

شناسایی سرمی موارد تحت بالینی کم خونی عفونی و اثر آن بر پاسخ ایمنی علیه واکسن آنفلوانزا (تحت تیپ H9N2) در جوجه‌های گوشتی استان اصفهان

مجید غلامی آهنگران^{۱*}، نوشا ضیاء جهرمی^۲، عزت‌اله فتحی هفشجانی^۱

چکیده

در این بررسی ۳۷۵ نمونه سرمی از ۲۵ گله گوشتی کشتار شده در شهر اصفهان اخذ شد. نمونه‌گیری همراه با ثبت تاریخچه از گله‌های به ظاهر سالم انجام شد. گله‌ها از نظر استفاده از واکسن آنفلوانزا به دو گروه واکسینه و غیر واکسینه تقسیم شدند. نمونه‌های سرمی با کیت تجاری الیزای رقابتی کم خونی عفونی تست شدند و تیتراژ HI آنفلوانزا نیز در گله‌های واکسینه و غیر واکسینه تعیین شد. نتایج نشان داد شیوع کم خونی عفونی در گله‌های مورد مطالعه جوجه گوشتی از ۲۰ تا ۱۰۰ درصد متغیر است و در ۳۷۵ نمونه سرمی متعلق به جوجه‌های گوشتی فاقد علائم بالینی ۵۶/۳٪ می‌باشد. در این بررسی شیوع سرمی کم خونی عفونی در گله‌های واکسینه و غیر واکسینه تفاوت معنی‌داری ندارد و هیچگونه ارتباط آماری بین میزان آنتی‌بادی‌های ضد کم خونی عفونی و تیتراژ ناشی از واکسن آنفلوانزا وجود ندارد اما تیتراژهای پایین در برابر واکسن آنفلوانزا در برخی از گله‌ها مشاهده می‌شود. به هرحال این بررسی نشان داد شیوع سرمی موارد تحت بالینی کم خونی عفونی در جوجه‌های گوشتی استان اصفهان بالا است و آلودگی تحت بالینی با این ویروس می‌تواند یکی از علل تضعیف سیستم ایمنی گله‌ها و پاسخ نامناسب نسبت به واکسن‌ها از جمله واکسن آنفلوانزا باشد به هرحال برای انتقال یک ایمنی تدافعی کامل به جوجه‌های گوشتی حتی‌الامکان استفاده از واکسن کم خونی عفونی در گله‌های مرغ مادر قبل از شروع تخمگذاری توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: کم خونی عفونی، ماکیان، آنفلوانزا، جوجه گوشتی.

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱۷ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۲۰

مقدمه

ویروس کم خونی جوجه‌ها اولین بار توسط یواسا جداسازی و توصیف شد. این ویروس بدون غشاء و نسبتاً مقاوم است و دارای ژنوم DNA تک رشته‌ای حلقوی می‌باشد. این ویروس

از جنس ژئروویروس و از خانواده سیرکویویریده است که به شکل عمودی از گله مادر و به شکل افقی از طریق تماس با جوجه‌های آلوده و مدفوع منتشر می‌شود (۱۱).

کم خونی عفونی به دو شکل بالینی و تحت بالینی بروز می‌کند (۱۱). شکل بالینی بیماری که با آلودگی جوجه‌ها در طول ۲ هفته اول زندگی (۳) یا اکتساب ویروس از طریق مادر (۱۱ و ۳) حاصل می‌شود به شکل کم خونی، آتروفی عمومی بافت‌های خونساز و لنفاوی و در نهایت تضعیف سیستم ایمنی مشخص می‌شود (۱۱). اگر جوجه‌ها پس از ۲ هفته اول زندگی با ویروس مواجه شوند بیماری به شکل بالینی آشکار نمی‌شود و فرم تحت بالینی شکل می‌گیرد. شکل بالینی بیماری با انتقال مقادیر کافی آنتی‌بادی از مرغ مادر به جوجه‌ها قابل پیشگیری است (۳).

این ویروس از این لحاظ که می‌تواند به شکل تنهایی و یا در ترکیب با سایر عوامل عفونی مانند ویروس گامبور و تضعیف ایمنی شدید ایجاد کند واجد اهمیت است (۹ و ۱۱). نتایج سرولوژی کم خونی عفونی نشان می‌دهد این ویروس در اکثر کشورهای تولیدکننده طیور وجود دارد (۱۰). در این بررسی نیز ضمن توصیف شیوع سرمی کم خونی عفونی در استان اصفهان به اثرات ویروس کم خونی عفونی بر تیتراژ واکسن آنفلوانزا و مقایسه شیوع سرمی کم خونی عفونی در گله‌های واکسینه و غیر واکسینه آنفلوانزا پرداخته می‌شود.

۱- استادیار بخش بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

(mgholamia@yahoo.com)

۲- مربی بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

مواد و روش کار

با مراجعه به یکی از کشتارگاه‌های طیور واقع در شهر اصفهان در تابستان ۱۳۸۸، به طور تصادفی از ۲۵ گله جوجه گوشتی نمونه خون اخذ و کدگذاری شد. علاوه بر این وضعیت واکسیناسیون گله‌های گوشتی علیه بیماری آنفولانزا ثبت شد. از هر گله حداقل ۱۵ نمونه خون اخذ شد که بلافاصله با انتقال به آزمایشگاه، سانتریفوژ شده و پس از تهیه نمونه سرمی، با حفظ کدهای قبلی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

برای بررسی وضعیت سرمی نمونه‌های جمع‌آوری شده، از کیت تجاری الیزای کم خونی عفونی ماکیان (IDEXX Laboratories Inc. Maine, USA)، استفاده شد و مطابق پروتکل توصیه شده توسط شرکت سازنده عمل شد. بر اساس دستورالعمل، نمونه‌های سرمی دارای نسبت S/N بیشتر از ۰/۶ به عنوان نمونه منفی و نمونه‌های با نسبت S/N کمتر یا مساوی ۰/۶ به عنوان نمونه مثبت ارزیابی شدند و نتایج بصورت درصد نمونه‌های مثبت از مجموع نمونه‌های سرمی تست شده، درصد نمونه‌های مثبت در هر گله و درصد گله‌های مثبت به مجموع گله‌های نمونه‌گیری شده گزارش شد. علاوه بر این نمونه‌های سرمی بار دیگر با روش HI (Haemagglutinin Inhibitor) با آنتی ژن اختصاصی آنفولانزا (H9N2) تست شدند. HI براساس ۴ واحد هماگلوتینین (HA) انجام شد.

برای بررسی ارتباط بین تیتراژهای آنفولانزا و کم خونی عفونی از روش آماری Pearson Correlation استفاده شد و برای مقایسه میانگین میزان آنتی‌بادی علیه کم خونی عفونی در گله‌های واکسینه و غیر واکسینه از روش واریانس یک طرفه داده‌ها (One way ANOVA) استفاده شد و در صورت وجود اختلاف میانگین با آزمون Tukey، میزان اختلاف تعیین شد.

نتایج

۱- سرولوژی کم خونی عفونی

تمام گله‌های مورد آزمایش از لحاظ کم خونی عفونی مثبت بودند (با وجود حداقل یک تیتراژ مثبت در گله). دامنه درصد موارد مثبت در هر گله از حداقل ۲۰٪ تا حداکثر ۱۰۰٪ متغیر بوده است. به طور متوسط ۵۶/۳٪ نمونه‌های سرمی از لحاظ کم خونی عفونی مثبت بودند. از مجموع ۳۶۰ نمونه سرمی اخذ شده کمترین S/N، ۰/۰۴۵ و بیشترین آن ۰/۸۳۴ بوده است. از مجموع ۲۵ گله نمونه‌گیری شده کمترین میانگین S/N، ۰/۰۹۰ و بیشترین میانگین S/N، ۰/۵۹۷ بوده است. میانگین S/N ۳۷۵ نمونه سرمی اخذ شده از ۲۵ گله نمونه‌گیری شده برابر ۰/۳۳۸ می‌باشد. از مجموع ۲۵ گله کمترین درصد پراکندگی (CV) ۱۸/۳ درصد و بیشترین درصد پراکندگی ۹۲٪ می‌باشد. درصد پراکندگی ۳۷۵ نمونه سرمی اخذ شده از ۲۵ گله ۵۳/۵٪ می‌باشد.

۲- سرولوژی آنفولانزا

از ۲۵ گله مورد بررسی ۱۵ گله علیه آنفولانزا واکسینه شده بودند. زمان واکسیناسیون گله‌ها در دامنه ۲۰-۱۰ روزگی وجود داشت. میانگین تیتراژهای واکسینه برابر ۳/۱۲ می‌باشد. کمینه تیتراژهای واکسینه ۱/۵۳ و بیشینه آن ۵/۴۶ می‌باشد. میانگین CV گله‌های واکسینه برابر ۵۶/۲۳ می‌باشد. کمینه CV برابر ۲۳/۸ و بیشینه آن ۸۱/۷ می‌باشد. از بین ۱۰ گله غیر واکسینه ۸ گله (۸۰٪) از نظر آنفولانزا مثبت می‌باشند (به جز گله ۱۱ و ۱۶). میانگین تیتراژهای متعلق به گله‌های غیر واکسینه با احتساب سرم منفی‌ها برابر ۴/۴۲ می‌باشد. کمینه تیتراژ غیر واکسینه‌ها با احتساب سرم منفی‌ها ۱/۷۳ و بیشینه آن ۶/۱۳ می‌باشد. میانگین تیتراژهای غیر واکسینه سرم مثبت برابر ۵/۰۶ می‌باشد. کمینه تیتراژهای غیر واکسینه سرم مثبت برابر ۳/۵۳ و بیشینه تیتراژهای غیر واکسینه سرم مثبت برابر ۶/۱۳ می‌باشد. میانگین CV گله‌های

گوشتی، گزارشات زیادی از کشورهای مختلف وجود دارد. بیشتر تحقیقات انجام شده در مورد کم خونی عفونی در ماکیان مربوط به مرغ‌های مادر می‌باشد. شیوع سرمی کم خونی عفونی در مرغ‌های مادر در آمریکا ۹۸٪ (۸) و در برزیل (۹)، سودان (۱۰) و ترکیه (۷) ۱۰۰٪ گزارش شده است. در فارم‌های تخمگذار تجاری نیز شیوع سرمی کم خونی عفونی در سودان ۶۷٪ (۱۰) و در ترکیه ۹۳٪ (۷) گزارش شده است. در مورد جوجه‌های گوشتی، گزارشات کمتری وجود دارد و در دهه اخیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. در سودان ۴۴٪ (۱۰) گله‌ها (۷)، در ژاپن ۶۹٪ گله‌ها و ۶۰٪ جوجه‌ها (۴)، در ترکیه در فارم‌های گوشتی ۷۰٪ و در جوجه‌ها ۲۰٪ بیان می‌شود (۷) و گزارش دیگر مربوط به اردن است که شیوع سرمی کم خونی عفونی را در گله‌های گوشتی ۱۰۰٪ و در جوجه‌های گوشتی از ۳۸٪ تا ۱۰۰٪ بطور متوسط ۸۲٪ بیان شده است (۱۰). در ایران اولین گزارش از طرقي و همکاران مربوط به فرم بالینی کم خونی عفونی در ۴ گله گوشتی در استان اصفهان با علائم کالبدگشایی خونریزی‌های پراکنده در سطح عضلات است (۱). علاوه بر آن محزونیه و همکاران در سال ۲۰۰۳ به بررسی این بیماری در جوجه‌های گوشتی استان چهارمحال و بختیاری پرداختند. آنها شیوع کم خونی عفونی در گله‌های نمونه‌گیری شده ۱۰۰٪ و در جوجه‌های گوشتی با سنین مختلف ۸۷٪ بیان کردند (۹). فرهودی و همکاران نیز در فاصله زمانی زمستان ۲۰۰۵ تا تابستان ۲۰۰۶ به بررسی کم خونی عفونی جوجه‌ها در گله‌های گوشتی با علائم مشکوک به این بیماری در استان‌های تهران، اصفهان و خراسان پرداختند. در این بررسی ۷۱٪ نمونه‌های سرمی با دامنه ۲۵ تا ۱۰۰٪ مثبت گزارش کردند و بیان کردند این ویروس در ایجاد خونریزی‌های بافتی در مرغ‌های گوشتی نقش عمده‌ای ایفا می‌کند (۲). با توجه به اینکه اکثر گزارشات مربوط به شیوع شکل بالینی این بیماری بوده است (مخصوصاً در استان اصفهان بعنوان اولین استان که

غیر واکسینه برابر ۳۷/۸۵ می‌باشد کمینه CV گله‌های غیر واکسینه برابر ۲۰/۱ و بیشینه CV در آنها برابر ۹۴/۲ می‌باشد.

۳- ارتباط و همزمانی کم خونی عفونی و آنفلوانزا

هیچ ارتباط معنی‌داری بین میزان تیتراهای آنفلوانزا در گله‌های واکسینه و غیر واکسینه با میزان تیتراهای کم خونی عفونی وجود ندارد ($P > 0.05$). اما مشاهده شده است در گله‌های واکسینه با آنفلوانزا درصد نمونه‌هایی که از نظر تیترا کم خونی عفونی منفی هستند بیشتر از گله‌های غیر واکسینه است (واکسینه ۲۷/۱ و غیر واکسینه ۱۸/۷ درصد). به عبارتی درصد موارد کم خونی عفونی مثبت در گله‌های واکسینه ۷۲/۹٪ و در گله‌های غیر واکسینه ۸۱/۳٪ است. ارتباط بین وضعیت واکسیناسیون علیه آنفلوانزا با میزان سرم مثبتی جوجه‌ها نسبت به کم خونی عفونی (Seropositivity) و نیز ارتباط بین وضعیت واکسیناسیون علیه آنفلوانزا با میانگین S/N الیزای کم خونی عفونی با روش آماری Pearson correlation test بررسی شده و از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($P > 0.05$). میانگین S/N الیزای کم خونی عفونی در گله‌های واکسینه با H₉N₂ آنفلوانزا برابر با ۰/۳۵۵ و در گله‌های غیر واکسینه ۰/۳۱۴ می‌باشد. این اختلاف میانگین نیز با روش One way ANOVA بررسی شده و از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($P > 0.05$).

بحث

در این بررسی تمامی گله‌های نمونه‌گیری شده از حداقل ۲۰٪ گله تا حداکثر ۱۰۰٪ گله از نظر سرمی آلوده به ویروس کم خونی عفونی می‌باشند. این شیوع در مجموع ۳۷۵ جوجه گوشتی فاقد علائم بالینی، ۵۶٪ است که نشان‌دهنده شیوع بالای کم خونی شکل تحت بالینی در جوجه‌های گوشتی استان اصفهان می‌باشد. به نظر می‌رسد شیوع این بیماری که کمتر به آن توجه می‌شود در اکثر کشورهای تولیدکننده طیور بالا است. در مرغ‌های مادر، تخمگذار تجاری و جوجه‌های

صحیح و تزریق درست واکسن آنفلوانزا و حمل و نگهداری صحیح نمونه‌های سرمی و بعضاً سایر عوامل تضعیف کننده سیستم ایمنی نیز بر روی تیتراکسن موثرند که در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته است اما به نظر می‌رسد شیوع بالای کم خونی عفونی می‌تواند از دلایل قابل قبول و موثر بر تیتراکسن آنفلوانزا در گله‌های مورد بررسی باشد بطوریکه گزارشات متعددی نشان داده است و ویروس کم خونی عفونی به شکل تنهایی و یا همراه با ویروس گامبورو از عوامل تضعیف کننده سیستم ایمنی می‌باشند (۳ و ۱۱). همچنین گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد گله‌های آلوده با ویروس کم خونی عفونی از نظر وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی و درصد ماندگاری، راندمان پایینی دارند (۳ و ۱۱). بنابراین پاسخ ضعیف در مقابل واکسن‌ها و بعضاً مشاهده تیتراکسن صفر در برخی گله‌های جوجه گوشتی استان اصفهان ممکن است به دلیل شیوع و گسترده‌گی بالای ویروس کم خونی عفونی در این استان و اثرگذاری این عامل بر عملکرد سیستم ایمنی باشد.

از آنجایی که ویروس کم خونی عفونی به شکل عمودی و افقی منتشر می‌گردد (۱۱) بنابراین در صورت آلودگی گله‌های SPF و نهایتاً انتقال ویروس به تخم مرغ‌های SPF که به منظور تهیه واکسن استفاده می‌شود می‌تواند یکی از راه‌های عمده انتقال آلودگی به سایر فارم‌های طیور باشد. از اولین گزارشات شیوع ویروس کم خونی عفونی در ایران این شک و شبهه در اذعان وجود دارد که ممکن است این ویروس از طریق واکسن‌های آلوده وارد فارم‌های طیور شده باشد. اگرچه بررسی این فرضیه نیاز به تحقیقات گسترده بیولوژی و مولکولی دقیق خصوصاً مطالعات گذشته نگر دارد اما بررسی ما نیز نشان می‌دهد که شیوع سرمی کم خونی عفونی در فارم‌های جوجه‌های واکسینه و غیر واکسینه تفاوت معنی‌داری ندارد و فرضیه مطرح شده در مورد واکسن‌های تجاری آنفلوانزا که در حال حاضر مورد استفاده قرار

در آن کم خونی عفونی گزارش شده است) در این مطالعه به شیوع تحت بالینی یا به عبارتی شیوع کم خونی عفونی در گله‌های بدون علائم کالبدگشایی پرداخته شده است. شیوع سرمی موارد تحت بالینی کم خونی عفونی در فارم‌های جوجه گوشتی دور از انتظار نیست بطوریکه مطالعه مولکولی ویروس کم خونی عفونی در گله‌های به ظاهر سالم توسط نویسندگان نشان‌دهنده آلودگی ۲۴/۵۳ درصدی جوجه‌های گوشتی و ۷۳/۳۳ درصدی گله‌های گوشتی (با وجود حداقل یک نمونه مثبت) به ویروس کم خونی عفونی به شکل تحت بالینی بوده است (۵). هر چند شواهد مستندی از ماندگاری آنتی‌بادی مادری تا سن کشتار (۶-۸ هفته‌گی) وجود ندارد و دوام آنتی‌بادی‌های مادری تا سن ۳-۴ هفته‌گی گزارش شده است (۳) لذا به نظر می‌رسد شیوع بالای سرمی در گله‌های مورد بررسی به دلیل مواجه شدن جوجه‌های گوشتی در دوران پرورش با این عامل باشد که به دلیل وجود آنتی‌بادی‌های مادری از بروز علائم کلینیکی جلوگیری شده است. از طرفی عدم رعایت اصول امنیت زیستی مؤثر در فارم‌های جوجه گوشتی در مقایسه با فارم‌های تخمگذار و مادر و نیز واکنش‌های متقاطع سرمی با سایر آلودگی‌های سیرکویروسی در پرندگان می‌تواند از علل شیوع بالای کم خونی عفونی در جوجه‌های گوشتی باشد.

در این بررسی شیوع سرمی آنفلوانزا در گله‌های غیرواکسینه حدود ۸۰٪ می‌باشد. میانگین تیتراکسن آنفلوانزا در گله‌های غیر واکسینه ۵/۰۶ و در گله‌های واکسینه ۳/۱۲ می‌باشد. در این بررسی هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین میزان آنتی‌بادی‌های ضد کم خونی عفونی و تیتراکسنی از واکسن آنفلوانزا وجود ندارد اما مشاهده تیتراکسن‌های پایین علیه واکسن آنفلوانزا با ضریب پراکندگی بالا در برخی از گله‌های واکسینه همزمان با شیوع بالای کم خونی عفونی می‌تواند بیانگر آلودگی این جوجه‌ها با ویروس کم خونی عفونی و تضعیف سیستم ایمنی در آنها باشد به هر حال عوامل متعدد دیگری از جمله نگهداری

- antibodies to chicken anemia virus in Japan. *Avian Pathology*. 27:316-320.
- 5- Gholami - Ahangaran, M., Momtaz, H., Zia-Jahromi, N. and Momeni, M. (2011): Genomic detection of the chicken anaemia virus from apparently healthy commercial broiler chickens in Iran. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 162 (12): 604-606.
- 6- Gholami - Ahangaran, M. and Zia-Jahromi, N. (2012): Chicken anaemia virus infection in broiler chickens vaccinated and not vaccinated to avian influenza in Iran, *Journal of Applied Poultry Research*, [accepted for publishing].
- 7- Hadimli, H.H., Erganis, O., Guler, L. and Ucan, U.S. (2008): Investigation of chicken infectious anemia virus infection by PCR and ELISA in chicken flocks. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*. 32(2):79-84.
- 8- Lucio, B., Schat, K.A. and Shivaprasad, H.L. (1990): Identification of the chicken anaemia agent reproduction of the disease, and serological survey in the United States. *Avian Diseases*. 34:146-153.
- 9- Mahzounieh, M., Karimi, I. and Zahraei Salehi, T. (2005): Serological evidence of chicken infectious anemia in commercial chicken flocks in Shahrekord, Iran. *International Journal of Poultry Science*. 4(7):500-503.
- 10- Roussan, D.A. (2006): Serological survey on the prevalence of CIVA in commercial broiler chicken flock in Northern Jordan. *International Journal of Poultry Science*. 5(6):544-546.
- 11- Saif, Y.M. and et. al. (2008): *Diseases of poultry*. 12th ed. Ames, IA, Blackwell, P:209-235.
- می‌گیرند، ممکن است نادرست باشد. در همین رابطه نویسندگان در یک بررسی وضعیت چندین سری واکسن تولیدی داخل و خارج از کشور را از نظر آلودگی به ویروس کم‌خونی عفونی مورد بررسی قرار دادند که نتایج آلودگی درباره همه واکسن‌های مورد بررسی منفی گزارش شده است (۶). یافته اخیر با مطالعه مولکولی واکسن‌ها از نظر آلودگی به ویروس کم‌خونی عفونی مطابقت دارد و یافته قبلی می‌تواند مؤید نتایج حاصله باشد.
- به هر حال این بررسی نشان داد شیوع سرمی کم‌خونی عفونی در جوجه‌های گوشتی استان اصفهان بعنوان یکی از استان‌های مرکزی ایران که در تعامل با استان‌های دیگر است، بالا است و آلودگی تحت بالینی این ویروس می‌تواند باعث اثرات تضعیف سیستم ایمنی از جمله پاسخ نامناسب نسبت به واکسن‌ها شود لذا برای انتقال یک ایمنی تدافعی کامل به جوجه‌های گوشتی حتی الامکان واکسیناسیون مناسب گله‌های مرغ مادر قبل از شروع تخم‌گذاری توصیه می‌گردد.

فهرست منابع

- ۱- طرقی، ر، شوشتری، ع، چرخکار، س و نیازی، م (۱۳۸۲): اولین گزارش وقوع بیماری کم‌خونی عفونی جوجه‌ها از گله‌های گوشتی ایران، خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره‌ی جامعه‌ی دامپزشکی ایران، تهران،: ۲۴۳-۲۴۰
- ۲- فرهودی، م، طرقی، ر، باسامی، م، کیانی زاده، م و چرخکار، س (۱۳۸۶): عفونت ویروس کم‌خونی عفونی جوجه‌ها در گله‌های گوشتی ایران، آرشیو رازی، ۶۲(۱): ۶-۱
- 3- Canal, C.W., Ferreira, D.J., Macagnan, M., Fallavena, L.C.B., Moraes, H.L.S. and Wald, V.B. (2004): Prevalence of antibodies against CAV in broiler breeder in southern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 24(2): 89-92.
- 4- Farkas, T., Maeda, K., Sugiura, H., Kal, K., Hirai, K., Otsuki, K. and Hayashi, T. A., (1998): serological survey of chickens, Japanese quail, pigeons, ducks and crows for

