مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۲، ۱۶۴-۱۵۹

مطالعه شاخص‌های بیماریزایی ویروس‌های بیماری نیوکاسل جداشده از مرغداری‌های صنعتی ایران

محمد عبدالشاه[۱] سید علی پوربخش[۲*] سید مصطفی پیغمبری[۱] بهرام شجاعدوست[۱] رضا ممیز[۲] زهره مجاهدی[۳]

۱) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) گروه بیماریهای طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج - ایران.
۳) مدیریت کنترل کیفی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۸ دی ماه ۱۳۹۰ ، پذیرش نهایی: ۲۸ اسفندماه ۱۳۹۰)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری نیوکاسل (ND) توسط سروتیپ یک پارامیکسو ویروس های طیور ایجاد می‌شود. سویه‌های ویروس نیوکاسل را به چهار پاتوتیپ به نام‌های ولوژنیک، مزوژنیک، لنتوژنیک، و غیربیماریزای روده‌ای گروه بندی می‌نمایند. **هدف:** هدف از این مطالعه، بررسی شاخص‌های بیماریزایی ویروس‌های بیماری نیوکاسل جداشده از گله‌های طیور ایران بود. **روش کار:** نمونه‌های فراوانی از گله‌های مختلف از استان‌های مختلف کشور تهیه شدند و برای جداسازی ویروس نیوکاسل آماده‌سازی شدند. از میان تعداد زیادی ویروس نیوکاسل جداشده، ۱۲ جدایه متعلق به ۱۰ استان کشور که بیشترین تراکم پرورش طیور را دارند مورد بررسی قرار گرفتند. از این جدایه‌ها دودمان ژنتیکی خالص (Clone) به روش Limiting dilution تکثیر و تولید شد. سپس شاخص‌های بیماریزایی (MDT، ICPI و IVPI) ویروس‌های کلون شده برای هر یک از این جدایه‌ها تعیین و با شاخص‌های بیماریزایی دو سویه شناخته شده استاندارد Herts ۳۳/۵۶ و Texas GB مقایسه شدند. **نتایج:** نتایج نشان داد که مقادیر شاخص‌های بیماریزایی جدایه‌های مورد مطالعه برای MDT از ۴۱/۶ تا ۶۰ ساعت، برای ICPI از ۱/۷۶ تا ۱/۹۱ و برای IVPI از ۲/۶۸ تا ۲/۸۸ متفاوت بودند و این نشان می‌داد جدایه‌های مذکور در پاتوتیپ ولوژنیک جای دارند. **نتیجه‌گیری نهائی:** یافته‌های این مطالعه نشان داد ویروس‌های نیوکاسل بسیار حاد که از لحاظ حدت نزدیک و یا حتی بالاتر از سویه‌های حاد استاندارد قرار دارند در مرغداری‌های ایران در چرخش هستند. لذا جداسازی، شناسایی، تعیین پاتوتیپ، و بررسی خصوصیات ملکولی جدایه‌های ویروس نیوکاسل در ایران، مسئولان ذیربط را در اتخاذ تصمیمات صحیح برای کاهش خطرات ناشی از بیماری نیوکاسل که صنعت طیور ایران را تهدید می‌کند، یاری خواهد نمود.

واژه‌های کلیدی: ویروس بیماری نیوکاسل، شاخص‌های بیماریزائی، پاتوتیپ، طیور، ایران.

مقدمه

بیماری نیوکاسل (ND) توسط سروتیپ یک پارامیکسوویروس‌های طیور ایجاد می‌شود که یک ویروس RNA با ژنوم تک رشته‌ای و دارای اندازه ۱۵۱۸۶ جفت باز است (۱۰). بر اساس شدت بیماری حاصله از این ویروس، سویه‌های آن را در چهار پاتوتیپ به نام‌های غیربیماریزای روده‌ای، لنتوژنیک، مزوژنیک، و ولوژنیک گروه بندی کرده‌اند (۱،۳).

در کنترل همه‌گیری‌ها معمولاً تشخیص NDV به تنهایی کفایت نمی‌کند، بلکه لازم است تا پاتوتیپ ویروس و حتی گاه میزان بیماریزایی آن هم ارزیابی شود. درسال ۱۹۵۵، پژوهشگران شاخص Time (MDT) Mean Death را برای تعیین پاتوتیپ ویروس‌های بیماری نیوکاسل معرفی کردند. به دنبال آن، شاخص‌های دیگری از جمله Index (ICPI) Intracerebral Pathogenicity و Intravenous Pathogenicity Index (IVPI) نیز به معیارهای طبقه‌بندی پاتوتیپ‌های این ویروس‌ها افزوده شدند (۱،۳،۱۳). مشخص کردن پاتوتیپ ویروس بر اساس روش‌های مرسوم (MDT، ICPI و IVPI) کارزمان بر و پرزحمتی به حساب می‌آید (۱۳). پس از ورود تکنیک‌های مولکولی بر اساس فن‌آوری اسید نوکلئیک، شناسائی و تعیین پاتوتیپ ویروس هم پیشرفت زیادی کرد (۸،۱۱،۱۶). در این میان روش (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) RT-PCR در ظرف ۲۴ ساعت قادر است سویه‌های حاد و غیر حاد NDV موجود در مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ‌های آلوده و سویه‌های حاد NDV موجود در نمونه‌های بالینی را به طور مستقیم شناسایی کند (۱۱). از این رو امروزه روش‌های مولکولی در حال راه‌اندازی و یا تکامل هستند تا با صرفه‌جویی در زمان و هزینه‌ها، جایگزین شیوه‌های سنتی شوند (۱۱). با وجود پیشرفت‌های زیادی که در این زمینه به دست آمده است، اما هنوز در گاهی موارد آزمایش‌های مولکولی حساسیت و ویژگی لازم را برای تعیین دقیق پاتوتیپ‌های ویروس‌های NDV ندارند (۱۳).

با توجه به ضرورت انجام مطالعات بر روی جدایه‌های ویروس نیوکاسل از طیور در سال‌های اخیر، تعدادی جدایه در موسسه رازی بر اساس روش‌های کلاسیک به عنوان ویروس نیوکاسل شناسایی شدند. هدف از این مطالعه، بررسی شاخص‌های بیماریزایی تعدادی از این ویروس‌هاست که از استان‌های دارای بیشترین جمعیت طیور به‌دست آمده‌اند تا هویت جدایه‌های ایرانی ویروس NDV مورد شناسایی و ارزیابی بیشتری قرار گیرد.

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۳۴۵۵۲۰۰۵-۰۲۶، نمابر: ۳۴۵۵۲۱۹۴-۰۲۶ Email: a.pourbakhsh@rvsri.ir

مواد و روش کار

نمونه برداری و جداسازی ویروس های نیوکاسل: نمونه‌های مغز، طحال و ریه متعلق به گله‌های تجاری از استان های مختلف ایران مورد بررسی قرار گرفتند. برای جداسازی ویروس نمونه‌های بافتی کاملاً ریز و خرد شدند. برای هر گله نمونه‌های گرفته شده از مغز با هم مخلوط شدند و از آنها در محیط حاوی آنتی بیوتیک، سوسپانسیون ۲۰٪ (w/v) تهیه شد. همین کار برای نمونه‌های مربوط به طحال و ریه نیز انجام گرفت. سوسپانسیون‌ها به مدت ۲-۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ x g سانتریفیوژ شدند و سپس مایعات رویی حاصل از آن برداشت شدند. به داخل حفره آلانتوئیک هرکدام از پنج تخم‌مرغ جنین‌دار SPF ۹ روزه، ۰/۲mL از این مایع تزریق و تخم‌مرغ‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۷-۴ روز انکوبه شدند. تخم مرغ ها روزانه نوردهی و بررسی می‌شدند. تلفات جنینی مربوط به ۲۴ ساعت نخست بعد از تزریق، به عنوان تلفات مکانیکی تلقی و حذف شدند. مابقی جنین‌های مرده یا در حال مرگ به مدت ۲۴ ساعت در یخچال ۸°C-۲ نگهداری و سپس مایع آلانتوئیک آنها جمع‌آوری شد(۳). حضور جدایه‌های NDV در مایع آلانتوئیک با استفاده از آزمایش‌های HA و HI به تایید رسید و از میان آن‌ها، ۱۲ جدایه برای انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند.

برای بالابردن دقت کار و رسیدن به دودمانی (Clone) که از نظر ژنتیکی خالص و عاری از آلودگی‌های دیگر باشد، عمل Dilution Limiting بر روی جدایه‌ها انجام گرفت؛ بدین معنی که حجمی از محلول حاوی ویروس تهیه شد که وقتی به یک تخم‌مرغ تلقیح می‌شود به احتمال بسیار زیاد دارای تنها یک ذره ویروسی باشد (۶،۱۵،۱۸). به این منظور، ابتدا برای هریک از ویروس‌های تحت آزمایش میزان EID50/mL محاسبه و سپس ویروس به همان اندازه رقیق شد. به عنوان مثال اگر میزان EID50/mL، $10^{7/7}$ بود، از ویروس ۴ رقت (۱/ ۵۰،۰۰۰،۰۰۰) 10^{-7}، $10^{-7/7}$، $10^{-8/4}$ و $10^{-9/1}$ تهیه شد. هریک از رقت‌ها با ۵ تکرار داخل کیسه آلانتوئیک تخم مرغ‌های جنین‌دار ۱۰-۹ روزه SPF تلقیح شد. مایع آلانتوئیک حاوی NDV در تلفات جنینی مربوط به بیشترین رقت ویروس به عنوان نمونه‌ای که از تکثیر یک ذره ویروسی حاصل شده و حاوی یک دودمان (کلون) از جدایه مربوط است، برای اجرای مراحل بعدی تحقیق، برداشت شد (۶). ویروس‌های حاصله در تخم مرغ جنین‌دار تکثیر و شاخص‌های بیماریزایی (MDT، ICPI و IVPI) ویروس‌های کلون شده برای هریک از این جدایه‌ها تعیین شدند (۳،۱۳).

تعیین متوسط زمان مرگ جنین (MDT): رقتهای ۷، ۸ و ۹ با مضرب ۱:۱۰ از مایع آلانتوئیک تازه عفونی تهیه شد و به مقدار ۰/۱mL در ۲ نوبت صبح و بعد از ظهر (با حدود ۹ ساعت فاصله زمانی)، به هر کدام یک از تخم‌مرغ‌های SPF جنین‌دار ۱۰-۹ روزه تلقیح شدند. برای هر رقت درهر نوبت، ۵ تکرار لحاظ شد. تمام تخم مرغ ها در دو نوبت صبح و بعد از ظهر با همان فاصله زمانی تزریق مورد بازبینی قرار گرفتند. میانگین زمانی که در آن جنین‌ها در بالاترین رقت تلف شدند (با گزارش صد درصد مرگ و میر)، به عنوان متوسط زمان مرگ جنین محاسبه شد (جدول ۱) (۶،۱۳).

تعیین شاخص بیماریزایی داخل مغزی (ICPI): ویروس مشتق از مایع آلانتوئیک عفونی تازه با تیتر هماگلوتیناسیون بیش از 2^4 (۱:۱۶)، به نسبت ۱:۱۰ رقیق شد و سپس ۰/۰۵mL آن به مغز هر یک از ۱۰ جوجه یک روزه SPF تلقیح شد. پرنده‌ها به مدت ۸ روز هر ۲۴ ساعت یک بار مورد بررسی قرار گرفتند و بدین شرح امتیازدهی شدند: صفر، اگر طبیعی بودند؛ ۱، اگر بیمار بودند و ۲، اگر تلف شده بودند. شاخص عبارت بود از میانگین امتیاز به ازای هر پرنده نسبت به هر بار مشاهده در یک دوره هشت روزه. ICPI در حادترین ویروس‌ها نزدیک به ۲ است ولی ویروس‌های لنتوژن مقادیری نزدیک صفر نشان می‌دهند (جدول ۱) (۶،۱۳).

تعیین شاخص بیماریزایی داخل وریدی (IVPI): ویروس مشتق از مایع آلانتوئیک عفونی تازه با تیتر هماگلوتیناسیون بیش از 2^4 (۱:۱۶) به نسبت ۱:۱۰ رقیق شد سپس ۰/۱ mL آن از راه وریدی به هر یک از ۱۰ جوجه مرغ ۶ هفته SPF تلقیح شد. پرنده‌ها به مدت ۱۰ روز هر ۲۴ ساعت یک بار معاینه و به شرح ذیل امتیازدهی شدند: صفر، اگر پرنده طبیعی بود؛ ۱، اگر بیمار بود؛ ۲، اگر فلج بود و ۳، اگر تلف شده بود. شاخص برابر بود با میانگین امتیاز به ازای هر پرنده نسبت به هر بار مشاهده در یک دوره ۱۰ روزه. IVPI در حادترین ویروسها نزدیک به ۳ و در ویروس‌های لنتوژن و اکثر مزوژن‌ها برابر صفر است (جدول ۱) (۶).

نتایج

از نمونه‌های مورد آزمایش، تعداد ۱۲ جدایه NDV حاصل شد. از هرکدام از جدایه‌ها کلونی به دست آمد که تحت آزمایش‌های تعیین ضرایب بیماریزایی قرار گرفت.

دامنه شاخص‌های MDT از کمترین مقدار ۴۱/۶ ساعت متعلق به Cloned NR۱۹ تا بیشترین مقدار ۶۰ ساعت مربوط به Cloned NR۳۶ بود. مقادیر شاخص ICPI از ۱/۹۱ برای Cloned NR۱۴ تا ۱/۷۶ برای Cloned NR۲ متفاوت بود. در مورد میزان ضریب IVPI نیز بیشترین، ۲/۸۸ مربوط به Cloned NR۱۴ و کمترین، ۲/۶۸ متعلق به Cloned NR۹ بود. آزمایش‌های تعیین ضرایب بیماریزایی حکایت از آن داشت که تمام جدایه‌ها به پاتوتیپ ولوژنیک تعلق دارند (جدول ۲).

ویژگی‌های دو سویه Herts۳۳/۵۶ و Texas GB به عنوان دو سویه حاد استاندارد، جهت مقایسه با جدایه‌های ایرانی آورده شده‌اند (۴).

بحث

در این مطالعه نشان داده شد که تمام ویروس های بیماری نیوکاسل که از استان‌های مختلف ایران جداشده بودند، پس از کلون شدن و تعیین شاخص‌های بیماریزایی (MDT، ICPI و IVPI) در پاتوتیپ ولوژن جای

جدول ۱ـ معیار تفریق جدایه‌های نیوکاسل بر اساس MDT، ICPI و IVPI(۴).

	غیربیماریزای روده‌ای	لنتوژن	مزوژن	ولوژن
MDT(ساعت)	۹۰<	۹۰<	۶۰-۹۰	۶۰>
ICPI	۰-۰/۲	۰/۲-۰/۵	۱-۱/۵	۱/۵-۲
IVPI	۰	۰	۰-۰/۵	۲-۳

دارند و بنابراین ویروس‌های در حال چرخش، به عنوان ویروس‌های حاد قادرند برای صنعت مرغداری کشور خطرساز باشند.

بیماری نیوکاسل نه تنها در ایران بلکه در تمام جهان، از گذشته تا حال در زمره زیان بارترین بیماری‌های پرندگان و از جمله نگرانی‌های صنعت پرورش طیور بوده است. برای کنترل این بیماری در مناطق اندمیک، واکسیناسیون ابزار مهمی به‌شمار می‌آید. علی‌رغم حضور پاتوتیپ‌های مختلف در بین ویروس‌های نیوکاسل و با وجود تفاوت‌های آنتی‌ژنیکی اندک میان آنها، همگی در یک گروه سرمی به نام سروتیپ یک پارامیکسوویروس طیور (APMV-1) جای می‌گیرند؛ و از آنجا که تمام این ویروس‌ها متعلق به یک سروتیپ هستند، می‌توان از سویه‌های کم حدت به‌عنوان واکسن علیه سویه‌های پرحدت استفاده کرد (۷). در عین حال واکسیناسیون تنها در مقابل شکل بالینی بیماری و مرگ و میر حاصله از پرنده محافظت می‌کند و از تکثیر، انتشار و انتقال ویروس جلوگیری نمی‌کند و بنابر این در پیشگیری از همه‌گیری های بیماری نقش چندانی ندارد (۱۷). از این رو با وجود برنامه‌های متعدد واکسیناسیون و استفاده از واکسن‌های مربوط به پاتوتیپ‌های مختلف، بروز و شیوع بیماری هنوز درمیان گله‌های طیور مناطق مختلف دیده می‌شود. در کنترل همه‌گیری‌ها معمولاً تشخیص NDV به تنهایی کفایت نمی‌کند؛ بلکه لازم است تا پاتوتیپ ویروس و حتی گاه میزان بیماریزایی آن هم ارزیابی شود (۵،۱۳). تعیین پاتوتیپ ویروس‌های نیوکاسل بر مبنای حدت آن‌ها انجام می‌گیرد، نه تفاوت‌های آنتی‌ژنیکی آن‌ها؛ و برای آن دو راه وجود دارد: اول، شیوه‌های مرسوم شامل تعیین شاخص‌های MDT، ICPI و IVPI که هزینه و زمان زیادی را می‌طلبد و دوم، تکنیک‌های مولکولی که با سرعت بیشتری قابل انجام است (۱۱،۱۳). درسال ۱۹۵۵، پژوهشگران شاخص MDT را برای تعیین پاتوتیپ ویروس‌های بیماری نیوکاسل معرفی کردند. به دنبال آن، شاخص‌های دیگری از جمله ICPI و IVPI نیز به معیارهای طبقه‌بندی پاتوتیپ‌های این ویروس‌ها افزوده شدند (۱،۳،۱۳).

در تشخیص بیماری نیوکاسل با کمک آزمایش‌های مولکولی که در آنها بر مبنای تعیین آمینواسیدهای بازی چندگانه در ناحیه شکافت (Cleavage) پروتئین F0 عمل می‌شود، می‌توان حضور ویروس‌های حاد یا بالقوه حاد را تایید کرد؛ اما عدم شناسایی ویروس یا تشخیص NDV بدون آمینواسیدهای بازی چندگانه در ناحیه شکافت (Cleavage) پروتئین F0 نمی‌تواند دلیلی بر عدم حضور ویروس حاد باشد. تطابق نداشتن پرایمر (آغازگر)، یا همراه بودن ویروس‌های حاد و غیرحاد از جمله دلایلی به شمار می‌آیند که نشان می‌دهند جداسازی ویروس و روش‌های تعیین پاتوتیپ روی موجود زنده (in vivo)، هنوز مورد نیاز و ارزشمند هستند. ارزیابی ویروس‌هایی که در سال ۱۹۹۰ در ایرلند و در طی همه‌گیری‌های بیماری نیوکاسل در استرالیا در سال ۱۹۹۸ جدا شدند، شواهد قوی دال بر این نکته هستند که ویروس‌های حاد ممکن است نتاج ویروس‌های والدی باشند که خود کم‌حدت محسوب می‌شوند. همچنین به طور تجربی و از طریق پاساژ ویروس کم‌حدت در جوجه، می‌توان حدت آن را افزایش داد و ویروس حاد NDV را بدست آورد (۱۳).

در خصوص شاخص‌های بیماریزایی ویروس‌های نیوکاسل در ایران مطالعات اندکی انجام شده است. دراین میان می‌توان به مطالعه Kianizadeh و همکاران در سال ۱۳۷۸ اشاره کرد که شاخص‌های ۱۲ جدایه NDV را که در سال‌های ۷۸-۱۳۷۴ از طیور صنعتی و بومی ایران (۷ مورد از استان خراسان) جدا شده بودند، بررسی کردند (۱۲).

در مطالعه ما از تعداد زیادی از گله‌های مشکوک به بیماری نیوکاسل مربوط به سال‌های اخیر و متعلق به استان‌های مختلف کشور نمونه‌برداری صورت گرفت. در مشاهده بالینی پرندگان مبتلا واگیری سریع، مرگ و میر بالا، افسردگی، مشکلات تنفسی، آماس بافت‌های صورت و اطراف چشم، پیچش گردن، فلجی بال و پا، کاهش میزان و کیفیت پوسته تخم‌مرغ را نشان می‌دادند. در کالبدگشایی نیز پرخونی و ترشحات در نای، خونریزی در راس غدد پیش‌معده، روده باریک، فولیکول‌های لنفاوی در محل دوشاخه شدن روده‌کور دیده می‌شد.

پس از جداسازی ویروس‌ها، از آنجا که تعداد زیادی از نمونه‌ها به گله‌های واکسینه تعلق داشتند و ممکن بود حضور ویروس واکسن در تعیین پاتوتیپ ویروس فیلد ایجاد اختلال کند، لذا جهت بالابردن دقت کار و رسیدن به دودمانی (Clone) که از نظر ژنتیکی خالص و عاری از آلودگی‌های دیگر باشد، عمل Limiting Dilution بر روی جدایه‌ها انجام گرفت؛ به این صورت که رقتی از محلول حاوی ویروس در واحد حجم تهیه شد تا زمانی که به یک تخم‌مرغ تلقیح می‌شود به احتمال بسیار زیاد دارای تنها یک ذره ویروسی باشد (۶). این کار تا زمان مطالعه فوق بر روی جدایه‌های ایران انجام نگرفته بود.

جدایه‌هایی که در این مطالعه بررسی شدند، شاخص‌های MDT بین ۴۱/۶ تا ۶۰ ساعت، ICPI بین ۱/۷۶ تا ۱/۹۱، و IVPI بین ۲/۶۸ تا ۲/۸۸ داشتند که بر این اساس همگی در پاتوتیپ ولوژنیک قرار می‌گیرند. یافته‌های ما با بررسی Kianizadeh و همکاران در سال ۱۹۹۹ که ویروس‌های تحت مطالعه نیز در گروه ولوژن جای داشتند همخوانی داشت (۱۲).

گهگاه در بررسی شاخص‌های بیماریزایی ویروس‌های نیوکاسل، ناهمخوانی‌هایی دیده می‌شود. برخی از جدایه‌های کبوتری ICPI بین ۱/۲ تا ۱/۵ و IVPI در محدوده ۱/۳-۱ نشان می‌دهند که بر این اساس

جدول ۲ـ نتایج آزمایشات تعیین ضرایب بیماریزایی جدایه‌های نیوکاسل. MDT کمتر از ۶۰ ساعت، ICPI بیش از ۱/۵ امتیاز و IVPI بالاتر از ۲ امتیاز ویژگی‌های ویروس‌های ولوژنیک را نشان می‌دهند.

شماره	جدایه	استان محل جداسازی	MDT	ICPI	IVPI
۱	Cloned NR 2	آذربایجان غربی	۵۲/۸	۱/۷۶	۲/۷۳
۲	Cloned NR 9	آذربایجان شرقی	۴۸	۱/۸۷	۲/۶۸
۳	Cloned NR 10	آذربایجان شرقی	۴۹/۶	۱/۷۹	
۴	Cloned NR 13	اردبیل	۵۴/۴	۱/۸۶	۲/۷۱
۵	Cloned NR 14	اصفهان	۵۲/۸	۱/۹۱	۲/۸۸
۶	Cloned NR 19	تهران	۴۱/۶	۱/۸۸	۲/۸
۷	Cloned NR 24	خراسان	۴۸/۸	۱/۸۵	۲/۷۳
۸	Cloned NR 35	فارس	۵۰/۴	۱/۸۶	
۹	Cloned NR 36	قزوین	۶۰		
۱۰	Cloned NR 41	قم	۴۹/۳۵	۱/۸۱	
۱۱	Cloned NR 45	قم	۴۶/۴	۱/۸۶	۲/۷۸
۱۲	Cloned NR 46	کردستان	۵۱/۲	۱/۸۶	
۱۳	Texas GB	-	۵۵	۱/۷۵	۲/۷
۱۴	Herts 33/56	-	۴۸	۲	۲/۷

دست‌کم در گروه مزوژن جای می‌گیرند، اما MDT ۹۸ ساعت دارند که آن‌ها را به پاتوتیپ لنتوژن متعلق می‌کند(۱۴). به هر حال این هم از جمله موانعی است که بر سر راه آزمایش‌های مرسوم in vivo وجود دارد و تفسیر نتایج را تاحدودی دشوار می‌سازد. برای رفع این مشکل، OIE تعیین کرده است که بیماریزایی هر جدایه تازه را بر مبنای شاخص ICPI جدایه بسنجند (۱۳). در بررسی کیانی‌زاده و همکاران، ۲ جدایه از لحاظ MDT در گروه مزوژن و از نظر سایر شاخص‌ها در پاتوتیپ ولوژن جای داشتند (۱۲)؛ اما در این مطالعه چنین ناهمخوانی‌هایی دیده نشدند. دلیل آن شاید این بود که قبل از تعیین شاخص‌ها، ویروس‌ها کلون شده بودند که این موضوع بررسی بیشتری را می‌طلبد.

سویه Herts ۳۳/۵۶ که از سال ۱۹۳۳ در آزمایشگاه Weybridge نگهداری می‌شود، در میان ویروس‌های حاد نیوکاسل به عنوان سویه‌ای شناخته می‌شود که بیشترین ضریب ICPI را دارد (۴،۹). از آنجا که این ضریب مبنای استاندارد تعیین حدت ویروس‌های NDV است؛ در مقایسه میان ICPI مربوط به جدایه‌های ایرانی و سویه Herts۳۳/۵۶ مشخص می‌شود در مزارع مرغداری صنعتی کشور نیز جدایه‌هایی بسیار حاد (مانند Cloned NR14) یافت می‌شوند که از لحاظ حدت نزدیک به آن و بالاتر از سویه‌های حاد دیگری هم‌چون Texas GB قرار دارند.

در ایران در بسیاری موارد، ویروس‌های نیوکاسل همچنان از موارد بیمارهای واگیردار حاد و سندرم‌های تنفسی جدا می‌شوند و باید مشخص شود که آیا این‌ها از گروه ویروس‌های حاد هستند و یا غیر حاد یا واکسینال. از آنجا که روش‌های مرسوم تعیین شاخص‌های بیماریزایی پرهزینه و زمان‌بر هستند و در بسیاری از آزمایشگاه‌ها قابلیت اجرا ندارند، لذا ضروری است با استفاده از آزمایش‌های مولکولی همچون RT-PCR ویروس‌های NDV شناسایی و تعیین حدت شوند تا در اسرع وقت بتوان به تشخیص رسید و فرصت اقدامات کنترلی از دست نرود.

در این مطالعه دو کار مهم صورت گرفته است. اول، کلون کردن ویروس قبل از تعیین شاخص‌ها، و دوم، تعیین شاخص‌های بیماریزایی بر اساس مقررات و ضوابط مدون که قرار است با روش‌های مولکولی جدید و نوین نیز مقایسه شود. در پایان پیشنهاد می‌شود این قبیل مطالعات بر روی جدایه‌های NDV متعلق به تمام استان‌های کشور انجام پذیرد و نسبت به گسترش کاربرد روش‌های مولکولی و مقایسه نتایج حاصل از آن با روش‌های قراردادی که به عنوان تست‌های طلایی مطرح هستند، اقدام شود.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های این مطالعه از محل اعتبارات طرح های شماره ۸۸۰۱۷-۱۸-۱۸-۲ موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و شماره ۷۵۰۸۰۰۷/۶/۷ معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تامین و پرداخت شده‌است. بدین وسیله از معاونت آموزش و تحقیقات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، و معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از همکاری‌های صمیمانه سرکار خانم نادیه شیری و آقایان محسن محمودزاده و محمدحسن فیروزجانی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Aldous, E.W., Alexander, D.J. (2001) Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). Avian Pathol. 30: 117- 128.
2. Alexander, D.J., Manvell, R.J., Parsons, G. (2006) Newcastle disease virus (strain Herts 33/56) in tissues and organs of chickens infected experimentally. Avian Pathol. 35: 99-101.
3. Alexander, D.J. (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. (eds.). (11th ed.) Iowa State Press. Ames, Iowa, USA. p. 75-115.
4. Alexander, D.J. (1998) Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.M., Pearson, J.E., Reed, W.M. (eds.). (4th ed.) American Association of Avian Pathologists. Pennsylvania, USA. p. 156-163.
5. Alexander, D.J. (1995) The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. J. Comp. Path. 112: 105-126.
6. Allan, W.H., Lancaster, J.E., Toth, B. (1978) Newcastle Disease Vaccines-Their Production and Use. FAO Animal Production and Health Series No. 10. Rome, Italy. p. 74-79.
7. Al-Garib, S.O., Gielkens, A.L.J., Gruys, E., Koch, G. (2003) Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination; World's Poult. Sci. J. 59: 185-200.
8. Baratchi, S., Ghorashi, S.A., Hosseini, M., Pourbakhsh, S.A. (2006) Differentiation of virulent and non-virulent NDV isolates using RT-PCR. Iranian. J. Biotech. 4: 61-63.
9. Czegliidi, A., Wehmann E., Lomniczi, B. (2003) On the origins and relationships of Newcastle disease virus vaccine strains Hertfordshire and Mukteswar and virulent strain Herts'33. Avian Pathol. 32: 271-276.
10. de Leeuw, O., Peeters, B.(1999) Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily paramyxovirinae. J. Gen. Virol. 80: 131-136.
11. Kant, A., Koch, G., van Roozelaar, D.J., Balk, F., Huurne, A. (1997) Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. Avian Pathol. 26: 837-849.
12. Kianizadeh, M., Ideris, A., Shahrabadi, M.S., Kargar, R., Pourbakhsh, S.A., Omar, A.R., Yusoff, K. (1999) Biological and molecular characterization of NDV isolated from Iran. Arch. Razi Inst. 50: 1-9.
13. Office International des Epizooties. (2008) Newcastle disease, Chapter 2.3.14. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties, Paris, France. p. 576-589.
14. Pearson, J.E., Senne, D.A., Alexander, D.J., Taylor, W.D., Peterson, L.A., Russel, P.H.(1987) Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons. Avian Dis. 31:105-111.
15. Perdue, M.L., Wainright, P., Palmieri, S., Brugh, M. (1989) In ovo competition between distinct virus populations in an avian influenza isolate. Avian Dis. 33:695-706.
16. Seal, B.S., King, D.J., Bennett, J.D. (1995) Characterization 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. 33: 2624-2630.
17. van Boven, M., Bouma, A., Fabri, T.H.F., Katsma, E., Hartog, L., Koch, G. (2008) Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. Avian Pathol. 37: 1-5.
18. Wang, C.W., Wang, C.H. (2003) Experimental selection of virus derivatives with variations in virulence from a single low-pathogenicity H6N1 avian influenza virus field isolate. Avian Dis. 47: 1416-1422.

Pathogenicity indices of Newcastle disease viruses isolated from Iranian poultry flocks in Iran

Abdoshah, M.[1], Pourbakhsh, S. A.[2*], Peighambari, S. M.[1], Shojadoost, B.[1], Momayez, R.[2], Mojahedi, Z.[3]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[2]*Department of Poultry Diseases, Razi Vaccine & Serum Research Institute, karaj- Iran.*
[3]*Department of Quality Control, Razi Vaccine & Serum Research Institute, karaj- Iran.*

(Received 8 January 2012 , Accepted 18 March 2012)

Abstract:

BACKGROUND: Newcastle disease (ND) is caused by serotype I of avian paramyxoviruses. The ND virus (NDV) strains are conveniently grouped as velogenic, mesogenic, lentogenic, and nonpathogenic-intestinal pathotypes. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to determine the pathogenicity indices of the isolated NDVs from poultry flocks in Iran. **METHODS:** Samples were provided from poultry flocks in different provinces of Iran and prepared for NDV isolation. From many isolated NDVs, 12 isolates belonged to 10 provinces with highly populated poultry farms which were selected for this study. A clone for each of these virus isolates was generated using limiting dilution procedure. Then, the mean death time (MDT), intracerebral pathogenicity index (ICPI), and intravenous pathogenicity index (IVPI) were determined for each virus clone and compared with those of standard virulent strains such as Hertz 33.56 and Texas GB. **RESULTS:** The results showed that the pathogenicity indices of the NDVs in the present study ranged from 41.6 - 60 hr for MDT, 1.76 - 1.91 for ICPI, and 2.68 - 2.88 for IVPI indicate which the velogenic type of our viruses. **CONCLUSIONS:** The findings of this study suggested that the very virulent NDVs currently circulating in Iranian poultry flocks are close to and even more virulent than standard virulent NDVs. Isolation, identification, pathotype determination, and molecular characteriz-ation of Iranian NDVs may help authorities to make right decisions to reduce the risks posing the Iranian poultry industry.

Key words: Newcastle disease virus, pathogenicity indices, pathotype, poultry, Iran.

Figure Legends and Tabel Captions

Table 1. Criteria for differentiation of Newcastle disease isolates based on MDT, ICPI, and IVPI (4).

Table 2. Results of pathogenicity indices determination of Newcastle disease isolates. MDT lower than 60 hr, ICPI higher than 1.5 scores, and IVPI higher than 2 scores demonstrate the characteristics of velogenic viruses.

***Corresponding author's email: a.pourbakhsh@rvsri.ir, Tel: 026-34552005, Fax: 026-34552194**