بررسی شیوع سرمی آلودگی تحت کلینیکی آنتریت هموراژیک در مزارع بوقلمون گوشتی تجاری ایران به روش الایزا

پیام حقیقی‌خوشخو*[۱]، گیتا اکبری‌آزاد[۱]، علی مسعودیان[۲]

چکیده

آنتریت هموراژیک یک بیماری عفونی بوقلمون‌ها با عامل آدنوویروس تیپ ۲ پرندگان است که منجر به جراحات روده‌ای و تضعیف سیستم ایمنی و در نهایت کاهش عملکرد پرورشی گله می‌شود. این مطالعه به منظور شیوع سرمی بیماری آنتریت هموراژیک در تعدادی از بوقلمون‌داری‌های گوشتی تجاری به وسیله آزمایش الایزا طراحی شد. در مجموع بطور تصادفی ٤٢٠ نمونه خون از ٢١ مزرعه بوقلمون گوشتی از ١٢ استان اخذ و به روش الایزا با کیت تجاری آنتریت هموراژیک بوقلمون (Synbiotics ProFlock-HET, USA) مورد آزمایش قرارگرفتند. نتایج نشان داد که بر اساس میانگین حسابی عیار آنتی بادی و تفسیر کیت، ٧٦/٢ درصد از گله‌ها از نظر آلودگی سرمی به آنتریت هموراژیک مثبت، ٩/٥ درصد مشکوک و ١٤/٣درصد منفی بودند. همچنین از ٤٢٠ نمونه سرم نیز، ٢٩٢ نمونه (٦٩/٥٪) دارای تیتر مثبت، ٥١ نمونه (١٢/٢٪) مشکوک و ٧٧ نمونه (١٨/٣٪) فاقد آنتی بادی علیه HE بودند. در بررسی آماری مشخص شد که بین عیار پادتن علیه آنتریت هموراژیک با ضریب تبدیل غذایی و درصد تلفات ارتباط مستقیم معنی‌دار و با میانگین وزن ارتباط معکوس معنی‌دار وجود دارد (P<٠/٠٥). این مطالعه بیانگر شیوع سرمی بالای این بیماری در مزارع پرورش بوقلمون گوشتی ایران می باشد. با اینحال مطالعات بیشتری مبتنی بر جداسازی و شناسایی ویروس در گله لازم است.

واژگان کلیدی: *آنتریت هموراژیک، بوقلمون گوشتی، الایزا، ایران.*

تاریخ دریافت: ٨٩/١٠/٧ تاریخ پذیرش: ٨٩/١٢/١٠

مقدمه

عامل آنتریت هموراژیک بوقلمون (Hemorrhagic Enteritis =HE)، ویروسی از خانواده آدنوویریده، جنس آدنویروس تیپ ۲ می‌باشد که به علت تفاوت با سایر آدنوویروسها، در جنس سیادنوویروس (Siadenovirus) جای گرفته است. بافت اصلی تکثیر این ویروس طحال و سلول هدف آن لنفوسیت‌های B و ماکروفاژها می‌باشند که در نتیجه تخریب این سلول‌ها، تضعیف سیستم دفاعی پرنده مبتلا را سبب می‌شود (١٦و١٧). آلودگی به این ویروس در بوقلمون، مرغ، قرقاول، کبک و مرغ شاخدار گزارش شده است. این ویروس علاوه بر ایجاد آنتریت هموراژیک در بوقلمون‌ها، سبب بروز بیماری طحال مرمری (Marble Spleen) در قرقاولها و اسپلینومگالی آدنوویروسی پرندگان (Avian Adenovirus Splenomegaly) نیز می‌شود (٢، ١٦، ١٩، ٢٠ و ٢١). آنتریت هموراژیک، بیماری حاد در بوقلمون‌های با سن بیش از ٤ هفته می‌باشد که با شروع ناگهانی علائم، بی حالی، مدفوع خون آلود و مرگ همراه است. در شکل تحت بالینی باعث تضعیف سیستم ایمنی پرنده، شکست واکسیناسیون علیه سایر بیماری‌ها، مستعد نمودن گله در برابر عفونت‌های ثانویه و افزایش هزینه‌های درمانی می‌شود (٢، ١٦، ١٧و٢٠). طول مدت این بیماری ٧ تا ١٠روز است که عمده تلفات در طی هفته اول بوده و ٢ تا ٣ هفته پس از بیماری، به علت عفونتهای ثانویه باکتریایی بخصوص کلی باسیلوز، موج جدیدی از تلفات رخ می‌دهد. به منظور پیشگیری در مناطقی که بیماری شایع است می توان از واکسنهای زنده پس از ٤ هفتگی بسته به میزان تیتر آنتی بادی مادری گله استفاده کرد (٥، ٩، ١٥ و١٦). تشخیص بیماری بر اساس علائم بالینی و یافته‌های کالبدگشایی بخصوص خونریزی روده و بزرگ شدن طحال (طحال مرمری) به همراه گنجیدگی‌های

*۱ــ استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران. (pkhoshkho@kiau.ac.ir)

۲ـ دستیار تخصصی بیماری‌های طیور، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، گروه بیماری‌های طیور، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

داخل هسته‌ای است که با جداسازی و شناسایی عامل بیماری در طحال و محتویات روده با آزمایش‌های ایمنوپراکسیداز، الایزای تسخیری (Capture ELISA Antigen) و واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) تأیید می‌شود. روش‌های سرولوژی شامل الایزا و رسوب در ژل آگار است. آزمایش الایزا قادر به شناسایی آنتی بادی مادری تا سن ٤ تا ٦ هفتگی و در صورت بروز عفونت طبیعی یا واکسیناسیون، ۳ روز تا ٤٠ ماه پس از عفونت خواهد بود (۳، ٦، ۷، ۹، ۱۱، ۱۳ و ١٦).

در حال حاضر بیش از ٤٠ واحد پرورش بوقلمون گوشتی در کشور فعال می‌باشند که در برخی از استان‌ها متمرکز شده‌اند. ظرفیت پرورش این بوقلمون‌داری‌ها بین ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ قطعه متغیر بوده و در اغلب واحدهای با بیش از ٤۰۰۰ قطعه، بصورت چند سنی پرورش داده می‌شوند (١٤). با توجه به گسترش قابل توجه پرورش صنعتی بوقلمون گوشتی در بسیاری از مناطق کشور، شیوع سرمی این بیماری در سطح بوقلمون‌داری‌های ۱۲ استان ایران به روش الیزا بررسی شد تا مقدمه‌ای برای شروع مطالعات افزونتر و کاملتر وارائه راهکارهای کنترلی مؤثر برعلیه این بیماری باشد.

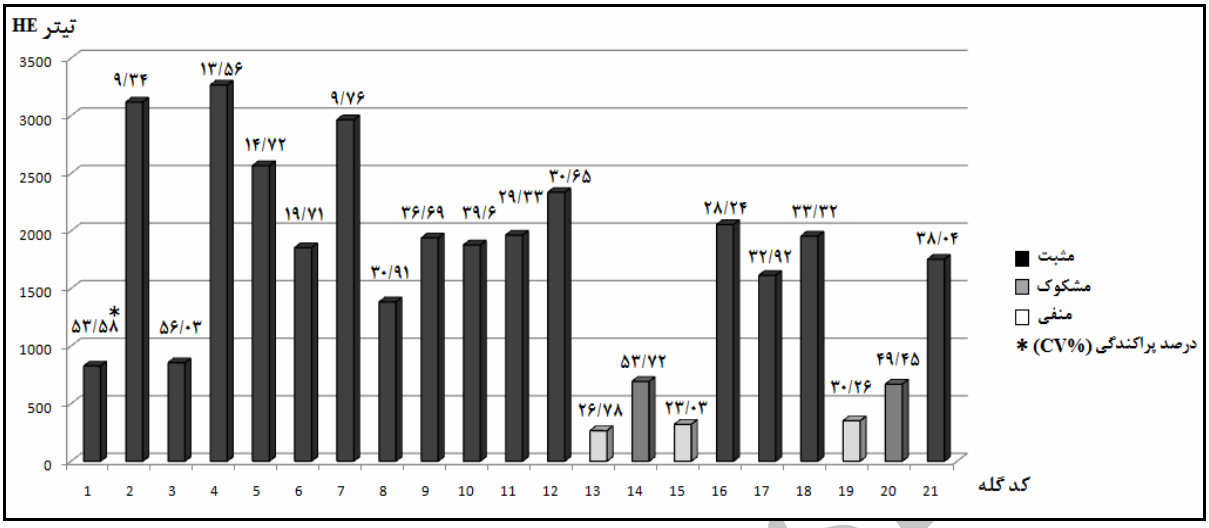
مواد و روش کار

در مجموع ۲۱ مزرعه پرورش بوقلمون از استان‌های مطرح در زمینه پرورش بوقلمون صنعتی گوشتی شامل تهران، قزوین، قم، خراسان رضوی، کرمانشاه، همدان، اصفهان، یزد، کرمان، سمنان، آذربایجان غربی و بندر عباس بطور تصادفی انتخاب شدند. این مراکز پرورشی با ظرفیت ۱۵۰۰ تا ۱۰۰۰۰ قطعه در هر مزرعه و در مجموع ۱۲۰۰۰۰ قطعه بوقلمون (در حدود ۳۰ درصد از ظرفیت کشور در سال ۱۳۸۹) متعلق به دو سویه تجاری BUT Big 6 و Turkey Hybrid و در محدوده سنی ۱۲ تا ۱۵ هفتگی بودند. پس از تهیه ۲۰ نمونه خون از هر مزرعه (در کل ٤٢٠ نمونه) بطریق ورید بالی، نمونه‌های خون به آزمایشگاه ارسال شدند تا عیار پادتن نمونه‌ها علیه آدنوویروس تیپ ۲، با کیت الایزای تجاری آنتریت هموراژیک بوقلمون (Synbiotics ProFlock-HET, USA) که اختصاصی برای این بیماری در بوقلمون است، سنجیده و با استفاده از نسخه ۲/۰۲ نرم افزار ProFILE محاسبه گردد. بر این اساس نمونه سرم‌هایی با تیتر کمتر یا برابر ٤٥٠ به عنوان نمونه منفی، تیترهای بین ٤٥١ تا ۹۰۰ مشکوک و تیترهای بالاتر از ۹۰۱ به عنوان تیتر مثبت در نظر گرفته شدند. همچنین راندمان‌های پرورشی مانند وزن، ضریب تبدیل غذایی، درصد تلفات، سابقه بیماری تا سن خونگیری در گله‌های تحت مطالعه اخذ گردید. داده‌های بدست آمده در این بررسی با استفاده از نسخه ۱۳ نرم افزار SPSS و آزمون T-Test و محاسبه ضریب همبستگی پیرسون مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. سطح معنی‌داری در این آزمون ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

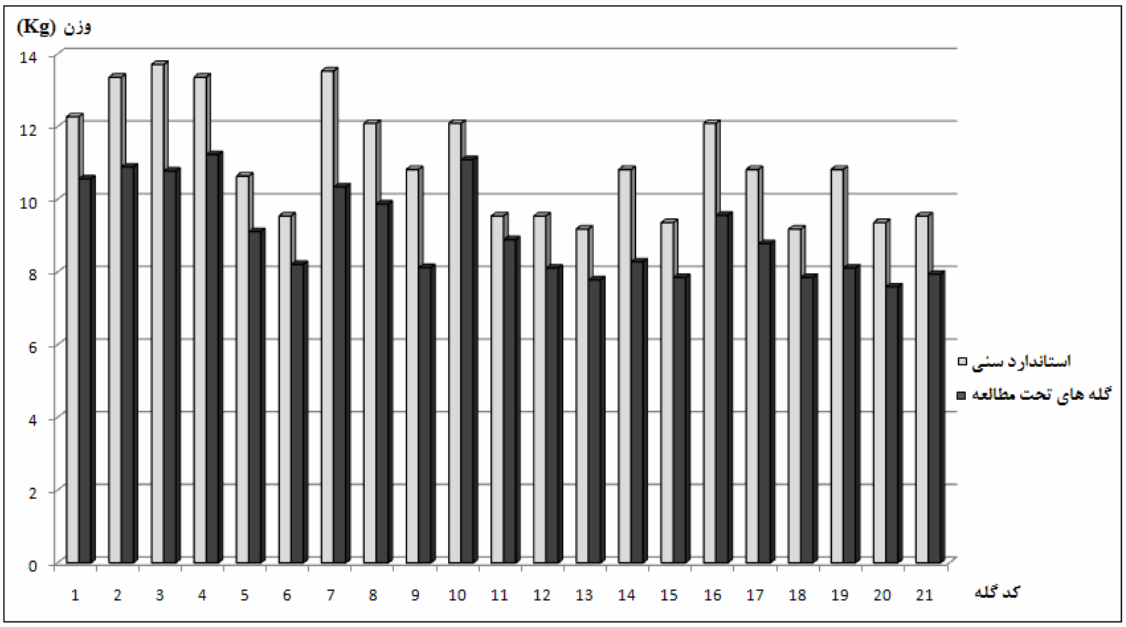
بر اساس راهنمای تفسیر شرکت سازنده کیت الایزا، از مجموع ٤٢٠ نمونه سرمی اخذ شده، ۲۹۲ نمونه (٦٩/٥٪) دارای تیتر مثبت، ٥١ نمونه (١٢/٢٪) مشکوک و ۷۷ نمونه سرم (١٨/٣٪) فاقد آنتی بادی HE بودند. بر اساس محاسبه میانگین تیتر مزارع مورد مطالعه، از ۲۱ مزرعه تحت بررسی، ١٦ گله (٧٦/٢٪) از نظر پاسخ سرمی به ویروس آنتریت همراژیک مثبت، ۲ مزرعه (۹/٥٪) مشکوک و ۳ مزرعه (١٤/٣٪) منفی بودند. در بین تیتر های محاسبه شده، کمترین و بیشترین تیتر به ترتیب ١٤٩ و ٤٦٣٤ و کمترین و بیشترین ضریب پراکندگی (CV%) تیترها در مزارع، به ترتیب ۹/۳٤٪ و ٥٦/٠٣ ٪ (با میانگین ٣١/٤١٪) بود (نمودار۱).

www.SID.ir



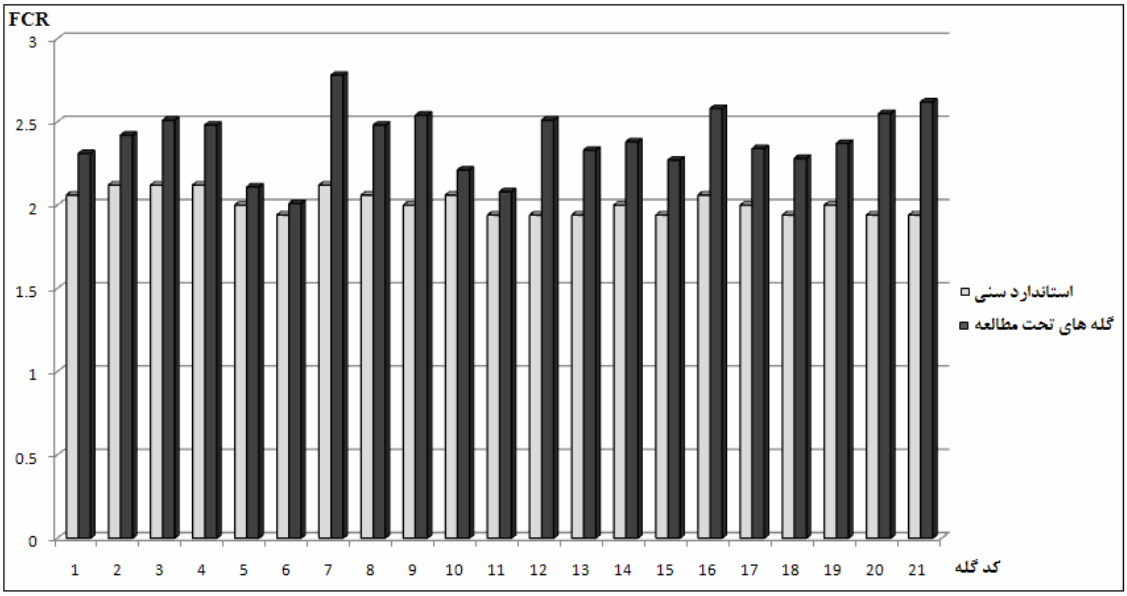
نمودار ۱ـ نتایج آزمایش الایزا به همراه درصد پراکندگی تیترها در مزارع تحت بررسی

در مزارع آلوده، ضریب تبدیل غذایی و درصد مرگ و میر بیشتر از مقادیر استاندارد و میانگین وزن کمتر از مقادیر استاندارد بود که گرچه این کاهش راندمان به طور مشخص مربوط به آلودگی با آنتریت هموراژیک نیست ولی مشاهده شد که بین عیار پادتن با ضریب تبدیل غذایی و تلفات ارتباط مستقیم معنی دار و با میانگین وزن ارتباط معکوس معنی‌دار وجود دارد که خود یافته قابل تأملی است ($P<0/05$). به عبارتی هرچه عیار پادتن بالاتر بود میانگین وزن کمتر (نمودار۲) و ضریب تبدیل غذایی (نمودار۳) و درصد تلفات (نمودار٤) بیشتر بود.

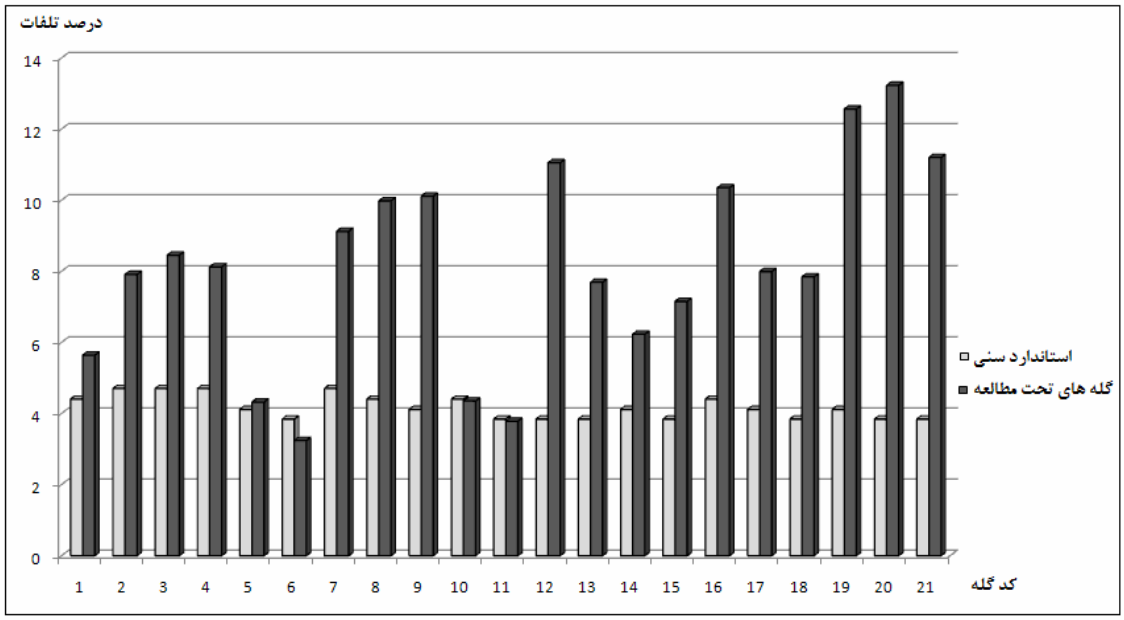


نمودار ۲ـمقایسه وزن مزارع تحت مطالعه در سن خونگیری با مقادیر استاندارد در همان سن

www.SID.ir



نمودار ۳ـ مقایسه ضریب تبدیل غذایی مزارع تحت مطالعه در سن خونگیری با مقادیر استاندارد در همان سن



نمودار ٤ـ مقایسه درصد تلفات مزارع تحت مطالعه در سن خونگیری با مقادیر قابل قبول در همان سن

بحث

از اولین مورد بیماری آنتریت هموراژیک بوقلمون که از آمریکا در سال ۱۹٦۰ گزارش شده، تاکنون این بیماری شیوع بالایی در اروپا و آسیا داشته است (۱٦) بنحوی که آلودگی سرمی در ٤ مطالعه مستقل در آمریکا ۱۰۰٪ (۱۰و۱٤،۱۲ و۱۸)، در ایتالیا ۱۰۰٪ (۱) و در مجارستان ٦۰٪ (٤) گزارش شده است. در مطالعه حاضر، از ٤۲۰ نمونه اخذ شده، ۲۹۲ نمونه سرمی (٦۹/۵٪) دارای تیتر مثبت، ۵۱ مورد (۱۲/۲٪)

www.SID.ir

مشکوک و ۷۷ نمونه سرم (۱۸/۳٪) منفی بودند. بر اساس محاسبه میانگین تیتر گله‌های مورد مطالعه، از ۲۱ مزارع تحت بررسی، ١٦ مزرعه (۷٦/۲٪) از نظر پاسخ سرمی به ویروس آنتریت همراژیک مثبت، ۲ مزرعه (۹/۵٪) مشکوک و ۳ مزرعه (١٤/٣٪) منفی بودند. از آنجایی که در هیچ یک از گله‌های پرورش بوقلمون در ایران از واکسن HE استفاده نمی شود، وجود تیتر مثبت بیانگر مواجه پرنده با این ویروس و آلودگی مزرعه می‌باشد. سن خونگیری در این مطالعه ۱۲ تا ۱۵ هفتگی انتخاب شده تا شانس ردیابی موارد مثبت بیشتر باشد زیرا مطالعات نشان داده که شیوع آلودگی با ویروس HE، بین سن ۸ تا ۱۰ هفتگی بوده وعیار آنتی بادی علیه این عفونت در ۱۲ هفتگی به حداکثر خود می‌رسد. آنتی بادی مادری پس از سن ٤ هفته بسیار کاهش می یابد بطوریکه با استفاده از آزمایش الایزا قابل شناسایی نمی‌باشد (۵و۱۲).

در مزارع آلوده تحت بررسی، ضریب تبدیل غذایی و درصد مرگ و میر بیشتر از مقادیر استاندارد و میانگین وزن کمتر از مقادیر استاندارد بود که گرچه این کاهش راندمان به طور مشخص مربوط به آلودگی با آنتریت هموراژیک نیست ولی مشاهده شد که بین عیار پادتن با ضریب تبدیل غذایی و تلفات ارتباط مستقیم معنی‌دار و با میانگین وزن ارتباط معکوس معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰۵). نتایج مشابهی مبنی بر کاهش راندمان در مزارع بوقلمون آلوده به این بیماری وجود دارد (۱، ۲، ۱۵ و ١٦).

در بررسی سوابق مزارع تحت بررسی مشاهده شد که اگرچه تمامی مزارع در طی دوره پرورش تا سن نمونه‌گیری سابقه نوعی اختلال و علائم گوارشی را داشتند ولی فقط در تاریخچه ٤ مزرعه (۱۹٪) تلفات به همراه مدفوع خون آلود ذکر شده بود و ۲ مزرعه از این مزارع بطور معنی‌داری دارای تیتر بیشتر در مقایسه با مزارع دیگر بودند (P<۰/۰۵). فقدان علائم بالینی آنتریت هموراژیک بوقلمون در مزارع مثبت سرمی، ممکن است به دلیل عدم دقت در تشخیص و یا وقوع پائین شکل بالینی بیماری باشد و بنظر می رسد بروز این عفونت در این مزارع بیشتر به شکل تحت بالینی باشد که این امر علاوه بر کاهش عملکرد پرورشی، با تضعیف سیستم ایمنی پرنده باعث شکست واکسیناسیون علیه سایر بیماریها، افزایش احتمال بروز سایر عفونتهای باکتریایی و ویروسی و افزایش هزینه های درمانی می شود.

بر اساس نتایج تحقیقات قبلی انجام شده در مورد وضعیت مزارع بوقلمون در ایران، در اغلب واحدهای پرورشی اصول مدیریتی و بهداشتی به درستی رعایت نمی شوند و مشکلاتی نظیر تراکم و تهویه نامناسب، پرورش گله‌های چند سنی بخصوص در واحدهای بیش از ٤۰۰۰ قطعه، عدم رعایت اصول امنیت زیستی در حین و انتهای دوره، بخصوص پاکسازی و ضد عفونی نامناسب، به همراه کشتارغیر بهداشتی، در اکثر مزارع دیده می‌شوند(۸). با توجه به نتایج این مطالعه، که اولین گزارش آلودگی سرمی این بیماری در ایران است، به نظر می‌رسد که دلیل اصلی شیوع بالا و گسترش این عفونت در سطح گله‌ها، عدم رعایت مسائل بهداشتی و اصول امنیت زیستی در آنها باشد و از طرفی به علت پرورش گله‌های چند سنی و عدم پاکسازی و ضد عفونی صحیح بین دوره، عفونت در مزرعه باقی مانده و از پرندگان مسن تر به جوجه ها و نیز از دوره قبل به دوره بعد، منتقل می شود که در صورت افزایش تراکم واحدهای پروشی در کشور، گسترش بیشتر این آلودگی، قابل پیش بینی است.

پیشنهاد می‌شود به منظور بررسی کامل تر، از آزمایش های مولکولی مانند PCR در تحقیقات بعدی استفاده گردد. همچنین جهت کنترل و جلوگیری از گسترش این عفونت در بین مزارع، رعایت کامل مسائل مدیریتی و بهداشتی نظیر پاکسازی و ضدعفونی صحیح سالن‌ها بین دو دوره، عدم پرورش چند سنی به همراه اجرای کامل اصول قرنطینه‌ای توصیه می شود.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست منابع

1. Ceruti, R., Valetina, M. D., Gavazzi, L., Venni, A., Ferrazzi, V. and Grilli, G. (2007): Haemorrhagic enteritis seroconversion in turkey breeders: a field Observations. Ital. J. of Anim. Sci. 6:231-325.
2. Chandra, R. and Kumar, A. (1998): Haemorrhagic enteritis of turkeys and infections of pheasants and domestic fowl: a review. World's poult. Sci. J. 54: 253-269.
3. Davidson, I., Aronovici, A., Weisman, Y. and Malkinson, M. (1985): Enzyme immunoassay studies on serological response of turkeys to hemorrhagic enteritis. Avian Dis. 29(1): 43-52.
4. Dinev, I., Gardin, Y. and Galabov, E. (2009): First evidence of haemorrhagic enteritis among turkey poults in Bulgaria. 16th Congress of World's Veterinary Poultry Association, Marrakesh: 435.
5. Fadly, A. M. and Nazerian, K. (1989): Hemorrhagic enteritis of turkeys: influence of maternal antibody and age at exposure. Avian Dis. *(Avian Diseases)* 33 (4): 778-786.
6. Hess, M. (2000): Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. Avian Pathol. 29: 195-206.
7. Hess, M., Rautenschlein, S. and Hafez, M. H. (1999): PCR for specific detection of hemorrhagic enteritis virus of turkeys, an avian adenovirus. J. of Virol. Method 81: 199-203.
8. Khoshkhoo, P. H., Akbari Azad, G., Masoudian, A. (2006): Evaluation of commercial turkey production in Iran and comparison to standard of breed performance. The 6th International Symposium on Turkey Disease, Germany.
9. Korosi, L. (2006): Vaccination large-scale turkey flocks against haemorrhagic enteritis. World Poult. 22 (2): 28-30.
10. Lanconescu, M., McCapes, R. H., Bankowski, R. A., Kelly, B. J. and Ghazikhanian, Y. (1984): Hemorrhagic enteritis of turkeys in California: serologic study of hemorrhagic enteritis virus antibody with an ELISA. Avian Dis. 29 (2): 356-363.
11. Lanconescu, M., Smith, E. J., Fadly, A., M. and Nazerian, K., (1984): An ELISA for detection of hemorrhagic enteritis virus and associated antibodies. Avian Dis. 28 (3): 677-692.
12. Meteyer, C. U., Mohammed, H. O., Chin, R. P., Bickford, A. A., Trample, D. W. and Klein, P. N. (1992): Relationship between age of flock, seroconversion to hemorrhagic enteritis virus and appearance of adenoviral inclusion in spleen and renal tubules epithelia of turkeys. Avian Dis. 36: 88-96.
13. Nazerian, K., Lee, L. F., and Payne, W. S. (1990): A double-antibody ELISA for the detection of turkey hemorrhagic enteritis virus antibody and antigen. Avian Dis. 34: 425-432.
14. Pantin-Jackwood, M. J., Spackman, E., Day, M. J. and Rives, D. (2007): Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farm. Avian Dis. 51: 674-680.
15. Palya, V., Nagy, M., Glavits, R., Ivanics, E., Szalay, D., Dan, A., Suveges, T., Markos, B. and Harrach, B. (2007): Investigation of field outbreaks of turkey haemorrhagic enteritis in hungary. Acta Veterinaria Hungarica 55: 135-149.
16. Pierson, F., W. and Fitzgerald, S., D. (2008): Hemorrhagic enteritis and related Infections, in: *Diseases of Poultry*, 12nd ed. (ed. Saif, Y. M., Barns, H. J., Fadly, A. M., Glisson, J. R., McDougald, L. R. and Swayne, D. E.). Iowa State University Press. Ames: 278-286.
17. Rautenschlein, S. and Sharma, J. M. (2000): Immunopathogenesis of hemorrhagic enteritis virus in turkeys. Devel. And Comp. Immunol. 24: 237-246.
18. Reynolds, D. L., Saif, M. Y. and Theil, K., W. (1987): Enteric viral infections of turkey poults: incidence of infection. Avian Dis. 31: 272-276.
19. Saif, Y., M., (1998): Infectious bursal disease and hemorrhagic enteritis. Poult Sci. 77: 1186-1189.
20. Sharma, J. M. (1991): Hemorrhagic enteritis of turkeys. Vet. Immunol. And Immunopathol. 30(1):67-71.
21. Shivaprasad, H., L. (2008): Adenovirus group II- like infection in chukar partridges. Avian Dis. 52: 353-356.

Archive of SID
www.SID.ir