



جداسازی و پاتوتیپینگ ویروس های نیوکاسل با استفاده از روش های RT-PCR و MDT در جوجه های گوشتی مرغداری های استان فارس

ستاره خوب یار^۱، محمد باقر نظری^۲، عبدالله رحیمیان^۳، محمد جواد مهربان پور^{۴*}

^۱ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، آکارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، گروه میکروبیولوژی
^۲ کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش ویروس شناسی، ^۳ استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش ویروس شناسی

چکیده

سابقه و هدف: بیماری نیوکاسل یکی از بیماری های ویروسی حاد و مسری در ماکیان می باشد که همواره خسارات اقتصادی جبران ناپذیری را بر صنعت طیور وارد کرده است. با توجه به تلفات ایجاد شده توسط این ویروس، تشخیص بیماری و نیز اطلاع کافی از سویه های در حال گردش ویروسی امری حیاتی به نظر می رسد. هدف از این پژوهش، جداسازی و پاتوتیپینگ ویروس نیوکاسل در مرغداری های گوشتی استان فارس با استفاده از روش های RT-PCR و MDT بود.

مواد و روش ها: در مطالعه حاضر ۳۰۰ نمونه سواب کلواک و بافت نای از ۳۰ واحد مرغداری با آمار تلفات بالا و درگیر با بیماری های تنفسی در استان فارس جمع آوری گردید. نمونه ها به تخم مرغ های جنین دار ۱۱-۹ روزه تلقیح و پس از ۷۲ ساعت مایع آلانوتوئیک با استفاده از آزمون همالگوتیناسیون، RT-PCR و MDT از نظر وجود ویروس نیوکاسل و نیز تایپ بندی سویه ها مورد بررسی قرار گرفتند. یافته ها: از مجموع نمونه های مورد بررسی با روش مولکولی، ۱۰ نمونه با تکثیر قطعه ۵۳۵ جفت بازی آلوده به ویروس نیوکاسل شناخته شدند. سپس با روش MDT سویه های ولوژنیک، مزوژنیک و لنتوژنیک به ترتیب در ۶، ۳ و ۱ نمونه شناسایی گردید. نتیجه گیری: به دلیل جداسازی ویروس های ولوژنیک و مزوژنیک از مرغداری ها، ضرورت پایش مستمر سویه های واکسن وارزیابی ایمنی زایی آن ها وجود دارد.

واژگان کلیدی: ویروس نیوکاسل، پاتوتیپینگ، RT-PCR، MDT

دریافت مقاله: بهمن ۱۳۸۹ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ۱۳۹۰

مقدمه

نسبت به این بیماری مستعدتر می باشند. سالیانه ویروس نیوکاسل به دلیل مرگ و میر بالا، کاهش وزن و افت تولید تخم مرغ، موجب خسارات زیادی می گردد. بیماری نیوکاسل توسط پارامیکسوویروس های سروتیپ ۱ (APMV-1) ایجاد می شود. این ویروس دارای ژنوم RNA تک رشته ای با قطبیت منفی و احاطه شده با کپسید مارپیچی است (۱). ژنوم این ویروس کد کننده ۶

بیماری نیوکاسل یکی از مسری ترین بیماری های ماکیان در سراسر جهان به شمار می آید. از میان پرندگان، مرغ های خانگی

* آدرس برای مکاتبه: شیراز، میدان صنایع، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، گروه ویروس شناسی، صندوق پستی ۷۱۹۵۵-۳۶۷
تلفن: ۰۷۱۱-۶۲۴۰۰۲۱، دورنگار: ۰۷۱۱-۶۳۵۳۹۷۵
پست الکترونیک: j.mehrabanpour@rvsri.ir

پروتئین می باشد. یکی از این پروتئین ها، پروتئین F است که در بیماری زایی ویروس نقش کلیدی را بر عهده دارد (۲). این ویروس ها بر اساس میزان حدت بیماری به ۳ سویه ولوژن (بیماری زایی حاد)، مزوژن (بیماری زایی متوسط) و لنتوژن (بیماری زایی با حدت پایین) تقسیم بندی می گردند (۳ و ۴). این تقسیم بندی بر اساس توالی اسید آمینه ناحیه شکستگی پروتئین F ویروس نیوکاسل صورت می گیرد. با وجود برنامه واکسیناسیون نیوکاسل در مرغداری ها، آلودگی با ویروس نیوکاسل به صورت مکرر مشاهده می شود. بنابراین ضرورت بررسی سویه های مختلف ویروس نیوکاسل و نیز تشخیص سویه های بیماری زا از غیر بیماری زا احساس می گردد. این پژوهش با هدف جداسازی و پاتوتیبینگ ویروس های نیوکاسل در مرغداری های استان فارس با استفاده از روش های RT-PCR و (Mean Death Time) MDT انجام گرفت.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه از مرغداری های درگیر: با مراجعه به ۳۰ واحد مرغداری با آمار تلفات بالا و درگیر با بیماری های تنفسی در استان فارس، تعداد ۳۰۰ نمونه سواب کلواک و بافت نای به صورت مقطعی - توصیفی جمع آوری گردید. تمامی نمونه ها با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه ویروس شناسی موسسه رازی منتقل و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- نگهداری شدند. در مرحله بعد مایع رویی نمونه های سواب کلواک مربوط به هر مرغداری پس از ذوب کردن، با یکدیگر مخلوط و سانتریفیوژ گردیدند. نمونه های نای نیز پس از خراش دادن بافت داخلی و جدا کردن قسمت غضروفی با یکدیگر مخلوط و سانتریفیوژ شدند. ب) جداسازی ویروس: مایع رویی نمونه های سانتریفیوژ شده پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی به تخم مرغ های جنین دار ۹-۱۱ روزه تلقیح گردید. پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت ۶۵٪، مایع آلتوتوئیک با استفاده از آزمون همگلوتیناسیون از نظر وجود ویروس نیوکاسل مورد بررسی قرار گرفت.

ج) آزمون ممانعت همگلوتیناسیون: بر اساس پروتکل

استاندارد OIE، آزمون ممانعت همگلوتیناسیون (Hemagglutination Inhibition=HI) به منظور تشخیص ویروس نیوکاسل با استفاده از آنتی سرم استاندارد (تهیه شده از آزمایشگاه رفانس نیوکاسل و آنفلوآنزا کشور ایتالیا) انجام پذیرفت. در ابتدا آنتی سرم اختصاصی نیوکاسل و آنفلوآنزا با استفاده از محلول فسفات بافر سالین (PBS) تا ۱۰ رقت متوالی در حد ۲۵ میکرولیتر رقیق شدند. به تمامی حفره ها، به جز ۲ حفره آخر، ۲۵ میکرولیتر آنتی ژن ۸ واحد HA برای نیوکاسل و ۴ واحد HA برای آنفلوآنزا اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه گرما گذاری گردیدند. سپس به تمامی حفره ها، گلبول قرمز جوجه ۱٪ اضافه و نتایج پس از ۳۰ دقیقه بررسی شد. عدم ایجاد همگلوتیناسیون نشان دهنده مثبت بودن ویروس مورد نظر می باشد (۵). در این مطالعه تنها نمونه هایی که دارای تیتراژ آنتی بادی بیشتر از ۴ بودند برای انجام آزمون RT-PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

د) استخراج RNA ویروس: برای این منظور از کیت (Vetek™ Viral Gene-Spin, INtRON Biotechnology) کشور کره مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. به طور خلاصه ۱۵۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۲۵۰ میکرولیتر بافر لیزکننده مخلوط گردید. پس از افزودن ۳۵۰ میکرولیتر بایندینگ بافر به آن، مخلوط حاصل به ستون و لوله جمع آوری (column and collection tube) منتقل شد و با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. پس از دور ریختن مایع زیرین، ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو دهنده A به آن اضافه و با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. مجدداً مایع رویی با ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو دهنده B مخلوط و با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. در نهایت ماده سفید رنگ حاصل دوباره با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس ستون و لوله جمع آوری، درون میکروتیوب های جدید قرار داده شد و ۵۰ میکرولیتر محلول بافر به تمامی نمونه ها اضافه گردید. مخلوط حاصل با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ و مایع حاوی RNA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

ه) آزمون RT-PCR: واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer (10x)، ۲ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۱ واحد آنزیم

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده در مطالعه.

پرایمر	توالی	قطعه تکثیر شده
N1	5'-ATGGGC(C/T)CCAGA(C/T)CTTCTAC-3'	۵۳۵ جفت باز
N2	5'-CTGCCACTGCTAGTTGTGATAATCC-3'	

استفاده از محلول استریل PBS رقیق سازی شدند. به منظور شناسایی کمترین دوز ویروس که موجب مرگ جنین می شود، رقت های 10^{-4} تا 10^{-9} به طور جداگانه به ۵ تخم مرغ جنین دار تزریق گردیدند. ۲۴ ساعت پس از تزریق کندل و جنین های مرده در اثر آلودگی حذف شدند. سپس هر ۱۲ ساعت تا یک هفته عمل کندل کردن ادامه داده شد. در نهایت رقت و زمان سوبیه ای که توانسته جنین تخم مرغ ۱۰ روزه را از بین ببرد یادداشت گردید (۷).

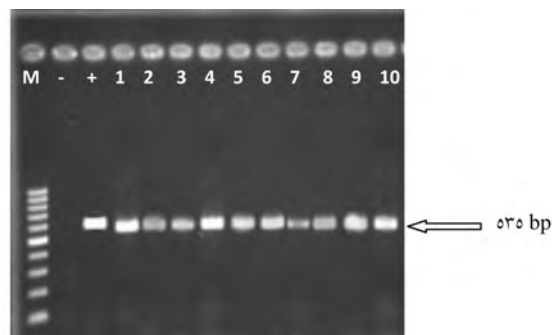
نتایج

از میان ۳۰۰ نمونه مورد مطالعه در آزمون HI، بیشتر نمونه ها به آنتی بادی یا سرم اختصاصی نیوکاسل جواب مثبت دادند. این نتایج به صورت اعداد ۳ تا ۱۰ گزارش گردید. در مجموع تیتراهای ۱ تا ۴ نشان دهنده تزریق واکسن به جوجه ها می باشد. در حالی که تیتراهای ۶ تا ۱۰ نشان دهنده درگیری گله ها با ویروس نیوکاسل است. از میان نمونه های مورد بررسی با روش RT-PCR، ۱۰ نمونه با تکثیر قطعه ۵۳۵ جفت بازی به عنوان مثبت شناسایی گردیدند (شکل ۱).

نتایج حاصل از MDT نشان داد که از میان ۱۰ نمونه مثبت شده با روش RT-PCR، ۶ نمونه ویروسی توانستند در مدت زمان ۶۰ ساعت جنین مرغ را از بین ببرند. بنابراین این سوبیه ها به عنوان ولوژنیک در نظر گرفته شدند. همچنین در ۳ نمونه دیگر اعداد بین ۶۰ تا ۹۰ ساعت به دست آمد که نشان دهنده مزوژنیک بودن این سوبیه ها می باشد. در مطالعه حاضر تنها یک سوبیه به دلیل مرگ جنین در مدت زمان بیش از ۹۰ ساعت به عنوان لنتوژنیک گزارش گردید.

DNA پلی مزاز *Taq*، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (جدول ۱) و ۵ میکرولیتر cDNA انجام گردید (مواد مورد استفاده در این آزمون از شرکت Vetek کشور کره تهیه شد). سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف با شرایط دمایی ۲ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم برمایند منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه Kodack gel scan مورد بررسی قرار گرفت (۶).

و) آزمون MDT: به منظور تشخیص سوبیه های بیماری زای نیوکاسل از غیر بیماری زا از آزمون زمان متوسط مرگ (Mean Death Time = MDT) مطابق با روش استاندارد OIE در سال ۲۰۰۹ استفاده گردید (۵). در این مطالعه تنها نمونه های مثبت به دست آمده در مرحله قبل با استفاده از روش MDT پاتوتایپینگ گردیدند. به طور خلاصه، در مرحله اول نمونه ها با



شکل ۱: نتایج RT-PCR MDT: ۱: مارکر ۱۰۰۰ bp، ۲: کنترل منفی، ۳: کنترل مثبت، ۴ تا ۱۰: نمونه های مثبت.

بحث

یکی از مشکلات اساسی در صنعت پرورش طیور در ایران، مشکلات ناشی از بیماری های تنفسی ویروسی می باشد (۸). بر اساس گزارش اداره کل دامپزشکی، حدود ۳۰٪ از جوجه های پروری استان فارس دچار مشکلات تنفسی می شوند. یکی از عوامل موثر در این مساله ویروس نیوکاسل می باشد. از این رو ضرورت تشخیص و جداسازی سریع این ویروس و نیز تولید واکسن های زنده، کشته شده و کلون شده به منظور جلوگیری از شیوع این بیماری در درجه اهمیت قرار دارد. از طرفی انجام مطالعات مولکولی می تواند موجب دست یابی به اطلاعاتی در زمینه تغییرات احتمالی به وجود آمده در این ویروس ها گردد. به عنوان نمونه در کشور تایوان ارزیابی این ویروس و سویه ولوژنیک آن به دلیل شیوع بالا در جوجه ها در طی سال های اخیر، در نهایت منجر به کسب اطلاعات بنیادی در زمینه توسعه واکسن های تولید شده از ویروس نیوکاسل گردید (۹). از جمله روش های تعیین کننده خصوصیات ویروس می توان به تست های (ICPI (Intra Cerebral Pathogenicity Index) و (IVPI (Intera Venous Pathogenicity Index) و (MDT (Mean Death Time) اشاره نمود (۱۰). برای تشخیص ویروس نیوکاسل از دیگر عوامل به وجود آورنده کمپلکس تنفسی، می توان از تکنیک RT-PCR و پرایمرهای اختصاصی این ویروس استفاده کرد (۱۱).

ویروس بیماری نیوکاسل بر اساس بیماری ایجاد شده به پاتوتیپ های ویستروپیک ولوژنیک یا حاد بیماری زا همراه با خونریزی، نروتروپیک ولوژنیک یا حاد بیماری زا همراه با علائم عصبی، مزوژنیک یا بیماری زایی متوسط و لنتوژنیک یا بیماری زایی خفیف طبقه بندی شده است (۳، ۴ و ۱۲). در مطالعه حاضر از ۱۰ نمونه ویروس نیوکاسل که با استفاده از روش مولکولی RT-PCR و روش غیرمولکولی MDT مورد بررسی قرار گرفتند، ۶ سویه ولوژنیک (کمتر از ۶۰ ساعت)، ۳ سویه مزوژنیک (بین ۶۰ تا ۹۰) و ۱ سویه لنتوژنیک (بیش از ۹۰ ساعت) گزارش گردید. مطالعه انجام شده توسط چوی (Choi) و همکاران در سال ۲۰۰۵ در کره نشان داد که با استفاده از روش های سرولوژی و مولکولی و نیز تکنیک های MDT، ICPI و RT-PCR، ۲ سویه نیوکاسل جدا

شده از جغدها از نوع ولوژنیک بوده است. در حالی که در مطالعه جاری ۶ سویه با روش MDT از نوع ولوژنیک گزارش گردید. از طرفی آن ها نشان دادند جغدهایی که از نژاد مختلط اروپایی- آسیایی بودند شدیداً به این سویه از ویروس حساس هستند و آنالیز فیلوژنی نیز آشکار نمود که این نمونه ها میزان شباهت بسیار زیادی با سویه های نیوکاسل جدا شده از ماکیان خانگی در کشور کره داشته است (۲). با توجه به سرعت انتشار بیماری نیوکاسل و نیز عدم وجود درمان مناسب برای آن، رعایت اصول بهداشتی و واکسیناسیون صحیح و به موقع می تواند از بروز یا حدت آن بکاهد (۱۳). همچنین اهمیت انجام واکسیناسیون به منظور کاهش حدت بیماری، با مطالعات انجام شده در سال ۲۰۰۷ توسط ممیز و همکاران در ایران بررسی گردید (۱۴). آن ها با استفاده از روش های ICPI، IVPI و MDT موفق به جداسازی و تشخیص سویه های ولوژنیک با قدرت پاتوژنیک شدید از بلدرچین شدند که با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر مبنی بر جداسازی و تشخیص سویه های ولوژنیک مطابقت دارد. در واقع در بین توالی اسیدهای آمینه محل شکست پروتئین F و بیماری زایی سویه های ویروس نیوکاسل ارتباط وجود دارد و تکنیک های مولکولی می توانند این ارتباط را مشخص نمایند (۱۵). به عنوان مثال در بررسی صورت گرفته توسط اتیم (Otim) و همکاران در سال ۲۰۰۱ در شرق اوگاندا با جداسازی ویروس نیوکاسل از جوجه های بیمار، به کمک آنالیز توالی ناحیه شکست پروتئین F و نیز روش ICPI موفق به یافتن سویه ولوژنیک شدند (۱۶). از طرفی آناند (Ananth) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ در کشور هند با استفاده از آنالیز Bio-Edit علاوه بر شناسایی ویروس نیوکاسل از جوجه های بومی غیرواکسینه، توان بیماری زا بودن ویروس را مورد توجه و بررسی قرار دادند. آن ها دریافتند بخشی از ژن که حاوی اسید آمینه فنیل آلانین است دارای قدرت بیماری زایی بالایی می باشد. همچنین بخشی از ژن که دارای اسید آمینه لوسین است قدرت بیماری زایی پایینی دارد (۱۱). بنابراین برای حل این مشکل بایستی با تکنیک های دقیق مولکولی در جداسازی ویروس ها و نیز تعیین توالی ناحیه شکست پروتئین F، ردیف اسید آمینه پروتئین را مشخص و در نهایت تطابق آنتی ژنتیکی با ویروس های موجود در بانک ژنی را بررسی نمود (۱۵).

فراوانی را در میان سویه های جدا شده به خود اختصاص داد. در پژوهش حاضر، ابتدا ویروس نیوکاسل به کمک روش های RT-PCR و HI تشخیص داده شد. سپس با روش MDT سویه های ولوژنیک مشخص گردیدند. ترتیب انجام این مطالعه با پژوهش انجام شده توسط مونایم (Monaim) و همکاران در مصر در سال ۲۰۰۵ مطابقت دارد. در حالی که محمد (Mohamed) و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مصر علاوه بر آزمون های HI و MDT از روش های ICPI و IVPI نیز به منظور پاتوتیبینگ سویه های ویروسی استفاده نمودند. نتایج آن ها نشان داد که هر ۳ سویه جداسازی شده از نوع ولوژنیک بوده است که با نتایج تحقیق جاری هم خوانی دارد (۲۱ و ۲۲). با توجه به مطالعات یاد شده نتایج پژوهش حاضر با تمامی بررسی های انجام شده در ایران و سایر نقاط جهان از نظر روش کار و نیز جداسازی و شناسایی سویه های مختلف ویروس نیوکاسل مطابقت دارد.

نتیجه گیری

از آن جایی که چرخش سویه ولوژن یکی از عوامل بیماری زای خطرناک در میان ماکیان است و شیوع آن خسارات سنگینی به صنعت پرورش طیور وارد می کند و نیز با توجه به جداسازی ویروس های ولوژنیک و مزوژنیک در مطالعه حاضر و سایر پژوهش ها، ضرورت ارزیابی مستمر سویه های واکسن و اثربخشی آن ها حتی با وجود انجام برنامه واکسیناسیون وجود دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی پرسنل مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی شیراز به دلیل حمایت های مالی و اجرایی کمال امتنان را دارند.

برای مثال لومینکزی (Lominczi) و همکاران توالی ژن فیوژن پروتئین را با بیماری های شایع در کشورهای غربی اروپا مقایسه کردند. آن ها مشاهده نمودند که این توالی با توالی ویروس های عامل بیماری در آلمان، ایتالیا، اسپانیا، هلند و بلژیک مطابق بوده است. اما با ژنوتیپ شمال آمریکا تطابق نداشته است (۱۷). نوانسریچای (Nuansrichay) و چایشینگ (Chaishing) در سال ۲۰۰۷ با تجزیه فیلوژنیکی ۱۸ جدایه نیوکاسل به دست آمده از سواب کلوک جوجه ها و اردک ها در تایلد نشان دادند که این سویه ها متعلق به ژنوتیپ ۱ از نوع لنتوژنیک است (۱۸). پژوهش های یاد شده با یافته های جاری مبنی بر جداسازی یک سویه لنتوژنیک هم خوانی دارد.

به طور کلی روش های دیگری نیز توسط برخی از پژوهشگران برای تعیین سویه ویروس نیوکاسل مورد استفاده قرار گرفته است. برای نمونه بوچر (Boucher) و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی گله های مرغ بیمار به کمک روش دیگری از MDT نمونه های ویروسی را تحت شکست و هضم با تریپسین ۰/۲۵٪ عاری از EDTA قرار دادند. سپس آنها را با نمونه های هضم نشده کنترلی مقایسه کردند. نتایج نشان داد که جدایه های ویروس از نوع لنتوژنیک بودند. در این تکنیک زمان تشخیص جدایه های لنتوژنیک به طور قابل توجهی به میزان ۲۶ ساعت کاهش یافت که زمان تشخیص جدایه ها نسبت به روش MDT انجام شده در تحقیق حاضر سریع تر می باشد. همچنین در این مطالعه بدون استفاده از تریپسین نیز تفاوت معنی داری بین سویه های ولوژن مشاهده نگردید (۱۹). در ایران نیز پژوهشگران ویروس نیوکاسل را از نظر مولکولی مورد بررسی قرار داده اند. برای نمونه کیانی زاده و همکاران در سال های ۱۳۷۵ تا ۱۳۷۸ به منظور جداسازی و شناسایی NDV از تست های IVPI، ICPI و MDT و برای تشخیص هویت جدایه ها از تکنیک PCR استفاده نمودند. یافته های آن ها نشان دهنده حضور سویه های ولوژنیک و مزوژنیک بود (۱۵). قیامی راد و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ با استفاده از همین روش ها سویه های ولوژنیک را از لاشه های شتر مرغ موجود در گله های تجاری جداسازی کردند (۲۰). اما در مطالعه جاری هر ۳ سویه جداسازی گردید به طوری که سویه ولوژنیک بیشترین

References

1. Alexander DJ. Newcastle disease and other paramyxovirus infection, In: Calnek, BW, Barnes, HJ, Reid, WM, Yoder, HW, Disease of Poultry, 9th ed, Amsterdam: Iowa State University Press, 1991, 496-513.
2. Choi KS, Lee EK, Jeon WJ, Nah JJ, Kim YJ, Lee MY Lee, HL, Kwon JH. Isolation of a recent Korean Epizootic strain of Newcastle disease virus from Eurasian scops owls affected with severe diarrhea. *J Wild Life Dis.* 2008; 44(1): 193-198.
3. Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections, In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif, YM. Disease of Poultry, 10th ed, Amsterdam: Iowa State University Press, 1997, 541-569.
4. Baratchi S, Ghorashi SA, Hosseini M, Pourbakhsh SA. Differentiation of virulent and non-virulent Newcastle disease virus isolates using RT-PCR. *Iranian J Biotech,* 2006; 4(1): 61-63.
5. World Organization for Animal Health (WOIE). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [online]. Paris: OIE; 2009, Newcastle disease, Available at: http://www.oie.int/eng/norms/manual/a_summry.Htm
6. Berhanu A, Ideris A, Omar AR, Bejo MH. 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(1): 183.
7. Alexander DJ. Newcastle disease and other Avian paramyxovirus, In: Calnek, BW, Barnes, HJ, Beard, CW, McDougald, LR and Saif, YM, Laboratory manual for the isolation and identification of Avian Pathologists, 4th ed, Amsterdam: Iowa State University Press, 1997, 156-163.
8. Mohan CM, Dey S, Kumanan K. Molecular changes of the fusion protein gene of chicken embryo fibroblast-Adapted velogenic Newcastle disease virus: Effect on its pathogenicity. *Avian Dis.* 2005; 49: 56-62.
9. Lien YY, Lee JW, Su HY, Tsai HJ, Tsai MC, Hsieh CY, Tsai SS. Phylogenetic characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan during 2003-2006. *Vet Microbiol.* 2007; 123: 194-202.
10. Ponnusamy P, Kirubakaran JJ, Chandramohan A. Sequence analysis of HN and F genes of a less virulent Newcastle disease virus isolated from unvaccinated village chicken. *Int J Poult Sci.* 2009; 8(10): 985-994.
11. Ananth R, Kirubaham JJ, Priyadarshini MLM, Albert A. Isolation of Newcastle disease viruses of high virulence in unvaccinated healthy village chickens in south India. *Int J Poult Sci.* 2008; 7(4): 368-373.
12. Aldous EW, Alexander DJ. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol.* 2001; 30(2): 117-128.
13. Chansiripornchai N, Sasipreeyajan J. Efficacy of live B1 or ulster 2C Newcastle disease vaccines simultaneously vaccinated with inactivated oil adjuvant vaccine for protection of Newcastle disease virus in broiler chickens. *Acta Vet Scandinavica.* 2006; 48(2): 1-4.
14. Momayez R, Gharahkhani P, Pourbakhsh SA, Toroghi R, Shoushtari AH, Banani M. Isolation and pathogenicity identification of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease) virus from a Japanese quail flock in Iran. *Arch Razi Inst.* 2007; 62(1): 39-44.
15. Kianizade M, Idersi A, Shahrabadi MS, Kargar R, Pourbakhsh SA, Omar AR, Yosoff K. Biological and molecular characterization of newcastle disease virus isolated from Iran. *Arch Razi Inst.* 1999; 50: 1-10.
16. Otim MO, Christensen H, Jorgensen PH, Handberg KJ, Bisgard M. Molecular characterization and phylogenetic study of Newcastle disease virus isolates from recent outbreaks in Eastern Uganda. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(6): 2802-2805.
17. Lominczi B, Wehmann E, Herczeg J, Ballagi-Pordany A, Kaleta EF, Werner O, Meulemans G, Jorgensen PH, Mante AP, Gielkens AL, Capua I, and Damoser J. Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch Virol.* 1998; 143(1): 49-64.
18. Nuansrichay B, Chashing A. Phylogenetic characterization of Newcastle disease viruses isolated in Thailand during 2006-2007. *Thai-NIAH e J.* 2008; 3(2): 179-188.
19. Boucher CE, Bragg RR, Albertyn J. An alternative method for the establishment of virulence of Newcastle disease virus isolates. *Afr J Microbiol Res.* 2010; 4(21): 2313-2317.
20. Ghiamirad M, Pourbakhsh A, Keyvanfar H, Momayez R, Charkhar S, Ashtari A. Isolation and characterization of Newcastle disease virus from Ostriches in Iran. *Afr J Microbiol Res.* 2010; 4(23): 2492-2497.
21. Moneim ASA, Sawah AAEL, Kandil MA. Characterization of variant strain of Newcastle disease virus in Egypt. *BS Vet Med J.* 2006; 16(1): 12-17.
22. Mohamed MHA, Kumar S, Paldourai A, Samal S. Sequence analysis of fusion protein gene of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in Egypt during 2006. *Virol J.* 2011; 8(1): 237.



Isolation and pathotyping of Newcastle viruses by RT-PCR and MDT methods from broiler chickens in Fars province

Setareh Khoobyar¹, Mohammad Bagher Nazari², Abdollah Rahimian³,
Mohammad Javad Mehrabanpour⁴

¹M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University Jahrom, Iran.

²M.Sc., Department of Microbiology, Urmia Branch, Islamic Azad University Urmia, Iran.

³M.Sc., Department of Virology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran.

⁴Assistant Professor, Department of Virology, Razi Vaccine and Serum Research Institute Shiraz, Iran.

Abstract

Background and objective: Newcastle is an acute and contagious disease in poultry that has irreparable economic detriments in the poultry industry. Due to many deaths in broiler chicken flocks, it is vital to detect and characterize the viral circulation. The aim of this study was to isolation and pathotyping of Newcastle virus by RT-PCR and MDT (Mean death time) methods in broiler chickens in Fars province.

Material and Methods: In this study 300 tracheal tissue and cloacal swab samples from 30 infected poultry farms with a high mortality and respiratory disease were collected in Fars province. The samples were inoculated in the allantoic cavities of 9-11-day-old embryonated chicken eggs. After 72 hours incubation, the allantoic fluids were tested by hemagglutination, RT-PCR and MDT methods for the present of Newcastle virus and their pathotyping.

Results: 10 out of total samples investigated by molecular method showed a 535bp amplification band fragment and were identified as Newcastle viruses. Also, among these samples, velogenic, mesogenic and lentogenic strains identified in 6, 3 and 1 sample respectively by MDT method.

Conclusion: Based on isolation of velogenic and mesogenic viruses in broiler chickens flocks, it is essential to continues survey vaccine strains and their effectiveness.

Keywords: Newcastle virus, Pathotyping, MDT, RT-PCR