ردیابی آنتی‌بادی علیه تحت تیپ H5 آنفلوانزای پرندگان در زرده تخم اردک‌های بومی استان گیلان، ۱۳۹۹

محمدحسین فلاح مهرآبادی[۱]، حمیده نجفی[۲]، پوریا معتمد چابکی[۲]، حسین حسینی[۳]، عباس برین[۲]، زهرا ضیافتی کافی[۲]، علی هژبر راجعونی[۲]، ایرج اشرافی تمای[۲]، ناصر صدری[۲]، آرش قلیان‌چی لنگرودی[۲*]

۱- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ دی ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۷ بهمن ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۵ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

آنفلوانزای پرندگان یکی از بیماری‌های مهم واگیر پرندگان می‌باشد که می‌تواند گونه‌های مختلفی از پرندگان صنعتی و بومی را درگیر نماید. در سال‌های اخیر گزارشات متعددی از شیوع تحت تیپ H5 آنفلوانزای فوق حاد پرندگان در طیور صنعتی بومی در کشور وجود داشته است. اردک‌سانان به‌عنوان مهم‌ترین مخزن این ویروس، نقش مهمی در همه‌گیرشناسی بیماری دارند. هدف از این مطالعه ردیابی آنتی‌بادی علیه ویروس‌های تحت تیپ H5 در زرده تخم اردک بومی می‌باشد. تعداد ۷۰ عدد تخم اردک از شهرستان‌های مختلف استان گیلان (رشت، انزلی، صومعه‌سرا، فومن، آستانه اشرفیه، لنگرود، و چابکسر) طی بهار و تابستان سال ۱۳۹۹ جمع‌آوری شد. فاز آبی تخم‌ها جدا گردید و سپس با آنتی‌ژن اختصاصی H5 و روش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) استاندارد OIE مورد بررسی قرار گرفت. ۱۱/۴۳ درصد از نمونه‌ها دارای آنتی‌بادی علیه تحت تیپ H5 بودند. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده چرخش ویروس‌های تحت تیپ H5 در جمعیت اردک‌های بومی شمال کشور می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *آنفلوانزای پرندگان، H5، شیوع، زرده، پاسخ سرمی، ممانعت از هماگلوتیناسیون*

*پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: ghalyana@ut.ac.ir

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان توسط ویروس‌های تیپ آ آنفلوانزا متعلق به خانواده اورتومیکسوویریده ایجاد می‌شود. تقسیم‌بندی تحت تیپ‌های ویروس‌های آنفلوانزا بر اساس دو آنتی‌ژن هماگلوتینین و نورآمینیداز می‌باشد. تا امروز ۱۶ تحت تیپ HA و ۹ تحت تیپ NA شناسایی شده که ۱۴۴ (۱۶*۹) تحت تیپ مختلف را ایجاد می‌کند (۱). آنفلوانزای پرندگان از دو جنبه دارای اهمیت می‌باشد: اول از جنبه بهداشت عمومی و قابلیت انتقال آن به انسان و دوم از جنبه اقتصادی و خسارت‌های ناشی از بیماری‌زایی و مرگ و میر که در پرندگان ایجاد می‌کند. سازمان بهداشت جهانی دام (OIE)، ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان را بر اساس بیماری‌زایی در پرندگان به دو پاتوتیپ تقسیم می‌کند. ویروس‌های با بیماری‌زایی پایین (LPAI) و ویروس‌های با بیماری‌زایی بالا (HPAI) که تحت عنوان آنفلوانزای فوق حاد بیان می‌شود. تا به امروز کلیه ویروس‌های با بیماری‌زایی بالا متعلق به دو تحت تیپ H5 و H7 می‌باشد، اما تمام تحت تیپ‌های H5 و H7 فوق حاد نیستند و برخی از آنها بیماری‌زایی پایینی دارند. تمامی تحت تیپ‌های H5 و H7 تحت عنوان آنفلوانزای اخطارکردنی بیان می‌شوند (۲). ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان به‌طور 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) به‌عنوان مخازن اصلی ویروس‌های آنفلوانزا مطرح هستند. بیشتر عفونت‌های آنفلوآنزای پرندگان، در پرندگان مهاجر آبزی بیماری قابل تشخیص ایجاد نمی‌کنند؛ البته ویروس‌های فوق حاد H5N1 در این زمینه استثناء هستند.

در استان‌های شمالی کشور و به‌خصوص گیلان و مازندران، پرورش طیور بومی و به‌خصوص اردک به‌عنوان یکی از راه‌های کسب درآمد خانوارها بوده و بسیاری از خانوارها از این طریق کسب درآمد می‌کنند. در طی سال‌های گذشته رخدادهای آنفلوانزا در طیور بومی و صنعتی این استان موارد بالایی داشته است. با توجه به انتقال عمودی ویروس‌های آنفلوانزا از طریق تخم پرندگان، در این مطالعه به بررسی میزان شیوع آنفلوانزای H5 در تخم اردک‌های بومی استان گیلان پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش: مطالعه مقطعی حاضر در بهار و تابستان سال ۱۳۹۹ و در استان گیلان انجام گرفت. محدوده جغرافیایی مورد بررسی در این مطالعه، شهرستان‌های استان گیلان (رشت، انزلی، صومعه‌سرا، فومن، آستانه اشرفیه، لنگرود و چابکسر) به مساحت ۱۴۰۴۴ کیلومتر مربع بود. در این مناطق بازارهای محلی بسیاری برای داد و ستد طیور بومی و محلی وجود دارد و به دلیل شرایط آب و هوایی هر ساله محل ورود و اقامت بسیاری از پرندگان مهاجر هم می‌باشد. ۷۰ عدد تخم اردک از ۷ شهرستان و از هر شهرستان ۱۰ عدد تخم اردک جمع‌آوری گردید. این ۱۰ تخم اردک از ۱۰ شخص مختلف از بازار خریداری شد.

استخراج از زرده و آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI): ابتدا هر دو انتهای تخم اردک با بتادین ۱۰ درصد استریل شده سپس با پنس استریل در کنار شعله در دو انتها سوراخ شدند و سفیده آنها به‌طور کامل از زرده آنها جدا شده و زرده در داخل فالکون استریل ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس به هر زرده معادل حجم آن سرم

فیزیولوژی استریل اضافه گردید. بعد از همگن شدن کامل زرده با سرم فیزیولوژی، از هر زرده ۰/۵ میلی‌لیتر برداشت و به درون دو میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال یافت. هر نمونه به خوبی ورتکس شده یکی از آنها در دور ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از انجام سانتریفیوژ فاز بالای آنها جداسازی شده، به میکروتیوب جدیدی منتقل و جهت نگهداری تا زمان آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس آزمون HI با استفاده آنتی‌ژن H5 بر اساس دستورالعمل سازمان دامپزشکی انجام شد. ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین به هر گوده از میکروپلیت اضافه و سپس ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر سرم به گوده اول اضافه نموده و بر اساس log2 رقت‌سازی انجام شد. میزان ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر از آنتی‌ژن با تیتر ۴ واحد هماگلوتینین به هر گوده افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در آخر گلبول‌های قرمز به هر گوده افزوده و مجدداً انکوبه شد. تیتر آنتی‌بادی محاسبه و نمونه‌های بالای تیتر ۴ مثبت در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Office Excel مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

تعداد ۸ زرده از مجموع ۷۰ زرده بررسی شده (شیوع برابر ۱۱/۴۳ درصد و فاصله اطمینان ۹۵ درصد برابر ۱/۵-۳/۲۱ درصد) در آزمایشات سرم مثبت بودند و آنتی‌بادی علیه H5 در زرده تخم اردک یافت گردید. بیشترین موارد سرم مثبت در شهرستان انزلی با ۳۰ درصد موارد (۳ مورد از ۱۰ مورد) یافت گردید و در دو شهرستان فومن و آستانه اشرفیه، آنتی‌بادی در زرده تخم اردک جمع‌آوری شده ردیابی نگردید.

جدول ۱- موارد مثبت میزان حضور آنتی‌بادی علیه H5 زرده تخم اردک در استان گیلان

نام شهرستان	نمونه مثبت (از ۱۰ عدد)	درصد نمونه‌های مثبت
رشت	۲	۲۰
انزلی	۳	۳۰
فومن	۰	۰
صومعه سرا	۱	۱۰
آستانه اشرفیه	-	۰
لنگرود	۱	۱۰
چابکسر	۱	۱۰
جمع کل	۸	۱۱/۴۳

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات سرو اپیدمیولوژیک با هدف قرار دادن آنتی‌بادی خاص علیه ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان معمولاً برای جمع‌آوری شواهدی از عفونت یا ارزیابی

اثرات واکسیناسیون و بررسی ابتدایی همه‌گیر شناسی استفاده می‌شود (۳). اردک‌ها حاملین بدون علامت نگران‌کننده‌ای برای آنفلوانزا با حدت کم و آنفلوانزای فوق حاد هستند (۴). بنابراین اردک‌ها در انتقال ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان نقش مهمی دارند. نتایج این مطالعه علاوه بر روش جدید در پایش آنتی‌بادی علیه ویروس H5 نشان داد که حدود ۱۱/۴۳ درصد نمونه‌ها دارای تیتر علیه این تحت تیپ بودند . این اولین و جدیدترین اطلاعات در حوزه اردک‌سانان و پایش سرمی در کشور می‌باشد.

اخیراً ویروس‌های مختلف AI از جمله زیرگروه‌های H3N2، H3N8، H4N6، H5N1، H5N2، H6N1، H9N2، H9N3، H9N6، H11N3 و H11N9 از اردک‌ها در ویتنام جدا شده‌اند، (۷-۵). برای کنترل ویروس‌های HPAI و نظارت بر تولید ویروس‌های جدید ، در کشورهایی که سویه‌های H5N1 در گردش هستند، نظارت بر ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در طیور را الزامی می‌کند. از نظر رفاه حیوانات و همچنین ملاحظات اقتصادی، استفاده از آنتی‌بادی‌های زرده تخم‌مرغ به جای سرم برای نظارت در بین مرغ‌ها و اردک‌ها کافی است. Hotta و همکاران در سال ۲۰۱۳، ردیابی ویروس آنفلوانزا با استفاده از روش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) بر روی زرده تخم اردک‌ها انجام شد. در این مطالعه ساب تایپ‌های H3، H6 و H9 در نوامبر ۲۰۱۰ حدود ۲۹ درصد، در اکتبر و نوامبر ۲۰۱۰ حدود ۵۰ درصد و در ژوئن ۲۰۱۱ حدود ۱۲ درصد مثبت بودند. نتایج آزمایش HI برای H5N1 نشان داد که واکنش آنتی‌بادی غالب HI از clade 2.3.4 clade H5N1 به 2.3.2.1 clade تغییر کرده است (۸). Qi و همکاران در سال ۲۰۲۰ برای نظارت بر شیوع آنتی‌بادی‌های خاص ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در زیرگروه‌های مختلف، ۱۷۰۵ تخم‌مرغ اردک وحشی از شش تالاب شمال شرقی چین برای ارزیابی آنتی‌بادی‌های H1 ، H3، H5 و H7 توسط آزمایشات c-ELISA و HI از ژانویه ۲۰۱۷ تا دسامبر ۲۰۱۹ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ترکیب چند نوع آنتی‌بادی آنفلوانزا به‌ترتیب H1(۱۲/۳۲ درصد)، H3 (۸/۱۵)، H5 (۲/۰۵ درصد)، و H7 (۳/۴۶ درصد)، بود. بنابراین، تجزیه و تحلیل دقیق توزیع جغرافیایی آنفلوانزاها در چین و عوامل خطر برای عفونت انسان از اهمیت حیاتی برخوردار است (۹). در مطالعه پولسون و همکاران (۲۰۲۱) بر روی میزان شیوع آنفلوانزای تیپ A در اردک (Whistling Ducks) در ایالات متحده میزان ردیابی مولکولی حدود ۰/۶ درصد و میزان شیوع سرمی ۱۰ درصد بود. در این مطالعه یک متا آنالیز بر روی سایر مطالعات ردیابی آنفلوانزای پرندگان در اردک‌سانان انجام دادند که محدوده شیوع و ردیابی عامل ۵/۵ درصد و بررسی سرمی بین ۰ تا ۴۲ درصد بود (۱۰).

Yeo و همکاران در سال ۲۰۰۳ میزان آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل را در تخم‌مرغ، سرم مرغ و سرم جوجه‌ها بررسی کردند و دریافتند که میزان تیتر آنتی‌بادی در زرده با تیتر سرم جوجه و مرغ از رابطه‌ای خطی پیروی می‌کند و پیشنهاد دادند که این روش می‌تواند زمان واکسیناسیون مناسب را تعیین نموده و اثرگذاری واکسن را نیز بررسی نمایند (۱۱). Saliva و همکاران نشان دادند که زرده تخم‌مرغ می‌تواند جایگزینی برای سرم برای نظارت سرولوژیکی گله در برابر عفونت‌های آنفلوانزای پرندگان با حدت پایین باشد، و سه روش (AGID، HI و ELISA) نتایج مشابهی را برای ۴۲ روز اول پس از عفونت به دست می‌دهند ، اگرچه AGID ممکن است زودتر پاسخ مثبت بدهد (۱۲). سیستم ایمنی ذاتی به‌طور کارآمد در جنین وجود دارد ولی سیستم ایمنی اکتسابی در جنین به

صورت غیر بالغ حضور دارد و آنتی‌بادی مادری از طریق زده به جنین منتقل می‌شود. این پدیده اولین بار به‌وسیله فلیکس کلمپرر در سال ۱۸۹۳ مشاهد شد جایی که نشان داد در پرندگان ایمنی علیه باکتری تتانوس از طریق کیسه زرده به جنین منتقل می‌شود. این مشاهدات نشان داد که ایمنی مادری در داخل زرده ذخیره می‌شود و به‌طور پیوسته به‌وسیله جنین در حال رشد جذب می‌شود (۱۳). تخم در واقع منبع غنی از مواد مغذی و آنتی‌بادی می‌باشد که آنتی‌بادی IgY در زرده و آنتی‌بادی‌های IgM و IgA در سفیده به مقدار فراوان یافت می‌شوند (۱۴). استفاده از زرده تخم به جای سرم باعث می‌شود تعداد بیشتری نمونه گرفته شود و پایش پرندگان به‌صورت اقتصادی انجام شود همچین عملیات خون‌گیری یک عمل دردناک برای حیوانات می‌باشد. از طرفی هر مرغ می‌تواند در هر هفته شش تخم بگذارد که تقریباً ۱۵ میلی‌لیتر آنها را زرده تشکیل می‌دهد که غلظت آنتی‌بادی در آن بسیار بیشتر از سرم می‌باشد. به‌طور کلی در یک هفته هر مرغ با زرده تخم‌مرغ می‌تواند به اندازه ۹۰ تا ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم یا ۱۸۰ تا ۲۰۰ میلی‌لیتر خون کامل آنتی‌بادی تولید کند. خود زرده تخم به تنهایی می‌تواند به‌عنوان منبع آنتی‌بادی استفاده شود ولی لیپید موجود در زرده ممکن است با فعالیت آنتی‌بادی تداخل ایجاد کند. آنتی‌بادی زرده بر خلاف برخی از نظرات مطرح شده برای کار در زمان طولانی مناسب می‌باشد و مطالعات پایداری ده ساله آنتی‌بادی زرده را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ثابت کرده است (۱۵). پیلا و همکاران در سال ۱۹۸۴ نشان دادند که زرده‌ای که با استفاده از کلروفرم و سانتریفیوژ با سرعت پایین مهیا شده بود می‌تواند یک جایگزین مناسب به جای سرم در آزمون ممانعت از هماگلوتئین برای ویروس بیماری نیوکاسل باشد (۱۶). بار جوزف و همکاران ۱۹۸۰ در مطالعه‌ای دو نوع ویروس گیاهی را به مرغ تزریق کردند و با استفاده از الایزای ساندویچ در زرده و سرم میزان آنتی‌بادی را اندازه گرفتند نتایج نشان داد که آنتی‌بادی در زرده برای اولین بار در روز هفت بعد از تزریق نمایان می‌شود و در روزهای ۹ تا ۱۱ به بیشترین مقدار خود رسیده و به مدت ۶ تا ۱۲ روز در بیشترین مقدار خود باقی می‌ماند (۱۷). بک و همکاران در سال ۲۰۰۳ در مطالعه‌ای استفاده از سرم و کیسه زرده را برای مشخص کردن وضعیت آنفلوانزای پرندگان مورد مقایسه قرار دادند. مرغ‌های لگهورن عاری از پاتوژن با استفاده از ویروس‌های زنده H7N2 و یا ویروس کشته H7N2 تلقیح شدند. سطح آنتی‌بادی با استفاده از روش‌های الایزا (ELISA)، ایمونودیفیوژن ژل اگار (AGID) و HI مورد مقایسه قرار گرفتند. آنتی‌بادی‌های ضد آنفلوانزا در سرم جوجه‌هایی که ویروس زنده دریافت کرده بودند بعدا از هفت روز از تلقیح به‌وسیله الایزا و AGID شناسایی شد ولی در زرده با تأخیر شناسایی شدند و در روز ۱۴ همه نمونه‌ها از نظر آنتی‌بادی مثبت بودند. سرم همه جوجه‌ها بدون در نظر گرفتن زنده یاکشته بودن ویروس در روز ۱۴ مثبت بود ولی در زرده این زمان ۱۸ روز بعد از دریافت ویروس بود. از طرفی آزمون HI نسبت به الایزا و AGID حساسیت کمتری برای تشخیص آنتی‌بادی ضد آنفلوانزا داشت (۱۸).

خون‌گیری و نمونه‌برداری از اردک‌ها جهت ردیابی آنتی‌بادی علیه ویروس در سرم اردک‌ها می‌تواند باعث ایجاد استرس و کاهش تولید تخم در آنها شود و از طرفی دسترسی به تخم پرندگان و نمونه‌برداری راحت‌تر و سریع‌تر انجام می‌گیرد و به همین دلیل ردیابی آنتی‌بادی در تخم اردک می‌تواند روش جایگزینی مناسبی باشد. مشاهده تحت تیپ‌های مشترک آنفلوانزا در اردک‌های وحشی می‌تواند بیانگر نقش حیاتی آنها در تکامل و بازآرایی

انواع آنفلوانزا باشد. این پرندگان به علت ارتباط با پرندگان مهاجر و طیور اهلی روستایی می‌توانند ساب تایپ‌های مختلف ویروس در حال گردش و یا ویروس‌های بازآرایی شده در خود را به راحتی منتقل نموده و باعث ایجاد اپیدمی‌های شدید و شکست واکسیناسیون در مناطق مختلف پرورش طیور صنعتی شوند. حضور ویروس‌های فوق حاد در اردک به دلیل عدم داشتن تظاهرات و علائم بالینی و رديابی آنها در زمان محدودی بعد از عفونت می‌تواند آنها را به ناقلینی برای گونه‌های حساس تبدیل نماید. رديابی آنتی‌بادی علیه ساب تایپ‌های این ویروس در اردک (از سرم و زرده) می‌تواند راهی مؤثر برای پایش بیماری در این پرندگان به‌عنوان مخزن و میزبانان بدون علامت در نظر داشت و بر اساس نتایج، برنامه‌ریزی برای کنترل و پیشگیری از گسترش ویروس‌های فوق حاد در جمعیت طیور بومی و صنعتی انجام گیرد.

این مطالعه نشان داد که ویروس H5 در جمعیت اردک‌سانان استان گیلان در حال چرخش می‌باشد. با توجه به اینکه اردک‌ها به‌عنوان مخازن بیماری بوده و از طرفی با توجه به قرار گرفتن مزارع صنعتی بزرگ در استان‌های شمالی، این موضوع از نظر همه‌گیرشناسی و اقتصادی بیماری دارای اهمیت زیادی می‌باشد. همچنین با توجه به نتایج به‌دست آمده موارد ذیل قابل توصیه می‌باشد تا نقشه اپیدمیولوژی این بیماری حساس و اقتصادی و مشترک کامل‌تر گردد: ۱- پایش مولکولی ویروس آنفلوانزا در جمعیت بازار پرندگان و روستایی در شمال کشور جهت پایش غیر فعال. ۲- رديابی سرمی در گونه‌های مختلف پرندگان. ۳ – توسعه جغرافیایی مطالعه به استان‌های شمالی و حتی جنوبی مانند خوزستان که دارای مناطق آبی گسترده برای پرندگان مهاجر و ورودی ویروس به کشور هستند. ۴- مطالعه سرمی و مولکولی بر روی ساب تایپ H7 به‌عنوان یکی دیگر از ویروس‌های فوق حاد پرندگان در پایش سرمی و مولکولی. ۵- گونه اردک در مطالعات بعدی مشخص گردد.

سپاسگزاری

از سرکار خانم سعیده عباسیان و جناب آقای مهندس بهروز اسدی در آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی تهران، به جهت کمک به انجام این طرح تحقیقاتی تشکر می‌گردد.

References

1- Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V. Diseases of Poultry. 13th ed. Iowa: Blackwell Publishing Ltd; 2013.

2- OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines. Office international des épizooties, 2015.

3- Silim A, Venne D. Comparison of egg-yolk and serum antibody titers to four avian viruses by enzyme-linked immunosorbent assay using paired field samples. Avian Dis. 1989; 33(4): 643-8.

4- Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Li Y, Jiao P, *et al.* The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. Proc Natl Acad Sci. 2004; 101(28): 10452-7.

5- Hotta K, Takakuwa H, Le QM, Phuong SL, Murase T, Ono E, *et al.* Isolation and characterization of H6N1 and H9N2 avian influenza viruses from Ducks in Hanoi, Vietnam. Virus Res. 2012; 163(2): 448-53.

6- Nguyen T, Rivailler P, Davis CT, Balish A, Dang NH, Jones J, *et al.* Evolution of highly pathogenic avian influenza (H5N1) virus populations in Vietnam between 2007 and 2010. Virology. 2012; 432(2): 405-16.

7- Nomura N, Sakoda Y, Endo M, Yoshida H, Yamamoto N, Okamatsu M, *et al.* Characterization of avian influenza viruses isolated from domestic ducks in Vietnam in 2009 and 2010. Arch Virol. 2012; 157(2): 247-57.

8- Hotta K, Takakuwa H, Yabuta T, Ung TT, Usui T, Nguyen HL, *et al.* Antibody survey on avian influenza viruses using egg yolks of ducks in Hanoi between 2010 and 2012. Vet Microbiol. 2013; 166(1-2): 179-83.

9- Qi Y, Wang H, Guo W, Liu C, Zhao L, Gu

Y, *et al*. Surveillance of multiple subtype specific antibodies against avian influenza viruses among egg yolk in wild ducks from northeast China, 2017–2019. Microb Pathog. 2021; 152: 104618.

10- Carter DL, Link P, Tan G, Stallknecht DE, Poulson RL. Influenza A Viruses in Whistling Ducks (Subfamily Dendrocygninae). Viruses. 2021; 13(2): 192..

11- Yeo S, Nagy E, Krell PJ. Indirect method for prediction of hemagglutination inhibition antibody titers to Newcastle disease virus in chickens by titration of antibodies in egg yolk. J Vet Diag Invest. 2003; 15(2): 184-7.

12- Sá e Silva M, Swayne DE. Serum and egg yolk antibody detection in chickens infected with low pathogenicity avian influenza virus. Avian Dis. 2012; 56(3): 601-4.

13- Härtle S, Magor KE, Göbel TW, Davison F, Kaspers B. Avian immunology. 2nd ed. London: Academic Press. 2014, P: 103-120.

14- Kovacs-Nolan J, Mine Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. Annu Rev Food Sci Technol. 2012; 3: 163-82.

15- Larsson A, Bålöw RM, Lindahl TL, Forsberg PO. Chicken antibodies: taking advantage of evolution—a review. Poult Sci. 1993; 72(10): 1807-12.

16- Piela TH, Gulka CM, Yates VJ, Chang PW. Use of egg yolk in serological tests (ELISA and HI) to detect antibody to Newcastle disease, infectious bronchitis, and Mycoplasma gallisepticum. Avian Dis. 1984; 28(4): 877-83.

17- Bar-Joseph M, Malkinson M. Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzymelinked immunosorbent assay (ELISA): a comparison of two plant viruses. J Virol Methods. 1980; 1(3): 179-83.

18- Beck JR, Swayne DE, Davison S, Casavant S, Gutierrez C. Validation of egg yolk antibody testing as a method to determine influenza status in white leghorn hens. Avian Dis. 2003; 47(s3): 1196-9.

Detection of antibodies against H5 subtype of Avian influenza in the egg yolks of native ducks in Gilan province, Iran, 2020.

Mohammad Hosein Fallah MehrAbadi[1], Hamideh Najafi[2], Pooria Motamed Chaboki[2], Hosein Hoseini[3], Abas Barin[2], Zahra Ziafati Kafi[2], Ali Hajhir Rajeouni[2], Iraj Ashrafi Tamai[2], Naser Sadri[2], Arash Ghalyanchi Langroudi[2*]

1- Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
2- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Karaj, Karaj, Iran.

Receive: January 9, 2021; Revise: February 15, 2021; Accept: March 5, 2021

Summary

Avian influenza disease is one of the most significant contagious diseases that can infect many birds, either in commercial farms or in indigenous birds. There have been many reports on the highly pathogenic H5 subtype of avian influenza outbreaks from Iran's industrial poultry farms in recent years. Anseriformes, as the main reservoir of the virus, play a critical role in the epidemiology of the disease. This study was conducted to detect antibodies against the H5 subtype of avian influenza viruses in the yolk of native ducks. Seventy duck eggs were collected from different cities of Gilan Province (Rasht, Anzali, SoomeSara, Fuman, Astaneh Ashrafie, Langroud und Chaboksar) from April to September of 2020. The aquatic phase of eggs was separated and subjected to the OIE approved HI standard test using H5 specific antigen. 11.43% of tested samples showed antibodies against the H5 subtype of influenza virus. This study demonstrates the circulation of the H5 subtype viruses among the native duck population of the north of Iran.

Keywords: *Avian Influenza, H5, Outbreak, Yolk, Inhibition of hemagglutination*