شیوع منطقه ای و زمانی ویروس منقار و پر طوطی سانان (BFDV) در گرین چیک پاراکیت (*Pyrrrhura Molinae*) های در اسارت در ایران

عمادالدین توحیدی [*۱]، ابوالفضل غنی ئی [۲]

۱- بخش بیوتکنولوژی، گروه پاتوفیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران emadto26@gmail.com

۲- گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران ghaniei@um.ac.ir

خلاصه

ویروس بیماری منقار و پر طوطی سانان (BFDV) یکی از کشنده ترین عوامل ویروسی واگیردار در بین طوطی سانان است و هیچ درمان قطعی برای آن وجود ندارد. هدف مطالعه حال حاضر بررسی شیوع منطقه ای و زمانی ویروس همراه با آنالیز آماری آن برای اولین بار در گرین چیک می باشد. در مطالعه حاضر، دو سری نمونه پر به تعداد ۱۰۰ و ۲۳۱ عدد از گرین چیک های مختلف در اسارت که از سراسر ایران به بیمارستان دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران به ترتیب از ابتدای جولای سال ۲۰۱۹ تا ابتدای جولای سال ۲۰۲۱ و از ابتدای جولای ۲۰۲۱ تا ابتدای جولای سال ۲۰۲۲ مراجعه کرده بودند، اخذ شد. تایید وجود ویروس در نمونه های پر به وسیله استخراج DNA ویروس و اجرای PCR بر روی ژن Rep آن انجام گرفت. در نهایت بررسی شیوع منطقه ای و زمانی ویروس همراه با آنالیز آماری آن انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که شیوع منطقه ای ویروس در منطقه شرقی، مرکزی و غربی ایران به ترتیب٪۰، ٪۳,۲۲ و ٪۳۳,۳۳ بود و رخداد ویروس در منطقه غربی ایران طور قابل توجهی بالاتر بود ($p < 0.05$). شیوع زمانی ویروس در فصل های بهار، تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب٪۰، ٪۲,۷۷، ٪۳,۴۴ و ٪۰ بود و اختلاف آماری معنی دار بین این شیوع ها مشاهده نشد. اما، در ماه دسامبر (آذر و دی) شیوع ویروس (33.33%) به طور معنی داری بالاتر بود ($P < 0.05$). به طور کلی، این تحقیق نشان داد تغییرات زمانی و منطقه ای می توانند به عنوان عوامل بالقوه موثر در رخداد BFDV در گرین چیک مطرح باشند.

کلمات کلیدی: PCR، Rep، DNA، ایران، پر

مقدمه

یکی از خطرات قابل توجه برای طوطی ها، یکی از گونه های پرندگان در معرض خطر، ظهور و پراکندگی جهانی بیماری منقار و پر طوطی سانان (PBFD) است. این بیماری شایع ترین بیماری ویروسی در طوطیسانان(Psittaciformes) وحشی است چرا که همه آنها مستعد ابتلا به عفونت ناشی از ویروس هستند. این ویروس در سرتاسر جهان در بین گونه های طوطی سانان در اسارت و وحشی مسری است و پرندگان غیر از طوطی سانان را نیز می تواند آلوده کند. در حال حاضر PBFDدر مجموع برای ۷۸ گونه (۱۸ طوطیسان دنیای جدید و ۶۰ طوطیسان دنیای قدیم) و پنج زیرگونه از طوطی سانان در سراسر جهان ثبت شده است. ویروس عامل بیماری منقار و پر طوطی سانان(BFDV) یک DNA تک رشته‌ای بدون قطعه است و از یک پروتئین کپسید ویروس (Cap) و پروتئین‌های مرتبط با تکثیر (Rep) تشکیل شده است، دو پروتئین اصلی که توسط دو فریم خواندن باز (ORFs) ژنوم ویروس کد گذاری می شوند، که مورد دوم نسبتاً حفاظت شده است و بنابراین در تشخیص ویروس نیز مورد استفاده قرار می گیرد [۱-۳]. BFDV به دلیل تجارت قانونی و غیرقانونی در سراسر جهان منتشر شده اس و در میان اکثر گونه های طوطی سانان اسیر در سراسر جهان شایع است، که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا و ژنوتیپ های جدید ویروس هست که هر ساله ردیابی می شوند [4]. BFDV به طور جهانی در پرندگان اسیر پراکنده است، که می تواند انتقال بالای ویروس را تسهیل کند و باعث تنوع ژنتیکی ویروسی قابل توجهی شود. همچنین این ویروس ظرفیت سرازیر شدن به گونه‌های دیگری غیر از طوطیسانان را دارد [5]. عفونت این ویروس به طور مستقیم از پرنده ای به پرنده دیگر یا به طور غیرمستقیم از طریق مدفوع یا پرهای آلوده و از راه های گوارشی یا تنفسی منتقل می شود. علائم بالینی این بیماری شامل اختلالات پر و منقار است که ممکن است به طور جداگانه یا همزمان رخ دهد. سن، نژاد و وجود عفونت ثانویه در میزان مرگ و میر نقش دارد [6]. پرندگانی که تحت بالینی آلوده باشند ممکن است مخازن بالقوه BFDVباشند و ویروس را برای دوره های طولانی دفع کنند. شیوع BFDV می تواند قابل توجه باشد و در برخی از جمعیت ها به ۱۰۰٪ برسد. احتمالاً به دلیل گوناگونی در تنوع ژنتیکی میزبان، شیوع و باربFDV ، ویروس می تواند در زیرگونه ها و هیبریدهای داخل گونه های با میزبان یکسان متفاوت باشد [7]. BFDV به طور طبیعی در طوطی سانان میزبانی می شود و دارای تعویض انعطاف پذیر میزبان درطوطی سانان می باشد. تجارت جهانی طوطی‌های زنده، پایداری محیطی بالای ویروس و انتقال بین گونه‌های مرتبط نزدیک از لحاظ میزبان، گسترش ویروس را تسهیل کرده است [8]. علاوه بر این، واکسن و درمان قطعی در حال حاضر برای این بیماری وجود ندارد [9]. تشخیصBFDV به وسیله PCR در نمونه های پرها رایج تر از خون است و تشخیص پرندگان بدون علامت در حال حاضر از طریق Real Time PCR امکان پذیر است. PCR در مقایسه با آزمایش سرولوژیکی، معتبر ترین روش برای تشخیص BFDV است و معمولاً به جای ژن Cap ویروس، محل بسیار حفاظت شده ORF 1 ویروس یعنی ژن Rep را هدف قرار می دهد. این ناحیه همچنین می تواند برای تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گیرد [۱-۲، ۱۰-11].

بر اساس اطلاعات ما، تاکنون بررسی های کمی در مورد وضعیت PBFD در جمعیت گرین چیک پاراکیت ها در جهان انجام شده است. از این رو، این مطالعه سعی در بررسی شیوع منطقه ای و زمانی BFDV در گرین چیک های در اسارت در ایران خواهد داشت.

مواد و روش ها

نمونه برداری

دو سری نمونه پر به تعداد ۱۰۰ و ۲۳۱ عدد از گرین چیک هایی در اسارت متفاوتی که از سراسر ایران به بیمارستان دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران به ترتیب از ابتدای جولای سال۲۰۱۹ تا ابتدای جولای سال ۲۰۲۱ میلادی و از ابتدای جولای سال ۲۰۲۱ تا ابتدای جولای سال ۲۰۲۲ میلادی مراجعه کرده بودند، جداسازی شد.

استخراج DNA

استخراج DNA ژنوم ویروس با استفاده از روش مبتنی بر محلول مطابق با روش انجام شده توسط [12] با برخی تغییرات جزئی انجام شد. به طور خلاصه، تکه‌های کوچک ریشه‌های پر (کالامی) دو یا سه پر از هر پرنده جداگانه توسط تیغ های جراحی استریل بر روی فویل آلومینیومی یکبار مصرف بریده و خرد شد و سپس در بافر لیز (10 میلی مولار NaCl، ۲ میلی مولار EDTA، ۱۰ میلی مولار Tris-HCl (pH = 8)، 1% SDS، ۰٫۵ میلی گرم در میلی لیتر پروتئیناز K و ۱۰ میلی گرم درمیلی لیتر DTT) قرار گرفت و سپس دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس DNA ویروسی به ترتیب توسط محلول های فنول/کلروفورم استخراج و توسط اتانول ٪۹۵ و سدیم استات رسوب داده شد و بعد با اتانول ٪۷۰ شسته شد. DNA شسته شده در ۳۰ میکرولیتر بافر TE حل شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا هنگام استفاده در PCR ذخیره شد [12].

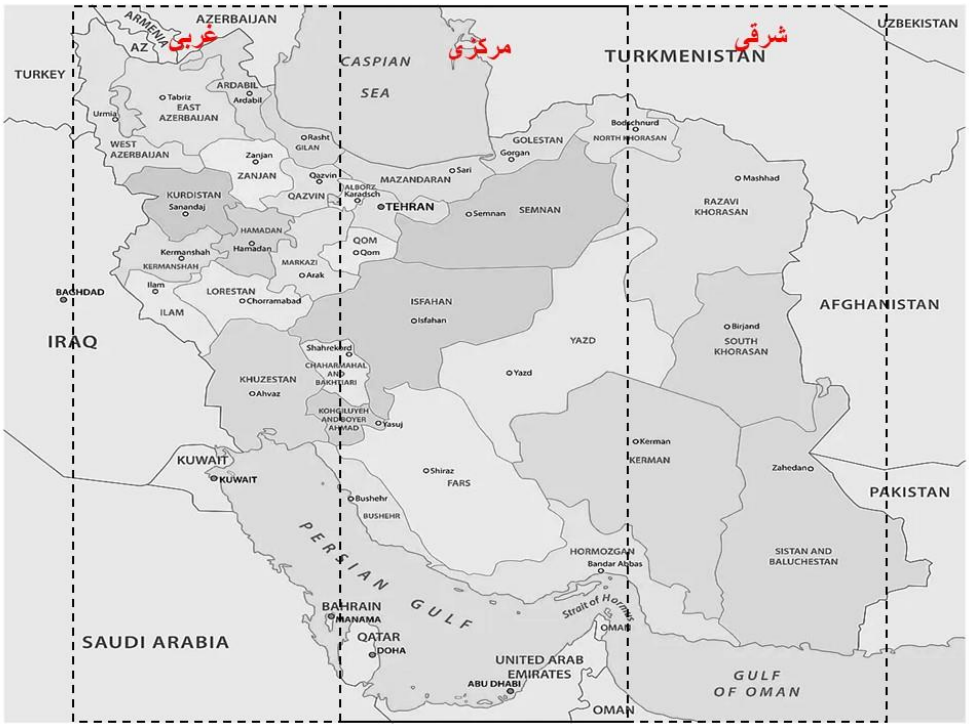
تکثیر و تشخیص PCR

قطعه ای از ORF 1 ژنوم ویروس (ژن Rep) با طول ۷۱۷ جفت باز بر اساس پروتکل PCR معمولی تکثیر شد. حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر بود که حاوی بافر PCR یک درصد، ۲ میکرولیتر DNA به عنوان الگو، ۰٫۵ میکرو مولار از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۲ میلی مولار $MgCl_2$، یک واحد Taq DNA polymerase و آب خالص بود. پرایمرها عبارت بودند از: ´5-AACCCTACAGACGGGCGAG-3´ به عنوان پرایمر فوروارد و ´5-GTCACAGTCCTCCTTGTACC-3´ به عنوان پرایمر معکوس. شرایط ترموسیکل شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه، سپس 35 چرخه (۳۰ ثانیه در دمای ۹۳ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد) و در نهایت اکستنشن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصولات DNA در ژل آگارز 1.5% الکتروفورز شدند; با اتیوم بروماید رنگ آمیزی شده و توسط ترانس لومیناتور زیر اشعهUV مشاهده شدند. آن باندهایی با اندازه مورد انتظار برای ژن Rep مثبت در نظر گرفته شدند [12].

بررسی شیوع ویروس

تقسیم بندی استان های ایران بر اساس تقریب به سه منطقه شرقی، مرکزی و غربی انجام شد (شکل ۱).

شکل ۱ – تقسیم بندی تخمینی استان های کشور ایران در سه منطقه برابر از لحاظ عرضی



نقشه از وب سایت https://www.worldatlas.com/maps/iran

شیوع ویروس در سری اول نمونه ها (۱۰۰ عدد) از لحاظ منطقه ای و در سری دوم نمونه ها (۲۳۱ عدد) از لحاظ زمانی بررسی شد. شیوع وسیله براورد نسبت تعداد نمونه مثبت از پر گرین چیک های مراجعه کننده مبتلا به BFDV به تعداد کل نمونه های پر گرین چیک های مراجعه کننده در آن ماه، فصل یا (از) منطقه محاسبه شد.

تحلیل آماری

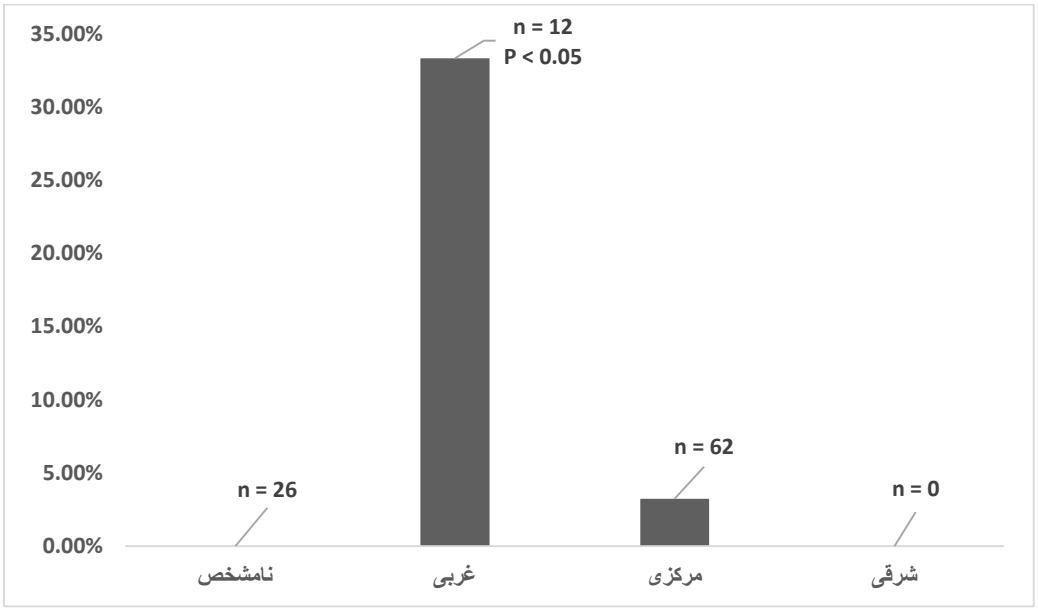
شیوع ویروس در هر ماه، فصل یا منطقه با آزمون دقیق فیشر مقایسه شد. $P\ value < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

شیوع ویروس در مناطق مختلف ایران

شیوع ویروس در منطقه شرقی، مرکزی و غربی ایران به ترتیب ٪۰، ٪۳,۲۲ و ٪۳۳,۳۳ بود. شیوع ویروس در منطقه غربی نسبت به سایر مناطق با تفاوت معنی داری ($P < 0.05$) بالاتر بود (شکل ۲).

شکل ۲ – وقوع ویروس پر و منقار طوطی سانان در در گرین چیک ها از مناطق مختلف ایران

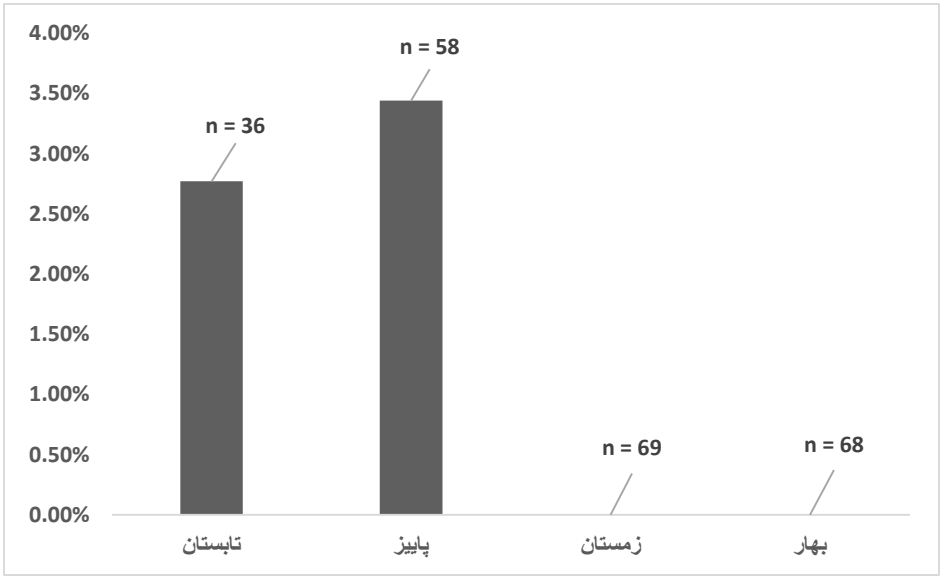


n: تعداد کل گرین چیک های تست شده در منطقه

شیوع ویروس در فصول مختلف

شیوع ویروس در فصول بهار، تابستان، پاییز و زمستان به ترتیب ۰٪، ۲,۷۷٪، ۳,۴۴٪ و ۰٪ بود. شیوع ویروس در هر فصل نسبت به سایر فصول تفاوت معنی دار نداشت ($P \geq 0.05$) (شکل ۳).

شکل ۳ – وقوع ویروس پر و منقار طوطی سانان در فصول مختلف در گرین چیک ها

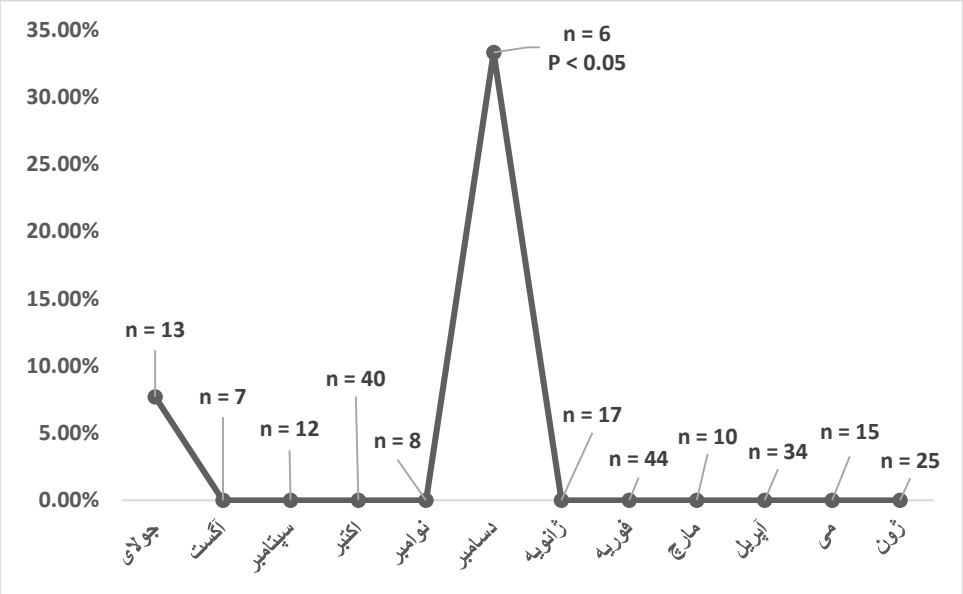


n: تعداد کل گرین چیک های تست شده در فصل

شیوع ویروس در ماه های مختلف

شیوع ویروس در تمامی ماه های بررسی شده ٪۰ بود به جز در ماه جولای و دسامبر که به ترتیب ٪7.69 و ٪33.33 بود. شیوع ویروس در ماه دسامبر نسبت به سایر ماه ها تفاوت معنی دار داشت ($P < 0.05$) (شکل ۴).

شکل ۴ – تغییرات وقوع ویروس پر و منقار طوطی سانان در ماه های مختلف در گرین چیک ها



n: تعداد کل گرین چیک های تست شده در ماه

بحث

بر خلاف وضعیت طوطی سانان در حیات وحش، پرندگانی که در اسارت نگهداری می شوند به علت نزدیکی با هم در معرض ریسک بیشتر عفونت هستند که در مورد گونه های مختلف که حتی در حیات وحش با هم تماس و نزدیکی ندارند نیز صدق می کند [13] بنابراین مطالعات فراوانی جهت بررسی رخداد بیماری PBFD در طوطی سانان مختلف انجام شده است. اما، بر اساس دانش ما، تا کنون بررسی های محدودی در خصوص شیوع ویروس BFDV در بین جمعیت های گرین چیک ها در سراسر دنیا انجام شده است. تنها یک مطالعه [14] یافت شد که شیوع ویروس در جنس *Pyrrhura* را نشان داد (60%) که نسبت به شیوع های گزارش شده در این مطالعه بیشتر بود.

در مطالعه حال حاضر اثر دو عامل منطقه و زمان بر رخداد ویروس عامل PBFD بررسی شد و مشخص شد هر دو عامل می توانند در میزان شیوع ویروس نقش ایفا کنند. برای مثال رخداد ویروس در منطقه غربی ایران به طور معنی داری بیشتر بود. یکی از عوامل ایجاد تفاوت در شیوع ویروس در مناطق مختلف می تواند تجارت قانونی یا غیر قانونی طیور باشد که با پخش ویروس موجب ظهور واریته های جدیدی از ویروس شود. با این حال، تعدادی از مطالعات قبلی بیان داشته اند که تمایل ویروس وابسته به گونه هست اما وابسته به منطقه نیست، هر چند جهت بررسی وابستگی ویروس چه به میزبان چه به منطقه مطالعات بیشتری در گونه های دیگر پرندگان و مناطق دیگر نیاز هست [11].

بر اساس مطالعه [15] رخداد ویروس در روزلاهای کریمسون در فصول تولید مثلی کمتر از فصول دیگر بود و بعد از فصل تولید مثل بالاترین رخداد ویروس رخ می دهد که احتمالا به دلیل تغییرات در وضعیت زادآوری میزبان یا به علت ورود

پرندگان جوان به داخل جمعیت هست. این مشاهدات در راستای نتیجه تحقیق حال حاضر در گرین چیک ها هم می باشد. چرا که رخداد ویروس در فصول بهار و تابستان کمتر از پاییز بود، خصوصا در ماه دسامبر که رخداد ویروس به طور معنی داری نسبت به ماه های قبلی بیشتر بود.

نتیجه‌گیری

تحقیق حال حاضر مشخص کرد که تغییرات منطقه ای و زمانی می توانند به عنوان عوامل بالقوه موثر در رخداد ویروس عامل PBFD در گرین چیک ها مطرح باشند. با این حال بررسی این دو عامل در سایر گونه ها می تواند اطلاعات وسیعتری را از منظر اپیدمیولوژی ویروس فراهم کند.

قدردانی

نویسندگان از جناب آقای سید علی کارگر جهت کمک در انجام این تحقیق کمال تشکر را دارند.

مراجع

1. Zhuang, Q., Chen, J., Mushtaq, M. H., Chen, J., Liu, S., Hou, G., Li, J., Huang, B., Jiang, W. (2012), "Prevalence and genetic characterization of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus isolated from budgerigars in Mainland China," Archives of virology, **157** (1), pp 53-61.

۲. Ma, J., Tian, Y., Zhang, M., Wang, W., Li, Y., Tian, F., ... & Sun, J. (2019), "Identification and characterization of novel genotypes of psittacine beak and feather disease virus from budgerigar in China," Transboundary and emerging diseases, **66** (5), pp 1827-1833.

۳. Fogell, D. J., Tollington, S., Tatayah, V., Henshaw, S., Naujeer, H., Jones, C., ... & Groombridge, J. J. (2021), "Evolution of Beak and Feather Disease Virus across three decades of conservation intervention for population recovery of the Mauritius parakeet," Diversity, **13** (11), pp 584.

4. Morinha, F., Carrete, M., Tella, J. L., & Blanco, G. (2020), "High prevalence of novel beak and feather disease virus in sympatric invasive parakeets introduced to Spain from Asia and South America. Diversity," **12** (5), pp 192.

5. Sarker, S., Moylan, K. G., Ghorashi, S. A., Forwood, J. K., Peters, A., & Raidal, S. R. (2015), "Evidence of a deep viral host switch event with beak and feather disease virus infection in rainbow bee-eaters (Merops ornatus)," Scientific Reports, **5** (1), pp 1-8.

6. Adiguzel, M. C., Timurkan, M. O., & Cengiz, S. (2020), "Investigation and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from companion birds in eastern Turkey," Journal of Veterinary Research, **64** (4), pp 495-501.

7. Martens, J. M., Stokes, H. S., Berg, M. L., Walder, K., Raidal, S. R., Magrath, M. J., & Bennett, A. T. (2020), "Beak and feather disease virus (BFDV) prevalence, load and excretion in seven species of wild caught common Australian parrots," PloS one, **15** (7), e0235406.

8. Fogell, D. J., Martin, R. O., Bunbury, N., Lawson, B., Sells, J., McKeand, A. M., ... & Groombridge, J. J. (2018), "Trade and conservation implications of new beak and feather disease virus detection in native and introduced parrots," Conservation Biology, **32** (6), pp 1325-1335.

9. Hakimuddin, F., Abidi, F., Jafer, O., Li, C., Wernery, U., Hebel, C., & Khazanehdari, K. (2016), "Incidence and detection of beak and feather disease virus in psittacine birds in the UAE," Biomolecular detection and quantification, **6**, pp 27-32.

10. Hakami, A., Al-Ankari, A., Zaki, M., & Yousif, A. (2017), "Isolation and characterization of psittacine beak and feather disease virus in Saudi Arabia using molecular technique," Int J Avian Wildlife Biol, **2**, pp 22-26.

11. Haddadmarandi, M. R., Madani, S. A., Nili, H., & Ghorbani, A. (2018), "Molecular detection and characterization of beak and feather disease virus in psittacine birds in Tehran, Iran," Iranian Journal of Veterinary Research, **19** (1), pp 22.

12. Razmyar, J., Dezfoulian, O., Basami, M. R., Zamani, A., & Peyghambari, S. (2008), "Psittacine beak and feather disease in Iran, molecular and histopathologic detection".

13. Rahaus, M., & Wolff, M. H. (2003), "Psittacine beak and feather disease: a first survey of the distribution of beak and feather disease virus inside the population of captive psittacine birds in Germany," Journal of Veterinary Medicine, Series B, **50** (8), pp 368-371.

14. González-Hein, G., Gil, I. A., Sanchez, R., & Huaracan, B. (2019), "Prevalence of Aves Polyomavirus 1 and Beak and Feather Disease Virus From Exotic Captive Psittacine Birds in Chile," Journal of avian medicine and surgery, **33** (2), pp 141-149.

15. Martens, J. M., Stokes, H. S., Berg, M. L., Walder, K., & Bennett, A. T. (2020), "Seasonal fluctuation of beak and feather disease virus (BFDV) infection in wild Crimson Rosellas (Platycercus elegans)," Scientific reports, **10** (1), pp 1-11.