

پایش مولکولی گاما کرونایروس پرندگان در کبوترسانان استان تهران

آرش قلیان چی لنگرودی^{۱*} و وحید کریمی^۲ محمدرضا عبدی حاجی^۱ مهدی وصفی مرنندی^۱ مسعودهاشم زاده^۳ حسین مقصودلو^۴ علی مدحی^۱

(۱) گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(۲) گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(۳) موسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

(۴) سازمان دامپزشکی ایران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۲۷ آبان ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۹ بهمن ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: کرونایروس‌ها طیف گسترده‌ای از بیماری‌های تنفسی، رودهای، کبدی، عصبی با حادتهای مختلف در گربه، سگ، خوک، جوندگان، گاو، پرندگان و انسان ایجاد می‌کنند. توانایی بالای کرونایروس‌ها در جهش و نوترکیبی به آن‌ها این امکان را می‌دهد که در میزبان‌های مختلف و شرایط اقلیمی متفاوت، فعال باشند. با توجه به احتمال وجود گاما کرونایروس در جمعیت پرندگان کشور از جمله کبوتران و همچنین عدم وجود اطلاعات کافی در این مورد، انجام مطالعه‌ای به منظور جداسازی و شناخت خصوصیات مولکولی کرونایروس کبوترها ضروری به نظر می‌رسید. هدف از این مطالعه ردیابی مولکولی کرونایروس پرندگان در جمعیت کبوتران استان تهران بود. روش کار: از ۲۵ گله‌های کبوتر تعداد ۲۵۰ سواب نای و ۲۵۰ سواب کلوآک، ۲۰ نمونه از هر گله در سال ۱۳۹۳ در محدوده استان تهران به صورت تصادفی به منظور ردیابی گاما کرونایروس جمع آوری گردید. پس از استخراج RNA، ردیابی ویروس با استفاده از پرایمرهای ژن‌های نوکلئوکپسید (N) و ناحیه غیر قابل ترجمه ناحیه ۳ (UTR₃) و با استفاده از کیت One-step RT-PCR شرکت کبازن انجام گرفت. نتایج: نمونه نایی در یک گله کبوتر از ۲۵ گله مورد مطالعه (۴٪) مثبت گردید. نتیجه گیری نهایی: نتایج این مطالعه حضور گاما کرونایروس در جمعیت کبوتران ایران را اثبات و قسمتی از نقشه اپیدمیولوژی این ویروس را تکمیل نمود. همچنین با توجه به میزان پایین شیوع عفونت گاما کرونایروس در کبوتر، پیشنهاد می‌شود نمونه‌گیری از کبوترهایی که دارای علائم بالینی از جمله علائم تنفسی و گوارشی هستند و همچنین از کبوترهایی که در تماس با سایر گونه‌های پرندگان و یا نزدیک به مرغداری‌ها می‌باشند، صورت بگیرد.

واژه‌های کلیدی: گاما کرونایروس، کبوتر، ایران، تشخیص مولکولی، اپیدمیولوژی

مقدمه

مولکولی آن‌ها مورد هدف قرار گیرد. یکی از نواحی نسبتاً حفاظت شده RNA پلی مرز وابسته به RNA در ژن ORF ۱b، ژن‌های نوکلئوکپسید (N) و ناحیه غیر قابل ترجمه ناحیه ۳ (UTR₃) است. با توجه به احتمال وجود گاما کرونایروس در جمعیت پرندگان کشور از جمله جمعیت کبوتران و همچنین حضور آن‌ها در مرغداری‌های صنعتی و همچنین عدم وجود اطلاعات کافی در این مورد، انجام مطالعه‌ای به منظور ردیابی خصوصیات مولکولی کرونایروس از کبوترها ضروری به نظر می‌رسید.

مواد و روش کار

نمونه گیری: تعداد ۲۵۰ عدد سواب نایی و ۲۵۰ سواب کلوآکی به تعداد مساوی از ۲۵ گله‌ی مختلف کبوتر در سال ۱۳۹۳ به صورت تصادفی در محدوده استان تهران طی مدت زمان ۶ ماه جهت جداسازی ویروس جمع آوری گردید. نمونه‌ها از نژادهای مختلف کبوتر اهلی تهیه شد. سپس سواب‌ها به ظروف نگهداری پلاستیکی استریل انتقال داده شد. نمونه‌های ذکر شده بلافاصله در یخچال یا فریزر بر حسب شرایط نمونه‌گیری و سپس به صورت زنجیره‌ی سرد به آزمایشگاه ویروس شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل گردید. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰°C - نگهداری گردید.

خانواده کرونایرید در چهار جنس آلفا، بتا، گاما و دلتا طبقه بندی شده و جنس گاما کرونایروس شامل ویروس برونشیت عفونی، کرونایروس بوقلمون، کرونایروس قرقاول، کرونایروس جدا شده از چند گونه پرند و وحشی و نهنگ بلوگا و پلنگ آسیایی است (۲). هر چند اخیراً مشخص شده که برخی از جدایه‌های کرونایروس پرندگان جزء دلتا کرونایروس‌ها هستند (۱۱). ژنوم ویروس برونشیت عفونی طیور، RNA تک رشته‌ای سنس مثبت است که حدود ۲۸-۲۷/۵ kb طول دارد. ژنوم در انتهای ۵' دارای کلاهک و در انتهای ۳' واجد دم پلی آدنین و ساختار ویروس شامل اسپایک‌های گریزی شکل (S)، پوشینه (E)، غشاء (M) و نوکلئوکپسید (N) است (۱). شواهدی از وجود عفونت گاما کرونایروس در انواع پرندگان وحشی در اروپا، چین و دیگر مناطق آسیا دیده شده و همچنین احتمال داده می‌شود که پرندگان وحشی مخزن طبیعی این ویروس‌ها باشند. با توجه به ماهیت گاما کرونایروس‌ها، پرندگان وحشی می‌توانند یک میزبان بالقوه برای کرونایروس‌های بیماری‌زا در طیور تجاری و همچنین یک ظرف اختلاط ژنتیکی کرونایروس‌های مختلف برای رسیدن به توانایی عبور از سد بین گونه‌ای باشند (۲). با توجه به وجود مناطق کمتر حفاظت شده در ژنوم کرونا ویروس‌ها، نواحی محدودی از ژنوم می‌تواند جهت ردیابی



جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی گاما کروناویروس.

نام ژن	نام پرایمر	توالی	اندازه قطعه	منبع
UTR ^۳	۴۱ UTR	ATG TCT ATC GCC AGG GAAAT GTC	۲۶۶	(۹)
	UTR ^{۱۱}	GCTCTAACTCTATAC TAG CCTA		
N	N۱۰۳F	CCT GAT GGT AAT TTC CGT TGG G	۳۵۷	(۶)
	N۱۰۲R	ACG CCC ATC CTT AAT ACC TTC CTC		

را در نظر داشت که دامنه میزبانان کروناویروس‌ها بیش از چیزی است، که تصور می‌شود. سیستم‌های متراکم پرورش به معنای تماس بیش تر با عوامل بیماری‌زای سایر پرندگان و پستانداران است و این احتمال تماس با کروناویروس‌های سایر گونه‌ها را افزایش می‌دهد. در نتیجه باید نسبت به بیماری‌هایی که توسط کروناویروس‌های پرندگان ایجاد می‌شود، آگاه باشیم. Jonassen و همکاران در سال ۲۰۰۵ با بررسی در غازهای پا خاکستری (Anser anser)، کبوترانی وحشی کلمبیا (livia) و اردک وحشی (Aras platrhynchos) دریافتند که در غاز پا خاکستری ۴۰ عدد از ۱۶۳ نمونه گرفته شده از نظر حضور کرونا ویروس مثبت بود در حالی که ۲ عدد از ۱۰۰ نمونه گرفته شده از کبوتران و یک مورد از پنج نمونه گرفته شده از اردک وحشی مثبت بوده است و با تجزیه تحلیل شجره شناسی این جدی‌ها دریافتند که همه آن‌ها متعلق به گاما کرونا ویروس‌ها بوده‌اند. حضور ویروس در کبد و طحال کبوترانی که مثبت بودند، نشان می‌دهد که عفونت در این گونه، با یک مرحله ویرمی همراه است. ویروس در نمونه‌های سواپ نایی از کبوترها شناسایی شده اما از ریه کبوترها جدا نشده است. در کبوترهای آلوده شده با کروناویروس در کالبدگشایی ضایعه بزرگ شدن طحال یا دیگر یافته‌ی پاتولوژیک مهمی مشاهده نشده است. عدم تکثیر در تخم مرغ جنین دار نشان می‌دهد که کروناویروس‌های غاز و کبوتر در این تحقیق نمی‌توانند به آسانی جنین جوجه را آلوده کنند (۵).

Felippe و همکاران در طی سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۹ در برزیل با مطالعه بر روی تنوع ژنتیکی ویروس برونشیت عفونی جدا شده از گله‌های مرغ اهلی و کروناویروس‌های جدا شده از کبوترانی وحشی دریافتند که، تنها نمونه کبوتری این مطالعه متعلق به گروه گاما کرونا ویروس‌ها می‌باشد. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد زمانی که ویروس برونشیت عفونی پرندگان در تخم مرغ نطفه دار SPF پاساژ داده می‌شود دارای علائم کوتاهی قد یا پیچش در انگشتان پا است. تمام ویروس‌های جدا شده از کبوتر باعث آسیب‌های مشابه در تخم مرغ SPF می‌شوند. بیشتر کروناویروس‌های جدا شده از پرندگان سالم دارای ژن کد کننده ی پروتئین اسپایک با شباهت نزدیک به ۱۰۰٪ با ویروس برونشیت عفونی بوده است و می‌توان حدس زد که کبوتر به همراه دیگر پرندگان وحشی می‌تواند در ایجاد اکو اپیدمیولوژی ویروس برونشیت عفونی پرندگان شرکت کند. این گونه پرندگان می‌توانند یک دامنه میزبانی وسیعی را ایجاد کنند که ویروس می‌تواند در آن‌ها تکامل یابد و همچنین به عنوان یک مخزن برای نوترکیبی بین نوع وحشی کروناویروس و واکسن برونشیت عفونی پرندگان تلقی می‌شوند (۳).

جدول ۲. جدول دمایی و زمانی مناسب جهت ردیابی گاما کروناویروس استفاده از کیت One Step RT-PCR شرکت کیاژن.

شماره و نام سیکل	دما (°C)	زمان
۱- رونوشت برداری معکوس	۵۰	۳۰ دقیقه
۲- اسرشت شدن اولیه	۹۵	۱۵ دقیقه
۳- اسرشت شدن	۹۴	۴۵ ثانیه
۴- اتصال	۴۸	۴۵ ثانیه
۵- تکثیر	۶۸	۶۰ ثانیه
۳۵ مرتبه تکرار سیکل‌های ۳ و ۴ و ۵		
۶- تکثیر نهایی	۶۸	۸ دقیقه

استخراج RNA: بمنظور استخراج RNA از کیت استخراج CinnaPure (شرکت سینا کلون، ایران)، طبق دستورالعمل کیت استفاده گردید. لازم به ذکر است کنترل منفی در هر استخراج RNA مورد استفاده قرار می‌گرفت.

آزمون RT-PCR: برای ردیابی گاما کروناویروس‌ها از پرایمرهای ژن N و UTR (توالی پرایمرها در جدول شماره یک آورده شده است) استفاده شد. آزمون تشخیصی این مطالعه با استفاده از کیت یک مرحله‌ای One Step RT-PCR شرکت QIAGEN (کیاژن، آمریکا) استفاده شد. برنامه دمایی واکنش در جدول ۲ آورده شده است. محصولات PCR بر روی ژل دو درصد آگارز بررسی شدند.

نتایج

از ۲۵ گله مورد مطالعه، یک گله دارای نمونه مثبت در هر دو ژن نوکلئو کپسید (N) (۳۵۷ جفت باز) و ژن ناحیه غیر قابل ترجمه ناحیه ۳ (UTR^۳) (۲۶۶ جفت باز) بود و در نتیجه با توجه به حضور کنترل‌های مناسب، نشان دهنده حضور گاما کرونا ویروس‌ها در گله مورد بررسی بوده است.

بحث

کروناویروس‌ها عامل ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌های تنفسی، روده‌ای، کبدی و عصبی با حدت‌های مختلف در گربه، سگ، خوک، جوندگان، گاو و انسان می‌باشند. نوترکیبی و جهش زیادی در ژنوم کروناویروس‌ها گزارش گردیده و به آن‌ها این امکان را می‌دهد که در میزبان‌های مختلف و شرایط اقلیمی متفاوت فعال باشند. باید این نکته



دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در قالب پایان نامه دکتری عمومی (شماره ۱۳/۷۵۰۸۰/۶/۱۵) قدردانی نمایند. همچنین از همکاری جناب آقای مهندس بهروز اسدی و سرکار خانم دکتر نجفی در طول این تحقیق قدردانی و تشکر می‌گردد.

References

1. Brian, D.A., Baric, R. (2005) Coronavirus Genome Structure and Replication Coronavirus Replication and Reverse Genetics. Springer Ltd. London, UK.
2. Cavanagh, D. (2005) Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology*. 34: 439-448.
3. Felipe, P., da Silva, L., Santos, M., Spilki, F., Arns, C. (2010) Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Diseases*. 54: 1191-1196.
4. Ghalyanchi Langeroudi, A., Hossein, H., Karimi, V., Madadgar, O., Hashemzadeh, M., Ghafouri, S.A., Bagheri, S.S., Vahedi, S.M. (2014) Phylogenetic study based on the phosphoprotein gene of Iranian Newcastle disease viruses (NDV) isolates, 2010-2012. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*. 8: 73-77.
5. Jonassen, C.M., Kofstad, T., Larsen, I.-L., Løvland, A., Handeland, K., Follestad, A., Lillehaug, A. (2005) Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columba livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *Journal of General Virology*. 86: 1597-1607.
6. Loa, C., Lin, T., Wu, C., Bryan, T., Hooper, T., Schrader, D. (2006) Differential detection of turkey coronavirus, infectious bronchitis virus, and bovine coronavirus by a multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 131: 86-91.
7. Madadgar, O., Karimi, V., Nazaktabar, A., Kazemimanesh, M., Ghafari, M. M., Azimi Dezfouli, S.M., Hojjati, P. (2013) A study of Newcastle disease virus obtained from exotic caged birds in Tehran between 2009 and 2010. *Avian Pathol*. 42: 27-31.
8. Mahzounieh, M., Heidari Khoei, H., Ghasemi

Qian و همکاران در سال ۲۰۰۶ از جراحات پانکراتیت کبوتر کرونا ویروس جداسازی نمودند. آن‌ها پس از مطالعات شجره‌شناسی دریافتند که این جدایه متعلق به گاما کرونا ویروس‌ها بوده و همچنین از نظر توالی نوکلئوتیدی ژن اسپایک، ارتباط بسیار نزدیکی با ویروس برونشیت عفونی پرندگان دارد. ویروس شناسایی شده از کبوترها بر اساس سائیز ویریون، مورفولوژی و آنالیز توالی ژن اسپایک به گروه گاما کرونا ویروس‌ها تعلق داشت. تغییر در دامنه میزبانی و گرایش به بافت کرونا ویروس‌ها تا حد زیادی به تفاوت در گلیکوپروتئین اسپایک نسبت داده می‌شود. میزان شباهت ژن گلیکوپروتئین اسپایک حدود ۷۹٫۳٪ تا ۹۹٫۶٪ در این ویروس مشابه ویروس برونشیت عفونی پرندگان است. در مقابل دارای شباهت بسیار کمتری حدود ۳۷٫۸٪ با گلیکوپروتئین اسپایک کرونا ویروس بوقلمون، آلفا و بتا کرونا ویروس‌ها است. همچنین این سویه با سویه جدید (SH2) ویروس برونشیت عفونی که به تازگی از جوجه‌های مبتلا به نفریت در شانگهای جدا شده است، از نظر شجره‌شناسی در یک زیر شاخه قرار می‌گیرد (۱۰). در ایران مطالعاتی بر روی سایر بیماری‌های ویروسی کبوتر صورت گرفته است. در مطالعه‌ای، شیوع سیر کوویروس در کبوتر در استان چهارمحال و بختیاری (ایران) با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۵۰ نمونه مدفوع مورد بررسی و و نمونه‌های مثبت مورد تعیین توالی قرار گرفتند. که این اولین گزارش از تشخیص مولکولی و خصوصیات ژنومی سیر کوویروس کبوتر از ایران بود (۸). مطالعه دیگری بر روی ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) و شدت آن در پرندگان اگزوتیک انجام گرفت. مجموعه‌ای از ۳۳۵ نمونه از ۲۴ گونه مختلف پرندگان اگزوتیک در قفس و اکسینه نشده از باغ وحش و بازارهای پرندگان استان تهران در طول یک سال جمع‌آوری شد. به جز سه کبوتر، تمام پرندگان سالم و بدون علائم بالینی بیماری نیوکاسل بودند. حضور NDV در سه کبوتر بیمار با استفاده از روش هماگلو تیناسیون (HA)، آزمون ممانعت از هماگلو تیناسیون (HI) و آزمون (RT-PCR) تشخیص داده شد (۷). همچنین تحلیل شجره‌شناسی توالی ژن فسفو پروتئین پارامیکسو ویروس کبوتر توسط Ghalyanchi و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که پارامیکسو ویروس کبوتر جدا شده در کشور در ژنوتیپ پنج قرار دارد (۴).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه حضور گاما کرونا ویروس در جمعیت کبوتران ایران را اثبات و قسمتی از نقشه اپیدمیولوژی این ویروس را تکمیل کرد. همچنین با توجه به میزان پایین شیوع عفونت گاما کرونا ویروسی در کبوتر، پیشنهاد می‌شود نمونه‌گیری از کبوترهایی که دارای علائم بالینی از جمله علائم تنفسی و گوارشی هستند و همچنین از کبوترهایی که در تماس با گونه‌های دیگر پرندگان و یا نزدیک به مرغداری‌ها می‌باشند، صورت بگیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می‌دانند از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی



- Shamsabadi, M., Dastjerdi, A. (2014) Detection and phylogenetic characterization of Columbid circoviruses in Chaharmahal va Bakhtiari province, Iran. *Avian Pathology*. 43: 524-528.
9. Moura-Alvarez, J. (2014) Detection of enteric pathogens in Turkey flocks affected with severe enteritis, in Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 46: 1051-1058.
10. Qian, D.H., Zhu, G.J., Wu, L.Z., Hua, G.X. (2006) Isolation and characterization of a coronavirus from pigeons with pancreatitis. *American Journal of Veterinary Research*. 67: 1575-1579.
11. Woo, P.C., Lau, S.K., Lam, C.S., Lau, C.C., Tsang, A.K., Lau, J.H., Bai, R., Teng, J.L., Tsang, C.C., Wang, M., Zheng, B.J., Chan, K. H., Yuen, K.Y. (2012) Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J Virol*. 86: 3995-4008.



Molecular surveillance of gamma coronaviruses in pigeon flocks, Tehran province, 2014-2015

Ghalyanchilangeroudi, A.^{1*}, Karimi, V.², AbdiHaji, M.R.¹, Vafimarandi, M.¹, Hashemzadeh, M.³, Maghssoudloo, H.⁴, Madhi, A.¹

¹Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

²Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³Department of Research and Production of Poultry Viral Vaccines, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

⁴Iranian Veterinary Organization, Tehran, Iran

(Received 17 November 2016, Accepted 28 January 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Coronaviruses have a wide range of host tropism causing respiratory, enteric and central nervous system diseases in pigs, cats, dogs, rodents, cattle, avian species and human. Coronaviruses undergo genetic mutations and recombination at high rates which make them able to infect a wide range of host species from different geographical locations. According to the possible existence of gammacoronavirus in Iranian bird population including pigeons and lack of information about virus prevalence, isolation and molecular characterization of pigeon coronaviruses are needed. **OBJECTIVES:** The present study was conducted to detect avian coronavirus in flocks of Tehran province. **METHODS:** samples were randomly collected from 25 pigeon flocks of Tehran province (250 tracheal swabs and 250 cloacal swabs, 20 specimens from each flock) between 2014-2015. The viral RNA was extracted from swab samples and RT-PCR reaction was run using the QIAGEN one-step RT-PCR Kit with primers targeting nucleocapsid (N) gene and 3' untranslated region (3'-UTR) of gammacoronavirus. **RESULTS:** Gammacoronavirus was detected in one out of 25 (4%) flocks. **CONCLUSIONS:** The results of this study approve the presence of gammacoronaviruses in pigeon population and help to complete the map of epidemiology of the virus in Iran. According to the low prevalence rate of coronavirus in pigeons, samples should be collected from pigeons showing respiratory or enteric signs of disease or from pigeons having contact with other birds or those which are housed near poultry farms.

Keyword: gama coronavirus, pigeon, detection

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primers use for detection of gamma coronaviruses.

Table 2. PCR cycles and temperature for detection of gamma coronaviruses using one-step Qiagene RT-PCR kit.



*Corresponding author's email: ghalyana@ut.ac.ir, Tel: 021-61117154, Fax: 021-66933222

J. Vet. Res. 72, 2, 2017