بررسی مولکولی و پاتوتیپینگ ویروس‌های نیوکاسل جدا شده از پرندگان مهاجر استان بوشهر

محمدجواد مهربانپور[۱*]، حمیدرضا فرزین[۲] و زهرا بهمنی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۲۶

چکیده

پرندگان مهاجر و آبزی مخازن پارامیکسوویروس‌ها می‌باشند و عامل ایجاد کننده‌ی بیماری در مرغداری‌های صنعتی نیز محسوب می‌گردند، لذا بررسی مولکولی و پاتوتایپینگ ویروس‌های جدا شده از پرندگان مهاجر به منظور پیش‌گیری از انتقال این ویروس ضروری می‌باشد. نمونه‌های پژوهش حاضر از پرندگان مهاجر تالاب‌های استان بوشهر، در جنوب کشور ایران جمع‌آوری شده است. جداسازی ویروس و بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده در مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شیراز انجام شد. جهت بررسی مولکولی و شاخص‌های بیماری‌زایی ۵ جدایه‌ی ویروس نیوکاسل، آزمایش‌های میانگین مدت زمان مرگ جنین جوجه (MDT)، شاخص بیماری‌زایی داخل مغزی (ICPI) و واکنش زنجیرهای پلی‌مراز معکوس (RT_PCR) انجام گردید. قطعه‌ی ۳۶۲bp، منطقه‌ی شکست پروتیین F، با PCR تکثیر و تعیین توالی محصول PCR، جهت شناسایی اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدها تعیین شد . آنالیز فیلوژنی ناحیه‌ی شکست پروتئین F توسط برنامه‌های Bioedit Blast و MegAlign-5 انجام گردید. بر اساس آزمایش‌های MDT، ICPI، ۵ نمونه‌ی بررسی شده از سویه‌ی لنتوژن با حدت بیماری‌زایی ضعیف تشخیص داده شد و همچنین در روش RT-PCR تمامی نمونه‌های مورد مطالعه در منطقه‌ی اختصاصی bp ۳۶۲ مثبت شدند. ردیف اسیدهای آمینه در منطقه‌ی شکست پروتیین F به صورت GRQGRL117 112 می‌باشد که همه لنتوژن می‌باشند. مقایسه‌ی انجام شده با تعدادی از ویروس‌ها بانک ژنی، نشان داد، بیش‌ترین شباهت با ویروس‌های لاسوتا و B1 می‌باشد. این تحقیق نشان داد که پرندگان مهاجر مخصوصاً پرندگان آبزی در منطقه‌ی بوشهر می‌توانند یکی از ناقلین این ویروس باشند، بنابراین بیماری نیوکاسل همیشه یک خطر برای پرندگان بومی منطقه در مسیر پرندگان مهاجر می‌باشد.

کلمات کلیدی: ویروس نیوکاسل، پرندگان مهاجر، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس

مقدمه

بیماری نیوکاسل یکی از مهمترین بیماری‌های پرندگان در سراسر دنیا می‌باشد. عامل این بیماری در بین گونه‌های مختلف پرندگان اهلی، وحشی، آبزی و مهاجر در دنیا ایجاد بیماری می‌نماید (Miahi et al. 2015). ژنوم ویروس به صورت خطی پوشش‌دار و از RNA تک رشته‌ای با سنس منفی تشکیل شده است (Shengqing et al. 2002) . این ویروس دارای ۱۵۱۸۶ نوکلئوتید و ۶ پروتئین می‌باشد. اساس بیماری‌زایی ویروس عامل بیماری نیوکاسل به تجزیه پروتئولیتیک پیش‌ساز پروتئین F(F0) به دو تحت واحد F1 و F2 که به وسیله‌ی باندهای دی سولفیدی به هم متصل شده‌اند برمی‌گردد . این شکست پروتئولیتیک در منطقه‌ای به نام محل شکافته شدن (Cleavage site) صورت می‌گیرد و معمولاً بین اسیدهای آمینه ۱۱۷-۱۱۲ قرار گرفته است و باعث

[۱*] استادیار بخش ویروس‌شناسی مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز

E-mail: mehrabanpourj@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استادیار بخش بیوتکنولوژی مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد

[۳] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده‌ی زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور شهر ری، تهران

آزادسازی انتهای آمینی جدید F و در نتیجه تشکیل فرم فعال بیولوژیکی پروتئین می‌گردد و تخریب غشای سلول هدف و القای الحاق غشایی را باعث می‌شود (Alexander 2000, Tolf et al. 2013). پروتئین F در انتشار داخل سلولی ویروس از سلول به سلول دیگر نقش اساسی دارد و در واقع می‌توان گفت پروتئین F در بیماری‌زایی ویروس بیماری نیوکاسل نقش کلیدی دارد (Fathi et al. 2006). نوع اسیدهای آمینه‌ی مستقر در جایگاه تقسیم (Cleavage site) پروتئین F تأثیر زیادی در بیماری‌زایی ویروس دارد. به طوری که OIE در حال حاضر سکانس اسیدهای آمینه در منطقه‌ی شکست پروتئین F را به عنوان، اولین شاخص جهت تشخیص بیماری‌زایی ویروس نیوکاسل پذیرفته است (Boynukara et al. 2013, Wise et al. 2004).

ویروس عامل بیماری نیوکاسل متعلق به جنس آولاویروس و خانواده‌ی پارمیکسوویریده قرار دارد که دارای ۹ سروتیپ (AMPV1-9) می‌باشد. اخیراً سروتیپ-های جدید APMV10 و APMV11 نیز شناسایی شده‌اند. تمامی سروتیپ‌ها به غیر از سروتیپ ۵ در بین پرندگان وحشی در حال چرخش می‌باشند. لیکن سرتیپ‌های ۱ و ۲ و ۳ قادر به بیماری شدید در پرندگان می‌باشند (Talf et al. 2013, Zarkov et al. 2005, Ke et al 2010). پرندگان وحشی به عنوان میزبان طبیعی ویروس‌های کم‌تر بیماری‌زا مطرح می‌باشند گرچه در سال‌های اخیر ویروس‌های بیماری‌زا نیز از پرندگان وحشی و اهلی در بعضی از کشورهای اروپایی نیز جدا شده‌اند، پرندگان آبزی مهاجر نیز نقش بسیار مهمی در انتشار ویروس در محیط‌های آبی و انتقال ویروس در طول مسیر مهاجرت می‌باشند (Oladele et al. 2012, Talf et al. 2013).

اگر چه ویروس‌های جدا شده از پرندگان وحشی و به خصوص پرندگان آبزی اکثراً غیر پاتوژن (Lentogenic) هستند و علائم کلینیکی ندارند لیکن، بررسی‌های مولکولی صورت گرفته روی جدایه‌های ویروس نیوکاسل در پرندگان اهلی و پرندگان آبزی وحشی نشان داده است که ویروس‌های وحشی منشاء آن‌ها در پرندگان اهلی ویروس-های نیوکاسل در پرندگان وحشی بوده است (Boynukara et al. 2013). پرندگان وحشی به لحاظ ناقل بودن ویروس اهمیت ویژه‌ای دارند لذا، بررسی ویروس نیوکاسل در پرندگان آبزی و وحشی ضروری به نظر می-رسد. به طور کلی می‌توان گفت پرندگان وحشی و مهاجر بدون این که به بیماری مبتلا شوند قادرند ویروس را منتقل نمایند و ویروس را در محیط اطراف خود منتشر نمایند و پرندگان اهلی و صنعتی را نیز آلوده کنند. پرندگان مهاجر و آبزی قادر به حمل ویروس تا فواصل طولانی و انتقال به مناطق جدید می‌باشند. با توجه به این که پرندگان وحشی با شروع فصل سرما از سیبری و حاشیه‌ی دریای خزر به تالاب‌های انزلی و شمال کشور و یا سواحل جنوبی کشور مهاجرت می‌نمایند، لذا می‌توانند ناقل ویروس نیوکاسل باشند. بنابراین، بررسی پرندگان مهاجر آبزی از لحاظ ناقل بودن ویروس نیوکاسل حائز اهمیت است. استان بوشهر در جنوب کشور واقع شده و دارای تالاب‌های متعدد می‌باشد که هر ساله تعداد قابل توجهی پرنده وحشی و آبزی به این منطقه مهاجرت می-نمایند. هدف از این تحقیق بررسی پاتوژنیسیتی و مولکولی تعدادی از ویروس‌های نیوکاسل جدا شده از پرندگان آبزی مهاجر به این تالاب‌ها می‌باشد.

مواد و روش کار

در این تحقیق ۵ جدایه ویرس نیوکاسل جدا شده از پرندگان مهاجر در جزیره‌ی ام‌الکرم بوشهر از بخش ویروس‌شناسی موسسه‌ی رازی تحویل گرفته شد. تعداد ۱۰۰ میکرولیتر از هر ویروس به طور جداگانه به ۵ عدد تخم مرغ جنین‌دار عاری از پاتوژن (SPF) ۹-۱۱ روزه تلقیح گردید و در دستگاه ستر با رطوبت ۶۵ درصد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. ۲۴ ساعت بعد از تزریق کلیه تخم مرغ‌ها کندل گردید و در ۷۲ ساعت پس از تلقیح مایع آلانتوئیک جدا گردید و بر اساس روش استاندارد آزمایش هماآلگوتیناسیون سریع

انجام گرفت . آزمایش ممانعت هماگلوتیناسیون : بر اساس پروتکل استاندار OIE آزمون HI به منظور تشخیص ویروس نیوکاسل با استفاده از آنتی‌سرم استاندارد (تهیه شده از آزمایشگاه رفرانس آنفلونزا و نیوکاسل ایتالیا) انجام گرفت (OIE 2009).

جهت تشخیص و ارزیابی جدایه‌های ویروس نیوکاسل از آزمایش‌های میانگین مدت زمان مرگ جنین جوجه (MDT) شاخص بیماری‌زایی داخل مغزی (ICPI) بر اساس پروتکل استاندارد در جوجه‌های ماکیان انجام گرفت.

برای تعیین شاخص بیماری‌زایی داخل مغزی (ICPI)، تمامی ویروس‌ها با تیتر هماگلوتیناسیون بیش از ۲۴ (۱:۱۶) پس از رقیق‌سازی (۱:۱۰) به میزان ۰/۰۵ سی‌سی به مغز ۱۰ عدد جوجه SPF بر اساس پروتکل OIE تلقیح گردید. بر اساس روش استاندارد، تمامی جوجه‌ها به مدت ۸ روز تحت بررسی قرار گرفتند و بر اساس حالت‌های طبیعی، بیماری و مرگ امتیاز صفر تا ۲ به ترتیب داده شد.

جهت استخراج RNA، ۵ جدایه ویروس از کیت (Vetek TM Viral Gene-spin, Intron Biotechnology) کشور کره استفاده گردید. جداسازی RNA مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده‌ی کیت صورت گرفت.

RT-PCR: واکنش زنجیره‌ای پلیمر از (RT-PCR) به صورت تک مرحله‌ای و همزمان توسط یک جفت پرایمر ۳۶۲bp (جدول ۱) روی ۵ نمونه انجام گرفت. مقادیر مربوط به واکنش RT-PCR در جدول ۲ نشان داده شده است. برنامه‌ی دمایی مورد نیاز جهت دستگاه ترموسایکلر اپندورف شامل ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه ۵۵، ۹۴، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد هر یک به مدت ۱ دقیقه، ۴۰ بار تکرار و سپس ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

بعد از قرار دادن نمونه‌ها بر اساس برنامه‌ی ذکر شده در دستگاه PCR، جهت مشاهده‌ی اندازه‌ی محصول PCR از ژل آگاروز ۱ درصد در رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید استفاده گردید بدین منظور قسمت تکثیر شده روی ژل آگاروز ران گردید.

جدول ۱: مشخصات پرایمر ۳۶۲bp مورد استفاده در واکنش RT-PCR

اسم پرایمر	توالی	قطعه تکثیر شده
NDV1	5'TTG ATG GCA GGC CTC TTG C 3'	362 bp
NDV2	5'GGA GGA TGT TGG CAG CAT T 3'	362 bp

جدول ۲: مقادیر مربوط به واکنش RT-PCR

مواد مورد نیاز	حجم برای هر نمونه بر حسب میکرولیتر
مخلوط کیت (One step RT-PCR)	۸
RNA Templetes	۲
پرایمرF	۱
پرایمرR	۱
آب مقطر	۸
حجم	۲۰

جهت تخلیص محصول PCR با استفاده از روش ژل، از کیت High pure PCR محصول شرکت Roche آلمان استفاده گردید و کلیه‌ی مراحل خالص‌سازی بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده‌ی کیت صورت پذیرفت.

۵ نمونه همراه با پرایمرهای مربوطه شرکت Roche جهت تعیین توالی ارسال گردید.

کلیه توالی‌های این مطالعه توسط برنامه‌ی MegAlign-5 محصول کمپانی DNastar USA مورد بررسی و اصلاح قرار گرفتند. آنالیز نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه توسط نرم‌افزار Bioedit انجام گرفت و در بانک ژن آزمون BLAST انجام شد و نیوکاسل بودن نمونه‌ها مورد تأیید قرار گرفت. توسط برنامه‌ی Bioedit توالی نوکلئوتیدهای ژن F به اسید آمینه تبدیل گردید و شماره‌گذاری اسیدهای آمینه صورت گرفت و تفاوت نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه مربوط به هر نمونه با یکدیگر مورد بررسی و با روش ClustalW multiple alignment مقایسه، ویرایش و آنالیز گردید.

درصد تشابه نمونه‌ها با دیگر ویروس‌های نیوکاسل ثبت شده در دنیا از طریق بانک ژنی نیز مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. آنالیز شجره‌شناسی توسط نرم‌افزار Meg Align-5 و رسم درخت فیلوژنتیک توسط برنامه‌ی Mega 6 با فرمت Neighbor joining algorithm انجام گرفت.

جهت مقایسه نمودن سکانس‌ها و نمونه‌های جدا شده از آسیا، آمریکا و آفریقا به همراه سایر ویروس‌های ایران مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳).

جدول ۳: مشخصات بررسی تعدادی از ویروس‌های نیوکاسل مورد استفاده در آنالیز شجره‌شناسی

Genbank accession	Strain	Fusion cleavage site
EF565077	NDV/ 88LACA4BWT/ Cameron Parish/ 1988	GGERQERL
EF564833	NDV/ 87OHCA6CGS/ Ottawa / 1987	GGERQERL
EF565014	NDV/ 95NY263CHK/ Live Bird Market/ 1995	GGERQERL
EF565074	NDV/ 88LACA1GWT/ Cameron Parish/ 1988	GGERQERL
EF564955	NDV/ 02MD147MLD / Kent/ 2002	GGERQERL
EF564986	NDV/ 03MD184MLD/ Dorcheste/ 2003	GGERQERL
EF565017	NDV/ 98MN266MLD/ Roseau/ 1998	GGERQERL
EF565056	NDV/ 05NJ329ENV/ Live Bird Market/ 2005	GGERQERL
EF564961	NDV/ 02MD154MLD/ Dorchester/ 2002	GGERQERL
EF564966	NDV/ 02MD160MLD/ Dorchester/ 2002	GGERQERL
EF565034	NDV/ 00MN289MLD/ Roseau/ 2000	GGERQERL
EF565061	NDV/ 05NY334CHK/ Live Bird Market/ 2005	GGERQDRL
EF565057	NDV/ 05MA330ENV/ Live Bird Market/ 2005	GGERQDRL
EF565062	NDV/ 05NY336ENV/ Live Bird Market/ 2005	GGERQDRL
EF564909	NDV/ 04MD92MLD/ Dorchester/ 2004	GGERQERL
EF564916	NDV/ 04MD100MLD/ Dorchester/ 2004	GGERQERL
EF564929	NDV/ 04MD118MLD/ Dorchester/ 2004	GGERQERL
EF565003	NDV/ 01MD207MLD/ Cecil/ 2001	GGERQERL
EF565065	NDV/ 05NJ339ENV/ Live Bird Market/ 2005	GGERQERL
EF564827	NDV/ 03MD168ENV/ Kent/ 2003	GGERQERL
EF564907	NDV/ 04MD90MLD/ Kent/ 2004	GGERQERL
EF565035	NDV/ 00MN290MLD/ Roseau/ 2000	GGERQERL
EF564883	NDV/ 00NJ40LSS/ Cumberland/ 2000	GGERQERL
EF564831	NDV/ 04DE248RDT/ Kent/ 2004	GGERQERL
EF565045	NDV/ 02TX314BWT/ Brazoria/ 2002	GGERQERL
EF565075	NDV/ 88LACA2GWT/ Cameron Parish/ 1988	GGERQERL
EF564897	NDV/ 04MD78MLD/ Kent/ 2004	GGGKQGRL
EF564888	NDV/ 01NJ48RDT/ Cumberland/ 2001	EGGKQGRL
EF564885	NDV/ 01NJ45SDL/ Cape May/ 2001	EGGKQGRL
EF564995	NDV/ 01OH197BWT/ Ottawa/ 2001	GGGKQGRL
EF564951	NDV/ 04MD143MLD/ Dorchester/ 2004	GGEKQGRL
EF565021	NDV/ 00MN270MLD/ Roseau/ 2000	GGEKQGRL
EF565028	NDV/ 01TX277MTD/ Brazoria/ 2001	RGGKQGRL
EF564826	NDV/ 87OH164NOP/ Ottawa/ 1987	GGGKQGRL
EF027144	NDV/ G05HK357PLT/ Hong Kong/ 2005	GGERQERL
EF027148	NDV/ G05HK361CHK/ Hong Kong/ 2005	GGEQQERL
AY972103	NDV/ G77FR SHD/ France/ 1977	GGERQERL
AY175736	NDV/ G83US LOO/ USA/ 1983	GGGKQGRL
AY175642	NDV/ G88ES CHK/ Spain/ 1988	GGGKQGRL
M24701	NDV/ G51JP CHK/ Japan/ 1951	GGRRQRRF
AF458009	NDV/ G85CH CHK/ China/ 1985	GGRRQRRF
AY562986	NDV/ G93US ANH/ USA/ 1993	RGRRQKRF
AY288996	NDV/ G00IT PGN/ Italy/ 2000	GGRRQKRF
AF456442	NDV/ G01CH GSE/ China/ 2001	GGRRQKRF
AF048763	NDV/ G60MY CHK/ Malaysia/ 1960	GGRRQKRF
AY845400	NDV/LaSota/China	GGGRQGRL

AY562991	NDV/C/Ulster/67/Ireland/1967	GGGKQGRL
M24696	NDV/LaSota/USA/1946	GGGRQGRL
AF375823	NDV/B1/USA/1947	GGGRQGRL
Y18898	NDV/clone30/Germany	GGGRQGRL
EF201805	NDV/Mukteswar/China/1941	GGRRQRRF
AY741404	NDV/Herts/33/USA/1933	GGRRQRRF
EU293914	NDV/Italien/Italy/1945	GGRRQRRF
AY427817	NDV/Heb02/China/2002	GGGKQGRL
DQ097394	NDV/PHY-LMV42/Hungary	GGGKQGRL
AY965077	NDV/A/Far East/3658/Russia/2002	GGGKQGRL
AY562987	NDV/US/211472/02/USA/2002	GGRRQKRF
AY341061	NDV/LuoY/China	GGRRQRRF
EF035485	NDV/28/2003/Slovakia/2003	GGGKQGRL
AF048763	NDV/AF2240/Malaysia/1960	GGRRQKRF

نتایج

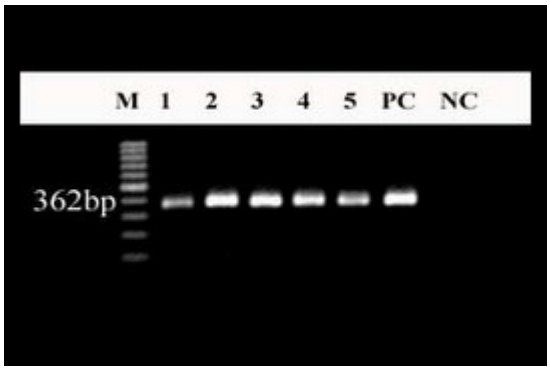
نتایج به دست آمده از MDT جهت هر ۵ جدایه بالاتر از ۹۰ ساعت به دست آمد که نشان دهنده‌ی لنتوژن بودن تمامی ویروس‌ها می‌باشد.

میزان شاخص بیماری‌زایی داخل مغزی (ICPI) تمامی نمونه‌ها از صفر تا ۰/۱۶ مشخص گردید.

جدول ۴: نتایج حاصل از MDT

نمونه ها	میانگین زمان مرگ MDT	حدت بیماری‌زایی
NDV1	>90	لنتوژن (بیماری‌زایی پایین)
NDV 2	>90	لنتوژن (بیماری‌زایی پایین)
NDV 3	>90	لنتوژن (بیماری‌زایی پایین)
NDV 4	>90	لنتوژن (بیماری‌زایی پایین)
NDV 5	>90	لنتوژن (بیماری‌زایی پایین)

نتایج حاصل از آزمایش RT-PCR مربوط به ۵ نمونه با تکثیر قطعه‌ی ۳۶۲ جفت بازی ژن F پروتئین به عنوان مثبت شناسایی شدند (شکل ۱). نتایج حاصل توالی‌یابی نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنی نشان داد که بر اساس توالی-یابی نوکلئوتیدی و ترجمه‌ی اسیدهای آمینه در منطقه‌ی شکست پروتئین F تمامی جدایه‌ها دارای توالی 112GRQGRL117 می‌باشند که از لحاظ بیماری‌زایی نشان‌دهنده‌ی کم حدت بودن بیماری (لنتوژن) آن‌ها است که با نتایج به دست آمده از آزمایش MDT و ICPI نیز مطابقات دارد. نتایج به دست آمده از نظر شباهت ویروسی نشان داد که ۵ نمونه به دست آمده کاملاً به یکدیگر شبیه می‌باشند که نشان دهنده‌ی این است که منشاء آن‌ها یکسان می‌باشد. میزان شباهت و تفاوت با ویروس‌های دیگر در جدول ۶ نشان داده شده است.



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR به منظور تکثیر ژن F بر روی ژل آگار ۱ درصد. M: مارکر، ردیف‌های ۱تا ۵ نمونه‌های مورد آزمایش، ردیفPC: کنترل مثبت، ردیف NC : کنترل منفی.

بحث

بیماری نیوکاسل سالانه خسارات قابل توجهی به صنعت مرغداری وارد می‌کند. پارامیکسوویروس‌ها از پرندگان وحشی، اهلی، آبزی و پرندگان زینتی جدا گردیده‌اند و به نظر می‌رسد که در سراسر دنیا منتشر

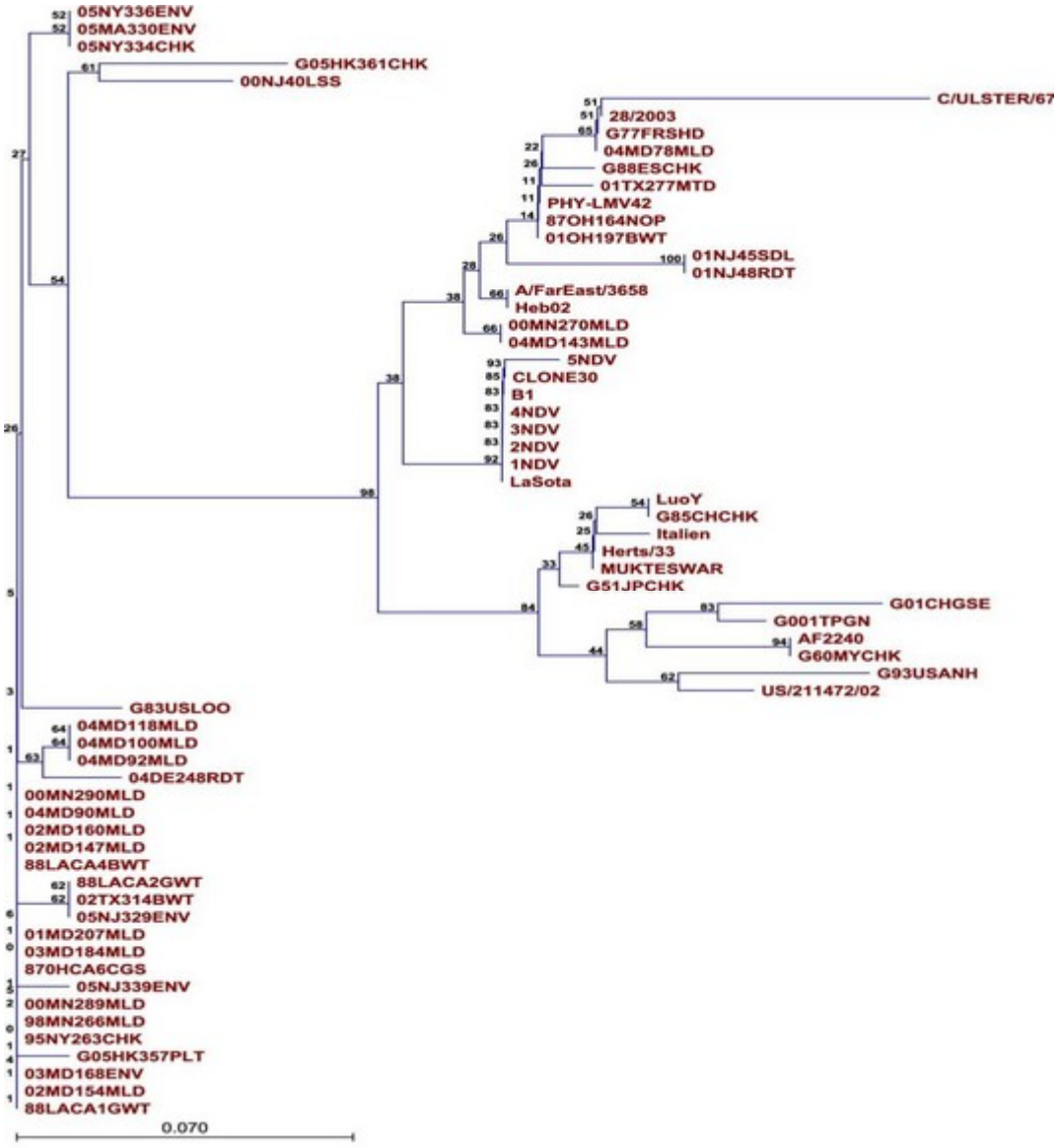
می‌باشند. پرندگان آبزی، مهاجر و همین طور پرندگان وحشی جمعیت قابل ملاحظه‌ای می‌باشند که با توجه مهاجرت آزادانه این پرندگان و ناقل بودن آن‌ها اهمیت به سزایی در انتقال و انتشار ویروس در مناطق در حرکت خود می‌باشند. اهمیت بسیار زیاد این بیماری در صنعت طیور در اکثر کشورهای دنیا باعث گردیده تا به راه‌های انتقال این ویروس توجه زیادی گردد. یکی از راه‌های انتقال توسط پرندگان مهاجر صورت می‌گیرد. پرندگان مهاجر به ویژه پرندگان آبزی ناقل بالقوه این ویروس می‌باشند (Rosenberger et al. 1975, Wang et al. 2012) در این تحقیق ویروس‌هایی که از پرندگان آبزی و وحشی از تالاب‌های استان بوشهر جدا گردیده بود از نظر پاتوژنیستی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. مطالعات زیادی در خصوص جداسازی ویروس نیوکاسل و شناسایی آن از پرندگان آبزی مهاجر صورت گرفته است. در یک تحقیق ۳۶۴ نمونه از اردک‌های وحشی مورد بررسی قرار گرفتند و ۲/۸۹ درصد از این نمونه‌ها ویروس لنتوژن نیوکاسل جدا گردید (Stanislawek et al. 2002). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ روی ۹۱۶ پرنده‌ی وحشی از جمله فلامینگو صورت گرفت نشان داده شد که جدایه‌هایی که از فلامینگو در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت کاملاً با ویروس لاسوتا شباهت داشتند. در این مطالعه ۸۷ نمونه (۱۲/۶۴ درصد) مربوط به اردک‌ها بود که همگی APMV1 بودند. در مطالعه‌ی دیگری که در بلغارستان انجام شد تعداد ۱۶۸ پرنده وحشی که شامل گونه‌های مختلف بودند مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این تحقیقات نشان داد که تنها ۵ نمونه (۲/۹۷ درصد) از نمونه‌ها که متعلق به اردک‌ها بودند ویروس‌های لنتوژن بوده که کاملاً شبیه به سویه واکسن می‌باشد (Zarkov et al. 2005) . در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۰۸ در فنلاند صورت گرفت، ۱۱۵ نمونه کلواک از گونه‌های مختلف اردک گرفته شد و به وسیله‌ی روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق تعدد ۶ نمونه (۵/۲۱ درصد) به وسیله‌ی RT-PCR مثبت گردیدند (Lindh et al. 2008). در سال ۲۰۰۵ در تحقیق دیگری که در آرژانتین روی پرندگان وحشی انجام دادند، مشخص گردید که ویروس‌های لنتوژن در پرندگان وحشی وجود دارد و این ویروس‌ها قرابت نزدیکی به سویه‌های واکسن دارند. لذا اهمیت برنامه واکسیناسیون در پرندگان صنعتی و حفاظت پرندگان صنعتی از پرندگان وحشی به طور جد مطرح شده است (Zanetti et al. 2005) . در یک مطالعه‌ی ۵ ساله از سال ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۷ تعداد ۶۲۰۶ نمونه از اردک‌های اهلی در شرق چین را مورد بررسی قرار دادند و ۲۰۱ جدایه‌ی ویروس نیوکاسل را از پرندگان مذکور جدا کردند و ۷۳ مورد از این جدایه‌ها را از نظر ویژگی‌های بیولوژیکی و ژنتیکی مورد بررسی قرار دادند. قسمت ژن پروتئین F این جدایه‌ها را به وسیله‌ی RT-PCR تکثیر و سپس تعیین توالی کردند. مطالعه‌ی توالی اسید آمینه‌های ناحیه‌ی شکست پروتئین F نشان داد که همه‌ی ۷۳ جدایه‌ها لنتوژن بودند. اگر چه آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که ۴۳ جدایه شباهت زیادی با جدایه‌های پرندگان آبزی منطقه‌ی شرق داشتند که نشان دهنده‌ی انتقال بین پرندگان وحشی و اهلی می‌باشند (Liu et al. 2009).

در تحقیق حاضر ۵ نمونه ویروس نیوکاسل از پرندگان مهاجر آبزی در تالاب‌های بوشهر که جدا شده بود از نظر پاتوژنیستی با آزمایش‌های MDT و ICPI و همین طور از نظر ردیف اسیدآمینه‌ها در ناحیه‌ی شکست پروتئین F مورد بررسی قرار گرفت و لنتوژن بودن جدایه‌ها مورد تأیید قرار گرفت و این نتایج با تحقیقات بسیاری از محققین در دیگر کشورها مطابقت دارد. به طور کلی می‌توان گفت پرندگان وحشی میزبان طبیعی ویروس‌های کم‌تر بیماری‌زا هستند و پرندگان صنعتی مخزن ویروس‌های بیماری‌زا می‌باشند و ارتباط بین پرندگان وحشی و صنعتی به عنوان یک خطر برای هر دو گروه مطرح می‌باشد.

جدول ۵: بررسی ناحیه‌ی شکست پروتئن F

جایگاه اسید / شماره جدایه	112	113	114	115	116	117
1	G	R	Q	G	R	L
2	G	R	Q	G	R	L
3	G	R	Q	G	R	L
4	G	R	Q	G	R	L
5	G	R	Q	G	R	L

*G : گلایسین R : آرژنین Q : گلوتامین L : لوسین



شکل ۲: درخت شجره‌شناسی جدایه‌های نیوکاسل این مطالعه همراه با جدایه‌های مختلف دنیا

منابع

Alexander, D.J. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. Revue Scientifiquet Technique, 19(2): 443-462.

Boynukara, B.; Guhan, T.; Coven, F.; Kiziroglu,I. and Durmus, A. (2013). Determination of Newcastle disease virus among wild bird populations in Lake Van basin, Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 37: 86-93.

Fathi, E.; Pourbakhash, A. and Jafarian Dehkordi, M. (2006). Phylogenetic survey analysis and detection of Newcastle virus on molecular technique in Chahar Mahal Bakhtiari province, Iran. Iranian Veterinary Journal, 5(2): 50-55.

Ke, G.M.; Yu, S.W.; Ho, C.H.; Chu, P.Y.; Ke, L.Y.; Lin, K.H. et al. (2010). Characterization of newly emerging Newcastle disease viruses isolated during 2002–2008 in Taiwan. Virus Research, 147: 247-257.

Lindh, E.; Huovilainen, A.; Rätti, O.; Ek-Kommonen, C.; Sironen, T.; Huhtamo, E. et al. (2008). Orthomyxo-, paramyxo- and flavivirus infections in wild waterfowl in Finland. Virology Journal, 5: 1-15.

Liu, X.; Wang, X.; Wu, S.; Hu, S.; Peng, Y.; Xue, F. and Liu, X. (2009). Surveillance for avirulent Newcastle disease viruses in domestic ducks (*Anas platyrhynchos* and *Cairina moschata*) at live bird markets in Eastern China and characterization of the viruses isolated. Avian Pathology, 38(5): 377-391.

Mayahi, M.; SefiAbad Shapouri, M.R.; Jafary, R. and Khosravi Farsani, M. (2015). Isolation and molecular diagnostic of pigeon paramyxovirus-1from suspected pigeons to Newcastle disease in Ahvaz, Iran. Iranian Veterinary Journal, 11(2): 102-112.

Office International Epizootic (OIE): Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.03.14, 2009; 576-589. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/ Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_ DIS.pdf

Oladele, S.B.; Enam, S.J. and Okubanjo, O.O. (2012). Pathogenic haemoparasites and antibody to Newcastle disease virus from apparently healthy wild birds in Zaria Nigeria. Veterinary World, 5(1): 13-18.

Rosenberger, J.K.; Klopp, S. and Krauss, W.C. (1975). Characterization of Newcastle disease viruses isolated from migratory waterfowl in the Atlantic flyway. Avian Diseases, 19: 142-149.

Stanislawek, W.L.; Wilks, C.R.; Meers, J.; Horner, G.W.; Alexander, D.J.; Manvell, R.J. et al. (2002). Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) in New Zealand. Archives of Virology, 147: 1287-1302.

Shengqing, Y.; Shinya, K.; Otsuki, K.; Ito, H. and Ito, T. (2002). Isolation of myxoviruses from migratory waterfowls in San-in district, western Japan in winters of 1997–2000. Journal of Veterinary Medical Science, 64: 1049-1052.

Tolf, C.; Wille, M.; Haidar, A.K.; Avril, A.; Zohari, S. and Waldenström, J. (2013). Prevalence of avian paramyxovirus type 1 in Mallards during autumn migration in the western Baltic Sea region. Virology Journal, 12(10): 285.

Wang, Y.; Duan, Z.; Hu, SH.; Kai, Y.; Wang, X.; Song, Q. et el. (2012). Lack of detection of host associated differences in Newcastle disease viruses of genotype VIId isolated from chickens and geese. Virology Journal, 9: 197-211.

Wise, M.G.; Suarez, D.L.; Seal, B.S.; Pedersen, J.C.; Senne, D.A.; King, D.J. et al. (2004). Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA. Journal of Clinical Microbiology, 42: 329-338.

Zanetti, F.; Berinstein, A.; Pereda, A.; Taboga, O. and Carrillo, E. (2005). Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from healthy wild birds. Avian Diseases, 49: 546-550.

Zarkov, I.; Bochev, I.; Oreshkova, N. and Manvell, R. (2005). Isolation of avian paramyxovirus type 1 (APMV-1) from free-living mallards (Anas platyrhynchos) (preliminary communication). Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 8: 173-181.

Molecular and phathotyping survey of Newcastle virus isolated from migratory birds in Bushehr province

Mehrabanpour, M.J.[1]; Farzin, H.R.[2] and Bahmani, Z.[3]

Received: 02.10.2016 Accepted: 16.05.2017

Abstract

Migratory birds and waterfowl are know reservoirs of avian paramyxoviruses and it considered cause of the disease in poultry industry, therefore, the survey of pathotyping viruses isolated from migratory birds to prevent transmission is necessary. Samples of present research collected from wetlands of Boushehr province in south of Iran and obtained from Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran. Virus isolation and characterization of the samples were performed at the Razi institute. The biological properties and pathogenicity of five NDV isolated were studied by intracerebral pathogenicity index (ICPI), mean death time (MDT) value and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) methods. The PCR was used to amplify 362bp the cleavage site of all isolates. Sequencing of PCR products was performed to identify nucleotides and deduce amino acids. Aligment and phylogentic analysis of F protein (cleavage site) was performed by software Megaline5, Blast and Bioedit. MDT and ICPI method showed that all of 5 samples were detected as lentogenic strain with low virulent and so, in RT-PCR method all of the samples in the special motif were positive. The deduced amino acid sequence of the cleavage site of the fusion (F) protein confirmed that, all isolates contained the avirulent motif ^{112} GRQGRL^{117} at the cleavage site. All isolates have high similarity with LaSota and B1 strain in gene bank. The result in this study showed that migratory birds particularly aquatic birds in Bushehr carries lentogenic NDVs and act as one the reservoirs for the virus. Therefore, ND is always a great risk for the native avian population living on the routes of migratory birds.

Key words: Newcastle virus, Migratory birds, Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

1- Assistant Professor, Department of Virology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Shiraz-Iran
2- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Mashhad, Iran
3- MSc Graduated of Genetic, Faculty of Biology, Payame Noor University, Tehran-Iran
Corresponding Author: Mehrabanpour, M.J., E-mail: mehrabanpourj@yahoo.com