

## تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ویروس بیماری منقار و پر طوطی سانان (PBFDV) در اصفهان

مهران ریاحی<sup>۱</sup>، عبدالکریم زمانی مقدم<sup>۲\*</sup>، محمدرضا محزونیه<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی تخصصی بهداشت و بیماری‌های پرندگان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ادلاید، ادلاید- استرالیا.

پذیرش: ۲۶ مردادماه ۱۴۰۳

دریافت: ۲۹ اردیبهشت‌ماه ۱۴۰۳

### چکیده

ویروس بیماری منقار و پر طوطی سانان (BFDV)، متعلق به خانواده *Circoviridae* و از لحاظ ساختاری دارای هفت چارچوب باز خوانش (open reading frames; ORFs) است. تنها دو ORF C1 و ORF V1، بیشتر تحت تأثیر تغییرات ژنتیکی قرار دارند. BFDV مستعد جهش‌هایی است که به سیر کوویروس اجازه می‌دهد تا حدت خود را حفظ کند. از آنجایی که تفاوت‌هایی در سرعت تکثیر بین توالی‌های Rep، Cap و بین ژنی وجود دارد، ارزیابی کامل کل توالی ژنوم BFDV برای تعیین همه فرصت‌های نوترکیبی اهمیت زیادی دارد. در این مطالعه از توالی‌های ارجاعی به کلینیک‌های دامپزشکی اصفهان (۲۰۲۱ - ۲۰۲۲)، ۳۰۰ توالی مشکوک به PBFDV از گونه‌های عروس هلندی، طوطی سبز و طوطی خاکستری آفریقایی برای نمونه‌گیری انتخاب شدند. تقریباً ۴ تا ۸ پر از هر پرنده که علائم بیماری را نشان می‌داد جدا گردید و DNA کل از نمونه‌های بالینی جدا شد. از میان موارد مثبت، ۵ نمونه انتخاب و توالی نوکلئوتیدی آن‌ها با استفاده از روش Sanger بر روی محصولات PCR تعیین شد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی نمونه‌ها نشان داد که این ۵ ویروس به ۳ شاخه تقسیم می‌شوند. توالی‌های نوکلئوتیدی از نمونه‌های عروس هلندی و نمونه‌های طوطی خاکستری آفریقایی در یک شاخه با ۹۷٪ شباهت به یکدیگر قرار گرفتند و با نمونه‌های طوطی خاکستری آفریقایی و باجریگار جدا شده در عربستان سعودی در سال ۲۰۱۷ در یک شاخه قرار گرفتند. توالی نوکلئوتیدی طوطی سبز بیشترین شباهت نوکلئوتیدی را به نمونه‌های جدا شده از طوطی سبز و سایر طوطی‌ها در عربستان سعودی و آفریقای جنوبی نشان داد. در واقع شباهت توالی نوکلئوتیدی نمونه‌های آسیای جنوب شرقی و اقیانوسیه کمتر از نمونه‌های آسیا و آفریقا است.

واژه‌های کلیدی: ویروس پر و منقار طوطی سانان، فیلوژنی، جهش، توالی‌یابی

### مقدمه

تشخیص منطقه حفاظت شده (ORF VI) Open Reading Frame (Reading Frame)، پرکاربردترین روش برای تشخیص این ویروس در سراسر جهان است (۵). مطالعات انجام شده در ایران میزان شیوع متفاوتی را برای PBFDV، از حدود ۲۱٪ تا ۳۵٪ نشان داده است (۱۱، ۱۵). عفونت BFDV می‌تواند حاد، مزمن یا تحت بالینی باشد (۲۹). در حال حاضر، هیچ درمان خاص و تجاری مناسبی برای پرندگان مبتلا به عفونت BFDV وجود ندارد (۲۶). تکثیر BFDV در بافت‌های مختلفی از جمله کبد، پوست، دستگاه گوارش و بورس فابریسیوس شناخته شده است (۴). علائم PBFDV می‌تواند از عدم وجود علائم

ویروس بیماری منقار و پر (Beak and Feather disease virus; BFDV)، متعلق به خانواده *Circoviridae* است که باعث بیماری منقار و پر طوطی سانان (Psittacine Beak and Feather disease; PBFDV) می‌شود (۲۵، ۲). محیطی بالا و توانایی انتقال بین میزبان‌های نزدیک به هم دارد و به سرعت در سراسر جهان گسترش یافته است (۲۱، ۹). انتقال ویروس شامل دو روش افقی و عمودی بوده و عوامل زیادی مانند تغییرات آب‌وهوایی بر گسترش آن تأثیر می‌گذارند (۲۷، ۳۱). در حال حاضر، PCR بر اساس



وگسترش بالای PBFV، هدف از این مطالعه بررسی محتوای ژنومی PBFV در منطقه اصفهان، ارزیابی توالی نوکلئوتیدی و فیلوژنی بود. در اکثر مطالعات انجام شده در ایران، بخشی از ژنوم Rep یا Cap برای مطالعه و مقایسه انتخاب شد، اما در این مطالعه، توالی کامل ژنوم برای سه گونه طوطی‌سبز (*Psittacula krameri*)، عروس‌هلندی (*Nymphicus hollandicus*) و کاسکو یا طوطی خاکستری آفریقایی (*Psittacus erithacus*) انتخاب و مطالعه گردید.

### مواد و روش کار

از بین طوطی‌های ارجاعی به کلینیک‌های دامپزشکی اصفهان در یک سال (از سال ۱۴۰۰ تا ۱۴۰۱)، ۳۰۰ طوطی مشکوک به PBFV از گونه‌های مختلف از جمله عروس هلندی، طوطی سبز و کاسکو برای نمونه‌گیری انتخاب شدند. برای جلوگیری از آلودگی ثانویه و انتقال ویروس بین نمونه‌ها، برای هر پرنده از پنس استریل شده با الکل و شعله استفاده شد. تقریباً ۴-۸ پر از هر پرنده که علائم بیماری (شامل نکروز و پیچ خوردگی ساقه پر) را نشان می‌داد، جدا شده و در ظروف نمونه استریل مناسب قرار داده شد (شکل ۱). برای هر نمونه، اطلاعاتی مانند سن، جنس، محل نگهداری (خانه یا پرند فروشی و...)، نوع نگهداری (محفظه تکی یا گروهی)، زمان شروع علائم، مشخصات صاحب پرنده ثبت شد. نمونه‌ها تا زمان ارسال به آزمایشگاه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

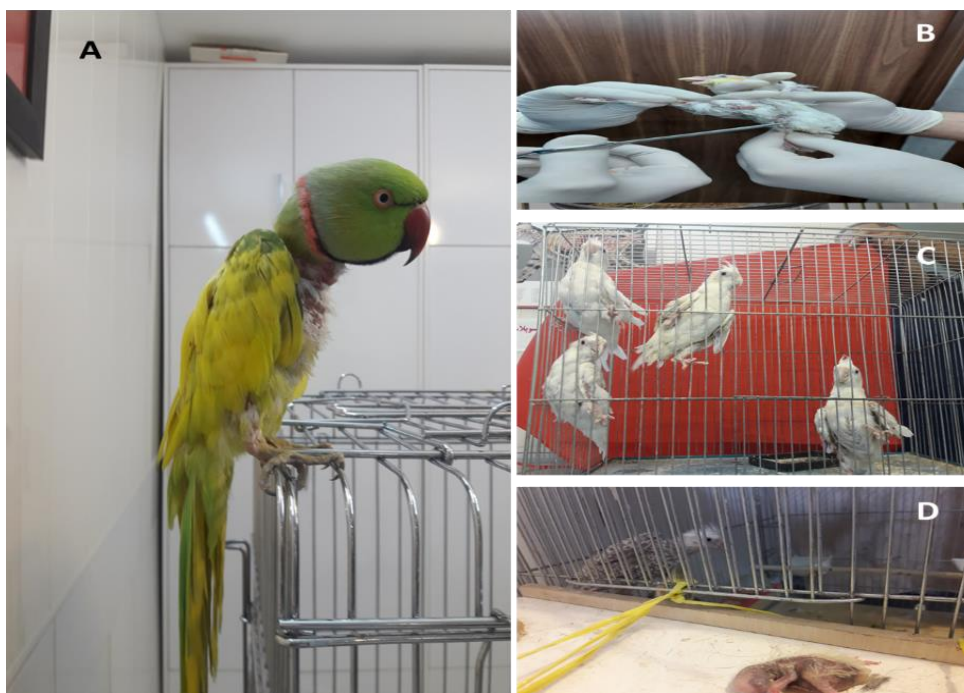
برای طراحی پرایمرها از نرم‌افزار Primer Blast استفاده شد. مشخصات پرایمرهای طراحی شده و توالی نوکلئوتیدی مورد انتظار در جدول ۱ آمده است. پرایمرها از شرکت سینا کلون خریداری شد و طبق دستورالعمل شرکت سازنده تا غلظت نهایی ۱۰۰ پیکومول در میکرولیتر رقیق شد. سپس محلول پرایمر ۱۰ پیکومول برای استفاده در واکنش PCR آماده گردید.

خاص تا علائم شدید و حتی مرگ متغیر باشد (۱۷،۱۰). علائم در برخی از گونه‌ها شامل تغییر رنگ، ازدیاد طول و نکروز پیش‌رونده استخوان فک بالا، از بین رفتن متقارن پره‌های دم و غیره است (۱-۲۴).

از لحاظ ساختاری، توالی BFDV دارای هفت فریم خوانش باز (ORFs) است و در بین آن‌ها تنها دو ORF C1 و ORF V1، به طور قابل توجهی تحت تأثیر تغییرات ساختاری و ژنتیکی قرار دارند (۳،۶). ORF V1 پروتئین مرتبط با تکثیر (Rep) و ORF C1 ژن کپسید ویروسی (cap) را کد می‌کند. دامنه عملکردی ژن Rep عموماً تشکیل توالی ssDNA را فعال می‌کند و در نتیجه توالی‌های شبیه‌سازی را از طریق اتصال به سلول میزبان آغاز می‌کند (۳۶،۳۲).

BFDV مستعد جهش‌هایی است که به سیرکویروس اجازه می‌دهد تا به یک میزبان عمومی تبدیل شود و با تسهیل تعویض میزبان انعطاف‌پذیر، حدت خود را حفظ کند (۱۶،۱۸). گزارش شده است که تغییرات نوکلئوتیدی، به‌ویژه در توالی‌های ثانویه خاص ژن کپسید، با تغییرات ساختاری ممکن است به سرکوب سیستم ایمنی در پرندگان آلوده و گسترش BFDV کمک کند. همچنین گزارش شده است که ژن کپسید سریع‌تر از ژن کدکننده پروتئین Rep در حال تکامل است، در نتیجه احتمال جهش در توالی ژنوم کپسید بیشتر است (۲۸). از سوی دیگر، از آنجایی که تفاوت‌هایی در سرعت رشد و تکثیر بین توالی‌های Rep، کپسید و بین ژنی وجود دارد، ارزیابی کامل کل توالی ژنوم BFDV برای تعیین موقعیت دقیق فیلوژنتیکی آن و همه فرصت‌های نوترکیبی ممکن اهمیت زیادی دارد (۳۳). پیش‌از این تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی انجام شده نشان داد که BFDV‌های ایرانی مورد مطالعه به چهار کلاس ژنتیکی متمایز متعلق به زیرگروه‌های ژنتیکی مختلف (N1، L1، T1 و I4) طبقه‌بندی شده‌اند (۱۲).

باتوجه به اینکه BFDV با سرعت بالایی در حال تکامل و تطبیق است و به طور مداوم بسته به شرایط جغرافیایی و میزبان در حال تغییر شکل است (۷). همچنین به دلیل مطالعات مداوم در مورد درمان‌های نوظهور بیماری‌های ویروسی، دانستن توالی کامل ژنوم ویروس حائز اهمیت است. با توجه به اهمیت و شیوع



شکل ۱- A: پرهای ژولیده و ریزش پرها در طوطی سبز، B: نمونه برداری پر از عروس هلندی مشکوک به PBFD برای ارسال به آزمایشگاه، C: پرهای ژولیده در عروس هلندی مبتلا به PBFD، D: تلفات در نتاج عروس هلندی مبتلا به PBFD

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای طراحی شده و توالی نوکلئوتیدی مورد نظر

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی مدنظر	اندازه	موقعیت در ژنوم کامل
PBFD F1	GGATCCAGCCGGTTCTGGC	19	1391-1411
PBFD F2	GTATCGCCTGATGTGACGTCTG	22	1887-1909
PBFD F3	CTGGGCATTGTGGCGAGAGAC	21	432-452
PBFD F4	GACCGTTACCCACATAAAGTG	21	789-808
PBFD R1	GGATCCCCTACAAGGAGGACC	22	1397-1375
PBFD R2	CGGACGCAGAATGAAGGAAG	20	494-513

درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه. الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٫۵ درصد برای بررسی و نظارت بر محصولات PCR و آمپلیکون تولید شده، و به دنبال آن مشاهده زیر لامپ UV استفاده شد.

از میان موارد مثبت، ۵ نمونه انتخاب و توالی نوکلئوتیدی آن‌ها با استفاده از روش Sanger بر روی محصولات ۴ مرحله‌ای PCR توسط شرکت زیست فناوری پیشگام تعیین شد. نتایج توالی‌یابی قطعات با استفاده از پرایمرهای فوروارد و ریورس مربوط به هر قطعه تراز شدند و به گونه‌ای اصلاح شدند که پایه‌های خوانده شده صحیح یا ناقص با توالی‌های معکوس و مکمل قطعه ریورس مقایسه و تصحیح شدند. در نهایت، توالی نوکلئوتیدی کامل تعیین شده از ۵ نمونه گرفته

به منظور تشخیص BFDV در نمونه‌ها، DNA کل از نمونه‌های بالینی با استفاده از کیت Qiagen طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. DNA استخراج شده و پرایمرهای طراحی شده برای فرایند PCR و تشخیص PBFD استفاده شد. واکنش PCR در یک محتوای ۲۵ میکرولیتری حاوی ۱۲٫۵ میکرولیتر از مخلوط اصلی  $\times 2$  PCR، ۱٫۵ میکرولیتر پرایمر فوروارد، ۱٫۵ میلی لیتر پرایمر معکوس، ۲ میلی لیتر الگوی DNA و آب مقطر انجام شد. شرایط PCR به شرح زیر بود: ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۳ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، با تمدید نهایی در دمای ۷۲

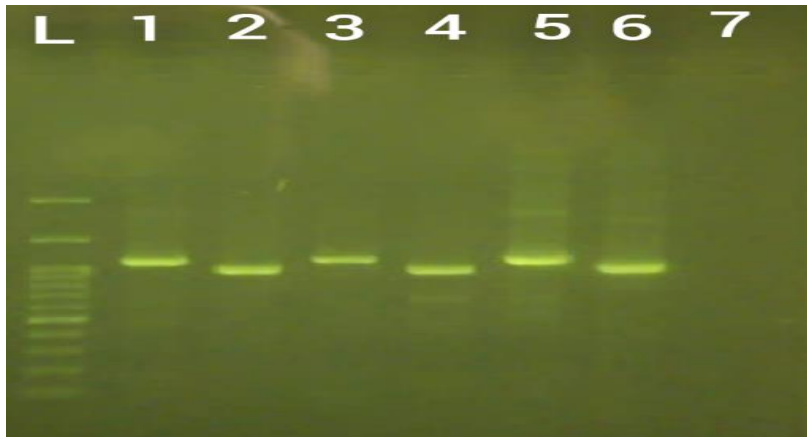


استفاده از نرم افزار MEGA جمع آوری شد تا توالی نوکلئوتیدی کل ژنوم استخراج گردد.

### نتایج

نتایج مثبت تست PCR برای پرایمرهای طراحی شده در شکل ۲ نشان داده شده است. ناحیه ۹۵۶ و ۱۰۳۸ جفت باز برای موارد BFDV مثبت در نظر گرفته شد. در ادامه ۵ نمونه مثبت از ۳ گونه انتخاب و برای تعیین توالی نوکلئوتیدی جدا شد.

شد و با توالی نوکلئوتیدی کامل ژنوم PBFDV به دست آمده از بانک جهانی ژن در پایگاه داده NCBI بر اساس تجزیه و تحلیل مبتنی بر مطالعه تامورا-نی با حداکثر شباهت به نتایج نمونه های قبلی و شناسایی بیشتر شباهت ها مقایسه شد (۳۵). نرم افزار Mega نسخه ۱۰ برای تجزیه و تحلیل فیلوژنی پنج نمونه PBFDV مثبت از دو نمونه عروس هلندی، دو طوطی خاکستری آفریقایی و یک نمونه طوطی سبز استفاده شد. لازم به ذکر است که اگرچه توالی یابی کل ژنوم بهترین روش است، اما گران است. بنابراین، از تقویت جزئی ژنوم استفاده شد و توالی نوکلئوتیدی آنها را با



شکل ۲- نتایج PCR روی ژل آگارز برای نمونه های مختلف. از جمله خطوط L (لدر ۱۰۰bp)، نمونه های مثبت عبارتند از: ۱ (طوطی خاکستری آفریقایی)، ۲ (طوطی خاکستری آفریقایی)، ۳ (طوطی سبز A)، ۴ (طوطی سبز B)، ۵ (عروس هلندی)

گرفتند. نمونه های جدا شده طوطی سبز بیشترین شباهت نوکلئوتیدی را با نمونه های جدا شده از طوطی سبز و سایر طوطی ها در عربستان سعودی و آفریقای جنوبی نشان داد. شباهت توالی نوکلئوتیدی نمونه های آسیای جنوب شرقی و اقیانوسیه کمتر از نمونه های آسیا و آفریقا است (شکل های ۳، ۴ و ۶). بر اساس این نتایج می توان گفت که ژنوتیپ های عروس هلندی و طوطی سبز با ژنوتیپ طوطی خاکستری آفریقایی تفاوت دارند. بخشی از نتایج همترازی توالی نوکلئوتیدی ۵ نمونه PBFD در شکل ۵ نشان داده شده است.

شماره دسترسی GenBank برای توالی های DNA ORF V1 تولید شده از ۵ نمونه BFDV در جدول ۲ آمده است. مقایسه توالی نوکلئوتیدی نمونه ها نشان داد که این ۵ ویروس به ۳ شاخه تقسیم می شوند. (نتایج مقایسه زوجی توالی نوکلئوتیدی نمونه ها در جدول ۳ آمده است). توالی های نوکلئوتیدی از نمونه های عروس هلندی و نمونه های طوطی خاکستری آفریقایی در یک شاخه با ۹۷٪ شباهت به یکدیگر قرار گرفتند و با نمونه های طوطی خاکستری آفریقایی و باجریگار عربستان سعودی در سال ۲۰۱۷ در یک شاخه قرار



ثبت شده مشاهده شد و بیشترین شباهت بین طوطی سبز جدا شده در این مطالعه و توالی ژنومی کپسید طوطی سبز برزیل مشاهده شد ( GENBANK: OL362209, 2017) (شکل ۶).

همچنین توالی ژنومی کپسید از نوکلئوتید شماره ۱۲۳۵ تا ۱۹۷۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و درخت فیلوژنتیک آن ردیابی شد. هنگام بررسی توالی نوکلئوتیدی کپسید، تفاوت‌هایی با سایر سویه‌های

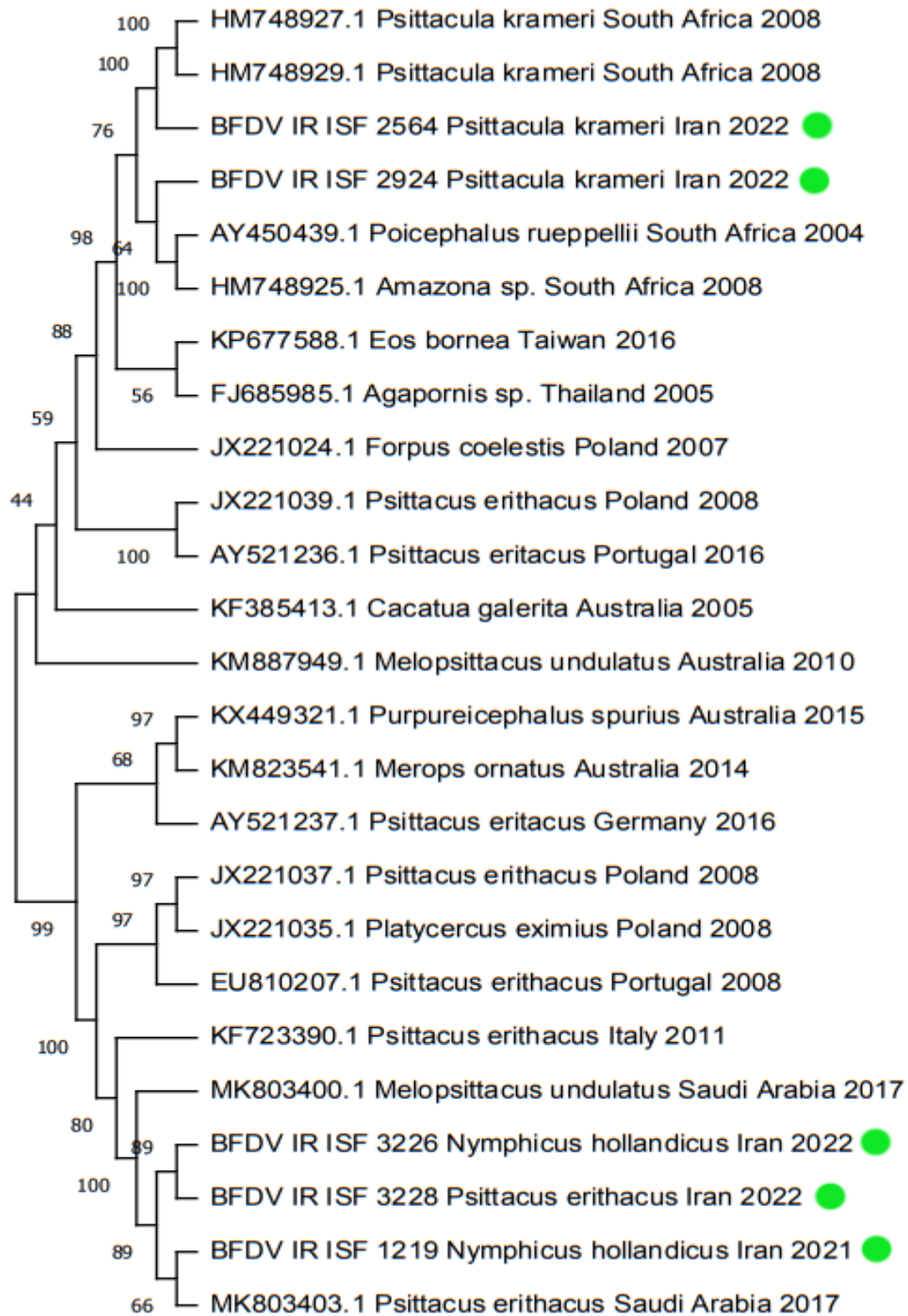
**جدول ۲- شماره دسترسی بانک ژن برای توالی‌های نوکلئوتیدی نمونه‌های مثبت BFDV**

شماره	ویژگی‌ها و مشخصات	شماره دسترسی در پایگاه NCBI
۱	2564 Psittacula krameri Iran 2022	OR393297
۲	2924 Psittacula krameri Iran 2022	OR393298
۳	3226 Nymphicus hollandicus Iran 2022	OR393295
۴	1219 Nymphicus hollandicus Iran 2021	OR393294
۵	3228 Psittacus erithacus Iran 2022	OR393296

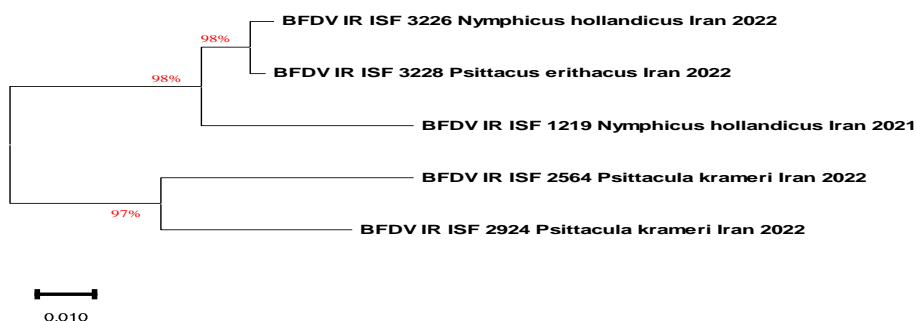
**جدول ۳- فواصل پاتریستیک بین جفت دنباله‌ها نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل با استفاده از مدل تامورا نی انجام شد. این تجزیه و تحلیل شامل ۱۸ توالی نوکلئوتیدی از منابع مختلف جغرافیایی انتخاب شد. در مجموع ۲۰۵۸ پوزیشن وجود داشت**

شماره دسترسی در پایگاه NCBI	اطلاعات جداییه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷
OR393297	Psittacula krameri Iran 2022																	
OR393298	Psittacula krameri Iran 2022	.08																
OR393295	Nymphicus hollandicus Iran 2022	.14	.12															
OR393294	Nymphicus hollandicus Iran 2021	.17	.16	.05														
OR393296	Psittacus erithacus Iran 2022	.14	.12	.01	.05													
FJ685985.1	BFDV13 Agapornis sp Thailand 2005	.08	.07	.11	.15	.11												
KP677588.1	Taiwan-4 Eos bornea Taiwan 2016	.10	.09	.13	.15	.13	.07											
MK303354.1	BFDV-s3Psittacus erithacus Saudi Arabia 2018	.05	.08	.14	.17	.13	.08	.10										
MK303400.1	BFDV-s19 Melopsittacus undulates Saudi Arabia 2017	.13	.12	.02	.06	.02	.11	.13										
KF723390.1	9IT11 Psittacus erithacus Italy 2014	.12	.10	.03	.05	.02	.09	.11	.11	.02								
D221035.1	Platyercus eximius BFDV-j pl-683 New Zealand 2008	.12	.10	.03	.07	.03	.09	.11	.12	.03	.01							
MK803403.1	BFDV-s24 Psittacus erithacus Saudi Arabia 2017	.14	.12	.02	.05	.02	.11	.13	.13	.02	.03	.03						
JX221024.1	BFDV-Q_PL-418_2007 Forpus coelestis New Zealand 2007	.12	.11	.11	.15	.12	.10	.12	.12	.12	.10	.10	.12					
KM887549.1	BFDV AU's BOG 326 Melopsittacus undulates Australia 2010	.13	.11	.10	.13	.10	.10	.09	.08	.10	.08	.10	.11					
AY450439.1	PBFD RP1-ZA Poicephalus rueppellii South Africa 2004	.08	.06	.13	.15	.13	.07	.08	.07	.12	.10	.11	.12	.11	.11			
HM748925.1	BFDV ZAAm83a Amazona sp. South Africa 2008	.08	.05	.12	.15	.12	.09	.06	.09	.02	.11	.10	.12	.10	.11	.02		
HM748927.1	BFDV ZAPK79 Psittacula krameri South Africa 2008	.05	.07	.13	.15	.13	.07	.07	.09	.02	.11	.11	.13	.11	.12	.07	.07	
HM748929.1	BFDV ZAPK74a Psittacula krameri South Africa 2008	.05	.07	.13	.15	.13	.08	.08	.09	.03	.11	.11	.13	.11	.12	.08	.07	0.00





شکل ۲- درخت فیلوژنی ۵ جدایه ویروس پر و منقار طوطی‌سانان از اصفهان و مقایسه با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI

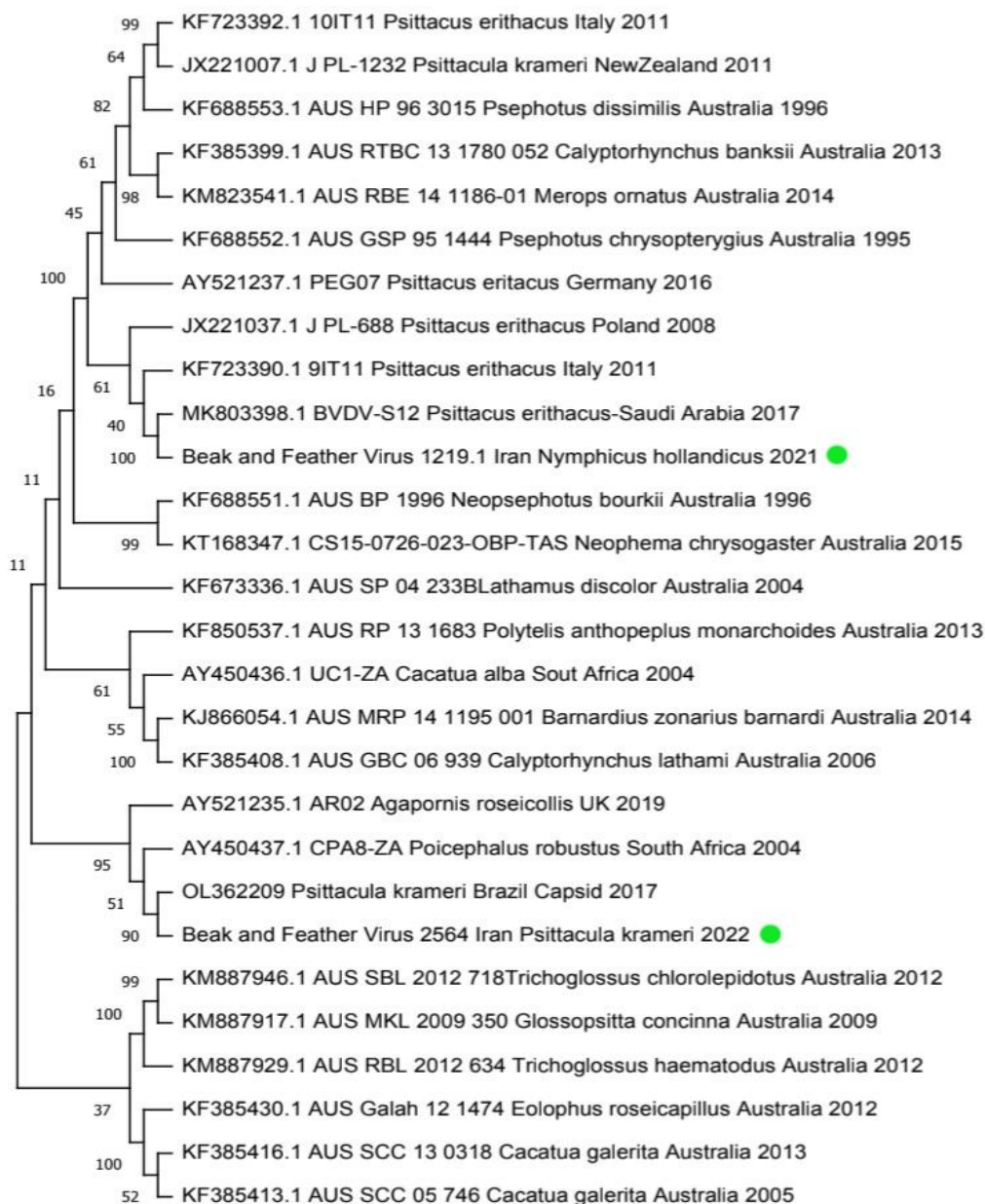


شکل ۳- درخت فیلوژنی: مقایسه و بررسی شباهت نوکلئوتیدی جداگانه ۵ جدایه ویروس پر و منقار طوطی‌سانان از اصفهان

جدول ۴- بخشی از نتایج همراهی ۵ نمونه BFDV ایران بین سال‌های ۲۰۲۱-۲۰۲۲

نام نمونه	توالی
2564_Psittacula_krameri	TATTACCCGCGCCTGGGGCACCGGGGCACTGCAGCCATTGGCTGCGGTG 50
2924_Psittacula_krameri	.....C..... 50
3226_Nymphicus_hollandicus	.....CT.....A.GT 50
1219_Nymphicus_hollandicus	.....C.....C.GT 50
3228_Psittacus_erithacus	.....CT.....A.GT 50
2564_Psittacula_krameri	CCCCAACCCCTCCCACTAGGGCGGAG- AAATGGCGACGTTATACGGCGCC 99
2924_Psittacula_krameri	.....T.....T.....C.....100
3226_Nymphicus_hollandicus	....GGTG..CG..C.....A....AC....A..C.....---....T. 97
1219_Nymphicus_hollandicus	....GGTG..CG..C.....A....AC....A..C.....---....T. 97
3228_Psittacus_erithacus	....GGTG..CG..C.....A....AC....A..C.....---....T. 97
2564_Psittacula_krameri	GTAATCTCCGGAGGATCACACTCGCC----- ACCATGCCGTCCAAGGAGG144
2924_Psittacula_krameri	..G.....G.....---.T.....145
3226_Nymphicus_hollandicus	.....CGGGA..T.....147
1219_Nymphicus_hollandicus	.....CGGGA..T.....147
3228_Psittacus_erithacus	.....CGGGA..T.....147
2564_Psittacula_krameri	GCTCCGGCTGTGCGCGTTGGTGTTCACCCTTAACAACCCTACAGACGGC194
2924_Psittacula_krameri	....T....C.....G.....G.C.195
3226_Nymphicus_hollandicus	.G..T.....G.....T.....T...197
1219_Nymphicus_hollandicus	.G..T.....T.....197
3228_Psittacus_erithacus	.G..T.....G.....T.....T...197





شکل ۵- درخت فیلوژنی توالی نوکلئوتیدی ژنوم کپسید P.BFD. میل ترکیبی و هم‌پوشانی کامل ژنوم جدایه‌های BFDV از این مطالعه را با سایر توالی‌های ژنوم کامل BFDV موجود در GenBank نشان می‌دهد

واقع، تعیین تنوع ژنومی و بیماری‌زایی جدایه‌های BFDV در پرندگان وحشی و اسیر از طریق مطالعات سیستماتیک و برنامه‌های غربالگری در سراسر جهان برای حفاظت از آنها مهم است. (۹ و ۲۲). مطالعه حاضر اولین آنالیز فیلوژنتیکی است که در ایران بر روی ژنوم کامل P.BFDV انجام شده است. به دلیل اهمیت آنالیز فیلوژنتیکی، ۵ نمونه که توسط PCR از نظر توالی نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنتیکی مثبت بودند، ارزیابی شد.

#### بحث

ویروس بیماری منقار و پر (BFDV) مهم‌ترین پاتوژن موجود در بین بیش از ۱۲ گونه طوطی‌سان در ایران است (۷). P.BFDV یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که بر جمعیت پرندگان تاثیر داشته و شیوع و همه‌گیری آن می‌تواند تلاش‌ها برای محافظت و بازسازی جمعیت این گونه ارزشمند را مختل کند (۸). از این حیث نظارت بر شیوع بیماری و غربالگری فعال مهم هستند. در

در تأیید نتایج به دست آمده Ghorani و همکاران در سال ۲۰۲۰، ویروس PBFD را در ۱۲۰ نمونه جدا شده از پرندگان مورد ارزیابی قرار داد و اظهار داشت که بر اساس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک، جدایه های ایرانی جدا شده از عروس هلندی بیشترین شباهت را به سویه های عربستان سعودی داشتند (۱۱). گزارش شده است که تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی توالی های DNA هفت پروتئین (rep) و ۱۰ پروتئین کپسید (Cap) از ۱۰۹۵ نمونه از ۱۷ گونه طوطی سان در ایران، شباهت هایی را با توالی های BFDV از لهستان، عربستان سعودی، آفریقای جنوبی، تایوان و تایلند نشان داد (۷). Mohamed و همکاران در سال ۲۰۲۱، پس از تجزیه و تحلیل و مقایسه توالی ژنوم کامل ۱۴ پرندۀ آلوده به BFDV به نمایندگی از ۶ گونه طوطی سان، گزارش داد که ژنوم BFDV جدید توالی یابی شده از عربستان سعودی متعلق به ۶ ژن مختلف است و بسیار نوترکیب است (۲۳). حساسیت آزمایش های مختلف و فیلوژنی نمونه های تشخیصی جمع آوری شده از ۶۷۹ نمونه از گونه های پرندۀ طوطی سان مشکوک به BFDV توسط Khalesi و همکاران در سال ۲۰۰۵، بررسی و مشخص شد که عفونت BFDV در طوطی های *Lathamus discolor* از نظر توالی ژنوم به خانواده های *Cacatuidae*، *Loriidae* و *Psittacidae* مربوط است (۱۵).

در ارتباط با توالی کپسید، Mahzounieh و همکاران در سال ۲۰۱۴، ژن Cap سه سویه BFDV (SD3، SD5 و SD9) را با استفاده از آنالیز فیلوژنتیک مورد بررسی قرار دادند و تمایز این سه سویه را با تمام ژنوتیپ های شناخته شده با استناد به میل ترکیبی کم این سه سویه (۶۷/۹ تا ۷۰ درصد) تشریح کردند (۲۰). در مطالعه Ma و همکاران در سال ۲۰۱۹، ژن های کپسید سه سویه (SD3، SD5 و SD9) شباهت کمی (۶۷/۹ تا ۷۰ درصد) به همه ژنوتیپ های شناخته شده BFDV نشان دادند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک همچنین نشان داد که این سه ژن کپسید یک دودمان واحد هستند که یک فرد را از هر ژنوتیپ شناخته شده متمایز می کند (۱۹). در واقع، درک اپیدمیولوژی BFDV و شناسایی توالی های ژنومی نوترکیب برای مقابله با تهدیدی که ویروس برای جمعیت طوطی سانان ایجاد می کند و ارائه استراتژی های

توالی یابی نوکلئوتیدی نمونه ها نشان داد که این ۵ ویروس به ۳ شاخه تقسیم می شوند. توالی نوکلئوتیدی نمونه های عروس هلندی و نمونه جدا شده از طوطی خاکستری آفریقای در همان شاخه و با شباهت ۹۷ درصدی بین آنها و نمونه های جدا شده از طوطی خاکستری آفریقای و طوطی سبز در عربستان سعودی در سال ۲۰۱۷ قرار گرفتند. در میان نمونه های جدا شده از طوطی سبز بیشترین شباهت نوکلئوتیدی را با نمونه های جدا شده از طوطی خاکستری آفریقای در عربستان سعودی و آفریقای جنوبی نشان می دهد. نتایج کلی این مطالعه حاکی از وجود چند موج آلودگی ناشی از تجارت بین المللی پرندگان زینتی است. Franzo و همکاران در سال ۲۰۲۲، ادعا می کنند که BFDV عمدتاً از جمعیت های وحشی به جمعیت های خانگی منتقل شده است، که نقش بازار تجارت پرندگان را برجسته می کند (۱۰). در عین حال بر اساس مطالعه Massaro و همکاران در سال ۲۰۱۲، پتانسیل ژنتیکی بالاتری برای تکامل در تأسیسات پرورش در اسارت وجود دارد که ممکن است فرصت هایی را برای انتقال افقی بیماری ها فراهم کند (۲۲). اثبات شده است که جهش در سیرکویروس ها می تواند در ژنوم هسته آنها رخ دهد و تمایل به گونه و منطقه خاص دارد (۱۳، ۱۴ و ۳۰).

همچنین در این مطالعه، توالی نوکلئوتیدی کپسید عروس هلندی و طوطی سبز با یکدیگر تفاوت داشتند که به ترتیب ۹۷ درصد شباهت به طوطی خاکستری آفریقای - عربستان سعودی در سال ۲۰۱۷ و طوطی سبز - برزیل در سال ۲۰۱۷ نشان دادند. بر اساس نتایج حاصل، توالی های کپسید از شباهت و حمایت ضعیف تری از هم تیان خود برخوردار بودند، که نشان می دهد میزان جهش توالی کپسید از rep بیشتر است. همانطور که قبلاً توسط Sarker و همکاران بیان شده است، مقایسه بین فاصله های دوتایی rep و cap از واگرایی کم توالی rep پشتیبانی می کند. (۳۴). این ویژگی ممکن است به توانایی فوق العاده حفظ توالی rep در مقایسه با توالی کپسید مربوط باشد. با این حال، هیچ مدرک متقنی برای توضیح دلیل واگرایی بالا در پروتئین کپسید مسئول حفاظت ضعیف تر از طریق انتقال BFDV در گونه میزبان وجود ندارد.



یک برنامه جامع نظارت و تعیین ژنوتیپ جمعیت طوطی‌سانان آلوده به PBFDV در سراسر کشور مورد نیاز است. برنامه‌های نظارتی و رعایت مقررات قرنطینه می‌تواند در پیشگیری از بیماری مؤثر باشد. بر اساس این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ‌های عروس هلندی و طوطی خاکستری آفریقایی با طوطی سبز متفاوت است. امید است که این مقاله در تهیه واکسن و ارائه برنامه‌های درمانی مبتنی بر ژنوم کمک‌کننده باشد.

### قدردانی و تشکر

با تشکر از دانشگاه شهرکرد که امکانات لازم را برای انجام این تحقیق فراهم کرده است. این تحقیق هیچ کمک مالی خاصی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

### منابع

1. Adiguzel MC, Timurkan MO, Cengiz S. Investigation and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from companion birds in eastern Turkey. *Journal of Veterinary Research*. 2020 Oct 15;64(4):495-501.
2. Al-Alhally AA. First analysis of beak and feather disease of psittacine in Nineveh province, Iraq. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. 2024 Jan 1;38(1):173-181.
3. Bassami MR, Berryman D, Wilcox GE, Raidal SR. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology*. 1998 Sep 30;249(2):453-9.
4. BEAK P. Avian circovirus and polyomavirus diseases. *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*, Volume 7. 2011 Jul 11;7:297.
5. Chae HG, Lim DR, Kim HR, Park MJ, Park CK. An advanced loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of beak and feather disease virus in psittacine birds.

مؤثر برای درمان و پیشگیری از بیماری ناشی از آن ضروری است. Ghorani و همکاران در سال ۲۰۲۰، یک درخت فیلوژنتیک مبتنی بر ژن rep از سویه‌های PBFDV جدا شده را طراحی و تجزیه و تحلیل کرد (۳۷). Haddadmarandi و همکاران در سال ۲۰۱۸، در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی مطالعه خود، توالی‌های ژن rep جزئی ویروس ایرانی را به چهار کلاس اصلی تقسیم کردند که ارتباط نزدیکی با زیر گروه‌های مختلف BFDV دارند (۱۲). در مطالعه Dolatyabi و همکاران در سال ۲۰۲۲، از ژن cap و ژن rep برای مقایسه فیلوژنتیک استفاده کردند (۷).

در این مطالعه روش PCR برای تشخیص انتخاب شد؛ زیرا تست PCR رایج‌ترین و مهم‌ترین روش برای تشخیص این بیماری در سراسر جهان شناخته شده است. Khalesi و همکاران در سال ۲۰۰۵، هم‌گلوپیناسیون (HA)، مهار هم‌گلوپیناسیون (HI) و PCR را مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند که PCR مناسب‌ترین روش تشخیصی برای این ویروس است (۱۵). Mahzounieh و همکاران در سال ۲۰۱۴، از روش‌های مبتنی بر PCR برای تشخیص سیرکوویروس‌ها در مطالعه خود استفاده کردند زیرا حساس، سریع و ارزان هستند و در ترکیب با توالی‌یابی، امکان بیان تنوع ژنتیکی وجود دارد (۲۰). Ghorani و همکاران در سال ۲۰۲۰، PBFDV توسط PCR را در مجموع ۱۲۰ نمونه پرنده شناسایی نموده و نمونه‌های مثبت را با استفاده از روش سنگر تعیین توالی نمودند (۱۱).

هرچند که نقش انتقال ویروس از پرندگان مهاجر و وارداتی در این مطالعه بارز و مشخص است؛ اما لازم به ذکر است که توالی‌های DNA بیشتر شامل نمونه‌های مختلف (خون، پر، بافت و غیره) برای درک بهتر توزیع ژنتیکی BFDV در جمعیت پرندگان طوطی‌سان ایرانی و شناسایی جهش‌های مختلف و سویه‌های جدید ویروس مورد نیاز است. با این حال، عوامل دیگری نیز وجود دارد که می‌تواند بر عفونت و جهش BFDV تأثیر بگذارد، از جمله اندازه جمعیت، شرایط پرندگان در اسارت یا در طبیعت، و تجارت بین‌المللی پرندگان زینتی. از دیگر سو این مطالعه تنها در یکی از استان‌های ایران انجام شد و می‌تواند تشخیص ژنوتیپ‌های محدود PBFDV را توضیح دهد.

- feather disease virus in psittacine birds in Tehran, Iran. Iranian journal of veterinary research. 2018;19(1):22.
13. Halami MY, Dorrestein GM, Couteel P, Heckel G, Müller H, Johne R. Whole-genome characterization of a novel polyomavirus detected in fatally diseased canary birds. J Gen Virol. 2010;91(12):3016-3022.
  14. Johne R, Fernandez-de-Luco D, Höfle U, Müller H. Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. J Gen Virol. 2006;87(Pt 5):1189-1195.
  15. Khalesi B, Bonne N, Stewart M, Sharp M, Raidal S. A comparison of haemagglutination, haemagglutination inhibition and PCR for the detection of psittacine beak and feather disease virus infection and a comparison of isolates obtained from loriids. Journal of general virology. 2005 Nov;86(11):3039-3046.
  16. Kundu S, Faulkes CG, Greenwood AG, Jones CG, Kaiser P, Lyne OD, Black SA, Chowrimootoo A, Groombridge JJ. Tracking viral evolution during a disease outbreak: the rapid and complete selective sweep of a circovirus in the endangered Echo parakeet. Journal of virology. 2012 May 1;86(9):5221-5229.
  17. Lam DK, Poon ES, Sin SY. Temporal characterization of the viral load of psittacine beak and feather disease virus in rosy-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). bioRxiv. 2024:2024-02.
  18. Liao PC, Wang KK, Tsai SS, Liu HJ, Huang BH, Chuang KP. Recurrent positive selection and heterogeneous codon usage bias events leading to coexistence of divergent pigeon circoviruses. Journal of General Virology. 2015 Aug;96(8):2262-2273.
  19. Ma J, Tian Y, Zhang M, Wang W, Li Y, Tian F, Cheng Y, Yan Y, Sun J. Identification and characterization of Journal of Virological Methods. 2020 Mar 1;277:113819.
  6. Crowther RA, Berriman JA, Curran WL, Allan GM, Todd D. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. Journal of virology. 2003 Dec 15;77(24):13036-41.
  7. Dolatyabi S, Peighambari SM, Razmyar J. Molecular detection and analysis of beak and feather disease viruses in Iran. Frontiers in Veterinary Science. 2022 Dec 1;9:1053886.
  8. Fogell DJ, Martin RO, Bunbury N, Lawson B, Sells J, McKeand AM, Tatayah V, Trung CT, Groombridge JJ. Trade and conservation implications of new beak and feather disease virus detection in native and introduced parrots. Conservation Biology. 2018 Dec;32(6):1325-1335.
  9. Fogell DJ, Tollington S, Tatayah V, Henshaw S, Naujeer H, Jones C, Raisin C, Greenwood A, Groombridge JJ. Evolution of Beak and Feather Disease Virus across three decades of conservation intervention for population recovery of the Mauritius parakeet. Diversity. 2021 Nov 16;13(11):584.
  10. Franzo G, Dundon WG, De Villiers M, De Villiers L, Coetzee LM, Khaiseb S, Cattoli G, Molini U. Phylodynamic and phylogeographic reconstruction of beak and feather disease virus epidemiology and its implications for the international exotic bird trade. Transboundary and Emerging Diseases. 2022 Sep;69(5):e2677-2687.
  11. Ghorani M, Rezapannah M. Molecular Characterization of Psittacine Beak and Feather Disease Virus from Cockatiels (*Nymphicus Hollandicus*) in Iran. Iranian Journal of Virology. 2020 Jun 10;14(1):47-52.
  12. Haddadmarandi MR, Madani SA, Nili H, Ghorbani A. Molecular detection and characterization of beak and



- South America. *Diversity*. 2020 May 13;12(5):192.
26. Munsamy Y. Improving the current diagnostic strategy for beak and feather disease virus in parrots. *BEAK P. Avian circovirus and polyomavirus diseases. Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy, Volume 7*. 2011 Jul 11;7:297.
  27. Ortiz-Catedral L, Wallace CJ, Heinsohn R, Krebs EA, Langmore NE, Vukelic D, Bucher EH, Varsani A, Masello JF. A PCR-based retrospective study for beak and feather disease virus (BFDV) in five wild populations of parrots from Australia, Argentina and New Zealand. *Diversity*. 2022 Feb 18;14(2):148.
  28. Raidal SR, Sarker S, Peters A. Review of psittacine beak and feather disease and its effect on Australian endangered species. *Australian Veterinary Journal*. 2015 Dec;93(12):466-70.
  29. Regnard GL, Rybicki EP, Hitzeroth II. Recombinant expression of beak and feather disease virus capsid protein and assembly of virus-like particles in *Nicotiana benthamiana*. *Virology journal*. 2017 Dec;14:1-12.
  30. Ritchie PA, Anderson IL, Lambert DM. Evidence for specificity of psittacine beak and feather disease viruses among avian hosts. *Virology*. 2003;306(1):109-115.
  31. Saechin A, Saksai P, Sariya L, Mongkolphan C, Tangsudjai S. Species and seasonality can affect recent trends in beak and feather disease virus prevalence in captive psittacine birds. *Acta Tropica*. 2024 Jan 1;249:107071.
  32. Sánchez-Godoy F, Estrada-Arzate D, Torres-Torres AA, Chávez-Maya F, Lima-Melo A, García-Espinosa G. First report of psittacine beak and feather disease in imported budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) chicks in Mexico.
  33. Sarker S, Ghorashi SA, Forwood JK, Bent SJ, Peters A, Raidal SR. novel genotypes of psittacine beak and feather disease virus from budgerigar in China. *Transboundary and emerging diseases*. 2019 Sep;66(5):1827-1833.
  20. Mahzounieh M, Heidari Khoei H, Ghasemi Shamsabadi M, Dastjerdi A. Detection and phylogenetic characterization of Columbidae circoviruses in Chaharmahal va Bakhtiari province, Iran. *Avian pathology*. 2014 Nov 2;43(6):524-528.
  21. Martens JM, Stokes HS, Berg ML, Walder K, Raidal SR, Magrath MJ, Bennett AT. A non-invasive method to assess environmental contamination with avian pathogens: beak and feather disease virus (BFDV) detection in nest boxes. *PeerJ*. 2020 Jun 11;8:e9211.
  22. Massaro M, Ortiz-Catedral L, Julian L, Galbraith JA, Kurenbach B, Kearvell J, Kemp J, van Hal J, Elkington S, Taylor G, Greene T. Molecular characterisation of beak and feather disease virus (BFDV) in New Zealand and its implications for managing an infectious disease. *Archives of virology*. 2012 Sep;157:1651-1663.
  23. Mohamed, El-Sabagh I, Vashi Y, Jagrit V, Salem MA, Al-Ramadan MA, Al-Ali AM, Kumar S. Analysis of the beak and feather disease viral genome indicates evidence of multiple introduction events into Saudi Arabia. *Virus Research*. 2021 Apr 2;295:198279.
  24. Molini U, De Villiers M, De Villiers L, Coetzee LM, Hoebes E, Khaiseb S, Cattoli G, Dundon WG, Franzo G. Investigation and sequence analysis of psittacine beak and feather disease virus and avian polyomavirus from companion birds in Windhoek, Namibia. *Acta Tropica*. 2023 Feb 1;238:106739.
  25. Morinha F, Carrete M, Tella JL, Blanco G. High prevalence of novel beak and feather disease virus in sympatric invasive parakeets introduced to Spain from Asia and



35. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*. 1993 May 1;10(3):512-526.
36. Todd D, Scott AN, Fringuelli E, Shivraprasad HL, Gavier-Widen D, Smyth JA. Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. *Avian pathology*. 2007 Feb 1;36(1):75-81.
- Phylogeny of beak and feather disease virus in cockatoos demonstrates host generalism and multiple-variant infections within Psittaciformes. *Virology*. 2014 Jul 1;460:72-82.
34. Sarker S, Ghorashi SA, Forwood JK, Raidal SR. Rapid genotyping of beak and feather disease virus using high-resolution DNA melt curve analysis. *Journal of virological methods*. 2014 Nov 1;208:47-55.





## Phylogenetic analysis of psittacine beak and feather disease virus (BFDV) in Isfahan

Mehran Tajmir Riahi<sup>1</sup>; Abdolkarim Zamani Moghadam<sup>2\*</sup>;  
Mohammad Reza Mahzonieh<sup>3</sup>

1. DVSc Student in Avian Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Adelaide University, Adelaide- Australia.

### Summary

*Received:* 18 May 2024

*Accepted:* 16 August 2024

Beak and feather disease virus (BFDV), belongs to the *Circoviridae* family and structurally has seven open reading frames (ORFs). Only two ORF C1 and ORF V1 are more affected by genetic changes. BFDV is prone to mutations that allow the circovirus to maintain its virulence. Because there are differences in replication rates between Rep, Cap, and intergenic sequences, a complete evaluation of the entire BFDV genome sequence is of great importance to determine all recombination opportunities. In this study, among the parrots referred to veterinary clinics in Isfahan (2021-2022), 300 parrots suspected of PBFD from the Cockatiel, Rose-ringed parakeet and African grey parrot species were selected for sampling. Approximately 4 to 8 feathers were removed from each bird showing signs of disease, and total DNA was isolated from clinical samples. Among the positive cases, 5 samples were selected and their nucleotide sequence was determined using the Sanger method on PCR products. Comparing the nucleotide sequence of the samples showed that these 5 viruses are divided into 3 branches. Nucleotide sequences from Cockatiel samples and African gray parrot samples were clustered with 97% similarity and with African gray parrot and Budgerigar samples isolated in Saudi Arabia in 2017. Isolated samples of Rose-ringed parakeet showed the highest nucleotide similarity to samples isolated from Rose-ringed parakeet and other parrots in Saudi Arabia and South Africa. In fact, the nucleotide sequence similarity of samples from Southeast Asia and Oceania is less than that of samples from Asia and Africa.

**Keywords:** PBFDV, Psittacine, Phylogeny, Mutation, Sequencing

\*Corresponding author: [azamani@sku.ac.ir](mailto:azamani@sku.ac.ir)

