

## مدت و فراوانی دفع ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 توسط پرنده آلوده شده: مبتنی بر یک مطالعه تجربی

هادی توکلی<sup>۱\*</sup>، احمد خسروی<sup>۲</sup>، سیده سعیده مصلی نژاد<sup>۳</sup>

### خلاصه

مقدمه: ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 علاوه بر اینکه در بسیاری از مناطق ایران به صورت اندمیک وجود دارد، توانایی انتقال از پرنده به انسان را دارا می‌باشد. در تحقیق حاضر خطر آفرین بودن این تحت تیپ برای انسان با تعیین مدت زمان و میزان دفع ویروس از پرنده آلوده مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش: مطالعه تجربی حاضر بر روی ۱۵ قطعه مرغ عشق چهارماهه نر انجام شد. مایع آلانتوییک حاوی ۱۰<sup>۶</sup>EID50/ml ویروس آنفلوانزای H9N2 از طریق قطره بینی به پرندگان تلقیح و در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ پس از تلقیح، از حلق و مدفوع پرندگان نمونه برداری انجام شد. وجود و تیترا ویروس آنفلوانزا در نمونه‌ها با استفاده از روش TaqMan-Real time-PCR ارزیابی گردید.

یافته‌ها: مطالعه حاضر نشان داد به دنبال چالش پرنده تزئینی، دفع ویروس از ترشحات حلق و مدفوع پرنده می‌تواند یک روز بعد از آلودگی آغاز و تا روز هفتم ادامه داشته باشد. در روزهای ابتدایی، تیترا ویروس در ترشحات حلقی بسیار زیاد بوده و با گذشت زمان کاهش می‌یابد درحالی که در مدفوع پرنده مبتلا در روزهای ابتدایی کم و با گذشت زمان افزایش می‌یابد. حداکثر میزان دفع ویروس در ترشحات حلق و مدفوع پرنده به ترتیب در روزهای ۳ و ۵ بعد از آلودگی دیده می‌شود.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 از ترشحات حلق و مدفوع پرنده دفع و در محیط اطراف منتشر می‌گردد. با توجه به ماهیت زئونوز بودن بیماری آنفلوانزا و همچنین گرایش روزافزون اقشار مختلف جامعه به نگهداری پرندگان، می‌توان بر لزوم آگاهی دادن به مردم در مورد آلودگی این پرندگان به بیماری و خطر آفرین بودن این پرندگان آلوده برای انسان و نیز راهکارهای پیشگیری بیماری تأکید کرد.

کلمات کلیدی: آنفلوانزا، مرغ عشق، زئونوز، H9N2

۱- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران ۲- مرکز تحقیقات لیشمایوز، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۳- دانش آموخته دکترای دامپزشکی

\* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: tavakkoli@Uk.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۴/۲۱ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۶/۸ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۸/۱۳

## مقدمه

آنفلوآنزا یک بیماری ویروسی به شدت مسری می باشد که انسان، پرندگان و بسیاری از حیوانات را مبتلا می نماید (۱-۳). ویروس های آنفلوآنزا در خانواده ارتومیکسویریده قرار می گیرند. بر اساس ویژگی های آنتی ژنتیکی نوکلئوپروتئین و پروتئین ماتریکس، ویروس های آنفلوآنزا به سه جنس یا تایپ A، B و C دسته بندی می شوند (۴). ویروس آنفلوآنزای تایپ A گسترش جهانی داشته و همه ساله موجب بروز اپیدمی های متعددی در سراسر دنیا می شود. در ساختمان ویروس های آنفلوآنزا، امکان تغییرات ژنتیکی زیادی وجود داشته و از سوی دیگر قطعه قطعه بودن ژنوم این ویروس ها، توانایی نو ترکیبی ژنتیکی را به آنها داده است به طوری که این امر می تواند با بروز اپیدمی و پاندمی های متعدد در سراسر جهان همراه گردد. پاندمی های آنفلوآنزا مربوط به سال های ۱۹۵۷ و ۱۹۶۸ که به ترتیب در آسیا و هنگ کنگ اتفاق افتاد، در اثر پدیده نو ترکیبی ژنتیکی بین سویه های انسانی و پرندگان ایجاد شد به طوری که میلیون ها نفر در اثر این بیماری جان خود را از دست دادند (۵-۹).

پایش و مطالعه ویروس های آنفلوآنزای تایپ A در ایران نشان داده است که ویروس تحت تیپ H9N2، در جمعیت های انسانی و طیور ایران در حال چرخش بوده و در بسیاری از مناطق کشور به عنوان یک عامل خطر شناخته شده است (۱۰-۱۳). با توجه به اندمیک بودن این تحت تیپ در ایران، انجام تحقیقات بیشتر پیرامون شناخت بهتر ویژگی های ویروس، انتقال بین گونه ای، مدت زمان تکثیر و دفع در بدن میزبان و همچنین میزان خطراتی که این ویروس می تواند برای انسان داشته باشند ضروری به نظر می رسد.

در تحقیق حاضر مدت زمان خطر آفرین بودن ویروس آنفلوآنزا تحت تیپ H9N2 برای انسان های در تماس با پرنده

تزیینی آلوده، از طریق تعیین مدت زمان دفع ویروس از ترشحات پرنده آلوده مورد ارزیابی قرار گرفت؛ زیرا هر چه مدت زمان دفع ویروس از پرنده آلوده بیشتر باشد، میزان انتشار آن در محیط و میزان خطر آفرین بودن آن برای انسان های در تماس نیز بیشتر می باشد.

## روش بررسی

## نگهداری پرنده

در مطالعه تجربی حاضر از ۱۵ قطعه مرغ عشق چهار ماهه نر سالم با میانگین وزن ۱۳۰-۱۰۰ گرم استفاده شد. شرایط نگهداری برای همه پرندگان یکسان و استاندارد (دمای ۲۳ درجه سانتی گراد، سیکل تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته و رطوبت ۳۰-۴۰ درصد و قفس های مخصوص) در نظر گرفته شد. پرندگان در طول مدت بررسی به آب و غذای مخصوص پرنده و دان پلت حرارت دیده، دسترسی آزاد داشتند. پس از یک هفته عادت به وضعیت جدید، مطالعه بر روی پرندگان صورت گرفت.

## تهیه ویروس

در تحقیق حاضر از تحت تیپ ویروس با مشخصات A/Chicken/Iran/SH-110/99(H9N2) استفاده گردید. این جدایه از موسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد. ابتدا ویروس در مایع آلانتوییک تخم مرغ جنین دار ۱۰ روزه کشت داده شد و پس از برداشت، EID50 ویروس با استفاده از روش رید و مانژ تعیین گردید (۱۴).

## چالش ویروس

ویروس آنفلوآنزا از طریق قطره بینی به پرندگان تلقیح گردید. جهت تلقیح به پرندگان مورد آزمایش مقدار ۰/۲ سی سی مایع آلانتوییک حاوی EID50/ml ۱۰۶ ویروس استفاده گردید.

## طراحی آزمایش

برای اطمینان از عدم آلودگی پرندگان به ویروس آنفلوانزا، قبل از تلقیح ویروس، از حلق و مدفوع پرندگان نمونه برداری گردید و به کمک روش Real time-PCR (Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction) حضور ویروس مورد ارزیابی قرار گرفت. در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ پس از تلقیح، از حلق و مدفوع پرندگان نمونه برداری انجام شد و نمونه‌ها با استفاده از روش Real time-PCR و پروب TaqMan برای تعیین حضور ویروس آنفلوانزا و همچنین اندازه گیری تیترو ویروس، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

## استخراج RNA

از نمونه‌های اخذ شده، RNA ویروس با استفاده از کیت تجاری QIAamp®Viral RNA kit ساخت شرکت کیاژن آلمان، استخراج گردید. بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت ابتدا به نمونه‌ها ۲۰۰ میکرولیتر آب DEPC افزوده و پس از هموژن شدن، مخلوط حاصل در دور ۱۴۰ به مدت ۱۵۰۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۱۴۰ میکرولیتر از مخلوط آماده شده برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت به RNA استخراج شده ۶۰ میکرولیتر بافر نهایی، RNase inhibitor و DNase افزوده و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

## ستز cDNA

از روی RNAهای استخراج شده، رشته مکمل (cDNA) با استفاده از کیت تجاری AccuPowder®RT PreMix kit ساخت شرکت بایونیر کره جنوبی و با استفاده از دستور شرکت سازنده، تهیه گردید. پرایمرهای مورد استفاده برای ساخت رشته مکمل با استفاده از یک توالی محافظت شده

ژنوم پروتئین ماتریکس ویروس آنفلوانزا طراحی شده بودند (۱۵).

## ارزیابی حضور ویروس آنفلوانزا در نمونه‌ها

حضور ویروس آنفلوانزا در نمونه‌های اخذ شده با استفاده از روش Real time-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی پرایمرها و پروب استفاده شده (پروب TaqMan) در جدول ۱ آورده شده است (۱۵). به کمک این پرایمرها از روی یک توالی ۱۰۴ نوکلئوتیدی از ژنوم M1 ویروس آنفلوانزا رونوشت برداری انجام گردید. برای انجام آزمون Real time-PCR، ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش حاوی ۵ میکرولیتر cDNA، ۱۰ پیکومول پرایمر، ۰/۶ پیکومول پروب TaqMan، ۲/۵ میکرولیتر dUTP، ۲ میکرولیتر بافر، ۲/۴ میکرولیتر  $MgCl_2$ ، ۵۰ میلی مولار Uracil-N-Glycosylase و یک واحد آنزیم تک پلیمراز تهیه گردید. مخلوط واکنش در دستگاه BIO-RAD MiniOpticon™ System و با برنامه ۴۰ سیکل دو مرحله‌ای (۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه) قرار داده شد.

## تهیه نمونه پلاسمید استاندارد

ابتدا RNA ویروس آنفلوانزا از ۱۰۰ میکرولیتر مایع آلتوتوییک تخم مرغ جنین دار ۹ روزه با استفاده از کیت تجاری QIAamp®Viral RNA kit ساخت شرکت کیاژن آلمان استخراج و cDNA به کمک کیت AccuPowder®RT PreMix ساخته شد. با استفاده از روش PCR یک توالی ۴۵۰ نوکلئوتیدی از ژنوم M1 ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 تهیه و پس از جداسازی محصول PCR در ژل آگاروز ۱٪، قطعه جدا شده در پلاسمید pTZ57R/T با استفاده از کیت Fermentas InsTAClone™ PCR cloning kit کلون گردید. پلاسمید تهیه شده در باکتری اشرشیا کولای XL1-blue

تکثیر و پس از استخراج پلاسمید، غلظت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. توالی پرایمرهای

مورد استفاده در این مرحله در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرها و پروب مورد استفاده برای آزمون Real time PCR و تهیه پلاسمید استاندارد

نام	توالی
ساخت cDNA	5'TCT AAC CGA GGT CGA AAC GTA 3'
Real time PCR پرایمر مستقیم	5'AAG ACC AAT CCT GTC ACC TCT GA 3'
Real time PCR پرایمر معکوس	5'CAA AGC GTC TAC GCT GCA GTC C 3'
Real time PCR پروب	5 FAM TTT GTG TTC ACG CTC ACC GT TAMRA 3'
پرایمر مستقیم برای تهیه پلاسمید استاندارد	5' GGG AAG AAC ACA GAT CTT GAG G 3'
پرایمر معکوس برای تهیه پلاسمید استاندارد	5 TGC TGG CTA GCA CCA TTC TG 3'

FAM, 6-carboxy fluorescein; TAMRA, 6-carboxy tetramethylrhodamine.

#### ارزیابی تیترو ویروس آنفلوآنزا در نمونه‌ها

تیترو ویروس آنفلوآنزا در نمونه‌های اخذ شده با استفاده از روش Real time-PCR و مقایسه تیترو ویروس با تیترو نمونه استاندارد (پلاسمید حاوی توالی کلون شده از ویروس آنفلوآنزا) مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت تیترو ویروس به صورت تعداد کپی ویروس در ۱ میکروگرم از RNA کل تعیین گردید.

#### نتایج

به دنبال تزریق داخل بینی ویروس آنفلوآنزای H9N2، پرندگان روزانه به مدت هفت روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج ارزیابی به شرح زیر می‌باشد:

#### نتایج ارزیابی حضور ویروس آنفلوآنزا در نمونه‌ها

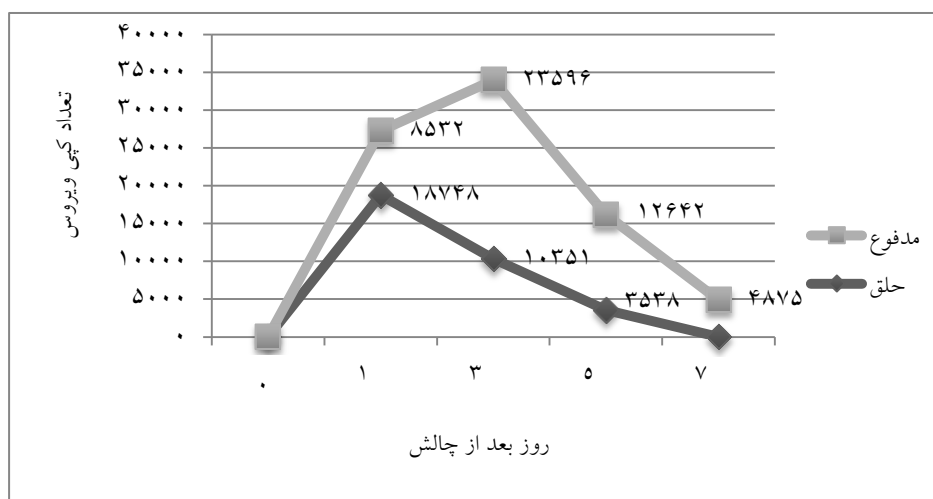
نتایج ارزیابی حضور ویروس آنفلوآنزای H9N2 در نمونه‌های گرفته شده از حلق و مدفوع پرندگان در جدول ۲ آورده شده است. قبل از تلقیح ویروس (روز ۰) در هیچ کدام از نمونه‌های گرفته شده، ویروس آنفلوآنزای H9N2

مشاهده نگردید. همان گونه که در جدول مشاهده می‌گردد، ویروس آنفلوآنزا در روزهای مختلف بعد از چالش، از نمونه‌های حلق و مدفوع پرندگان جدا گردید. در نمونه‌های گرفته شده از حلق پرندگان در روز ۱ بعد از چالش ۷۵٪ پرندگان، در روز ۳ بعد از چالش ۶۷٪ پرندگان و در روز ۵ بعد از چالش ۲۵٪ پرندگان از نظر وجود ویروس مثبت بودند ولی در روز ۷ بعد از چالش در هیچ کدام از پرندگان، نمونه مثبت ویروس تشخیص داده نشد. در نمونه‌های گرفته شده از مدفوع پرندگان در روز ۱ بعد از چالش ۴۲٪ پرندگان، در روز ۳ ۷۵٪ پرندگان و در روز ۵، ۴۲٪ پرندگان حضور ویروس را در ترشحات حلق نشان دادند. علاوه بر این ویروس آنفلوآنزا تا روز ۷، در مدفوع ۱۷٪ پرندگان ردیابی گردید.

#### نتایج ارزیابی تیترو ویروس آنفلوآنزا در نمونه‌ها

نتایج ارزیابی تیترو ویروس آنفلوآنزای H9N2 در نمونه‌های گرفته شده از حلق و مدفوع پرندگان در نمودار ۱ آورده شده است. تعداد کپی ویروس در نمونه‌های حلق

پرنندگان در روز ۱ بعد از چالش ۱۸۷۴۷، در روز ۳، ۱۰۳۵۱، در روز ۵، ۳۵۳۸ و روز ۷، تعیین گردید. در نمونه‌های اخذ شده از مدفوع پرنندگان، تعداد کپی ویروس در روز ۱ بعد از چالش ۸۵۳۲، در روز ۳، ۲۳۵۹۶، در روز ۵، ۱۲۶۴۲ و در روز ۷ بعد از چالش ۴۸۷۵ کپی محاسبه گردید (جدول ۲).



نمودار ۱. متوسط فراوانی ویروس آنفلوانزا در نمونه‌های گرفته شده از حلق و مدفوع پرنندگان چالش شده در روزهای مختلف بعد از چالش ویروس

جدول ۲. حضور ویروس آنفلوانزا در نمونه‌های گرفته شده از حلق و مدفوع پرنندگان چالش شده در روزهای مختلف بعد از چالش ویروس

نمونه	روزهای بعد از چالش ویروس				
	۰*	۱	۳	۵	۷
حلق	۱۲/۰	۱۲/۹	۱۲/۸	۱۲/۳	۱۲/۰
مدفوع	۱۲/۰	۱۲/۵	۱۲/۹	۱۲/۵	۱۲/۲

\* قبل از تلقیح ویروس، اعداد نشان دهنده تعداد نمونه‌های مثبت دارای ویروس/کل نمونه‌ها می‌باشند

## بحث

لازم را انجام داد. ویروس مورد استفاده در تحقیق حاضر ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 می‌باشد که در حال حاضر به‌عنوان یک ویروس اندمیک در ایران شناخته شده است.

مطالعه تحت تیپ‌های مختلف ویروس‌های آنفلوانزا در جامعه بسیار اهمیت دارد زیرا از این طریق می‌توان خصوصیات ویروس‌های در حال گردش را شناسایی کرده و به‌منظور جلوگیری از اثرات سوء اقتصادی و اجتماعی اقدامات

با وجود سرمایه گذاری‌های عظیم تحقیقاتی و روش‌های کنترل متعدد علیه ویروس آنفلوآنزا، هنوز بیماری ناشی از این ویروس کنترل نشده و هر چند سال یک بار نوع جدیدی از ویروس آنفلوآنزا به سرعت گسترش می‌یابد به نحوی که قبل از هر گونه اقدامی، موجب همه‌گیری جهانی می‌شود و زندگی میلیون‌ها نفر را به خطر می‌اندازد. به منظور دستیابی به راهکارهای مؤثر در مورد کنترل بیماری آنفلوآنزای اندمیک در یک منطقه و جلوگیری از انتقال ویروس از پرنده به انسان‌های در تماس، اولین گام اطلاع از مدت زمان دفع ویروس از پرنده آلوده به محیط در روزهای مختلف پس از آلودگی و آگاهی دادن به مردم جامعه در این مورد می‌باشد؛ زیرا هر چه مدت زمان دفع ویروس از پرنده آلوده بیشتر باشد، میزان انتشار آن در محیط و میزان خطر آفرین بودن آن برای انسان‌های در تماس نیز بیشتر می‌گردد. در تحقیق حاضر مشخص گردید، به دنبال آلوده شدن پرنده تزئینی مرغ عشق، دفع ویروس آنفلوآنزا از ترشحات حلقی می‌تواند یک روز بعد از آلودگی آغاز و تا روز ۵ بعد از آلودگی ادامه داشته باشد. از طرف دیگر ردیابی ویروس آنفلوآنزای بومی ایران با تحت تیپ H9N2 در ترشحات حلقی پرنده آلوده نشان دهنده تمایل این ویروس به دستگاه تنفسی فوقانی می‌باشد که با توجه به ماهیت زئونوز بودن این تحت تیپ، لزوم اقدامات پیشگیرانه به منظور کاهش ابتلای انسان‌ها به آن پیش از پیش آشکار می‌گردد.

در تحقیق حاضر ردیابی ویروس آنفلوآنزای H9N2 در نمونه‌های مدفوع مرغ عشق‌های چالش شده نشان داد ویروس به مدت طولانی تری می‌تواند از طریق مدفوع پرنده آلوده، در مقایسه با ترشحات حلق، به محیط اطراف وارد گردد به طوری که تا ۷ روز بعد از چالش پرنده با ویروس آنفلوآنزا، این ویروس در مدفوع پرنده ردیابی گردید. با توجه به موارد ذکر شده فوق می‌توان نتیجه‌گیری نمود که مدفوع پرندگان تزئینی آلوده به ویروس آنفلوآنزای H9N2

اولین گزارش شیوع ویروس آنفلوآنزا H9N2 در پرندگان ایران مربوط به سال ۱۹۹۸ می‌باشد. درصد مرگ و میر بالا و کاهش شدید تولید تخم مرغ از عوارض اقتصادی است که به این ویروس نسبت داده می‌شود. مطالعه مولکولار اپیدمیولوژیک در رابطه با مسیر تکاملی و منشأ ویروس‌های آنفلوآنزای H9N2 که طی سال‌های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۶ در ایران در گردش بودند نشان می‌دهد که بیشتر این ویروس‌ها در زیر گروه ویروس آنفلوآنزای کره‌ای دسته‌بندی می‌گردد و تغییرات زیادی نیز در برخی از ژن‌های این ویروس ایجاد شده است (۱۹-۱۶).

فلاح و همکاران شیوع سری بالای آنفلوآنزای H9N2 را در طیور بومی روستایی در ایران گزارش کردند (۱۱). حقیقت و همکاران نشان دادند این تحت تیپ می‌تواند باعث ایجاد تلفات و خسارات اقتصادی سنگین در جمعیت طیور صنعتی ایران گردد (۲۰). آلودگی گونه‌های دیگر پرندگان نیز با این تحت تیپ گزارش شده است (۲۳-۲۱، ۱۳). بررسی‌های سرولوژیک جمعیت‌های انسانی در مناطق مختلف ایران نیز حاکی از وجود تیتیر سری مثبت در برابر آنفلوآنزای H9N2 می‌باشد (۲۷-۲۴).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوآنزا می‌تواند به پرندگان تزئینی که توسط انسان در خانه نگهداری می‌شوند منتقل و علاوه بر تکثیر در بدن پرنده، از ترشحات حلق و مدفوع آن‌ها دفع شده و در محیط اطراف پراکنده گردد. گزارش‌ها و تحقیقات مختلف حاکی از انتقال تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوآنزا به انسان می‌باشد (۲۸-۳۲). از طرف دیگر به دنبال جداسازی این تحت تیپ برای اولین بار از جوامع انسانی هنگ کنگ، توجه جوامع مختلف علمی به این نکته معطوف گردیده که این تحت تیپ می‌تواند به‌عنوان یک کاندید جهت ایجاد پاندمی‌های آینده نیز مطرح باشد (۳۴، ۳۳، ۲۸).

### نتیجه گیری

چالش پرنده تزئینی مرغ عشق با ویروس آنفلوانزای اندمیک ایران نشان داد این ویروس می‌تواند به مدت ۵ تا ۷ روز از ترشحات حلقی و مدفوع پرنده آلوده دفع گردد به طوری که حداکثر میزان تیترو ویروس در ترشحات دفعی پرنده، در روزهای ۳ و ۵ بعد از آلودگی دیده می‌شود. با توجه به ماهیت زئونوز بودن بیماری آنفلوانزا و همچنین گرایش روزافزون اقشار مختلف جامعه به نگهداری پرندگان تزئینی، می‌توان بر لزوم آگاهی دادن به مردم در مورد این بیماری، راه‌های انتشار ویروس، مدت زمان دفع و خطر آفرینی ویروس برای انسان و همچنین راهکارهای کنترل و پیشگیری بیماری تأکید کرد.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر وافر خود را از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی به دلیل در اختیار قرار دادن ویروس آنفلوانزای تحت تیپ اعلام می‌دارند.

می‌تواند باعث انتشار طولانی مدت تر ویروس در محیط گردد و میزان خطر آفرین بودن آن برای انسان‌های تماس در مقایسه با ترشحات حلقی بیشتر می‌باشد.

ارزیابی میزان دفع ویروس از مرغ عشق‌ها در زمان‌های مختلف بعد از چالش نشان داد که در روزهای ابتدایی آلوده شدن پرنده، تیترو ویروس در ترشحات حلقی آن بسیار زیاد بوده ولی با گذشت زمان تیترو ویروس در این ترشحات کاهش و مدفوع پرنده مبتلا حاوی حداکثر تیترو ویروسی می‌باشد. با مقایسه تیترو ویروس در روزهای مختلف بعد از چالش مشخص گردید که حداکثر میزان دفع ویروس در ترشحات حلق و مدفوع پرنده آلوده به ترتیب در روزهای ۳ و ۵ بعد از آلودگی دیده می‌شود. بنابراین با توجه به مطلب ذکر شده می‌توان نتیجه گیری نمود که حداکثر میزان خطر آفرین بودن پرنده تزئینی مبتلا به آنفلوانزا برای انسان، روزهای ۳ و ۵ بعد از آلودگی می‌باشد زیرا هر چه تیترو ویروس در یک محیط بیشتر باشد به همان نسبت شانس ابتلای میزبان به آن نیز بیشتر می‌گردد.

### References

1. Liu J, Xiao H, Wu Y, Liu D, Qi X, Shi Y, et al. H7N9: a low pathogenic avian influenza A virus infecting humans. *Curr Opin Virol* 2014; 5(3): 91-7.
2. Fusaro A, Monne I, Salviato A, Valastro V, Schivo A, Amarini NM, et al. Phylogeography and evolutionary history of reassortant H9N2 viruses with potential human health implications. *J Virol* 2011; 85(16): 8413-21.
3. Butt AM, Siddique S, Idrees M, Tong Y. Avian influenza A (H9N2): computational molecular analysis and phylogenetic characterization of viral surface proteins isolated between 1997 and 2009 from the human population. *Virol J* 2010; 7(1): 319.
4. Xiong X, Martin SR, Haire LF, Wharton SA, Daniels RS, Bennett MS, et al. Receptor binding by an H7N9 influenza virus from humans. *Nature* 2013; 499(7459): 496-9.
5. Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases* 2012; 12(1): 36-44.
6. Brien S, Kwong JC, Buckeridge DL. The determinants of 2009 pandemic A/H1N1

- influenza vaccination: a systematic review. *Vaccine* 2012; 30(7): 1255-64.
7. Rasmussen SA, Kissin DM, Yeung LF, Mac Farlane K, Chu SY, Turcios-Ruis RM, et al. Preparing for influenza after 2009 H1N1: special considerations for pregnant women and newborns. *Am j Obstetr Gynecol* 2011; 204(6): S13-S20.
  8. Moghadaszadeh M, Golchin M, Tavakkoli H, Ghambarpour R. Cloning, expression and purification of M2e-HA2 from Influenza A virus in Escherichia coli. *Online Journal of Veterinary Research* 2015; 19(2): 124-9.
  9. Price GE, Lo C-Y, Mispion JA, Epstein SL. Mucosal immunization with a candidate universal influenza vaccine reduces virus transmission in a mouse model. *J Virol* 2014; 88(11): 6019-30.
  10. Tavakkoli H, Asasi K, Mohammadi A. Effectiveness of two H9N2 low pathogenic avian influenza conventional inactivated oil emulsion vaccine on H9N2 viral replication and shedding in broiler chickens *Iranian Journal of Veterinary Research* 2011; 12(3): 214-21.
  11. Fallah Mehrabadi MH, Bahonar MR, Zeynolabedini Tehrani F, Mardani M, Sadrzadeh A, Ghafouri SA, et al. Seroepidemiology of Avian Influenza (H9N2) in Rural Domestic Poultry of Iran: A Cross-Sectional Study. *Iranian Journal of Epidemiology* 2015; 10(4): 1-9.
  12. Tavakkoli H. Replication of H9N2 avian influenza virus in lungs and kidneys after inoculation in broilers. *Online Journal of Veterinary Research* 2012; 16(6): 321-6.
  13. Tavakkol H, Kheirandish R. Assessment of the shedding pattern of a chicken origin H9N2 avian influenza subtype in ostrich (*Struthio camelus*) using TaqMan real time PCR. *Online Journal of Veterinary Research* 2012; 16(4): 266-73.
  14. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Higiene* 1938; 27(3): 493-7.
  15. Ward C, Dempsey MH, Ring CJ, Kempson RE, Zhang L, Gor D, et al. Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *J Clin Virol* 2004; 29(3): 179-88.
  16. Ebrahimi M, Grigorian S, Shoushtari A, Abedini F, Moeini H. Sequence analysis and phylogenetic profiling of the nonstructural (NS) genes of H9N2 influenza A viruses isolated in Iran during 1998-2007. *Archives of Razi Institute* 2014; 69(2): 127-35.
  17. Bashashati M, Vasfi Marandi M, Sabouri F. Genetic diversity of early (1998) and recent (2010) avian influenza H9N2 virus strains isolated from poultry in Iran. *Arch Virol* 2013; 158(10): 2089-100.
  18. Kianizadeh M, Pourbakhsh S.A, Toroghi R, Momayez R. Pathogenicity and haemagglutinin gene sequence analysis of Iranian avian influenza H9N2 viruses isolated during (1998–2001). *Iranian Journal of Veterinary Research* 2006; 7(3): 37-41.
  19. Soltanialvar M, Shoushtari H, Bozorgmehrifard M, Charkhkar S,



- Akbarnejad F. Sequence and phylogenetic analysis of neuraminidase genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from commercial broiler chicken in Iran (2008 and 2009). *Trop Anim Health Prod* 2012; 44(3): 419-25.
20. Haghghat-Jahromi M, Asasi K, Nili H, Dadras H, Shoostari AH. Coinfection of avian influenza virus (H9N2 subtype) with infectious bronchitis live vaccine. *Arch Virol* 2008; 153(4): 651-5.
21. Tavakkoli H, Salehi M. Low pathogenic avian influenza in zebra finch (*Taeniopygia guttata*): clinical signs, replication and excretion time. *Human & Veterinary Medicine* 2015; 7(3): 221-4.
22. Tavakkoli H, Mosallanejad S, Noori S. Heterologous H9N2 avian influenza viral shedding pattern in *Alectoris chukar*. *Online Journal of Veterinary Research* 2013; 17(10): 566-70.
23. Ebrahimi SM, Ziapour S, Tebianian M, Dabaghian M, Mohammadi M. Study of infection with an Iranian field-isolated H9N2 avian influenza virus in vaccinated and unvaccinated Japanese quail. *Avian Dis* 2011; 55(2): 195-200.
24. Hadipour MH. H9N2 avian influenza virus antibody titers in human population in fars province, Iran. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2010; 12(3): 160-4.
25. Hadipour MM. Seroprevalence of H9N2 avian influenza virus in human population in Boushehr Province, Iran. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 2011; 6(2): 196-200.
26. Alizadeh E, Kheiri MT, Bashar R, Tabatabaeian M, Hosseini SM. Avian Influenza (H9N2) among poultry workers in Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 2009; 1(3): 3-6.
27. Anvar E, Hosseini SM, Tavasoti Kheiri M, Mazaheri V, Fazaei K, Shabani M, et al. Serological survey of avian influenza (H9N2) among different occupational groups in Tehran and Qazvin provinces in IR Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2013; 6(4):
28. Wang Q, Ju L, Liu P, Zhou J, Lu X, Li L, et al. Serological and virological surveillance of avian influenza A virus H9N2 subtype in humans and poultry in Shanghai, China, between 2008 and 2010. *Zoonoses and public health* 2015; 62(2): 131-40.
29. Edge R, Heath J, Rowlingson B, Keegan T, Isba R. Seasonal influenza in medical students: an outbreak simulation model based on a social network approach. *The Lancet* 2014; 384(S29): 29-30.
30. Gomaa MR, et al. Avian influenza A (H5N1) and A (H9N2) seroprevalence and risk factors for infection among Egyptians: a prospective, controlled seroepidemiological study. *Journal of Infectious Diseases* 2014; 211(9): 1399-407.
31. Huang Y, Li X, Zhang H, Chen B, Giang Y, Yang L, et al. Human infection with an avian influenza A (H9N2) virus in the middle region of China. *Journal of Medical Virology* 2015; 87(10): 132-9.
32. Khan SU, Anderson BD, Heil GL, Liang S, Gray GC. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Seroprevalence of Influenza A (H9N2) Virus Infection

- Among Humans. *J Infect Dis* 2015; 212(4): 109-15.
33. Trombetta C, Piccirella S, Perini D, Kistner O, Montomoli E. Emerging Influenza Strains in the Last Two Decades: A Threat of a New Pandemic? *Vaccines* 2015; 3(1): 172-85.
34. Heithoff DM, Mahan MJ. Pandemic influenza virus: Tracking a Three-Headed Monster. *Virulence* 2015; 4(2): 112-119.

## Duration and Frequency of Shedding of Influenza Virus H9N2 Subtype by Infected Birds based on an Experimental Study

Hadi Tavakkoli, Ph.D. <sup>1\*</sup>, Ahmad Khosravi D.V.M., MPH., <sup>2</sup>, Seyedeh Saideh Mosallanejad D.V.M. <sup>3</sup>

1. Assistant Professor of Avian Medicine, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
2. MPH, Leishmaniosis Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Graduate Student of Veterinary Medicine

\* Corresponding author; e-mail: tavakkoli@Uk.ac.ir

(Received: 12 July 2015 Accepted: 4 Nov. 2015)

### Abstract

**Background & Aims:** The H9N2 avian influenza subtype is endemic in many parts of Iran and has the ability to transmit from bird to human. In the present study, the risk of this subtype for humans was assessed by determination of the viral titer and shedding time in bird.

**Method:** The experiment was done on fifteen male budgerigars at 4 months of age. The birds were inoculated intranasally with allantoic fluid containing  $10^6$  EID<sub>50</sub>/ml of H9N2 virus. At days 1, 3, 5 and 7 post inoculation, viral presence and titer in the pharynx and cloacal were determined using TaqMan-real time-PCR.

**Results:** The study showed that following infection of companion birds, viral shedding from pharyngeal and cloacal secretions can start one day after infection continued up to 7 days. In the early days, the viral titer in pharyngeal secretions is very high and reduces over time, while in the dropping of affected bird, it is low in the early days and increases, over time. Maximum viral shedding in the pharyngeal and fecal exertion was seen on days 3 and 5, respectively.

**Conclusion:** The results of the present study showed that the H9N2 subtype sheds from pharyngeal and cloacal secretions and releases in the environment. Due to the zoonotic nature of the influenza disease and the increasing tendency of people to keep birds, informing the public about the disease, duration of shedding, risk for human and strategies of disease prevention is necessary.

**Keywords:** Influenza, Budgerigar, Zoonoses, H9N2