JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره سیزدهم، شماره اول، ۱۳۹۶، پیاپی ۳۴: ۷۵-۶۷

خصوصیات فیلوژنتیکی ویروس کمخونی عفونی جوجه یافت شده در جوجه‌های گوشتی استان چهار محال و بختیاری، ایران

ایرج کریمی[۱،*]، محمد رضا محزونیه [۲]، جعفر براتی [۳]

۱- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۳

چکیده

ویروس عامل کمخونی عفونی جوجه موجب کمخونی شدید، آتروفی تیموس، بورس، طحال، مغز استخوان، سرکوب ایمنی و افزایش حساسیت نسبت به سایر عوامل بیماریزا می‌شود. عفونت تحت بالینی با این ویروس موجب بروز خسارت اقتصادی فراوانی در گله‌های جوجه گوشتی می‌شود. راه‌های تشخیص این بیماری شامل جداسازی ویروس در کشت سلول، جستجوی ژنوم این ویروس با آزمایش PCR و آزمایش‌های سرولوژی است. اهداف مطالعه حاضر جستجو و تعیین توالی بخشی از ژنوم ویروس کمخونی عفونی توسط آزمایش PCR و روش تعیین توالی مستقیم بود. ۷۷ نمونه کبد جوجه متعلق به ۸ مرغداری مختلف اطراف شهرکرد در استان چهار محال و بختیاری مورد آزمایش PCR قرار گرفت. از این تعداد ۱۹ نمونه متعلق به ۴ مرغداری مختلف مثبت بودند. شباهت توالی نوکلئوتیدی ۴ نمونه مثبت از محصولات PCR از مرغداری‌های مذکور ۱۰۰٪ بود. توالی نوکلئوتیدی موارد مثبت بیشترین شباهت را با جدایه های هند، مالزی، آلمان و چین نشان دادند. با توجه به شباهت فیلوژنتیک به نظر می‌رسد که جدایه شهرکرد و هاریانا و ماهاراشترا خاستگاه یکسانی دارند.

واژه‌های کلیدی: ویروس کمخونی عفونی جوجه، آزمایش زنجیره‌ای پلیمراز، فیلوژنی

**نویسنده مسئول: ایرج کریمی*

آدرس: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۱۸۲۱۲۴۳، فکس ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۲۷

پست الکترونیک: irkarimi@yahoo.com

مقدمه

کم خونی عفونی جوجه (CIA) اولین بار توسط یواسا (Yuasa) به عنوان یک بیماری جدید که توسط ذره ویروسی نوظهور ایجاد می‌شود. در جوجه‌های جوان گزارش شد. (۲۱ و ۲۲). علائم بیماری کم خونی آپلاستیک و آتروفی لنفوئید به طور عمومی توام با سرکوب ایمنی بود که با دخالت سایر عفونت‌های ویروسی، باکتریال، یا قارچی به وخامت می‌گراید. مطالعات بعدی نشان دادکه ویروس نقش مهمی در ایجاد بیماری‌های چند فاکتوری که با سندرم خونریزی دهنده و کم خونی آپلاستیک ظاهر می‌شود ایفا می‌کند. پس از اولین شناسایی این بیماری و جدا سازی ویروس عامل آن در ژاپن ویروس از سایر کشورهایی که صنعت مرغداری داشتند جدا شد. از آنجا که بیماری عموماً به کم خونی جوجه معروف است بهتر است ویروس را ویروس کم خونی جوجه (CIAV) نامید (۱۷).

ویروس را از اکثر بافت‌ها و سلول‌های بافی کوت جوجه‌های بیمار می‌توان جدا کرد و در روز ۷ بعد از عفونت احتمال یافتن ویروس بیشتر است. عصاره یکنواخت شده بافت‌ها را می‌توان برای ۵ دقیقه در ۷۰ درجه دم کرد یا با کلروفرم مجاور نمود تا آلودگی‌های احتمالی قبل از تلقیح به محیط کشت سلول حذف یا غیر فعال شوند (۲۳). آزمایش PCR ویژگی و حساسیت بیشتری از جداسازی ویروس در کشت سلولی دارد و آنالیز آنزیم‌های محدود کننده و تعیین توالی ژنوم را تسهیل می‌کند. ژنوم ویروس دارای ۳ چهار چوب قابل قرائت است که پروتئین‌های ویروسی به نام‌های VP1، VP2 و VP3 را کد می‌نماید (۱۳). در بین این، Vp13 مهم‌ترین آنهاست که پروتئین کپسید را کد می‌کند و دارای یک ناحیه بسیار متغیر دارای ۱۳ اسید آمینه است که نقش مهمی در حدت ویروس دارد (۱۴).

اگر چه حساسیت روش دومرحله‌ای یا nested PCR افزایش می‌یابد ولی با این حال در این روش احتمال آلودگی متقاطع بیشتر است (۶ و ۱۸).

از دیگر روش‌های تشخیصی آلودگی آزمایشات سرولوژی مثل الیزا، IF و آزمایشات خنثی سازی ویروس است. وجود موارد مثبت کاذب از اهمیت این آزمایشات در قبال PCR می‌کاهد.

در سال ۱۳۸۲ در مطالعه‌ای که محزونیه و همکاران در مرغداری‌های گوشتی استان چهار محال و بختیاری انجام دادند برای اولین بار نشان دادند ویروس در منطقه حضور دارد و تیتر مادری جوجه‌ها تا سن ۷-۲ هفته برای ویروس کم خونی عفونی جوجه‌ها مثبت بود (۱۵). در سال ۱۳۸۳ عمادی ژنوم ویروس کم خونی عفونی را با آزمون PCR در استان چهار محال و بختیاری شناسایی کرد و موارد مثبت را گزارش کرد (۱). کریمی و همکاران (۲۰۱۰) مواردی از آسیب‌های ویروس کمخونی عفونی جوجه را در بافت‌های لنفاوی تیموس و بورس پرندگان سروپوزیتیو یافتند. میانگین تعداد گلبول‌های قرمز و انواع گلبول‌های سفید نیز به طور معنی داری در این گروه کمتر از پرندگان بدون ضایعات میکروسکوپی بود که همه‌ی این علائم هیستوپاتولوژیک و هماتولوژیک نشاندهنده‌ی این بود که عفونت فعال با اثر سرکوبگری ویروس در جوجه‌های گوشتی استان چهار محال و بختیاری نقش دارد (۱۱). فرهودی و همکاران (۱۳۸۶) نیز حدود ۷۲ درصد موارد را از نظر سرمی در بین جوجه‌های گوشتی دارای علامت خونریزی در کشتارگاه در استان‌های خراسان، اصفهان و تهران و درصد بالاتری را با روش

PCR مثبت یافتند (۲). توالی نوکلئوتیدی ژنوم ویروس کمخونی عفونی جوجه در نواحی مرکزی و شمال شرق ایران و همچنین بسیاری از کشورهای مختلف مشخص و منتشر شده است لیکن این توالی‌ها در استان چهار محال و بختیاری گزارش نشده است. همچنین مطالعه فیلوژنی که بتواند اطلاعات جامعی از ویروس‌های در حال گردش را در ایران نشان دهد در دست نیست. این مطالعه به منظور تعیین توالی و مطالعه فیلوژنی ویروس کمخونی عفونی جوجه در استان چهار محال و بختیاری انجام شده است.

روش کار

در این مطالعه نمونه‌های کبد ۷۷ جوجه گوشتی مشکوک به بیماری کمخونی عفونی جوجه متعلق به ۸ مرغداری در نقاط مختلف استان چهار محال و بختیاری و جوجه‌های ارجاعی به درمانگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد اخذ و تا زمان انجام آزمایش PCR دردمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. جهت انجام آزمایش PCR ابتدا ژنوم نمونه‌ها به کمک کیت تجاری استخراج اسید نوکلئیک محصول شرکت سیناژن خالص سازی شد. در ادامه طبق پروتکل موجود Master Mix به حجم ۲۰ میکرو لیتر با ۵ میکرو لیتر DNA مخلوط شد. سپس با کمک پرایمر های CA1NF و CA2NR با روش PCR که محصولی به وزن ۴۸۰ جفت باز ایجاد می‌کند، قطعه‌ی اختصاصی ژنوم ویروس تکثیر و پس از الکتروفورز روی ژل ۱/۵ درصد با دستگاه تصویر برداری مشاهده شد. در صورت وجود قطعه تکثیر شده با طول مورد انتظار، حضور ویروس تأیید شد.

در این مرحله برای تکثیر ژن از دستگاه ترمو سیکلر (Corbett Research, Australia) تحت برنامه Palm cycler و پروتکل مشخص استفاده شد. تعداد سیکل حرارتی ۳۰ بار و درجه سرشت ۵۵ درجه سانتی گراد بود (۱). در آزمایش PCR ۱۹ مورد مثبت متعلق به ۳ مرغداری مختلف و نمونه‌های ارجاعی به درمانگاه دانشکده دامپزشکی شهرکرد به ثبت رسید. محصولات PCR متعلق به تعداد ۴ مورد مثبت از نمونه‌های مذکور که باند مورد انتظار را نشان دادند، برای تخلیص و تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت ژن‌فناوران ارسال شد. توالی نوکلئوتیدی قطعات تکثیر شده با استفاده از روش تعیین توالی سانگر در دو جهت با پرایمر های رفت و برگشت تعیین شد. کروماتوگرام‌های دریافت شده از شرکت ماکروژن (سئول، کره جنوبی) با فرمت FASTA توسط نرم افزار BLASTn نسخه 2.3.0 در وبگاه NCBI از نظر همولوگی بررسی شد. توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده با روش Neighbor-Joining با bootstrap ۵۰۰ تکرار (۲۰)، با روش محاسبه حداکثر مشابهت با نرم‌افزار MEGA 6 تحلیل و ارتباط فیلوژنتیکی آن‌ها با پروتیپ‌های ویروس CIAV تعیین و ترسیم شد.

در این تحقیق از پرایمر های مندرج در جدول ۱، استفاده شد. این پرایمر حاوی قسمتی از ژنوم ویروس است که در بردارنده قسمت‌هایی از VP1,VP2,VP3 است. و هدف تعیین توالی قسمتی از ژنوم بود که بر اساس شباهت موجود بین این جدایه و سایر جدایه ها خاستگاه آن از لحاظ فیلو ژنیک مشخص شود.

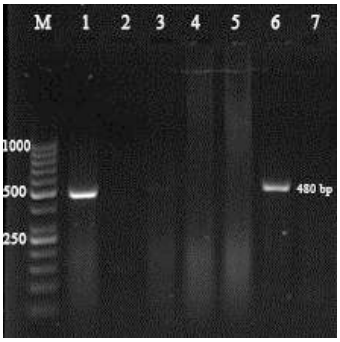
جدول شماره ۱: پرایمر های استفاده شده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر (3' ⟵ 5')	اندازه محصول (BP)
CA1N F	CCAAGAAGATACTTCACCCG	۴۸۰
CA2N R	TACGATACCGCTGTCTCCTC	

نتایج

بر اساس آزمایشات انجام شده در ۱۹ نمونه کبد متعلق به ۴ گله جوجه‌های گوشتی استان چهار محال و بختیاری، وجود ویروس CIAV با مشاهده‌ی باند ۴۸۰ زوج بازی تأیید شد (شکل شماره ۱). تعداد ۴ محصول PCR از ۴ مرغداری مذکور انتخاب و توالی نوکلئوتیدی آنها با استفاده از پرایمر های Forward و Reverse در دو جهت تعیین شد. کروماتوگراف این توالی‌ها با استفاده از نرم افزارهای Bio Edit، BLAST و MEGA 6 به ترتیب مشاهده، همتراز و مورد ارزیابی فیلوژنی قرار گرفت (شکل شماره ۲). پس از تصحیح توالی نوکلئوتیدی و حذف ابتدا و انتهای آن که به خوبی خوانده نشده بود، آنالیز فیلوژنی توالی قطعه‌ی ۴۳۰ نوکلئوتیدی باقیمانده سویه‌های چهارمحال و بختیاری و الگوی ژنوتیپ های ویروس کمخونی عفونی جوجه منتشر شده در بانک جهانی ژن NCBI با استفاده از روش حداکثر مشابهت (Maximum Likelihood method) بررسی شد (۱۹) و در نهایت با بررسی و مقایسه توالی‌ها از بین بیش از ۶۰۰ مورد ثبت شده در بانک ژن، مواردی که به عنوان پروتوتیپ گروه خود بودند انتخاب شد و درخت اولیه با روش Neighbor-Joining با bootstrap ۵۰۰ تکرار (۲۰)، تهیه و با روش محاسبه حداکثر مشابهت با نرم‌افزار MEGA 6، تکمیل گردید (۹) که در شکل شماره ۳ آمده است.

نتایج نشان داد که توالی همه‌ی ۴ نمونه یکسان است و همگی ۱۰۰٪ با سویه‌های هاریانا و ماهاراشترا در هند شباهت دارند. همچنین این سویه‌ها با سویه‌های دیگر که از چین، المان و مالزی که در فاصله سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۱ ثبت شده‌اند در یک شاخه قرار می‌گیرند و از این رو به نظر می‌رسد که خاستگاه این ویروس‌ها یکسان باشد لیکن با سویه مصر کمی اختلاف نشان می‌دهند. تشابه ۱۰۰ درصدی با سویه‌های ثبت شده در سال ۲۰۱۵ از ایران مربوط به مناطق دیگر نیز مشاهده گردید.



شکل شماره ۱: تصویر الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز. M: DNA ladder ۵۰ زوج بازی، ۱: کنترل مثبت با باند ۴۸۰ زوج باز، ۲: کنترل منفی، ۶: نمونه مثبت، ۲، ۴، ۵ و ۷: نمونه‌های منفی

ACAAGTTCACGGCCGTTGGAACNCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTGGTATCGCTGGNATTACAATCACTCTATCGCTGTG
TGGCTGCGCGAATGCTCGCGCTCCCACGCTAAGATCTGCAACTGCGGACAATTCAGAAAGCACTGGTTTCAAGAATGTGCCG
GACTTGAGGACCGATCAACCCAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATCCTGCGACCCCTCCGAGTACAGGGTAAGCGAGCTAAAAG
AAAGCTTGATTACCACTACTCCCAGCCGACCCCGAACCGCAAGAAGGTGTATAAGACTGTAAGATGGCAAGACGAGCTCGCA
GACCGAGAGGCCGATTTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACCACCTCAAGCGACTTCGACGAAGATATAAATTTNNACA
TCGGAGGAGACAGCGGTATCGTAA

شکل شماره ۲: توالی نوکلئوتیدی شاخه forward از نمونه‌های مورد آزمایش

شکل شماره ۳: آنالیز فیلوژنی توالی ۴۳۰ نوکلئوتیدی جدایه‌ی چهارمحال‌وبختیاری و الگوی ژنوتیپ های ویروس کمخونی عفونی جوجه منتشر شده در بانک جهانی ژن NCBI. نمونه Iran 2003 که با مربع سیاه رنگ مشخص شده پروتوتیپ ویروس‌های یافت شده در این تحقیق است.

بحث

عفونت CIAV تقریباً از سال ۱۹۹۲ در بین طیور جهان آشکار و گزارش شد و در حال حاضر تقریباً در همه‌ی کشورهای مختلف دنیا از جمله نیوزیلند، چین، نیجریه، مکزیک، فلسطین، ایالات متحده، مالزی، برزیل، ژاپن، امریکا و حتی استرالیا شایع است (۱، ۳، ۵ و ۷). برای اولین بار وجود ویروس در سال ۱۳۸۲ توسط محزونیه و همکاران در مرغداری‌های گوشتی استان چهارمحال و بختیاری نشاندهنده ی ۸۵٪ آلودگی جوجه‌های گوشتی با سن ۵-۲ هفته بود (۱۵). درسال ۱۳۸۳ عمادی وجود ژنوم ویروس کم خونی را با آزمون PCR در استان چهار محال و بختیاری تعیین کرد. بر اساس نتایج به دست آمده، میزان موارد مثبت ۲۵٪ اعلام شد (۱).

مطالعات محلی در کشورهای دیگر درجات مختلفی از مشابهت توالی نوکلئوتیدی ژنوم ویروس را با سایر سویه‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن نشان داده است. کاتو و همکاران در سال ۱۹۹۵ در ژاپن پس از

تعیین توالی جدایه ویروس کم خونی عفونی جوجه شباهت ۹۸٪ ژنوم ویروس را با جدایه CUX HAVEN-2 جدا شده از اروپا گزارش کردند و جدایه را با نام CAA82-2 به ثبت رساندند (۱۳).

می‌توان قسمت‌های اختصاصی ژنوم ویروس را هم مورد مطالعه قرار داد و شباهت را پیدا کرد. چنانچه رزیپال و همکاران ۱۹۹۷ با تکثیر و تعیین توالی یک بخش اختصاصی از ژنوم ویروس کم خونی عفونی جوجه شامل ۱۸۶ جفت باز، اعلام کردند که این جدایه حدود ۹۹/۵٪ با جدایه CUX-HAVEN قرابت دارد و آن را با نام جدایه ARKANSAS ثبت کردند (۱۶).

ویروس‌های جدا شده از یک منطقه هم می‌توانند با هم متفاوت باشند. کارپز و همکاران (۲۰۰۶) در اسلوونی ویروس را از سه همه گیری بیماری جدا کردند و پس از تعیین توالی اعلام کردند که این سه سویه با هم حدود ۹۹/۴٪ تا ۹۹/۹٪ قرابت دارند. همچنین مشخص کردند که این سویه‌ها بیشترین شباهت را با سویه BD-3 از بنگلادش دارند (۱۲).

بررسی توالی نوکلئوتیدی گزارش شده از قسمت‌های مختلف ژنوم این ویروس در سراسر دنیا تنوع شدیدی را نشان می‌دهد و در اکثر مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف، چند ژنوتیپ همزمان در بین گله‌های طیور در حال گردش بوده است. با در نظر گرفتن این نکته که در اکثر مطالعات انجام شده توجه بیشتر محققین به سویه‌های محلی معطوف بوده و در مطالعه فیلوژنی خود همه موارد ثبت شده در بانک جهانی ژن که دارای اختلاف بودند را در نظر نگرفته‌اند، نامگذاری و طبقه بندی ژنوتیپ ها بر اساس توالی ژن‌های مختلف، روش‌های متفاوت با نامگذاری های مختلف همراه بوده است. به عنوان مثال کیم و همکاران (۲۰۱۰) بر اساس مطالعه فیلوژنی ناحیه ی ژن‌های VP1، سویه‌های کره‌ای را متعلق به دو ژنوتیپ ۲ و ۳ دانستند و توالی نوکلئوتیدی تعدادی از آنها را مشابه توالی نوکلئوتیدی واکسن‌های رایج در آن کشور گزارش نمودند (۱۴). تحقیق مشابهی توسط Hailemariam وهمکاران در سال ۲۰۰۸ نیز این تنوع را در سویه‌های مالزی آشکار نمود و آنها نیز سویه‌های ویروس را در دو گروه قرار دادند (۱۰). مطالعه Altahir و همکاران در چین (۲۰۱۱) بر روی توالی نوکلئوتیدی ژنوم کامل ویروس، آشکار نمود ویروس‌های کمخونی عفونی جوجه‌ها در چین در ۴ گروه از A تا D قابل طبقه بندی هستند و همگی متعلق به گروه بیماریزا بودند زیرا در موقعیت ۳۹۴ دارای اسید آمینه گلوتامین بودند (۸). این نتایج در مطالعه‌ی Zhang و همکاران (۲۰۱۳) نیز تکرار شد و گروه E را نیز به گروه‌های قبلی افزودند. در این مطالعه اشاره شد نوترکیبی بین ژنوم گروه‌ها نقش مهمی را در ایجاد سویه‌های جدید داشته است (۲۴).

در مطالعه حاضر حضور آلودگی با این ویروس در طیور گوشتی استان چهارمحال و بختیاری با تعیین توالی نوکلئوتیدی سویه‌های ویروس کمخونی عفونی جوجه تأیید شد. پس از تعیین توالی چند کلون از نمونه مورد نظر محتمل‌ترین توالی به دست آمد و مشخص شد که توالی نمونه‌های مثبت کاملاً شبیه بوده و با مقایسه آنها با سویه‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن نشان داده شد که بیشترین شباهت را با سویه‌های هاریانا و ماهاراشترا (۹۸٪) دارد و به نظر می‌رسد که خاستگاه این دو ویروس یکسان بوده است. مطالعه فیلوژنی ویروس‌های استان چهار محال و بختیاری آنها را متعلق به ژنوتیپ ۳ نشان داد که با

تعدادی از موارد گزارش شده قبلی توسط Kaffashi در سال ۲۰۱۵ در بانک جهانی ژن مشابه بود ولی با مواردی که توسط Bassami و همکاران در سال ۲۰۰۹ از خراسان (شمال شرق ایران) انتشار یافته بود اختلاف داشت. در کل این مطالعه فیلوژنی نشان داد، دست کم دو ژنوتیپ ۱ و ۳ در حال حاضر در ایران حضور دارند (۴) که در صورت انتخاب واکسن باید به آنها توجه نمود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مادی و معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام گرفته است و بدینوسیله از زحمات مسئولین محترم این حوزه تشکر می‌گردد. همچنین از همکاری بی دریغ خانم فاطمه کبیری قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. عمادی، آ (۱۳۸۲)، جستجوی ژنوم ویروس کم خونی عفونی جوجه (CIAV) به روش PCR در جوجه‌های گوشتی استان چهار محال و بختیاری، پایان نامه دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد،، ش،۹۱

۲. فرهودیم, طرقی ر، باسامی م, کیانی زاده م، چرخکار س (۱۳۸۶). عفونت ویروس کم خونی عفونی جوجه‌ها در گله‌های گوشتی ایران، *نشریه علمی-پژوهشی آرشیو رازی*، جلد ۶۲، شماره ۱، صفحات ۱- ۶

3. Bassami, M.R., Berryman, D., Wilcox, G.E., Raidal, S. R. (1998). Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus plant circoviruses, and chicken anemia virus. *Virology* **249:** 453-459.

4. Bassami, M.R., Hashemitabar, G. (2012). Sequence analysis of VP1 gene of chicken infectious anemia virus circulating in commercial broiler farms of northeast Iran. *3rd International Veterinary Poultry Congress*. Mashhad, Iran.

5. Brentano, L., Mores, N., Wentez, I., Chandratilleke, D., Schat, K. A. (1991). Isolation and identification of chicken anemia agent. *Avian Pathology* **17:** 713-723.

6. Cardona, C.J., Oswald, W.B., Schat, K. A. (2000). Distribution of chicken infectious anemia virus in the reproductive tissues of specific pathogen-free chicken. *Journal of general virology* **81:** 2067-2075.

7. Daividson,I., Kedem, M., Borochovitz, H., Kass, N., Ayali, G., hamzani, E., Perelman, B., smith B., perk, S. (2003). Chicken infectious anemia virus infection in Israeli commectial flock: Amplification ,clinical signs, performance and antibody status, Avian *Disease* **48:** 108-118.

8. Eltahir, Y.M., Qian, K., Jin, W., Wang, P., Qin, A. (2011). Molecular epidemiology of chicken anemia virus in commercial farms in China. *Virology Journal* 8: 145-152.

9. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39:**783-791.

10. Hailemariam, Z., Omar, A.R., Hair-Bejo, M., Giap, T.C. (2008). Detection and characterization of chicken anemia virus from commercial broiler breeder chickens. *Virology Journal* **5:** 128-138

11. Karimi, I., Mahzounieh, M., Bahadoran, S., Azad, F. (2010). Chicken anemia virus infection in broiler chickens in Shahrekord, Iran: Serological, hematological, and histopathological findings. *Comparative clinical pathology*, **19:** 63-67.

12. Karpez, U., Barlic D.M., Top, L.I., hoastnic, P., Rojs, O.Z. (2006). Biological and molecular characterization of chicken anemia virus isolates from Slovenia. *Avian Disease*. **50:** 69-76.

13. Kato, A., Fujino, M., Nakamora, T., Ishihsma, A., Otaki, Y. (1995). Gene organization of chicken anemia virus, *Journal of Virology* **209:** 480-488.

14. Kim, H.R., Kwon, Y.K., Bae, Y.C., OEM, J.K., Lee, O.S. (2010). Molecular characterization of chicken infectious anemia viruses detected from breeder and broiler chickens in South Korea. *Poultry science*, **89:** 2426-2431.

15. Mahzounieh, M., Karimi, I., Dastjerdi, M., Zamani, A. (2003). High prevalence of chicken anemia virus infection in shahrekord broiler. *6th international congress of veterinary virology*. Saint Malo, France.

16. Rozypal, T., L, Skeeles, J.K., Dash, G.K. Anderson E.J. Beasly, J.N. (1997). Identification and partial characterization of Arkansas isolates of chicken anemia virus. *Avian disease* **41:** 610-616.
17. Schat, K. A., van Santen, V. L. (2008). Chicken Infectious Anemia In: Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R., Swayne D.E. *Disease of poultry*. 12th edition, Wiley-Blackwell, London: 211-235.
18. Soine, C., Watson, S.K. Rybicki, E. Lucio, B. Nordgren, R.M. Parrish C.R. Schat, K. A. (1993). Determination of the detection limit of the polymerase chain reaction infectious anemia virus. *Avian Disease* **37:** 467-476.
19. Tamura, K., Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10:** 512-526.
20. Tamura, K., Peterson D., Peterson, N., Stecher, G., Nei M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28:** 2731-2739.
21. Taniguchi, T., Yuasa, N., Maeda, M., Horiachi, T. (1982). Hemato pathological changes in dead and moribund chicks induced by chicken anemia agent. *National institute of Animal health* **22:** 61-66.
22. Yuasa, N., Taniguchi, T., Yoshida, I. (1979). Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks *Avian Disease* **23:** 366-38
23. Yuasa, N., Taniguchi, T., Imada, T. Hihara, H. (1983). Distribution of chicken anemia agent (CAA) and detection of neutralizing antibody in chicks experimentally inoculated with CAA. *National institute of Animal health*. **23:** 78-81.
24. Zhang, X., Liu, Y., Wu, B., Sun, B., Chen, F., Ji, J., Xie, Q. (2013). Phylogenetic and molecular characterization of chicken anemia virus in southern China from 2011 to 2012. *Scientific reports,* **3:** 3519-3526.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 13, Issue 1, 2017

Phylogenetic characterization of chicken infectious anemia virus detected from broiler chickens in Chahrmahal VA Bakhtiari province, Iran

Karimi, I. [*1], ***Mahzounieh, M.R.*** [2], ***Barati, J.*** [3]

1. Associate professor, pathobiology department, veterinary faculty, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. Professor, pathobiology department, veterinary faculty, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
3. Graduate student, veterinary faculty, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received Date: 1 June 2016 *Accepted Date:3 March 2017*

Abstract

Chicken infectious anemia virus (CAV), cause severe anemia, and makes atrophy in lymphatic organs include thymus, bursa of fabricious, spleen and bone marrow. It suppresses immunity system and increase the susceptibility to other infections. Subclinical infection of CAV caused high economic losses in broiler flocks. Isolation of the virus in tissue culture, detection of genome by PCR based method and serological tests are diagnostic methods of chicken infectious anemia virus. The aims of the present study were detection and partial nucleotide sequencing of CAV genome by PCR and direct sequence method, respectively. Seventy seven liver samples from chickens belong to 8 different broilers flocks around the Sharekord city, in Chahrmahal VA Bakhtiari province, were tested. Results showed that 19 samples belong to 4 broiler flocks were positive. Amplicons of 4 PCR positive samples belong to 4 different flocks were sequenced and the results showed that partial gene sequences of chicken infectious anemia viruses had 100% homology. These sequences had more homology with nucleotide sequences of Indian, Malaysian, German and Chinese CIAV strains. With regards to phylogenic similarity, it seems that all of these isolates have a same origin.

Keywords: Chicken infectious anemia virus, Polymerase chain reaction test, phylogeny

**Corresponding author: Karimi, I.*
Address: pathobiology department, veterinary faculty, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
Tel:+983832324427
Email: irkarimi@yahoo.com