مجله دنیای میکروب ها
سال چهارم، شماره اول و دوم (پیاپی ۱۰)، تابستان ۱۳۹۰
صفحات ۳۵ ـ ۲۹

Original Article

جداسازی و پاتوتیپینگ ویروس‌های نیوکاسل با استفاده از روش های RT- PCR و MDT در جوجه‌های گوشتی مرغداری‌های استان فارس

ستاره خوب‌یار[1]، محمد باقر نظری[2]، عبدالله رحیمیان[3]، محمدجواد مهربان‌پور*[4]

[1]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، [2]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، گروه میکروبیولوژی
[3]کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش ویروس شناسی، [4]استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش ویروس شناسی

چکیده

سابقه و هدف: بیماری نیوکاسل یکی از بیماری‌های ویروسی حاد و مسری در ماکیان می‌باشد که همواره خسارات اقتصادی جبران ناپذیری را بر صنعت طیور وارد کرده است. با توجه به تلفات ایجاد شده توسط این ویروس، تشخیص بیماری و نیز اطلاع کافی از سویه‌های در حال گردش ویروسی امری حیاتی به نظر می‌رسد. هدف از این پژوهش، جداسازی و پاتوتایپینگ ویروس نیوکاسل در مرغداری‌های گوشتی استان فارس با استفاده از روش های RT-PCR و MDT بود.

مواد و روش ها: در مطالعه حاضر ۳۰۰ نمونه سواب کلواک و بافت نای از ۳۰ واحد مرغداری با آمار تلفات بالا و درگیر با بیماری‌های تنفسی در استان فارس جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها به تخم مرغ‌های جنین دار ۱۱-۹ روزه تلقیح و پس از ۷۲ ساعت مایع آلانتوئیک با استفاده از آزمون هماگلوتیناسیون، RT-PCR و MDT از نظر وجود ویروس نیوکاسل و نیز تایپ بندی سویه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از مجموع نمونه‌های مورد بررسی با روش مولکولی، ۱۰ نمونه با تکثیر قطعه ۵۳۵ جفت بازی آلوده به ویروس نیوکاسل شناخته شدند. سپس با روش MDT سویه‌های ولوژنیک، مزوژنیک و لنتوژنیک به ترتیب در ۶، ۳ و ۱ نمونه شناسایی گردید.

نتیجه‌گیری: به دلیل جداسازی ویروس‌های ولوژنیک و مزوژنیک از مرغداری‌ها، ضرورت پایش مستمر سویه‌های واکسن وارزیابی ایمنی‌زایی آن‌ها وجود دارد.

واژگان کلیدی: ویروس نیوکاسل، پاتوتایپینگ، RT-PCR، MDT

دریافت مقاله: بهمن ۱۳۸۹ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ۱۳۹۰

مقدمه

بیماری نیوکاسل یکی از مسری‌ترین بیماری‌های ماکیان در سراسر جهان به شمار می‌آید. از میان پرندگان، مرغ‌های خانگی نسبت به این بیماری مستعدتر می‌باشند. سالیانه ویروس نیوکاسل به دلیل مرگ و میر بالا، کاهش وزن و افت تولید تخم مرغ، موجب خسارات زیادی می‌گردد. بیماری نیوکاسل توسط پارامیکسوویروس‌های سروتیپ ۱ (APMV-1) ایجاد می‌شود. این ویروس دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای با قطبیت منفی و احاطه شده با کپسید مارپیچی است (۱). ژنوم این ویروس کد کننده ۶

*) آدرس برای مکاتبه: شیراز، میدان صنایع، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، گروه ویروس شناسی.صندوق پستی ۳۶۷-۷۱۹۵۵
تلفن: ۰۷۱۱-۶۲۴۰۰۲۱، دورنگار: ۰۷۱۱-۶۳۵۳۹۷۵
پست الکترونیک: j.mehrabanpour@rvsri.ir

پروتئین می‌باشد. یکی از این پروتئین‌ها، پروتئین F است که در بیماری‌زایی ویروس نقش کلیدی را بر عهده دارد (۲). این ویروس‌ها بر اساس میزان حدت بیماری به ۳ سویه ولوژن (بیماری‌زایی حاد)، مزوژن (بیماری‌زایی متوسط) و لنتوژن (بیماری‌زایی با حدت پایین) تقسیم بندی می‌گردند (۳ و ۴). این تقسیم‌بندی بر اساس توالی اسیدآمینه ناحیه شکستگی پروتئین F ویروس نیوکاسل صورت می‌گیرد. با وجود برنامه واکسیناسیون نیوکاسل در مرغداری‌ها، آلودگی با ویروس نیوکاسل به صورت مکرر مشاهده می‌شود. بنابراین ضرورت بررسی سویه‌های مختلف ویروس نیوکاسل و نیز تشخیص سویه‌های بیماری‌زا از غیربیماری‌زا احساس می‌گردد. این پژوهش با هدف جداسازی و پاتوتایپینگ ویروس‌های نیوکاسل در مرغداری‌های استان فارس با استفاده از روش‌های RT-PCR و (Mean Death Time) MDT انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری نمونه از مرغداری‌های درگیر: با مراجعه به ۳۰ واحد مرغداری با آمار تلفات بالا و درگیر با بیماری های تنفسی در استان فارس، تعداد ۳۰۰ نمونه سواب کلواک و بافت نای به صورت مقطعی ـ توصیفی جمع‌آوری گردید. تمامی نمونه‌ها با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه ویروس شناسی موسسه رازی منتقل و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- نگهداری شدند. در مرحله بعد مایع‌رویی نمونه‌های سواب کلواک مربوط به هر مرغداری پس از ذوب کردن، با یکدیگر مخلوط و سانتریفیوژ گردیدند. نمونه‌های نای نیز پس از خراش دادن بافت داخلی و جداکردن قسمت غضروفی با یکدیگر مخلوط و سانتریفیوژ شدند.

ب) جداسازی ویروس: مایع رویی نمونه‌های سانتریفیوژ شده پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی به تخم مرغ‌های جنین دار ۱۱-۹ روزه تلقیح گردید. پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت ۶۵٪، مایع آلانتوئیک با استفاده از آزمون هماگلوتیناسیون از نظر وجود ویروس نیوکاسل مورد بررسی قرار گرفت.

ج) آزمون ممانعت هماگلوتیناسیون: بر اساس پروتکل استاندارد OIE، آزمون ممانعت هماگلوتیناسیون (Hemagglutination Inhibition=HI) به منظور تشخیص ویروس نیوکاسل با استفاده از آنتی‌سرم استاندارد (تهیه شده از آزمایشگاه رفرانس نیوکاسل و آنفولانزاکشور ایتالیا) انجام پذیرفت. در ابتدا آنتی‌سرم اختصاصی نیوکاسل و آنفولانزا با استفاده از محلول فسفات بافر سالین (PBS) تا ۱۰ رقت متوالی در حد ۲۵ میکرولیتر رقیق شدند. به تمامی حفره‌ها، به جز ۲ حفره آخر، ۲۵ میکرولیتر آنتی ژن ۸ واحد HA برای نیوکاسل و ۴ واحد HA برای آنفولانزا اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه گرما گذاری گردیدند. سپس به تمامی حفره‌ها، گلبول قرمز جوجه ۱٪ اضافه و نتایج پس از ۳۰ دقیقه بررسی شد. عدم ایجاد هماگلوتیناسیون نشان دهنده مثبت بودن ویروس مورد نظر می‌باشد (۵). در این مطالعه تنها نمونه‌هایی که دارای تیتر آنتی‌بادی بیشتر از ۴ بودند برای انجام آزمون RT-PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

د) استخراج *RNA* ویروس: برای این منظور از کیت (VetekTM Viral Gene-Spin, INtRON Biotechnology) کشور کره مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. به طور خلاصه ۱۵۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۲۵۰ میکرولیتر بافر لیزکننده مخلوط گردید. پس از افزودن ۳۵۰ میکرولیتر بایندینگ بافر به آن، مخلوط حاصل به ستون و لوله جمع آوری (column and collection tube) منتقل شد و با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. پس از دور ریختن مایع زیرین، ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو دهنده A به آن اضافه و با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. مجدداً مایع رویی با ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو دهنده B مخلوط و با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. در نهایت ماده سفید رنگ حاصل دوباره با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس ستون و لوله جمع آوری، درون میکروتیوب‌های جدید قرار داده شد و ۵۰ میکرولیتر محلول بافر به تمامی نمونه‌ها اضافه گردید. مخلوط حاصل با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ و مایع حاوی RNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

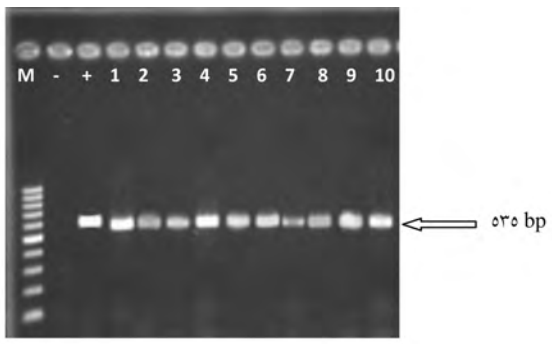
ه) آزمون *RT-PCR*: واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer (10x)، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۱ واحد آنزیم

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده در مطالعه.

پرایمر	توالی	قطعه تکثیر شده
N1	5′-ATGGGC(C/T)CCAGA(C/T)CTTCTAC-3′	۵۳۵ جفت باز
N2	5′-CTGCCACTGCTAGTTGTGATAATCC-3′	

DNA پلی مراز *Taq*، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (جدول ۱) و ۵ میکرولیتر cDNA انجام گردید (مواد مورد استفاده در این آزمون از شرکت Vetek کشور کره تهیه شد). سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف با شرایط دمایی ۲ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و پس از الکتروفورز به‌وسیله‌ی دستگاه Kodack gel scan مورد بررسی قرار گرفت (۶).

و) آزمون *MDT*: به منظور تشخیص سویه‌های بیماری‌زای نیوکاسل از غیر بیماری‌زا از آزمون زمان متوسط مرگ (Mean Death Time= MDT) مطابق با روش استاندارد OIE در سال ۲۰۰۹ استفاده گردید (۵). در این مطالعه تنها نمونه‌های مثبت به دست آمده در مرحله قبل با استفاده از روش MDT پاتوتایپینگ گردیدند. به طور خلاصه، در مرحله اول نمونه‌ها با استفاده از محلول استریل PBS رقیق سازی شدند. به منظور شناسایی کم‌ترین دوز ویروس که موجب مرگ جنین می‌شود، رقت‌های 10^{-4} تا 10^{-9} به طور جداگانه به ۵ تخم مرغ جنین‌دار تزریق گردیدند. ۲۴ ساعت پس از تزریق کندل و جنین‌های مرده در اثر آلودگی حذف شدند. سپس هر ۱۲ ساعت تا یک هفته عمل کندل کردن ادامه داده شد. در نهایت رقت و زمان سویه‌ای که توانسته جنین تخم مرغ ۱۰ روزه را از بین ببرد یادداشت گردید (۷).



شکل ۱: نتایج RT-PCR **M**: مارکر ۱۰۰bp، ۱: کنترل منفی، ۲: کنترل مثبت، ۳ تا ۱۰: نمونه های مثبت.

نتایج

از میان ۳۰۰ نمونه مورد مطالعه در آزمون HI، بیشتر نمونه‌ها به آنتی‌بادی یا سرم اختصاصی نیوکاسل جواب مثبت دادند. این نتایج به صورت اعداد ۳ تا ۱۰ گزارش گردید. در مجموع تیترهای ۱ تا ۴ نشان دهنده تزریق واکسن به جوجه ها می‌باشد. در حالی که تیترهای ۶ تا ۱۰ نشان‌دهنده درگیری گله‌ها با ویروس نیوکاسل است. از میان نمونه‌های مورد بررسی با روش RT-PCR، ۱۰ نمونه با تکثیر قطعه ۵۳۵ جفت بازی به عنوان مثبت شناسایی گردیدند (شکل ۱).

نتایج حاصل از MDT نشان داد که از میان ۱۰ نمونه مثبت شده با روش RT-PCR، ۶ نمونه ویروسی توانستند در مدت زمان ۶۰ ساعت جنین مرغ را از بین ببرند. بنابراین این سویه‌ها به عنوان ولوژنیک در نظر گرفته شدند. همچنین در ۳ نمونه دیگر اعداد بین ۶۰ تا ۹۰ ساعت به دست آمد که نشان دهنده مزوژنیک بودن این سویه‌ها می‌باشد. در مطالعه حاضر تنها یک سویه به دلیل مرگ جنین در مدت زمان بیش از ۹۰ ساعت به عنوان لنتوژنیک گزارش گردید.

بحث

یکی از مشکلات اساسی در صنعت پرورش طیور در ایران، مشکلات ناشی از بیماری‌های تنفسی ویروسی می‌باشد (۸). بر اساس گزارش اداره کل دامپزشکی، حدود ۳۰٪ از جوجه‌های پروشی استان فارس دچار مشکلات تنفسی می‌شوند. یکی از عوامل موثر در این مساله ویروس نیوکاسل می‌باشد. از این رو ضرورت تشخیص و جداسازی سریع این ویروس و نیز تولید واکسن‌های زنده، کشته شده و کلون شده به منظور جلوگیری از شیوع این بیماری در درجه اهمیت قرار دارد. از طرفی انجام مطالعات مولکولی می‌تواند موجب دست یابی به اطلاعاتی در زمینه تغییرات احتمالی به وجود آمده در این ویروس‌ها گردد. به عنوان نمونه در کشور تایوان ارزیابی این ویروس و سویه ولوژنیک آن به دلیل شیوع بالا در جوجه‌ها در طی سال‌های اخیر، در نهایت منجر به کسب اطلاعات بنیادی در زمینه توسعه واکسن‌های تولید شده از ویروس نیوکاسل گردید (۹). از جمله روش‌های تعیین کننده خصوصیات ویروس می توان به تست‌های ICPI (Intra Cerebral Pathogenisity Index)، IVPI (Intera Venous Pathogenisity Index) و MDT (Mean Death Time) اشاره نمود (۱۰). برای تشخیص ویروس نیوکاسل از دیگر عوامل به وجود آورنده کمپلکس تنفسی، می توان از تکنیک RT-PCR و پرایمرهای اختصاصی این ویروس استفاده کرد (۱۱).

ویروس بیماری نیوکاسل بر اساس بیماری ایجاد شده به پاتوتیپ‌های ویسترو پیک ولوژنیک یا حاد بیماری‌زا همراه با خونریزی، نوروتروپیک ولوژنیک یا حاد بیماری‌زا همراه با علایم عصبی، مزوژنیک یا بیماری‌زایی متوسط و لنتوژنیک یا بیماری‌زایی خفیف طبقه‌بندی شده است (۳، ۴ و ۱۲). در مطالعه حاضر از ۱۰ نمونه ویروس نیوکاسل که با استفاده از روش مولکولی RT-PCR و روش غیرمولکولی MDT مورد بررسی قرار گرفتند، ۶ سویه ولوژنیک (کمتر از ۶۰ ساعت)، ۳ سویه مزوژنیک (بین ۶۰ تا ۹۰) و ۱ سویه لنتوژنیک (بیش از ۹۰ ساعت) گزارش گردید. مطالعه انجام شده توسط چوی (Choi) و همکاران در سال ۲۰۰۵ در کره نشان داد که با استفاده از روش‌های سرولوژی و مولکولی و نیز تکنیک‌های MDT، ICPI و RT-PCR، ۲ سویه نیوکاسل جدا شده از جغدها از نوع ولوژنیک بوده است. در حالی که در مطالعه جاری ۶ سویه با روش MDT از نوع ولوژنیک گزارش گردید. از طرفی آن‌ها نشان دادند جغدهایی که از نژاد مختلط اروپایی- آسیایی بودند شدیداً به این سویه از ویروس حساس هستند و آنالیز فیلوژنی نیز آشکار نمود که این نمونه‌ها میزان شباهت بسیار زیادی با سویه‌های نیوکاسل جدا شده از ماکیان خانگی در کشور کره داشته است (۲). با توجه به سرعت انتشار بیماری نیوکاسل و نیز عدم وجود درمان مناسب برای آن، رعایت اصول بهداشتی و واکسیناسیون صحیح و به موقع می تواند از بروز یا حدت آن بکاهد (۱۳). همچنین اهمیت انجام واکسیناسیون به منظور کاهش حدت بیماری، با مطالعات انجام شده در سال ۲۰۰۷ توسط ممیز و همکاران در ایران بررسی گردید (۱۴). آن‌ها با استفاده از روش‌های ICPI، IVPI و MDT موفق به جداسازی و تشخیص سویه‌های ولوژنیک با قدرت پاتوژنیک شدید از بلدرچین شدند که با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر مبنی بر جداسازی و تشخیص سویه‌های ولوژنیک مطابقت دارد. در واقع در بین توالی اسیدهای آمینه محل شکست پروتئین F و بیماری زایی سویه های ویروس نیوکاسل ارتباط وجود دارد و تکنیک‌های مولکولی می‌توانند این ارتباط را مشخص نمایند (۱۵). به عنوان مثال در بررسی صورت گرفته توسط اتیم (Otim) و همکاران در سال ۲۰۰۱ در شرق اوگاندا با جداسازی ویروس نیوکاسل از جوجه‌های بیمار، به کمک آنالیز توالی ناحیه شکست پروتئین F و نیز روش ICPI موفق به یافتن سویه ولوژنیک شدند (۱۶). از طرفی آناند (Ananth) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ در کشور هند با استفاده از آنالیز Bio-Edit علاوه بر شناسایی ویروس نیوکاسل از جوجه‌های بومی غیرواکسینه، توان بیماری‌زا بودن ویروس را مورد توجه و بررسی قرار دادند. آن‌ها دریافتند بخشی از ژن که حاوی اسیدآمینه فنیل آلانین است دارای قدرت بیماری زایی بالایی می باشد. همچنین بخشی از ژن که دارای اسیدآمینه لوسین است قدرت بیماری‌زایی پایینی دارد (۱۱). بنابراین برای حل این مشکل بایستی با تکنیک‌های دقیق مولکولی در جداسازی ویروس‌ها و نیز تعیین توالی ناحیه شکست پروتئین F، ردیف اسیدآمینه پروتئین را مشخص و در نهایت تطابق آنتی ژنتیکی با ویروس‌های موجود در بانک ژنی را بررسی نمود (۱۵).

برای مثال لومینکزی (Lominczi) و همکاران توالی ژن فیوژن پروتئین را با بیماری‌های شایع در کشورهای غربی اروپا مقایسه کردند. آن‌ها مشاهده نمودند که این توالی با توالی ویروس‌های عامل بیماری در آلمان، ایتالیا، اسپانیا، هلند و بلژیک مطابق بوده است. اما با ژنوتیپ شمال آمریکا تطابقی نداشته است (۱۷). نوانسریچای (Nuansrichay) و چایشینگ (Chaishing) در سال ۲۰۰۷ با تجزیه فیلوژنیکی ۱۸ جدایه نیوکاسل به دست آمده از سواب کلواک جوجه‌ها و اردک‌ها در تایلند نشان دادند که این سویه‌ها متعلق به ژنوتیپ ۱ از نوع لنتوژنیک است (۱۸). پژوهش‌های یادشده با یافته‌های جاری مبنی بر جداسازی یک سویه لنتوژنیک هم خوانی دارد.

به طور کلی روش‌های دیگری نیز توسط برخی از پژوهشگران برای تعیین سویه ویروس نیوکاسل مورد استفاده قرار گرفته است. برای نمونه بوچر (Boucher) و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی گله‌های مرغ بیمار به کمک روش دیگری از MDT نمونه‌های ویروسی را تحت شکست و هضم با تریپسین ۰/۲۵٪ عاری از EDTA قرار دادند. سپس آنها را با نمونه‌های هضم نشده کنترلی مقایسه کردند. نتایج نشان داد که جدایه‌های ویروس از نوع لنتوژنیک بودند. در این تکنیک زمان تشخیص جدایه‌های لنتوژنیک به طور قابل توجهی به میزان ۲۶ ساعت کاهش یافت که زمان تشخیص جدایه‌ها نسبت به روش MDT انجام شده در تحقیق حاضر سریع‌تر می‌باشد. همچنین در این مطالعه بدون استفاده از تریپسین نیز تفاوت معنی‌داری بین سویه های ولوژن مشاهده نگردید (۱۹). در ایران نیز پژوهشگران ویروس نیوکاسل را از نظر مولکولی مورد بررسی قرار داده‌اند. برای نمونه کیانی‌زاده و همکاران در سال‌های ۱۳۷۵ تا ۱۳۷۸ به منظور جداسازی و شناسایی NDV از تست‌های IVPI، ICPI و MDT و برای تشخیص هویت جدایه‌ها از تکنیک PCR استفاده نمودند. یافته‌های آن‌ها نشان دهنده حضور سویه‌های ولوژنیک و مزوژنیک بود (۱۵). قیامی راد و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ با استفاده از همین روش‌ها سویه‌های ولوژنیک را از لاشه‌های شترمرغ موجود در گله‌های تجاری جداسازی کردند (۲۰). اما در مطالعه جاری هر ۳ سویه جداسازی گردید به طوری که سویه ولوژنیک بیشترین فراوانی را در میان سویه‌های جدا شده به خود اختصاص داد.

در پژوهش حاضر، ابتدا ویروس نیوکاسل به کمک روش‌های RT-PCR و HI تشخیص داده شد. سپس با روش MDT سویه‌های ولوژنیک مشخص گردیدند. ترتیب انجام این مطالعه با پژوهش انجام شده توسط مونایم (Monaim) و همکاران در مصر در سال ۲۰۰۵ مطابقت دارد. در حالی که محمد (Mohamed) و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مصر علاوه بر آزمون‌های HI و MDT از روش‌های ICPI و IVPI نیز به منظور پاتوتایپینگ سویه‌های ویروسی استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که هر ۳ سویه جداسازی شده از نوع ولوژنیک بوده است که با نتایج تحقیق جاری هم‌خوانی دارد (۲۱و۲۲). با توجه به مطالعات یاد شده نتایج پژوهش حاضر با تمامی بررسی‌های انجام شده در ایران و سایر نقاط جهان از نظر روش کار و نیز جداسازی و شناسایی سویه‌های مختلف ویروس نیوکاسل مطابقت دارد.

نتیجه گیری

از آن‌جایی که چرخش سویه ولوژن یکی از عوامل بیماری‌زای خطرناک در میان ماکیان است و شیوع آن خسارات سنگینی به صنعت پرورش طیور وارد می‌کند و نیز با توجه به جداسازی ویروس‌های ولوژنیک و مزوژنیک در مطالعه حاضر و سایر پژوهش‌ها، ضرورت ارزیابی مستمر سویه‌های واکسن و اثربخشی آن‌ها حتی با وجود انجام برنامه واکسیناسیون وجود دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی پرسنل مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی شیراز به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی کمال امتنان را دارند.

References

1. Alexander DJ. Newcastle disease and other paramyxovirus infection, In: Calnek, BW, Barnes, HJ, Reid, WM, Yoder, HW, Disease of Poultry, 9th ed, Amesterdam: Iawa State University Press, 1991, 496-513.
2. Choi KS, Lee EK, Jeon WJ, Nah JJ, Kim YJ, Lee MY Lee, HL, Kwon JH. Isolation of a recent Korean Epizootic strain of Newcastle disease virus from Eurasian scops owls affected with severe diarrhea. J Wild Life Dis. 2008; 44(1): 193-198.
3. Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections, In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Mcdougald LR, Saif, YM. Disease of Poultry, 10th ed, Amesterdam: Iawa State University Press, 1997, 541-569.
4. Baratchi S, Ghorashi SA, Hosseini M, Pourbakhsh SA. Differentiation of virulent and non-virulent Newcastle disease virus isolates using RT-PCR. Iranian J Biotech, 2006; 4(1): 61-63.
5. Word Organization for Animal Health (WOIE). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [online]. Paris: OIE; 2009, Newcastle disease, Available at: http: // www. oie. int/ eng/norms/manual/ a_ summry. Htm
6. Berhanu A, Ideris A, Omar AR, Bejo MH. Molecular characterization of partial fusion gene and C-terminus extension length of haemagglutinin-neuraminidase gene of recently isolated Newcastle disease virus isolates in Malaysia. Virol J. 2010; 7(1): 183.
7. Alexander DJ. Newcastle disease and other Avian paramyxovirus, In: Calnek, BW, Barnes, HJ, Beard, CW, Mcdougald, LR and Saif, YM, Laboratory manual for the isolation and identification of Avian Phathologisit, 4th ed, Amesterdam: Iawa State University Press, 1997, 156-163.
8. Mohan CM, Dey S, Kumanan K. Molecular changes of the fusion protein gene of chicken embryo fibroblast-Adapted velogenic Newcastle disease virus:Effect on its pathogenicity. Avian Dis. 2005; 49: 56-62.
9. Lien YY, Lee JW, Su HY, Tsai HJ, Tsai MC, Hsieh CY, Tsai SS. Phylogenetic characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan during 2003-2006. Vet Microbiol. 2007; 123: 194-202.
10. Ponnusamy P, Kirubaharan JJ, Chandramohan A. Sequence analysis of HN and F genes of a less virulent Newcastle disease virus isolated from unvaccinated village chicken. Int J Poult Sci. 2009; 8(10): 985-994.
11. Ananth R, Kirubaham JJ, Priyadarshini MLM, Albert A. Isolation of Newcastle disease viruses of high virulence in unvaccinated healthy village chickens in south India. Int J Poult Sci. 2008; 7(4): 368-373.
12. Aldous EW, Alexander DJ. Detection and differentiation of Newcastle disease virus(avian paramyxovirus type 1). Avian Pathol. 2001; 30(2): 117-128.
13. Chansiripornchai N, Sasipreeyajan J. Efficacy of live B1 or ulster 2C Newcastle disease vaccines simultaneously vaccinated with inactivated oil adjuvant vaccine for protection of Newcastel disease virus in broiler chickens. Acta Vet Scandinavica. 2006; 48(2): 1-4.
14. Momayez R, Gharahkhani P, Pourbakhsh SA, Toroghi R, Shoushtari AH, Banani M. Isolation and pathogenicity identification of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease) virus from a Japanese quail flock in Iran. Arch Razi Inst. 2007; 62(1): 39-44.
15. Kianizade M, Idersi A, Shahrabadi MS, Kargar R, Pourbakhsh SA, Omar AR, Yosoff K. Biological and molecular characterization of newcastle disease virus isolated from Iran. Arch Razi Inst. 1999; 50: 1-10.
16. Otim MO, Christensen H, Jorgensen PH, Handberg KJ, Bisgard M. Molecular characterization and phylogenetic study of Newcastle disease virus isolats from recent outbreaks in Estern Uganda. J Clin Microbiol. 2004; 42(6): 2802-2805.
17. Lominczi B, Wehmann E, Herczeg J, Ballagi-Pordany A, Kaleta EF, Werner O, Meulemans G, Jorgensen PH, Mante AP, Gielkens AL, Capua I, and Damoser J. Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). Arch Virol. 1998; 143(1): 49-64.
18. Nuansrichay B, Chashing A. Phylogenetic characterization of Newcastle disease viruses isolated in Thailand during 2006-2007. Thai-NIAH e J. 2008; 3(2):179-188.
19. Boucher CE, Bragg RR, Albertyn J. An alternative method for the establishment of virulence of Newcastle disease virus isolates. Afr J Microbiol Res. 2010; 4(21): 2313-2317.
20. Ghiamirad M, Pourbakhsh A, Keyvanfar H, Momayez R, Charkhkar S, Ashtari A. Isolation and characterization of Newcastle disease virus from Ostriches in Iran. Afr J Microbiol Res. 2010; 4(23): 2492-2497.
21. Moneim ASA, Sawah AAEI, Kandil MA. Characterization of variant strain of Newcastle disease virus in Egypt. BS Vet Med J. 2006; 16(1): 12-17.
22. Mohamed MHA, Kumar S, Paldourai A, Samal S. Sequence analysis of fusion protein gene of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in Egypt during 2006. Virol J. 2011; 8(1): 237.

Journal of Microbial World
Volume 4, No. 1 & 2, September 2011

Isolation and pathotyping of Newcastle viruses by RT-PCR and MDT methods from broiler chickens in Fars province

Setareh Khoobyar[1], Mohammad Bagher Nazari[2], Abdollah Rahimian[3], Mohammad Javad Mehrabanpour[4]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University Jahrom, Iran.
[2]M.Sc., Department of Microbiology, Urmia Branch, Islamic Azad University Urmia, Iran.
[3]M.Sc., Department of Virology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran.
[4]Assistant Professor, Department of Virology, Razi Vaccine and Serum Research Institute Shiraz, Iran.

Abstract

Background and objective: Newcastle is an acute and contagious disease in poultry that has irreparable economic detriments in the poultry industry. Due to many deaths in broiler chicken flocks, it is vital to detect and characterize the viral circulation. The aim of this study was to isolation and pathotyping of Newcastle virus by RT-PCR and MDT (Mean death time) methods in broiler chickens in Fars province.

Material and Methods: In this study 300 tracheal tissue and cloacal swab samples from 30 infected poultry farms with a high mortality and respiratory disease were collected in Fars province. The samples were inoculated in the allantoic cavities of 9-11-day-old embryonated chicken eggs. After 72 hours incubation, the allantoic fluids were tested by hemagglutination, RT-PCR and MDT methods for the present of Newcastle virus and their pathotyping.

Results: 10 out of total samples investigated by molecular method showed a 535bp amplification band fragment and were identified as Newcastle viruses. Also, among these samples, velogenic, mesogenic and lentogenic strains identified in 6, 3 and 1 sample respectively by MDT method.

Conclusion: Based on isolation of velogenic and mesogenic viruses in broiler chickens flocks, it is essential to continues survey vaccine strains and their effectiveness.

Keywords: Newcastle virus, Pathotyping, MDT, RT-PCR

Correspondance to: Mohammad Javad Mehrabanpour
Tel: +987116240021
E-mail: j.mehrabanpour@rvsri.ir
Journal of Microbial World, 2011, 4(1&2): 29-35.