JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره هفتم، شماره دوم، ۱۳۹۰، پیاپی ۲۳: ۳۶-۲۵

شناسایی و آنالیز فیلوژنتیکی ویروس بیماری نیوکاسل به روش مولکولی در طیور صنعتی استان اصفهان

محمد داود رحیمیان[1*]، عبدالکریم زمانی مقدم[2]، حسن ممتاز[3]، محمد حسین نیازی[4]

۱- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، عضو باشگاه پژوهشگران جوان واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴- رئیس بخش طیور اداره کل دامپزشکی استان اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۵ اسفند ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: ۱۸ خرداد ۱۳۹۱

چکیده

ویروس بیماری نیوکاسل (APMV-1)، از خانواده Paramyxoviridae، تحت خانواده Paramyxovirinae و جنس Avulavirus می‌باشد که واجد هفت ژن `3 NP/V-M-F-HN-L 5` است. این بیماری در سرتاسر دنیا به عنوان یکی از مهمترین بیماری‌های ماکیان و سایر پرندگان به حساب آمده و می تواند گاهی باعث مرگ و میر ۱۰۰ درصدی در طیور مبتلا گردد. به دلیل این که طبیعت بیماری نیوکاسل حاد و وخیم است و عواقب متعاقب آن خطرناک است، بیماری مذکور از طرف دفتر بین‌المللی همه‌گیری‌ها (OIE) جزء بیماری‌های لیست A گروه‌بندی شده است. به منظور تعیین قرابت ژنتیکی ژن F ویروس NDVدر ایران و مقایسه آن با سایر کشورها، در ابتدا قطعه ۱۰۹۷ جفت بازی مربوط به ژن M از ۳۷ نمونه بافتی ویروس جهت شناسایی بیماری و سپس قطعه ۱۳۴۹ جفت بازی از ژنF جهت تعیین قرابت ژنتیکی، در سیستم RT-PCR تکثیر داده شد. محصول PCR مربوط به ژن F، ۴ نمونه مثبت جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدی سکانس گردید. نتایج حاصل از مقایسه ردیف نوکلئوتیدی تعیین شده در این مطالعه با سکانس شناخته شده ژن F ویروس نیوکاسل در سایر کشورها نشانگر وجود ۱/۴ تا ۲۷/۳درصد تنوع ژنتیکی در این ژن بود که در این میان بیشترین قرابت با ردیف نوکلئوتیدی ژن F در هند (سکانس AY339401.1) و بیشترین تفاوت با ردیف نوکلئوتیدی شناخته شده این ژن در ایالات متحده (سکانس ACD14136.1) مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: *ویروس بیماری نیوکاسل، ژن M، ژن F، RT-PCR، قرابت ژنتیکی، ایران.*

*نویسنده مسئول: محمد داود رحیمیان

آدرس: دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۳۰۲۱۱۴۸

پست الکترونیک: *modarahimian@yahoo.com*

مقدمه

ویروس بیماری نیوکاسل (APMV-1) از خانواده Paramyxoviridae،تحت‌خانواده Paramyxovirinae و جنس *Avulavirus* می‌باشد (۱). این بیماری در سرتاسر دنیا به عنوان یکی از مهمترین بیماری‌های ماکیان و سایر پرندگان به حساب می‌آید که گاهی باعث مرگ و میر ۱۰۰ درصدی در طیور مبتلا می‌شود. به‌دلیل این که طبیعت بیماری نیوکاسل حاد و وخیم است و عواقب متعاقب آن خطرناک است، ND از طرف دفتر بین‌المللی همه‌گیری‌ها (OIE) جزء بیماری‌های لیست A گروه‌بندی شده است (۸). جدا از اهمیت بیماری نیوکاسل به عنوان بیماری که باعث بروز سوء تغذیه در جوامع فقیر انسانی می‌شود، ویروس بیماری نیوکاسل به عنوان یک عامل پاتوژن برای انسان‌ها شناسایی شده است. گزارش‌های بیان شده از درگیری بیماری در انسان به صورت تصادفی و تک‌گیر است (۱).

خانواده ویروسی Paramyxoviridae، Filoviridae، Rhabdoviridae راسته ویروسی Mononegavirales را تشکیل می‌دهند.

خصوصیات این راسته ویروسی عبارت است از ژنوم تک رشته‌ای[1]، غیرتکه‌ای[2]، RNA دار با سنس منفی[3]. خانواده ویروسی Paramyxoviridae به دو تحت‌خانواده Paramyxovirinae و Pneumovirinae تقسیم می‌شوند (۱).

نُه سروگروه[4] از پارامیکسوویروس‌های پرندگان شناسایی شده است: APMV-1 تا APMV-9 (۱۲). از این میان، ویروس بیماری نیوکاسل (APMV-1) به عنوان مهمترین پاتوژن برای صنایع طیور مطرح می‌باشد، اما APMV-2، APMV-3 ، APMV-4 ، APMV-7 نیز به عنوان عوامل بیماری‌زا در صنایع طیور شناخته شده‌اند (۱).

ویروس ND (APMV-1) دارای ژنوم RNA خطی تک‌رشته‌ای حاوی ۱۵۱۹۸-۱۵۱۸۶ نوکلئوتید می‌باشد (۱). این ژنوم هفت پروتئین ویروسی را کد می‌کنند که عبارتند از: ۱-L ۲-HN ۳-F ۴-NP ۵-M ۶-V-P، ترتیب ژن‌ها برای تشکیل پروتئین ها در ژنوم ویروس به ترتیب `5 L-HN-F-M-V/NP 3` می‌باشد. از این میان ژن F، احتمالاً در بروز حدت این ویروس نقش اصلی را بر عهده دارد (۱).

استراتژی تکثیر به کار رفته توسط NDV از اصول تکثیر ویروس‌های با سنس منفی تبعیت می‌کند و بخصوص روش تکثیری مشابه *Avulaviruses* دارد (۱). نخستین مرحله اتصال ویروس به‌گیرنده‌های سلولی میزبان می‌باشدکه توسط پلی پپتیدهای HN انجام می‌پذیرد. در مرحله بعد اتصال ویروس و غشاء سلولی میزبان توسط فعالیت اتصالی پروتئین F رخ می‌دهد و بدین ترتیب نوکلئوکپسید وارد سلول میزبان می‌شود. تکثیر درون سلولی ویروس کاملاً درون سیتوپلاسم رخ می‌دهد. به علت اینکه RNA ویروس سنس منفی است RNA ترانس کریپتاز ویروسی باید مکمل این رشته را به صورت سنس مثبت ساخته تا به جای mRNA سلول عمل کرده و بتواند از مکانیسم‌های سلولی برای ترجمه به پروتئین و ژنوم ویروس استفاده کند. پروتئین F سنتز شده با یک مقدمه غیرعملکردی بنام پروتئین F0 تولید شده، این پروتئین F0 بوسیله پروتئینازهای سلول میزبان به F1 و F2 تقسیم می‌شود. اهمیت این ناحیه‌شکاف در بیماری‌زایی سویه‌های‌ویروس نیوکاسل بسیارمهم می‌باشد. همچنین پروتئین HN نیز در برخی سویه‌های NDV نیازمند شکاف پس از ترجمه می‌باشد.

[1] Single stranded
[2] Non segmented
[3] Negative-sence RNA viruses
[4] Serogroup

در انتها پروتئین‌های ساخته شده در سلول آلوده به غشای سلولی انتقال یافته و به دنبال نزدیک شدن نوکلئوکپسید، دیواره سلولی تغییر شکل یافته تکه‌های ویروسی از سطح سلول آلوده جوانه می‌زنند (۱).

به طور گسترده‌ای ویروس بیماری نیوکاسل از نظر تیپ و حدت بیماری‌زایی که ایجاد می‌کند متفاوت است. این تفاوت‌های موجود اغلب منجر به بروز برخی مشکلات در شناسایی و تشخیص بیماری به عنوان Newcastle Disease (ND) می‌شود به خصوص در مواقعی که این ویروس به کشور یا ناحیه‌ای برای نخستین بار وارد می‌شود و متعاقب آن بیماری نوپدیدی ظاهر می‌گردد. تشخیص ND خصوصاً در این گونه موارد پیچیده و بغرنج می‌شود. برای آسان‌سازی‌این موضوع، طبقه‌بندی‌فرم‌هایا پاتوتیپ‌های بر پایه علائم کلینیکی در مرغان توسط دو دانشمند به نام‌های Hanson و Beard به طور خلاصه انجام پذیرفته است (۱):

۱) Doyle's form: که فرمی از بیماری با عفونتی حاد و کشنده، در کلیه سنین مرغان می‌باشد. ضایعات خونریزی دهنده در دستگاه گوارش غالباً مشاهده می‌شود و این فرم از بیماری به‌عنوان بیماری ولوژنیک احشاء دوست نیوکاسل[1] نامیده می‌شود.

۲) Beache's form: فرمی حاد و غالباً همراه با عفونت‌های کشنده در کلیه سنین مرغان می‌باشد. در این فرم از بیماری علائم تنفسی و عصبی مشاهده می‌گردد، بنابراین این فرم از بیماری به عنوان فرم ولوژنیک عصب‌گرا[2] نامیده می‌شود.

۳) Beaudett's form: که به نظر می‌رسد نسبت به فرم NVND کمتر بیماری‌زا باشد، درحالی که دراین فرم معمولاً مرگ و میر در پرندگان جوان تنها مشاهده می‌گردد. ویروس‌هایی که منجر به بروز این تیپ از بیماری می‌شوند از پاتوتیپ‌های مزوژنیک بیماری هستند و این پاتوتیپ‌ها معمولاً به عنوان واکسن‌های زنده ثانویه به کار گرفته می‌شوند.

۴) Hitchner's form: این فرم همراه با عفونت‌های جزئی یا خفیف تنفسی بروز می‌یابد که بوسیله ویروس‌هایی از پاتوتیپ‌هایی لنتوژنیک بروز می‌یابند، درحالی‌که این پاتوتیپ‌های لنتوژنیک معمولاً به‌عنوان واکسن زنده به کار می‌روند.

۵) Asympyomatic enteric form: فرمی که اصولاً باعث عفونت‌های گوارشی بوسیله‌ی ویروس‌های لنتوژنیک می‌شود، ویروس‌هایی که هیچ‌گونه بیماری واضح و مشخصی را ایجاد نمی‌کنند. برخی از واکسن‌های تجارتی زنده طیور صنعتی در این پاتوتیپ جای می‌گیرند (۱).

در استان اصفهان با وجود واکسیناسیون علیه بیماری هر از چندگاه تلفات بالایی در طیور صنعتی و بومی بروز می‌کند که احتمالاً ناشی از بیماری نیوکاسل می‌باشد. از آنجایی که تنها از روی علایم کلینیکی و کالبدگشایی نمی‌توان بیماری را تشخیص داد و شناسایی هرچه سریع‌تر بیماری می‌تواند در کاهش تلفات و یا جلوگیری از انتشار آن از اهمیت زیادی برخوردار باشد. هدف از این مطالعه بررسی نقش ویروس نیوکاسل در تلفات مذکور و شناسایی خصوصیات مولکولی ویروس نیوکاسل در طیور استان اصفهان می‌باشد.

در این مطالعه علاوه بر شناسایی ویروس بیماری نیوکاسل بر پایه ژن M در نمونه‌های بافتی به کمک تعیین ردیف نوکلئوتیدی ژن F در ایران و قرابت ژنتیکی آن با سایر کشورها آنالیز فیلوژنتیکی ویروس بیماری نیوکاسل نیز بررسی شده است.

[1] Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease(VVND)
[2] Neurotropic Velogenic Newcastle Disease(NVND)

مواد و روش کار

تعداد ۲۰ نمونه ویروس NDV جدا شده از نمونه‌های بافتی نظیر طحال، مغز، نای، لوزه سکومی، ریه و دوازدهه طیور گوشتی مبتلا به بیماری نیوکاسل بعلاوه ۱۷ نمونه ویروسی مشکوک رشد کرده در مایع آلانتوئیک به همراه نمونه کنترل مثبت واکسن لاسوتای موسسه رازی انتخاب گردید.

جهت استخراج RNA از نمونه‌های آلوده به NDV از کیت Tripure ساخت شرکت Roche Applied Science طبق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده استفاده شد.

جهت ساخت cDNA از نمونه‌های RNA استخراج شده، در مرحله اول ۵ میکرولیتر DEPC-Water به همراه ۱ میکرولیتر Random Hexamer و ۲ میکرولیتر از RNA مربوط به هر نمونه در یک تیوب استریل مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از ۵ دقیقه سرد کردن تیوب روی یخ به مخلوط فوق ۵ میکرولیتر M-Mulv RT buffer 5X، ۲ میکرولیتر dNTP 10 mM و ۱ میکرولیتر آنزیم M-Mulv RT اضافه و به مدت ۱/۵ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۲).

جهت شناسایی ویروس بیماری نیوکاسل قطعه ژنی کد کننده پروتئین M به طول ۱۰۹۷جفت باز (۱۲) و جهت تعیین قرابت ژنتیکی این ویروس قطعه ژنی کدکننده محل شکاف پروتئین F به طول ۱۳۴۹جفت باز (۶) به روش PCR تکثیر داده شد.

جدول ۱- ردیف نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن F و M ویروس NDV

Primer Name	Size of product (bp)	Primer Sequence	References
NDV (Mgene)-F	1097	5'-TCT AGG ACA ATT GGG CTG TAC TTT GAT T-3'	14
NDV (Mgene)-R		3'-AGA GAC GCA GCT TAT TTC TTA AAA GGA TTG-5'	
NDV (Fgene)-F	1349	5'-TAC CTC TAT CCG TAG GAT ACA AGA GTC TG-3'	5
NDV (Fgene)-R		3'-GAT CTA GGG TAT TAT TCC CAA GCC A-5'	

جهت انجام آزمایش PCR و تکثیر قطعه ژنی مورد نظر از دستگاه Master Cycler gradient (Eppendorf) با حجم ۵۰ میکرولیتر واجد۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۱ میلی مول $MgCl_2$، ۱۵۰ میکرومول dNTP، ۱۰۰پیکومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲/۵ میکرولیتر از cDNA مربوط به هر نمونه استفاده شد.

برنامه حرارتی مورد استفاده برای تکثیر ژن M عبارت بود از: یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۸۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱۰دقیقه. برنامه حرارتی مورد استفاده برای تکثیر ژن F عبارت بود از: یک سیکل ۹۴درجه سانتی گراد ۶ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۰ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد ۸۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱۰۵ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه.

جهت تائید وجود قطعه تکثیر یافته، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR هر دو مرحله روی ژل ۱درصد آگاروز

واجد اتیدیوم بروماید در حضور مارکر ۱کیلو بازی DNA در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز گردید.

محصول PCR مربوط به ۴ نمونه از نمونه‌های مثبت شده در آزمایش PCR جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدی ژن تکثیر یافته به شرکت Macrogen کشور کُره ارسال و به روش Sanger Sequencing Method سکانس گردید.

ردیف نوکلئوتیدی ژن F تعیین شده در این مطالعه با سکانس شناخته شده این ژن در سایر کشورها (ثبت شده در بانک ژنی NCBI) با استفاده از نرم‌افزار Clustal X و Njplot مقایسه و ضمن تعیین Sequence Identity Matrix درخت فیلوژنی مربوطه رسم گردید.

نتایج

ردیف نوکلئوتیدی ژن F ویروس بیماری نیوکاسل مربوط به ۴ نمونه مثبت شده در آزمایش RT-PCR سکانس و با استفاده از نرم‌افزار Clustal X با ردیف نوکلئوتیدی این ژن ثبت شده در بانک ژنی (NCBI)، قرابت فیلوژنی گردید. پس از مقایسه شباهت‌ها و تفاوت‌های ردیف نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار Njplot قرابت فیلوژنی آن‌ها ترسیم شد که درخت فیلوژنی حاصله در شکل۱ و میزان قرابت این ژن در نمونه‌های ایران با سایر کشورها در جدول ۲ نشان داده شده است.

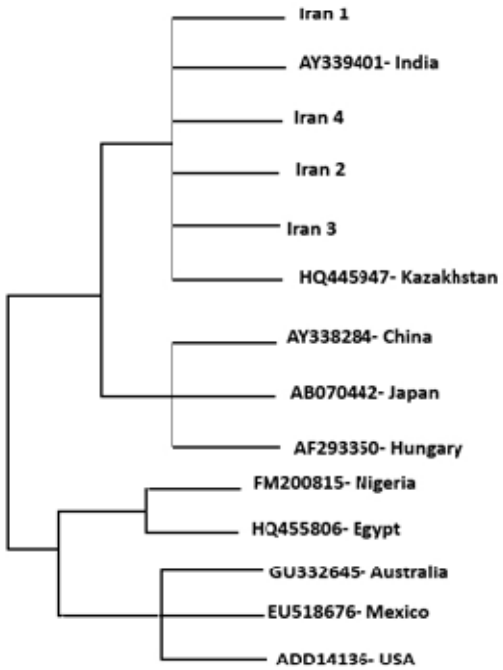
باتوجه به توضیحات قبلی در خصوص حضور دو جفت اسید آمینه بازیک در جایگاه‌های ۱۱۶-۱۱۳ و یا حضور اسید آمینه فنیل آلانین در جایگاه ۱۱۷در ناحیه شکاف پروتئین F در ویروس‌های حاد اینگونه می‌توان گفت که ویروس‌های جدا شده از گله های استان اصفهان با حدت بالا بودند.

جدول۲- ترتیب نوکلئوتیدی و ترجمه اسید های آمینه در منطقه شکاف پروتئین F در نمونه های ویروسی جدا شده از استان اصفهان و مقایسه آن با چند سویه دیگر

Virus strain	Virulence for Chicken	Cleavage site Amino acid/Sequence111to117	References
La Sota	Low	-G-G-R-Q-G-R*L- GGG GGA AGG CAG AGA CGT CTT	۱
Peats Ridge (Australian isolate)	Low	-G-R-R-Q-G-R*L- GGA AGG AGA CAG AGA CGT CTT	۱
NDV1-Esf	High	-G-R-R-Q-R-R*F- GGG AGG AGG CAG AGA CGT TTT	-
NDV2-Esf	High	-G-R-R-Q-R-R*F- GGA AGG AGG CAG AGA CGT TTT	-
NDV3-Esf	High	-G-R-R-Q-R-R*F- GGG AGG AGG CAG AGA CGT TTT	-
NDV4-Esf	High	-G-R-R-Q-R-R*F- GGG AGG AGG CAG AGA CGT TTT	-
Herts 33	High	-G-R-R-Q-R-R*F- GGA AGG AGA CAG AGA CGT TTT	۱
Dean Park (Australian isolate)	High	-G-R-R-Q-R-R*F- GGA AGG AGA CAG AGA CGT TTT	۱

Table 3-Sequence identity matrix of partial F gene of Iranian NDV virus isolate in Iran and comparison with 10 known reference sequences

Seq	Iran 2	ACD14136.1 USA	AY338284.1 China	AY339401.1 India	EU518676.1 Mexico	FM200815.1 Nigeria	Iran 4	HQ445947.1 Kazakhstan	Iran 3	HQ455806.1 Egypt	AB070442.1 Japan	GU332645.1 USA-Australia	Iran 1	AF293350.1 Hungary
Iran2	ID	0.627	0.739	0.925	0.726	0.646	0.985	0.901	0.987	0.711	0.801	0.637	0.963	0.808
ACD14136.1 USA	0.627	ID	0.825	0.701	0.903	0.876	0.691	0.821	0.704	0.806	0.906	0.937	0.629	0.802
AY338284.1 China	0.739	0.825	ID	0.761	0.629	0.634	0.764	0.899	0.772	0.796	0.972	0.862	0.777	0.924
AY339401.1 India	0.925	0.701	0.761	ID	0.821	0.729	0.964	0.901	0.972	0.726	0.706	0.805	0.986	0.901
EU518676.1 Mexico	0.726	0.903	0.629	0.821	ID	0.799	0.791	0.729	0.806	0.901	0.897	0.961	0.821	0.709
FM200815.1 Nigeria	0.646	0.876	0.634	0.729	0.799	ID	0.679	0.806	0.704	0.967	0.811	0.921	0.826	0.706
Iran4	0.985	0.691	0.764	0.964	0.791	0.679	ID	0.971	0.989	0.711	0.806	0.701	0.901	0.808
HQ445947.1 Kazakhstan	0.901	0.821	0.899	0.901	0.729	0.806	0.971	ID	0.921	0.781	0.871	0.826	0.973	0.806
Iran3	0.987	0.704	0.772	0.972	0.806	0.704	0.989	0.921	ID	0.716	0.806	0.691	0.996	0.811
HQ455806.1 Egypt	0.711	0.806	0.796	0.726	0.901	0.967	0.777	0.781	0.716	ID	0.811	0.811	0.777	0.811
AB070442.1 Japan	0.801	0.906	0.972	0.706	0.897	0.811	0.806	0.871	0.806	0.811	ID	0.899	0.821	0.91
GU332645.1 USA-Australia	0.637	0.937	0.862	0.805	0.961	0.921	0.701	0.826	0.691	0.811	0.899	ID	0.666	0.801
Iran1	0.963	0.629	0.777	0.986	0.821	0.826	0.901	0.973	0.996	0.777	0.821	0.666	ID	0.836
AF293350.1 Hungary	0.808	0.802	0.924	0.901	0.709	0.706	0.808	0.806	0.811	0.811	0.91	0801	0.836	ID



تصویر ۱- درخت فیلوژنی مربوط به آنالیز ردیف نوکلئوتیدی ژن F ویروس NDV در ایران با تعدادی از سکانس های ثبت شده این ژن در بانک ژنی

بحث و نتیجه‌گیری

در بین بیماری‌های ویروسی در پرندگان، بیماری نیوکاسل در صدر اهمیت قرار دارد به همین جهت است که تحقیقات بسیار گسترده‌ای در مورد روش‌های تشخیص، کنترل و پیشگیری از بیماری با استفاده از روش‌های سرولوژیک، ویروس‌شناسی و مولکولی انجام گرفته است. بیماری نیوکاسل در هر منطقه‌ای بر حسب عوامل موثر در بروز و شدت بیماری چهره‌ای متفاوت دارد و باتوجه به تشابه علائم کلینیکی و کالبدگشایی با سایر بیماری‌های تنفسی ویروسی و میکروبی هیچکدام از علائم فوق نمی‌تواند بعنوان یک نشانه اختصاصی بشمار آید. لذا استفاده از آزمایشات پاراکلینیکی که در کمترین زمان ممکن بتوانند سبب تشخیص و شناسایی عامل بیماری گردند، از اهمیت بسزائی در جهت کم کردن میزان تلفات و پیشگیری از عواقب بعدی بیماری برخوردار است (۱). Aldous و همکاران اینگونه بیان می‌کنند که تعیین ژنوتیپی‌سویه‌های NDV جداسازی شده باید بخشی از روش‌های تشخیصی در تعیین خصوصیات و ویژگی‌های ویروسی برای آزمایشگاه‌های رفرانس محسوب شود که این مسئله از طریق تعیین توالی و سکانس ناحیه‌ای ۳۷۵ نوکلئوتیدی شامل ناحیه‌ای شکاف ژن F0 امکان‌پذیر می‌باشد. در طی روند تکثیر ویروس بیماری نیوکاسل پروتئین مهم عملکردی Fusion protein به عنوان گلیکوپروتئینی پیش‌ساز برای F0 فعالیت می‌کند که این گلیکوپروتئین در طی روند شکاف به دو زیر واحد F1 و F2 تقسیم می‌شود (۱۱). این شکاف پس از ترجمه پروتئین ویروسی توسط پروتئازهای سلول میزبان رخ می‌دهد (۶). اگر شکاف رخ ندهد ذرات ویروسی غیرعفونی خواهند بود (۷).

استفاده از روش RT-PCR بدلیل سریع بودن حساس بودن و عدم استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در مقایسه با روش‌هایی مانند جداسازی ویروس و روش‌های سرولوژی جهت تشخیص بیماری کاربرد و اهمیت بالاتری دارد (۱).

در یک مطالعه انجام گرفته بر روی آنالیز سکانس ژنومی پروتئین F و M پارامیکسوویروس‌های تیپ ۱ بدست آمده از کبوتران در اسلوونی این‌گونه بیان شده است که کلیه سویه‌های PMV-1 مورد مطالعه در این تحقیق به گروه مشخصی از PMV-1 کبوتران با درجه بیماری‌زایی متوسط تعلق دارد. اما این سویه‌ها به عنوان سویه‌های ولوژنیک NDV برای ماکیان هستندکه منجر به واگیری وتلفات شدید در ماکیان می‌شوند. در نتیجه سویه‌های PMV-1 درحال چرخش بین کبوتران وحشی آزاد به عنوان یک خطر بالقوه برای صنایع طیور در سرتاسر جهان محسوب می‌شوند (۲).

در مطالعه انجام شده بر روی ۱۷ سویه جداسازی شده از ویروس بیماری نیوکاسل در کشور ژاپن به روش RT-PCR مشخص گردید که این سویه‌های جداسازی شده به سه گروه ژنتیکی VI و VII و I طبقه‌بندی می‌شوند که پیش از این نیز گزارش شده است.کلیه سویه‌های جداسازی شده از ماکیان در گروه ژنوتیپی VII تقسیم‌بندی می‌شوند؛ که ژنوتیپ VII مسئول اصلی در واگیری‌های بیماری نیوکاسل در کشورهای آسیای شرقی می‌باشد. همچنین کلیه سویه‌های جداسازی شده پس از سال ۲۰۰۲ میلادی در کشور ژاپن با سویه‌های جداسازی شده در کشور کُره به شدت قرابت ژنتیکی داشتند (۴).

براساس مطالعات فیلوژنتیکی انجام‌شده در ایالات متحده‌ی آمریکا اینگونه بیان‌شده است که سویه‌های ویروسی جداسازی شده در این کشور تشابهات بسیار زیادی با سویه‌های جداسازی شده از مکزیک و آمریکای مرکزی دارد. تشابهات بسیار زیاد ژنتیکی بین سویه‌های ولوژنیک بیماری نیوکاسل جداسازی شده در طی سال‌های ۲۰۰۲-۲۰۰۳ در ایالات متحده آمریکا و سایر کشورهای همسایه با ایالات‌متحده و حوزه جغرافیایی آمریکای مرکزی این مطلب را تائید می‌کند که سویه‌های ویروس بیماری نیوکاسل در بین طیور صنعتی و غیر صنعتی در این حوزه جغرافیایی در حال گردش می‌باشد، این موضوع نشانگر انجام برنامه پروتکل‌های مقابله با بیماری در حوزه جغرافیایی ایالات متحده آمریکا، مکزیک وآمریکای مرکزی می‌باشد (۹).

در مطالعه‌ای که در کشور قزاقستان بر روی ۱۰ سویه NDV جداسازی شده از ماکیان انجام شده است، براساس آنالیز فیلوژنتیکی ژن F اینگونه مشخص شده است که سویه‌های جداسازی شده جدید در این کشور متعلق به گروه ژنتیکی VIIb می‌باشند. کلیه سویه‌های جداسازی شده دارای ناحیه شکاف حدت‌زای (RRQRR/F) می‌باشند؛ که براین اساس کلیه سویه‌ها به پاتوتیپ‌های مزوژنیک و ولوژنیک متعلق می‌باشند (۳).

در مطالعه‌ای انجام شده در کشور چین بر روی ۳۰ نمونه ویروس نیوکاسل جداسازی شده از واگیری این بیماری ۹ نمونه ویروسی ولوژنیک بودند. بر اساس آنالیز ناحیه شکاف ژن F، ۶ سویه متعلق به ژنوتیپ II، ۳ سویه متعلق به ژنوتیپ III، ۱ سویه جداسازی شده از کبوتر متعلق به ژنوتیپ VI، ۲۰ سویه جداسازی شده متعلق به ژنوتیپ VII بودند (۱۰).

در مطالعه صورت گرفته در کشورهای غربی قاره آفریقا، بر روی ژن F، ۴۴ سویه ویروس بیماری نیوکاسل از گونه‌های مختلف ماکیان، کلیه سویه‌های

جدا شده حاد بودند و نیز کلیه سویه‌ها به ۵ دسته تقسیم شدند. حداقل تفاوت ژنتیکی بین تحت گروه‌های ویروسی جداسازی شده جدید و قدیمی ۹/۴ تا ۱۵/۹٪ و حداقل تفاوت ژنتیکی در بین تحت گروه‌های ویروسی جدید ۱۱/۵ تا ۱۷/۳٪ بود. این تنوع ژنتیکی گسترده و حضور در سه کشور آفریقایی متفاوت بیانگر این مسئله است که این تحت گروه‌های جدید شناسایی شده واریته اندمیک جدیدی از NDV در کشورهای حوزه آفریقای غربی هستند (۱۳).

مطالعات مولکولی زیادی برروی پارامیکسوویروس تیپ ۱ در استان اصفهان انجام نگرفته است. مطالعه حاضر برای اولین بار در استان اصفهان با هدف تشخیص ویروس عامل بیماری نیوکاسل بر اساس تکثیر قطعه ژنی از پروتئین M که 1097جفت باز دارد و تعیین ردیف نوکلئوتیدی در منطقه شکاف پروتئین ژن F بر روی ۳۷ گله مشکوک به بیماری و مقایسه آن با سایر کشورها انجام گرفته است. بدین منظور قطعه ۱۳۴۹ جفت بازی تکثیر یافته درآزمایش RT-PCR از ۴ نمونه مثبت شده در این تست پس از خالص‌سازی و تعیین ردیف نوکلئوتیدی با سکانس شناخته شده ژن F پارامیکسوویروس در سایر کشورها ثبت شده در بانک ژنی مقایسه گردید. نتایج حاصل از قرابت فیلوژنی سکانس‌های تعیین شده در این مطالعه با سایر کشورها نشانگر وجود ۱/۴ تا ۲۷/۳ درصد تنوع در این ژن بود که در این میان بیشتر قرابت ژنتیکی مربوط به سکانس ژن F در ایران با سکانس شناخته شده این ژن در هند (سکانس AY339401.1) با ۹۸/۶ درصد قرابت و بیشترین تفاوت مربوط به سویه این ویروس در ایران با سکانس ثبت شده این ژن در ایالات متحده (سکانس ACD14136.1) با ۶۲/۷ درصد قرابت تعیین شد (جدول۳).

در ۴ نمونه سکانس شده در ایران نیز ۰/۰۴ تا ۹/۹ درصد تنوع ژنتیکی در ژن F مشاهده شد. با استفاده از نرم‌افزار Njplot، Clustal X درخت فیلوژنی سکانس‌های مقایسه شده ترسیم گردیدکه همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، سکانس‌های مورد مطالعه در چهار خوشه مجزا قرار گرفته و در این میان نمونه‌های سکانس شده در ایران در شاخه سکانس ژن F در هند و قزاقستان قرار گرفته و تفاوت معنی‌داری را با سویه‌های جدا شده این ویروس در ایالات متحده، مکزیک و استرالیا نشان می‌دهند. هرچند که بر پایه نتایج حاصل از این تحقیق نمی‌توان زیر گروه‌های ویروس NDV را در ایران تعیین نمود ولی وجود تنوع ژنتیکی حاصله را براساس گسترش جغرافیایی ویروس می‌توان تا حدی توجیه کرد. باتوجه به این که نقل و انتقال طیور و فرآورده‌های بیولوژیک ماکیان بین کشورهای آمریکای شمالی، اقیانوسیه و ایران سابقه تاریخی ندارد. لذا استقرار سویه‌های ایالات‌متحده و مکزیک و استرالیا در شاخه‌ای مجزا از سویه‌های ایران در درخت فیلوژنی می‌تواند نشانگر وجود تفاوت بیشتر ردیف ژنی این ویروس بین ایران با ایالات متحده، مکزیک و استرالیا باشد.

باتوجه به نتایج حاصل از مطالعه صورت گرفته در سال ۲۰۰۴ در ایالات متحده آمریکا بیان شده است که ویروس نیوکاسل در بین پرندگان بومی و صنعتی درحال گردش است و بایستی در کنترل و پیشگیری بیماری در پرندگان بومی توجه داشت. شناسایی بیماری نیوکاسل از نمونه‌های بافتی و تعیین ردیف نوکلئوتیدی ناحیه شکاف ژن F ویروس نیوکاسل به روش مولکولی کاملاً مورد تائید می‌باشد. بدین ترتیب می‌توان سویه‌های درگیر در مناطق جغرافیایی آلوده را در کمترین زمان با استفاده از روش مولکولی با

بیشترین حساسیت بررسی کرد و از این جهت حائز اهمیت است که برنامه‌ریزی صحیحی برای واکسیناسیون با توجه به منطقه جغرافیایی اعمال کرد (۹).

پیشنهاد می‌شود اینگونه روش‌های مولکولی در جهت ردیابی و تعیین حدت سریع و دقیق نمونه‌های پرندگان آزادزی و گله‌های طیور بومی و صنعتی مشکوک به بیماری نیوکاسل در استان‌های همجوار با استان اصفهان و استان‌های مرزی کشور سالیانه صورت پذیرد، تا به کمک تعیین حدت ناحیه شکاف ژن F و نیز تعیین قرابت‌های ژنتیکی ژن F ویروس بیماری نیوکاسل در بین گونه‌های مختلف پرندگان در اقصی نقاط کشور، برنامه‌ریزی‌های صحیح و مناسبی برای واکسیناسیون علیه بیماری نیوکاسل و نیز کنترل این بیماری در جهت کاهش تلفات اقتصادی انجام پذیرد.

منابع

1. Alexander D.J., Senne D.A. (2008). *Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections*. In: Saif, Y.M. (Ed) *Diseases of Poultry*. 12th edition, Blackwell, Ames, Iowa, USA: 75-115.
2. Barlic-Maganja, D., Krapez, U., Mankoc, S., Toplak, I., Rojs, O.Z. (2005). Fusion and matrix protein gene sequence analysis of Paramyxoviruses of Type1 (PMV-1) isolated from pigeons in Slovenia. *Virus Genes* **31**(3): 265-73.
3. Bogoyavlenskiy, A. (2005). Molecular characterization of virulent Newcastle disease virus isolates from chickens during the 1998 NDV outbreak in Kazakhstan**.** *Virus Genes* **31**: 13-20.
4. Mase, M., Inoue, T., Imada, T. (2009). Genotyping of Newcastle disease viruses isolated from 2001 to 2007 in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* **71**: 1101-4.
5. Mohan, C.M., Dey, S., Kumanan, K. (2005). Molecular changes of the fusion protein gene of chicken embryo fibroblast-adapted velogenic Newcastle disease virus: effect on its pathogenicity. *Avian Diseases* **49**: 56-62.
6. Nagai, Y., Klenk, H.D., Rott, R. (1976). Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and it's significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* **72**: 494-508.
7. Nagai, Y., Ogura, H., Klenk, H.D. (1976). Studies on the assembly of the envelope of Newcastle disease virus. *Virology* **69**: 523-38.
8. Office International des Epizooties (2001). *Newcastle disease. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 4th ed. Paris: OIE.
9. Pedersen, J.C. (2004). Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreaks in California and other recent outbreaks in North America. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 2329-34.
10. Qin, Z.M. (2008). Pathotypical characterization and molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from different hosts in China from 1996 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology* **46**: 601-11.
11. Rott, R., Klenk, H.D. (1988). *Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle disease virus*. In: Alexander, D.J. (Ed) *Newcastle Disease*. Kluwer Academic Publisher, Boston, MA, 98-112.
12. Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3th Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
13. Snoeck, C.J. (2009). Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. *Archives of Virology* **154**: 47-54.
14. Wehmann, E., Herczeg, J., Ballagi-Pordány, A., Lomniczi, B. (1997).

Rapid identification of Newcastle disease virus vaccine strains LaSota and B-1 by restriction site analysis of their matrix gene. *Vaccine* **15**: 1430-33.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 7, Issue 2, 2011

Detection and Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Virus Based on Molecular Techniques in Broiler in Isfahan Province

Rahimian, M.D.[1*] Zamani Moghaddam, A.[2] Momtaz, H.[3] Niazi, M.H.[4]

1- Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University-Shahrekord Branch, Member of Young Researchers Club, Shahrekord, Iran,
2- Department of clinical science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
3- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
4- Department of Poultry, Veterinary Organization of Isfahan Province, Isfahan, Iran

Recived Date: 5 Mar 2012 *Accepted Date: 7 Jun 2012*

Abstract: *Newcastle disease virus (APMV-1) belongs to the genus of Avulavirus and the subfamily of Paramyxovirinae and family of Paramyxoviridae which contains seven genes 3′ NP/V-M-F-HN-L 5′. Newcastle disease (ND) is regarded throughout the World as one of the most important contagious diseases of poultry and other birds that sometimes cause 100% mortality rate in poultry flock. It is recognized as a notifiable infectious disease (List A) by the World Organization for Animal Health (OIE). For the determination of genetic relationship between F gene of this virus in Iran and those in other countries, fragment 1097bp of M gene of 37 tissue samples was firstly obtained for the detection of Newcastle disease and fragment 1349bp of F gene was later used to analyze phylogenetic relationship of this virus. Corresponding to F gene, four NDV strains having been isolated from infected birds in Iran were amplified in PCR system and were sequenced for determining nucleotide sequence and were compared with identified nucleotide sequence of this gene in other countries. A comparison made on F gene in Iran with that of other countries showed 1.4 to 27.3% variability in this gene, in which the greatest sequence similarity exists between sequences of F gene in Iran and India (AY339401.1) and the least relationship exists between sequences of this virus in Iran with USA (ACD14136.1).*

Keywords: *Newcastle disease virus, M gene, F gene, RT-PCR, Phylogenetic relationship, Iran.*

**Corresponding author: Rahimian, M.D.*
Address: Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University-Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
Tel: 09133021148
Email: modarahimian@yahoo.com