DOI: 10.22092/VJ.2023.363286.2081
شماره ۱۴۳ تابستان ۱۴۰۳
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

مقاله کامل

# ارزیابی فیلوژنتیکی و سرولوژیکی متاپنومووویروس پرندگان در گله های ماکیان گوشتی استان قزوین

• **مصطفی قلی زاده‌گیگلو**
گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **فروغ طلازاده (نویسنده مسئول)**
گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **رمضانعلی جعفری**
گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **آرش قلیانچی لنگرودی**
گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲-۰۶-۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲-۰۹-۰۵
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲-۰۸-۱۳ تاریخ انتشار: ۱۴۰۳-۰۴-۱۲
Email: f.talazadeh@scu.ac.ir

## چکیده

**متاپنومووویروس پرندگان یک پاتوژن مهم در بوقلمون و ماکیان محسوب می شود که مسئول ایجاد عفونت های حاد دستگاه تنفسی فوقانی و سندرم تورم سر است. به علاوه سبب خسارات اقتصادیِ قابل توجهی در جوجه های گوشتی و گله های بوقلمون به ویژه در همراهی با عفونت های ثانویه می شود. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی فیلوژنتیکی و ژنوتایپینگ متاپنومووویروس پرندگان همچنین بررسی میزان شیوع متاپنومووویروس پرندگان به روش الایزا در گله های گوشتی استان قزوین بود. از میان ۲۰ گله ی گوشتی در سنین ۳ الی ۵ هفتگی ، تعداد ۱۲۰ نمونه سرم و ۲۰۰ نمونه سوآب نای، بافت نای و ریه از گله های دارای علائم تنفسی و تورم سر جمع آوری شد. ۶۲/۵درصد نمونه ها با آزمون الایزا مثبت گردید. این مطالعه اولین گزارش بررسی سرولوژیکی متاپنومووویروس پرندگان در استان قزوین می باشد. در نمونه های کلینیکی نیز آزمایش RT-PCR بر اساس ژن N متاپنومووویروس در ۶ گله (۳۰٪) از ۲۰ گله مثبت بودکه تعیین تیپ نمونه های مثبت با ژن G بیانگر این می باشد که نمونه های مثبت متعلق به تحت تیپ B ویروس است. بر اساس نتایج سرولوژی و مولکولی، ماکیان گوشتی در استان قزوین در معرض عفونت با متاپنومووویروس پرندگان می باشند و از این رو در بروز سندرم های تنفسی در گله های ماکیان گوشتی در این منطقه بایستی مورد توجه قرار گیرد.**

**کلمات کلیدی: ارزیابی فیلوژنتیکی ، بررسی سرمی، متاپنومووویروس پرندگان، RT-PCR، الایزا**

● Veterinary Researches & Biological Products No 143 pp: 32-40

**Phylogenetic and serological assessment of avian metapneumovirus in broiler flocks of Qazvin province**

*By: Gholizadeh Gigloo, M. Department of Livestock, Poultry and Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Talazadeh, F., (Corresponding Author), Department of Livestock, Poultry and Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Jafari, R.A., Department of Livestock, Poultry and Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. and Ghalyanchi Langeroodi, A., Department of Microbiology and Immunology , Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.*

**Received:2023-08-26** **Accepted: 2023-11-26**

**Revised:2023-11-04** **Published: 2024-07-02**

Email: f.talazadeh@scu.ac.ir

Avian Metapneumovirus is an important pathogen in turkeys and chickens which causes acute upper respiratory tract infections and head swelling syndrome. In addition, it causes significant economic losses in broiler and turkey flocks, especially in association with secondary infections. This study aimed to evaluate Avian Metapneumovirus phylogenetically and genotypically and investigate the prevalence of avian metapneumovirus by ELISA method in poultry flocks of Qazvin province. 120 serum samples and 200 samples of tracheal swabs, tracheal tissue, and lungs were collected from 20 poultry flocks at the age of 3-5 weeks and with respiratory symptoms and head swelling. The results showed that 62.5% of the samples were positive by the ELISA test. This study is the first serological report of Avian Metapneumovirus in Qazvin province. In clinical samples, the RT-PCR test based on the N gene of metapneumovirus was positive in six flocks (30%) out of 20 flocks, and determining the type of positive samples with the G gene indicates that the positive samples belong to the B type of the virus. Based on the serological and molecular results, broiler chickens in Qazvin province are exposed to infection with avian metapneumovirus.Therefore, it should be considered in the occurrence of respiratory syndromes in broiler flocks in this region.

**Key words:** Phylogenetic Assessment; Serological Assessment; Avian Metapneumovirus; RT-PCR; ELISA.

## مقدمه

متاپنوموویروس پرندگان (AMPV) جزء ویروس‌های RNAدار تک رشته‌ای غیرقطعه‌ای است که متعلق به خانواده پنوموویریده، و جنس متاپنوموویروس می‌باشد. ترتیب ژنی متاپنوموویروس پرندگان به ترتیب ۳-M۲-F-M-P-N-L-G-SH-۵ می‌باشد (۱۱). تاکنون ۴ تحت تیپ A، B، C، و D از این ویروس شناسایی شده است (۱۲) که تحت تیپ A و B برای اولین بار در جنوب آفریقا در سال ۱۹۷۸ و در ابتدا در بوقلمون شناسایی شد. و بعد از آن در اروپا و آسیا گزارش شد (۶). تحت تیپ C اولین بار در آمریکا و تحت تیپ D در فرانسه جداسازی شد (۳، ۶) و هم‌اکنون در بیشتر مناطق دنیا شناسایی شده است (۲۱). در ایران اولین بار توسط شیخی و مسعودنیا (۲۰) با استفاده از روش سرولوژیکی الایزا گزارش گردید. بعد از آن حسینی و قلیانچی (۸) اولین مطالعه اپیدمیولوژیکی را به انجام رساندند.

AMPV بطور عمده موجب بیماری تنفسی و تولیدمثلی در طیور می‌شود و اثرات اقتصادی جدی را بر صنعت مرغداری وارد می‌آورد. میزبان‌های اصلی آن بوقلمون، جوجه ماکیان و اردک هستند (۲۳) اگرچه آن‌ها از قرقاول هم جداسازی شده است و توسط روش‌های سرولوژیکی و مولکولی در مرغ دریایی یا پرندگان آبی وحشی نیز شناسایی شده است. انتقال ویروس نیز از طریق هوا و تماس مستقیم با پرندگان وحشی صورت می‌پذیرد (۴).

عفونت AMPV موجب افزایش نسبت ضریب تبدیل، افت تولید تخم‌مرغ، شکستگی پوسته تخم‌مرغ و کاهش ضریب جوجه‌آوری می‌گردد(۲۳). بیماری‌های کلینیکی که توسط AMPV ایجاد می‌شوند شامل پنومونی عفونی پرندگان، سندرم تورم سر، رینوتراکئیتیس بوقلمون و رینوتراکئیتیس پرندگان می‌باشند که دیسترس تنفسی و اختلالات تولید مثلی، اصلی‌ترین مشکلات این عامل عفونی می‌باشند (۲۱).

رینوتراکئیت یک تظاهر بسیار مهم در AMPV است که ارگان‌های بافت تنفسی را مورد هدف قرار می‌دهد. از سوی دیگر، عفونت همزمان با عوامل تشدیدکننده مانند اشریشیاکلی، بوردتلا ایویوم، اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال، ریمرلا آناتی پستیفر، مایکوپلاسما گالی سپتیکوم و بیماری نیوکاسل لنتوژنیک بروز علائم بالینی را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد(۲۱).

تشخیص عفونت متاپنوموویروس پرندگان عموماً بوسیله‌ی روش‌های جداسازی ویروس، سرولوژی و روش‌های مولکولی بوده که هر کدام از

این روش‌ها دارای مزایا و معایبی در مقایسه با سایر روش‌ها می‌باشد که به دلیل مشکلات موجود در جداسازی و شناسایی AMPV، روش‌های سرولوژی برای اثبات آلودگی در طیور تجاری و سایر گونه‌های پرندگان توسعه یافته‌اند.

RT-PCR نیز 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 (۱۰، ۱۷).

در کشور ما علی‌رغم گزارش‌های کلینیسین‌های شاغل در بخش طیور صنعتی و گزارش وجود آنتی‌بادی علیه عفونت متاپنوموویروس پرندگان در برخی استان‌های کشور، مطالعات کمی از ردیابی و شناسایی مولکولی این ویروس در طیور صنعتی و تعیین تحت تیپ‌های در گردش صورت گرفته است (۱۹). بنابراین مطالعه حاضر با هدف شناسایی مولکولی و تعیین تحت تیپ و بررسی سرولوژیکی و مقایسه این دو روش در استان قزوین در سال ۱۴۰۱ صورت گرفته است و مقایسه نتایج آن‌ها با ویروس‌های موجود در سایر نقاط کشور و سایر کشورها ضروری به نظر می‌رسد.

## مواد و روش کار

### الف- نمونه‌گیری

در این مطالعه ، با توجه به سطح اطمینان ۹۵٪ و همچنین برآورد تقریبی شیوع پنوموویروس ۳۵٪ (با توجه به یک بررسی پایلوت) و همچنین دقت ۷٪ ، از ۲۰۰ قطعه طیور گوشتی از شهرستان‌های مختلف استان قزوین(از هر گله ۱۰ پرنده) در سنین(۳-۵ هفتگی) با نشانه‌های بیماري تنفسی شامل تورم سر و صورت، ترشحات بینی، سرفه، رال‌هاي نایی و تورم بافت ملتحمه چشم نمونه‌برداری انجام گرفت. به وسیله سواب استریل مرطوب از بوقکی‌هاي بینی، شکاف دهانی، سینوس زیرچشمی و از بافت‌های نای و ریه‌ی ماکیان تلف شده، نمونه‌برداری گردید (نمونه‌های سوآب و نمونه‌های بافتی در آزمایشگاه مخلوط و یک نمونه محسوب شد). و سپس، نمونه‌ها در دماي ۱۸- درجه سانتی‌گراد فریز شده و جهت اقدامات بعدی به آزمایشگاه مولکولی منتقل شدند.

همچنین از تعداد ۲۰ گله‌ی گوشتی مورد نظر، تعداد ۱۲۰ نمونه خون (از هر گله ۶ نمونه) از قسمت ورید زیر بال جهت انجام آزمایشات سرولوژی، اخذ گردید.

### ب- استخراج RNA

جهت استخراج RNA ویـروس از کیـت SinaPure one (stimultaneous DNA and RNA extraction) با استفاده از روش پیشنهادی خود کیت استفاده گردید. در نهایت RNA در۵۰ میکرولیتر از بافر مخصوص جمع‌آوري و تا هنگام استفاده در دماي ۷۰- نگهداري شد. همچنین جهت سنتز cDNA از کیت تجاری Thermo Fisher استفاده گردید.

### ج- تکثیر با استفاده از واکنش RT-PCR

حضور و عدم حضور ویروس توسط ژن N متاپنوموویروس و با تولید قطعه‌ی ۱۱۵ جفت بازی تایید گردید و تعیین تیپ B توسط پرایمرهای ژن G و ایجاد باند ۳۱۲ جفت بازی توسط پرایمرهای Ga و G۱۲ صورت گرفت.

واکنش تکثیر ژنوم به منظور ردیابی حضور ویروس، تعیین تحت تیپ و انجام سکانس نوکلئوتیدی ژن G انجام گرفت. بدین منظور پس از استخراج RNA، سنتز cDNA توسط کیت اختصاصی آن انجام گرفت. از واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نوکلئوتیدی ژن N ویروس (Nd/Nx) (بایون- اوبوئر و همکاران،۲۰۰۰) که بر اساس توالی ناحیه حفاظت شده مشترک ژن N در بین تیپ‌های A، B، C و D متاپنوموویروس پرندگان طراحی شده است، جهت ردیابی حضور ویروس، استفاده شد(۲). پرایمرهای ذکر شده قطعه‌ایی به طول ۱۱۵ جفت بازی را تکثیر می‌کنند. اختصاصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ درج شده است.

مراحل PCR با دستگاه TMApplied Biosystems TM MiniAmp با برنامه درجه حرارت و زمانی واسرشت شدن ابتدایی، ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه(یک سیکل)، ۳۰ سیکل اصلی واسرشت، اتصال و ساخت به ترتیب در درجه حرارت ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، ۵۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و در آخر گسترش انتهایی با ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه (یک سیکل) انجام شد. در پایان محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت و ۴۰۰ میلی‌آمپر الکتروفورز گردید. در این تحقیق از آب دوبار تقطیر عاری از RNase به عنوان کنترل منفی و از نمونه‌های قبلی مثبت موجود در بخش مولکولی به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

برای شناسایی ساب تایپ‌های A و B از پرایمرهای Ga و G۱۲ (جدول ۱) مطابق با پروتکل بایون- اوبوئر و همکاران، ۲۰۰۰استفاده گردید (۲).

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تعیین تیپ و سکانس ژن G.

| توالی | سایز محصول | ژن | پرایمر |
|---|---|---|---|
| AGC AGG ATG GAG AGC CTC TTT G | bp۱۱۵ | N | Nd |
| CAT GGC CCA ACA TTA TGT T | bp۱۱۵ | N | Nx |
| CCG GGA CAA GTA TCT CTA TGG | bp۳۱۲ | G | Ga |
| CAGTCGCCTGTAATCTTCTAGGG | bp۳۱۲ | G | G۱۲ |

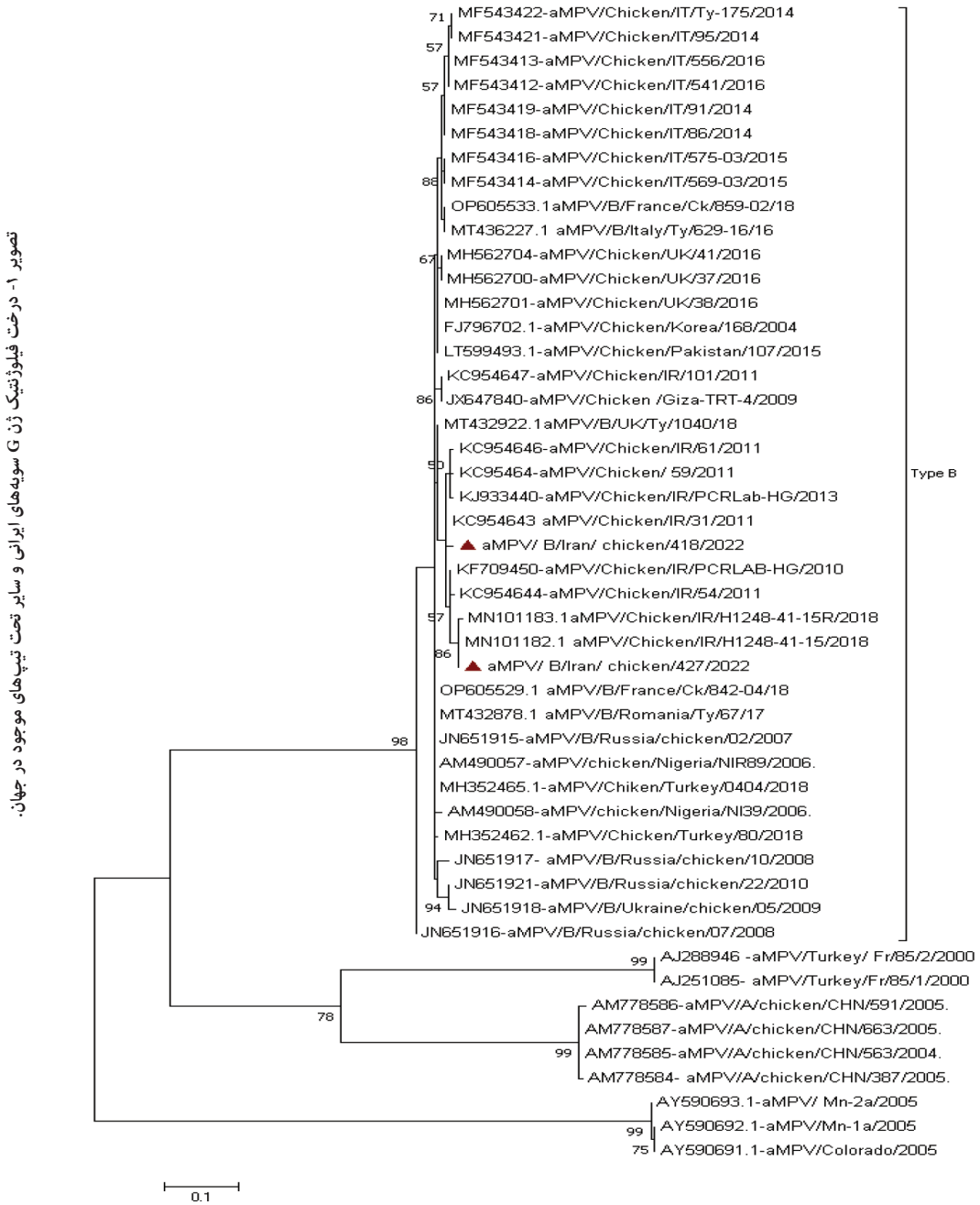
سایر تیپ‌ها مشخص گردد.

### د- سکانس نوکلئوتیدی ژن G و آنالیز توالی فیلوژنتیک

محصول RT-PCR بر روی آگارز Low melting point به مدت یک ساعت الکتروفورز گردید. و سپس تعیین توالی نوکلئوتیدی نمونه‌ها با استفاده از پرایمر Ga-G۱۲ انجام گرفت. درخت فیلوژنتیک به روش GTR با استفاده از نرم افزار Mega ۷ مدل maximum likehood و با بوت استرپ ۱۰۰۰ رسم گردید (تصویر۱). سپس توسط نرم‌افزار Mega ۷ تحت تیپ‌های مطالعه حاضر با علامت مثلث بنفش در کنار سایر توالی‌های مشخص گردید و جدول همولوژی رسم گردید تا میزان شباهت آن‌ها با

### ه- روش الایزا

نمونه خون جمع‌آوری شده بعد از جداسازی سرم، تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. از کیت اختصاصی پنوموویروس طیور از شرکت IDEXX (آمریکا)که می‌تواند آنتی‌بادی در مقابل تحت تیپ‌های A، B و C را شناسایی کند، استفاده شد. روش انجام آزمایش و تفسیر نتایج آن بر اساس پیشنهاد شرکت سازنده کیت صورت گرفت. نمونه‌های سرم با طول موج ۶۵۰ nm قرائت گردید. با نسبت s/p کمتر یا مساوی ۰/۲ منفی و نمونه‌های بالاتر از ۰/۲(تیتر بالاتر از ۲۰۰)




تصویر ۱- درخت فیلوژنتیک ژن G سویه‌های ایرانی و سایر تحت تیپ‌های موجود در جهان.

مثبت ارزیابی شدند.

## نتایج

در آزمایش RT-PCR از تعداد ۲۰ گله (۲۰۰ قطعه پرنده) مورد بررسی که دارای علائم تنفسی بودند تعداد ۶ گله (۳۰ درصد) از نظر وجود ژن N متاپنومو‌ویروس مثبت شدند و قطعه‌ایی به طول ۱۱۵ جفت باز تکثیر گردید.

تعیین تیپ متاپنومو‌ویروس در ۶ نمونه مثبت شده نشان داد که ۲ نمونه از آن‌ها متعلق به تیپ B متاپنومو‌ویروس پرندگان می‌باشند و باند ۳۱۲ جفت بازی مرتبط با تیپ B متاپنومو‌ویروس پرندگان در آن‌ها مشاهده گردید.

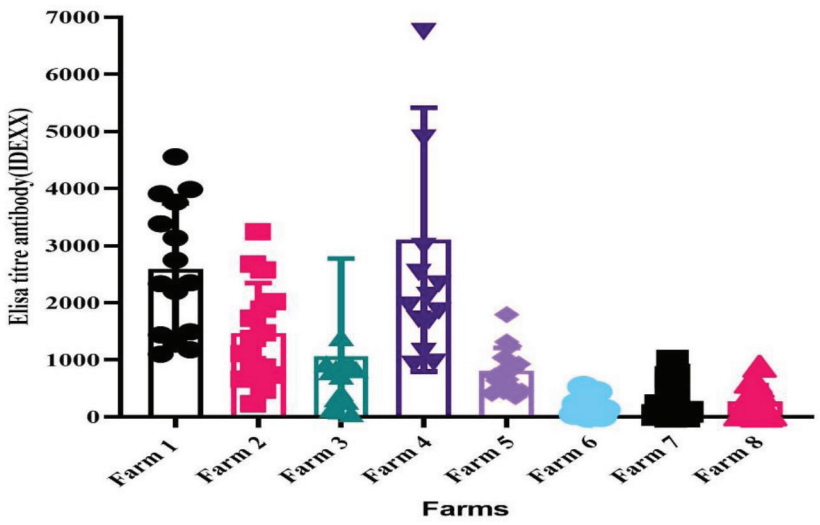
بررسی درخت فیلوژنتیک ژن G نشان‌دهنده این است که سویه‌های ایرانی با تحت تیپ B ویروس خوشه‌بندی شده‌اند.

در روش سرولوژی نیز از مجموع ۲۰ گله مورد بررسی، تعداد ۸ گله (۴۰ درصد) نسبت به عفونت متاپنومو‌ویروس مثبت ارزیابی شدند. حداقل و حداکثر میانگین تیتر آنتی‌بادی در بین نمونه‌های سرمی در سطح گله‌ها بین ۲۰۵ و ۳۱۰۴ بود (جدول ۳). مشخصات گله‌های مورد مطالعه در جدول ۲ آمده است.

**جدول ۲- مشخصات گله‌های مورد آزمایش در مناطق متفاوت استان قزوین.**

| No | Date of sapling | Place | Age of infection (day) | Result |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۲۰۲۲/December/۱۷ | Qazvin | ۳۲ | Negative |
| ۲ | ۲۰۲۲/December/۲۳ | Kuhin | ۳۸ | Positive |
| ۳ | ۲۰۲۲/December/۲۵ | Qazvin | ۲۹ | Negative |
| ۴ | ۲۰۲۲/December/۲۵ | Takestan | ۳۳ | Negative |
| ۵ | ۲۰۲۲/December/۲۸ | Takestan | ۴۱ | Positive |
| ۶ | ۲۰۲۲/January/۰۲ | Qazvin | ۲۵ | Negative |
| ۷ | ۲۰۲۲/January/۰۲ | Buin zahra | ۴۶ | Negative |
| ۸ | ۲۰۲۲/January/۰۵ | Kuhin | ۴۳ | Negative |
| ۱۰ | ۲۰۲۲/January/۰۶ | Abeyek | ۳۶ | Negative |
| ۱۱ | ۲۰۲۲/January/۰۸ | Qazvin | ۲۸ | Negative |
| ۱۲ | ۲۰۲۲/January/۰۸ | Takestan | ۳۹ | Positive |
| ۱۳ | ۲۰۲۲/January /۰۸ | Takestan | ۲۸ | Positive |
| ۱۴ | ۲۰۲۲/January/۱۳ | Kuhin | ۴۰ | Negative |
| ۱۵ | ۲۰۲۲/January /۱۶ | Buin zahra | ۳۶ | Negative |
| ۱۶ | ۲۰۲۲/February/۰۲ | Qazvin | ۲۴ | Positive |
| ۱۷ | ۲۰۲۲/February/۰۵ | Takestan | ۳۹ | Negative |
| ۱۸ | ۲۰۲۲/February/۰۹ | Kuhin | ۴۴ | Positive |
| ۱۹ | ۲۰۲۲/February/۰۹ | Kuhin | ۴۳ | Negative |
| ۲۰ | ۲۰۲۲/February/۱۲ | Takestan | ۳۸ | Negative |

جدول ۳- تیتر آنتی بادی پنوموویروس گله‌های گوشتی در سن ۴-۵ هفتگی با کیت آیدکس الایزا.




| | Farm 1 | Farm 2 | Farm 3 | Farm 4 | Farm 5 | Farm 6 | Farm 7 | Farm 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mean | 2588 | 1464 | 1059 | 3104 | 808.5 | 205.4 | 278.5 | 268.3 |
| Std. Deviation | 1154 | 882.5 | 1716 | 2311 | 399.6 | 164.6 | 319.9 | 283.4 |

## بحث

با توجه به افزایش بیماری‌های تنفسی در صنعت طیور در سال‌های اخیر و افزایش خسارات اقتصادی ناشی از تلفات بالا بخصوص در گله‌های گوشتی کشور، جهت تعیین عوامل زمینه‌ای و مستعدکننده همراه بایستی مطالعات کافی در این بخش صورت گیرد. با توجه به نقش بسزای استان قزوین در تولید جوجه گوشتی و مشکلات استان شامل تراکم بالای مزارع گوشتی و نزدیکی آن‌ها به یکدیگر، نیاز جدی برای مطالعه مشکلات تنفسی در این استان احساس می‌شود. متاپنوموویروس پرندگان در اکثر گونه‌های پرندگان شایع است و اثبات وجود آن به صورت مطالعات سرولوژی، ویروس‌شناسی و نیز با تکنیک‌های مولکولی از کشورهای مختلف پرورش دهنده‌ی طیور گزارش شده است (۵).

این مطالعه، اولین گزارش شیوع سرولوژیکی AMPV در استان قزوین و همچنین اولین مطالعه مولکولی در ۵ سال اخیر این استان می‌باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان آلودگی با متاپنوموویروس در گله‌های طیور گوشتی به روش سرولوژی ۴۰ درصد و تأیید آن به روش مولکولی ۳۰ درصد می‌باشد. اختلاف نتایج سرولوژی و مولکولی در این بررسی و تحقیقات پیشین را می‌توان چنین بیان نمود که به این دلیل که متاپنوموویروس‌ها فقط در مدت چند روز بعد از عفونت اولیه شناسایی می‌شود، امکان ردیابی آن‌ها بطور کامل امکانپذیر نیست. در صورتی که پاسخ آنتی‌بادی در مدت طولانی‌تری بعد از عفونت در میزبان قابل ردیابی می‌باشد (۱۴).

در مرحله بعد جهت تعیین تحت تیپ ویروس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، تحت تیپ این ویروس به عنوان تیپ B مشخص شد. در حال حاضر تیپ B متاپنوموویروس پرندگان بیش‌ترین سهم آلودگی را در گونه‌های متفاوت پرندگان به خود اختصاص داده است.

در این مطالعه در آزمایش PCR تعداد ۶ گله مثبت شدند که همگی برای سکانس ارسال گردید اما در هنگام خوانش تنها ۲ نمونه جهت خوانش مناسب تشخیص داده شد و در آزمایش PCR میزان حدت برای این ۴ نمونه (گله) جهت توالی‌یابی مطلوب نبود و لذا خوانش برای این ۴ نمونه با شکست مواجه شد. نتیجتاً با توجه به رسالت کار علمی، نویسندگان مقاله، نتایج حقیقی مطالعات خود را ذکر کرده اند و ۲ نمونه (گله) مورد توالی‌یابی قرار گرفتند.

در سال ۱۳۹۲، مطالعه همایونفر و همکاران (۱۵) با تکنیک RT-PCR نشان داد که از میان ۵۰ گله طیور صنعتی (۴۳ گله گوشتی، ۵ گله تخم‌گذار، ۲ گله مادر گوشتی) با علائم تنفسی در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی، تعداد ۸ گله (۱۶٪) از نظر وجود ژن G متاپنوموویروس مثبت بودند که همگی به تحت تیپ B تعلق داشتند.

اسدپور و همکاران (۲۸) در سال ۱۳۹۵ با بررسی ۲۹ گله گوشتی در سنین کشتار، تعداد ۴۶۰ نمونه سرم و از ۷۱ گله مرغ گوشتی با علائم تنفسی، سواب نای، بافت نای و ریه جمع‌آوری کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که تعداد ۱۶ گله (۵۵٪) نسبت به عفونت متاپنوموویروس در آزمایش الایزا مثبت بودند و ۱۷ گله (۲۴٪) در آزمایش RT-PCR از نظر وجود ژن N متاپنوموویروس مثبت بوده و قطعه‌ایی به طول ۱۱۵ جفت باز را

تکثیر کردند.

قلیانچی لنگرودی و همکاران (۲۶) مطالعه‌ایی را در بازه‌ی زمانی ۲۰۱۶ تا ۲۰۱۸ در ده استان ایران (آذربایجان، سمنان، اصفهان، کردستان، سیستان و بلوچستان، قزوین، خوزستان، فارس، گیلان و خراسان رضوی) به انجام رساندند و نشان دادند که تحت تیپ B متاپنوموویروس پرندگان در مناطق مختلف وجود دارد و در بین سال‌های ۲۰۱۶ تا ۲۰۱۸ افزایش معناداری داشته است. لذا بنظر می‌رسد این ویروس در کشور ایران اندمیک می‌باشد.

چابکی و همکاران (۵) در سال ۲۰۱۸ به بررسی نقش بازار پرندگان زنده در اپیدمیولوژی بیماری‌های ویروسی پرندگان پرداختند. در این مطالعه از مجموع ۴۵۰ نمونه اوروفارینژال از ۸ گونه متفاوت پرنده (مهاجر و بومی) در استان گیلان حضور AMPV توسط واکنش RT-PCR بر اساس ژن نوکلئوپروتئین (N) بررسی شد و حضور AMPV در ۳۰/۶٪ پرندگان به اثبات رسید. آنالیز بیوانفورماتیکی و درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی ژن N نشان داد که تمامی آن‌ها متعلق به ساب تایپ B بودند که این مطالعه بیانگر این مطلب است که میزبان‌های پرندگان وحشی و اهلی در شیوع پاتوژن را نباید نادیده گرفته شود.

حسامی و میاحی (۱۴) در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که ۲۸٪ گله‌های مرغ گوشتی اهواز (۱۴ گله از مجموع ۵۰ گله) در سن کشتار برای AMPV با تکنیک RT-PCR بر اساس ژن N مثبت بودند.

مطالعه‌ایی در سال‌های ۲۰۱۶ تا ۲۰۲۰ در استان سمنان توسط دره‌باغی و همکاران (۲۷) صورت گرفت که بر شناسایی مولکولی و ردیابی تحت تیپ‌های استان سمنان در گله‌های مرغ گوشتی پرداختند. نتایج نشان داد که از مجموع ۸۵ گله گوشتی، ۳۰ گله (۳۵٪/۳) برای AMPV با پرایمرهای Nd و Nx مثبت بودند. ۲۸ نمونه به عنوان تحت تیپ B با پرایمرهای Ga و G۱۲ شناسایی شد و ۲ نمونه باقیمانده احتمالاً مربوط به تحت تیپ‌های A، B و یا C می‌باشند.

شیخی و مسعودیان (۲۰) در سال ۲۰۱۰، بطور تصادفی از ۱۱ استان اصلی تولیدکننده جوجه یک روزه کشور، تعداد ۲۷ گله مرغ مادر گوشتی که در برنامه واکسیناسیون خود از واکسن متاپنوموویروس استفاده نکرده بودند، تعداد ۵۴۰ سرم را با استفاده از کیت الایزای تجاری مورد آزمایش قرار دادند. ۲۵ گله مادر(۹۳٪) میانگین تیتر مثبت علیه متاپنوموویروس طیور و ۲ گله دیگر از نظر آلودگی به متاپنوموویروس طیور مشکوک بودند. ۵۰۱ نمونه سرمی (۹۳٪) تیتر مثبت، ۲۰ نمونه (۴٪) تیتر مشکوک و مابقی نمونه‌ها فاقد پاسخ سرمی علیه عفونت بودند. این مطالعه بیانگر شیوع بالای عفونت در سطح گله‌های مرغ مادر گوشتی ایران بوده است.

روش این تحقیق، به عنوان حساس‌ترین روش برای تشخیص ویروس است، همانطور که یافته‌های اونگور و همکارانش (۱۸) در سال ۲۰۱۰ نیز صحت این موضوع را تأیید می‌کند. در مطالعه او، گله‌هایی که در روش RT-PCR مثبت اعلام شده بودند، در تکنیک کشت سلولی هیچ مورد مثبتی گزارش نگردید. عدم وجود نتایج مثبت در کشت سلولی می‌تواند به علت تیتر پایین ویروس در نمونه‌ها، زمان نامناسب اخذ نمونه و یا حضور ویروس‌های مرده یا غیرفعال باشد. روش‌های تشخیصی سرولوژیک مانند ELISA از تکنیک جداسازی ویروس سریع‌ترند و پاسخ آنتی‌بادی بعد از عفونت به مدت طولانی‌تری باقی می‌ماند. با این‌حال، آلودگی با سویه‌هایی از AMPV که از ایمنی‌زایی خوبی برخوردار نیستند ممکن است موجب کاهش حساسیت این روش گردد (۱۵). لذا در مطالعه حاضر حضور ویروس‌ها و تعیین تحت تیپ ویروس با تکنیک RT-PCR به اثبات رسید و در کنار این روش بررسی سرولوژیک نیز انجام گرفت. سپس با سکانس ژن G این ویروس، جایگاه ویروس‌های ردیابی شده در این مطالعه نسبت به ویروس‌های سایر مناطق و نیز ویروس‌های رایج در کشور تعیین شد.

برخلاف شیوع بالای AMPV در فارم‌های گوشتی در ایران، در کشورهای همسایه مانند پاکستان، ترکیه و مصر شیوع AMPV به ترتیب ۲/۲٪، ۷/۲٪ و ۱۲/۵٪ می‌باشد. این تفاوت بین ایران و کشورهای همسایه قابل تأمل می‌باشد. از دلایل آن می‌توان به بحث امنیت زیستی، گله‌های با تراکم بالا، و پرندگان وحشی در اپیدمیولوژی AMPV اشاره نمود (۱، ۴و۲۲).

در مطالعه انجام شده در کشور اردن در سال ۲۰۰۷ (۹) به روش الایزا، وجود آنتی‌بادی AMPV در ۲۱/۷٪ از گله‌های مرغ گوشتی، ۷۵٪ گله‌های مرغ تخم‌گذار و تمامی گله‌های مادر گوشتی گزارش شد. در مطالعه مورد نظر، در بررسی به روش RT-PCR، ۱۲/۸٪ آلودگی به این ویروس در گله‌های گوشتی و ۴۲/۹٪ در گله‌های تخم‌گذار مورد ردیابی قرار گرفت و در گله‌های مادر گوشتی، AMPV به روش مولکولی ردیابی نشد. شناسایی سویه‌های AMPV با RT-PCR نشان داد که تمام سویه‌های شناسایی شده در آن کشور در تحت‌تیپ B قرار دارند.

نگوین و همکاران (۲۴) در سال ۲۰۲۱، مطالعه‌ایی را در خصوص توزیع AMPV در استان‌های شمالی کشور ویتنام به انجام رساندند. این بررسی نشان داد که چرخش AMPV در ۱۲ استان/شهر از ۱۴ مورد با تکنیک‌های الایزا و nested RT-PCR به ترتیب ۳۷/۶٪ و ۱۷/۲٪ بوده است. تمامی نمونه‌های مثبت جزء تحت تیپ B محسوب می‌شدند. ویژگی‌های ژنتیکی سویه‌ها نشان داد که به ویروس‌های سویه واکسن تخفیف حدت‌یافته مرتبط نبوده‌اند و حداقل به دو شاخه ژنتیکی دیگر تعلق دارند.

## نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج سرولوژی و مولکولی مطالعه حاضر، عفونت متاپنوموویروس در گله‌های مرغ گوشتی استان قزوین وجود داشته و مطالعات بعدی جهت بررسی درگیری‌های همزمان ویروسی و باکتریایی با پنوموویروس طیور در کمپلکس‌های تنفسی توصیه می‌گردد. از آنجایی که گله‌های مرغ گوشتی در قزوین در برابر AMPV واکسینه نشده‌اند، وجود سروپوزیتیوهای AMPV نشان دهنده‌ی این است که AMPV در گله‌های مرغ گوشتی استان قزوین شایع می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حامیت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز در قالب شماره پژوهانه SCU.VC۱۴۰۰,۳۷۲ در انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع مورد استفاده


1. Abdelmoez, N., Shawky, M., Abdelhady, H., Lebdah, M., and Salama, S. (2019). Isolation and identification of some possible causative agents of swollen head syndrome (SHS) in broiler chickens in Egypt. Slov Vet Res, 56(22-Suppl).

2. Bayon-Auboyer, M.H., Arnauld, C., Toquin, D., et al. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. J Gen Virol; 81: 2723-2733.

3. Bäyon-Auboyer, M.H. (2001). Comparison of F-, G-and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. Archive of Virology, 144(6):1091-1109.

4. Bayraktar, E., Umar, S., Yilmaz, A., Turan, N., Franzo, G., Tucciarone, C.M., Cecchinato, M., Cakan, B., Iqbal, M. and Yilmaz, M. (2018). First molecular characterization of avian metapneumovirus (aMPV) in Turkish broiler flocks. Avian Dis., 62: 425-430.

5. Chaboki, P.M., Ghalyanchilangeroudi, A.,Karimi, V., Abdollahi, H., Maghsoudloo, H., Hosseini, H., Farahani, R.K., Ghafouri, S.A., Falah, M.H., Rezaee, H., Jabbarifakhr, M. and Mousavi, F.S. (2018). Prevalence of avian metapneumovirus subtype B in live bird market in Gilan province, Iran. Vet. Res. Forum., 9: 93-97.

6. Cook, J.K.A. (2000). Avian Pneumovirus Infections of Turkeys and Chickens. The Veterinary Journal, 160(2): 118-125.

7. Cook, J.K.A., Ellis, M.M. and Huggins, M.B. (1991). The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poults inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria. Avian Pathology, 20(1):155-166.

8. Ghalyanchi-Langeroudi, A., Haghbin-Nazarpak, H. and Hosseini, H. (2013). Phylogenetic study based on the gene of attachment protein (G) avian metapneumovirus from broiler breeder farm in Iran, 2013. Iran. J. Virol., 7: 7-11.

9. Gharaibeh, S.M. and Algharaibeh, G.R. (2007). Serological and molecular detection of avian pneumovirus in chickens with respiratory disease in Jordan. Journal of Poultry Science, 86: 1677-1681.

10. Gough, R.E. and Jonnes R.C. (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.

11. Govindarajan, D., Buchholz, U.J. and Samal, S.K. (2006). Recovery of avian metapneumovirus subgroup C from cDNA: cross-recognition of avian and human metapneumovirus support proteins. J. Virol., 80: 5790- 5797.

12. Graaf, M., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A. and Holmes, E.C. (2008). Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. Journal of General Virology, 89: 2933-2942.

13. Hafez, H. M. (2002). Diagnosis of Ornithobacterium Rhinotracheale. International Journal of Poultry Science, 1: 114-118.

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

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

Jones, R.C.,Williams, R.A., Baxter-Jones, C., Savage, C.E. and Wilding, G.P. (1988). Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response. Avian Pathology, 17: 841–50.

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

17. Ongor, H., Karahan, M., Bulut, H., Cetinkaya, B. (2010): Detection of avian metapneumovirus subtypes in turkeys using RT-PCR. J.Vet. Rec. 166:363-366.

18. Rahimi, M. 2011. Seroprevalence of avian metapneumovirus infection in broiler and breeder chickens in Iran. Veterinary Medicina, 56(8):395-3.

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

20. Suarez, D. L., Miller, P. J., Koch, G., Mundt, E., and Rautenschlein, S. (2020). Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and avian metapneumovirus infections. Diseases of Poultry, 109-166.

21. Umar, S., Teillaud, A., Aslam, H. B., Guerin, J. L., and Ducatez, M. F. 2019. Molecular epidemiology of respiratory viruses in commercial chicken flocks in Pakistan from 2014 through to 2016. BMC Vet Res, 15(1), 351.

22. Umar, S., Sabir, H., Ahmed, A. and Subhan, S. (2016). Avian metapneumovirus infection in poultry. Worlds Poult. Sci. J., 72: 833-846.

23. Nguyen, V.G., Chung, H.C., Do, H.Q., Nguyen,T.T., Phuong Cao, T.B., et al. (2021). Serological and Molecular Characterization of Avian Metapneumovirus in Chickens in Northern Vietnam. Veterinary Science, Oct; 8(10): 206.

24. Md Zulfekar, A., Park, J.E., Shin, H.J. (2019). Serological Survey of Avian Metapneumovirus Infection in Chickens in Bangladesh. Journal of Applied Poultry Research, 28(4) 1330-1334.

25. Hosseini, H. , Ziafati Kafi, Z., Malekan, M. , Ghafouri, S.

A., Fallah Mehrabadi, M. H. , Sadri, N. ,Hojabr Rajeoni, A. and Ghalyanchilangeroudi, A. (2021). Molecular characterization of circulating avian metapneumovirus, subgroup B, in broiler chickens, Iran, 2016-2018. Iranian Journal of Veterinary Research. 22(3) 217-221.

26. Darebaghi, A., Emadi Chashmi,S.H., Kafshdozan, K.H., hossein, H. (2020). Molecular Detection of Avian Metapneumovirus in Semnan BroilerFarms. Iranian Journal of Veterinary Medicine. 15(1). 27-34.

27. Asadpour, Y., Rahimabadi, E., Shppshtari, A. (2016). province Guilan of flocks chicken broiler in pneumovirus avian of detection molecular and Serological. Veterinary Journal. 115: 35-41.