مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۲، ۲۱۷-۲۱۳
Journal of Veterinary Research. 72,2:213-217, 2017
Original Article

پایش مولکولی گاماکروناویروس پرندگان در کبوترسانان استان تهران

آرش قلیان چی لنگرودی[۱*] وحید کریمی[۲] محمدرضا عبدی حاجی[۱] مهدی وصفی مرندی[۱] مسعودهاشم زاده[۳] حسین مقصودلو[۴] علی مدحی[۱]

۱) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، 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: کروناویروس‌ها طیف گسترده‌ای از بیماری‌های تنفسی، روده‌ای، کبدی، عصبی با حدت‌های مختلف در گربه، سگ، خوک، جوندگان، گاو، پرندگان و انسان ایجاد می‌کنند. توانایی بالای کروناویروس‌ها 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 گاماکروناویروس 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 کروناویروس کبوترها ضروری به نظر می‌رسید. هدف: هدف از این مطالعه ردیابی مولکولی کروناویروس پرندگان درجمعیت کبوتران استان تهران بود. **روش کار:** از ۲۵ گله‌های کبوتر تعداد ۲۵۰ سواب نای و ۲۵۰ سواب کلواک، ۲۰ نمونه از هر گله در سال ۱۳۹۳ در محدوده استان تهران به صورت تصادفی به منظور ردیابی گاما کرونا ویروس جمع آوری گردید. پس از استخراج RNA، ردیابی ویروس با استفاده از پرایمرهای ژن‌های نوکلئوکپسید (N) و ناحیه غیر قایل ترجمه ناحیه ۳' (UTR۳') و با استفاده از کیت One-step RT-PCR شرکت کیاژن 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 کروناویروس 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 کروناویروس در کبوتر ، پیشنهاد می‌شود نمونه‌گیری از کبوترهایی که دارای علایم بالینی از جمله علایم تنفسی و گوارشی هستند و همچنین از کبوترهایی که در تماس باسایر گونه‌های پرندگان و یا نزدیک به مرغداری‌ها می‌باشند، صورت بگیرد.

واژه‌های کلیدی: گاماکرونا ویروس، کبوتر، ایران، تشخیص مولکولی، اپیدمیولوژی

مقدمه

خانواده کروناویریده در چهار جنس آلفا، بتا، گاما و دلتا طبقه بندی شده و جنس گاما کروناویروس شامل ویروس برونشیت عفونی، کروناویروس بوقلمون، کروناویروس قرقاول ، کروناویروس جدا شده از چند گونه پرنده وحشی و نهنگ بلوگا و پلنگ آسیایی است (۲) . هر چند اخیراً مشخص شده که برخی از جدایه‌های کروناویروس پرندگان جزء دلتا کروناویروس‌ها هستند (۱۱) .ژنوم ویروس برونشیت عفونی طیور, RNA تک رشته‌ای سنس مثبت است که حدودkb ۲۸-۲۷/۵ طول دارد. ژنوم در انتهای '۵ دارای کلاهک و در انتهای '۳ واجد دم پلی آدنین و ساختار ویروس شامل اسپایک‌های گرزی شکل (S)، پوشینه (E)، غشاء (M) و نوکلئوکپسید (N) است (۱). شواهدی از وجود عفونت گاما کروناویروس 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 کروناویروس‌ها، پرندگان وحشی می‌توانند یک میزبان بالقوه برای کروناویروس‌های بیماریزا در طیور تجاری و همچنین یک ظرف اختلاط ژنتیکی کروناویروس‌های 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 ازژنوم می‌تواند جهت ردیابی مولکولی آن‌ها مورد هدف قرار گیرد. یکی از نواحی نسبتاً حفاظت شده RNA پلی مراز وابسته به RNA در ژن ORF ۱b، ژن‌های نوکلئوکپسید (N) و ناحیه غیر قایل ترجمه ناحیه '۳ (UTR۳') است. با توجه به احتمال وجود گاماکروناویروس 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 ملکولی کروناویروس از کبوترها ضروری به نظر می‌رسید .

مواد و روش کار

نمونه گیری: تعداد ۲۵۰ عدد سواب نایی و ۲۵۰ سواب کلواکی به تعداد مساوی از ۲۵ گله‌ی مختلف کبوتردر سال ۱۳۹۳ به صورت تصادفی در محدوده‌ی 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 وسپس به صورت زنجیره‌ی سرد به آزمایشگاه ویروس شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل گردید. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در فریزر۲۰°C- نگهداری گردید.

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۵۴-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: ghalyana@ut.ac.ir

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 GAA AT GTC	۲۶۶	(۹)
	UTR۱۱	GCTCTAACTCTATAC TAG CCTA		
N	N۱۰۳F	CCT GAT GGT AAT TTC CGT TGG G	۳۵۷	(۶)
	N۱۰۲R	ACG CCC ATC CTT AAT ACC TTC CTC		

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

شماره و نام سیکل	دما (ºC)	زمان
۱-رونوشت برداری معکوس	۵۰	۳۰ دقیقه
۲-واسرشت شدن اولیه	۹۵	۱۵ دقیقه
۳-واسرشت شدن	۹۴	۴۵ ثانیه
۴-اتصال	۴۸	۴۵ ثانیه
۵-تکثیر	۶۸	۶۰ ثانیه
۳۵ مرتبه تکرار سیکل‌های ۳ و۴ و۵		
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 اورده شده است) استفاده شد . آزمون تشخیصی این مطالعه با استفاده از کیت یک مرحله‌ای One Step RT-PCR شرکت QIAGENE (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 نوکلئوکپسید (N) (۳۵۷ جفت باز) و ژن ناحیه غیر قایل ترجمه ناحیه ۳ (UTR۳) (۲۶۶جفت باز) بود و در نتیجه با توجه به حضور کنترل‌های مناسب، نشان دهنده حضور گاماکرونا 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 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 جدایه‌ها دریافتند که همه آن‌ها متعلق به گاماکرونا وبروس‌ها بوده اند. 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 جدانشده است. در کبوترهای آلوده شده با کروناویروس در کالبدگشایی ضایعه بزرگ شدن طحال یا دیگر یافته ی پاتولوژیک مهمی مشاهده نشده است. عدم تکثیر در تخم مرغ جنین دار نشان می‌دهد که کروناویروس‌های غاز و کبوتر در این تحقیق نمی توانند به آسانی جنین جوجه را آلوده کنند (۵).

Felippe و همکاران درطی سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۹در 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 گاماکرونا ویروس‌ها می‌باشد. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد زمانی که ویروس برونشیت عفونی پرندگان در تخم مرغ نطفه دارSPF پاساژ داده می‌شود دارای علایم کوتاهی قد یا پیچش در انگشتان پا است.تمام ویروس‌های جدا شده از کبوتر باعث آسیب‌های مشابه در تخم مرغ SPF می‌شوند. یشتر 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) .

Qian و همکاران در سال ۲۰۰۶ از جراحات پانکراتیت کبوتر کرونا ویروس جداسازی نمودند. آن‌ها پس از مطالعات شجره شناسی دریافتند که این جدایه متعلق به گاماکرونا 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 سایز ویریون ، مورفولوژی و آنالیز توالی ژن اسپایک به گروه گاماکروناویروس‌ها تعلق داشت. تغییر در دامنه میزبانی و گرایش به بافت کروناویروس‌ها 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 گلیکوپروتیین اسپایک کروناویروس بوقلمون، آلفا و بتا کروناویروس‌ها است. همچنین این سویه با سویه جدید (SH۲) ویروس برونشیت عفونی که به تازگی از جوجه‌های مبتلا به نفریت در شانگهای جدا شده است، از نظر شجره شناسی در یک زیر شاخه قرار می‌گیرد (۱۰). در ایران مطالعاتی بر روی سایر بیماری‌های ویروسی کبوتر صورت گرفته است. در مطالعه‌ای، شیوع سیرکوویروس در کبوتر در استان چهارمحال و بختیاری (ایران) با استفاده آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (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 سیرکوویروس 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 واکسینه نشده از باغ وحش و بازارهای پرندگان استان تهران در طول یک سال جمع آوری 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 هماگلوتیناسیون (HA)، آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI)و آزمون (RT-PCR) تشخیص داده شد (۷). همچنین تحلیل شجره شناسی توالی ژن فسفوپروتئین پارامیکسوویروس کبوتر توسط Ghalyanchi و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که پارامیکسوویروس کبوتر جدا شده در کشور در ژنوتیپ پنج قرار دارد (۴).

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه حضور گاما کروناویروس در 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 کروناویروسی در کبوتر، پیشنهاد می‌شود نمونه‌گیری از کبوترهایی که دارای علایم بالینی از جمله علایم 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 دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در قالب پایان نامه دکتری عمومی (شماره ۱۵/۶/۷۵۰۸۰۱۳) 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. Felippe, 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 (Columbia 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

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], Vasfimarandi, M.[1], Hashemzadeh, M.[3], Maghssoudloo, H.[4], Madhi, A.[1]

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

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

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

[4]*Iranian 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**