



11/11/11 ✓

۸۷/۱/۱۰۸۲۹۰
۸۸-۱-۲۵



وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشکده علوم زیستی
گروه آموزشی میکروبیولوژی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد
رشته میکروبیولوژی

عنوان

ردیابی ویروس های آنفلوآنزای پرندگان به روش ملکولی RT-PCR

اساتید راهنما

دکتر سید مسعود حسینی - دکتر معصومه توسی خیری

استاد مشاور

دکتر نریمان شیخی

دانشجو

یونس پيله ور سلطان احمدی

۱۳۸۸ / ۱ / ۲۱

بهمین ۸۷

تقدیم به
پدر و مادرم که سرمایه‌های اصلی زندگی‌م هستند

باساس و قدردانی از

جناب آقای دکتر سید مسعود حسینی: بخاطر حسن اخلاق و رهنمودهای سازنده ای که در

تمام مراحل این پایان نامه داشتند،

سرکار خانم دکتر معصومه توسلی خیری: که همچون مادری دلسوزانه در طی یک سال و

نیمی که افتخار شاگردیشان را داشتیم رویشگر راهم بودند،

جناب آقای دکتر زریحان شیحی: که سمت مشاوره ای این پایان نامه را بر عهده داشتند و

اجازه دادند تا از امکانات آزمایشگاه بی کم کاست استفاده کنم.

همچنین از همکاری صمیمانه پرسنل واحد آنفلونزای انستیتو پاستور، آزمایشگاه دامپزشکی پاستور، دوستان و همکلاسی های

خوبم کمال تشکر و قدردانی را دارم.

« صور تجلسه دفاع پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد »

بران ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین

فن: ۲۹۹۰۱

بازگشت به مجوز دفاع ۸۷/۱۰/۲۹ مورخ ۸۷/۱۰/۲۹ جلسه هیأت داوران ارزیابی
پایان نامه آقای یونس پیله ور سلطان احمدی به شماره شناسنامه ۹۸۶ صادره از
سلماس متولد ۱۳۶۰ دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته زیست شناسی -
میکروبیولوژی
با عنوان:

ردیابی حضور ویروس های آنفولانزای پرندگان با روش RT-PCR

به راهنمایی:

- ۱- آقای دکتر سید مسعود حسینی
- ۲- خانم دکتر معصومه توسلی خیری

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۸۷/۱۱/۷ تشکیل گردید و براساس رأی هیأت داوران و با
عنایت به ماده ۲۰ آئین نامه کارشناسی ارشد مورخ ۷۵/۱۰/۲۵ پایان نامه مزبور با
نمره ۱۸/۶ و درجه عالی مورد تصویب قرار گرفت.

- ۱- استاد راهنما: آقای دکتر سید مسعود حسینی
- ۲- استادراهنما: خانم دکتر معصومه توسلی خیری
- ۳- استاد مشاور: آقای دکتر نریمان شیخی
- ۴- استاد داور: آقای دکتر سعید چرخکار
- ۵- استاد داور و نماینده تحصیلات تکمیلی: آقای دکتر بهروز ابطحی

۱.....	فهرست مطالب
۵.....	فهرست جداول
۶.....	فهرست تصاویر و نقشه ها
۷.....	اختصارات
۸.....	چکیده فارسی
۱۰.....	مقدمه

فصل اول مروری بر مطالعات گذشته..... ۱۱

۱۲.....	۱-۱- تاریخچه
۱۲.....	۱-۱-۱- تاریخچه آنفلوئزای پرندگان در دنیا
۱۸.....	۱-۲- تاریخچه آنفلوئزای پرندگان در ایران
۲۰.....	۲-۱- طبقه بندی ویروس های آنفلوآنزا
۲۲.....	۳-۱- ویژگی های کلی ویروس های آنفلوآنزای تیپ A
۲۳.....	۴-۱- پایداری ویروس آنفلوآنزای پرندگان
۲۴.....	۵-۱- انتقال از پرنده به پرنده
۲۵.....	۶-۱- علایم بیماری آنفلوآنزا در پرندگان
۲۶.....	۷-۱- انتقال از پرندگان به انسان
۲۸.....	۸-۱- انتقال به سایر گونه ها
۲۸.....	۱-۸-۱- خوک
۲۹.....	۲-۸-۱- گربه و سگ
۲۹.....	۳-۸-۱- سمور

- ۲۹-۴-۸-۱-..... پستانداران دریایی
- ۳۰-۹-۱- پیشگیری و کنترل آنفلوآنزای پرندگان.....
- ۳۰-۱-۹-۱-..... واکسیناسیون در طیور
- ۳۴-۲-۹-۱-..... واکسیناسیون انسانها
- ۳۴-۳-۹-۱-..... داروهای ضد ویروسی
- ۳۵-۱۰-۱- پیش بینی وقوع موارد بیماری آنفلوآنزا.....
- ۳۶-۱۱-۱- پیش بینی وقوع و الگوی حرکت آنفلوآنزا.....
- ۳۷-۱-۱۱-۱- حرکت توده ای روبجلو.....
- ۳۷-۲-۱۱-۱- حرکت چند کانونی.....
- ۳۷-۳-۱۱-۱- حرکت کانونی جابجاشونده فصلی.....
- ۳۷-۴-۱۱-۱- حرکت انفجاری پیشرو.....
- ۳۷-۱۲-۱- خطر پاندمی آنفلوآنزای A(H5N1) و راه های مقابله با آن.....
- ۴۰-۱-۱۲-۱- مراحل ایجاد یک پاندمی آنفلوآنزا در سطح جهان.....
- ۴۱-۲-۱۲-۱- اقدامات لازم برای مقابله با پاندمی آنفلوآنزا.....
- ۴۲-۱-۲-۱۲-۱- اقدامات لازم در مرحله قبل از پاندمی.....
- ۴۲-۲-۲-۱۲-۱- اقدامات لازم در مرحله ظهور ویروس جدید.....
- ۴۳-۳-۲-۱۲-۱- اقدامات لازم در مرحله پاندمی و انتشار بین المللی بیماری.....
- ۴۴-۱۳-۱- نمونه گیری.....
- ۴۵-۱-۱۳-۱- انواع نمونه گیری.....
- ۴۵-۱-۱-۱۳-۱- نمونه برداری از کلوآک و تراکته.....
- ۴۶-۲-۱-۱۳-۱- نمونه گیری از مدفوع.....
- ۴۶-۳-۱-۱۳-۱- نمونه گیری از آب.....

۴۶.....	۴-۱-۱۳-۱- نمونه گیری از بافت ها.....
۴۷.....	۲-۱۳-۱- محیط های ترانسپورت.....
۴۷.....	۱۴-۱- تشخیص آزمایشگاهی ویروسهای آنفلوآنزای پرندگان.....
۴۷.....	۱-۱۴-۱- تشخیص سرولوژیکی.....
۴۸.....	۱-۱-۱۴-۱- آزمون هماگلوتیناسیون.....
۴۹.....	۲-۱-۱۴-۱- آزمون AGID.....
۴۹.....	۳-۱-۱۴-۱- آزمون ELISA.....
۴۹.....	۴-۱-۱۴-۱- آزمون HI و NI.....
۵۰.....	۲-۱۴-۱- تشخیص مولکولی.....
۵۰.....	۱-۲-۱۴-۱- RT-PCR.....
۵۰.....	۲-۲-۱۴-۱- RRT-PCR.....
۵۱.....	۳-۲-۱۴-۱- NASBA.....
۵۱.....	۳-۱۴-۱- کیت های تشخیصی سریع.....

فصل دوم مواد و روش ها..... ۵۲

۵۲.....	۱-۲- مناطق هدف.....
۵۳.....	۱-۱-۲- تالاب کانی برازان.....
۵۵.....	۲-۱-۲- دریاچه سد ارس.....
۵۵.....	۲-۲- نمونه برداری.....
۵۵.....	۳-۲- استخراج RNA در این مطالعه.....
۵۵.....	۱-۳-۲- مواد و وسایل مورد نیاز استخراج RNA.....
۵۶.....	۲-۳-۲- اصول کار.....

۵۶.....	۲-۳-۳- روش کار.....
۵۸.....	۲-۴- سنتز cDNA.....
۵۹.....	۲-۵- PCR.....
۶۱.....	۲-۶- بررسی محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز.....
۶۱.....	۲-۶-۱- مواد و وسایل مورد نیاز.....
۶۱.....	۲-۶-۲- مراحل آماده سازی ژل.....
۶۲.....	۲-۶-۳- نحوه لود کردن نمونه ها.....
۶۲.....	۲-۷- سرشماری پرندگان وحشی مهاجر آبی.....

فصل سوم نتایج ۶۳.....

۶۴.....	۳-۱- نتایج حاصل از بهینه سازی.....
۶۵.....	۳-۲- نتایج حاصل از نمونه
۶۶.....	۳-۳- نتایج حاصل از سرشماری پرندگان وحشی مهاجر آبی.....

فصل چهارم بحث و نتیجه گیری ۶۹.....

فصل پنجم منابع و مأخذ ۸۳.....

۹۲.....	چکیده انگلیسی.....
---------	--------------------

فهرست جداول

- جدول ۱. آمار مبتلایان به آنفلوآنزای فوق حاد طیور H5N1 تا ۱۶ دسامبر ۲۰۰۸..... ۱۸
- جدول ۲. مراحل ایجاد یک پاندمی آنفلوآنزا..... ۴۱
- جدول ۳. مقادیر لازم از معرف های کیت فرمتناز جهت سنتز cDNA..... ۵۹
- جدول ۴. پرایمر های انتخابی جهت شناسایی ژنهای M و NP و ویروسهای آنفلوآنزای A پرندگان..... ۶۰
- جدول ۵. مقدار معرف های مورد نیاز برای هر واکنش PCR..... ۶۰
- جدول ۶. برنامه ترموسایکلر RT-PCR برای تمام ۷۳ نمونه مدفوعی..... ۶۱
- جدول ۷. آمار پرندگان وحشی آبی دریاچه سد ارس طی سرشماری ژانویه ۲۰۰۸..... ۶۷
- جدول ۸. آمار پرندگان وحشی آبی تالاب کانی برازان طی سرشماری ژانویه ۲۰۰۸..... ۶۸
- جدول ۹. میزان تلفات ناشی از ویروس H5N1(HPAI) تا مارس ۲۰۰۸ در ماکیان ترکیه..... ۷۵
- جدول ۱۰. آمار مربوط به تلفات ماکیان ترکیه ناشی از شیوع ویروس H5N1 طی ماه های ژانویه تا مارس ۲۰۰۸..... ۷۶
- جدول ۱۱. آمار تلفات ناشی از شیوع ویروس H5N1 در ماکیان دو استان سلیمانیه و میسان عراق طی ژانویه ۲۰۰۶..... ۷۸
- جدول ۱۲. احتمال وجود بیماری آنفلوآنزای پرندگان را بر اساس تعریف مورد بیماری..... ۸۰

فهرست تصاویر و نقشه ها

- تصویر ۱. ساختار ویروس آنفلونزای تیپ A..... ۲۳
- تصویر ۲. مدل سرفلینگ..... ۳۶
- تصویر ۳. محصول RT-PCR با استفاده از پرایمر های M و NP بر روی ویروس ۴ ویروس آنفلوانزای پرندگان..... ۶۴
- تصویر ۴. محصول RT-PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی M بر روی ۷۳ نمونه مدفوعی پرندگان..... ۶۵
- تصویر ۵. محصول RT-PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی NP بر روی ۷۳ نمونه مدفوعی پرندگان..... ۶۶
- نقشه ۱. (A) دریاچه سد ارس و (B) تالاب کانی برازان..... ۵۴
- نقشه ۲. مسیرهای پروازی پرندگان مهاجر..... ۷۴
- نقشه ۳. مناطق آلوده ترکیه طی شیوع آنفلونزای پرندگان، ژانویه تا مارس ۲۰۰۸..... ۷۶
- نقشه ۴. مناطق آلوده جمهوری آذربایجان طی شیوع آنفلونزای پرندگان، فوریه ۲۰۰۶..... ۷۷

Abbreviations

اختصارات

AGID: Agar Gel Immunodiffusion

CEF: Chicken Embryo Fibroblast

DIVA: Differentiating Infected from Vaccinated Animals

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

HPAI: Highly Pathogenic Avian Influenza

GPS: Global Positioning System

IF: Immunofluorescence

IVPI: Intravenous Pathogenicity Index

LPAI: Low Pathogenic Avian Influenza

MDCK: Madian-Darby Canine Kidney cells

NASBA: Nucleic Acid Sequence – Based Amplification

OIE: Office International des Epizooties

PMK: Primary Rhesus Monkey cells

PPE: Personal Protective Equipment

RRT-PCR: Real – Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SAN: Specific Antibody Negative

SPF: Specific Pathogen Free

WHO: World Health Organization

چکیده

جابجایی و مهاجرت پرندگان وحشی آبی در نقاط مختلف دنیا همواره با خطر جابجایی و انتقال ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان همراه بوده و با توجه به گستردگی محدوده جغرافیایی مهاجرتی این پرندگان و همچنین همپوشانی کوریدورهای پروازی در گونه‌های متفاوت از پرندگان، خطر و پیچیدگی انتشار ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان توسط پرندگان وحشی آبی مهاجر دو چندان گردیده است. پرندگان وحشی آلوده به ویروس آنفلوآنزا بمدت بیش از یک ماه ویروس را دفع می‌نماید. تجمع پرندگان مهاجر در زیستگاه‌های بزرگ عمده در دنیا سبب انتقال بین گونه‌ای گسترده‌ای در این پرندگان شده و این خود عمده‌ترین دلیل انتشار ویروس از منطقه‌ای به نقاط مختلف دنیا می‌گردد. بنابراین با توجه به تعدد گزارش‌های منجر به مرگ در میان پرندگان اهلی و وحشی در اثر ابتلا به سبب تایپ‌های در حال گردش کنونی آنفلوآنزا بویژه H5N1 و اثرات ویران‌کننده اقتصادی آن روی صنایع خصوصاً صنعت طیور و صنایع وابسته و نیز امکان انتقال عفونت به انسان و ایجاد پاندمی بین انسانها، شناسایی بموقع ویروس در کنترل دامنه عفونت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

در همین راستا دو ناحیه، دریاچه سد ارس و تالاب کانی برازان در استان آذربایجان غربی که جزء مناطق پرخطر از نظر ارائه ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان در کشور معرفی شدند، در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. این دو ناحیه بعنوان بخشی از دو کوریدر پروازی سیبری - دریای مدیترانه و آسیای غربی - آفریقای شرقی و stop-over پرندگان مهاجری که از سمت آسیای مرکزی و سیبری به سمت آفریقا پیش می‌روند، شناسایی شده است و هرساله با شروع فصل پاییز گونه‌های مختلفی از پرندگان مهاجر مناطق مورد نظر را برای توقف کوتاه و زمستان‌گذرانی انتخاب می‌کنند. با تجزیه و تحلیل مسیر مهاجرت پرندگان وحشی مشخص گردیده که پرندگان وحشی ناقل ویروس‌های آنفلوآنزا در فصل مهاجرت از طریق این دو کوریدر قابلیت انتقال و گسترش بیماری را در میان طیور اهلی کشورهای مسیر پروازی از جمله ایران، ترکیه، آذربایجان، عراق، کشورهای حاشیه دریای سیاه و مدیترانه را دارند. بنابراین مطالعات پایشی در پرندگان وحشی آبی مهاجر این دو منطقه طی ماه‌های ژانویه و مارس ۲۰۰۸ بوسیله مجموعه‌ای از داده‌ها شامل بررسی‌های ملکولی نمونه‌های جمع‌آوری شده با روش RT-PCR، سرشماری و پایش موارد مرگ و میر پرندگان انجام گرفت.

نتایج حاصل RT-PCR تمام ۷۳ نمونه مدفوعی جمع‌آوری شده از محل تجمع پرندگان وحشی آبی مهاجر منفی بدست آمد. همچنین نتایج حاصله از سرشماری و پایش موارد مرگ و میر طی مدت مطالعه حاکی از عدم کاهش در جمعیت پرندگان وحشی

آبزی مهاجر نسبت به سالهای قبل بود و نیز مورد مشکوکی از مرگ و میر و تلفات در پرندگان وحشی آبزی مهاجر، ماکیان روستاهای اطراف و مرغداری های این دو منطقه تا شعاع ۱۰ کیلومتری مشاهده نگردید. ضمن اینکه هیچ گزارشی در کشورهای همسایه آذربایجان، ترکیه و عراق مبنی بر شیوع بیمار آنفلونزای پرندگان بدست نیامد. بنابراین میتوان به این نتیجه رسید که خطری از جانب پرندگان وحشی آبزی مهاجر از نظر ارائه ویروس های آنفلوانزا، طیور بومی و صنعتی این دو منطقه را طی تهدید نمی کند و اگر بیماری در منطقه حضور داشته باشد، به احتمال زیاد نمی تواند منشأ پرندگان وحشی مهاجر آبزی باشد.

کلید واژگان: ویروسهای آنفلونزای پرندگان، تالاب کانی یرازان، دریاچه سد ارس، RT-PCR

مقدمه

ویروس های آنفلوآنزای پرندگان در سراسر دنیا گسترش داشته و از بسیاری از پرندگان اهلی و وحشی جدا می شوند. ویروس غالباً از پرندگان آبی مهاجر سالم جدا می گردد. این پرندگان اغلب از راسته اردک و غاز سانان وحشی^۱ و همچنین از راسته کارادیفرها^۲ (شامل گونه هایی نظیر مرغ نروزی و چلچله دریایی) بوده که منابع اصلی ذخایر ژنتیکی ویروسهای آنفلوآنزای تیپ A بشمار می آیند. جابجایی و مهاجرت پرندگان وحشی آبی در نقاط مختلف دنیا همواره با خطر جابجایی و انتقال ویروسهای آنفلوآنزای پرندگان همراه بوده و با توجه به گستردگی محدوده جغرافیایی مهاجرتی این پرندگان و همچنین همپوشانی کوریدورهای پروازی در گونه های متفاوت از پرندگان، خطر و پیچیدگی انتشار ویروسهای آنفلوآنزای پرندگان توسط پرندگان وحشی آبی مهاجر دو چندان گردیده است برخی از ساب تایپ های ویروسهای آنفلوآنزای پرندگان مانند H5 و H7 قدرت بیماریزای فوق العاده زیادی داشته و در صورتی که طيور اهلی با یکی از این ساب تایپ ها آلوده شود، منجر به تلفات تا صد در صد می گردد. در حقیقت این نوع ساب تایپ ها عامل طاعون طیور بوده و در ردیف ویروس های آنفلوآنزای با پاتوتایپ HPAI قرار گرفته و مشمول اعلام اجباری به OIE هستند. بنابراین نیاز به مطالعات میدانی نظیر سرشماری، شناسایی گونه های پرندگان حساس به ویروس های آنفلوآنزای، پایش موارد مرگ و میر و همچنین نمونه برداری جهت شناسایی ساب تایپ های در حال گردش کنونی در این پرندگان که مظنونین اصلی گسترش ویروس های آنفلوآنزا محسوب می شود ضروری بنظر می رسد. مطالعات پایشی در پرندگان وحشی مهاجر آبی ضمن اینکه اطلاعات مفیدی از گسترش ویروس های آنفلوآنزای پرندگان در محیط فراهم می کند، این امکان را هم بوجود می آورد که معرف های رفرانس جهت تشخیص سریع ذخیره شده و سویه های واکسنی کاندید شناخته شوند تا در مواقع شیوع آنفلوآنزای پرندگان در انسان و پرندگان بکار روند.

^۱ Anseriformes

^۲ Charadriiformes

فصل اول

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱- تاریخچه

۱-۱-۱- بیماری آنفلوآنزا در دنیا

نخستین بار بقراط در سال ۴۱۲ قبل از میلاد یک اپیدمی منسوب به آنفلوآنزا را در منطقه ای بنام پرنیتوس در شمال یونان که اکنون قسمتی از خاک ترکیه است را ثبت نمود. این اپیدمی جمعیت زیادی شامل تمام گروههای سنی را در بر گرفته بود. گزارشات متعدد دیگری از اپیدمی های منسوب به آنفلوآنزا در مکتوبات قدیمی به ثبت رسیده است، اولین گزارش اپیدمی در اروپا به سال ۱۱۷۰ در انگلیس بوقوع پیوست. طی اپیدمی دیگری به سال ۱۴۸۵ در بریتانیا صدها تن از جمله شهردار لندن و شش عضو شورای شهر جان باختند، در این حادثه ناو سلطنتی بعلت درگیری سربازان با این بیماری نتوانست اسکله را ترک کند. همچنین در سال ۱۵۱۰ در آفریقا یک اپیدمی بروز کرد که به اروپا گسترش یافت. *Petite Pest* و *Jally rout, Gripp Galanterie* نام هایی بودند که به این بیماری داده شد (Adams 2006) به سال ۱۵۸۰ شیوع دیگری از بیماری در آسیای صغیر و بخش های شمالی آفریقا به ثبت رسید. گزارش منابع ایتالیایی دال بر گسترش ویروس از جزیره مالت به جزیره سیسیل در جولای ۱۵۸۰ و متعاقبا نفوذ آن به طرف شمال از طریق این شبه جزیره ایتالیایی تا ماه آگوست بوده است. در آن زمان فیلیپ دوم بر بخش های جنوبی ایتالیا (شبه جزیره ایبری)^۱ و چندین بندر در شمال آفریقا فرمانروایی می کرد. در اوایل ماه جولای بیماری در بخشی از هلند که تحت سلطه اسپانیا بود شیوع یافت که احتمالا علت آن اعزام نیروهایی برای جنگ با هلندیها توسط فیلیپ دوم بود (Laver et al.,

2001; Adams 2006)

حرفه پزشکی در قرن هیجدهم آنقدر مجهز نبود که قادر به بررسی آنفلوآنزا (در هر سطحی) باشد. بعقیده اکثر پزشکان آن دوره بخصوص در شش یا هفت دهه اول قرن، آنفلوآنزا بوسیله عوامل جوی تولید یا گسترش می یافت. در نتیجه اغلب مقاله ها در مورد آنفلوآنزا در اواخر قرن هیجدهم و اوایل قرن نوزدهم بیشتر حاوی جداول مفصل هواشناسی بود تا مدلسازیهای جغرافیایی و آمار میزان مبتلایان و تلفات بیماری. پاندمی آنفلوآنزا حداقل سه بار در قرن هیجدهم اتفاق افتاده است: طی سال های ۱۷۳۰-۱۷۲۹، ۱۷۳۳-۱۷۳۲ و ۱۷۸۲-۱۷۸۱. بعلاوه دو مورد اپیدمی عمده که احتمالا پاندمی در نظر گرفته می شوند، بین سال های ۱۷۶۲-۱۷۶۱

^۱ Iberian Peninsula

و ۱۷۸۸-۱۷۸۹ وجود داشته اند. از میان اینها دو مورد بحث بیشتری را می طلبد، پاندمی های رخ داده طی سال های ۱۷۳۰-۱۷۲۹ و ۱۷۸۲-۱۷۸۱:

پاندمی سال های ۱۷۳۰-۱۷۲۹ اولین پاندمی ثبت شده بود که احتمالاً عصر کشف سرزمین های جدید دربروز آن نقش داشته است. آنفلوانزا تا اکتبر ۱۷۳۲ در آمریکای شمالی بروز نکرده بود که در این زمان بیماری در طول ساحل نیوانگلند^۱ از بوستون^۲ تا مین^۳ جنوبی گسترش یافت. اگر چه آغاز و گسترش بیماری نامعلوم است، ولی به وضوح یک پاندمی و اولین مورد از سری پاندمی های بوده است که به عقیده صاحب نظران اروپایی منشأ آن در روسیه بوده است. در نظر گرفتن روسیه بعنوان منشأ بیماری منطقی به نظر می رسد، اما مدارک مستندی در این مورد وجود ندارد. گزارشات اولیه در آوریل ۱۷۲۹ مبنی بر بروز موارد مهمی از بیماری در دو شهر روسیه که از هم فاصله زیادی داشتند یعنی مسکو و آستارخان در ساحل دریای خزر وجود داشت. در طول تابستان گزارش دیگری موجود نبود تا اینکه آنفلوانزا در ماه سپتامبر در سوئد و در ماه اکتبر در وین شیوع یافت. در جریان ماه نوامبر آنفلوانزا در مجارستان و لهستان شایع بود، سپس تا عمق کشور آلمان نفوذ کرده و لندن، پلیموت یورک، دورهام و بعلاوه در دوولین ایرلند نیز خود را نشان داد. برابر شواهد آماری طی این همه گیری میزان ابتلا گسترده ولی میزان تلفات اغلب پائین بود و اغلب موارد مرگ بیشتر در میان افراد مسن و زنان آبستن بود (Laver et al., 2001; Kilbourne et al., 2006).

رخداد پاندمی سال های ۱۷۸۱-۱۷۸۲ همراه با پاندمی های سالهای ۱۸۹۰-۱۸۸۹ و ۱۹۱۹-۱۹۱۸ در میان گسترده ترین و تأثیر گذارترین موارد شیوع بیماری در تاریخ قرار می گیرد. برخلاف سایر پاندمی های قرن هیجدهم پاندمی سال های ۱۷۸۱-۱۷۸۲ برخی جنبه های جالب داشت که می توان آنها را با موارد اپیدمی در قرن بیستم مقایسه نمود. چند مشخصه عمومی این پاندمی بشرح زیر می باشد:

- آغاز پاندمی در سال ۱۷۸۲ از چین و گسترش به سوی غرب،
- موارد گسترده ای از شیوع بیماری در چین و مناطق تحت اشغال هند توسط انگلستان در جریان پائیز ۱۷۸۱،
- انتشار بیماری به نیمکره شرقی زمین در سال ۱۷۸۱،
- شواهدی دال بر شیوع بیماری در شروع فصل بهار در مناطقی از افریقا و آمریکای شمالی.

^۱ New England

^۲ Boston

^۳ Maine

این پاندمی موجب مرگ دهها میلیون نفر از مبتلایان شد و با سرعتی برابر سریعترین سیستمهای حمل و نقل آن زمان گسترش یافت و آنطور که انتظار می رفت، انگیزه ای برای نگارش تعداد زیادی اسناد پزشکی شد (Adams 2006).

در خلال سالهای ۱۸۲۲-۱۸۲۹ یک اپیدمی در آسیا آغاز گردید و تا اندونزی گسترش یافت. در ادامه طی زمستان ۱۸۳۰ کشور روسیه نیز تحت تاثیر قرار گرفت و از آنجا اپیدمی به طرف غرب گسترش یافت و در نهایت به ایالات متحده رسید. مابین سال های ۱۸۹۸-۱۸۹۹ اپیدمی دیگری به وقوع پیوست. آنالیزهای سرولوژیکی گذشته نگر^۱ بیانگر این است که اپیدمی آنفلوآنزای انسانی سال ۱۸۹۹-۱۸۹۸ که به آنفلوآنزای روسی معروف شد، توسط ویروسی ایجاد گردید که از نظر آنتی ژنی شبیه سویه های آسیایی هم دوره یعنی A(H2N2) بود. این بیماری از آسیای مرکزی شروع و به سمت شمال در روسیه از سمت شرق در چین و از سمت غرب به سوی اروپا گسترش یافت (Kaiser 2004).

پاندمی آنفلوآنزا سال ۱۹۱۸ تحت ساب تایپ H1N1 که بنام آنفلوآنزای اسپانیایی نیز شناخته می شود، سریعتر از هر شکل دیگری از آنفلوآنزا که تا آن زمان رخ داده بود، موجب مرگ انسانها گشت. این پاندمی دو مشخصه قابل توجه داشت:

- تخمین زده می شود که حداقل ۵۰۰ میلیون نفر درگیر شدند که نزدیک ۵۰ میلیون نفر از آنها جان خود را از دست داده باشند.
- اغلب قربانیان در سنین اوج زندگی خود قرار داشتند.

این ساب تایپ خاص آنفلوآنزا بین سالهای ۱۹۱۸-۱۹۱۹ با سه موج پاندمی تمام سطح کره زمین را تحت سیطره خود در آورد. اگر چه هنوز در مورد محل آغاز موج اول بیماری در بهار ۱۹۱۸ تردید وجود دارد اما شواهد موجود از ابتلا و موارد مرگ و میر کم و پراکنده بیماری طی ماه مارس ۱۹۱۸ در ایالات متحده خبر می دهد. با توجه به ابتلا پراکنده و موارد تک و توک مرگ و میر در مراحل اولیه شیوع، این مورد بیماری در آن زمان کمتر مورد توجه واقع شد. تنها بعدها پس از موجهای کشنده دوم و سوم بود که متخصصین آمار متوجه شدند، بخش بزرگ و غیر معمولی از قربانیان آنفلوآنزا و ذات الریه بالغین جوان می باشند. موج دوم طی ماههای مارس و آوریل رخ داد و در طول آمریکای شمالی گسترش یافت و بطور موقت عملیات قرارگاههای ارتش و چند کارخانه را متوقف کرد. در جریان همین موج بود که بیماری در اغلب بخش های باقیمانده از کره زمین شیوع یافت. بنابر مستندات، بیماری در ماه آوریل در اروپا به سطح اپیدمی رسید. بیماری در طول بهار و تابستان کل قاره را درنوردید و تعداد تلفات

^۱ Sero-archeology

مبهورت کننده بود. طی ماه جولای فقط در سوئیس ۵۳ هزار نفر بعلت آنفلوآنزای اسپانیایی از پای درآمدند. در اواخر ماه آگوست شدت عفونت تغییر کرده و ناگهان به ساب تایپ یا ساب تایپ های بسیار خطرناک ظاهر شده تا آن موقع تبدیل شد. بیماری در سه بخش عمده اقیانوس آتلانتیک شمالی تقریباً بطور همزمان رخ داد: فری تاون در سیرالئون جاییکه سربازان و ملاحان بومی افریقای غربی، افریقای جنوبی، انگلیس، افریقای شرقی و استرالیا گردهم آمده بودند - شهر برست فرانسه که بندر اصلی نیروهای متفق بود و بوستون ماساچوست که شلوغترین اسکله و چهارراه اصلی برخورد پرسنل نظامی و غیرنظامی تمام ملل درگیر در جنگ متفقین بود. نقل و انتقالات گسترده سربازان بصورت گروهی و مهاجرت یا کوچ اجباری بخش قابل توجهی از جمعیت انسانی طی جنگ جهانی اول، نقش مهمی را در انتقال بیماری ایفا کردند (Olson et al., 2005; Adams 2006).

در سال ۱۹۲۸ رابرت شوپ^۱ که در قسمت آسیب شناسی مقایسه ای موسسه راکفلر^۲ واقع در پرینستون- نیوجرسی کار می کرد، طی آزمایشاتی نشان داد که آنفلوآنزای خوکی توسط ترشحات موکوسی فیلتر شده منتقل می شود. این اولین شاهد آزمایشگاهی قابل اتکایی بود که نشان داد بیماری توسط ویروس ایجاد می شود (Wright et al., 2001). همچنین برای اولین بار ویروس آنفلوآنزای تیپ A(H1N1) توسط اندرز^۳ و همکاران در سال ۱۹۳۳ در انگلستان از انسان جدا شد. در سال ۱۹۴۱ هیرست^۴ دریافت که ویروس آنفلوآنزا باعث هماگلوآگوتیناسیون گلبولهای قرمز می شود، بدین ترتیب روش جدیدی برای شناسایی ویروس فراهم شد. آنفلوآنزای تیپ C نیز نخستین بار در سال ۱۹۴۷ توسط Taylor شرح داده شد. همچنین به سال ۱۹۵۵ اندرز و همکاران واژه میکسوویروس را برای ویروسهای آنفلوآنزا انتخاب کردند (Adams 2006).

در ماه می ۱۹۵۷ بروز اپیدمی بیماری که تصور می شد آنفلوآنزا است، در هنگ کنگ گزارش شد. پس از چندین ماه تحقیق اپیدمیولوژیستها توافق نمودند که این همان ساب تایپ از ویروس آنفلوآنزاست که قبلاً در اوایل سال ۱۹۵۷ در چین ظاهر شده بود (H2N2). در این میان بیماری از طرف شرق آسیا بطرف خارج قاره در حال گسترش بود. ساب تایپ جدید آنفلوآنزا که ابتدا به آن "آنفلوآنزای آسیایی" اطلاق می شد، بسرعت تا پایان ماه مه ۱۹۵۷ از هنگ کنگ به ژاپن، فیلیپین، مالایا و اندونزی گسترش یافت. تا ماه ژوئن گزارشات بی شماری از بروز آنفلوآنزا در میان مسافران و خدمه کشتی هایی که از بنادر آسیای شرقی خارج شده بودند، موجود بود. در خلال ماه ژوئن بیماری در هند و خاورمیانه نیز گسترش یافت. شهرهای بندری اولین مکانهایی بودند که به

^۱ Robert Shope

^۲ Rockefeller Institute

^۳ Sir Christopher Andrews

^۴ Hirst