Archive of SID

جداسازی و تشخیص مولکولی پارامیکزوویروس-۱ کبوتری از کبوتران مشکوک به بیماری نیوکاسل در شهرستان اهواز

منصور میاحی[۱*]، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۲]، رمضانعلی جعفری[۳] و مهرداد خسروی‌فارسانی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۴

چکیده

بیماری نیوکاسل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی پرندگان است که گونه‌های زیادی از پرندگان از جمله ماکیان اهلی و کبوتران را آلوده می‌کند. سویه‌ی حادِ ویروس بیماری نیوکاسل که عامل ایجاد کننده‌ی این بیماری در کبوتران است پارامیکزوویروس-۱ کبوتری (PPMV-1) نام دارد و می‌تواند باعث بیماری نیوکاسل در ماکیان اهلی نیز شوند. به منظور جداسازی و تشخیص ملکولی PPMV-1، از ۵۰ گله‌ی کبوتر در شهرستان اهواز در خلال سال‌های ۹۳-۹۲، نمونه‌برداری از طریق سوآب‌های کلوآکی و دهانی- نایی انجام شد. همچنین از مغز، نای، ریه، کبد، طحال و لوزه‌های سکومی برخی پرندگان تلف شده نیز نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها به تخم‌مرغ‌های جنین‌دار ۱۱-۹ روزه تلقیح شدند و تایید مثبت بودن مایع آلانتوییک دارای فعالیت هماگلوتیناسیون با آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون با سرم اختصاصی ضد PPMV-1، انجام شد. سپس RNAی ویروس نمونه‌ها استخراج گردید و از روی آن cDNA سنتز شد. در واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز (PCR) از توالی‌های پرایمری که قطعه‌ی ۵۳۵ جفت بازی تولید می‌کرد، استفاده گردید. در نهایت محصولات PCR به وسیله‌ی الکتروفورز آنالیز شدند. نتایج این مطالعه نشان داد ۹ گله از ۵۰ گله، در جداسازی در تخم‌مرغ جنین‌دار و آزمون هماگلوتیناسیون سریع مثبت بودند. آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون با سرم اختصاصی PPMV-1 تایید کرد تمامی ویروس‌های جداشده PPMV-1 هستند. درصد فراوانی جداسازی در این مطالعه از کبوتران مشکوک به آلودگی با این ویروس، ۱۸ درصد بود. در PCR تمام ۹ گله، مثبت بودند و محصولات PCR این نمونه‌ها، باند ۵۳۵ جفت بازی را در الکتروفورز نشان دادند. یافته‌های این مطالعه تایید می‌کنند PPMV-1 در کبوتران شهرستان اهواز انزوتیک بوده و می‌تواند همواره تهدیدی برای صنعت پرورش ماکیان اهلی باشد، لذا توالی‌یابی و تعیین ناحیه‌ی شکافت ویروس؛ قرنطینه، حذف و واکسیناسیون مؤثر کبوتران آلوده و بررسی حدت این ویروس‌ها در ماکیان صنعتی در پیش‌گیری و کنترل بیماری و چرخش آن از کبوتران به ماکیان و بالعکس بسیار حائز اهمیت است.

کلمات کلیدی: بیماری نیوکاسل، پارامیکزوویروس-۱ کبوتری، جداسازی، PCR

مقدمه

بیماری نیوکاسل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی پرندگان است که گونه‌های زیادی از پرندگان از جمله ماکیان اهلی و کبوتران را آلوده می‌کند و گسترش جهانی دارد. این بیماری تلفات قابل توجهی را به صنعت طیور دنیا از جمله کشورمان تحمیل می‌کند. بیماری نیوکاسل به وسیله‌ی سویه‌های حادی از سروتایپ ۱ پارامیکزوویروس پرندگان (APMV-1) ایجاد می‌گردد. علاوه بر گونه‌های پرندگان اهلی همچون ماکیان اهلی، آلودگی‌های طبیعی و تجربی با ویروس بیماری نیوکاسل حداقل در ۲۴۱ گونه از ۲۷ راسته از ۵۰ راسته‌ی پرندگان مشاهده شده است (Kaleta and Baldauf 1988).

[۱*] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: mansoormayahi@scu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۴] دانشجوی دکترای تخصصی بهداشت و بیماری‌های طیور، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

www.SID.ir

Archive of SID

ویروس بیماری نیوکاسل در خانواده‌ی پارامیکزوویریده، تحت‌خانواده‌ی پارامیکزوویرینه و جنس آوولاویروس قرار دارد. ژنوم این ویروس، RNA تک‌رشته‌ایِ ۱۵ کیلو بازی است. ویروس بیماری نیوکاسل بر اساس حدت به سویه‌های لنتوژن، مزوژن، ولوژن و بدون نشانه طبقه‌بندی می‌شوند. تعیین حدت ویروس بیماری نیوکاسل به طور عمده به ناحیه‌ی شکافت پروتئین الحاق (F) بستگی دارد (Office International des Epizooties 2012, Saif et al. 2008).

انتقال این بیماری که به صورت افقی است از طریق استنشاق و بلع ذرات یا آئروسل‌های آلوده به ویروس صورت می‌گیرد. یکی از راه‌های انتقال این بیماری از طریق پرندگان زنده از جمله کبوترها صورت می‌گیرد (Meulemans 1988).

عفونت حاد پارامیکزوویروس نوع ۱ در کبوتر با مرگ و میر بالا، تنفس سریع و ضعف همراه است و درجات متغییری از درگیری تنفسی و ادم پیرامون چشم‌ها و سر دیده می‌شود. مهم‌ترین نشانه‌های بیماری نیوکاسل در کبوتر اسهال و نشانه‌های عصبی است و برخلاف ماکیان، نشانه‌های تنفسی دیده نمی‌شود. نشانه‌های عصبی شامل فلج یک طرفه یا دوطرفه در پاها یا بال‌ها، حرکت دایره مانند و لرزش در ناحیه‌ی سر و گردن است. در کبوتران مادر تخم‌گذار، کاهش در تعداد تخم‌ها و جوجه‌درآوری و نشانه‌های گوارشی به ویژه اسهال دیده شده است. نشانه‌های بالینی و کالبدگشایی در ماکیان بسته به شکل و حدت بیماری از تنفسی، گوارشی، عصبی و بدون نشانه متفاوت است. در ماکیان نشانه‌های بالینی شامل کاهش اشتها، کم شدن و یا توقف تخم‌گذاری، اسهال آبکی متمایل به سبز، فلج پا و بال، پیچش گردن، رال‌های تنفسی، سرفه و نفس‌نفس زدن است (Jordan et al. 2008, Kim et al. 2007, Saif et al. 2008).

از اوایل دهه‌ی ۱۹۸۰ تا کنون یک همه‌گیری ادامه‌دار در کبوتران وجود دارد. سویه‌ی حاد ویروس بیماری نیوکاسل که مسئول این بیماری در کبوتران بوده پارامیکزوویروس نوع ۱ کبوتر نامیده شده (PPMV-1) که سبب بیماری حاد نیوکاسل در ماکیان نیز می‌گردد (Saif et al. 2008). کبوتران منبع بالقوه‌ای برای بیماری حاد نیوکاسل بوده و معمولاً نادیده گرفته می‌شوند. این پرندگان در دسته‌های بزرگی وجود دارند و به طور آزادانه در حال پروازند و می‌توانند در انتقال بیماری حاد نیوکاسل به ایفای نقش بپردازند. بیماری نیوکاسل در کبوتران شبیه به فرم با گرایش عصبی در ماکیان اهلی و بدون حضور نشانه‌های تنفسی است که برای اولین بار در خاورمیانه ظهور کرد و سپس به اروپا رسید و پس از آن گزارش‌های متعددی از این بیماری در سراسر جهان ثبت گردیده است (Alexander et al. 1985a, Alexander et al. 1987, Kaleta et al. 1985, Pearson et al. 1987, Weingartl et al. 2003, Toro et al. 2005, Abolnik et al. 2008, Irvine et al. 2009).

انتقال بیماری نیوکاسل واریانت کبوتری به ماکیان اهلی در چندین کشور از جمله انگلستان رخ داده است (Alexander et al. 1985b). بیماری در کبوتران سال‌هاست که شناخته شده، اما به نظر می‌رسد که در کشورهای زیادی از جمله کشور ما به صورت انزوتیک باقی‌مانده و تهدیدی پابرجا برای صنعت طیور می‌باشد.

در ایران به ویژه در ناحیه‌هایی که ویروس بیماری نیوکاسل انزوتیک بوده، نظارت بیش‌تر روی مزارع ماکیان متمرکز است و در خصوص جداسازی و تعیین هویت ویروس بیماری نیوکاسل در کبوتر و نقش آن در بیماری‌زایی برای ماکیان اهلی در کشورمان مطالعات زیادی صورت نگرفته است. بر این اساس، به منظور جداسازی و تشخیص مولکولی ویروس بیماری نیوکاسل در کبوتران این مطالعه به وسیله‌ی کشت نمونه‌های مشکوک در تخم‌مرغ جنین‌دار ماکیان و تکثیر قطعه‌ی مربوط به ناحیه‌ی شکافت انجام گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش کار

نمونه‌برداری

در این مطالعه که در سال ۱۳۹۳-۱۳۹۲ در فصول مختلف صورت گرفت، از ۵۰ گله‌ی کبوتر (۹۵ کبوتر) شامل کبوتران خانگی در شهرستان اهواز و موارد ارجاعی به بخش بیماری‌های پرندگان دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که دارای تاریخچه‌ی مشخص و ثبت شده در کاربرگ‌های ویژه‌ی مطالعه بودند، نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌برداری از کبوتران زنده‌ی مشکوک به بیماری نیوکاسل (۲۲ گله) از طریق سوآب‌های کلوآکی و دهانی- نایی انجام شد. هم‌چنین از کبوتران مشکوک تلف شده از مغز، نای، ریه، کبد، طحال و لوزه‌های سکومی نمونه‌برداری گردید (۲۸ گله) و نمونه‌ها در کنار یخ به همراه بافر نمکی فسفات در pH=7.0-7.4 به آزمایشگاه بخش بیماری‌های طیور منتقل شدند. نمونه‌های سوآبی در یک محیط دارای آنتی‌بیوتیک کافی به نسبت ۲۰ درصد وزنی قرار گرفتند. آنتی‌بیوتیک‌ها شامل پنی‌سیلین IU/ml ۲۰۰۰، استرپتومایسین mg/ml ۲، جنتامایسین µg/ml ۵۰ و آمفوتریسین B ml/IU (10 µg) ۱۰۰۰ بودند و در نمونه‌های آلوده به مدفوع این مقادیر تا ۵ برابر نیز مورد استفاده قرار گرفت (Saif et al. 2008, Office International des Epizooties 2012) و تا زمان انجام مراحل بعدی در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جداسازی ویروس

یک گرم از بافت‌ها در میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی قرار داده شد تا به دمای محیط برسند، سپس به صورت مخلوط همگن درآمده و ۱ سی‌سی بافر نمکی فسفات دارای آنتی‌بیوتیک‌های یاد شده به آن اضافه گردید. هم-چنین نمونه‌های سوآب‌های کلوآکی، دهانی- نایی نیز به صورت همگن درآمدند (در هنگام تهیه و انتقال این نمونه‌ها آنتی‌بیوتیک‌های مورد نیاز اضافه شدند و نمونه‌های سوآبی یک گله به صورت مخلوط ترکیبی و واحد در آمدند). میزان ۰/۱ تا ۰/۲ میلی‌لیتر از مایع شناور رویی نمونه‌های مشکوک که پس از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه آماده شدند به روش تلقیح داخل حفره‌ی آلانتوییک به ۵ تخم‌مرغ جنین‌دار ۹ تا ۱۱ روزه تلقیح گردیدند. پس از انکوباسیون جنین‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵ درصد، تلفات احتمالی روز اول حذف شدند و تلفات روزهای دوم تا هفتم یادداشت گردید و تخم‌مرغ‌های تلف شده در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت یا یک شب سرد گشته و سپس مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ‌های جنین‌دار جمع‌آوری شد (Alexander 1987, Office International des Epizooties 2008, Meulemans et al. 2002).

آزمون هماگلوتیناسیون سریع

مایع حفره‌های آلانتوئیک به دست آمده، برای فعالیت هماگلوتیناسیون آزمایش شدند؛ به طور اختصار ۲۵ میکرولیتر از RBC شسته و آماده شده‌ی ۵ درصد روی لام‌های مخصوص آزمون هماگلوتیناسیون سریع ریخته و سپس ۲۵ میکرولیتر از مایع حفره‌ی آلانتوییک استخراج شده روی خون ریخته و به آرامی با یکدیگر مخلوط شده، سپس فعالیت هماگلوتیناسیون مشاهده و ثبت گردید. نمونه‌های منفی از نظر آزمون هماگلوتیناسیون سریع، مجدداً، در تخم‌مرغ جنین‌دار تلقیح شدند (Office International des Epizooties 2012).

آزمون هماگلوتیناسیون به روش میکروتیتراسیون

به اختصار ۵۰ میکرولیتر PBS در هر گوده ریخته شده سپس از مایع حفره‌ی آلانتوییک که به روش هماگلوتیناسیون سریع مثبت تشخیص داده شد میزان ۵۰ میکرولیتر در گوده‌ی اول ریخته و از آن رقت‌های سریالی تهیه گردید. سپس از گلبول قرمز ۰/۵ درصد به میزان ۵۰ میکرولیتر به تمام گوده‌ها اضافه شد. برای مخلوط شدن بهتر گلبول‌های قرمز با آنتی‌ژن، میکروپلیت چند دقیقه‌ای

www.SID.ir

Archive of SID

روی یک سطح صاف تکان داده شد و پس از گذشت ۳۰ دقیقه با نشست گلبول‌های قرمز در ردیف کنترل گلبول‌های قرمز، نتیجه‌ی آزمایش قرائت گردید. آخرین رقتی که هماگلوتیناسیون کامل انجام شده بود مبنای محاسبه‌ی معیار آنتی‌ژن قرار گرفت. بنابراین به دنبال تیتراسیون آنتی‌ژن به روش HA میزان ۴ واحد HA جهت انجام آزمایش HI با سرم اختصاصی ضدویروس پارامیکزوویروس کبوتر برای تایید حضور ویروس پارامیکزوویروس کبوتری در مایعات حفره‌ی آلانتوییک تهیه شد (Dufour-Zavala et al. 2008, Office International des Epizooties 2012).

آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون با سرم اختصاصی پارامیکزوویروس-۱ کبوتری

تأیید حضور ویروس نیوکاسل توسط آزمون ممانعت از هماگلوتیناسون و با سرم اختصاصی انجام گرفت. به طور اختصار، در هر ردیف میکروپلیت، ۲۵ میکرولیتر محلول PBS ریخته شد. در گوده‌ی اول به میزان ۲۵ میکرولیتر از سرم اختصاصی ضد ویروس پارامیکزوویروس کبوتری (تهیه شده از بخش بهداشت و بیماری‌های طیور دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز) قرار داده شد؛ سپس از هر سرم رقت متوالی تهیه گردید. سپس به تمام رقت‌ها ۲۵ میکرولیتر آنتی‌ژن با عیار ۴ واحد هماگلوتیناسیون از ویروس مشکوک اضافه شد. پس از نیم ساعت از زمان لازم جهت مهار هماگلوتیناسیون به کلیه‌ی گوده‌ها ۲۵ میکرولیتر گلبول قرمز ۱ درصد اضافه گردید. پس از گذشت ۴۵-۳۰ دقیقه با نشست گلبول‌های قرمز در ردیف کنترل گلبول‌های قرمز، نتیجه‌ی آزمایش خوانده شد. نمونه‌هایی که در آن‌ها عیار پادتن ضد ویروس مطابق با عیار پادتنی سرم اختصاصی بود، به عنوان نمونه‌ی مثبت PPMV-1 در نظر گرفته شد (Alexander 1987, Dufour-Zavala et al. 2008, Meulemans et al. 2002, Office International des Epizooties 2012).

واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز

جهت استخراج اسید ریبونوکلئیک ویروس، ۳۰۰µl از مایع آلانتوئیک برداشته شده، در میکروتیوب‌های عاری از RNAase ریخته شد و مراحل کار طبق پروتکل کیت استخراج RNAی متعلق به شرکت سیناژن انجام گردید. RNAی استخراج شده با رونوشت‌برداری معکوس به cDNA تبدیل گردید. برای سنتز cDNA از کیت تجاری DART RT-KIT ساخت شرکت EURx کشور لهستان طبق پروتوکل استفاده شد. سپس DNA حاصل با پرایمرهای ژن F ویروس نیوکاسل تکثیر شد. پرایمرها و برنامه‌های دمایی PCR مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. دو پرایمر به کار گرفته شده، قطعه‌ی ۵۳۵ جفت بازی را می‌سازند که نوکلئوتیدهای ۴۷ تا ۵۸۱ از ژن F ویروس را در در برمی‌گیرند (Liu et al. 2006). این برنامه‌ها مطابق برنامه‌های حرارتی Liu و همکاران که در سال ۲۰۰۶ ارائه گردید، در دستگاه ترموسایکلر Quanta Biotech ساخت کشور انگلستان انجام شد (Berhanu et al. 2010, Liu et al. 2006). مواد PCR از شرکت سیناژن ساخت ایران تهیه و واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر (۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ واحد آنزیم DNA Taq پلی‌مراز، ۱ میکرولیتر با غلظت ۱۰ میکرومولار از هر پرایمر، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۳۵ میکرولیتر آب عاری از RNase) انجام گردید. در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز (ساخت سیناژن، ایران) ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: مشخصات پرایمرها و واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز

توالی پرایمرها	دما و زمان سیکل‌ها			سیکل	اندازه‌ی محصول
	Denaturation	Anealing	Elongation		
Sense: 5'-ATG GGC (C/T)CC AGA (C/T)CT TCT AC-3' Antisense: 5'-CTG CCA CTG CTA GTT GTG ATA ATC C-3'	۹۴ °C ۱ دقیقه	۵۶ °C ۲ دقیقه	۷۲ °C ۱ دقیقه	۳۵	۵۳۵

نتایج

توزیع و شدت آلودگی بافتی کبوتران آلوده به ویروس پارامیکزوویروس- ۱ در جدول ۲ و نمودارهای ۱ و ۲ آورده شده است. از ۵۰ مرکزی که نمونه‌گیری انجام شد و کبوتران، مشکوک به بیماری نیوکاسل و آلوده به پارامیکزوویروس- ۱ کبوتری تشخیص داده شدند، ۹ مرکز در جداسازی در تخم‌مرغ جنین‌دار، توسط آزمایش‌های هماگلوتیناسیون سریع و میکروهماگلوتیناسیون، مثبت تشخیص داده شد و تایید حضور پارامیکزوویروس-۱ کبوتری توسط آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون با سرم اختصاصی پارامیکزوویروس- ۱ کبوتری و واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز، انجام شد. درصد فراوانی جداسازی در این مطالعه از کبوتران مشکوک به آلودگی پارامیکزوویروس- ۱ کبوتری (۹ مورد از ۵۰ گله) ۱۸ درصد بود که ۱۰ درصد متعلق به کبوتران مشکوک زنده و ۸ درصد متعلق به کبوتران مشکوک تلف شده بود. درصد جداسازی در کبوتران مشکوک زنده (۵ مورد از ۲۲ گله) ۲۲/۷ درصد و در کبوتران مشکوک تلف شده (۴ مورد از ۲۸ گله) ۱۴/۳ درصد بود.

در کبوتران مشکوک زنده (۲۲ گله)، درصد فراوانی جداسازی و تعیین هویت مثبت پارامیکزوویروس-۱ کبوتری در سوآب دهانی- نایی (۵۷ درصد) و سوآب کلوآکی (۴۳ درصد) بود.

درصد فراوانی جداسازی و تعیین هویت مثبت پارامیکزوویروس-۱ کبوتری در بافت‌های کبوتران مشکوک تلف شده (۲۸ گله) شامل مغز و لوزه‌های سکومی به طور مشترک (۳۳/۵ درصد)، نای-ریه و کبد به طور مشترک (۱۶/۵ درصد) و طحال (۰ درصد) بود.

همچنین در ۱۳ نمونه ژن اختصاصی F از پارامیکزوویروس- ۱ کبوتری وجود داشت و قطعه‌ی ۵۳۵ جفت بازی از ژن F در آزمون زنجیره‌ی پلیمراز تکثیر گردید (تصویر ۱).

جدول ۲: توزیع و شدت آلودگی بافتی ویروس پارامیکزوویروس-۱ کبوتری (PPMV-1) در کبوتران آلوده به ویروس

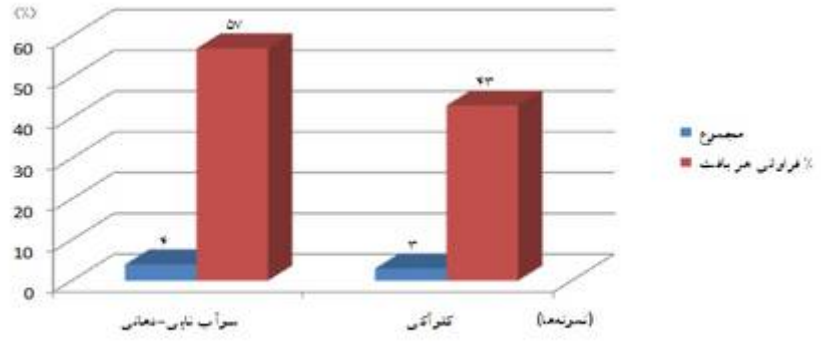
کبوتران مشکوک زنده (۲۲ گله)			کبوتران مشکوک تلف شده (۲۸ گله)					
شماره نمونه	سوآب		شماره نمونه	نمونه‌های بافتی				
	دهانی- نایی	کلوآکی		مغز	نای- ریه	کبد	طحال	لوزه‌های سکومی
۱		+ (۵)	۱					+ (۷)
۲	+ (۶)		۲	+ (۶)				
۳	+ (۷)	+ (۳)	۳		+ (۶)	+ (۷)		+ (۶)
۴	+ (۷)		۴	+ (۷)				
۵	+ (۵)	+ (۵)						
مجموع	۴	۳	مجموع	۲	۱	۱	۰	۲
درصد فراوانی هر بافت	٪۵۷	٪۴۳	درصد فراوانی هر بافت	۳۳/۵	٪۱۶/۵	٪۱۶/۵	۰	۳۳/۵

۱) + : نمونه‌های مثبت

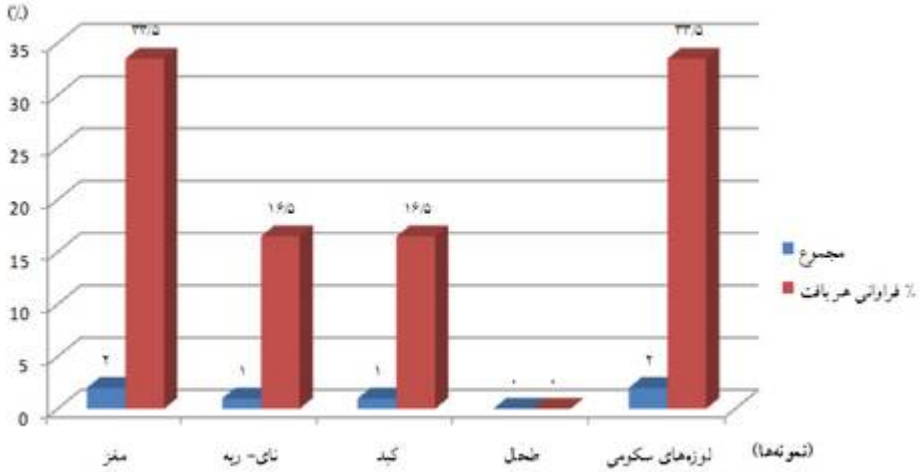
۲) اعداد داخل پرانتز: عیار هماگلوتیناسیون ویروس جداشده در مایع آلانتوییک با آزمون هماگلوتیناسیون به روش میکروتیتراسیون

www.SID.ir

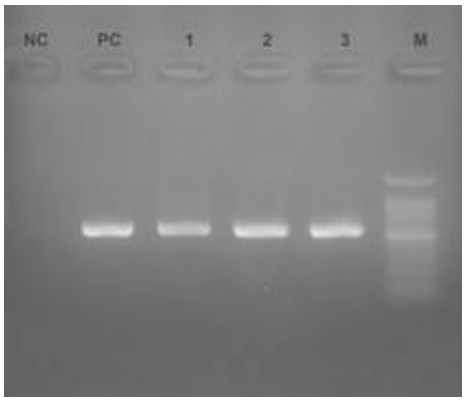
Archive of SID



نمودار ۱: میزان و درصد فراوانی بافت‌های آلوده به پارامیکزوویروس-۱ کبوتری در کبوتران زنده‌ی مشکوک (۲۲ گله) در تلقیح به تخم‌مرغ جنین‌دار و تایید تشخیص توسط آزمون‌های هماگلوتیناسیون، ممانعت از هماگلوتیناسیون با سرم اختصاصی PPMV-1 و واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز.



نمودار ۲: میزان و درصد فراوانی بافت‌های آلوده به پارامیکزوویروس-۱ کبوتری در کبوتران تلف شده‌ی مشکوک (۲۸گله) در تلقیح به تخم‌مرغ جنین‌دار و تایید تشخیص توسط آزمون‌های هماگلوتیناسیون، ممانعت از هماگلوتیناسیون با سرم اختصاصی PPMV-1 و واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز.



تصویر ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن F پارامیکزوویروس-۱ کبوتری. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ NC: کنترل منفی؛ PC: کنترل مثبت پارامیکزوویروس-۱ کبوتری (۵۳۵ جفت باز)؛ ۱، ۲ و ۳ نمونه‌های مثبت از نظر وجود پارامیکزوویروس-۱ کبوتری.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

APMV-1 تقریباً ۲۳۶ گونه از پرندگان زنده‌ی آزاد و خانگی به علاوه‌ی گونه‌های اهلی‌شده‌ی پرندگان از جمله کبوتر را آلوده می‌کند و از این رو این پرندگان می‌توانند سبب انتقال این ویروس گردند (Kaleta and Baldauf 1988). در خصوص بیماری نیوکاسل تحقیقات و مطالعات فراوانی در دنیا و کشورمان صورت پذیرفته، اما در خصوص نقش سایر پرندگان از جمله کبوتران برخلاف بسیاری از کشورهای دنیا در کشور ما مطالعه‌های چندانی صورت نپذیرفته است.

مطالعه‌ی حاضر که با جداسازی و تشخیص پارامیکزوویروس نوع ۱ کبوتری به روش واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز در اهواز توأم بود و جزء معدود مطالعات در ارتباط با این موضوع در کشور است. پیش از این قاسمی و همکاران در سال ۱۳۸۲ توانستند از موارد مشکوک به بیماری نیوکاسل در شهرستان اهواز ۵۸ درصد جداسازی ویروس را در تخم‌مرغ جنین‌دار با آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون با آنتی‌سرم ویروس کلاسیک بیماری نیوکاسل انجام دهند، اما در مطالعه‌ی ایشان تشخیص مولکولی این ویروس با استفاده از واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز انجام نشده است. اولین جداسازی پارامیکزوویروس نوع ۱ کبوتر (PPMV-1) توسط Kaleta و همکاران در سال ۱۹۸۵ گزارش شد و ویروس BVC 78 نامیده شد که ویژگی‌های آن بسیار مشابه با پارامیکزوویروس‌هایی بود که بعدها در سال ۱۹۸۲ و ۱۹۸۴ از کبوترهای بیمار در یک همه‌گیری در اروپا به دست آمد (Kaleta et al. 1985). پارامیکزوویروس‌های کبوتری دارای گسترش جهانی هستند. اگرچه در بسیاری از کشورها واکسینه کردن کبوتران مسابقه‌ای اجباری است، اما هیچ شکل کنترلی در کبوتران وحشی که به تناوب در تماس با ماکیان خانگی و با پرورش آزاد هستند، وجود ندارد. در کشور ما این امر وخیم‌تر بوده، چرا که هیچ قانونی در واکسینه کردن اجباری کبوتران اهلی نیز وجود نداشته و در صورت صحت تئوری انتقال بیماری نیوکاسل از کبوتران به فارم‌های صنعتی این پرندگان می‌توانند به عنوان کانون‌های مهمی در انتقال ویروس بیماری نیوکاسل ایفای نقش نمایند (Alexander et al. 1984, Alexander et al. 1985, Toro et al. 2005).

همچنان که جدایه‌های حاد PPMV-1 به صورت جهانی به چرخش و اشاعه در کبوتران ادامه می‌دهند، شیوع PPMV-1 در ماکیان اهلی نیز امکان‌پذیر است (Abolnik et al. 2008, Abolnik et al. 2004b, Alexander et al. 1984, Kim et al. 2007, Liu et al. 2007). جدایه‌های حاد پارامیکزوویروس ۱ کبوتر، که به صورت بالینی با گرایش عصبی در ماکیان اهلی بوده، برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ از کبوتران جدا گردید و پس از آن با گسترشی جهانی به گردش خود در پرندگان وحشی خانواده‌ی Columbidae ادامه داده است (Kaleta et al. 1985, Kim et al. 2007, Office International des Epizooties 2012). Alexander و همکاران در سال ۱۹۸۴ در شیوع بیماری نیوکاسل در ماکیان صنعتی در انگلستان ویروس‌هایی را جدا کردند که از نظر سرولوژیکی قابل تمایز از ویروس‌های جدا شده از کبوتران وحشی به دام افتاده در فروشگاه‌های تأمین کننده‌ی جیره‌ی گله‌های آلوده، نبودند. در مطالعه‌ی ایشان مدفوع کبوتران به صورت مصنوعی با ویروس PMV-1/Chicken/England/298/84 آلوده گردید و به ۱۲ مرغ خورانده شد. تمامی مرغان آلوده شده و در دو مورد نشانه‌های عصبی پیشرفت کرد و یک مورد نیز تلف گردید (Alexander et al. 1984).

در خلال سال‌های ۱۹۸۱ تا ۱۹۸۳ نوعی بیماری در کبوتر که اغلب با نشانه‌های عصبی مشخص می‌گردید در سراسر اروپا انتشار یافت. در مطالعه‌ای که توسط Alexander و همکاران در سال ۱۹۸۵ انجام گرفت، ۵۷ جدایه‌ی ویروس از کبوتران ۱۵ کشور (۱۲ کشور اروپایی، ژاپن، فلسطین اشغالی و سودان) مورد ارزیابی قرار

www.SID.ir

Archive of SID

گرفت، نشان داده شد که تمامی جدایه‌ها متعلق به سروتایپ ۱ پارامیکزوویروس پرندگان بودند. آزمایش اتصال پادتن مونوکلونال نشان داد که ۵۳ جدایه از ۵۷ جدایه مشابه هستند. ویروس جدا شده از سودان با این ویروس‌ها مشابه بود، اما تفاوت‌های قابل توجهی را نشان می‌داد. یک ویروس واکسن نیز از فرانسه و دو ویروس حاد از چک و اسلوواکی با سایر جدایه‌های PPMV-1 مرتبط نبودند (Alexander et al. 1985). Pearson و همکاران در سال ۱۹۷۵ در خلال شیوع بیماری نیوکاسل باگرایش احشایی ولوژنیک در کالیفرنیای جنوبی، پرندگان وحشی آزاد، پرندگان نیمه اهلی شده و قفسی و پرندگان اگزوتیک از نواحی قرنطینه‌ای جمع‌آوری کرده و نقش آنان را در همه‌گیری بیماری بررسی کردند. ویروس VVND از ۰/۰۴ درصد از ۹۴۴۶ پرنده‌ی وحشی آزاد، ۰/۷۶ درصد از ۴۳۶۷ پرنده‌ی نیمه اهلی و ۱/۰۱ درصد از ۳۷۸۰ پرنده‌ی اگزوتیک جدا گردید (Pearson and McCann 1975). Oncel و همکاران در سال ۱۹۹۷ شیوع بیماری نیوکاسل در یک گله‌ی گوشتی، گله‌ای تخم‌گذار، مرغان خانگی و ۵ کبوتر خانه را در ناحیه‌ی جنوب مرمر کشور ترکیه بررسی کردند. از این شیوع ۴ ویروس در ماکیان اهلی و ۵ ویروس از کبوتران با عنوان ویروس‌های بیماری نیوکاسل جدا گردید (Oncel et al. 1997).

Irvine و همکاران در سال ۲۰۰۹ در گله‌ی کبک‌های خاکستری شیوعی از بیماری نیوکاسل را توسط آلودگی با ویروس پارامیکزوویروس نوع ۱ پرندگان در اسکاتلند مشاهده کردند که این ویروس مسئول پانزوتیک‌های رایج در کبوتران (PPMV-1) بود. دو پن از کبک‌ها با نشانه‌های اسهال، نشانه‌های عصبی پیش‌رونده و مرگ و میری در حدود ۲۴ درصد تحت تأثیر قرار گرفتند. بررسی‌ها نشان داد که جمعیتی از کبوتران وحشی که در بالای پن کبک‌های آلوده قرار داشتند، منبع آلودگی بودند (Irvine et al. 2009).

در این مطالعه ۳۳/۵ درصد از کل جدایه‌ها در گله‌های مشکوک تلف شده از نمونه‌های مغز جدا گردیدند که نشان می‌دهد برخی جدایه‌های این مطالعه تمایل زیادی به بافت مغز دارند. کاربرگ نمونه‌ها بیان‌گر این موضوع بود که گله‌های نمونه‌برداری شده ضد بیماری نیوکاسل با واکسن زنده واکسینه نشده بودند و ۱۸ گله فقط واکسن کشته دریافت کرده بودند و حتی در صورت واکسیناسیون با واکسن زنده، ویروس واکسن زنده قادر به ورود به بافت مغز نمی‌باشد؛ بنابراین، می‌توان گفت ویروس جدا شده از بافت مغز کبوتران، ویروس‌های مزرعه هستند و حدت بالایی دارند. اما بیش‌تر جداسازی ویروس در این مطالعه متعلق به دستگاه گوارشی بود (۵۷ درصد سوآب دهانی- نایی در گله‌های زنده، ۴۳ درصد سوآب کلوآکی در گله‌های زنده و ۳۳/۵ درصد لوزه‌های سکومی در گله‌های تلف شده که در مجموع ۹ جدایه از ۱۳ جدایه و به عبارتی دیگر نزدیک ۷۰ درصد جدایه‌ها در کل ۵۰ گله). هم‌چنین تمامی نمونه‌های کبوتری که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند نشانه‌های اسهال سبز رنگ و نشانه‌های عصبی را نشان می‌دادند. تمامی جدایه‌ها در سروتیپ-۱ پارامیکزوویروس پرندگان یا همان پارامیکزوویروس-۱ کبوتری (PPMV-1) قرار داشتند (Jordan et al. 2008).

با توجه به نشانه‌های بالینی کبوترها و با توجه به این که جداسازی در تخم‌مرغ جنین‌دار یک روش با حساسیت استاندارد بوده، جداسازی در این مطالعه در نگاه اول به نظر پایین‌تر از حد مورد انتظار به نظر می‌رسد (۹ گله از ۵۰ گله‌ی مشکوک). در خصوص دلایل این جداسازی کم احتمالی، Dufour-Zavala و همکاران، در سال ۲۰۰۸ بیان کردند که به دلیل عدم عادت داشتن برخی جدایه‌های PPMV-1 به تخم‌مرغ جنین‌دار ماکیان ممکن است ویروس به خوبی رشد نکند و جدا نگردد و از سویی دیگر تشخیص غلط می‌تواند روی میزان جداسازی تأثیرگذار باشد. هم‌چنین در برخی موارد نیز با گذشت مدت زمانی از اوج بیماری در کبوتران با نشانه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

عصبی، احتمال اندک شدن دفع ویروس در مدفوع و یا حتی بافت‌های مغز نیز وجود دارد. برای رفع چنین مشکلات احتمالی، استفاده از کشت سلول جنین ماکیان و پاساژ در ماکیان زنده می‌تواند کمک کننده باشد (Dufour-Zavala et al. 2008, Office International des Epizooties 2012).

هیچ یک از جدایه‌هایی که از نظر آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون با سرم اختصاصی پارامیکزوویروس-۱ پرندگان مثبت بود، در آزمون واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز منفی نگردید و این موضوع تأیید می‌کند که این واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز برای تشخیص و تایید ملکولی جدایه‌ها در جداسازی و تأیید فعالیت واکنش هماگلوتیناسیون ویروس مشکوک به پارامیکزوویروس- ۱ کبوتری، برابر با آزمون ممانعت از هماگلوتیناسون با سرم اختصاصی پارامیکزوویروس- ۱ پرندگان می‌باشد. هم‌چنین از سویی دیگر و از آن جا که پرایمرهای این آزمون اختصاصی سروتیپ ۱ پارامیکزوویروس پرندگان بوده، یافته‌های این مطالعه تأیید می‌کند که در موازات آزمون‌های هماگلوتیناسیون و ممانعت از هماگلوتیناسیون با سرم اختصاصی روی مایع آلانتوییک تخم‌مرغ جنین‌دار مشکوک به ویروس پارامیکزوویروس ۱ کبوتری، این آزمون واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز می‌تواند یک آزمون تاییدی (و با حساسیت بالا) باشد و می‌تواند جایگزینی برای آزمون‌های تعیین هویتی یاد شده جهت تعیین هویت این ویروس باشد. Madadgar و همکاران در سال ۲۰۱۳ با آزمون واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز با یک پرایمر دیگر کاربرد مناسب این آزمون را در موازات سایر آزمون‌ها برای تأیید جداسازی ویروس بیماری نیوکاسل کبوتر در تخم‌مرغ جنین‌دار اعلان کردند (Berhanu et al. 2010, Liu et al. 2006, Madadgar et al. 2013).

جمعیت کبوتران در شهرها و اطراف شهرها و بر فراز مرغ‌داری‌ها آزادانه در حال پرواز هستند؛ از این رو می‌توانند عاملی در انتقال این ویروس به ماکیان اهلی باشند. این مطالعه تأیید می‌کند که پارامیکزوویروس-۱ کبوتری در کبوتران شهرستان اهواز به صورت انزوتیک وجود دارد و می‌تواند همواره تهدیدی برای صنعت پرورش ماکیان اهلی و سایر پرندگان حساس به این ویروس باشد. در بسیاری از کشورها واکسیناسیون کبوتران به ویژه کبوتران مسابقه‌ای و پرواز آزاد، اجباری است، اما در ایران این قانون وجود ندارد. از سویی دیگر باید به این نکته‌ی توجه کرد که امنیت زیستی عاملی مهم در پیش‌گیری از ورود ویروس بیماری نیوکاسل از طریق پرندگان آزاد پروازی مانند کبوتر به مزرعه پرورش و نگهداری ماکیان و سایر پرندگان است و هر گونه آلودگی ویروس بیماری نیوکاسل که با منشأ کبوتر باشد و از سد امنیت‌زیستی مزرعه‌ای بگذرد، می‌تواند به عنوان عامل خطری مطرح باشد؛ بنابراین رعایت امنیت زیستی از جمله عایق بودن آشیانه‌های نگه‌داری، پرورش، انبار دان و غیره در پیش‌گیری و کنترل بیماری نیوکاسل حائز اهمیت است. در مرحله‌ی بعدی مطالعات بیش‌تر و واکسیناسیون مؤثر کبوتران خانگی آزاد پرواز و مراقبت بیش‌تر روی این گونه از پرندگان، انجام توالی‌یابی، تعیین ناحیه‌ی شکافت، مقایسه‌ی فیلوژنتیکی و بررسی حدت این جدایه‌ها در کبوتران و ماکیان صنعتی و تلاش برای تولید واکسن برای کبوتران که در حال حاضر در ایران وجود ندارد، ولی در سایر کشورها به صورت واکسن زنده‌ی همولوگ وجود دارد، می‌تواند در پیش‌گیری و کنترل بیماری در کبوتران مؤثر باشد و پخش این ویروس را در محیط کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان وظیفه‌ی خود می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که پژوهش فوق را حمایت مالی نمودند، تشکر و قدردانی نمایند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

قاسمی، سعید (۱۳۸۲). مطالعه روی سرولوژی و جداسازی ویروس از کبوترهای مشکوک به بیماری نیوکاسل در اهواز. پایان‌نامه دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز.

Abolnik, C.; Gerdes, G.H.; Kitching, J.; Swanepoel, S.; Romito, M. and Bisschop, S.P. (2008). Characterization of pigeon paramyxoviruses (Newcastle disease virus) isolated in South Africa from 2001 to 2006. Onderstepoort Journal of Veterinary Reasearch, 75: 147-152.

Abolnik, C.; Horner, R.F.; Maharaj, R. and Viljoen, G.J. (2004). Characterization of a pigeon paramyxovirus (PPMV-1) isolated from chickens in South Africa. Onderstepoort Journal of Veterinary Reasearch, 71: 157-160.

Alexander, D.J.; Manvell, R.J.; Kemp, P.A.; Parsons, G.; Collins, M.; Brockman, S. et al. (1987). Use of monoclonal antibodies in the characterisation of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates submitted to an intreference laboratory. Avian Pathology, 16: 553-565.

Alexander, D.J.; Parsons, G. and Marshall, R. (1984). Infection of fowls with Newcastle disease virus by food contaminated with pigeon faeces. Veterinary Record, 115: 601-602.

Alexander, D.J.; Russell, P.H.; Parsons, G.; Abu Elzein, E.M.E. Ballouh, A. and Cernik, K. (1985a). Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type I isolates from pigeons - an international collaborative study. Avian Pathology, 14: 365-376.

Alexander, D.J.; Wilson, G.W.; Russell, P.H.; Lister, S.A. and Parsons, G. (1985b). Newcastle disease outbreaks in fowl in Great Britain during 1984. Veterinary Record, 117: 429-434.

Berhanu, A.; Ideris, A.; Omar, A.R. and Bejo, M.H. (2010). Molecular characterization of partial fusion gene and C-terminus extension length of haemagglutinin-neuraminidase gene of recently isolated Newcastle disease virus isolates in Malaysia. Virology Journal, 7: 183-193.

Dufour-Zavala, L.; Swayne, D.E.; Glisson, J.R.; Pearson, J.E.; Reed, W.M.; Jackwood, M.W. and Woolcock P.R. (2008). A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogen, 5th ed. Athens, American Association of Avian Pathologists, pp: 135-141.

Irvine, R.M.; Aldous, E.W.; Manvell, R.J.; Cox, W.J.; Ceeraz, V.; Fuller, C.M. et al. (2009). Outbreak of Newcastle disease due to pigeon paramyxovirus type 1 in grey partridges (Perdix perdix) in Scotland in October 2006. Veterinary Record, 165: 531-535.

Jordan, F.; Pattison, M. and Alexander, D.J. (2008). Poultry Diseases. the University press, Saunders Company Ltd, Cambridge, pp: 259-272.

Kaleta, E.F. and Baldauf, E. (1988). Newcastle disease in free-living and pet birds. In: Alexander D.J. (Eds). Newcastle Disease, Kluwer Academic Publishers, Boston, pp: 197-246.

Kaleta, E.F.; Alexander, D.J. and Russell, P.H. (1985). The first isolation of the PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons. Avian Pathology, 14: 553-557.

Kim, L.M.; King, D.J.; Curry, P.E.; Suarez, D.L.; Swayne, D.E.; Stallknecht, D.E. et al. (2007). Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. Journal of Virology, 81: 12641-12653.

Liu, H.; Wang, Z.; Song, C.; Wang, Y.; Yu, B.; Zheng, D. et al. (2006). Characterization of pigeon-origin Newcastle disease virus isolated in China, Avian Diseases, 50: 636-640.

Liu, H.; Wang, Z.; Wu, Y.; Zheng, D.; Sun, C.; Bin, D. et al. (2007). Molecular epidemiological analysis of Newcastle disease virus isolated in China in 2005. Journal of Virology Methods, 140: 206-211.

Madadgar, O.; Karimi, V.; Nazaktabar, A.; Kazemimanesh, M.; Ghafari, M.M.; Azimi Dezfouli, S.M. and Hojjati, P. (2013). A study of Newcastle disease virus obtained from exotic caged birds in Tehran between 2009 and 2010. Avian Pathology, 42(1): 27-31.

Meulemans, G. (1988). Control by vaccination. In: Alexander D.J., (Eds), Newcastle Disease, Kluwer Academic Publishers, Boston, pp: 318-332.

www.SID.ir

Archive of SID

Meulemans, G.; van den Berg, T.P.; Decaesstecker, M. and Boschmans, M. (2002). Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. Avian Pathology, 31: 515-519.

Office International des Epizooties. (2012). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties, Paris. pp: 576-589.

Oncel, T.; Alexander, D.J.; Manvell, R.J. and Ture, O. (1997). Characterization of Newcastle disease viruses isolated from chickens and pigeons in the South Marmara region of Turkey. Avian Pathology, 26: 129-137.

Pearson, G.L. and McCann, M.K. (1975). The role of indigenous wild, semidomestic, and exotic birds in the epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in southern California, 1972–1973. Journal of the American Veterinary Medical Association, 167: 610-614.

Pearson, J.E.; Senne, D.A.; Alexander, D.J.; Taylor, W.D.; Peterson, L.A. and Russell, P.H. (1987). Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons. Avian Diseases, 31: 105-111.

Saif, Y.M.; Fadly, A.M.; Glisson, j.R.; McDougald, L.R.; Nalon, L.K. and Swayne, D.E. (2008). Disease of poultry. 12th ed. Blackwell Publishing, Oxford, pp:75-100.

Toro, H.; Hoerr, F.J.; Farmer, K.; Dykstra, C.C.; Roberts, S.R. and Perdue, M. (2005). Pigeon paramyxovirus: association with common avian pathogens in chickens and serologic survey in wild birds. Avian Diseases, 49: 92-98.

Weingartl, H.M.; Riva, J. and Kumthekar, P. (2003). Molecular characterization of avian paramyxovirus 1 isolates collected from cormorants in Canada from 1995 to 2000. Journal of Clinical Microbiology. 41: 1280-1284.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 11, No. 2, Summer, 2015

Isolation and molecular diagnostic of pigeon paramyxovirus-1 from suspected pigeons to Newcastle disease in Ahvaz, Iran

Mayahi, M.[1]; Sefi Abad Shapouri, M.R.[2]; Jafary, R.A.[3] and Khosravi Farsani, M.[4]

Received: 10.06.2014 Accepted: 15.11.2014

Abstract

The Newcastle disease is one of the most important avian viral diseases that infect many species of birds such as chickens and pigeons. Virulent strain of Newcastle disease virus that is the causative agent of this disease in pigeons called pigeon paramyxovirus-1 (PPMV-1) and also cause virulent Newcastle disease in chickens. In order to isolate and clone the F gene cleavage site of PPMV-1, cloacal and oro-tracheal swabs samples were collected from 50 pigeon lofts in Ahvaz during 2013-2014. Also samples of brain, trachea, lungs, liver, spleen and cecal tonsils from the suspected died birds were collected. Each sample after preparation was inoculated to 9 to 11-day-old embryonated eggs and after collection of alantoic fluid, hemagglutination inhibition test was performed by specific positive PPMV-1 serum. Then, virus RNA of sample was extracted and cDNA synthesized. Primer sequences were used to amplify a 535 base pair fragment in polymerase chain reaction (PCR). Finally, PCR products were analyzed by electrophoresis. Results of the present study indicated that 9 of 50 pigeon lofts were positive in embryonated egg and in rapid hemagglutination test. hemagglutination inhibition test with specific PPMV-1 positive serum confirmed that all of isolated viruses are PPMV-1. Eighteen Percent of the suspected pigeons were positive to PPMV-1. PCR, confirmed that all 9 lofts were positive and PCR products of samples indicated 535–base pair fragment in electrophoresis. It was concluded that PPMV-1 was enzootic in pigeon lofts of Ahvaz and could always be a threat for poultry industry. Thus, sequencing and determining the cleavage site of virus; quarantining, eliminating and effective vaccination of infective pigeons and evaluating virulent of these viruses in poultry industry are very important in prevention, control and circulating virus from pigeons to chickens and vice versa.

Key words: Newcastle disease, Pigeon paramyxovirus-1, Isolation, PCR

1- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
3- Assosiated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
4- DVSc student of Health and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Mayahi, M., E-mail: mansoormayahi@scu.ac.ir

www.SID.ir