مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۵، شماره۴، ۱۳۹۹، ۴۰۶-۳۹۹
مقاله پژوهشی

بررسی سرمی و مولکولی شیوع آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در بازارهای زنده فروشی پرندگان در سال ۱۳۹۵

محمدحسین فلاح‌مهرآبادی[۱]، عبدالحمید شوشتری[۱]، فرشاد تهرانی[۲]، نجمه معتمد[۱]، بهرام حائریان[۱]، آرش قلیانچی‌لنگرودی[۳]، سیدعلی غفوری[۴]، سعید امیرحاجلو[۲]

[۱] *بخش تحقیقات بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران*
[۲] *دفتر بهداشت و مدیریت بیماری‌های طیور، سازمان دامپزشکی کشور، تهران، ایران*
[۳] *گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۴] *گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران*

10.22059/jvr.2019.278728.2921
تاریخ دریافت: ۱۴ تیر ماه ۱۳۹۹، **تاریخ پذیرش:** ۱۹ شهریور ماه ۱۳۹۹

چکیده

زمینهٔ مطالعه: آنفلوانزای پرندگان یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها از نظر اقتصادی و بهداشت عمومی است. ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 شایع‌ترین ویروس آنفلوانزا با بیماریزایی کم در بین طیور در سراسر دنیا می‌باشد.

هدف: بررسی شیوع سرمی و مولکولی AI-H9N2 در بازارهای فروش پرندگان زنده، باغ‌های پرندگان و پارک‌های کشور بود.

روش‌کار: مطالعه مقطعی از مرداد تا آخر آذرماه سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. در هر واحد از ۴۰ پرنده از گونه‌های مختلف خون‌گیری و از ۶۰ پرنده آبزی (اردک و غاز) نمونه سواب کلواک اخذ گردید. نمونه‌های سرمی با تست HI برای شناسایی تحت تیپ H9N2 آزمایش شدند. پرندگانی که دارای عیار سرمی ۴ به بالا بوده و واحدهایی که دارای حداقل یک پرنده مثبت بودند، مثبت در نظر گرفته شدند. نمونه‌های سواب به روش RT-PCR با استفاده از دو جفت پرایمر M و H9 آزمایش شدند.

نتایج: از تعداد ۲۶۳۸ پرنده در ۱۲۷ بازار، باغ وحش، پارک پرنده در ۲۲ استان کشور، نمونه سرم و از ۳۰۰۱ پرنده در ۱۲۲ واحد سواب کلواک اخذ شد. تعداد ۷۳ واحد از ۱۲۷ واحد نمونه‌برداری شده (۵۷/۴۸ درصد و فاصله اطمینان ۹۵ درصد برابر ۶۶/۲ - ۴۸/۴ درصد) و تعداد ۷۲۰ پرنده از ۲۶۳۸ پرنده نمونه‌برداری شده (۲۷/۲۹ درصد و فاصله اطمینان ۹۵ درصد برابر ۲۹/۶ - ۲۵/۶ درصد) از نظر سرمی مثبت بودند. در بین گونه‌های پرنده نیز بالاترین درصد سرم مثبت مربوط به بوقلمون و مرغ به ترتیب با ۴۷/۶ درصد و ۴۵/۳ درصد و کمترین درصد سرم مثبت نیز مربوط به اردک و غاز به ترتیب با ۱۳/۸ درصد و ۱۶/۳ درصد بود. همچنین تعداد ۳۹ سواب تجمیع شده از ۱۸ واحد (۱۴/۷۵ درصد) مثبت بود.

نتیجه‌گیری نهایی: نتیجه مطالعه نشان‌دهنده شیوع بالای آنفلوانزای H9N2 و گردش آن در طیور بازارهاست. ساماندهی بازارها از طریق ارتقاء سطح بهداشتی و امنیت زیستی بازارها، آموزش مردم و پایش مداوم پرندگان عرضه شده در بازارها جهت کنترل بیماری در بازارهای کشور ضروری می‌باشد.

کلمات کلیدی: آنفلوانزا، H9N2، بازار، شیوع، بررسی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: *محمدحسین فلاح‌مهرآبادی، بخش تحقیقات بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران*
پست الکترونیکی: *mhf2480@yahoo.com*

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام می‌باشد و از نظر اقتصادی، سیاسی، اجتماعی و بهداشت عمومی دارای اهمیت می‌باشد. این بیماری توسط ویروس‌های تیپ A آنفلوانزا متعلق به خانواده اورتومیکسوویریده ایجاد می‌شود. ویروس‌های آنفلوانزا دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای، چند قسمتی و با قطبیت منفی می‌باشند که در خانواده اورتومیکسوویریده قرار می‌گیرند (۴). این خانواده دارای هفت جنس شامل: آنفلوانزای تیپ A، B، C و D، کارانجاویروس، توگوتوویروس و آیزاویروس می‌باشد (۱۱). ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A که در پرندگان بیماری آنفلوانزا را ایجاد می‌کنند، از دو نوع برجستگی گلیکوپروتئینی عمده شامل تریمرهای هماگلوتینین (HA) میله‌ای شکل و تترامرهای نورآمینیداز (NA) قارچی شکل تشکیل شده‌اند. ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A براساس واکنش‌های سرمی مربوط به گلیکوپروتئین‌های سطحی هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) به تحت تیپ‌های HA و NA تقسیم می‌شوند. تاکنون ۱۸ تحت تیپ هماگلوتینین (H1-H18) و ۱۱ تحت تیپ نورآمینیداز (N1-N11) شناسایی شده است. به استثنای H17N10 و H18N11 که اخیراً از خفاش جدا شده است، سایر تحت تیپ‌ها در پرندگان در حال گردش می‌باشد (۴). پروتئین HA گلیکوپروتئین فیوژن غشایی و اتصال به گیرنده می‌باشد و القاکننده آنتی‌بادی نوترالیزان در عفونت ویروسی است. پروتئین NA علاوه بر القای آنتی‌بادی نوترالیزان، در رها شدن ویروس نتاج از سلول در مراحل انتهایی تکثیر نقش مهمی را ایفا می‌کند. هر دو پروتئین HA و NA نقش حیاتی در پاتوژنیسیته، آنتی‌ژنیسیته ویروس و طیف میزبانی ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان را بازی می‌کنند. بدلیل مکانیسم ناکامل تصحیح‌کنندگی RNA پلی‌مراز در ویروس آنفلوانزا، ایجاد تنوعی از ژن‌های HA و NA غالباً ممکن است اتفاق بیفتد و منجر به ظهور سویه‌های واریانت جدید گردد (۴).

سازمان بهداشت جهانی دام (OIE)، ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان را براساس بیماریزایی در طیور به دو پاتوتیپ تقسیم می‌کند. ویروس‌های با بیماریزایی پایین (LPAI) و ویروس‌های با بیماریزایی بالا (HPAI) که تحت عنوان آنفلوانزای فوق حاد بیان می‌شود. تا به امروز کلیه ویروس‌های با بیماریزایی بالا متعلق به دو تحت تیپ H5 و H7 می‌باشد، اما تمام تحت تیپ‌های H5 و H7 فوق حاد نیستند و برخی از آن‌ها بیماریزایی پایینی دارند. تمام تحت تیپ‌های H5 و H7 تحت عنوان آنفلوانزای اخطارکردنی بیان می‌شوند (۱۴).

ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 شایع‌ترین ویروس آنفلوانزا با بیماریزایی کم در بین طیور در سراسر دنیا می‌باشد. پرندگان آبزی وحشی میزبان طبیعی ویروس‌های آنفلوانزا هستند، اما ویروس‌های H9N2 نسبتاً غیرمعمول در این پرندگان می‌باشد (۹). ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 که با طیور سازگار شده‌اند، به عنوان یک نگرانی بزرگ در ۲۰ سال گذشته در صنعت طیور بوده است. اما در عین حال به دلیل اینکه برخی از دودمان‌های این ویروس قابلیت انتقال به انسان را دارند، به عنوان یک نگرانی بهداشت عمومی نیز تلقی می‌شود (۱،۱۰).

اولین بار این ویروس از بوقلمون در دهه ۱۹۶۰ در آمریکا جدا شد و تا دهه ۱۹۹۰ گزارش رخدادهای تک گیر بیماری در دنیا وجود دارد (۷). در اواسط دهه ۱۹۹۰ بیماری از جوجه‌هایی در گاندونگ چین و سپس در سراسر چین گزارش شد (۱۹). در اواخر دهه ۱۹۹۰ بیماری از تعدادی دیگر از کشورهای آسیایی، خاورمیانه و شمال آفریقا گزارش شد و اکنون در بسیاری از آن کشورها بومی است (۷).

در کشور ما در اواسط تیرماه سال ۱۳۷۷ این تحت تیپ خود را در مرغداری‌های اطراف تهران و قزوین بصورت بیماری ناشناخته نشان داد و به سرعت بین مزارع تخمگذار کشور گسترش یافت و اکنون در کشور بومی شده است (۱۳).

آنالیز فیلوژنتیک ژن NA تحت‌تیپ N2 دو دودمان عمده آمریکای شمالی و اوراسیا را نشان می‌دهد. متعاقباً دودمان اوراسیا به ۴ خوشه BJ/94-like و یا Y280-like، G1-like، Y439-like و F/98-like تقسیم‌بندی می‌شوند (۲۰).

صنعت پرورش طیور در ایران از نظر اقتصادی، اجتماعی و امنیت غذایی دارای اهمیت ویژه‌ای است. با توجه به شرایط جغرافیایی و طبیعت مناسب، در سال‌های اخیر پرورش طیور صنعتی و بومی در اکثر مناطق کشور گسترش یافته است. در پرورش طیور صنعتی ایران بزرگ‌ترین تولید کننده در خاورمیانه می‌باشد (۱۷). به دلیل قیمت مناسب، گوشت مرغ و تخم مرغ با سرانه مصرف ۲۶/۱ کیلوگرم و ۱۰/۷ کیلوگرم در برابر گوشت قرمز و ماهی به ترتیب با ۱۱/۴۳ و ۱۵/۲ کیلوگرم به عنوان مهم‌ترین منبع پروتئینی خانوارها می‌باشد (۵).

علاوه بر طیور صنعتی، پرورش طیور بومی نیز در کشور دارای رونق می‌باشد. طبق آمار GIS در بیش از ۶۰۰۰۰ روستا در کشور طیور بومی پرورش و نگه داری می‌شوند و حدود ۵۰ میلیون طیور

بومی در کشور پرورش داده می‌شود. جهت عرضه و فروش طیور بومی بیش از ۱۰۰ بازار زنده فروشی وجود دارد. تقریباً در اکثر مناطق روستایی کشور، طیور بومی پرورش داده می‌شوند و بیشتر آن‌ها برای فروش در بازارها عرضه می‌شوند. در این بازارها انواع گونه‌های پرندگان عرضه می‌شوند و در کنار هم قرار می‌گیرند. تنوع گونه‌ها، ارتباط آن‌ها با هم، پایین بودن وضعیت بهداشتی و امنیت زیستی بازارها سبب می‌شود این بازارها به عنوان منبع بالقوه برای ویروس‌های آنفلوانزا مطرح باشند (۳).

با توجه به تعدد بازارهای فروش پرندگان در کشور و اهمیت طیور بومی در نگه داری و انتقال ویروس‌های آنفلوانزای H9N2، این مطالعه با هدف بررسی شیوع سرمی و مولکولی این بیماری در بازارهای فروش پرندگان زنده، باغ‌های پرندگان و پارک‌های کشور انجام گرفت.

مواد و روش‌کار

روش انجام مطالعه و حجم نمونه: این مطالعه به صورت مقطعی (Cross- sectional) و از مرداد ماه تا آخر آذر ماه سال ۱۳۹۵ در تمامی بازارهای فروش پرندگان زنده، باغ پرندگان، پارک‌ها و باغ وحش‌هایی که در زمان انجام مطالعه فعال بوده و پرنده داشتند انجام گرفت. از هریک از واحدها حداقل از ۴۰ پرنده از گونه‌های مختلف خون‌گیری شد. تعداد پرنده مورد نیاز برای نمونه‌برداری جهت تشخیص با در نظر گرفتن شیوع ۳۰ درصد و با ۹۵ درصد اطمینان در سطح پرنده انتخاب گردید. همزمان از هر یک از واحدها از ۶۰ پرنده آبزی (اردک و غاز) نیز نمونه سواب کلواک اخذ گردید. در صورتی که تعداد پرنده آبزی کمتر از ۶۰ پرنده بود، از تمامی آن‌ها نمونه سواب اخذ شد. تعداد پرنده لازم برای شناسایی ویروس، با در نظرگرفتن شیوع ۵ درصد ویروس در پرنده‌ها و با ۹۵ درصد اطمینان محاسبه شد (۶).

جدول ۱. تعداد و درصد واحد و نمونه‌های سرمی اخذ شده و مثبت برای آنفلوانزای H9N2 از بازارها و.... به تفکیک استان و نوع پرنده در سال ۱۳۹۵.

ردیف	نام استان	نعداد نمونه‌های اخذ شده/ تعداد مثبت (درصد)							
		واحد	اردک	غاز	مرغ	بوقلمون	بلدرچین	کبوتر	سایر	مجموع
۱	قزوین	۴/۴	۱۰/۱۱	۷/۱۰	۱۲/۱۴	۴/۵	-	۳/۳	۸/۸	۴۴/۵۱ (۸۶)
۲	سمنان	۱/۱	۰/۲۱	۰/۷	-	۱/۱۲	-	-	-	۱/۴۰ (۳)
۳	سیستان	۰/۱	۰/۴۰	-	-	-	-	-	-	۰/۴۰ (۰)
۴	همدان	۱/۱	۳۴/۴۰	-	-	-	-	-	-	۳۴/۴۰ (۸۵)
۵	گلستان	۱/۷	۱/۲۴۴	-	-	-	-	-	-	۱/۲۴۴ (۰/۵)
۶	هرمزگان	۳/۵	۲/۵۹	۰/۳۴	۲۴/۶۰	-	-	۰/۹	۰/۱۱	۲۶/۱۷۳ (۱۵)
۷	فارس	۲/۳	۹/۹	-	۶/۱۲	-	۶/۶	-	-	۲۱/۲۷ (۷۸)
۸	لرستان	۳/۳	۳۵/۱۲۰	-	-	-	-	-	-	۳۵/۱۲۰ (۲۹)
۹	خوزستان	۰/۳	۰/۴۰	۰/۸۰	-	-	-	-	-	۰/۱۲۰ (۰)
۱۰	بوشهر	۱/۲	۰/۳۸	۰/۲	۱۰/۱۸	۰/۲	-	-	-	۱۰/۶۰ (۱۷)
۱۱	مرکزی	۱/۱	۶/۴۴	-	-	-	-	-	-	۶/۴۴ (۱۴)
۱۲	البرز	۵/۵	-	۲/۳	۳۶/۵۵	۱/۱	-	۸/۲۲	۴/۵	۵۱/۸۶ (۵۹)
۱۳	کرمان	۱/۱	۱۰/۲۲	-	-	-	-	-	-	۱۰/۲۲(۴۵)
۱۴	تهران	۷/۱۲	۸/۲۱	۷/۱۴	۱۱/۳۴	-	-	-	۵/۱۰	۳۱/۷۹ (۷۹)
۱۵	مازندران	۱۱/۱۳	۷/۴۹	۶/۹	۵۹/۷۴	۷/۱۱	۲/۲	-	۵/۵	۸۶/۱۵۰ (۵۷)
۱۶	اصفهان	۲/۴	۴/۱۲	۰/۳	۱۰/۱۷	۳/۳	-	-	۱/۱	۱۸/۳۶ (۵۰)
۱۷	کرمانشاه	۱/۱	۰/۶	-	۱۹/۲۰	-	-	-	۱/۵	۲۰/۳۱ (۶۵)
۱۸	آذرغربی	۹/۹	۳۰/۱۲۰	-	۳۶/۱۲۰	-	-	-	-	۶۶/۲۴۰ (۲۸)
۱۹	قم	۳/۴	۳۰/۱۲۰	-	-	-	-	-	-	۳۰/۱۲۰ (۲۵)
۲۰	آذربایجان شرقی	۸/۱۱	۶/۱۵	۷/۷	۱۰۸/۱۶۳	۲۳/۳۷	-	-	۱/۳	۱۴۵/۲۲۵ (۶۴)
۲۱	خراسان رضوی	۳/۹	۲۶/۴۵	۰/۳	۲۶/۱۴۷		-	-	۳/۱۱	۵۵/۲۰۶ (۲۷)
۲۲	گیلان	۶/۲۷	۱/۲۶۹	۰/۶	۲۹/۱۹۴	۰/۱۱	-	-	۰/۴	۳۰/۴۸۴ (۶)
	مجموع	(۵۷/۵) ۷۳/۱۲۷	(۱۳/۸) ۱۸۵/۱۳۴۵	(۱۶/۳) ۲۹/۱۷۸	(۴۵/۳) ۴۲۰/۹۲۸	(۴۷/۶) ۳۹/۸۲	۲/۸ (۲۵)	(۳۲/۴) ۱۱/۳۴	(۲۴/۶) ۳۴/۱۳۵	(۲۷/۳) ۷۲۰/۲۶۳۸

جدول۲. تعداد نمونه‌های سواب اخذ شده برای آنفلوانزای H9N2 به تفکیک استان و نوع پرنده، از بازارها در سال۱۳۹۵.

ردیف	نام استان	تعداد واحد نمونه‌برداری شده و (تعداد واحد مثبت)	تعداد سواب کلواک اخذ شده		
			اردک	غاز	مجموع
۱	قزوین	۴ (۰)	۶۵	۵۷	۱۲۲
۲	سمنان	۱(۰)	۳۵	۱۱	۴۶
۳	سیستان	۱(۰)	۴۰	-	۴۰
۴	همدان	۱(۰)	۴۰	-	۴۰
۵	گلستان	۵ (۱)	۱۰۰	۵۴	۱۵۴
۶	هرمزگان	۳ (۱)	۷۰	۳۵	۱۰۵
۷	فارس	۳ (۰)	۱۰۲	۲۹	۱۳۱
۸	لرستان	۳ (۰)	۹۱	-	۹۱
۹	خوزستان	۳ (۰)	۱۲۹	-	۱۲۹
۱۰	بوشهر	۲ (۰)	۵۷	-	۵۷
۱۱	مرکزی	۳ (۰)	۴۱	-	۴۱
۱۲	البرز	۵ (۱)	۷	-	۷
۱۳	کرمان	۱ (۰)	۳۵	-	۳۵
۱۴	تهران	۱۲ (۲)	۲۷۱	-	۲۷۱
۱۵	مازندران	۱۳ (۴)	۲۱۴	-	۲۱۴
۱۶	اصفهان	۴ (۱)	۱۴۲	-	۱۴۲
۱۷	کرمانشاه	۱ (۰)	۱۲	-	۱۲
۱۸	آذر.غربی	۹ (۲)	۳۱	۹۱	۱۲۲
۱۹	قم	۴ (۰)	۱۸۰	-	۱۸۰
۲۰	آذربایجان شرقی	۱۱ (۲)	۶۷	۸۳	۱۵۰
۲۱	خراسان رضوی	۱۱ (۲)	۸۲	۲	۸۴
۲۲	گیلان	۲۲ (۳)	۶۷۴	۱۵۴	۸۲۸
مجموع		۱۲۲ (۱۸)	۵۱۶	۳۰۰۱	مجموع
		۲۴۸۵			

تست‌های آزمایشگاهی: پس از مراجعه به هر واحد بر اساس حجم نمونه محاسبه شده از هر پرنده با سرنگ ۲/۵ میلی لیتری از ورید بالی به اندازه یک میلی لیتر خون اخذ شد و بعد از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه سرم آن‌ها جدا و در میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری قرار گرفت و بعد از کدگذاری و ثبت اطلاعات مربوط به محل نمونه‌برداری و مشخصات گونه پرنده، تا زمان انجام آزمایش HI در فریز ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

آزمون HI-H9: در مورد ماکیان کلیه نمونه‌های سرمی با تست HI برای شناسایی آنتی بادی تحت تیپ H9 آزمایش شدند (۱۴). در مورد سایر طیور برای انجام آزمایش HI ابتدا درمان لازم بر روی نمونه‌های سرمی با استفاده از RBC جوجه‌های SPF مطابق دستورالعمل OIE (افزودن ۰/۰۲۵ میلی لیتر RBC جوجه SPF به هر میلی‌لیتر سرم و قرار دادن در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه و سانتریفیوژ با ۸۰۰ دور در ۲-۵ دقیقه) انجام گرفت و سپس آزمون‌های HI مانند روش‌های ذکر شده برای ماکیان انجام گرفت. کلیه نمونه‌های سرمی با استفاده از آنتی‌ژن H9N2 مورد آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون قرار گرفتند تا از نظر تیتر آنتی بادی ضد ویروس (HI) بررسی شوند. محاسبه تیتر آنتی بادی بر اساس لگاریتم ۲ انجام گرفت. عیار سرمی ۴ به بالا (عیار ۱/۱۶) به عنوان مثبت بودن عیار در نظر گرفته شد (۱۴). پرندگانی که دارای عیار سرمی ۴ به بالا بودند مثبت و واحدهایی که دارای حداقل یک نمونه مثبت بودند به عنوان واحد آلوده در نظر گرفته شدند.

آزمون مولکولی: جهت انجام آزمایشات مولکولی، نمونه‌های سواب اخذ شده (پنج نمونه سواب از یک گونه پرنده) مخلوط و از آن‌ها سوسپانسیون ۱۰ درصد با PBS حاوی ۱۰۰ واحد پنی سیلین ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین و ۸۰ میکروگرم جنتاماسین در میلی لیتر تهیه شد. جهت جداسازی RNA ویروس، از کیت High pure viral Nucleic Acid Kit ساخت کمپانی (Roche, Germany) و مطابق دستورالعمل کارخانه استفاده شد. تمامی نمونه‌ها به روش RT-PCR با استفاده از دو جفت پرایمر جهت ردیابی ژن M و نیز ژن H9 جهت ردیابی ویروس H9N2 به روش توصیه شده آزمایش شدند (۲).

تحلیل داده‌ها: اطلاعات مربوط به واحدها و نتایج آزمایشگاهی وارد اکسل شده و جهت تحلیل نهایی از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده گردید. برای توصیف داده‌های کیفی، فراوانی و فراوانی نسبی و فاصله اطمینان ۹۵ درصد آن‌ها بیان گردید.

نتایج

نتایج سرمی: در این مطالعه از تعداد ۲۶۳۸ پرنده در ۱۲۷ بازار، باغ وحش، پارک پرنده و... در ۲۲ استان کشور، نمونه سرمی اخذ شد. تعداد ۷۳ واحد از ۱۲۷ واحد (۵۷/۴۸ درصد و فاصله اطمینان ۹۵ درصد برابر ۶۶/۲ - ۴۸/۴ درصد) نمونه‌برداری شده سرم مثبت بودند. ۷۲۰ پرنده از ۲۶۳۸ پرنده (۲۷/۲۹ و فاصله اطمینان ۹۵ درصد برابر۲۹ - ۲۵/۶ درصد) نمونه‌برداری شده سرم مثبت بودند. بیشترین تعداد واحد سرم مثبت در استان‌های مازندران، تهران و آذربایجان شرقی و به ترتیب با ۱۱، ۹ و ۸ واحد بود. بیشترین تعداد پرنده سرم مثبت نیز مربوط به استان‌های آذربایجان شرقی و مازندران به ترتیب با ۱۴۵ و ۸۶ پرنده سرم مثبت بود. در بین گونه‌های پرنده نیز بالاترین درصد سرم مثبت مربوط به بوقلمون و مرغ به ترتیب با ۴۷/۶ و ۴۵/۳ درصد کمترین درصد سرم مثبت نیز مربوط به اردک و غاز به ترتیب با ۱۳/۸ و ۱۶/۳ درصد بود. نتایج سرمی به تفکیک استان و تعداد و نوع پرنده سرم مثبت در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج مولکولی: در این مطالعه تعداد ۳۰۰۱ سواب کلواک از اردک و غاز در ۱۲۲ واحد برای آزمایشات مولکولی نمونه‌برداری شد. بر اساس نتایج، تعداد ۳۹ سواب تجمیع شده از ۱۸ واحد (۱۴/۷۵ درصد) مثبت بود. استان‌های مازندران و گیلان به ترتیب با ۴ و ۳ واحد، بیشترین تعداد واحد مثبت را داشتند. تعداد سواب اخذ شده به تفکیک استان و نوع پرنده در جدول ۲ نشان داده شده است.

بحث

طیور بومی نقش مهمی در معیشت و اقتصاد روستاییان در ایران دارند و علاوه بر تأمین تخم مرغ و گوشت سفید مورد نیاز آن‌ها، با فروش مازاد تولید، بخشی از هزینه‌های زندگی روستاییان از این راه تأمین می‌شود. بازارهای فروش پرندگان زنده به عنوان یکی از مهم‌ترین مراکز عرضه تولیدات طیور بومی روستاییان در سراسر کشور و به خصوص استان‌های شمالی تلقی می‌گردد. در این بازارها طیور پرورش داده شده به صورت زنده و کشتار شده عرضه می‌شوند. علاوه بر طیور بومی، در فصل مهاجرت پرندگان مهاجر، پرندگان شکار شده نیز به صورت زنده و کشتار شده عرضه می‌گردند. تنوع گونه‌های طیور عرضه شده در کنار تنوع فروشندگان و خریداران از نظر جغرافیایی باعث شده این بازارها گاهاً فراتر از منطقه‌ای عمل کرده و نقش استانی و حتی ملی داشته باشند به گونه‌ای که در این بازارها فروشندگان و خریدارانی از مناطق مختلف کشور حضور داشته باشند. از طرفی بسیاری از پرندگانی که در بازارها عرضه شده و فروخته نمی‌شوند، توسط فروشندگان در روزهای بعد به بازاهای شهرهای مجاور منتقل شده و شانس انتقال بیماری به این طریق نیز افزایش می‌یابد. در این میان شرایط نامطلوب بازارها از نظر بهداشتی و امنیت زیستی باعث فراهم آوردن شرایط مناسب برای تبادل انواع عوامل بیماریزا و به خصوص ویروس‌های آنفلوانزا بین طیور عرضه شده و هم چنین شرایط انتقال با وسایل نقلیه، افراد و حتی سایر وسایل موجود در بازارها را فراهم نماید. در بازارهای کشور عرضه پرنده زنده بدون رعایت اصول اولیه امنیت زیستی به همراه عرضه پرندگان به صورت کشتار شده و حتی کشتار و پرکنی در محل شرایط را برای انتقال و گسترش ویروس‌های آنفلوانزا دوچندان مساعد نموده است. از طرفی تراکم بالای این پرندگان باعث افزایش شانس انتقال و گسترش آنفلوانزا و حفظ بقای ویروس به دلیل وجود مخازن حساس و زیاد در آن‌ها می‌شود. این ارتباط بین طیور بومی باعث گسترش عفونت از پرندگان آلوده به سایر طیور و هم چنین انتقال توسط جابه‌جایی پرنده زنده آلوده، افراد، وسایل نقلیه و... به سایر مناطق و حتی طیور صنعتی می‌گردد و نقش مهمی در بقای ویروس و به تبع آن گسترش بیماری دارد.

ویروس H9N2 دارای بیماری‌زایی بالایی برای ماکیان نیست. اما طغیان‌ها و اپیدمی‌های مختلف این ویروس در سال‌های گذشته و در نقاط مختلف دنیا و از جمله ایران خسارت‌های شدیدی را به صنعت پرورش طیور وارد کرده است. در مطالعه حاضر بیش از ۵۷ درصد از واحدهای نمونه‌برداری شده و بیش از ۲۷ درصد پرندگان نمونه‌برداری شده از نظر سرمی علیه آنفلوانزای H9N2 مثبت بودند. شیوع بالای عیار سرمی H9N2 بدون داشتن علائم بیماری می‌تواند به دلیل مواجهه مداوم طیور بومی با این ویروس و کسب ایمنی در این

پرندگان ناشی از گردش این ویروس در محیط و بین طیور بومی باشد. در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۳ در بازارهای کشور انجام گرفت، ۵۳/۳ درصد بازارها سرم مثبت بودند که مانند مطالعه حاضر شیوع بالایی داشته است. در مطالعه مذکور ۱۶ درصد نمونه‌های اخذ شده نیز سرم مثبت بودند که نسبت به مطالعه حاضر شیوع در بین پرندگان پایین بوده است (۷). در مطالعه‌ای که توسط Saadat و همکاران در سال ۲۰۱۴ در استان بوشهر بر روی ۱۵۳۰ نمونه خون ماکیان بومی جهت تعیین تیتر آنتی بادی علیه ویروس آنفلوانزای (H9N2) انجام گرفت، ۳۹ درصد نمونه‌ها دارای تیتر سرمی علیه ویروس‌های آنفلوانزا H9N2 بودند که نشان دهنده شیوع بالای H9N2 در طیور بومی استان بوشهر می‌باشد (۱۶).

در مطالعه حاضر بالاترین میزان شیوع در بین مرغ‌ها با بیش از ۴۵ درصد سرم مثبت و کم‌ترین مربوط به اردک و غاز با ۱۳ و ۱۷ درصد شیوع سرمی بود. این تفاوت در میزان شیوع احتمالاً به چند دلیل می‌تواند ایجاد شده باشد. اول تراکم بالاتر این گونه و به تبع آن ارتباط و تماس بیشتر پرنده‌ها با هم و تبادل بیشتر ویروس و در نتیجه مواجهه مداوم و تولید پاسخ ایمنی توسط پرندگان مواجهه یافته، اما در مطالعات متعددی که انجام گرفته، مشخص شده پاسخ‌های آنتی‌بادی در مواجهه با ویروس‌های آنفلوانزا در جوجه‌ها > قرقاول> بوقلمون> بلدرچین> اردک بوده است. علت این موضوع می‌تواند به دلیل سرعت رسوب پادتن‌ها در سرم، فعالیت کمپلمان و یا فرایند شناسایی و مبارزه با ویرس در بدن میزبان باشد (۱۸).

در مطالعه حاضر در ۱۵ درصد از واحدها، ویروس شناسایی شد. با توجه به اینکه نمونه‌های سواب فقط از طیور آبزی (اردک و غاز) اخذ شده بود، نتایج حاکی از گردش نسبتاً بالای ویروس در بین طیور عرضه شده در بازارها می‌باشد. نتایج این مطالعه مشابه نتایج مطالعه انجام گرفته توسط Majidzadeh و همکاران در ۲۰۱۲ بر روی ۱۰۰ نمونه مدفوع پرندگان وحشی (اردک، گنجشک، طوطی، کلاغ، قو و کبوتر) موجود در پارک‌های شهر تهران (آزمایش RT- PCR) بود که ۱۴ درصد نمونه‌های مدفوع برای H9 مثبت بودند (۱۳). در مطالعه انجام گرفته در بازارهای چین در سال‌های ۲۰۱۴ و ۲۰۱۵ بیش از ۳۴ درصد نمونه‌های اخذ شده برای H9N2 در آزمون مولکولی (RRT-PCR)، مثبت بودند (۲۰).

اما بر خلاف نتایج این مطالعه، در مطالعه‌ای که توسط Poursafar و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی ۵۵۰ نمونه سواب اخذ شده از کلواک اردک‌های بومی استان گیلان جهت ردیابی ویروس‌های آنفلوانزا (آزمایش RT-PCR) انجام گرفت، ویروس آنفلوانزای پرندگان در هیچ یک از نمونه‌های مورد آزمایش ردیابی نشد (۱۵).

نتیجه‌گیری: نتیجه این مطالعه نشان دهنده شیوع بالای ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 و گردش آن‌ها در بین طیور عرضه شده در بازارهاست. در مشاهدات میدانی، علاوه بر پایین بودن سطح امنیت زیستی در بازارها، وضعیت بهداشتی طیور کشتار شده عرضه شده نیز مناسب نبوده و حتی در بسیاری از موارد غیر بهداشتی می‌باشد که می‌تواند از نظر بهداشت عمومی و انتقال سایر بیماری‌های مشترک نیز مسئله‌ساز گردد. در سال‌های اخیر با شیوع آنفلوانزا، سازمان دامپزشکی اقدام به تعطیلی بازارها نموده که این اقدام پیشگیرانه نه تنها مؤثر نبوده بلکه سبب ایجاد بازارهای حاشیه‌ای و کوچک‌تر در اطراف بازارهای اصلی شده و از طرفی با توجه به تأثیر آن بر معیشت مردم، موجب نارضایتی مردم و به تبع آن عدم تمایل مسئولین محلی در تعطیلی بازارها و بازگشایی آن‌ها گردیده است. بنابراین سامان دهی بازارها با ارتقاء سطح بهداشتی و امنیت زیستی بازارها، آموزش مردم با همکاری شهرداری و سایر دستگاه‌های متولی و پایش مداوم پرندگان عرضه شده در بازارها از نظر ویروس‌های آنفلوانزا به منظور آگاهی از ویروس‌های در گردش و تغییرات ایجاد شده در آن‌ها و اتخاذ تصمیمات پیشگیرانه مناسب، به خصوص در فصل‌های پرخطر از جمله اقدامات ضروری جهت کنترل بیماری در بازارهای کشور می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پروژه مصوب موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی با کد ۹۶۰۶۸۳--۱۸-۰۵۶-۹۶۰۲۳-۱۲-۱۸ و مشترک با دفتر بهداشت و مدیریت بیماری‌های طیور سازمان دامپزشکی و با هم کاری ادارات کل دامپزشکی استان‌های مربوطه انجام گرفته که از همکاری آن‌ها در اجرای این مطالعه تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Azizpour, A., Bokaei, S., Sheikhi N., Habibzadeh S. (2012). A serological study of antibodies to h9n2 avain influenza virus in human population of ardabil area, iran. J Comp Pathol Iran, 9, 619-628.
2. Capua, I., Alexander, D.J. (2009). Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual. Springer. Milan, Italy, p. 230-245 https://doi.org/10.1007/978-88-470-0826-7
3. Cardona, C., Yee, K., Carpenter, T. (2009). Are live bird markets reservoirs of avian influenza? Poult Sci, 88, 856-859. https://doi.org/10.3382/ps.2008-00338 PMID: 19276435
4. David, E.S., David, L.S., Leslie, D.S. (2013). Influenza. In: Diseases of Poultry. David, E.S. (ed.). (5th ed.) Blackwell Publishing Ltd., Iowa 50010, USA. p. 209-273.
5. Ebadzadeh, H.R. (2018). Agricultural statistics. 2015, Center for Information and Communication Technology: Tehran. Iran. p. 160-199.
6. Fallah Mehrabadi, M.H., Bahonar, A.R., Vasfi Marandi, M., Sadrzadeh, A., Tehrani, F., Salman, M.D. (2016). Sero-survey of Avian Influenza in backyard poultry and wild bird species in Iran-2014. Prev Vet Med, 128, 1-5. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.01.031 PMID: 27237384
7. Group, S.H.W. (2013). Assessing the fitness of distinct clades of influenza A (H9N2) viruses. Emerg Microb & Infect, 2(11), e75-85. https://doi.org/10.1038/emi.2013.75 PMID: 26038443
8. Homme, P.J., B.C. Easterday. (1970). Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus. Avian Dis, 14, 66-74. https://doi.org/10.2307/1588557 PMID: 4314007
9. Iqbal, M.,Yaqub, T., Reddy, K., McCauley, JW. (2009). Novel genotypes of H9N2 influenza A viruses isolated from poultry in Pakistan containing NS genes similar to highly pathogenic H7N3 and H5N1 viruses. PloS one. 4(6),e5788 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005788 PMID: 19517011
10. Khan, S.U., Anderson, B.D., Heil, G.L., Liang, S., Gray, G.C. (2015). A systematic review and meta-analysis of the seroprevalence of influenza A(H9N2) infection among humans. J Infect Dis, 212, 562-569. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv109 PMID: 25712969
11. Knipe, D.M., Howley, P.M. (2013). Fields Virology. (6th ed.) Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Philadelfia .USA. p. 1151-1185. https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.023 PMID: 23217624
12. Majidzadeh, K., Ghalyanchi-Langeroudi, A., Soleimani, M., Karimi, V., Morovati, A. (2012). Molecular surveillance of avian influenza in bird parks of Tehran, Iran. Iranian J Vet Med, 6, 165-169. https://doi.org/10.21859/isv.6.4.33
13. Nili, H., K. Asasi. (2003). Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. Avian dis. 47, 828-831. https://doi.org/10.1637/0005-2086-47.s3.828 PMID: 14575072
14. OIE. (2015). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018. Chapter 2.3.4. Avian Influenza (Infection with Avian Influenza Viruses) Office International Des épizooties. (8th ed.) French. Paris. p. 1594-1607
15. Poursafar, F., Karimi, V., Charkhkar, S., Ghalyanchilangeroudi, A., Maghsoudlou, H. (2012). Molecular surveillance of avian influenza virus in domestic ducks: A provincial study. J Vet Res, 67, 345-351
16. Saadat, Y., Ghafouri, S.A., Tehrani, F., Ghalyanchi Langeroudi, A. (2014). An active serological survey of antibodies to newcastle disease and avian influenza (H9N2) viruses in the unvaccinated backyard poultry in Bushehr province, Iran, 2012-2013. Asian Pac J Trop Biomed, 4, 213-216. https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1293 PMID: 25183083
17. Shariatmadari, F. (2000). Poultry production and the industry in Iran. World Poult Sci J, 56, 55-65. https://doi.org/10.1079/WPS20000006
18. Suarez, D., Schultz-Cherry, S. (2000). Immunology of avian influenza virus: a review. Develop & Comp Immunolo. 24, 269-283. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00078-6 PMID: 10717293
19. Sun, Y., Liu, J. (2015). H9N2 influenza virus in China: a cause of concern. Protein & Cell, 6, 18-25. https://doi.org/10.1007/s13238-014-0111-7 PMID: 25384439
20. Zeng, X., Liu, M., Zhang, H., Wu, J., Zhao, X., Chen, W., Yang, L., He, L., Fan, G., Wang, D., Chen, Shu, Y. (2017). Avian influenza H9N2 virus isolated from air samples in LPMs in Jiangxi, China. Virol J, 14, 1-6 https://doi.org/10.1186/s12985-017-0800-y PMID: 28738865

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 75, Number 4, 2020
Original Article

Serological and Molecular Survey of Avian Influenza H9N2 Subtype in Live Birds Markets- 2016

Mohammad Hossein Fallah Mehrabadi[1], Abdolhamid Shoushtari[1], Farshad Tehrani[2], Najmeh Motamed[1], Bahram Haerian[1], Arash Ghalyanchilangeroudi[3], Seyed Ali Ghafouri[4], Saeed Amirhajloo[2]

[1] *Department of Poultry Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, AgriculturalResearch, Education and ExtensionOrganization (AREEO), Tehran, Iran*
[2] *Department of Health and Management of Poultry Diseases, Iran Veterinary Organization, Tehran, Iran*
[3] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[4] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran*

10.22059/jvr.2019.278728.2921
Received: *4 July 2020*, ***Accepted:*** *9 September 2020*

Abstract

BACKGROUND: Avian influenza is one of the most important diseases both economically and from a public health viewpoint.
OBJECTIVES: To investigate the serological and molecular prevalence of AI-H9N2 in live bird markets, bird gardens, parks and zoos.
METHODS: This cross-sectional study was conducted from August to December 2016. In each unit, 40 blood samples from different bird species and 60 cloacal samples from waterfowl (ducks and geese) were taken. All sera samples were tested by HI for detection of antibodies against H9N2 virus. The birds with sera titer =>4 (log2) and units with at least one positive bird were considered as positive. Swab samples were tested by RT-PCR method using two pairs of primers to detect M and H9 gene of H9N2 virus.
RESULTS: 2638 sera samples from birds in 127 units in 22 provinces and 3001 swab samples from duck and goose were taken. 73 units out of 127 (57.48 %; 95 % confidence interval, 66.2 % - 48.4 %) and 720 birds from a total of 2638 birds (27.29 %: 95 % confidence interval, 29.6 % - 25.6 %) were sero-positive. Among the bird species, the highest seroprevalence was 47.6 % and 45.3 % in turkey and chicken, respectively and the lowest seroprevalence was 13.8 % and 16.3 % for ducks and geese, respectively. 39 pooled samples from 18 units (14.75 %) were positive.
CONCLUSIONS: The results of this study showed high prevalence and circulation of avian influenza H9N2 viruses among poultry in these markets. Organizing the markets by improving the health and biosecurity of the markets, and it is necessary to educate the people and continuously surveillance the birds that offered in the markets to control the disease.

Keywords: Influenza, H9N2, Prevalence, Markets, Survey

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: mhf2480@yahoo.com Tel/Fax: 026-34570039/026-34552194

How to cite this article:

Fallah Mehrabadi, M., Shoushtari, A., Tehrani, F., Motamed, N., Haerian, B., Ghalyanchilangeroudi, A., Ghafouri, S., Amirhajloo, S. (2021). Serological and Molecular Survey of Avian Influenza H9N2 Subtype in Live Birds Markets- 2016. J Vet Res, 75(4), 399-406. https://doi.org/10.22059/jvr.2019.278728.2921

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Number and percentage of units and sera samples taken for H9N2 avian influenza from LBM and Zoos by province and bird type- 2016.
Table 2. Number of swab samples collected for H9N2 influenza, by province and type of bird, from LBM and Zoos- 2016.