



## 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 گیلان،

رشت، ایران

• ابراهیم رحیم آبادی

بخش تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان،

رشت، ایران

• عبدالحمید شوشتری

بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، موسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج،

ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۵ تاریخ پذیرش: تیر ۹۵

Emali: yasadpour@yahoo.com



### چکیده

پنومو ویروس طیور عامل مسبب عفونت فوقانی دستگاه تنفسی در جوجه‌ها و بوقلمون‌ها است. عفونت پنومو ویروس طیور سبب افزایش خسارت اقتصادی قابل توجهی در مرغ‌های گوشتی می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع پنومو ویروس 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 سوآب‌های سواب‌های، بافت‌های و ریه جمع‌آوری شد. نتایج نشان داد که تعداد ۱۶ گله (۵۵ درصد) نسبت به عفونت پنومو ویروس 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 پنومو ویروس طیور در گله‌های گوشتی استان گیلان بود. بر اساس نتایج سرولوژی و ملکولی، عفونت پنومو ویروس در گله‌های مرغ گوشتی وجود داشته و به علت تاثیر آن بر عملکرد طیور بایستی توجه بیشتری به این عفونت شود.

کلمات کلیدی: پنومو ویروس 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 Department, Agricultural Research, Education and Natural Resources Center, Guilan, Iran. Rahimabadi, E., Veterinary Department, Agricultural Research, Education and Natural Resources Center, Guilan, Iran. and Shoostari.A., Department of Research and Diagnosis of Poultry Disease, Razi Vaccine and serum Research Institute, Karaj, Iran.

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

Email: 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) در گله‌های بوقلمون آفریقای جنوبی در اواخر دهه ۱۹۷۰ میلادی گزارش شد که در آن هنگام به علت علائم بالینی و جراحات کالبدگشایی با نام رینوتراکئیت بوقلمون (Turkey Rhinotracheitis=TRT) معرفی گردید (۹). این عفونت با درگیر نمودن قسمت فوقانی دستگاه تنفس ماکیان و بوقلمون‌ها، سبب کاهش عملکرد پرورشی شامل کاهش رشد، کاهش تولید تخم‌مرغ، افت کیفیت پوسته به همراه افزایش میزان مرگ و میر به ویژه در صورت وقوع عفونت‌های همزمان باکتریایی و ویروسی می‌گردد. متاپنوموویروس طیور در تعداد زیادی از انواع گونه‌های طیور وجود داشته اما مخزن اصلی آن بوقلمون و ماکیان می‌باشد این ویروس به خانواده پارامیکسوویریده و تحت خانواده پنوموویریده و تحت جنس متاپنوموویروس تعلق دارد (۸). آزمایش میکروسکوپ الکترونی نشان داد که متاپنوموویروس طیور پلی‌مورف، چتری و معمولاً به شکل کروی ناصاف می‌باشد. دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای بوده اما فعالیت نور آمینیداز و هم‌گلویتینین ندارد (۴). انتقال بیماری به صورت افقی از طریق تماس مستقیم بین پرندگان آلوده و غیر آلوده 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 شده است

(۸). علائم معمول شامل خس خس کردن (رال)، عطسه، تورم ملتحمه چشم، تورم سینوس زیر چشمی و ادم صورت، بی‌حالی و ضعف می‌باشد. در صورت ابتلا به عفونت‌های ویروسی و باکتریایی همزمان ممکن است پنومونی، پریکاردیت، پری‌هپاتیت و التهاب کیسه‌های هوایی نیز مشاهده گردد. تشخیص عفونت پنوموویروس پرندگان عموماً به وسیله روش‌های جداسازی ویروس، سرولوژی و روش‌های مولکولی 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 سلولی است (۴، ۸، ۹). با توجه به گزارش کلینیسین‌های بخش خصوصی و مسئولین بهداشتی استان از علائم تورم سر در فارم‌های گوشتی و عدم تشخیص بیماری بر اساس نشانه‌های بالینی و تشابه نشانه‌های کالبدگشایی با سایر بیماری‌های معمول طیور و همچنین گزارش منتشر نشده از وضعیت عفونت در استان گیلان، برای اولین بار مطالعه حاضر به منظور بررسی وضعیت شیوع عفونت در سطح گله‌های گوشتی در کشتارگاه و ردیابی ویروس در گله‌های دارای علائم تنفسی در مرغداری‌های استان گیلان اجرا گردید

**مواد و روش‌ها**

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

با استفاده از سالیین بافر فسفات (PBS) سوسپانسیون ۲۰ درصد تهیه و جهت استخراج RNA استفاده شد. بر اساس دستور سازنده کیت (Roche-) High Pure Vired Nucleic Acid Kit (Germany) مراحل استخراج RNA از مایع هموژنیزه نمونه‌های کلینیکی انجام شد و 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: ۵ میکرولیتر از cDNA به ۴۵ میکرولیتر مخلوط PCR اضافه شد. مخلوط PCR شامل ۲/۵ واحد DNA Taq پلی مراز، (۱۱) میکرولیتر بافر ۱۰ X Taq پلی مراز، ۱/۵ میکرولیتر  $MgCl_2$  ۵۰ میلی مول، ۱ میکرولیتر مخلوط dNTPS ۱۰ میلی مول و (۵۰ pmol) پیکومول از هر پرایمر بود. سپس مراحل PCR با دستگاه (Mastercycler gradient, 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 حرارت ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۱ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه بود و در آخر بسط انتهایی 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 قرار گرفت. واکسن زنده تحت تیپ B نموواک (میرال فرانسه) به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر عاری از RNase به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

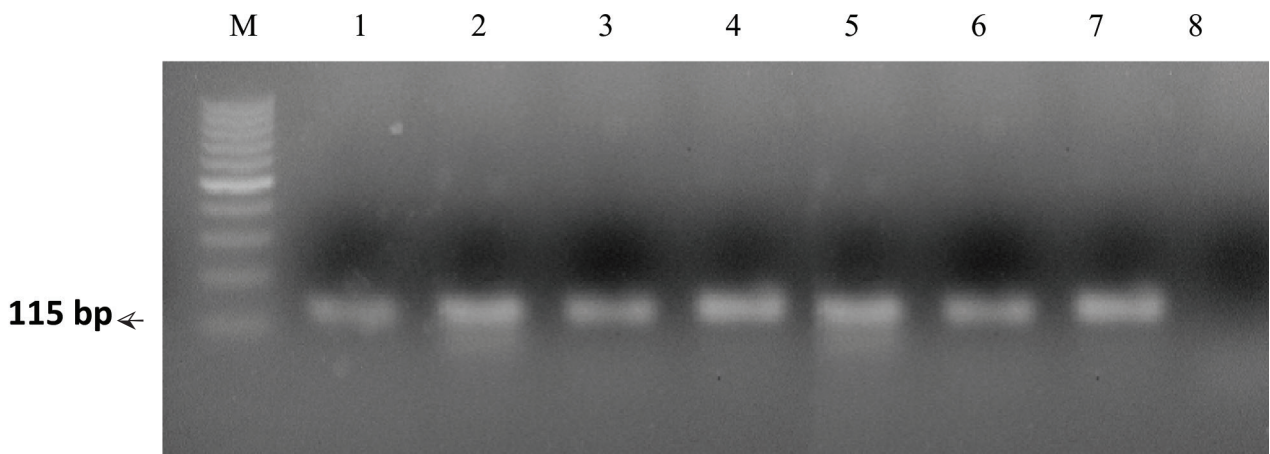
ورید زیر بال ۲۹ گله مرغ گوشتی در سن کشتار (۸-۶ هفتگی) اخذ شد. همچنین در مطالعه هدفدار از ۷۱ گله مرغ گوشتی در سنین ۳-۶ هفتگی که دارای علائم تنفسی و تورم سر بودند بطور ضربدری تعداد ۱۰ سوآب نای در هر گله از مرغ زنده و از مرغ‌های تلف شده نیز بطور همزمان بعد از کالبدگشایی تعداد ۵ بافت نای و ریه جهت شناسایی 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 ۶۵۰ nm قرائت گردید و با نسبت S/P کمتر یا مساوی ۰/۲ منفی و نمونه‌های بالاتر از ۰/۲ (تیترا بالاتر از 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



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز دو درصد، رنگ آمیزی 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- تیتراژ 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 تیتراژ گله	CV درصد
F1	۱۵	۵	۳۳	۴۰۳	۴۸
F2	۱۶	۸	۵۰	۷۲۱	۳۹
F3	۱۵	۳	۲۰	۲۸۴	۵۳
F4	۱۶	-	-	-	-
F5	۱۷	-	-	-	-
F6	۱۷	۹	۵۲	۶۲۷	۵۱
F7	۱۵	۷	۴۷	۴۷۸	۴۵
F8	۱۵	-	-	-	-
F9	۱۶	۶	۳۵	۵۹۶	۳۸
F10	۱۶	۷	۴۴		
F11	۱۶	-	-	-	-
F12	۱۶	۸	۵۰	۴۸۰	۳۰
F13	۱۶	-	-	-	-
F14	۱۶	-	-	-	-
F15	۱۷	۶	۳۶	۴۲۳	۴۳
F16	۱۷	۷		۶۵۹	۴۳
F17	۱۵	-	-	-	-
F18	۱۶	۸	۵۰	۴۱۷	۴۲
F19	۱۵	-	-	-	-
F20	۱۵	۸	۵۳	۴۵۳	۳۹
F21	۱۵	-	-	-	-
F22	۱۶	-	-	-	-
F23	۱۷	۹	۵۳	۴۲۸	۳۴
F24	۱۶	۷	۴۴	۵۰۲	۴۳
F25	۱۶	-	-	-	-
F26	۱۶	-	-	-	-
F27	۱۵	۴	۲۷	۳۷۸	۵۲
F28	۱۵	-	-	-	-
F29	۱۷	۱۰	۵۹	۸۳۲	۲۸

گله گوشتی بین ۳۲ تا ۷۶ درصد و از ۷ گله مادر گوشتی در ۶ گله مادر بین ۵ تا ۴۸ 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 صورتی که از نظر مولکولی پنوموویروس طیور در ۱۷ گله گوشتی (۱۳ درصد) و در ۳ گله تخم‌گذار (۴۳ درصد) شناسایی گردید، جدایه‌های ۲۰ گله از نوع تحت تیپ B بوده است (۳).

عفونت پنوموویروس در گله‌های مرغ مادر گوشتی استان آذربایجان غربی 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 (۱).

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 گله مادر (۹۳ درصد) دارای میانگین تیتراژ مثبت علیه متاپنوموویروس طیور و ۲ گله دیگر از نظر آلودگی به متاپنوموویروس طیور مشکوک بودند. ۵۰۱ نمونه سرمی (۹۳ درصد) تیتراژ مثبت، ۲۰ مورد (۴ درصد) تیتراژ مشکوک و مابقی نمونه‌ها فاقد پاسخ سرمی بر علیه عفونت بودند. بین شیوع عفونت پنوموویروس با مشکل تنفسی ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ( $p < 0/05$ ) مطالعه بیانگر شیوع بالای عفونت در سطح گله‌های ( $p < 0/05$ ) مرغ مادر گوشتی ایران بوده است.

رحیمی (۱۱) در سال ۲۰۱۱ از چهار منطقه جغرافیایی استان کرمانشاه تعداد ۴۳۵ نمونه از ۳۰ گله تجاری (۲۴ گله گوشتی در سنین بین ۶-۸ 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 تیتراژ آنتی‌بادی بر علیه پنوموویروس بودند اما از تعداد ۸۸ نمونه سرم 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، تأیید شد.

ضیاء چهرمی 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 آنتی‌بادی مادری بیش از ۴ هفته

## نتایج

در روش سرولوژی از ۲۹ گله مرغ گوشتی در سن کشتار، تعداد ۱۶ گله (۵۵ درصد) نسبت به عفونت پنوموویروس مثبت بودند. از ۴۶۰ نمونه سرم خون، تعداد ۱۱۲ نمونه (۲۴ درصد) سرم مثبت و تعداد سرم منفی ۳۴۸ نمونه (۷۶ درصد) بود. میزان درصد سرم مثبت بین ۲۰ تا ۵۹ درصد متغیر بود. حداقل و حداکثر میانگین تیتراژ آنتی‌بادی در بین نمونه‌های سرمی در سطح گله‌ها بین ۲۸۴ و ۸۳۲ بود (جدول ۱). در آزمایش RT-PCR، ۷۱ گله مرغ گوشتی که دارای علائم تنفسی و تورم سینوس‌های زیر چشمی بودند یک باند DNA ۱۱۵ جفت بازی در ۱۷ گله (۲۴ درصد) مشاهده شد (شکل ۱).

## بحث

در صنعت طیور عفونت‌های تنفسی سبب خسارت اقتصادی شدیدی شده که شامل 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 تأیید قرار گرفت. از نظر میزان درصد شیوع آلودگی عفونت پنوموویروس در مرغ‌های گوشتی، نتایج تحقیق حاضر شباهت و تفاوت‌هایی 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 تیتراژ 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 تیتراژ آنتی‌بادی بر علیه پنوموویروس بودند. همچنین ۹۱ درصد گله‌های گوشتی مورد بررسی در کشور برزیل، و ۳۰ 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. تیتراژ آنتی‌بادی بر علیه پنوموویروس در گله‌های بوقلمون آمریکا در سال‌های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۲ در ایالت مینه‌سوتا به عنوان یکی از مناطق مهم پرورش بوقلمون از ۱۴ درصد به ۶۵ درصد افزایش یافت که دلالت بر سرعت گسترش این عفونت بوده است. شیوع آلودگی در گله‌های 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 فارم‌هایی 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 آنتی‌بادی در ۸

همدیگر در ۳ گله (۶ درصد) تعیین هویت شدند (۱۲).

### نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج سرولوژی و مولکولی مطالعه حاضر، عفونت پنوموویروس به طور وسیع در گله‌های مرغ گوشتی استان گیلان وجود داشته و مطالعات بعدی جهت بررسی عفونت‌های همزمان ویروسی و باکتریایی با پنوموویروس طیور در کمپلکس بیماری تنفسی توصیه می‌شود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله برخود لازم می‌دانند تا از موسسه سرم‌سازی رازی جهت تخصیص اعتبارات مالی این پروژه (کد ۹۰۰۷-۱۸-۵۸-۲) و همچنین از ناظر محترم پروژه جناب آقای دکتر طرقي و همکاران محترم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان، آزمایشگاه خصوصی دامپزشکی دکتر میراعلمی و پرسنل 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. Eterra-dossi., 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 respiratory 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. SeyfiAbad 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. Bo-zorgmehrifard . 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

پس از تفریح دوام نداشته، فلذا مشاهده تیترا سرمی در اواخر دوره پرورش می‌تواند بیانگر چالش طبیعی با این ویروس باشد.

در مطالعه حاضر میزان آلودگی عفونت در گله‌های طیور گوشتی (۵۵ درصد) و تأیید آن به روش مولکولی (۲۴ درصد) اعلام شد. اختلاف نتایج سرولوژی و مولکولی در این مطالعه و تحقیقات سایر محققین (۶) را می‌توان چنین بیان نمود که در حقیقت پنوموویروس‌ها در سلول‌های میتلای میزبان به آهستگی همانندسازی نموده و فقط در مدت چند روز بعد از عفونت اولیه شناسائی شده در صورتی که پاسخ آنتی‌بادی در مدت طولانی تری بعد از عفونت در میزبان قابل ردیابی می‌باشد.

در بررسی انجام شده توسط اونگور و همکاران (۱۰) در سال ۲۰۱۰ هیچ مورد مثبتی از کشت سلولی از نمونه‌های مثبت حاصل از RT-PCR گزارش نگردید. این یافته نشان‌دهنده حساس بودن روش مولکولی نسبت به روش کشت سلولی است، عدم وجود نتایج مثبت در کشت سلولی می‌تواند به علت عدم وجود ویروس زنده، تیترا پائین نمونه‌ها و زمان نامناسب اخذ نمونه‌ها باشد.

همایونفر و همکاران (۷) در سال ۲۰۱۴ از ۵۰ گله دارای علائم تنفسی (۴۳ گله گوشتی، ۵ گله تخم‌گذار، ۲ گله مادر گوشتی) نمونه‌هایی از سواب شکاف کامی، نای و بوقک‌های بینی پرندگان جمع‌آوری نمودند. تعداد ۸ گله (۱۶ درصد) از نظر ژن G پنوموویروس مثبت بودند. تمامی گله‌های مثبت متعلق به گله‌های گوشتی بوده و در میانگین سنی ۳-۵ هفتگی قرار داشتند، نمونه‌های مثبت تحت تیپ B ویروس بوده و با تعیین توالی نوکلئوتیدی موارد مثبت و بررسی درخت فیلوژنیک سویه‌های ایرانی و سویه‌های واکسن‌های مورد مصرف در کشور، چنین نتیجه گرفته شد 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 سندرم‌های تنفسی گله‌های مایکسان استان‌های آذربایجان شرقی و غربی دارد. میزان شیوع آلودگی متاپنوموویروس در گله‌های گوشتی اهواز ۵۵ درصد گزارش گردید و سپس در مطالعه دیگری که بر روی ۵۰ گله گوشتی غیر واکسینه و در سنین ۸-۶ هفته در دو کشتارگاه اهواز انجام شد نمونه‌های سواب نای با پرایمر اختصاصی PCR Nd/Nx گردید که در ۱۴ گله (۲۸ درصد) باند ۱۱۵ bp تشکیل و پنوموویروس شناسائی شد و با استفاده از Semi Nested PCR جهت تأیید نتایج از Nd / Nx انجام شد که برای اولین بار در ایران صورت گرفت (۶).

نقش هر کدام از عوامل بیماری‌زای تنفسی شامل آنفلوانزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>، برونشیت عفونی، نیوکاسل، پنوموویروس و مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم به تنهایی و یا باهمدیگر در ۱۱۵ گله گوشتی دارای علائم تنفسی در کشور اردن از نظر مولکولی بررسی شد. نتایج نشان داد که ۱۵ گله (۱۳ درصد) به نیوکاسل، ۱۷ گله (۱۱ درصد) به برونشیت عفونی به تنهایی درگیر بودند در صورتی که درگیر شدن گله‌ها به دو عامل بیماری‌زا به ترتیب ۱۸ گله (۱۶ درصد) به برونشیت عفونی و ویروس آنفلوانزا، ۱۳ گله (۱۱ درصد) به ویروس نیوکاسل و آنفلوانزا، ۱۲ گله (۱۰ درصد) به برونشیت عفونی و مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم، ۱۱ گله (۱۰ درصد) به برونشیت عفونی و ویروس نیوکاسل، ۷ گله (۶ درصد) پنوموویروس و مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم، ۶ گله (۵ درصد) به نیوکاسل و مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم شناسائی شد و ویروس‌های برونشیت عفونی، نیوکاسل، پنوموویروس با

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 chick-

en 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).

