در امور دام و آبزیان

مقایسه توالی اسیدهای آمینه در محل شکسته شدن پروتئین هماگلوتینین سه ویروس آنفلوانزای طیور (H_9N_2)

• رضا طرقی، • رضا ممیز و • سید علی پور، بخش موسسه تحقیقات واکسن وسرم‌سازی رازی، کرج بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش: مهرماه ۱۳۸۲

چکیده

صنعت طیور کشور ایران از سال ۱۳۷۷ درگیر بیماری آنفلوانزای طیور (H_9N_2) می‌باشد. بروز بیماری با تلفات بالا این تصور را ایجاد کرده است که ویروس آنفلوانزا در سطح مزرعه دچار تغییرات ژنتیکی شده است. در این مطالعه سه ویروس آنفلوانزای طیور (H_9N_2) جدا شده از گله های آلوده با تلفات متفاوت مورد شناسائی ملکولی قرار گرفتند. قطعه ۴۸۶ جفت‌باز در این ویروس‌ها که در برگیرنده نوکلئوتیدهای محل شکسته شدن پروتئین هماگلوتینین بود توسط PCR تکثیر و سپس توالی نوکلئوتیدهای آنها مشخص شد. آنالیز نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه موید وجود سه ویروس بسیار شبیه به یکدیگر ولی متمایز از همدیگر بود. همانند ویروس‌های آنفلوانزای طیور (H_9N_2) سایر کشورهای آسیائی و اروپائی، اسیدهای آمینه محل شکسته شدن پروتئین هماگلوتینین ویروس‌ها (PARSSR*G) کاملا شبیه به یکدیگر بودند. آنالیز فیلوژنی ۴۵۳ جفت‌باز محصولات PCR این ویروس‌ها به‌همراه ویروس‌های گزارش شده از سایر نقاط جهان نشان داد، ویروس‌های آنفلوانزای طیور ایران رابطه بسیار نزدیکی با یکدیگر داشته و به احتمال فراوان دارای منشاء یکسانند. بیشترین قرابت ژنتیکی این ویروس‌ها به ترتیب با ویروس‌های آنفلوانزای طیور کشور عربستان سعودی، آلمان و پاکستان بود. نتایج این مطالعه نشان داد که علیرغم بروز تلفات زیاد در سطح مزرعه، ویروس‌های آنفلوانزای طیور ایران شبیه ویروس‌های غیر بیماری‌زای H_9N_2 گزارش شده از سایر کشورهای اروپائی و آسیائی (به جز کشور چین) بوده و تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در این ویروس‌ها منجر به افزایش حدت آنها نشده است.

کلمات کلیدی: ویروس آنفلونزای طیور، پروتئین هماگلوتینین ، مقایسه فیلوژنی، H_9N_2

Pajouhesh & Sazandegi No 60 pp: 95-103

Amino acid sequence analysis of cleavage site of hemagglutinin protein in three avian influenza viruses (H9N2)

By: Toroghi, R., Momayez, R. and Porbakhsh, S.A. Members of Scientific Board of Research & Diagnosis of Avian Diseases Department, Razi Vaccine & Serum. Research Institute, Tehran, Iran.

Since 1998, Iranian poultry industry has been affected by avian influenza (AI) virus,subtype H9N2. The association of high mortality with these outbreaks in the field raised the specter of a possible new genetic modified AI virus. In this study, three AI viruses (H9N2) isolated from the broiler flocks with different mortality rates were characterized.The 486 bp PCR products containing the cleavage site of hemagglutinin (HA) protein were generated and sequenced to determine molecular characterization of the isolates.Sequence analysis of main region ofHAl gene of three isolates showed that the viruses had similar sequences at the cleavage site. However, none of the isolates were identical at the nucleotide as well as amino acid levels. Phylogenefic analysis of 453 bp nucleotide region of the PCR products revealed that Iranian AI viruses had very close relationship to each other indicating these came from the common source. Moreover, the maximum genetic similarity of these viruses was observed with AI viruses from Saudi Arabia, Germany and Pakistan, respectively. Overall, the results indicate that with the exception of some Chinese isolates the current status of Iranian AI viruses resembles to other Eurasian H9N2 viruses and in spite of different nucleotide sequences among the viruses there is no evidence for existence of new AI pathotype.

Key words: Avian influenza virus, Hemagglutinin protein, H9N2, Phylogenetic analysis

Pajouhesh & Sazandegi

مقدمه

آنفلوانزای طیور یک عفونت یا بیماری ویروسی است که توسط تیپ A ویروس‌های آنفلوانزا ایجاد می‌شود. ویروس‌های آنفلوانزا در خانواده ارتومیکسوویریده قرار داشته و دارای ژنوم قطعه‌ای با پولاریته منفی هستند. این ویروس‌ها براساس شاخص های آنتی ژنیکی پروتئین های نوکلئوپروتئین و ماتریکس، به سه تیپ A، B و C تقسیم بندی شده‌اند. در این میان فقط تیپ A ویروس‌های آنفلوانزا هستند که می‌توانند ایجاد عفونت طبیعی در پرندگان نمایند. براساس شاخص های آنتی ژنیکی دو گلیکو پروتئین سطحی هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA)، تیپ A این ویروس‌ها به ۱۵ تحت A (تیپ ۱ تا ۱۵) و ۹ تحت تیپ N (۱تا ۹) طبقه بندی شده اند (۲۹) . دامنه وسیعی از حدت در ویروس‌های تیپ A آنفلوانزای طیور وجود دارد که از یک عفونت بدون علائم بالینی تا ظهور صد در صد تلفات در پرندگان حساس متغیر می باشد. عموماً آلودگی ماکیان و بوقلمون با ویروس‌های با حدت کم منجر به ظهور علائم خفیف تنفسی، کاهش میزان تولید تخم و در بعضی موارد تلفات کم می‌شود. این ویروس‌ها می توانند با حضور و تداخل سایر میکروارگانیسم ها یا عوامل نا مساعد محیطی موجب وخیم تر شدن بیماری و تلفات بالا شوند و این در صورتی است که این ویروس‌ها به تنهائی در شرایط تجربی فقط قادر به ایجاد بیماری خفیف می باشند (۱) . به نظر می رسد حدت ویروس آنفلوانزا تحت کنترل چندین عامل باشد بطوریکه قلمداد کردن یک عامل به عنوان عامل حدت بسیار دشوار می باشد. با این وجود یکی از مهمترین عواملی که در حدت ویروس آنفلوانزا نقش دارد شکسته شدن پروتئین هماگلوتینین می باشد. تمامی ویروس‌های آنفلونزا با حدت بالا در محل شکسته شدن این پروتئین دارای اسیدهای آمینه بازی هستند که بصورت متوالی پشت سر هم قرار گرفته‌اند و این در حالی است که ویروس‌های با حدت کم فاقد این توالی در محل مذکور می باشند (۳، ۲۲، ۲۳، ۲۹). تحت تیپ H_9 از ویروس‌های آنفلوانزای طیور با حدت کم می‌باشد که در اواخر سالهای دهه ۱۹۹۰ گزارشات متعددی از وقوع آنفلوانزا با این تحت تیپ از نقاط مختلف دنیا گزارش شده است. وقوع آنفلوانزای طیور با تحت تیپ H_9N_2 در ماکیان، بوقلمون و اردک‌های اهلی کشور آلمان در طی سالهای ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۷ (۲۸) در ماکیان کشور ایتالیا در سال ۱۹۹۵(۱۷)در قرقاول های کشور ایرلند در سال ۱۹۹۷ (۵) در شتر مرغهای کشور آفریقای جنوبی در سال ۱۹۹۵ (۲) در بوقلمون‌های کشور آمریکا در سال ۱۹۹۵ (۷) در ماکیان کشور کره در سال ۱۹۹۶ (۱۱) و در ماکیان کشور پاکستان در سال ۱۹۹۸ تا ۱۹۹۹(۱۳) گزارش شده است. اگرچه تحت تیپ H_9 ویروس آنفلونزا به‌طور منظم در طی ۳۰ سال گذشته از پرندگان وحشی و اهلی جدا شده است ولی هرگز چنین وقوعی به‌طور همزمان با یک تحت تیپ مشخص (H_9N_2) گزارش نشده بود (۴). البته جداسازی تحت تیپ (H_9N_2) از خوکهای کشور چین و همچنین از موارد وقوع آنفلوانزای انسانی(۹، ۱۸، ۱۹) اهمیت این تحت تیپ را بیشتر کرده است. پس از واگیری صنعت طیور کشور ما به آنفلوانزا در سال ۱۳۷۷ این صنعت متحمل خسارات اقتصادی سنگینی گشت. پس از جداسازی ویروس مشخص شد که این ویروس در تحت تیپ H_9N_2 قرار دارد (۲۰). متاسفانه علیرغم تلاشهای فراوان هنوز این صنعت نتوانسته است از این بیماری رهائی یابد . طی چند سال گذشته موارد بسیار زیادی از این بیماری در بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور موسسه رازی ثبت شده است که در بعضی موارد مرغداران، شکایت از وجود تلفات بسیار زیاد در سطح گله های خود را داشتند. با توجه به تغییرات آنتی ژنیکی سریع این ویروس و ظهور سویه‌های با حدت بالا از سویه‌های مادری با حدت کم در نقاط مختلف جهان، این سئوال مطرح شد که آیا ویروس‌های موجود در گله دستخوش تغییرات آنتی ژنیکی و یا حدتی شده‌اند. اخیراً ما نشان دادیم که در شرایط آزمایشگاهی در جوجه های S PF هیچگونه تفاوتی در میزان حدت سه ویروس جدا شده از دو وقوع بیماری آنفلوانزا با تاریخچه تلفات بالا و یک وقوع بیماری با تاریخچه تلفات پائین در ماکیان وجود ندارد (۱۲). همانطور که گفته شد از طرفی تغییرات و نوع اسیدهای آمینه در محل شکسته شدن پروتئین HA یکی از مهمترین عوامل تاثیرگذار در حدت ویروس آنفلوانزا می‌باشد (۲۲). این مطالعه تغییرات احتمالی در محل شکسته شدن پروتئین HA در سه ویروس مذکور و تعیین میزان قرابت ژنتیکی این ویروس‌ها با ویروس‌های تحت تیپ H_9N_2 گزارش شده از سایر نقاط دنیا را مورد بررسی قرار می‌دهد.

مواد و روش کار

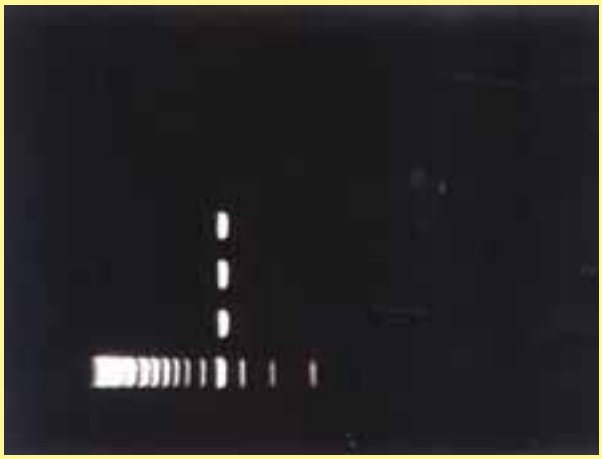
ویروس‌ها

از دو وقوع آنفلوانزای طیور در گله‌های مرغ گوشتی شهرستان هشتگرد با تاریخچه تلفات بالا (A/chicken /Iran/۷۷۲/۲۰۰۰, A/chicken /Iran/۵۲۸/۲۰۰۱) و از یک وقوع این بیماری در شهرستان کرج با تاریخچه تلفات پائین (A/chicken /Iran/ ۷۹۸/۲۰۰۰) سه ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H_9N_2 در بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور موسسه رازی جداسازی گردیده بود که این ویروس‌ها در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. هریک از این ویروس‌ها برای دو بار بر روی تخم مرغهای جنین دار SPF (Valo, Lohmann, Germany) توسط Limiting dilution کلون شده بودند.

استخراج RNA و RT – PCR

جداسازی RNA ویروسی از مایع آلانتوئیک تخم مرغ های جنین دار SPF که ویروس‌ها در آنها تکثیر شده بودند با استفاده از محلول تجارتی Tripure (Roche,Germany) صورت گرفت. به‌طور خلاصه ۰/۱ میلی لیتر مایع آلانتوئیک با ۱ میلی لیتر محلول Tripure مخلوط شده سپس به این محلول ۰/۲ میلی لیتر کلروفرم اضافه شد. پس از سانتریفوژ، RNA

موجود با اســتفاده از ۰/۵ میلی لیتر ایزوپرونول رسـوب داده شـد. RNA ترسـیب شده با الکل اتیلیک ۷۵٪ شستشو و در انتها در ۱۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز حل شد. با استفاده از یک میکروگرم RNA به‌دست آمده، پرایمررانـدوم ،آنزیم ترانس کریپتاز معکوس M-MULV و بنابه دسـتور العمل شـرکت سـازنده آنزیم، cDNA ویروس‌ها سـاخته شـد (Roche, Germany). واکنـش PCR بـرای تکثیر قطعـه ۴۸۶ جفت‌باز از cDNA ساخته شـده که در برگیرنده محل شکسته شدن پروتئین HA بود، انجام گرفـت. تکثیر این قطعه در ۵۰ میکرولیتر محلول واکنش PCR که حاوی ۲ میکرولیتر cDNA، ۱۵ پیکومول از هر یک از پرایمرهای گزارش شـده توسـط Banks و همـکاران (۴) (TGGGCATACAYCAY-'۳- ۵ و پرایمـر معکـوس ۳- TCTATGAACCCWGCWATTGCTCC - ۵) ۱۰۰ میکرومول مخلوط dNTPs، ۱/۵ میلی مول منیزیم کلراید و یک واحـد آنزیم DNA پلی مراز Taq(Roche, Germany) بود انجام گرفت. واکنش فوق با استفاده از ماشین PCR (Eppendorf Mastercycler. gradIent) و بـا برنامه ۹۴، ۶۶، ۷۲ درجه سانتیگراد هر یک به مدت ۴۵ ثانیه با ۳۰ بار تکرار و در انتها



شکل ۱ – الکتروفورز ژل آگاروز محصولات PCR سه ویروس آنفلوانزای طیور ایران با اندازه جفت‌باز ۴۸۶ به همراه مارکر ۱۰۰ جفت‌باز DNA

۷۲ درجه سـانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. تائید اندازه محصولات PCR به دست آمده با استفاده از جداسازی توسط الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد بهمراه مارکر استاندارد ۱۰۰ جفت‌باز صورت پذیرفت.

تعیین توالی نوکلئوتیدها و آنالیز فیلوژنی

خالـص سـازی محصـولات PCR ویروس‌هـا بـا اسـتفاده از کیـت تجارتـی خالـص سـازی محصـولات PCR (Roche) انجام شـد. تعیین توالی نوکلئوتیدهای این محصولات با اسـتفاده از پرایمرهای مذکور توسط شـرکت MWG-BIOTECH (AG,GERMANY) انجام گرفت. آنالیز نوکلئوتیدهای بدسـت آمده و اسـیدهای آمینه مربوط به آنها توسط برنامه نرم افزار (version۵ DNASTAR صورت گرفت (DNASTAR Inc., Madison, USA).

آنالیز فیلوژنی

آنالیز فیلوژنی این سـه ویروس به همراه ۱۵ ویروس گزارش شده برای ۴۵۳ نوکلئوتیـد بـا موقعیت نوکلئوتیدهای ۵۷۱ تا۱۰۲۲ براسـاس توالی نوکلئوتیدهـای ویـروس A/turkey/Wisconsin/۶۶ (۱۵) کـه معـادل موقعیت اسـیدهای آمینه ۱۹۱ تا ۳۴۱ بود انجام شـد . اطلاعات مربوط به این ویروس‌ها به همراه شـماره دسترسی به آنها در Genbank در جدول یک آمده است.

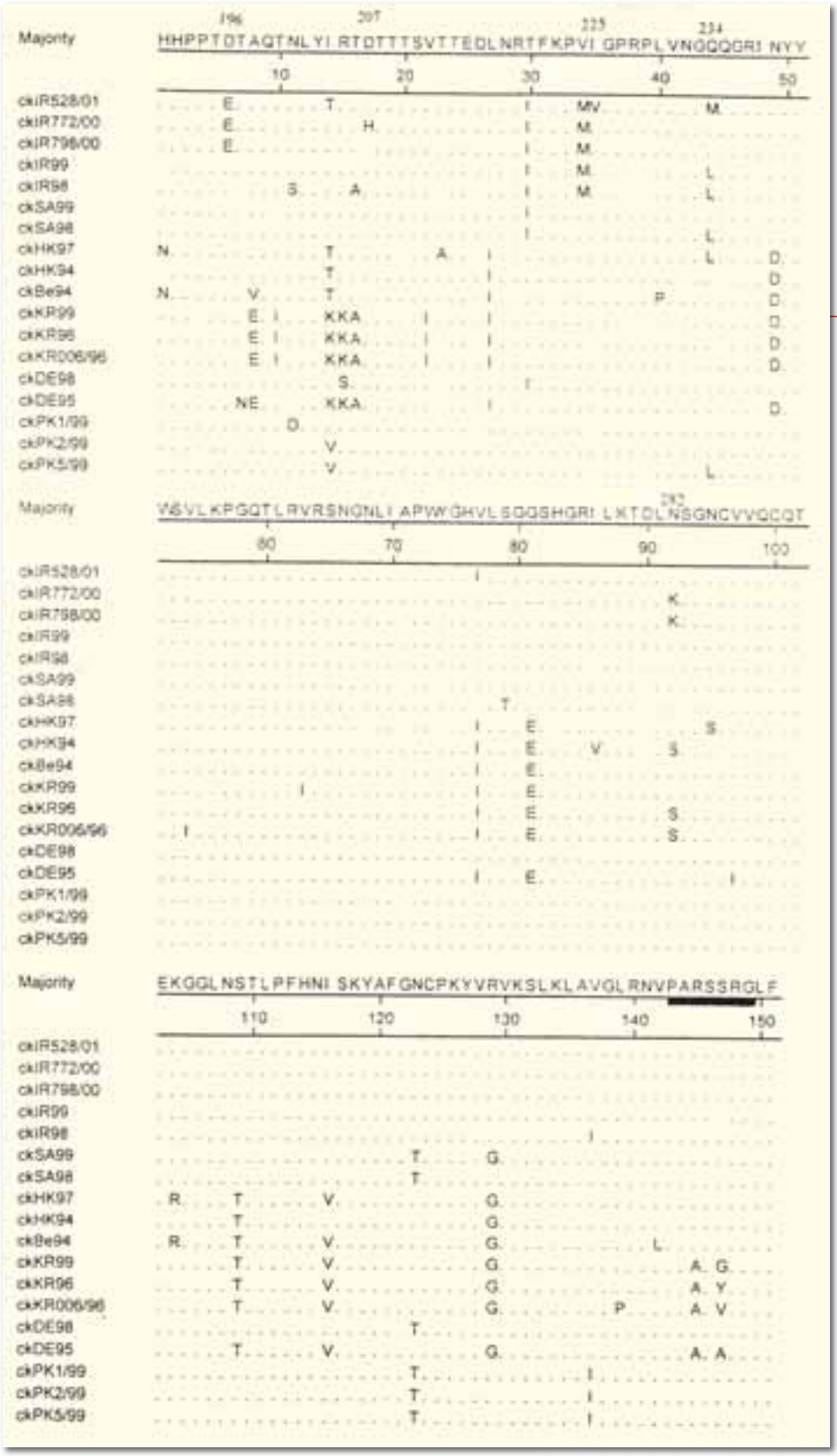
نتایج

RT-PCR

محصـولات PCR با اندازه ۴۸۶ جفت‌باز برای سـه ویروس اسـتفاده شـده در این مطالعه با اسـتفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. صحت محصـولات PCR فوق با اسـتفاده از انـدازه آنها بـر روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز (شـکل ۱) و تعیین توالی نوکلئوتیدهای آنها صورت پذیرفت . این محصولات حاوی قسمت C ترمینال HA_1 و ابتدای N ترمینال HA_2 ژن HA ویروس‌ها بودند. به عبارتی این محصولات حاوی ناحیه شکستگی ژن HA ویروس‌های مورد مطالعه بودند. پس از تعیین توالی نوکلئوتیدها، اسید آمینه های مربوط به این نوکلئوتیدها توسط نرم افزار DNASTAR تعیین و بـا تمام ویروس‌های آنفلوانزای طیور H_9N_2 موجود در Genbank که با منشاء جداسـازی از ماکیان بود مقایسه شد(شکل ۲). همانگونه که دراین شـکل مشخص است برای ویروس‌های آنفلوانزای طیور ایران از سال ۱۹۹۸ الی ۲۰۰۱ حداقل یک نماینده ویروسـی به ازاء هر سـال موجود می‌باشد. مقایسه سه ویروس مورد مطالعه در این بررسی نشان داد که شباهت کاملاً یکسـانی ما بین آنها در سطح اسـیدهای آمینه یا نوکلئوتیدها وجود ندارد. تعداد اسـیدهای آمینه جانشین شده در ویروس‌های IR۵۲۸/۰۱ IR۷۷۲/۰۰ ،۰۱ و IR۷۹۸/۰۰ در مقایسـه با اسـیدهای آمینه توالـی majority به ترتیب ۴ ، ۵ و ۷ اسیدآمینه بود.

در مقایسـه بـا ویروس‌هـای آنفلوانـزای طیـور سـایر کشـورها بیشـترین شـباهت اسـیدهای آمینـه ویـروس هـای IR۵۲۸/۰۱,IR۷۷۲/۰۰,IR۷۹۸/۰۰ با ویروس آنفلوانزای کشور عربستان سـعودی (ckSA۹۹) و کشور آلمان (ckDE۹۸) بود که به ترتیب ۹۶/۷ ، ۹۶ و ۹۴/۷ درصد بود و بیشترین تفاوت این ویروس‌ها با ویروس آنفلوانزای طیور کـره جنوبی (ckkR۰۰۶/۹۶) بود که به ترتیب ۱۵/۴، ۱۶/۲ و۱۶/۲ درصد بود. به‌نظر می‌رسـد نمونه ویروس آنفلوانزای کشور آلمان ckIR۹۸ اولین نمونه ویروس جدا شـده از ایران باشد که تعیین توالی نوکلئوتیدهای آن توسـط Banks و همکاران انجام شـده اسـت. بیشـترین شـباهت اسـیدهای آمینه ایـن ویروس با ویروس‌های آنفلوانزای کشـور عربسـتان سـعودی (ckSA۹۸) و کشـور پاکسـتان (ckPK۵/۹۹,ckPK۱/۹۹) و سـپس بـا ویـروس ckDE۹۸ بـود (بـه ترتیـب ۹۶ و۹۵/۴ درصد). بیشـترین تفاوت ویروس ckIR۹۸ با ویروس آنفلوانزای طیور کره جنوبی (ckkR۰۰۶/۹۶) بود (۱۶/۲ درصد) . چنانچه در شکل ۲ مشاهده می‌شود اسیدهای آمینه در موقعیت

(N to K) ۲۸۲, (Q-L to M) ۲۳۴, (L to V) ۲۲۵, (V to M)۲۲۴
(D to H) ۲۰۷, (D to E) ۱۹۶

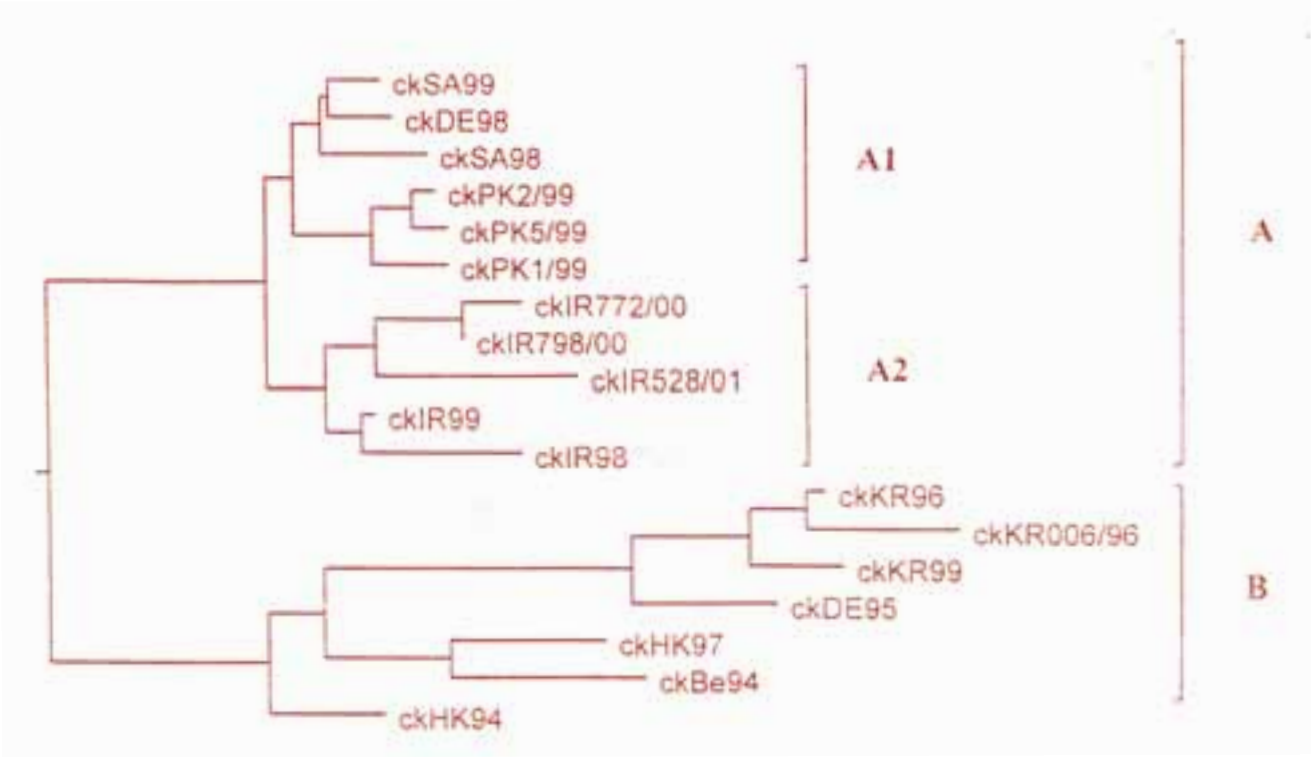


شکل ۲ – مقایسه توالی اسیدهای آمینه سه ویروس آنفلوانزای طیور ایران با ۱۵ ویروس آنفلوانزای طیور جدا شده از ماکیان در اطراف محل شکسته شدن پروتئین HA . اسیدهای آمینه مشابه با Majority با خط تیره مشخص شده اند. محل شکسته شدن پروتئین HA با خط کشی زیر این ناحیه مشخص شده است و شماره اسید های آمینه جانشین شده با عدد مشخص شده اند.

اختصاصی ویروس‌های آنفلوانزای مورد مطالعه در این بررسی می‌باشند. مقایسه این اسیدهای آمینه با اسیدهای آمینه ویروس‌های آنفلوانزای طیور (H_9N_2) گزارش شده از سایر پرندگان نشان داد که فقط اسیدهای آمینه در موقعیت ۲۲۵(V) ، ۲۰۷(H)، ۱۹۶ (E) و ۲۳۴ (M) منحصر به ویروس‌های مورد مطالعه می باشند. با مقایسه محل شکسته شدن پروتئین HA در ویروس‌های مورد مطالعه و استفاده شده در این بررسی مشخص گردید که پنج نوع موتیف (motif) در نمونه ها وجود دارد ،به جز سه نوع موتیف در سه ویروس آنفلوانزای طیور کشور کره جنوبی و یک نوع دیگر motif در ویروس آنفلوانزای طیور کشور آلمان بقیه ویروس‌ها دارای موتیف مشترک (R-S-S- R -G) بودند و هیچ تغییری در موتیف ذکر شده در سه ویروس مورد مطالعه مشاهده نشد.

آنالیز فیلوژنی

اسیدهای آمینه در سه ویروس مطالعه شده به‌همراه ۱۵ ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H_9N_2 گزارش شده با استفاده از برنامه Megaliagn به روش Clustal W مورد تجزیه و بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این بررسی به‌صورت درخت فیلوژنی در شکل ۳ آمده است. ویروس‌های مورد بررسی تشکیل دو گروه عمده (B,A) را داده‌اند در گروه Aتمامی ویروس‌های آنفلوانزای طیور کشورهای ایران ، پاکستان ، عربستان سعودی و یک ویروس از کشور آلمان قرار



شکل ۳ – درخت فیلوژنی براساس توالی اسیدهای آمینه اطراف محل شکسته شدن پروتئین HA در سه ویروس آنفلوانزای طیور ایران بهمراه ۱۵ ویروس آنفلوانزای طیور جدا شده از ماکیان . فاصله شاخه ها معرف میزان تفاوت توالی‌هاست.

دارند. این گروه خود به دو تحت گروه(A_2,A_1) تقسیم می‌شود. در تحت گروه A_1 ویروس‌های آنفلوانزای طیور کشور عربستان سعودی به‌همراه آلمان و پاکستان مستقل از یکدیگر قرار گرفته اند. در تحت گروه A_2 تمامی ویروس‌های آنفلوانزای طیور ایران قرار گرفته اند. در گروه B ویروس‌های آنفلوانزای طیور کشورهای چین ،کره جنوبی به‌همراه یک ویروس از کشور آلمان قرار دارند به‌طوریکه تمام ویروس‌های آنفلوانزای طیور کشور کره جنوبی به‌همراه نمونه ویروسی کشور آلمان در یک تحت گروه مجزا قرار دارند . چنانچه در شکل ۳ مشاهده می‌شود تمامی ویروس‌های آنفلوانزای طیور ایران جدا شده در طی سالهای ۱۳۷۷ الی ۱۳۸۰ در یک تحت گروه قرار داشته و اختلاف آنها از نمونه اولیه جدا شده در سال ۱۳۷۷ (ckiR ۹۸) به‌صورت پلکانی به ازاء هر سال بیشتر شده است. هنگامی که ویروس های آنفلوانزای طیور کشورهای ایران،پاکستان ، عربستان سعودی به‌طور جداگانه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند دور بودن و متفاوت شدن نسبت به سویه اولیه در نمونه های ویروس آنفلوانزای طیور ایران بیشتر مشهود گردید به‌طوریکه ویروس ckIR۵۲۸/۰۱ به طور مستقل در یک گروه قرار گرفت (شکل ۴) .

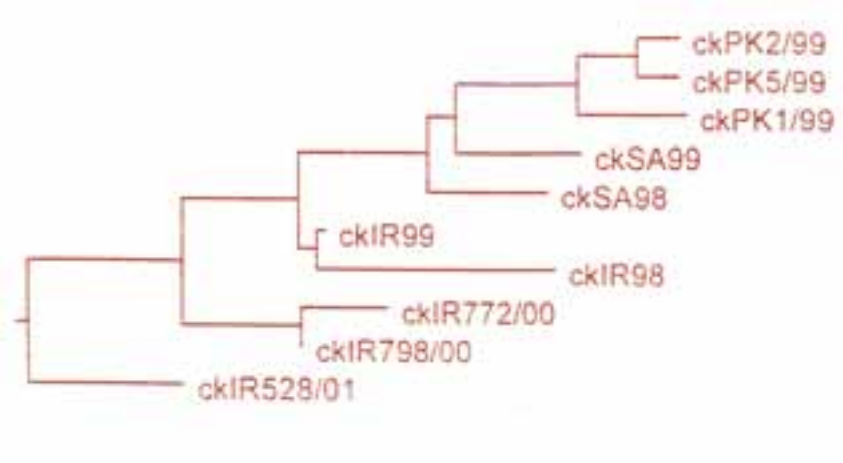
بحث:

با ورود ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H_9N_2 به صنعت طیور کشور ما در سال ۱۳۷۷ ،این صنعت تاکنون متحمل خسارات بسیار سنگینی شده است . پس از اولین جداسازی ویروس در کشور (۲۰، ۲۷) تاکنون مطالعه کاملی در خصوص تعیین حدت ویروس های جدا شده براساس دستور العمل های بین المللی انجام نشده است واین در حالی است که تعیین حدت ویروس آنفلوانزای طیور یکی از مهمترین اصول جهت اعمال سیاستهای پیشگیری، کنترل و ریشه کنی بیماری است. حدت در ویروس آنفلوانزای طیور طیف وسیعی را شامل می‌شود که از سویه های بسیار بیماری‌زا تا سویه های غیر بیماری‌زا متغیر است . براساس دستورالعمل OIE (Office International des Epizooties)، ویروس آنفلوانزای طیور که یک یا چند معیار از سه معیار زیر را دارا باشد به عنوان ویروس بسیار بیماری‌زا محسوب می‌شود. این سه معیار شامل : ۱ – هر ویروس آنفلوانزا که بتواند بیشتر از ۷۵ در صد جوجه های ۴ تا ۶ هفته حساس را متعاقب تزریق ۰/۲ میلی لیتر از محلول رقیق شده (۱۰: ۱) مایع عفونی آلانتوئیک در طی ده روز تلف کند ۲- هر ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H_5 یا H_7 که نتواند شرط اول را احراز نماید ولی توالی موتیف در محل شکسته شدن پروتئین HA آنها با ویروس های بسیار بیماری‌زا گزارش شده مشابه باشد. ۳ – هر ویروس آنفلوانزا که در تحت تیپ H_5 یا H_7قرار نمی‌گیرد ولی توانائی ایجاد تلفات کمتر از ۷۵٪ در جوجه های حساس را داشته و می تواند در غیاب تریپسین در کشت سلولی رشد کند . اصولاً به تمام ویروس‌های آنفلوانزا طیورکه نتوانند حداقل یکی از این سه معیار را کسب نمایند ویروس‌های غیر بسیار بیماری‌زا اطلاق می‌شود که اینها خود به دو گروه غیر بیماری‌زا و با بیماری‌زائی کم تقسیم می شوند . ویروس‌های غیر بیماری‌زا آن دسته از ویروس‌هائی هستند که متعاقب

جدول ۱ – اطلاعات مربوط به ویروس های مورد بررسی قرار گرفته و ویروس‌های استفاده شد در این مطالعه که همگی آنها دارای تحت تیپ H۹N۲ و از ماکیان جدا شده بودن

شماره دسترسی	موتیف محل شکسته شدن پروتئین HA	نام اختصار	سویه ویروس
AJ۵۳۶۳۳۱	PARSSRG	ckIR۵۲۸/۰۱	A/chicken/Iran /۵۲۸/۰۱
AJ۵۳۶۳۳۰	PARSSRG	ckIR۷۷۲/۰۰	A/chicken/Iran /۷۷۲/۲۰۰۰
AJ۵۳۶۳۳۲	PARSSRG	ckIR۷۹۸/۰۰	A/chicken/Iran /۷۹۸/۲۰۰۰
AF۲۱۸۱۱۲	PARSSRG	ckIR۹۹	A/chicken/Iran /۱۱T/۹۹
AF۲۱۸۱۰۹	PARSSRG	ckIR۹۸	A/chicken/Iran /۱۶/۹۸
AF۲۱۸۱۱۴	PARSSRG	ckPK۱/۹۹	A/chicken/Pakistan /۱/۹۹
AF۲۱۸۱۱۵	PARSSRG	ckPK۲/۹۹	A/chicken/Pakistan /۲/۹۹
AF۲۱۸۱۱۸	PARSSRG	ckPK۵/۹۹	A/chicken/Pakistan /۵/۹۹
AF۲۱۸۱۱۹	PARSSRG	ckSA۹۹	A/chicken/Saudi Arabia/۵۳۲/۹۹
AF۲۱۸۱۱۰	PARSSRG	ckSA۹۸	A/chicken/Saudi Arabia/۲۲۴/۹۸
AF۱۵۶۳۷۴	PARSSRG	ckHK۹۷	A/chicken/Hong kong/G۲۳/۹۷
AF۱۵۶۳۸۰	PARSSRG	ckBe۹۴	A/chicken/Beijing/۱/۹۴
AF۱۵۶۳۷۹	PARSSRG	ckHK۹۴	A/chicken/Hong kong/۷۳۹/۹۴
AF۲۱۸۱۰۷	PARSSRG	ckDE۹۸	A/chicken/Germany/R۴۵/۹۸
AF۲۱۸۰۹۹	PAASARG	ckDE۹۵	A/chicken/Germany/۹۰/۹۵
AF۱۵۶۳۸۵	PAASVRG	ckKR ۰۰۶/۹۶	A/chicken/korea/۲۵۲۳۲-۰۰۶/۹۶
AF۱۵۶۳۸۴	PAASYRG	ckKR۹۶	A/chicken/korea/۳۸۳۴۹-p۹۶۳۲۳/۹۶
AF۲۱۸۱۱۱	PAASGRG	ckKR۹۹	A/chicken/korea/۹۹۰۲۹/۹۹

تزریق به جوجه های حساس نتوانند علائم بالینی یا تلفات ایجاد نمایند ولی ویروس‌های با بیماری‌زائی کم می توانند متعاقب تزریق به جوجه های حساس تا اندازه‌ای علائم بالینی و تلفات کمتر از ۷۵٪ ایجاد نمایند(۲۴). با شیوع بیماری آنفلوانزا در صنعت طیور ایران گزارشات متعددی مبنی بر تلفات بسیار زیاد ناشی از ویروس‌های آنفلوانزا در سطح مزرعه گزارش گردیده است(۲۷،۱۶). در این مطالعه شناسائی ملکولی دو ویروس اخذ شده از گله های آلوده با تاریخچه تلفات بالا و یک ویروس آنفلوانزای طیور از گله آلوده با تاریخچه تلفات پائین براساس معیارهای توصیه شده OIE مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات انجام شده در بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور موسسه رازی نشان داد این سه ویروس در تحت تیپ H۹N۲ قرار داشته و علیرغم وجود تاریخچه تلفات متفاوت، کلون های اخذ شده از این سه ویروس به جزءعلائم تنفسی خفیف و کاهش اشتها نتوانستند هیچگونه علائم بالینی دیگری و یا تلفات در جوجه های حساس SPF ایجاد نمایند. همچنین هیچیک از این سه ویروس نتوانستند در شرایط کشت سلولی رشد نمایند (۱۲) . قطعه ۴۸۶ جفت‌باز برای سه ویروس مذکور که حاوی محل شکسته شدن پروتئین HA بود توسط RT-PCR تکثیروتعیین توالی نوکلئوتید آنها صورت پذیرفت. عدم وجود کاملاً یکسان شباهت در سطح اسیدهای آمینه و نوکلئوتید ها موید وجود سه ویروس متفاوت بود. مقایسه این ویروس‌ها با دو ویروس آنفلوانزای طیور ایران که قبلاً تعیین توالی نوکلئوتید آنها صورت گرفته بود (۴) نشان داد که اگرچه تا حدود زیادی این دو ویروس شبیه ویروس‌های مورد مطالعه در این بررسی بودند ولی کاملاً یکسان نبودند. این امر حاکی از قدرت موتاسیون و تغییر سریع ژنتیکی ویروس آنفلوانزا است. توالی اسیدهای آمینه این سه ویروس با توالی اسیدهای آمینه۱۵ ویروس آنفلوانزای طیور



منتشـر شـده (H_9N_2) که از ماکیان جدا شده بودند مورد مقایسه ژنتیکی قرار گرفت.

این مقایسه نشـان داد که اسیدهای آمینه در موقعیت

(Q-L to M) ۲۳۴, (I to V) ۲۲۵ (V to M) ۲۲۴, (D to H) ۲۰۷, (D to E) ۱۹۶

منحصر به ویروس‌های مورد بررسی در این مطالعـه بودند. ولی هنگامی‌که این مقایسـه با تمامی ویروس‌های آنفلوانـزای طیور (H_9N_2) موجود در Genbank صورت گرفت مشـخص گردیـد که فقط اسـیدهای آمینـه در موقعیت ۱۹۶، ۲۰۷، ۲۲۵و ۲۳۴ منحصر به ویروس‌های آنفلوانـزای طیور ایران بودند.به عبارتی می توان گفت کـه احتمالاً جانشـینی اسـیدهای آمینه مذکور در روند پاساژ ویروس در سطح مزرعه در کشور ما اتفاق افتاده است. با توجه به حدت کم این سـه ویروس، میتوان اسـتنتاج نمود که تغییرات اسـیدهای آمینه فوق نمی توانند عامل حدت در این ویروس‌ها باشند، ولی ممکن است موجب تغییر آنتی ژنیکی شده باشند.

مقایسه موتیف محل شکسته شدن پروتئین HA ویروس‌های استفاده شـده در این مطالعه نشـان داد که ویروس‌های آنفلوانـزای طیور (H_9N_2) در کشورهای آسـیائی (به جزء کشور کره جنوبی) دارای موتیف مشترک (R-S-S-R□G) هسـتند. به عبارتی اگرچه سه ویروس مورد مطالعه ما از گله های با تاریخچه تلفات متفاوت جدا شده بودند ولی همگی آنها موتیف مشـابه در محل فوق داشـتند. مقایسـه این موتیف با موتیف مشابه آن در ویروس‌هـای آنفلوانـزای طیور تحت تیپ H_5 یا H_7 که بسـیار بیماری‌زا بودند موید عدم وجود توالی پی در پی اسـیدهای آمینه بازی بود. از طرفی اطلاعـات اخیر حاکی از حضور ویروس‌های آنفلوانزای H_9N_2 با حدت بالا (۶) وتروپیسـم بافتی گسـترده تر (۸) اسـت به‌طوری که در موتیف محل شکسـته شـدن پروتئین HA آنها اثری از توالی پی در پی اسیدهای آمینه بازی نیست. شـواهد حاصل از تعیین حدت براساس دستورالعمل OIE در سـه ویروس آنفلوانزای طیور جدا شده از گله های آلوده که دارای تاریخچه تلفات متفاوت بودند نشـان داد که ویروس آنفلوانـزای طیور ایران تاکنون در گروه ویروس‌های غیر بیماری‌زا طبقه بندی می‌شـود. به نظر می رسـد وجود عوامل توام با ویروس در سـطح مزرعه (عوامل باکتریائی، ویروسـی و محیطـی) نقش تعیین کننده ای در بیماری‌زائی ویـروس دارند. مطالعه گذشته نگر در واگیریهای آنفلوانزای طیور با تلفات بالا که به موسسه رازی مراجعه کرده بودند حاکی از دخالت یکی از عوامل باکتریائی در این واگیرها بود (اطلاعات منتشـر نشـده). در تلقیح مایع شستشو و فیلتر شده از نای پرنـدگان مبتلا به آنفلوانزای طیور (H_9N_2) به پرندگان حسـاس، کاهش میـزان تلفات از ۶۵ درصد به ۱۹ درصد گزارش شـده اسـت(۱۶) که این امـر می‌تواند موید نقش تعیین کننده عوامل باکتریائی و محیطی در میزان تلفات ناشی از ویروس باشد.

مکانیسـم نقش عفونتهای باکتریائی در افزایش حدت ویروس آنفلوانزا و یـا نقش ویروس آنفلوانزا در افزایـش حدت عفونتهای باکتریائی مجموعه پیچیده‌ای است که مشـتمل براثرات متقابل عوامل اتیولوژیکی، محیطی و میزبان می‌باشـد. عفونت‌های تنفسی باکتریائی یا ویروسی می‌توانند موجب افزایش واسطه‌های التهابی شده که این واسطه خود به عنوان عوامل افزایش دهنده حدت (پروتئازهای سلولی) در تعدادی از ویروس‌های آنفلوانزا عمل مـی نمایند.(۲۱). از طرفـی پروتئازهای باکتریائی نـه تنها می‌توانند نقش مهمی در شکسـتن پروتئین HA به HA۱ و HA۲ داشته باشند (۲۶)، بلکه با تحریک سـنتز پروتئازهای سلولی می‌توانند در عفونت‌های همزمان باکتـری و ویـروس آنفلوانزا موجـب افزایش حدت ویـروس گردند (۱۰). گفتنی است که در انسان علت عمده مرگ در عفونت‌های آنفلوانزائی ناشی از پنومونی حاصل از همکاری ویروس و باکتری است (۲۵). گزارشات بسیار زیـادی در خصوص همـکاری عفونت‌های باکتریائی و ویـروس آنفلوانزای طیـور در افزایش تلفات وجود دارد (۱، ۱۴). انجام مطالعات کنترل شـده ترکیبی (ویروس آنفلوانزا H_9N_2 به همراه عوامل باکتریائی شـناخته شـده در سـطح مزرعه ایران) مشـخص خواهد ساخت که کدامیک از این عوامل باکتریائی در افزایش تلفات نقش بیشتری دارند. لازم به ذکر است که تکثیر اولیه ویروس در سـلولهای مخاطی تنفسی موجب آسیب یا مرگ سلولهای مژک‌دار شـده که این خود نیز می‌توانـد موجب ممانعت کلیرانس باکتریها و افزایـش قدرت چسـبندگی و تهاجمـی باکتریها و تداخل بـا ایمنی غیر اختصاصی شـود(۲۲). با توجه به دلایل فوق ، می‌توان تلفات زیاد ناشـی از ویروس آنفلوانزای طیور ایران را به عفونت‌های توام و شـرایط نامسـاعد محیطی نسبت داد.

آنالیز فیلوژنی سـه ویـروس مورد مطالعه بهمـراه ۱۵ ویروس آنفلوانزا (H_9N_2) جدا شـده از ماکیان نشـان داد که تمام ویروس‌های آنفلوانزای کشـورهای ایران، پاکستان ،عربستان سعودی و یک ویروس از کشور آلمان در یک شـاخه قرار گرفته اند. در حالیکه ویروس‌های آنفلوانزای کشورهای چین و کره جنوبی به‌همراه یک ویروس از کشور آلمان در شاخه دیگر قرار گرفتند. شـباهت بسـیار زیاد ویروس‌های این کشورها که همسایه یکدیگر می‌باشـند، موید این مهم اسـت که همگـی آنها احتمالاً منشـاء واحدی داشته‌اند . بیشترین شباهت این ویروس‌ها با ویروس آنفلوانزای طیور کشور آلمـان (ckDE۹۸) می‌باشـد. همچنین ویروس‌های‌آنفلوانزای کشـورهای ایران، پاکستان، عربستان سعودی و کره جنوبی هر یک در زیر شاخه مجزا و جداگانه قرار گرفته‌اند که این امر نشان دهنده ارتباط بسیار نزدیک آنها

به یکدیگر و احتمالاً منشاء یکسان آنها می‌باشد . به عبارتی به نظر می‌رسد وقوع آنفلوانزای طیور در ایران طی واقعه مستقل و منفردی ایجاد شده است و سپس ویروس در طی پاساژهای متمادی در سطح مزرعه تغییر ژنتیکی پیدا کرده است که این امر می‌تواند برای کشورهای دیگر آسیائی به جز کشور چین صادق باشد.

بیشترین شباهت ژنتیکی سه ویروس مورد مطالعه با ویروس‌های کشور عربستان سعودی و پاکستان می‌باشد. ویروس ckIR۹۸ اولین نمونه ویروس آنفلوانزای طیور ایران است که سه سال قبل از این مطالعه تعیین توالی نوکلئوتیدی شده است (۴). بیشترین شباهت ژنتیکی این ویروس با ویروس‌های کشور پاکستان و عربستان سعودی و سپس با ckDE۹۸ بود. اگرچه وجود شباهت ژنتیکی زیاد ویروس‌های جدا شده از ایران با ویروس‌های گزارش شده از پاکستان و از طرفی هم مرز بودن با این کشور بیشترین احتمال مبنی بر گسترش این بیماری از پاکستان را می‌دهد ولی با در نظر گرفتن اولین گزارش وجود ویروس آنفلوانزای H_9N_2 از پاکستان در اواخر سال ۱۹۹۸ (۱۳) و اولین وقوع آنفلوانزای طیور در ایران در اواسط سال ۱۹۹۸ (۲۰، ۲۷) می‌توان استنتاج نمود که احتمال ورود ویروس از طریق پاکستان غیر محتمل می‌باشد. به خصوص اینکه شیوع بیماری از نقطه ای بسیار دورتر از نواحی جغرافیائی مشترک بین ایران و پاکستان رخ داده است. از این روی احتمالاً منشاء ویروس‌های آنفلوانزای ایران از کشور عربستان سعودی یا کشور آلمان می باشد. با توجه به قرابت بسیار نزدیک ویروس‌های ایران با ویروس‌های این دو کشور و از طرفی ارتباطات بسیار زیاد بازرگانی کشور ما با آلمان در مقایسه با عربستان سعودی می‌توان احتمال دارد که منشاء ویروس‌های آنفلوانزای ایران از کشور آلمان باشد. البته تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن HA یا ژنهای دیگر ویروس‌های آنفلوانزای ایران و مقایسه آن با ویروس ckDE۹۸ می‌تواند اطلاعات بیشتری را به دست دهد. Banks و همکاران (۴) نیز در مقایسه ژنتیکی تمامی ویروس‌های آنفلوانزای طیور(H_9N_2) جدا شده از میزبان‌های مختلف نشان دادند که ویروس ckDE۹۸ تنها ویروس اروپائی است که قرابت ژنتیکی بسیار زیادی با ویروس‌های آنفلوانزای طیور کشورهای آسیائی (به جزء کشور کره جنوبی و هنگ کنگ) را دارد.

همچنین آنالیز فیلوژنی ویروس‌های آنفلوانزای ایران در طی چهار سال گذشته (۱۳۷۷ الی ۱۳۸۰) نشان داد که هرچه این ویروس ها در سطح مزرعه بیشتر پاساژ خورده‌اند بیشتر دچار تغییرات ژنتیکی شده‌اند. این تغییرات به صورت پلکانی به ازاء هر سال بیشتر شده است به‌طوری که حداکثر تغییر ژنتیکی در ویروسی دیده می‌شود که در سال ۱۳۸۰ جدا گردیده است . تغییرات ژنتیکی سریع ویروس آنفلوانزا یکی از مهمترین مشکلات موجود جهت کنترل بیماری است، به‌طوری‌که برای تبدیل موتیف ناحیه شکستگی پروتئین HA ویروس‌های آنفلوانزای طیور ایران (R-S-S-R) به موتیف ویروس‌های آنفلوانزای بسیار بیماری‌زا تحت تیپ‌های H۵ و H۷ ، R-X-R/K-R هر امینو اسید غیر بازیک است) فقط احتیاج به یک موتاسیون نقطه ای است یعنی فقط تبدیل نوکلئوتید C به A یا G کافی است تا اولین اسید آمینه سرین را به آژرنین تبدیل شده و نهایتاً این ویروس به یک ویروس بسیار بیماری‌زا تبدیل شود.

به‌طور کلی با توجه به وجود تغییرات ژنتیکی سریع این ویروس در طی چهار سال گذشته و وجود پتانسیل زیاد تبدیل این ویروس به یک ویروس بسیار بیماری‌زا (موتاسیون نقطه ای)، تجدید نظر در سیاست‌های کنترلی این بیماری در کشورمان امری ضروری به نظر می‌رسد.

منابع مورد استفاده

1- Alexander, D.J. 1993. Orthomyxovirus infections. In J.B.McFerran & M.S McNulty (Eds.) M.C Horzinek (Series Ed.)Viral Infections of Vertebrates Volume 3: Viral Infections of Birds (PP. 287-316). Amsterdam : Elsevier Science Publishers.

2- Alexander, D.J. 2000. A review of avain influenza in different birds species. Proceedings of the ESVV Symposium on Animal Influenza Viruses Gent, 1999. Veterinary Microbiology , 74, 3-13.

3- Banks,J., Speidel,E.C., McCauley,J.W. & Alexander, D. J. 2000. Phylogenetic analysis of H_7 haemagglutinin subtype infulenza A viruses. Archives of Virology, 145, 1-12.

4- Banks,J., Speidel, E.C. Harris, P.A. & Alexander,D.J. 2000 . Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H_9 haemagglutinin subtype. Avian Pathology, 29,353- 360.

5- Campbell, G. 1998. Roport of the Irish national reference laboratory for 1996 and 1997. In Proceedings of the joint fourth Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avain Influenza Labroratories of Countries of the Eurpean Union 9-10 December 1997 (P.13) Brussle, Belgium

6- Guo , Y.J., Krauss,S., Senne , D.A., Mo, I.P., Lo, K.S., Xiong, X .P., Norwood , M., Shotridge , K.F., Webster , R.G. & Guant, Y. 2000. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H_9N_2 influenza virus lineages in Asia. Virology, 267, 279 – 288.

7- Halvorson,D.A.1998. Strengths and weaknesses of vaccine as a control tool. In Proceeding of the 4th International Symposium on Avian Influenza 29-31 May1997 (pp.223-227).Athens,GA:US animal Health Association.

8- Lee,C.W., Song,C.S., Lee,Y.J., Mo,I.P., Garcia,M., Suarez, D.L & Kim, S.J. 2000. Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H_9N_2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolate MS96. Avian Diseases, 44, 527-535.

9- Lin,Y.P., Shaw,M. Gregory,V., Cameron,K., Lim,W., Klimov,A., Subbarao K., Guan,Y., Krauss,S., Shortidge,S., Webster,R., Cox.N., & Hay,A. 2000. Avain–to human transmission of H_9N_2 and H_5N_1 human isolates. Proc. Natl. Acad .Sci. USA, 97,9654-9658.

10- Maeda, H. 1996. Role of microbial proteases in pathogenesis. Microbiol. Immunol 40, 685 – 699.

11- MO, I.P., Song,C.S., Kim , K.S & Rhee, J.C. 1998. An occurrence of non- highly pathogenic avian influenza in Korea

. In Proceedings of the 4th International Symposium on Avian Influenza 29-31 May 1997 (pp.379 – 383). Athens , GA:US Animal Health Association.

12- Momayez, R., Toroghi ,R. & Pourbakhsh , S.A. 2003 . Pathogenicity study of avain influenza virus H_9N_2 subtype isolated from chicken in Iran. (Submitted to Pajouhesh - va - Sazandegi)

13- Naeem,k., Ameerullah.M., Manvell, R.j. & Alexander,D.J.1999. Avian influeza a subtype H_9N_2 in poultry in Pakistan. Veterinary Record, 145,560.

14- Newman, J., Halvorson , D. & Karunakaran , D. 1981. Complications associated with avian influenza infections, In Proc.1st International symposium on avian influenza, 22 – 24 April, Beltsville, Maryland United States Animal Health Association, Richmond, Virginia, 8-12.

15- Nobusawa , E., Aoyama, T., Kato, H., Suzuki,Y, Taleno,y. & Nakajima , K. 1991. Comparison of complete amino acid sequences and receptor – binding properties among 13 serotypes of hemagglutinin of influenza A viruses. Virology 182 (2), 475 – 485.

16- Nilli, Hassan & Asasi, Keramat. 2002. Natural cases and an exprimental study of H_9N_2 avian influenza in commerical broiler chickens of Iran. Avian Pathology,31, 247 – 252 .

17- Papparella,V., Fioretti,A.,& Menna,L.F.1995. Proceedings of the joint second annual meeting of the national Newcastle Disease and Avian Influenza Labroatories of countries of the European Union 18-19 October 1994 (pp. 14-15).Brussels,Belgium.

18- Peiris,M., Yam.W.C., Chan.K.H., Ghose,P.& Shortuidge,K.F.1999. Influenza A H_9N_2: aspects of laboratory diagnosis. Journal of Clinical Microbiology, 37,3426-3427.

19- Peiris,M., Yuen,K.,Y., Leung,C.W., Chan,K.H., Ip,P.L.S., Lai, .W.M.,Orr, W.K. & Shortridge ,K.F.1999. Human infection with influenza H_9N_2. The Lancet, 354, 916 – 917.

20- Pourbakhsh,S.A., Khodashenas, M., Kianizadeh, M. & Goodarzi, H. 2000. Isolation and identification of avian influenza virus H_9N_2 Subtype. Arch. Razi Ins.51, 27-38.

21- Scheiblauer,H., Reinacher, M.,Tashiro, M. & Rott, R.1992. Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. J. Infect. Dis. 166 , 783 – 791

22- Steinhauer,D.A. 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. Virology , 258, 1-20 .

23- Suarez, D.L. 1998. Molecular diagnostic techniques: Can we identify influenza viruses , differentiate subtypes and determine pathogenicity potential of viruses by RT- PCR ?. In proceeding of the 4 th International Symposium on Avain Influenza. 29- 31 May 1997 (pp:.318 – 325).

24 – Swayne, D.E & Suarez,D.L. 2000. Highly pathogenic avian influenza. Rev. Sci. tech . Off. Int . Epiz., 19(2) , 463 – 482 .

25- Sweet, C., & Smith, H. 1980. Pathogenicity of influenza virus. Microbiol. Rev. 44 , 303 – 330.

26- Tashiro, M., Ciborowski, P., Klenk, H.D., Pulverer, G. & Rott, R. 1987. Role of staphylococcus protease in the development of influenza pneumonia. Nature, 325, 536 – 537.

27- Vasfi Marandi, M. & Bozorgmehrifard , M.H.1999.An outbreak of non-highly pathogenic avain influenza in chickens in Iran. Proceedings of the 61st Meeting of the World Veterinary Association (CD- ROM). Lyon, France .

28- Werner,O.1999. Avian influenza – situation in Germany 1997/98 In Proceeding of the Joint Fifty Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avian Influenza Labroatories of Countries of the European Union 9-10 November 1998(pp.10-11) Vienna, Austria.

29- Wood, G. W., McCauley, J. W., Bashiruddin, J. B & Alexander,D.J.1993. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian infuenza A viruses of H_5 and H_7 subtypes. Archives of Virology, 130 , 209 – 217.