



عفونت تجربی بلدرچین ژاپنی با ویروس آنفلوآنزای کم حدت پرندگان (H9N2)

منصور میاحی^۱، زهرا برومند^۲، فروغ طلازاده^۲، سمیه دیبوند^{۳*}، الهام ملکی^۳

۱. استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز-ایران.
۲. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز-ایران.
۳. دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت و بیماری‌های طیور، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز-ایران.

پذیرش: ۱۳ تیر ماه ۹۳

دریافت: ۲۷ خرداد ماه ۹۳

چکیده

به منظور مطالعه نشانه‌های بالینی، میزان مرگ‌ومیر، پاسخ‌های سرولوژی و دفع ویروس در بلدرچین‌های آلوده با ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان H9N2 با بیماری‌زایی کم (LPAI)، صد بلدرچین ژاپنی به‌طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم و بلدرچین‌های گروه ۱ و ۳ در ۹ روزگی با واکسن کشته آنفلوآنزای پرندگان H9N2 واکسینه شدند. بلدرچین‌های گروه ۱ و ۲ با ۰/۱ میلی‌لیتر مایع آلتوتویک حاوی ویروس‌های آنفلوآنزای کم حدت پرندگان H9N2 (LPAI) A/Chicken/Iran/772/99 با ELD₅₀ ۵×۱۰^{۵/۵} جداسازی شده از جوجه، آلوده شدند. بلدرچین‌های گروه ۴ به‌عنوان گروه کنترل بدون واکسن و آلودگی، نگهداری شدند. در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۱۰ بعد از آلودگی، ۴ بلدرچین از هر گروه به‌طور تصادفی جدا شد و پس از آسان‌کشی، نای، ریه، لوزه‌ی سکومی و پانکراس هرکدام به منظور ردیابی ویروس در میکرو تیوپ‌های استریل جمع‌آوری گردید. RNA از نمونه‌های بافتی استخراج شد و cDNA ساخته شده با استفاده از پرابرهای اختصاصی در واکنش RT-PCR قرار گرفتند. نمونه‌های خون در ۸، ۳۱ و ۴۸ روزگی جمع‌آوری شدند و عیار پادتن سرم خون ضد بیماری آنفلوآنزا با آزمایش مهارکننده هم‌گلویتیناسیون (HI) با 4HA آنتی‌ژن آنفلوآنزا اندازه‌گیری شد. اطلاعات جمع‌آوری‌شده با برنامه نرم‌افزاری SPSS ویرایش ۱۶ آنالیز گردید. نتایج مطالعه حاضر نشان داد بلدرچین نقش کلیدی در سیر تکاملی AIV به‌عنوان میزبان واسط دارد و ویروس‌های آنفلوآنزا در بلدرچین توانایی تکثیر و انتقال به گونه‌های حیوانی دیگر را پیدا می‌کنند و واکسن کشته روغنی نمی‌تواند از آلودگی بلدرچین و تکثیر ویروس آنفلوآنزای پرندگان با بیماری‌زایی کم H9N2 محافظت کند. **واژه‌های کلیدی:** آنفلوآنزای پرندگان، ردیابی، بلدرچین، واکسیناسیون، عیار پادتن.

مقدمه

مناطق جنوب شرق آسیا تا خاورمیانه در بازارهای طیور زنده می‌شوند و در این مناطق اندمیک باقی می‌مانند. اهمیت بیشتر ویروس‌های یاد شده در این است که به فراوانی به خوک - که به‌عنوان یک میزبان واسط در سویه‌های آنفلوآنزا با پتانسیل پاندمیک مطرح است - انتقال می‌یابند. آلودگی انسان به ویروس‌های H9N2 با نشانه‌های خفیف مشابه آنفلوآنزای انسانی گزارش شده است (۱۰ و ۱۱). اولین مورد بیماری تنفسی آنفلوآنزای A پرندگان H9N2 در بلدرچین در ایتالیا و در سال‌های ۱۹۶۸-۱۹۶۶ گزارش شد. بلدرچین به‌طور طبیعی می‌تواند با چندین تحت تیپ

ویروس‌های A آنفلوآنزا (IAVs) به خانواده‌ی ارتومیکسوویریده تعلق دارند. ژنوم ویروس RNA، تکرار شده‌ای منفی و ۸ قطعه‌ای است. تفاوت آنتی‌ژنی بر روی دو پروتئین سطحی ویروس، هم‌گلویتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) منجر به طبقه‌بندی IAVs به تحت تیپ می‌شود و تاکنون ۱۷ تحت تیپ از HA و ۱۰ تحت تیپ از NA گزارش شده است (۱۱). ویروس‌های آنفلوآنزای A پرندگان H9N2 به‌طور گسترده در جمعیت‌های طیور حضور دارند و موجب شیوع بیماری در تعداد وسیعی از





پس از چالش، ۴ پرندۀ از هر گروه آزمایشی به طور تصادفی جدا و به روش انسانی کشته شدند و نای، ریه، پانکراس و لوزه‌های سکومی آن‌ها جمع‌آوری و به منظور بررسی انتشار ویروس در بافت‌ها در هر گروه آزمایش RT-PCR بر روی بافت‌های ذکر شده انجام گرفت.

جدول ۱- طرح آزمایش مطالعه

گروه‌ها	تعداد	واکسن (۹ روزگی)	چالش (۳۵ روزگی)
گروه ۱	۲۵	+	+
گروه ۲	۲۵	-	+
گروه ۳	۲۵	+	-
گروه ۴	۲۵	-	-

به منظور آزمایش RT-PCR، نخست استخراج RNA از نمونه‌های بافتی با استفاده از RNX TM کیت سیناژن مطابق با پروتکل کارخانه به انجام رسید. به طور خلاصه، ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه هموژنیزه با ml RNX ۱ و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط اضافه و مخلوط در ۱۲۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز بالا به داخل میکروتیوب جدید انتقال یافت و با حجم مساوی از ایزوپروپیل مخلوط و متعاقباً در ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بعد از مرحله شست‌وشو، با استفاده از ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد در دور ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سرانجام، پلت در ۵۰ میکرولیتر DEPC حل و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا فرا رسیدن زمان استفاده ذخیره گردید.

ساخت cDNA با استفاده از AccuPowderRochetScript RT PreMix (Bioneer Corporation, Republic of Korea) مطابق با دستورالعمل کارخانه سازنده، سنتز گردید. توالی پرایمرها در جدول ۲ نشان داده شده است. PCR منجر

آنفلوآنزا از پرندگان، انسان و خوک آلوده شود (۸).

عفونت‌های ویروس آنفلوآنزای A پرندگان در انسان‌ها و حیوانات با فعل و انفعال بین HA ویروس و مولکول‌های حاوی اسید سیالیک (SA) روی سلول‌های هدف اپیتلیال مجاری تنفسی آغاز می‌شود. هماگلوتینین ویروس‌های آنفلوآنزای A پرندگان و انسان به ترتیب به رسپتورهای آلفا ۲-۳ سیالیک اسید و رسپتورهای آلفا ۶-۲ سیالیک اسید متصل می‌شوند، لیکن خوک و بلدرچین هر دو رسپتور پرندگان و انسان را دارند (۹)؛ بنابراین، بلدرچین می‌تواند به‌عنوان بازسازی‌کننده در دسته‌بندی جدید ویروس آنفلوآنزای عمل کند تا توان آلوده کردن انسان و یا دیگر گونه‌های پستانداران را داشته باشد (۴).

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی نشانه‌های بالینی، میزان مرگ‌ومیر، پاسخ‌های سرولوژی و دفع ویروس در بلدرچین‌های واکسینه و غیر واکسینه آلوده با ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان با بیماری‌زایی کم (H9N2 (LPAI است.

مواد و روش کار

در این مطالعه از جدایه A/Chicken/Iran/772/99 (H9N2) استفاده شد. ویروس ۲ بار در تخم‌مرغ جنین دار ۹-۱۱ روزه تکثیر یافت که دوز کشنده جنین (ELD₅₀) مطابق با فرمول رید-مانچ محاسبه گردید.

به منظور انجام آزمایش، ۱۰۰ بلدرچین ژاپنی به‌طور تصادفی به ۴ گروه مساوی؛ ۲۵ بلدرچین در هر گروه تقسیم شدند. پرندگان مورد آزمایش در قفس، در اتاق‌های جداگانه نگهداری شدند (جدول ۱). در ۹ روزگی، دو گروه (گروه‌های ۱ و ۳) با واکسن کشته H9N2، ساخت مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، واکسینه شدند. در ۳۵ روزگی، ۲ گروه (گروه‌های ۱ و ۲) از طریق شکاف شوان با ۰/۱ میلی‌لیتر مایع آلانتوئیک حاوی ELD₅₀ ۵×۱۰ از ویروس H9N2 تلقیح و گروه چهارم به‌عنوان کنترل منفی نگهداری شدند؛ علاوه‌براین، در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۱۰ روز





جدول ۲- توالی پرایمرها

اندازه (جفت باز)	توالی	ژن هدف
۴۸۸	F-5'GTC ACA CTT GTT GTT GTR TC 3' R-3'GG AAT CAC GAR ACA CAC CTY5'	H9

با استفاده از پلیت ۹۶ خانه با رقت دو برابر در PBS (۰/۰۱) (مول) و pH برابر با ۷/۲، گلوبول قرمز ۰/۵ درصد و ۴HA از آنتی ژن AIV انجام شد.

در پایان مقایسه آماری بین عیار پادتن سرم ضد ویروس آنفلوانزای پرندگان H9N2 در گروه‌های مورد مطالعه، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶، به انجام رسید.

نتایج

در این پژوهش هیچ‌گونه نشانه بالینی یا مرگ‌ومیر در پرندگان همه گروه‌ها طی دوره مطالعه مشاهده نشد؛ همچنین، جراحات ماکروسکوپی در بافت‌های بلدرچین‌های کشتار شده در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۱۰ روز بعد از چالش دیده نشد.

با توجه به نتایج آزمایش سرولوژی HI که در جدول ۳ آمده است، عیار پادتن سرم خون پرندگان در ۸ روزگی (قبل از واکسیناسیون) در همه گروه‌ها صفر و در گروه کنترل در ۳۱ و ۴۵ روزگی نیز صفر بود. در ۳۱ روزگی، میانگین عیار پادتن گروه‌های واکسن شده ۶/۱۷ بود و در ۴۵ روزگی، میانگین عیار پادتن در گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۷/۶۶، ۸/۳۳ و ۵/۹۰ بود.

در بررسی انتشار ویروس در بافت‌ها، حضور ویروس در همه نمونه‌های به‌دست‌آمده از گروه‌های تلقیح شده

به تولید محصول ۴۴۸ جفت بازی شد. ۸ میکرولیتر از کل RNA و ۲ میکرولیتر از پرایمر H9F با غلظت ۲۰ پیکومول برای تهیه cDNA استفاده شد. مخلوط اصلی PCR حاوی ۲ میکرولیتر ۱۰X PCR buffer، ۰/۳ میکرولیتر $MgCl_2$ (۰/۷۵ میلی‌مول) ۰/۲ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مول)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۲۰ پیکومول)، ۵ میکرولیتر cDNA، ۱۵ میکرولیتر آب مقطر و ۰/۲ میکرولیتر Taq DNA polymerase (۵ IU/ μ l) بود. برنامه در دستگاه ترمو سایکلر $94^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه و $35^{\circ}C$ سیکل شامل مراحل زیر: $94^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $50^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $72^{\circ}C$ به مدت ۳۵ ثانیه و مرحله پس از پلی‌مراز $72^{\circ}C$ به مدت ۴ دقیقه بود؛ سپس محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز و ژل آگارز ۱ درصد آنالیز شدند.

برای تعیین عیار پادتن سرمی ضد ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ مورد مطالعه، روش HI استفاده شد. ۱۲ بلدرچین در هر گروه از سیاه‌رگ و داج‌شان در ۸، ۳۱ و ۴۵ روزگی خون‌گیری شد. نمونه‌های خون در دمای اتاق به منظور انعقاد نگه‌داری شد؛ سپس سرم‌ها جداسازی و تا زمان آزمایش در دمای $-20^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. سرم‌ها قبل از آزمایش در دمای $56^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه غیرفعال شدند. آزمایش HI

جدول ۳- مقایسه میانگین \pm انحراف معیار عیار پادتن (HI) ضد ویروس آنفلوانزای H9N2 در گروه‌های مورد مطالعه

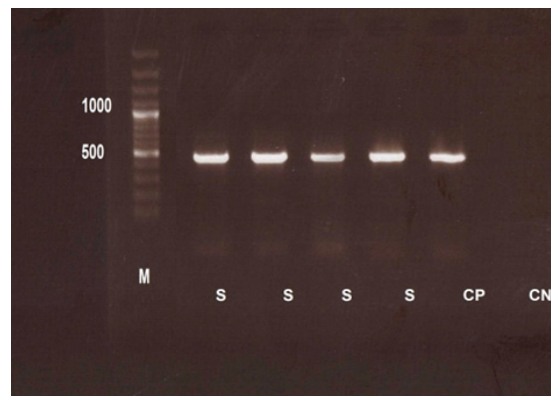
گروه‌ها	۸ روزگی	۳۱ روزگی	۴۵ روزگی
گروه ۱	-	۶/۱۷ \pm ۱/۵۲	۷/۶۶ \pm ۰/۸۸
گروه ۲	-	-	۸/۳۳ \pm ۰/۵
گروه ۳	-	۶/۱۷ \pm ۱/۵۲	۵/۹ \pm ۲/۱۱
گروه ۴	-	-	-





طور عمده در مجاری تنفسی تکثیر می‌شوند (۴). Son و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که بلدرچین ژاپنی به ویروس‌های H5N1 بسیار حساس است و ویروس‌ها نیز بسیار کشنده هستند (۷)؛ همچنین، برتران و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند بلدرچین اروپایی می‌تواند عفونت (LPAIV (H7N2/LP را بدون نشانه‌های بالینی نگه دارد؛ لیکن نشانه‌های بالینی و مرگ و میر، جراحات ماکروسکوپی و هیستوپاتولوژی تنها در گروه‌های آلوده با H7N1/HP و HPAIV (H5N1/HP) قابل مشاهده است و بلدرچین‌های آلوده، ویروس را به طور عمده از دهان طی دوره قابل توجهی دفع می‌کنند، اگرچه دفع کمتری از کواک در عفونت با HPAIV بلدرچین شناسایی شد؛ لیکن بلدرچین اروپایی ممکن است ریسپتورهای اتصالی اساسی در نای و روده داشته باشند (۱). مطالعه حاضر نشان داد ویروس در بسیاری از اندام‌های بلدرچین‌ها از جمله لوزه‌های سکومی در روزهای پس از تلقیح قابل ردیابی است؛ بنابراین محتویات دستگاه گوارش می‌تواند به‌عنوان راه احتمالی انتقال باشد. ابراهیمی و همکاران در سال ۲۰۱۰ بلدرچین‌های ژاپنی ۱۴ روزه را به‌طور تجربی با ویروس (H9N2) A/chicken/Iran/ 339/02 آلوده و از نظر هیستوپاتولوژی، مرگ و میر و قابلیت انتقال ارزیابی کردند. آن‌ها مرگ‌ومیری مشاهده نکردند اما نشانه‌های بالینی خفیفی را در بعضی از پرندگان مشاهده

و شاهد بررسی شد. ویروس در نای، ریه‌ها، پانکراس و لوزه‌های سکوم به‌طور مداوم در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۱۰ پس از تلقیح در گروه‌های G1 و G2 شناسایی شد (جدول ۴ و شکل ۱).



شکل ۱- محصول الکتروفورز PCR. NC: کنترل منفی، CP: کنترل مثبت ویروس، S: نمونه

بحث

این پژوهش نشان داد بلدرچین ژاپنی (*Coturnix japonica*) می‌تواند با LPAIV جدا شده از پرندگان کشورمان آلوده شود. این یافته به‌خوبی با گزارش ماکاوا و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطابقت دارد. آن‌ها نشان دادند از ۱۵ تحت تیپ ویروس آنفلوآنزای A آزمایش شده در بلدرچین ژاپنی بعد از تلقیح تجربی، ۱۴ تحت تیپ به جز (H15N8)A/duck/Australia/341/83، به

جدول ۴- مقایسه انتشار ویروس در بافت‌ها در هر گروه

گروه	۱dpi*				۲dpi				۳dpi				۱۰dpi			
	لوزه سکومی	پانکراس	ریه	نای	لوزه سکومی	پانکراس	ریه	نای	لوزه سکومی	پانکراس	ریه	نای	لوزه سکومی	پانکراس	ریه	نای
۱	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴
۲	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴
۳	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴
۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴

* days post inoculation (روز بعد از تلقیح)

عدد سمت راست ممیز بیان‌گر تعداد بافت‌های تهیه شده و عدد سمت چپ ممیز بیان‌گر تعداد بافت‌های مثبت است.



ZMT-102, ZMT 103) در امولسیون روغنی (ساخت موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی کرج) واکسینه و آن‌گاه در ۴۳ روزگی با جدایه فیلدی A/chicken/Iran/SH-110/99/H9N2 آلوده کردند که نشانه‌های بالینی ۶ روز بعد از تلقیح مشاهده شد و در نتیجه هیچ مرگ و میری دیده نشد اما کاهش در مصرف غذا و آب و تولید تخم وجود داشت. یک هفته بعد از آلودگی عیار پادتن در گروه چالش دیده شد؛ لیکن بین گروه‌ها اختلاف معنی‌دار نبود (۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد بلدرچین نقش کلیدی در سیر تکاملی AIV به‌عنوان میزبان واسط دارد و ویروس‌های آنفلوانزا در بلدرچین توانایی تکثیر و انتقال به گونه‌های حیوانی دیگر را پیدا می‌کنند و واکسن کشته روغنی نمی‌تواند از آلودگی بلدرچین و تکثیر ویروس آنفلوانزای پرندگان با بیماری‌زایی کم H9N2 محافظت کند.

منابع

- 1- Bertran, K; Dolz, R; Busquets, N; Gamino, V; Vergara-Alert, J; Chaves, A.J; Ramis, A; Abad, F.X; Hofle, U and Majo, N; Pathobiology and transmission of highly and low pathogenic avian influenza viruses in European quail (*Coturnix c. coturnix*). *Veterinary Research*; 2013; 44:23.
- 2- Ebrahimi, S.M; Nili, H and Sohrabi, N; Histopathological Evaluation of A/chicken/iran/339/02 (H9N2), an Iranian Field Isolate of Influenza Virus, on Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *WASJ*; 2010; 9 (2):226-229.
- 3- Keshtkar, M; Nili, H; Dadras, H and

کردند. یافته‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی، بیشتر در سیستم تنفسی، کبد و روده وجود داشت و دستگاه تنفس و گوارش نسبت به ارگان‌های دیگر بیشتر تحت تأثیر قرار گرفته بودند (۲).

کشتکار و همکاران در سال ۲۰۱۰ بیماری‌زایی ویروس آنفلوانزای A/chicken/Iran/ZMT-101/98 (H9N2) را در بلدرچین ژاپنی ۳۲ روزه مطالعه کردند، در طی آزمایش نشانه‌های بالینی در گروه‌های چالش مشاهده شد. عیار پادتن از سروتیپ H9 در ۱۰ روز پس از تلقیح به ۹ تا ۱۰ افزایش یافت. هیچ‌یک از بلدرچین‌ها نمردند؛ اما طی دوره مطالعه نشانه‌هایی از قبیل عطسه، نفس‌زدن، افسردگی و کاهش تخم‌گذاری دیده شد. در این مطالعه کاهش در مصرف غذا یا آب مشاهده نشد و همه بلدرچین‌ها به‌خوبی رشد کردند و هیچ چیز غیرطبیعی دیده نشد (۳).

در مطالعه حاضر، ۳ گروه بجز گروه کنترل افزایش قابل‌توجهی در عیار پادتن نشان دادند؛ همچنین در طی ۱۰ روز پس از تلقیح، میزان افزایش عیار پادتن در گروه‌های چالش شده نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود. بلدرچین‌های گروه واکسینه-چالش، نسبت به گروه چالش، عیار پادتن کمتری را نشان دادند؛ لیکن ویروس‌ها به‌طور پیوسته دفع شدند؛ همچنین در گروه واکسینه-بدون چالش میزان عیار پادتن از ۳۱ روزگی تا ۴۵ روزگی کاهش یافت. اختلاف پاسخ‌های سرولوژیک بین گروه‌های چالش-واکسن، چالش-بدون واکسن و گروه واکسن-بدون چالش در ۴۵ روزگی معنی‌دار نبود. سعد و همکاران در سال ۲۰۱۰ پاسخ ایمنی در بلدرچین‌های واکسینه شده در ۴ و ۸ روزگی با امولسیون روغنی غیرفعال H5N1 و H5N2 را تعیین کردند، پاسخ پادتن به‌تدریج تا هفته چهارم بعد از واکسیناسیون افزایش یافت اما عیار پادتن از هفته پنجم شروع به کاهش کرد (۶).

نیلی و همکاران در سال ۲۰۰۷ بلدرچین‌های ژاپنی را در ۳۲ روزگی با ویروس کشته (مخلوطی از SH-110,





- viruses. *Vet. Microbiol*; 2012, 160 (3-4):305-13.
- 9- Thontiravong, A; Rung-ruangkijkrai, T; Kitikoon, P; Oraveerakul, K and Poovorawan, Y; Influenza A Virus Receptor Identification in the Respiratory Tract of Quail, Pig, Cow and Swamp Buffalo. *Thai J Vet Med*; 2011; 41(3):371-376.
- 10- Xu, K. M; Li, K.S; Smith, G. J. D; Li, J. W; Tai, H; Zhang, J. X; Webster, R. G; Peiris, J. S. M. Chen H and Guan, Y; Evolution and Molecular Epidemiology of H9N2 Influenza A Viruses from Quail in Southern China, 2000 to 2005. *Virology*; 2007; 81(6):2635-2645.
- 11- Xu, K; Ferrerri, L; Rimond, A; Olivera, V; Romano, M; Ferreyra, H; Rago, V; Uhart, M; Chen, H; Sutton, T; pereda, A; Perez, D.R; Isolation and characterization of an H9N2 influenza virus isolated in Argentina. *Virus research*; 2012; 168(1-2):41-7
- Asasi, K. Experimental Assessment of the Pathogenicity of Avian Influenza Virus H9N2 Subtype in Japanese Quail (*Coturnix Coturnix Japonica*). *Archives of Razi Institute*; 2010; 65(2):59-65.
- 4- Makarova, N.V; Ozaki, H; Kida, H; Webster, R.G and Perez, R.D, Replication and transmission of influenza viruses in Japanese quail. *Virology*; 2003; 310:8-15.
- 5- Nili, H; Asasi, K; Dadras, H and Ebrahimi, M; Pathobiology of H9N2 Avian Influenza Virus in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Avian Diseases*; 2007; 51(s1):390-392.
- 6- Saad, M.A; Abd-Elhady, A.I and EL-nagar, A; Study on immune response of quail for avian influenza vaccines. *Journal of American Science*; 2010; 6(12):1475-1478.
- 7- Sun, H; Jiao, P; Jia, B; Xu, C; Wei, L; Shan, F; Luo, K; Xin, C; Zhang, K and Liao, M; Pathogenicity in quails and mice of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from ducks. *Veterinary microbiology*; 2011; 152:258-265.
- 8-Thontiravong, A; Kitikoon, P; Wannaratanana, S; Tantilertcharoen, R; Tuanudom, R; Pakpinyo, S; Sasipreeyajan, J; Oraveerakul, K and Amonsin, A; Quail as a potential mixing vessel for the generation of new reassortant influenza A





Experimental infection of Japanese quail (*coturnix coturnix japonica*) with low- pathogen avian influenza virus H9N2

Mayahi, M.¹; Boroomand, Z.²; Talazadeh, F.²; Dibavand, S.^{3*}; Maleki, E.³

1. Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran.

1. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran.

2. PhD students, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran.

Recieved: 16 January 2015 *Accepted:* 3 July 2015

Summary

In order to evaluate clinical signs, mortality rate, serologic responses and virus shedding in quail infected with Low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses H9N2, 100 Japanese quail were divided randomly into four equal groups. Group 1 and 3 chicks were vaccinated by avian influenza H9N2 killed vaccine. Group 1 and 2 chicks were infected by 0.1 ml allantoic fluid containing $5 \times 10^{5.5}$ ELD₅₀ Low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses H9N2 isolated from chicken, A/Chicken/Iran/772/99 (H9N2). Group 4 quails were kept as unvaccinated uninfected control group. Four quails from each group were randomly collected at 1, 2, 3 and 10 days after infection and trachea, lungs, caecal tonsil and pancreas were collected in sterile microtube. RNA from tissue samples were extracted and subjected to reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific primers. The PCR products were sequenced and analyzed. Blood samples collected at 8, 31 and 48 days and antibody titer against influenza disease was measured by Hemagglutination inhibition (HI) test with 4 HA unit influenza antigen. The data were analyzed with SPSS software version 16. The results of the present study showed that quail have a key role in evolution of AIV as intermediate host and influenza virus in quails can be amplified and transmitted avian influenza virus to other animal species and Killed vaccine could not protect quail against influenza infection and propagation of Low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses H9N2.

Keywords: Avian influenza, detection, quails, vaccination, antibody titers.

* Corresponding Author email: faranakdiba_dvm@yahoo.com

