نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۵ تابستان ۱۳۹۶
DOI: 10.22034/vj.2017.109221

ردیابی سرمی و مولکولی پنومو ویروس طیور در گله‌های مرغ گوشتی استان گیلان

• **یداله اسدپور (نویسنده مسئول)**
بخش تحقیقات دامپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ، رشت، ایران
• **ابراهیم رحیم آبادی (نویسنده مسئول)**
بخش تحقیقات دامپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ، رشت، ایران
• **عبدالحمید شوشتری**
بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سر م سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ، کرج، ایران
تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۵ تاریخ پذیرش: تیر ۹۵
Emali: yasadpour@yahoo.com

چکیده

پنومویروس طیور عامل مسبب عفونت فوقانی دستگاه تنفسی در جوجه‌ها و بوقلمون‌ها است. عفونت پنومویروس طیور سبب افزایش خسارت اقتصادی قابل توجهی در مرغ‌های گوشتی می‌شود. هدف ازاین مطالعه بررسی میزان شیوع پنومویروس در مرغ‌های گوشتی در سنین کشتار به روش الایزا و ردیابی آن به عنوان یک عامل در بیماری تنفسی گله‌های گوشتی به روش ملکولی بود. از ۲۹ گله گوشتی در سنین کشتار، تعداد ۴۶۰ نمونه سرم و از ۷۱ گله مرغ گوشتی با علائم تنفسی و تورم سینوس‌های زیر چشمی نمونه‌های سوآب نای، بافت نای و ریه جمع‌آوری شد. نتایج نشان داد که تعداد ۱۶ گله (۵۵ درصد) نسبت به عفونت پنومویروس در آزمایش الایزا مثبت بود. در نمونه‌های کلینیکی پس از استخراج RNA ویروس، آزمایش RT-PCR براساس پرایمر اختصاصی نوکلئوتیدی ژن N ویروسی انجام شد. نتایج مولکولی نشان‌دهنده تکثیر یک باند DNA ۱۱۵ جفت بازی در ۱۷ گله (۲۴ درصد) از ۷۱ گله طیور بود. این مطالعه اولین گزارش از وضع عفونت پنومویروس طیور در گله‌های گوشتی استان گیلان بود. بر اساس نتایج سرولوژی و ملکولی، عفونت پنومویروس در گله‌های مرغ گوشتی وجود داشته و به علت تاثیر آن بر عملکرد طیور بایستی توجه بیشتری به این عفونت شود.

کلمات کلیدی: پنومویروس طیور، الایزا، RT-PCR، گیلان

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 35-41

Serological and molecular detection of avian pneumovirus in broiler chicken flocks of Guilan province

By: Asadpour, Y., (Corresponding Author)Veterinary Research Department, Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Rasht, Iran. Rahimabadi, E., Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Rasht, Iran. and Shooshtari. A., Department of Research and Diagnosis of Poultry Disease Razi Vaccine and Serum Research Institute , AREEO, Karaj, Iran.

Received: 2016-05-11 Accepted: 2016-06-25

Emali: yasadpour@yahoo.com

Avian pneumovirus (APV) causes upper respiratory tract infection in chickens and turkeys. APV infection in chicken flocks gives rise to considerable economic losses. The aim of this study was to investigate the prevalence rate of APV in broiler flocks at slaughtering ages by Elisa method and detection it as a factor in the respiratory disease by molecular method. Total of 460 serum samples from 29 broiler flocks at slaughtering ages and from clinical samples (tracheal swabs, tracheal and lung tissues) of 71 broiler chicken flocks with respiratory signs and swollen infraorbital sinuses were collected. The serological results showed that 16 flocks (%55) were positive to APV infection, RNA was extracted from clinical samples and RT-PCR based on viral N gene sequence specific primer was performed. The molecular results revealed that 17(%24) out of 71 broiler flocks were positive in the amplification of a DNA band of 115 bp. This study was the first report of APV infection in broiler chicken flocks of Guilan province. Conclusively, based on results of this study APV infection is widespread in chicken flocks of Guilan and more attention should be paid to this virus, due to its effect on chicken's performance.

Keywords: Avian pneumovirus, ELISA, RT-PCR, Guilan

مقدمه

بیماری عفونی متاپنوموویروس پرندگان (Avian Metapeunomuvirus = aMPV) در گله‌های بوقلمون آفریقای جنوبی در اوخر دهه ۱۹۷۰میلادی گزارش شـد که در آن هنگام به علت علائم بالینی و جراحات کالبدگشایی با نـام رینوتراکئیت بوقلمـون(Turkey Rhinotracheitis=TRT) معرفی گردیـد (۹). این عفونت با درگیر نمودن قسـمت فوقانی دسـتگاه تنفس ماکیان و بوقلمون‌ها، سـبب کاهش عملکرد پرورشی شامل کاهش رشد، تولیدتخـم مرغ، افت کیفیت پوسـته بـه همراه افزایش میـزان مرگ و میـر به ویژه در صـورت وقوع عفونت‌های همزمان باکتریایی و ویروسـی می‌گـردد. متاپنوموویروس طیور در تعداد زیـادی از انواع گونه‌های طیور وجود داشـته اما مخزن اصلی آن بوقلمون و ماکیان می‌باشد این ویروس به خانواده پارامیکسـوویریده و تحت خانـواده پنوموویریده و تحت جنس متاپنوموویروس تعلق دارد(۸). آزمایش میکروسـکوپ الکترونی نشان داد کـه متاپنوموویروس طیـور پلی مورف چتری و معمولاً به شـکل کروی ناصـاف می‌باشـد. دارای ژنوم RNA تک رشـته‌ای بوده امـا فعالیت نور آمینیداز و هماگلوتینین ندارد (۴). انتقال بیماری به صورت افقی از طریق تماس مسـتقیم بین پرندگان آلوده و غیر آلـوده صورت می‌گیرد مدرک مستند علمی و قوی مبنی بر اینکه متاپنوموویروس طیور از طریق عمودی منتقل شود وجود ندارد. عفونت‌های پنوموویروس طیور با سندروم تورم سر مرتبط بوده که بیشتر در سنین ۶ - ۴ هفتگی مشاهده شده و میزان تلفات عفونت در موارد غیر کمپلکس تا ۲ درصد و بهبودی ۱۴ - ۱۰ روز می‌باشد. در موارد کمپلکس میزان تلفات ۳۰-۲۰ درصد گزارش شـده اسـت(۸). علائم معمول شـامل خس خس کردن (رال)، عطسه، تورم ملتحمه چشم، تورم سـینوس زیر چشـمی و ادم صورت، بی‌حالی و ضعف می‌باشـد. در صـورت ابتلا به عفونت‌های ویروسـی و باکتریایی همزمان ممکن اسـت پنومونی، پریکاردیت، پری هپاتیت و التهاب کیسه‌های هوایی نیز مشاهده گردد. تشـخیص عفونت پنوموویروس پرندگان عموما به وسیله روش‌های جداسـازی ویروس، سرولوژی و روش‌های ملکولی بوده که هر کدام از این روش‌ها دارای مزایا و معایبی در مقایسه با سایر روش‌ها می‌باشد. RT-PCR یک روش مناسب برای ردیابی این ویروس می‌باشد که دارای حساسیت و سرعت عمل بیشتری در مقایسه با روش‌های استاندارد جداسازی ویروس بوده که علت آن طبیعت مشکل پسند ویروس جهت رشد در محیط کشت سـلولی است(۴، ۸، ۹). با توجه به گزارش کلینیسین‌های بخش خصوصی و مسـئولین بهداشتی استان از علائم تورم سر در فارم‌های گوشتی و عدم تشخیص بیماری بر اساس نشانه‌های بالینی و تشابه نشانه‌های کالبدگشائی با سـایر بیماری‌های معمول طیور و همچنین گزارش منتشـر نشـده از وضعیت عفونت در اسـتان گیلان، برای اولین بار مطالعه حاضر به منظور بررسـی وضعیت شیوع عفونت در سـطح گله‌های گوشتی در کشتارگاه و ردیابی ویروس در گله‌های دارای علائم تنفسـی در مرغداری‌های اسـتان گیلان اجرا گردید

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی با هماهنگی مسئولین فنی ۳ کشتارگاه استان بطـور تصادفی تعداد ۴۶۰ نمونه خون جهت انجام آزمایش سـرولوژی از

ورید زیر بال ۲۹ گله مرغ گوشتی در سن کشتار (۸-۶ هفتگی) اخذ شد. همچنین در مطالعه هدف‌دار از ۷۱ گله مرغ گوشتی در سنین ۶-۳ هفتگی که دارای علائم تنفسی و تورم سر بودند بطور ضربدری تعداد ۱۰ سوآب نای در هر گله از مرغ زنده و از مرغ‌های تلف شده نیز بطور همزمان بعد از کالبدگشایی تعداد ۵ بافت نای و ریه جهت شناسائی مولکولی اخذ گردید(در آزمایشگاه نمونه‌های سوآب و نمونه‌های بافتی مخلوط شده و یک نمونه محسوب شد). گله‌ها در کشتارگاه فاقد نشانه بالینی بیماری بوده و هیچکدام از گله‌ها(کشتارگاه و سالن مرغداری) بر علیه پنوموویروس واکسینه نشده بودند اما سابقه واکسیناسیون بر علیه بیماری‌های نیوکاسل، برونشیت، آنفلوآنزا و گامبورو داشتند.

روش الایزا

نمونه خون اخذ شده بعد از جداسازی سرم، تا زمان آزمایش، در فریز ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. باکیت اختصاصی پنوموویروس طیور(Flock Chek® Avian Pneumovirus, IDEXX, Leibefeld-Bern, Switzerland) که قادر به تعیین آنتی بادی در مقابل تحت تیپ B,A و C پنوموویروس بوده استفاده شد. روش آزمایش و تفسیر نتایج بر اساس توصیه کارخانه سازنده کیت انجام شد. نمونه‌های سرم با طول موج nm۶۵۰ قرائت گردید و با نسبت S/P کمتر یا مساوی ۰/۲ منفی و نمونه‌های بالاتر از ۰/۲(تیتر بالاتراز ۳۹۶) مثبت ارزیابی شدند.

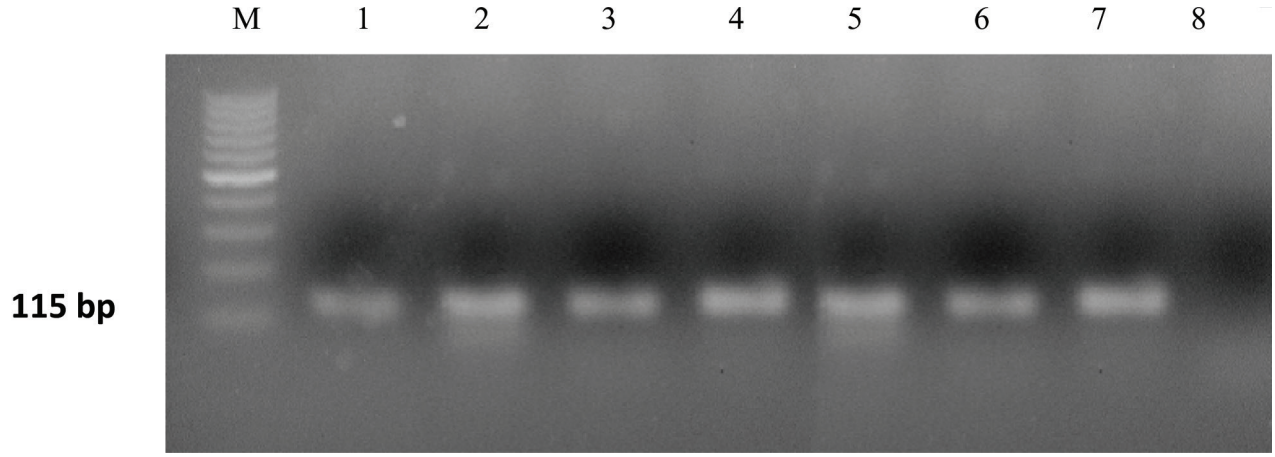
روش RT-PCR

سوآب‌ها در ۴ درجه سانتی گراد و نمونه‌های بافتی در ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند. از نمونه‌های بافتی با استفاده از سالین بافر فسفات (PBS) سوسپانسیون ۲۰ درصد تهیه و جهت استخراج RNA استفاده شد. بر اساس دستور سازنده کیت (Roche-Germany) High Pure Vired Neucleic Acid Kit مراحل استخراج RNA از مایع هموژنیزه نمونه‌های کلینیکی انجام شد واکنش RT جهت ساخت رشته cDNA از RNA در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد سپس آزمایش PCR برای تولید و تکثیر قطعه ۱۱۵ جفت بازی با استفاده از پرایمر اختصاصی نوکلئوتیدی ژن N ویروس (Nd/Nx) بر اساس طراحی (بایون-اوبوئر و همکاران،۱۹۹۹)(۲) انجام شد.

Nd: 5 AGC AGG ATG GAG AGC CTC TTT G 3

Nx: 5 CAT GGC CCA ACA TTA TGT T 3

به طور خلاصه: (µl) ۵ میکرولیتر از cDNA به ۴۵ میکرولیتر مخلوط PCR اضافه شد. مخلوط PCR شامل :۲/۵ واحد DNA Taq پلی مراز،(µl) ۵ میکرولیتر بافر Taq ۱۰ X پلی مراز، ۱/۵ میکرولیتر Mgcl۲ ۵۰ میلی مول، ۱میکرولیتر مخلوط dNTPS ۱۰میلی مول و (pmol۵۰) پیکومول از هر پرایمر بود. سپس مراحل PCR با دستگاه (Mastercycler gradiant, Eppendorf با تنظیم برنامه درجه حرارت و زمانی واسرشت شدن ابتدایی، ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه(یک سیکل)، ۳۰ سیکل اصلی واسرشت، اتصال و ساخت به ترتیب در درجه حرارت۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۱ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه بود و در آخر بسط انتهائی با ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه (یک سیکل) انجام شد. سپس محصولات PCR در اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و در ژل آگاروز ۲ درصد مورد بررسی قرارگرفت. واکسن زنده تحت تیپ B نموواک (مریال فرانسه) به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر عاری از RNase به عنوان کنترل منفی استفاده شد.



شکل ۱- الکترفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز دو درصد، رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید
M؛ مارکر با وزن ملکولی ۱۰۰ جفت باز،۱؛ کنترل مثبت (واکسن تحت تیپ B) ، ۲-۷؛ نمونه‌های مثبت، ۸؛ کنترل منفی (آب مقطر).

جدول ۱- تیتر آنتی بادی گله های گوشتی در سن کشتار به پنوموویروس با کیت آیدکس الایزا

گله	تعداد سرم	تعداد سرم مثبت	میزان درصد سرم مثبت	میانگین تیتر گله	CV درصد
F۱	۱۵	۵	۳۳	۴۰۳	۴۸
F۲	۱۶	۸	۵۰	۷۲۱	۳۹
F۳	۱۵	۳	۲۰	۲۸۴	۵۳
F۴	۱۶	-	-	-	-
F۵	۱۷	-	-	-	-
F۶	۱۷	۹	۵۲	۶۲۷	۵۱
F۷	۱۵	۷	۴۷	۴۷۸	۴۵
F۸	۱۵	-	-	-	-
F۹	۱۶	۶	۳۵	۵۹۶	۳۸
F۱۰	۱۶	۷	۴۴		
F۱۱	۱۶	-	-	-	-
F۱۲	۱۶	۸	۵۰	۴۸۰	۳۰
F۱۳	۱۶	-	-	-	-
F۱۴	۱۶	-	-	-	-
F۱۵	۱۷	۶	۳۶	۴۲۳	۴۳
F۱۶	۱۷	۷		۶۵۹	۴۳
F۱۷	۱۵	-	-	-	-
F۱۸	۱۶	۸	۵۰	۴۱۷	۴۲
F۱۹	۱۵	-	-	-	-
F۲۰	۱۵	۸	۵۳	۴۵۳	۳۹
F۲۱	۱۵	-	-	-	-
F۲۲	۱۶	-	-	-	-
F۲۳	۱۷	۹	۵۳	۴۲۸	۳۴
F۲۴	۱۶	۷	۴۴	۵۰۲	۴۳
F۲۵	۱۶	-	-	-	-
F۲۶	۱۶	-	-	-	-
F۲۷	۱۵	۴	۲۷	۳۷۸	۵۲
F۲۸	۱۵	-	-	-	-
F۲۹	۱۷	۱۰	۵۹	۸۳۲	۲۸

نتایج

در روش سرولوژی از ۲۹ گله مرغ گوشتی در سن کشتار، تعداد ۱۶گله (۵۵ درصد) نسبت به عفونت پنوموویروس مثبت بودند. از ۴۶۰ نمونه سرم خون، تعداد ۱۱۲نمونه (۲۴ درصد) سرم مثبت و تعداد سرم منفی ۳۴۸ نمونه (۷۶ درصد) بود. میزان درصد سرم مثبت بین ۵۹ درصد-۲۰ درصد متغیر بود. حداقل و حداکثر میانگین تیتر آنتی بادی در بین نمونه های سرمی در سطح گله ها بین۲۸۴ و ۸۳۲ بود (جدول ۱). در آزمایش-RT PCR ، ۷۱ گله مرغ گوشتی که دارای علائم تنفسی و تورم سینوس های زیر چشمی بودند یک باند DNA ۱۱۵ جفت بازی در ۱۷گله (۲۴ درصد) مشاهده شد (شکل ۱).

در صنعت طیور عفونت‌های تنفسی سبب خسارت اقتصادی شدیدی شده که در نتیجه افزایش میزان تلفات، بالارفتن هزینه‌های درمان، موارد حذف کشتارگاهی، کاهش میزان تولید و کاهش کیفیت پوسته تخم مرغ می‌باشد. عوامل بیماری‌زای مختلفی ممکن است باعث بیماری تنفسی شوند که بصورت تنها و یا بصورت همزمان با سایر میکروارگانیسم‌ها و یا فاکتورهای غیر عفونی نظیر شرایط بد محیطی و مشکلات مدیریتی قرار گیرند(۴، ۸، ۹). در مطالعه حاضر با استفاده از روش‌های سرولوژی و مولکولی عفونت پنوموویروس در مرغ‌های گوشتی استان گیلان مورد تائید قرار گرفت. از نظر میزان درصد شیوع آلودگی عفونت پنوموویروس در مرغ‌های گوشتی، نتایج تحقیق حاضرشباهت و تفاوت‌هائی با مطالعات سایر محققین داشته و در کمپلکس بیماری‌های تنفسی نقش پنوموویروس طیور در تمامی مطالعات به اثبات رسیده است به طوری که حافظ و ویلند(۵) در سال ۱۹۹۰ در گله‌های مادر مبتلا به سندرم تورم سر، پاسخ سرمی مثبت به پنوموویروس را گزارش نمودند اما علیرغم وجود تیتر آنتی‌بادی بر علیه پنوموویروس، علائم کلینیکی تورم سر در برخی گله‌ها مشاهده نشد. در شرق آسیا محققین گزارش کردند که ۸۴ درصد گله‌های مبتلا به سندرم تورم سر دارای تیتر آنتی بادی بر علیه پنوموویروس بودند. همچنین ۹۱ درصد گله‌های گوشتی مورد بررسی در کشور برزیل، و۳۰ درصد گله‌های گوشتی و ۶۰ درصد گله‌های بوقلمون در کشور شیلی از نظر پنوموویروس مثبت بودند. در لهستان، سرواپیدمیولوژی متاپنوموویروس در سرم‌های جمع‌آوری شده از ۳۹ گله مادر گوشتی سنین ۹۶-۱۲ هفتگی، ۵۶ درصد مثبت بود. تیتر آنتی بادی بر علیه پنوموویروس در گله‌های بوقلمون آمریکا در سال‌های ۱۹۹۸ و۲۰۰۲ در ایالت مینه سوتا به عنوان یکی از مناطق مهم پرورش بوقلمون از ۱۴درصد به ۶۵ درصد افزایش یافت که دلالت بر سرعت گسترش این عفونت بوده است. شیوع آلودگی درگله‌های مرغ مادر و گوشتی کشور مالزی در سال ۱۹۹۶ به طور میانگین از ۴۷ درصد به ۶۴ درصد در سال ۲۰۰۷ افزایش یافت. پژوهش‌های انجام شده در گله‌های تخم‌گذار در فیلیپین نشان‌دهنده آلودگی ۱۰۰ درصد این گله‌ها بوده است. در کره جنوبی فارم‌هائی که دچار کاهش تولید بودند ۵۹ درصد آلودگی به عفونت پنوموویروس را نشان دادند و در پرندگان بظاهر سالم ۳۷ درصد آلودگی به عفونت گزارش شد. در کشور ترکیه بررسی سرولوژیک و میکروبیولوژی پنوموویروس در جوجه‌ها انجام شد که از تعداد ۴۲۶ نمونه سرم متعلق به ۹ گله گوشتی نتایج آنتی بادی در ۸ گله گوشتی بین ۷۶ درصد - ۳۲ درصد و از۷ گله مادر گوشتی در۶ گله مادر بین ۴۸ درصد - ۵ درصد بود (۸، ۹).

نقش پنوموویروس به عنوان یک فاکتور در بیماری تنفسی در کشور اردن در گله‌های گوشتی، تخم‌گذار و مادر گوشتی بررسی شد. از ۲۳ گله گوشتی تعداد ۵ گله (۲۲ درصد)، از ۸ گله تخم‌گذار تعداد ۶ گله (۷۵ درصد) و ۱۰۰ درصد گله مادر گوشتی (۷ گله) از نظر سرولوژی مثبت گزارش گردید، در صورتی‌که از نظر مولکولی پنوموویروس طیور در ۱۷ گله گوشتی (۱۳ درصد) و در ۳ گله تخم گذار (۴۳ درصد) شناسائی گردید، جدایه‌های ۲۰ گله از نوع تحت تیپ B بوده است (۳).

عفونت پنوموویروس در گله‌های مرغ مادر گوشتی استان آذربایجان غربی(۱) بررسی شد. از ۵۵۲ نمونه خون اخذ شده، ۲۰۷ مورد (۳۷ درصد) مثبت، ۱۵۳ نمونه (۲۸ درصد) مشکوک و ۱۹۲ نمونه (۳۵ درصد) منفی تشخیص داده شد. بیشترین نمونه‌های مثبت مربوط به گله‌های مسن و پرندگانی که در دوران پس از پیک تولید تخم مرغ بوده و تنها ۲۳ درصد از گله‌های جوان در حال پرورش دارای آنتی‌بادی بر علیه پنوموویروس بودند.

شیخی و مسعودیان(۱۳) در سال ۲۰۱۰، از ۱۱ استان اصلی تولید جوجه یکروزه کشور بطور تصادفی تعداد ۲۷ گله مرغ مادر گوشتی که در برنامه واکسیناسیون آن‌ها از واکسن پنوموویروس استفاده نکرده بودند تعداد ۵۴۰ سرم را با استفاده از کیت الایزای تجاری مورد آزمایش قرار دادند. ۲۵ (۹۳ درصد) گله مادر دارای میانگین تیتر مثبت علیه متاپنوموویروس طیور و ۲ گله دیگر از نظر آلودگی به متاپنوموویروس طیور مشکوک بودند. ۵۰۱ نمونه سرمی (۹۳ درصد) تیتر مثبت،۲۰مورد (۴ درصد) تیتر مشکوک و مابقی نمونه‌ها فاقد پاسخ سرمی بر علیه عفونت بودند. بین شیوع عفونت پنوموویروس با مشکل تنفسی ارتباط معنی‌داری مشاهده شد($p < ۰/۰۵$) مطالعه بیانگر شیوع بالای عفونت در سطح گله‌های ($p < ۰/۰۵$) مرغ مادرگوشتی ایران بوده است.

رحیمی(۱۱) در سال ۲۰۱۱ از چهار منطقه جغرافیائی استان کرمانشاه تعداد ۴۳۵ نمونه از ۳۰ گله تجاری (۲۴ گله گوشتی در سنین بین ۸-۶ هفتگی و ۶ گله مرغ مادر گوشتی در سنین بین ۷۲-۵۶ هفتگی) جمع‌آوری نمودند. ۲۰ گله (۸۳ درصد) از ۲۴ گله گوشتی و ۱۶۷ نمونه (۴۸ درصد) از تعداد ۳۴۷ نمونه سرم نسبت به آنتی‌بادی پنوموویروس مثبت بود. ۱۰۰ درصد گله‌های مادر دارای تیتر آنتی‌بادی بر علیه پنوموویروس بودند اما از تعداد ۸۸ نمونه سرم خون اخذ شده تعداد ۸۲ نمونه (۹۳ درصد) نسبت به عفونت پنوموویروس مثبت بود. نتایج تحقیق نشان داد که آلودگی سرولوژیک به متاپنوموویروس در تمام جوجه‌هایی که دارای علائم تنفسی بودند، تایید شد.

ضیاء جهرمی و همکاران(۱۴) در سال ۲۰۱۱ در استان اصفهان، تعداد ۳۶۰ نمونه سرمی از ۲۴ فارم گوشتی کشتار شده در سنین ۵۰ تا ۶۰ روزگی جمع‌آوری نمودند. نتایج نشان داد که از ۳۶۰ نمونه سرمی، ۱۲۲ نمونه (۳۴ درصد) از لحاظ وجود آنتی‌بادی علیه پنوموویروس مثبت بود، در این بررسی ۸۳ درصد از فارم‌های نمونه‌گیری شده از لحاظ پنوموویروس واجد حداقل یک نمونه مثبت سرمی بود. در این بررسی به دلیل نمونه‌گیری در زمان کشتار، احتمال بقای آنتی‌بادی مادری بسیار کم بوده زیرا بر اساس شواهد موجود آنتی بادی مادری بیش از ۴ هفته پس از تفریخ دوام نداشته، فلذا مشاهده تیتر سرمی در اواخر دوره پرورش می‌تواند بیانگر چالش طبیعی با این ویروس باشد.

در مطالعه حاضر میـزان آلودگی عفونت در گله‌های طیور گوشـتی (۵۵ درصد) و تائید آن به روش مولکولی (۲۴ درصد) اعلام شـد. اختلاف نتایج سـرولوژی و مولکولی در این مطالعه و تحقیقات سـایر محققین(۶) را می‌توان چنین بیان نمود که در حقیقت پنوموویروس‌ها در سـلول‌های مبتلای میزبان به آهسـتگی همانندسازی نموده و فقط در مدت چند روز بعد از عفونت اولیه شناسـائی شده در صورتی‌که پاسخ آنتی‌بادی در مدت طولانی تری بعد از عفونت در میزبان قابل ردیابی می‌باشد.

در بررسـی انجام شده توسـط اونگور و همکاران (۱۰) در سال ۲۰۱۰ هیچ مورد مثبتی از کشـت سلولی از نمونه‌های مثبت حاصل از RT-PCR گزارش نگردید. این یافته نشـان‌دهنده حساس بودن روش ملکولی نسبت به روش کشـت سـلولی اسـت، عدم وجود نتایج مثبت در کشت سلولی می‌توانـد به علت عدم وجود ویـروس زنده، تیتر پائیـن نمونه‌ها و زمان نامناسب اخذ نمونه‌ها باشد.

همایونفـر و همـکاران(۷) در سـال ۲۰۱۴ از ۵۰ گلـه دارای علائم تنفسـی (۴۳ گله مربوط به گله گوشـتی، ۵ گله تخم‌گـذار، ۲ گله مادر گوشتی) نمونه‌هائی از سوآب شکاف کامی، نای و بوقک‌های بینی پرندگان جمـع‌آوری نمودند. تعداد ۸ گله (۱۶ درصـد) از نظر ژنG پنوموویروس مثبت بودند. تمامی گله‌های مثبت متعلق به گله‌های گوشـتی بوده و در میانگین سـنی ۵-۳ هفتگی قرار داشتند، نمونه های مثبت تحت تیپ B ویـروس بوده و با تعیین توالی نوکلئوتیدی موارد مثبت و بررسـی درخت فیلوژنیک سویه‌های ایرانی و سویه‌های واکسن‌های مورد مصرف در کشور، چنین نتیجه گرفته شـد که سویه‌های ایرانی دور از سویه‌های واکسینال و در شاخه‌ای جداگانه قرار گرفته و با این بررسی نتیجه‌گیری شد که ویروس متاپنوموویروس پرندگان نقش قابل توجهی در بروز سـندرم‌های تنفسی گله‌های ماکیان اسـتان‌های آذربایجان شـرقی و غربی دارد. میزان شیوع آلودگی متاپنوموویروس در گله‌های گوشتی اهواز ۵۵ درصد گزارش گردید و سـپس در مطالعه دیگری که بر روی ۵۰ گله گوشتی غیر واکسینه و در سـنین ۸-۶ هفته در دو کشـتارگاه اهواز انجام شد نمونه‌های سوآب نای با پرایمر اختصاصـی Nd/Nx,PCR گردید که در ۱۴گله (۲۸ درصد) باند ۱۱۵ bpتشکیل و پنوموویروس شناسائی شد و با استفاده از Semi Nested PCR جهت تائید نتایج از Nd / Nx انجام شـد که برای اولین بار در ایران صورت گرفت(۶).

نقش هر کدام از عوامل بیماری‌زای تنفسـی شامل آنفلوانزای H۹N۲، برونشـیت عفونی، نیوکاسل، پنوموویروس و مایکوپلاسماگالی سپتیکوم به تنهائی و یا باهمدیگر در ۱۱۵ گله گوشـتی دارای علائم تنفسی در کشور اردن از نظر مولکولی بررسی شد. نتایج نشان داد که ۱۵گله (۱۳ درصد) به نیوکاسـل، ۱۷ گله (۱۱ درصد) به برونشیت عفونی به تنهائی درگیر بودند در صورتی که درگیر شـدن گله‌ها به دو عامل بیماری‌زا به ترتیب ۱۸ گله (۱۶ درصد) به برونشـیت عفونی و ویـروس آنفلوانزا، ۱۳ گله (۱۱ درصد) به ویروس نیوکاسـل و آنفلوانزا، ۱۲ گله (۱۰درصد) به برونشـیت عفونی و مایکوپلاسـماگالی سـپتیکوم، ۱۱ گله (۱۰ درصد) به برونشیت عفونی و ویروس نیوکاسـل، ۷ گله (۶ درصد) پنوموویروس و مایکوپلاسـماگالی سـپتیکوم، ۶ گله (۵ درصد) به نیوکاسـل و مایکوپلاسـماگالی سپتیکوم شناسـائی شد و ویروس‌های برونشـیت عفونی، نیوکاسل، پنوموویروس با همدیگر در ۳ گله (۶ درصد) تعیین هویت شدند (۱۲).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج سرولوژی و مولکولی مطالعه حاضر، عفونت پنوموویروس به طور وسـیع در گله‌های مرغ گوشـتی اسـتان گیلان وجود داشـته و مطالعات بعدی جهت بررسـی عفونت‌های همزمان ویروسی و باکتریائی با پنوموویروس طیور در کمپلکس بیماری تنفسی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسـندگان مقاله برخود لازم می‌دانند تا از موسسه سرم‌سازی رازی جهـت تخصیـص اعتبارات مالی ایـن پروژه (کـد ۹۰۰۷-۱۸-۵۸-۲) و همچنین از ناظر محترم پروژه جناب آقای دکتر طرقی و همکاران محترم مرکز تحقیقات کشـاورزی و منابع طبیعی گیلان، آزمایشـگاه دامپزشکی دکتر میراعلمی و پرسـنل بخش تحقیق و تشخیص موسسه رازی تقدیر و تشکر بعمل آورند.

منابع مورد استفاده

1- Allymehr,M., M. Tabatabaei and A. Mamaghani. 2006. Seroprevalence study of avian pneumovirus infection in breeder chickens. *Journal of Veterinary Medicine Research*, 61(2): 129-133. [In Farsi]

2- Bayon-Auboyer, M.H., C. Arnauld, D. Toquin and N. Eterradossi,. 2000. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumovirus (APV) reveal a novel APV subgroup. *Journal of Genetic Virology*, 81: 2723-2733.

3- Gharibeh, S.M. and G.R. AL-gharibeh,. 2007. Serological and molecular detection of avian pneumovirus in chickens with respirstory disease in Jordan. *Journal of Poultry Science*, 4:455-461.

4-Gough, R.E. and R.C. Jonnes. 2008. Avian metapneumovirus Chapter 3, section 1, Viral disease.pp. 683-688, in: Y.M. Saif, B.W. Calnek, Barnes, and et al, Disease of poultry (12theds), Ames Iowa state university press.

5- Hafez,H.M. and M.U. Weiland. 1990. Isolierung des virus der Rhinotracheitis der puten (TRT). Freie Universitat Berlin. *Tierarzt, Umschau*. P: 103-111.

6- Hesami, G., M.R. Seyfi Abad Shapouri and M. Mayahi. 2013. Detection of avian Metapneumovirus infection in broilers by nested RT-PCR. *Online Journal of Veterinary Research,* 17(4)159-166.

7- Homayounfar, N., A. Soushtari, S. Charkhkar and M.H . Bozorgmehrifard . 2014. Detection of avian Metapneumovirus infection in fowls of west and east Azarbijan. *Journal of Comparative pathobiology.* 2:965-970. [In Farsi]

8- kannan, G.(2007). Avian metapneumovirus- anelusive pathogen of chickens. *World Poultry*, 23(4): 36-37.

9- OIE terrestrial Manual. (2008). Turkey Rhinotracheitis (avian metapneumovirus) in: Manual of diagnostic tests and vaccine for

terrestrial animals (mammals, birds and bees),6th Edition, Vol 1, chapter 2.3.15, pp:590-598.

10- Ongor, H. Karahan, M., Kalin, R., Bulut, H. and Cetinkava, B. 2010. Detection of avian metapneumovirus subtypes in turkey using RT-PCR. *Journal of Veterinary Record*, 166:363-366.

11- Rahimi, M. 2011. Seroprevalence of avian metapneumovirus infection in broiler and breeder chickens in Iran. *Veterinary Medicina*, 56(8):395-399.

12- Roussan, D.A., R. Haddad And G. Khawaldeh. 2008. Molecular survey of respiratory pathogens in commercial broiler chicken flocks with respiratory diseases in Jordan. *Poultry Sciences,* 87(3):444- 448.

13-Sheikhi, N. and A. Masoudian. 2010. Seroprevalence of Avian Metapneumovirus infection In some Broiler Breeder Flocks of Iran. *Journal of Comparative Pathobiology*. 8(1):431-438. [In Farsi].

14- Zia-Jahromi, N., M. Gholami-Ahangaran and E. Fathi-Hafshejani,. 2011. The Serologic Evidence of Avian Pneumovirus in Broiler Chickens of Isfahan Province. *Journal of Veterinary Microbiology*. 7 (2):57-62. [In Farsi].