تعیین تیپ مولکولی متانومویروس پرندگان در جوجه‌های گوشتی استان اصفهان

بهزاد سپیانی[۱]، مجید غلامی‌آهنگران[۲*] و حسن ممتاز[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۶

چکیده

عفونت متانومویروس 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 متانومویروس پرندگان در جوجه‌های گوشتی استان اصفهان از ۳۵ فارم جوجه‌ی گوشتی با تلفات بالا نمونه‌گیری شد و پس از استخراج RNA و ساخت cDNA به شناسایی موارد متانومویروس پرندگان با یک جفت پرایمر عمومی نومویروس 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 علایم تنفسی ۱۷ فارم (۴۸/۵۷ درصد) آلوده به متانومویروس 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 متانومویروس پرندگان در فارم‌های گوشتی لازم است پس از تأیید بیماری‌زایی ویروس، واکسیناسیون مناسب در جهت پیش‌گیری و کنترل ویروس با سویه‌های اتوژن منطقه اجرا گردد.

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

مقدمه

متانومویروس پرندگان از خانواده‌ی پارامیکسوویریده، تحت خانواده‌ی پنومویرینه و جنس متانومویروس است . این ویروس به علت تفاوت‌های مولکولی با متانومویروس پستانداران در جنس مجزای متانومویروس 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).

عفونت متانومویروس 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 ثانویه‌ی 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

[۱] دانش‌آموخته‌ی دانشکده‌ی دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی

[۲*] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی

E-mail: mgholami6@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۳] استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی

به این عامل حساس هستند. در گله‌های ماکیان، متانومویروس پرندگان یکی از عوامل دخیل در سندرم تورم سر است (Jones 1996). گزارش‌هایی از عفونت متانومویروس 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 متانومویروس 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 متانومویروس پرندگان در فارم‌های طیور در ایران (Allymehr et al. 2006, Arab et al. 2017, Gholami-Ahangaran et al. 2011, Homayounfar et al. 2013, Rahimi et al. 2011, Zia-Jahromi et al. 2011) و از طرفی تنوع در تیپ‌های مختلف متانومویروس 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 متانومویروس 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 اصفهان نمونه‌گیری شد. نمونه‌های نای و ریه از فارم‌هایی 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.

RNA از 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 سانتی‌گراد 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 متانومویروس پرندگان طراحی

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

واکنش RT-PCR به منظور شناسایی متانومویروس پرندگان در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، شامل ۱۰ میکرولیتر بافر 5X (همراه با کلرید منیزیم با غلظت ۷/۵ میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر محلول DTT (۰/۲۵ میلی‌مول)، یک میکرولیتر dNTP (۲۰۰ میکرمول 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 واسرشت-سازی، هم‌سرشت‌سازی و گسترش به ترتیب در دمای ۹۴ 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 واکسن زنده متانومویروس پرندگان 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.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی و تعیین تیپ متانومویروس پرندگان (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 متانومویروس پرندگان

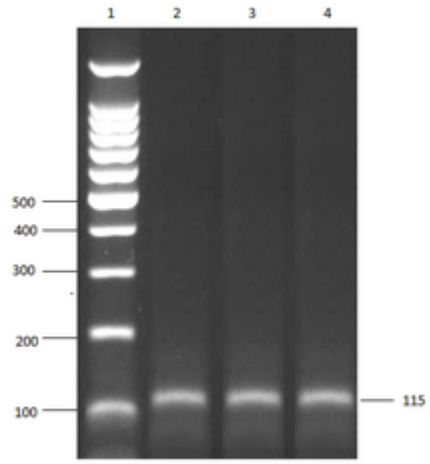
نام پرایمر	ژن	اختصاصیت	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)	اندازه محصول PCR	منبع
Nd/Nx	N	مشترک	۵۱	۱۱۵	Gharaibeh and Algharaibeh 2007
Ga/G2-	G	A	۵۴	۵۰۴	
Ga/G12-	G	B	۵۴	۳۱۲	
G150/G1005	G	D	۵۷	۹۵۶	
C1/C2	M	C	۵۱	۴۶۸	

نتایج

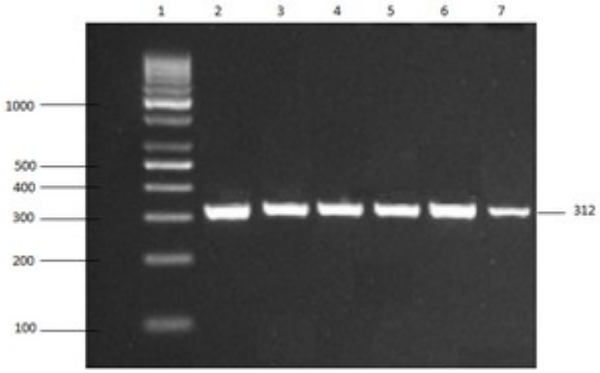
در نمونه‌های مثبت متانومویروس پرندگان قطعه‌ی ۱۱۵ جفت بازی همانند کنترل مثبت تکثیر شد (شکل ۱).

نتایج PCR مربوط به متانومویروس پرندگان نشان می‌دهد از ۳۵ فارم واجد علایم تنفسی ۱۷ فارم آلوده به متانومویروس پرندگان (۴۸/۵۷ درصد) و از ۲۱۰ نمونه اخذ شده ۵۶ نمونه (۲۶/۶۶ درصد نمونه‌ها) مثبت می‌باشد . در این بررسی میزان واگیری متانومویروس پرندگان در گله‌های مثبت از ۱۶/۶۶ درصد تا ۱۰۰ درصد متغیر و میانگین واگیری در گله‌های آلوده ۵۴/۹ درصد می‌باشد.

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



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



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR تیپ B متانومویروس پرندگان

(از چپ به راست، ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲ : قطعه ۳۱۲ جفت بازی ژن G مربوط به تیپ B متانومویروس در کنترل مثبت، ستون ۳ تا ۷: قطعه ۳۱۲ جفت بازی ژن G مربوط به تیپ B متانومویروس 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 علایم تنفسی آلوده به متانومویروس پرندگان است و تمامی نمونه‌های تجمیع شده در این فارم‌ها متعلق به تیپ B متانومویروس پرندگان می‌باشد. با توجه به مشاهده‌ی علایم تنفسی و تلفات در فارم‌های نمونه‌برداری شده و با توجه به عدم استفاده از واکسن متانومویروس پرندگان در فارم‌های جوجه‌ی گوشتی می‌توان علایم تنفسی و علت تلفات را به متانومویروس پرندگان نسبت داد . متانومویروس پرندگان در اکثر گونه‌های پرندگان شایع است و اثبات وجود آن به صورت مطالعات سرولوژی، ویروس‌شناسی و نیز با تکنیک‌های مولکولی از کشورهای مختلف پرورش‌دهنده‌ی 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 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 متانومویروس نشان دادند. پس از آن با شیوع سندرم تورم سر در برخی از فارم‌های گوشتی توجه محققین داخلی به متانومویروس پرندگان 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 واکسیناسیون در فارم‌های مرغ مادر تفریق و تفسیر تیترهای سرمی مادری از موارد آلودگی مشکل می‌نمود، تا این که مطالعات تکمیلی در سراسر ایران به نقش پیچیده ساز متانومویروس پرندگان 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 علایم تنفسی گزارش کردند که تمامی فارم‌ها و ۸۸/۹ درصد نمونه‌های سرمی در استان اصفهان از لحاظ متانومویروس 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 علایم تنفسی از نظر متانومویروس پرندگان مثبت هستند. علاوه بر آن، Arab و همکاران در سال ۱۳۹۵ با بررسی‌های مولکولی بیان کردند که حدود ۲۰ درصد نمونه‌های اخذ شده از پرندگان واجد علایم تنفسی استان اصفهان به طور هم‌زمان با ویروس H9N2 آنفولانزا و متانومویروس پرندگان آلوده هستند. در همین راستا و با هدف تعیین تیپ متانومویروس پرندگان در جوجه‌های گوشتی با پرایمرهای اختصاصی به تعیین تیپ‌های A، B، C و D در نمونه‌های مثبت از لحاظ متانومویروس پرندگان پرداخته شد. اگر چه در گزارش-های قبلی آمده است که متانومویروس پرندگان در سلول‌های دستگاه تنفس ماکیان در مقایسه با بوقلمون ضعیف‌تر رشد می‌کند و عمده آلودگی با متانومویروس پرندگان 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 متانومویروس پرندگان را در بافت نای فراهم آورده است چرا که در گزارش‌های قبلی بیان شده است متانومویروس پرندگان 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 متانومویروس شایع نیز در امکان شناسایی متانومویروس در سلول‌های نای تأثیرگذار باشد. مطالعات نشان داده است پراکندگی و تمایل بافتی متانومویروس 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 پرندگان با تیپ B متانومویروس، این تیپ از کشورهای مختلف اروپایی شامل فرانسه، آلمان، اسپانیا، مجارستان، ایتالیا، هلند و بلژیک گزارش شده است (Catelli et al. 2004, Cook 2000, Naylor et al. 1997). 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

Algharibeh 2007) نیز گسترده شد. در حال حاضر تیپ B متانومویروس پرندگان بیش‌ترین سهم آلودگی نومویروس را در گونه‌های مختلف پرندگان به خود اختصاص داده است . اصولاً در مرغ‌های مادر در کشورهای مختلف از واکسن‌های اتوژن علیه تیپ‌های شایع استفاده می شود. در ایران نیز در مرغ‌های مادر از زمان ورود واکسن متانومویروس از واکسن‌های متعلق به تیپ B استفاده شده است. انتشار تیپ B متانومویروس پرندگان 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 نومویروس (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 2000, Cook et al. 1991) و نیز انتشار تیپ B متانومویروس بیماری‌زا از پرندگان 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 متانومویروس پرندگان 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 2000, Owoade et al. 2008, Youn et al. 2010) 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 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 متانومویروس پرندگان در جوجه‌های گوشتی دلیل بر عدم وجود تیپ-های دیگر متانومویروس پرندگان 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 تعیین کننده‌ی تیپ‌های شایع و غالب متانومویروس در یک کشور باشد اما باید در نظر داشت که با توجه به امکان موتاسیون در این ویروس پایش مکرر تیپ‌های متانومویروس پرندگان 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 متانومویروس پرندگان در ایران علاوه بر پایش مکرر، از سویه‌های اتوژن منطقه برای ایمنی‌زایی علیه سویه‌های موجود در ایران استفاده شود.

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-incidence 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 Bozorgmehrifard, 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. 13th 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.[1]; Gholami-Ahangaran, M.[2] and Momtaz, H.[3]

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