



مطالعه توالی و شجره‌شناسی دو جدایه ویروس آبله مرغان جدا شده از مرغان تخم‌گذار و جرب قرمز (درمانیسوس گالینه) در سال ۱۳۹۵

نوا ارم^۱، سید مصطفی پیغمبری^۱، سید احمد مدنی^۲، جمشید رزم یار^۱، عباس برین^۱

^۱ گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ گروه بهداشت، پرورش و تغذیه دام و طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

doi 10.22059/jvr.2019.253199.2770

تاریخ دریافت: ۱ دی ماه ۱۳۹۸، تاریخ پذیرش: ۳ اسفند ماه ۱۳۹۸

چکیده

زمینه مطالعه: این مطالعه در رابطه با بررسی توالی و شجره‌شناسی ویروس‌های آبله مرغان جدا شده در ایران می‌باشد.

هدف: مطالعه حاضر با هدف تعیین هویت دو جدایه ویروس آبله شامل نمونه‌ی بافتی جراحات تیپیک آبله مرغان و دیگری نمونه جرب درمانیسوس گالینه صورت گرفت. آبله در طیور صنعتی موجب خسارات اقتصادی زیادی مانند کاهش رشد و وزن‌گیری، کاهش تولید تخم مرغ، کوری و افزایش مرگ و میر می‌شود. ویروس آبله می‌تواند با تماس مستقیم و یا تماس غیرمستقیم از طریق ناقل‌هایی هم‌چون جرب و مگس نیز انتقال یابد. جرب درمانیسوس گالینه مهم‌ترین انگل خارجی طیور خصوصاً طیور تخم‌گذار محسوب می‌شود. علاوه بر خسارات مهم اقتصادی، به عنوان ناقل شماری از عوامل بیماری‌زا مطرح است.

روش کار: هر دو جدایه جداگانه به تخم مرغ‌های جنین‌دار تلقیح شدند و به کمک پرایمر اختصاصی ژن 4b ویروس آبله تکثیر، تعیین توالی و مورد تجزیه و تحلیل شجره‌شناسی قرار گرفتند.

نتایج: هر دو جدایه ضایعات پوک در لایه کوریوآلانتویک تخم مرغ‌های جنین دار ایجاد نمودند و در واکنش PCR، قطعه ۵۷۸ جفت باز را تکثیر نمودند. ارزیابی توالی نوکلئوتیدی قطعه تکثیر شده ژن 4b نشان داد که هر دو جدایه ۱۰۰ درصد مشابه بوده و در یک دسته قرار گرفتند. همچنین توالی نوکلئوتیدی این دو جدایه تشابه حدود ۷۳ الی ۱۰۰ درصد را با سایر جدایه‌های انتخاب شده از بانک ژنی داشتند.

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج این تحقیق نشان داد جرب درمانیسوس گالینه می‌تواند به عنوان ناقلی مهم در انتقال بیماری آبله پرندگان نقش داشته باشد. لذا کنترل جرب قرمز طیور در فارم‌ها نه تنها می‌تواند مشکلاتی همچون خونخواری، کاهش تولید و کاهش میزان رشد را مهار کند بلکه باعث کاهش انتقال بیماری‌ها و عوامل بیماری‌زا در فارم‌ها نیز خواهد شد.

کلمات کلیدی: آبله پرندگان، ژن 4b، درمانیسوس گالینه، طیور تخم‌گذار، شجره‌شناسی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: سید مصطفی پیغمبری، گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: mpeigham@ut.ac.ir

مقدمه

بیماری آبله پرندگان، یک بیماری ویروسی شایع در گونه‌های مختلف پرندگان اهلی و وحشی می‌باشد به طوری که ۲۳۲ گونه از ۲۳ شاخه پرندگان شناخته‌شده در جهان تا به امروز به صورت طبیعی به این ویروس مبتلا شده‌اند (۲). ویروس آبله پرندگان تنها جنسی از ویروس خانواده آبله است که گونه‌ای غیر از پستانداران را مبتلا می‌کند. بیماری آبله پرندگان به دو فرم اصلی بروز می‌کند،

فرم جلدی و فرم دیفتریک. فرم جلدی سبب ضایعات جلدی بر روی پوست و نقاط بدون پر بدن مانند منقار، پلک‌ها، گوشه چشم و پاها می‌شود و فرم دیفتریک آن نیز با ضایعاتی در غشاهای موکوسی بدن مانند دهان، حلق، مری و نای همراه است. همچنین هر دو فرم جلدی و دیفتریک ممکن است در یک پرنده رخ دهد. فرم سیستمیک بیماری نیز در قناری‌ها به دلیل آسیب‌های شدید ریوی

آمده از نمونه‌ی بافتی دارای جراحات تبییک آبله مرغان و از نمونه جرب درمانیسوس گالینه از همان گله آلوده به آبله صورت گرفت.

مواد و روش کار

نمونه برداری: ضایعات پوستی و ندول‌های روی پوست سه قطعه مرغ تخم‌گذار تلف شده از بیماری با علائم کالبدگشایی آبله مرغان و حدود ۵۰ جرب موجود در فارم نمونه‌برداری شدند. نمونه‌ها از یک گله تخم‌گذار تجاری ۶۰ هفته نژاد LSL در اطراف تهران با تلفات روزانه ۳۰ الی ۵۰ قطعه در روز و مشکوک به بیماری آبله مرغان تهیه شدند. گله مذکور علیه بیماری آبله واکسینه شده بود ولی نشانه‌های ضایعات جلدی مشابه آبله به صورت ندول‌های پرولیفراتیو پوستی در تمام سطح بدن مرغان مشاهده شد. از دیگر نکات قابل توجه آلودگی شدید این گله به جرب درمانیسوس گالینه بود.

تلقیح لایه کوریوآلانتوتیک و جداسازی ویروس: هر نمونه بافتی و هر نمونه جرب جداگانه بعد از هموژنیزه شدن توسط PBS شامل پنسیلین (۵۰ واحد در میلی لیتر) و استرپتومایسین (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) در دور ۴۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی هر نمونه داخل لایه کوریوآلانتوتیک تخم مرغ‌های جنین دار ۹-۱۱ روزه تلقیح شد. تخم مرغ‌ها به مدت ۷-۵ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و سپس برای دیدن ضایعات Pock مورد بررسی قرار گرفتند (۱۱،۱۲).

استخراج DNA: برای استخراج DNA ویروس از کیت شرکت MBST ایران (Rapid Genomic DNA Isolation Kit) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. هر نمونه با PBS مخلوط و هموژنیزه و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی با ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K و ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیزه‌کننده مخلوط شد و به میزان ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. بعد به محلول فوق ۳۶۰ میکرولیتر بافر متصل شونده و ۲۷۰ میکرولیتر اتانول اضافه شد. محلول حاصل به Spin column اضافه گردید و در دور ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو دهنده به Spin column اضافه شد و مجدداً طبق دستور قبلی سانتریفیوژ شد. در پایان DNA ویروس با اضافه نمودن ۷۰ میکرولیتر Elution buffer و گرمخانه‌گذاری

با تلفات بالا رخ می‌دهد (۲۱). بیماری آبله در طیور صنعتی موجب خسارات اقتصادی زیادی مانند کاهش رشد و وزن‌گیری، کاهش تولید تخم مرغ، کوری و افزایش مرگ و میر می‌شود. واکسیناسیون با واکسن‌های زنده از دیرباز برای کنترل بیماری و کاهش خسارات ناشی از بیماری به کار رفته است اما در سال‌های اخیر گزارش‌های متعددی از درگیری مجدد گله‌های واکسینه‌شده با بیماری آبله ارائه شده است (۵).

عامل ویروسی بیماری آبله می‌تواند با تماس مستقیم و یا تماس غیرمستقیم از طریق حاملانی مانند جرب و مگس نیز انتقال یابد (۱۶). جرب قرمز طیور، درمانیسوس گالینه یک خطر جدی برای طیور تخم‌گذار در بسیاری از نقاط جهان از جمله ایالات متحده آمریکا، اروپا، ژاپن و چین محسوب می‌شود. ضررهای اقتصادی ناشی از کاهش تولید و کنترل این جرب در صنعت تخم مرغ اتحادیه اروپا سالانه حدود ۱۳۰ میلیون یورو تخمین زده شده است و این رقم در بسیاری از نقاط جهان نیز بیش از این برآورد می‌شود (۱۹). در سال‌های اخیر مطالعاتی در خصوص بیماری آبله پرندگان در ایران و شیوع و خسارات اقتصادی ناشی از جرب قرمز طیور در فارم‌های تخم‌گذار ایران و طیور بومی صورت گرفته است. به طوری که ادعا شده است بیش از ۸۰ درصد فارم‌های تخم‌گذار ایران به این جرب آلوده هستند (۱۷،۲۰). در خصوص طیور بومی، Gholami و Ahangaran و همکاران در سال ۲۰۱۴، تعداد ۳۲۸ قطعه مرغ بومی در نواحی غرب ایران که علائم آبله (شامل ضایعات جلدی و مخاطی) را نشان می‌دادند بررسی نمودند و ۶۶/۱ و ۸۰/۷ درصد از موارد مشکوک به آبله را به ترتیب با روش هیستوپاتولوژی و PCR مثبت گزارش کردند و همچنین PCR را به عنوان روش مناسبی برای تشخیص آبله پرندگان مورد تأیید قرار دادند (۶). Norouziان و همکاران در سال ۲۰۱۷، نیز همه‌گیری آبله پرندگان در مرغان بومی حومه خرم‌آباد با میزان ابتلای ۵۰ درصد و تلفات ۵ تا ۲۰ درصد را مورد بررسی آسیب‌شناسی و مولکولی قرار دادند (۱۴).

آلودگی با جرب درمانیسوس گالینه می‌تواند منجر به استرس شدید مرغان تخم‌گذار، مشکلات پوستی شدید و به دنبال آن موجب کاهش وزن پرند و کاهش کمی و کیفی تولید تخم مرغ در پرندگان شود. علاوه بر این درمانیسوس گالینه به عنوان ناقل و مخزن چندین عامل بیماری‌زای باکتریایی و ویروسی مطرح است و می‌تواند موجب انتقال بسیاری از عوامل بیماری‌زا شود (۱).

مطالعه حاضر با هدف تعیین هویت دو جدایه ویروس آبله بدست

از SEQAID II انجام شد. کلیه مواد مصرفی واکنش PCR از شرکت سیناکلون تهیه شدند.

تعیین توالی و آنالیز فیلوژنتیک: فرآورده PCR با وزن ۵۷۸ جفت باز ژن 4b مربوط به دو جدایه یکی از نمونه بافتی جراحات تیپیک آبله مرغان و دیگری از نمونه جرب با استفاده از کیت تجاری AccuPrep[®] DNA Gel Purification Kit شرکت Bioneer کره جنوبی خالص سازی شدند و برای تعیین توالی از دو جهت به شیوه اتوماتیک و با استفاده از پرایمرهای مشابه واکنش PCR به شرکت Bioneer ارسال شدند. هم‌ردیف‌سازی توالی‌های حاصل به کمک نرم افزارهای مربوطه در کنار توالی‌های انتخاب شده از بانک ژن از جمله توالی‌های مربوط به ویروس‌های آبله موجود در بانک ژن انجام گرفت. درخت‌های شجره‌شناسی بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی ژن 4b با استفاده از روش Neighbor joining در نرم افزار CLC Main Workbench 8 ترسیم شدند. توالی‌های مربوط به جدایه‌های تعیین هویت شده FPVIR1 و FPVIR8 در مطالعه حاضر در بانک ژن موجود هستند و شماره‌های دسترسی آن‌ها به ترتیب MG787211 و MG787218 می‌باشند.

نتایج

کلیه نمونه‌ها در آزمون PCR برای قطعه ۵۷۸ جفت باز ژن 4b مثبت بودند، بنابراین آلودگی نمونه‌ها به ویروس عامل بیماری آبله مورد تأیید قرار گرفت. همین‌طور هر دو جدایه در لایه کوریوآلانتوتیک تخم مرغ جنین‌دار ضایعه پوک ایجاد کردند. درخت شجره‌شناسی دو جدایه این مطالعه که یکی از نمونه بافتی جراحات تیپیک آبله مرغان و دیگری از نمونه جرب قرمز طیور بود بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی ژن 4b با ۱۲ جدایه دیگر ثبت شده در بانک ژنی مقایسه شدند. دو جدایه ویروس آبله با سایر جدایه‌های انتخاب‌شده از بانک ژنی شباهت حدود ۷۳ تا ۱۰۰ درصد را از خود نشان دادند. هر دو جدایه مورد مطالعه با یکدیگر و با دو جدایه دیگر مرغی و یک جدایه بوقلمون ۱۰۰ درصد شباهت داشتند (جدول ۱). بررسی شجره‌شناسی این دو جدایه و مقایسه آن‌ها با ۱۲ جدایه دیگر از بانک ژنی هفت دسته‌ی متفاوت را نشان داد. با توجه به شباهت ۱۰۰ درصد سکانس نوکلئوتیدی نمونه جدا شده از نمونه بافتی جراحات تیپیک آبله مرغان (FPVIR1)، نمونه جرب درمانیسوس گالینه (FPVIR8)، دو جدایه دیگر مرغی و یک جدایه بوقلمون همگی در کنار هم در یک شاخه درخت فیلوژنتیک قرار گرفتند (تصویر ۱).

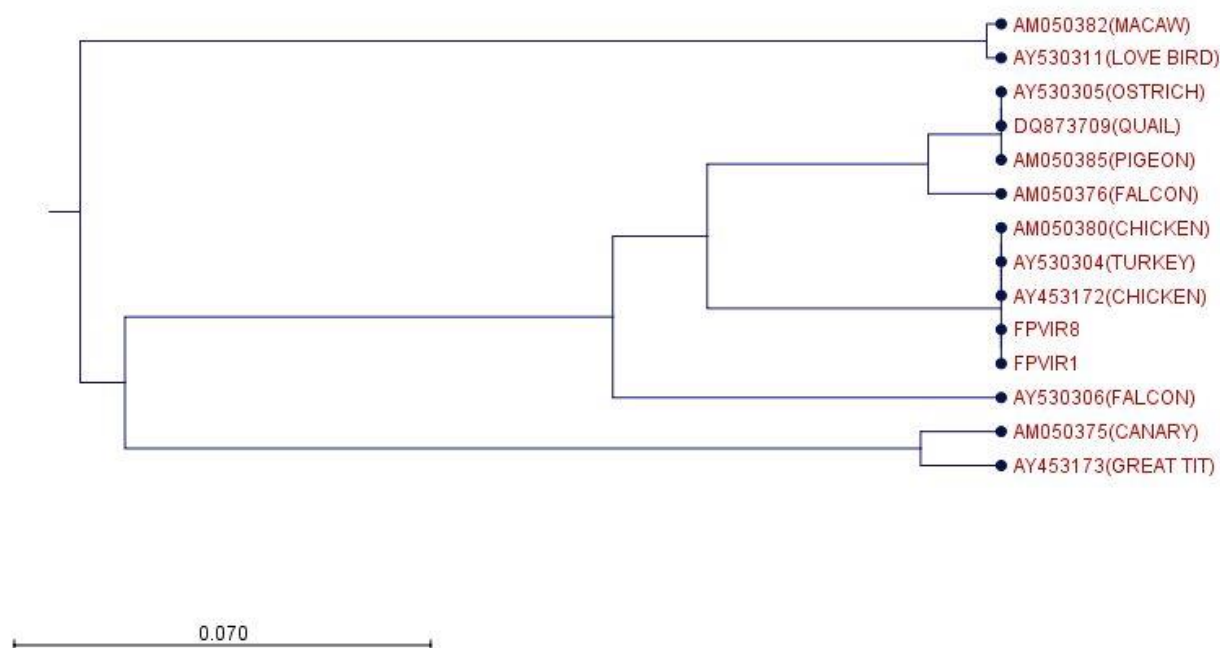
به مدت ۳ دقیقه و سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه استخراج شد.

واکنش (Polymerase Chain Reaction (PCR)

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از یک جفت پرایمر با توالی 5'-Forward: CAGCAGGTGCTAAACAACAA-3' و Reverse: 5'-CGGTAGCTTAACGCCGAATA-3' برای تکثیر قطعه‌ای از ژن 4b به اندازه ۵۷۸ جفت باز انجام شد (۹). مخلوط واکنش PCR برای هر نمونه بدین ترتیب تهیه شد: ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10x PCRbuffer، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط 10mM dNTPs، ۱/۲۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ میکرولیتر در پیکومول)، ۰/۷۵ میکرولیتر از 50mM MgCl₂، ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase (۵U/μl)، و ۲/۵ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده از نمونه مربوطه و سپس ۱۶ میکرولیتر آب دیونیزه استریل تا حجم ۲۵ میکرولیتر اضافه گردید. در کلیه واکنش‌ها، برای کنترل مثبت از واکسن آبله موسسه سرم و واکسن‌سازی رازی و برای کنترل منفی از آب دیونیزه به جای DNA الگو استفاده شد. میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر Labcycler 48, SensoQuest, Goettingen, Germany) قرار داده شدند و برنامه تکثیر بر اساس جداسازی اولیه به مدت ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد؛ و سپس ۳۵ سیکل شامل جداسازی به مدت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال به مدت یک دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، گسترش یا طولیل شدن به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در خاتمه مرحله طولیل شدن نهایی به مدت ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد (۱۵). محصولات PCR برای شناسایی قطعه ۵۷۸ جفت باز ژن 4b بر روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۷۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با ترکیب DNA Safe Stain (سیناکلون، تهران، ایران) رنگ‌آمیزی شدند. درانتها ژل با دستگاه ترانس ایلومیناتور با نور UV مورد بررسی قرار گرفت و عکس‌برداری انجام شد. از مارکر تجاری Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus ساخت شرکت Fermentas به عنوان استاندارد وزن ملکولی نیز در هر ژل استفاده شد. تعیین وزن مولکولی باندهای مشاهده شده با استفاده از نرم افزار (ver. 3.5, Kansas State University, US)

جدول ۱. درصد تشابه بین توالی اسید نوکلئیک ژن 4b ویروس آبله در دو جدایه این مطالعه با تعدادی دیگر از جدایه‌ها.

سویه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
FPVIR1	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۱/۵۵	۷۵/۱۲	۷۷/۷۸	۷۵/۳۶	۷۵/۶۰
FPVIR8	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۱/۵۵	۷۵/۱۲	۷۷/۷۸	۷۵/۳۶	۷۵/۶۰
AY530304 (TURKEY)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۱/۵۵	۷۵/۱۲	۷۷/۷۸	۷۵/۳۶	۷۵/۶۰
AM050380 (CHICKEN)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۱/۵۵	۷۵/۱۲	۷۷/۷۸	۷۵/۳۶	۷۵/۶۰
AY453172 (CHICKEN)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۱/۵۵	۷۵/۱۲	۷۷/۷۸	۷۵/۳۶	۷۵/۶۰
DQ873709 (QUAIL)	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۱۰۰	۱۰۰	۹۷/۵۸	۱۰۰	۸۸/۶۵	۷۴/۶۴	۷۶/۳۳	۷۴/۶۴	۷۴/۸۸
AY530305 (OSTRICH)	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۱۰۰	۱۰۰	۹۷/۵۸	۱۰۰	۸۸/۶۵	۷۴/۶۴	۷۶/۳۳	۷۴/۶۴	۷۴/۸۸
AM050376 (FALCON)	۹۱/۵۵	۹۱/۵۵	۹۱/۵۵	۹۱/۵۵	۹۱/۵۵	۹۷/۵۸	۱۰۰	۹۷/۵۸	۹۷/۵۸	۸۸/۱۶	۷۳/۹۱	۷۶/۰۹	۷۴/۱۵	۷۴/۴۰
AM050385 (PIGEON)	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۹۰/۵۸	۱۰۰	۱۰۰	۹۷/۵۸	۱۰۰	۸۸/۶۵	۷۴/۶۴	۷۶/۳۳	۷۴/۶۴	۷۴/۸۸
AY530306 (FALCON)	۸۷/۹۲	۸۷/۹۲	۸۷/۹۲	۸۷/۹۲	۸۷/۹۲	۸۸/۶۵	۸۸/۱۶	۸۸/۶۵	۸۸/۶۵	۱۰۰	۷۵/۱۲	۷۵/۸۵	۷۲/۷۱	۷۳/۱۹
AY453173 (GREAT TIT)	۷۵/۱۲	۷۵/۱۲	۷۵/۱۲	۷۵/۱۲	۷۵/۱۲	۷۴/۶۴	۷۴/۶۴	۷۴/۶۴	۷۴/۶۴	۷۴/۶۴	۷۵/۱۲	۹۷/۳۴	۷۴/۴۰	۷۴/۸۸
AM050375 (CANARY)	۷۷/۷۸	۷۷/۷۸	۷۷/۷۸	۷۷/۷۸	۷۷/۷۸	۷۶/۳۳	۷۶/۳۳	۷۶/۳۳	۷۶/۳۳	۷۶/۰۹	۷۵/۸۵	۹۷/۳۴	۷۴/۶۴	۷۵/۱۲
AY530311 (LOVE BIRD)	۷۵/۳۶	۷۵/۳۶	۷۵/۳۶	۷۵/۳۶	۷۵/۳۶	۷۴/۶۴	۷۴/۶۴	۷۴/۶۴	۷۴/۶۴	۷۴/۱۵	۷۴/۶۴	۷۴/۴۰	۷۴/۴۰	۹۹/۵۲
AM050382 (MACAW)	۷۵/۶۰	۷۵/۶۰	۷۵/۶۰	۷۵/۶۰	۷۵/۶۰	۷۴/۸۸	۷۴/۸۸	۷۴/۸۸	۷۴/۸۸	۷۴/۴۰	۷۴/۸۸	۷۴/۸۸	۹۹/۵۲	۱۰۰



تصویر ۱. درخت فیلوژنی بر اساس توالی اسید نوکلئیک ژن 4b ویروس آبله در دو جدایه این مطالعه با تعدادی دیگر از جدایه‌ها.

بحث

بیماری آبله از جمله بیماری‌های ویروسی مهم در پرندگان اهلی و وحشی می‌باشد. این بیماری در طیور صنعتی موجب خسارات اقتصادی فراوان می‌شود. عامل بیماری آبله می‌تواند از طریق حاملانی مانند جرب و مگس نیز انتقال یابد. در مورد نقش انگل‌های خارجی در انتقال بیماری‌ها تحقیقات زیادی صورت گرفته است با این حال نقش آن‌ها در انتقال سیکل‌های مختلف عوامل بیماری‌زا به درستی شناخته نشده است. جرب *درمانیسوس گالینه* مهم‌ترین انگل خارجی طیور محسوب می‌شود که از خون پرندگان تغذیه می‌نماید. از معایب آلودگی با جرب *درمانیسوس گالینه* می‌توان به استرس شدید مرغان، مشکلات پوستی، کاهش وزن پرنده، کاهش کمی و کیفی تولید تخم مرغ در پرندگان اشاره نمود. جرب *درمانیسوس گالینه* علاوه بر نقش حامل بودن در انتقال عوامل بیماری‌زا، می‌تواند میکروارگانیسم را برای مدت طولانی به صورت ناقل مکانیکی حمل کند (۳،۴).

روش‌های تشخیص بیماری آبله شامل هیستوپاتولوژی از طریق تکثیر سلول‌های اپیتلیال و تشکیل اجسام ائوزینوفیلی تیپ A داخل سیتوپلاسم (اجسام بولینجر)، میکروسکوپ الکترونی، جداسازی ویروس در کشت سلول و یا تزریق داخل لایه کوریوآلتوتویک تخم مرغ‌های جنین‌دار بوده است. در سال‌های اخیر تشخیص قطعی بیماری آبله از طریق آزمایش PCR و شناسایی ژن 4b صورت گرفته است. Jarmin و همکاران در سال ۲۰۰۶، مطالعه شجره‌شناسی ژن 4b را برای ویروس آبله پرندگان انجام دادند که بر اساس مطالعه آن‌ها، ویروس‌های آبله جدا شده از پرندگان عمدتاً در دو Clade اصلی A و B قرار می‌گیرند. در Clade A، عمدتاً ویروس‌های آبله جدا شده از ماکیان و بوقلمون قرار دارند و این Clade خود به سه زیر دسته A1، A2، A3 تقسیم می‌شود. در حالی که Clade B عمدتاً مربوط به ویروس‌های آبله‌ای می‌باشد که از قناری‌ها و خانواده گنجشک‌سانان جدا شده است. Clade B نیز به دو زیر دسته B1 و B2 تقسیم می‌شود. دسته سوم Clade C نام دارد. جدایه‌های اندک داخل این دسته از خانواده طوطی‌سانان جدا شده‌اند (۸).

در این مطالعه یک فارم تخم‌گذار تجاری با جراحات تیپیک جلدی و همینطور آلودگی شدید با جرب قرمز طیور (*درمانیسوس گالینه*) مورد نمونه‌گیری قرار گرفت. نمونه‌ها در آزمون PCR برای

ژن 4b مثبت شده و همچنین در تلیچ به CAM تخم‌مرغ جنین‌دار نیز جراحات پوک نشان دادند. پس از تأیید اولیه بیماری آبله، دو جدایه از نمونه بافتی جراحات تیپیک آبله مرغان و نمونه جرب *درمانیسوس گالینه* برای سکنس و بررسی آنالیز شجره‌شناسی مورد مطالعه قرار گرفتند و با سایر جدایه‌های آبله موجود در بانک ژنی مقایسه شدند. سکنس این دو جدایه و مقایسه آن‌ها با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژنی، شباهت ۱۰۰ درصد آن دو و قرار گرفتن این دو جدایه در یک شاخه را نشان داد. گله تخم‌گذار مورد آزمایش در این مطالعه قبل از وقوع بیماری، بر علیه بیماری آبله واکسینه شده بود. در سال‌های اخیر گزارش‌هایی از وقوع آبله پرندگان در فارم‌های تخم‌گذار تجاری واکسینه شده علیه این بیماری گزارش شده است. در آنالیز فیلوژنتیک مشخص شد که سویه جدا شده از این گله با سویه واکسن کاملاً مطابقت داشته است (اطلاعات منتشر نشده) و لذا شاید ضعف در واکسیناسیون علت درگیری این گله با ویروس آبله پرندگان بوده است.

به دلیل اینکه ویروس آبله دارای DNA دو رشته‌ای است بنابراین میزان موتاسیون در خانواده Poxviridae ناچیز می‌باشد. در کاری که Luschow و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام دادند، سکنس نوکلئوتیدی ژن 4b تفاوت ۷۲ تا ۱۰۰ درصدی بین جدایه‌ها از خود نشان داد که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد (۱۱). در مطالعه‌ای که Manarolla و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند از ۱۵ نمونه مشکوک به بیماری آبله پرندگان، تمامی موارد در آزمون PCR بر روی ژن 4b مثبت شدند. سکنس جدایه‌ها نشان داد که اکثر جدایه‌ها در دسته‌ی A (آبله ماکیان) و یا دسته B (آبله قناری) قرار داشتند (۱۲). Literak و همکاران در سال ۲۰۱۰ در بررسی سکنس ژن 4b در ۶ مورد از گونه‌ای خاص از پرنده وحشی (Great tit) که یک مورد از نمونه‌ها از اتریش، دو مورد از مجارستان و دو مورد نیز از جمهوری چک بودند، سکنس بسیار مشابهی را گزارش نمودند (۱۰). Nakamura و همکاران در سال ۲۰۰۶، گزارشی از وقوع آبله جلدی در یک گله تخم‌گذار تجاری در ژاپن ارائه کردند. گله مذکور نیز واکسن علیه بیماری آبله را دریافت کرده بود. در سکنس فیلوژنی ژن 4b ویروس جدا شده از این فارم و ویروس واکسن در یک دسته قرار گرفتند. همچنین در این گزارش، آلودگی شدید فارم به جرب *درمانیسوس گالینه* نیز ذکر شده بود (۱۳). مطالعات زیادی از نقش وکتوری *درمانیسوس گالینه* و اهمیت این جرب در انتقال عوامل بیماری‌زا موجود نیست. در برخی از آن‌ها فقط به جداسازی آن ارگانیسم از جرب *درمانیسوس گالینه* موجود در فیلد اکتفا شده است. Shirinov و

نتیجه گیری: در این مطالعه، نمونه‌های جرب درمانیسوس گالینه جدا شده از فارم مبتلا به بیماری آبله در تست‌های تشخیصی بیماری آبله مثبت شدند. نتایج تست PCR و تلقیح داخل CAM تخم مرغ جنین‌دار نشان داد که جرب درمانیسوس گالینه می‌تواند به عنوان وکتوری مهم در انتقال بیماری آبله پرندگان نقش داشته باشد. طبیعت خونخوار جرب درمانیسوس گالینه عامل مهمی در انتقال عوامل پاتوژن محسوب می‌شود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ریشه کنی مشکل جرب قرمز طیور در فارم‌ها نه تنها مشکلاتی همچون خونخواری، کاهش تولید، کاهش رشد را مهار می‌کند بلکه می‌تواند باعث کاهش انتقال بیماری‌ها و عوامل پاتوژن در فارم‌ها نیز شود.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از اعتبار تحقیقاتی شماره ۲۶-۶-۷۵۰۸۰۰۷ شورای پژوهشی دانشگاه تهران انجام شد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

همکاران نیز در سال ۱۹۷۲ بیان داشتند که نمونه‌های جرب درمانیسوس گالینه جمع‌آوری شده از فارمی که مبتلا به آبله پرندگان بوده است، حامل ویروس آبله پرندگان بوده‌اند (۱۸). همین طور زمانی که جرب‌ها به صورت طبیعی در آزمایشگاه نگهداری شدند ویروس تا ۳۰۰ روز داخل آن‌ها زنده ماند. همچنین ویروس با گزش جرب به پرندگان سالم نیز انتقال یافت. Houg و همکاران در سال ۲۰۱۴، تحقیقی انجام دادند و در آن با استفاده از PCR نقش جرب درمانیسوس گالینه را در انتقال ۷ عامل بیماری‌زا شامل ویروس آبله پرندگان، ویروس آدنوویروس، مارک، باکتری /ریزیوپلاتریکس روزیوپاتیه، سالمونلا انتریکا، مایکوپلاسما سینویه و مایکوپلاسما گالی سیتیکوم بررسی کردند. تعداد ۱۵۹ عدد جرب قرمز طیور بین سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۱۲ از ۱۴۲ فارم طیور در ۳۸ منطقه جغرافیایی ژاپن مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۳۲ نمونه مثبت، ۲۵ نمونه از آن‌ها برای یک پاتوژن مثبت بوده و ۷ مورد از آن‌ها برای چند پاتوژن مثبت بوده‌اند. همینطور ۱۳/۸ درصد از موارد برای ویروس آبله مثبت شد، ۹/۴ درصد برای مایکوپلاسما سینویه و ۱/۳ درصد نیز برای مایکوپلاسما گالی سیتیکوم مثبت شدند. بنابراین جرب درمانیسوس گالینه می‌تواند در انتقال عوامل پاتوژن نقش داشته باشد (۷).

References

- Arzey, G. (1990). Mechanism of Spread of Newcastle Disease. Technical Bulletin – NSW Agriculture and Fisheries. (1th ed.). Sydney, Australia.
- Bolte, A.L., Meurer, J., Kaleta, E.F. (1999). Avian host spectrum of avipoxviruses. Avian Pathol, 28, 415–432. <https://doi.org/10.1080/03079459994434>. PMID: 26911595.
- Chikuba, T., Itou, H., Sakakibara, H., Inoue, D. (2008). Detection of fowlpox virus from red mite (*Dermanyssus gallinae*) at a layer farm occurring cutaneous fowlpox. J Jpn Soc Poult Dis, 44, 113–117.
- Chirico, J., Eriksson, H., Fossum, O., Jansson, D. (2003). The poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, a potential vector of *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing erysipelas in hens. Med. Vet Entomol, 17, 232–234. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00428.x> PMID: 12823843.
- Fatunmbi, O.O., Reed, M.W. (1998). Vaccination against fowl pox may not result in protection. World Poult, 14, 67.
- Gholami-Ahangaran, M., Zia-Jahromi, N., Namjoo, A. (2014). Molecular detection of avian pox virus from nodular skin and mucosal fibrino-necrotic lesions of Iranian backyard poultry. Trop Anim Health Prod, 46, 349-353. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0495-z> PMID: 24202734
- Huong, C.T., Murano, T., Uno, Y., Usui, T., Yamaguchi, T. (2014). Molecular detection of avian pathogens in poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) collected in chicken farms. J Vet Med Sci, 76, 1583–1587. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0253> PMID: 25649939
- Jarmin, S., Manvell, R., Gough, R.E., Laidlaw, S.M., Skinner, M.A. (2006). Avipoxvirus phylogenetics: Identification of a PCR length polymorphism that discriminates between the two major clades. J Gen Virol, 87, 2191- 2201. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81738-0> PMID: 16847115
- Lee, L.H., Lee, K.H. (1997). Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. J Virol Methods, 63, 113-119. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(96\)02119-2](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(96)02119-2) PMID: 9015281
- Literak, I., Kulich, P., Robesova, B., Adamik, P., Roubalova, E. (2010). Avipoxvirus in great tits (Parusmajor). Eur J Wild Res, 56, 529-534. <https://doi.org/10.1007/s10344-009-0345-5>
- Luschow, D., Hoffmann, T., Hafez, H. M. (2004). Differentiation of avian poxvirus strains on the basis of nucleotide sequences of 4b gene fragment. Avian Dis, 48, 453–462. <https://doi.org/10.1637/7111> PMID: 15529967
- Manarolla, G., Pisoni, G., Sironi, G., Rampin, T. (2010). Molecular biological characterization of avian poxvirus strains isolated from different avian species. Vet Microbiol, 140, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.004> PMID: 19646826
- Nakamura, K., Waseda, K., Yamamoto, Y., Yamada, M., Nakazawa, M., Hata, E., Terazaki, T., Enya, A., Imada, T., Imai K. (2006). Pathology of cutaneous fowlpox with amyloidosis in layer hens inoculated with fowlpox vaccine. Avian Dis, 50, 152-156. <https://doi.org/10.1637/7408-071305R.1> PMID: 16618002
- Norouzian, H., Farjanikish, G., Hosseini, H. (2018). Pathological and molecular diagnosis of avian pox in backyard chickens in Khorram Abad. Vet Res & Biologic Products, 117, 2-10. <https://doi.org/10.22092/vj.2017.113185>
- Petrov, D. (1975). Study on the gamasid red mite of poultry, *Dermanyssus gallinae*, as a carrier of *Pasteurella multocida*. Vet Med Nauki, 12, 32–36. PMID: 1210004

16. Proctor, H., Owens, I.I. (2000). Mites and birds: diversity, parasitism and coevolution. *Trends Ecol Evol*, 15, 358–364. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01924-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01924-8) PMID: [10931667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10931667/)
17. Rahbari, S., Nabian, S., Ronaghi, H. (2009). Haematophagus mites in poultry farms of Iran. *Iran J Arthropod-Borne Dis*, 3, 18–21. PMID: [22808378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22808378/)
18. Shirinov, F.B., Ibragimova, A.I., Misirov, Z.G. (1972). The dissemination of the fowl-pox by the mite *Dermanyssus gallinae*. *Veterinarya*, 4, 48–49.
19. Sparagano, O., Pavlicevic, A., Murano, T., Camarda, A., Sahibi, H. (2009). Prevalence and key figures for the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, infections in poultry farm systems. *Exp Appl Acarol*, 48, 3–10. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9233-z> PMID: [19160060](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19160060/)
20. Tavassoli, M., Allymehr, M., Pourseyed, S.H., Ownag, A., Bernousi, I., Mardani, K., Ghorbanzadegan, M., Shokrpour, S. (2011). Field bioassay of *Metarhizium anisopliae* strains to control the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Vet Parasitol*, 178, 374–378. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.031> PMID: [21320753](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21320753/)
21. Tripathy, D.N., Reed, W.M. (2008). Pox. In: *Diseases of Poultry*. Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E. (eds.). (12th ed.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. p. 291–307



Sequence and Phylogenetic Study of Two Fowlpox Virus Isolates Obtained from Layer Chickens and Red Mite (*Dermanyssus gallinae*) in 2016

Nava Eram¹, Seyed Mostafa Peighambari¹, Seyed Ahmad Madani², Jamshid Razmyar¹, Abbas Barin¹

¹ Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Department of Animal and Poultry Health, Production and Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

 [10.22059/jvr.2019.253199.2770](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.253199.2770)

Received: 22 December 2020, Accepted: 22 February 2020

Abstract

BACKGROUND: This study was conducted to characterize two fowlpox viruses isolated in Iran and study their phylogenetic relationship.

OBJECTIVES: The aim of this study was to determine the identity of two pox viruses recovered from a tissue sample with typical lesions of fowl pox and red mites from a laying farm. Fowl pox in poultry industry causes significant economic losses associated with decreased egg production, reduced growth, blindness and increased mortality. The pox virus, by direct or indirect contact, may also be transmitted through vectors such as mites and fleas. *Dermanyssus gallinae* also known as the poultry red mite is the most important blood feeder ectoparasite affecting poultry, in particular, laying hens. In addition to its significant economic losses, it is considered as a potential vector for a number of important avian pathogens.

METHODS: Both isolates were inoculated to chorioallantoic membrane (CAM) of embryonated chicken eggs, detected by specific PCR for pox virus 4b gene and characterized by sequencing and phylogenetic analysis.

RESULTS: Both isolates developed pock lesions in CAM of embryonated eggs. A 578 bp fragment of the poxvirus 4b gene was amplified in both isolates by PCR. The sequence analyses revealed that the two isolates were 100% identical and placed in the same branch. The nucleotide sequence of these two isolates showed a similarity of 73 to 100% to the other selected avian pox sequences available in the GenBank.

CONCLUSIONS: These results confirmed that *Dermanyssus gallinae* are considered to be an important vector for the spread of fowl pox virus in the flocks. Therefore, controlling the red mites in poultry farms will not only inhibit problems such as blood feeding, decreased production and reduced growth rate, it can reduce the transmission of diseases and pathogenic agents in the farms.

Keywords: Fowl pox, 4b gene, *Dermanyssus gallinae*, Commercial layer, Phylogenetic analysis

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: mpeigham@ut.ac.ir Tel/Fax: 021-61117150, 021-66933222

How to cite this article:

Eram, N., Peighambari, S., Madani, S., Razmyar, J., Barin, A. (2020). Sequence and Phylogenetic Study of Two Fowlpox Virus Isolates Obtained from Layer Chickens and Red Mite (*Dermanyssus gallinae*) in 2016. J Vet Res, 75(2), 218-225.

<https://doi.org/10.22059/jvr.2019.253199.2770>

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Percentage of the 4b gene nucleotide sequence similarity between two avian poxviruses of this study and some other published sequences of FPV strains.

Figure 1. The phylogenetic tree based on the 4b gene nucleotide sequence of two avian poxviruses of this study and some other published sequences of FPV strains.