Archive of SID

بررسی مولکولی رخداد مشترک آنفلوانزای پرندگان (تحت‌تیپ H9N2) و نومو‌ویروس ماکیان در جوجه‌های گوشتی مبتلا به سندرم تنفسی در استان اصفهان

محمد عرب[۱]، مجید غلامی آهنگران[۲*]، محسن جعفریان دهکردی[۳]

۱. دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.

دریافت: ۱۸ شهریور ماه ۹۴ **پذیرش**: ۱۹ اسفند ماه ۹۴

چکیده

در فاصله زمانی پاییز ۱۳۹۳ تا پاییز ۱۳۹۴ از ۳۵ گله جوجه گوشتی واجد سندرم تنفسی مشکوک به آنفلوانزای پرندگان با تلفات بیش از یک درصد در روز، از نقاط مختلف استان اصفهان، نمونه نای و ریه اخذ شد RNAی ویروسی از نمونه‌های بافتی با کیت تخلیص RNA استخراج شد و پس از سنتز cDNA با پرایمرهای اختصاصی گروه و تیپ به شناسایی موارد آنفلوانزای پرندگان (سویه H9N2) پرداخته شد؛ سپس با پرایمر اختصاصی مشترک بین تیپ‌های نوموویروس قطعه‌ای به طول ۱۱۵ جفت بازی تکثیر شد. نتایج نشان داد از ۳۵ گله واجد علایم تنفسی ۲۴ گله جوجه گوشتی (۶۸/۵۷ درصد) آلوده به ویروس H9N2 آنفلوانزای پرندگان بوده است؛ از ۲۴ گله آلوده به ویروس آنفلونزا، ۱۱ گله (۴۵/۸۳ درصد) آلودگی مشترک با نوموویروس داشتند و متوسط واگیری مشترک آنفلوانزا و نوموویروس ۲۰/۸۳ درصد بوده است؛ لذا به نظر می‌رسد نوموویروس پرندگان در شکل‌گیری و پیچیده‌سازی علایم تنفسی در جوجه‌های گوشتی مبتلا به سویه H9N2 آنفلوانزای پرندگان در استان اصفهان نقش عمده داشته باشد و در درصد بالایی از موارد آلوده به سویه H9N2 آنفلوانزای پرندگان امکان پیچیده‌سازی عفونت با نوموویروس پرندگان وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: آنفلوانزا، جوجه گوشتی، نوموویروس پرندگان، PCR، اصفهان.

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان یک بیماری واگیردار متعلق به گروه A آنفلوانزا و از خانواده ارتومیکسوویریده است. ویروس آنفلوانزا گروه A دارای تحت‌تیپ‌های مختلفی هستند که بر اساس آنتی‌ژن هماگلوتینین و نورامینیداز تقسیم‌بندی و نام‌گذاری می‌شوند. تاکنون ۱۸ تحت تیپ از هماگلوتینین و ۱۱ تحت تیپ نورامینیداز گزارش شده است (۱۷).

سویه غالب آنفلوانزای پرندگان در ایران تحت تیپ H9N2 است. ویروس‌های آنفلوانزا بر اساس آزمایش‌های بیولوژی و توالی ناحیه تقسیم ژن هماگلوتینین به دو دسته آنفلوانزای با بیماری‌زایی کم و آنفلوانزای با بیماری‌زایی شدید تقسیم می‌شود. تحت‌تیپ شایع در ایران (H9N2) جزء آنفلوانزای با بیماری‌زایی کم تقسیم‌بندی می‌شود (۱۸).

نشانه‌های بیماری به عوامل متعددی مانند سویه ویروس، گونه، سن، وضعیت ایمنی پرنده، عفونت‌های همراه و عوامل محیطی بستگی دارد. بارزترین علایم این بیماری تلفات شدید و ناگهانی به همراه علایم تنفسی مانند عطسه، سرفه و رال‌های تنفسی است. بی‌اشتهایی،

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: mgholamia@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

بی‌حالی، سیانوزه شدن تاج و ریش، اسهال و قطع تخم‌گذاری از دیگر علایم ابتلا به آنفلوانزاست. علایم کالبدگشایی بسیار متغیر است عمدتاً به صورت پرخونی عمومی لاشه و خونریزی در امعا و احشا و پرده‌های سروزی جلب توجه می‌کند. رعایت اصول امنیت زیستی و انجام واکسیناسیون در پیشگیری از بیماری اهمیت دارد. واکسن کشته به شکل تجاری موجود است و در ایران از واکسن کشته تحت‌تیپ H9N2 به منظور کنترل این بیماری به طور گسترده در گله‌های طیور استفاده می‌شود (۱۶).

عفونت نوموویروس پرندگان (متانوموویروس) یک عفونت تنفسی در گله‌های بوقلمون و ماکیان است که به طور عمده قسمت‌های فوقانی تنفسی را مبتلا می‌کند؛ این عامل به صورت اولیه و ثانویه می‌تواند بیماری ایجاد کند و موجب کاهش رشد، کاهش تولید در طیور تخم‌گذار و حتی تلفات گردد (۸).

ویروس عامل بیماری از خانواده پارامیکسوویریده است و ۴ تحت تیپ A، B، C و D دارد. اگرچه منشأ اولیه این بیماری آفریقاست (دهه ۱۹۷۰) اما به سرعت در بیشتر کشورهای اروپایی، آسیایی و امریکایی گسترش یافت و در حال حاضر در سراسر جهان منتشر شده است. عمده بیماری‌زایی این ویروس در گله‌های بوقلمون است که موجب رینوتراکئیت می‌شود. گله‌های ماکیان، به ویژه مرغ‌های مادر و تخم‌گذار تجاری به این عامل حساس هستند. در گله‌های ماکیان، نوموویروس یکی از عوامل دخیل در سندرم، تورم سر است. گزارش‌هایی از عفونت نوموویروس در سایر گونه‌های پرندگان مانند مرغ شاخ‌دار، قرقاول و اردک وجود دارد. تمامی سنین به این عامل حساس هستند اما به طور عمده بوقلمون و ماکیان با سن بالا علایم را به خوبی نشان می‌دهند (۸). در بوقلمون در عفونت‌های ثانویه تنفسی مانند اشریشیاکلی، اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال، پاستورلا و مایکوپلاسماها شدت بیماری افزایش می‌یابد و نواحی تحتانی دستگاه تنفس را نیز مبتلا می‌کند. عوامل مدیریتی مانند غلظت بالای آمونیاک، گرد و غبار، تراکم بالا و تهویه ضعیف از عوامل تشدیدکننده ضایعات و تلفات هستند. واگیری در این عفونت تنفسی بالاست و تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است. تماس مستقیم، عامل اصلی انتقال ویروس است. انتقال ویروس از طریق هوا ثابت شده است اما انتقال عمودی ندارد. عمدتاً عطسه، سرفه، آبریزش از چشم و بینی، تورم ملتحمه و تورم سینوس‌های چشمی جلب توجه می‌کند. گاهی کمی بی‌اشتهایی در پرندگان مبتلا دیده می‌شود. پیچش سر به ندرت در برخی پرندگان مبتلا مشاهده شده است. در پرندگان تخم‌گذار کاهش کمی و کیفی تخم مشاهده می‌گردد (۸). التهاب بافت پوششی بینی و نای، سینوزیت چرکی، تورم پلک و تجمع چرک در بافت زیرجلدی صورت و در گله‌های تخم‌گذار تورم مجرای تخم، تخم‌گذاری داخلی و بی‌رنگی زرده‌ها، رقیق شدن آلبومین و به ندرت بدشکلی تخم‌ها در پرندگان تلف شده جلب‌توجه می‌کند. با رعایت اصول بهداشت و واکسیناسیون می‌توان از ابتلا به بیماری پیشگیری کرد؛ همچنین برای مبارزه با این بیماری واکسن به صورت تجاری موجود است (۸).

روش‌های مختلف سرم‌شناسی، ویروس‌شناسی و مولکولی برای تشخیص موارد آلودگی به ویروس آنفلوانزا و نوموویروس وجود دارد که در این میان PCR به عنوان یک فن‌آوری سریع و با حساسیت بالا معرفی شده است (۱۶). Lee و همکاران در سال ۲۰۰۱ برای اولین بار پرایمرهای اختصاصی تحت تیپ‌های مختلف آنفلوانزا را معرفی کردند. با استفاده از این پرایمرها به راحتی و در مدت زمان کمتر می‌توان به ردیابی تحت تیپ‌های مختلف آنفلوانزا پرداخت (۱۰). علاوه بر آن، Bayon-Auboyer و همکاران در سال ۲۰۰۱ نیز یک پرایمر مشترک برای شناسایی تیپ‌های مختلف نوموویروس را ارائه کردند که در مدت زمان کوتاه قادر به شناسایی موارد آلودگی نوموویروس پرندگان است (۶). با توجه به وجود شواهدی

www.SID.ir

Archive of SID

سرمی از وجود عفونت نومویروسی در گله‌های گوشتی در ایران (۱ و ۲) و از سویی عدم اعمال برنامه مناسب واکسیناسیون علیه این بیماری در گله‌های مرغ مادر و جوجه گوشتی، ما را بر آن داشت تا در مطالعه اخیر با استفاده از پرایمرهای مذکور به شناسایی موارد آلودگی به نومویروس و سویه H9N2 آنفلوانزا بپردازیم و نقش نومویروس پرندگان در تشدید و پیچیده‌سازی علایم تنفسی در موارد آنفلوانزای پرندگان را بیان کنیم تا بر اساس این یافته‌ها اقدامات لازم برای کنترل این بیماری در گله‌های طیور ایران به عمل آید.

مواد و روش کار

این مطالعه در فاصله زمانی پاییز ۱۳۹۳ تا پاییز ۱۳۹۴ از ۳۵ گله جوجه گوشتی مبتلا به سندرم تنفسی در استان اصفهان انجام شد. نمونه‌های نای و ریه از گله‌هایی اخذ شد که واجد تلفات بالا و حداقل ۱درصد تلفات در روز به مدت حداقل ۵ روز متوالی بودند. از هر گله حداقل ۶ نمونه نای و ریه اخذ شد. نمونه‌ها به صورت انفرادی کدگذاری شد و در کنار یخ منتقل گردید. نمونه‌ها تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

RNAی ویروسی از نمونه نای و ریه با کیت تخلیص RNA (High Pure Viral Nucleic Acid Kit، ساخت شرکت Roche از آلمان) استخراج شد.

به منظور سنتز cDNA مطابق دستورالعمل کیت ترانس‌کریپتاز معکوس (AccuPower® RT PreMix Kit ساخت شرکت BioNeer از کره‌جنوبی) عمل شد. به طور خلاصه، ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده از نای و ۲۰ پیکومول از هر پرایمر اختصاصی، برای سنتز cDNA استفاده شد.

برای شناسایی و تعیین تیپ H9 ویروس آنفلوانزای پرندگان با روش RT-PCR، از پرایمرهای اختصاصی بر اساس توالی قطعه حفاظت شده ژن نوکلئوپروتئین (NP) و H9 ویروس آنفلوانزای که قبلاً از سوی Lee و همکاران در سال ۲۰۰۱ منتشر شده بود، استفاده شد تا قطعات ۳۳۰ و ۴۸۸ جفت بازی ژن نوکلئوپروتئین و H9 ویروس آنفلوانزا تکثیر شود (۱۰). توالی و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ درج شده است.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی ویروس آنفلوانزا (۱۰)

ژن	ویژگی پرایمر	توالی پرایمر (5'-3')	طول قطعه تکثیر شده (جفت بازی)
NP	آنفلوانزای A	CAG(A/G)TACTGGGC(A/T/C)ATAAG(A/G)AC GCATTGTCTCCGAAGAAATAAG	۳۳۰
H9	تحت تیپ H9	CT(C/T)CACACAGA(A/G)CACAATGG GTCACACTTGTTGTTGT(A/G)TC	۴۸۸

برای انجام PCR، از کیت تجاری PCR (AccuPower® PCR PreMix Kit ساخت شرکت BioNeer از کره جنوبی) استفاده شد. در هر واکنش از ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۳۰ میلی‌مول کلرید پتاسیم، ۱۰ میلی‌مول تریس-هیدروکلراید، ۲۵۰ میکرومول هر dNTP و یک واحد DNA پلیمراز (BioNeer Corporation, South Korea) استفاده شد. ۵ میکرولیتر از cDNA تهیه شده و ۱۰ پیکومول از هر جفت پرایمر در هر واکنش بهره گرفته شد. شرایط دمایی سنتز cDNA شامل نگهداری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه و سپس ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه است. شرایط PCR برای تکثیر ژن NP شامل ۳۵ سیکل دمایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه (واسرشت‌سازی)، ۵۵

www.SID.ir

Archive of SID

درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه (هم‌سرشت‌سازی) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه (گسترش) و نهایتاً ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه است.

محصول تکثیر شده نهایی به روش الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد رنگ شده با اتیدیوم بروماید، با تابش اشعه UV مشاهده شد. در این مطالعه از آنتی‌ژن استاندارد سویه H9N2 ویروس آنفلوانزای پرندگان (ZMT-110) به عنوان کنترل مثبت و از آب دوبار تقطیر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

به منظور شناسایی نومویروس پرندگان (متانومویروس) و برای سنتز cDNA و تکثیر ژنوم از سیستم RT-PCR یک مرحله‌ای TITAN (ساخت شرکت Roche، آمریکا) و پرایمرهای NX و ND (۶) استفاده شد. پرایمرهای مذکور که بر اساس توالی ناحیه حفاظت شده مشترک ژن N در بین تیپ‌های A، B، C و D نومویروس ماکیان طراحی شده است، قادرند قطعه‌ای به طول ۱۱۵ جفت بازی تکثیر کنند؛ همچنین توالی و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ درج شده است.

واکنش RT-PCR به منظور شناسایی نومویروس پرندگان در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، شامل ۱۰ میکرولیتر بافر 5X (همراه با کلرید منیزیم با غلظت ۷/۵ میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر محلول DTT، یک میکرولیتر dNTP، ۲ میکرولیتر پرایمر فرادست و ۲ میکرولیتر پرایمر فرودست، یک میکرولیتر مخلوط آنزیمی، ۴ میکرولیتر RNA الگو و ۲۷/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل انجام شد. مخلوط واکنش PCR پس از آماده‌سازی مطابق دستورالعمل کیت به منظور نسخه‌برداری معکوس (RT) و به عبارتی سنتز cDNA، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد سپس به منظور واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. مراحل واسرشت‌سازی، هم‌سرشت‌سازی و گسترش به ترتیب در دمای ۹۴ درجه و به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۱ درجه و به مدت ۴۵ ثانیه و ۶۸ درجه به مدت ۱ دقیقه در ۳۵ سیکل متوالی انجام شد. در پایان گسترش نهایی در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه به انجام رسید. سرانجام محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت و ۴۰۰ میلی‌آمپر الکتروفورز شد.

در این پژوهش آب دوبار تقطیر استریل برای کنترل منفی و واکسن نومویروس پرندگان (نمونواک، مریال، فرانسه) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی نومویروس (۶)

ژن هدف	نام پرایمر	توالی پرایمر ('3-'5)	موقعیت	اندازه محصول
	Nc	TTCTTTGAATTGTTTGAGAAGA	۶۵۳-۶۳۲	RT primer
ژن N	Nx	CATGGCCCAACATTATGTT	۸۱۲-۸۳۰	۱۱۵
	Nd	AGCAGGATGGAGAGCCTCTTTG	۷۱۶-۷۳۷	۱۱۵

نتایج

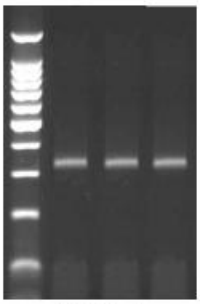
در نمونه‌های مثبت آنفلوانزا و تأیید شده H9N2 و همچنین نمونه‌های مثبت نومویروس قطعات ۳۳۰، ۴۸۸ و ۱۱۵ جفت بازی به ترتیب همانند کنترل‌های مثبت تکثیر شد (شکل ۱، ۲ و ۳). نتایج PCR مربوط به آنفلوانزا نشان می‌دهد از ۳۵ گله واجد علایم تنفسی ۲۴ گله جوجه گوشتی (۶۸/۵۷ درصد) آلوده به ویروس H9N2 آنفلوانزای پرندگان بوده‌اند. نتایج PCR مربوط

www.SID.ir

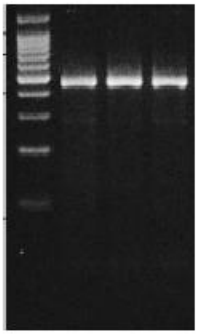
Archive of SID

به نومووویروس نیز نشان می‌دهد از ۳۵ گله واجد علایم تنفسی ۱۷ گله آلوده به نومووویروس است (۴۸/۵۷ درصد) که در ۱۱ مورد آلودگی توأم با ویروس آنفلوانزا وجود دارد (۶۴/۷۰ درصد). از ۲۴ گله آلوده به ویروس آنفلونزا ۱۱ گله آلوده به نومووویروس بوده است. به عبارتی ۴۵/۸۳ درصد موارد آلودگی به ویروس آنفلوانزا، واجد آلودگی مشترک با نومووویروس پرندگان هستند.

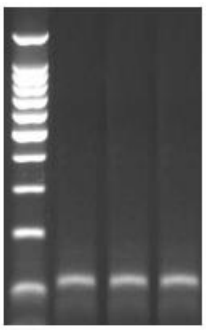
واگیری آنفلوانزا در گله‌های مثبت از ۱۶ درصد تا ۱۰۰ درصد و به طور متوسط ۶۶/۶ درصد بوده است. میزان واگیری نومووویروس در گله‌های آنفلوانزا مثبت از صفر تا ۸۳ درصد و به طور متوسط ۲۸/۴۷ درصد بوده است. به طورکلی میزان متوسط واگیری مشترک (توأم) آنفلوانزا و نومووویروس ۲۰/۸۳ درصد بوده است (جدول ۳).



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ویروس آنفلوانزای تیپ A (از چپ به راست، ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲: کنترل مثبت آنفلوانزای تیپ A، ستون ۳ و ۴: قطعه ۳۳۰ جفت بازی ژن NP ویروس آنفلوانزا)



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR تحت تیپ H9N2 آنفلوانزا (از چپ به راست، ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲: کنترل مثبت ویروس H9N2 آنفلوانزا، ستون ۳ و ۴: قطعه ۴۸۸ جفت بازی ژن H9 ویروس آنفلوانزا)



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR نومووویروس پرندگان (از چپ به راست، ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲: کنترل مثبت نومووویروس پرندگان، ستون ۳ و ۴: قطعه ۱۱۵ جفت بازی ژن N نومویروس پرندگان)

جدول ۳- میانگین ± انحراف معیار درصد واگیری و آلودگی مشترک ویروس آنفلوانزا (تحت تیپ H9N2) و نومووویروس در گله‌های آنفلوانزا مثبت

تعداد گله‌ها	واگیری آنفلوانزا	واگیری نومووویروس	واگیری مشترک آنفلوانزا و نومووویروس
۲۴	۶۶/۶۲±۲۱/۴۲	۲۸/۴۵±۳۲/۳۸	۲۰/۸۱±۲۵/۶۳

بحث

نتایج بررسی اخیر نشان می‌دهد فراوانی موارد آنفلوانزا در سندرم تنفسی جوجه‌های گوشتی در استان اصفهان ۶۸/۵۷ درصد است و واگیری در گله‌های آنفلوانزا مثبت نیز به طور متوسط ۶۶/۶۶ درصد است. سابقه حضور تحت‌تیپ H9N2 آنفلوانزا در ایران به سال‌های ۹۷-۹۸ میلادی برمی‌گردد. وصفی‌مرندی و بزرگمهری‌فرد در سال ۱۳۷۷ به دنبال واگیری‌های گسترده در اطراف تهران، کرج و قزوین با نمونه‌گیری از گله‌های مرغ مادر، تخم‌گذار و گوشتی از وجود یک ویروس آنفلوانزای تیپ A خبر

www.SID.ir

Archive of SID

دادند که با بررسی‌های تکمیلی مشخص شد تیپ غالب در ایران H9N2 است (۱۸). اگرچه این ویروس قادر بود در آن شرایط در حالت طبیعی موجب ۶۵ درصد تلفات و گاهی تا ۷۵ درصد کاهش تولید تخم در برخی گله‌ها شود (۱۸) اما مطالعات تجربی و آزمایشگاهی نشان می‌داد که این ویروس قادر به مرگ‌ومیر بالا در جوجه های SPF تحت چالش تجربی نیست (۱۲)؛ لذا از زمان بدو ورود این ویروس به ایران این پرسش مطرح شد که چه عواملی موجب تشدید بیماری‌زایی این ویروس در فیلد می‌شوند. در آن سال‌ها بنانی و همکاران به شناسایی باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در گله‌های واجد علایم تنفسی پرداختند (۵) و با توجه به مشکلات در جداسازی و احیاناً شناسایی بالینی این عفونت باکتریایی تا آن زمان این عامل عفونی در ایران توصیف نشده بود. هم‌زمان با شناسایی اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال و ردیابی این عامل در گله‌های آلوده به تحت‌تیپ H9N2 آنفلوانزای پرندگان، توجه پژوهشگران به نقش اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در پیچیده‌سازی علایم آنفلوانزا معطوف شد به گونه‌ای که یک گزارش نشان می‌دهد میزان تلفات ناشی از تحت تیپ H9N2 آنفلوانزا در عفونت‌های منفرد ۱۰ درصد و عفونت‌های هم‌زمان با اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال به ۷۰ درصد می‌رسد (۱۳). هم‌زمان با شناسایی اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در ایران، حضور سروتیپ ۴/۹۱ ویروس برونشیت عفونی در دورترین نقاط ایران اثبات شد (۲ و ۱۵). از سویی جداسازی این عامل از اکثر گله‌های آلوده به ویروس آنفلوانزا (۲) و از سویی دیگر نبود عامل بیماری‌زایی قطعی سروتیپ ۴/۹۱ برونشیت عفونی در عفونت‌های منفرد (۱۵)، سروتیپ ۴/۹۱ ویروس برونشیت عفونی را یکی از معضلات اصلی در رخداد سندرم‌های تنفسی مشکوک به آنفلوانزا معرفی می‌کرد؛ به طوری که فرضیه‌ای مطرح می‌گردد که آلودگی با این ویروس علاوه بر ایجاد استرس در پرندگان با تولید پروتئازها قادر است در تشدید بیماری‌زایی و تسریع روند بیماری‌زایی ویروس آنفلوانزا نقش عمده‌ای داشته باشد (۱۵). به هر حال علاوه بر دو عامل اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال و ۴/۹۱ که در داخل کشور توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده بود در خارج از کشور گزارش‌هایی از عفونت‌های هموفیلوس و استافیلوکوک در موارد آنفلوانزا در گله‌های مرغ مادر و تخم‌گذار مطرح بود که نشان می‌داد این عفونت‌ها باعث تشدید تکثیر ویروس آنفلوانزا در بافت‌های تنفسی می‌گردند (۹). همچنین گزارش‌هایی از هم‌زمانی سویه‌های مختلف نیوکاسل با آنفلوانزا وجود داشت که نشان می‌داد پرنده‌های آلوده به هر دو ویروس بقای کمتری را نسبت به عفونت‌های منفرد دارند (۴).

پژوهش اخیر نشان می‌دهد امکان رخداد آلودگی مشترک آنفلوانزا با نوموویروس پرندگان وجود دارد. در ۴۵/۸۳ درصد گله‌های آلوده به ویروس آنفلوانزا، آلودگی آنفلوانزا توأم با نوموویروس است و واگیری آلودگی مشترک آنفلوانزا و نوموویروس در گله‌های آنفلوانزا مثبت ۲۰/۸۱ درصد است. اگرچه ماهیت عفونت نوموویروس به گونه‌ای است که بیشتر گله‌های مادر و تخم‌گذار را درگیر می‌کند، اما در دهه اخیر گزارش‌های متعددی از وجود آلودگی نوموویروس در گله‌های جوجه گوشتی در ایران و سایر کشورها وجود دارد. پیشتر مطالعات سرمی نوموویروس در گله‌های جوجه گوشتی استان اصفهان حاکی از آلودگی ۳۳/۹ درصدی در سن کشتار (۱) و آلودگی ۸۸/۹ درصدی در گله‌های واجد علایم تنفسی (۳) بوده است. علاوه بر آن، رحیمی در سال ۲۰۱۱ با نمونه‌گیری‌های تصادفی در کرمانشاه میزان شیوع سرمی پنوموویروس را در جوجه‌های گوشتی ۸۳ درصد گزارش کرد (۱۴). در پژوهش اخیر، میزان فراوانی موارد نوموویروس در سندرم‌های تنفسی استان اصفهان ۴۸/۵۷ درصد گزارش شده است. علت تفاوت در میزان فراوانی موارد نوموویروس در پژوهش یاد شده و پژوهش‌های قبلی را می‌توان به دلیل تکنیک ردیابی این ویروس دانست؛ به طوری که در روش‌های سرولوژی معمولاً به دنبال یک

www.SID.ir

Archive of SID

واگیری، آنتی بادی‌های علیه ویروس برای مدت طولانی‌تری در سرم باقی می‌ماند؛ اما در روش‌های مولکولی عمدتاً با پاک شدن ارگان‌های درگیر امکان ارزیابی گله‌های آلوده کاهش می‌یابد.

در پژوهش اخیر متوسط واگیری مشترک پنوموویروس و آنفلوانزا حدود ۲۰ درصد است. قبلاً واگیری‌های مشترک پنوموویروس با سایر عفونت‌های تنفسی مانند اشریشیاکلی (۱۹)، اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (۱۱) و برخی سویه‌های نیوکاسل (۷) در بوقلمون بیان شده است؛ اما با توجه به اینکه گزارش اخیر اولین گزارش از عفونت مشترک پنوموویروس و آنفلوانزا در جوجه‌های گوشتی است و مکانیسم دقیق اثرگذاری و پیچیده‌سازی پنومو ویروس در عفونت آنفلوانزا به خوبی مشخص نیست، اما به نظر می‌رسد کنترل پنوموویروس در مجاور سایر عوامل عفونی و غیرعفونی تأثیرگذار بر روند بیماری‌زایی آنفلوانزا، می‌تواند نقش عمده‌ای در کنترل آنفلوانزا داشته باشد.

به نظر می‌رسد در سندرم‌های تنفسی مشکوک به آنفلوانزا، آنچه در فیلد بالینی مشاهده دیده می‌شود برآیندی از تمامی عوامل عفونی و غیرعفونی تأثیرگذار در بیماری‌زایی آنفلوانزاست و نسبت دادن تلفات و ضایعات فقط به یک عامل تنفسی ممکن است موجب سوء برداشت از چهره بالینی آنفلوانزای غالب در ایران شود.

به طور کلی اگرچه در دهه اخیر واکسیناسیون علیه نوموویروس پرندگان در گله‌های مرغ مادر به طور پراکنده و غیرمنسجم انجام می‌شود اما با توجه به شیوع نسبتاً بالای پنوموویروس در گله‌های جوجه گوشتی به نظر می‌رسد الزام واکسیناسیون پنوموویروس در مرغ‌های گوشتی می‌تواند سهم عمده‌ای در کنترل عوارض و تلفات در عفونت‌های مخلوط آنفلوانزا داشته باشد.

منابع

۱- ضیاءجهرمی، نوشا؛ غلامی‌آهنگران، مجید و فتحی هفشجانی، عزت‌اله؛ شواهد سرمی از آلودگی نوموویروس پرندگان در جوجه‌های گوشتی استان اصفهان؛ میکروبیولوژی دامپزشکی؛ ۱۳۹۰؛ ۲۳: ۵۷-۶۱.

۲- غلامی‌آهنگران، مجید؛ چرخکار، سعید؛ شوشتری، عبدالحمید؛ بزرگمهری‌فرد، محمدحسن و عشرت‌آبادی، فاطمه؛ شناسایی مولکولی و تعیین تیپ ویروس برونشیت عفونی در موارد سندرم تنفسی جوجه‌های گوشتی در استان اصفهان؛ مجله علوم دامپزشکی ایران؛ ۱۳۸۷؛ ۵: ۴۶۹-۴۷۶.

۳- غلامی‌آهنگران، مجید؛ شوشتری، عبدالحمید؛ بهمنی‌نژاد، محمدعلی و نیکخواه‌قمصری، محمد؛ بررسی میزان آلودگی به متانوموویروس و آنفلوانزای پرندگان (تحت تیپ H9N2) در موارد سندرم تنفسی در جوجه‌های گوشتی استان اصفهان؛ مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج؛ ۱۳۹۰؛ ۵: ۱۵-۲۳.

4- Annonimus, Experimental Co-infection of Chickens and Turkeys with Avian Influenza and Newcastle Disease Viruses (http://www.thepoultrysite.com/articles/2927). 2013.

5- Banani, M; Pourbakhsh, S.A. and Khaki, P; Characterization of Ornithobacterium rhinotracheale isolates from commercial chickens. Arch. Razi Inst; 2001; 52: 27-34.

6- Bäyon-Auboyer, M.H; Comparison of F, G and N based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus.

www.SID.ir

Archive of SID

Arch. Virol; 2001; 144: 1091-1109.

7- Elizabeth, A; Turpin-Laura E.L; Perkins, D.E; Swayne, C; Experimental Infection of Turkeys with Avian Pneumovirus and Either Newcastle Disease Virus or Escherichia coli. Avian Dis; 2002; 46: 412-422.

8- Jones, R.C. and Rautenschlein, S; Avian metapneumovirus. Disease of Poultry; 13th Ed; Swayne, D.E; Glisson, J.R; McDougald, R; Nolan, L.K; Suarez, D.L. and Nair, V.L; W.B. Publishing, Massachusetts, USA, 2013; pp:121-139.

9- Kishida, N; Sakoda, Y; Eto, M; Sunaga, Y. and Kida, H; Co-infection of staphylococcus aureus or heamophilus paragallinarum exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chicken. Arch. Virol; 2004; 149: 2095-2104.

10-Lee, C.W; Shien, J.H; Chany, M.C. and Shieh, H.K; Identification and snbtyping of Avian Influenza Viruses by RT-PCR. J Virol. Methods; 2001; 97: 13-22.

11-Marien, M; Decostere, A; Martel, A; Chiers, K; Froyman, R. and Nauwynck, H; Synergy between avian pneumovirus and Ornithobacterium rhinotracheale in turkeys. Avian Pathol; 2005; 34: 204-11.

12-Nili, H. and Asasi, K; Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. Avian Pathol; 2002; 31: 247-52.

13-Pan, Q; Liu, A; Zhang, F; Ling, Y; Changbo, O; Hou, N. and He, C; Co-infection of broilers with Ornithobacterium rhinotracheale and H9N2 avian influenza virus. BMC Vet. Res; 2012; 8: 104-106.

14-Rahimi, M; Seroprevalence of avian metapneumovirus infection in broiler and broiler breeder chickens in Iran. Veterinarni Medicina; 2011; 56: 395-399.

15-Seifi, S; Asasi, K. and Mohammadi, A; Natural co-infection caused by avian influenza H9 sub type and infectious bronchitis viruses in broiler chicken farm.Vet. Sky Arhiv; 2010; 80: 269-281.

16-Suarez, D.L. and Sims, L.D; Influenza. Disease of Poultry; 13th Ed; Swayne, D.E; Glisson, J.R; McDougald, R; Nolan, L.K; Suarez, D.L. and Nair, V.L; W.B. Publishing, Massachusetts, USA, 2013; pp:181-219.

17-Tong, S; Zhu, X; Li, Y; Shi, M; Zhang, J; Bourgeois, M; Yang, H; Chen, X; Recuenco, S; Gomez, J; Chen, L.M; Johnson, A; Tao, Y;

www.SID.ir

Archive of SID

Dreyfus, C; Yu, W; McBride, R; Carney, P.J; Gilbert, A.T; Chang, J; Guo, Z; Davis, C.T; Paulson, J.C; Stevens, J; Rupprecht, C.E; Holmes, E.C; Wilson, I.A. and Donis, R.O; New world bats harbor diverse influenza A viruses. PLoS Pathol; 2013; 9(10):e1003657.

18-Vasfi-Marandi, M. and Bozorgmehri-Ford, M.H; Isfahan of H9N2 subtype of AI viruses during an outbreak in chikens in Iran. Iranian Biomed. J; 2002; 6: 13-17.

19-Zande, S.V; Nauwynck, H and Pensaert, M; The clinical, pathological and microbiological outcome of an Escherichia coli O2:K1 infection in avian pneumovirus infected turkeys. Vet. Mic; 2001; 81: 353-365.

www.SID.ir

Archive of SID

The molecular study of co- incidence of avian influenza (H9N2 subtype) and metapneumovirus in broiler chickens with respiratory syndrome in Isfahan province

Arab, M.[1]; Gholami-Ahangaran, M.[2*]; Jafarian-Dehkordi, M.[3]

1. DVM, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord- Iran.
2. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord- Iran.
3. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord- Iran.

Recieved: 9 September 2015 ***Accepted:*** 9 March 2016

Summary

At autumn of 2014 to 2015, lung and tracheal samples were taken from 35 broiler chickens flocks with respiratory syndrome suspected to avian influenza (AI) (H9N2 subtype) disease from different regions of Isfahan province. Viral RNA was extracted from tissue samples using RNA extraction kit and after synthesis of cDNA, avian influenza (H9N2 subtype) was detected with type and subtype specific primers. Therefore, a fragment approximately 115 base pair (bp) was amplified by one common pair primers for to all avian pneumovirus (AP). Results showed 24 out of 35 (68.57%) of chicken flocks with respiratory syndrome were infected to AI. The 11 out 24 flocks (45.83%) that infected to AI were co-infected to AP. The common morbidity of AI and AP in chicken flocks was 20.83%. Therefore it seems metapneumovirus has main role in forming and complexing of respiratory signs in broiler chickens suffering from AI in Isfahan province and complexing of AI and metapneumovirus infection may be possible in high percent of cases with respiratory syndrome.

Keywords: **Avian Influenza, Broiler Chicken, Metapneumovirus, PCR, Isfahan.**

* Corresponding Author E-mail: mgholamia@yahoo.com

www.SID.ir