مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۴، ۳۵۱-۳۴۵

پایش مولکولی تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزای پرندگان در اردک‌های بومی: یک مطالعه استانی

فاطمه پورصفر[۱] وحید کریمی[۱*] سعید چرخکار[۲] آرش قلیان چی لنگرودی[۳] حسین مقصودلو[۲]

۱) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) آزمایشگاه مرکز تشخیص، سازمان دامپزشکی کشور، تهران - ایران.
۳) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۰ بهمن ماه ۱۳۹۰ ، پذیرش نهایی: ۲۷ اردیبهشت ماه ۱۳۹۱)

چکیده

زمینه مطالعه: آلودگی به ویروس آنفلوانزای پرندگان در صنعت طیور ایران نخستین بار توسط تحت تیپ H9N2 در سال ۱۳۷۷ در استان قزوین تشخیص داده شد و از آن زمان به بعد در کشور به شکل اندمیک درآمده است. پرندگان آبزی مانند اردک‌های اهلی می‌توانند به عنوان مخزن تحت تیپ‌های موجود ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان محسوب شوند و در گردش این ویروس‌ها در طبیعت و جمعیت‌های طیور اهلی نقش ایفا نمایند. گزارش منتشرشده از سوی سازمان دامپزشکی کشور پیرامون بررسی صورت گرفته بر روی تلفات ۱۳۵ قطعه قو در استان گیلان حاکی از نقش تحت تیپ بسیار بیماریزای H5N1 ویروس آنفلوانزای پرندگان می‌باشد. **هدف:** هدف از این بررسی تعیین تحت تیپ های ویروس های آنفلوانزای پرندگان در اردک‌های بومی استان گیلان می‌باشد. **روش کار:** تعداد ۵۵۰ نمونه سواب کلواک از گونه‌های اردک مالارد و پکین در مناطق روستایی اطراف شهرستان‌های شفت، فومن و یک مزرعه پرورش اردک اهلی به منظور ردیابی تحت تیپ‌های (H9، H7، H5) ویروس آنفلوانزای پرندگان به کمک آزمون RT-PCR مطابق دستورالعمل‌های استاندارد، مورد بررسی قرار گرفتند. **نتایج:** RNA ویروس آنفلوانزای پرندگان در هیچ یک از نمونه‌های موردآزمایش با RT-PCR ردیابی نشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** اردک‌های وحشی در چرخش و ظهور سویه‌های جدید ویروس آنفلوانزای پرندگان نقش مهمی دارند. به دلیل ظهور ویروس آنفلوانزای H1N1 و آنفلوانزای پرندگان در جهان و کشورهای منطقه، نیاز به طراحی مجدد برنامه‌های پایش جهت بررسی انتشار و گسترش این ویروس‌ها وجود دارد. همچنین برای اطمینان از عدم انتقال تحت تیپ‌های H7 و H5 به جمعیت‌های انسانی و مزارع طیور صنعتی، برنامه‌های پایش آنفلوانزای پرندگان در پرندگان وحشی باید برای تأمین اطلاعات همه‌گیری شناسی بیشتر در مورد ویروس‌های در حال گردش ادامه داشته باشد. نتایج این مطالعه نشان از تأثیر برنامه‌های کنترلی دقیق آنفلوانزای پرندگان همراه با روش‌های آموزشی و اجرایی بکار گرفته‌شده و رعایت مسایل امنیت زیستی در کنترل بیماری در گله‌های اردک در مناطق آلوده به ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت نظارت سازمان دامپزشکی کشور دارد.

واژه‌های کلیدی: آنفلوانزای پرندگان، ایران، اردک، RT-PCR.

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان از مهمترین بیماریهای ویروسی پرندگان بشمار می‌رود. این ویروس در خانواده ارتومیکسوویریده قرار گرفته و دارای RNA تک رشته‌ای قطعه قطعه با قطبیت منفی و به طول ۱۲۰nm-۸۰ می‌باشد. ژنوم هشت قطعه‌ای آن، ده نوع پروتئین را رمزگذاری می‌کند. این ویروس دارای تقارن مارپیچی و حاوی پوشش است که بر روی غشای آن، پادگن‌های اصلی هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) ویروس قرار می‌گیرند (۴).

ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان به دو دسته کلی ویروس‌های بسیار بیماریزا ((Highly Pathogentic Avian Influenza (HPAI) و آنفلوانزای غیر حاد ((Non-Highly-high Pathogenic Avian Influenza (NHPAI) تقسیم می‌شوند. که دسته اخیر خود به چهار گروه بیماریزا، بیماریزایی ملایم، کم بیماریزا و غیربیماریزا تقسیم می‌گردد (۸).

در کشور ما گزارش‌هایی از وقوع یک بیماری با واگیری بالا در مزارع پرورش ماکیان در سال ۱۳۳۳ وجود دارد که بعنوان طاعون مرغی تشخیص داده شد (شیمی، احمد، مشاهدات شخصی). Aghakhan و همکاران در سال ۱۳۷۳ آنتی بادی علیه ۳ تحت تیپ مختلف آنفلوانزای پرندگان را در ماکیان ردیابی کردند. در خرداد ماه سال ۱۳۷۷ بیماری آنفلونزای پرندگان برای نخستین بار در مرغداری‌های اطراف تهران و قزوین بصورت بیماری ناشناخته خود را نشان داد و در همان سال توسط محققین دانشکده دامپزشکی و موسسه واکسن و سرم سازی رازی مورد تأیید قرار گرفت و بر اساس آزمون‌های استاندارد تعیین حدت، این ویروس جزء ویروس‌های غیر پاتوژن قرار گرفت (۱۲). نخستین بار در کشور تحت تیپ H5N1 ویروس آنفلوانزای پرندگان در بهمن ماه ۱۳۸۴ (۱۴ فوریه ۲۰۰۶) که سبب مرگ ۱۳۵ قو در بندر انزلی شد، مورد تائید قرار گرفت. در دی ماه ۱۳۸۶ نیز دومین گزارش بصورت رسمی توسط سازمان دامپزشکی کشور اعلام گشت. مکان این تایید، روستای درزی نقیب در بابلسر بوده که از ۴۸۹ مرغ

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۵۰-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: vkarimi@ut.ac.ir

بومی ۱۴ قطعه در اثر بیماری تلف گردیده و در مورد بقیه سیاست معدوم سازی اجرا گردید(۱۶). تا به حال ویروس آنفلوانزای پرندگان از ۹۰ گونه پرنده متعلق به ۱۳ راسته مختلف جدا شده است. پرندگان وحشی از مهمترین مخازن ویروس آنفلوانزای پرندگان بشمار می‌روند. دو راسته اردک سانان و آبچلیک سانان مهمترین نقش را در همه گیرشناسی ویروس آنفلوانزای پرندگان برعهده دارند. ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان به طور انتخابی سلول‌های پوششی دستگاه گوارش پرندگان را عفونی ساخته و به مقادیر زیاد از طریق مدفوع دفع می‌شوند. انتقال آلودگی بین پرندگان اساساً از طریق مدفوعی ـ دهانی است. از آن جایی که اردک‌ها، معمولاً علائم بالینی مشخص مانند مرگ و میر و کاهش وزن بدن را در هنگام عفونت با ویروس آنفلوانزا نشان نمی‌دهند، بنابراین به عنوان یکی از مخازن بالقوه ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان به شمار می‌آیند. اردک‌ها در ایجاد تحت تیپ‌های جدید ویروس آنفلوانزای پرندگان نقش مهمی بازی می‌کنند(۸). با توجه به اهمیت نقش اردک در بروز سویه‌های بسیار بیماریزا و موارد همه گیرشناسی ذکر شده، هدف از این مطالعه پایش مولکولی تحت تیپ‌های ژنوم ویروس آنفلوانزای پرندگان از اردک‌های اهلی با استفاده از روش RT-PCR در استان گیلان در سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ می‌باشد.

مواد و روش کار

۱- محل وروش نمونه گیری: منطقه جغرافیایی مورد بررسی شامل مناطق روستایی از اطراف شهرستان‌های فومن، شفت و یک مزرعه پرورش اردک در حسین کوه واقع در نزدیکی شهر ماسوله بود. گونه‌های اردک‌های مورد نمونه‌گیری شامل اردک‌های مالارد یا سرسبز (Mallard, Anas Platyrhynchos) نر و ماده و تعداد کمتری اردک‌های پکین (Pekin, Anas Platyrhynchos F.dom) بودند. تعداد ۵۵۰ عدد سواب کلواک از اردک‌های اهلی اخذ و سپس سواب‌ها درداخل محلول PBS منتقل گردیدند. هر ۵ سواب با هم در داخل یک لوله یکی شدند. سوآب‌ها پس از استفاده در داخل یک کیسه پلاستیکی قرار گرفتند و لوله‌ها نیز در مجاورت یخ قرار داده شدند (۲).

۲- استخراج RNA ویروسی: برای استخراج RNA ویروسی از کیت High pure viral RNA Kit (Roche, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت و با رعایت نکات بهداشتی و زیست محیطی انجام پذیرفت (۱۸).

۳- آزمایش نسخه‌برداری معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (RT-PCR): برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت ردیابی تیپ A و سه تحت تیپ H5، H7 و H9 ابتدا از واکنش دوگانه (Duplex) برای شناسایی تیپ A و تحت تیپ H5 استفاده شد. به علت هم پوشانی قطعه حاصل از تیپ A و تحت تیپ H7، این تحت تیپ به صورت جداگانه بررسی گردید. آزمایش نسخه‌برداری معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با کیت یک مرحله‌ای "Titan one tube RT-PCR system" (Roche, Germany) (شماره محصول ۱۱۷۸۵۸۳۴۰۰۱) انجام پذیرفت. در این کیت آنزیم AMV نسخه برداری معکوس برای ساخت اولین رشته cDNA، و مخلوط آنزیم‌های Taq DNA polymerase و Tgo DNA polymerase برای تکثیر cDNA در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز بکار گرفته شده است. مخلوط دو آنزیم اخیر علاوه بر واجد بودن بازدهی تولید بالا قدرت اصلاح خوانش در هنگام تولید محصول PCR را دارا می‌باشند. غلظت نهایی هر یک از مواد برای هر واکنش زنجیره پلی مراز نسخه برداری معکوس (RT-PCR) شامل: $MgCl_2$، ۱/۵mmol، مخلوط dNTPs، T۱۰mmol هر یک از پرایمرها (۱۰ pM/µl)، ۰/۴µmol، DTT ۱۰mmol و ۵ الی ۱۰ واحد ممانعت کننده از RNase مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است(۲). برنامه حرارتی شامل حرارت‌های اتصال (Annealing)، جداشدن (Denaturation) و تکثیر (Elongation) در جدول ۲ اشاره شده است. سپس محصول واکنش در ژل آگاروز ۲٪ مورد بررسی قرار گرفت. جهت کنترل مثبت واکنش از ژنوم استاندارد که توسط OIE در اختیار سازمان دامپزشکی قرار گرفت، استفاده شد(۲،۱۸).

نتایج

در RT-PCR نمونه‌های اخذ شده، برای تعیین تیپ A و تحت تیپ H5 و H7، همه ۵۵۰ نمونه از لحاظ وجود ویروس آنفلوانزای پرندگان منفی بودند. در تصویر ۳ و ۴، موارد مثبت مشاهده شده بر روی ژل، مربوط به کنترل‌های مثبت استخراج و RT-PCR می‌باشد که نشان دهنده بهینه بودن واکنش می‌باشد.

بحث

در بررسی‌های انجام شده توسط محققین، تحت تیپ‌های مختلفی از اردک‌ها جدا گردیده است. بررسی‌های شجره شناسی بر روی تحت تیپ‌های جدا شده از اردک‌ها، نشان داده است که اکثر این ویروس‌ها متعلق به دودمان ویروس‌های در حال گردش بین ماکیان می‌باشند. بنابراین اردک‌ها از عوامل مهم در همه گیر شناسی بیماری آنفلوانزا به شمار می‌روند. تمامی تحت تیپ‌های ویروس‌های آنفلوآنزا در اردک سانان وجود دارد(۱). در ایران مطالعاتی در زمینه بررسی آنفلوانزای پرندگان در پرندگان آبزی صورت گرفته است. Fereidouni و همکاران در سال ۲۰۰۷، برای مطالعه ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در پرندگان آبزی وحشی در ایران، از ۱۱۴۶ پرنده وحشی آبزی از ۴۵ گونه متفاوت (۱۱ خانواده) از مناطق زمستان گذرانی پرندگان آبزی شش استان آذربایجان غربی، فارس، گیلان، خوزستان، مازندران و تهران که اکثریت آنها اردک‌ها و پرندگان ساحلی بودند، جهت تشخیص بیماری آنفلوانزای پرندگان نمونه گیری انجام دادند. ۳٪ از پرندگان مورد بررسی، مثبت بودند. بیشترین

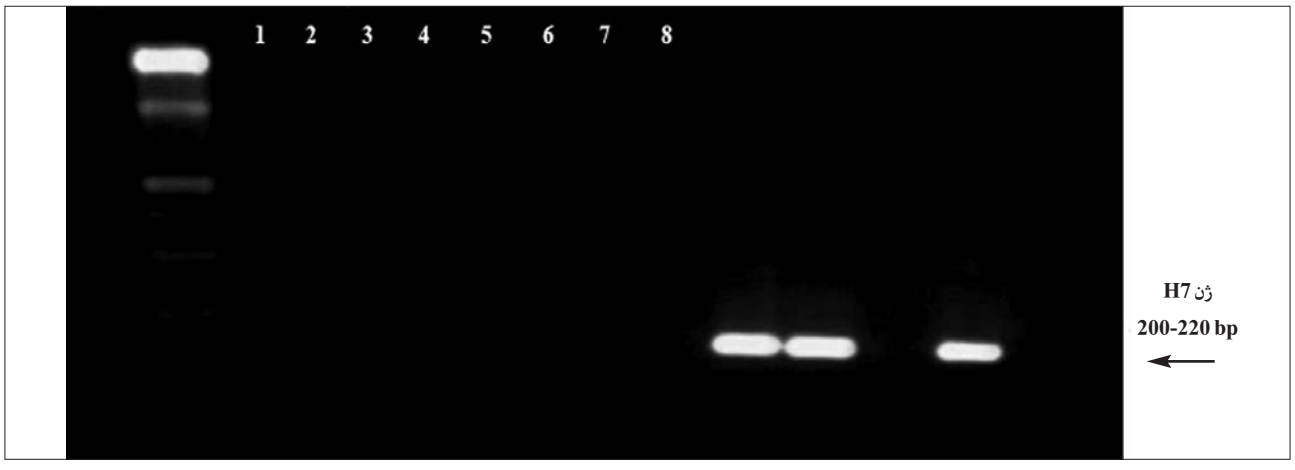
جدول ۱- توالی پرایمر های مورد استفاده جهت تشخیص مولکولی ویروس آنفلوانزای پرندگان.

طول محصول	ژن	توالی '3-'5	پرایمر	هدف
۲۴۴ bp	ماتریکس	'۳- CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG -'۵	M52	تیپ A
		'۳5'-AGG GCA TTT TGG ACA AAK CGT CTA-	M25	
۲۰۰-۲۲۰bp	هماگلوتینین	5'-ATG TCC GAG ATA TGT TAA GCA-3'	GK 7.3	تحت تیپ H7
		5'-TTT GTA ATC TGC AGC AGT TC-3'	GK 7.4	
۱۵۷bp	هماگلوتینین	5'-TTA TTC AAC AGT GGC GAG-3'	H5	تحت تیپ H5
		5'-CCA KAA AGA TAG ACC AGC-3'	H5NE	

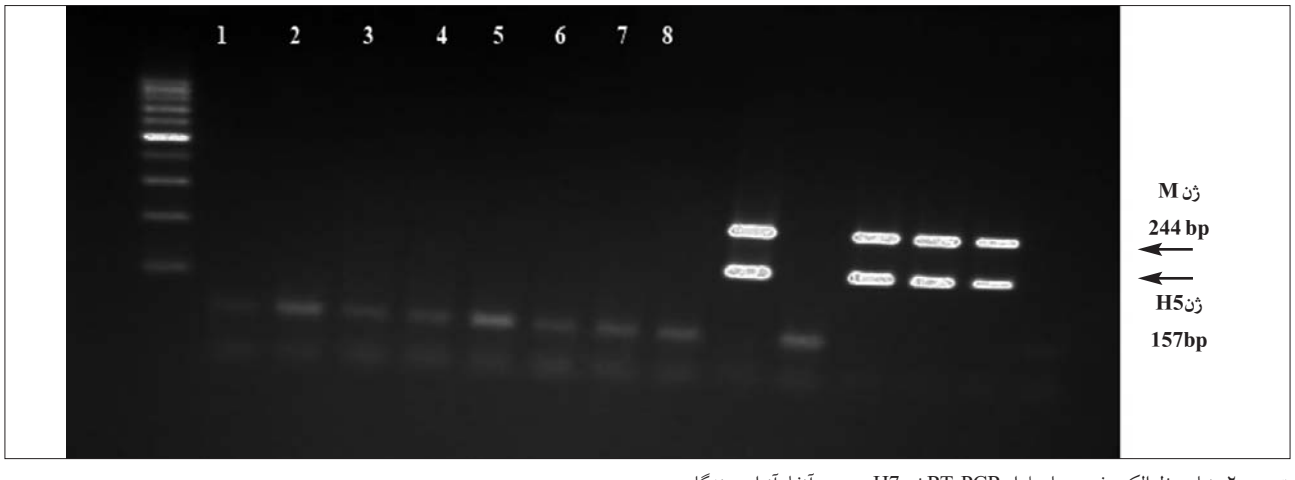
جدول ۲- برنامه دستگاه ترموسایکلر برای تشخیص تیپ A و تحت تیپ‌های H5 و H7 ویروس آنفلوانزای پرندگان.

شماره و نام سیکل	دما(^{o}C)	زمان
رونوشت برداری معکوس	۵۰	۳۰ دقیقه
واسرشت شدن اولیه	۹۵	۳ دقیقه
واسرشت شدن	۹۴	۴۵ ثانیه
اتصال	۵۰	۴۵ ثانیه
تکثیر	۷۲	۲دقیقه
۳۵ مرتبه تکرار سیکل‌های ۳ و ۴ و ۵		
تکثیر نهایی	۷۲	۱۰دقیقه
توقف	۴	۱۰دقیقه

موارد مثبت جدا شده مربوط به اردک‌های Dabbling، شامل اردک‌های Mallard با تعداد ۱۵ اردک و ۸/۳٪ مثبت، اردک‌های Common Teal با تعداد ۹ اردک و ۲/۵٪ مثبت و اردک‌های Northern Shoveler با تعداد ۲ اردک بودند. غاز Greylag و اردک‌های Garganey، Northern pintail، Common pochard و Tufted نیز منجر به نتایج مثبت گردیدند. بیشترین نمونه‌های اخذ شده و بیشترین تعداد موارد مثبت مربوط به خانواده اردک سانان بود. تمامی تحت تیپ‌های مشخص شده در این مطالعه از نوع کم بیماریزا بودند. این مطالعه، اطلاعات مهمی در مورد شیوع ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان، با بیماریزایی کم در ایران و به ویژه مناطق آبی اطراف دریای مازندران که محل اقامت پرندگان مهاجر است، فراهم نمود. Hadipour و همکاران در سال ۲۰۱۱، برای پایش تحت تیپ H9N2 آنفلوانزای پرندگان، با بیماریزایی کم در اردک‌های لجن خوار، با نمونه‌گیری از ۴۰۰ پرنده در ۴ منطقه مختلف (شمال، جنوب، شرق و غرب) ایران و ارزیابی نمونه‌ها، به این نتیجه رسیدند که در سرم آن‌ها آنتی بادی علیه تحت تیپ H9N2 وجود داشت و علیرغم تیترهای بالای آنتی بادی، این اردک‌ها هیچ گونه علایم بالینی نشان نمی‌دادند (۶). Kokan و همکاران در سال ۱۹۷۷، با بررسی ۳۵۶ اردک مهاجر در اکلاهما، تحت تیپ‌های H1N1 را از اردک‌های Mallard، H6N2 از اردک‌های Wigeon American و H1N2 را از اردک‌های Green Winged Teal، جدا نمودند. وجود تیترهای بالای ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در مدفوع اردک‌ها و جداسازی ویروس‌ها از آب دریاچه نشان دهنده اینست که این ویروس‌ها در طبیعت، می‌توانند از طریق آب آلوده شده با مدفوع به سایر پرندگان منتقل گردند(۱۰). Hanson و همکاران در سال ۲۰۰۲، برای بررسی ویروس‌های آنفلوانزا و پارامیکسو ویروس‌ها در زمستان در اردک‌های ساکن در تگزاس با نمونه‌گیری از ۲۵۸ اردک، تحت تیپ‌های مختلفی را جدا نمودند (۷). Runstadler و همکاران در سال ۲۰۰۵، برای تعیین شیوع ویروس آنفلوانزای پرندگان در اردک‌های آلاسکا، تعداد ۵۰۰ جفت نمونه از اردک‌های Northern pintail، Mallard، Green wing Teal و Widgeon تهیه کردند. از ۷۳۸ اردک Pintail، ۵/۹٪، از ۱۲۱ اردک Mallard ۳۷/۲٪، از ۱۹ اردک Green wing Teal، ۵/۹٪ و از ۲ اردک Widgeon یکی مثبت شدند(۱۵). Gilbert و همکاران در سال ۲۰۰۵ در تایلند، با تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده خود نشان دادند که اردک‌های آزاد در زمستان، نقش حیاتی در همه‌گیر شناسی بیماری، هم در زمینه پیدایش و هم گسترش آنفلوانزای پرندگان با بیماریزایی بالا بازی می‌کنند. نتایج این مطالعه تأیید نمود که بین تعداد اردک‌های آزاد و تعداد ماه‌هایی که در آن، دومین برداشت محصول برنج انجام میشود ارتباط تنگاتنگی وجود دارد. تعداد دفعات کاشت محصول برنج در هر سال، ارتباط قوی با تراکم اردک‌های آزاد چرو بنابراین حضور ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان بسیار بیماریزا، طی موج اپیدمیک ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ دارد. به این معنا که در مناطقی که تعداد دفعات کاشت دو و سه بار بوده، تراکم اردک‌ها بیشتر بوده است. در طی فصول خشک، زمین‌های مرطوب آبیاری شده مانند زمین‌های کاشت برنج، محل سکونت مهمی برای پرندگان وحشی آبزی به وجود آورده، بنابراین افزایش فرصت انتقال ویروس به و یا از پرندگان محلی ایجاد میگردد. در ویتنام و اندونزی نیز، مطالعات اولیه، ارتباط بین تراکم اردک‌ها در زمین‌های کشاورزی و ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان بسیار بیماریزا را اثبات نمود که مورد با توجه به شباهت اکولوژی محیط ذکر شده با استان گیلان قابل بررسی است(۵). Busquets و همکاران در سال ۲۰۰۶، با جمع آوری ۵۲۵۶ نمونه از ۱۴ کشور اروپای شرقی، خاورمیانه و آفریقا، ۳/۳٪ نمونه‌ها را از نظر وجود ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A، مثبت اعلام نمودند(۶). Terregino و همکاران در سال ۲۰۰۶، با نمونه گیری، از ۱۶۴ گله خانگی و ۴۰۸۳ پرنده وحشی در سه منطقه در شمال ایتالیا، موفق به جداسازی ۲۷ ویروس با بیماریزایی ملایم از گله‌های خانگی و ۴۹ جدایه از پرندگان وحشی گردیدند. از بین این جدایه‌ها، ۲۶ جدایه متعلق به تحت



تصویر ۱- نتایج ژل الکتروفورز حاصل از RT-PCR ژن‌های M و H5 ویروس آنفلوانزای پرندگان.



تصویر ۲- نتایج ژل الکتروفورز حاصل از RT-PCR ژن H7 ویروس آنفلوآنزای پرندگان.

تیپ‌های H5 یا H7 و مرتبط با سویه‌های بیماریزایی ملایم معاصر از دودمان آسیایی- اروپایی بودند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که گله‌های خانگی در معرض خطر دریافت ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان هستند و تایید می‌کند که پرندگان آبزی وحشی درعرضه و ماندگار کردن (سازی) ویروس در طبیعت در فصل زمستان در جنوب اروپا نقش دارند(۱۷). Pfeiffer و همکاران در سال ۲۰۰۵ با شناسایی بیولوژیکی و شجره شناسی ویروس‌های آنفلوانزای فوق حاد پرندگان در مرغ‌ها و اردک‌ها در ویتنام اعلام کردند که در مقایسه با قبل بیماریزایی این ویروس‌ها در اردک افزایش یافته که مرتبط با تزاید ویروسی و افزایش تمایل بافتی است که با گزارشات OIE در ۲۰۰۸ نیز منطبق می‌باشد(۱۴). Lee و همکاران در سال ۲۰۰۷ با جداکردن ویروس تحت تیپ H5N1 (A/DUCK /China/E319-2/03) از یک اردک قاچاق از جزیره کینمن در تایوان وآنالیز شجره شناسی آن دریافتند که این ویروس شباهت زیادی به ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان H5N1 درحال چرخش درآسیا طی سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ دارد. این مطالعه نشان می‌دهد که اردک‌های آلوده شده با H5N1 بسیار بیماریزا که هیچ علایمی از بیماری نشان نمی‌دهند، می‌توانند به صورت خاموش، ویروس را حمل کنند و قاچاق پرنده یک خطر جدی برای انتقال ویروس آنفلوانزای پرندگان H5N1 به شمار می‌رود (۱۱). در بررسی Kang و همکاران در سال ۲۰۰۷، تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع از ۲۰ مزرعه‌ی پرورش اردک‌های اهلی درکره جمع آوری گردید. بدین ترتیب که تحت تیپ‌های H3N2 و H3N6 شناسایی شدند. ژن‌های نوکلئوپروتئین دو سویه نشان داد که بازآرایی ژنتیکی، بین ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان می‌تواند در اردک‌های محلی اتفاق افتاده باشد(۹). Couacy-Hymann و همکاران در سال ۲۰۰۶ با بررسی ۲۱۲۵ نمونه اخذ شده از پرندگان وحشی و اهلی در سواحل آیوری در بینگرویل، به منظور ردیابی تیپ A و تحت تیپ‌های بسیار بیماریزا، ۱۶ نمونه ی مثبت تیپ A ردیابی نمودند که از بین آنها ۱۲ نمونه، تحت تیپ H5N1 بودند. ۱۶ نمونه‌ی مثبت تیپ A که از لحاظ وجود تحت تیپ H5N1 منفی بودند، دارای تحت تیپ H7 نیز نبودند(۳). Pannwitz و همکاران در سال ۲۰۰۷ با جمع آوری ۱۹۹۱ نمونه‌ی مدفوع از اردک‌ها، قوها و غازهای مناطق ساحلی شمالی آلمان، جهت ردیابی حضور ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان، به این نتیجه رسیدند که تمامی ۶۵۹ نمونه مربوط به اردک‌ها از لحاظ وجود ویروس منفی بودند و تنها

۰/۹٪ نمونه مربوط به غاز و قوها مثبت بودند(۱۳). سه هدف مختلف در کنترل آنفلوانزای پرندگان وجود دارد: ۱) آموزش، ۲) مدیریت و ۳) ریشه کنی. این نتایج براساس استراتژیهای حاصل از ترکیب پنج جزء اختصاصی به دست می‌آید. ۱) آموزش، ۲) امنیت زیستی، ۳) تشخیص و پایش، ۴) حذف پرندگان آلوده و ۵) کاهش ابتلاپذیری میزبان. چگونگی تأثیر هر استراتژی در کنترل آنفلوانزای پرندگان، بستگی به این دارد که چه تعداد از پنج جزء ذکر شده استفاده می‌شوند و چگونه کاملاً در سطح مزرعه به کار بسته می‌شوند. اهداف استراتژی‌های کنترل آنفلوانزای کم بیماریزای پرندگان و آنفلوانزای بسیار بیماریزای پرندگان، ممکن است بسته به کشور، تحت تیپ ویروس، وضعیت اقتصادی و خطر سلامت عمومی متفاوت باشند. هیچ استراتژی یکسانی برای کنترل آنفلوانزای پرندگان وجود ندارد. در بیشتر کشورهای پیشرفته درگیری‌های آنفلوانزای کم بیماریزای پرندگان در مدت شش ماه تا یکسال، به وسیله برنامه‌های درست ریشه کن شده است، اما در برخی از کشورهای در حال توسعه عدم پرداخت غرامت، زیربنای ضعیف دامپزشکی و مقادیر بالای پرورش و تولید پرندگان در روستا، ریشه کنی سریع را غیرقابل دست یافت نموده است. در این موارد، مدیریت بیماری برای کاهش میزان عفونت، عملی واقع گرایانه می‌باشد. همانطور که ذکر گردید بیشتر بررسی‌های انجام شده، در اردک‌های ساکن در مناطق ساحلی و تالاب‌ها صورت گرفته که در این مناطق، اردک‌ها با پرندگان آبزی مهاجر که مسیرهای پرواز را طی کرده و در این مناطق بر روی زمین می‌نشینند، درتماس هستند. بنابراین تماس اردک‌ها با مدفوع پرندگان و یا آب آلوده به مدفوع آن‌ها، باعث انتقال ویروس به اردک‌ها می‌گردد. کشور ایران نیز در مسیر پرواز پرندگان وحشی مهاجر قرار دارد. در بررسی انجام شده در این تحقیق، عدم وجود ویروس آنفلوانزای پرندگان در اردک‌های اهلی استان گیلان می‌تواند به چند علت باشد. با توجه به سابقه بروز درگیری با تحت تیپ H5N1 بسیار بیماریزا در استان گیلان (مرگ ۱۳۵ قو در بندر انزلی در بهمن ماه ۱۳۸۴) (۱۶) و با توجه به مخزن بودن اردک‌ها اعم از اهلی و وحشی، برای جلوگیری از وقوع مجدد درگیری با ویروس‌های آنفلوانزای بسیار بیماریزا و گسترش آن به سایر پرندگان و به علت مصرف غذایی گوشت و تخم اردک‌ها که در ارتباط مستقیم با سلامتی انسان است، سازمان دامپزشکی اقدام به اجرای طرح‌های پایش قویتر بیماری نموده است و پس از درگیری با ویروس‌های H5N1 بسیار بیماریزا، اقدام به معدوم سازی پرندگان در مناطق مشکوک وکاهش جمعیت آن‌ها نموده است. در نتیجه نظارت دقیق و پایش، منجر به کاهش آلودگی با ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان گردیده است. همچنین پرداخت غرامت به پرورش دهندگان، باعث ایجاد انگیزه جهت گزارش مورد یا موارد مشکوک شده و متعاقباً از گسترش بیشتر بیماری جلوگیری می‌نماید. در مزرعه پرورش اردک مورد نمونه‌گیری در اطراف شهرستان فومن، مسائل مربوط به امنیت زیستی، مانند نگهداری اردک‌ها در داخل سالن، نگهداری دان و غذای اردک‌ها در انبار و جلوگیری از دسترسی پرندگان وحشی به آن‌ها، وجود حصار در اطراف مزرعه و جلوگیری از تماس اردک‌ها با پرندگان دیگر، مورد توجه قرار گرفته بود. در پایان پیشنهاد می‌شود برای جلوگیری از همه‌گیری آنفلوآنزای پرندگان، به ویژه ویروس‌های بسیار بیماریزا، لازم است که پایش مستمر بیماری در پرندگانی که به عنوان مخزن بیماری هستند، انجام شود. برای اجرای برنامه پایش مناسب و دقیق، لازم است که همکاری‌های بیشتری بین نهادهای مرتبط و سازمان دامپزشکی کشور صورت گیرد. همچنین پایش بیماری در تمامی مناطق جغرافیایی انجام شده و فواصل بین مکان‌های نمونه‌گیری و تعداد نمونه‌های مورد نیاز، توسط محاسبات آماری دقیق محاسبه گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس طرح مصوب دانشگاه تهران انجام گرفته است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از توجهات و مساعدت‌های معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و سازمان دامپزشکی کشور و همکاران محترم مرکز تشخیص سازمان دامپزشکی کشور کمال تشکر و قدردانی را بنمایند.

References

1. Busquets, N., Alba, A., Napp, S., Sanchez, A., Serrano, E., Rivas, R., et al. (2006) Influenza A virus subtypes in wild birds in North-Eastern Spain (Catalonia). Virus Res. 149: 10-18.
2. Capua, I., Alexander, D.J. (2009) Avian Influenza and Newcastle Disease: a field and laboratory manual, Springer Verlag. Berlin, Germany.
3. Couacy-Hymann, E., Danho, T., Keita, D., Bodjo, S.C., Kouakou, C., Koffi, Y.M., et al. (2009) The first specific detection of a highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in Ivory Coast. Zoonoses Public Health. 56:10-15.
4. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (2007) Fields virology, (5th ed.) Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA.
5. Gilbert, M., Xiao, X., Chaitaweesub, P., Kalpravidh, W., Premashthira, S., Boles, S., et al. (2007) Avian

influenza, domestic ducks and rice agriculture in Thailand. Agric Ecosyst Environ. 119:409-415.

6. Hadipour, M.M., Hadipourfard, M.R., Shayanpour, N., Fakhrabadipour, M., Azad, F. (2011) Surveillance of Scavenging Ducks for Low-Pathogenicity (H9N2) Avian Influenza Virus. J. Anim. Vet. Adv. 10:1543-1545.
7. Hanson, B.A., Swayne, D.E., Senne, D.A., Lobpries, D.S., Hurst, J., Stallknecht, D.E. (2005) Avian influenza viruses and paramyxoviruses in wintering and resident ducks in Texas. J. Wildl Dis. 41:624-628.
8. Jordan, F.T.W., Pattison, M. (2001) Poultry diseases (5th ed). Elsevier Health Sciences press, Philadelphia, USA.
9. Kang, S.J., Kim, H.M., Kim, Y.H., Hwang, S.D., Shin, J.S., Ku, K.B., et al. (2009) Phylogenic analysis of reassorted avian influenza viruses isolated from Korean domestic ducks from 2005 to 2007. Virus Genes. 38: 80-84.
10. Kocan, A.A., Hinshaw, V.S., Daubney, G.A. (1980) Influenza A viruses isolated from migrating ducks in Oklahoma. J. Wildl Dis. 16: 281-285.
11. Lee, M.S., Deng, M.C., Lin, Y.J., Chang, C.Y., Shieh, H.K., Shiau, J.Z., et al. (2007) Characterization of an H5N1 avian influenza virus from Taiwan. Vet Microbiol. 124: 193-201.
12. Nili, H., Asasi, K. (2003) Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. Avian Dis. 47: 828-831.
13. Pannwitz, G., Wolf, C., Harder, T. (2009) Active surveillance for avian influenza virus infection in wild birds by analysis of avian fecal samples from the environment. J. Wildl Dis. 45: 512-518.
14. Pfeiffer, J., Pantin-Jackwood, M., To, T.L., Nguyen, T., Suarez, D.L. (2009) Phylogenetic and biological characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses (Vietnam 2005) in chickens and ducks. Virus Res. 142: 108-120.
15. Runstadler, J.A., Happ, G.M., Slemons, R.D., Sheng, Z.M., Gundlach, N., Petrula, M., et al. (2007) Using RRT-PCR analysis and virus isolation to determine the prevalence of avian influenza virus infections in ducks at Minto Flats State Game Refuge, Alaska, during August 2005. Arch Virol. 152: 1901-1910.
16. Shoushtari, A., Hablolvarid, M.H., Vascellari, M., Hedayati, A. (2008) Mortality of wild swans associated with naturally infection with highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in Iran. Arch. Razi. 62: 207-213.
17. Terregino, C., De Nardi, R., Guberti, V., Scremin, M., Raffini, E., Martin, A.M., et al. (2007) Active surveillance for avian influenza viruses in wild birds and backyard flocks in Northern Italy during 2004 to 2006. Avian Pathol. 36: 337-344.
18. Webster, R.G., Krauss, S., World Health, O., Programme, G.I. (2002) WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, World Health Organization, Dept of Communicable Disease Surveillance and Response. WHO publication. Geneva, Switzerland. p. 55-56.

J.Vet.Res. 67,4:345-351,2012

Molecular surveillance of avian influenza virus in domestic ducks: A provincial study

Poursafar, F.[1], Karimi, V.[1*], Charkhkar, S.[2], Ghalyanchi Langeroudi, A.[3], Maghsoudlou, H.[2]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[2]*Laboratory Diagnosis Center, Iranian Veterinary Organization, Tehran-Iran.*

[3]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

(Received 30 January 2012 , Accepted 16 May 2012)

Abstract:

BACKGROUND: In the first time, avian Influenza (AI) infection, subtype H9N2, was isolated from chicken in 1988 in Qazvin province and since then has become endemic in Iran. Waterfowls, such as wild ducks, are natural reservoirs for all types of influenza A viruses and cause virus circulation in environment and poultry population. In 2006, Iranian Veterinary Organization confirmed that 135 dead swans in Gilan province were positive for H5N1 avian influenza virus. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to determine the role of domestic ducks in avian influenza virus circulation (subtypes: H5,H7 and H9) in Gilan province during 2010-2011 through molecular surveillance techniques. **METHODES:** 550 cloacal swabs from Mallard and Pekin ducks were tested in rural areas of Shaft and Fouman cities. Meanwhile a breeding farm in Gilan was tested by RT-PCR assay for detection of AI virus subtypes (H5,H7 and H9) according to OIE protocols. **RESULTS:** We did not detect AI viral RNA in 550 samples which were tested for type A and subtypes H5 and H7. **CONCLUSIONS:** While waterfowls could have a crucial role in emergence of new influenza virus strains, no AI viral RNA mentioned subtypes was detected for the mentioned subtypes. These findings could be due to restrict control programs following 2006 AI outbreak in the mentioned region. However, surveillance programs for monitoring AI viruses need to be continuously performed.

Key words: avian influenza, domestic duck, Iran, RT-PCR.

Figure Legends and Tabel Captions

Table 1. primer sequences for molecular diagnosis of avian influenza virus.

Table 2. Thermocycler program for diagnosis of type A and subtypes H5 and H7 avian influenza virus.

Figure 1. Gel electrophoresis results of M and H7 genes RT-PCR of avian influenza virus.

Figure 2. Gel electrophoresis results of H7 gene RT-PCR of avian influenza virus.

***Corresponding author's email: vkarimi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117150, Fax: 021- 66933222**