

ردیابی گاما کرونا ویروس‌ها در بازار پرندگان زنده، تهران، ۱۳۹۹

زهرا ضیافتی کافی^۱، حسین حسینی^۲، آرش قلیان چی لنگرودی^۱، محمد عبدالشاه^۳، عابد میرباقری^۱، علی هژبر راجعونی^۱، ناصر صدری^۱، حمیده نجفی^{۱*}

۱- گروه میکروبیولوژی و ایمونشناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲- گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران.
۳- بخش تشخیص و تحقیقات بیماری‌های طیور، مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۲۱ مهر ۱۴۰۰، بازنگری: ۲۵ آذر ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۱ دی ۱۴۰۰

چکیده

ویروس برونشیت عفونی یک گاما کرونا ویروس است که مسئول خسارات اقتصادی سنگین به صنعت پرورش طیور در سراسر جهان است. ماکیان (*Gallus gallus*) میزبان طبیعی اصلی این ویروس می‌باشند اما کرونا ویروس‌های مشابه با ویروس برونشیت عفونی در گونه‌های مختلفی از پرندگان یافت می‌شوند. به منظور تعیین نقش گونه‌های مختلف پرندگان در همه‌گیرشناسی ویروس برونشیت عفونی، مطالعه حاضر به ردیابی گاما کرونا ویروس‌ها در بازار پرندگان تهران می‌پردازد. سواب‌های کلوآک از سه گونه پرنده شامل ماکیان، اردک و بوقلمون اخذ شد، سپس RNA با استفاده از کیت استخراج CinnaPure استخراج و در نهایت DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت RevertAid First strand ساخته شد. آزمون‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به منظور تکثیر ژن‌های اسپایک و نوکلئوکپسید گاما کرونا ویروس‌ها مورد استفاده واقع شد. این واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز موفق به ردیابی ژن اسپایک و ژن نوکلئوکپسید گاما کرونا ویروس‌ها به ترتیب در ۴۰ درصد از ماکیان و همچنین در ۶۶/۶ درصد از بوقلمون‌ها شد. تحلیل شجره‌شناسی نشان داد گاما کرونا ویروس‌های یافت شده در بوقلمون‌ها بسیار مشابه تیپ ۴/۹۱ ویروس برونشیت عفونی طیور بودند. این مطالعه بیانگر گردش گاما کرونا ویروس‌ها در گونه‌های مختلف پرندگان در بازار پرندگان می‌باشد که در مطالعات همه‌گیرشناسی آتی حائز اهمیت است، همچنین بر مبنای نتایج به دست آمده، ردیابی ژن نوکلئوکپسید نسبت به ژن اسپایک جهت غربالگری گاما کرونا ویروس‌ها کارآمدتر می‌باشد.

واژگان کلیدی: اردک، ایران، بوقلمون، ردیابی مولکولی، ویروس‌های شبه کرونا

مقدمه

ژنوم کروناویروس به اندازه تقریبی ۳۰ کیلوباز، بزرگ‌ترین ژنوم در بین RNA ویروس‌ها است. ژنوم، سنس مثبت و دارای کلاهک در انتهای ۵' و دم پلی‌آدنیل در انتهای ۳' است که به آن اجازه می‌دهد به‌عنوان یک mRNA جهت ترجمه پلی‌پروتئین‌های رپلیکاز عمل نماید. ژن رپلیکاز که کدکننده پروتئین‌های غیر ساختاری است دو سوم ژنوم (تقریباً ۲۰ کیلوباز) را اشغال نموده، در حالی که پروتئین‌های ساختمانی و پروتئین‌های فرعی در مجموع ۱۰ کیلوباز از ژنوم را تشکیل می‌دهند. انتهای ۵' ژنوم دارای توالی پیشرو و نواحی غیر قابل ترجمه می‌باشد که ساختارهای حلقه-ساقه مورد نیاز جهت تکثیر RNA و نسخه‌برداری در آن قرار دارند. به علاوه در ابتدای هر ژن ساختمانی یا ژن فرعی، توالی‌های تنظیم‌کننده نسخه‌برداری وجود دارد که برای بیان هر یک از این ژن‌ها لازم است. ناحیه غیر قابل ترجمه ۳' نیز دارای ساختارهای RNA است که جهت تکثیر و سنتز RNA ویروسی مورد نیاز است. ساختار ژنومی کروناویروس‌ها شامل ۵'-پیشرو-ناحیه غیر قابل ترجمه-رپلیکاز-اسپایک (S)-غشا (E)-ممبران (M)-نوکلئوکپسید (N)-ناحیه غیر قابل ترجمه ۳'-دم پلی‌آدنیل و همچنین ژن‌های فرعی قرار گرفته مابین ژن‌های ساختاری در انتهای ۳' ژنوم می‌باشد. ژن‌های فرعی برای تکثیر در کشت سلول ضروری نمی‌باشند، اما برخی از آنها در بیماری‌زایی ویروس نقش اساسی دارند (۱، ۲).

کروناویروس‌ها بر اساس ساختار ژنومی و ترتیب ژنی به چهار جنس آلفا، بتا، گاما و دلتا کروناویروس تقسیم می‌شوند. ویروس‌هایی که پرندگان را آلوده می‌کنند در دو جنس گاما و دلتا قرار می‌گیرند (۳). ویروس شاخص در جنس گاما کروناویروس ویروس برونشیت عفونی طیور می‌باشد که تا سال ۱۹۵۶

فقط سویه ماساچوست آن شناخته شده بود، اما امروزه واریانت‌های فراوانی از این ویروس در سراسر جهان وجود دارد. کروناویروس دیگری که طیور را آلوده می‌سازد کروناویروس بوقلمون است که در سال ۱۹۷۱ به‌عنوان عامل ایجاد "انتریت بوقلمون" یا بیماری "تاج آبی" شناخته شد. کروناویروس بوقلمون در جنس گاما کروناویروس از خانواده کروناویروس‌ها و راسته نیدوویرالز قرار دارد. طول ژنوم کروناویروس بوقلمون تقریباً ۲۷,۶۳۲ نوکلئوتید، به اضافه دم پلی‌آدنیل ۳' می‌باشد. ژنوم دارای دو قالب قرائت باز هم‌پوشان در دو سوم انتهای ۵' و تعدادی قالب قرائت در یک سوم انتهای ۳' می‌باشد. نواحی غیر قابل ترجمه در هر دو انتهای ژنوم وجود دارند. ژنوم کروناویروس بوقلمون از لحاظ ظرفیت کد کردن و ساختار ژنومی مشابه سایر کروناویروس‌هاست. ۱۱ قالب قرائت باز در این ژنوم دیده می‌شود. ژن ۱ کدکننده رپلیکاز ویروس بوده حاوی دو قالب قرائت باز 1a و 1b است. این ژن دارای موتیف‌هایی است که بین تمام کروناویروس‌ها مشترک است و حاوی توالی‌های تغییر قالب ریبوزومی می‌باشد. ژن‌های معمول ساختاری کروناویروس‌ها شامل ژن‌های کدکننده اسپایک (S)، غشایی کوچک (E یا 3c)، ممبران (M) و نوکلئوکپسید (N)، در ادامه ژن ۱ قرار دارند. ژنوم کروناویروس بوقلمون دارای ژن‌های پلی‌سیسترونیک ۳ و ۵ است که به ترتیب مابین ژن‌های S و E، و مابین ژن‌های M و N قرار می‌گیرند. در ژنوم ویروس برونشیت عفونی ژن ۳ تری سیسترونی و شامل 3a، 3b و 3c است که ژن 3c کدکننده پروتئین E است. ژن ۵ کدکننده دو محصول 5a و 5b که عملکرد آنها نامشخص است می‌باشد. قالب قرائت باز سوم بین ژن M و ژن 5a قرار داشته و با نام ORF X شناخته می‌شود. این قالب قرائت حاوی توالی‌های تنظیم‌کننده نسخه‌برداری است. به صورت

خلاصه ساختار ژنومی در کرونا ویروس بوقلمون بدین شرح می‌باشد (۴):

5'UTR-Gene 1(ORF 1a-1b)-S- Gene 3(ORFs 3a,3b, E)-M-Gene 5 (ORFs X, 5b,5c)-N-UTR3'

با وجود دهه‌ها تحقیق، محققین به تازگی به بررسی کرونا ویروس‌ها در جمعیت پرندگان وحشی پرداخته‌اند و چه بسا جمعیت متنوعی از کرونا ویروس‌ها در پرندگان وحشی بدون هیچ علامت بالینی حضور داشته باشند. این ویروس‌ها همگی متعلق به جنس‌های گاما و دلتا کرونا ویروس‌ها می‌باشند (۵). با توجه به اهمیت فراوان و خسارات اقتصادی سنگین ویروس برونشیت عفونی طیور در ایران و همچنین عدم وجود اطلاعات کافی در مورد حضور ویروس‌های مشابه این ویروس در گونه‌های مختلف پرندگان در ایران، تحقیق حاضر به بررسی حضور گاما کرونا ویروس‌ها در سه گونه از پرندگان بازار پرندگان تهران می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: در این مطالعه تعداد ۲۲ سواب کلوآک از سه گونه پرند شامل ماکیان، اردک و بوقلمون از پرندگان واقع در بازار پرندگان تهران اخذ گردید. نمونه‌ها شامل ۱۰ نمونه از ماکیان، ۶ نمونه از اردک‌ها و ۶ نمونه از بوقلمون‌ها بود و به صورت تصادفی از پرندگان فاقد علامت بالینی اخذ شد. حجم نمونه بر اساس میزان جمعیت و مطالعات فراوانی قبلی به دست آمد.

استخراج RNA و ساخت DNA مکمل: RNA با استفاده از کیت استخراج CinnaPure (سیناکلون، ایران) از نمونه‌های سواب استخراج گردید. خلوص RNA استخراج شده توسط خوانش نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین گردید. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی در حین استخراج استفاده گردید. ساخت DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت RevertAid First strand (ترموفیشر، امریکا) انجام شد.

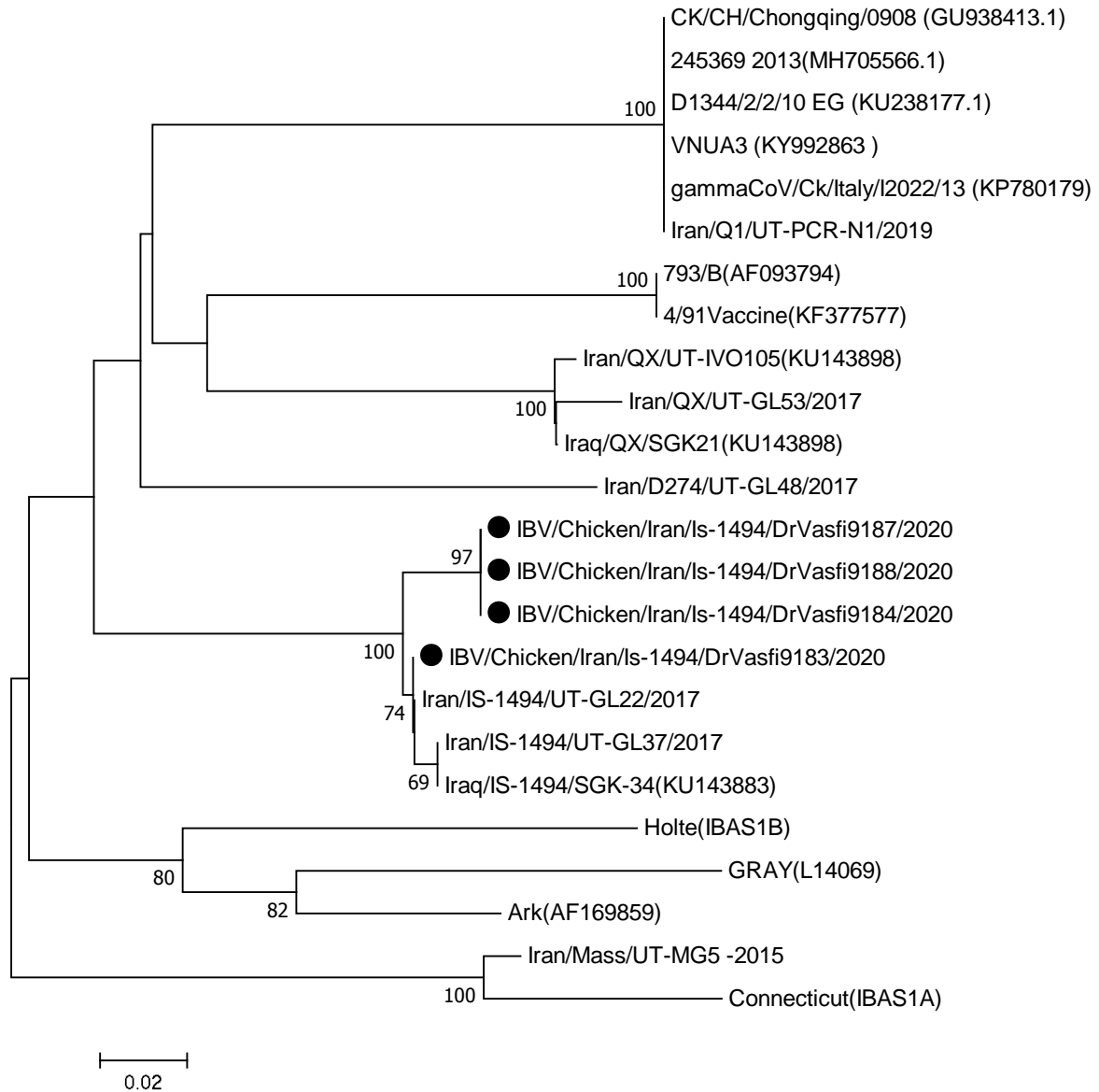
آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تکثیر ژن نوکلئوکپسید: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن نوکلئوکپسید عبارتند: از پرایمر فوروارد (CCT GAT GGT AAT TTC CGT TGG G معکوس (ACG CCC ATC CTT AAT ACC TTC) (CTC). چرخه حرارتی دستگاه به منظور انجام آزمون زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۴۰ چرخه واسرشت در دمای ۹۴^{°C} به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله اتصال در ۵۸^{°C} به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن در دمای ۷۲^{°C} به مدت ۴۵ ثانیه بود (۶).

آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای جهت تکثیر ژن اسپایک: ژن هدف شامل بخش فوق‌العاده متغیر ژن اسپایک بود. هر واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر که شامل ۲ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای SX1 و SX2، ۳ میکرولیتر از cDNA و ۱۳ میکرولیتر از مسترمیکس 2x سیناکلون بود. چرخه حرارتی شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۴^{°C} به مدت ۲ دقیقه و ۳۵ چرخه دناتورسازی در دمای ۹۴^{°C} به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸^{°C} به مدت ۳۰ ثانیه، و طویل‌سازی در دمای ۷۲^{°C} به مدت ۳۰ ثانیه بود. طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲^{°C} و زمان ده دقیقه انجام شد. مرحله دوم این آزمون با استفاده از یک میکرولیتر از رقت یک صدم از محصول مرحله اول و با استفاده از پرایمرهای SX3 و SX4 در چرخه حرارتی مشابه با مرحله اول انجام شد. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، در بافر TBE و با رنگ RedSafe با استفاده از اشعه فرابنفش مورد مشاهده واقع شدند.

تجزیه و تحلیل شجره‌شناسی: محصولات به دست آمده از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز توسط کیت AccuPrep (شرکت بیونیر، کره جنوبی) خالص‌سازی و به منظور تعیین توالی ارسال گشتند (شرکت بیونیر، کره جنوبی). سپس کروماتوگرام‌ها با نرم‌افزار CromasPro مورد تحلیل قرار گرفتند. توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های نوکلئوکپسید

شجره‌شناسی با استفاده از الگوریتم Neighnor-Joining رسم شد.

و اسپایک نمونه‌ها با سایر توالی‌های مرتبط که در بانک ژنی موجود بود مقایسه و فواصل ژنتیکی با استفاده از مدل کایمورا در نرم‌افزار MEGA محاسبه گشتند. درخت



شکل ۱- درخت شجره‌شناسی بر مبنای آنالیز بخشی از ژن اسپایک گاما کرونا ویروس‌های ردیابی شده در ماکیان بازار پرندگان تهران. از نسخه ۷ نرم افزار MEGA و روش neighbor-joining جهت ترسیم درخت استفاده شد. فواصل تکاملی با استفاده از روش کایمورا محاسبه گردید. ویروس‌های ردیابی شده در این مطالعه با علامت دایره مشکی نمایش داده شده‌اند.

ژن اسپایک بودند. از بین ۶ عدد نمونه اخذ شده از بوقلمون‌ها ۴ عدد (۶۶/۶ درصد) دارای نتیجه مثبت در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با هدف تکثیر ژن نوکلئوکپسید بودند و از ۶ نمونه اخذ شده از

نتایج

از بین ۱۰ عدد نمونه اخذ شده از ماکیان، ۴ نمونه (۴۰ درصد) دارای نتیجه مثبت در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای با هدف تکثیر

۲۰۱۷ از ایران و ۲۰۱۵ از عراق گزارش شدند (۷)، (جدول ۱ و شکل ۱). نمونه‌های مثبتی که در بوقلمون‌ها یافت شدند بیشترین میزان از شباهت را به یکدیگر و سپس به ژنوتیپ ۴/۹۱ و همچنین ژن نوکلئوکسپید سویه‌ای از کرونا ویروس بوقلمون که در سال ۲۰۰۸ در فرانسه جدا شد داشتند (۹) (جدول ۲ و شکل ۲).

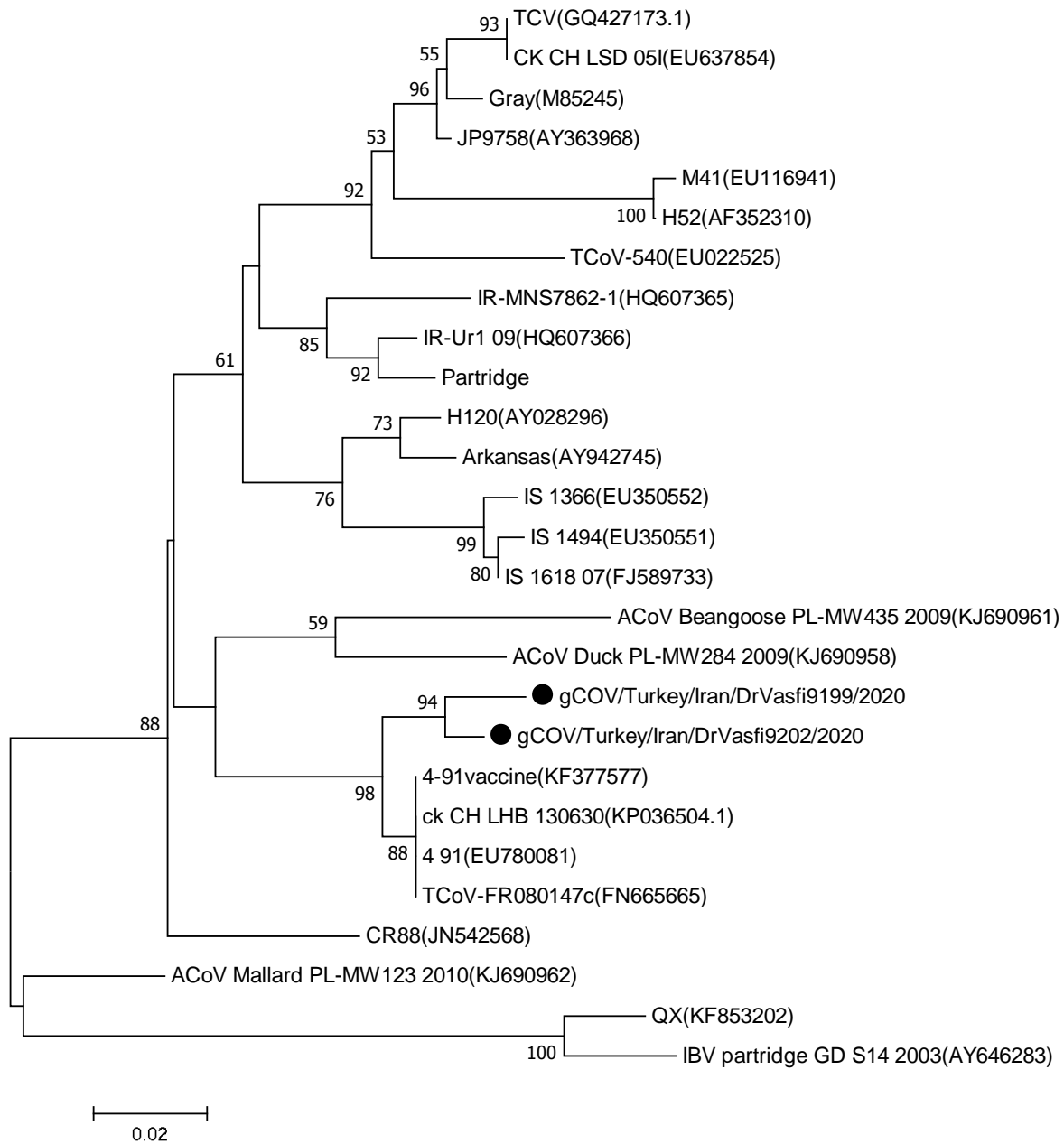
اردک‌ها مورد مثبتی در هیچ کدام از آزمون‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دیده نشد. از بین نمونه‌های مثبتی که از ماکیان گزارش شد ۳ نمونه دارای شباهت ۱۰۰ درصد با یکدیگر و شباهت ۹۷/۹۸ درصد با نمونه چهارم بودند. هر ۴ نمونه متعلق به واریانت ۲ (IS-1494) ویروس برونشیت عفونی پرندگان و دارای تشابه نوکلئوتیدی بسیار بالا با سویه‌هایی از واریانت ۲ بودند که در سال‌های

جدول ۱- درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن اسپایک گاما کرونا ویروس‌های ردیابی شده در ماکیان بازار پرندگان تهران با ویروس‌های برونشیت عفونی مرتبط

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	IBV/Chicken/Iran/Is-1494/DrVasfi9183/2020																
2	IBV/Chicken/Iran/Is-1494/DrVasfi9184/2020	97.98															
3	IBV/Chicken/Iran/Is-1494/DrVasfi9187/2020	97.98	100.00														
4	IBV/Chicken/Iran/Is-1494/DrVasfi9188/2020	97.98	100.00	100.00													
5	Iran/IS-1494/UT-GL22/2017	100.00	97.98	97.98	97.98												
6	Iran/IS-1494/UT-GL37/2017	99.50	97.46	97.46	97.46	99.50											
7	Iran/Q1/UT-PCR-N1/2019	79.77	77.76	77.76	77.76	79.77	79.04										
8	Iraq/IS-1494/SGK-34(KU143883)	99.50	97.46	97.46	97.46	99.50	100.00	79.04									
9	Iran/D274/UT-GL48/2017	81.34	79.33	79.33	79.33	81.34	80.67	77.33	80.67								
10	Iran/QX/UT-IVO105(KU143898)	81.96	79.95	79.95	79.95	81.96	81.29	76.71	81.29	77.41							
11	Iran/QX/UT-GL53/2017	80.63	78.57	78.57	78.57	80.63	79.94	75.32	79.94	76.73	97.96						
12	Iraq/QX/SGK21(KU143898)	82.60	80.63	80.63	80.63	82.60	81.95	76.71	81.95	78.09	99.50	98.48					
13	Iran/Mass/UT-MG5_-2015	80.04	79.33	79.33	79.33	80.04	79.36	72.24	79.36	76.56	73.15	72.42	73.88				
14	D1344/2/2/10_EG_(KU238177.1)	79.77	77.76	77.76	77.76	79.77	79.04	100.00	79.04	77.33	76.71	75.32	76.71	72.24			
15	CK/CH/Chongqing/0908_(GU938413.1)	79.77	77.76	77.76	77.76	79.77	79.04	100.00	79.04	77.33	76.71	75.32	76.71	72.24	100.00		
16	245369_2013(MH705566.1)	79.77	77.76	77.76	77.76	79.77	79.04	100.00	79.04	77.33	76.71	75.32	76.71	72.24	100.00	100.00	
17	4/91Vaccine(KF377577)	79.86	77.72	77.72	77.72	79.86	79.14	78.67	79.14	79.93	81.22	80.55	81.22	69.12	78.67	78.67	78.67

جدول ۲- درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن نوکلئوکسپید گاما کرونا ویروس‌های ردیابی شده در بوقلمون‌های بازار پرندگان تهران با ویروس‌های برونشیت عفونی مرتبط

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	gCOV/Turkey/Iran/DrVasfi9199/2020										
2	gCOV/Turkey/Iran/DrVasfi9202/2020	97.90									
3	TCV(GQ427173.1)	87.91	88.88								
4	H120(AY028296)	88.31	89.30	93.51							
5	IS_1494(EU350551)	87.81	88.81	90.68	96.14						
6	CR88(JN542568)	90.76	92.17	89.83	91.66	91.66					
7	4-91vaccine(KF377577)	97.05	97.48	89.83	90.21	89.72	93.07				
8	QX(KF853202)	77.36	79.09	79.03	80.65	82.84	81.17	80.12			
9	4_91(EU780081)	97.05	97.48	89.83	90.21	89.72	93.07	100.00	80.12		
10	TCoV-540(EU022525)	87.91	88.40	93.48	91.20	89.26	88.86	89.83	80.16	89.83	
11	TCoV-FR080147c(FN665665)	97.05	97.48	89.83	90.21	89.72	93.07	100.00	80.12	100.00	89.83



شکل ۲- درخت شجره‌شناسی بر مبنای آنالیز بخشی از ژن نوکلئوکپسید گاما کرونا ویروس‌های ردیابی شده در بوقلمون‌های بازار پرندگان تهران. از نسخه ۷ نرم افزار MEGA و روش neighbor-joining جهت ترسیم درخت استفاده شد. فواصل تکاملی با استفاده از روش کایمورا محاسبه گردید. ویروس‌های ردیابی شده در این مطالعه با علامت دایره مشکی نمایش داده شده‌اند.

می‌باشند. بازارهای پرندگان می‌توانند به‌عنوان مخزن ویروس‌های مختلف عمل نمایند، و به دلیل تنوع میزبانی، ویروس‌ها قادرند به سرعت گسترش یافته، در نتیجه این بازارها محل مناسبی برای نوترکیبی ویروسی و انتقال بین گونه‌ای هستند (۶).

بحث و نتیجه‌گیری

کرونا ویروس‌ها عوامل ایجاد بیماری‌های مهمی همچون سندرم تنفسی خاورمیانه و سندرم فوق حاد تنفسی و همچنین برونشیت عفونی در طیور صنعتی

مطالعه حاضر به بررسی گاما کرونا ویروس های موجود در سه گونه از پرندگان بازار پرندگان تهران پرداخته است. نتایج حاصل مبین ردیابی ژن نوکلئوکپسید گاما کرونا ویروس ها در بوقلمون و تشابه بالای این ویروس ها هم با سایر گاما کرونا ویروس های یافت شده در بوقلمون و همچنین با ژنوتیپ ۴/۹۱ ویروس برونشیت عفونی پرندگان است. ابتلای بوقلمون ها توسط گاما کرونا ویروس در سایر مطالعات نیز مشاهده گشت. Villarreal و همکاران موفق به ردیابی کرونا ویروس بوقلمون در ۱۷ گله مبتلا به التهاب روده حاد و دو گله به ظاهر سالم شدند. گاما کرونا ویروس در ۸۲ درصد از گله های بیمار و ۵۰ درصد از گله های سالم ردیابی شد (۱۰). Jones و همکاران با بررسی نمونه های مشکوک بالینی موفق به ردیابی گاما کرونا ویروس در ۲۰ درصد از نمونه های بوقلمون شدند (۱۱). در مطالعه ای که بین سال های ۲۰۰۷ الی ۲۰۰۹ در فرانسه صورت گرفت ژن نوکلئوکپسید گاما کرونا ویروس بوقلمون در ۳۷ درصد از گله های دارای علائم انتریت دیده شد، در حالی که این نرخ در گله های فاقد علامت ۱۷ درصد گزارش شد (۹). Yu و همکاران نیز در گزارشی، شیوع کرونا ویروس بوقلمون را در در گله های مبتلا به انتریت، ۲۲ درصد عنوان نمودند (۱۲). همان گونه که از مطالعات بالا بر می آید گاما کرونا ویروس نه تنها در بوقلمون های مبتلا به انتریت، به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده این بیماری، و بلکه حتی در پرندگان فاقد علائم نیز ردیابی گردیده که همسو با نتایج حاصل از این مطالعه است.

همچنین شیوع گاما کرونا ویروس در ماکیان در ایران سابقه ای طولانی دارد. در مطالعه ای که بین سال های ۲۰۱۰ الی ۲۰۱۴ انجام گرفت شیوع این ویروس تقریباً ۷۰ درصد در بین طیور صنعتی گزارش گردید (۱۳). مطالعه بعدی که بین سال های

۲۰۱۴ الی ۲۰۱۵ انجام شد حاکی از شیوع ۶۰ درصدی ویروس در بین گله های مرغ گوشتی بود که این میزان در بین سال های ۲۰۱۵ الی ۲۰۱۷ به ۵۲ درصد رسید (۸). با در نظر گرفتن این مطالعات، شیوع ۴۰ درصد این ویروس در ماکیان دور از انتظار نمی باشد.

ارتباط نزدیک کرونا ویروس بوقلمون با ویروس برونشیت عفونی در سایر مطالعات نیز هم در مورد ژن نوکلئوکپسید و هم سایر ژن ها نیز مشاهده گشت که در ادامه به ذکر چند مورد از آنها می پردازیم. Maurel و همکاران نیز در گزارشی در سال ۲۰۰۸ ارتباط نزدیک کرونا ویروس بوقلمون یافت شده در فرانسه را با تیپ ۴/۹۱ ویروس برونشیت عفونی طیور ذکر نمودند (۱۴). Breslin و همکاران ثابت نمودند ژن های M و N سه کرونا ویروس جدا شده از بوقلمون ها در آمریکا دارای شباهت بیش از ۹۰ درصدی با همین ژن ها در ویروس برونشیت عفونی بوده و همچنین ژن ۵ (واقع در بین ژن های M و N) ناحیه غیر قابل ترجمه ۳ این ویروس ها کاملاً مشابه این ژن ها در ویروس برونشیت عفونی بوده است. علاوه بر این، درصد تفاوتی که بین این جدایه ها یافت شده بود مشابه همان درصدی از اختلاف است که بین جدایه های ویروس برونشیت عفونی وجود دارد. همچنین این محققین به بیان تشابه بالای ناحیه غیر قابل ترجمه ۳ کرونا ویروس بوقلمون و ویروس برونشیت عفونی پرداختند (۱۵). Lin و همکاران درصد بالایی از تشابه (۹۲-۸۲ درصد) بین ژن های ۳، M، ۵ و N یک سویه کرونا ویروس بوقلمون با ویروس برونشیت یافتند (۱۷). علاوه بر این گزارشی مبنی بر تشابه فراوان بین ژن پلیمرز کرونا ویروس بوقلمون و ویروس برونشیت عفونی وجود دارد (۱۸). افزون بر تشابهات ژنتیکی، Lin و همکاران مشاهده نمودند ۱۸ جدایه کرونا ویروس بوقلمون دارای الگوی واکنش پذیری

رابطه نزدیک این ویروس‌های با سویه واکسینال ماساچوست ویروس برونشیت عفونی بود (۲۱). ژن RNA پلیمراز وابسته به RNA گاما کروناویروس‌ها در ۱۸ گونه از پرندگان وحشی (غاز، اردک، مرغ دراز پا، مرغ نوروژی، پنگوئن) در تنگه برینگ ردیابی شد و تجزیه شجره‌شناسی حاکی از ارتباط بسیار نزدیک این سویه‌ها با ویروس برونشیت عفونی بود (۲۲). همچنین ژن RNA پلیمراز وابسته به RNA در پرندگان وحشی مهاجر در کره جنوبی ردیابی و ارتباط آنها با ویروس برونشیت عفونی اثبات گردید (۲۳).

این مطالعه بیانگر گردش گاما کروناویروس‌ها در گونه‌های مختلف پرندگان در بازار پرندگان می‌باشد که در مطالعات همه‌گیر شناسی آتی حائز اهمیت است. نکته دیگر آن که بر طبق نتایج پرایمرهای طراحی شده جهت تکثیر ژن نوکلئوکپسید در ردیابی گاما کروناویروس‌ها در پرندگان توانمند بوده و این مسأله پیش از این از سوی Suryaman و همکاران نیز مطرح شد. آنها با انجام آزمون تکمیلی ایمونوهیستوشیمی ثابت کردند پرایمرهایی که ژن نوکلئوکپسید را هدف قرار می‌دهند قدرت ردیابی بیشتری نسبت به پرایمرهایی دارند که ژن اسپایک را تکثیر می‌کنند (۲۰).

References

1- Jogalekar MP, Veerabathini A, Gangadaran P. Novel 2019 coronavirus: Genome structure, clinical trials, and outstanding questions. *Experimental Biology and Medicine*. 2020; 245(11): 964-9.

2- Zhou Z, Qiu Y, Ge X. The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. *Animal Diseases*. 2021; 1(1): 1-28.

3- Torres C, Listorti V, Lupini C, Franzo G, Drigo M, Catelli E, et al. Gamma and Deltacoronaviruses in quail and pheasants from Northern Italy. *Poultry science*. 2017; 96(3): 717-22.

آنتی‌ژنیک یکسان در برابر پنل آنتی‌بادی‌های مشابه بودند. واکنش پذیری مثبت با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال در برابر جدایه‌های کروناویروس بوقلمون و سویه ماساچوست ویروس برونشیت عفونی مشاهده گردید (۱۹).

بنابر نتایج این مطالعه و سایر مطالعات مذکور، کروناویروس بوقلمون ارتباط نزدیکی با ویروس برونشیت عفونی داشته و این موضوع تنها مختص گونه بوقلمون نبوده و گاما کروناویروس‌هایی که در انواع مختلفی از پرندگان یافت می‌شوند معمولاً دارای شباهت زیادی با ویروس برونشیت عفونی می‌باشند. مطالعه‌ای در اندونزی صورت گرفت و به ردیابی دو ژن اسپایک و نوکلئوکپسید گاما کروناویروس در طوطی‌سانان پرداخت. از ۱۸ گله نمونه‌برداری شده یک جواب مثبت در آزمون زنجیره‌ای پلیمراز ژن اسپایک و ۵ واکنش مثبت در مورد ژن نوکلئوکپسید مشاهده گشت. تجزیه و تحلیل شجره‌شناسی تشابه بسیار بالای ویروس‌های ردیابی شده را با ژنوتیپ ۴/۹۱ ویروس برونشیت عفونی نشان داد (۲۰). Hughes و همکاران در مطالعه‌ای به ردیابی ناحیه غیر قابل ترجمه ۳' گاما کروناویروس در جمعیت پرندگان وحشی شمال انگلستان پرداختند و تحلیل شجره‌شناسی بیانگر

4- Wang Y, Cui X, Chen X, Yang S, Ling Y, Song Q, et al. A recombinant infectious bronchitis virus from a chicken with a spike gene closely related to that of a turkey coronavirus. *Archives of virology*. 2020; 165(3): 703-7.

5- Wille M, Holmes EC. Wild birds as reservoirs for diverse and abundant gamma- and deltacoronaviruses. *FEMS microbiology reviews*. 2020; 44(5): 631-44.

6- Yaghoubi H, Ghalyanchilangeroudi A, Karimi V, Ghafouri S, Hashemzadeh M, Hosseini H, et al. Molecular detection of gamma coronaviruses in bird parks of Iran. *Archives of Razi Institute*. 2019; 74(4): 349-55.

7- Seger W, Ghalyanchi Langeroudi A, Karimi V, Madadgar O, Marandi MV, Hashemzadeh M. Genotyping of infectious bronchitis viruses from broiler farms in Iraq during 2014-2015. *Archives of virology*. 2016; 161(5): 1229-37.

8- Hamadan AM, Ghalyanchi Langeroudi A, Hashemzadeh M, Hosseini H, Karimi V, Yahyaraeyat R, et al. Genotyping of Avian infectious bronchitis viruses in Iran (2015–2017) reveals domination of IS-1494 like virus. *Virus research*. 2017; 240: 101-6.

9- Maurel S, Toquin D, Quéguiner M, Men MI, Allée C, Lamandé J, et al. Molecular identification and characterization of a turkey coronavirus in France. VI International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens, Rauschholzhausen, Germany, 14-17 June 2009; 2009: VVB Laufersweiler Verlag.

10- Villarreal L, Assayag M, Brandão P, Chacón J, Astolfi-Ferreira C, Gomes C, et al. Identification of turkey astrovirus and turkey coronavirus in an outbreak of poult enteritis and mortality syndrome. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 2006; 8(2): 131-5.

11- Jones R, Ellis R, Cox W, Errington J, Fuller C, Irvine R, et al. Development and validation of RT-PCR tests for the detection and S1 genotyping of infectious bronchitis virus and other closely related gammacoronaviruses within clinical samples. *Transboundary and emerging diseases*. 2011; 58(5): 411-20.

12- Yu M, Ismail M, Qureshi M, Dearth R, Barnes H, Saif Y. Viral agents associated with poult enteritis and mortality syndrome: the role of a small round virus and a turkey coronavirus. *Avian diseases*. 2000; 297-304.

13- Hosseini H, Fard MHB, Charkhkar S, Morshed R. Epidemiology of avian infectious bronchitis virus genotypes in Iran (2010–2014). *Avian diseases*. 2015; 59(3): 431-5.

14- Maurel S, Toquin D, Briand F-X, Quéguiner M, Allee C, Bertin J, et al. First full-length sequences of the S gene of European isolates

reveal further diversity among turkey coronaviruses. *Avian pathology*. 2011; 40(2): 179-89.

15- Breslin JJ, Smith LG, Fuller FJ, Guy JS. Sequence analysis of the turkey coronavirus nucleocapsid protein gene and 3' untranslated region identifies the virus as a close relative of infectious bronchitis virus. *Virus research*. 1999; 65(2): 187-93.

16- Breslin JJ, Smith LG, Fuller FJ, Guy JS. Sequence analysis of the matrix/nucleocapsid gene region of turkey coronavirus. *Intervirology*. 1999; 42(1): 22-9.

17- Lin TL, Loa CC, Wu CC. Complete sequences of 3' end coding region for structural protein genes of turkey coronavirus. *Virus research*. 2004; 106(1): 61-70.

18- Stephensen CB, Casebolt DB, Gangopadhyay NN. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus research*. 1999; 60(2): 181-9.

19- Lin TL, Loa CC, Wu CC, Bryan T, Hooper T, Schrader D. Antigenic relationship of turkey coronavirus isolates from different geographic locations in the United States. *Avian diseases*. 2002; 46(2): 466-72.

20- Suryaman GK. Identification and Pathomorphological Study of Avian Coronavirus in Chicken and Several Psittacine Species: *IPB University*; 2021.

21- Hughes LA, Savage C, Naylor C, Bennett M, Chantrey J, Jones R. Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England. *Emerging infectious diseases*. 2009; 15(7): 1091.

22- Muradrasoli S, Bálint Á, Wahlgren J, Waldenström J, Belák S, Blomberg J, et al. Prevalence and phylogeny of coronaviruses in wild birds from the Bering Strait area (Beringia). *PLoS One*. 2010; 5(10): e13640.

23- Kim H-R, Oem J-K. Surveillance of avian coronaviruses in wild bird populations of Korea. *Journal of wildlife diseases*. 2014; 50(4): 964-8.

Detection of Gammacoronaviruses from live bird markets, Tehran, 2020

Zahra Ziafati Kafi¹, Hossein Hosseini², Arash Ghalyanchi Langeroudi¹, Mohammad Abdoshah³, Abed Mirbagheri¹, Ali Hojbar Rajeouni¹, Naser Sadri, Hamideh Najafi^{1*}

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

2 - Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran.

3 - Department of Avian Disease Research and Diagnostic, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Receive: October 13, 2021; Revise: December 16, 2021; Accept: January 1, 2022

Summary

Infectious Bronchitis Virus is a Gammacoronavirus responsible for huge economic loss to poultry industry worldwide. Poultry (*Gallus gallus*) is the major host of the virus, but IBV-like coronaviruses can infect different species of birds. To determine the role of different bird species in infectious bronchitis virus epidemiology, this work was conducted to detect Gammacoronaviruses in Tehran live bird market. Cloacal swabs were collected from three bird species including poultry, duck and turkey; the RNA was extracted by CinnaPure isolation kit; subsequently the complementary DNA was synthesized by RevertAid First strand kit. Polymerase chain reactions targeting two genes of the nucleocapsid and the spike were run on complementary DNAs synthesized in the previous step. Polymerase chain reactions successfully detected the spike and the nucleocapsid genes in 40% of poultry and 66.6% of turkeys, respectively. Phylogenetic analysis showed that the gammacoronaviruses detected in this work were closely related to infectious bronchitis virus type 4/91. This work also introduced the circulation of gammacoronaviruses in different bird species from a bird market. This issue could be significant in the future epidemiologic studies. The findings also described that the nucleocapsid gene detection is much more effective than the spike gene detection in terms of gammacoronavirus monitoring.

Keywords: *Duck, Iran, Turkey, Molecular detection, Corona-like viruses*

