی) در طی تحقیقی اعلام نمودند که نفريت لوله‌های بینابینی (Tubulointerstitial nephritis) و تورم پانکراس (Pancreatitis) مهم‌ترین ضایعات اختصاصی مشاهده شده بوده و آنها NP ویروس را به روش ایمونوهیستوشیمی (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 (حبل‌الورید و همکاران (۲۰۰۴ میلادی)) به مطالعه هیستوپاتولوژیک ضایعات ناشی از تلقیح داخل نایی ویروس آنفلوآنزای H9N2 (A/Chicken/Iran/259/1998) 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



به استناد مطالعات انجام یافته بر روی ژن HA جدایه‌های ایرانی ویروس آنفلوانزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>، بنظر می‌رسد که تمامی آنها از منشاء مشترکی هستند و شباهت زیادی بین آن‌ها و ویروس‌های H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 هم‌گلویتینین 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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> (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 (Deletion) 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 تأیید 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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 هم‌ادزوربینگ (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) این ویروس‌ها دیده نشد. مطالعه فیلوژنتیک آنها نشان داد که ژن N<sub>2</sub> 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 N<sub>2</sub> و ردیف (اسیدهای آمینه) پروتئین سویه تازه جدا شده (در سال ۲۰۰۶) تفاوت قابل توجهی با سویه‌ای که قبلاً (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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> (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

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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> گزارش شده از سایر کشورهای اروپایی و آسیایی (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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> (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 منشاء آلودگی ویروس آنفلوانزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 (H<sub>9</sub>N<sub>1</sub>) 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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> جدا شده از جوجه‌های تجاری (در طی سال‌های ۲۰۰۲-۱۹۹۸) را مطالعه نموده و با سویه‌های موجود ویروس H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> در بانک ژن مقایسه نمودند. تمامی ۱۰ سویه مورد مطالعه دارای ردیف مشابه پروتوتیپ (-R-S-S-R/G-L-) در محل شکسته شدن هم‌گلویتیناسیون بودند. ردیف نوکلئوتیدهای ژن HA سویه‌های ایرانی ۹۹/۱٪- ۹۵/۲٪ با هم مشابهت داشتند. آنها بر اساس مطالعه فیلوژنتیک و خصوصیات سویه‌های ویروس H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> (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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> ویروس آنفلوانزا (که در طی سال‌های ۲۰۰۳-۲۰۰۵ از گله‌های جوجه در استان‌های مختلف جدا گردیده بود) نموده و اعلام کردند که تمامی این جدایه‌ها دارای ردیف‌های مشابه در محل شکسته شدن هم‌گلویتینین می‌باشند. با توجه به اینکه ردیف‌های شناخته شده قابلیت اتصال به گیرنده‌های انسانی را دارا می‌باشد و همچنین وجود آنتی بادی ضد ویروس H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> نمودند (۵۵).



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 اخیراً جدا شده‌اند احتمالاً می‌تواند بر بیماری‌زایی این ویروس‌ها اثر بگذارد. بنابراین ضروری است که برنامه ارزیابی روش‌های پیشگیری و آگاهی از میزان اثربخشی واکسن‌های تولیدی مرتباً صورت پذیرد.

### تغییرات ژن M2

ردیف کامل نوکلئوتیدهای ژن M2 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 H9 و H5 (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 (۲۰۱۲ میلادی) در طی مطالعه‌ای به ارزیابی مقاومت جدایه‌های ویروس آنفلوانزا H9N2 (در طی سال‌های ۲۰۰۹-۱۹۹۸) به داروی آمانتادین (Amantadin) پرداخته و دو گروه ویروس، مشتمل بر ۵ نمونه ویروس تحت تیپ H9N2 که در محدوده زمانی ۱۹۹۸-۲۰۰۶ و ۲۰۰۷-۲۰۰۹ جداسازی شده بودند را از نظر خصوصیات ملکول پروتئین M2 (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 H9N2 آنفلوانزا پرهیز شود (۱۷). در طی مطالعه دیگری بشاشاتی و همکاران (۲۰۱۳ میلادی) 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 H9N2 (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 Q226L 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 M2 گردیده که باعث مقاومت دارویی نسبت به آمانتادین (Amantadin) گردیده است آن‌ها بمنظور آگاهی بیشتر از طبیعت و سیر تکامل (evolution) ویروس‌هایی که عامل همگیری جهانی آنفلوانزا می‌باشند، تاکید بسیار بر اجرای مستمر برنامه مراقبت ویروس H9N2 در انسان و طیور (در آینده) نموده‌اند (۲۲).

در مجموع بررسی‌های انجام یافته حاکی از بروز موتاسیون‌های نقطه‌ای در ژن M2 می‌باشد که می‌تواند سبب القای مقاومت دارویی (ضد داروی

گله مختلف) جدا گردیده بودند، ژن گلیکوپروتئین سطحی در بیش از ۹۰٪ موارد مشابه lineage A/Quail/Hongkong/G1/97 (H9N2) 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 قبلاً در ایران جدا شده بودند تفاوت دارد. همانند بیشتر ویروس‌های H9N2 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 H9N2 (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 کاملاً محفوظ (conserved) بوده است. احتمالاً 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 ویروس آنفلوانزای H9N2 (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. جابجایی 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 H9N1 (virus contributed internal genes of H9N1) می‌باشد. آنها بدلیل وجود موتاسیون‌های سریع در ویروس آنفلوانزا H9N2 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 H9N2 (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 H9N2 در یک الگوی سالیانه تغییر یافته است. ردیف نوکلئوتیدها در سه جدایه مورد مطالعه مشابهت ۹۷-۹۴٪ با جدایه اخیر H9N2 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 اخیراً جداسازی شده‌اند بر روی بیماری‌زایی آن‌ها تاثیرگذار است و در نتیجه بسیار ضروری است که بررسی خصوصیات ژنتیکی ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 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

که بر روی ۷ جدایه ویروس (بین سال‌های ۲۰۰۸-۲۰۰۹) که از گله‌های تجاری طیور جداسازی شده بود، چنین نتیجه‌گیری نمودند که جدایه‌های ایرانی ویروس آنفلونزای H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> در ایران دچار بازآرایی قابل توجهی (Striking reassortment) 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 ریبونوکلوپروتئین (PB<sup>۱</sup>, PB<sup>۲</sup>, PA, NP) جدایه‌های ایرانی ویروس آنفلونزای H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> 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) کاملاً 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 منشأ آنها (تا سال ۲۰۰۳) از سویه‌های پاکستانی H<sup>۷</sup>N<sup>۳</sup> می‌باشد. در حالیکه از سال ۲۰۰۸ احتمالاً از سویه‌های پاکستانی H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> منشأ گرفته‌اند. گرچه ویروس‌های کم بیماری‌زای H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> از سال ۱۹۹۸ تا کنون (در ایران) در چرخش هستند، ولی وجود تنوع اپیدمولوژیک می‌تواند بدنبال اجرای واکسیناسیون‌های گسترده و یا بازآرایی (reassortment) 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 آنفلونزای H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> (که در طی سال‌های ۱۰۱۱-۲۰۰۷ از جوجه در ایران جدا گردیده بودند) نموده و آنها را با سایر جدایه‌های ایرانی ویروس آنفلونزای طیور موجود در بانک ژن مقایسه نمودند. شباهت بین اولین سویه جدا شده (A/chicken/Iran/ZMT/101/1998) با سویه‌هایی که اخیراً 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 سویه‌هایی را که اخیراً 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 H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> با سویه بسیار بیماری‌زای H<sup>۵</sup>N<sup>۱</sup> ایرانی تفاوت دارد. به اعتقاد این گروه از محققین، بدلیل وجود پدیده بازآرایی بین ژن‌های ویروس H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> و ویروس‌های بسیار بیماری‌زا و همچنین تغییرات ژنتیکی و جابجای اسیدهای آمینه ویروس‌های آنفلونزا (که در بیماری‌زایی و همچنین ایمنوژنیسیته آنها نقش دارند) ضروری است که ادامه دادن به برنامه مراقبت ویروس‌های آنفلونزا مورد توجه خاص قرار گیرد (۶۱).

### تحقیق و توسعه روش‌های تشخیص، پیشگیری و درمان

#### آنفلونزای تحت تیپ H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup>

تحقیق و توسعه روش‌های تشخیصی آنفلونزای تحت تیپ H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> مرادی و همکاران (۱۳۸۴) ضمن تولید آنتی سرم اختصاصی بر علیه آنتی ژن NA ویروس آنفلونزای A/chicken/Iran/259/1998(H9N2) در طی مطالعه‌ای

آمانتادین) گردیده باشد. بنابراین تحت هیچ شرایطی نباید خودسرانه از داروی آمانتادین بمنظور درمان و پیشگیری از عفونت آنفلونزای H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> استفاده نمود.

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

چندین اسید آمینه موجود در کمپلکس ریبونوکلوپروتئین ویروس مشتمل بر نوکلئو پروتئین (NP) و پروتئین‌های پلیمرز (PB<sup>۱</sup>, PB<sup>۲</sup>, PA) در تنوع میزبانان و همچنین بیماری‌زایی ویروس‌های آنفلونزا 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 ریبونوکلوپروتئین (RNP) دوجدا ویروس H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> آنفلونزای 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 PB<sup>۱</sup> و PA و NP سویه وجود دارد. بیشترین جایگاه‌ها در پروتئین RNP حاوی اسیدهای آمینه میزبان‌های پرنده است. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که کمپلکس ژن‌های RNP در سویه‌های ایرانی متحمل بازآرایی (Reassortment) گردیده‌اند (۲۳).

### تغییرات ژن NP

در مطالعه‌ای که جایبری و همکاران (۱۳۸۹) از طریق تعیین توالی و بررسی فیلوژنتیک ژن NP تحت تیپ H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> ویروس آنفلونزای پرندگان جدا شده در شهر اهواز انجام دادند، چنین نتیجه‌گیری نموده‌اند که ویروس‌های آنفلونزای H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> از زمان ورود به ایران، یا دچار تحول ژنتیکی شده‌اند و یا اینکه تائون زیرگروه‌های مختلفی از این ویروس به کشور وارد شده است (۴).

### تغییرات ژن‌های کمپلکس پلیمرز (PB<sup>۱</sup>, PB<sup>۲</sup>, PA)

پازانی و همکاران (۲۰۱۱ میلادی) در بررسی شجره‌شناسی ژن PB<sup>۲</sup> جدایه ویروس آنفلونزای H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> پرندگان جدا شده از طیور صنعتی استان تهران (طی سال‌های ۲۰۰۱ تا ۱۹۹۸)، گزارش نموده‌اند که منشأ ژن PB<sup>۲</sup> جدایه‌های ایرانی متفاوت از جدایه‌های امارات متحده عربی، پاکستان، عربستان سعودی (کشورهای خاورمیانه) و هند می‌باشد. احتمال دارد که اجداد جدایه‌های H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> ایرانی دچار بازآرایی با سایر تحت تیپ‌ها شده باشند. ردیف نوکلئوتیدها در ژن PB<sup>۲</sup> این جدایه‌ها به میزان زیادی به یکدیگر شباهت داشته‌اند (۹۷/۵-۹۹/۶٪). شباهت 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 پلیمرز (PB<sup>۲</sup> and PA, PB<sup>۱</sup>) ویروس‌های آنفلونزای طیور H<sup>۹</sup>N<sup>۲</sup> 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

گردیدند. دو هفته بعد از تلقیح در هر دو گروه آزمایش و همچنین گروه کنترل (غیر واکسینه) تیترا بالایی ملاحظه گردید. در همین زمان میزان جداسازی ویروس از طریق سواب نای و کلوآک (shedding) در جوجه‌های واکسینه کاهش یافته بود. در حالی که 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 آنفلوآنزای طیور H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 آنفلوآنزای 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 آنفلوآنزای طیور H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 میکوباکتریوم توبرکولوسیس HSP۷۰ به پروتئین ماتریکس آنفلوآنزا (M<sub>2</sub>e) و بیان آن در باکتری اشیرشیا کولی (*E. coli*) موفق به ساخت واکسن بسیار موثر نوترکیب (Recombinant) فیوژن پروتئین ۴xM<sub>2</sub>e.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 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 آنفلوآنزا (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 غیر واکسینه 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 استفاده و همچنین هیچگونه ارتباط معناداری بین واکسیناسیون بر علیه آنفلوآنزا و بروز بیماری کم خونی عفونی جوجه‌ها پیدا نکرده و چنین نتیجه‌گیری کردند که واکسیناسیون آنفلوآنزا 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 آنفلوآنزای طیور در سال‌های دور در بین طیور کشور مشهود است ولی بنا به دلایلی نامعلومی در سال ۱۳۷۷ به ناگاه همگیری آنفلوآنزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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

خرگوش، به امکان استفاده از آن در آزمایشات تشخیصی ابراز امیدواری نمودند (۱۲). نوروزیان و وصفی مرنندی (۲۰۰۷ میلادی) در مطالعه‌ای با بکارگیری روش RT-PCR اقدام به ردیابی ویروس آنفلوآنزا تحت تیپ H<sub>9</sub> 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 آنفلوآنزا تحت تیپ H<sub>9</sub> 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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> آنفلوآنزای طیور پرداخته و نتیجه‌گیری نمودند که برای تشخیص و تعیین تحت تیپ ویروس و جداسازی آنفلوآنزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> می‌توان آزمایش RT-PCR را (با بکارگیری آغازگرهای (Primer) اختصاصی H<sub>9</sub>) مستقیماً 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 آنفلوآنزا (H<sub>5</sub> و H<sub>9</sub>) بهره‌برداری نموده و مفید بودن آن روش در تشخیص سریع ویروس‌های آنفلوآنزای طیور و تعیین تحت تیپ‌های آن را گزارش کرده‌اند (۶۵). در یک مطالعه تجربی گلچین فر و همکاران (۲۰۱۴ میلادی) نشان دادند که تعیین تیترا آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین غیر ساختمانی (NS<sub>1</sub>) به روش الیزا، در تشخیص تفریقی تیترا 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 آنفلوآنزای تحت تیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>

زمانی مقدم و همکاران (۱۳۸۰) در طی تحقیقی تجربی به بررسی ایمنی‌زایی چند نوع واکسن کشته آنفلوآنزای تحت تیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> در جوجه‌های گوشتی پرداخته و گزارش نمودند که در تمامی گروه‌های واکسینه شده با واکسن کشته آنفلوآنزا (تحت تیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>)، 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 آنفلوآنزای طیور (RI و FVM) واکسینه شده بودند نسبت به گروه‌هایی که واکسن‌های خارجی آنفلوآنزای طیور (Ivaz و Lohmman) دریافت نموده بودند سطح بالاتری از آنتی‌بادی (در آزمایش HI) نشان دادند (۸). در تحقیق دیگری وصفی مرنندی و همکاران (۲۰۰۲ میلادی) با تهیه واکسن امولسیون روغنی آنفلوآنزای 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 آزمایش HI به بررسی تیترا سرمی اقدام نمودند. نیمی از این جوجه‌ها در سنین ۸ هفتگی (جوجه‌های گوشتی) و ۲۷ هفتگی (جوجه‌های تخم‌گذار) توسط سویه H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> به روش داخل نایی و داخل وریدی آلوده

۶- دوستار، یوسف، طرقي، رضا، هاشمی، مهرداد، و مهاجری، داریوش. (۱۳۸۸). مطالعه تجربی مرگ سلولی در بافت‌های لنفوئیدی جوجه‌های SPF متعاقب عفونت با ویروس آنفلوآنزای مرغی سروتیپ H9N2. فصلنامه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۹ (۲ پی در پی ۵۶)، صفحه ۸۶-۸۱. ۷- دوستار، یوسف، طرقي، رضا، هاشمی، مهرداد، آبالو، حاجی. (۱۳۸۶). مطالعه تجربی آپوپتوز سلول‌های توپولی کلیه جوجه‌های SPF متعاقب عفونت با ویروس آنفلوآنزا سروتیپ H9N2. مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. دوره ۱۷ شماره ۳، صفحه ۱۳۱-۱۲۷.

۸- زمانی مقدم، عبدالکریم، بزرگمهری فرد، محمدحسن، وصفی مرنیدی، مهدی، حسنی طباطبایی، عبدالمحمد. (۱۳۸۰). بررسی تجربی ایمنی‌زایی چند نوع واکسن کشته آنفلوآنزای طیور تحت تیپ H9N2 در جوجه‌های گوشتی. مجله تحقیقات دامپزشکی (دانشگاه تهران)، ۵۶ (۳)، ۱۰۷-۱۰۳. ۹- طرقي، رضا، ممیز، رضا، و پوربخش، سید علی. (۱۳۸۲). مقایسه توالی اسیدهای آمینه در محل شکسته شدن پروتئین هم‌گلوکوتینین سه ویروس آنفلوآنزای طیور H9N2. پژوهش و سازندگی، شماره ۶۰، بهار ۱۳۸۲، صفحه ۱۰۳-۹۵.

۱۰- عزیزپور، آیدین، گودرزی، حسین، چرخکار، سعید، ممیز، رضا، و حبل‌الورید، محمد حسن. (۱۳۹۱). مطالعه تجربی عفونت هم‌زمان ویروس آنفلوآنزای H9N2 و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال 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، حبل‌الورید، محمد حسن، بیژن زاد، پیمان، میرزایی، سید غلامرضا، عشرت آبادی، فاطمه، و محمودزاده، محسن. (۱۳۹۲). مطالعه علائم بالینی و کالبد گشایی ناشی از آلودگی تجربی با ویروس آنفلوآنزای H9N2 و باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال 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 H9N2 ویروس آنفلوآنزای طیور. مجله علوم پایه پزشکی ایران. ۸ (۳۳ پیپای ۲۷)، ۲۰۸-۲۱۴.

۱۳- مقدم پور، مسعود، اخویزادگان، محمد علی، طالب شوشتری، عبدالمحمد، قدسیان، ناصر، چرخکار، سعید، و آقا علیخانی، محمد. (۱۳۸۳). ارزیابی سطح ایمنی حاصل از مصرف دو نوع واکسن کشته روغنی آنفلوآنزای 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 مرنیدی و مهدی رزازیان. (۱۳۸۷). مقایسه RT-PCR با جداسازی ویروس در تشخیص ویروس‌های تحت تیپ H9 آنفلوآنزای طیور. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۳، شماره ۱، صفحه ۲۲-۱۷.

۱۵- وصفی مرنیدی، مهدی، بزرگمهری فرد، محمد حسن، و چرخکار، سعید. (۱۳۸۹). بررسی سرولوژیک آنفلوآنزای طیور در گله‌های ماکیان ایران در طی سال‌های 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

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 آنفلوآنزای H9N2 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 آنفلوآنزای H9N2 در کاهش دفع و ویروس و کاهش شدید تولید تخم مرغ مفید می‌باشد. جدایه‌های ایرانی ویروس آنفلوآنزای H9N2 با گذشت زمان در برخی ژن‌های خود دچار تغییرات ژنتیکی گردیده که می‌تواند باعث تغییر بیماری‌زایی و اثربخشی واکسن‌ها و داروهای مورد استفاده در درمان و پیشگیری از عفونت بشود. ولی تغییرات عمده‌ای در محل شکسته شدن پروتئین هم‌گلوکوتینین آن‌ها، مطابق با مشخصه ویروس‌های بسیار بیماری‌زا صورت نپذیرفته است. پرندگان وحشی در انتشار آلودگی (به تحت تیپ‌های مختلف ویروس آنفلوآنزا) 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 آنفلوآنزای 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 می‌باشد.

### منابع مورد استفاده

۱. بروجرودی، 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 آنفلوآنزای H9N2 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، سعیدعلی، گودرزی، حسین، و بهمنی نژاد، محمدعلی. (۱۳۸۱). جداسازی هم‌زمان اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال و ویروس آنفلوآنزای طیور تحت تیپ H9N2 از طیور صنعتی. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران (دانشگاه شیراز). دوره ۳ شماره ۲، صفحه ۱۹۸-۱۹۰.
۳. پورصفر، فاطمه، کریمی، وحید، چرخکار، سعید، قلیچیری لنگرودی، آرش، و مقصودلو، حسین. (۱۳۹۱). پایش مولکولی تحت تیپ‌های ویروس آنفلوآنزای پرندگان در اردک‌های بومی: یک مطالعه استانی. مجله تحقیقات دامپزشکی (دانشگاه تهران)، ۶۷ (۴)، صفحه ۳۵۱-۳۴۵.
۴. جایدی، امین، صیفی آبادی شاپوری، مسعود رضا، قربان پور نجف آبادی، مسعود، و میاحی، منصور. (۱۳۸۹). تعیین توالی و بررسی فیلوژنتیک ژن NP در ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H9N2 جدا شده در شهر اهواز. مجله دامپزشکی ایران، دوره ۶، شماره ۴، صفحه ۱۰۰-۱۰۷.
- ۵- دوستار، یوسف، مهاجری، داریوش، و فیضی زنگبار، عادل. (۱۳۸۸). مطالعه آسیب شناسی بافتی تاثیر ویروس آنفلوآنزای تحت تیپ H9N2 در دستگاه تنفسی جوجه‌های SPF. دامپزشکی، ۳ (۷)، ۱۰-۱.



- هیستوپاتولوژیک و ردیابی آنتی ژن ویروسی در ماکیان گوشتی تلقیح شده با ویروس آنفلوئازای طیور H9N2. مجله دامپزشکی ایران (دانشگاه شهید چمران اهواز). ۴ (۴ مسلسل ۲۱)، صفحه ۶۱-۷۱.
- 17- Aghahosseini 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 rhinotracheale* 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., Momayez, R., Bozorgmehri Fard, M. H., Hablolvarid, M. H., Mohmoodzadeh, M., Jeyrani Moghaddam, A. R., Kaboli, K., Azizpour, A., and Eshratbadi, F. (2013). Study on clinical aspect of SPF chicken 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 Eshratbadi, 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., Zabehe 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., Bozorghmehrfard, M. H., Akhaviadegan, M. A., Gaidet, N., Newman, S. H., Hammoumi, S., Cattoli, G., Globig, A., Hoffmann, B., Sehati, M. E., Masoodi, S., Dodman, T., Hagemeyer, 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. *Archives of Razi institute*, 69(1), 41-45.
- 36- Hablolvarid, M.H., Sohraby Haghdst, 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 Haghdoost, 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. Journal 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., Eshraty, 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., Shirazinejad, 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 molecular 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., Bozorgmehrfard, 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., Goodarzi, R., and Akbarnejad, 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 haemagglutination inhibition antibodies in a multi aged layer farm following avian influenza outbreak due to H9N2 sub-serotype in 1998 in Iran. Journal 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 pathogenicity of A/Chicken/ZMT/- 173/99(H9N2) strain 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., Bozorgmehrfard, 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., Bozorgmehrfard, 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.

