

## ارزیابی حدت و مطالعه فیلوژنی ویروس بیماری نیوکاسل جدا شده از مرغداری‌های گوشتی استان مازندران

محمد حسن زاده<sup>۱</sup>، محمد عبدالشاه<sup>۲\*</sup>، علیرضا یوسفی<sup>۲</sup>، آیدین ملوکی<sup>۲</sup> و فرهاد حق‌شناس<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> استادیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

<sup>۳</sup> دامپزشک فعال در بخش خصوصی، بیمارستان دامپزشکی اختصاصی طیور البرز، آمل، ایران

پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۱۲

دریافت: ۱۴۰۰/۳/۹

### چکیده

بیماری نیوکاسل از بیماری‌های مهم ویروسی طیور است که خسارت اقتصادی قابل توجهی را به واحدهای پرورشی وارد می‌سازد. برای کنترل همه‌گیری این بیماری، ارزیابی مداوم پاتوتیپ و ژنوتیپ ویروس‌های در گردش ضروری است. پژوهش کنونی با هدف مطالعه فیلوژنی و تعیین شاخص‌های بیماری‌زایی ویروس نیوکاسل در گردش مرغداری‌های استان مازندران طی همه‌گیری سال ۱۳۹۷ انجام شد. پس از جداسازی ویروس از مغز جوجه‌های تلف شده متعلق به پنج مرغداری مختلف، شاخص‌های بیماری‌زایی داخل‌مغزی و متوسط زمان القای مرگ جنینی آن‌ها تعیین شد. برای انجام آنالیز فیلوژنی، به دنبال استخراج RNA و انجام RT-PCR، توالی ژن F تعیین و با ویروس‌های موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که ویروس‌های عامل همه‌گیری با شاخص بیماری‌زایی داخل‌مغزی ۱/۹۷ و متوسط زمان مرگ جنینی ۵۶ ساعت، متعلق به پاتوتیپ ولژن، و از نظر حدت نزدیک به سویه‌های استاندارد چالش بودند. همچنین بر اساس نتایج آنالیز فیلوژنی، این ویروس‌ها در دسته‌ی ژنوتیپ VII قرار گرفتند. با تعیین هویت فنوتیپی و ژنوتیپی ویروس‌های جدا شده، شواهد بالینی و کالبدگشایی منبئ بر ولژنیک و احشایی بودن شکل بیماری به تأیید رسید. این مطالعه نشان داد ویروس عامل تلفات در گله‌های طیور صنعتی استان مازندران در سال ۱۳۹۷، حدتی نزدیک به سویه‌های استاندارد چالش و در دسته‌ی ویروس‌های نیوکاسل با ژنوتیپ VII و ساب‌ژنوتیپ VII.1.1 قرار دارد؛ لذا می‌توان از این جدایه به عنوان یک سویه بومی حاد، برای انجام آزمایش‌های چالش و ارزیابی عملکرد برنامه‌های واکسیناسیون پیش‌گیرانه، استفاده کرد.

**کلمات کلیدی:** آنالیز فیلوژنیک، حدت، ژنوتیپ، شاخص بیماری‌زایی، گوشتی، ویروس بیماری نیوکاسل

### مقدمه

پارامیکسوویریده است (Walker et al, 2019). ژنوم این ویروس شش ژن دارد که به ترتیب با نام‌های 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' شناخته می‌شوند. ویروس بیماری نیوکاسل با انتشار جهانی، خسارات اقتصادی قابل

بیماری نیوکاسل یکی از بیماری‌های مسری و کشنده پرندگان است که به وسیله‌ی ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) ایجاد می‌شود. این RNA ویروس با ژنوم قطب منفی، متعلق به جنس اورتو آوولاویروس<sup>۱</sup>، از خانواده

\*نویسنده مسئول: محمد عبدالشاه، استادیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

E-mail: m.abdosshah@rvsri.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

بسیاری از آزمایشگاه‌های دنیا از روش‌های بر پایه بیولوژی مولکولی برای تعیین و شناسایی ویروس بیماری نیوکاسل استفاده می‌شود (Smietanka et al, 2006).

با همه‌ی پیشرفت‌هایی که در زمینه تشخیص بیماری نیوکاسل صورت گرفته است، در کنترل همه‌گیری‌ها، تشخیص NDV به تنهایی کفایت نمی‌کند، بلکه ارزیابی پاتوتیپ ویروس و حتی تعیین میزان بیماری‌زایی آن نیز ضروری است. در سال ۱۹۵۵، شاخص میانگین زمان مرگ جنینی (Mean Death Time: MDT) برای تعیین پاتوتیپ ویروس‌های بیماری نیوکاسل معرفی شد. به دنبال آن، شاخص‌های دیگری از جمله شاخص بیماری‌زایی داخل-مغزی (Intracerebral Pathogenicity Index: ICPI) و شاخص بیماری‌زایی داخل سیاهرگی (Intravenous Pathogenicity Index: IVPI) نیز به معیارهای طبقه‌بندی پاتوتیپ‌های این ویروس‌ها افزوده شدند (Alexander, 2008; OIE, 2012). از آن جا که تعیین پاتوتیپ ویروس نیوکاسل بر اساس روش‌های مرسوم (MDT, ICPI و IVPI) نیاز به تجهیزات و رعایت شرایط خاص دارد (OIE, 2012)، لذا به کارگیری روش‌هایی مولکولی در آزمایشگاه‌های تشخیصی به منظور ارائه نتایج با دقت بالا و در مدت زمان کمتر نیز ضروری به نظر می‌رسد. از این روش‌ها در دهه اخیر برای شناسایی ویروس‌های عامل همه‌گیری در سطح مزرعه، استفاده شایانی شده است (Istimewa, 2016; Dhaygude et al, 2017). از دیدگاه مولکولی، دانشمندان به این نتیجه رسیده‌اند که حدت NDV عملاً به تمامی ژن‌ها و پروتئین‌های آن بستگی دارد (Dortmans et al, 2011)؛ با این حال، پروتئین F و ترکیب آمینواسیدی جایگاه شکست آن، نشانگر اصلی حدت NDV و تروپسم بافتی آن است و برای ورود ویروس به سلول و همچنین انتشار آن از سلولی به سلول دیگر، نقش اساسی ایفا می‌کند (Dhaygude et al, 2017). از این رو، در تکنیک‌های مولکولی تشخیص ویروس و حدت آن، همچنان نوکلئوتیدهای مجاور جایگاه شکست ژن پروتئین F مورد مطالعه قرار می‌گیرند (Dhaygude et al, 2017). با توجه

توجهی در صنعت طیور به بار می‌آورد (Smietanka et al, 2008; Pattison et al, 2006). بسته به سویه ویروس، نرخ ابتلا و میزان مرگ و میر در گله از تقریباً ۱۰۰ درصد تلفات در حالت فوق حاد تا بدون ضایعات و مرگ و میر در شکل تحت بالینی تغییر می‌کند (Dhaygude et al, 2017). اگر چه این ویروس فقط یک سروتیپ دارد، با تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک بر اساس توالی ژن F، سویه‌های NDV به دو کلاس I و II دسته‌بندی می‌شوند (Dimitrov et al, 2019). تقریباً همه ویروس‌های موجود در کلاس I، سویه‌های با حدت پایین هستند که از پرندگان آبی وحشی جدا شده‌اند. با این حال، در گروه ویروس‌های نیوکاسل کلاس II، ویروس‌های با حدت کم و زیاد جای می‌گیرند که از پرندگان اهلی و وحشی جدا شده‌اند. خود این کلاس به حداقل ۲۱ ژنوتیپ تقسیم می‌شود. برای کنترل شیوع NDV، واکسیناسیون طیور به طور مرتب با واکسن‌های حاصل از سویه‌های شناخته شده‌ای انجام می‌گیرد که متعلق به ژنوتیپ‌های I یا II هستند. با این حال، گزارش‌های اخیر حاکی از آن است که شیوع ND طی دهه گذشته در ایران عمدتاً ناشی از ویروس‌های حاد کلاس II و ژنوتیپ VII بوده است (Goudarzi et al, 2019; Allayari et al, 2020). روش‌های رایج تشخیص بیماری نیوکاسل، اساس سرم‌شناسی دارند؛ اما همه‌ی این آزمون‌ها از حساسیت و ویژگی کافی برخوردار نیستند. افزون بر این، تشخیص قطعی بیماری مستلزم جداسازی ویروس و شناسایی آن است (OIE, 2012). اساس روش‌های توصیه شده توسط سازمان جهانی بهداشت دام (WOAH/OIE) و اتحادیه اروپا در زمینه تشخیص بیماری نیوکاسل بر مبنای جداسازی ویروس است. در این روش، نمونه حاوی ویروس به حفره آلتوییک تخم مرغ‌های SPF (-Specific pathogen-free) جنین‌دار تلقیح و نتیجه‌ی آن با آزمون ممانعت از جمع شدن گلبول‌های قرمز HI (Haemagglutination inhibition test) تأیید می‌شود. به علاوه، OIE واکنش زنجیره پلیمرز با روش نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) را نیز توصیه نموده است؛ و اکنون در

به ضرورت شناسایی دقیق ویژگی ویروس‌های نیوکاسل در گردش به منظور ارائه راهکارهای کنترلی مؤثرتر، این مطالعه با هدف جداسازی، تعیین شاخص‌های بیماری‌زایی و مطالعه فیلوژنی ویروس عامل بیماری در استان مازندران، طی همه‌گیری‌های سال ۱۳۹۷ انجام شد.

### مواد و روش کار

نمونه‌برداری مربوط به این پژوهش در اواخر سال ۱۳۹۷ و از گله‌های گوشتی و مرغ مادر درگیر در استان مازندران انجام شد. مکان، نوع پرورش، میزان تلفات و نشانه‌های بیماری گله‌های درگیر در Table 1 نشان داده شده‌اند. در ارزیابی‌های بالینی، پرندگان طی یک واگیری سریع، نشانه‌هایی مانند مرگ و میر بالا، افسردگی، مشکلات تنفسی، آماس بافت‌های صورت و اطراف چشم، پیچش گردن، فلجی بال و پا داشتند. در کالبدگشایی نیز پرخونی و ترشحات در نای، خونریزی در رأس غدد پیش‌معه، روده باریک، فولیکول‌های لنفاوی در محل دوشاخه شدن روده‌کور دیده شد. تلفات در گله‌های مختلف از ۱۰ تا ۸۰ درصد متغیر بود، به طوری که گله‌های دارای علایم عصبی، بالاترین درصد مرگ و میر را داشتند. برنامه واکسیناسیون گله‌های مورد مطالعه نیز در Table 2 گزارش شده است.

در این پژوهش، نمونه‌های بافت مغز، نای، طحال و سکال‌تانسیل جوجه‌های تلف شده مربوط به گله‌های مورد مطالعه نمونه‌برداری شد. برای جداسازی ویروس، نمونه‌های مغز طبق روش Alexander و همکاران در سال ۲۰۰۸، ابتدا به طور کامل ریز و خرد شدند، سپس نمونه‌های هر گله با یکدیگر مخلوط و به صورت سوسپانسیون ۲۰ درصد وزنی/حجمی (w/v) در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند. سوسپانسیون‌های تهیه شده به مدت ۱-۲ h در دمای اتاق نگهداری و سپس در ۱۰۰×g به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ و مایعات رویی حاصل از آن برداشت شد. در ادامه، ۰/۲ mL از این مایع برداشت شده به داخل حفره آلتوتویک هر یک از پنج تخم‌مرغ جنین‌دار ۹ روزه SPF تزریق شد. سپس، تخم‌مرغ‌ها در دمای ۳۷ °C تا ۷ روز انکوبه و روزانه بررسی شدند. مایع آلتوتویک تخم‌مرغ‌های با تلفات جنینی طی ۲۴ h نخست، برداشت و پس از آن که در آزمایش HA واکنشی نشان نداد، این تخم‌مرغ‌ها به عنوان تلفات مکانیکی تلقی و حذف شدند. سایر جنین‌های مرده یا در حال مرگ به مدت ۲۴h در یخچال (دمای ۸-۲ °C) نگهداری و مایع آلتوتویک آن‌ها جمع‌آوری شد (Alexander, 2008). حضور جدایه‌های NDV در مایع آلتوتویک با استفاده از آزمایش‌های HA و HI به تأیید رسید.

**Table 1: Type, size, age, mortality rate and disease symptoms in studied flocks**

Flock No.	Type	Flock size (×1000 birds)	Region	Age at outbreak time (day)	Age at sampling time (day)	Daily Mortality (bird)	Clinical symptoms & Gross lesions
1	Broiler	50	Amol	28	32	60	Mild neurological and visceral symptoms
2	Broiler breeder (males birds)	40*	Nour	26	28	10	Decrease in feed intake, Respiratory rales and visceral symptoms
3	Broiler	35	Amol	31	38	150	Respiratory rales and Neurological symptoms
4	Broiler**	32	Ghaemshahr	21	27	242	Respiratory rales, Neurological and Visceral symptoms
5	Broiler	50	Baladeh-Nour	20	24	300	Respiratory rales, Neurological and Visceral symptoms

\*n= 2500 birds in outbreak house; \*\* n=8700 birds in outbreak house.

**Table 2. Vaccination program in studied poultry farms**

Flock 1		Flock 2		Flock 3		Flock 4		Flock 5	
Age (day)	Vaccine/administration route	Age (day)	Vaccine/administration route	Age (day)	Vaccine/administration route	Age (day)	Vaccine/administration route	Age (day)	Vaccine/administration route
1	Bivalent live B1+H120 and 793B/Sp	1	Bivalent live B1+H120 and 793B / ED	1	Bivalent live B1+H120 and 793B /Sp	1	Bivalent live B1+H120 /Sp	7	ND (apatogenic vaccinal strain)/DW
8	Bivalent inactivated ND +AI/Inj and LaSota/ED	6	Coccidiosis/DW	6	Bivalent inactivated ND +AI/Inj	9	LaSota/DW	11	Bivalent live ND (coloned LaSota)+IB /DW
12	IBD/DW	9	Bivalent inactivated ND +AI/Inj and coloned LaSota/ED	10	LaSota/Sp	15	IBD/DW	16	IBD/DW
16	LaSota/DW	15	IBD/DW	15	IBD/DW	19	coloned LaSota/DW	-	-
20	IBD/DW	18	Reo/Inj and LaSota/ED	18	Bivalent live ND (coloned LaSota)+IB /DW	24	ND (coloned LaSota)/Sp*	-	-
27	ND (entrotropic lentogenic strain)/DW	22	IBD/DW	28	ND (apatogenic vaccinal strain)/DW	-	-	-	-
-	-	26	ART/ED	-	-	-	-	-	-

\* administrated at the disease outbreak, as emergency vaccination.

Note: DW=drinking water; Sp=spray; ED=eye drop; Inj=Injection; ND=Newcastle disease vaccine; IBD= Infectious bursal disease vaccine; IB= Infectious bronchitis vaccine.

رقت‌های ۷، ۸ و ۹ با مضرب ۱:۱۰ از مایع آلتوتویک تازه عفونی شده، تهیه و به مقدار ۰/۱mL در ۲ نوبت صبح و عصر (با حدود ۹ ساعت فاصله زمانی)، به هر یک از تخم‌مرغ‌های SPF جنین‌دار ۹ تا ۱۰ روزه تلقیح شدند. برای هر رقت در هر نوبت، ۵ تکرار لحاظ شد. همه تخم‌مرغ‌ها در دو نوبت صبح و عصر با همان فاصله زمانی تزریق، نوربینی شدند. میانگین زمانی که در آن جنین‌ها در بالاترین رقت تلف شدند (با گزارش ۱۰۰ درصد مرگ و میر)، به عنوان متوسط زمان مرگ جنین محاسبه شد (OIE, 2012).

ژنوم ویروس توسط کیت High Pure Viral RNA Isolation کمپانی Roche آلمان استخراج شد. سپس طبق روش One Step-RT PCR و با استفاده از کیت Biotech Rabbit آلمان ژن F ویروس نیوکاسل تکثیر شد. برای این منظور، از پرایمرهای پیشتر گزارش شده (Molouki et al, 2019)، با توالی نوکلئوتیدی پرایمر رفت و برگشت به

برای ارزیابی پاتوتیپ جدایه‌های به دست آمده بر اساس دستورالعمل‌های استاندارد بین‌المللی، ویروس مشتق از مایع آلتوتویک عفونی تازه با تیتراهماگلوئیناسیون بیش از ۲<sup>۴</sup> (۱:۱۶)، به نسبت ۱:۱۰ رقیق شد و سپس ۰/۰۵mL از آن به مغز هر یک از ۱۰ جوجه یک روزه SPF تلقیح شد. پرنده‌ها روزانه به مدت ۸ روز (در پایان هر ۲۴h) مورد بررسی قرار گرفتند و برای جوجه‌هایی که شرایط طبیعی داشتند امتیاز صفر، برای جوجه‌های بیمار امتیاز ۱، و برای جوجه‌های تلف شده امتیاز ۲ در نظر گرفته شد. میانگین امتیاز به ازای هر پرنده نسبت به هر بار مشاهده در یک دوره هشت روزه به عنوان شاخص بیماری‌زایی داخل مغزی ثبت شد. لازم به ذکر است که ICPI در حادترین ویروس‌ها نزدیک به ۲ است، ولی ویروس‌های لتوژن مقادیری کمتر از ۰/۷ را نشان می‌دهند (Allan et al, 1978; OIE, 2012).

## نتایج

### جداسازی ویروس و تعیین شاخص بیماری زایی

در این آزمایش، جداسازی ویروس نیوکاسل از نمونه-های باقی پرنده‌های مشکوک با موفقیت انجام شد. نتایج آزمایش HA و HI نشان داد که ویروس جداسازی شده، ویروس بیماری نیوکاسل بود. شاخص‌های ICPI و MDT جدایه‌ها، به ترتیب برابر با ۱/۹۷ و ۵۶ ساعت بود که در دسته ویروس‌های ولوژن قرار گرفتند. از آن جا که معیار اصلی برای تعیین حدت ویروس بیماری نیوکاسل، ICPI است، لذا ویروس جدا شده از گله شماره یک، به عنوان نماینده هر پنج جدایه مورد بررسی، انتخاب و تعیین توالی کامل ژن F بر روی آن انجام پذیرفت.

### ارزیابی مشابهت، درخت ژنتیکی و فاصله تکاملی

#### ویروس جداسازی شده

توالی نمونه به دست آمده با نام Ck/IR/ABD/2018 در بانک ژن با کد MN615882 ثبت شد. نتایج آزمایش‌های مولکولی و BLAST نشان داد که بیشترین درصد تشابه (بیش از ۹۹ درصد)، بین توالی ژن F ویروس جداسازی شده با توالی‌هایی دیده شد که بیشتر توسط Molouki و همکاران در سال ۲۰۱۹ از مزارع گوشتی، و Sabouri و همکاران در سال ۲۰۱۸ در مرغ‌های بومی گزارش شده بود. برای نمونه، جدایه Ck/IR/MAM72/2018 با کد MH481362.1 که توسط ملوکی در سال ۲۰۱۹ گزارش شد، تشابه ۹۹/۷ درصد با نمونه مورد مطالعه داشت. جالب‌تر این که، بین نمونه Ck/IR/EMMA140/2018 با کد MN370896 که توسط Allayari و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش شده است و نمونه مورد مطالعه، ۱۰۰ درصد تشابه وجود داشت.

درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از توالی جدایه ویروس نیوکاسل مورد مطالعه (Ck/IR/ABD/2018) در Figure 1 نشان داده شده است.

ترتیب 5'-YTGCTTATAGTTAGTTYACCTGTC-3' و 5'-ACCCGTGTATTGCTYTTYGG-3' استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده شامل ۵۰°C به مدت ۳۰ min، ۹۵°C به مدت ۲ min و ۳۵ سیکل دمایی شامل واسرشته-سازی در ۹۵°C به مدت ۱۵s، اتصال پرایمر در ۵۰°C به مدت ۲۰s، و پلیمریزاسیون یا تکثیر در ۷۲°C به مدت ۲ min انجام شد. در نهایت یک سیکل تکثیر نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ min اجرا شد. پس از آن، محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد و پس از مشاهده باند مورد نظر (حدود ۱۷۰۰ bp)، محصول PCR از ژل بریده و استخراج شد. برای توالی‌یابی، افزون بر پرایمرهای PCR که پیشتر به آن اشاره شد، دو پرایمر اختصاصی که محل اتصال آن‌ها نقاط میانی قطعه تکثیر شده بود، انتخاب شدند. توالی رفت و برگشت این پرایمرها به ترتیب شامل 5'-GCAACCAATGAAGCTGTGCATGA-3' و 5'-ACAGCTTCTCCATAATTTTGCGA-3' بود.

به منظور رسم درخت فیلوژنی، توالی ژن F با استفاده از نتایج تعیین توالی اسمبل و برای بررسی اولیه، BLAST صورت پذیرفت. برای بررسی فیلوژنیک توالی مورد تحقیق، توالی به دست آمده درون فایل‌های دادگان (dataset) به روز شده گروه بین‌المللی تکسونومی NDV (Dimitrov et al, 2019) که از وبسایت GitHub دانلود شده بود، قرار گرفت و با استفاده از نرم افزار MEGA X درخت فیلوژنی رسم شد. در این آنالیز، از روش Maximum Likelihood و بوت‌استرپ ۵۰۰ استفاده شد. سپس پارامترهای Gamma Time Reversible (GTR) و Gamma distributed (G) انتخاب و عدد ۵ برای No of Discrete Gamma Categories در نظر گرفته شد. افزون بر این، از Complete deletion برای Gap/Missing Data Treatment استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان اختلاف تکاملی یا همان Evolutionary distance نیز از بوت‌استرپ ۱۰۰۰ و مدل Maximum composite likelihood استفاده شد و عدد ۱ برای Gamma distributed در نظر گرفته شد.

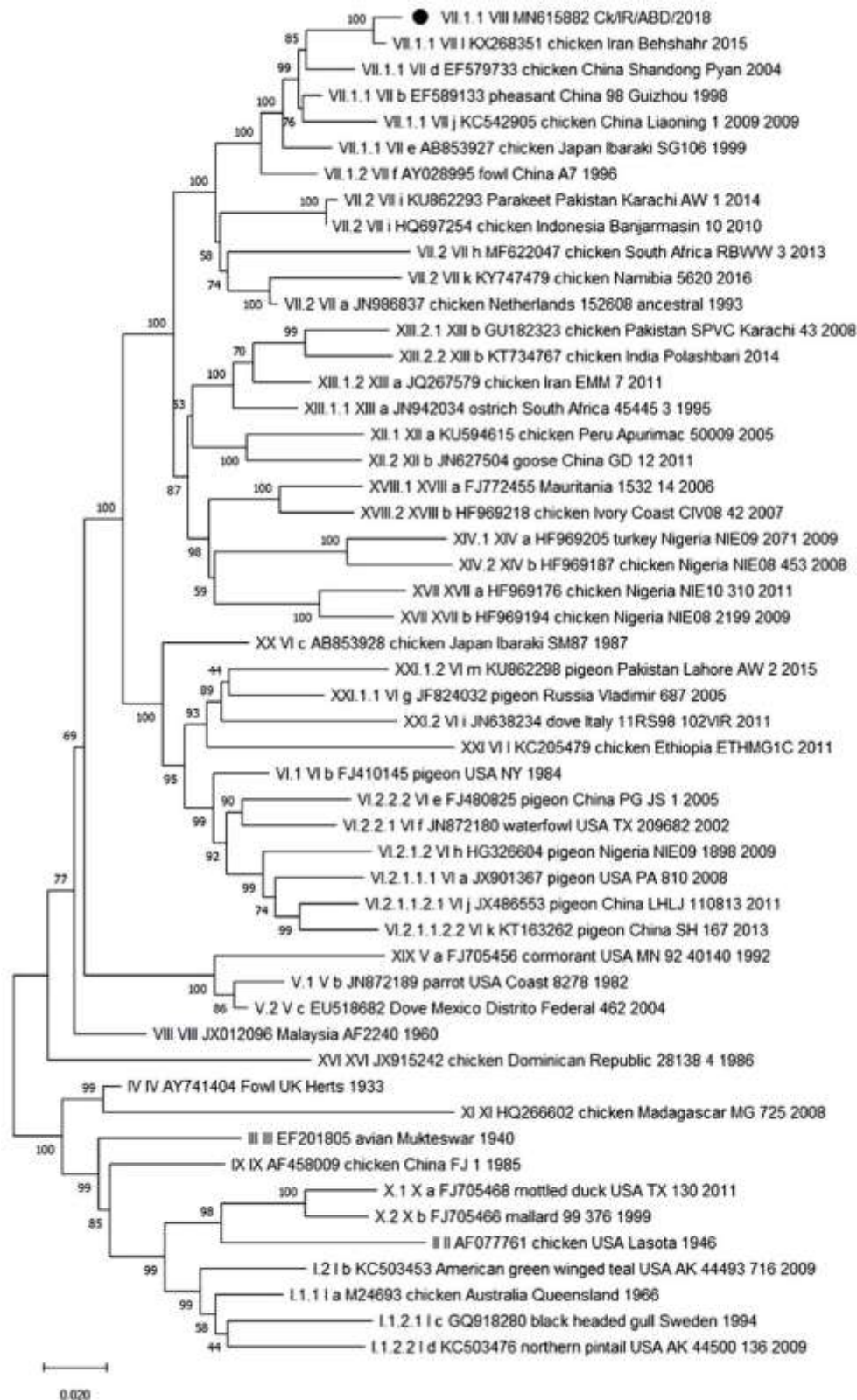


Figure 1. Phylogenetic tree drawn using F gene sequence of Newcastle virus Ck/IR/ABD/2018 isolated from poultry farms in the north of Iran during 2018 and the sequences in the pilot file of NDV International Taxonomy Group. The virus had a high similarity with subgenotype viruses VII.1.1. Bootstrap 500 has been used to draw a phylogenetic tree.

پیشگیری از همه‌گیری‌ها، به تنهایی مؤثر نیست (van Boven et al, 2008). از این رو، با وجود برنامه‌های گوناگون واکسیناسیون و استفاده از واکسن‌های مربوط به پاتوتیپ‌های مختلف، بروز و شیوع بیماری هنوز در میان گله‌های طیور مناطق مختلف گزارش می‌شود. گفتنی است که در کنترل همه‌گیری‌ها، تشخیص NDV به خودی خود کفایت نمی‌کند، بلکه لازم است پاتوتیپ ویروس و میزان بیماری‌زایی آن نیز ارزیابی شود (Alexander, 1995; OIE, 2012). تعیین پاتوتیپ ویروس‌های نیوکاسل بر مبنای تفاوت‌های آنتی‌ژنیکی آن‌ها نبوده، بلکه بر اساس حدت آن‌ها انجام می‌گیرد (OIE, 2012). در این مطالعه، پس از جداسازی ویروس‌های نیوکاسل در گردش در مزارع طیور استان مازندران، اقدام به تعیین حدت عامل بیماری با کمک شاخص‌های بیماری‌زایی و همچنین تکنیک‌های مولکولی و آنالیز فیلوژنتیک شد.

بر اساس حدت ویروس و شدت بیماری ایجاد شده، ویروس‌های NDV در چهار گروه متفاوت قرار می‌گیرند که شامل ۱) سویه‌های ولوژنیک با شاخص MDT کمتر از ۶۰h، ICPI معادل ۲-۱/۵ و IVPI برابر با ۳-۲؛ ۲) سویه‌های مزوژنیک با شاخص MDT ۶۰h-۹۰، ICPI معادل ۱-۱/۵ و IVPI برابر با ۳-۲؛ ۳) سویه‌های لتوژنیک با شاخص MDT بیشتر از ۹۰h، ICPI معادل ۰/۵-۰/۲ و IVPI برابر با صفر؛ ۴) سویه‌های روده‌ای بدون علامت که شاخص‌های MDT ۹۰h، ICPI معادل ۰/۲-۰ و IVP برابر با صفر می‌شوند (Alexander, 2008). بر اساس دستورالعمل‌های سازمان جهانی بهداشت دام (OIE, 2012)، شاخص استاندارد برای تشخیص حدت ویروس نیوکاسل، ICPI است. این شاخص قابل اطمینان‌ترین و تکرارپذیرترین آزمایشی است که به خوبی حدت نسبی ویروس را نشان می‌دهد (OIE, 2012). با توجه رخداد همه‌گیری مورد اشاره در بازه زمانی مشخص و منطقه جغرافیایی دارای تراکم بالای طیور صنعتی و روستایی، یکسان بودن ICPI اندازه‌گیری شده (معادل ۱/۹۷) برای

همان طور که پیشتر اشاره شد، تجزیه و تحلیل تکاملی با روش Maximum Likelihood و استفاده از فایل موجود در وبسایت GitHub مربوط به کنسرسیون ویروس نیوکاسل انجام شد. جدایه مورد مطالعه که با یک دایره سیاه در شکل مشخص شده است، قرابت زیادی با جدایه ایرانی بهشهر و در زیرخوشه VII.1.1 داشت. تاریخچه تکاملی جدایه مورد تحقیق با استفاده از روش Maximum Likelihood و مدل General Time Reversible استنباط شد. درخت دارای بیشترین Likelihood مورد استفاده قرار گرفت که در شکل نشان داده شده است. همچنین، نتایج نشان داد فاصله ژنتیکی جدایه ویروس نیوکاسل مورد مطالعه با سایر ساب‌ژنوتیپ‌های VII.1.1 ویروس نیوکاسل بین ۱/۴ تا ۶/۴ درصد بود. از طرفی، نقطه شکاف بر روی پروتئین F جدایه‌ی مورد مطالعه دارای توالی آمینو اسیدی  $^{112}RRQKRF^{117}$  بود که مشابه با توالی سویه‌های ولوژن می‌باشد.

## بحث

بیماری نیوکاسل از دیرباز در زمره زیان‌بارترین بیماری‌های پرندگان بوده و از جمله نگرانی‌های صنعت پرورش طیور، نه تنها در ایران بلکه در تمام جهان است. برای کنترل این بیماری در مناطق اندمیک، واکسیناسیون ابزار مهمی به شمار می‌آید. با وجود پاتوتیپ‌های مختلف در بین ویروس‌های نیوکاسل و همچنین تفاوت‌های آنتی‌ژنی اندک میان آن‌ها، همگی در یک گروه سرمی به نام ارتو آوولاویروس ۱ پرندگان (AOAV-1) جای دارند (Walker et al, 2019) که بیشتر از آن با عنوان سروتیپ یک پارامیکسوویروس طیور (APMV-1) یاد می‌شود. به دلیل این که همه این ویروس‌ها متعلق به یک سروتیپ هستند، می‌توان از سویه‌های کم حدت در ساخت واکسن علیه سویه‌های پرحدت استفاده کرد (Strochkov et al, 2020). با این حال، واکسیناسیون از پرنده در مقابل شکل بالینی بیماری و مرگ و میر حاصل از آن محافظت می‌کند، اما بر تکثیر، انتشار و انتقال ویروس اثر چندانی ندارد و در

گذشته (Allayari et al, 2020) را نشان داد، به طوری که جدایه Ck/IR/EMMA140/2018 و Ck/IR/ABD/2018 شباهت ۱۰۰ درصد داشتند. به علاوه توالی Ck/IR/ABD/2018 بیش از ۹۹ درصد تشابه با توالی‌های گزارش شده توسط Molouki و همکاران در سال ۲۰۱۹ داشت. Sabouri و همکاران در سال ۲۰۱۸ با جداسازی ۸ ایزوله ویروس نیوکاسل نشان دادند که ویروس در گردش گله‌های بومی نیز به این ژنوتیپ تعلق دارد. فاصله ژنتیکی جدایه ویروس نیوکاسل مورد مطالعه با سایر ساب‌ژنوتیپ‌های VII.1.1 ویروس نیوکاسل موجود در فایل پایلوت گروه بین‌المللی تکسونومی بین ۱/۴ تا ۶/۴ درصد بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که جدایه ویروس نیوکاسل مورد تحقیق دارای ژنوتیپ VII بود که پیش‌تر نیز توسط سایر پژوهشگران (Allayari et al, 2020) از نظر حدت، در دسته ویروس‌های ولوژن معرفی شده بود. همچنین، بیماری‌زا بودن جدایه‌ی مورد مطالعه، با داشتن ICPI معادل ۱/۹۷ که نزدیک به شاخص سویه استاندارد چالش (Herts 33) است، به تأیید رسید.

توالی محل شکافته شدن F0 (پیش‌ساز F) با بیماری‌زایی سویه‌های NDV ارتباط دارد. در سویه‌های ولوژن و مزوژن، این محل دارای آمینواسیدهای بازی بیشتری، به ویژه در جایگاه‌های ۱۱۲ و ۱۱۵، است (Alexander, 2008). گفته می‌شود حضور دو جفت اسید آمینه بازی در جایگاه‌های ۱۱۲، ۱۱۳ و ۱۱۵، ۱۱۶ و اسید آمینه فیل‌آلانین در جایگاه ۱۱۷، نشان دهنده حدت بالای ویروس نیوکاسل است (Alexander, 2008). بر این اساس، می‌توان از سکانس نوکلئوتیدی ویروس برای تعیین پاتوتیپ آن استفاده کرد (Dortmans et al, 2011). در سویه‌های حاد NDV جایگاه شکست دارای ردیف آمینواسیدی -R/L<sup>112</sup> برای R-Q-R/K-R-F<sup>117</sup> است. توالی <sup>117</sup>RRQKR<sup>112</sup> برای ویروس مورد مطالعه، نشان‌گر احتمال فوق حاد بودن این ویروس می‌باشد (Dortmans et al, 2011; OIE, 2012). در کلیه مزارع تجاری مورد مطالعه، برنامه واکسیناسیون نسبتاً مشترکی علیه بیماری نیوکاسل به کار رفته بود. تا

جدایه‌های پژوهش حاضر، نشان از مشابه بودن ویروس عامل رخداد بیماری در هر پنج مزرعه مورد بررسی داشت. گزارش‌های اندکی درباره شاخص‌های بیماری‌زایی ویروس‌های نیوکاسل در ایران موجود است. با این حال، Abdoshah و همکاران در سال ۲۰۱۲ پاتوتیپ جدایه‌های نیوکاسل خود را ولوژن معرفی کردند. Abdoshah و همکاران در سال ۲۰۱۲ با مطالعه بر روی جدایه‌های NDV استان‌های مختلف ایران، ویروس‌های حادی را شناسایی کردند که ICPI نزدیک به سویه‌های استاندارد چالش، همانند Herts 33/56 و Texas GB، داشتند؛ به طوری که MDT آن‌ها بین ۴۱/۶ تا ۶۰h، ICPI بین ۱/۷۶ تا ۱/۹۱، و IVPI بین ۲/۶۸ تا ۲/۸۸ بود. Ghalyanchilangeroudi و همکاران در سال ۲۰۱۸ با جداسازی و تعیین توالی کامل ژنوم ویروس عامل بیماری نیوکاسل در یک مزرعه پرورش مرغ گوشتی، ضریب بیماری‌زایی داخل مغزی آن را ۱/۷ گزارش کردند. مجموع این یافته‌ها نشان می‌دهد که در صورت جداسازی و نگهداری مناسب ویروس‌های نیوکاسل، افزون بر شناخت حدت و بیماری‌زایی، می‌توان از سویه‌های حاد در گردش برای انجام مطالعات کارآیی واکسن‌ها، در چالش با ویروس مزرعه نیز استفاده کرد.

در کنترل همه‌گیری بیماری نیوکاسل، برای کاهش شیوع و اجرای برنامه‌ی صحیح واکسیناسیون، افزون بر تعیین حدت و پاتوتیپ ویروس عامل بیماری، باید ژنوتیپ آن نیز به درستی تشخیص داده شود. استفاده از واکسن نیوکاسل که با سویه‌ی ویروس در گردش همولوگ باشد، احتمالاً می‌تواند در کاهش دفع ویروس مؤثر باشد و کارایی واکسیناسیون را بهبود بخشد (Miller et al. 2010). ترسیم درخت فیلوژنی نشان داد که سویه جدا شده در این مطالعه، در دسته ویروس‌های نیوکاسل ساب‌ژنوتیپ VII.1.1 قرار می‌گیرد. همچنین درخت فیلوژنی نشان از نزدیکی زیاد جدایه مورد مطالعه با جدایه ایرانی بهشهر در زیرخوشه VII.1.1 داشت که توسط گروه بین‌المللی تکسونومی NDV در فایل این گروه قرار داده شده است. نتایج BLAST نیز قرابت زیاد سویه مورد مطالعه با نتایج



جلوگیری از ابتلا به NDV، حتی در صورتی که ویروس‌های حاد در گله‌های واکسینه ایجاد بیماری نکنند، احتمال ایجاد آلودگی و تکثیر آن‌ها همچنان باقی است (Zhang et al, 2014; Zhu et al, 2018). بنابراین، آنچنان که پیشتر گفته شد، واکسیناسیون به تنهایی کافی نبوده و برای کاهش خطر آلودگی، لازم است به همراه آن اقدامات ایمنی‌زیستی مناسبی نیز به کار گرفته شوند (Zhu et al, 2018). این مطالعه نشان داد ویروس عامل تلفات در گله‌های طیور صنعتی استان مازنداران در سال ۱۳۹۷، حدتی نزدیک به سویه‌های استاندارد چالش و در دسته‌ی ویروس-های نیوکاسل با ژنوتیپ VII و ساب‌ژنوتیپ VII.1.1 قرار دارد؛ لذا می‌توان از این جدایه به عنوان یک سویه بومی حاد، برای انجام آزمایش‌های چالش و ارزیابی عملکرد برنامه‌های واکسیناسیون پیش‌گیرانه، استفاده کرد.

ابتدای هفته دوم، یک واکسن زنده و یک واکسن غیرفعال شده و تا ۲۰ روزگی دو واکسن زنده دیگر به روش‌های مختلف مصرف شدند. میزان مرگ و میر نیز بین ۳ تا ۷ روز پس از بروز نشانه‌های بیماری، به حداکثر خود رسید. در گله شماره دو، درگیری تنها در سالن پرورش خروس اتفاق افتاد که می‌تواند به دلیل اجرای نامناسب واکسیناسیون و یا حساسیت بیشتر جنس نر در مواجهه با ویروس حاد نیوکاسل باشد (Leitner et al, 1989). مشابه با یافته‌های این پژوهش، احمد و آدیشو (Ahmed and Odisho, 2018) در کردستان عراق در ۴۶ مورد از ۹۶ گله مورد مطالعه، ویروس حاد نیوکاسل را جدا کردند که همگی تا ۸ روزگی دست کم یک نوبت واکسن زنده و در مواردی یک واکسن غیرفعال را نیز دریافت کرده بودند، و تلفات در طی چهار روز پس از آغاز نشانه‌های بالینی اتفاق افتاد. با توجه به استفاده گسترده از واکسن‌ها در صنعت طیور ایران برای

## تشکر و قدردانی

نویسندگان از هیأت مدیره شرکت تعاونی تولیدی-توزیعی رازی و به ویژه جناب آقای مهندس مهدی حجازی مدیرعامل محترم این شرکت که هزینه‌های مطالعه را پرداخت نمودند، مراتب سپاس و امتنان خود را اعلام می‌دارند.

## تعارض منافع

نویسندگان متعهد می‌گردند در این مقاله با خود یا دیگران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

## منابع مالی

هزینه‌های مطالعه توسط شرکت تعاونی تولیدی-توزیعی رازی البرز تأمین و پرداخت شده است.

## منابع

- Abdoshah, M., Pourbakhsh, S., Peighambari, S., Shojadoost, B., Momayez, R. & Mojahedi, Z. (2012). Pathogenicity indices of Newcastle disease viruses isolated from Iranian poultry flocks in Iran. *Journal of Veterinary Research* 67(2): 159-164 (In persion).
- Ahmed, A. & Odisho, S. M. (2018). Isolation identification and pathotyping of newcastle disease viruses form naturally infected chickens in Iraqi Kurdistan region. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences* 49(1): 132-141.
- Alexander, D. (1995). The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *Journal of Comparative Pathology* 112(2): 105-126.
- Alexander, D. J., 2008. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infection. In: Shaif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R. and McDougald, L.R. *Disease of Poultry*. Blackwell, Oxford, UK, pp. 75-100.
- Allan, W. H., Lancaster, J. E. & Toth, B., 1978. Newcastle disease vaccines, their production and use. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Allayari, E., Allymehr, M., Molouki, A. & Fallah, M. (2020). Molecular characterisation and phylogenetic study of the fusion gene of Newcastle disease viruses isolated from broiler farms of Iran in 2018-2019. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 1-12.
- Dhaygude, V., Sawale, G., Chawak, M., Bulbule, N., Moregaonkar, S. & Gavhane, D. (2017). Molecular characterization of velogenic viscerotropic Ranikhet (Newcastle) disease virus from different outbreaks in desi chickens. *Veterinary World* 10(3): 319-323.
- Dimitrov, K. M., Abolnik, C., Afonso, C. L., Albina, E., Bahl, J., Berg, M., Briand, F.-X., Brown, I. H., Choi, K.-S. & Chvala, I. (2019). Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infection, Genetics and Evolution* 74:103917.
- Dortmans, J. C., Koch, G., Rottier, P. J. & Peeters, B. P. (2011). Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Veterinary Research* 42(1): 1-11.
- Ghalyanchilangeroudi, A., Hosseini, H., Jabbarifakhr, M., Fallah Mehrabadi, M. H., Najafi, H., Ghafouri, S. A., Mousavi, F. S., Ziafati, Z. & Modiri, A. (2018). Emergence of a virulent genotype VIIi of Newcastle disease virus in Iran. *Avian Pathology* 47(5): 509-519.
- Goudarzi, H., Borm, S., Bashashati, M., Sabouri, F., Abdoshah, M., Nouri, A., Banani, M., Ebrahimi, M. M. & Molouki, A. (2019). Characterization and full genome sequencing of a velogenic Newcastle disease virus (NDV) strain Ck/IR/Beh/2011 belonging to subgenotype VII (L). *Acta Virologica* 63(2): 217-222.
- Istimewa, D. (2016). Molecular pathotyping of Newcastle disease virus from naturally infected chickens by RT-PCR and RFLP methods. *Asian Journal of Animal Sciences* 10(1): 39-48.
- Leitner, G., Heller, E. D., Friedman, A. J. V. i. & immunopathology (1989). Sex-related differences in immune response and survival rate of broiler chickens. 21(3-4): 249-260.
- Miller, P. J., Decanini, E. L. & Afonso, C. L. (2010). Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection, Genetics and Evolution* 10(1): 26-35.
- Mohan, C. M., Dey, S. & Kumanan, K. (2005). Molecular changes of the fusion protein gene of chicken embryo fibroblast-adapted velogenic Newcastle disease virus: effect on its pathogenicity. *Avian Diseases* 49(1): 56-62.
- Molouki, A., Mehrabadi, M. H. F., Bashashati, M., Akhijahani, M. M., Lim, S. H. E. & Hajloo, S. A. (2019). NDV subgenotype VII (L) is currently circulating in commercial broiler farms of Iran, 2017-2018. *Tropical Animal Health and Production* 51(5): 1247-1252.
- OIE (2012). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009. *World Organisation for Animal Health*.
- Pattison, M., McMullin, P., Bradbury, J. M. & Alexander, D., 2008. Poultry Diseases. Elsevier Health Sciences, London, Pp: 1-624.
- Sabouri, F., Vasfi Marandi, M. & Bashashati, M. (2018). Characterization of a novel VIII sub-genotype of Newcastle disease virus circulating in Iran. *Avian Pathology* 47(1): 90-99.
- Smietanka, K., Minta, Z. & Domanska-Blicharz, K. (2006). Detection of Newcastle disease virus in infected chicken embryos and chicken tissues by RT-PCR. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 50(1): 3-7.
- Strochkov, V., Burashev, Y., Sandybayev, N., Xie, G., Erkkila, T. & Cui, H. (2020). Whole Genomes of Avian orthoavulavirus 1 (Newcastle Disease Virus Genotypes VIg or new genotype XXI.) in Wild Birds in Kazakhstan. *Virology and Mycology* 9(1): 1-9.
- van Boven, M., Bouma, A., Fabri, T. H., Katsma, E., Hartog, L. & Koch, G. (2008). Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Avian Pathology* 37(1): 1-5.
- Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Dempsey, D. M., Dutilh, B. E., Harrach, B., Harrison, R. L., Hendrickson, R. C. & Junglen, S. (2019). Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Archives of Virology* 164(9): 2417-2429.
- Zhang, Y.-y., Shao, M.-y., Yu, X.-h., Zhao, J. & Zhang, G.-z. (2014). Molecular characterization of chicken-derived genotype VIIId Newcastle disease virus isolates in China during 2005-2012 reveals a new length in hemagglutinin-neuraminidase. *Infection, Genetics and Evolution* 21: 359-366.
- Zhu, H., Zhang, H., Wang, Y., Ciren, D., Dong, H., Wu, Q., Rehman, M. U., Nabi, F., Mehmood, K. & Li, J. (2018). Phylogenetic and pathotypic characterization of newcastle disease virus in Tibetan chickens, China. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(1): 37-40.

Received: 30.05.2021

Accepted: 03.09.2021

## Evaluation of virulence and phylogenetic study of Newcastle disease virus isolated from broiler poultry farms in Mazandaran province

Mohammad Hassanzadeh<sup>1</sup>, Mohammad Abdolshah<sup>2\*</sup>, Ali Reza Yousefi<sup>2</sup>,  
Aidin Molouki<sup>2</sup> and Farhad Haghshenas<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Professor, Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

<sup>3</sup> Poultry Practitioner, Alborz Poultry Veterinary Hospital, Amol, Iran

Received: 30.05.2021

Accepted: 03.09.2021

### Abstract

Newcastle disease (ND) is one of the important viral diseases of poultry that causes considerable economic loss to breeding farms. Continuous evaluation of circulating virus genotypes and pathotypes is the crucial step to control the disease prevalence. The present study aimed to study the phylogenetic and pathogenicity indices of circulating ND virus (NDV) in poultry farms located in Mazandaran province during 2018. Following the isolation of the virus from the brains of the dead chickens in five different farms, intracerebral pathogenicity index (ICPI) and the mean death time (MDT) were determined. For phylogenetic analysis, virus RNA was extracted and following RT-PCR, the sequence of the F gene was determined and compared with those presented in the gene bank. Results showed that the isolated viruses had ICPI of 1.97 and MDT of 56 hours, related to the velogenic pathotype and their virulence was close to the standard strains of challenge viruses. Also, based on the results of phylogenetic analysis, the isolated viruses were classified as genotype VII. By determination of phenotypic and genotypic identity of the isolated viruses, the clinical evidence showing the velogenic and visceral form of ND was confirmed. The present study showed that the NDV causing mortality in commercial poultry farms during 2018 had virulence near to standard challenge strains and belonged to VII genotype and VII.1.1 subgenotype of NDV. Therefore, the isolated virus, as a local virulent strain, could be used in challenge tests and evaluation of the preventive vaccination programs.

**Key words:** Broiler, Genotype, Newcastle disease virus, Pathogenicity index, Phylogenetic analysis, Virulence

---

\* **Corresponding Author:** Mohammad Abdolshah, Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran  
E-mail: m.abdosah@rvsri.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).