

اثرات پاتولوژیک آنتی ژن های ویروس آنفلوانزا بومی (تحت تیپ H9N2) در ایران با استفاده از مدل جنین جوجه

شیرین محمدی پور^{۱*}، هادی توکلی^۲، آرام شریفی^۳، سپیده اسدی^۴، مجتبی خسروی^۴

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان- ایران.
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان- ایران.
۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، کردستان- ایران.
۴. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، مازندران- ایران.

پذیرش: ۳۱ اردیبهشت ماه ۱۴۰۴

دریافت: ۹ اسفندماه ۱۴۰۳

چکیده

تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزا نه تنها در مناطق مختلف ایران شیوع دارد، بلکه خطر بیماری مشترک بین انسان و حیوان (زئونوز) را نیز به همراه دارد و قابلیت انتقال از پرندگان به انسان را دارا است. این امر آن را به یک کاندیدای بالقوه برای شیوع پاندمی های آینده تبدیل می کند. مطالعه حاضر باهدف بررسی اثرات پاتولوژیک آنتی ژن های ویروس آنفلوانزای پرندگان (زیرگروه H9N2) بر روی جنین مرغ انجام شد. براین اساس، عصاره های آنتی ژنی ویروس H9N2 با دوز EID50/ml 106 به تخم مرغ های بارور تجاری تزریق شد تا اثرات پاتولوژیک بر جنین های در حال رشد ارزیابی شود. یافته ها نشان داد که این ویروس قادر است به طور معنی داری اثرات نامطلوب قابل توجهی بر وزن و رشد جنین در طول رشد (به ویژه کاهش پارامترهای مرتبط با وزن و نرخ رشد جنین) بگذارد ($P < 0.05$). همچنین ویروس باعث ایجاد اثرات پاتولوژیک شدید در بافت های مغز و کبد جنین شد. این مطالعه نشان می دهد که تحت تیپ بومی H9N2 در ایران می تواند اثرات پاتولوژیک گسترده ای بر جنین های در حال رشد ایجاد کند. مطالعات بیشتری برای بررسی مکانیسم های مولکولی و سلولی که از طریق آن آنتی ژن آنفلوانزای H9N2 بر رشد جنین تأثیر می گذارد، مورد نیاز است.

واژه های کلیدی: آنفلوانزا، مرغ تجاری، زئونوز، H9N2

مقدمه

RNA تشکیل شده و ده پروتئین متمایز را کد می کند (۲) و (۹). ویروس های آنفلوانزای A بر اساس ویژگی های آنتی ژنی همگلوپتیینین (HA) به ۱۸ تحت تیپ و نورآمینیداز (NA) به ۱۱ تحت تیپ تقسیم می شوند. از نظر اپیدمیولوژی، آنفلوانزا مسئول اپیدمی های مختلف ویروسی در سراسر جهان بوده است. چندین اپیدمی آنفلوانزا منجر به خسارات اقتصادی قابل توجه، بحران های بهداشت عمومی و حتی مرگ و میرهای فراوان شده است. در حال حاضر، تحت تیپ آنفلوانزای H9N2 به دلیل حضور دوگانه در جمعیت های حیوانی و انسانی، توجه علمی محققان حوزه های مختلف زیستی را به خود جلب کرده است و آن را به یک کاندیدای بالقوه برای همه گیری های

آنفلوانزا یک بیماری ویروسی بسیار مسری است که نه تنها انسان ها، بلکه پرندگان و طیف گسترده ای از گونه های جانوری را نیز تحت تأثیر قرار می دهد. ویروس آنفلوانزا به خانواده Orthomyxoviridae تعلق دارد و بر اساس ویژگی های آنتی ژنی نوکلئوپروتئین و پروتئین ماتریکس، به سه تیپ اصلی A، B و C طبقه بندی می شود (۷ و ۱۴). ویروس های Orthomyxoviruses می توانند از اشکال بیضی تا چندشکلی با قطر معمول بین ۸۰ تا ۱۲۰ نانومتر متغیر هستند. ژنوم ویروسی شامل یک RNA تک رشته ای قطعه بندی شده با تقارن مارپیچی است که از هشت قطعه



آینده تبدیل کرده است (۱۱). تحقیقات در مورد شیوع H9N2 در ایران نشان‌دهنده حضور و گردش گسترده آن در بین انسان‌ها و طیور است (۳).

اثرات نامطلوب و پاتولوژیک ویروس‌ها بر مادران باردار و جنین‌های در حال رشد، نگرانی دیرینه‌ای در علوم پزشکی بوده است. ویروس‌های آنفلوآنزا به‌ویژه به دلیل پتانسیل خود برای ایجاد انواع اثرات مضر بر جنین‌های در حال رشد شناخته شده‌اند (۱۰). بااین‌حال، مطالعات علمی که به طور خاص به بررسی اثرات مرتبط با تحت تیپ بومی H9N2 در ایران، به‌ویژه در مورد جنین‌های انسانی و پرندگان، می‌پردازد، محدود است (۵)؛ بنابراین، تحقیقات بیشتر برای بررسی اثرات تراژوژنیک و پاتولوژیک این ویروس بر رشد، وزن و رشد اندام‌های خارجی و داخلی در جنین‌ها ضروری است. مدل جنین مرغ به طور گسترده‌ای به‌عنوان یک مدل پیش‌بالینی مناسب برای ارزیابی اثرات پاتولوژیک ترکیبات زیستی شناخته شده است و محققان اغلب از آن برای ارزیابی تأثیر رشدی ترکیبات و داروهای مختلف استفاده می‌کنند (۱۳). باتوجه‌به موارد ذکر شده، هدف این مطالعه بررسی تأثیر آنتی‌ژن‌های ویروس آنفلوآنزای H9N2 بر رشد جنینی با استفاده از مدل جنین مرغ به‌عنوان یک مدل پیش‌بالینی است. به طور خاص، به دنبال ارزیابی اثرات قرار گرفتن در معرض ویروس بر پارامترهای وزن و رشد جنین و ارزیابی اثرات پاتولوژیک بر بافت‌های خارجی و داخلی جنین است. باتکیه‌بر این تحقیقات، این مطالعه قصد دارد بینشی در مورد چالش‌های رشدی ناشی از H9N2 ارائه دهد، و خطرات تراژوژنیک بالقوه مرتبط با این ویروس و پیامدهای آن برای سلامت پرندگان، خطر زئونوز انسانی و تأثیر اقتصادی در مناطقی که H9N2 در آن شیوع دارد را برجسته نماید.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر در کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان با کد HNU,1635-25 تأیید شده است. برای انجام مطالعه، ابتدا تخم‌های بارور شده از فارم

جوجه‌کشی تجاری تهیه شدند. این تخم‌ها از لاین‌هایی با میانگین وزن مشابه انتخاب شده و تحت شرایط استاندارد و کنترل شده تولید شدند.

جدایه ویروسی مورد استفاده در این مطالعه با عنوان H9N2 A/Chicken/Iran/SH-110/99 از مؤسسه رازی تهیه شد. ابتدا ویروس در حفره آلتوتوئیک تخم‌های جنین‌دار ۱۰ روزه کشت داده شد. پس از کشت، EID₅₀ ویروس با استفاده از روش Reed and Muench تعیین شد. سپس محلول ویروسی برای استخراج آنتی‌ژن‌های ویروسی با استفاده از سونیکاتور Top Sonics، (20 کیلوهرتز، ۴۰۰ وات، شرکت توسعه فناوری اولتراسوند، ایران) تحت پروتکل زیر سونیکه شد: چهار دقیقه سونیکاسیون با پالس‌های متناوب ۱۰ ثانیه روشن و ۱۰ ثانیه خاموش. محلول سونیکه شده از طریق فیلتر ۰/۲۲ میکرون فیلتر شد تا خلوص و غلظت آنتی‌ژن ویروسی تضمین شود.

تخم‌های بارور شده به طور تصادفی به دو گروه مساوی تقسیم شدند، هر گروه شامل هفت تخم بود که مشخصات هر گروه در ادامه آورده شده است. تخم‌ها در انکوباتور PLC-DQSH (شرکت بلدر دماوند) واقع در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، در دمای ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد انکوبه شدند.

برای گروه اول که به‌عنوان گروه در معرض آنتی‌ژن ویروس آنفلوآنزا تعیین شد، عصاره آنتی‌ژن ویروسی به آلبومین هر تخم تزریق شد. حجم تلقیح شده، ۰/۲ میلی لیتر با دوز EID₅₀/ml ۱۰^۶ با استفاده از سرنگ سوزن گیج ۲۲ تلقیح شد. این تزریق در روز چهارم انکوباسیون (زمان حیاتی که با مراحل حساس اندام‌زایی همخوانی دارد)، انجام شد.

گروه دوم، به‌عنوان کنترل، ۰/۲ میلی لیتر محلول بافر فسفات (PBS) را دریافت کردند، که با همان روش شرح داده شده برای گروه اول انجام شد.

در روز هجدهم انکوباسیون، جنین‌ها از هر گروه با دقت از انکوباتور خارج شدند. انتهای پهن پوسته هر تخم باز شد تا جنین‌ها با دقت خارج شوند. هر جنین به طور جداگانه با

رشد جنین‌ها شد. در مقابل، جنین‌های گروه کنترل که آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا را دریافت نکردند، الگوهای طبیعی وزن و رشد را در طول دوره رشد نشان دادند (جدول ۱، شکل ۱).

ارزیابی اثرات استخراج آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا بر پوشش خارجی جنین‌ها انجام شده است. بررسی جنین‌ها در گروه‌هایی که استخراج آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا را دریافت کرده بودند، نشان داد که تزریق این آنتی‌ژن به تخم‌مرغ‌ها می‌تواند تأثیرات مضر بر پوشش خارجی جنین‌ها در طول دوره توسعه آن‌ها داشته باشد. به طور خاص، این آنتی‌ژن منجر به اختلالاتی در رشد طبیعی پوشش خارجی و همچنین هیپریمی (افزایش خون‌رسانی) در جنین‌هایی شد که آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا را دریافت کرده بودند.

اثرات پاتولوژیک ناشی از استخراج آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا بر ارگان‌های داخلی جنین در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است که گروه‌های تجربی مختلف را نشان داده است. در جنین‌های متعلق به گروهی که استخراج آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا را دریافت کرده بودند، حضور قابل توجه هیپریمی و گشاد شدن فضاهای ویرچو-رابین در بافت مغز مشاهده شد. این هیپریمی و گشاد شدن فضاهای ویرچو-رابین عمده‌تاً به ورم مغزی نسبت داده می‌شود. علاوه بر این، در کبد نیز گشاد شدن و هیپریمی ورید مرکزی قابل مشاهده بود. در مقابل، در جنین‌های گروه کنترل، تمامی بافت‌های بررسی‌شده، از جمله مغز و کبد، ظاهر ساختاری طبیعی و سالمی داشتند که نشان‌دهنده عدم وجود هرگونه تغییر پاتولوژیک بود.

کولیس‌های دقیق اندازه‌گیری شد تا اندازه‌گیری‌های دقیق از استخوان پیشانی تا انتهای دیستال استخوان شرمگاهی به دست آید. پس از اندازه‌گیری، جنین‌ها وزن شدند و شاخص وزن جنین نسبت به وزن تخم برای تسهیل تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای بین گروه‌ها محاسبه شد.

جنین‌های خارج شده به دقت زیر میکروسکوپ بررسی شدند تا اثرات عصاره آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا بر اندام‌های خارجی مختلف ارزیابی شود. برای تجزیه و تحلیل ضایعات میکروسکوپی، نمونه‌های اندام‌های داخلی، به‌ویژه از مغز و کبد، جمع‌آوری شدند. پس از جمع‌آوری، این نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و برای تهیه مقاطع بافتی آماده شدند. بلوک‌های پارافینی از نمونه‌ها ایجاد و مقاطع ۵ میکرونی تهیه شدند. سپس این مقاطع با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. ویژگی‌های بافت‌شناسی متعاقباً زیر میکروسکوپ بررسی و مقایسه شدند.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. روش آماری t-test برای ارائه تفسیر دقیق داده‌ها به کار گرفته شد. در مطالعه حاضر سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

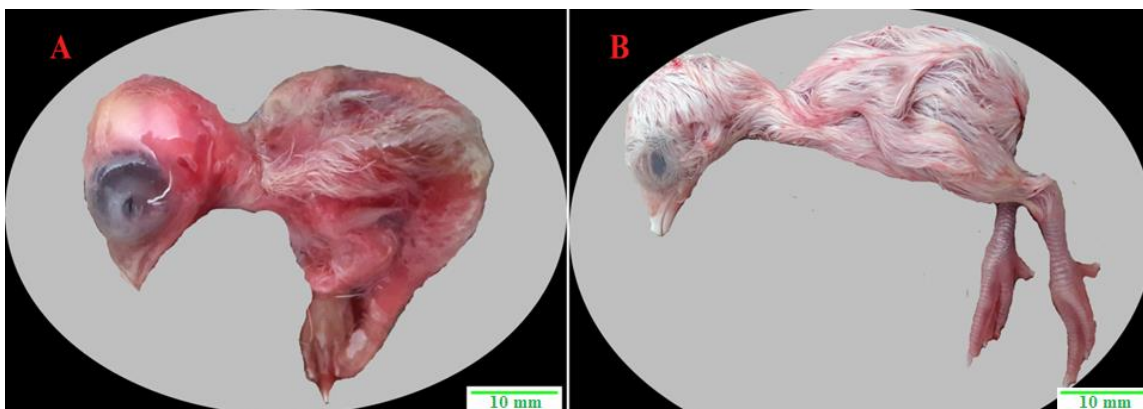
بررسی جنین‌ها در گروه‌هایی که عصاره آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا را دریافت کردند، نشان داد که تزریق این عصاره به تخم‌ها به طور معنی‌داری باعث کاهش وزن و رشد جنین‌ها در طول دوره رشدشان شده است. به طور خاص، آنتی‌ژن باعث کاهش قابل توجه در پارامترهای مربوط به وزن کلی و

جدول ۱- آثار عصاره آنتی‌ژنی ویروس آنفلوانزا بر وزن و رشد جنین

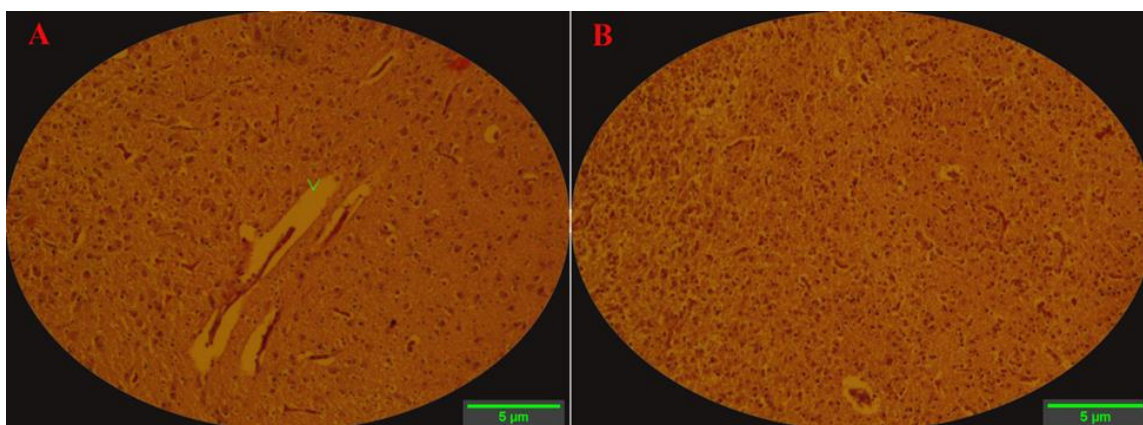
عصاره آنتی‌ژنی ویروس آنفلوانزا	PBS	پارامتر
50 ± 8^b	78 ± 4^a	طول بدن (میلی‌متر)
0.40 ± 0.23^b	0.70 ± 0.13^a	وزن جنین به وزن تخم‌مرغ

اعداد $\pm$ SD میانگین هستند.

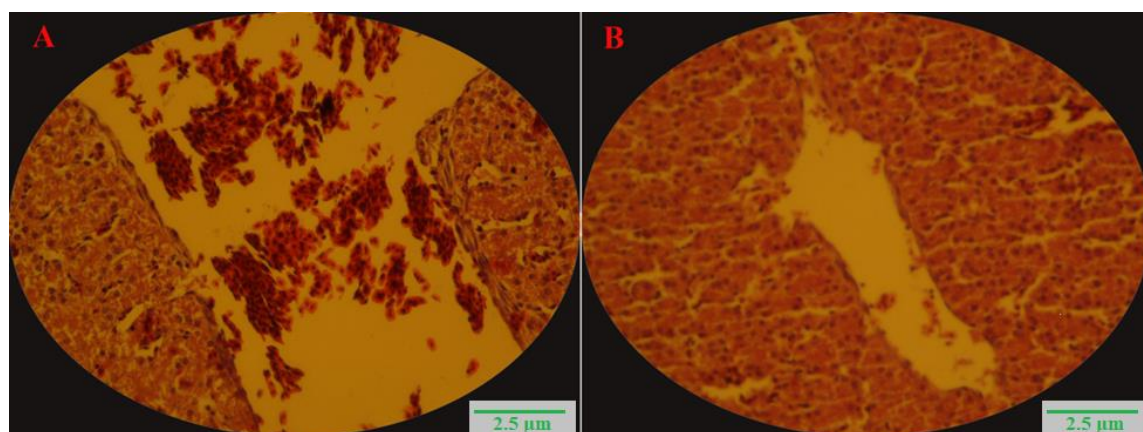
^{a,b} حروف متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار هستند ($P < 0.05$).



شکل ۱- بررسی اثر ویروس روی جنین، A گروه دریافت کننده ویروس، B گروه دریافت کننده PBS



شکل ۲- جنین دریافت کننده عصاره آنتی‌ژن ویروس آنفلوآنزا (A) و کنترل دریافت کننده PBS (B)؛ هیپرمی و اتساع فضای ویرشو-رابین (فلش) در بافت مغز به دلیل ادم مغزی مشاهده می‌شود (هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۱۰۰ برابر).



شکل ۳- جنین دریافت کننده عصاره آنتی‌ژن ویروس آنفلوآنزا (A) و کنترل دریافت کننده PBS (B)؛ اتساع و هیپرمی ورید مرکزی در کبد مشاهده می‌شود (هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۲۰۰ برابر).

بحث

ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2، به عنوان یکی از مهم ترین عوامل بیماری زا در پرندگان، نه تنها زیان های اقتصادی فراوانی به صنعت طیور وارد کرده، بلکه با توجه به گزارشاتی از قابلیت انتقال به انسان، نگرانی هایی در حوزه بهداشت عمومی نیز ایجاد نموده است. مطالعات قبلی بیشتر بر جنبه های اپیدمیولوژیک، ایمنی زایی و ویژگی های ژنومی این ویروس متمرکز بوده اند، اما اطلاعات اندکی درباره تأثیر مستقیم آنتی ژن های ویروسی آن بر رشد و تکوین جنین های طیور وجود دارد (۲). از این رو، بررسی حاضر با هدف پر کردن این خلأ علمی، اثرات عصاره آنتی ژنی ویروس H9N2 را بر مراحل مختلف رشد جنینی مورد ارزیابی قرار داده است.

بررسی های این مطالعه نشان داد که قرارگیری جنین در معرض عصاره آنتی ژن ویروس آنفلوانزا در مرحله حساس اندام زایی (روز چهارم انکوباسیون)، منجر به کاهش قابل توجه وزن و طول بدن جنین ها شد. علاوه بر این، ناهنجاری هایی در ساختار خارجی و نشانه های پاتولوژیک در بافت های مغز و کبد، نظیر هیپرمی و گشادشدگی فضاهای ویرچو-رابین، مشاهده گردید. این نتایج حاکی از آن است که ترکیبات آنتی ژنی ویروس H9N2 می توانند به طور بالقوه مسیرهای طبیعی رشد و تمایز بافتی را مختل نمایند. چنین نتایجی می تواند بسیار حایز اهمیت باشند؛ زیرا نشان می دهند که حتی قرارگرفتن در معرض این ویروس می تواند فرایندهای رشد طبیعی جنین را مختل نماید (۸، ۱۲).

مطالعه حاضر با نتایج برخی پژوهش های پیشین هم راستا است. در مطالعه مشابه دیگری، تأثیرات پاتولوژیک ویروس آنفلوانزای پرندگان H9 با حدت پایین در جوجه های گوشتی بررسی شد. در این تحقیق، آلودگی تجربی از طریق مسیرهای داخل بینی، چشمی و خوراکی در سن ۲۱ روزگی انجام گرفت. علائم بالینی متوسطی از دو روز پس از آلودگی ظاهر شد که در روز پنجم به اوج شدت رسید و از روز هفتم به بعد کاهش یافت. بیشترین شدت علائم و ضایعات در دستگاه تنفسی مشاهده شد، به ویژه در پرندگانی که از طریق بینی آلوده شده بودند. مرگومیر قابل توجهی مشاهده نشد و

تنها در گروه های آلوده شده از طریق بینی و خوراکی، هر کدام یک مورد مرگ ثبت شد. در ارزیابی آسیب شناسی بافت ها، نای به طور شدید دچار پرخونی و ریه ها دچار احتقان بودند. همچنین، در تمامی گروه های تیمار، احتقان متوسط کلیه ها و نکرورز خفیف بافت کبد مشاهده گردید (۴).

در مطالعه ای مشابه در بنگلادش، به بررسی ویژگی های بیماری زایی ویروس H9N2 با بیماری زایی پایین (LPAI) در سویه های تجاری مرغ های بومی (سونالی) و گوشتی پرداخته شد. در این تحقیق، ویروس های جدا شده از اپیدمی های آن کشور، از نظر ژنتیکی مورد تحلیل قرار گرفتند و طی آزمایش عفونت تجربی با دوز 10^6 EID₅₀ از طریق مسیرهای بینی و چشم انجام شد. بر اساس نتایج، اگرچه هیچ مرگومیری در بین پرندگان مشاهده نشد، اما بررسی های ماکروسکوپی و بافت شناسی، ضایعات خفیف تا متوسطی مانند خونریزی، احتقان و التهاب در نای، ریه و روده ها تا روز هفتم پس از عفونت را نشان داد. این ضایعات در روز دهم به تدریج کاهش یافتند. همچنین، ویروس بیشتر در دستگاه تنفسی تکثیر یافته و دفع آن از طریق ترشحات حلقی - دهانی بیشتر از مسیر کلوک گزارش شد. یافته های این مطالعه نیز مانند پژوهش حاضر، نشان دهنده بیماری زایی خفیف ویروس H9N2 در جنین یا طیور جوان بوده و گویای پتانسیل آسیب ویروسی حتی در غیاب علائم بالینی واضح است (۶).

در مطالعه ای مشابه باهدف بررسی وضعیت ویروس آنفلوانزای پرندگان H9N2 در مصر و ارزیابی بیماری زایی آن در جوجه های گوشتی، از میان ۱۰۰ گله بررسی شده، ۳۲ گله (معادل ۳۲ درصد) به ویروس با بیماری زایی پایین H9N2 آلوده تشخیص داده شدند. نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که تمام سویه های جدا شده در این مطالعه به دودمان G1 تعلق دارند و قرابت ژنتیکی نزدیکی با سویه های اسرائیلی دارند. پس از آلودگی آزمایشگاهی، علائم تنفسی (رال، عطسه، ترشحات بینی و چشم)، اسهال سفید تا سبز رنگ، افسردگی و بی اشتها در طیور مشاهده شد و میزان مرگومیر تا ۲۰ درصد گزارش گردید. همچنین، کاهش قابل توجهی در وزن بدن طیور آلوده نسبت به گروه شاهد



اختلالات، همچنین بررسی سایر اندام‌ها و مسیرهای تنظیم رشد، توجه بیشتری مبذول گردد.

منابع

- 1- Abdel Hamid H, Ellakany H, Hussien H, El-Bestawy A, Abdel Baky K. Pathogenicity of an Avian Influenza H9N2 Virus isolated From Broiler Chickens in Egypt. *Alex J Vet Sci.* 2016; 51(2).
- 2- Abdelwhab EM, Abdel-Moneim AS. Orthomyxoviruses. *Recent Adv Anim Virol.* 2019; 351-78.
- 3- Alizadeh E, Kheiri M, Bashar R, Tabatabaeian M, Hosseini SM, Mazaheri V. Avian Influenza (H9N2) among poultry workers in Iran. *Iran J Microbiol.* 2009; 1(3): 3-6.
- 4- Aslam R, Aslam A, Tipu Y, Nazir J, Ghafoor A, Fatima S. Histopathological and immunohistochemical studies for the pathogenesis of a low pathogenicity H9 avian influenza virus in experimentally infected commercial broilers. *JAPS: J Anim Plant Sci.* 2015; 25(1).
- 5- Bashashati M, Chung DH, Fallah Mehrabadi MH, Lee DH. Evolution of H9N2 avian influenza viruses in Iran, 2017–2019. *Transbound Emerg Dis.* 2021; 68(6): 3405-3414.
- 6- Begum JA, Hossain I, Nooruzzaman M, King J, Chowdhury EH, Harder TC, et al. Experimental pathogenicity of H9N2 avian influenza viruses harboring a tri-basic hemagglutinin cleavage site in Sonali and broiler chickens. *Viruses.* 2023; 15(2): 461.
- 7- Javanian M, Barary M, Ghebrehewet S, Koppolu V, Vasigala V, Ebrahimpour S. A brief review of influenza virus infection. *J Med Virol.* 2021; 93(8): 4638-4646.
- 8- Jin H, Wang W, Yang X, Su H, Fan J, Zhu R, et al. Evolution of H9N2 avian influenza virus in embryonated chicken eggs with or without homologous vaccine antibodies. *BMC Vet Res.* 2018; 14: 1-11.

مشاهده شد (به‌طور میانگین ۲۹۰ گرم کاهش وزن). یافته‌های هیستوپاتولوژیک نیز شامل کاهش لنفوسیت‌ها در تیموس، آتروفی فولیکول‌ها و ایجاد فولیکول‌های کیستی در بورس فابریسیوس بود که نشانگر ایجاد سرکوب سیستم ایمنی در طیور آلوده می‌باشد (۱).

مطالعات ذکر شده از ویروس فعال یا نیمه‌فعال برای بررسی اثرات مختلف ویروس H9N2 استفاده کرده‌اند، اما ویژگی بارز پژوهش حاضر استفاده صرف از عصاره آنتی‌ژنی است؛ بدین معنا که حتی در غیاب ویروس زنده نیز تغییرات پاتولوژیک قابل توجهی قابل وقوع است.

از سوی دیگر، برخلاف برخی مطالعاتی که تنها به توصیف ظاهری ناهنجاری‌های جنینی پرداخته‌اند، تحقیق حاضر علاوه بر ارزیابی ظاهری، شواهد بافت‌شناسی و آماری مستندی از اثرات منفی آنتی‌ژن ارائه می‌دهد. باین‌حال، علی‌رغم مشاهده آسیب‌های قابل‌توجه، به دلیل محدود بودن تعداد نمونه‌ها و تمرکز تنها بر اندام‌های مغز و کبد، نمی‌توان با قطعیت در مورد سایر ارگان‌ها اظهارنظر کرد.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به تعداد نسبتاً کم تخم‌های بررسی‌شده، محدود بودن بررسی‌ها به برخی بافت‌ها و نیز استفاده از تنها یک دوز آنتی‌ژنی اشاره کرد. همچنین، بررسی حاضر صرفاً بر پایه مدل طیوری انجام شده و ارتباط مستقیمی با انسان، به‌ویژه زنان باردار، برقرار نشده است؛ بنابراین، تعمیم نتایج به جمعیت انسانی نیازمند احتیاط و انجام پژوهش‌های بیشتر در مدل‌های پستانداران یا سلولی است.

در مجموع، یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که حتی ترکیبات غیرفعال ویروسی مانند عصاره آنتی‌ژنی H9N2 نیز می‌توانند تأثیرات منفی قابل توجهی بر رشد جنینی طیور داشته باشند. این موضوع می‌تواند از منظر زیستی و بهداشتی حائز اهمیت باشد، به‌ویژه در مناطقی که ویروس H9N2 بومی بوده و تماس با آن رایج است. در نهایت، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی به بررسی سازوکارهای مولکولی زمینه‌ساز این





- Nucleotide Variants (SNVs) Induced by Passages of Equine Influenza Virus H3N8 in Embryonated Chicken Eggs. *Viruses*. 2021; 13(8): 1551.
- 13- Tare DS, Pawar SD. Use of embryonated chicken egg as a model to study the susceptibility of avian influenza H9N2 viruses to oseltamivir carboxylate. *J Virol Methods*. 2015; 224: 67-72.
- 14- Webster RG. Influenza: an emerging disease. *Emerg Infect Dis*. 1998; 4(3): 436.
- 9- Parija SC. Orthomyxoviruses. In: *Textbook of Microbiology and Immunology*. Springer; 2023. p. 797-809.
- 10- Pleschka S. Overview of influenza viruses. *Swine influenza*. 2012: 1-20.
- 11- Pu J, Wang S, Yin Y, Zhang G, Carter RA, Wang J, et al. Evolution of the H9N2 influenza genotype that facilitated the genesis of the novel H7N9 virus. *Proc Natl Acad Sci*. 2015; 112(2): 548-53.
- 12- Rozek W, Kwasnik M, Socha W, Sztromwasser P, Rola J. Analysis of Single





Pathological effects of avian influenza virus antigens (H9N2 subgroup) using a chicken embryo model

Shirin Mohammadipour^{1*}; Hadi Tavakoli²; Aram Sharifi³; Sepideh Asadi³; Mojtaba Khosravi⁴

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman- Iran.
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman- Iran.
3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Kurdistan- Iran.
4. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol- Iran.

Summary

Received: 27 February 2025

Accepted: 21 May 2025

The H9N2 subtype of influenza virus is prevalent not only across various regions in Iran but also poses a zoonotic risk, capable of transmission from birds to humans. This makes it a potential candidate for future pandemic outbreaks. The present study was aimed to investigate the pathological effects of avian influenza virus antigens (H9N2 subgroup) on the chicken embryo. Accordingly, the antigenic extracts of the H9N2 virus at a dose of 10⁶ EID₅₀/ml were injected into commercial fertilized eggs to assess the pathological effects on developing embryos. The findings indicated significant adverse impacts on embryonic weight and growth throughout development, notably reducing parameters associated with embryonic mass and growth rates ($P < 0.05$). Severe pathological effects were observed in the brain and liver tissues of the embryos. This study suggests that the indigenous H9N2 subtype in Iran can cause extensive pathological impacts on developing embryos. Further studies are needed to investigate the molecular and cellular mechanisms through which the H9N2 influenza antigen affects embryonic development.

Keywords: Influenza, Commercial poultry, Zoonosis, H9N2

*Corresponding author: mohammadipourshirin20@gmail.com; a.sharifi@uok.ac.ir

