

## تعیین تیپ مولکولی متانوموویروس پرندگان در جوجه‌های گوشتی استان اصفهان

بهزاد سپیانی<sup>۱</sup>، مجید غلامی‌آهنگران<sup>۲\*</sup> و حسن ممتاز<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۶

### چکیده

عفونت متانوموویروس پرندگان یک عفونت تنفسی در گله‌های بوقلمون و ماکیان است که به طور عمده قسمت‌های فوقانی تنفسی را مبتلا می‌کند. به منظور بررسی تیپ غالب متانوموویروس پرندگان در جوجه‌های گوشتی استان اصفهان از ۲۵ فارم جوجه‌ی گوشتی با تلفات بالا نمونه‌گیری شد و پس از استخراج RNA و ساخت cDNA به شناسایی موارد متانوموویروس پرندگان با یک جفت پرایمر عمومی نوموویروس پرداخته شد. سپس نمونه‌های مثبت با چهار جفت پرایمر اختصاصی تیپ‌های A، B، C و D تعیین تیپ شد. نتایج نشان داد از ۳۵ فارم واجد علائم تنفسی ۱۷ فارم (۴۸/۵۷ درصد) آلوده به متانوموویروس پرندگان بودند. در این مطالعه ۵۶ نمونه از مجموع ۲۱۰ نمونه جمع‌آوری شده مثبت بود (۲۶/۶۶ درصد) و میانگین میزان آلودگی در فارم‌های مثبت ۵۴/۹۰ درصد گزارش می‌شود. تعیین تیپ نمونه‌های مثبت نشان داد تمامی نمونه‌ها متعلق به تیپ B می‌باشد لذا با توجه به گستردگی تیپ B متانوموویروس پرندگان در فارم‌های گوشتی لازم است پس از تأیید بیماری‌زایی ویروس، واکسیناسیون مناسب در جهت پیش‌گیری و کنترل ویروس با سویه‌های اتوزن منطقه اجرا گردد.

کلمات کلیدی: متانوموویروس پرندگان، تعیین تیپ، جوجه گوشتی، PCR

### مقدمه

عفونت متانوموویروس پرندگان یک عفونت تنفسی در گله‌های بوقلمون و ماکیان است که به طور عمده قسمت‌های فوقانی تنفسی را مبتلا می‌کند. ویروس عامل بیماری در سلول‌های مجاری تنفسی فوقانی و به طور عمده در بوقک‌های بینی، نای، غشای ملتحمه و سینوس‌ها تکثیر یافته و سلول‌های مژه‌دار را تخریب می‌کند و کارایی سد دفاعی مخاطی را مختل می‌کند. این امر موجب تکثیر عوامل ثانویه بیماری‌زا می‌گردد (Jones and Rautenschlein 2013). عمده‌ی بیماری‌زایی این ویروس در گله‌های بوقلمون است که باعث رینوتراکئیت می‌شود. گله‌های ماکیان، به ویژه مرغ‌های مادر و تخم‌گذار تجاری

متانوموویروس پرندگان از خانواده‌ی پارامیکسوویریده، تحت خانواده‌ی پنوموویرینه و جنس متانوموویروس است. این ویروس به علت تفاوت‌های مولکولی با متانوموویروس پستانداران در جنس مجزای متانوموویروس طبقه‌بندی شده است. تا کنون چهار تحت تیپ A، B، C و D از این ویروس شناسایی شده است (Graaf et al. 2008) که تحت تیپ A و B در جنوب آفریقا در سال ۱۹۷۸ و بعد از آن از اروپا و آسیا گزارش شد (Cook 2000). تحت تیپ C، اولین بار در آمریکا و تحت تیپ D در فرانسه جداسازی شد (Bayon- Auboyer 2001, Cook 2000).

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته‌ی دانشکده‌ی دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی

<sup>۲\*</sup> دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی

(نویسنده‌ی مسئول)

E-mail: mgholami6@gmail.com

<sup>۳</sup> استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی

اصفهان نمونه‌گیری شد. نمونه‌های نای و ریه از فارم- هایی اخذ شد که واجد تلفات بالا و حداقل ۱ درصد تلفات در روز به مدت حداقل ۳ روز متوالی بودند. از هر فارم حداقل ۶ نمونه نای و ریه اخذ شد. نمونه‌ها به صورت انفرادی کد گذاری شد و در کنار یخ منتقل گردید. نمونه‌ها تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

از RNA نمونه‌های بافتی نای و ریه با استفاده از کیت تخلیص RNA استخراج شد (High Pure Viral Nucleic Acid Kit، ساخت شرکت Roch). RNA ویروسی استخراج شده در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

به منظور سنتز cDNA مطابق دستورالعمل کیت ترانس کریپتاز معکوس (Accu Power RT PreMix Kit، Bioneer, South Korea) عمل شد.

جهت ساخت cDNA از نمونه‌های RNA استخراج شده به این ترتیب عمل شد که در ابتدا مخلوط ۵ میکرولیتر DEPC water و یک میکرولیتر Random Hexamer به همراه ۲ میکرولیتر RNA استخراج شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از سردسازی محلول واکنش بر روی یخ اجزای زیر به لوله اضافه شد:

بافر واکنش ترانس کریپتاز معکوس به میزان ۵ میکرولیتر و مخلوط dNTP به میزان ۲ میکرولیتر و آنزیم واکنش ترانس کریپتاز معکوس به میزان ۱ میکرولیتر به همراه ۹ میکرولیتر DEPC water به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد و در نهایت cDNA تهیه شده در فریزر در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی-گراد نگهداری شد.

برای سنتز cDNA و تکثیر ژنوم از سیستم RT-PCR یک مرحله‌ای TITAN (ساخت شرکت Roche، آمریکا) و پرایمرهای NX و ND (جدول ۴) استفاده شد که بر اساس توالی ناحیه‌ی حفاظت شده مشترک ژن N در بین تیپ‌های A، B، C و D متانوموویروس پرندگان طراحی

به این عامل حساس هستند. در گله‌های ماکیان، متانوموویروس پرندگان یکی از عوامل دخیل در سندرم تورم سر است (Jones 1996). گزارش‌هایی از عفونت متانوموویروس پرندگان در سایر گونه‌های پرندگان مانند مرغ شاخ‌دار، قرقاول و اردک وجود دارد (Gharibeh and Shamoun 2011). تمامی سنین به این عامل حساس هستند اما به طور عمده بوقلمون و ماکیان با سن بالا علایم را به خوبی نشان می‌دهند (Jones and Rautenschlein 2013). عفونت متانوموویروس پرندگان علاوه بر مشکلات تنفسی باعث عقب‌افتادگی از رشد، کاهش تولید در طیور تخم‌گذار و حتی تلفات می‌گردد (Arab et al. 2017).

پیش‌گیری بر مبنای رعایت اصول بهداشت و واکسیناسیون است. واکسیناسیون مؤثرترین روش کنترل این عفونت در فارم‌های پرورش است. علیه این بیماری واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته و غیرفعال شده موجود است (Jones and Rautenschlein 2013). با توجه به وجود شواهدی بالینی و آزمایشگاهی از وجود عفونت متانوموویروس پرندگان در فارم‌های طیور در ایران (Allymehr et al. 2006, Arab et al. 2017, Gholami-Ahangaran et al. 2011, Homayounfar et al. 2011, Zia-Jahromi et al. 2011, Rahimi et al. 2013) و از طرفی تنوع در تیپ‌های مختلف متانوموویروس پرندگان لازم است در مرحله‌ی اول به شناسایی تیپ‌های آلوده کننده در کشور پرداخته و با بررسی بیماری‌زایی این سویه‌ها برنامه‌ی مناسب واکسیناسیون علیه تیپ‌های شایع اعمال گردد. در همین راستا در مطالعه‌ی اخیر به بررسی تیپ‌های شایع متانوموویروس پرندگان در جوجه‌های گوشتی در استان اصفهان پرداخته شده است تا مسیر انتخاب سویه‌های هومولوگ شایع در تهیه‌ی واکسن مناسب فراهم شود.

## مواد و روش کار

در فاصله‌ی زمانی مهر ماه ۱۳۹۳ تا مهر ماه ۱۳۹۴ از ۳۵ فارم جوجه‌ی گوشتی مبتلا به سندرم تنفسی در استان

درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۴۵ ثانیه و ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه در ۳۵ سیکل متوالی انجام شد. نهایتاً گسترش نهایی در دمای ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه 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 مطالعه از آب دو بار تقطیر استریل به عنوان کنترل منفی و از واکنش زنده متانوموویروس پرنندگان تحت تیپ B (Nemovac, Merial, France) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

به منظور تعیین تیپ ویروس‌های شناسایی شده از پرایمرهای منتشر شده قبلی که برای شناسایی تیپ‌های A، B، C و D طراحی شده است مورد استفاده قرار گرفت. توالی و جزئیات مربوط به پرایمرها در جدول آمده است. برنامه‌ی دمایی و مواد واکنش شبیه مرحله‌ی شناسایی تنظیم شد و به طور اختصاصی بر مبنای دمای ذوب پرایمرها، دمای واسرشت‌سازی تنظیم شد.

شده است، استفاده شد. پرایمرهای مذکور قادرند قطعه‌ای به طول ۱۱۵ جفت بازی تکثیر کنند.

واکنش RT-PCR به منظور شناسایی متانوموویروس پرنندگان در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، شامل ۱۰ میکرولیتر بافر ۵X (همراه با کلرید منیزیم با غلظت ۷/۵ میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر محلول DTT (۰/۲۵ میلی‌مول)، یک میکرولیتر dNTP (۲۰۰ میکرومول از هر کدام)، ۲ میکرولیتر پرایمر فرادست و ۲ میکرولیتر پرایمر فرودست (۴۰ پیکومول از هر پرایمر)، یک میکرولیتر مخلوط آنزیمی (Titan One Tube RT-PCR system, Roche)، ۴ میکرولیتر RNA الگو (یک میکروگرم) و ۲۷/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل انجام شد. مخلوط واکنش PCR پس از آماده‌سازی مطابق دستورالعمل کیت به منظور نسخه‌برداری معکوس (RT) و به عبارتی سنتز cDNA، ۴۵ دقیقه در دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد سپس به منظور واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۲ دقیقه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. مراحل واسرشت‌سازی، هم‌سرشت‌سازی و گسترش به ترتیب در دمای ۹۴

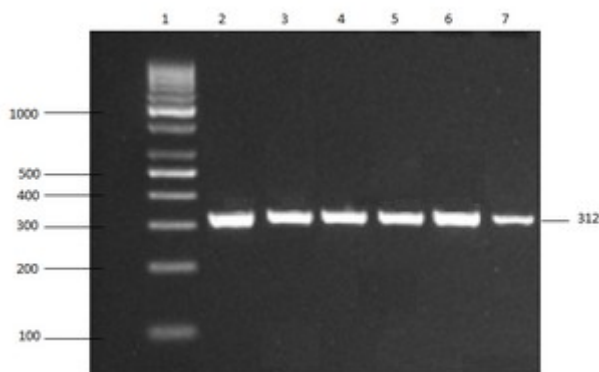
جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی و تعیین تیپ متانوموویروس پرنندگان (۷ و ۲۳)

نام پرایمر	ژن	توالی	منبع
Nd	N	5' AGC AGG ATG GAG AGC CTC TTT G 3'	Bayon-Auboyer et al. 1999
Nx	N	5' CAT GGC CCA ACA TTA TGT T 3'	Bayon-Auboyer et al. 1999
Ga	G	5' CCG GGA CAA GTA TCT CTA TGG 3'	Bayon-Auboyer et al. 1999
G2-	G	5' CCA CAC TTG AAA GAT CTA CCC 3'	Bayon-Auboyer et al. 1999
G12-	G	5' CAG TCG CCT GTA ATC TTC TAG GG 3'	Bayon-Auboyer et al. 1999
C1	M	5' GAT GAC TAC AGC AAA CTA GAG 3'	Shin et al. 2000
C2	M	5' CTT CAG GAC ATA TCT CGT AC 3'	Shin et al. 2000
G150	G	5' GCG ATG CCC AGT TAA TGA A 3'	Bayon-Auboyer et al. 1999
G1005	G	5' CCC CTT ACA AAC ACT GTT C 3'	Bayon-Auboyer et al. 1999

جدول ۲: اختصاصات پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی و تعیین تیپ متانوموویروس پرنندگان

نام پرایمر	ژن	اختصاصیت	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)	اندازه محصول PCR	منبع
Nd/Nx	N	مشترک	۵۱	۱۱۵	Gharaibeh and Algharaibeh 2007
Ga/G2-	G	A	۵۴	۵۰۴	
Ga/G12-	G	B	۵۴	۳۱۲	
G150/G1005	G	D	۵۷	۹۵۶	
C1/C2	M	C	۵۱	۴۶۸	

## نتایج



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR تیپ B متانوموویروس پرندگان

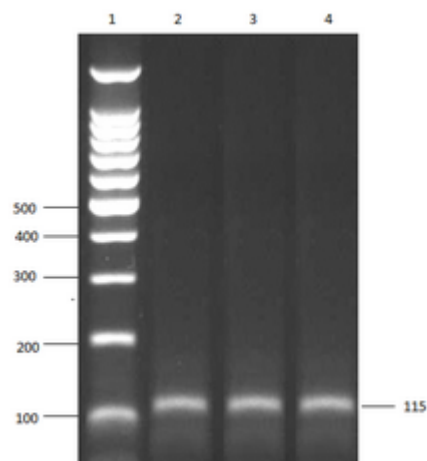
(از چپ به راست، ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲: قطعه ۳۱۲ جفت بازی ژن G مربوط به تیپ B متانوموویروس در کنترل مثبت، ستون ۳ تا ۷: قطعه ۳۱۲ جفت بازی ژن G مربوط به تیپ B متانوموویروس در نمونه‌های مثبت).

## بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که حدود ۴۸/۵ درصد فارم‌ها و ۵۵ درصد نمونه‌های اخذ شده از دستگاه تنفس پرندگان واجد علائم تنفسی آلوده به متانوموویروس پرندگان است و تمامی نمونه‌های جمع شده در این فارم‌ها متعلق به تیپ B متانوموویروس پرندگان می‌باشد. با توجه به مشاهده‌ی علائم تنفسی و تلفات در فارم‌های نمونه-برداری شده و با توجه به عدم استفاده از واکسن متانوموویروس پرندگان در فارم‌های جوجه‌ی گوشتی می‌توان علائم تنفسی و علت تلفات را به متانوموویروس پرندگان نسبت داد. متانوموویروس پرندگان در اکثر گونه‌های پرندگان شایع است و اثبات وجود آن به صورت مطالعات سرولوژی، ویروس‌شناسی و نیز با تکنیک‌های مولکولی از کشورهای مختلف پرورش‌دهنده-ی طیور گزارش شده است (Cook 2000). این بیماری اولین بار در دهه‌ی ۱۹۷۰ از جنوب آفریقا و سپس از فرانسه و انگلیس در دهه‌ی ۱۹۸۰ گزارش شد و پس از آن

در نمونه‌های مثبت متانوموویروس پرندگان قطعه‌ی ۱۱۵ جفت بازی همانند کنترل مثبت تکثیر شد (شکل ۱). نتایج PCR مربوط به متانوموویروس پرندگان نشان می‌دهد از ۳۵ فارم واجد علائم تنفسی ۱۷ فارم آلوده به متانوموویروس پرندگان (۴۸/۵۷ درصد) و از ۲۱۰ نمونه اخذ شده ۵۶ نمونه (۲۶/۶۶ درصد نمونه‌ها) مثبت می‌باشد. در این بررسی میزان واگیری متانوموویروس پرندگان در گله‌های مثبت از ۱۶/۶۶ درصد تا ۱۰۰ درصد متغیر و میانگین واگیری در گله‌های آلوده ۵۴/۹ درصد می‌باشد.

تعیین تیپ متانوموویروس در ۱۷ نمونه جمع شده از ۱۷ فارم مثبت نشان داد که همگی آلوده به تیپ B متانوموویروس پرندگان می‌باشند. به عبارتی در تمامی نمونه‌ها باند ۳۱۲ جفت بازی مربوط به تیپ B متانوموویروس پرندگان تکثیر شد (شکل ۲) و با سایر پرایمرهای مربوط به تیپ A، C و D قطعه‌ای تکثیر نشد.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR متانوموویروس پرندگان (از چپ به راست، ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲: قطعه ۱۱۵ جفت بازی ژن N نوموویروس پرندگان در کنترل مثبت، ستون ۳ و ۴: قطعه ۱۱۵ جفت بازی ژن N نوموویروس پرندگان در نمونه‌های مثبت)

در جوجه‌های گوشتی با پرایمرهای اختصاصی به تعیین تیپ‌های A, B, C و D در نمونه‌های مثبت از لحاظ متانوموویروس پرنندگان پرداخته شد. اگر چه در گزارش‌های قبلی آمده است که متانوموویروس پرنندگان در سلول‌های دستگاه تنفس ماکیان در مقایسه با بوقلمون ضعیف‌تر رشد می‌کند و عمده آلودگی با متانوموویروس پرنندگان در توربینت‌های بینی و قسمت‌های ابتدایی دستگاه تنفس اتفاق می‌افتد (Cook et al. 1991, Jones 1996) اما به نظر می‌رسد حساسیت و ویژگی بالای مربوط به پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه و مدیریت زمان نمونه‌گیری و موکول‌سازی آن به ابتدای شروع عفونت امکان شناسایی متانوموویروس پرنندگان را در بافت نای فراهم آورده است چرا که در گزارش‌های قبلی بیان شده است متانوموویروس پرنندگان فقط در ابتدای شروع عفونت قابل ردیابی است و ردیابی آن پس از گذشت چند روز از شروع عفونت مشکل می‌شود (Cook and Cavanagh 2002, Shin et al. 2000). علاوه بر فاکتورهای ذکر شده، به نظر می‌رسد نوع سروتیپ متانوموویروس شایع نیز در امکان شناسایی متانوموویروس در سلول‌های نای تأثیرگذار باشد. مطالعات نشان داده است پراکندگی و تمایل بافتی متانوموویروس A و B در ارگان‌های تنفسی متفاوت است به گونه‌ای که تیپ B در اکثر مواقع در ریه ردیابی نمی‌شود و به قسمت‌های بالاتر تمایل بیشتری دارد در حالی که تمایل بافتی تیپ A در قسمت‌های مختلف دستگاه تنفس یکسان است (Zande et al. 1999).

در خصوص آلودگی پرنندگان با تیپ B متانوموویروس، این تیپ از کشورهای مختلف اروپایی شامل فرانسه، آلمان، اسپانیا، مجارستان، ایتالیا، هلند و بلژیک گزارش شده است (Catelli et al. 2004, Cook 1997, Naylor et al. 2000). مدت کوتاهی پس از شناسایی در اروپا در سایر کشورها شبیه ژاپن (Mase et al. 2003)، برزیل (Chacon et al. 2007)، نیجریه (Owoade et al. 2008) و اردن (Gharibeh and

در سراسر اروپا، کشورهای آسیایی و آمریکا منتشر شد. شواهد بیان می‌کند این ویروس در تمامی کشورهای دارای صنعت طیور منتشر شده است اما با توجه به نبود گزارشی در خصوص آلودگی فارم‌های پرورش طیور در استرالیا و کانادا به نظر می‌رسد این دو کشور عاری از آلودگی باشند (Jones 1996, Cook 2000). در ایران این ویروس در ابتدا در فارم‌های بوقلمون گزارش شد و به دنبال آن عالی مهر و همکاران در سال ۱۳۸۵ آلودگی فارم‌های مرغ مادر را به متانوموویروس نشان دادند. پس از آن با شیوع سندرم تورم سر در برخی از فارم‌های گوشتی توجه محققین داخلی به متانوموویروس پرنندگان معطوف شد. مطالعات ابتدایی به صورت سرولوژی در سطح کشتارگاه‌ها نشان‌دهنده‌ی آلودگی بالای سرمی در فارم‌های گوشتی بود (Zia-Jahromi et al. 2011) که با توجه به انجام واکنش‌های PCR در فارم‌های مرغ مادر تفریق و تفسیر تیرهای سرمی مادری از موارد آلودگی مشکل می‌نمود، تا این که مطالعات تکمیلی در سراسر ایران به نقش پیچیده ساز متانوموویروس پرنندگان در سندرم‌های تنفسی فارم‌های گوشتی اشاره داشت (Arab et al. 2017, Gholami-Ahangaran et al. 2011, Homayoun far et al. 2013). به عنوان مثال، غلامی آهنگران و همکاران در سال ۱۳۹۰ با بررسی ۳۶۰ نمونه سرمی در فارم‌های واجد علائم تنفسی گزارش کردند که تمامی فارم‌ها و ۸۸/۹ درصد نمونه‌های سرمی در استان اصفهان از لحاظ متانوموویروس مثبت ارزیابی شدند. Homayounfar و همکاران در سال ۱۳۹۲ با روش PCR نشان دادند که ۱۶ درصد از ۵۰ فارم طیور صنعتی در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی با علائم تنفسی از نظر متانوموویروس پرنندگان مثبت هستند. علاوه بر آن، Arab و همکاران در سال ۱۳۹۵ با بررسی‌های مولکولی بیان کردند که حدود ۲۰ درصد نمونه‌های اخذ شده از پرنندگان واجد علائم تنفسی استان اصفهان به طور هم‌زمان با ویروس H9N2 آنفولانزا و متانوموویروس پرنندگان آلوده هستند. در همین راستا و با هدف تعیین تیپ متانوموویروس پرنندگان

تیپ‌های دیگر به دلیل حفاظت متقاطع تیپ B با سایر تیپ‌ها باشد به طوری که مطالعات مختلف کارایی حفاظت متقاطع بین سروتیپ A و B را نشان داده‌اند (Cook 2000, Jones and Rautenschlein 2013) به هر حال امکان مشاهده یا چرخش هم‌زمان دو تیپ در یک منطقه‌ی جغرافیایی وجود دارد به طوری که طی سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۴ چرخش سروتیپ A و B در اسرائیل گزارش شده است (Banet et al. 2005). علاوه بر آن، در کره به طور هم‌زمان سه تیپ A، B و C در حال چرخش است (Youn et al. 2010).

در مطالعه‌ی اخیر، ردیابی تیپ B متانوموویروس پرنندگان در جوجه‌های گوشتی دلیل بر عدم وجود تیپ‌های دیگر متانوموویروس پرنندگان در ایران نیست چرا که این مطالعه صرفاً در ماکیان گوشتی انجام شده است و سروتیپ‌های شایع در سایر گونه‌ها به ویژه میزبان اصلی آن، بوقلمون، ممکن است متفاوت باشد به طوری که حافظ و همکاران در سال ۲۰۰۰ در فارم‌های مرغ مادر در آلمان تیپ B را گزارش کردند در حالی که در فارم‌های بوقلمون در آلمان سروتیپ A و B وجود داشت (Hafez et al. 2000). به هر حال به نظر می‌رسد منطقه‌ی جغرافیایی و میزبان دو عامل تعیین‌کننده‌ی تیپ‌های شایع و غالب متانوموویروس در یک کشور باشد اما باید در نظر داشت که با توجه به امکان موتاسیون در این ویروس پایش مکرر تیپ‌های متانوموویروس پرنندگان در یک منطقه ضروری است. به طوری که در دهه‌ی ۱۹۹۰ در بریتانیا در سروتیپ A موتاسیون شیفت اتفاق افتاد و تیپ A به تیپ B تغییر کرد (Naylor et al. 1997). لذا به طور کلی توصیه می‌شود برای اجرای برنامه‌های مناسب واکسیناسیون علیه تیپ‌های شایع متانوموویروس پرنندگان در ایران علاوه بر پایش مکرر، از سویه‌های اتوزن منطقه برای ایمنی‌زایی علیه سویه‌های موجود در ایران استفاده شود.

Algharibeh 2007) نیز گسترده شد. در حال حاضر تیپ B متانوموویروس پرنندگان بیش‌ترین سهم آلودگی نوموویروس را در گونه‌های مختلف پرنندگان به خود اختصاص داده است. اصولاً در مرغ‌های مادر در کشورهای مختلف از واکسن‌های اتوزن علیه تیپ‌های شایع استفاده می‌شود. در ایران نیز در مرغ‌های مادر از زمان ورود واکسن متانوموویروس از واکسن‌های متعلق به تیپ B استفاده شده است. انتشار تیپ B متانوموویروس پرنندگان در فارم‌های مرغ گوشتی در ایران می‌تواند ناشی از فرار سویه واکسنی از فارم‌های مرغ مادر و انتشار آن در فارم‌های جوجه‌ی گوشتی باشد. علاوه بر آن، با توجه به احتمال تغییر شکل سویه‌ها در نوموویروس (Cook 2000, Naylor et al. 1997)، سویه‌ی واکسن می‌تواند به مرور زمان دچار تغییر شکل شده و منجر به ظهور سویه‌های جدید با بیماری‌زایی متفاوت شود. به هر حال با توجه به عدم استفاده از واکسن در فارم‌های گوشتی احتمال سرایت و انتشار سویه‌های تغییر شکل یافته واکسن و یا انتقال عمودی سویه‌های واکسنی (Cook et al. 2000, Cook et al. 1991) و نیز انتشار تیپ B متانوموویروس بیماری‌زا از پرنندگان وحشی نیز وجود دارد. علاوه بر آن، با توجه به شیوع تیپ B در کشور برزیل (Chacon et al. 2007) و از طرفی واردات گوشت مرغ از برزیل به نظر می‌رسد شیوع تیپ B متانوموویروس پرنندگان در ایران به دلیل واردات مرغ از این کشور باشد.

قرابت بالای تیپ B در اکثر کشورهای آلوده حکایت از این واقعیت دارد که منشاء تمام سویه‌های در حال چرخش تیپ B مشترک است. به هر حال، با توجه به شیوع تیپ‌های A، B و حتی C در کشورهای آسیایی مانند ژاپن، کره، لبنان، اردن، اسرائیل و چین (Cook et al. 2010, Owoade et al. 2008, Youn et al. 2000) و با توجه به منطقه‌ی جغرافیایی ایران انتظار مشاهده‌ی تیپ A، B و یا هر دو وجود داشت اما با توجه به ردیابی تیپ B و عدم مشاهده‌ی سایر تیپ‌ها ممکن است عدم وجود

## منابع

- Allymehr, M.; Tabatabaei, M. and Mamaghani, A. (2006). Seroprevalence study of avian pneumovirus infection in breeder chickens. *Journal of Veterinary Medicine Research*, 61(2): 129-133 (In Persian).
- Arab, M.; Gholami-Ahangaran, M. and Jafarian-Dehkordi, M. (2017). The molecular study of co-occurrence of Avian Influenza (H9N2 subtype) and Metapneumovirus in Broiler Chickens with Respiratory Syndrom in Isfahan Province. *Iranian Journal of Veterinary Clinical Sciences*, 10(2): 3-11 (In Persian).
- Banet-Noach, C.; Simanov, L. and Perk, S. (2005). Characterization of Israeli avian metapneumovirus strains in turkeys and chickens. *Avian Pathology*, 34(3): 220-226.
- 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.
- Catelli, E.; Cecchinato, M.; Cassandro, M.; Delogu, M.; De Matteo, P.; Franciosi, C. et al. (2004). Avian Pneumovirus infection in turkey and broiler farms in Italy: a virological, molecular and serological field survey. *Italian Journal of Animal Science*, 3(3): 287-292.
- Chacón, J.L.; Brandão, P.E.; Buim, M.; Villarreal, L. and Piantino, Ferreira, A.J. (2007). Detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and molecular characterization of subtype B avian metapneumovirus isolated in Brazil. *Avian Pathology*, 36(5):383-387.
- Cook, J.K.A. and Cavanagh, D. (2002). Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathology*, 31(2):117-132.
- Cook, J.K.A. (2000). Avian Pneumovirus Infections of Turkeys and Chickens. *The Veterinary Journal*, 160(2): 118-125.
- 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.
- Gharaibeh, S.M. and Algharaibeh, G.R. (2007). Serological and Molecular Detection of Avian Pneumovirus in Chickens with Respiratory Disease in Jordan. *Poultry Science*, 86(8): 1677-1681.
- Gharaibeh, S. and Shamoun, M. (2011). Avian Metapneumovirus Subtype B Experimental Infection and Tissue Distribution in Chickens, Sparrows and Pigeons. *Veterinary Pathology*, 49 (4): 704-709.
- Gholami-Ahangaran, M.; Shoushtari, A.H.; Bahmani-nejad, N.M.A. and Nikkhah-Ghamsari, M. (2011). Seroprevalence of avian metapneumovirus and influenza (H9N2 subtype) infection in broiler chickens with respiratory syndrome in Isfahan province. *Veterinary Journal of Islamic Azad University*, 5(3):15-21.
- 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.
- Hafez, H.M.; Hess, M.; Prusas, C.; Naylor, C.J. and Cavanagh, D. (2000). Presence of avian pneumovirus type A in continental Europe during the 1980s. *Journal of Veterinary Medicine series B*, 47(8): 629-633.
- Homayounfar, N.; Soushtari, A.; Charkhkar, S. and Bozorgmehrfard, M.H. (2013). Detection of avian Metapneumovirus infection in fowls of west and east of Azarbijan. *Journal of Comparative pathobiology*, 10(2): 965-970 (In Persian).
- Jones, R.C. (1996). Avian pneumovirus infection: questions still unanswered. *Avian Pathology*, 25(4): 639-648.
- Jones, R.C. and Rautenschlein, S. Avian Metapneumovirus. In: Swayne, D.E.; Glisson, J.R.; McDougald, R.; Nolan, L.K.; Suarez, D.L. and Nair, V.L. (2013). *Disease of Poultry*. 13<sup>th</sup> ed. Massachusetts, W.B. Saunders, Pp: 121-139.
- Mase, M.; Yamaguchi, S.; Tsukamoto, K.; Imada, T.; Imai, K. and Nakamura, K. (2003). Presence of Avian Pneumovirus Subtypes A and B in Japan. *Avian Diseases*, 47(2): 481-484.
- Naylor, C.; Shaw, K.; Britton, P. and Cavanagh, D. (1997). Appearance of type B avian Pneumovirus in great Britain. *Avian Pathology*, 26(2): 327-338.
- Owoade, A.A.; Ducatez, M.F.; Hübschen, J.M.; Sausy, A.; Chen, H.; Guan, Y. and Muller, C.P. (2008). Avian Metapneumovirus Subtype A in China and Subtypes A and B in Nigeria. *Avian Diseases*, 52(3): 502-506.
- Rahimi, M. (2011). Seroprevalence of avian metapneumovirus infection in broiler and broiler breeder chickens in Iran. *Veterinarni Medicina*, 56(8): 395-399.

Shin, H.J.; Rajashekara, G.; Jirjis, F.F.; Shaw, D.P.; Goyal, S.M.; Halvorson, D.A. and Nagaraja, K.V. (2000). Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR. *Archive of Virology*, 145(6): 1239-1246.

Youn, H.S.; Lee, D.W.; Do, S.H.; Park, S.Y.; Choi, I.S.; Lee, J.B. and Song, C.S. (2010). Isolation and characterization of avian metapneumovirus from chickens in Korea. *Journal of Veterinary Science*, 11(1): 59-66.

Zande, S.; Nauwynck, H.; De Jonghe, S. and Pensaert, M. (1999). Comparative pathogenesis of a subtype A with a subtype B avian pneumovirus in turkeys. *Avian Pathology*, 28(3): 239-244.

Zia-Jahromi, N.; Gholami-Ahangaran, M. and Fathi-Hafshejani, E. (2011). The Serologic Evidence of Avian Pneumovirus in Broiler Chickens of Isfahan Province. *Journal of Veterinary Microbiology*, 7(2): 57-62 (In Persian).



## Molecular typing of avian metapneumovirus in broiler chickens in Isfahan province

Sepiani, B.<sup>1</sup>; Gholami-Ahangaran, M.<sup>2</sup> and Momtaz, H.<sup>3</sup>

Received: 02.03.2017

Accepted: 17.12.2017

### Abstract

Bacterial metapneumovirus infection is a respiratory infection in turkeys and poultry flocks, which mainly affects the upper respiratory tract. For study of the common type of avian metapneumovirus (AMPV) in broiler chickens in Isfahan province, 35 broiler chicken flocks with high mortality were sampled. After RNA extraction and synthesis of cDNA, AMPV was investigated by one pair of specific primer. The AMPV positive samples were investigated for AMPV types (A, B, C and D) by type specific primers. Results showed 17 out of 35 (48.57%) of flocks were infected to AMPV. In this study, 56 out of 210 samples (26.66%) were positive for AMPV. The mean of morbidity to AMPV was 54.90% in sampled flocks. The typing of positive samples showed all of the positive samples belonged to B type. In conclusion, by considering to a high distribution of B type of AMPV in broiler chicken flocks, it is necessary to apply for a proper AMPV vaccination program with autogenic strains, after approval of pathogenicity of AMPV strains.

**Key words:** Avian Metapneumovirus, Broiler Chicken, PCR, Typing

---

1- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

3- Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

**Corresponding Author:** Gholami-Ahangaran, M., E-mail: mgholami6@gmail.com