

بررسی میزان همزمانی شیوع بیماریهای نیوکاسل و آنفلوانزا سویه (H9N2) در جوجه های گوشتی در شهرستان شهرکرد

عزت الله فتحی هفشجانی^{1*}، اسماعیل دوستی²، مجید غلامی¹، عبدالکریم زمانی مقدم³

1. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
2. دانش آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
3. گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسئول: ezzatfathi@yahoo.com

چکیده

در این مطالعه به بررسی میزان شیوع بیماریهای نیوکاسل و آنفلوانزا سویه (H9N2) به طور همزمان در گله های گوشتی دارای تلفات در شهرستان شهرکرد از طریق آزمایشات HI و RT-PCR پرداخته شده است. در این بررسی با انتخاب 15 گله دارای تلفات اقدام به اخذ نمونه خون در دو نوبت (نوبت اول در شروع بیماری و نوبت دوم به فاصله 14 روز بعد از بیماری) و انجام تست HI گردید. بر اساس نتایج حاصل از آزمایش HI، تعداد 6 گله (40%) بطور همزمان هم دارای عیار آنتی بادی ضد ویروس نیوکاسل و عیار آنتی بادی ضد ویروس آنفلوانزا سویه (H9N2) بودند و با توجه به میانگین تیتراژ آنتی بادی در دو نوبت نمونه گیری و مقایسه آنها با یکدیگر، 53/33 درصد گله ها در مورد آنفلوانزا و 60 درصد در مورد نیوکاسل دارای تیتراژ آنتی بادی ضد ویروس بالاتر از 2 بودند. نتایج آزمایش RT-PCR نشان داد که 11 گله همزمان به هر دو ویروس نیوکاسل و آنفلوانزا سویه (H9N2) آلوده بودند (73/33 درصد). در بررسی اختصاصی جهت تعیین پاتوتیپهای ویروس نیوکاسل بوسیله پرایمرهای VLTe و AVLTe (ولژن و غیر ولژن) 33/3 درصد گله ها آلوده به سویه ولژن و 66/6 درصد گله ها آلوده به سویه های غیر ولژن (شامل سویه های مزوژن و یا واکسینال) بودند. بررسی ویروس های آنفلوانزا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی H5N1 و H9N2 نشان داد که تمامی ویروس ها متعلق به تیپ H9N2 بودند. بر اساس نتایج این تحقیق علت تلفات شدید در تعدادی از گله های گوشتی بخاطر ابتلای همزمان آنها به این دو ویروس بوده است.

کلمات کلیدی: ویروس نیوکاسل، ویروس آنفلوانزا (H9N2)، طیور گوشتی، همزمانی، HI، RT-PCR.

مقدمه

وارد می کنند. علائم این دو بیماری به صورت تحت بالینی یا عفونت خفیف دستگاه فوقانی تنفس تا بیماری حاد و کشنده می توانند متفاوت باشد. عوامل متعددی همچون استرسهای محیطی، عفونتهای همزمان، سن پرند و ایمنی مادری می تواند نتیجه عفونت را تحت تاثیر قرار دهد. این دو بیماری در صورت ابتلا می توانند تا 100 درصد باعث مرگ و میر شوند. از راههای مبارزه با این دو بیماری جلوگیری از ورود ویروس به مزرعه، جداسازی پرندگان حساس از پرندگان آلوده، عدم تماس پرندگان حساس با

دو بیماری نیوکاسل و آنفلوانزا از دیر باز یکی از عوامل اصلی تلفات طیور در اکثر کشورها بوده اند. عامل بیماری نیوکاسل ویروسی از خانواده پارامیکسوویریده جنس اوولایروس که اسید هسته ای آن RNA با سنس منفی می باشد و عامل بیماری آنفلوانزا ویروسی از خانواده ارتومیکسوویریده جنس آنفلوانزا که اسید هسته ای آن RNA هشت قطعه ای با سنس منفی است (Saif et al., 2003; Alexander, 1999). این دو بیماری هر سال خسارات جبران ناپذیری به صنعت طیور کشورهای مختلف

آزمایشگاه، نمونه های سرمی و بافتی نیز کد گذاری شده و منجمد گردیدند و در پایان مرحله نمونه برداری، مورد آزمایش HI و RT-PCR قرار گرفتند. نمونه های خون پس از جداسازی سرم تحت آزمایش ممانعت از همآگلوتیناسیون (HI) قرار گرفتند تا از نظر تیتراژ آنتی بادی ضد ویروس های آنفلوانزا (H9N2, H5N1) و نیوکاسل کنترل شوند و در پایان نتایج بدست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در آزمون HI آن دسته از گله هایی که تیتراژ آنتی بادی بالای 2 داشتند و همچنین تیتراژ آنتی بادی آنها در نوبت دوم خونگیری نسبت به نوبت اول روند صعودی داشت مثبت و گله هایی که تیتراژ آنتی بادی آنها زیر عدد 2 و در خونگیری نوبت دوم نسبت به اول روند نزولی داشت منفی در نظر گرفته شدند.

آزمون RT-PCR

استخراج RNA و تخلیص آن با کیت تخلیص ساخت شرکت Roch و هموژنیزه کردن نمونه ها با Tris Hcl و SDS انجام شد. مراحل انجام RT-PCR بدین شرح بود: 1- تهیه ماده مسترمیکس (cDNA) با استفاده از کیت کیازن، پرایمرهای اختصاصی و آنزیم Taq DNA Polymerase 2- قراردادن لوله حاوی مسترمیکس در دستگاه اپندورف با سیکل دمایی 30/50 و 15/95 و 10/72 (درجه/دقیقه). 3- الکتروفورز در محیط ژل 2% آگارز جهت ردیابی محصول PCR به همراه مارکر 100 bp ساخت شرکت فرمتاز و در ولتاژ 120 بمدت 45 دقیقه، در آزمایش RT-PCR ابتدا نمونه های بافتی نای و سکاال تانسیل پس از استخراج RNA توسط پرایمرهای عمومی شرکت سیناکلون از نظر گروه ویروس ها مورد بررسی قرار گرفتند، بطوریکه در مورد نیوکاسل تمامی نمونه ها توسط پرایمرهای عمومی

پرندگان بهبود یافته، واکسیناسیون و درمانهای حمایتی را می توان نام برد (Saif et al., 2003; Jordan et al., 2001) در بررسیهای متعدد وجود ویروس نیوکاسل در اکثر پرندگان اهلی و وحشی در اکثر نقاط دنیا گزارش شده است. بیماری آنفلوانزای طیور سویه (H9N2) نخستین بار در خرداد 1377 در مرغداری های اطراف تهران و قزوین دیده شد که عامل آن توسط موسسه رازی و دانشکده دامپزشکی تهران جدا و به ترتیب به اسامی A/chicken/Iran/259/1377 و A/chicken/Iran/ZMT/101/1377 نام گذاری شدند (Vasfi Marandi and Bozorgmehri Fard, 2002; Nili and Asasi, 2003). با توجه به اندمیک بودن این دو بیماری در برخی از کشورها از جمله ایران، مطالعات زیادی در خصوص این دو بیماری بصورت مجزا در کشور انجام گرفته است ولی این دو بیماری تاکنون بصورت همزمان مورد بررسی قرار نگرفته اند. لذا در مطالعه حاضر همزمانی این دو بیماری مورد بحث قرار گرفته است.

مواد و روش کار

این مطالعه بصورت مقطعی و در فصل پاییز 1389 انجام شد، بدین صورت که ابتدا پس از دریافت گزارش تلفات از طرف مسئولین فنی مرغداریها به محل مورد نظر مراجعه نموده و پس از اخذ تاریخچه (شامل برنامه واکسیناسیون، برنامه غذایی، تاریخ شروع تلفات، تعداد تلفات، روند صعودی یا نزولی بودن تلفات و ثبت علائم کلینیکی) اقدام به نمونه گیری های بافتی (نای و سکاال تانسیل) و سرمی (در دو نوبت) می شد، بطوریکه از هر واحد 10000 قطعه ای، تعداد 12 عدد نمونه خون و 7 عدد نمونه بافتی اخذ گردید و تمامی نمونه ها در کنار یخ و در حداقل زمان به آزمایشگاه انتقال داده شد. پس از انتقال نمونه ها به

گروه نیوکاسل مورد بررسی قرار گرفتند که در هر 15 گله پرایمرهای اختصاصی VLTe و AVLTe مورد بررسی قرار ویروس نیوکاسل ردیابی شد. در مرحله دوم نمونه ها توسط گرفتند (Astrid et al., 2008).

جدول 1- پرایمرهای اختصاصی و عمومی مورد استفاده جهت تکثیر ژن ویروس نیوکاسل

نام پرایمر	توالی
پرایمر عمومی گروه ND	ALLs 5'-TTGATGGCAGGCCTCTTGC-3'
	Alle 5'-GGAGGATATTAACAGCATT-3'
پرایمرهای اختصاصی ویروس نیوکاسل ولوژن	ALLs 5'-TTGATGGCAGGCCTCTTGC-3'
	VLTe 5'-AGCGT(C/T)TCTGTCTCCT-3'
پرایمرهای اختصاصی ویروس نیوکاسل غیر ولوژن	AVLTs 5'-TTGATGGCAGGCCTCTTGC-3'
	AVLTe 5'-G(Ng)CG(A/T)CCCTGT(C/T)TCCC-3'

جدول 2- پرایمرهای اختصاصی و عمومی مورد استفاده جهت تکثیر ژن ویروس آنفلوانزا

نام پرایمر	توالی
پرایمر AI تیپ A	F1 5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACG-3'
	F2 5'-AGGGCATTTTGGACAAAKCGTCTA-3'
پرایمرهای اختصاصی H5	KHA-1 5'-CCAGARTATGCMTAYAAAAATT-3'
	KHA-3 5'-ACCAACCGTCTACCATKCCYTG-3'
پرایمرهای اختصاصی H9	F 5'-ATGGGGTTTGCTGCC-3'
	R 5'-TTATATACAAATGTTGCAC(T)CTG-3'
	Probe 5'-TTCTGGGCCATGTCCAATGG-3'

ضریب پراکندگی (CV) در هر گله بدست آمد. در ادامه با توجه به موارد مثبت و منفی نتایج آزمایشات HI و PCR با استفاده از روش آماری غیرپارامتریک، Chi-square و t-test گروهها در سطح ($P<0/05$) مورد بررسی آماری قرار گرفتند.

نتایج

آن دسته از گله هایی که میانگین تیتراژ آنتی بادی آنها بالای 2 بود و در آزمایش نوبت دوم نسبت به نوبت اول روند صعودی داشتند، مثبت قلمداد شدند و آن دسته که تیتراژ آنتی بادی آنها زیر عدد 2 بود و در آزمایش دوم نسبت به نوبت اول روند نزولی داشتند، منفی تلقی گردیدند. در

در خصوص بیماری آنفلوانزا تمام نمونه ها از طریق پرایمر تیپ A، مورد بررسی قرار گرفتند و موارد مثبت جهت تعیین سویه، جدا شد و در مرحله دوم RT-PCR توسط پرایمرهای اختصاصی سویه های H5N1 و H9N2 مورد بررسی قرار گرفتند (Monne et al., 2008).

تجزیه و تحلیل آماری

پس از بدست آمدن نتایج، ابتدا داده ها در نرم افزار Excel جمع آوری و طبقه بندی گردید سپس با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه 11/5 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در این نرم افزار ابتدا مقادیر میانگین و انحراف معیار عیار آنتی بادی در گله ها محاسبه شد و سپس

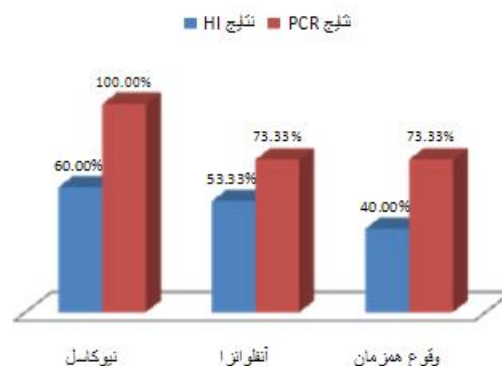
بحث

دو بیماری نیوکاسل و آنفلوانزا (H9) از بیماری های بسیار مسری و مهم در پرندگان و طیور گوشتی می باشند که همه ساله موجب تلفات زیاد و خسارت اقتصادی فراوانی به صنعت پرورش طیور در سراسر جهان می شوند. در کشور ما نیز این دو بیماری از اولویت های اول در ایجاد مرگ و میر در طیور گوشتی می باشند. تا کنون مطالعات گسترده ای در خصوص میزان شیوع این دو بیماری در دنیا انجام شده است. فتحی در سال 2007 با بررسی 13 گله مشکوک به بیماری نیوکاسل در استان چهارمحال و بختیاری با انجام آزمایشات HI، RT-PCR و کشت ویروسی در تخم مرغهای SPF به این نتیجه رسید که در روش PCR، همه گله ها دارای ویروس نیوکاسل و 4 گله از 13 گله آلوده به ویروس فوق حاد نیوکاسل و در آزمایش HI، 84/6% نمونه ها دارای آنتی ژن ضد ویروس نیوکاسل بودند (Fathi Hafshejani, 2007). رحیمیان در سال 2011 در استان اصفهان با بررسی 37 گله مشکوک به نیوکاسل اعلام کرد تمام گله ها، حاوی ویروس نیوکاسل بودند که از بین آنها 4 گله از نظر فرم ولوژنیک مثبت بود (Rahimian, 2011).

در بررسی حاضر نیز نتایج مشابهی بدست آمد بطوریکه در روش PCR هر 15 گله از نظر ویروس نیوکاسل مثبت و 5 گله آلوده به سویه ولوژن ویروس نیوکاسل بود و در روش HI، 60% گله ها از نظر وجود آنتی بادی ضد ویروس نیوکاسل مثبت بودند. محمدی درویش وند (1386) در بررسی 50 گله طیور گوشتی در استان اصفهان و چهارمحال به این نتیجه رسید که از 17 گله آلوده به آنفلوانزا تیپ A، 12 گله آلوده به سویه H9N2 بوده است و البته هیچ کدام از این 17 گله به سویه H5N1 آلوده نبودند (Mohamadi

آزمایش HI با توجه به میانگین تیتراژ آنتی بادی بدست آمده در دو نوبت نمونه گیری و مقایسه آنها با یکدیگر، در خصوص آنفلوانزا 53/33 درصد گله ها و در مورد نیوکاسل، 60 درصد گله ها دارای تیتراژ آنتی بادی ضد ویروس بالای 2 بودند. همچنین 40 درصد گله ها نیز از نظر وجود هر دو آنتی بادی بطور همزمان مثبت بودند (نمودار 1).

در نتایج بدست آمده از آزمایش RT-PCR، 100 درصد گله ها از نظر ویروس نیوکاسل و 73/33 درصد گله ها از نظر ویروس آنفلوانزا سویه (H9N2) و 73/33 درصد گله ها نیز از نظر وجود هر دو ویروس بطور همزمان مثبت بودند (نمودار 1).



نمودار 1- مقایسه نتایج موارد مثبت بیماری نیوکاسل و آنفلوانزا در آزمایش HI و PCR

در بررسی اختصاصی پاتوتیپهای ویروس نیوکاسل، بوسیله پرایمرهای VLTe و AVLTe (ولوژن و غیر ولوژن) 33/33 درصد گله ها آلوده به سویه ولوژن و 66/66 درصد گله ها آلوده به سویه های غیر ولوژن (شامل سویه های مزوژن و یا واکسینال) بودند. ویروس آنفلوانزا از طریق پرایمرهای سویه های H9N2 و H5N1 مورد بررسی قرار گرفتند که تمام موارد مثبت مربوط به سویه H9N2 بود.

نیوکاسل، بوسیله پرایمرهای VLTe و AVLTe (ولوژن و غیر ولوژن) 33/33 درصد گله‌ها آلوده به سویه ولوژن و 66/66 درصد گله‌ها آلوده به سویه‌های غیر ولوژن (شامل سویه‌های مزوژن و یا واکسینال) بودند. با توجه به نتایج این تحقیق و سایر محققین از جمله (Fathi, 2007) و (Rahimian, 2011) که در یک منطقه جغرافیایی انجام گردیده می‌توان چنین نتیجه گرفت که سویه‌های ولوژن ویروس نیوکاسل جدا شده در این تحقیق می‌توانند مشابهت زیادی با سویه‌های جدا شده در دو تحقیق فوق داشته باشند. همچنین با مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق و بررسی‌های سایر افراد که در مناطق مختلف انجام شده، مشخص می‌گردد که سویه‌های حاد ویروس نیوکاسل در برخی از کشورها مانند ایران سبب خسارات مهمی در صنعت طیور میشوند و از شیوع بالایی نیز برخوردار هستند و با مطالعه فوق همخوانی دارند. اما عدم جداسازی سویه‌های فوق حاد ویروس آنفلوانزا در این مطالعه در مقایسه با برخی مناطق همخوانی نشان نمی‌دهد. با تجزیه و تحلیل نتایج بدست آمده و تاریخچه گله‌های تحت مطالعه می‌توان علت اصلی تلفات را در 5 گله، سویه ولوژن ویروس نیوکاسل و در 9 گله دیگر ویروس آنفلوانزا (سویه H9N2) و یا ترکیبی از ویروس آنفلوانزا (H9 N2) و سویه‌های مزوژن نیوکاسل دانست و عامل تلفات در دو گله چیزی غیر از نیوکاسل و آنفلوانزا بوده، و در مواردی که آلودگی همزمان دو بیماری نیوکاسل و آنفلوانزا وجود داشته است، شدت تلفات گله‌ها تحت مطالعه بیشتر بوده است.

(Darvishvand, 2007). نیکخواه (1388) در مطالعه طیور کشتار شده کاشان به این نتیجه رسید که از 20 گله غیر واکسینه مورد بررسی، 17 گله از نظر آنفلوانزا سویه H9N2 مثبت هستند و 5/82 درصد گله‌های غیر واکسینه دارای آلودگی به آنفلوانزا و نوموویروس هم بودند (Nikkhah, 2009). (Ghamsary, 2009) در سال 2009 در موزامبیک بیشترین خسارت در طیور روستایی ناشی از ویروس‌های حاد نیوکاسل گزارش شد و همچنین میزان شیوع بیماری آنفلوانزا در مرغهای صنعتی پاکستان نیز در محدوده 10-20 درصد گزارش شده است (Naeem et al., 2003; Naeem et al., 1999). کمالی پور (1386) در گله‌های گوشتی در شهرستان رامهرمز میزان شیوع تیترا آنتی بادی ضد ویروس آنفلوانزا را 60 درصد گزارش کرد (Kamalipur, 2007). در مصر میزان شیوع سویه‌های حاد ویروس آنفلوانزا 75-28/8 درصد در اردک و 53/3-83/3 درصد در گله‌های مرغ و در ارتباط با نیوکاسل از 33/3-94/4 درصد گزارش شده است (Aly et al., 2009). در مطالعه حاضر که بطور همزمان دو بیماری نیوکاسل و آنفلوانزا در 15 گله گوشتی دارای تلفات مورد بررسی قرار گرفت، در روش RT-PCR، 73/33% گله‌ها و در روش HI 40% گله‌ها بطور همزمان از نظر ویروس نیوکاسل و آنفلوانزا مثبت بودند. همچنین در تست HI پس از دو بار خونگیری و آزمایش، 53/33% گله‌ها از نظر آنتی بادی ضد ویروس آنفلوانزا (سویه H9N2) مثبت و در روش RT-PCR، 73/33% از همین سویه مثبت بودند و اختلاف آماری معنی داری در مقایسه نتایج این دو روش، در سطح $P < 0/05$ وجود دارد. در این بررسی همه گله‌ها از نظر سویه H5N1 آنفلوانزا منفی بودند. در بررسی اختصاصی پاتوتیپهای ویروس

References

- Alexander, D.J. 1999. A review of avian influenza, Symposium on Animal Influenza Viruses, Ghent, Belgium.
- Aly, M., Mona Samaha, H.A., Gala, S.A., Arafa, A., Zahra, A., and Karin, S.B. 2009. Study on the presence of highly pathogenic avian influenza virus and Newcastle disease Virus in live bird markets in Tana district Egypt. FAO application.
- Astrid, G., Bernd, H., Timm, H., Christan, G., and Martin, B. 2008. Universal Primer Set for Amplification and Sequencing of HA₀ Cleavage Sites of All Influenza Viruses, J. Clin. Microbiol. 40: 2561-2567.
- Fathi hafshejani, E. 2007. Isolation and Identification of causative agent of Newcastle Disease in broiler chicken in Charmahal Va Bakhtiyari Province. Ph.D Thesis. Islamic Azad University, Science and Research Campus.
- Jordan, F.T.W., Patisson, M., Alexander, D., and Faragher, T. 2001. Poultry diseases, 5th ed, W.B .Saunders, London, p: 112-116.
- Kamalipur, M. 2007. Prevalence of the type H9N2 of avian influenza virus in broiler chicken from in Khuzestan Province, D.V.M. Thesis, Islamic Azad University, Shahrekord Branch.
- Mohamadi Darvishvand, E. 2007. Prevalence of avian influenza virus (H9N2) infection in broiler chicken from in Isfahan and Charmahal Va Bakhtiyari Province based on molecular techniques, D.V.M. Thesis, Islamic Azad University, Shahrekord Branch.
- Monne, I., Ormelli, S., Salviato, A., De Battisti, C., Bettini, F., Salomoni, A., Drago, A., Zecchin, B., Capua, I., and Cattoli, G. 2008. Development and Validation of a one-setup Real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7 and H9 Avian Influenza Virus, J. Clin. Microbiol. 46: 1769-1773.
- Naeem, K.A., Manvell, R.J., and Alexander, D.J. 1999. Influenza a subtype H9N2 in poultry in Pakistan. Vet. Rec. 145: 560.
- Naeem, K., Naurin, M., Rashid, S., and Bano, S. 2003. Seroprevalence Avian Influenza Virus and its relationship with increased mortality and decreased egg production. Avian. Pathol. 32: 285- 289.
- Nikkhah ghamasary, M. 2009. Seroprevalence of Avian Pneumovirus in broiler chicken in Kashan City, D.V.M. Thesis, Islamic Azad University, Shahrekord Branch.
- Nili, H., and Asasi, K. 2003. Avian Influenza (H9N2) outbreak in Iran. Avian. Dis. 47: 828-831.
- Rahimian, M.D. 2011. Detection and Characterization of Newcastle Disease Virus in broiler based on molecular techniques in Isfahan Province. D.V.M. Thesis, Islamic Azad University, Shahrekord Branch.
- Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., mc Dougald, L.R., and Swayne, D.E. 2003. Disease of poultry. 11th ed. Blackwell, New Jersey, p: 63-92, 135-160.
- Vasfi Marandi, M., and Bozorgmehri Fard, M.H. 2002. Isolation of H9N2 subtype of Avian Influenza Viruses during outbreak in chickens in Iran, Iran. Biomed. J. 6: 13-17.