نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هفدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۰،
پیاپی ۴۳ : ۷۰-۵۹

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

شناسایی مولکولی ویروس آنفلوانزا در پرندگان آبزی باغ پرندگان تهران و یک پرنده فروشی با استفاده ژن ماتریکس و نوکلئوپروتئین در تابستان سال ۱۴۰۰

سروش گرامی تبار[۱]، هادی پورتقی[۲*]

۱- دانشجوی دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۲- استادیار میکروبیولوژی دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۳۱

چکیده

بیماری آنفلوآنزای پرندگان یک بیماری واگیردار ویروسی با اهمیت اقتصادی و بهداشت عمومی است که پرندگان، انسان و سایر پستانداران را درگیر می‌کند. ویروس آنفلوآنزا از خانواده ارتومیکسوویریده می‌باشد و بر پایه تفاوت پادگنی نوکلئوپروتئین (NP) و پروتئین ماتریکس (M) به سه زیرگروه A و B و C طبقه‌بندی می‌گردد. زیرگروه A مسبب ایجاد بیماری در پرندگان است. پرندگان وحشی آبزی مانند اردک‌ها، غازها، قوها و پرندگان ساحلی به عنوان مخازن اصلی ویروس‌های آنفلوانزا مطرح هستند. ویروس‌های آنفلوانزا از طریق ترشحات تنفسی و مدفوع دفع می‌گردد. هدف از انجام این مطالعه شناسایی ویروس آنفلوانزای پرندگان در پرندگان آبزی مراکز عرضه و باغ‌های پرندگان شهر تهران بود. به منظور شناسایی ویروس، تعداد ۱۴۲ سواب استریل مدفوع تازه، کلواک و دهانی-حلقی از ۱۰ گونه پرنده شامل پکینی، پلیکان پا خاکستری، فلامینگوی بزرگ، قو فریادکش، قو صامت، قو سیاه، اردک تاجدار، غاز سرنواری، غاز کانادایی و آنقوت بین ماه‌های تیر تا شهریور سال ۱۴۰۰ جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها در ۵۰ لوله به صورت ۲ تایی و ۳ تایی ترکیب شدند. نمونه‌های هر لوله مربوط به یک پرنده یا یک گونه بود. تمامی نمونه‌ها پس از جمع‌آوری بلافاصله در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد و جهت شناسایی با استفاده از ژن ماتریکس و نوکلئوپروتئین و روش RT-PCR مورد آزمایش قرار گرفت. در مقایسه با کنترل مثبت و کنترل منفی، نتیجه تمامی نمونه‌ها منفی بود. بنابراین در زمان انجام این تحقیق، خطر جدی از جانب پرندگان آبزی موجود در باغ پرندگان و پرنده‌فروشی مورد بررسی از نظر امکان انتقال ویروس‌های آنفلوانزا به طیور بومی و صنعتی و همچنین خریداران و بازدیدکنندگان وجود نداشته است. البته این موضوع می‌تواند تحت تاثیر زمان مطالعه باشد و این امر می‌تواند با دفع بسیار اندک ویروس آنفلوانزا در تابستان مرتبط باشد. همچنین عدم شناسایی موارد مثبت می‌تواند تحت تاثیر انجام واکسیناسیون ضد ویروس آنفلوانزا در پرندگان آبزی ساکن در باغ پرندگان باشد. در این صورت انجام واکسیناسیون می‌تواند تاثیر مثبتی در کاهش دفع ویروس آنفلوانزا و افزایش بهداشت عمومی داشته باشد.

کلمات کلیدی: ویروس آنفلوانزا پرندگان، شناسایی مولکولی، پرندگان آبزی وحشی.

*نویسنده مسئول: هادی پورتقی

آدرس: گروه میکروبیولوژی دامپزشکی ، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

پست الکترونیک: hadi.pourtaghi1@gmail.com

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان، یک بیماری عمده عفونی ویروسی است که گونه‌های پرندگان و همچنین انسان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این بیماری توسط چندین زیرگروه ویروس آنفلوانزای نوع A ایجاد می‌شود و در سراسر جهان در حال گردش است (۳۵). ویروس‌های آنفلوانزای A، متعلق به خانواده ارتومیکسوویریده (Orthomyxoviridae) می‌باشند (۲۸) و به ۱۸ زیرگروه هماگلوتینین (HA) و ۱۱ زیرگروه نورآمینیداز (NA) طبقه بندی می‌شوند که ۱۶ زیرگروه HA (H1 -H16) و ۹ زیرگروه NA (N1 -N9) در گونه‌های پرندگان در گردش هستند (۲۴). H17N10 وH18N11 در خفاش‌های آمریکای جنوبی با استفاده از روش‌های مولکولی تشخیص داده شدند (۳۸). بر اساس توانایی ایجاد بیماری در جوجه‌ها، ویروس آنفلوانزای پرندگان (AIV) به دو زیرگروه، با قابلیت ایجاد بیماری‌زایی کم (کم‌حدت) (LPAI) و بیماری‌زایی بالا (فوق‌حاد) (HPAI) تقسیم می‌شوند. ویروس‌های (LPAI) می‌توانند هر نوع هماگلوتینینی داشته باشند، اما تا به امروز همه ویروس‌های (HPAI) دارای H5 یا H7 بوده‌اند (۲۹). پرندگان آبزی، به ویژه راسته‌های غازسانان (Anseriformes) و آبچلیک‌سانان (Charadriiformes)، مخازن طبیعی ویروس آنفلوانزای پرندگان هستند (۴۱، ۳۱، ۱۵) و همچنین، مسئول معرفی و ورود آنفلوانزای پرندگان به گله طیور می‌باشند (۳۶). طبق مطالعه اخیر در بنگلادش، مشخص شد پرندگان وحشی از راسته غازسانان مخزن اصلی H5N1 هستند (۱۶). همچنین، نقش مهم اردک‌های وحشی (Mallard)، در اپیدمیولوژی ویروس آنفلوانزا در ایران، نشان داده شده است (۱۱، ۱۰). این ویروس‌ها در سلول‌های اپیتلیال دستگاه تنفسی و روده‌ای پرندگان تکثیر می‌شوند و با غلظت بالایی در مدفوع دفع می‌شوند (۲۹). اروفارنکس و کلوآک ممکن است حاوی غلظت بالایی از ویروس باشند (۴۰، ۳۴). مدفوع ناشی از پرندگان آلوده نیز حاوی ویروس می‌باشد که می‌تواند عفونت را برای مدت طولانی در محیط حفظ کند (۴۰، ۳۰، ۵). این ویروس‌ها می‌تواند مستقیماً بین پرندگان یا با بلعیدن آب آلوده منتقل شود (۳۹، ۳۴، ۲۵). اکثر ویروس‌های آنفلوانزای A در پرندگان وحشی، برای طیور اهلی بیماری‌زایی کمی دارند؛ با این حال، پرندگان وحشی آلوده، تهدید جدی برای طیور خشکی‌زی و صنعت طیور محسوب می‌شوند و در صورت تماس با آن‌ها، ممکن است با مواد دفعی آلوده به ویروس خود، عفونت را به طیور منتقل کنند (۱۰). ویروس آنفلوانزای پرندگان با بیماری‌زایی کم (LPAI)، به طور گسترده‌ای در پرندگان وحشی، به خصوص در پرندگان آبی از راسته غازسانان (شامل اردک ، غاز و قو) و راسته Charadriiformes (به ویژه مرغ نوروزی و چلچله دریایی) شناسایی شده‌اند (۳۲). این پرندگان، در انتشار ویروس‌های فوق‌حاد هم می‌توانند نقش داشته باشند. در سال ۲۰۰۵، ویروس‌های (HPAI) زیرگروه H5N1در آسیا، اروپا، خاورمیانه و آفریقا، از جمله آفریقای جنوبی شناسایی شدند (۴۲، ۳۳). اخیراً، سه زیرگونه دیگر H5 از نوع (HPAI) ظاهر شده است: H5N8 در سال ۲۰۱۴/۱۵، H5N8 در ۲۰۱۶/۱۷ و H5N6 در ۲۰۱۷/۱۸ (۲۴). این ویروس‌های (HPAI) به احتمال زیاد توسط پرندگان مهاجر وحشی پراکنده شده‌اند که در طول مهاجرت بهاری و پاییزی خود، مسافت‌های طولانی را طی می‌کنند (۱۹).

پرنده فروشی‌ها و مراکز عرضه پرندگان زنده، منبع متداول تأمین طیور و معیشت در بسیاری از کشورهای در حال توسعه از جمله ایران هستند. آنفلوانزای فوق

حاد پرندگان (HPAI)، در مراکز عرضه پرندگان زنده بسیاری از کشورها از جمله مصر، نیجریه، چین، کره جنوبی، هنگ کنگ، ویتنام و بنگلادش تشخیص داده شده است (۲۳، ۶، ۲، ۱). نشان داده شده است که گسترش و انتشار چندین بیماری از جمله لارنگوتراکئیت، بیماری نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان، به شدت با این مراکز ارتباط دارد (۳۶). در ایران، این مراکز و پرنده فروشی‌ها، معمولاً فاقد فضای متناسب با تعداد پرندگان، نظافت، ضد عفونی و امنیت زیستی مناسب هستند که منجر به تراکم زیاد پرندگان و محیط ایده آل برای انتشار و انتقال بیماری‌های طیور به پرندگان و انسان می‌شود؛ در نتیجه، احتمال انتقال بیماری بین پرندگان وحشی و اهلی، به دلیل تراکم بالای پرندگان اهلی (به ویژه غاز و اردک) و محدودیت‌های ایمنی زیستی بسیار زیاد است (۲۰، ۹). علاوه بر پرنده فروشی‌ها و سایر مراکز عرضه پرندگان، چندین باغ پرنده و باغ وحش در ایران وجود دارند که در آن‌ها، انواع پرندگان برای نمایش عمومی نگهداری می‌شوند. باغ‌های پرندگان، مکان‌های ایده‌آل برای اختلاط ژنتیکی و انتشار ویروس آنفلوانزا هستند. زیرا میزبان‌های متعددی را (در تماس نزدیک و تراکم زیاد) گرد هم می‌آورند؛ بنابراین مسبب بازآرایی ژنتیکی ویروس و انتقال بین گونه‌ها هستند (۲۱)؛ درنتیجه ممکن است مکان‌های بالقوه‌ای برای معرفی و گسترش آنفلوانزای پرندگان در ایران باشند. حتی خطر انتقال ویروس آنفلوانزای پرندگان توسط راه‌های مختلف، از پرندگان به بازدیدکنندگان وجود دارد. در اکثر مکان‌ها، قفس پرندگان در نزدیکی بازدیدکنندگان قرار گرفته است که امکان انتقال از پرندگان به انسان را فراهم می‌کند. علاوه بر این، ضایعات مرتبط با قفس‌ها، در زمین‌های پست اطراف انباشته می‌شوند که یک خطر زیستی بالقوه محسوب می‌شود (۱۷)؛ به طوری که قبلاً شیوع H5N1 (HPAI) در پرندگان وحشی و اسیر (گوشتخواران) در کامبوج به دلیل مصرف طیور آلوده به ویروس به عنوان خوراک گزارش شده است (۸). علاوه بر این، شیوع H5N1 از نوع (HPAI) در پرندگان اسیر در مرکز نجات حیات وحش (Phnom Tamao)، در کامبوج رخ داد (۸). بنابراین مراکز عرضه و باغ‌های پرندگان، به عنوان حلقه‌ای مفقوده در اپیدمیولوژی ویروس آنفلوانزای پرندگان فرض می‌شوند و نظارت بر آن‌ها برای کنترل این بیماری، بسیار اهمیت دارد.

هدف از انجام این مطالعه، شناسایی ویروس آنفلوانزای پرندگان در پرندگان آبزی مراکز عرضه و باغ‌های پرندگان شهر تهران با استفاده از ژن ماتریکس و ژن نوکلئوپروتئین و روش مولکولی RT-PCR می‌باشد. نتایج این گونه تحقیقات برای پایش، مدیریت خطر و حفاظت از طیور و حفظ سلامت عمومی انسان بسیار مهم است.

مواد و روش کار

تعداد و نحوه جمع‌آوری نمونه‌ها: تعداد ۱۴۲ نمونه سواب در ۵۰ لوله در بین ماه‌های تیر تا شهریور ۱۴۰۰ از یک پرنده فروشی در شهر تهران و باغ پرندگان تهران از گونه‌های مختلف پرندگان آبزی جمع‌آوری شد. جمع‌آوری نمونه‌ها به صورت سواب سه تایی از مدفوع تازه دفع شده (در هر لوله از سه پرنده آبزی مختلف ولی از یک گونه خاص) و سواب کلواک و دهانی-حلقی به صورت دوتایی (در هر لوله از یک پرنده) انجام شد. به این صورت که در هشت لوله، سواب کلواک و دهانی-حلقی به صورت دوتایی با هم ترکیب شدند (تعداد ۱۶ نمونه از ۸ پرنده آبزی) و در بقیه لوله‌ها (۴۲ لوله) تعداد سه عدد سواب مدفوع تازه با

یکدیگر مخلوط شدند (تعداد ۱۲۶ نمونه از ۱۲۶ پرنده آبزی). نمونه‌هایی که در یک لوله قرار می‌گرفت همه از یک گونه پرنده خاص بود و نمونه سواب‌ها از گونه‌های متفاوت در یک لوله قرار داده نشد. در پرنده فروشی ۳۴ نمونه و در باغ پرندگان تهران ۱۰۸ نمونه گرفته‌شد. تمامی نمونه‌های گرفته شده از باغ پرندگان به صورت مدفوع تازه بودند و نمونه‌های کلواک و دهانی-حلقی که تعدادش پیشتر ذکر شد همگی از پرنده فروشی اخذ شدند. قبل از شروع نمونه‌گیری، برای جلوگیری از خشکی و کاهش تیتر ویروس، در هر لوله، به میزان ۱/۵ میلی‌لیتر PBS ریخته شد. اطلاعات نمونه‌ها در هنگام نمونه‌گیری از جمله شماره لوله، گونه و نوع پرنده، نوع نمونه تهیه شده با سواب، مکان نمونه‌گیری، زمان نمونه‌گیری، داشتن یا نداشتن علامت بالینی خاص در هنگام نمونه‌گیری، جنسیت پرنده و نوع محل نگه‌داری، در پرسشنامه ثبت و درج شد.

نوع و تعداد نمونه جمع‌آوری شده از هر گونه: اردک پکینی ۱۶ نمونه دهانی-حلقی و کلواک و ۱۸ نمونه مدفوع تازه که از پرنده فروشی گرفته شد. بقیه نمونه‌هایی که در ادامه ذکر می‌شوند به صورت مدفوع تازه از باغ پرندگان تهران جمع‌آوری شدند: پلیکان پا خاکستری ۹ عدد، قو فریادکش ۱۵ عدد، فلامینگو بزرگ ۱۲ عدد، قو گنگ ۱۲ عدد، قو سیاه ۲۱ عدد، اردک تاجدار ۹ عدد، آنقوت ۹ عدد، غاز کانادایی ۱۲ عدد و غاز سرنواری ۹ عدد.

استخراج ژنوم ویروس: پس از انتقال نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه، در زیر هود لامینار فلو، سواب آغشته به نمونه از لوله خارج و لوله مذکور سانتریفیوژ شد تا ذرات درشت، رسوب کنند. مایع رویی جمع آوری شد. سپس در مورد تمام نمونه‌های جمع آوری شده استخراج ژنوم در همان روز جمع‌آوری نمونه‌گیری انجام شد. برای این منظور در ابتدا طبق دستورالعمل کیت برای جلوگیری از ذوب و انجماد مکرر، ابتدا پروتئیناز K و RNA حامل آماده‌سازی و در لوله‌های متعدد تقسیم شد. سپس با استفاده از کیت (Dynabio Viral Nucleic Acid DNA/RNA Extraction Mini Kit) با شماره کاتالوگ Cat No:K10025 مربوط به شرکت تکاپوزیست ژنوم ویروس‌های احتمالی موجود در نمونه‌ها استخراج شد.

ساخت cDNA با استفاده از ژنوم استخراج شده: پس از استخراج ژنوم ویروس، اقدام به ساخت DNA از روی RNA احتمالی با استفاده از کیت ساخت cDNA (cDNA Synthesis Kit) با شماره کاتالوگ (Cat NO:YT4500) مربوط به شرکت یکتا تجهیز آزما گردید. لازم به ذکر است که ساخت cDNA در روز بعد از زمان نمونه‌گیری انجام گرفت و برای این منظور cDNA های ساخته شده تا زمان انجام PCR در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. برای ساخت cDNA ابتدا (DEPC water)، (Random Hexamer Primer) و ژنوم استخراج شده به ترتیب با مقادیر ۱۰، ۱ و ۲/۴ میکرولیتر با یکدیگر مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس (first-strand Buffer 5x)، (dNTP 10Mm)، (M-MLV) و (RNase Inhibitor) به ترتیب با مقادیر ۴، ۱، ۱ و ۰/۵ میکرولیتر اضافه شدند و در مرحله نهایی، پس از مخلوط کردن این مواد با هم تیوب‌ها در داخل دستگاه ترمال سایکلر به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

انجام PCR: در این مطالعه از پرایمرهای درج‌شده در مقاله وو و همکاران در سال ۲۰۰۸ جهت شناسایی ژن ماتریکس و از پرایمرهای درج شده در مقاله لی و

همکاران در سال ۲۰۰۱ جهت شناسایی ژن نوکلئوپروتئین استفاده شد. جدول ۱ حاوی اطلاعات مربوط به پرایمرها می‌باشد:

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص ویروس آنفلوانزا نوع A

ژن	توالی پرایمر ('۳-'۵)[a]	برنامه RT- PCR	اندازه محصول (bp)	منبع
M	F: AGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTAT R: GGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCAT	۱	۱۳۰	۴۳
NP	F: CAGRTACTGGGCYATAAGRAC R: GCATTGTCTCCGAAGAAATAAG	۲	۳۳۰	۱۸

a: R = A/G and Y= A/T/C

ساخت مسترمیکس: مقدار ۲۰ میکرولیتر حجم نهایی مسترمیکس برای هر کدام از ژن‌ها در نظر گرفته شد که ترکیب اجزای مختلف آن به این ترتیب بود: ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10x، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۲ میکرولیتر پرایمر با غلظت 25µmol/µl، ۲ میکرولیتر cDNA، ۰/۲ میکرولیتر (Taq DNA Polymerase) و ۱۲/۸ میکرولیتر آب مقطر استریل. جهت انجام ست‌آپ قبل از شروع آزمایش، برای (DNA template) یا همان cDNA مقادیر ۲ و ۵ میکرولیتر انتخاب شده بود که پس از انجام آزمایش و مشاهده محصول نهایی مقدار ۲ میکرولیتر برای آن در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که در این مطالعه برای کنترل مثبت، از ژنوم استخراج شده و مورد تایید در مطالعات قبلی و برای کنترل منفی از نمونه آب استریل استفاده شد.

مراحل دمایی PCR: برای شناسایی قطعه مربوط به ژن ماتریکس (M) برنامه دمایی به این صورت به کار رفت: واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و سپس ۴۰ تکرار از پرخه دمایی که در آن واسرشت در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و چسبیدن پرایمرها در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش قطعه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در انتها گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

برای شناسایی قطعه مربوط به ژن نوکلئوپروتئین (NP) برنامه دمایی به این صورت به کار رفت: واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ تکرار از پرخه دمایی که در آن واسرشت در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و چسبیدن پرایمرها در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه و گسترش قطعه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. در انتها گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

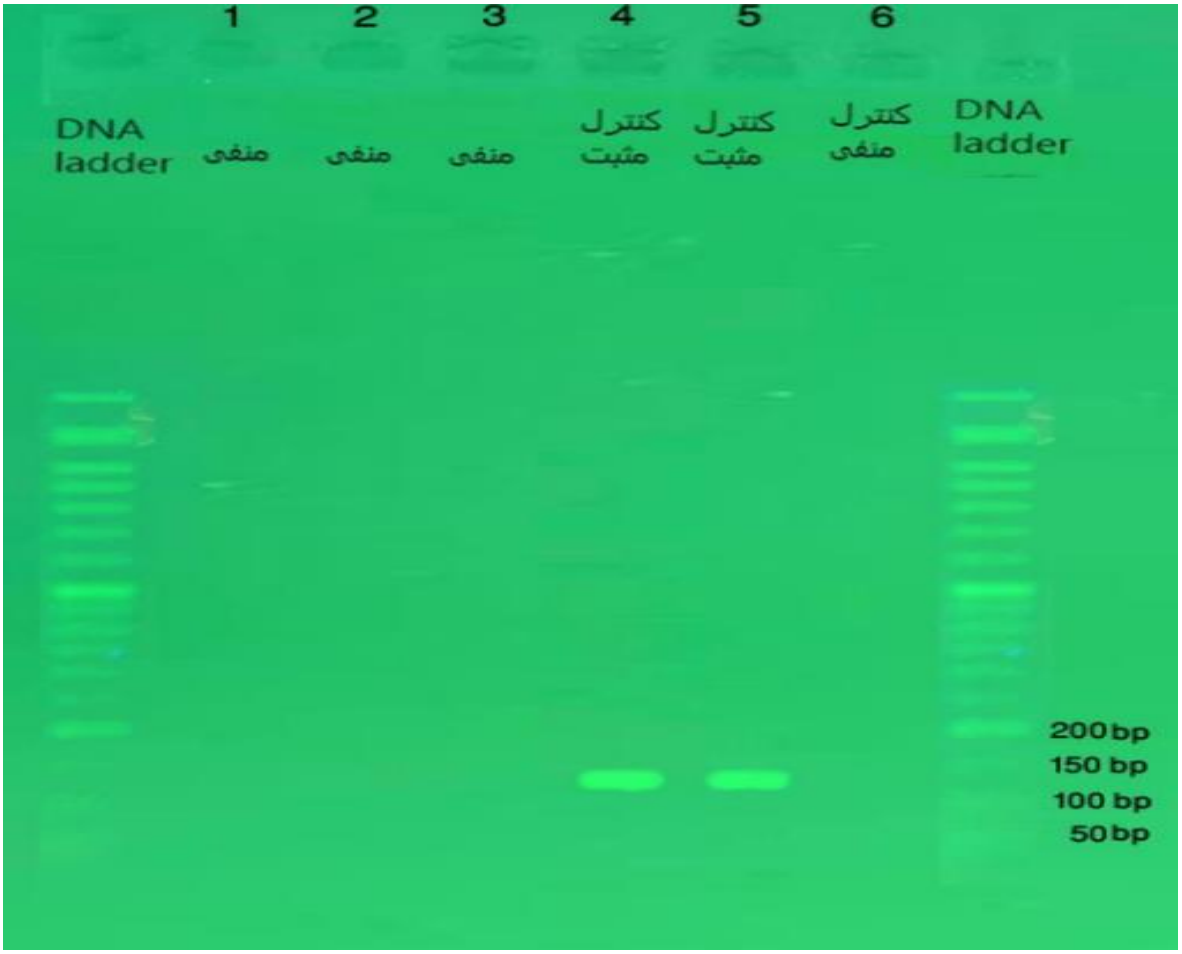
برای بهینه سازی دما مربوط به ژن ماتریکس سه دمای ۵۶، ۵۸ و ۶۰ درجه و برای ژن نوکلئوپروتئین سه دمای ۵۳، ۵۵ و ۵۷ درجه برای مرحله چسبیدن پرایمرها در نظر گرفته شد که پس از انجام آزمایش و مشاهده محصول نهایی، به ترتیب دمای ۶۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ژن ماتریکس و نوکلئوپروتئین انتخاب شد.

الکتروفورز: به منظور مشاهده محصول نهایی، ژل یک درصد برای الکتروفورز ساخته شد. در چاهک اول و آخر ۵ میکرولیتر (DNA ladder 50 bp) و در بقیه چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه پس از اینکه با ۲ میکرولیتر (loading buffer) مخلوط شدند ریخته شد. در نهایت ژل زیر نور UV در دستگاه ترنس ایلومیناتور مشاهده شد. در این مطالعه، هدف، مشاهده قطعاتی به

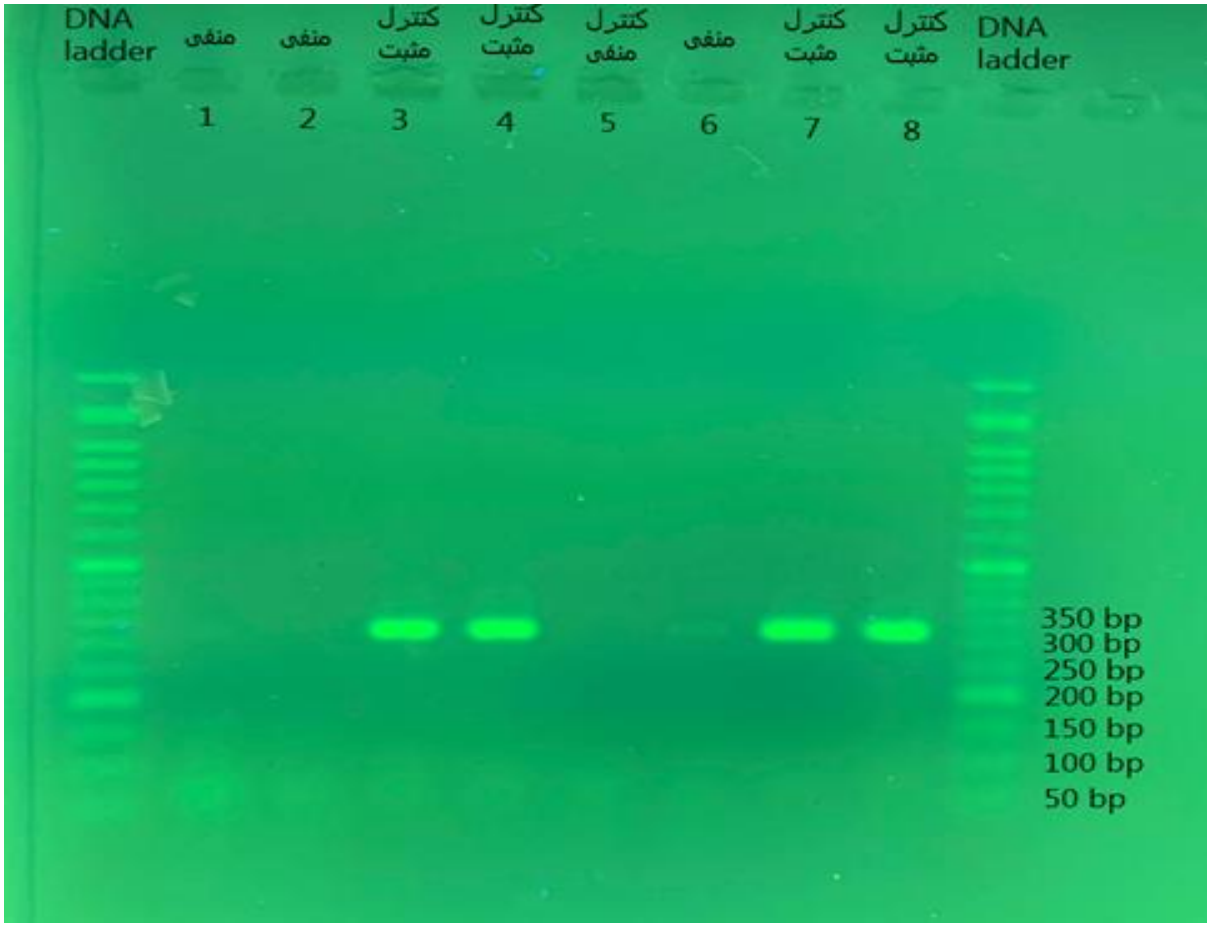
اندازه ۱۳۰ و ۳۳۰ جفت باز به ترتیب برای ژن‌های ماتریکس و نوکلئوپروتئین بود.

نتایج

پس از انجام الکتروفورز و بررسی محصول نهایی، مشاهده شد که تمامی نمونه‌های مورد بررسی محصولی مرتبط با تکثیر بخشی از ژن ماتریکس و نوکلئوپروتئین را در RT-PCR تولید نکردند. بنابراین تمامی نمونه‌ها از نظر حضور هر گونه ویروس آنفلوانزای پرندگان، چه آنفلوانزای فوق حاد پرندگان (HPAI) و چه ویروس آنفلوانزای پرندگان با بیماری‌زایی کم (LPAI)، منفی بودند. این در حالی بود که در انجام RT-PCR با کنترل مثبت حاصل از مطالعات قبلی، هر دو نوع ژن ماتریکس و نوکلئوپروتئین در هنگام الکتروفورز دارای باند اختصاصی به ترتیب ۱۳۰ جفت باز و ۳۳۰ جف باز مربوط به خود بودند (تصویر ۱ و ۲).



تصویر ۱: ژل آگارز ۱ درصد مربوط به RT-PCR در نمونه‌های مربوط به پرندگان آبزی وحشی جهت بررسی حضور ویروس آنفلوانزا با استفاده از ژن ماتریکس (M). حفره‌های ۱، ۲، و ۳ موارد منفی و حفره‌های ٤ و ٥ دو نمونه کنترل مثبت با محصولی به اندازه ۱۳۰ جفت باز و حفره ٦ کنترل منفی. M: مارکر ۵۰ جفت باز



تصویر ۲: ژل آگارز ۱ درصد مربوط به RT-PCR در نمونه‌های مربوط به پرندگان آبزی وحشی جهت بررسی حضور ویروس آنفلوانزا با استفاده از ژن نوکلئوپروتئین (NP). حفره‌های ۱، ۲ و ٦ موارد منفی و حفره‌های ۳، ٤، ۷ و ۸ چهار نمونه کنترل مثبت با محصولی به اندازه ۳۳۰ جفت باز و حفره ۵ کنترل منفی. M: مارکر ۵۰ جفت باز.

بحث

هدف از انجام این تحقیق، تشخیص ویروس آنفلوانزای پرندگان در پرندگان آبزی مراکز عرضه و باغ‌های پرندگان شهر تهران با استفاده از ژن ماتریکس و نوکلئوپروتئین و روش مولکولی RT-PCR بوده است. نقش مهم پرندگان آبزی به عنوان مخزنی برای ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان، در تحقیقات انجام شده در بسیاری از مناطق جهان به خوبی شناخته شده است. نظارت بر آنفلوانزای پرندگان در پرندگان وحشی و آبزی در زیستگاه‌های طبیعی و مناطقی که خطر انتقال بین طیور اهلی و پرندگان وحشی در آن نقاط وجود دارد، دانش اپیدمیولوژی، اکولوژی و روابط ژنتیکی عفونت‌های ویروسی مرتبط با آنفلوانزای پرندگان را افزایش می‌دهد. این دانش، ارزیابی خطر مربوط به جمعیت طیور و پرندگان وحشی و آبزی را تسهیل می‌کند و اطلاعاتی در مورد ویروس آنفلوانزای پرندگان در حال گردش در اختیار قرار می‌دهد که ممکن است برای سلامت انسان نیز مهم باشد. با این حال، اطلاعات کمی در مورد گردش ویروس‌های آنفلوانزا در پرندگان آبزی در غرب و آسیای مرکزی و خاورمیانه از جمله ایران در دسترس است (۲۲، ۱۴، ۷، ۳).

فریدونی و همکاران در سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۷ بر روی ۱۱۴۶ پرنده آبزی از ۱۸ مکان واقع در ۶ استان ایران از جمله تهران تحقیقی انجام دادند. ۶۶ درصد از نمونه‌ها

را در نیمه دوم بهمن و اسفند جمع‌آوری کردند و ۸۸ درصد از نمونه‌های مثبت در این مدت زمان یافت شدند که اهمیت بازه زمانی و فصل را جهت نمونه‌برداری برای تشخیص ویروس آنفلوانزای پرندگان خاطر نشان می‌سازد (۱۱). اهمیت مطالعه پرندگان آبزی موجود در پارک‌های پرندگان تهران توسط پژوهشی که در آذر و آبان سال ۲۰۰۹ به وسیله جمع‌آوری ۱۰۰ سواب مدفوع از گونه‌های مختلف از جمله اردک و غاز و قو در پارک‌های پرندگان تهران مشخص شد. در این مطالعه ۱۴ درصد از نمونه‌ها که مربوط به اردک و گنجشک بود مثبت بودند (۲۰). در مطالعه‌ای در کشورهای تایلند و بنگلادش برروی باغ‌وحش‌ها، پارک‌های تفریحی و پارک‌های شهری که مکان‌های مهم گردشگری هستند انجام شد، مشخص شد انواع پرندگان اسیر و وحشی در قفس‌های باغ‌وحش‌ها نگه‌داری می‌شوند که می‌توانند در انتقال ویروس آنفلوانزا به دیگر پرندگان و جامعه انسانی نقش داشته باشند. همچنین مدفوع پرندگان که پس از تمیزکردن قفس‌ها در دشت‌های مجاور پارک‌ها و باغ‌های پرندگان دفع می‌شود، می‌تواند یک خطر بسیار مهم برای محیط زیست و بحث بهداشت عمومی از نظر انتقال ویروس آنفلوانزا باشد (۲۶). در تحقیقی تعداد ۸۷۸۷ پرنده وحشی متعلق به ۱۲۳ گونه در شمال اروپا با استفاده از RT-PCR برای ویروس آنفلوانزای پرندگان با جمع‌آوری سواب‌های کلواک و نمونه مدفوع بررسی شدند که ۲/۶ درصد از اردک و ۱/۴ درصد از غاز و ۱ درصد از همه نمونه‌ها مثبت یافت شد که نشان می‌دهد معمولاً درصد یافته‌های مثبت در بین پرندگان آبزی و وحشی بسیار پایین است و به همین دلیل برای شناسایی این ویروس در بین این پرندگان، تعداد بالایی نمونه باید مورد بررسی قرار گیرد (۱۰).

واکسیناسیون نیز در پیشگیری و کنترل بیماری آنفلوانزا، به خصوص در پارک‌های پرندگان، بسیار اهمیت دارد (۱۲، ۴). تمامی پرندگان آبزی موجود در باغ پرندگان تهران که ۱۰۸ نمونه منفی از آن‌ها به دست آمد، قبلا همگی با واکسن کشته H9N2 مربوط به موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی نسبت به ویروس آنفلوانزای پرندگان، واکسینه شده بودند. درنتیجه با توجه به نتایج منفی مربوط به تحقیق حاضر در شناسایی آلودگی به ویروس آنفلوانزای پرندگان، استراتژی واکسیناسیون برای کنترل این ویروس در پارک‌های پرخطر در ایران توصیه می‌شود.

نتیجه گیری نهایی

به دلیل اینکه همه نتایج حاصل از نمونه‌برداری منفی شد، می‌توان به این نتیجه رسید که در زمان انجام این تحقیق، خطر جدی از جانب پرندگان آبزی موجود در باغ پرندگان و پرنده‌فروشی مورد بررسی از نظر امکان انتقال ویروس‌های آنفلوانزا به طیور بومی و صنعتی و همچنین خریداران و بازدیدکنندگان وجود نداشته اما این بدان معنا نیست که پایش مداوم این ویروس نباید صورت بگیرد. به خصوص گسترش عفونت به ایران توسط پرندگان وحشی و آبزی در هنگام مهاجرت امکان پذیر است که مستلزم نظارت و مراقبت پیوسته بر طیور و پرندگان وحشی و آبزی است. همچنین، آزمایش مداوم این پرندگان به عنوان میزبان طبیعی و مخزن اصلی انتقال این ویروس به طیور اهلی مورد نیاز است تا اطمینان حاصل شود که ویروس‌های آنفلوانزای H5 یا H7 به جمعیت انسانی یا مرغداری‌های تجاری منتقل نمی‌شود. این نظارت مستمر، درک ما را از نقش واقعی پارک‌ها و باغ‌های پرندگان و پرنده‌فروشی‌ها در اکولوژی ویروس‌های آنفلوانزا بهبود می‌بخشد و هرگونه تغییر در شیوع ساب‌تایپ‌ها را فراهم می‌کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر هاشمی‌پور زواره به خاطر همکاری ایشان در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله ابراز می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع

1. Abdelwhab, E.M., Selim, A.A., Arafa, A., Galal, S., Kilany, W.H., Hassan, M.K., Hafez, H.M. (2010). Circulation of avian influenza H5N1 in live bird markets in Egypt. *Avian Diseases*, **54:** 911-914.
2. Aiki-Raji, C.O., Adebiyi, A.I., Agbajelola, V.I., Adetunji, S.A., Lameed, Q., Adesina, M., Adekanye, G., Omidokun, F., Fagbohun, O., Oluwayelu, D. (2015). Surveillance for low pathogenic avian influenza viruses in live-bird markets in Oyo and Ogun States, Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **5:** 369-373.
3. Alexander D., J. (2003). Report on Avian Influenza in the Eastern Hemisphere during 1997-2002. *Avian Diseases*, **47:** 792-797.
4. Bertelsen, M., F., Klausen, J., Holm, E., Grondahl, C., Jorgensen, P.H. (2007). Serological response to vaccination against avian influenza in zoo-birds using an inactivated H5N9 vaccine. *Vaccine*, **25:** 4345-9.
5. Brown J.D., Goekjian, G., Poulson R., Valeika, S., Stallknecht, D.E. (2009). Avian influenza virus in water: infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. *Veterinary Microbiology*, **136:** 20–26.
6. Bui, C.M., Gardner, L., MacIntyre, R., Sarkar, S. (2017). Influenza A H5N1 and H7N9 in China: A spatial risk analysis. *PLoS ONE*, **12:**e0174980.
7. De Marco, M., A., Fonic, E., Campitelli, L., Raffini, E., Di Trani, L., Delogu, M., Guberti, V., Barigazzi, G., Donatelli, I. (2003). Circulation of Influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993-1999 period: evidence of virus shedding and seroconservation in wild ducks. *Avian Diseases*, **47:** 861-866.
8. Desvaux, S., Marx, N., Ong, S., Gaidet, N., Hunt, M., Manuguerra, J.C., Sorn, S., Peiris, M., Van der Werf, S., Reynes, J.M. (2009). Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) outbreak in captive wild birds and cats, Cambodia. *Emerging Infectious Diseases*, **15:** 475-478.
9. Dhama, K., Mahendran, M., Tomar, S. (2008). Pathogens Transmitted by Migratory Birds: Threat Perceptions to Poultry Health and Production. *International Journal of Poultry Science*, **7:** 516-525.
10. Fereidouni, S.R., Bozorgmehrifard, M.H., Starick, E., Werner, O., Amini, H., Modirrousta, H., Aghakhan, M. (2005). Serological monitoring of avian influenza in migratory birds of Iran. *Archives of Razi Institute*, **60**, 11-20.
11. Fereidouni, S.R., Werner, O., Starick, E., Beer, M., Harder, T., Aghakhan, M., Mettenleiter, T.C. (2010). Avian influenza virus monitoring in wintering waterbirds in Iran, 2003-2007. *Journal of Virology*, **7:**1-14.
12. Fouchier, R.A.M., Olsen, B., Bestebroer, T.M., Herfst S., Kemp, van der L, Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D.M.E. (2003), Influenza A Virus Surveillance in Wild Birds in Northern Europe in 1999 and 2000. *Avian Diseases*, **47**, 857-860.
13. Furger, M., Hoop, R., Steinmetz, H., Eulenberger, U., Hatt, J.M. (2008). Humoral immune response to avian influenza vaccination over a six-month period in different species of captive wild birds. *Avian Diseases*, **52:**222-228.

Fransson, T.,… Fouchier, R., A., M. (2007). Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathogens*, **3:**e61.

23. Negovetich, N.J., Feeroz, M.M., Jones-Engel, L., Walker, D., Alam, S.M.R., Hasan, K.,… Webster, R.G. (2011). Live bird markets of Bangladesh: H9N2 viruses and the near absence of highly pathogenic H5N1 influenza. *PLoS ONE*, **6:** e19311.
24. Poen, M.J., Fouchier, R.A.M., Webby, R.J., Webster, R.G., El Zowalaty, M.E. (2019). Evidence of the Presence of Low Pathogenic Avian Influenza A Viruses in Wild Waterfowl in 2018 in South Africa, *Pathogens*, **8:** 163.
25. Roche, B., Lebarbenchon, C., Gauthier-Clerc, M., Chang, C.M., Thomas, F., Renaud, F., Van der Werf, S., Guegan, J.F. (2009). Water-borne transmission drives avian influenza dynamics in wild birds: the case of the 2005–2006 epidemics in the Camargue area. Infection, Genetics and Evolution: *Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, **9:** 800-805.
26. Sangkachai, N., Thongdee, M., Chaiwattanarungruengpaisan, S., Buddhirongawatr, R., Chamsai, T., Poltep, K., Wiriyarat, W., Paungpin, W. (2019). Serological evidence of influenza virus infection in captive wild felids, Thailand. *Journal of Veterinary Medical Science*, **81:**1341-1347.
27. Sarwar, M., Khushi, M.Z., Rabbani, M., Younus, M., Sarwar, N., Ali, M.A., Ahad, A. (2013). Prevalence of Avian Influenza Viruses in Live Bird Markets of Lahore. *Journal of Animal and Plant Sciences*, **23:** 388-392.
28. Shaw, M., Palese, P., Orthomyxoviruses. In Fields Virology; Knipe, D.M., Howley, P.M., 4th Eds. (2013). Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia: 356-370.
14. Gaidet, N., Dodman, T., Caron, A., Balança, G., Desvaux, S., Goutard, F., Cattoli, G., Lamarque, F., Hagemeijer, W., Monicat, F. (2007). Avian influenza viruses in water birds, Africa. *Emerging Infectious Diseases*, **13:** 626-629.
15. Gaidet, N., Caron, A., Cappelle, J., Cumming, G.S., Balanca, G., Hammoumi, S., Dodman, T. (2012). Understanding the ecological drivers of avian influenza virus infection in wildfowl: a continentalscale study across Africa. Proceedings of the Royal Society B: *Biological Sciences*, **279:** 1131-1141.
16. Hassan, M.M., Hoque, M.A., Debnath, N.C., Yamage, M., Klaassen, M. (2017). Are poultry or wild birds the main reservoirs for avian influenza in Bangladesh?. *EcoHealth*, **14:** 490-500.
17. Hassan, M.M., Islam, A. (2020), Serological Evidence of Avian Influenza in Captive Wild Birds in a Zoo and Two Safari Parks in Bangladesh. *Veterinary Sciences*, **7:**122.
18. Lee, M.S., Chang, P.C., Shien, J.H., Cheng, M.C., Shieh, H.K. (2001). Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, **97:**13-22.
19. Lycett, S.J., Bodewes, R., Pohlmann, A., Banks, J., Bányai, K., Boni, M.F.,… Kuiken, T. (2016). Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8. *Science*, **354:**213–217.
20. Majidzadeh-A, K., Ghalyanchi-Langeroudi, A., Soleimani, M., Karimi, V., Morovati, A. (2012). Molecular Surveillance of Avian Influenza in Bird Parks of Tehran, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, **6:**165-169.
21. Majidzadeh-A, K., Soleimanidor, M., Morovvati, A., Karimi, V., Ghalyanchi-Langeroudi, A. (2012). Molecular Surveillance of Avian Influenza in Live Bird Market of Qom City in Iran. *Iranian Journal of Virology*, **6:** 33-34.
22. Munster, V.J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenström, J., Wallensten, A.,

influenza A virus from bats. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **109:** 4269-4274

38. Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M.,… Donis, R.O. (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathogens*, **9**, e1003657.
39. VanDalen, K.K., Franklin, A.B., Mooers, N.L., Sullivan, H.J., Shriner, S.A. (2010). Shedding light on avian influenza H4N6 infection in mallards: modes of transmission and implications for surveillance. *PLoS One*, **5:**e12851.
40. Webster, R.G., Yahkno, M., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Murti, K.G. (1978). Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology*, **84:** 268–278.
41. Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, **56:** 152-179.
42. World Health Organization (WHO). Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/*(*H5N1*)* Reported to WHO, 2003–2019; World Health Organization: Geneva, Switzerland. Available online: https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2019_04_09_tableH5N1.pdf?ua=1 (accessed on 28 May 2019).
43. Wu, C., Cheng, X., He, J., Lv, X., Wang, J., Deng, R., Long, Q., Wang, X. (2008). A multiplex real-time RT-PCR for detection and identification of influenza virus types A and B and subtypes H5 and N1. *Journal of Virological Methods*, **148:** 81-88.
29. Spickler, A.R., Trampel, D.W., Roth, J.A. (2008). The onset of virus shedding and clinical signs in chickens infected with high pathogenicity and low-pathogenicity avian influenza viruses. *Avian Pathology*, **37:** 555-577.
30. Stallknecht, D.E., Shane S.M., Kearney, M.T., Zwank, P.J. (1990). Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Diseases*, **34:** 406-411.
31. Stallknecht, D.E. (2007). Impediments to wildlife disease surveillance, research, and diagnostics. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **315:** 445-461.
32. Stallknecht, D.E., Brown, J.D. (2008). Ecology of Avian Influenza in Wild Birds. In Avian Influenza; Blackwell Publishing, Ames, Iowa Swayne, D.E., 43-58.
33. Sonnberg, S., Webby, R.J., Webster, R.G. (2013). Natural history of highly pathogenic avian influenza H5N1. *Virus Research*, **178:** 63–77.
34. Sturm-Ramirez, K., Hulse-Post, D.J., Govorkova, E.A., Humberd, J., Seiler, P., Puthavathana, P.,… Webster, R.G. (2005). Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia?. *Journal of Virology*, **79:** 11269–11279.
35. Swayne, D.E., Akey, B.L. (2005). Avian influenza control strategies in the United States of America, In Avian Influenza Prevention and Control; **8**: 113-130.
36. Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Nair, V. (2013). Diseases of Poultry, Blackwell Publishing Ltd., Iowa 50010, USA.
37. Tong, S., Li, Y., Rivailler, P., Conrardy, C., Castillo, D.A.A., Chen, L.M.,… Donis, R.O. (2012). A distinct lineage of

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 17, Issue 2,
Autumn & Winter 2021

Detection of avian influenza virus in aquatic birds in the bird's garden of Tehran and in a bird supply center during summer 2021

Soroush Geramitabar[1], Hadi Pourtaghi[2*]
1. DVM Graduated, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2. Assistant Professor of Veterinary Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
Received: 7March2022 Accepted: 21June2022

Abstract
Avian influenza is a contagious viral disease with economic and public health impact that affects birds, humans, and other mammals. Influenza virus belongs to the Orthomyxoviridae family and based on the difference between nucleoprotein (NP) and matrix protein (M) antigens is classified into three subgroups A, B, and C. Subgroup A is responsible for causing disease in birds. Wild aquatic birds such as ducks, geese, swans, and shorebirds are the main reservoirs of influenza viruses. Influenza viruses are shed through respiratory secretions and feces. The aim of this study was detection of avian influenza virus in aquatic birds in a bird supply center and in the bird garden of Tehran. To detect the influenza virus, 142 sample of fresh feces, cloacal and oropharyngeal were collected by using sterile swabs from 10 bird species including Domestic duck, Dalmatian pelican, Greater flamingo, Whooper swan, Mute swan, Black swan, Crested duck, Bar-headed goose, Canada goose, and Ruddy shelduck during July to September 2021. Collected samples were pooled in 50 tubes where 2 and 3 swabs include 1 sample. Samples of each tube were related to a bird or a species. All samples were immediately transferred to the laboratory with ice and tested for detection of influenza virus using the matrix gene and nucleoprotein gene by RT-PCR method. Comparing positive control and negative control, the results of all samples were negative. So, all the samples were negative. Therefore, at the time of doing this study, there was no serious risk of transmission of influenza viruses to terstal birds and to humans that visited these places. This fact could be influenced by the time of the sample collection and this could be related to low titer shedding of influenza virus in the summers. Besides, detection of no positive sample could be related to vaccination against influenza virus in the bird garden of Tehran. In this way, vaccination in aquatic birds can play an important role in reducing infection to influenza virus and improving public health.

Keywords: Avian Influenza Virus, Molecular Detection, Wild Aquatic Birds.

**Corresponding author: Hadi Pourtaghi*
Address: Department of Veterinary Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
E. mail: hadi.pourtaghi1@gmail.com