Archive of SID

توانایی حفاظت واکسن بیماری نیوکاسل (B_1) در مقابل سویه غالب ویروس حاد نیوکاسل جداشده در استان خوزستان

منصور میاحی[۱*]، مسعودرضا صیفی‌آباد شاپوری[۲]، بابک محمدیان قلعه جوقی[۳]

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. دانش‌آموخته دکترای تخصصی بهداشت و بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران.

دریافت: ۱۴ دی‌ماه ۹۵ **پذیرش:** ۱۷ آبان‌ماه ۹۶

چکیده

به منظور ارزیابی حفاظت ایجاد شده به وسیله واکسن نیوکاسل (B_1) در برابر سویه غالب ویروس حاد نیوکاسل جدا شده از ۵۰ مزرعه پرورش جوجه‌ی گوشتی استان خوزستان، به طور تصادفی از مزارع مشکوک به بیماری نیوکاسل ۲۰ قطعه جوجه انتخاب گردید و از بافت‌های نای، ریه، کبد، کلیه، طحال، پیش‌معده، لوزه‌های سکومی و مغز هر پرنده نمونه گرفته شد. از هشت جدایه ویروس نیوکاسل، یک جدایه به ژنوتیپ II و هفت جدایه به ژنوتیپ VII تعلق داشتند. به منظور تعیین میزان حفاظت واکسن B_1 در برابر جدایه حاد متعلق به ژنوتیپ VII، ۱۶۰ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه سویه رأس ۳۰۸ به چهار گروه مساوی تقسیم و در اتاق‌های مجزا نگهداری شدند. جوجه‌های گروه‌های ۱ و ۳ در سن هشت و ۱۸ روزگی (دو نوبت) با واکسن B_1 ساخت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به روش قطره چشمی واکسینه شدند، جوجه‌های گروه‌های ۲ و ۴ واکسینه نشدند. در ۳۲ روزگی جوجه‌های گروه‌های ۲ و ۳ با ویروس حاد نیوکاسل ژنوتیپ VII جدا شده از مزارع استان خوزستان با دوز 10^5 EID_{50} به روش قطره چشمی چالش داده شدند. برای ارزیابی پاسخ ایمنی از گروه‌ها در سنین ۱، ۱۴، ۲۵، ۳۲، ۳۷ و ۴۲ روزگی خون‌گیری به عمل آمد و میزان پادتن ضد ویروس نیوکاسل با آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) اندازه‌گیری شد. نتیجه گرفته شد ویروس بسیار حاد نیوکاسل در مزارع پرورش طیور استان خوزستان در گردش است و دو نوبت واکسیناسیون در گله‌های گوشتی با واکسن B_1 احتمالاً می‌تواند محافظت کافی در برابر ویروس حاد بیماری نیوکاسل ایجاد کند.

واژه‌های کلیدی: حفاظت، بیماری نیوکاسل، جوجه گوشتی، ژنوتیپ، واکسن B_1، RT-PCR.

مقدمه

بیماری نیوکاسل یک بیماری عفونی، به شدت واگیردار و بیماری‌زا در پرندگان است که توسط ویروس متعلق به گروه سرمی پارامیکسوویروس تیپ یک پرندگان (APMV-1) ایجاد می‌شود و ژنوتیپ I تا X دارد (۱۰). از نظراقتصادی بیماری نیوکاسل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی طیور است. ثابت شده تاکنون بیش از ۲۳۶ گونه از پرندگان به ویروس بیماری نیوکاسل مبتلا شده‌اند و علاوه بر ماکیان سایر پرندگان مانند کبوتر، طوطیان، طاووس، پرندگان آبزی وحشی، و پرندگان ساحل‌زی غالباً به ویروس بیماری نیوکاسل مبتلا می‌شوند(۷). کشورهای آلوده به بیماری نیوکاسل طی سال‌های ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۹ از بالاترین به ترتیب ایران، آفریقای جنوبی، چین، ویتنام، کلمبیا، رومانی، کره جنوبی، کویت و سوئد هستند. سالیانه به طور متوسط ۵۶ کشور وقوع بیماری نیوکاسل را از سال ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۹ گزارش کردند و فراوانی بیماری نیوکاسل بعد از بیماری هاری گزارش شده است. ۷۷ کشور از سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۰ وقوع

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: m_mayahi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری نیوکاسل در پرندگان اهلی را گزارش کردند، در سال‌های ۲۰۱۳، ۲۰۱۴ و ۲۰۱۵ به ترتیب در ۶۸، ۶۱ و ۵۶ کشور بیماری نیوکاسل گزارش شده است (۳ و ۱۲). در کشورهای توسعه یافته نه تنها شیوع vND موجب خسارت اقتصادی سنگینی می‌شود، بلکه روش‌های کنترل بیماری مانند واکسیناسیون هم هزینه‌های زیادی را به صنعت طیور تحمیل می‌کند. در بسیاری از کشورهای در حال توسعه vND به صورت آندمیک وجود دارد، بنابراین یک عامل محدود کننده مهم در توسعه صنعت طیور است. با توجه به ماهیت آندمیک بیماری نیوکاسل در طیور بومی و صنعتی بسیاری از کشورها، واکسیناسیون به همراه اجرای امنیت زیستی و پیشگیری از بیماری‌های تضعیف‌کننده سیستم ایمنی می‌تواند درکنترل بیماری مؤثر باشد (۲، ۱۳ و ۲۰) ؛ اما گزارش‌هایی وجود دارد که واکسن‌های تجاری موجود ضد بیماری نیوکاسل به طور مطلوب عمل نمی‌کنند (۲۳) و به نظر می‌رسد بر سر میزان حفاظت واکسن‌های تجاری موجود به خصوص در برابر ویروس‌های نیوکاسل نوظهور تفاهم وجود ندارد (۲۰). واکسن‌های غیرفعال میزان پادتن هومورال بالاتری ایجاد می‌کنند ولی پاسخ ایمنی سلولی قوی ایجاد نمی‌کنند و در پرندگان واکسینه شده با واکسن غیرفعال هنگام چالش با ویروس حاد، میزان بالاتری از ویروس حاد را در مقایسه با پرندگان واکسینه شده با واکسن‌های زنده در محیط دفع می‌کنند (۹ و ۱۷). بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف ویروس نیوکاسل مرتبط با ناحیه شکست پروتئین F آن‌هاست. 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 شبه تریپسین امکان شکستن دارند. تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک ژن پروتئین F مشخص کرده است که در جایگاه شکست بین اسیدهای آمینه ویروس‌های حاد و غیر حاد تفاوت وجود دارد (۲۱). این پژوهش به منظور بررسی میزان حفاظت واکسن نیوکاسل (B_1) در برابر سویه حاد نیوکاسل جدا شده از گله‌های گوشتی استان خوزستان انجام شد.

مواد و روش کار

از مزارع ماکیان گوشتی با تلفات بالا در سطح استان خوزستان که بر اساس یافته‌های بالینی، تلفات و نشانه‌های کالبدگشایی مشکوک به بیماری نیوکاسل بودند ۵۰ مزرعه انتخاب و از هر مزرعه ۲۰ پرنده انتخاب شد و از بافت‌های مغز، نای، ریه، کبد، کلیه، پیش معده، لوزه‌های سکومی و طحال هر پرنده به طور جداگانه نمونه گرفته شد و نمونه‌ها تا هنگام آزمایش در فریزر منهای ۷۰ نگهداری شدند (۱۶ و ۲۲).

در آزمایشگاه بافت‌های یکسان هر مزرعه با هم مخلوط شدند و پس از آماده‌سازی نمونه‌ها در آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین و آمفوتریسین کافی به نسبت ۲۰ درصد وزنی قرار گرفتند (۵)؛ سپس سوسپانسیون بافتی به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰g سانتریفیوژ شد و به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر از مایع رویی به حفره آلانتوئیک ۴ تخم‌مرغ جنین‌دار ۹ تا ۱۱ روزه تلقیح گردید، سپس تخم‌مرغ‌ها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵ درصد منتقل و به طور روزانه بررسی شدند. تلفات ۲۴ ساعت اول حذف گردید، لیکن پس از آن تلفات تا ۷ روز پس از تلقیح به یخچال منتقل شدند. مایع آلانتوئیک در شرایط سترون و در کنار شعله جمع‌آوری گردید و به وسیله گلبول‌های قرمز ماکیان با غلظت ۵ درصد تحت آزمون هماگلوتیناسیون قرار گرفتند (۵). در مجموع ۱۴ نمونه از نظر فعالیت هماگلوتیناسیون مثبت بودند که همگی برای انجام آزمایش مولکولی انتخاب گردیدند.

تمامی ۱۴ نمونه که فعالیت هماگلوتیناسیون داشتند به وسیله آزمون RT-PCR بررسی شدند. توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر به شرح زیر

www.SID.ir

Archive of SID

است:

5 - ATGGGC(C/T)CCAGA(C/T)CTTCTAC - 3

5- CTGCCACTGCTAGTTGTGATAATCC – 3

لازم به ذکر است که قطعه تکثیر شده به طول ۵۳۵ جفت باز است که اختصاص به آنتی‌ژن فیوژن دارد (۶ و ۱۱).

از کیت استخراج RNA شرکت سیناژن و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، مراحل استخراج به انجام رسید. به طور خلاصه ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۱ میلی‌لیتر بافر لیزکننده مخلوط شده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد و پس از آماده‌سازی، با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ و پس از سانتریفیوژ فاز آبی استحصال گردید و به میزان هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد و سرانجام پس از آماده‌سازی با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید، سپس مایع رویی دور ریخته شد و مایع باقی‌مانده با یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد مخلوط گردید و پس از آن با دور ۷۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و در پایان ماده سفید رنگ به دست آمده پس از طی مرحله آماده‌سازی با ۳۰ میکرولیتر بافر مخلوط گردید و تا زمان مصرف در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

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 شد (کیت سنتز cDNA مربوط به شرکت BIONEER کره جنوبی بود)، سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر تحت برنامه‌ای به شرح ذیل به انجام رسید:

واسرشت ابتدایی به مدت ۲ دقیقه و در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت و سپس در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت به مدت یک دقیقه و دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال به مدت ۲ دقیقه و دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد، طویل شدن به مدت یک دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت طویل شدن پایانی به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد 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 تأثیر اختلاف پتانسیل الکتریکی معادل ۹۵ ولت قرار گرفتند.

در این پژوهش نیز از همان پرایمرهای استفاده شده در آزمون RT-PCR برای تعیین توالی ژنی به کار گرفته شد که به صورت خوانش دوطرفه با روش COMFORT READ توسط شرکت BIONEER (کشور کره جنوبی) انجام گرفت.

سکانس‌های نوکلئوتیدی ژن F جدایه‌های مورد بررسی با نرم‌افزار DNASIS MAX 3.0 ویرایش شد و توالی آمینواسیدی ناشی از آن به دست آمد (۴، ۸ و ۱۱).

برای تعیین عیار EID_{50} (Embryonic Infective Dose) جدایه‌های غالب ویروس نیوکاسل ده رقت متوالی به نسبت ۱/۱۰ از جدایه غالب ویروس نیوکاسل تهیه گردید و سپس ۵ تخم مرغ جنین‌دار ۱۱-۹ روزه (برای اطمینان از زنده بودن جنین‌ها حاصل گردید) به هر رقت اختصاص یافت. پس از استریل کردن محل مناسب تزریق با یک سوزن نوک‌تیز، پوسته تخم مرغ سوراخ شد و ۰/۲ میلی‌لیتر ویروس نیوکاسل به حفره آلانتوئیک هر تخم‌مرغ تلقیح گردید و در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) نگهداری و روزانه از نظر وضعیت حیاتی، جنین‌ها کنترل شدند. تلفات بعد از ۲۴ ساعت از زمان تزریق به یخچال منتقل شد و سپس مایع آلانتوئیک با وسایل استریل به ترتیب زیر جمع‌آوری گردید: پس از جدا کردن پوسته بالایی تخم‌مرغ با کمک قیچی استریل و برداشتن غشاهای داخلی و خارجی و غشای کوریوآلانتوئیک از روی جنین، مایع آلانتوئیک با کمک پیپت پاستور استریل به طور جداگانه جمع‌آوری شد و برای انجام آزمایش فعالیت هماگلوتیناسیون استفاده شدند. پس از ۶ روز،

www.SID.ir

Archive of SID

تخم‌مرغ‌های باقیمانده از دستگاه انکوباتور خارج شدند و EID_{50} آن‌ها با روش رید و مانش (Reed and Muench) محاسبه گردید.

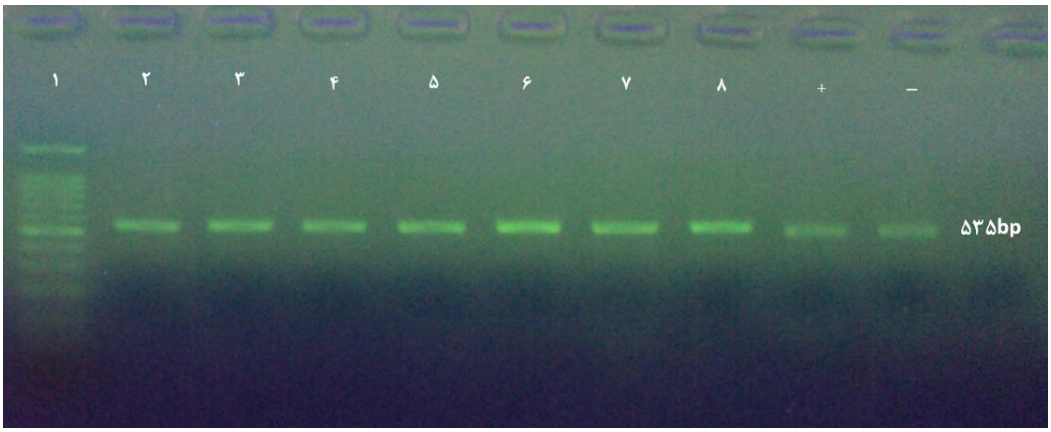
البته دوز ویروس استفاده شده برای چالش دادن جوجه‌ها در آزمایش 10^5 EID_{50} بود که به روش قطره چشمی استفاده شد (۱۸).

یکصد و شصت قطعه جوجه گوشتی یک روزه سویه راس به چهار گروه ۴۰ قطعه‌ای تقسیم شدند. در طول دوره پرورش شرایط نگهداری و تغذیه با رعایت دقیق اصول امنیت زیستی صورت گرفت. جوجه‌های گروه ۱ و ۳ در سنین هشت و هجده روزگی دو نوبت با یک دوز واکسن B_1 ساخت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به روش قطره چشمی واکسینه شدند (۱۵). در ۳۲ روزگی جوجه‌های گروه ۲ و ۳ با ویروس حاد ژنوتیپ غالب (ژنوتیپ VII) جدا شده با دوز 10^5 EID_{50} به روش قطره چشمی چالش شدند (۱۹). در سنین ۱، ۱۴، ۲۵، ۳۲، ۳۷ و ۴۲ روزگی (غیر از گروه ۲ به علت تلف شدن در سن ۴۲ روزگی) خون‌گیری به عمل آمد. برای ارزیابی عیار پادتن ضدویروس نیوکاسل از آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون به روش بتا با استفاده از ۴ واحد HA استفاده گردید (۱۸).

عیار پادتن تمامی گروه‌ها در سنین ۱۴، ۲۵، ۳۲، ۳۷ و ۴۲ روزگی) در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و حدود اطمینان $P\leq ۰/۰۵$، ۹۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

نتایج آزمون RT-PCR ۸ جدایه را با تشکیل باند ۵۳۵ جفت بازی مربوط به پروتئین فیوژن، به عنوان ویروس نیوکاسل شناسایی کرد (شکل ۱).



شکل ۱– در شکل بالا ۸ جدایه (به ترتیب از شماره ۱ تا ۸) با تشکیل باند ۵۳۵ جفت بازی مربوط به پروتئین فیوژن به عنوان ویروس نیوکاسل شناسایی شد (+) یک جدایه واکسن به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و (–) کنترل منفی است.

پس از توالی‌یابی نوکلئوتیدی ناحیه شکست پروتئین فیوژن ۸ جدایه ویروس نیوکاسل، توالی آمینواسیدی بررسی شد به طوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، ۷ جدایه ۳ اسید آمینه بازی (لیزین و آرژنین) در جایگاه شماره ۱۱۳ تا ۱۱۶ دارند همچنین این ۷ جدایه دارای اسید آمینه فنیل آلانین در جایگاه شماره ۱۱۷ هستند، لیکن یک جدایه (جدایه شماره ۲)، ۲ اسید آمینه بازی در جایگاه شماره ۱۱۳ تا ۱۱۶ داشت و البته این جدایه دارای اسید آمینه لوسین در جایگاه شماره ۱۱۷ بود.

آنالیز فیلوژنتیکی ۸ جدایه و تعدادی از سویه‌های دیگر ویروس نیوکاسل در نمودار ۱ نشان داده شده است. جدایه شماره ۲ قرابت کمی از نظر ژنتیکی با هفت جدایه دیگر و شباهت زیادی به سویه‌های واکسن دارد؛

همچنین جدایه‌های شماره ۳ و ۶ تفاوت ژنتیکی

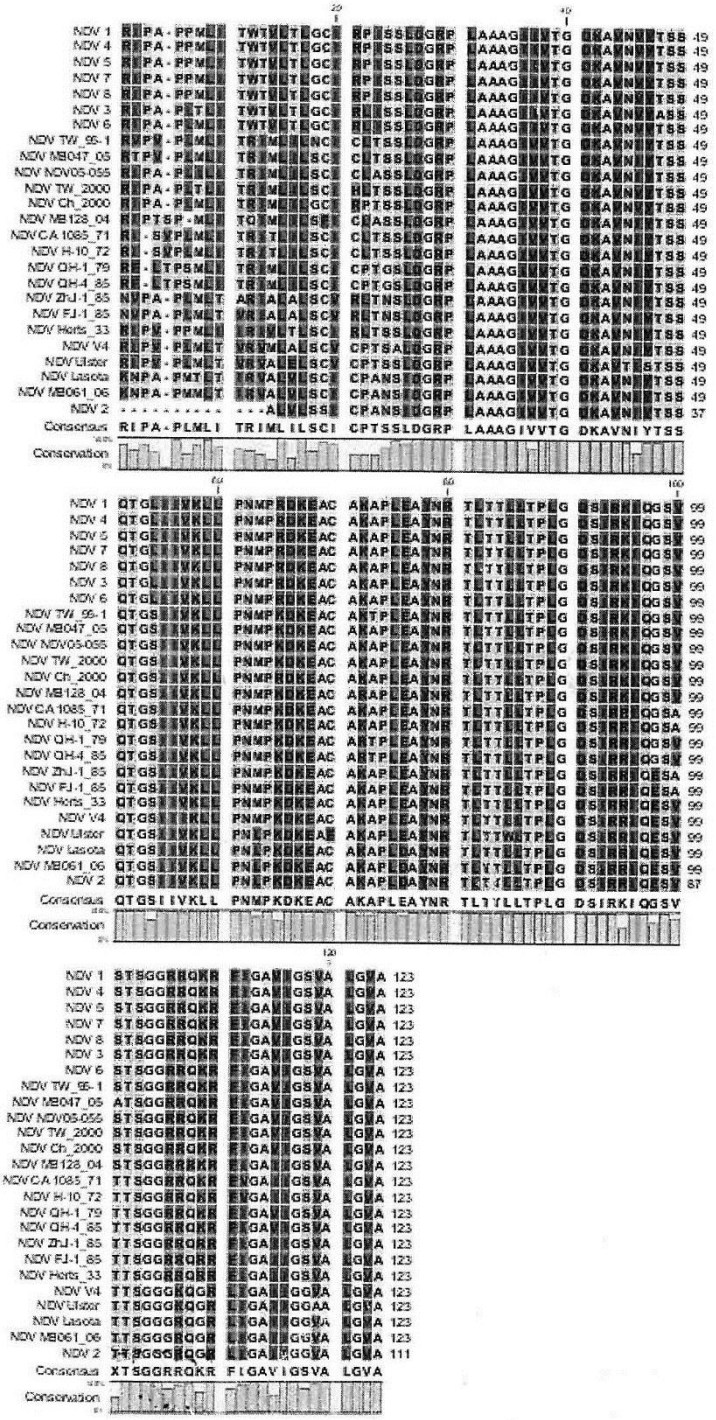
www.SID.ir

Archive of SID

اندکی با ۵ جدایه دیگر (۱، ۴، ۵، ۷ و ۸) دارند.

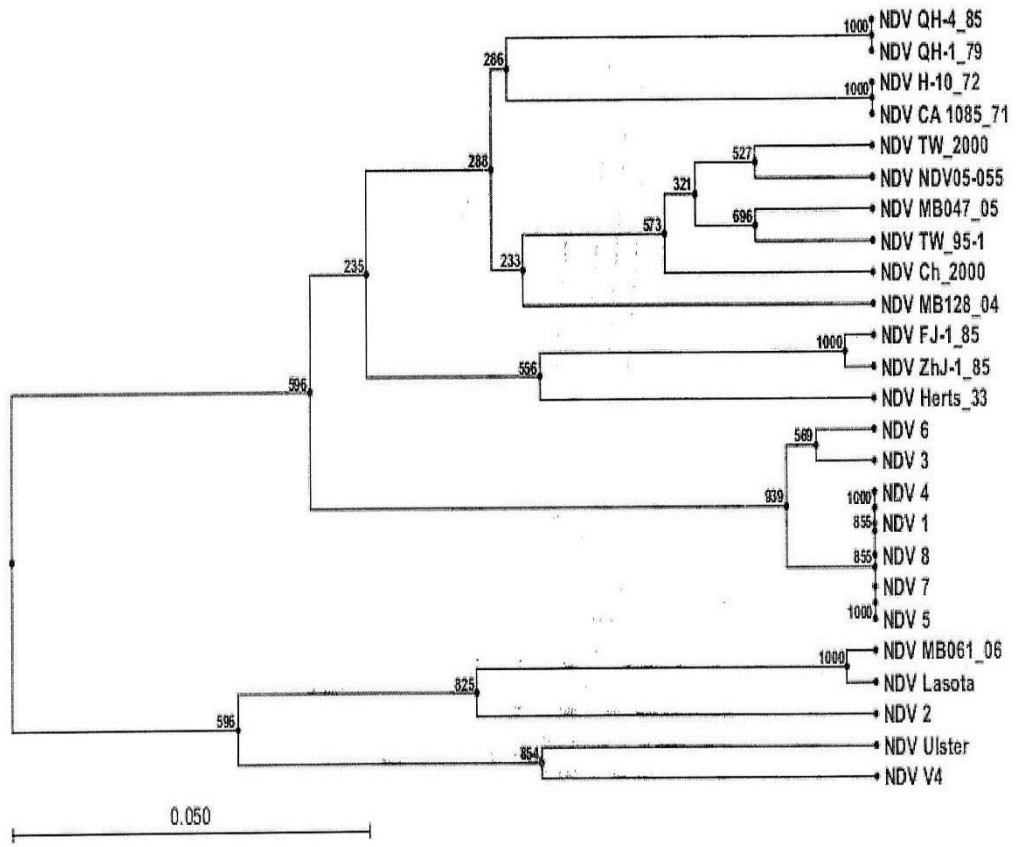
باتوجه به نتایج مندرج در نمودار ۴، ۲ جدایه شماره ۲ متعلق به ژنوتیپ II و ۷ جدایه دیگر (۱، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸) متعلق به ژنوتیپ VII هستند. نکته قابل توجه در مورد جدایه‌های شماره۳ و ۶ این است که علی‌رغم تفاوت بسیار جزئی با سایر جدایه‌ها (۱، ۴، ۵، ۷ و ۸)، اما همگی در یک ژنوتیپ قرار می‌گیرند.

جدول ۱– مقایسه توالی آمینواسیدی ناحیه ۵۳۵ جفت بازی ۸ جدایه شناسایی شده با جدایه‌های دیگر

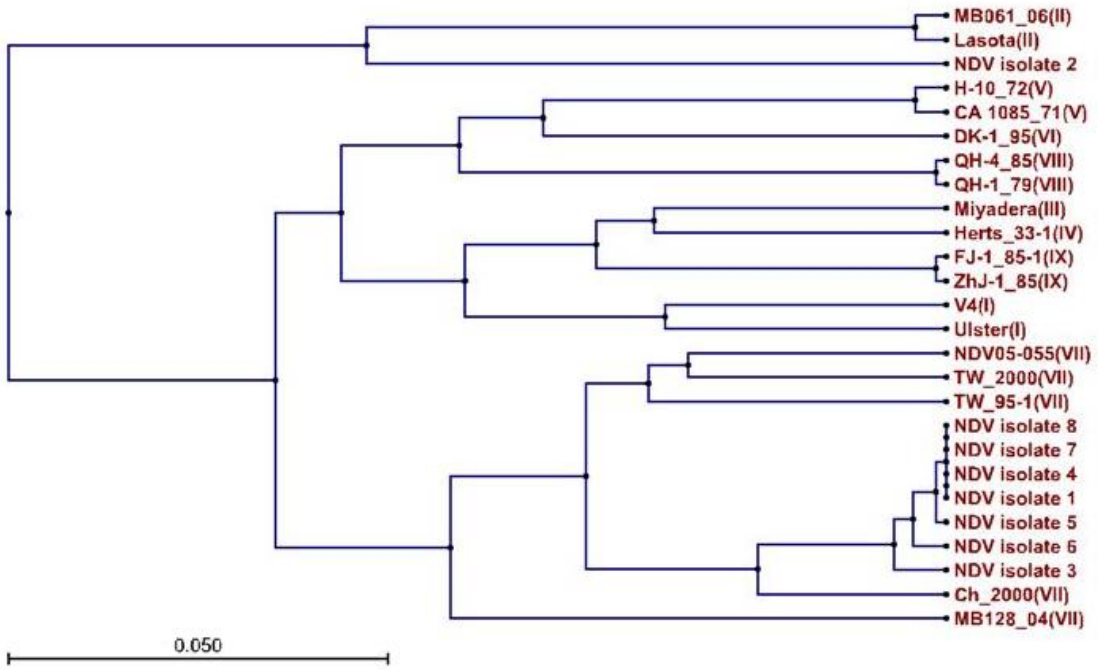


نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱– آنالیز فیلوژنتیکی ۸ جدایه و تعدادی از سویه‌های ویروس نیوکاسل



نمودار ۲– آنالیز فیلوژنتیکی و تعیین ژنوتیپ ۸ جدایه و تعدادی از سویه‌های ویروس نیوکاسل

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- میانگین ± SD عیار پادتن سرم خون جوجه‌های مورد مطالعه در آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون

گروه‌ها	قبل از نوبت اول واکسن		بعد از نوبت اول واکسن		بعد از نوبت دوم واکسن	
	یک روزگی	۱۴ روزگی	۲۵ روزگی	۳۲ روزگی (چالش)	۳۷ روزگی	۴۲ روزگی
گروه ۱ (واکسن)	۷ ± ۰/۷۲	۳/۱ ± ۱/۵	۴ ± ۱/۴^{bd}	۳/۵ ± ۱^{bd}	۴/۵ ± ۰/۵۲^{bd}	۴/۲ ± ۰/۴۲^{bc}
گروه ۲ (چالش)	۷ ± ۰/۷۲	۳ ± ۱/۱	۱ ± ۰/۹۴^{ac}	۰/۵ ± ۰/۷^{ac}	۰/۵ ± ۰/۷^{ac}	تلف شدند
گروه ۳ (واکسن و چالش)	۷ ± ۰/۷۲	۳/۱ ± ۱/۵	۴ ± ۱/۴^{bd}	۳/۸ ± ۰/۹۱^{bd}	۴/۶ ± ۰/۶۹^{bd}	۸ ± ۱/۶^{ad}
گروه۴ (کنترل منفی)	۷ ± ۰/۷۲	۳ ± ۱/۱	۱ ± ۰/۹۴^{ac}	–	–	–

^{a,b,c,d}وجود حرف لاتین (کوچک) در هر خانه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P< ۰/۰۵$) بین گروه‌هاست.

بحث

هفت جدایه از ۸ جدایه ویروس بیماری نیوکاسل از تمامی بافت‌ها از جمله مغز جدا شدند و باتوجه به نتایج سکانس توالی آمینواسید و آنالیز فیلوژنتیکی و بر اساس تعریف OIE این جدایه‌ها از سویه‌های حاد محسوب می‌شوند. در حال حاضر واکسن‌های نیوکاسل که در ایران اجازه مصرف دارند از سویه‌های لنتوژن هستند و ویروس لنتوژن واکسن قدرت تهاجم به بافت مغز را ندارند و منجر به بروز علایم عصبی نمی‌شوند (۱ و ۵). ژنوتیپ ویروس‌های جدا شده در این پژوهش نشان می‌دهد جدایه ۲ متعلق به ژنوتیپ II و بقیه جدایه‌ها متعلق به ژنوتیپ VII هستند. بررسی منابع نشان می‌دهد پژوهش‌های مشابه در ایران و خارج از کشور با سویه‌های متفاوت ویروس نیوکاسل انجام گرفته است. در یک مطالعه روی ۱۴ نمونه از مناطق مختلف ایران در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، تمامی ۱۴ نمونه مشکوک پس از آزمایش RT-PCR (روی پروتئین F)، از نظر نیوکاسل مثبت ارزیابی شدند (۱). سابقه مزارع مطالعه شده نشان می‌دهد تعدادی از گله‌ها واکسن نیوکاسل دریافت کرده بودند و احتمالاً تعدادی از نمونه‌های مثبت جدا شده مربوط به سویه‌های واکسن بودند، لیکن در پژوهش حاضر ۷ جدایه از مغز استحصال شد که با توجه به توالی آمینواسیدی در جایگاه شکافت پروتئین فیوژن از سویه‌های حاد محسوب می‌شوند. طی سه دهه اخیر در تایوان سه بار بیماری نیوکاسل در سال‌های ۱۹۶۹، ۱۹۸۴ و ۱۹۹۵ بروز کرد و توالی‌یابی بین نوکلئوتیدهای ۴۷ و ۴۳۵ ژن F عمل ژنوتایپینگ انجام شد. جدایه جدا شده در سال ۱۹۶۹ مشابه ژنوتیپ III بوده است اما تمام جدایه‌های سال‌های ۱۹۸۴ و ۱۹۹۵ (هفت جدایه از هشت جدایه در سال ۱۹۹۵) متعلق به ژنوتیپ VII بوده‌اند. امروزه در اغلب موارد بروز بیماری نیوکاسل در شرق آسیا و غرب اروپا ناشی از ویروس‌های ژنوتیپ VII است (۲۳). در پژوهش دیگری ۵ جدایه از هفت جدایه ویروس عامل بیماری نیوکاسل که طی سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۰ در چین و تایوان از گله‌های ماکیان و کبوتر جدا شدند متعلق به ژنوتیپ VIIc و VIId، یک جدایه متعلق به ژنوتیپ VIb و یک جدایه حد فاصل این دو گروه بودند (۲۴)، همچنین برای بررسی میزان حفاظت یک جدایه متعلق به ژنوتیپ VII، از این جدایه واکسن امولسیون روغنی تهیه شد و یک گروه ماکیان را با واکسن آماده شده از سویه مزرعه و گروه دیگر را با واکسن لاسوتای تجاری واکسینه کردند و چهار هفته بعد هر دو گروه را با سویه جدا شده از مزرعه چالش کردند، گروهی که با واکسن تهیه شده از سویه مزرعه واکسینه شده بودند در برابر ابتلا به بیماری و مرگ و میر محافظت شدند اما گروهی که با واکسن لاسوتای تجاری واکسینه شده بودند میزان حفاظت بالینی به ۴۰٪ کاهش یافت (۲۴). در پژوهش دیگری قطعه ژنی به طول ۳۷۵ نوکلئوتید از ژنی که ناحیه شکست فعال و سیگنال پپتید را در پروتئین F کد می‌کنند در ۱۷۴ جدایه توالی‌یابی شدند و با توالی نوکلئوتیدی ۱۶۴ جدایه

www.SID.ir

Archive of SID

بانک ژن مورد مقایسه قرار دادند و جدایه‌ها را به شش گروه مجزا(lineage 1 to 6) تقسیم کردند و ناهمگنی ژنتیکی قابل توجهی در بین پارامیکسوویروس‌های تیپ ۱ پرندگان وجود داشت که به نظر می‌رسد متأثر از میزبان، زمان و منطقه جغرافیایی باشد (۴). در پژوهشی عامل شیوع بیماری نیوکاسل در مناطق مختلف آفریقای جنوبی را متعلق به گروه ژنتیکی 5d/VIId گزارش کرد. در حالی که سویه استاندارد آفریقای جنوبی متعلق به گروه ژنتیکی3d/VIII است، اما زمانی که پرندگان واکسینه شده با واکسن محتوی سویه VG-GA را با این دو سویه چالش دادند، این واکسن قادر به ایجاد حفاظت پرندگان در برابر سویه جدید بود (۱۳). در مالزی ۱۱ جدایه از ویروس عامل بیماری نیوکاسل را طی سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۷ با تکنیک RT-PCR شناسایی کردند که متعلق به ۳ ژنوتیپ مختلف بودند که این جدایه‌ها با جدایه‌های گزارش شده از کشورهای جنوب شرق آسیا مشابهت زیادی داشتند (۶). طی سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۲، ۵ جدایه ویروس نیوکاسل از جوجه‌های گوشتی (استان‌های گیلان، مازندران، البرز و اصفهان) و یک جدایه از بوقلمون (استان تهران) و ۱ جدایه از کبوتر (استان تهران) با تکنیک RT-PCR شناسایی گردید و بر اساس توالی ژن P (فسفوپروتئین) تجزیه و تحلیل ژنتیکی شدند. نتایج آنالیز فیلوژنتیکی بیانگر آن بود که جدایه‌های جوجه‌های گوشتی و بوقلمون قرابت زیادی دارند و هر دو به ژنوتیپ VII تعلق دارند، اما جدایه کبوتری در ژنوتیپ V قرار دارد (۱۱)، که با نتایج پژوهش حاضر در خصوص جداسازی ویروس نیوکاسل ژنوتیپ VII مطابقت دارد؛ همچنین در سال ۲۰۱۴ در اندونزی جدایه‌های ویروس نیوکاسل را در جوجه‌های گوشتی با RT-PCR شناسایی کردند و بر اساس ژن F و HN توالی‌یابی کردند و گزارش دادند ۶ جدایه به ژنوتیپ VII، یک جدایه به ژنوتیپ VI و سایر جدایه‌ها به ژنوتیپ I تعلق دارند. این پژوهش نشان داد در اندونزی ژنوتیپ VII غالب است (۸) که با یافته‌های این مطالعه مطابقت دارد. در حال حاضر ژنوتیپ‌های V، VI و VII از ژنوتیپ‌های غالب در سراسر جهان هستند و به ویژه ژنوتیپ VII اهمیت زیادی دارد؛ زیرا اغلب درگیری‌های اخیر با ویروس بیماری نیوکاسل در آسیا، آفریقا و خاورمیانه مربوط به ژنوتیپ VII است (۱۶). در یک پژوهش در استان فارس ۱۰ جدایه ویروس نیوکاسل از مزارع گوشتی در سال‌های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۲ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن F با RT-PCR شناسایی شدند و جدایه‌ها را بر اساس توالی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک بخشی از ژن F توسط RT-PCR بررسی شد و ۱۰ جدایه ویروس عامل بیماری نیوکاسل متعلق به ژنوتیپ III بودند (۱۵) که با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت ندارد. این تفاوت در ژنوتیپ ویروس نیوکاسل جدا شده در ۲ منطقه از کشورمان می‌تواند به نوع پرنده، منطقه جعرافیایی و از همه مهم‌تر به زمان مطالعه مرتبط باشد. در پژوهش حاضر میزان حفاظت واکسن B_1 ساخت داخل، در برابر جدایه غالب حاد ویروس نیوکاسل با تکیه بر نتایج به دست آمده از آزمون HI، نشانگر حفاظت کافی واکسن لنتوژنیک در برابر سویه غالب حاد ویروس نیوکاسل جدا شده بود؛ زیرا جوجه‌های واکسینه و چالش شده در ۴۲ روزگی میانگین عیاری حدود $۲^۸$ داشته و تلفات نداشتند، ولی در گروهی که فقط واکسن B_1 دریافت کردند در ۴۲ روزگی میانگین عیار پادتن حدود $۲^۴$ بود ولی گروه غیر اکسینه و چالش شده تلفات ۱۰۰ درصدی نشان دادند و در مدت ۸ روز همگی تلف شدند. جوجه‌های واکسنیه نشده و چالش نشده (کنترل منفی) هیچ‌گونه نشانه بالینی یا تلفات نشان ندادند و میانگین عیار پادتن آن‌ها در ۴۲ روزگی حدود صفر بود. میزان حفاظت دو واکسن اوینیو (سویه VG/GA) و BCRDV (سویه F) در برابر ویروس بیماری نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی بررسی شد. واکسیناسیون در دو نوبت در سنین ۳ و ۲۰ روزگی انجام گرفت و در ۳۰ روزگی با ویروس حاد نیوکاسل چالش

www.SID.ir

Archive of SID

شدند، گروهی که با واکسن اوینیو واکسینه شده بودند، پس از هر دو نوبت واکسیناسیون، عیار بالاتری (2^5) نسبت به گروه واکسینه با سویه F (2^4) داشته‌اند (۱۳). ویروس واکسن اگر از نظر فیلوژنتیکی به ویروس چالش یافته نزدیک‌تر باشد، میزان انتشار ویروس وحشی از میزبان در مقایسه با واکسن‌های هترولوگ کمتر است (۱۶). روش‌ها و برنامه‌های مختلف واکسیناسیون ضدبیماری نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی ارزیابی گردید و نتیجه گرفته شد که جوجه‌های گوشتی واکسینه شده در یک روزگی به روش اسپری و واکسیناسیون مجدد در ۹ روزگی با واکسن B_1 به روش قطره چشمی و واکسن کشته نیوکاسل بهترین پاسخ ایمنی را ایجاد می‌کند و این برنامه را برای مناطق پرخطر پیشنهاد کردند. (۱۴). پژوهش حاضر نشان داد ۲ نوبت واکسیناسیون صحیح و با دقت کافی با واکسن B_1 همراه با رعایت اصول امنیت زیستی، ایمنی کامل در پرنده ایجاد می‌کند و نیازی به تزریق واکسن کشته و یا دفعات متوالی واکسیناسیون با واکسن‌های زنده -که تولید و واردات آن‌ها هزینه زیادی را به کشور تحمیل می‌کند و استرس زیادی به گله وارد می‌کند - نیست. به نظر می‌رسد از مهم‌ترین دلایل شکست واکسیناسیون، عدم رعایت صحیح امنیت زیستی، حضور عوامل تضعیف کننده ایمنی، عفونت‌های همراه، رعایت نکردن زنجیره سرد، غیرفعال شدن ویروس واکسن به وسیله مواد ضدعفونی کننده، استفاده از آب نامناسب برای رقیق کردن واکسن و ... باشد. پژوهش حاضر نشان داد ویروس بسیار حاد نیوکاسل در مزارع پرورش طیور گوشتی استان خوزستان در گردش است و دو نوبت واکسیناسیون گله‌ای گوشتی با واکسن B_1 و با رعایت اصول بهداشت و امنیت زیستی میتواند محافظت کافی در برابر ویروس حاد بیماری نیوکاسل ایجاد کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که از این پژوهش حمایت مالی کردند و نیز از زحمات سرکار خانم دکتر فروغ طلازاده که در تحلیل آماری همکاری کردند، قدردانی به عمل می‌آورند.

منابع

۱- اشتری، عباس؛ پوربخش، سید علی؛ ممیز، رضا و عشرت‌آبادی، فاطمه؛ تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل با استفاده از روش RT-PCR، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار؛ ۱۳۸۷؛ ۴(۲): ۸۹-۹۳.

۲- میاحی، منصور؛ بیماری نیوکاسل؛ بیماری‌های ویروسی پرندگان؛ ویرایش دوم؛ انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز؛ ۱-۲۶.

3- Anonymous. World Livestock Disease Atlas: A Quantitative Analysis of Global Animal Health Data (2006–2009), forum, T.I.B.f.R.a.D.T.W.B.a.T.T., ed. (Washington, DC).

4- Aldous, E; Mynn, J. K; Banks, J. and Alexander, D. J; A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. Avian. Pathol; 2003; 32: 239-257.

5- Alexander, D. J. and Senne, D. A; Newcastle Disease Virus and Other Avian Paramyxoviruses. In: Dufour-Zavala, L; A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens; 5thed. American Association of Avian Pathol. Florida; 2008: 135-141.

6- Berhanu, A; Ideris, A; Omar, A. R. and

www.SID.ir

Archive of SID

12- Liu, X. F; Wan, H. Q; Ni, X. X; Wu, Y. T. and Liu, W. B; Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001; J. Virol.; 2003: 1387-1403.

13- Mahmud, M. S; Hossain, M. T; Monoura, P. and Amin, M. M; Comparative efficacy of Avinew (VG/GA strain) and BCRDV (F strain) vaccines against Newcastle disease in broiler chickens. Bangladesh J. Vet. Med.; 2007; 5: 19-23.

14- Mayahi, M; Noury nejad, H. and Joshan, B; Evaluation efficacy of different vaccination program against Newcastle disease in broiler chicks; In; 4th International Veterinary Poultry Congress; Tehran, Iran; 2014: 16-17.

15- Mehrabanpour, M. J; Khoobyar, S; Rahimian, A; Nazari, M. B. and Keshtkar, M. R; Phylogenetic characterization of the fusion genes of the Newcastle disease viruses isolated in Fars province poultry farms during 2009-2011; Vet. Res. Forum; 2013: 187-191.

16- Miller, P. J; King, D. J; Afonso, C. L. and Suarez, D. L; Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. Vaccine; 2007: 7238-7246.

17- Miller, P. J; Alfonso, C. L; El Attrache, J; Dorsey, K. M; Courtney, S. C, Guo, Z. and Kapczynski, D. L; Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the Bejo, M. H; 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: 183-193.

7- Cardenas, G. S; Lopez, R.N; Morales, R; Olvera, M.A; Marquez, M.A; Merino, R; Miller, P. J. and Afonso, C. L; Molecular epidemiology of Newcastle disease in Mexico and the potential spillover of viruses for poultry into wild bird species. Appl. Environ. Microbiol. 2013; 79: 4985-4992.

8- Dharmayanti, N. I; Hartawan, R; Hewajuli, D. A. and Indriani, R; Phylogenetic analysis of genotype VII of Newcastle disease virus in Indonesia; African J. Microbiol. Res.; 2014; 1368-1374.

9- Dimitrov, K. M; Afonso, C. L, Yu, Q. and Miller, P. J; Newcastle disease vaccines- A solved problem or a continuous.Vet. Microbiol.; 2017; 126-136

10- Dimitrov, K. M; Ramey, A. M; Qiu, X, Bahl, J. and Afonso, C.L; Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). Infect. Genet. Evol.; 2016; 39: 22-34.

11- Ghalyanchi Langroudi, A; Hosseini, H.; Karimi, V; Madadgar, O; Hashemzadeh, M; Ghafouri, S. A; Bagheri Ghadikolaei, S. S. and Vahedi, S. M; Phylogenetic study based on the phosphoprotein gene of Iranian Newcastle disease viruses (NDV) isolates, 2010-2012. Iranian J. Vet. Med.; 2014; 8(2): 73-77.

www.SID.ir

Archive of SID

shedding and transmission of challenge viruses. Dev. Cop. Immunol.; 2013; 41; 505-513.

18- OIE; Office International des Epizooties; Newcastle disease; Terrestrial Animal Health; Paris; 2012: 1-19.

19- Perozo, F; Marcano, R. and Afonso, C. L; Biological and phylogenetic characterization of a genotype VII Newcastle disease virus from Venezuela; Efficacy of field vaccination; J. Clinic. Microbiol; 2011: 1204-1208.

20- Schijns, V. E. J. C; Van de Zande, S; Lupiani, B. and Reddy, S. M; Practical aspects of poultry vaccination;In; Schat, K. A; Kaspers, B; Kaiser, P; Eds;Avian Immunology; Elsevier Sci.; 2013; pp: 345-362.

21- Suarez, D. L; 2013. Newcastle disease; In; Swayne, D. E; Glisson, J. R; McDougald, L. R; Nolan, L. K; Suarez, D. L. and Nair V. (eds.); Disease of poultry; 13th ed; Ames. Iowa; Iowa State University Press; 2013: pp: 89-138.

22- Thayer, S. G. and Beard, CW; Serologic procedures; In: Dufour-Zavala, L; (Ed); A Laboratory Manual for the Identification and Characterization of Avian Pathogens; 5thed; American Association of Avian Pathologists; Florida; 2008; pp: 222-229.

23- Yang, YC; Shieh, KH; Lin, LY. and Chang, CP; Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (Genotype VII) from recent outbreaks in Western Europe; Avian Dis.; 1999: 125-130.

24- Yu, L; Wang, W; Jiang, Y; Chang, L. and Kwang, J.; Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the people's Republic of China and Taiwan. J. Clinic. Microbiol.; 2001: 3512-3519.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol.12 / No.2
Fall-Winter 2018-2019

Efficacy of B1 Newcastle disease vaccine against the prevalent virulent strain of Newcastle disease virus isolated from broiler farms of Khouzestan province

Mayahi, M.[1*]; Seyfi-Abad Shapouri, M. R.[2]; Mohamadian, B.[3]

1. Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran.
2. Professor of Virology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran.
3. DVSc Graduated of avian diseases and health Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran.

Received: 4 January 2017 ***Accepted:*** 8 November 2017

Summary

In order to evaluate protection of B_1 ND vaccine against the prevalent virulent ND virus isolated from broiler farms in Khuzestan province, samples from trachea, lungs, liver, kidney, spleen, proventriculus, cecal tonsils and brain were collected from 50 Newcastle disease suspected flocks. One isolated ND virus was belonged to genotype II and 7 isolates were belonged to genotype VII. In order to evaluate protection of Newcasle B1 vaccine aginst virulent isolate belonged to genotype VII, 160 day-old broiler chicks were randomlly divided into 4 equal groups and kept in separated rooms. Groups 1 and 3 chicks were vaccinated two times with live B_1 strain vaccine at 8 and 18 days of age via eye-drop route and groups 2 and 4 chocks were kept as unvaccinated control groups. Groups 2 and 3 chicks were challenged intraocularly with 10^5 EID_{50} doses of the virulent prevalent isolated ND virus. Blood samples from all groups were collected on days 1, 14, 25, 32, 37 and 42 and antibody titer was measured by hemagglutination inhibition (HI) test. It was concluded that, very virulent ND virus are present in poultry farms of Khuzestan province and two times vaccination with B_1 vaccine probably produced sufficient protection against very virulent ND virus.

Keywords: Protection, Newcastle disease, Broiler chick, Genotyping, B_1 Vaccine, RT-PCR.

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

www.SID.ir