DOI: 10.22092/vj.2019.127568.1613
شماره ۱۳۰ بهار ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی سرولوژی ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 در طیور بومی استان‌های شمالی ایران

• **محمد ابراهیمی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
• **ساموئل گریگوریان**
گروه ویروس شناسی و میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ایالتی ارمنستان، ایروان، ارمنستان
• **محمد حسین فلاح مهرآبادی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
• **عبدالحمید شوشتری(نویسنده مسئول)**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۶-۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۹-۳۰
Email: hamid1342ir@yahoo.com

چکیده

آنفلوآنزای پرندگان بیماری ویروسی واگیردار و مشترک بین انسان و دام می‌باشد و عامل آن ویروسی از خانواده ارتومیکسوویریده می‌باشد. امروزه ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H۹N۲ یکی از معضلات اصلی و مهم صنعت طیور کشور ما می‌باشد. این مطالعه که با هدف بررسی وضعیت آلودگی طیور بومی استان‌های شمالی به آنفلوانزای H۹N۲ و از ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ انجام گرفت. بر روی نمونه‌های سرمی آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) جهت ردیابی ویروس آنفلوانزای H۹ انجام گرفت. برای جدا سازی ویروس‌ها نمونه‌های سواب، پس از آماده‌سازی به تخم‌مرغ تلقیح شدند. جهت آنالیز مولکولی ویروس جدا شده پس از استخراج RNA، واکنش RT- PCR به صورت یک مرحله‌ای جهت تکثیر ژن‌های HA و NA انجام شد. با استفاده از دو جفت پرایمر کلی هافمن تمام open reading frame هر دو ژن HA و NA سکانس و در خت فیلوژنیک برای هر دو ژن رسم شد. در مجموع در سه استان از ۷۰ روستا (استان مازندران ۲۰ روستا، استان گیلان ۲۰ روستا و استان گلستان ۳۰ روستا) و ۹۹۳ پرنده (استان مازندران ۲۷۶ پرنده، استان گلستان ۳۷۰ پرنده و استان گیلان ۳۴۷ پرنده) نمونه برداری شد. در مجموع سه استان از مجموع ۷۰ روستای نمونه‌برداری شده تعداد ۶۷ روستا (۹۶٪) و از مجموع ۹۹۳ پرنده تعداد ۵۵۷ پرنده (۵۶٪) سرم مثبت بودند. نتایج مطالعه جاری نشاندهنده شیوع بالای ویروس آنفلوانزای H۹N۲ در طیور بومی در استان‌های شمالی کشور می‌باشد.

کلمات کلیدی: آنفلوانزا، H۹N۲، استان‌های شمالی، طیور بومی، بررسی سرمی

Veterinary Researches & Biological Products No 130 pp: 15-25

Serological survey of H9N2 influenza viruses in rural chicken of Northern provinces, Iran

By: Ebrahimi1, M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research,Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. Grigorian, S., Department of Virology & Microbiology, College of Veterinary Medicine, Armenian State University, Yerevan, Armenia. Fallah Mehrabadi M.H., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research,Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. and Shoushtari, A., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research,Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Email: hamid1342ir@yahoo.com

Received: 2019-08-31 Accepted: 2019-12-21

Avian Influenza is an acute and contagious disease of humans and animals, an agent of Orthomyxoviridae family. H9N2 subtype of avian influenza virus (AIVs) is one of the main problems of poultry industry in Iran. The aim of study was to investigate the status of domestic poultry contamination and identifying the hemagglutinin gene of H9N2 isolates in northern providences of Iran.This cross-sectional study was carried out in rural population of Gilan, Mazandaran and Golestan provinces from 1393 to 1394.The sera and cloacal swabs were sampled and tested, using a haemagglutination inhibition test and reverse transcriptase polymerase chain reaction respectively. The RNA was extracted, HA and NA genes was proliferated, using; two pairs of full-open-reading frame universal primer pairs, Titan one step tube RT-PCR system (Roche). A total of 70 villages and 993 birds; (Mazandaran province, 20 villages with 276 birds , Gilan province, 20 villages, with 347 birds and Golestan province, 30 villages with , 370 birds) were sampled. The sera sample of 67 villages (96%) out of 70 and 557 birds (56%) out of 993 were positive. The only H9N2 subtype was isolated of swab sample named A / chicken / Iran / RZ18 / 2014.Both HA and NA genes were common close to Iran / Markazi / 2014 and Iran / MMV9- 2013 isolate. The results reveal a high level of circulation of H9N2 influenza viruses in domestic poultry in the northern provinces of Iran.

Key words: Influenza, H9N2, Northern provinces, backyard poultry, Sero-servey

مقدمه

آنفلوآنزای پرندگان بیماری ویروسی واگیردار و مشترک بین انسان و دام می‌باشد و عامل آن ویروسی از خانواده ارتومیکسوویریده می‌باشد (۱۵). این ویروس دارای جنس‌های (تیپ ها) مختلفی می‌باشد که فقط تیپ A در پرندگان اهمیت دارد. تقسیم‌بندی تحت تیپ‌ها بر اساس دو گلیگو پروتئین سطحی هماگلوتینین و نورآمینیداز می‌باشد. که برای تیپ A، ۱۶ تحت تیپ هماگلوتینین (H۱-۱۶) و ۹ تحت تیپ نورآمینیداز (N۱-۹) در پرندگان شناسایی شده است. اخیرا دو تحت تیپ جدید H۱۷N۱۰ و H۱۸N۱۱، از خفاش شناسائی و گزارش شده است (۱۵، ۱۸، ۱۹).

مطالعات نشان می‌دهد که بعضی از ویروس‌های آنفلوآنزای H۵ و H۷ بسیار بیماری‌زا بوده و سایر آنها ویروس‌های کم‌حدت می‌باشند (۱۵).

تحت تیپ H۹N۲ موجب ایجاد بیماری خفیف تنفسی می‌گردد بطوریکه در شرایط آزمایشگاهی در ماکیان بدون حضور عوامل ثانویه تلفاتی ایجاد نمی‌کنند اما در مزارع پرورش طیور با پیدایش عوامل ثانویه موجب تلفات زیادی می‌شود. این تحت تیپH۹N۲ که امروزه یکی از معضلات اصلی و مهم صنعت طیور بویژه در آسیا و بالاخص منطقه خاورمیانه از جمله کشور ما می‌باشد که حتی با استفاده از واکسن نیز به صورت وسیعی منتشر است (۱۴). تحت تیپ H۹N۲ اولین بار در سال ۱۹۶۶ از بوقلمونی که نشانه‌های خفیف تنفسی داشت جدا شد. در آمریکای شمالی، ویروس‌های آنفلوآنزای H۹N۲ عمدتا" از بوقلمون و در درجه بعدی از بلدرچین و به ندرت از ماکیان جدا شده است (۱). تصور می‌شود که در آسیا ویروس آنفلوآنزای تحت تیپ H۹N۲ بومی شده است زیرا در

طی سال‌های گذشته به کرات از کشورهای آسیایی جدا شده است (۱۱, ۲۰). برای اولین بار در سال ۱۹۷۵ در هنگ‌کنگ از اردك‌های به ظاهر سالم تحت تیپ H9N2 جدا شده بود پس از آن در سال ۱۹۹۲ این تحت تیپ در منطقه گوانگ‌دنگ چین از ماکیان جداسازی شد (۲).

شیوع تحت تیپ H9N2 از کشورهای اروپایی مانند ابتالیا در سال‌های ۱۹۹۶ و ۱۹۹۴ در ماکیان، آلمان سال‌های ۱۹۹۶ و۱۹۹۸ در ماکیان، بوقلمون واردك‌های وحشی، ایرلند در سال ۱۹۹۷ در قرقاول و کشورهای خاورمیانه شامل ایران، پاکستان، امارات متحده عربی، عربستان صعودی و کره در سال ۱۹۹۶ در ماکیان، چین در سال ۱۹۹۴، آفریقای جنوبی در سال ۱۹۹۵ در شترمرغ ایالات متحده در سال‌های ۱۹۹۵-۱۹۹۶ در بوقلمون گزارش شده است. به نظر می‌رسد که تحت تیپ H9N2 در کشورهای خاورمیانه اندمیك شده باشد (۲, ۱۰).

گستردگی پرورش مرغان محلی در منطقه خاورمیانه بیشترین حجم را دارد و بخشی اعظمی از درآمد و تولید پروتئین مثل گوشت و تخم‌مرغ را دارا می‌باشد. در کشور ما نیز طیور بومی در بیش از ۶۰ هزار روستا با هدف تولید گوشت سفید و تخم‌مرغ و به عنوان منبع درامد خانوار رواج دارد (۶). استان‌های شمالی کشور بدلیل داشتن آب و هوای معتدل و پوشش گیاهی مطلوب، شرایط بسیار مناسبی در جهت پرورش طیور، از گذشته تاکنون دارا بوده‌اند، بطوری‌که پرورش طیور بومی در این دیار، قدمتی دیرینه داشته و امروزه نیز کمتر خانه‌ای رادر روستاها می‌توان یافت که فاقد مرغ و خروس و یا دیگر پرندگان بومی باشد. علاوه بر پرورش مرغان بومی، استان‌های شمالی حدود ۴۸/۹۸٪ مزارع مادر گوشتی و ۱۹/۸۵٪ مزارع جوجه‌های گوشتی کل کشور را دارا هستند (۴). در حقیقت این جمعیت انبوه پتانسیل خوبی برای ورود ویروس‌های جدید و یا بقا ویروس‌های قبلی و و مجموعا چرخش ویروس‌ها و سر ریز ویروس‌های آنفلوآنزا به دیگر استان‌های کشور فراهم می کند.

نکته بسیار مهم در رابطه با آلودگی با این ویروس در این می‌باشد که مزارع کشور اغلب درگیر سایر عفونتهای باکتریایی، ویروسی وسایر عوامل پاتوژن و ضعف مدیریتی می‌باشند و این امر شدت اثر ویروس آنفلونزا را افزایش می‌دهد. این در حالی است این ویروس در جوجه‌های SPF به تنهایی علایم کلینیکی و ضایعات شدید ایجاد ننموده و در گروه پاتوتیپ کم بیماری‌زا (LP) قرار می‌گیرد. این در حالی است که صنعت طیور کشور از سال ۱۳۷۷ به دنبال ابتلای به ویروس آنفلوآنزا H9N2 دچار خسارت‌های سنگین اقتصادی گردید. در این میان ژن هماگلوتینین به عنوان ژن اصلی در اتصال به سلول حساس و شرکت در عمل فیوژن نقش اساسی را در بیماری‌زایی و نیز ایمنی‌زایی در پرنده را دارد. با بررسی سکانس و شجره‌شناسی این ژن در ویرو س‌های مناطق مختلف جهان این ویروس‌ها به ۲ دودمان اصلی ویروس‌های آنفلونزا H9N2 که منشا اولیه آنها از آمریکا شمالی می‌باشد و ویروس‌های آنفلونزا H9N2 که شامل ویروس‌های از اروپا و آسیا گردیده است و این دودمان خود به ۳ تحت دودمان تقسیم می‌گردد (۷, ۱۶).

نکته مهم این است که تاکنون تمام جدایه‌هایی که منجر به ابتلای انسان گردیده‌اند مربوط به دودمان اروپایی – آسیایی می‌باشد. از مسائل مهم و پیچیده در مورد ویروس آنفلوانزا تغییرات دریفتی تا تغییرات اساسی شیفت در ژن‌های این ویروس به ویژه هماگلوتینین می‌باشد که می‌تواند حدت و نیز طیف میزبانی را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین شناخت هر چه بیشتر ژن و پروتئین هماگلوتینین نه تنها در شناخت منشا و خواستگاه ویروس مفید می‌باشد بلکه با توجه به نقش آنها در ایجاد ایمنی در میزبان می‌توان با شناسایی توالی نوکلوتیدی ژن هماگلوتینین اقدام به طراحی و ساخت واکسن‌های مناسب به منظور جلوگیری ویا کاهش میزان عفونت به این ویروس در سطح مزارع طیور نمود (۲۱). در این مطالعه که با هدف بررسی وضعیت آلودگی طیور بومی به آنفلوانزای H9N2 و شناخت هرچه بیشتر ژن هماگلوتینین جدایه‌های کشور، تعیین هویت مولکولی، بررسی تغییرات صورت گرفته بویژه در جایگاه‌های مهم و اساسی و تعیین خواستگاه احتمالی این ویروس‌ها در استان‌های شمالی کشور انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

محدوده جغرافیایی مورد بررسی در در این مطالعه، استان‌های شمالی شامل استان گلستان، مازندران و گیلان به مساحت ۵۸۱۶۷ کیلومتر مربع بود. در این مناطق بازارهای محلی بسیاری برای داد و ستد طیور بومی و محلی وجود دارد و به دلیل شرایط آب و هوایی هر ساله محل ورود و اقامت بسیاری از پرندگان مهاجر هم می‌باشد.

طراحی مطالعه، جامعه آماری و نمونه‌برداری

جامعه آماری در این مطالعه، ماکیان روستایی این سه استان بوده و نمونه‌برداری از روستاهای این استان‌ها انجام گرفت. این مطالعه بصورت مقطعی و از سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ در روستاهایی که در آن‌ها ماکیان بومی نگهداری و یا پرورش داده می‌شدند انجام گرفت. در این مطالعه تعداد روستای مورد نیاز جهت نمونه‌گیری به گونه‌ای انتخاب گردید که بر اساس شیوع ۵ درصد و با ۹۵ درصد اطمینان بتوان حداقل یک روستای سرم مثبت در هر استان شناسایی کرد. همچنین تعداد پرنده مورد نیاز برای نمونه‌برداری جهت تشخیص سرمی در هر روستا به گونه‌ای انتخاب گردید که با فرض شیوع سرمی مساوی و بیشتر از ۳۰ درصد و با ۹۵ درصد اطمینان بتوان حداقل یک پرنده مثبت را شناسایی نمود (۵). نمونه‌برداری از روستاهایی که بر اساس اعلام سازمان دامپزشکی در ۶ ماه قبل از مطالعه واکسنی دریافت نکرده بودند انجام گرفت. انتخاب روستاها به صورت تصادفی ساده انجام گرفت.

روند انجام تست‌های آزمایشگاهی بر روی نمونه‌های جمع‌آوری شده

پس از مراجعه به هر روستا به خانوارهای منتخب مراجعه شده و از هر پرنده با سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری ۱ میلی‌لیتر خون از ورید بالی اخذ شد. خون به مدت یکساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا سرم آن جدا شود. بعد از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه سرم آنها جدا و در میکرو تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفت و بعد از ثبت مشخصات هر نمونه، سرم‌ها تا زمان انجام آزمایشات در فریز ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

بر روی نمونه‌های سرمی آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) جهت ارزیابی پاسخ سرمی سیستم ایمنی پرنده در مواجهه احتمالی با ویروس آنفلوانزای h۹ انجام گرفت. آزمایش HI بر اساس دستورالعمل OIE با استفاده از آنتی‌ژن ۴ واحدی ساخت موسسه رازی انجام گرفته شد و

تیتر ۴ و بالاتر بر مبنای log۲ به عنوان مثبت در نظر گرفته شد (۱۵). روستاهایی که دارای یک پرنده سرم مثبت بودند نیز به عنوان روستای مثبت در نظر گرفته شدند.

جداسازی ویروس

در ابتدا نمونه های سواپ کلواک تهیه شده، در دمای اتاق قرار داده تا از حالت انجماد خارج گردد. سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه با دور۳۰۰۰ سانتریفوژ و مایع رویی آن جهت تزریق به تخم‌مرغ عاری از پاتوژن ۹ تا ۱۱ روزه برداشت شد. به هر ۵ سی‌سی مایع نمونه فوق ۰,۱ تا ۰,۲ محلول آنتی‌بیوتیک حاوی جنتامایسین ۸۰ میلی‌گرم، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد و استرپتومایسین ۱۰۰ میلی‌گرم آماده شده از قبل افزوده شد. محلول مذکور به مدت ۱ ساعت در حرارت آزمایشگاه باقی ماند تا آنتی‌بیوتیک اثر خود را داشته باشد. از این محلول برای تزریق به تخم‌مرغ‌های جنین‌دار استفاده گردید. برای تلقیح ویروس از تخم‌مرغ‌های ۹ تا ۱۱روزه عاری از پاتوژن استفاده شد. برای اطمینان از جنین‌دار بودن یا زنده بودن جنین، تمام تخم‌مرغ‌ها کندلینگ گردید و پس از مشخص کردن سر جنین، طرف مقابل آن علامت‌گذاری شد. میزان ۰/۲ سی‌سی از مایع تهیه شده در حفره کوریوالانتوئیک تزریق گردید. تخم‌مرغ‌ها در دمای ۳۷ درجه به مدت ۷- ۴ روز انکوبه شدند و هر۲۴ ساعت یک بار مورد کندلینگ قرارگرفتند. تخم‌مرغ‌هایی که طی ۲۴ ساعت اولیه پس از تلقیح جنین آن‌ها از بین رفته بود حذف و تخم‌مرغ‌هایی که جنین آنها پس از طی ۲۴ ساعت از بین می‌رفت جمع‌آوری و در یخچال در دمای ۸- ۲ درجه نگه‌داری شد و سپس مایع آلانتوئیک آن‌ها جمع‌آوری و با استفاده از آزمایش‌های HA و HI حضور ویروس آنفلوانزا مورد تایید قرارگرفت.

آزمایش‌های مولکولی

واکنش RT- PCR به صورت یک مرحله‌ای و با استفاده از یک جفت پرایمریونیورسال (Hoffmann et al. ۲۰۰۱) و کیت Titan one step tube RT- PCR system شرکت (Roche) آلمان بر روی بر نمونه(ها) جهت تکثیر ژن‌های هما گلوتینین (HA) و نورامینیداز (NA) انجام شد. با استفاده از دو جفت پرایمر کلی هافمن (۲۰۰۱) تمام open reading frame هر دو ژن سکانس شد(۱۲). سکانس‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Megaalign و Bioedit ویرایش شد. درخت فیلوژنیک با استفاده از نرم‌افزار MegaV و روش neighbor -joining و برای هر دو ژن HA و NA رسم شد.

نتایج

سرولوژی

در مجموع در سه استان از ۷۰ روستا (استان مازندران ۲۰ روستا، استان گیلان ۲۰ روستا و استان گلستان ۳۰ روستا) و ۹۹۳ پرنده (استان مازندران ۲۷۶ پرنده، استان گلستان ۳۷۰ پرنده و استان گیلان ۳۴۷ پرنده) نمونه‌برداری شد. در مجموع سه استان از مجموع ۷۰ روستای نمونه‌برداری شده تعداد ۶۷ روستا (۹۶٪) و از مجموع ۹۹۳ پرنده تعداد ۵۵۷ پرنده (۵۶٪) سرم مثبت بودند. فراوانی روستاها و نمونه‌های اخذ شده و سرم مثبت به تفکیک استان در جدول ۱ نشان داده شده است. در جدول ۲ نیز فراوانی توزیع تیتر سرمی نمونه‌ها به تفکیک استان نشان داده شده است.

نتایج استان مازندران

از مجموع ۲۰ روستای نمونه‌برداری شده تعداد ۱۹ روستا (۹۵٪) سرم مثبت بودند. همچنین از ۲۷۶ نمونه پرنده اخذ شده نیز تعداد ۱۶۶ نمونه (۶۰٪) سرم مثبت بودند. فراوانی نمونه‌های اخذ شده و سرم مثبت ومقدار تیتر سرم‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است.

نتایج استان گلستان

از مجموع ۳۰ روستای نمونه‌برداری شده تعداد ۲۸ روستا (۹۳/۳٪) سرم مثبت بودند. همچنین از ۳۴۷ نمونه پرنده اخذ شده نیز تعداد ۲۳۴ نمونه (۶۷/۴٪) سرم مثبت بودند. فراوانی نمونه‌های اخذ شده و سرم مثبت و مقدار تیتر سرم‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۱- فراوانی و فراوانی نسبی شهر، روستا و پرنده نمونه برداری شده و سرم مثبت (HI) برای بیماری آنفلوانزای H۹N۲ در استانهای شمالی ایران سال ۹۴-۱۳۹۳

ردیف	نام استان	تعداد روستای نمونه برداری شده	تعداد و درصد روستای سرم مثبت	تعداد شهر نمونه برداری شده	تعداد و درصد شهر سرم مثبت	تعداد پرنده نمونه برداری شده	تعداد و درصد پرنده سرم مثبت
۱	مازندران	۲۰	(۹۵٪ ۱۹)	۹	(۱۰۰٪ ۹)	۲۷۶	(۶۰٪ ۱۶۶)
۲	گیلان	۲۰	(۱۰۰٪ ۲۰)	۱۴	(۱۰۰٪ ۱۴)	۳۷۰	(۴۲/۴٪ ۱۵۷)
۳	گلستان	۳۰	(۹۳٪ ۲۸)	۱۰	(۱۰۰٪ ۱۰)	۳۴۷	(۶۷/۴٪ ۲۳۴)
۴	مجموع	۷۰	(۹۶٪ ۶۷)	۳۳	(۱۰۰٪ ۳۳)	۹۹۳	(۵۶٪ ۵۵۷)

نتایج استان گیلان

در این استان تمامی ۲۰ روستای نمونه‌برداری شده (۱۰۰٪) سرم مثبت بودند.

همچنین از ۳۷۰ نمونه پرنده اخذ شده نیز تعداد ۱۵۷ نمونه (۴۲/۴٪) سرم مثبت بودند. فراوانی نمونه‌های اخذ شده و سرم مثبت و مقدار تیتر سرم ها در جدول ۵ نشان داده شده است.

جداسازی و آنالیز مولکولی

تنها از یک نمونه مازندران ویروس H۹N۲ جدا شد. هویت H۹ این ویروس با استفاده از آزمایش ممانعت از هماآگلوتینین تایید شد. این ویروس به صورت A/chicken/Iran/RZ (H۹N۲)/۲۰۱۴/۱۸ نام‌گذاری شد.

هر دو ژن HA و NA ویروس جدا شده در این مطالعه به همین ژن‌ها در ویروس‌های رایج در ایران مانند Iran/Markazi/۲۰۱۴ و Iran/MMV۹/۲۰۱۳ بسیار نزدیک بودند (شکل‌های ۱ و ۲). از لحاظ مشابهت به ویروس‌ها خارج از کشور (در مورد هردو ژن) به ویروس‌های پاکستان با هموژوزی بیش از ۹۰٪ نزدیک بودند.

همانطور که در شکل ۲ مشخص است این ویروس مانند تمام ویروس‌ها

جدول ۲- فراوانی توزیع تیتر سرمی نمونه‌ها به تفکیک استان

ردیف	نام شهرستان	تعداد پرنده نمونه برداری شده	سرم مثبت	تیتر										
				۰	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
۱	مازندران	۲۷۶	۱۶۶	۹۴	۰	۲	۱۴	۲۷	۳۸	۴۲	۲۲	۲۱	۴	۱۲	
۲	گلستان	۳۴۷	۲۳۴	۸۹	۲	۵	۱۷	۲۳	۲۸	۳۳	۲۷	۶۱	۲۳	۳۰	۹
۳	گیلان	۳۷۰	۱۵۷	۱۳۶	۱	۳۶	۴۰	۲۴	۲۱	۱۷	۲۸	۲۲	۲۰	۱۸	۷
مجموع		۹۹۳	۵۵۷	۳۱۹	۴۳	۷۱	۷۴	۸۷	۹۲	۷۷	۱۰۴	۴۷	۶۰	۱۶	

جدول ۳- فراوانی نمونه های اخذ شده و سرم مثبت (HI) و توزیع تیتر سرمی نمونه های اخذ شده برای بیماری آنفلوانزای H۹N۲ به تفکیک روستا در استان مازندران در سال۹۳-۹۴

ردیف	نام شهرستان	تعداد پرنده نمونه برداری شده	سرم مثبت	تیتر										
				۰	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
۱	گلوگاه	۴۷	۲۴	۲۰			۳	۲	۵	۶	۵	۳		۳	
۲	بابلسر	۱۵	۱۳	۲						۲	۵	۵	۱		
۳	بابل	۲۴	۱۷	۴			۳	۳	۵	۶	۳				
۴	نکا	۸	۶	۱			۱			۱		۱	۱	۳	
۵	بهشر	۶۷	۳۴	۳۲		۱		۷	۲	۷	۳	۱۰	۱	۴	
۶	چالوس	۵۵	۲۹	۲۲			۴	۶	۱۱	۹	۳				
۷	نوشهر	۱۹	۱۷	۱			۱	۸	۵	۳	۱				
۸	محموداباد	۲۹	۱۷	۱۰			۲	۱	۱۰	۵	۱				
۹	ساری	۱۲	۹	۲		۱				۳	۱	۲	۱	۲	
مجموع		۲۷۶	۱۶۶	۹۴		۲	۱۴	۲۷	۳۸	۴۲	۲۲	۲۱	۴	۱۲	

(ژن هماگلوتینین) در تحت دودمان G از دودمان اروپا -آسیایی ژن H۹ قرا گرفتند. این مسئله شامل ویروس جدا شده در مطالعه پیش رو نیز بود. این درحالی است که ویروس‌های که در سال ۲۰۰۷ از اردک جدا شدند شامل این مقوله نبوده و این ویروس‌ها متعلق به دودمان تحت دودمان Korean قرار می‌گیرند.

بحث

در این مطالعه ۹۶٪ روستاها و ۵۶٪ پرنده‌ها سرم مثبت بودند که نشان‌دهنده آلودگی بالا هم در سطح روستا و هم در سطح پرنده‌ها می‌باشد. آلودگی بالا نشان‌دهنده گردش ویروس در بین طیور بومی در این استان‌ها می‌باشد.

در بررسی انجام گرفته توسط فلاح و همکاران ۲۰۱۴ برای تحت تیپ H۹N۲ ویروس آنفلوانزا در کشور، ۸۶ درصد روستاها در سال ۱۳۹۲ و ۹۰ درصد روستاها در سال ۱۳۹۳ برای این تحت تیپ، سرم مثبت بودند(۶). نتایج مطالعه انجام گرفته توسط هادی‌پور (۲۰۱۰ میلادی) بر روی ۷۰۰ نمونه سرمی ماکیان بومی غیرواکسینه و بدون علایم بالینی بیماری در روستاهای اطراف دریای خزر میزان شیوع سرمی H۹N۲ به روش HI را ۷۳٪ نشان داد و علت این تیتر سرمی را تماس پرندگان بومی با پرندگان مهاجر آبزی و همچنین مجاورت این پرندگان با مزارع پرورش صنعتی اعلام کرد(۸). وی یک سال بعد در بررسی دیگری که بر روی ۲۰۰۰ پرنده (اردک و ماکیان بومی) در شیراز انجام داد میزان شیوع سرمی H۹N۲ را در بین اردک‌ها ۴ /۷۸٪ و ماکیان ۶۲/۹٪ گزارش کرد و نتیجه‌گیری می‌کند که اردك به عنوان میزبان طبیعی ویروس‌های آنفلوانزای نقش مهمی در اپیدمیولوژی این ویروس کشور دارد (۹)

در مطالعه دیگری که توسط محمدی و همکاران بر روی ۵۰ نمونه سرم کبوتر در منطقه کوار فارس انجام گرفت، ۳۴٪ نمونه‌ها دارای تیتر سرمی ۵ و بالاتر علیه تحت تیپ H۹N۲ بودند اما در آزمایشات مولکولی (آزمایش RT-PCR) انجام گرفته بر روی نمونه‌های مدفوع آنها، تمامی نمونه‌ها منفی بودند. آنها بیان کردند که برخلاف آلودگی بالای این پرندگان به ویروس آنفلوانزا، شواهدی کافی که نشان‌دهنده انتقال ویروس از کبوتر به طیور صنعتی مجاور آنها باشد، وجود ندارد (۱۳). همچنین در مطالعه‌ای که توسط سعادت و همکاران (۲۰۱۴ میلادی) در استان بوشهر بر روی ۱۵۳۰ نمونه خون ماکیان بومی جهت تعیین تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس آنفلوانزای (H۹N۲) انجام گرفت، ۳۹٪ نمونه‌ها دارای تیتر سرمی علیه ویروس‌های آنفلوانزا H۹N۲ بودند و نتیجه‌گیری کردند که این ویروس در بین طیور بومی استان شیوع دارد و ضروری است در استراتژی کنترل بیماری، طیور بومی مد نظر قرار گیرند(۱۷). اما بر خلاف نتایج این مطالعه، در مطالعه‌ای که توسط پورصفر و همکاران (۱۳۹۱) بر روی ۵۵۰ نمونه سواب اخذ شده از کلواک اردک‌های بومی استان گیلان جهت ردیابی ویروس‌های آنفلوانزا (آزمایش RT-PCR) انجام گرفت، ویروس

جدول ۴- فراوانی نمونه های اخذ شده و سرم مثبت (HI) و توزیع تیتر سرمی نمونه های اخذ شده برای بیماری آنفلوانزای H۹N۲ به تفکیک روستا در استان گلستان در سال ۹۳-۹۴

ردیف	نام شهرستان	تعداد پرنده نمونه برداری شده	سرم مثبت	تیتر										
				۰	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
۱	بندر گز	۶۹	۵۲	۱۳	۱	۲	۱	۱۰	۷	۱۱	۷	۱۴		۳	
۲	رامیان	۲۵	۱۵	۵		۱	۴	۳	۲	۲		۱		۷	
۳	علی اباد	۱۵	۱۰	۵					۱	۲	۲	۱	۱	۳	
۴	بندر ترکمن	۴۰	۳۰	۹			۱	۲		۳	۲	۶	۱۰	۲	۵
۵	آزادشهر	۴۰	۱۰	۲۴			۶	۳	۲	۲	۱	۱	۱		
۶	کردکوی	۲۷	۷	۲۰				۱	۱	۳	۱	۱			
۷	کلاله	۳۳	۲۴	۴		۱	۴	۲	۳	۶	۵	۴	۴		
۸	گنبدکاووس	۴۹	۴۵	۴				۱	۱۰	۴	۶	۱۲	۵	۷	
۹	مینودشت	۱۹	۱۸				۱		۱		۱	۷	۲	۳	۴
۱۰	گرگان	۳۰	۲۳	۵	۱	۱		۱	۱		۲	۱۴		۵	
مجموع		۲۳۴	۸۹	۲	۵	۱۷	۲۳	۲۸	۳۳	۲۷	۶۱	۲۳	۳۰	۹	

آنفلوانزا پرندگان در هیچ یک از نمونه‌های مورد آزمایش ردیابی نشد. آنها علت آنرا تاثیر اجرای برنامه‌های کنترل بیماری آنفلوانزا ی پرندگان، اجرای برنامه‌های آموزشی بکار گرفته شده توسط سازمان دامپزشکی کشور و رعایت اصول امنیت زیستی در گله‌های اردک بیان کردند.

در بررسی انجام گرفته شیوع بالای عیار سرمی H9N2 بدون داشتن علائم بیماری می‌تواند به دلیل مواجهه مداوم طیور بومی با این ویروس و کسب ایمنی در این پرندگان و واکسیناسیون طبیعی آنها باشد که می‌تواند ناشی از گردش این ویروس در محیط و بین طیور بومی باشد که می‌توانند به عنوان مخزن آن را نگه داشته و باعث انتقال آن به مراکز پرورشی صنعتی گردند.

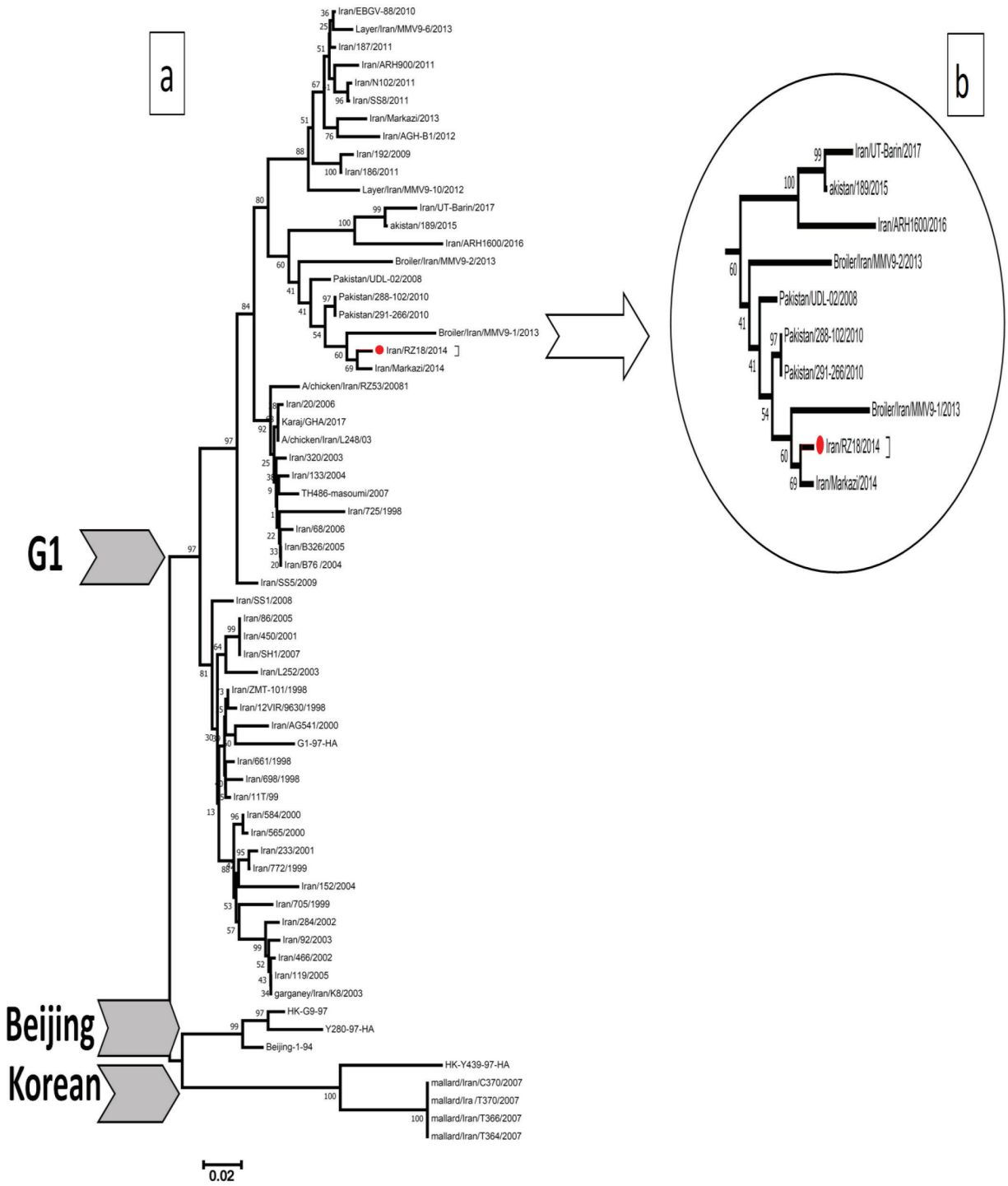
نتایج این مطالعه مشابه نتایج مطالعه‌ای است که توسط حیدرپور و همکاران در مورد طیور بومی انجام گرفت و ۷۸/۲٪ اردک‌ها و ۶۲٪/۹ طیور خانگی از نظر تیتر سرمی مثبت بودند آنها در مطالعه خود نتیجه‌گیری کردند که گردش ویروس در محیط باعث مواجهه مکرر پرندگان و مثبت شدن عیار سرمی آنها گردیده است.

در این مطالعه علی رغم تزریق تمام نمونه‌ها تنها یک ویروس از استان مازندران جداشد. با توجه به اینکه نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه نگهداری می‌شدند احتمالا امکان جداسازی ویروس کاهش پیدا کرده بود. این ویروس A/chicken/Iran/RZ (H9N2) ۲۰۱۴/۱۸ نام‌گذاری شد. این ویروس قرابت بالایی با ویروس‌های جدا شده از مرغان صنعتی دارد. گرچه جداسازی و آنالیز تنها یک ویروس نتیجه‌گیری کلی را مشکل می‌سازد ولی شباهت این ویروس به ویروس‌های جدا شده از مرغان صنعتی و آلودگی بالای سرمی یافت شده در این مطالعه احتمالا نشان‌دهنده حرکت پیوسته (دینامیک) ویروس‌های H9N2 بین این دو جمعیت ماکیان(بومی و صنعتی) باشد. با توجه به شباهت ویروس آنالیز شده در این مطالعه به ویروس‌های دیگر مناطق کشور از یک طرف و و از طرف دیگر شباهت ویروس‌های ایرانی به ویروس‌های کشور پاکستان این احتمال وجود دارد که ویروس‌های H9 برخلاف ویروس‌های با پاتوژنسیتی بالا آنفلوآنزا H5N1 از دیگر مناطق کشور به وارد مناطق شمالی کشور می‌شوند. کاملا مشخص است که برای تعمیم دادن این نتیجه‌گیری احتیاج به شواهد و یافته‌های بیشتری وجود دارد.

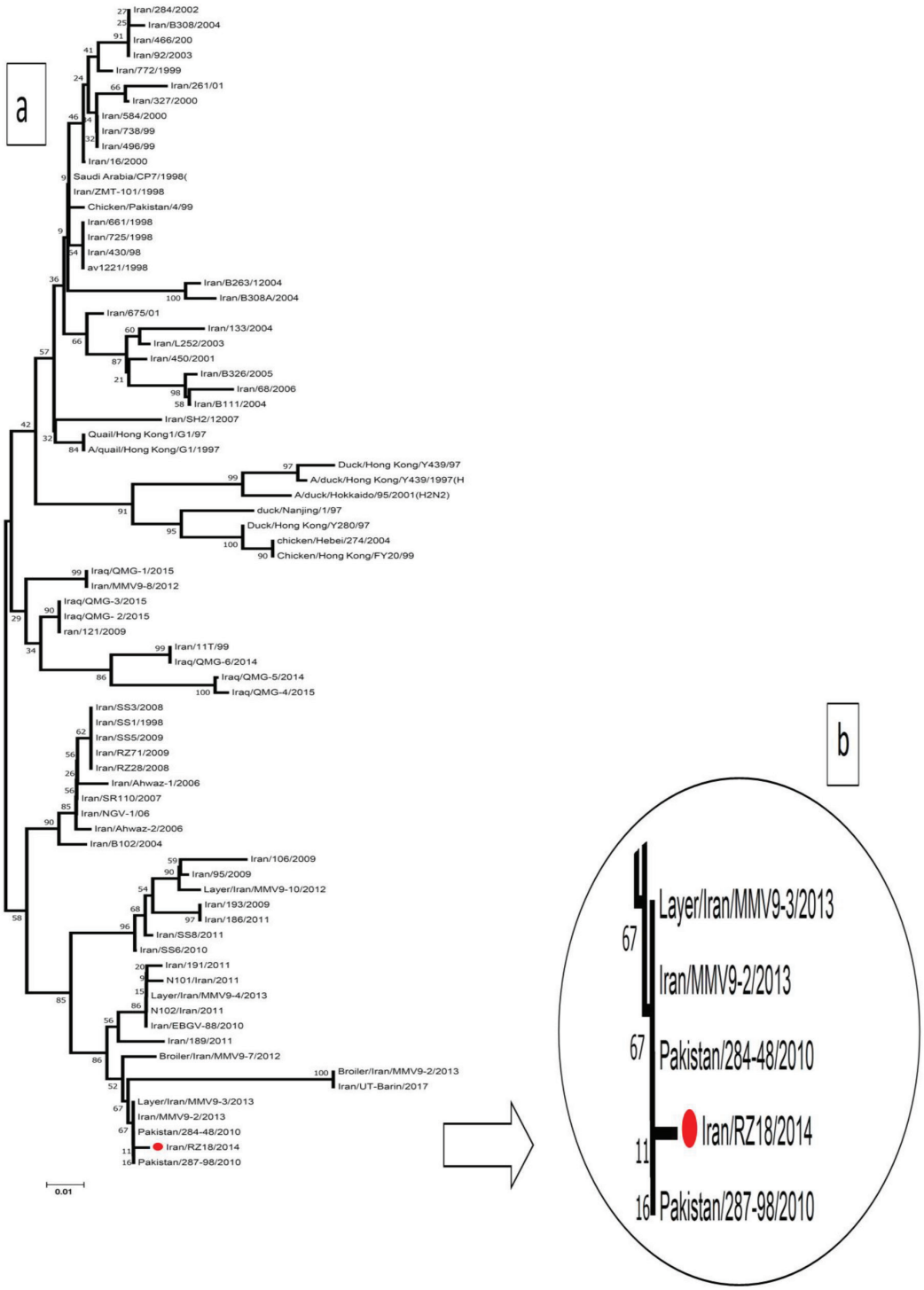
در مطالعه‌ای که توسط بشاشتی و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی اولین

جدول ۵:-فراوانی نمونه های اخذ شده و سرم مثبت (HI) و توزیع تیتر سرمی نمونه¬های اخذ شده برای بیماری آنفلوانزای H9N2 به تفکیک روستا دراستان گیلان در سال ۹۳-۹۴

ردیف	نام شهرستان	تعداد پرنده نمونه برداری شده	سرم مثبت	تیتر										
				۰	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
۱	رودسر	۴۲	۲۲	۱۳	۱	۳	۳	۲	۲	۵	۳	۷	۲	۱	
۲	استارا	۳۹	۲۳	۸		۲	۶	۴	۴	۴	۲	۳	۳	۳	
۳	ماسال	۱۶	۲	۱۰		۲	۲				۲				
۴	املش	۲۸	۱۶	۸		۲	۲	۳	۳		۶			۴	
۵	انزلی	۴۱	۱۵	۲۰		۳	۳	۱	۱		۳	۳	۲	۱	۴
۶	تالش	۱۷	۱۰	۵		۱	۱	۲	۲			۱	۲	۳	
۷	ثفت	۱۵	۱	۱۱		۳		۱							
۸	رشت	۳۲	۱۳	۱۲		۲	۵	۱	۱	۲	۵		۴		
۹	رضوانشهر	۱۷	۹	۴		۲	۲		۲	۱	۴		۲		
۱۰	رودبار	۱۹	۸	۸		۲	۱	۱		۱		۲		۲	۲
۱۱	سیاهکل	۱۳	۷	۴		۱	۱	۱	۲	۱	۲		۱		
۱۲	صومعه سرا	۳۱	۱۳	۹		۴	۵	۵	۲			۱	۳	۱	۱
۱۳	فومن	۱۹	۷	۷		۲	۳	۲			۱	۲	۱	۱	
۱۴	لنگرود	۴۱	۱۱	۱۷		۷	۶	۱	۲	۳		۳		۲	
مجموع		۳۷۰	۱۵۷	۱۳۶	۱	۳۶	۴۰	۲۴	۲۱	۱۷	۲۸	۲۲	۲۰	۱۸	۷



شکل ۱- آنالیز فیلو ژنیک ژن هماگلوتینین: در این آنالیز از تمام ژن هماگلوتینین گرو ههای ویروسی که در ایران گزارش شده تعدادی انتخاب شد. برای آنالیز از متد **neighbor-joining** استفاده شد. آنالیز تکرار با روش **bootstrap** انجام شد. در سمت چپ تصویر درخت فیلوژنیک و نیز سه تحت دودمان اصلی ژن های H۹ دیده می شوند ویروس جدا شده در این مطالعه در تحت دودمان G۱ قرار گرفت(a). شاخه ای که ویروس۲۰۱۴ /Iran/CK/RZ۲۸ جدا شده در این مطالعه بزرگنمایی شده است(b)



شکل ۲- آنالیز فیلو ژنیک ژن نورامینیداز در این آنالیز از تمام ژن نورامینیداز گروههای ویروسی که در ایران گزارش شده تعدادی انتخاب شد. برای آنالیز از متد neighbor-joining استفاده شد. آنالیز تکرار با روش bootstrap به مفدار ۵۰۰ بار انجام شد. در سمت چپ تصویر در خت فیلو ژنیکت(a) و در سمت شاخه ای که ویروس۲۰۱۴ Iran/CK/RZ۲۸/ جدا شده در این مطالعه بزرگنمایی شده است(b).

ویروس آنفلوانزای H9N2 گزارش شده با ویروس‌های در گردش در سال مطالعه انجام گرفت، مشخص شد در مورد ژن HA ویروس‌ها تغییرات زیادی انجام گرفته و بیش از ۹ درصد اختلاف بین دو ویروس مشاهده شد و نتیجه‌گیری کردند که با توجه به تغییر زیاد ویروس، بذر واکسن مورد استفاده می‌بایست تغییر کند (۳). همچنین در مطالعه‌ای که توسط فلاح و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی ویروس‌های H9N2 در گردش در کشور انجام گرفت، نشان می‌دهد ویروس‌های مذکور شباهت زیادی با ویروس‌های در گردش با پاکستان و کشورهای همسایه ایران دارند (۷).

از زمان ورود ویروس آنفلوانزای H9N2 در سال‌های ۱۳۷۶-۱۳۷۷ این ویروس در کشور اندمیک شده است با آنکه این ویروس در گروه ویروس‌های آنفلوآنزا با بیماری‌زایی بالایی طبقبندی نمی‌شود، اما طغیان‌ها و اپیدمی‌های مختلف از این ویروس در سال‌های گذشته و در نقاط مختلف دنیا و از جمله ایران همراه با خسارت‌های شدیدی به صنعت پرورش طیور گزارش شده است. بنابراین شناخت اپیدمیولوژی ورود و گسترش این ویروس بسیار حائز اهمیت است. با توجه به اینکه تقریباً در اکثر روستاهای کشور پرورش ماکیان و سایر پرندگان با اهداف مختلف از جمله تولید تخم‌مرغ و گوشت سفید کماکان رایج می‌باشد. بنابراین جمعیت می‌تواند پتاسیل خوبی برای گردش و تکثیر این ویروس‌ها فراهم آورد و در نتیجه بررسی میزان شیوع آنفلوانزا در بین طیور بومی به خصوص از لحاظ انتقال آن به طیور صنعتی اهمیت زیادی دارد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج مطالعه جاری نشان‌دهنده شیوع بالای ویروس آنفلوانزای H9N2 در طیور بومی در استان‌های شمالی کشور می‌باشد و با توجه به تراکم بالای طیور در این استان‌ها و توزیع طیور از این استان به سایر مناطق کشور، احتمال انتقال آلودگی از این استان به سایر مناطق وجود دارد. اجرای اقدامات بهداشتی، اجرای برنامه مراقبت بیماری آنفلوانزا در طیور بومی و اجرای راهبردهای مناسب کنترل بیماری در این طیور با هدف کنترل بیماری و جلوگیری از انتقال بیماری به طیور صنعتی و سایر استان‌ها ضروری است.

منابع مورد استفاده

1. Alexander, D. J. 2000. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary microbiology* 74: 3-13.

2. Alexander, D. J. 2007. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002-2006. *Avian Dis* 51: 161-166.

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

4. Ebadzadeh, H. R., K. Ahmadi, S. Mohammadnia Afruzi, R. A. Taghani, M. Abbasi and S. Yari. 2017. *Agricultural statistics*. Tehran.

5. EC. 2010. Commission decision 2011/367/EU of 25 June 2010 on the implementation by member states of surveillance programs for avian influenza in poultry and wild birds. Off. *J. Eur. Union L* 166,7. (accessed 01.07.10.).

6. Fallah Mehrabadi, M., A. Bahonar, M. V. Marandi, A. Sadrzadeh, F. Tehrani and M. Salman. 2016. Sero-survey of Avian Influenza in backyard poultry and wild bird species in Iran—2014. *Preventive veterinary medicine* 128: 1-5.

7.Fallah Mehrabadi, M. H., A. Ghalyanchilangeroudi, S. A. Ghafouri, M. Malekan, Z. Ziafati, H. Hosseini, F. S. Mousavi, M. Jabbarifakhr and L. Aghaeean. 2019. Full-genome characterization and genetic analysis of a H9N2 virus in commercial broilers in Iran, 2017. *Tropical animal health and production*.

8.Hadipour, M. 2010. Seroprevalence survey of H9N2 avian influenza virus in backyard chickens around the Caspian Sea in Iran. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 12: 53-55.

9. Hadipour, M. and P. Golchin. 2011a. Serosurvey of H9N2 avian influenza virus during respiratory disease outbreaks in broiler flocks in Dezful, southern Iran. *Bulg J Vet Med* 14: 62-65.

10. Haji-Abdolvahab, H., A. Ghalyanchilangeroudi, A. Bahonar, S. A. Ghafouri, M. Vasfi Marandi, M. H. F. Mehrabadi and F. Tehrani. 2019. Prevalence of avian influenza, Newcastle disease, and infectious bronchitis viruses in broiler flocks infected with multifactorial respiratory diseases in Iran, 2015-2016. *Tropical animal health and production* 51: 689-695.

11. Hassan, K. E., S. A. Shany, A. Ali, A. H. Dahshan, A. A. El-Sawah and M. F. El-Kady. 2016. Prevalence of avian respiratory viruses in broiler flocks in Egypt. *Poultry science 95*: 1271-1280.

12. Hoffmann, E., J. Stech, Y. Guan, R. G. Webster and D. R. Perez. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of virology* 146: 2275-2289.

13. Mohammadi, A., M. Masoudian, Y. Nemati and S. Seifi. 2010. Serological and RT-PCR assays for detection of avian influenza of domestic pigeons in Kavar area (Fars province, Iran). *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 13: 117-121.

14. Nili, H. and K. Asasi. 2003. Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. *Avian diseases* 47: 828-831.

15. OIE. 2017b. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017. Chapter 2.3.4. Avian influenza (infection with avian influenza viruses) (NB: Version adopted in May 2015).

16. Pourbakhsh, S. A., R. Momayez, R. Toroghi R and A. H. Shoushtari. 2008. Ninetythree B type, the Predominant Circulating Type of Avian Infectious Bronchitis Viruses 1999 - 2004 in Iran: a retrospective study. *Archives of Razi Institute* 63: 1-5.

17. Saadat, Y., S. A. Ghafouri, F. Tehrani and A. G. Langeroudi. 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 Pacific journal of tropical biomedicine 4*: S213-S216.

18. Swayne, D. E., J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez and V. Nair. 2013. Diseases of Poultry. Blackwell Publishing Ltd. Iowa 50010, USA.

19. Swayne, D. E. and D. J. King. 2003. Avian influenza and Newcastle disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222: 1534-1540.

20. Vasfi Marandi, M. and M. H. Bozorgmehri Fard. 2002. Isolation of H9N2 subtype of avian influenza viruses during an outbreak in chickens in Iran. *Iranian Biomedical Journal 6*: 13-17.

21. Xia, J., J.-Q. Cui, X. He, Y.-Y. Liu, K.-C. Yao, S.-J. Cao, X.-F. Han and Y. Huang. 2017. Genetic and antigenic evolution of H9N2 subtype avian influenza virus in domestic chickens in southwestern China, 2013–2016. *PLOS ONE* 12: e0171564.