JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره یازدهم، شماره دوم، ۱۳۹۴، پیاپی ۳۱: ۱۰۸-۱۰۱

جداسازی و شناسایی عامل بیماری نیوکاسل از مزارع پرورش ماکیان گوشتی استان خوزستان

منصور میاحی[۱]، مسعودرضا صیفی آباد شاپوری[۲]، رمضانعلی جعفری[۳]، بابک محمدیان قلعه جوقی[۴*]

۱- استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴- دستیار تخصصی بهداشت و بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۵ خرداد ۱۳۹۳ *تاریخ پذیرش: ۱۶ مهر ۱۳۹۳*

چکیده

از آنجایی که بیماری نیوکاسل در سطح مزارع گوشتی بسیار شایع می‌باشد و خسارات جبران ناپذیری به صنعت طیور وارد می‌کند. لذا، بررسی و شناسایی عامل این بیماری خطرناک حائز اهمیت می‌باشد. در این میان استفاده از تکنیک‌های ساده‌تر، سریع‌تر، حساس‌تر و در عین حال دقیق‌تر می‌تواند کمک شایانی به تشخیص بهتر بیماری نماید. در همین راستا از ۳۰ مزرعه پرورش جوجه‌های گوشتی در استان خوزستان، نمونه‌گیری به عمل آمد. نمونه‌ها پس از آماده سازی و تلقیح به تخم مرغ جنین‌دار ۹ تا ۱۱ روزه و پس از نگهداری در انکوباتور با آزمون HA از نظر حضور عامل واجد هماگلوتیناسیون بررسی شدند. در نهایت ۱۲ نمونه از نظر فعالیت هماگلوتیناسیون، مثبت اعلام شدند و پس از آن بر روی این نمونه‌ها جهت شناسایی ویروس عامل بیماری نیوکاسل، آزمون RT-PCR انجام گرفت که ۶ مورد ویروس بیماری نیوکاسل جدا گردید. نکته قابل توجه این که همه شش جدایه عامل بیماری نیوکاسل، علاوه بر جداسازی از سایر بافت‌ها، از بافت مغز نیز جدا گردیدند. البته واکسن‌های نیوکاسل موجود در ایران جزو ویروس‌های لنتوژن می‌باشند، لذا قاعدتاً ویروس‌های جدا شده (۶ مورد) مربوط به ویروس واکسن نمی‌باشند.

کلمات کلیدی: *بیماری نیوکاسل، RT-PCR، پروتئین F، جوجه‌های گوشتی*

**نویسنده مسئول: بابک محمدیان قلعه جوقی*

آدرس: دستیار تخصصی بهداشت و بیماری‌های طیور، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۷۳۴۰۹۵۰

پست الکترونیک: b-mohammadian@phdstu.scu.ac.ir

مقدمه

بیماری نیوکاسل یک بیماری عفونی و به شدت واگیردار در پرندگان است که در اثر ویروس پارامیکسوویروس تیپ یک پرندگان (APMV-1) ایجاد می‌شود (۹). تا قبل از ظهور ویروس آنفلوآنزای فوق حاد (H_5N_1)، بیماری نیوکاسل در بین بیماری‌های ویروسی طیور از لحاظ تاثیرات اقتصادی بر صنعت طیور پیشتاز بود (۷). پس می‌توان این طور نتیجه گرفت که از دید اقتصادی بیماری نیوکاسل یکی ازمهم‌ترین بیماری‌های ویروسی طیور می‌باشد. البته ویروس عامل بیماری نیوکاسل می‌تواند در بیش از ۲۰۰ گونه پرنده، عفونت ایجاد کند (۱۲). بیماری نیوکاسل قابل انتقال به انسان می‌باشد و جزء بیماری‌های زئونوز محسوب می‌شود (۷و۱۱). اگرچه ویروس نیوکاسل به ندرت از انسان جدا شده است، در گزارشات معدودی علائم شبه آنفلوآنزا در تلقیح چشمی ویروس، ۸۸ درصد بیشتر از تلقیح داخل وریدی در انسان بوده است (۱۱).

در موارد وقوع بیماری‌های حاد و واگیردار طیور مانند نیوکاسل روش‌های تشخیصی سریع و قابل اطمینان مانند RT-PCRاهمیت ویژه‌ای دارند و به همین دلیل امروزه این تکنیک، جایگاه ویژه‌ای در تشخیص بیماری‌ها دارد (۴). خوشبختانه تکنیک RT-PCR دارای قابلیت تائید تشخیص ویروس نیوکاسل طی حداقل زمان ممکن (یعنی حدود ۲۴ ساعت)، حساسیت و اختصاصیت بالا می‌باشد (۱۰).

یکی از نکات مهم در مورد ویروس بیماری نیوکاسل این است که بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف ویروس، مرتبط با ناحیه شکست پروتئین F آن‌ها است. پروتئین F_0 جدایه‌های حاد به وسیله آنزیم‌های پروتئاز که در اکثر سلول‌های بدن پرنده یافت می‌شود به دو تحت واحد F_1 و F_2 شکسته می‌شود. پروتئین F جدایه‌های بدون حدت، تنها در سلول‌های دارای آنزیم‌های پروتئاز شبه تریپسین (عمدتا دستگاه تنفسی و گوارشی) امکان شکستن دارند. تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک ژن پروتئین F مشخص کرده است که در جایگاه شکست بین اسیدهای آمینه ویروس‌های ویرولنت و غیر ویرولنت تفاوت وجود دارد (۷).

در تحقیق حاضر شناسایی ویروس به روش RT-PCR بر اساس پروتئین F صورت گرفته است زیرا شناسایی ویروس عامل نیوکاسل در بسیاری از تحقیقات معتبر داخلی و خارجی بر مبنای پروتئین F می‌باشد. به دلیل اهمیت بیماری نیوکاسل در سطح مزارع گوشتی استان خوزستان، در این تحقیق در نظر داریم ویروس بیماری نیوکاسل را به وسیله کشت در تخم مرغ جنین‌دار جدا نموده و با روش RT-PCR بر اساس پروتئین F مورد شناسایی قرار دهیم.

مواد و روش کار

در این مطالعه جمعا از ۳۰ مزرعه (در سطح استان خوزستان و موارد ارجاعی به بخش بیماری‌های طیور بیمارستان دانشکده دامپزشکی دانشگاه چمران اهواز) نمونه‌گیری به عمل آمد (از هر مزرعه ۱۰ عدد لاشه انتخاب گردید که دارای مجموعه‌ای از نشانه‌های عصبی، تنفسی و گوارشی بودند). بدین ترتیب که از بافت‌های مغز، نای، ریه، کبد، کلیه، پیش معده، لوزه‌های سکومی و طحال به‌طور جداگانه و به وسیله پنس و قیچی استریل نمونه‌گیری انجام شد. سپس بافت‌های یکسان هر مرغداری به طور مخلوط درهاون استریل کوبیده شد و نمونه‌ها در یک محیط حاوی آنتی بیوتیک (مانند پنی سیلین، استرپتومایسین و آمفوتریسین) کافی به نسبت ۲۰ درصد وزنی قرار گرفتند.

سوسپانسیون بافتی به مدت ۱۵ دقیقه با دور g۱۰۰۰ سانتریفیوژ شده و پس از آن به میزان ۰/۲ میلی لیتر از مایع رویی به حفره آلانتوئیک تخم مرغ‌های جنین دار ۹ تا ۱۱ روزه تلقیح گردید. برای هر نمونه ۴ تخم مرغ در نظر گرفته شد و سپس تخم مرغ‌ها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت ۶۵ درصد منتقل شدند. پس از تلقیح، به طور روزانه تخم مرغ‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. تلفات ۲۴ ساعت اول حذف گردید ولی پس از آن تلفات تا ۷ روز پس از تلقیح به یخچال منتقل شدند. پس از آن مایع آلانتوئیک در شرایط سترون و در کنار شعله جمع آوری گردید و به وسیله گلبول‌های قرمز ماکیان با غلظت ۵ درصد تحت آزمون هماگلوتیناسیون قرار گرفتند (۶). در مجموع ۱۲ نمونه از نظر فعالیت هماگلوتیناسیون مثبت بودند و همگی جهت انجام آزمایش مولکولی انتخاب گردیدند و مایع آلانتوئیک آن‌ها به وسیله آزمون RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر بر اساس مطالعه Berhanu و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۸)، به شرح زیر می‌باشد:

- ATGGGC(C/T)CCAGA(C/T)CTTCTAC- 3´5

–CTGCCACTGCTAGTTGTGATAATCC – 3´5

لازم به ذکر است که قطعه تکثیر شده به طول ۵۳۵ جفت باز می‌باشد که اختصاص به آنتی ژن فیوژن تمامی سویه‌ها (حاد و غیر حاد) دارد (۸).

استخراج RNA ویروس

بدین منظور از کیت استخراج RNA شرکت سیناژن و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، مراحل استخراج انجام گردید. به طور خلاصه ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۱ میلی لیتر بافر لیز کننده مخلوط شده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد و پس از آماده سازی، با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ فاز آبی استحصال گردید و به میزان هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. پس از آماده سازی با دور rpm۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. بعد مایع رویی دور ریخته شد و مایع باقی مانده با یک میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد مخلوط گردید و پس از آن با دور rpm ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شد و در نهایت ماده سفید رنگ حاصل بعد از طی مرحله آماده سازی با ۳۰ میکرولیتر بافر مخلوط گردید و تا زمان مصرف در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

آزمون RT-PCR

واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر PCR buffer (10x)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز *Taq*، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها و ۵ میکرولیتر cDNA انجام گردید (کیت سنتز cDNA مربوط به شرکت BIONEER کره جنوبی بود). سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر تحت برنامه‌ای به شرح ذیل انجام شد:

واسرشت ابتدایی به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد صورت گرفت و سپس در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت به مدت یک دقیقه و دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال به مدت ۲ دقیقه و دمای ۵۶ درجه سانتی گراد، طویل شدن به مدت یک دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت طویل شدن پایانی به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به انجام رسید.

برای بررسی محصول RT-PCR ژل آگاروز ۱/۵ درصد با استفاده از بافر TAE تهیه گردید و نمونه‌ها در کنار Ladder 100 تحت تاثیر اختلاف پتانسیل الکتریکی معادل ۹۵ ولت قرار گرفتند.

نتایج

از مجموع ۳۰ نمونه تلقیح شده به حفره آلانتوئیک، ۱۲ نمونه دارای فعالیت هماگلوتیناسیون بودند که از بین این ۱۲ نمونه، شش نمونه در آزمون RT-PCR با تکثیر قطعه ۵۳۵ جفت بازی به عنوان ویروس نیوکاسل شناسایی گردیدند که البته تمامی این ۶ مورد را می‌توان جزء ویروس‌های وحشی (غیر واکسنی) در نظر گرفت زیرا تمامی موارد از بافت مغز و سایر بافت‌ها مانند نای، ریه، پیش معده، لوزه‌های سکومی، کلیه و کبد جدا گردیدند. با توجه به نتایج به دست آمده تقریبا ۴۰ درصد مزارع نمونه‌گیری شده از نظر آلودگی با ویروس‌های دارای فعالیت هماگلوتیناسیون، مثبت بوده که در این میان حدود ۲۰٪ آن‌ها به عنوان ویروس نیوکاسل شناسایی گردیدند.

بحث

بیماری نیوکاسل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های طیور می‌باشد و خسارات جبران ناپذیری به صنعت طیور وارد می‌کند. البته تا کنون درمان قطعی برای این بیماری شناخته نشده است (۱۱). پس با توجه به موارد مذکور، پیشگیری عمده‌ترین راه مقابله با بیماری نیوکاسل می‌باشد. در بحث پیشگیری ابتدا بایستی وجود ویروس توسط آزمون‌های مختلف به خوبی شناسایی شود، حال هر چه این آزمون‌ها دارای حساسیت و اختصاصیت بالاتری باشند و ضمنا در کمترین زمان ممکن قابل اجرا باشند به عنوان یک موفقیت بزرگ در امر تشخیص بیماری و شناسایی ویروس عامل بیماری محسوب می‌شوند. با توجه به مطالعات انجام شده آزمون RT-PCR واجد شرایط ذکر شده در بالا می‌باشد و باید گفت که ارجحیت آزمون RT-PCR به آزمون HI با سرم معلوم (در تشخیص ویروس نیوکاسل) به دلیل وجود مشکلات در تهیه سرم بوده و از این نظر تکنیک RT-PCR انتخاب گردید.

در این مطالعه در مجموع از ۳۰ واحد مرغداری گوشتی (هر مرغداری ۱۰ لاشه) نمونه‌گیری به عمل آمد. البته باید گفت که چون بیماری نیوکاسل دارای علائم بالینی و کالبدگشایی پاتوگنومونیک نیست (۱۱)، لذا تمامی مزارع مورد نمونه‌گیری دارای علائمی چون گردن پیچ و یا زخم در پیش معده نبودند (البته تعدادی از مزارع نیز دارای علائم تیپیک عصبی و غیره بودند). بنابراین در صورت وجود تلفات زیاد و درگیری گله با عفونت‌های حاد، نمونه‌گیری انجام می‌گرفت و احتمال این که تمامی ۳۰ گله به بیماری نیوکاسل مبتلا نبوده و با سایر عوامل عفونی ویروسی مانند آنفلوآنزا و غیره درگیر باشند، وجود داشت. در این مطالعه از میان جدایه‌های دارای فعالیت هماگلوتیناسیون (۱۲ مورد) تنها ۶ مورد در آزمون RT-PCR با پرایمر اختصاصی نیوکاسل مثبت بودند. نمونه‌های منفی در آزمون RT-PCR ویروس آنفلوآنزا بودند که در آزمون الایزای نقطه‌ای به عنوان ویروس آنفلوآنزا شناسایی گردیدند (داده‌های مربوطه اینجا آورده نشده است).

در مطالعه حاضر شش جدایه ویروس عامل بیماری نیوکاسل به وسیله تکنیک RT-PCR جدا گردید که البته تمامی این ۶ جدایه از بافت مغز و سایر بافت‌ها (نای، ریه، طحال، کلیه، پیش معده، لوزه‌های سکومی و کبد) جدا گردیدند. با توجه به این که تمام واکسن‌هایی که در ایران اجازه مصرف دارند جزو سویه‌های لنتوژن

می‌باشند و ویروس‌های لنتوژن توانایی تکثیر در دستگاه‌های گوارش و تنفس را دارند و در عین حال قدرت تهاجم به بافت مغز را نداشته و منجر به بروز علائم عصبی نمی‌شوند (۳ و ۵) بنابراین می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که جدایه‌های مذکور، ویروس واکسن نبوده و جزو سویه‌های وحشی می‌باشند.

مطالعات مشابهی هم در ایران و هم در خارج از کشور انجام گرفته است. در مطالعه‌ای که توسط اشتری وهمکاران (۱۳۷۸) روی نمونه‌های ارسالی از مناطق مختلف ایران به موسسه رازی انجام گرفت، ۱۴ نمونه مشکوک پس از آزمایش RT-PCR (بر روی پروتئین F) از نظر نیوکاسل مثبت ارزیابی شدند و به عنوان روشی سریع و آسان معرفی گردید (۱). البته در مطالعه اشتری و همکاران با توجه به سابقه مزارع، تعدادی از گله‌ها اخیرا واکسن دریافت کرده بودند که احتمالا تعدادی از نمونه‌های مثبت مربوط به سویه‌های واکسن بوده‌اند. تفاوت مطالعه اشتری و همکاران با مطالعه حاضر در این مورد است که نتوانسته‌اند بین سویه‌های واکسینال و مزرعه تمایز ایجاد کنند ولی در مطالعه حاضر تمامی جدایه‌ها از مغز و سایر بافت‌ها استحصال گردیدند که این خود باعث منتفی شدن بحث جدایه‌های واکسنی می‌شود.

در تحقیقی که توسط خوب یار و همکاران (۱۳۸۹) بر روی ۳۰۰ نمونه سواب کلواک و بافت نای از ۳۰ واحد مرغداری در استان فارس با آمار تلفات بالاو درگیر با بیماری‌های تنفسی انجام گرفت، از مجموع نمونه‌های مورد بررسی با آزمون RT-PCR (بر روی پروتئین F)، ۱۰ مورد به عنوان ویروس بیماری نیوکاسل شناسایی گردیدند (۲). البته لازم به ذکر است که پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر مشابه پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق خوب یار و همکاران می‌باشند و دیگر این‌که تعداد نمونه (۳۰ مزرعه) هر دو مطالعه یکسان می‌باشد و تقریبا نتایج مشابهی از هر دو تحقیق حاصل گردیده است.

همین‌طور در مطالعه‌ای که توسط نوروزیان و همکاران (۱۳۹۰) بر روی ۲۲ نمونه بافتی از طیور ارجاعی (گله‌های گوشتی) به درمانگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان انجام گرفت، از مجموع نمونه‌های مورد بررسی با آزمون RT-PCR (بر روی پروتئین M)، ۹ جدایه به عنوان ویروس بیماری نیوکاسل شناسایی گردیدند (۴). از تفاوت‌های بارز مطالعه نوروزیان و همکاران با تحقیق پیش‌رو، اختلاف در بررسی دو پروتئین متفاوت ویروس نیوکاسل می‌باشد. در واقع با نگاهی اجمالی به اکثر مطالعات انجام گرفته در این حوزه باید گفت که بررسی پروتئین فیوژن، بیشترین سهم را به خود اختصاص داده است.

در مطالعه‌ای که توسط Kant و همکاران (۱۹۹۷) بر روی بافت‌های مغز، نای، ریه و طحال ۱۳ گله مشکوک به نیوکاسل انجام گرفت، با استفاده از تکنیک RT-PCR (بر روی پروتئین F) هیچ گونه فراورده اختصاصی از سایر ویروس‌های پرندگان که واجد خاصیت هماگلوتیناسیون بودند تولید نگردید و این نشان می‌دهد که با استفاده از تکنیک مذکور ویروس عامل بیماری نیوکاسل شناسایی شده است. لازم به ذکر است که در این مطالعه جداسازی ویروس در تخم مرغ جنین‌دار صورت نگرفته است و مستقیما از بافت‌های مذکور ویروس شناسایی گردیده که این امر به تشخیص سریع‌تر ویروس کمک می‌کند. البته در مطالعه Kant و همکاران علاوه بر شناسایی ویروس، حدت جدایه نیز با RT-PCR مشخص گردید اما در مطالعه حاضر حدت ویروس به‌وسیله جداسازی آن از بافت مغز (علاوه بر بافت‌های دیگر) تعیین گردید (۱۰).

در مطالعه‌ای که توسط Singh و همکاران (۲۰۰۵) در هند انجام گرفت، ۳۰ نمونه فیلدی (۲۷ نمونه بافتی و ۳ نمونه مایع آلانتوئیک) از مزارع ماکیان گوشتی به‌وسیله تکنیک RT-PCR (بر روی پروتئین F) مورد بررسی قرار گرفتند که شامل بافت‌های نای، ریه و مغز بودند. ۵ جدایه از نمونه‌های فیلدی با تشکیل باند ۳۵۶ جفت بازی به وسیله RT-PCR به عنوان ویروس عامل نیوکاسل شناسایی گردیدند و نیز ۳ جدایه دیگر با تشکیل باند ۲۱۶ جفت بازی به وسیله nested PCR به عنوان عامل بیماری نیوکاسل شناسایی شدند که در مجموع ۸ نمونه از نظر ویروس بیماری نیوکاسل مثبت بودند. این مطالعه نشان داد که به وسیله RT-PCR و به دنبال آن nested PCR می‌توان ویروس نیوکاسل را مستقیما از نمونه بافتی جدا نمود. از نظر مقایسه باید گفت که تعداد نمونه و تعداد جدایه‌ها و پروتئین مورد بررسی (F)، هردو تحقیق مشابهت زیادی دارند (۱۳).

همین‌طور در مطالعه‌ای که توسط Berhanu و همکاران (۲۰۱۰) جهت شناسایی مولکولی ژن F و HN جدایه-های اخیر ویروس نیوکاسل در کشور مالزی انجام گردید، تعداد ۱۱ جدایه از ویروس عامل بیماری نیوکاسل طی سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۷ از نقاط مختلف مالزی به وسیله تکنیک RT-PCR جدا شده است. در این مطالعه مبنای شناسایی ویروس، پروتئین‌های F و HN بودند. لازم به ذکر است که در این مطالعه توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ناحیه شکست فعال پروتئین F مورد توالی یابی قرار گرفته است. بر همین اساس ۱۱ جدایه مذکور متعلق به ۳ ژنوتیپ مختلف می‌باشند که این جدایه‌ها با جدایه‌های گزارش شده از کشورهای جنوب شرق آسیا مشابهت زیادی داشته‌اند. همچنین شایان ذکر است که پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر، از مطالعه Berhanu و همکاران برداشت شده است (۸).

با توجه به مطالعاتی که در بالا ذکر گردید، تکنیک RT-PCR قابلیت این را دارد که به عنوان یک آزمایش متداول درآزمایشگاه‌های تشخیصی دامپزشکی به کار گرفته شود. البته جهت تمایز سویه‌های حاد از غیر حاد می‌توان از تعیین توالی ناحیه شکست آنتی ژن F نیز بهره برد. در صورتی که در جایگاه شماره ۱۱۷، اسید آمینه فنیل آلانین قرار داشته و نیز در بین جایگاه ۱۱۳ تا ۱۱۶ چندین اسید آمینه بازی (آرژنین یا لیزین) وجود داشته باشد، می‌توان آن سویه را جزو سویه‌های ویرولنت دسته بندی کرد (۱۲و۷).

در پایان می‌توان این طور نتیجه گیری کرد که جدا سازی و تشخیص ویروس عامل نیوکاسل از بافت‌های خاصی مانند بافت مغز می‌تواند در تفکیک نمودن جدایه مذکور از جدایه‌های واکسنی به عنوان یک شاخص مدنظر قرار گیرد که البته در هیچ یک از مطالعات مذکور این مورد مشاهده نگردیده است.

منابع

۱. اشتری، ع.، پوربخش، س.ع.، ممیز، ر.، عشرت آبادی، ف. (۱۳۸۷). تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل با استفاده از روش RT-PCR. *مجله میکروبیولوژی دامپزشکی*، دوره ۴، شماره ۲، صفحات ۹۳-۸۹.

۲. خوب یار، س.، نظری، م.ب.، رحیمیان، ع.، مهربان پور، م.ج. (۱۳۹۰). جداسازی و پاتوتایپینگ ویروس‌های نیوکاسل با استفاده از روش‌های RT-PCR و MDT در جوجه‌های گوشتی مرغداری‌های استان فارس. *مجله دنیای میکروب‌ها*، دوره ۴، شماره ۱و۲، صفحات ۳۵-۲۹.

۳. صدرزاده، ا. (۱۳۹۱). *مدیریت پیشگیری از بیماری‌های طیور بهداشت، پرورش و سلامت جوجه‌های گوشتی*. چاپ اول، ویرایش دوم، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار با همکاری نشر پشوتن، گرمسار، صفحه ۴۸۰.

۴. نوروزیان، ح.، وصفی مرندی، م.، پیرزاده، ع. (۱۳۹۰). کاربرد یک روش تشخیص ویروس نیوکاسل بر پایه RT-PCR در مقایسه با روش استاندارد جداسازی ویروس در تخم مرغ جنین دار. *مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی*، دوره ۴، شماره ۱، ویژه نامه ۱، صفحه ۱۷۳.

5. Alexander, D.J., Jones, R.C. (2007). *Paramyxoviridae*. In: *Poultry Diseases*. Pattison, M., McMullin, P., Bradbury, J., Alexander, D.J. 6th ed. Saunders, PP: 294-316.

6. Alexander, D.J., Senne, D.A. (2008). *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*. 5th ed. American Association of Avian Pathologists, PP: 135-141.

7. Alexander, D.J., Senne, D.A. (2008). *Newcastle Disease*. In: *Diseases of Poultry*. Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., Mcdougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E. 12th ed. Blackwell Publishing Professional. Ames, Iowa, USA, PP 75-100.

8. Berhanu, A., Ideris, A., Omar, A.R., Bejo, M.H. (2010). Molecular characterization of partial fusion gene and C – terminus extension length of haemagglutinin- neuraminidase gene of recently isolated Newcastle disease virus isolates in Malaysia. *Virology Journal* **7**: 183-93.

9. Bwala, D.G. (2009). Challenge studies in chickens to evaluate the efficacy of commercial Newcastle disease vaccines against the strains of Newcastle disease virus prevalent in South Africa since 2002. Thesis of Master of Science. Department of Production Animal Studies, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria.

10. Kant, A., Koch, G., Van Roozelaar, D.J., Balk, F., Ter Huurne, A. (1997). Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Pathology* **26**: 837-49.

11. Miller, P.J., Koch, G. (2013). *Newcastle disease.* In: *Diseases of Poultry*. Swayne, D.E., Glisson, J.R., Mcdougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Venugopal, N. 13th ed. Blackwell Publishing Professional. Ames, Iowa, USA, PP 89-107.

12. OIE (Office International des Epizooties) (2009). *Newcastle Disease*. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 2.3.14: 576-89.

13. Singh, K., Jindal, N., Gupta, S.L., Gupta, A.K., Mittal, D. (2005). Detection of Newcastle disease virus genome from the field outbreaks in poultry by reverse transcription-polymerase chain reaction. *International Journal of Poultry Science* **4**: 472-5.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 11, Issue 2, 2015

Isolation and Identification of Newcastle Disease Virus in Broiler Farms, Khuzestan Province

Mayahi, M.[1], Seyfi Abad Shapouri, M.R.[2], Jafari,R.A.[3], Mohammadian Ghale Jooghi, B.[4*]

1. Professor of Health and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

2.Professor of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

3. Assosiated Professor of Health and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

4. DVSc Graduated of Health and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

Received Date: 26 May 2014 *Accepted Date: 8 October 2014*

Abstract: *Newcastle disease is common in broiler farms. It causes huge losses to the poultry industry. Because of these, investigating and identifying the disease are important. Moreover, it would be much better to use simpler and cheaper techniques while being more accurate and more sensitive. Therefore, 30 broiler farms, located in Khuzestan province, were sampled and the suspensions were prepared. Then the suspensions were inoculated into 9 to 11 days old-embryonated chicken eggs and after the incubation period were investigated with hemagglutination test. Twelve samples were positive in the haemagglutination test. Finally RT-PCR was performed on the 12 samples to detect Newcastle Disease Virus and the results were positive in six cases. It is important to mention that all six isolates were brain-sourced (also isolated from other tissues) and since all available Newcastle disease vaccines in Iran are lentogen, so the isolates were not from vaccine virus.*

Keywords: *Newcastle disease, RT-PCR, F protein, Broilers*

**Corresponding author: Mohammadian Ghale Jooghi, B.*
Address: Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran Tel: +989127340950
Email: mohammadian@phdstu.scu.ac.ir