مقاله کامل

دوره نوزدهم ـ شماره ۲ ـ تابستان ۱۴۰۲

DOI: 10.22055/IVJ.2022.318520.2420
DOR: 20.1001.1.17356873.1402.19.2.14.1

جداسازی و تعیین هویت مولکولی ویروس نیوکاسل در گله‌های مادر گوشتی استان مازندران طی سال‌های ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۰

سجاد فاریابی[۱]، منصور میاحی[۲*]، زهرا برومند[۳] و هادی حق‌بین‌نظرپاک[۴]

[۱] دانشجوی دکترای بهداشت و بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۲] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۳] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۴] دانشیار گروه علو درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار، ایران

دریافت: ۱۴۰۰/۹/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۴

چکیده

بیماری نیوکاسل باعث ایجاد عفونت در طیف گسترده‌ای از پرندگان می‌شود و به عنوان تهدیدی جهانی برای صنعت طیور به شمار می‌آید. به منظور جداسازی و تعیین هویت مولکولی ویروس نیوکاسل، از پرندگان تلف شده مشکوک به بیماری نیوکاسل ۱۵ گله مادر گوشتی واکسینه شده استان مازندران طی سال‌های ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۰ نمونه‌های بافتی نای و لوزه‌های سکومی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به تخم‌مرغ جنین‌دار ماکیان ۹ روزه تلقیح شدند و مایع آلانتوئیک جمع‌آوری شد. آزمون RT-PCR جهت ردیابی ژن F ویروس نیوکاسل در مایع آلانتوئیک انجام گرفت و محصول PCR سه نمونه تعیین توالی شد و درخت فیلوژنی رسم گردید. مقایسه نتایج توالی اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدی، جدایه‌های به دست آمده از ۳ گله مادر گوشتی نشان می‌دهد ژنوتیپ VIId در مزارع مادر گوشتی استان مازندران در گردش است که شباهت بین ۹۹ تا ۹۶ درصدی با سویه‌های قبلی کشور دارد. این مطالعه نشان داد، جداسازی ویروس نیوکاسل با ژنوتیپ VIId از مزارع مادر گوشتی واکسینه شده در طی دوره تولید بیان‌گر عدم موفقیت کامل واکسیناسیون در پیش‌گیری از بیماری نیوکاسل است و لازم است برنامه واکسیناسیون و نوع واکسن‌ها تغییر یابند.

کلمات کلیدی: بیماری نیوکاسل، مادر گوشتی، ژنوتیپ VIId ، RT-PCR

مقدمه

بیماری نیوکاسل[۱] یکی از مسری‌ترین بیماری‌های ویروسی است که تقریباً همه گونه‌های پرندگان با سنین مختلف را مبتلا می‌کند. این بیماری در بسیاری از کشورهای جهان به عنوان عامل محدودکننده گسترش صنعت طیور مطرح است. ویروس بیماری نیوکاسل در جنس *اورتواولاویروس* زیر خانواده جدید اولاویرینه[۲] از

*نویسنده مسئول : منصور میاحی، استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: mansoormayahi@scu.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/).

[1] Newcastle disease (ND)
[2] Avulavirinae

خانواده پارامیکسوویریده[1] قرار دارد (Dimitrov et al, 2019). در سال ۱۳۲۳ هجری شمسی، این بیماری برای نخستین بار در ایران به صورت همه‌گیری گسترده‌ای همراه با تلفات سنگین در ماکیان استان خوزستان گزارش شد و سپس در اطراف تهران گزارش گردید و هم‌زمان با شکل‌گیری صنعت طیور در کشور، یک مورد آلودگی از شهرستان تبریز در سال ۱۳۲۹ گزارش شد. تا قبل از ظهور ویروس آنفلوآنزای فوق حاد (H_5N_1)، این بیماری در بین بیماری‌های ویروسی طیور، از لحاظ تأثیرات اقتصادی و تلفات در صنعت طیور پیشتاز بود. طی سال‌های ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۹ حدود ۷۱ بیماری مهم دامی از کشورهای مختلف گزارش گردید، که با توجه به گزارشات ۵۶ کشور از ۱۶۷ کشور عضو OIE، بیماری نیوکاسل در رتبه دوم از حیث شیوع می‌باشد، البته این آمار ممکن است کم‌تر از تعداد واقعی باشد زیرا با توجه به تنوع نشانه‌های بالینی در بسیاری از موارد، بیماری نیوکاسل قابل تشخیص نمی‌باشد (Miller and Koch, 2013). ظهور مداوم انواع ویروس بیماری نیوکاسل و گسترش وسیع ویروس در جمعیت پرندگان منجر به تنوع ژنتیکی قابل توجه ویروس شد. در مطالعه Shabani و همکاران در ۶۰ درصد نای شترمرغ‌های استان اصفهان نیوکاسل جدا کردند و نتیجه گرفتند ویروس نیوکاسل سهم بالایی در ایجاد تلفات در گله‌های شترمرغ دارد (Shabani et al, 2017). نشانه‌های بیماری نیوکاسل، بسته به پاتوتیپ ویروس، گونه‌ی پرنده، ساختار ایمنی، سن، شرایط پرورش و عفونت‌های هم‌زمان متفاوت هستند. در ماکیان بالغ نشانه‌های تنفسی و عصبی، تورم ناحیه سر، تلفات، تولید تخم‌مرغ‌های بدون پوسته یا با پوسته نرم، کاهش تولید تا قطع کامل تخم‌گذاری از نشانه‌های بیماری در ماکیان بالغ است. سویه‌های سروتیپ یک *پارامیکسوویروس* پرندگان (اورتواولاویروس یک)، به دو کلاس I و II تقسیم می‌شوند و از پرندگان اهلی و وحشی جدا شده‌اند و به حداقل ۲۱ ژنوتیپ تقسیم می‌شوند. برای پیش‌گیری از بیماری، واکسیناسیون با واکسن‌های حاصل از سویه‌های متعلق به ژنوتیپ‌های I یا II انجام می‌گیرد. Ghalyanchilangeroudi و همکاران (۲۰۱۸) یک تحت ژنوتیپ جدید را در مزارع ایران گزارش کردند. 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). تحلیل فیلوژنتیک توالی‌های ژنوم ویروس، در بسیاری از آزمایشگاه‌ها روشی استاندارد برای تعیین خصوصیت سویه‌های ویروس بیماری نیوکاسل است. با توجه به اهمیت ژن F در تعیین حدت ویروس، در ابتدا تحلیل‌های فیلوژنتیکی بر روی توالی بخشی از این ژن انجام می‌شد، ولی تلاش‌های اخیر توالی کامل ژن F یا ژنوم کامل ویروس‌ها را مورد مقایسه قرار می‌دهند. برای تعیین حدت ویروس با استفاده از تکنیک‌های مولکولی، تحلیل توالی بخشی از ژن پروتئین F به طول ۲۷۴ جفت باز، که شامل محل شکافت پیش‌ساز F. به قطعات F_1 و F_2 است، کفایت می‌کند (Saurez 2020). Sultan و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش کردند در مناطق درگیر با سویه VII نیوکاسل استفاده از واکسن‌های زنده به همراه واکسن‌های کشته منجر به کاهش دفع ویروس و افزایش تولید تخم مرغ در گله‌های تخم‌گذار تجاری می‌شود. Molouki و همکاران در سال ۲۰۲۱ گزارش نمودند به استثنای خانواده کبوتر تحت ژنوتیپ VII.1.1 ژنوتیپ غالب بسیاری از پرندگان ایران است ولی در کشورهای همسایه تحت ژنوتیپ غالب VII.2 می‌باشد.

در خصوص جداسازی ویروس بیماری نیوکاسل از مزارع مرغ مادر گوشتی واکسینه شده در کشورمان و جهان، مطالعات چاپ شده و در دسترس محدودی وجود دارد و در حال حاضر در مزارع مادر گوشتی واکسیناسیون با واکسن‌های زنده و کشته به منظور افزایش سطح ایمنی گله، پیش‌گیری از بیماری و نیز انتقال ایمنی مادری به نتاج انجام

1 Paramyxoviridae

می‌شود، با این وجود از درگیری گله‌های مادر کشورمان به بیماری نیوکاسل گزارشات متعددی وجود دارد که باعث تلفات و افت تولید قابل ملاحظه می‌گردد. مطالعه حاضر به منظور بررسی علت موفق نبودن واکسیناسیون در برخی از مزارع مادر گوشتی مازندران و تعیین جدایه ویروس نیوکاسل این مزارع و بررسی احتمال نقش واکسن‌های استفاده در این مزارع با شکست واکسیناسیون و بروز بیماری است.

مواد و روش کار

از بین مزارع تحت نظر نمونه‌گیری از ۱۵ مزرعه مرغ مادر گوشتی واکسینه شده ضد بیماری نیوکاسل استان مازندران مشکوک به بیماری نیوکاسل با نشانه‌های تنفسی و کاهش تولید بیش از ۱۰ درصد در فاصله زمانی بهار ۱۳۹۹ تا بهار ۱۴۰۰ و با ثبت مشخصات هر گله در کاربرگ مخصوص انجام گردید. از هر مزرعه مشکوک به بیماری که با نشانه‌های تنفسی، کاهش تولید و تلفات همراه بود نمونه‌های بافتی نای و لوزه‌های سکومی از ۱۰ قطعه جمع-آوری شد. نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ارسال و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

نمونه‌های بافتی هر پرنده به طور جداگانه در هاون استریل کوبیده و با نرمال‌سالین سانترفیوژ گردید و سپس مایع رویی جدا شده و به نسبت یک به ده پنی‌سیلین IU/ml ۱۰۰۰۰، استرپتومایسین ۱۰۰۰۰µg/ml، جنتامایسین ۵µg/ml، آمفوتریسین B ۵µg/ml اضافه گردید. ۰/۲ میلی-لیتر از هر نمونه بافتی به ۵ تخم‌مرغ جنین‌دار ۹ روزه تلقیح گردید و در ادامه تخم‌مرغ‌ها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵ درصد منتقل شدند. پس از تلقیح تخم‌مرغ‌ها به طور روزانه مورد بررسی قرار گرفته و تلفات ۲۴ ساعت اولیه حذف و بعد از ۴۸ ساعت به یخچال منتقل گردید و مایع آلانتوئیک در شرایط سترون برداشت شد. پس از آزمون RT_PCR موارد منفی به صورت سریالی تا ۳ بار پاساژ داده شدند.

جهت استخراج RNA ویروس، ۲۰۰ میکرولیتر از مایع آلانتوئیک به صورت جداگانه برداشته شده و با استفاده از کیت Qiagn Rneasy mini Kit (ساخت کشور آلمان) استخراج RNA، طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت عمل شد.

جهت سنتز cDNA از کیت شرکت RevertAID First Strand cDNA Synthesis Kit (ساخت کشور آلمان) استفاده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده عمل شد. cDNA ساخته شده در فریزر در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت انجام واکنش PCR از پرایمرهای اختصاصی ژن F استفاده گردید و قطعه‌ای به طول ۳۶۲ نوکلئوتید که شامل محل شکافت پروتئین F می‌باشد، تکثیر یافت (Kant et al, 1997).

میزان عوامل شرکت کننده در واکنش شامل: مستر میکس 2X با غلظت ۱/۵ mM، MgCl2 (آمپلیکون، کانادا) ۱۰ µl، آغازگرهای اختصاصی ژن F، ndvf (TT GAT GGC AGG CCT CTT GC) و ndvr (GG AGG ATG TTG GCA GCA TT) هر کدام ۱۰ pmol/ µl (۳)، DNA الگو ۳ µl، آب ۶ µl در حجم نهایی ۲۰ µl و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و شرایط دمایی ۹۵^{0}C ، به مدت سه دقیقه واسرشت اولیه (Early Denaturation) و ۴۰ سیکل شامل واسرشت (Denaturation) در دمای ۹۵^{0}C به مدت ۳۰S، اتصال پرایمر (Annealing) در دمای ۵۵^{0}C به مدت ۶۰S و امتداد (Extension) در دمای ۷۲^{0}C به مدت ۶۰ S تکرار شد و به دنبال آن نیز امتداد نهایی (Final Extension) در دمای ۷۲^{0}C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل واکنش PCR یک نمونه کنترل منفی (آب DEPC به جای DNA الگو) و یک نمونه کنترل مثبت (RNA استخراج شده از واکسن B1) قرار داده شد.

توالی پرایمرها و برنامه‌های دمای آزمون PCR در Table 1 آورده شده است.

محصولات PCR در ژل آگارز یک درصد رنگ‌آمیزی با رنگ ایمن، به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شده در برابر نور UV تصویربرداری به عمل آمد. مارکر مورد استفاده DNA، 100 (ساخت شرکت سیناژن، ایران) بود (Figure 1).

Table 1: Used primer sequences (Kant et al., 1997)

Primer sequence	Time and temperature of cycles			Cycle	Product size
	Denaturation	Anealing	Elongation		
F: 5-TTG ATG GCA GGC CTC TTG C-3 R: 5-GGA GGA TGT TGG CAG CAT T-3	95 30 Second	72 30 Second	72 60 Second	40	362

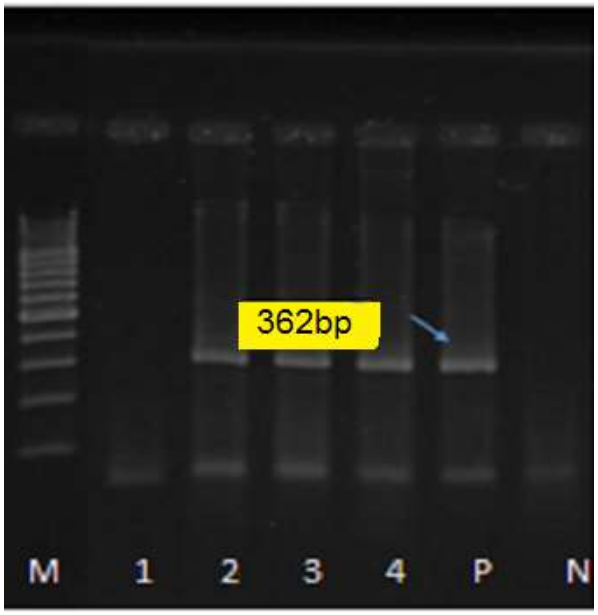

Figure 1: RT-PCR- Electrophoresis production; Band size:362 bp, Marker; 100 bp, N: Negative control, P: Positive control (vaccine strain), ; Positive samples, number 2 up to 4; Negative sample, number one.

به میزان ۵۰ میکرولیتر از محصول PCR نمونه‌های مثبت (جمعاً سه نمونه از سه مزرعه) به همراه ۱۰ میکرولیتر از هرکدام از آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در واکنش به شرکت تکاپو زیست جهت خالص‌سازی و ارسال به شرکت کره‌ای BIONEER برای تعیین توالی فرستاده شد (سرویس توالی یابی شرکت BIONEER، با عنوان Next Generation Sequencing Service توالی‌یابی نسل بعدی (NGS) یک فناوری توالی یابی با توان بالاست که جهت تعیین توالی محصول PCR در این شرکت مورد استفاده قرار میگیرد). توالی نوکلئوتیدی (به طول ۳۶۲ جفت باز از نوکلئوتید ۹۵ تا ۴۵۷ ژن فیوژن) به جدایه‌های این مطالعه با یکدیگر و با جدایه‌های قبلی از ایران، کشورهای همسایه و سویه‌های مرجع NDV در مرکز ملی بیوتکنولوژی اطلاعات پایگاه داده (http://ncbi.nlm.nih.gov) با استفاده از nBLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) و نرم‌افزار ClustalW2 مقایسه شد.

نتایج

در بررسی نمونه‌های بافت‌های نای و لوزه‌های سکومی اخذ شده از مزارع مرغ مادر واکسینه از بهار ۱۳۹۹ تا بهار ۱۴۰۰ در استان مازندران، ویروس بیماری نیوکاسل از ۳ مزرعه از ۱۵ مزرعه با آزمون RT-PCR مثبت گردید (Table 2).

Table 2: Results of Molecular Identification of NDV from Breeder Broiler Farms in Mazandaran Province positive samples/total samples

broiler breeder number	Age of broiler flocks (week)	Vaccine program					Samples		Isolated genotype
		Kill vacc ND	Avinew	B1	Clone	Lasota	Trachea	Caecal Toncil	
1	21	3	1	2	4	2	-	-	-
2	52	4	1	4	7	4			-
3	41	3	2	4	5	4	8/10	5/10	VIId
4	16	1	-	3	3	1	-	-	-
5	24	3	1	2	4	2	5/10	7/10	VIId
6	31	3	1	2	5	3	-	-	-
7	25	3	2	3	3	3	-	-	-
8	14	2	-	2	3	1	-	-	-
9	33	3	2	3	4	2	6/10	-	VIId
10	51	3	1	2	6	3	-	-	-
11	19	2	-	3	3	1	-	-	-
12	31	3	-	4	4	2	-	-	-
13	22	3	1	3	3	1	-	-	-
14	18	2	1	1	2	2	-	-	-
15	11	1	-	3	2	1	-	-	-

از مجموع ۴۵۰ نمونه‌ای که به مایع الانتوئیک تخم‌مرغ جنین‌دار تزریق شدند، ۴۲ مورد مثبت در آزمون RT-PCR به دست آمد که یک مورد مثبت از هر مزرعه جهت تعیین توالی به شرکت BIONEER کره جنوبی ارسال گردید و توالی به دست آمده در برنامه BLAST سایت NCBI قرار گرفت. همچنین توالی‌های مورد نظر با سایر ژنوتیپ‌های شناسایی شده در ایران، کشورهای همسایه و سایر نقاط جهان، مقایسه و درصد تشابه نوکلوئتیدی و آمینواسیدی به دست آمد. توالی‌های به دست آمده در بانک ژن ثبت و شماره دسترسی گرفتند (Table 3).

Table 3: Isolated virus

Isolate name	Access number	Genotype	Cleavage site
IR/H2316-4/18	MZ747022	VIId	SSGGRRQKRFIG
IR/H2612-1/18	MZ747023	VIId	TSGGRRQKRFIG
IR/H2614-1/18	MZ747025	VIId	MSGGRRQKRFIG

با بررسی نتایج مشخص گردید که توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده MZ747022، MZ747023 و MZ747025، در این مطالعه، ۹۶ تا ۹۸ درصد با یکدیگر تشابه داشتند (Table 4). جدایه‌های مطالعه حاضر بیش-ترین شباهت را با جدایه‌های (MN481197، MK659698، MK659698) از ایران داشتند که در شاخه تحت ژنوتیپ VIId قرار گرفتند.

Table 4: Nucleotide similarity of isolated sequences

	IR/H2316-4/18	IR/H2612-1/18	IR/H2614-1/18
IR/H2316-4/18	*	97.83%	96.90%
IR/H2612-1/18	97.83%	*	98.45%
IR/H2614-1/18	96.90%	98.45%	*

بررسی مقایسه توالی آمینواسیدی ناحیه شکست ژن F0 موجود در این مطالعه (Table 5) با برخی جدایه‌های مهم ویروس نیوکاسل از طریق پایگاه اطلاعاتی www.Web.expasyorg.translate انجام گرفت و مشخص گردید همه جدایه‌ها به لحاظ بیماری‌زایی دارای توان بالایی می‌باشند (تصویر ۲).

Table 5. The amino acid sequences of F protein cleavage site of some previous isolates (Suarez et al, 2020)

Virus strain	Virulence[a]	ICPI	Cleavage site AA 111-118[b]
Herts33	High	1.88	G-R-R-Q-R-R↓F-I
Essex ’70	High	1.86	G-R-R-Q-K-R↓F-V
135/93	High	1.30	V-R-R-K-K-R↓F-I
617/83	High	1.46	G-G-R-Q-K-R↓F-I
34/90	High	1.81	G-K-R-Q-K-R↓F-I
Beaudette	High	1.46	G-R-R-Q-K-R↓F-I
Karachi/SPV/33	High	1.85	G-R-R-Q-R-R↓F-I
Kvuzat-Yavne/50-826	High	1.89	G-R-R-Q-K-R↓F-I
Australian isolates			
Peats Ridge	Low	0.41	G-R-R-Q-G-R↓L-I
QV4	Low	0.39	G-K-R-Q-G-R↓L-I
Somersby 98	Low	0.51	G-R-R-Q-R-R↓L-I
Dean Park	High	1.60–1.70	G-R-R-Q-R-R↓F-I
PR-32	Low	0.64	G-K-R-Q-G-R↓F-I
African isolates			
Chicken/MG/’92	High	[c]_	G-R-R-R-R-R↓F-V
Niger/1377-7/06	High	1.84	G-R-R-Q-K-R↓F-I
Nigeria/228-7/06	High	1.90	G-R-R-Q-R-R↓F-I
Chicken/Mali/’07	High	[c]_	G-R-R-R-K-R↓F-V
Burkina Faso/2415-580/08	High	1.69	G-R-R-R-K-R↓F-I
South Africa/08100426/08	High	1.91	G-R-R-R-K-R↓F-I

a Virulence for chickens.

b ↓ = cleavage point. Basic amino acids in bold. Note that all virulent viruses have phenylalanine (F) at position 117 (the F1 N terminus).

c Unknown ICPI.

رابطه فیلوژنتیک توسط نرم‌افزار one click در سایت http://www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi محاسبه شد و در نهایت درخت فیلوژنی با استفاده از روش Neighbor joining method و نرم‌افزار MEGA 6.0 به دست آمد. پایداری توپولوژیک درخت توسط ۱۰۰۰ تکرار بوت‌استرپ مورد ارزیابی قرار گرفت (Figure 2).

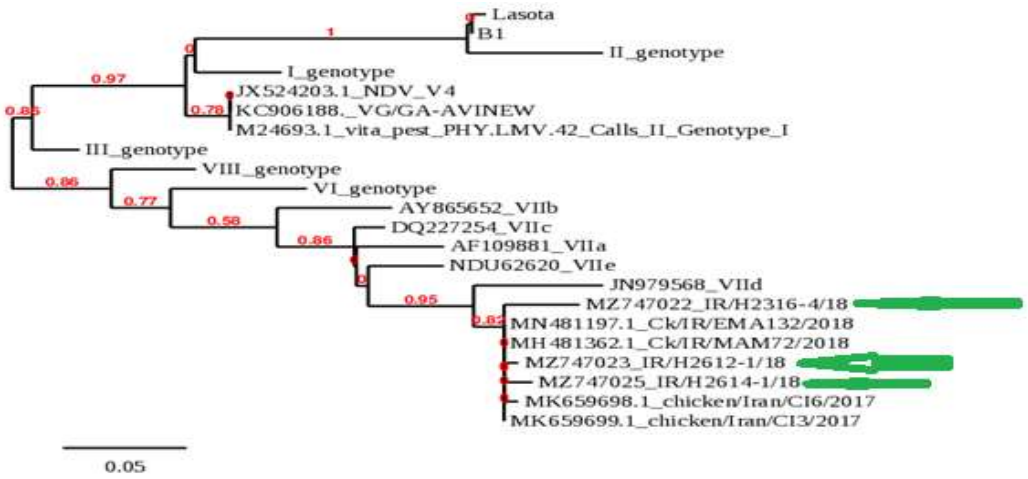

Figure 2. The phylogenetic tree based on the partial F gene nucleotide sequence of isolates obtained from this study (detected by green)

بحث

در بین بیماری‌های ویروسی پرندگان، بیماری نیوکاسل تا قبل از بروز آنفلوانزای فوق حاد، بیش‌ترین میزان تلفات و خسارات اقتصادی را به صنعت طیور در تمامی نقاط دنیا وارد می‌کرد. با توجه به شکل بالینی این بیماری با سایر بیماری‌های ویروسی از قبیل آنفلوانزا و برونشیت عفونی، ضروری است از روش‌های مولکولی جهت تأیید تشخیص سریع بیماری استفاده کرد. در بسیاری موارد در کمپلکس-های تنفسی ویروس نیوکاسل جدا می‌گردد و باید به واکسینه بودن یا نبودن آن توجه ویژه‌ای شود که در این میان روش‌های مولکولی همچون RT-PCR از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند (Abdolshah et al, 2012). مطالعات مولکولی معدودی بر روی پارامیکسوویروس تیپ یک پرندگان در مزارع مرغ مادر گوشتی کشور واکسینه شده صورت گرفته است. بر این اساس مطالعه حاضر با هدف ردیابی ویروس عامل بیماری نیوکاسل در ۱۵ مزرعه مادرگوشتی مشکوک به بیماری انجام گرفت و محصول PCR سه گله مثبت تعیین توالی شدند. بر اساس تعیین توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه در محل شکاف پروتئین ژن F ، هر سه جدایه بیماری‌زا و در ژنوتیپ VIId قرار گرفتند. تا کنون ژنوتیپ‌های متنوعی از ویروس نیوکاسل از نقاط مختلف دنیا ثبت گردید که ژنوتیپ VIId از فراوانی بیش-تری برخوردار است. Rahimian و همکاران (۲۰۱۱) با مطالعه بر روی ۲۰ نمونه بافتی جدا شده از طیور گوشتی مبتلا به بیماری نیوکاسل به همراه ۱۷ نمونه ویروسی مشکوک رشد کرده در مایع آلانتوئیک، بعد از انجام آزمون PCR ردیف نوکلئوتیدی ژن F ویروس بیماری نیوکاسل مربوط به ۴ نمونه مثبت شده در آزمایش RT- PCR ، با توالی 112RRQRR116*F117 گزارش نمودند. Rostamali و همکاران (۲۰۱۳) بین سال‌های ۱۳۸۹–۱۳۹۰ به دنبال همه‌گیری بیماری نیوکاسل در مزارع گوشتی، مادر و تخم‌گذار، از ۱۰ نمونه جمع‌آوری شده از یزد، اردبیل، سمنان، اصفهان، ایلام و مازندران و آنالیز سکانس اسید آمینه ناحیه شکسته شدن گزارش نمودند همه جدایه‌ها دارای توالی RRQKRF می‌باشند. در مطالعه Samadi و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای بر روی ویروس‌های بیماری نیوکاسل مشخص نمودند، ویروس حاد در جایگاه شکست پروتئین امتزاجی دارای توالی 112RRQRR116*F117 است. در این مطالعه سویه‌های جدا شده دارای موتیف آمینواسیدی سویه‌های حاد با ترادف R-R-RQ-R در حد فاصل آمینواسیدهای 112-116 و فنیل‌آلانین در موقعیت اسیدی ۱۱۷ می‌باشند. وجود آمینواسیدهای جفت بازی در جایگاه شکست پروتئین امتزاجی از خصوصیات انواع NDV حاد بوده و امکان تکثیر و توزیع گسترده آن‌ها را فراهم ساخته است. Gowthaman و همکاران (۲۰۱۱) با

بررسی یک بیماری همراه با نشانه‌های تنفسی و مرگ و میر شدید در گله مرغ مادر گوشتی ۳۵ هفته، عامل این بیماری را ویروس با حدت بالا تشخیص دادند که در مدت ۴۸ ساعت منجر به تلفات جنین در تخم‌مرغ‌ها گردید و مایع آلانتوییک تیتر $HA\ 2^9$ را نشان داد و ژن F ویروس بیماری نیوکاسل بر اساس آزمایش RT-PCR در نمونه‌های مایعات آمنیوآلانتوئیک تأیید شد. در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۱۲) بر روی ۴۲ گله مرغ مادر گوشتی از نه استان کشور چین در سال های۲۰۱۰–۲۰۱۱ نشان دادند که ویروس نیوکاسل CK-JSX1-201005 در گله‌های مرغ مادر گوشتی واکسینه شده با واکسن‌های زنده و کشته منجر به کاهش تولید از ۸۰ درصد به ۳۰ درصد الی ۴۰ درصد شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک نشان داد NDV CK-JSX1-201005 متعلق به ژنوتیپ VII و به طور خاص به زیر ژنوتیپ VIId است. ژنوتیپ VIId پاتوژن غالب اکثر شیوع بیماری‌های نیوکاسل در چین بوده است. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک نشان داد که NDV CK-JSX1-201005 متعلق به ژنوتیپ VII و به طور خاص به زیر ژنوتیپ VIId است. Ghalyanchilangeroudi و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی توالی ژن پروتئین ماتریکس (M) از سه سویه ویروس بیماری نیوکاسل جدا شده از مزارع طیور کشورمان (گوشتی، مادر، تخم‌گذار)، طی سال‌های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۱ نشان دادند هر سه سویه با ویروس‌های کلاس II تقسیم-بندی شده‌اند که از نظر فیلوژنتیکی نزدیک به ژنوتیپ VIIb و VIId می‌باشد. Umali و همکاران (۲۰۱۵) در ژاپن با مطالعه بر روی یک گله تخم‌گذار که در تشخیص بالینی گله اندکی کاهش تولید و افزایش قابل توجه تولید تخم‌های پوسته نرم و بدون تلفات مشاهده نمودند، با تجزیه و تحلیل ژنتیکی مشخص گردید که گله علاوه بر ویروس برونشیت عفونی، به ویروس نیوکاسل نیز آلوده بود. این نتایج نشان می‌دهد که متخصصان طیور باید به دنبال نیوکاسل ولوژنیک آتیپیک به ویژه در گله‌های مرغ تجاری واکسینه شده باشند، که ممکن است بیماری نیوکاسل به شکل عفونت پنهان داشته باشند. Morla و همکاران (۲۰۱۶) بر روی بیولوژی و ژنوتیپ ویروس نیوکاسل در مزارع مرغ تخم‌گذار و طیور بومی پاکستان مطالعه‌ای انجام دادند و گزارش کردند هر هشت نمونه ویروس نیوکاسل جدا شده دارای توالی 112RRQRR116*F117 هستند. در بررسی Boroomand و همکاران (۲۰۱۶) از مزارع مرغ گوشتی تجاری واکسینه شده و با تلفات بالا در اهواز در سال‌های ۲۰۱۳– ۲۰۱۴، همه جدایه‌ها را دارای توالی اسید آمینه 112RRQKRF117 گزارش نمودند و توالی آن‌ها را ژنوتیپ VIId در کلاس II گزارش نمودند. تحقیق آن‌ها نشان داد ویروس فوق حاد بیماری نیوکاسل در گله‌های گوشتی تجاری اهواز در گردش می‌باشد. Mayahi و Esmaelizad (۲۰۱۷) طی مطالعه‌ای که از سال ۱۹۹۵ تا ۲۰۱۶ بر روی ژنوتیپ‌های درگیر کننده ویروس نیوکاسل مزارع کشور انجام داده‌اند، ژنوتیپ‌های VIg, VIj, VIIj, VIId, XIIIa و XIIId را گزارش نمودند و بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌ها، جدایه VIg دارای بیش‌ترین شباهت توالی با جدایه‌های روسی و لهستانی تحت ژنوتیپ VIg و جدایه‌های زیر ژنوتیپ VIj بیش‌ترین تشابه را با ویروس جدا شده از هند در سال ۲۰۱۵ می‌باشد. Gowthaman و همکاران (۲۰۱۹) با مطالعه‌ای که بر روی ۳۷ گله تخم‌گذار تجاری انجام دادند، گزارش کردند عفونت هم‌زمان ژنوتیپ XIII ویروس بیماری نیوکاسل با آنفلوانزای پرندگان با بیماری‌زای کم (H9N2)، شدت نشانه‌های بالینی بیماری نیوکاسل را در گله‌های مرغ-تخمگذار تجاری واکسینه شده بیش‌تر نموده بود. همچنین، عفونت‌های ناشی از *اشریشیا کلی* و مایکوپلاسما در اکثر پرندگان بیمار/ تلف شده، در گله‌های آلوده در مدت زمان پیشرفت بیماری بالینی تشخیص داده شد. Ahmadi و همکاران (۲۰۲۱) ۳۰ نمونه از مزارع مشکوک گوشتی استان مرکزی، شامل مغز، نای، ریه و طحال را جمع آوری نمودند وپس از آماده سازی به جوجه‌های SPF ۹ تا ۱۱ روزه تزریق کردند. نتایج RT-PCR آن‌ها بر اساس ژن F نشان داد، تمام جدایه‌های NDV متعلق به ژنوتیپ VII و تحت ژنوتیپ VII-j بود. Moussa و همکاران (۲۰۲۱) مزارع گوشتی مصر را از نظر ویروس بیماری نیوکاسل بررسی

کردند. تمامی ویروس‌های جدا شده از ژنوتیپ VII و دارای قسمت کلیواژ 112RRQKRF117 بودند که مشابهت بسیار زیادی با سویه چینی Chicken/China/SDWF07/2011 داشتند. Suputri و همکاران (۲۰۲۱) از مزارع گوشتی و تخم‌گذار آلوده به NDV نمونه‌برداری کردند. نتایج آن‌ها نشان داد ۱۰ ویروس نیوکاسل جدا شده دارای موتیف R-R-Q-K-R-F در قسمت کلیواژ خود بودند. بررسی فیلوژنیک ژن F نشان داد که جدایه‌ها در ژنوتیپ VII.2 قرار می‌گیرند.

مطالعه حاضر نشان داد جداسازی ویروس بیماری نیوکاسل با ژنوتیپ VIId از مزارع مادر گوشتی واکسینه شده مازندران در طی دوره تولید بیان‌گر عدم موفقیت کامل واکسیناسیون در پیش‌گیری از بیماری نیوکاسل است و لازم است برنامه واکسیناسیون و نوع واکسن‌های به کار رفته تغییر یابند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهش و فن‌آوری دانشگاه شهید چمران اهواز برای تأمین منابع مالی این پروژه تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع مالی

هزینه‌های انجام این پژوهش به وسیله حمایت مالی دانشگاه شهید چمران اهواز (پژوهانه شماره SCU.V1400.145) تأمین شده است.

منابع

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.

Abdolshah, M., Pourbakhsh, S.A., Peighambari, S.M., Shojadoost, B., Momayez, R., Mojahedi, Z. (2012). Pathogenicity indices of Newcastle disease viruses isolated from Iranian poultry flocks in Iran. J Vet Res, 67(2), 159-164.

Ahmadi, E., Pourbakhsh, S. A., Ahmadi, M., Mardani, K., & Talebi, A. (2016). Phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease viruses isolated during outbreaks in northwestern Iran in 2010. *Archives of virology*, *161*(11), 3151-3160.

Ahmadi, M., Ebrahimi, M.M., Shahsavandi, S., Ebrahimi, S., Hamidi, A., & Ghaemmaghami, S. (2021). Identification and phylogenetic analysis based on Newcastle disease virus gene F isolated from broiler poultry farms in Markazi province. *Veterinary Researches & Biological Products*, *34*(2), 20-31.

Boroomand, Z., Jafari, R. A., & Mayahi, M. (2016). Molecular characterization and phylogenetic study of the fusion genes of Newcastle disease virus from the recent outbreaks in Ahvaz, Iran. *Virusdisease*, *27*(1), 102-105.

Chen, F., Liu, J., Liu, D., Yan, Z., Ji, J., Qin, J., ... & Xie, Q. (2012). Complete genome sequence of a Newcastle disease virus strain isolated from broiler breeder flocks in China. American Society for Microbiology Journals (2012): 12461-12462.

Dimitrov, K. M., Abolnik, C., Afonso, C. L., Albina, E., Bahl, J., Berg, M., ... & Diel, D. G. (2019). Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infection, Genetics and Evolution*, *74*, 103917.

Ghalyanchilangeroudi, A., H., Hosseini, M., Karimi, V., Hashemzadeh, M., Estabragh, A. S., & Madadgar, O. (2014). Phylogenetic study base on matrix gene of Iranian Newcastle disease virus isolates, 2011-2012. *Comparative Clinical Pathology*, *23*(1), 77-81.

Ghalyanchilangeroudi, A., H. Hosseini, M. Jabbarifakhr, M. H. Fallah Mehrabadi, H. Najafi, S.A. Ghafouri, F.S. Mousavi, Z. Ziafati and A. Modiri.(2018). Emergence of a virulent genotype VIIi of Newcastle disease virus in Iran. Avian Pathology, 47 (5): 509-519.

Gowthaman, V., Singh, S. D., Dhama, K., Ramakrishnan, M. A., Malik, Y. P. S., Murthy, T. G. K., ... & Munir, M. (2019). Co-infection of Newcastle disease virus genotype III with low pathogenic avian influenza exacerbates clinical outcome of Newcastle disease in vaccinated layer poultry flocks. *VirusDisease*, *30*(3), 441-452.

Gowthaman, V., Singh, S. D., Dhama, K., Barathidasan, R., & Ramakrishnan, M. A. (2011). Pathology and molecular diagnosis of Newcastle disease virus infection in broiler breeders. *Indian Journal of Veterinary Pathology*, *35*(2), 168-170.

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.

Mayahi, V., & Esmaelizad, M. (2017). Molecular evolution and epidemiological links study of Newcastle disease virus isolates from 1995 to 2016 in Iran. *Archives of virology*, *162*(12), 3727-3743.

Miller, PJ. and Koch, G. (2013). Newcastle disease. In: Swayne, DE.; Glisson, JR.; Mcdougald, LR.; Nolan, LK.; Suarez, DL. and Venugopal, N. (Eds). Diseases of Poultry. 13th ed. Blackwell Publishing Professional. Ames, Iowa, USA, PP 89-107.

Molouki, A., Sotani, M., Mehrabadi, M. H. F., Shoushtari, A., Abtin, A., Akhijahani, M., Abdolshah M., ... & Lim, S. H. E. (2021). Predominance of Fourth Panzootic Newcastle Disease Virus Subgenotype VII. 1.1 in Iran and Its Relation to the Genotypes Circulating in the Region. *Current microbiology*, 78(10):3068-3078.

Morla, S., Shah, M., Kaore, M., Kurkure, N. V., & Kumar, S. (2016). Molecular characterization of genotype XIIIb Newcastle disease virus from central India during 2006–2012: evidence of its panzootic potential. *Microbial pathogenesis*, *99*, 83-86.

Moussa, S. A., Abdullah, M. A. M., Saied, M., Saleh, M., Soliman, M. A., & Zanaty, A. M. (2021). Genotyping of recent virulent Newcastle disease virus strains isolated from Menofia governorate, Egypt. *Hosts and Viruses*, *8*(1), 1-7.

Rahimian M. D., Zamani Moghadam A. K., Mumtaz, H, and N. M. Hossein. (2011). Identification and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus by molecular method in industrial poultry of Isfahan province.*Journal of Veterinary Microbiology*, *7*(2): 25-36.

Rostamali, T., Shushtari, A.H., Charkhkar, S., Bozorgmehrifard, M.H. (2013) Phylogenetic analysis of F gene of Newcastle viruses isolated in Iran in 2010 and 2011. *Comparative pathobiology*, number 4, pages 1065-1070.

Samadi S, Kiani zadeh M, Fathi Najafi M, Mousavi nasab S D, Hossein Nia Davatgar A M, jafari M, .(2013). Identification of Newcastle Disease Virus F gene from Recent Outbreaks in Iran. *Journal. Ilam University. Med. Sci.; 21 (1) :135-142*.

Saputri, M. E., Poetri, O. N., & Soejoedono, R. D. (2021). Phylogenetic studies of Newcastle disease virus isolated from poultry flocks in South Sulawesi Province, Indonesia, in 2019. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, *8*(1), 129.

Shabani, A. A., Gholami-Ahangaran, M., & Momtaz, H. (2017). Molecular detection of Ornithbacterium rhinotracheale and Newcastle disease virus in ostriches of Isfahan province. *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal*, *11*(2 (42) Summer), 97-105.

Suarez, D. L., P. J. Miller, G. Koch, E. Mundt and S. Rautenschlein (2020). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections.PP.111-166.In: D. E. Swayne, M. Boulianne, C. M. Logue, L. R. McDougald, V. Nair, D. J. Suarez, S. Wit, T. Grimes, D. Johnson, M. Kromm, T. Y. Prajitno, L. Rubinoff and G. Zavala (eds.). Diseases of Poultry, 14th edn. Wiley Blackwell, New York.

Sultan, HA, Talaat S, Elfeil WK, Selim K, Kutkat MA, Amer SA, Choi KS (2020). Protective efficacy of the Newcastle disease virus genotype VII-matched vaccine in commercial layers. Poult Sci. 99(3):1275-1286.

Umali, DV., Ito H, Shirota K, Ito T, Katoh H. Atypical velogenic Newcastle disease in a commercial layer flock in Japan. Poult Sci. 2015;94(5):890-7.

Received: 06.12.2021
Accepted: 03.02.2022

Vol. 19, No. 2, Summer, 2023 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2022.318520.2420
DOR: 20.1001.1.17356873.1402.19.2.14.1

Isolation and Molecular Identification of Newcastle disease virus in broiler breeder flocks in Mazandaran province

Sajad Fariaby[1], Mansour Mayahi[2*], Zahra Boroomand[3] and Hadi Haghbin[4]

[1] DVSc Candidate in Avian Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[4] Associate Professor, Department of Avian Diseases, Garmsar Azad University, Garmsar, Iran

Received: 06.12.2021 Accepted: 03.02.2022

Abstract

The Newcastle disease virus (NDV) causes infection in a wide range of birds and is considered a global threat to the poultry industry worldwide. To isolate and identify the molecular NDV, trachea and caecal tonsil samples were collected from dead birds suspected to Newcastle disease from 15 vaccinated broiler breeder flocks in Mazandaran province during 2020 to 2021.The tissue samples after preparation were inoculated into 9-day-old embryonated chicken eggs. The RT-PCR reaction was performed to detect the F gene of NDV on allantoic fluids. The PCR products of 3 isolates were sequenced, and a phylogenetic tree was drawn. The results of comparing the amino and nucleotide sequences of partial F gene isolates obtained from Mazandaran province showed that genotype VIId is circulating in broiler breeder farms and is 99 to 96% similar to previous reported isolates in Iran. It was concluded that the isolation of VIId genotype from vaccinated broiler breeder flocks during the production period means that the present vaccination program could not successfully prevent Newcastle diseases in breeder farm and it is a necessary type of vaccine and changed vaccination program.

Key words: Newcastle disease, Broiler breeder, Genotype VIId, RT-PCR

* **Corresponding Author**: Mansour Mayahi, Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: mansoormayahi@Scu.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/).