DOI: 10.22092/vj.2018.120310.1424
شماره ۱۱۹ تابستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مروری بر آغاز و مدت زمان دفع ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در گونه‌های مختلف پرندگان

• کامران میرزایی
شبکه دامپزشکی آبیک، اداره کل دامپزشکی استان قزوین، قزوین، ایران
• محمدحسین فلاح‌مهرآبادی(نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. تهران. ایران

تاریخ دریافت: ۰۳-۱۱-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲۹-۱۱-۱۳۹۶
Email: : mhf2480@yahoo.com

چکیده

آنفلوآنزای پرندگان یک بیماری بسیار واگیردار با اهمیت اقتصادی و بهداشت عمومی میباشد که منشأ خسارات اقتصادی فراوان در سطح جهان می‌باشد. ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان بطور طبیعی تعداد زیادی از پرندگان وحشی و اهلی را درگیر می نماید. پرندگان وحشی آبزی (اردکها، غازها، و قوها) و پرندگان ساحلی به عنوان مخازن اصلی ویروسهای آنفلوانزا مطرح هستند. ویروس های آنفلوآنزا از طریق ترشحات تنفسی و مدفوع دفع می‌گردند. ویروسهای فوق حاد در بدن طیور سیستمیک شده و در گوشت طیور و تخم مرغ نیز قابل شناسایی می‌باشند. دفع ویروس یک روز بعد از تلقیح، در گوشت و سه روز بعد در تخم مرغ قابل ردیابی هستند. در مطالعات تجربی، دفع ویروسهای آنفلوانزای فوق حاد و کم حدت در مدفوع و ترشحات تنفسی یک تا دو روز بعد از تلقیح آغاز میشود و تا چندین روز ادامه می یابد که این دوره‌های دفع ویروس در پرندگان مختلف، متفاوت می‌باشد. دوره عفونت‌زایی در طیور مبتلا به ویروس‌های آنفلوآنزای کم حدت نسبت به ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد، طولانی‌تر بوده و میزان دفع ویروس در آنها بیشتر می‌باشد. با توجه به مطالعات صورت گرفته در خصوص مقدار و نحوه دفع ویروس در پرندگان مختلف، عقاید متفاوتی در خصوص کارایی نمونه‌های سواب کلواک و نای جهت شناسایی ویروس‌های آنفلوآنزای کم حدت و فوق حاد وجود دارد. دفع بالاتر ویروس در کلواک نسبت به ترشحات تنفسی می‌تواند به‌دلیل تکثیر ویروس در کلیه‌ها و بورس در نتیجه عفونت عمومی باشد. در برنامه‌های مراقبت بیماری آنفلوآنزا می‌بایست از هردو نوع این نمونه‌ها بهره جست.

کلمات کلیدی: آنفلوانزای پرندگان، دفع ویروس، کلواک، نای

● Veterinary Researches & Biological Products No 119 pp: 17-24

Review of the onset and duration of avian influenza viruses shedding in different birds species

By: Mirzaei, K., Qazvin Veterinary Organization, Qazvin.Iran. and Fallah Mehrabadi, M.H., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research,Education and Extension Organization (AREEO), Tehran.Iran.

Received: 2018-01-23 Accepted: 2018-02-18

Email: : mhf2480@yahoo.com

Avian influenza is a highly contagious disease with economic and public health importance, which is the cause of many economic losses in poultry industry worldwide. Influenza viruses naturally infected a large number of wild and domestic birds. Migratory wild birds (ducks, geese, and swans) and shore birds are the main reservoirs of influenza viruses. Influenza viruses are excreted through the respiratory secretions and feces. Highly pathogenic avian influenza viruses can be found in the poultry meat and the eggs. HPAI viruses can be found in meat and eggs one day and three days after inoculation, respectively. In experimental studies, the shedding of HPAI and LPAI viruses in the feces and respiratory secretions begins one or two days after inoculation and continue up to several days, which are different in different bird species. The infectious period of disease in poultry affected with LPAI viruses is longer than the HPAI viruses, and the rate of shedding is higher.Based on the conducted studies on the amount and method of the virus shedding in different birds, there are different opinions about the efficacy of cloacal and tracheal swab specimens for the detection of the LPAI and HPAI viruses. Higher shedding of the virus in the feces than respiratory secretion can be due to the proliferation of the virus in the kidneys and the bursa as a result of general infection. Both types of these specimens should be taken in influenza surveillance programs.

Key words: Avian influenza, virus shedding, cloacal, tracheal

مقدمه

آنفلوآنزای پرندگان یک بیماری بسیار واگیردار با اهمیت اقتصادی و بهداشت عمومی می‌باشد که منشأ خسارات اقتصادی فراوان در سطح جهان می‌باشد. ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان از اعضای خانواده اورتومیکسوویریده بوده و یک گروه بسیار ناهمگون از ویروس‌ها با بیماری‌زایی متفاوت در گونه‌های مختلف می‌باشند که بر اساس آنتی‌ژن‌های سطحی هماگلوتینین و نورآمینیداز طبقه‌بندی می‌شوند. تاکنون در پرندگان ۱۶ آنتی‌ژن هماگلوتینین و ۹ آنتی‌ژن نورآمینیداز شناخته شده‌اند که ۱۴۴ ترکیب مختلف از تحت تیپ‌های متفاوت ویروس را ایجاد می‌نمایند و تا به امروز ۱۳۸ ترکیب آن شناسایی شده است (۳۰). از نظر بیماری‌زایی، ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان به دو پاتوتیپ فوق حاد (Highly Pathogenicity AvianIinfluenza (HPAI) و کم حدت (Low-Pathogenicity Avian Influenza (LPAI) تقسیم می‌شوند که به ترتیب عفونت‌های کشنده و ملایمی را در طیور ایجاد می‌نمایند. ویروس‌های کم حدت می‌توانند دارای هر نوع آنتی‌ژن هماگلوتینینی باشند، اما تا به امروز تمامی ویروس‌های فوق حاد دارای آنتی‌ژن هماگلوتینین از نوع H۵ یا H۷ بوده‌اند (۲۵, ۲۷).

تفاوت‌های ساختاری در آنتی‌ژن هماگلوتینین

ساختار آنتی‌ژن هماگلوتینین - پروتئینی که برای ورود ویروس به داخل سلول میزبان می‌بایست شکافته شود - در بین ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد و کم حدت متفاوت می‌باشد. این تفاوت‌های ساختاری تأثیرات مهمی در انتشار ویروس در محصولات طیور دارد. هماگلوتینین ویروس‌های آنفلوآنزای کم حدت توسط آنزیم‌های شبه تریپسین که در سلول‌های پوششی و ترشحات تنفسی یافت می‌شوند یا بوسیله پروتئازهای باکتریایی معین، شکافته می‌شوند (۲۷). بنابراین تکثیر این ویروس‌ها محدود به روده (۲۶) و راه‌های تنفسی (۲۰) می‌باشد که این آنزیم‌ها در آن‌ها یافت می‌شوند و توانایی انتشار این ویروس‌ها مربوط به مقدار ویروس دفع شده از طریق راه‌های تنفسی یا روده‌ای می‌باشد؛گرچه برخی از ویروس‌های آنفلوآنزای کم حدت تلقیح شده بصورت داخل وریدی، از سدهای طبیعی عبور نموده، و به دیگر بافت‌ها انتشار می‌یابند. برخی از این ویروس‌ها از تعداد معدودی از دیگر بافت‌ها شامل پانکراس، کلیه، و لوله تخم‌بر طیور تلقیح شده از راه بینی، جدا شده‌اند (۲۷) (۳۵) (۱). در مقابل، هماگلوتینین ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد توسط آنزیم‌های خانواده فورین‌ها شکافته می‌شوند که در سرتاسر بدن یافت می‌گردند؛ لذا عفونت‌های فوق حاد، حالت عمومی داشته (۳۰) و بدین دلیل است که ویروس‌های فوق حاد علائم شدیدتری ایجاد نموده و به احتمال بیشتری در بافت‌هایی مثل عضلات اسکلتی دیده می‌شوند (۲۷).

مخازن و نحوه چرخش ویروس در طبیعت

ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان بطور طبیعی تعداد زیادی از پرندگان وحشی و اهلی، علی‌الخصوص پرندگان آبزی آزادپرواز را درگیر می‌نماید. این ویروس‌ها از بیش از ۹۰ گونه از پرندگان آزادپرواز موجود در ۱۳

راسته مختلف جدا شده‌اند. دو راسته غازسانان (اردک‌ها، غازها، و قوها) و سلیمسانان (مثل پرندگان ساحلی (shorebirds)) به عنوان مخازن اصلی ویروس‌های آنفلوانزا مطرح هستند(۲۹).

علاوه بر پرندگان آبزی وحشی، برخی دیگر پرندگان نیز در انتشار ویروس‌های آنفلوآنزا نقش دارند. پرندگان وحشی مسئول نگهداری و انتشار ویروس‌های آنفلوآنزای کم حدت می‌باشند، اما نقش آن‌ها در انتشار ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد نامشخص باقی مانده است و ارزیابی نقش بالقوه پرندگان وحشی در انتقال و انتشار ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد مشکل است. پرندگان خانگی و پرندگان موجود در بازارهای زنده فروشی، منابع مهمی از ویروس‌های آنفلوآنزا برای ابتلای طیور و جمعیت‌های انسانی می‌باشند و می‌بایست در برنامه‌های مراقبت هدفمند، در کنار مزارع صنعتی طیور مورد توجه قرار گیرند (۱۱-۱۳).

آنفلوانزای پرندگان یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که هر ساله خسارات زیادی بر صنعت طیور کشور وارد می‌کند. گزارشات متعددی از آنفلوانزای H_9N_2 در طیور بومی(۱۳-۱۵) و صنعتی کشور (۲۳) وجود دارد همچنین چندین طغیان آنفلوانزای فوق حاد نیز در طی سال‌های گذشته در کشور گزارش شده است (۱۶, ۱۷).

در این مقاله به مرور مطالعات انجام گرفته در خصوص مدت زمان دفع ویروس در پرندگان آبزی (اردک و غاز) به عنوان مهمترین مخازن بیماری، و ماکیان به عنوان حساسترین گونه‌ها به ویروس‌های آنفلوانزا پرداخته شده است.

بقای ویروس، مدت زمان، مقدار و نحوه دفع ویروس آنفلوآنزا

انتقال موفق ویروس از میزبان آلوده به میزبان حساس بستگی به بقای ویروس در محیط دارد. اساس معیارهای امنیت زیستی برای پیشگیری و حذف انتقال بیماری، دانش در مورد پایداری ویروس می‌باشد. ویروس آنفلوانزا در pH و حرارت بالا ناپایدار است اما در وضعیت‌های مرطوب و سرد برای مدت زمان طولانی زنده می‌ماند. بقای ویروس در آب (محیط مهم میزبان طبیعی ویروس) برای انتقال ویروس در بین پرندگان وحشی آبزی حیاتی است و بر حسب دما، شوری و pH آب متفاوت است. در شرایط محیطی ویروس در آب با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۲ روز و در آب با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ روز بقا دارد(۳۴). در شرایط فارم، ترشحات بینی و مواد مدفوع ویروس را محافظت کرده و باعث بقای بیشتر آن می‌شوند. ویروس در دمای ۵۶ درجه در عرض ۳ ساعت و در ۶۰ درجه در عرض نیم ساعت غیر فعال می‌شود. ویروس در مدفوع در دمای ۱۵ تا۲۰ درجه در زمان کمتر از ۷ روز غیر فعال می‌شود(۲۲). ویروس آنفلوانزا در بافت پر تا ۶ روز، در مدفوع در دمای ۴ درجه تا ۳۵ روز و در دمای ۳۷ درجه تا ۶ روز و در مدفوع مایع تا ۱۰۵ روز زنده می‌ماند(۴).

از آنجا که آب مصرفی به عنوان یکی از راه‌های مؤثر انتقال ویروس به پرندگان آبزی می‌باشد (ماندگاری ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان در آب در دمای ۱۷ درجه سلسیوس، ۲۰۷ روز و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، ۱۰۲ روز می‌باشد)، نمونه‌های آب و مدفوع برای اهداف مراقبتی بجای سواب‌های نای و کلواک و یا در کنار آنها، می‌تواند ایده آل باشد (۳۳). ویروس‌های آنفلوانزا در محیط‌های سرد و مرطوب بقای بیشتری دارند. احتمالاً تالاب‌ها نقش حیاتی در انتقال بیماری دارند، چراکه ویروس‌های آنفلوانزا در آب برای مدت زمان بیشتری پایدار می‌باشند. اما به دلیل آلودگی محیطی کمتر و پایداری کوتاه مدت‌تر ویروس‌های فوق حاد در آب در مقایسه با ویروس‌های کم حدت، تالاب‌ها شرایط مناسب‌تری برای انتقال ویروس‌های کم‌حدت نسبت به ویروس‌های فوق حاد دارند (۱۸).

در مطالعات تجربی، دفع ویروس‌های آنفلوانزای فوق حاد و کم حدت در مدفوع و ترشحات تنفسی یک تا دو روز بعد از تلقیح آغاز می‌شود (۲۷). در بررسی چالش‌های آزمایشگاهی انجام گرفته و ارزیابی طول مدت و مقدار دفع ویروس‌های کم حدت و فوق حاد از راه دهان و کلواک در اردک‌ها و غازها، مشخص شده است که میانگین تیتر ویروس دفع شده در اردک‌های مبتلا به ویروس‌های آنفلوانزای کم حدت، بالاتر از اردک‌های آلوده به ویروس‌های فوق حاد بوده است. متعاقب عفونت اولیه، اردک‌های مبتلا به ویروس‌های آنفلوآنزای کم حدت ۱۵۰ برابر بیشتر از اردک‌های مبتلا به ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد، ویروس از طریق مدفوع دفع کردند. برآوردها حاکی از آنست که اردک‌های مبتلا، ویروس را به صورت مداوم و هر روز دفع می‌کنند (نه بصورت متناوب). اما دوره دفع ویروس ممکن است بین پرندگان در یک مطالعه متفاوت باشد و هر چه به سمت انتهای دوره عفونت پیش می‌رویم، دفع متناوب ویروس بیشتر دیده شود. در مقابل، تیتر کلواکی ویروس‌های فوق حاد در طول زمان ثابت است (۱۸).

میانه دوره عفونت‌زایی در سواب‌های دهانی و کلواکی در غاز و اردک در مورد ویروس‌های کم حدت ۱۱/۵-۱۰ روز و در مورد ویروس‌های فوق حاد، ۵ روز در اردک ها، و ۷/۵ روز در غازها بود. این بررسی‌ها بر اساس میانه دوز عفونت‌زایی پرندگان نشان داد که دفع ویروس و ایجاد آلودگی محیطی از سوی اردک‌های آلوده به ویروس‌های آنفلوآنزای کم حدت نسبت به اردک‌های آلوده به ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد، دو برابر بیشتر است. این موضوع سبب می‌شود احتمال آلوده شدن پرندگان حساس در تماس با این پرندگان، در طول طغیان‌های بیماری ناشی از ویروس‌های کم حدت نسبت به طغیان‌های ویروس‌های فوق حاد، بیشتر باشد. دفع کمتر ویروس در محیط و آلودگی محیطی کمتر در طول دوره بیماری و ماندگاری محیطی کوتاه‌تر ویروس‌های فوق حاد نسبت به ویروس‌های کم حدت، نشان می‌دهد که محیط مخزن مناسبی برای ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد نمی‌باشد (۱۸).

دفع ویروس از طریق کلواک در اردک‌های تلقیح شده با ویروس H_5N_2 از ۳ تا ۱۰ روز پس از تلقیح، و در اردک‌های تلقیح شده با ویروس H_2N_8 از ۳ تا ۹ روز پس از تلقیح، مشاهده شده است(۲۴). برخی محققین معتقدند که در برنامه‌های مراقبت برای شناسایی ویروس‌های کم حدت سواب‌های کلواک، و برای شناسایی ویروس‌های فوق حاد، سواب‌های دهانی کارایی بهتری دارند (۱۸). درمقابل، برخی دیگر محققین نیز نشان دادند که ویروس کم حدت H_5N_2 در طغیان پنسیلوانیای امریکا در اوایل ۱۹۸۳ تا ۱۹۸۴ به ندرت از نمونه‌های سواب کلواک جدا شده و مکرراً از ترشحات تنفسی جداسازی شده‌اند؛ در حالی‌که یک ویروس فوق حاد که بعداً در همان طغیان شناسایی شده بود، به راحتی از نمونه‌های کلواک و نای جدا شده بود. گزارشات برخی دیگر محققین نیز مبتنی بر این است که ویروس‌های کم حدت، بیشتر در نمونه‌های سواب نای، و ویروس‌های حادتر، از هر دو نوع نمونه‌های سواب‌های کلواک و نای، جدا می‌شوند اما

طول دوره دفع ویروس در کلواک بیشتر از نای بود (۲۷).

ویروس‌های آنفلوآنزای کم حدت

زارکوف و همکاران (۲۰۱۱) پیرو تلقیح داخل وریدی ویروس کم حدت H۶N۲ در مرغ، بوقلمون، غاز و اردک، مشاهده نمودند که دوره‌های دفع ویروس در آنها متفاوت می‌باشد. اردک(میزبان طبیعی) نسبت به سه گونه دیگر پرندگان مورد مطالعه، دوره دفع ویروس طولانی‌تری داشت، درحالیکه جوجه‌ها دفع کمتری داشتند. ماکیان (مرغ و بوقلمون) به ترتیب تا ۵ و ۱۰ روز بعد از تلقیح، ویروس را دفع کردند، درحالی‌که در اردک‌ها دفع ویروس از طریق کلواک تا روز ۲۱ بعد از تلقیح دیده شد. این امر نشان‌دهنده‌ی این است که وقتی یک ویروس از یک گونه معین جدا شده و بصورت تجربی به دیگر گونه‌ها تلقیح می‌گردد، دوره دفع ویروس در گونه‌های دریافت‌کننده ویروس نسبت به گونه میزبان اصلی، کمتر خواهد بود. در این پرندگان نیز نسبت نمونه‌های مثبت کلواک در مقایسه با نمونه‌های نای، بیشتر بود. دلیل این امر اینست که با تلقیح داخل وریدی ویروس، انتشار وسیع و سریع آن در بدن از جمله کلیه‌ها اتفاق می‌افتد و ارتباط آناتومیکی کلواک با کلیه‌ها از طریق مجاری ادراری، باعث تجمع بالای ویروس در کلواک می‌گردد. درصد بالای جداسازی ویروس از نمونه‌های کلواک برای یک مدت طولانی‌تر در این ۴ گونه پرنده مورد مطالعه، نشان داد که نمونه‌های کلواک برای بررسی حضور ویروس و تشخیص بیماری مناسب‌تر می‌باشند. این یافته‌ها در تطابق با دیگر مطالعات می‌باشند، گرچه برخی محققین، حضور طولانی تر ویروس و تیتر بالاتر آن‌ها را در نمونه‌های نای مشاهده نموده‌اند (۳۷)

ویروس‌های آنفلوآنزای کم‌حدت در مخاط روده اردک‌ها تکثیر می‌یابند و این باعث دفع مقادیر فراوان ویروس از طریق مدفوع این پرندگان می‌گردد. این ویروس‌ها در محیط و همچنین در شرایط آزمایشگاهی در دمای ۴ درجه سلسیوس، تا ۲۱ روز در مدفوع عفونت‌زا باقی مانده و با آزمایش RT-PCR قابل تشخیص می باشند. نتایج مثبت حاصل از نمونه‌های سواب کلواک و نمونه‌های سواب مدفوع تازه جمع آوری شده طی روزهای سوم و چهارم پس از تلقیح در اردک‌های مورد مطالعه نشان داد که این دو روش جمع‌آوری نمونه با یکدیگر قابل مقایسه بوده و نمونه‌های مدفوع تازه می‌توانند در مطالعات انتشار ویروس از طریق مهاجرت پرندگان ارزشمند باشد (۲۴).

در مطالعه تجربی انجام گرفته توسط کاستا و همکاران (۲۰۰۹) برای بررسی اثر سن در دفع ویروس آنفلوانزای تحت حاد در اردک، بر روری گروه‌های سنی ۲ هفته، ۱ ماه، ۲ ماه، ۳ ماه و ۴ ماه گروه سنی یک ماه و بالاتر به طور مداوم ویروس را از روز اول تا چهارم بعد از تلقیح دفع کردند. و در گروه سنی دو هفته دفع ویروس با یک روز تاخیر نسبت به بقیه گروه‌ها آغاز شد. دفع ویروس در تمامی گروه‌ها متفاوت بود و تا ۲۱ روز ادامه داشت. بیشترین مقدار ویروس دفع شده در گروه سنی یک ماه و از طریق کلواک مشاهده شد. بر اساس نتایج مذکور، گرچه اردک‌های وحشی در سنین مختلف به ویروس‌های کم‌حدت آنفلوآنزای پرندگان مبتلا می‌شوند و سن بر روی حساسیت آن‌ها تأثیری ندارد، اما سن اردک‌ها در زمان شروع عفونت ممکن است برروی میزان دفع ویروس و انتقال آن‌ها مؤثر باشد. در واقع، تأخیر در دفع ویروس در پرندگان جوان ممکن است همانطور که قبلاً در خصوص ویروس‌های هپاتیت B و رئوویروس‌ها مشاهده شده بود، مربوط به موتاسیون در سلول‌های میزبان و ظرفیت پشتیبانی از تکثیر ویروس در آن‌ها باشد. لذا قابل توجه است که حتی کمترین تفاوت‌ها در سن پرندگان می‌تواند بر روی نتایج آزمایشات تجربی تأثیرگذار بوده، و برای مقایسه چنین نتایجی می‌بایست پرندگان در سنین مشابه هم مورد آزمایش قرار بگیرند (۷).

ون دیلن و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که دفع ویروس H۴N۶ پس از تلقیح در اردک‌های وحشی ۶ ماهه نسبت به اردک‌های ۳ ماهه، بیشتر می‌باشد. این محققین همچنین دفع ویروس در نمونه‌های مدفوعی را بیشتر از سواب‌های نای و کلواک گزارش نمودند. کاستا و همکاران (۲۰۱۱) با تلقیح تحت تیپ‌های مختلف ویروس‌های کم حدت آنفلوآنزای پرندگان به گونه‌های مختلف اردک‌های وحشی، حساسیت و الگوی‌های دفع ویروس متفاوتی را در آن‌ها مشاهده نمودند. در این مطالعه، ویروس آنفلوآنزا در نمونه‌های حلقی اردک سرخ‌سر (Redhead Duck)، اردک بیشه (Wood Duck)، و مرغ نوروزی (laughing gulls) بیشتر از نمونه‌های کلواکی آن‌ها جدا شد؛ و نتایج مطالعه نشان داد که دفع ویروس‌های کم حدت، ممکن است بین گونه‌های پرندگانی که از نظر طبقه‌بندی ژنی به هم مرتبط می‌باشند نیز متفاوت باشد. لذا الگوی قدیمی مبنی بر اینکه تکثیر ویروس‌های آنفلوآنزای کم‌حدت در پرندگان آبزی بطور عمده و اولیه در سلول‌های روده‌ای صورت می‌پذیرد، ممکن است در خصوص همه گونه‌های پرندگان صحیح نباشد و محل تکثیر ویروس در بین گونه‌های میزبانی مختلف و بر اساس سویه ویروس متفاوت می‌باشد. در بین پرندگان مورد مطالعه، اردک‌های وحشی بیشترین دفع ویروس را بر اساس تعداد پرنده دفع‌کننده ویروس و طول مدت دفع ویروس، از خود نشان دادند که این امر حاکی از نقش مهم آن‌ها در تاریخچه طبیعی بیماری می‌باشد(۸).

دیمیتروف و همکاران (۲۰۱۶) دینامیک دفع ویروس را در قرقاول (مرغ گینه) در سنین مختلف پس از تلقیح تجربی داخل وریدی با ویروس کم حدت H۶N۲ مورد مطالعه قرار دادند. در سنین مختلف مورد مطالعه، تفاوت در تعداد پرندگان دارای دفع ویروس از طریق کلواک و راه‌های تنفسی در فواصل زمانی مختلف بعد از تلقیح مشاهده گردید و درکل، دفع ویروس از طریق کلواک بیشتر بود (۳۶) و (۱۰) که این امر احتمالاً بدین دلیل تکثیر ویروس در کلیه‌ها و بورس در نتیجه عفونت عمومی می‌باشد. گرچه در این مطالعه جوجه‌های جوان مورد آزمایش قرار نگرفتند، دوره‌های مشابه دفع ویروس در تمامی گروه‌های سنی مورد مطالعه نشان داد که عفونت ویروسی آنفلوآنزای کم‌حدت در قرقاول‌ها وابسته به سن نمی‌باشد. این محققین در برخی نمونه‌های نای و کلواک که از نظر جداسازی ویروس منفی بودند، در آزمایش rRT-PCR نتایج مثبت کسب نمودند. البته عکس این اتفاق نیز در تعداد کمتری از نمونه‌ها رخ داد که بیشتر شامل نمونه‌های کلواک بود (۱۰). قرقاول‌ها در بسیاری از بازارهای زنده‌فروشی در سطح جهان دیده می‌شوند. علاوه برآن، قرقاول‌ها به وفور در سیستم‌های باز و نیمه باز پرورش یافته و بنابراین در سطح وسیع در معرض پرندگان وحشی قرار داشته و با توجه به دوره‌های دفع ویروس مشاهده شده در آن‌ها، این پرندگان نقش مهمی در اکولوژی آنفلوآنزای پرندگان ایفا می‌نمایند (۱۰).

عفونت ویروسی ناشی از ویروس H۹N۲ یک مشکل تنفسی نوپدید می‌باشد که شیوع آن در بین گونه‌های مختلف متفاوت است. دانش کنونی ما در خصوص دفع ویروس در پرندگان خشکی‌زی محدود می‌باشد. تلقیح داخل بینی این ویروس در مرغ گینه، بلدرچین ژاپنی (Japanese Quail)، گنجشک خانگی (House Sparrows)، کلاغ خانگی (House Crows)، و مرغ مینا (Bank Myna) نشان داد که همگی آن‌ها ویروس را دفع می‌نمایند اما الگوی دفع ویروس در آن‌ها متفاوت می‌باشد. باستثنای کلاغ خانگی، عفونت ویروسی H۹N۲ در بقیه پرندگان علائم بالینی ایجاد می‌نماید. در بین این پرندگان، بلدرچین ژاپنی بیشترین و کلاغ خانگی کمترین دفع ویروس را از خود نشان دادند که این امر نشان‌دهنده مقاومت نسبی کلاغ خانگی در برابر این ویروس می‌باشد. دفع ویروس در گنجشک خانگی و مرغ مینا عمدتاً از طریق راه‌های گوارشی، و در مرغ گینه و بلدرچین ژاپنی از راه دهانی (Buccal cavity) می‌باشد. حساسیت بالای همه این پرندگان (بجز کلاغ خانگی) نسبت به ویروس H۹N۲ باعث می شود این پرندگان شرایط مناسبی را برای نگهداری و بازآرایی ژنی (reassortment) ویروس فراهم نمایند و از آنجاکه مقادیر زیادی از ویروس را دفع می‌نمایند، می‌توانند در طغیان‌های محلی در طیور اهلی باعث انتقال ویروس شوند. احتمال زیادی وجود دارد که تبادل ویروس H۹N۲ جدید در گردش کنونی، و انتقال بین گونه ای آن بین طیور و مرغ مینا و گنجشک خانگی، در کشور پاکستان و کشورهای همسایه وجود داشته باشد. لذا برقراری برنامه‌های پیوسته پایش و مراقبت ویروس‌های آنفلوآنزای کم حدت ضروری به نظر می‌رسد (۳۲).

محققین با پاساژهای مکرر سویه کم‌حدت H۷N۳ ویروس آنفلوآنزای پرندگان در بلدرچین و بوقلمون، نشان دادند که این پرندگان نیز ممکن است سازگاری ویروس‌های آنفلوآنزا با منشأ پرندگان وحشی را برای ماکیان تسهیل نموده و بیماری زایی و دفع ویروس را در آن‌ها افزایش دهند که این امر می‌تواند انتشار عفونت در مزارع طیور را تشدید نماید (۶).

ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد

ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد معمولا هم در ترشحات تنفسی و هم در مدفوع دیده می‌شوند و ۱ تا ۲ روز پس از تلقیح، در مدفوع و ترشحات تنفسی قابل شناسایی هستند (۲۷). اردک‌ها توانایی دفع ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد برای دوره‌های طولانی مدت را دارند؛ در یک مطالعه دفع ویروس در این پرندگان تا ۱۷ روز گزارش شده است (۲۴). مقایسه ویروس‌های فوق حاد H۵N۱ ویتنامی و اندونزیایی در اردک‌های چینی نشان داد که سویه ویتنامی ابتلای شدید همراه با تب و دپرسیون ایجاد می‌نماید، درحالی‌که سویه اندونزیایی تنها باعث یک تب‌گذرا می‌گردد. آزمایش نمونه سواب‌های دهانی و کلواکی اخذ شده هر روزه از اردک‌ها نشان داد که از ۲۴ ساعت بعد از چالش با ویروس تا ۵ روز بعد آن، دفع ویروس در اردک‌های مورد مطالعه از راه کلواک و دهان وجود دارد. مشاهده مقادیر بیشتر ویروس از سواب‌های اخذ شده از اردک‌های آلوده شده با سویه ویتنامی نشان می‌دهد که این سویه نسبت به سویه اندونزیایی، احتمالاً با اردک‌ها بیشتر وفق یافته است و احتمالاً اردک‌ها نمی‌توانند به عنوان میزبان نگهدارنده کارآمد سویه اندونزیایی عمل نمایند (۳).

در برخی مطالعات تجربی، محققین با تلقیح ویروس فوق حاد H۵N۱ به کبوتران مشاهده نمودند که کبوتران نسبت به عفونت آنفلوآنزایی بسیار مقاوم‌تر از مرغ‌ها بوده و ممکن است بسته به دوز ویروس تلقیح شده و سویه آن، ویروس را دفع نمایند یا اینکه آنرا دفع ننمایند (۵). در یک مطالعه تجربی که ویروس فوق حاد H۵N۱ به شترمرغ تلقیح شده بود، محققین ویروس را از سواب‌های حلقی، از روز دوم تا هفتم پس از تلقیح، و همچنین از سواب‌های کلواکی، از روز چهارم تا پنجم پس از تلقیح جدا نمودند (۵).

دفع ویروس در محصولات طیور

ویروس‌های آنفلوآنزا در ترشحات و دفعیات بدن طیور دفع می‌شوند و علی الخصوص همراه با مدفوع حیوان ممکن است در سطح تخم‌مرغ حضور داشته باشند. مطالعات تجربی نشان داده‌اند که دفع ویروس آنفلوآنزای فوق حاد در مدفوع و گوشت طیور، کمی زودتر و یا تقریباً همزمان با ظهور اولین علائم بالینی بیماری اتفاق می‌افتد. ویروس‌های دفع شده همچنین می‌توانند عضلات اسکلتی (گوشت) و دیگر بافت‌ها را در هنگام فرآوری، آلوده نمایند. علاوه بر آن، برخی جدایه‌های ویروس ممکن است در عضلات اسکلتی و/یا محتویات داخل تخم‌مرغ تجمع یابند. برخی ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد ۱ روز پس از تلقیح، در گوشت، و ۳ روز پس از تلقیح، در تخم‌مرغ مشاهده شده‌اند. گرچه جداسازی ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد از گوشت طیور آلوده شده بصورت طبیعی، هنوز گزارش نشده است؛ ویروس H۵N۱ از گوشت مرغابی‌های آلوده شده بصورت طبیعی، یافت شده است. همچنین با وجود اینکه آنتی‌ژن‌های ویروس H۵N۱ طی دو روز ابتدایی پس از تلقیح، در تخمدان طیور تلقیح شده از راه بینی شناسایی شده‌اند، اما ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد تا قبل از ظهور علائم بالینی بیماری، در تخم‌مرغ دفع نمی‌شوند. (۲۷).

هیچ گزارشی از حضور ویروس‌های آنفلوآنزای کم حدت در گوشت طیور و تخم‌مرغ موجود نمی‌باشد. در واقع دفع ویروس‌های کم حدت در زرده و سفیده تخم‌مرغ، نه اثبات و نه رد شده است (۲۷).

اثر ایمنی طبیعی بر دفع ویروس

پرندگانی که قبلاً در معرض یک ویروس آنفلوآنزای کم‌حدت قرار گرفته اند، ممکن است ویروس کمتری در محیط دفع نموده و میزان انتقال آلودگی کمتری برای دیگر پرندگان حساس ایجاد نمایند. وقتی اردک‌ها طی ۴۶ روز پس از عفونت اولیه، دچار درگیری مجدد با سویه مشابه ویروس آنفلوآنزا می‌شوند، یک پاسخ ایمنی ثانویه در آن‌ها شکل گرفته و دفع مدفوعی ویروس در آن‌ها قطع می‌شود. بررسی گردش ویروس در اردک‌های وحشی ایتالیا در زمستان در طول سال های ۱۹۹۳ تا ۱۹۹۹ با جداسازی ویروس و آزمایشات سرولوژیکی نشان داد که این ویروس‌ها در طول فصل زمستان نیز پیوسته در حال گردش در پرندگان وحشی می‌باشند (۹). بطور کلی عفونت قبلی با یک ویروس کم‌حدت، طول مدت دفع ویروس در مدفوع را تغییر داده و در اردک‌هایی که قبلاً مبتلا به ویروس همگون یا ناهمگون شده‌اند، بطور قابل ملاحظه‌ای آنرا کاهش می‌دهد. ضمناً این کاهش وقتی‌که عفونت ثانویه ۲۸ روز پس از عفونت اولیه اتفاق می‌افتد، نسبت به زمانی‌که ۱۴ روز پس از آن رخ می‌دهد،

بیشتر خواهد بود. دفع ویروس پس از تلقیح اولیه در اردک‌ها تا ۷ روز پس از تلقیح مشاهده می‌گردد؛ البته دفع انفرادی ویروس پس از روز هفتم نیز مشاهده می‌گردد. تلقیح اردک‌ها با ویروس H۵N۲، و تلقیح مجدد آن‌ها با سویه H۲N۸ پس از ۲۸ روز، باعث دفع ویروس در دومین تا هفتمین روز پس از تلقیح دوم شده؛ در حالی‌که تلقیح مجدد با سویه مشابه H۵N۲ در آن‌ها، باعث دفع ویروس تنها طی یک روز پس از تلقیح دوم می‌گردد. این امر نشان‌دهنده پیشرفت یک پاسخ ایمنی در اثر تلقیح سویه ویروس مشابه و جلوگیری از دفع ویروس در تلقیح مجدد ثانویه می‌باشد. در واقع یک عفونت ثانویه با ویروس همگون، باعث تقویت پاسخ ایمنی می‌گردد. بنابراین، پاسخ ایمنی ذاتی ممکن است مسئول کاهش طول مدت دفع ویروس در اردک‌های مبتلا به سویه ویروس ناهمگون باشند. این کاهش طول مدت دفع ویروس پیرو عفونت ثانویه ممکن است باعث شود ویروس‌ها در جمعیت پرندگان آبزی وحشی باقی بمانند، بدون این‌که در آزمایشات مورد شناسایی قرار گیرند. لذا به هنگام ترسیم مدل‌های چرخش آنفلوآنزا در طبیعت، می‌بایست به اثر احتمالی رخداد عفونت‌های متوالی و تأثیر در تغییر الگوهای دفع ویروس در عفونت‌های بعدی، توجه کافی داشت (۲۴).

تأثیر واکسیناسیون بر روی دفع ویروس

واکسیناسیون در طیور، بسته به میزان آنتی‌ژن واکسن و ارتباط آنتی‌ژنیکی بین سویه مورد استفاده در واکسن و سویه حاد در گردش در مزرعه، می‌تواند دفع ویروس را کاهش دهد (۲۱). هرقدر درجه تشابه در توالی ژنتیکی بین ویروس واکسن و سویه در گردش در مزرعه بیشتر باشد، دفع ویروس از طریق راه‌های تنفسی طیور کمتر خواهد بود (۲۸). محققین عقیده دارند که واکسیناسیون علاوه بر کاهش دفع ویروس و انتقال آن، از شدت علائم بالینی بیماری می‌کاهد و این امکان وجود دارد که جوجه‌های واکسینه بسته به دز ویروس موجود و دیگر عوامل، آلوده شده و بدون اینکه علائم بیماری را نشان دهند یا با یک درگیری ملایم، ویروس دفع نمایند (۲۷). در همین راستا، استفاده از دوبار تجویز یک واکسن غیرفعال روغنی در پیشگیری از علائم بالینی بیماری و مرگ و میر، جلوگیری از دفع ویروس H۵N۱، و ویرمی و انتشار افقی آن و پیشگیری از تجمع ویروس در گوشت اردک‌های پرورشی، مؤثر بوده است. لذا واکسیناسیون ممکن است از ادامه چرخه عفونت‌زایی ویروس جلوگیری نماید؛ چراکه به نظر می‌رسد متعاقب آلودگی یک گله واکسینه شده، دفع ویروس به اندازه کافی برای آلوده نمودن دیگر گله‌های واکسینه و غیرواکسینه انجام نشده، و تحت این شرایط احتمالاً خطر آلودگی جمعیت پرندگان وحشی و دیگر میزبانان کاهش می‌یابد. گرچه بر اساس مطالعات تجربی، در نتیجه انجام واکسیناسیون از دفع ویروس جلوگیری به عمل می‌آید، ولی عوامل بسیاری مانند نگهداری و تجویز نادرست واکسن، شرایط از بین برنده ایمنی بدن، و بیماری‌های همزمان و ... وجود دارند که ممکن است کارایی واکسن در مزرعه را تحت تأثیر قرار داده و باعث دفع ویروس در محیط شوند. در این شرایط، همانطور که پیرو مصرف گسترده واکسن در برابر ویروس کم حدت H۵N۲ در جوجه‌ها در مکزیک نشان داده شده است، چرخش ویروس می‌تواند باعث بوجود آمدن تغییرات آنتی‌ژنیکی (Antigenic drift) گردد. به همین دلیل است که سازمان‌های بین‌المللی بر انجام مراقبت در کنار عملیات واکسیناسیون طیور، تأکید دارند (۲).

استفاده از یک واکسن تجاری اختصاصی از یک دودمان متفاوت و حاوی یک تحت تیپ ناهمگون نورآمینیداز (H۵N۹) در هفته سوم و هفتم پرورش، در برابر چالش با ویروس تحت تیپ H۵N۱، یک پاسخ ایمنی قوی را ایجاد می‌نماید که باعث کاهش دفع ویروس به حدی می‌شود که ویروس‌ها با آزمایش جداسازی قابل تشخیص نبوده و فقط با آزمایش RT-PCR قابلیت تشخیص خواهند داشت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که متعاقب استفاده از واکسن، عفونت اتفاق نیافتاده و در کشورهایی که برنامه واکسیناسیون برای آنفلوآنزای پرندگان وجود دارد، واکسیناسیون در دستیابی به هدف ریشه‌کنی کمک خواهد نمود (۳۱).

در نهایت باید توجه داشت علی الخصوص در کشورهایی که آنفلوآنزا در آن‌ها بومی می‌باشد، صرفاً استفاده از واکسن بدون برقراری مقررات سختگیرانه امنیت-زیستی، حذف گله‌های درگیر، و تلاش در جهت تطابق همیشگی سویه مورد استفاده در واکسن با سویه ویروس در گردش، برای جلوگیری از بروز طغیان کفایت نمی‌نماید. در همین راستا، محققین در سال ۲۰۱۲ در یک گله تخم‌گذار تجاری در کشور مصر با وجود استفاده مکرر از واکسن غیرفعال سویه همگون H۵N۱ در هفته‌های اول، هفتم، و شانزدهم پرورش، تلفات قابل توجه و میزان ابتلای بالا به آنفلوآنزای فوق حاد H۵N۱ را گزارش نمودند که مؤید این مطلب می‌باشد (۱۱).

تأثیر پروتئین F۲-PB۱ برروی دفع ویروس

پـروتئین کوچک F۲-PB۱ ویروس‌های آنفلوآنزای تیپ A پرندگان، به اصطلاح یک پروتئین جانبی بوده و برای تکثیر ویروس در بسیاری از گونه‌های میزبانی ضروری نیستند. این پروتئین در افزایش انتقال ویروس‌های آنفلوآنزای تیپ A در پرندگان مخزن طبیعی یا در محیط پرندگان خانگی نسبت به طیور تجاری در مزارع دارای سیستم بسته، نقش دارد. حضور پروتئین کامل F۲-PB۱ حاصل از یک ویروس آنفلوآنزای کم حدت H۹N۲ باعث طولانی‌تر شدن دوره دفع ویروس از جوجه‌های تلقیح شده با ویروس می‌گردد، لذا باعث افزایش انتقال ویروس به پرندگان دارای تماس مستقیم شده و علاوه بر آن باعث سرکوب بیماری‌زایی ویروس می‌گردد؛ چراکه باعث افزایش حداقل دز کشـــند ویروس در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار (embryonated chicken eggs) و افزایش زنده ماندن پرندگان چالش‌یافته با ویروس می شود (۱۹).

نتیجه‌گیری

در طول سه دهه اخیر، آنفلوآنزای پرندگان به یک معضل سلامتی قابل انتقال از حیوان به انسان تبدیل شده و نگرانی در خصوص حضور ویروس در محصولات طیور را افزایش داده است. از آنجاکه ویروس‌های آنفلوآنزا از طریق مخاطات و گوارش، قابل انتقال به پستانداران و انسان می‌باشند، شروع دفع ویروس از بدن پرنده آلوده اهمیت پیدا می‌کند. از طرف دیگر، علائم بالینی بیماری ممکن است تا یک هفته یا بیشتر در گله‌های آلوده مشاهده نگردند؛ ولی در طول این مدت ویروس آنفلوآنزا ممکن است در محصولات مختلف طیور از جمله تخم‌مرغ و گوشت مرغ یافت شوند و باعث انتقال بیماری به انسان و دیگر میزبانان شوند (۲۷). لذا

اطلاع از الگوی دفع ویروس از جهت درک امکان و نحوه انتقال ویروس و همچنین توانایی گونه‌های مختلف در عمل کردن به عنوان میزبان نگهدارنده اهمیت خواهد داشت (۳).

با توجه به مطالعات صورت گرفته در خصوص مقدار و نحوه دفع ویروس در پرندگان مختلف، عقاید متفاوتی در خصوص کارایی نمونه‌های سواب کلواک و نای جهت جداسازی ویروس‌های آنفلوآنزای کم‌حدت و فوق حاد وجود دارد. دفع بالاتر ویروس در کلواک نسبت به ترشحات تنفسی می‌تواند بدلیل تکثیر ویروس در کلیه‌ها و بورس در نتیجه عفونت عمومی باشد؛ گرچه عکس این مطلب نیز در بسیاری از مطالعات گزارش شده است. به هرحال، آنچه که اهمیت دارد اینست که در برنامه‌های مراقبت بیماری آنفلوآنزا می‌بایست از هردو نوع این نمونه‌ها بهره جست. البته نمونه‌های آب و مدفوع نیز برای اهداف مراقبتی در کنار نمونه‌های نای و کلواک مورد توجه می‌باشند.

حساسیت و میزان دفع ویروس آنفلوآنزا در میزبان‌های مختلف به عواملی چون پاتوتیپ و سویه ویروس، گونه، نژاد، و حتی سن پرنده، سابقه عفونت قبلی، و ... وابسته می‌باشد. درکل، دوره عفونتزایی در طیور مبتلا به ویروس‌های آنفلوآنزای کم حدت نسبت به ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد، طولانی‌تر بوده و میزان دفع ویروس در آن‌ها بیشتر می‌باشد. بطور کلی در مطالعات تجربی به دنبال تلقیح ویروس‌های آنفلوآنزای کم حدت و فوق حاد در پرندگان مختلف، دفع ویروس معمولاً از ۲ تا ۳ روز پس از تلقیح شروع شده و تا چندین روز ادامه می‌یابد که این دوره‌های دفع ویروس در پرندگان مختلف، متفاوت می‌باشد. در این بین، سابقه عفونت قبلی با یک ویروس همگون یا ناهمگون از طریق القاء یک پاسخ ایمنی، باعث کاهش طول مدت این دوره‌های دفع ویروس در پرندگان مبتلا می‌گردد. بعلاوه، عوامل مختلف دیگری نیز وجود دارند که دفع ویروس را متأثر می‌سازند. از جمله این عوامل می‌توان از کاربرد واکسن، انترفرون‌ها، و ... نام برد که برخی از آن‌ها می‌توانند به عنوان روش‌هایی جدید در راستای کنترل و پیشگیری از بیماری در انسان و دیگر میزبان‌ها مطرح باشند.

منابع مورد استفاده

1- Akhtar T., G. Ara and N. Ali. 2016. Effects of dietary supplementation of mannan-oligosaccharide on virus shedding in avian influenza (H9N2) challenged broilers. *Iranian Journal of Veterinary Research* 17,268.

2- Beato M.S., A. Toffan, R. De Nardi, A. Cristalli, C. Terregino, G. Cattoli and I. Capua. 2007. A conventional, inactivated oil emulsion vaccine suppresses shedding and prevents viral meat colonisation in commercial (Pekin) ducks challenged with HPAI H5N1. *Vaccine* 25,4064-4072.

3- Bingham J., D.J. Green, S. Lowther, J. Klippel, S. Burggraaf, D.E. Anderson, H. Wibawa, D.M. Hoa, N.T. Long and P.P. Vu. 2009. Infection studies with two highly pathogenic avian influenza strains (Vietnamese and Indonesian) in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*), with particular reference to clinical disease, tissue tropism and viral shedding. *Avian Pathology* 38,267-278.

4- Brown J.D., D.E. Swayne, R.J. Cooper, R.E. Burns and D.E. Stallknecht. 2007. Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. *Avian Dis* 51,285-289.

5- Cardona C.J., Z. Xing, C.E. Sandrock and C.E. Davis. 2009. Avian influenza in birds and mammals. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 32,255-273.

6- Cilloni F., A. Toffan, S. Giannecchini, V. Clausi, A. Azzi, I. Capua and C. Terregino. 2010. Increased pathogenicity and shedding in chickens of a wild bird–origin low pathogenicity avian influenza virus of the H7N3 subtype following multiple in vivo passages in quail and turkey. *Avian diseases* 54,555-557.

7- Costa T., J. Brown, E. Howerth and D. Stallknecht. 2010. The effect of age on avian influenza viral shedding in mallards (*Anas platyrhynchos*). Avian diseases 54,581-585.

8- Costa T.P., J.D. Brown, E.W. Howerth and D.E. Stallknecht. 2011. Variation in viral shedding patterns between different wild bird species infected experimentally with low-pathogenicity avian influenza viruses that originated from wild birds. *Avian Pathology* 40,119-124.

9- De Marco M., G. Foni, L. Campitelli, E. Raffini, L. Di Trani, M. Delogu, V. Guberti, G. Barigazzi and I. Donatelli. 2003. Circulation of influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993–99 period: evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. *Avian diseases* 47,861-866.

10- Dimitrov K.M., I.S. Zarkov, I. Dinev, G.V. Goujgoulova, P.J. Miller and D.L. Suarez. 2016. Histopathologic Characterization and Shedding Dynamics of Guineafowl (*Numida meleagris*) Intravenously Infected with a H6N2 Low Pathogenicity Avian Influenza Virus. *Avian diseases* 60,279-285.

11- El-Zoghby E.F., A.-S. Arafa, W.H. Kilany, M.M. Aly, E.M. Abdelwhab and H.M. Hafez. 2012. Isolation of avian influenza H5N1 virus from vaccinated commercial layer flock in Egypt. *Virology journal* 9,294.

12- Fallah Mehrabadi M.H., A.R. Bahonar, F. Tehrani, M. Vasfi-marandi, A. Sadrzadeh, S.A. Ghafouri, M. Meshkat and F. Masror. 2015. Avian influenza H9N2 seroepidemiological survey in rural domestic poultry of Iran. *Iran J Epi* 10,1-8.

13- Fallah Mehrabadi M.H., A. Bahonar, M.V. Marandi, A. Sadrzadeh, F. Tehrani and M. Salman. 2016a. Sero-survey of Avian Influenza in backyard poultry and wild bird species in Iran-2014. *Preventive Veterinary Medicine.*

14- Fallah Mehrabadi M.H., A.R. Bahonar, F. Tehrani, M. Vasfi Marandi, A. Sadrzadeh and M. Shabani. 2016. Determinants and Sero-Prevalence of Avian Influenza (H5 and H7 Sub Types) in Industrial and Backyard Poultry of Iran 2014. irje 12,19-27.

15- Fallah Mehrabadi M.H., A.R. Bahonar, F. Zaynolabedini Tehrani, M. Vasfi Marandi, A. Sadrzadeh, S.A. Ghafouri, M. Meshkat and F. Masror. 2015. Seroepidemiology of Avian Influenza (H9N2) in Rural Domestic Poultry of Iran: A Cross-Sectional Study. *irje* 10,1-9.

16- Ghafouri S.A., A. GhalyanchiLangeroudi, H. Maghsoudloo, R. Kh Farahani, H. Abdollahi, F. Tehrani and M.H. Fallah. 2017. Clade 2.3.4.4 avian influenza A (H5N8) outbreak in commercial poultry, Iran, 2016: the first report and update data. *Tropical animal health and production* 49,1089-1093.

17- Ghafouri S.A., A.G. Langeroudi, H. Maghsoudloo, F. Tehrani, R. Khaltabadifarahani, H. Abdollahi and M.H. Fallah. 2017. Phylogenetic study-based hemagglutinin (HA) gene of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) detected from backyard chickens in Iran, 2015. *Virus Genes* 53,117-120.

18- Hénaux V. and M.D. Samuel. 2011. Avian influenza shedding patterns in waterfowl: implications for surveillance, environmental transmission, and disease spread. *Journal of wildlife diseases* 47,566-578.

19- James J., W. Howard, M. Iqbal, V.K. Nair, W.S. Barclay and H. Shelton. 2016. Influenza A virus PB1-F2 protein prolongs viral shedding in chickens lengthening the transmission window. *Journal of General Virology* 97,2516-2527.

20- Kawase M., F. He, A. Kubota, G. Harata and M. Hiramatsu. 2010. Oral administration of lactobacilli from human intestinal tract protects mice against influenza virus infection. *Letters in applied microbiology* 51,6-10.

21- Lierz M., H.M. Hafez, R. Klopfleisch, D. Lüschow, C. Prusas, J.P. Teifke, M. Rudolf, C. Grund, D. Kalthoff and T. Mettenleiter. 2007. Protection and virus shedding of falcons vaccinated against highly pathogenic avian influenza A virus (H5N1). *Emerging infectious diseases* 13,1667.

22- Lu H., A.E. Castro, K. Pennick, J. Liu, Q. Yang, P. Dunn, D. Weinstock and D. Henzler. 2003. Survival of avian influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. *Avian Dis* 47,1015-1021.

23- Mehrabadi M.H.F., A. Bahonar, K. Mirzaei, A. Molouki, A. Ghalyanchilangeroudi, S.A. Ghafouri, F. Tehrani and S.H.E. Lim. 2017. Prevalence of avian influenza (H9N2) in commercial quail, partridge, and turkey farms in Iran, 2014–2015. *Tropical animal health and production*,1-6.

24- Muth J.P. 2012. Viral shedding and antibody response of mallard ducks to avian influenza viruses. Colorado State University. Libraries.

25- OIE. 2017b. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017. Chapter 2.3.4. Avian influenza (infection with avian influenza viruses) (NB: Version adopted in May 2015).

26- Poorbaghi S., H. Dadras, H. Gheisari, N. Mosleh, S. Firouzi and H. Roohallazadeh. 2013. Effects of *Lactobacillus acidophilus* and inulin on faecal viral shedding and immunization against H9N2 Avian influenza virus. *Journal of applied microbiology* 116,667-676.

27- Spickler A.R., D.W. Trampel and J.A. Roth. 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.

28- Suarez D. and S. Schultz-Cherry. 2000. Immunology of avian influenza virus: a review. *Developmental & Comparative Immunology* 24,269-283.

29- Swayne, G. John R., M. Larry R., N. Lisa K., S. David L. and N. Venugopal. 2013. Diseases of Poultry. Blackwell Publishing Ltd. Iowa 50010, USA.

30- Swayne D.E. 2007. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian diseases* 51,242-249.

31- Terregino C., A. Toffan, M. Beato, R.D. Nardi, A. Drago and I. Capua. 2007. Conventional H5N9 vaccine suppresses shedding in specific-pathogen-free birds challenged with HPAI H5N1 A/chicken/Yamaguchi/7/2004. *Avian diseases* 51,495-497.

32- Umar S., A. Rehman, S. Asif, M. Usman, M. Atif, S. Ali, M.T. Munir, A. Ali, M. Shahzad and M.A.A. Shah. 2016. Variation in viral shedding patterns between domestic and wild terrestrial birds infected experimentally with reassortant avian influenza virus (H9N2). *Avian Biology Research* 9,200-206.

33- VanDalen K.K., A.B. Franklin, N.L. Mooers, H.J. Sullivan and S.A. Shriner. 2010. Shedding light on avian influenza H4N6 infection in mallards: modes of transmission and implications for surveillance. *PLoS One* 5,e12851.

34- Webster R.G., W.J. Bean, O.T. Gorman, T.M. Chambers and Y. Kawaoka. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological reviews* 56,152-179.

35- Youn H.-N., Y.-N. Lee, D.-H. Lee, J.-K. Park, S.-S. Yuk, H.-J. Lee, J.-M. Yeo, S.-Y. Yang, J.-B. Lee and S.-Y. Park. 2012. Effect of intranasal administration of *Lactobacillus fermentum* CJL-112 on horizontal transmission of influenza virus in chickens. *Poultry science* 91,2517-2522.

36- Zarkov I., K. Koev and I.D. Ivanov. 2014. Shedding of the avian influenza A H6N2 subtype virus isolate in *Numida meleagris*. *Trakia J Sci* 12,59-64.

37- Zarkov I., P. Marutsov and E. Raenkova. 2011. Period of shedding of the avian influenza A H6N2 subtype virus isolates in young domestic fowl. *Trakia J Sci* 9,71-77.