

*Research Article***Detection of avian influenza virus type A in broiler flocks with respiratory symptoms in some provinces of Iran****Behshad Baheshtian¹, Zahra Boroomand^{1*}, Masoud Reza Seyfi Abad Shapoori², Mansour Mayahi¹**¹Department of livestock, poultry and aquatic animal health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran²Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran**Key Words**Zinc
In ovo injection
Chicken
Product health
Meat quality**Abstract****Introduction:** Avian influenza is one of the most important and deadly poultry diseases all over the world and in Iran, which always causes massive losses in poultry farms. They are classified as common diseases or zoonotic. This study was designed to investigate the role of the influenza virus in causing casualties in the poultry farms of the country. Therefore, 28 flocks from four different provinces (Qazvin, Gilan, Zanjan and Khuzestan) were monitored.**Materials & Methods:** Samples were taken from casualties suspected of respiratory diseases (10 chickens from each flock), and from tissues of the trachea, lungs, cecal tonsils, and kidneys. First, the presence of the influenza virus in the tissues was confirmed with the NP primers, and then the positive samples were evaluated with the specific H9 primer to check the presence of the H9N2 serotype.**Results:** Out of the total of 28 flocks, 17 flocks were diagnosed positive with the NP primers, and 5 of these 17 flocks were positive with H9-specific primer.**Conclusion:** According to the evaluation done in this study and the prevalence of the virus in a significant number of regions of the country, it is always recommended to follow biosecurity principles.**Article info*** Corresponding Author's email:
z.boroomand@scu.ac.ir

Received: 22 December 2023

Reviewed: 25 January 2024

Revised: 26 March 2024

Accepted: 28 April 2024

مقاله علمی - پژوهشی

ردیابی مولکولی ویروس آنفلوآنزای پرندگان تیپ A در گله‌های گوشتی دارای علائم تنفسی در برخی استان‌های ایران

بهشاد بهشتیان^۱، زهرا برومند^{۱*}، مسعود رضا صیفی‌آبادشاپوری^۲، منصور میاحی^۱

^۱ گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

کلمات کلیدی

چکیده

آنفلوآنزای پرندگان
H9N2
علائم تنفسی
گله‌های گوشتی
آزمون RT-PCR

مقدمه: بیماری آنفلوآنزای پرندگان یکی از مهم‌ترین و کشنده‌ترین بیماری‌های طیور در سراسر جهان و ایران می‌باشد که همواره باعث تلفات گسترده در سطح مزارع پرورش طیور می‌شود. برخی از سویه‌های ویروس با عبور از سد بین گونه ای پرند و انسان در گروه بیماری‌های مشترک یا زئونوز طبقه می‌شوند. این مطالعه به جهت بررسی نقش ویروس آنفلوآنزا در ایجاد تلفات در سطح مزارع پرورش طیور گوشتی کشور طراحی و انجام شده است. بدین جهت تعداد ۲۸ گله از ۴ استان مختلف (قزوین، گیلان، زنجان و خوزستان) مورد پایش قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها: نمونه‌ها از تلفات مشکوک به بیماری‌های تنفسی (از هر گله ۱۰ قطعه مرغ)، و از بافت‌های نای، ریه، لوزه‌های سکومی و کلیه‌ها اخذ شدند. نمونه بافتی هر ۵ قطعه مرغ به‌صورت جداگانه مخلوط شده و سپس ابتدا با پرایمر NP وجود ویروس آنفلوآنزا در بافت‌ها تایید و در نهایت سرو تیپ H9N2 در نمونه‌های مثبت شده با استفاده از پرایمر اختصاصی H9، ردیابی شد. **نتایج:** از مجموع ۲۸ گله پایش شده، ۵ گله پایش شده، ۵ ویروس آنفلوآنزای نوع A در ۱۷ گله ردیابی شد و از این ۱۷ گله، در ۵ مورد ژن H9 مثبت تشخیص داده شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به ارزیابی انجام شده در این مطالعه و شیوع ویروس در تعداد قابل توجهی از مناطق کشور، همواره رعایت اصول بیوسکیوریتی توصیه می‌گردد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:
z.boroomand@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱ دی ۱۴۰۲

تاریخ داوری: ۵ بهمن ۱۴۰۲

تاریخ اصلاح: ۷ فروردین ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: ۹ اردیبهشت ۱۴۰۳

مقدمه

ویروس‌های آنفلوانزا در خانواده ارتومیکسوویریده قرار داشته و دارای ژنوم قطعه‌ای با پولاریته منفی هستند. ویروس‌های این خانواده در ۷ جنس *Beta*influenzavirus، *Alpha*influenzavirus، *Isavirus*، *Quar*anjavirus، *Delta*influenzavirus، *Gamma*influenzavirus و *Thogotovirus* تقسیم‌بندی شده‌اند (۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲). در این میان فقط ویروس‌های جنس *Alpha*influenzavirus که در گذشته جنس A و یا تیپ A نام داشت می‌توانند ایجاد عفونت طبیعی در پرندگان نمایند. ویروس‌های این جنس دارای ۸ پروتئین ساختاری می‌باشد و بر اساس شاخص‌های آنتی‌ژنیکی پروتئین‌های سطحی خود شامل ۱۶ نوع (سروتیپ) پروتئین هم‌گلوکوتینین (HA) که در سطح ویروس به شکل گرد و سه‌وجهی و ۹ نوع (سروتیپ) پروتئین نورامینیداز (NA) که چهاروجهی و قارچی شکل هستند طبقه‌بندی می‌شوند. این ویروس‌ها هم‌چنین یک پروتئین چهاروجهی (Tetrameric) به نام (M2)(Matrix2) در سطح خود دارند. در واقع واژه ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان برای توضیح ویروس‌های آنفلوانزای از جنس *Alpha*influenzavirus استفاده می‌شود که در پرندگان یافت می‌گردد. پرندگان آبی میزبان طبیعی ویروس‌های جنس *Alpha*influenzavirus هستند (۶). 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 (۶). ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان از جمله سروتیپ‌هایی مانند H5N1، H7N7 و H9N2 قادر به ایجاد عفونت و بیماری در انسان نیز بوده‌اند (۱۳). سروتیپ H9N2 ویروس آنفلوانزای پرندگان با بیماری‌زایی کم در سراسر جهان در بین گونه‌های مختلف پرندگان در گردش است و در نتیجه نه تنها برای صنعت طیور، بلکه برای سلامت عمومی نیز یک تهدید بالقوه به حساب می‌آید (۲). این ویروس به دلیل ماهیت ژنومی قطعه قطعه‌ای که دارد توانایی ایجاد همه‌گیری‌های جهانی را دارد (۱۷). بیماری آنفلوانزا به دلیل خاصیت کم‌حدتی که در ماکیان دارد در بسیاری از کشورهای جهان در اولویت‌های اولیه از نظر بررسی و پایش نمی‌باشد. اما گزارش‌هایی از ابتلای انسان‌ها به آنفلوانزای H9N2 پرندگان نگرانی‌های جدیدی را در سطح جوامع ایجاد کرده است (۱۶). این ویروس ایران را نیز سال‌هاست که مورد تهاجم خود قرار داده است. در خرداد سال ۱۳۷۷ بیماری آنفلوانزای تحت تیپ

H9N2 در گله‌های طیور ایران باعث ایجاد علائم بالینی و مرگ و میر بالایی گردید (۱۴). نشانه‌های بیماری در پرندگان به عوامل متعددی مانند سویه ویروس، گونه، سن، وضعیت ایمنی پرنده، عفونت‌های همراه و عوامل محیطی بستگی دارد. بارزترین علائم این بیماری شامل تلفات شدید و ناگهانی به همراه علائم تنفسی مانند عطسه، سرفه و رال‌های تنفسی است. بی‌اشتهایی، بی‌حالی و سیانوز شدن تاج و ریش، اسهال و قطع تخم‌گذاری از دیگر علائم ابتلا به آنفلوانزا است. علائم کالبدگشایی بسیار متغییر است و عمدتاً به صورت پرخونی عمومی لاشه و خونریزی در امعا و احشا و پرده‌های سروزی جلب توجه می‌کند. رعایت اصول امنیت زیستی و انجام واکسیناسیون در پیشگیری اهمیت دارد (۲۰). آخرین تحقیقات نشان داده است که ویروس‌های H9N2 قادر هستند به گیرنده‌های سیالیک اسید (SA) انسانی متصل شوند (۱۰). طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی در دسامبر ۲۰۲۰ تعداد ۶۶ مورد بروز عفونت در انسان، همراه با علائم شبه آنفلوانزا و شناسایی H9N2 در آزمایشگاه، از سراسر جهان گزارش شده که نشانگر اهمیت بالای این سروتیپ به عنوان یک عامل ژئونوز مهم می‌باشد (۱۵). تشخیص به موقع تغییرات سویه‌های در گردش برای کنترل بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است. به همین دلیل تحقیقات مستمر جهت کسب آگاهی از وجود تغییرات در سویه‌ها برای تعیین سیاست‌های مبارزه با بیماری و مصرف واکسن از امور اجتناب‌ناپذیر است. جداسازی و شناسایی ویروس، یافتن اسید نوکلئیک‌های ویروس و روش‌های سرولوژی از موارد تشخیص آزمایشگاهی ویروس آنفلوانزای پرندگان می‌باشد. تشخیص سریع و یافتن عامل بیماری‌زا در کنترل روند بیماری می‌تواند نقش کلیدی ایفا کند. آزمون PCR یک فنآوری نسبتاً جدید با سرعت و حساسیت بالاست که در مطالعات مختلف برای شناسایی ویروس‌های آنفلوانزا به منظور تحقیقات و بررسی همه‌گیری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۵). اولین بار در ایران با نام A/chicken/Iran/259/1998 در بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور مؤسسه رازی و دانشکده دامپزشکی تهران جداسازی و شناسایی کردند (۱۴). در این مطالعه، ردیابی ویروس آنفلوانزای تیپ A و سپس سروتیپ H9N2 در کمپلکس تنفسی طیور گوشتی استان‌های قزوین، زنجان، گیلان و خوزستان به روش مولکولی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: پس از ثبت مشخصات هر گله با علائم تنفسی (رال تنفسی، عطسه، ترشحات از چشم، بینی و دهان، بی‌اشتهایی) و پس

از مشاهده علایم کالبدگشایی (پرخونی و ترشحات در نای و ریه همراه با وجود cast در محل دوشاخه شدن نای، پرخونی در پانکراس و لوزه‌های سکومی) در کاربرد مخصوص، ۱۰ قطعه مرغ تلف شده از ۲۸ گله گوشتی از استان‌های قزوین، زنجان، خوزستان و گیلان (هر استان ۷ گله) انتخاب شده و از بافت‌های نای، ریه، کلیه و لوزه‌های سکومی نمونه‌گیری انجام شد. اولین نمونه‌گیری از مهرماه سال ۱۴۰۰ آغاز و روند نمونه‌گیری تا خرداد ماه سال ۱۴۰۲ ادامه داشت. همه نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند.

استخراج RNA: جهت استخراج RNA ویروس، ۵۰ تا ۱۰۰ میلی گرم نمونه بافتی را هموژن کرده و در ادامه، مراحل طبق دستورالعمل

شرکت سازنده کیت (شرکت تایوانی Favorgen) انجام شد. بر روی RNA استخراج شده ۵۰ میکرولیتر آب DEPC اضافه شد و در فریزر ۷۰- نگهداری گردید.

سنتز cDNA: سنتز cDNA با استفاده از کیت و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (یکتا تجهیز آزما، ایران) انجام پذیرفت و در نهایت cDNAهای به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. **آزمون RT-PCR:** آزمون RT-PCR جهت ردیابی وجود ویروس ژن NP (۲۴) و سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن H9 (طراحی شده در این مطالعه) و ویروس آنفلوانزا در نمونه‌های بافتی انجام شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده و دمای انجام PCR جهت ردیابی ژن NP

ژن	توالی	چرخه	دما	زمان
NP	F CAGRTACTGGGCHATAAGRAC	۳۵	۹۵°C	۳ دقیقه
			۹۵°C	۳۰ ثانیه
	R GCATTGTCTCCGAAGAAATAAG	۳۵	۵۰°C	۴۰ ثانیه
			۷۲°C	۱ دقیقه
			۷۲°C	۱۰ دقیقه
PCR production size			bp ۳۳۰	

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده و دمای انجام PCR جهت ردیابی ژن H9

ژن	توالی	چرخه	دما	زمان
H9	F ATAATTGACAAGATGAAC	۳۵	۹۵°C	۳ دقیقه
			۹۵ °C	۳۰ ثانیه
	R CGAATAAATGGTAAGAAT	۳۵	۴۶ °C	۴۰ ثانیه
			۷۲ °C	۱ دقیقه
			۷۲ °C	۱۰ دقیقه
PCR production size			۴۱۱ (bp)	

در ۷ گله، در استان خوزستان ۴ مورد NP مثبت و ۱ مورد H9 مثبت (شهرستان ایذه) در مجموع ۷ گله، در استان گیلان (شهرستان لوشان) ۲ مورد NP مثبت و ۰ مورد H9 در ۷ گله و در استان زنجان ۵ مورد NP مثبت و ۲ مورد H9 مثبت در میان ۷ گله وجود داشت.

جدول ۳: سن و نتایج ردیابی مولکولی ویروس آنفلوانزا در گله‌های

گوشتی تحت مطالعه استان‌ها

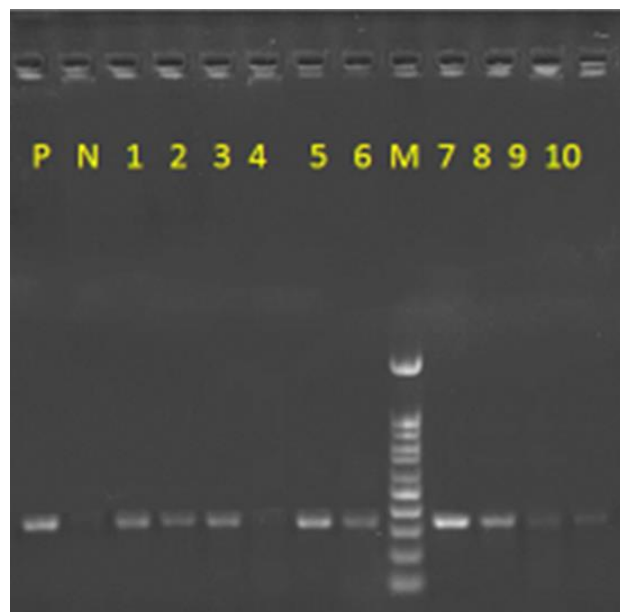
شماره	استان	سن گله‌ها (روز)	موارد مثبت ژن NP ویروس آنفلوانزا	موارد مثبت ژن H9
۱	قزوین	۲۵-۴۸	۶ گله	۲
۲	خوزستان	۲۰-۴۳	۴ گله	۱
۳	گیلان	۲۸-۳۷	۲ گله	-
۴	زنجان	۲۱-۴۰	۵ گله	۲

در نهایت محصولات PCR در کنار نردبان ژنی 100 bp (سیناژن، ایران) در ژل آگارز ۱ درصد حاوی رنگ ایمن (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۹۰ به مدت ۲۰ دقیقه الکتروفورز شده و تحت تابش نور UV در دستگاه ترانس ایلومیناتور (Uvitec، انگلستان) مورد مشاهده قرار گرفتند.

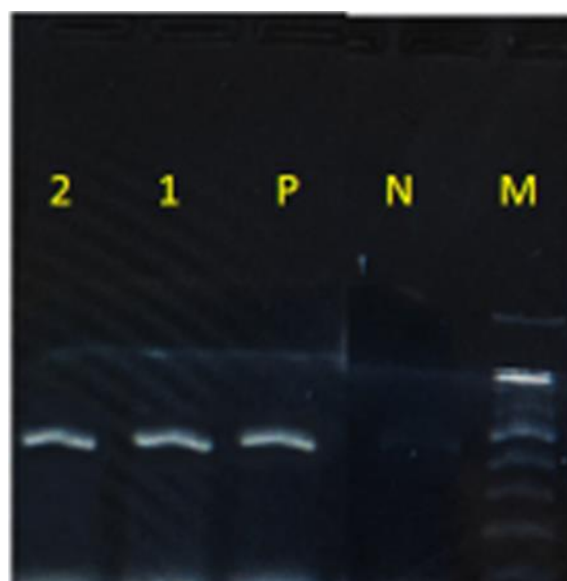
نتایج

نمونه‌ها ابتدا با پرایمر NP و سپس با پرایمر مخصوص H9 بررسی شدند که نتایج حاصل شده به شرح زیر می‌باشد. از مجموع نمونه‌های بافتی اخذ شده از ۲۸ گله و بعد از انجام RT-PCR، ۱۷ گله توسط پرایمر NP، آنفلوانزا مثبت (شکل ۱) و ۵ گله از میان همین ۱۷ گله، در ردیابی ژن با پرایمر اختصاصی H9 مثبت شناسایی شدند (شکل ۲). در استان قزوین ۶ مورد NP مثبت و ۲ مورد H9 مثبت

توزیع شده است. علاوه بر این، گوشت مرغ و تخم مرغ مهم ترین منبع پروتئین برای خانواده های ایرانی محسوب می شود. ویروس آنفلوآنزای H9N2 کاندیدای مهمی برای بروز پاندمی در انسان ها می باشد. این ویروس از مهم ترین عوامل بیماری زا در طیور به شمار می رود. بیماری آنفلوآنزای پرندگان توسط ویروس های آنفلوآنزای نوع A متعلق به خانواده Orthomyxoviridae ایجاد می شود. ۱۶ زیرگروه HA و ۹ NA برای ویروس های آنفلوآنزا پرندگان وجود دارد و در میان آن ها، سه زیرگروه (H5، H7 و H9N2) به دلیل پاتوژنز و اثرات آن ها بر سلامت و اقتصاد عمومی در طیور اهمیت بیش تری دارند (۶). تنها ویروس های آنفلوآنزای تیپ A باعث ایجاد عفونت های طبیعی در پرندگان می شوند، اما همه ویروس های زیرگروه A آنفلوآنزا در اکثر گونه های پرندگان جدا شده اند. از سال ۱۹۵۹، اولین گزارش از شیوع HPAI در طیور ۱۷ بار (۸ بار از سال ۱۹۹۰)، ۵ مورد در بوقلمون و ۱۲ مورد در مرغ گزارش شده است. ویروس های HPAI به ندرت از پرندگان وحشی جدا می شوند، اما میزان جداسازی بسیار بالایی از ویروس های با حدت کم برای طیور در مطالعات ثبت شده است که ارقام کلی حدود ۱۵ درصد برای اردک ها و غازها و حدود ۲ درصد برای همه گونه های دیگر را نشان می دهد. نشان داده شده است که ویروس آنفلوآنزا همه انواع پرندگان اهلی را در تمام مناطق جهان تحت تاثیر قرار می دهد، اما فراوانی بروز عفونت های اولیه در هر نوع پرند به میزان تماس با پرندگان وحشی بستگی دارد. احتمالاً انتقال مدفوع عفونی از پرندگان آلوده به پرندگان حساس توسط انسان، عامل گسترش ثانویه ویروس می باشد (۱). در این مطالعه از مجموع ۲۸ گله مرغ گوشتی دارای علائم تنفسی در ۴ استان کشور، در ۱۷ گله ویروس آنفلوآنزای تیپ A ردیابی شد که از این تعداد موارد مثبت آنفلوآنزا، در ۵ مورد ژن H9 ردیابی شد. این نتیجه بیانگر این است که اغلب سروتیپ های در گردش آنفلوآنزا در گله های طیور گوشتی H9 نبودند. با این حال با توجه به جهش پذیری بالای ژنوم ویروس های آنفلوآنزا، احتمال عدم تناسب پرایمرهای انتخاب شده برای شناسایی ژن H9 در برخی از جدایه های ویروس نیز ممکن است در این موضوع موثر بوده باشد. درک کنونی از اکولوژی ویروس های آنفلوآنزای پرندگان این است که مخازن بزرگی از این ویروس ها وجود دارد که همه زیرگونه های شناخته شده در پرندگان وحشی، به ویژه اردک ها و غازها را پوشش می دهد. به نظر می رسد شیوع هر دو HPAI و LPAI در ماکیان نتیجه مواجهه ماکیان اهلی با پرندگان وحشی باشد. آنفلوآنزای پرندگان بسیار بیماری زا (HPAI) که توسط زیرگروه های خاصی از ویروس آنفلوآنزای A در جمعیت های حیوانی، به ویژه پرندگان ایجاد می شود، یک خطر مداوم برای سلامت عمومی انسان در جهان است. از سال ۲۰۰۲، بروز HPAI در طیور اهلی به طور قابل توجهی افزایش یافته است، در حالی که



شکل ۱: الکتروفورز محصول RT-PCR ژن NP اندازه باند ۳۳۰ جفت باز، P نمونه مثبت، N نمونه منفی، M مارکر ۱۰۰ جفت باز، شماره های ۱ تا ۱۰ نمونه های آزمایش شده



شکل ۲: الکتروفورز محصول RT-PCR ژن H9 اندازه باند ۴۱۱ جفت باز، P نمونه مثبت، N نمونه منفی، M مارکر ۱۰۰ جفت باز، شماره های ۱ و ۲ نمونه های آزمایش شده

بحث

پرورش طیور در ایران از نظر اقتصادی، اجتماعی و امنیت غذایی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. از آن جا که شرایط جغرافیایی ایران مناسب پرورش طیور است، این صنعت در اکثر بخش های کشور

سروتیپ‌های با بیماری‌زایی کم، مانند H9N2، در اروپا و آسیا اندمیک شده‌اند. سروتیپ‌های متعدد AIV در نمونه‌های جمع‌آوری شده از بازار پرندگان زنده، اردک‌ها، پرندگان آبی و محیط زیست ردیابی شده‌اند (۴). شیوع آنفلوآنزای فوق‌حاد پرندگان H5N8 در مزارع صنعتی ایران در سال ۲۰۱۶ نشان‌دهنده ضعف و انفعال در مراقبت و گزارش بیماری بود. تشخیص و واکنش سریع موثرترین اقدامات برای پیشگیری و کنترل آنفلوآنزای فوق‌حاد پرندگان است و اگر به‌خوبی انجام شود، این اقدامات گسترش سریع عفونت را تحت کنترل قرار می‌دهد. این شیوع در ایران در مناطقی با بیش‌ترین تراکم پرورش طیور رخ داد و خسارات مستقیم و غیرمستقیم و همچنین اثرات اجتماعی را به همراه داشت. تشخیص اولین طغیان در یک مزرعه صنعتی و تشخیص چندین طغیان در مدت زمان کوتاه نشان‌دهنده تاخیر در شناسایی بیماری و عدم موفقیت در تشخیص زودهنگام بیماری‌ها در طیور خانگی است. منبع عفونت در اولین مزارع مشخص نشد. اما طیور بومی به‌ویژه اردک و غاز در روستاهای نزدیک به این مزارع و نزدیک به استان مازندران به فروش می‌رسید و از آن‌جا مقداری اردک بومی به نقاط دیگر عرضه می‌شد. بنابراین محتمل‌ترین منبع این ویروس در استان مازندران بوده است (۷). Ghazi Marashi در مطالعه خود در سال ۱۴۰۱ با هدف یافتن ویروس‌های آنفلوآنزای فوق‌حاد پرندگان در جمعیت‌های حیات وحش، ویروس‌های آنفلوآنزای تیپ A را با استفاده از روش مولکولی مورد بررسی قرار داد و نتیجه گرفت که هیچ مورد مثبتی در میان پرندگان زنده به ظاهر سالم وجود نداشت. با این حال ویروس‌های فوق‌حاد آنفلوآنزای پرندگان نظیر H5N1-H5N2-H5N6-H5N8 در پرندگانی که به‌صورت تکی یا دسته‌جمعی تلف شده بودند یافت گردید (۲۵). در طی مطالعه‌ای که بین سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱ توسط Kariminejhad و Mehrabanpour انجام گردید، آن‌ها با انجام آزمایشات سرمی (الایزا و HI) و مولکولی سعی در تشخیص آلودگی گله‌های مرغ گوشتی با علائم تنفسی در استان فارس نمودند که در آزمایش RT-PCR، ۲۴ گله از نظر آنفلوآنزای پرندگان H9N2 مثبت بودند (۹). Boroomand و همکاران در مطالعه نقش ویروس‌های عامل نیوکاسل، آنفلوآنزا (H9N2) و برونشیت عفونی در بیماری‌های تنفسی ماکیان بومی منطقه اهواز ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۵، از تعداد ۱۰۰ مرغ بومی با نشانه‌های تنفسی و تلفات، با تهیه نمونه خون و نیز سواب از نای و کلوآک، میزان ویروس آنفلوآنزا را بررسی نمودند که در نهایت وجود این ویروس به میزان ۳۴ درصد گزارش داد (۱۹). Naguib و همکاران در مطالعه خود در مصر، وجود ویروس آنفلوآنزای پرندگان با بیماری‌زایی زیاد تحت تیپ (H5N1) و گردش همزمان ویروس آنفلوآنزای پرندگان با بیماری‌زایی کم، تحت تیپ (H9N2) را به‌صورت اندمیک گزارش کردند (۱۱). Malekan و همکاران با انجام مطالعه‌ای در خصوص

بررسی مولکولی ویروس‌های H9N2 جدا شده از مرغداری‌های صنعتی به‌منظور ردیابی مقاومت به داروهای مسدودکننده کانال یونی M2 و مهارکننده‌های نورآمینیداز، پس از انجام RT-PCR در سال ۲۰۱۶، دریافتند که ویروس تحت تیپ H9N2 در نمونه‌های دارای خاصیت هم‌گلویتیناسیون وجود دارد (۲۲). Fallah Mehrabadi و همکاران با انجام دو سال پایش بر روی طغیان‌های ویروس آنفلوآنزای H9N2 در جوجه‌های بومی روستایی به‌روش آزمایش RT-PCR بر روی بافت‌های نای و ریه دریافتند که تلفات ناشی از عفونت آنفلوآنزای H9N2 با نرخ ۵۴ مورد از ۱۲۱ مورد طغیان، بسیار قابل توجه می‌باشد (۲۱). Mayahi و همکاران بر روی بیش از ۱۰۰ کبوتر صید شده در اهواز، جهت ردیابی آنفلوآنزای جنس A مطالعه جامعی را انجام دادند. آن‌ها روش RT-PCR را برای پایش خود انتخاب نمودند که در نهایت هیچ مورد مثبتی در ردیابی ژن M یافت نکردند، آن‌ها این‌گونه استنباط کردند که یا تحت تیپ‌های حاد ویروس آنفلوآنزا در این منطقه وجود ندارند و یا کبوتر احتمالاً نقشی در انتشار ویروس آنفلوآنزای پرندگان ندارد (۲۳). Boroomand و همکاران به بررسی نقش گنجشک‌های خانگی در انتشار ویروس آنفلوآنزای پرندگان سروتیپ H9N2 در منطقه اهواز پرداختند و حضور ژن‌های M و سپس H9 را در روده و نای گنجشک‌ها ردیابی کردند نتایج آن‌ها نشان داد که ۱۱ نمونه از ۲۰۰ نمونه برای دو ژن M و H9 مثبت بودند. بر اساس یافته‌های پژوهش آن‌ها، گنجشک‌های خانگی آلوده به H9N2 بوده و خطری برای طیور تجاری محسوب می‌شوند. این پرندگان ممکن است نقش مهمی در انتقال AIV بین حیات وحش و حیوانات اهلی داشته باشند. بنابراین، این موضوع در موضع‌گیری‌های پیشگیرانه مهم است (۳). با توجه به ارزیابی انجام شده در این مطالعه و شیوع ویروس در تعداد قابل‌توجهی از مناطق کشور همواره رعایت اصول بیوسکیوریتی، توجه به حرکت طیور داخلی، بررسی و اصلاح ساختار مرغداری‌های صنعتی، آموزش روستاییان، کشاورزان، دامپزشکان و اصناف مرتبط و کارکنان آن‌ها، ضدعفونی صحیح و اصولی واحدها، افزایش نظارت بر پرندگان مهاجر، افزایش نظارت بالینی فعال در مزارع صنعتی، افزایش آگاهی مسئولین درخصوص اهمیت آلودگی و تامین اعتبارات و امکانات مورد نیاز توصیه می‌گردد. تهیه نهاده‌های با کیفیت که عاری از هرگونه عوامل تضعیف‌کننده سیستم ایمنی باشد در کنار موارد ذکر شده در بالا توصیه می‌شود. بالا نگه داشتن سطح ایمنی پرند در طول دوره با ترکیبات مختلف ویتامینی و گیاهی مانند ویتامین‌های A، E و B در کنار مصرف ترکیبات مفید گیاهی مانند اسطوخودوس که بیان ژن موسین را در جوجه‌های گوشتی افزایش می‌دهد (۲۴) می‌تواند از اقدامات مفید در سطح فارم‌های کشور باشد. با توجه به طیف گسترده واکسن‌های تزریقی استفاده شده بر علیه ویروس آنفلوآنزا باز هم شاهد شیوع قدرتمند این

- Egypt. Infect Genet Evol. 34: 278-291. doi: 10.1016/j.meegid.2015.06.004
12. **Raynard, R.S., Murray, A.G. and Gregory, A., 2001.** Infectious salmon anemia virus in wild fish from Scotland. *Dis Aquat Organ.* 46(2): 93-100. doi: 10.3354/dao046093
13. **Sun, J., Han, Z., Shao, Y., Cao, Z., Kong, X. and Liu, S., 2014.** Comparative proteome analysis of tracheal tissues in response to infectious bronchitis coronavirus, Newcastle disease virus, and avian influenza virus H9 subtype virus infection. *Proteomics.* 14(11): 1403-1423. doi: 10.1002/pmic.201300404
14. **Vasfi-Marandi, M. and Bozorgmehri fard, M., 1999.** An outbreak of non-highly pathogenic avian Influenza in chicken in Iran. 61st Meeting of the World Veterinary Association. Lyon, France.
15. **Monthly Risk Assessment Summary. WHO. 2020.** Available from: https://www.who.int/influenza/human-animal-interface/HAI_Risk_Assessment/en.
16. **Yan, W., Cui, H., Engelsma, M., Beerens, N., Van Oers, M.M., de Jong, M.C.M., Li, X., Liu, Q., Yang, J., Teng, Q. and Li, Z., 2022.** Molecular and Antigenic Characterization of Avian H9N2 Viruses in Southern China. *Microbiol Spectr.* 10(1): e0082221. doi: 10.1128/spectrum.00822-21
17. **Zaker, S.R., Nili, H. and Asasi, K., 2022.** Apoptosis in field and experimental cases of avian influenza H9N2 infection in broiler chickens in Iran. *Vet Res Forum.* 13(3): 439-441. doi: 10.30466/vrf.2020.119136.2818
18. **Lee, M.S., Chang, P.C., Shien, J.H., Cheng, M.C. and Shieh, H.K., 2001.** Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods.* 97(1-2): 13-22. doi: 10.1016/s0166-0934(01)00301-9.
19. **Boroomand, Z., Jafari, R.A. and Mayahi, M., 2018.** Detection of Newcastle disease, H9N2 Avian Influenza, and Infectious Bronchitis Viruses in Respiratory Diseases in Backyard Chickens in Ahvaz, Iran, in 2014-2015. *Archives of Razi Institute.* 73(1): 19-25. (In Persian)
20. **Arab, M., Ahangaran G., Jafarian, M. and Dehkordi, M., 2017.** The molecular study of co-incidence of Avian Influenza (H9N2 subtype) and Metapneumovirus in Broiler chickens with respiratory syndrome in Isfahan province. *Iranian Journal of Veterinary Clinical Sciences.* 10(2): 3-11. (In Persian)
21. **Fallah Mehrabadi, M.H., Ghalyanchilangeroudi, A., Ghafouri, S.A., Hosseini, H., Zabihi Petroudi, M.T., Modiri Hamadan, A., Rezaee, H., Motamed Chaboki, P., Vatandour, S. and Shayegannmehr, A., 2020.** Comparison of autogenous and commercial H9N2 avian influenza vaccines in a challenge with recent dominant virus. *Iranian Journal of Veterinary Research.* 21(2): 109-114. doi: 10.22099/ijvr.2019.33162.4937 (In Persian)
22. **Malekan, M., VasfiMarandi, M., Barin, A., Mokhtari azad, T., Ranjbar, M.M. and Bashashati, M., 2016.** Molecular evaluation of M2 protein of Iranian avian influenza viruses of H9N2 subtype in order to find mutations of adamantane drug resistance. *Iranian Journal of Veterinary Medicine.* 10(4): 253-262. doi: 10.22059/ijvm.2016.5971 (In Persian)
23. **Mayahi, M., Boroomand, Z. and Ghorniani, M., 2018.** Detection of genus A avian influenza viruses in the wild pigeons around Ahwaz, southwest of Iran, by RT-PCR. *Veterinary Research & Biological Products.* 31(4): 57-62. doi: 10.22092/vj.2018.122074.1462 (In Persian)
24. **Pahlavan Afshari, K. and Sanaan, H., 2022.** Effect of dietary levels of lavender oil on Muc2 gene expression in broiler chickens. *Journal of Animal Environment.* 14(2): 113-122. doi: 10.22034/AEJ.2022.340130.2797 (In Persian)
25. **Ghazi Marashi, S.M., 2022.** Study of Ecology and Epidemiology of Avian Influenza Viruses Type A by molecular methods. *Journal of Animal Environment.* doi:10.22034/aej.2021.255425.2398 (In Persian)

ویروس در کشور و متعاقب آن ایجاد تلفات در سطح واحدها هستیم که ادامه پایش‌ها و مطالعات بر کارایی واکسن‌های موجود و هم‌چنین تعیین سویه‌های در حال گردش در سطح کشور توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز برای حمایت مالی از این اثر تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

1. **Alexander, D.J., 2000.** A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol.* 74(1-2): 3-13. doi: 10.1016/s0378-1135(00)00160-7
2. **Banakar, A., Sadeghi, M. and Shushtari, A., 2016.** An intelligent device for diagnosing avian diseases: Newcastle, infectious bronchitis, avian influenza. *Comput Electron Agric.* 127: 744-753. doi: 10.1016/j.compag.2016.08.006
3. **Boroomand, Z., Mayahi, M., Hosseini, H. and Valadbeigi, S., 2019.** Detection and Isolation of H9N2 Subtype of Avian Influenza Virus in House Sparrows (*Passer domesticus*) of Ahvaz, Iran. *Archives of Razi Institute.* 74(4): 439-444. doi: 10.22092/ari.2019.122504.1223
4. **Chaharacain, B., Omar, A.R., Aini, I., Yusoff, K. and Hassan, S.S., 2009.** Detection of H5, H7 and H9 subtypes of avian influenza viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Microbiological Research.* 164(2): 174-179. doi: 10.1016/j.micres.2007.01.001
5. **Cherian, T., Bobo, L., Steinhoff, M.C., Karron, R.A. and Yolken, R.H., 1994.** Use of PCR-enzyme immunoassay for identification of influenza A virus matrix RNA in clinical samples negative for cultivable virus. *J Clin Microbiol.* 32(3): 623-628. doi: 10.1128/jcm.32.3.623-628.1994
6. **Swayne, D.E., Suarez, D.L., Sims, D. L., Influenza, I., Swayne, D.E., Boulianne, M., Logue, C.M., Mc Dougald, L.R., Nair, V. and Suarez, D.L., 2020.** Editors. *Diseases of Poultry.* 111 River Street, Hoboken, NJ 07030, USA. 14th Edition. 219-235
7. **Fallah Mehrabadi, M.H., Tehrani, F., Shoushtari, A., Bahonar, A.R., Rabiee, M.H., Ghalyanchilangeroudi, A., Ghafouri, S.A. and Amirhajloo, S., 2021.** Outbreak Investigation of Officially Reported and Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N8 Subtype) in Iran During 2016. *Archives of Razi Institute.* 76(1): 17-29. doi: 10.22092/ari.2019.124904.1291
8. **Jones, L.D. and Nuttall, P.A., 1989.** Non-viraemic transmission of Thogoto virus: influence of time and distance. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 83(5): 712-714. doi: 10.1016/0035-9203(89)90405-7
9. **Kariminejad, E. and Mehrabanpour, J., 2012.** Serological and Molecular Assays for Detection of Avian Influenza Virus in Broiler Chickens Flocks of Fars Province-Iran. *Int J Anim Vet Adv.* 4: 125-129.
10. **Li, F., Liu, J. and Yang, J., 2021.** H9N2 virus-derived M1 protein promotes H5N6 virus release in mammalian cells: Mechanism of avian influenza virus inter-species infection in humans. *Plos Pathogens.* 17(12): e1010098. doi: 10.1371/journal.ppat.1010098
11. **Naguib, M.M., Arafa, A.S., El-Kady, M.F., Selim, A.A., Gunalan, V., Maurer-Stroh, S., Goller, K.V., Hassan, M.K., Beer, M., Abdelwhab, E.M. and Harder, T.C., 2015.** Evolutionary trajectories and diagnostic challenges of potentially zoonotic avian influenza viruses H5N1 and H9N2 co-circulating in