بررسی سرولوژی پادتن‌های ویروس نیوکاسل در مرغان بومی اطراف خرم‌آباد

حسن نوروزیان[۱*]، زیبا نظری[۲]

۱- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد- ایران.
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد- ایران.

دریافت: ۱۲ تیرماه ۹۶ **پذیرش:** ۲۷ دی‌ماه ۹۶

چکیده

بیماری نیوکاسل یکی از علل مهم بیماری و مرگ میر طیور بومی در ایران است و تشخیص و تعیین سریع و قابل اعتماد حدت عامل آن، در آزمایشگاه‌های تشخیص دامپزشکی اهمیت زیادی دارد. در پژوهش حاضر ۱۷۸ نمونه سرم از مرغان بومی روستاهای اطراف خرم‌آباد با آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون بررسی شد. نمونه‌های بافتی به دست آمده از چند گله مشکوک به نیوکاسل نیز برای جداسازی ویروس به تخم‌مرغ جنین‌دار تلقیح شد. ۶۵٪ نمونه‌ها و ۱۰۰٪ گله‌ها از نظر سرولوژی مثبت بودند. سه مورد نمونه مایع آلانتوئیک در آزمایش RT – PCR از نظر نیوکاسل مثبت شد و با آنزیم آندونوکلئاز محدودکننده *BglI* بررسی و حاد بودن سویه ویروس تأیید شد. تعیین توالی قطعه ژن F این سه نمونه هم نشانه‌ای از از حاد بودن این جدایه‌ها بود. این آزمایش REA/RT-PCR به دلیل سرعت عمل در تشخیص ویروس و تعیین حدت ویروس نیوکاسل می‌تواند به عنوان یک روش مناسب در آزمایشگاه‌های تشخیصی طیور استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: بیماری نیوکاسل، سرولوژی، تعیین حدت، RT-PCR/REA.

مقدمه

بیماری نیوکاسل یکی از مشکلات مهم صنعت طیور در کشور ایران است و هر ساله منجر به خسارت اقتصادی زیادی می‌گردد. در مورد فرم حاد یا ولوژنیک بیماری نیوکاسل لازم است بیماری به سرعت و با روش‌های دقیق تشخیص داده شود و کانون بیماری در منطقه حذف و عملیات قرنطینه انجام شود. روش «جداسازی ویروس» به دلیل کار با ویروس زنده، برای بررسی همه جانبه خصوصیات ویروس به‌خصوص در همه‌گیری‌های جدید اهمیت زیادی دارد و از این جنبه هیچ روش تشخیصی دیگری نمی‌تواند جایگزین آن شود (۹). از سوی دیگر، روش‌های سرم‌شناسی باتوجه به کم هزینه بودن و سرعت اجرا و در دسترس بودن، در مطالعه همه‌گیری‌ها و بررسی وضعیت گله‌های طیور از نظر بیماری نیوکاسل جایگاه مهمی دارند، البته با توجه به این که به‌طور معمول پادتن‌ها یک هفته پس از ابتلا، به مقادیر قابل ردیابی در سرم می‌رسند، نمی‌توان از این روش‌ها برای تشخیص اولیه بیماری بهره برد (۱) و صرفاً می‌توان سابقه بیماری را در گله بررسی کرد، به‌علاوه کاربرد فراوان انواع واکسن‌ها، تفسیر نتایج سرولوژی را در مورد نیوکاسل دشوار می‌کند.

پرورش طیور بومی در کشورهای توسعه نیافته و حتی در حال توسعه رواج زیادی دارد و بخش مهمی از نیاز پروتئینی جوامع را برآورده می‌کند. در کشورهای توسعه یافته هم، امروزه تمایل مصرف‌کنندگان به محصولات طیور طبیعی و ارگانیک موجب رونق پرورش طیور بومی شده است. بیماری نیوکاسل، به‌ویژه فرم ولوژنیک آن، همواره به‌عنوان مهم‌ترین تهدید صنعت طیور بومی در اکثر کشورهای جهان مطرح است و به‌نظر می‌رسد که به شکل آندمیک در جمعیت طیور بومی حضور داشته باشد (۲۳). به دلیل نزدیکی بسیاری از واحدهای مرغداری صنعتی با

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: noroozianh@yahoo.com

روستاها، طیور بومی همواره به‌عنوان یک مخزن بیماری برای طیور صنعتی مطرح می‌شوند. در خصوص بررسی شیوع سرمی بیماری نیوکاسل در طیور بومی در سراسر جهان و ایران پژوهش‌های زیادی انجام شده است (۸، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱ و ۲۲). در اکثر این پژوهش‌ها به‌ویژه در کشورهای توسعه نیافته که پرورش مرغ بومی رواج بیشتری دارد، میزان شیوع گزارش شده، بسیار بالاست و حتی در کشورهایی که این بیماری در گله‌های طیور صنعتی ریشه کن شده آثاری از حضور بیماری در گله‌های طیور بومی وجود دارد (۱۶). برخی از پژوهشگران نشان داده‌اند که تغییرات آب و هوایی متناسب با فصول مختلف روی شیوع نیوکاسل مؤثر است. به‌عنوان مثال، در پژوهشی که در ناحیه‌ای پرتراکم از نظر طیور بومی و بازارهای طیور زنده در کشور اتیوپی در دو سال متوالی روی مجموعه‌ای از نمونه‌ها با روش ELISA انجام و در کل ۱۸۹۹ نمونه اخذ شد. میزان شیوع سرمی نیوکاسل در فصل خشک (اردیبهشت) ۷۸/۶٪ بود که کمتر از فصل پر باران (شهریور) با ۸۲/۶٪ بود (۲۰).

روش‌های سرولوژیک معمول، اطلاعاتی در مورد حدت ویروس نمی‌دهند و در صورتی که پرنده‌ها واکسینه شده باشند، به‌سختی می‌توان پاسخ سرمی واکسینال را از بیماری تفکیک کرد. استفاده گسترده از واکسن‌های نیوکاسل در گله‌های طیور صنعتی که عمدتاً از سویه‌های لنتوژنیک هستند، تشخیص آزمایشگاهی بیماری را در این گله‌ها با روش جداسازی ویروس دشوار می‌کند؛ چرا که این ویروس‌های واکسینال تا چند هفته پس از واکسیناسیون از گله‌های طیور قابل جداسازی‌اند (۱۲)، البته این مشکل در گله‌های طیور بومی که معمولاً واکسیناسیون انجام نمی‌شود، کمتر ایجاد می‌گردد. از سوی دیگر، روش PCR قادر به ردیابی ویروس در دوره حاد بیماری و قبل از ایجاد پاسخ ایمنی در گله است، به‌علاوه، با توجه به این‌که حدت ویروس نیوکاسل با توالی آمینواسیدی محل شکسته شدن پروتئین F ارتباط مستقیم دارد (۷)، از نظر تئوری، تعیین حدت ویروس‌های نیوکاسل با روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR امکان‌پذیر است و چنین روش‌هایی مزیت و کاربرد زیادی خواهد داشت.

هدف از این پژوهش، بررسی شیوع سرمی بیماری نیوکاسل در گله‌های مرغ بومی روستاهای اطراف شهرستان خرم‌آباد است، البته ویروس‌های نیوکاسل جدا سازی شده با روشی که بتواند سویه‌های لنتوژنیک و ولوژنیک را تمیز دهد، ارزیابی خواهد شد و به‌منظور تعیین دقیق حدت، توالی ناحیه شکسته شدن ژن F آن‌ها بررسی خواهد شد.

مواد و روش کار

تعداد ۱۷۸ نمونه خون (به حجم ۱ تا ۲ سی‌سی) از گله‌های مرغ بومی اطراف شهرستان خرم‌آباد از ۶ روستا در نواحی مختلف جمع‌آوری شد. روستاها به‌صورت تصادفی از نقاط مختلف جغرافیایی شهرستان انتخاب شدند و از هر روستا ۳ گله گزینش شد و از مرغ و خروس‌های آن نمونه‌گیری به عمل آمد. بر اساس تاریخچه اخذ شده از صاحبان پرنده‌ها، گله‌های مورد بررسی هیچ‌گونه واکسنی دریافت نکرده بودند. نمونه‌های خون منعقد شده در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شد. از نمونه‌های خون در آزمایشگاه سرم جدا گردید. برای تهیه سرم بیشتر، نمونه‌ها ۱ تا ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. سرم‌ها در فریزر $-20\ ^{\circ}C$ نگه‌داری شد و عیار پادتن نیوکاسل با روش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) تعیین گردید.

به‌علاوه، نمونه‌های بافتی (شامل نای، ریه و روده) از موارد تلفات گله‌های مشکوک به نیوکاسل جمع‌آوری شد. برای جداسازی ویروس، از نمونه‌های بافتی با هاون چینی هموژن تهیه و طبق دستورالعمل Senne (۱۱) به تخم‌مرغ‌های جنین‌دار تلقیح شد. مایع آلانتوئیک همه تخم‌مرغ‌ها استخراج و آزمایش هماگلوتیناسیون (HA) روی آن‌ها انجام شد. آزمایش هماگلوتیناسیون و ممانعت

از هماگلوتیناسیون (روش بتا) بر اساس دستورالعمل OIE به انجام رسید (۶). آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون روی نمونه‌های سرمی با استفاده از آنتی‌ژن نیوکاسل (شرکت تولید مواد بیولوژیک پسوک، ایران) حاوی ۴ واحد HA انجام شد. رقت ۱/۱۶ (تیتر ۴) یا بیشتر به‌عنوان نتیجه مثبت در آزمایش HI در نظر گرفته شد (۱۷). روی نمونه‌های مایع آلانتوئیک که در آزمایش HA هماگلوتیناسیون مثبت شده بودند (هماگلوتیناسیون را نشان دادند) آزمایش PCR اختصاصی نیوکاسل به شرح ذیل انجام شد:

استخراج RNA ویروس از مایع آلانتوئیک با محلول استخراج RNA به نام RNX^{TM}- Plus (شرکت سیناکلون، ایران) انجام شد. مختصراً در این روش ۲۰۰μl از مایع آلانتوئیک را به ۱ml از RNX^{TM}- Plus افزوده شد و ۲۰۰µl از محلول کلروفرم – ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) اضافه گردید و سپس در ۱۰/۰۰۰ ×g به مدت ۱۵ دقیقه در ۴C° سانتریفوژ شد. فاز آبی (بالایی) با دقت به میکروتیوب دیگری منتقل گردید و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه و در ۲۰- °C به مدت ۲۰ دقیقه نگه‌داری شد، سپس میکروتیوب در ۱۰/۰۰۰ ×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. به رسوب 1ml اتانل ۷۰٪ اضافه گردید و در ۸/۰۰۰ ×g به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت، رسوب پس از خشک شدن در آب مقطر حاوی DEPC(Diethylpyrocarbonate) حل گردید.

آزمایش RT با کیت RevertAid First Strand cDNA synthesis (Cat. No # 1621, Thermoscientific) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده به عمل آمد. برای تشخیص ویروس نیوکاسل، آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن F و با توالی: NDV F : 5-GGT GAG TCT ATC CGG ARG ATA CAA G-3 و NDV R : 5- TCA TTG GTT GCR GCA ATG CTC T-3 انجام شد (۲). مقدار مواد استفاده شده در واکنش PCR شامل cDNA 3μl، 10x PCR buffer 2.5μl، 10x PCR buffer 2.5μl، 50mM $MgCl_2$ 0.75μl (1.5 mM)، 10mM dNTPs 0.5μl، Forward & Reverse primers (each) 1 μl (10 pmol)، Taq DNA polymerase (CinnaClone) 0.25 μl (1.25 u) و nuclease free H2O 16μl در حجم نهایی ۲۵ μl بود. برنامه حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه به‌مدت یک دقیقه در ۹۵°C، ۴۰ سیکل شامل دناتوراسیون به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۹۵°C، اتصال پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه در ۵۲°C، گسترش به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۷۲°C و گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲°C بود. محصول PCR قطعه‌ای با طول ۲۰۲bp بود و با استفاده از الکترو فورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ نشان داده شد.

محصول PCR با کیت Silica Bead DNA Gel Extraction (Cat. No # K0513, Thermoscientific) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده خالص سازی شد، سپس محصول PCR مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، با آنزیم محدودکننده *Bgl*I هضم آنزیمی شد (Cat.No # BP33251, Thermoscientific)(۲). مقدار مواد در هضم آنزیمی شامل: PCR product 20µl, Buffer O (10X) 3µl, 5 U/µl *Bgl*I enzyme 2µl , nuclease free water 5µl بود. هضم آنزیمی در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت انجام شد و محصول PCR هضم شده روی ژل با غلظت ۳٪ الکتروفورز گردید. آنزیم *Bgl*I به این دلیل انتخاب شد که تمام سویه‌های لنتوژنیک شناخته شده APMV-1 حاوی یک محل برش این آنزیم (5-GCCNNNN↓NGGC-3) در ناحیه شکسته شدن ژن F هستند (۱۰). نمونه‌هایی که هضم آنزیمی در آن‌ها اتفاق نیفتاده بود، به‌منظور تایید، تشخیص و تعیین توالی ارسال گردید (Sequetech Co. Ltd., USA). شماره ثبت توالی نمونه‌ها در ژن بانک عبارت بود از: KC570912, KC570913, KC570914، همچنین

از ویروس واکسینال سویه LaSota به‌عنوان نمونه شاهد مثبت استفاده شد.

نتایج

نتایج آزمایش HI انجام شده روی نمونه‌های سرمی در جدول ۱ درج شده است. ۶۵٪ نمونه‌های سرم و ۱۰۰٪ گله‌های بررسی شده از نظر نتایج HI نیوکاسل مثبت بود. بین برخی روستاهای بررسی شده از نظر میانگین نتایج HI نیوکاسل تفاوت معنی‌دار وجود داشت (جدول ۱).

جدول ۱– نتایج آزمایش HI بیماری نیوکاسل در گله‌های مرغ بومی اطراف خرم‌آباد

روستا	تعداد نمونه	میانگین تیتر ± ۹۵٪ SD	CV (%)	موارد مثبت (٪)
خیرآباد سفلی	۲۲	۶/۵۹ ± ۱/۴۸ [a*]	۵۰	۷۷
جلگه	۳۲	۲/۲۵ ± ۱/۱۳[b]	۱۳۸	۳۷
کاکاشرف	۳۰	۳/۳۳ ± ۱/۰۹ [b]	۸۳	۳۳
ویسیان	۲۸	۳/۹۳ ±۱/۲۱[b]	۶۲	۵۷
بادیه	۳۶	۷/۳۳ ± ۰/۹۴ [a]	۳۶	۸۸
چغلوندی	۳۰	۹/۳۳ ± ۰/۷۱ [c]	۱۹	۱۰۰
مجموع	۱۷۸	۵/۴۶ ± ۰/۵۷	۶۹	۶۵

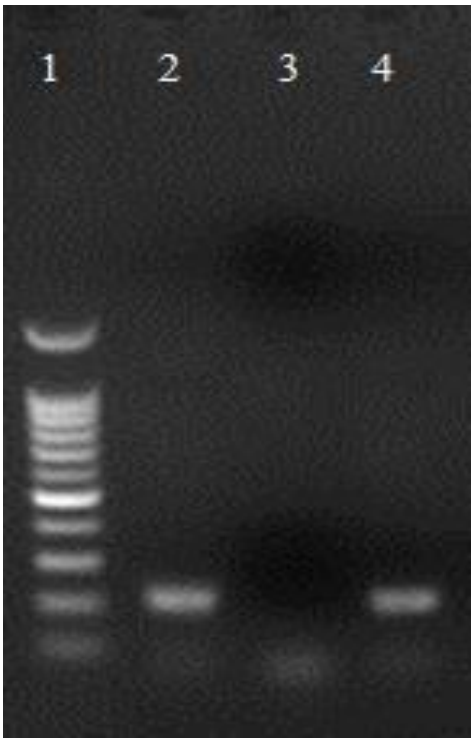
*حروف نامشابه در هر ستون حاکی از اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

تخم‌مرغ‌هایی که در کندلینگ فاقد مشخصه‌های جنین زنده بودند هر روز به یخچال منتقل می‌شدند. مایع آلانتوئیک جنین‌های تلف شده در شرایط استریل برداشت و آزمایش هماگلوتیناسیون می‌شدند. سه مورد از نمونه‌ها که از نظر HA و HI مثبت بود و در آزمایش RT-PCR هم مثبت تشخیص داده شد، برای آزمایش آنالیز با آنزیم آندونوکلئاز محدودکننده (REA) به کار رفت (شکل ۱).

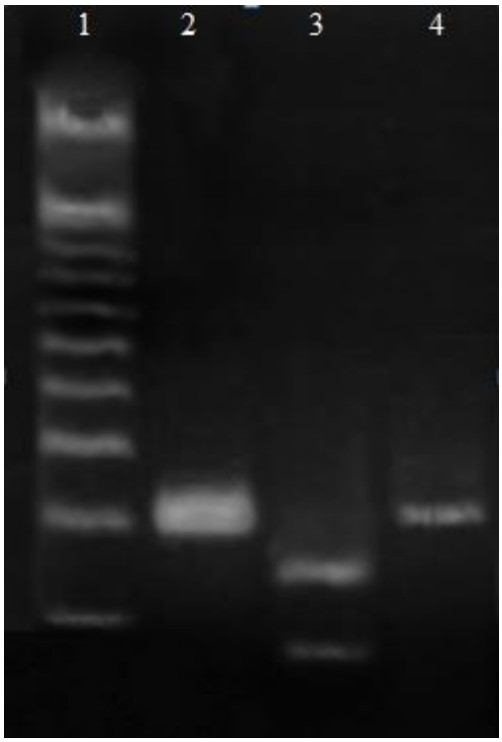
نمونه‌های مثبت شده در آزمایش RT-PCR (به دست آمده از نای و لوزه سکومی) در آزمایش هضم آنزیمی برش نخوردند. در حالی‌که نمونه به دست آمده از سویه واکسینال لاسوتا به دو قطعه ۶۷bp و ۱۳۵bp برش خورد (شکل ۲). با توجه به ویژگی آنزیم *Bgl*I، هضم نشدن آنزیمی حاکی از لنتوژنیک نبودن سویه ویروس است. نتایج تعیین توالی قطعه تکثیر شده این سه جدایه نیز مطابق انتظار حاکی از ولوژنیک بودن ویروس‌ها بود. یکی از توالی‌های مشخصه پاتوتیپ‌های حاد نیوکاسل در محل شکسته شدن پروتئین F (GRRQKR/FI) در جدایه‌های بررسی شده، مشاهده گردید (شکل ۳).

بحث

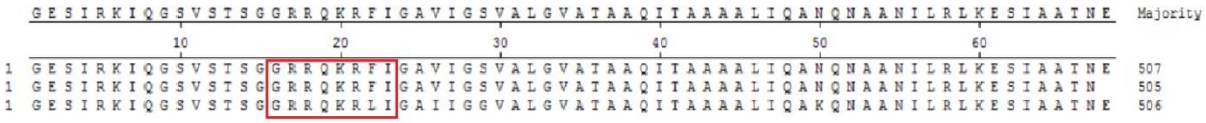
گوشت و تخم‌مرغ به دست آمده از پرورش طیور بومی در کشورهای در حال توسعه و کشور ایران نقش مهمی در تأمین نیاز غذایی خانوارهای روستایی دارد و بیماری نیوکاسل یکی از عوامل اصلی زیان‌رسان به این بخش از اقتصاد روستایی است. این بیماری هر ساله معمولاً در فصول خاصی در جمعیت طیور بومی شایع می‌شود و عمدتاً جوجه‌های جوان را درگیر می‌کند و موجب تلفات گسترده و کاهش شدید تولید تخم‌مرغ در مرغان محلی می‌شود. به‌دلیل طیف گسترده میزبانی، بیماری نیوکاسل گونه‌های مختلف طیور بومی مانند مرغ و خروس، بوقلمون، اردک و غاز و ... را درگیر می‌کند و به این ترتیب در محیط بقا می‌یابد.



شکل ۱– نتیجه آزمایش RT-PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی NDV از چپ به راست به ترتیب (۱) مارکر 100bp، (۲) شاهد مثبت، (۳) شاهد منفی، (۴) نمونه مثبت



شکل ۲– آزمایش هضم آنزیمی (REA) با استفاده از آنزیم *Bgl*I از چپ به راست به ترتیب (۱) مارکر، (۲) شاهد مثبت، (۳) نمونه هضم شده، (۴) نمونه هضم نشده



شکل ۳– توالی محل شکسته شدن پروتئین F جدایه‌های نیوکاسل

در خصوص بررسی شیوع سرمی بیماری نیوکاسل در طیور بومی در سراسر جهان پژوهش‌های فراوانی انجام شده است. در پژوهشی روی گله‌های مرغ بومی شهر chitungwiza در زیمباوه شیوع سرمی نیوکاسل با روش ELISA حدود ۲۷٪ از کل نمونه‌های اخذ شده و ۶۲٪ از مرغداری‌ها تعیین گردید. این در حالی بود که در گله‌های مزبور هیچ واکسنی به‌طور معمول به کار نمی‌رفت. تعداد پرنده‌های هر گله از ۱ تا ۶۵۰ متغیر بود و به‌طور میانگین ۶۵ قطعه بود. آمار تلفات در این گله‌ها از ۳ تا ۱۰۰٪ متغیر و میانگین آن حدود ۲۵٪ گزارش شده بود که بنا به اظهار نظر تولید کنندگان عمدتا به دلیل مشکلات تنفسی مثل عطسه، تورم صورت، دشواری تنفسی، التهاب ملتحمه، فلجی و اسهال بود. در اکثر این گله‌ها درمان آنتی بیوتیکی بدون موفقیت انجام شده بود (۱۸). در پژوهش حاضر هم شیوع سرولوژیک نیوکاسل در اطراف خرم‌آباد از ۳۳ تا ۱۰۰ درصد در بین پرنده‌ها متغیر بود و در مقیاس گله تمامی موارد مثبت بود. این موضوع حاکی از شیوع بالای این بیماری در جمعیت طیور بومی شهرستان خرم‌آباد بود. با توجه به این‌که در بررسی‌های سرولوژیکی بین موارد اخیر بیماری و همه‌گیری‌های گذشته، تفکیکی نمی‌توان قائل شد، نتایج به‌دست آمده نشانه‌ای از سابقه بیماری نیوکاسل و چرخش ویروس در گله‌های بررسی شده دارد.

در یک پژوهش دیگر روی سه روستا از دره ریفت در اتیوپی در سال ۲۰۱۵ در مجموع تعداد ۱۵۵ نمونه سرمی اخذ شد و با روش ELISA یررسی شد. به‌طور کلی ۱۱/۶٪ نمونه‌ها از نظر سرمی مثبت بود و تفاوت معنی‌داری بین روستاهای مختلف بررسی شده مشاهده نشد. این پژوهشگران نتیجه گرفتند که بیماری نیوکاسل شیوع گسترده‌ای در منطقه تحت مطالعه دارد (۲۲). در پژوهش حاضر، نتایج به‌دست آمده بیان‌گر تفاوت معنی‌دار میانگین تیتر سرمی نیوکاسل بین برخی روستاهای بررسی شده، است (جدول ۱). این تفاوت‌ها می‌تواند به دلیل تفاوت زمان شیوع بیماری در گله‌های بررسی شده باشد؛ بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که میزان شیوع نیوکاسل در مناطق مختلف خرم‌آباد متفاوت است. در برخی روستاها بیماری اخیرا شایع بوده است در حالی‌که در برخی روستاها آثار سرولوژیک ابتلای اخیر به نیوکاسل وجود ندارد. این موضوع مربوط به گستردگی جغرافیایی شهرستان خرم‌آباد، دور یا نزدیک بودن روستا از جاده‌های اصلی و اختلاف در تراکم مرغداری‌های صنعتی در اطراف روستاست و جا دارد در یک پژوهش دیگر، عوامل خطر توجیه کننده این تفاوت بررسی شود.

در پژوهش سرولوژی با روش HI روی تعداد ۹۷۰ نمونه خون ازمرغان بومی ۳۰ روستا در ناحیه Yucatan مکزیک، در ۹ روستا نتایج سرمی مثبت وجود داشت و در مجموع تنها ۲/۲٪ نمونه‌های اخذ شده مثبت بود (۱۶)؛ اگرچه ناحیه مذکور از نظر حضور فرم حاد گوارشی بیماری نیوکاسل در گله‌های طیور صنعتی عاری اعلام شده بود. یادآور می‌شود این ناحیه در مسیر مهاجرت و توقف کوتاه پرندگان آبزی در قاره آمریکاست. بیماری نیوکاسل از نظر طیف میزبان در بین پرندگان بسیار متنوع است و پرندگان آبزی مهاجر به‌عنوان مخزن بیماری تلقی می‌شوند (۱۴)؛ البته گله‌های طیور بومی هم می‌توانند به‌عنوان مخزن ویروس نیوکاسل در منطقه عمل کنند و امکان همه‌گیری‌های مکرر بیماری در گله‌های طیور صنعتی را فراهم کنند. برای کنترل بیماری نیوکاسل در کشور باید شیوع این بیماری در گله‌های مرغ بومی تا حد قابل توجهی کاهش یابد. نتایج پژوهش حاضر موید شیوع بالای بیماری نیوکاسل در جمعیت طیور بومی خرم‌آباد است و بر اساس تجربیات کلینیسین‌های طیور و گزارش‌های اداره کل دامپزشکی لرستان این بیماری در گله‌های طیور صنعتی هم رواج زیادی دارد.

در ایران پژوهش‌های ارزشمندی در زمینه شیوع سرمی بیماری نیوکاسل در استان‌های مختلف انجام شده است و همگی بیانگر شیوع گسترده بیماری نیوکاسل در بین گله‌ای طیور بومی است. در یک پژوهش جامع در استان بوشهر (واقع در جنوب غرب ایران) در طی سال‌های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳ از ۱۵۳۰ نمونه سرم به‌دست آمده از ۳۲ روستا در ۶ بخش مختلف استان ۴۰/۱۳٪ نمونه‌ها مثبت بود و در واقع هیچ بخشی عاری از بیماری نیوکاسل نبود. در بین بخش‌های بررسی شده «تنگستان» با ۵۶/۲٪ نمونه مثبت، آلوده‌ترین بخش استان بوشهر به نیوکاسل بود (۱۷). در استان فارس نیز در ۲۱ روستای در سال ۲۰۱۰ ، در حدود ۷۰٪ روستاهای بررسی شده موارد مثبت سرمی نیوکاسل وجود داشت (۲۱). نقش پرندگان مهاجر آبزی در اشاعه بیماری نیوکاسل مورد بحث است و این پرندگان به‌دلیل مقاومت نسبی به سویه‌های ولوژنیک نیوکاسل ممکن است در بقای این ویروس‌ها نقش داشته باشند (۲۴). در پژوهش هادی‌پور شیوع سرمی نیوکاسل در روستاهای اطراف دریاچه مهارلو حدود ۳۷٪ تعیین شد (۱۴). دریاچه مهارلو محل زیست تعداد زیادی پرنده مهاجر است. با توجه به قرار گرفتن کشور ایران در مسیر مهاجرت پرندگان آبزی و سبک معمول نگه‌داری پرندگان بومی در فضای باز که عملاً امکان تماس با آن‌ها را فراهم می‌آورد، نقش پرندگان آبزی در آلودگی گسترده و پایدار طیور بومی ایران، باید بیشتر بررسی شود.

حسن‌زاده و بزرگ‌مهری فرد در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که در جوجه مرغ‌های بومی ناحیه‌ای در غرب گیلان

بدون انجام واکسیناسیون پس از گذشت ۶۰ تا ۹۰ روز از تولد، مقادیر تیتر سرمی نیوکاسل افزایش می‌یابد که نشانه مواجهه جوجه‌ها با ویروس فیلد است (۱۵)، بر همین اساس به‌نظر می‌رسد حضور ویروس‌های وحشی نیوکاسل در محیط پرورش طیور بومی چالش مهمی در رشد این بخش از تولیدات دامی کشور باشد؛ به‌علاوه، تنوع سنی گله‌های مرغ بومی و حضور دایمی میزبان‌های حساس که معمولاً مرغ‌های جوان را دربر می‌گیرد، چرخش و بقای ویروس را در گله‌ها تسهیل می‌کند. پژوهش بوزری و مورکانی در سال۲۰۰۶ در ۴۰۰ قطعه طیور بومی چهار منطقه اطراف اصفهان در دو تابستان متوالی در سال‌های ۱۹۹۸ و ۱۹۹۹ میزان شیوع سرمی نیوکاسل تفاوت عمده‌ای نداشت و در حد ۶۹٪ بود. نکته جالب توجه در این پژوهش این بود که در هر بار نمونه‌گیری حدود یک چهارم پرنده‌ها (به‌خصوص جوجه‌های زیر ۱ تا ۲ سال) فاقد پاسخ آنتی‌بادی بودند و در نتیجه به عنوان میزبان حساس به بقا و چرخش ویروس در جمعیت طیور بومی منطقه کمک می‌کردند (۱۹).

یک موضوع مهم در مورد بیماری نیوکاسل تفکیک سویه‌های پرحدت از کم‌حدت است. با توجه به گستردگی کاربرد واکسن‌های نیوکاسل، صرفاً تشخیص حضور ویروس در نمونه‌های به‌دست آمده از گله‌های طیور نمی‌تواند دلیل بر بروز بیماری باشد و معمولاً زمانی اهمیت تشخیصی دارد که ثابت شود این ویروس حدت بالایی دارد. روش استاندارد و رایج تشخیص حدت ویروس ND شامل تعیین شاخص پاتوژنسیته است که بهتر است با جوجه‌های SPF انجام شود و در آزمایشگاه‌های مجهز قابل اجراست. این روش‌ها وقت‌گیر و پرهزینه هستند؛ بنابر مصوبه سازمان OIE در سال ۱۹۹۹ می‌توان از توالی آمینواسیدی در محل شکسته شدن پروتئین F به‌عنوان یک شاخص تشخیص حدت ویروس ND استفاده کرد. توالی تیپیک سویه‌های حاد ویروس در این ناحیه 112R/G/K-R-Q/K-K/R-R↓F است (۶). به این ترتیب از روش PCR که در آن تکثیر این قسمت از ژن F صورت گیرد و با کمک تعیین توالی، می‌توان برای تعیین حدت ویروس استفاده کرد (۵)؛ اما استفاده از این روش به‌صورت معمول درحال حاضر برای بسیاری از آزمایشگاه‌ها امکان‌پذیر نیست و تعیین توالی فرآیند زمان‌بری است. البته، توالی موتیف محل شکسته شدن پروتئین F تنها عامل دخیل در حدت ویروس نیست و استثناهای اندکی در این زمینه وجود دارد (۲۲).

Kant و همکاران در سال ۱۹۹۷ برای تکثیر قطعه‌ای از ژن F از سه پرایمر (A, B, C) استفاده کردند که ترکیب A+B و A+C به توالی ویروس‌های ولوژنیک می‌چسبید و تنها ترکیب A+C به توالی ویروس‌های لنتوژنیک می‌چسبید (۴). استفاده از هضم آنزیمی (REA) نیز برای تعیین حدت و منشا (واکسینال یا فیلد) نیز مورد توجه قرار گرفته است. Wehmann و همکاران در سال ۱۹۹۷ با آنالیز آنزیمی پروتئین ماتریکس سویه‌های واکسینال B1 و Lasota با استفاده از آنزیم‌های آندونوکلئاز *Mbo*I و *Hinf*I الگوهای برشی مشخصی پیدا کردند که به تشخیص این سویه‌ها از ویروس‌های فیلد نیوکاسل کمک می‌کند (۱۳). Frsang و همکاران در سال ۲۰۰۳ این روش را در مورد سایر سویه‌های واکسینال نیوکاسل هم به‌کار بردند (شامل VG/GA وUlster 2C وV4) و از آن برای تشخیص صحت حضور سویه‌های ادعا شده به‌وسیله شرکت‌های واکسن‌سازی و وجود آلودگی با دیگر سویه‌ها در بچ‌های واکسن استفاده کردند (۳). در پژوهش حاضر، نمونه‌های مثبت در آزمایش RT-PCR در آنالیز آنزیمی REA هضم نشدند و با توجه به سایت برشی آنزیم *Bgl*I (5-GCCNNNN↓NGGC-3) پرحدت محسوب می‌شدند که این موضوع با تعیین توالی قطعه ژن F تأیید شد (شکل ۳)، البته یک نقطه ضعف مشترک در مورد کلیه روش‌های تشخیص بر پایه PCR، امکان حضور مواد مهار کننده PCR و ایجاد نتایج منفی کاذب (به‌ویژه در نمونه‌های

خون و مدفوع) است. به همین دلیل تکثیر اولیه ویروس احتمالی در تخم‌مرغ جنین‌دار حساسیت و ویژگی آزمایش را افزایش می‌دهد.

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که شیوع سرولوژیک نیوکاسل در جمعیت طیور بومی شهرستان خرم‌آباد بالاست و آزمایش RT-PCR و REA ارایه شده روشی قابل اعتماد برای تشخیص و تعیین حدت ویروس نیوکاسل است و می‌توان از این روش در آزمایشگاه‌های دامپزشکی بهره برد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان به‌دلیل تأمین هزینه‌های این پژوهش اعلام می‌دارند.

منابع

1- Allwinn, R; Preiser, W; Rabenau, H; Burbaum, S; Sturmer M. and Doerr, H. W; Laboratory diagnosis of Influenza – virology or serology? Med. Microbiol. Immunol; 2002; 191: 157-160.

2- Creelan, J. L; Graham, D. A. and McCullough, S. J; Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Avian Pathol; 2002; 31: 493-499.

3- Farsang A; Wehmann E; Soo T. and Lomniczi, B; Positive Identification of Newcastle Disease Virus Vaccine Strains and Detection of Contamination in Vaccine Batches by Restriction Site Analysis of the Matrix Protein Gene. J. Vet. Med.; B 2003; 50: 311-315.

4- Kant, A; Koch, G; Van Roozelaar, D. J; Balk, F. and Ter Huurne, A; Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle Disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. Avian Patho.; 1997; 26: 837-849.

5- Li, Y. P. and Zhang, M. F; Rapid pathotyping of Newcastle disease virus from allantoic fluid and organs of experimentally infected chickens using two novel probes. Arch. Virol.; 2004; 149: 1231-1243.

6- Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, part 2, section 2.1, chapter 2.1.15, Newcastle disease.

7- Millar, N. S; Chambers, P. and Emmerson, P. T; Nucleotide sequence of the fusion and haemagglutinin –neuraminidase glycoprotein genes of Newcastle Disease virus, strain Ulster: Molecular basis for variations in pathogenicity between strains. J. General Virol.; 1988; 69: 613-620.

8- Momayez, R; Gharahkhani, P; Pourbakhsh, S. A; Toroghi, R; Shoushtari, A. H. and Banani, M. Isolation and pathogenicity identification of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease) virus from a Japanese quail flock in Iran. Arch. Razi Ins.; 2007; 62(1): 39-44.

9- Noroozian, H; Vasfi Marandi, M. and Razazian, M; Detection of Avian Influenza Virus of H9 Subtype in the Faeces of Experimentally and Naturally Infected Chickens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. Acta Vet. Brno; 2007; 76: 405-413.

10- Seal, B. S; King, D. J. and Bennett, J. D; Characterisation of Newcastle Disease Virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. J. Clin. Microbiol.; 1995; 33(10): 2624-2630.

11- Senne, D. A; 1998; Virus propagation in embryonating eggs. In: Isolation and identification of avian pathogens. (4th ed.) Swayne, D. E; Glisson, J. R; Jackwood, M. W; Pearson, J. E. and Reed, W. M; (eds.). American Association of Avian Pathologists, University of pensylvania, USA, 2008; pp: 235-240.

12- Van Eck, J. H. H; Van Wiltenburg, N; and Jaspers, D; An Ulster 2C strain-derived Newcastle disease vaccine: efficacy and excretion in maternally immune chickens. Avian Pathol.; 1991; 20: 481-495.

13- Wehmann, E; Herczeg, J; Ballagi-Pordany, A. and Lomniczi, B; Rapid identification of Newcastle disease virus vaccine strains LaSota and B-l by restriction site analysis of their matrix gene. Vaccine; 1997; 15(12/13): 1430-1433.

14- Hadipour, M; A Serological Survey for Newcastle Disease Virus Antibodies in Backyard Chickens Around Maharlou Lake in Iran. J. Anim. Vet. Adv.; 2009; 8: 59-61.

15- Hassanzadeh, M. and Bozorgmeri Fard M. H. A serological study of Newcastle disease in pre- and post-vaccinated village chickens in north of Iran. Int. J. Poult Sci.; 2004; 10: 658-661.

16- Gutierrez-RuizE, J; Ramirez-Cruz G. T; Camara Gamboa E. I; AlexanderD. J. and GoughR. E. A; Serological survey for avian infectious bronchitis virus and Newcastle disease virus antibodies in backyard (free-range) village chickens in Mexico. Trop. Anim. Health. Prod. 2000; 32: 381-390.

17- Saadat, Y; Ghafouri, S. A; Tehrani, F; Langeroud, A. G; An active serological survey of antibodies to newcastle disease and avian influenza (H9N2) viruses in the unvaccinated backyard poultry in Bushehr province,Iran, 2012–2013 Asian .Pac. J. Trop. Biomed.; 2014; 4: 213-216

18- Kelly, P. J; Chitauro, D; Rhode, C; Rukwava, J; Majok, Davelar, A. and Mason, P. R; Diseases and management of backyard chicken flocks in chiturgwiza. Zimbabwe. Avian Dis; 1994; 38: 626-629.

19- Bouzari, M. and Mousavi Morekani, R; Seroepidemiology of Newcastle disease in domestic village chickens of plain areas of Isfahan province, central India. Ind. J. Vet. Res.; 2006; 7:80–84.

20- Chaka, H; Goutard, F; Gil, P; Abolnik, C; Servan de Almeida, R; Bisschop, S. and Thompson, P. N; Serological and molecular investigation of Newcastle disease in household chicken flocks and associated markets in Eastern Shewa zone, Ethiopia. Tropic. Anim. Health Prod.; 2013; 45(3), 705-714.

21- Rezaeianzadeh, G; Dadras, H; Makenali, A. S. and Nazemshirazi, M. H; Serological and molecular study of

Newcastle disease virus circulating in village chickens of Fars province, Iran. J. Vet. Med. Anim. Health; 2011; 3: 105-111.

22- Terefe, D; Belaineh, R; Chaka, H; Sombo, M. and Mekuria, A; Serological and Molecular Study of Newcastle Disease Virus in Village Chickens in Selected Rift-Valley Areas, Ethiopia. J Veterinar Sci. Technol; 2015; 6: 264.

23- Awan, M. A; Otte, M. J. and James, A. D; The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review. Avian Pathol. 1994, 23(3): 405-423.

24- Kaleta, E. F. and Baldauf C. Newcastle disease in freeliving and pet birds. In: Newcastle Disease. D. J. Alexander, ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands; Boston, Massachusetts, USA.; 1988; 197-246.

Serological and molecular study of Newcastle disease in backyard chickens of Khorram Abad suburbs

Norouzian, H.[1*]; Nazari, Z.[2]

1- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorram Abad- Iran.
2. MSc, Graduated Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorram Abad- Iran.

Received: 3 July 2017 ***Accepted:*** 17 January 2018

Summary

Newcastle disease virus (NDV) is among major causes of disease and mortality in backyard chicken flocks in Iran and rapid and reliable diagnosis and determination of its causative agent is very important in veterinary diagnostic laboratories. In this study 178 serum samples were investigated backyard chicken flocks of 6 villages around Khorram Abad suburbs using hemaglutination inhibition. In addition, a few tissue samples were obtained from suspected flocks for virus isolation, using embryonated chicken eggs. Then, RT-PCR was established with RNA extracted from allantoic fluid samples using specific primers for F gene. All of the studied flocks and 65% of serum samples were positive for NDV antibodies. A total number of 3 isolates, detected in virus culture and RT-PCR, further were evaluated by restriction endonuclease analysis (REA) with *Bgl*I. The results showed that the three isolates were not of lentogenic pathotype, confirmed in sequencing analysis. The extensive prevalence of ND antibodies among backyard chicken flocks of Khorram Abad and pathotype determination of the isolates are indications for circulation of velogenic NDV. The RT-PCR/REA technique in this study could be an accurate detection and pathotype differentiation method for NDV in backyard chickens.

Keywords*:* ND, serological study, RT-PCR/REA, Khorram Abad.

* Corresponding Author E-mail: noroozianh@yahoo.com