ردیابی مولکولی عوامل ویروسی نیوکاسل، برونشیت عفونی پرندگان و آنفلوانزای پرندگان (H_9) در نمونه‌های کمپلکس تنفسی گله‌های گوشتی استان گلستان در سال ۱۳۹۸

محمد منتظری[۱]، آرش قلیانچی لنگرودی*[۲]، ناصر صدری[۳]، زهرا ضیافتی کافی[۳]، مهدی وصفی مرندی[۴]

۱- دانشجوی دکترای بهداشت و بیماری‌های پرندگان، گروه بهداشت و بیماری‌های پرندگان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲- استاد، گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- دانشجوی دکترای تخصصی ویروس شناسی، گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۴- استاد، گروه بهداشت و بیماری‌های پرندگان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۱۸ آذر ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۵ بهمن ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۲ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

گسترش صنعت طیور و پرورش متراکم پرندگان در فضای بسته و محدود باعث به وجود آمدن عفونت‌های تنفسی با منشأ عوامل عفونی مختلف، خصوصاً عوامل ویروسی آنفلوانزای پرندگان (AI)، بیماری نیوکاسل (ND) و برونشیت عفونی شده است. شواهد نشان می‌دهد که این عوامل در گله‌های درگیر، به‌صورت هم افزایی عمل می‌کنند. تعداد ۲۰ گله گوشتی درگیر عفونت تنفسی در استان گلستان در سال ۱۳۹۸ انتخاب شد. نمونه‌های نای و کلیه به آزمایشگاه منتقل شد و به‌منظور ردیابی ویروس‌های نیوکاسل، برونشیت عفونی و آنفلوانزای (H9)، روش PCR مورد استفاده قرار گرفت. طبق نتایج، گله‌ها بیشتر درگیر برونشیت عفونی (۲۰ درصد) بودند و پس از آن، به‌ترتیب بیماری‌های نیوکاسل (۱۵ درصد) و آنفلوانزای پرندگان (H9) (۱۰ درصد) شیوع داشتند. همچنین در بین عفونت‌های کمپلکس، ترکیب برونشیت عفونی با عوامل نیوکاسل (۲۰ درصد) و آنفلوانزای پرندگان (۲۰ درصد)، بیشترین فراوانی را داشت. بر اساس نتیجه‌گیری این مطالعه ویروس برونشیت عفونی مهم‌ترین نقش را در ایجاد کمپلکس‌های تنفسی داشت و عفونت همزمان با ویروس عامل نیوکاسل و آنفلانزای H9 نیز باعث شدید شدن علائم و تلفات در گله می‌شود. توصیه می‌شود برای اطلاع از شیوع فاکتورهای خطر این بیماری و ارزیابی واکسن‌ها در گله‌ها، هر سال مطالعات اپیدمیولوژیکی دقیقی صورت گیرد. این اولین مطالعه جامع بر روی کمپلکس تنفسی گله‌های گوشتی در استان گلستان، یکی از قطب‌های تولید گوشت مرغ در کشور، می‌باشد.

واژگان کلیدی: *کمپلکس تنفسی، نیوکاسل، برونشیت عفونی پرندگان، آنفلوانزای H9، استان گلستان*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: arashghalyanchi@gmail.com

مقدمه

هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان شیوع و تعیین سهم هر یک از سه عامل ویروسی مهم (نیوکاسل، برونشیت عفونی پرندگان و آنفلوانزای پرندگان H9) در ایجاد کمپلکس‌های تنفسی در گله‌های گوشتی استان گلستان در سال ۱۳۹۸ می‌باشد. در سال‌های اخیر، بیماری‌های تنفسی به‌ویژه با منشأ ویروسی به دلیل خسارت‌های اقتصادی قابل توجه، یکی از مشکلات اصلی صنعت طیور ایران بوده است. استان گلستان با دارا بودن ۹۱۱ واحد پرورش جوجه گوشتی و ظرفیت بیش از ۲۹ میلیون قطعه جوجه گوشتی در هر دوره، یکی از قطب‌های تولید گوشت مرغ در کشور به شمار می‌رود. بر اساس آمار منتشر شده از سازمان دامپزشکی کشور، بیشترین خسارت اقتصادی در گله‌های گوشتی ناشی از درگیری با مشکلات تنفسی بوده است. کمپلکس تنفسی اصطلاحی متداول است که برای توضیح مشکلات و علایم تنفسی رایج، به‌خصوص در گله‌های مرغ گوشتی، مورد استفاده قرار می‌گیرد و از آنجا که مشکلات تنفسی طیور در غالب موارد تحت تأثیر بیش از یک عامل است، از آنها با عنوان کمپلکس بیماری‌های تنفسی یاد می‌شود. این کمپلکس‌ها که بیشتر در فصول سرد سال پدیدار می‌شوند، عموماً نشانه‌هایی مانند رال‌های تنفسی، عطسه، سرفه و تورم سر و صورت را ایجاد می‌کنند. در کالبدگشایی نیز جراحاتی از قبیل پرخونی و وجود چرک در نای و ریه به چشم می‌خورد. از جمله بیماری‌های ویروسی که چنین نشانه‌های بالینی و کالبدگشایی را ایجاد می‌کنند می‌توان به نیوکاسل، برونشیت عفونی و آنفلوانزای پرندگان (H9) اشاره کرد. عوامل هر سه بیماری از راه تنفس وارد بدن پرنده می‌شوند. ویروس‌های به وجود آورنده این سه بیماری دارای پوشش بوده و به بسیاری از ضد عفونی کننده‌ها حساس هستند و به راحتی از بین می‌روند. راه اصلی انتقال هر سه ویروس نیز به صورت افقی مستقیم و غیر مستقیم می‌باشد (۱، ۲).

برونشیت عفونی یک بیماری تنفسی بسیار واگیردار است که به واسطه نشانه‌های دستگاه تنفسی فوقانی از قبیل رال، سرفه و عطسه مشخص می‌گردد. این بیماری گسترش جهانی دارد و یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی صنعت طیور است. ویروس عامل برونشیت عفونی، پروتوتیپ گاماکرونا‌ویرس بوده و ژنوتیپ و سروتیپ‌های زیادی دارد که حاصل جهش‌های متعدد در ژنوم (RNA) این ویروس می‌باشد. این سروتیپ‌ها ایمنی متقاطع ایجاد نمی‌کنند، بدین معنی که ایجاد ایمنی با یک نوع سروتیپ، نمی‌تواند پرنده را در مقابل سروتیپ‌های دیگر به طور کامل محافظت کند (۲). برای کنترل این بیماری در مزارع پرورش جوجه گوشتی در کشور، از واکسن‌های زنده حاوی سروتیپ‌های ماساچوست و 793/B استفاده می‌شود که معمولاً به‌صورت اسپری در هچری و سالن در روز یک، و حداقل هفت روز بعد تکرار آن صورت می‌گیرد.

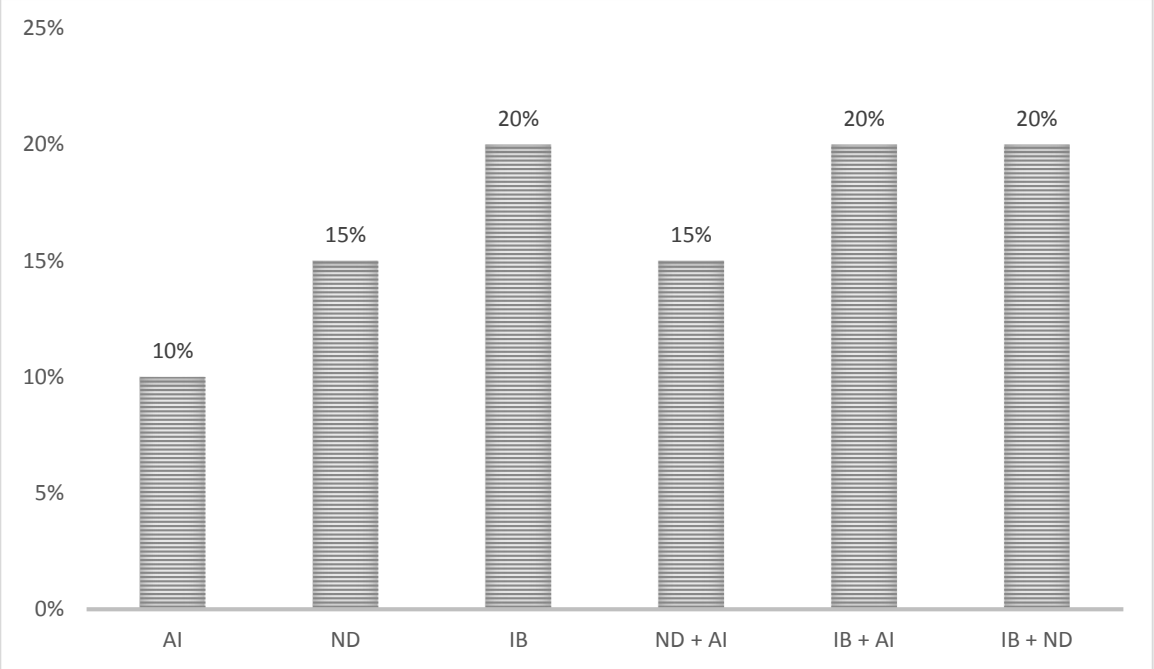
بیماری نیوکاسل در سراسر دنیا پرندگان وحشی و صنعتی را آلوده و خسارات فراوانی به صنعت وارد می‌کند. عامل آن یک پارامیکسوویروس است و ژنوم RNA تک‌رشته‌ای دارد. این بیماری بسیار مسری است و بدون استراتژی کنترلی مناسب، منجر به واگیری و تلفات بالا در جوجه‌های غیرواکسینه یا جوجه‌هایی که به درستی در آنها واکسیناسیون صورت نگرفته می‌شود. این بیماری، خصوصاً در فرم‌های حاد، توسط OIE یک بیماری خطرناک قلمداد شده و وقوع آن حتماً باید گزارش شود (۱). در ایران برای کنترل بیماری نیوکاسل در گله‌های گوشتی، از برنامه‌های متنوع واکسن‌های کشته و زنده استفاده می‌شود. سویه‌های متداول مورد استفاده شامل لاسوتا و B1، VG/GA می‌باشد.

بیماری آنفلوانزای پرندگان یکی از مهم‌ترین

بیماری‌های ویروسی طیور است که منجر به ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌های بدون نشانه تا نشانه‌های شدید تنفسی به همراه عفونت حاد سیستمیک با تلفات تقریباً ۱۰۰ درصدی و خسارات سنگین اقتصادی می‌شود. عامل این بیماری ارتومیکسوویروس بوده که دارای ژنوم RNA هشت قطعه‌ای می‌باشد. ویروس‌های آنفلوانزا به چهار تیپ A، B، C و D تقسیم می‌شوند. تمامی ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان متعلق به تیپ A هستند. به‌طور کلی ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان به دو پاتوتیپ HP با تلفات گاهی در حدود ۱۰۰ درصد و LP با بیماری ملایم به صورت علایم تنفسی و دپرس با تلفات کم (۵ درصد) تا شدید (۹۷ درصد) در صورت همراهی با سایر عوامل بیماری‌زا تقسیم می‌شوند (۳). H9N2 و H5Nx در کشور ما بومی هستند. ویروس‌های H5N1 در برخی از کشورهای خاور دور مثل چین، ویتنام، بنگلادش و اندونزی و همچنین مصر به شکل اندمیک وجود دارد. در ایران این ویروس همچنان در طیور روستایی و همچنین پرندگان وحشی در گردش است و هرلحظه امکان ورود H5N1 از طیور بومی و روستایی استان‌های شمالی و استان‌هایی که سابقه درگیری دارند به‌طور صنعتی وجود دارد. تحت تیپ H5N8 در آسیا و اروپا و خاور میانه وجود دارد و در کشور ما نیز ۱۵ استان درگیر شده‌اند. این تحت تیپ در حال حاضر می‌تواند در اردک، غاز و قو تلفات ایجاد کند و در عین حال وارد جمعیت صنعتی شود. مدفوع عامل اصلی انتقال بین مزارع است (۳). در ایران برای کنترل این بیماری در گله‌های گوشتی، از واکسن کشته (H9N2) در سن یک روزگی یا هفت روزگی استفاده می‌شود که گاهی به همراه بیماری نیوکاسل، به‌صورت دوگانه تزریق می‌شود، البته برخی از گله‌های گوشتی از واکسن آنفلوانزا استفاده نمی‌کنند.

جدول ۱- انواع پرایمرهای استفاده شده به همراه توالی پرایمر و اندازه محصول

ویروس	ژن هدف	نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول(bp)
Avian Influenza virus	M	MF	CTYCACACAGARCACAATGG	۲۴۴
		MR	GTCACACTTGTTGTTGTRTC	
Infectious Bronchitis virus	UTR	UTR41	AGT TCT ATC GCC AGG GAA AT GTC	۴۰۵
		UTR11	GCTCTAACTCTATAC TAG CCTA	
Newcastle Disease virus	F	NDCreF	GGTGAGTCTATCCGGARGATACAAG	۲۰۳
		NDCreR	TCATTGGTTGCRGCAATGCTCT	



نمودار ۱- فراوانی عوامل ویروسی مختلف در گله‌های گوشتی استان گلستان

مواد و روش‌ها

اخذ و حمل نمونه‌ها: ۲۰ مزرعه گوشتی با نشانه‌های تنفسی در استان گلستان برای شرکت در این آزمایش انتخاب شد. تمامی مزارع از نظر هر سه بیماری واکسینه بودند. از تلفات هر مزرعه، پنج نمونه نای و پنج نمونه کلیه جمع‌آوری شد. قطعات بافتی نای و کلیه در ظروف جداگانه استریل قرار گرفت و سپس تا زمان ارسال به آزمایشگاه، در فریزر قرار گرفت. سپس در مجاورت یخ به آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل گردید. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

استخراج RNA: برای استخراج RNA از کیت استخراج CinnaPure (شرکت سیناکلون، ایران) استفاده شد. کلیه مراحل استخراج مطابق شیوه‌نامه شرکت سازنده کیت و با رعایت نکات بهداشتی و زیست محیطی انجام گرفته است. در هر استخراج نیز، کنترل منفی مورد استفاده قرار می‌گرفت.

آزمون RT-PCR: برای ردیابی ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان (H9)، برونشیت عفونی و نیوکاسل، به‌ترتیب از پرایمرهای ژن M، UTR و F (شرکت سیناکلون، ایران) استفاده شد. توالی پرایمر و اندازه محصول در جدول ۱ آمده است. مواد و برنامه دمایی مورد نیاز برای تکثیر ژن‌های F (۴)، M (۵) و UTR (۶) در منابع ذکر شده است. پس از اتمام کار واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، محصولات در ژل الکتروفورز ۱ درصد قرار داده شد تا در صورت حضور DNA، باند مورد نظر نمایان شود.

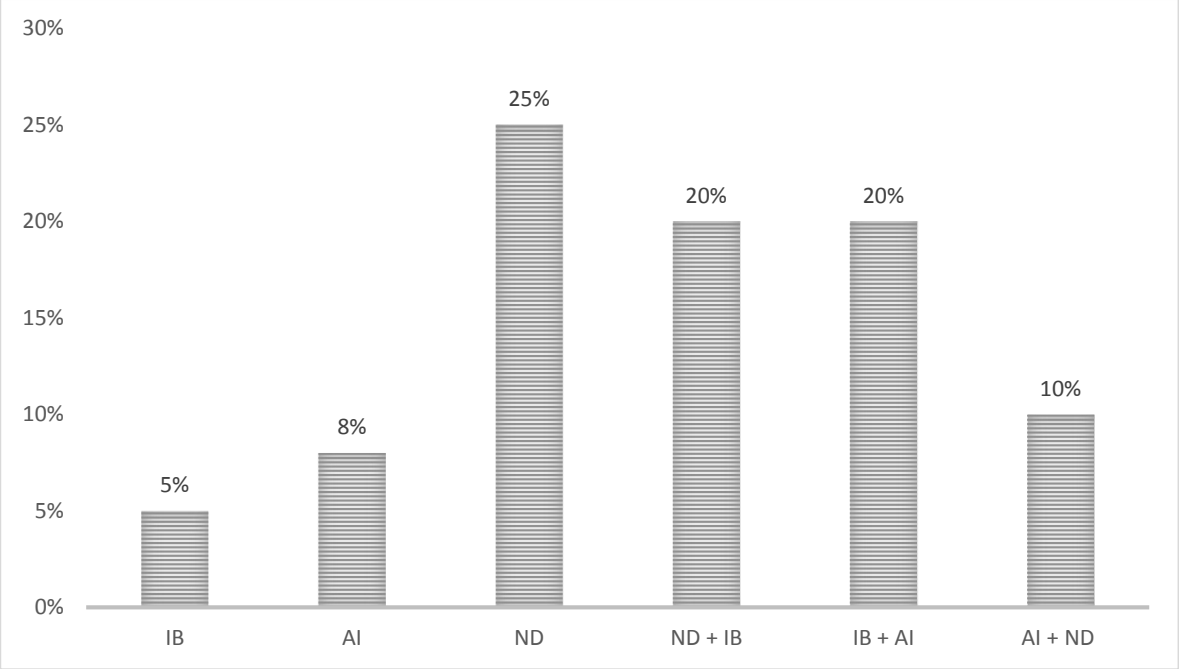
نتایج

درصد فراوانی عوامل ویروسی تشخیص داده شده در ۲۰ گله مورد آزمایش در نمودار ۱ قابل مشاهده است. با توجه به این نتایج، بیشترین درگیری مربوط به بیماری برونشیت عفونی به تنهایی و ترکیب آن با عوامل نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان (H9) بوده است. در مجموع، ۶۰ درصد گله‌ها آلوده به ویروس برونشیت عفونی، ۵۰ درصد گله‌ها آلوده به ویروس نیوکاسل و ۴۵ درصد گله‌ها آلوده به ویروس آنفلوانزای پرندگان (H9) بودند. هیچ گله‌ای از نظر

هر سه بیماری به طور همزمان مثبت نشد در جدول ۲، اطلاعات ثبت شده از نوع ویروس تشخیص داده شده از گله‌های درگیر بیماری تنفسی آمده است. همان‌طور که در این جدول مشخص است، به طور کلی بیماری برونشیت عفونی پرندگان در سنین پایین‌تری شناسایی شد. پس از این بیماری، به‌ترتیب نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان (H9) در سنین بالاتری درگیری ایجاد کرده‌اند. این موضوع احتمالاً نشان‌دهنده این است که بیماری برونشیت عفونی به تنهایی زودتر از دو عامل دیگر وارد گله می‌شود. تلفات حاصل از این سندرم تنفسی در گله‌ها در نمودار ۲ قابل مشاهده می‌باشد. معمولاً عفونت همزمان در گله توسط دو عامل، تلفات بیشتری را به همراه داشته است.

جدول ۲- اطلاعات ثبت شده از نوع ویروس تشخیص داده شده از گله‌های درگیر بیماری تنفسی

شماره مزرعه	سن (روز)	برونشیت عفونی	نیوکاسل	آنفلوانزای H9
۱	۳۰	+	+	-
۲	۲۵	+	-	-
۳	۳۱	+	+	-
۴	۲۴	+	-	-
۵	۳۳	+	-	+
۶	۳۴	+	-	+
۷	۲۹	+	+	-
۸	۳۴	+	-	+
۹	۳۶	-	+	+
۱۰	۲۹	-	+	-
۱۱	۳۳	-	+	+
۱۲	۲۶	+	+	-
۱۳	۲۸	-	+	-
۱۴	۳۲	+	-	+
۱۵	۳۵	-	-	+
۱۶	۳۴	-	+	+
۱۷	۳۶	-	-	+
۱۸	۲۹	-	+	-
۱۹	۲۴	+	-	-
۲۰	۲۵	+	-	-



نمودار ۲- درصد تلفات ناشی از هر بیماری در گله‌های درگیر با سندرم تنفسی در استان گلستان

بحث

در سال‌های اخیر، بیماری‌های تنفسی یک از مشکلات اساسی گله‌های گوشتی در سراسر دنیا بوده است. در این میان، برونشیت عفونی، بیماری نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان (H9) در ایران نقش مهم‌تری در ایجاد این مشکل داشته‌اند (۱۵-۷). در سال ۲۰۱۱، هادی‌پور و همکاران با بررسی نمونه‌های حاصل از گله‌های گوشتی درگیر مشکلات تنفسی در ایران، به نقش مهم بیماری برونشیت عفونی در ایجاد این نشانه‌ها در گله‌ها پی بردند (۷). در سال ۲۰۱۵ نشان داده شد که بیماری برونشیت عفونی، متداول‌ترین عامل جدا شده از گله‌های مبتلا به علائم تنفسی در ایران بوده است. در این مطالعه بیشترین درگیری تنفسی مربوط به ویروس برونشیت عفونی در ۶۰ مزرعه و ترکیب آن با سایر عوامل در ۱۱۰ مزرعه بود. از آنجا که ویروس‌ها و سویه‌های غالب دائماً در حال تغییر هستند، گله‌ها به طور پی در پی درگیر عفونت‌های جدید ویروسی خواهند شد. (۱۶). چالش اصلی در کنترل بیماری برونشیت عفونی، چرخش ژنوتیپ‌های متنوع این ویروس در مناطق و بازه‌های زمانی گوناگون بوده است. علاوه بر این، هیچ واکسنی برای بیماری برونشیت عفونی وجود ندارد که بتواند با ایجاد ایمنی متقاطع، علیه تمامی سروتیپ‌های شناخته شده مقاومت ایجاد کند. در مطالعه ما نیز همانند مطالعه آقاخان و همکاران (۱۷)، برخی گله‌ها که واکسن برونشیت عفونی پرندگان دریافت کرده بودند، از نظر بیماری مثبت شدند. بنابراین لازم است با بررسی توالی نوکلئوتیدی ویروس‌های در گردش و تعیین سروتیپ‌های غالب، ارزیابی دقیقی از شباهت سویه‌های موجود در واکسن‌های مورد استفاده با سویه‌های وحشی صورت گیرد. مراقبت و بررسی مداوم ویروس‌های در گردش و استفاده از واکسن‌های مشابه سویه‌های در گردش، در کنار رعایت اصول امنیت زیستی، استراتژی‌هایی هستند که می‌توانند در کاهش درگیری با بیماری برونشیت عفونی به کار گرفته شوند. در مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که جدایه‌های استان گلستان،

شباهت زیادی با سویه QX ایران و عراق داشته‌اند (۱۸).

بیماری نیوکاسل نیز یکی از بیماری‌های مهم در ایجاد مشکلات تنفسی در گله‌های گوشتی ایران است. نیوکاسل ولوژن در ایران اندمیک می‌باشد و به رغم واکسیناسیون گسترده علیه آن، هر ساله شاهد طغیان‌هایی از این بیماری هستیم (۹). در بسیاری از کشورها، طیور خانگی مخزن عامل بیماری نیوکاسل ولوژن هستند و این نقش مهمی در انتقال آلودگی به گله‌های صنعتی دارد (۱۹). در ایران نیز طیور خانگی خصوصاً در استان‌های شمالی جمعیت زیادی را تشکیل می‌دهند و خطر انتقال آلودگی به مزارع صنعتی وجود دارد. طبق بررسی ما در استان گلستان، به رغم واکسیناسیون گسترده در اغلب مزارع پرورشی، این بیماری یکی از مشکلات مهم در صنعت طیور گوشتی است که می‌تواند به دلایل مختلفی نظیر عدم رعایت امنیت زیستی و برنامه نامناسب واکسیناسیون در برخی گله‌ها باشد. مراقبت مداوم از گله‌ها به‌منظور پی بردن به جهش در ویروس، بررسی برنامه واکسیناسیون و افزایش سطح بهداشت در مرغداری‌ها از روش‌های بسیار پر اهمیت در کنترل بیماری نیوکاسل می‌باشد. طبق تحقیقات سواین و همکاران، بیماری نیوکاسل نقش بیشتری نسبت به بیماری آنفلوانزای پرندگان (H9) در ایجاد بیماری‌های تنفسی ویروسی دارند (۲۰). در مطالعه دیگری، ویروس بیماری نیوکاسل با درصدی بالا در کمپلکس تنفسی جوجه‌های گوشتی جدا شد. از میان آنها نتیجه‌گیری شد که جدایه‌های لنتوژن و سویه‌های واکسینال نیز موجب تشدید کمپلکس تنفسی می‌شوند (۲۱). همچنین با روش‌های سرمی توانسته‌اند شیوع ویروس نیوکاسل را در استان‌های شمالی بررسی کنند که مشخص شد در گله‌های خانگی، این ویروس شیوع بالایی دارد و می‌تواند به گله‌های صنعتی وارد شود (۲۲).

بیماری آنفلوانزای پرندگان (H9) نیز یکی از عوامل مهم و مؤثر در ایجاد مشکلات تنفسی در گله‌های گوشتی است. این بیماری در کشور ایران اندمیک است و برخلاف حدت پایین این ویروس، همراهی آن با ویروس نیوکاسل یا برونشیت عفونی می‌تواند واگیری و تلفات بالا و در نتیجه خسارات جبران ناپذیری در گله گوشتی ایجاد کند (۱۰، ۲۳). در ایران واکسیناسیون علیه این بیماری در گله‌های مادر، تخم‌گذار و تعداد زیادی از گله‌های گوشتی انجام می‌شود اما با این وجود، این بیماری اثرات مخرب خود را در گله‌ها ایجاد می‌کند. در مطالعه ما، در گله‌هایی که بیش از یک عامل در ایجاد سندرم تنفسی نقش داشت، تلفات بیشتر به ثبت رسید. برخی بررسی‌ها نیز نشان داد که تلفات حاصل از برونشیت عفونی و آنفلوانزای پرندگان (H9) بیشتر از تلفات به هنگام درگیری با برونشیت عفونی به تنهایی بوده است (۱۲، ۲۴). این نتایج، اهمیت ترکیب شدن چند عامل را در ایجاد تلفات شدیدتر نشان می‌دهد. به طرز جالبی، عفونت همزمان با عوامل نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان (H9) منجر به تلفات زیادی نشد. این اتفاق در بررسی دیگری نیز رخ داده است که دلیل احتمالی آن را ایمنی سلولی برانگیخته شده علیه پروتئین‌های مشابه این دو ویروس و همچنین تداخل ایجاد شده در بین این دو ویروس می‌دانند (۲۴). با آزمایش‌های سرمی نیز شیوع ویروس آنفلوانزا را ارزیابی کرده‌اند، در مقاله‌ای، مشخص شد ویروس آنفلوانزای H9N2 شیوع بالایی در پرندگان بومی استان‌های شمالی کشور دارد که می‌تواند خطر جدی برای صنعت باشد (۲۵).

همچنین در مطالعاتی به وجود کم‌خونی عفونی در گله‌های گوشتی درگیر کمپلکس تنفسی اشاره شده است که می‌تواند زمینه مطالعات بیشتر در استان گلستان باشد. در این مطالعه، مشخص شده

است که ۵۰ درصد گله‌های گوشتی درگیر کمپلکس تنفسی، دارای آثار پاتولوژیک کم‌خونی عفونی ماکیان بوده‌اند (۲۶). علاوه بر این، مشخص شده که باکتری‌ها نیز می‌توانند در ایجاد کمپلکس‌های تنفسی نقش داشته باشند. یکی از آنها باکتری اونیتوباکتریوم رینوتراکئاله است. در یک مطالعه این باکتری در ۳۵ درصد از نمونه‌های کمپلکس تنفسی گله‌های گوشتی ردیابی شد (۲۷). در بررسی‌های دیگری، به نقش متاپنومو‌ویروس در ایجاد کمپلکس تنفسی در گله‌های گوشتی پرداخته شده است که نقش بسیار قابل توجهی (۳۵ درصد) را شامل می‌شود (۲۸).

طبق نتایج حاصل از این مطالعه، مهم‌ترین عامل ایجاد عفونت‌های تنفسی در استان گلستان در سال گذشته، ویروس برونشیت عفونی به تنهایی، و ترکیب آن با عوامل نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان (H9) بوده است. علاوه بر این، بیماری‌های نیوکاسل و آنفلوانزای پرندگان (H9) نیز نقش مهمی در ایجاد این سندرم داشته‌اند و عفونت همزمان آنها در گله منجر به شدیدتر شدن علائم و تلفات در گله شده است. بنابراین باید به صورت دائم این‌گونه مطالعات با جزئیات بیشتر به همراه توالی‌یابی و تعیین سروتیپ‌ها و سویه‌های غالب منطقه صورت گیرد و میزان شباهت سویه‌های وحشی با سویه‌های واکسن مورد ارزیابی دقیق قرار گیرد تا علت شیوع بالای یک عامل عفونی در منطقه مشخص شود. شناخت الگوی بیماری‌ها در هر سال می‌تواند به درک بهتر دینامیک آلودگی منطقه و این که چه عواملی در رأس ایجاد بیماری‌ها هستند کمک کند. با استفاده از این الگوها می‌توان راه‌های مناسب‌تری برای مقابله با بیماری‌ها مثلاً بررسی برنامه‌های واکسیناسیون در گذشته و ایجاد تغییر در آنها انتخاب کرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که این پروژه را تحت شماره گرنت ۳۸۶۴ مورد حمایت مالی قرار دادند، تشکر می‌نماییم. همچنین به پاس قدردانی از زحمات استاد گرانقدرمان، مرحوم دکتر مهدی وصفی مرندی که در این پژوهش ما را یاری کردند، این مقاله را به روح ایشان تقدیم می‌کنیم.

References

1- Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL, *et al.* Diseases of poultry. 14th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2020; P: 109-66.

2- Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL, *et al.* Diseases of poultry. 14th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2020; P: 167-88.

3- Authority EFS. Avian influenza overview February–May 2020. *EFSA J.* 2020; 18(6): 6194.

4- Creelan JL, Graham DA, McCullough SJ. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 2002; 31(5): 493-9.

5- Lee M-S, Chang P-C, Shien J-H, Cheng M-C, Shieh HK. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods.* 2001; 97(1-2): 13-22.

6- Mousavi FS, Ghalyanchilangeroudi A, Hosseini H, Fasaei BN, Ghafouri SA, Abdollahi H, *et al.* Complete genome analysis of Iranian IS-1494 like avian infectious bronchitis virus. *Virus Dis.* 2018; 29(3): 390-4.

7- Hadipour M, Golchin P. Serosurvey of H9N2 avian influenza virus during respiratory disease outbreaks in broiler flocks in Dezful, southern Iran. *Bulg J Vet Med.* 2011; 14(1): 62-5.

8- Hosseini H, Fard MHB, Charkhkar S, Morshed R. Epidemiology of avian infectious bronchitis virus genotypes in Iran (2010–2014). *Avian Dis.* 2015; 59(3): 431-5.

9- Hosseini H, Langeroudi AG, Torabi R. Molecular characterization and phylogenetic study of Newcastle disease viruses isolated in Iran, 2010–

2012. *Avian Dis.* 2014; 58(3): 373-6.

10- Pourbakhsh S, Momayez R, Toroghi R R, Shoushtari A. Ninetythree B type, the Predominant Circulating Type of Avian Infectious Bronchitis Viruses 1999-2004 in Iran: a retrospective study. *Arch Razi Instit.* 2008; 63(1): 1-5.

11- Sabouri F, Vasfi Marandi M, Bashashati M. Characterization of a novel VIIl sub-genotype of Newcastle disease virus circulating in Iran. *Avian Pathol.* 2018; 47(1): 90-9.

12- Seifi S, Asasi K, Mohammadi A. Natural co-infection caused by avian influenza H9 subtype and infectious bronchitis viruses in broiler chicken farms. *Veterinarski Arhiv.* 2010; 80(2): 269-81 [In Persian].

13- Boroomand Z, Miahi M, Seif abadi M, Gharbyani M. Detection and isolation of infectious bronchitis in respiratory complexes of Iranian broiler herds. The Second International Conference on New Technologies in Science: March 13, 2019; Amol, Iran, Amol University of Special Modern Technologies. 2019, P: 100 [In Persian].

14- Fallah Mehrabadi MH, Motamed N, Ghalyanchilangeroudi A, Ghafouri SA, Tehrani F. Newcastle Disease and Avian Influenza H9N2 Outbreaks in Backyard Chickens, Iran, 2014-2015. *J Vet Res.* 2021; 76(1): 75-82.

15- Fallah Mehrabadi MH, Shoushtari A, Tehrani F, Motamed N, Haerian B, Ghalyanchilangeroudi A, *et al.* Serological and Molecular Survey of Avian Influenza H9N2 Subtype in Live Birds Markets- 2016. *J Vet Res.* 2021; 75(4): 399-406.

16- Haji-Abdolvahab H, Ghalyanchilangeroudi A, Bahonar A, Ghafouri SA, Marandi MV, Mehrabadi MHF, *et al.* Prevalence of avian influenza, Newcastle disease, and infectious bronchitis viruses in broiler flocks infected with multifactorial respiratory diseases in Iran, 2015–2016. *Trop Anim Health Prod.* 2019; 51(3): 689-95.

17- Aghakhan S, Abshar N, Fereidouni SRN, Marunesi C, Khodashenas M. Studies on avian viral infections in Iran. *Arch Razi Instit.* 1994(44/45): 1-10.

18- Gharbiani M, Boroomand Z, Mayahi M, Shapouri SA. The role of infectious bronchitis virus in respiratory complexes of broiler flocks in East Azarbaijan and Golestan provinces. *J Vet Microbiol.* 16(1): 53-64.

19- Awan MA, Otte M, James A. The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review. *Avian Pathol.* 1994; 23(3): 405-23.

20- Swayne DE, King DJ. Avian influenza and Newcastle disease. *J Am Vet Medical Assoc.* 2003; 222(11): 1534-40.

21- Behashtian B, Haghighi khoshkho P, Akbari Azad G, Hoseini H. Phylogenetic study and study of Newcastle disease virus in multifactorial respiratory diseases in broiler flocks of Qazvin province, 2014-2015. *Iran J Vet Med.* 2020; 14(2): 135-45.

22- Alamian A, Pourbakhsh A, Shushtari A, Keivanfar H. Seroprevalence Investigation of Newcastle Disease in Rural Poultries of the Northern Provinces (Golestan, Gilan, and Mazandaran) of Iran. *Arch Razi Instit.* 2019; 74(4): 365-73 [In Persian].

23- Nili H, Asasi K. Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathol.* 2002; 31(3): 247-52.

24- Hassan KE, Shany SA, Ali A, Dahshan A-HM, Azza A, El-Kady MF. Prevalence of avian respiratory viruses in broiler flocks in Egypt. *Poult Sci.* 2016; 95(6): 1271-80.

25- Ebrahimi, Mohammad, Grigurian, Samuel, Mehrabadi F, Hosein M, *et al.* Serological survey of H9N2 influenza viruses in rural chicken of Northern provinces, Iran Vet Res Biol Prod. 2021; 34(1): 15-25 [In Persian].

26- Mahdavi Asl M, Soltani Alvar M, Pedram B. Survey of Simultaneous Contamination with Chicken Infectious Anemia Virus (CIAV) and Respiratory Complex Disease in Broiler Chicken of Shoushtar and Bavi City. *Vet Histol.* 2019; 7(3): 41-50 [In Persian].

27- Zamani Moghaddam A, Tahmasebi H, Hashemi Babaheidari H, Khosravi Farsani M, Kiani Salmi A. molecular detection of ornithobacterium rhinotracheale in broiler chickens with respiratory infection in Shahrekord. *Vete Res Biol prod.* 2012; 25(3): 41-4 [In Persian].

28- Darebaghi A, Emadi Chashmi H, Kafshdoozan H, Hoseini K. Molecular detection of avian metapenomovirus in Semnan broiler flocks by RT-PCR. *Iran J Anim Med.* 2021; 15(1): 27-34.

Molecular Detection of Newcastle, Infectious Bronchitis, and Influenza (H9) viruses in Respiratory Complex Samples in Broiler Flocks of Golestan Province, 2019-2020

Mohammad Montazeri[1], Arash Ghalyanchilangroudi[*2], Naser Sadri[3], Zahra Ziafati Kafi[3], Mehdi Vasfi Marandi[4]

1- DVSc Student, Department of Avian Health and Diseases, Faculty of veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
2- Professor, Department of microbiology and immunology, Faculty of veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
3- Ph.D. Student, Department of microbiology and immunology, Faculty of veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
4- Professor, Department of Avian Health and Diseases, Faculty of veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Receive: December 8, 2020; Revise: February 13, 2021; Accept: March 2, 2021

Summary

The expansion of the poultry industry and the intensive breeding of birds indoors have led to respiratory infections of several different infectious agents, especially avian influenza (AI), Newcastle disease (ND) and infectious bronchitis. Evidence suggest that these agents act synergistically with each other in affected flocks. Twenty broiler flocks with respiratory infection in Golestan Province were selected. Trachea and kidney samples were transferred to the laboratory, and PCR was carried out to detect ND, IB, and H9 influenza viruses. According to the results, flocks were more involved with IB infection (20%), and then ND (15%) and H9 influenza (10%) were more prevalent, respectively. Also, among these respiratory complex infections, the co-infection of IB with ND (20%) and AI (20%) viruses was the most common. According to the conclusions of this study, infectious bronchitis virus played the most crucial role in the development of respiratory complexes, and co-infection with Newcastle disease virus and Influenza H9 also causes severe symptoms and mortality in the flocks. It is recommended that accurate epidemiological studies be conducted each year to determine the prevalence of risk factors of this disease and vaccines' efficiency in flocks. This is the first comprehensive study on the respiratory complex of broiler herds in Golestan Province, one of the centers of chicken meat production in the country.

Keywords: *Respiratory complex, Newcastle Disease, Infectious bronchitis, Avian Influenza (H9), Golestan province*