

جداسازی و تعیین شاخصهای بیماریزائی ویروس نیوکاسل از موارد بیماری در خراسان

● روحانی کارگر مؤخر، استاد پژوهشی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج
● مهدی کیانی زاده، پژوهشگر موسسه رازی شعبه مشهد

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۳۵، تابستان ۱۳۷۶

چکیده

از ۱۴ مورد مشکوک به بیماری نیوکاسل در مرغهای گوشتی، تخمگذار و بومی و یک مورد کبوتر در استان خراسان (فروردین ۱۳۷۴ تا اردیبهشت ۱۳۷۵)، پس از کالبد گشایی و مشاهده علائم بیماری نمونه برداری لازم (نمونه مغز و ریه) به طور استریل انجام و تا زمان آزمایش در فریزر ۷۰- درجه قرار گرفت. نمونه های برداشت شده پس از آماده سازی به حفره آلانتوئیک جنین ۹ تا ۱۱ روزه SPF تزریق گردید. از ۷ نمونه مرضی، ویروس با موفقیت جدا گردید. در مرحله بعد شناسایی ویروس های جدا شده، براساس شاخصهای بیماریزایی شامل MDT، ICPI، IVPI انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان می دهد که دو مورد از ویروس های جدا شده در گروه مزوژنیک و بقیه در گروه ولوژنیک قرار می گیرند.

جدول شماره ۱- مثالی برای ICPI

وضعیت جوجه ها	روز											
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	جمع	ضریب	جمع کل	
سالم	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰	۰	۰	
بیمار	۰	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵	۱	۵	
مرده	۰	۵	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۶۵	۲	۱۳۰	
محاسبه											۸۰	۱۳۵

$$ICPI = \frac{135}{80} = 1.7$$

جدول شماره ۲- مثالی برای IVPI

وضعیت جوجه ها	روز											
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	جمع	ضریب	جمع کل	
سالم	۱۰	۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۷	۰	۰	
بیمار	۰	۳	۶	۱	۰	۰	۰	۰	۱۰	۱	۱۰	
فلج	۰	۰	۴	۵	۰	۰	۰	۰	۹	۲	۱۸	
مرده	۰	۰	۰	۴	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۴۴	۳	۱۲۲	
محاسبه											۸۰	۱۶۰

$$IVPI = \frac{160}{80} = 2$$

جدول شماره ۳- شاخصهای پاتوژنیسیته ویروس های نیوکاسل جدا شده از خراسان

ویروس	ICPI	IVPI	MDT
MK5	۱/۸۵	۲/۱	۶۶/۲
MK6	۱/۸	۲	۶۸/۸
MK7	۱/۸	۲/۱۲	۵۶
MK11	۱/۸۳	۲	۵۹/۲
MK12	۱/۹۱	۲/۲۱	۴۴/۲
MK13	۱/۷۷	۲/۱۵	۴۷/۴
MK14	۱/۹۶	۲/۳۲	۵۴/۶

مقدمه

بیماری نیوکاسل ممکن است به صورت بسیار شدید و با تلفاتی در حدود ۱۰۰٪ یا اشکال بسیار خفیفی فاقد هر گونه علامتی ظاهر شود. سایر پرندگان مثل بوقلمون، کبک، طوطی، قناری و کبوتر نیز به بیماری نیوکاسل حساس هستند اما عوارض بیماری در آنها به شدت آن در ماکیان نیست. بیماری در ایران ابتدا در سال ۱۳۲۹ رسماً تأیید شد (مؤسسه رازی) گواپنکه شواهد

جدول شماره ۴- نمونه های ارسالی جهت جداسازی ویروس نیوکاسل

نتیجه	پاساژ دوم	پاساژ اول	نمونه ارسالی	سابقه بیماری	سابقه واکسیناسیون	سن	نژاد	شماره	موقعیت دام
منفی	منفی	منفی	جوجه مریض مرده	مواردی اسهال و افتادگی بال داشته	واکسیناسیون نامنظم	۲۵ روزه	گوشتی	MK1	جاده قدیم قوچان
منفی	منفی	منفی	جوجه	-	دو نوبت آشامیدنی	۲۶ روزه	گوشتی	MK2	چاهک
منفی	منفی	منفی	جوجه مریض	گامبور در ۴۲ روزگی	چهار نوبت	۴ ماه	تخمگذار	MK3	طرقبه
منفی	منفی	منفی	جوجه مریض	-	دو نوبت	۴۰ روزه	بومی	MK4	جاده سرخس
مثبت	مثبت	مثبت	جوجه مریض	-	-	۳ ماهه	بومی	MK5	بلوار وکیل آباد
مثبت	مثبت	مثبت	جوجه مریض	۲۰ روزه گامبور	-	۳۰ روزه	گوشتی	MK6	چهار فصل
مثبت	مثبت	مثبت	جوجه مریض	گامبور و CRD	برونشیت و گامبور	۲۴ روزه	گوشتی	MK7	ناظریه
منفی	منفی	منفی	جوجه مریض مرده	-	۱ نوبت لاسوتا	۵۲ روزه	گوشتی	MK8	نیشابور
منفی	منفی	منفی	نمونه مریض	-	-	۸ ماهه	بومی	MK9	مشهد
منفی	منفی	منفی	نمونه مریض	-	-	۴ ماهه	کبوتر	MK10	مشهد
مثبت	مثبت	مثبت	نمونه مریض و تلف شده	-	-	یکساله	گوشتی تخمی	MK11	نیشابور خواجه
مثبت	مثبت	مثبت	نمونه مریض	-	-	یکساله	گوشتی تخمی	MK12	نیشابور - بوژمهران
مثبت	مثبت	منفی	نمونه مریض	-	-	۲ ماهه	بومی رنگی	MK13	تربت جام
مثبت	مثبت	مثبت	نمونه مریض	-	۱ نوبت لاسوتا ۲۲ روزه	۴۰ روزگی	رنگی	MK14	مشهد- جاده سرخس

$$\text{MDT/MLD}_{(-7)} \text{ for MK5} = \frac{(2 \times 53) + (2 \times 62) + (6 \times 72)}{10} = \frac{662}{10} = 66.2 = 66.2 - 5$$

آزمایش ICPI برای MK5

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز							جمع	ضریب	جمع کل
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷			
سالم	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵	۰
مریض	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
مرده	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲
جمع	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵	۱۴۶

$$\text{ICPI} = \frac{146}{180} = 1/85$$

آزمایش IVPI برای MK5

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز							جمع	ضریب	جمع کل
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷			
سالم	۱۰	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۱۲	۰	۰
مریض	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۱
فلج	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰
مرده	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳
جمع	۱۰	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۱۲	۰	۱۷۱

$$\text{IVPI} = \frac{171}{80} = 2/1$$

$$\text{MDT/MLD}_{(-7)} \text{ for MK6} = \frac{(1 \times 40) + (9 \times 72)}{10} = \frac{688}{10} = 68.8$$

آزمایش ICPI برای MK6

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز							جمع	ضریب	جمع کل
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷			
سالم	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵	۰	۰
مریض	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
مرده	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲
جمع	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵	۰	۱۴۵

$$\text{ICPI} = \frac{145}{180} = 1/8$$

آزمایش IVPI برای MK6

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز							جمع	ضریب	جمع کل
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷			
سالم	۱۰	۸	۱	۰	۰	۰	۰	۱۹	۰	۰
مریض	۰	۱	۵	۱	۰	۰	۰	۷	۰	۷
فلج	۰	۱	۲	۲	۰	۰	۰	۵	۰	۱۰
مرده	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳
جمع	۱۰	۹	۳	۲	۰	۰	۰	۲۶	۰	۱۶۴

$$\text{IVPI} = \frac{164}{80} = 2$$

$$\text{MDT/MLD}_{(-7)} \text{ for MK7} = \frac{(3 \times 48) + (2 \times 53) + (5 \times 62)}{10} = \frac{560}{10} = 56$$

آزمایش ICPI برای MK7

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز							جمع	ضریب	جمع کل
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷			
سالم	۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۶	۰	۰
مریض	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
مرده	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲
جمع	۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۶	۰	۱۴۰

$$\text{ICPI} = \frac{144}{180} = 1/8$$

آزمایش IVPI برای MK7

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز							جمع	ضریب	جمع کل
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷			
سالم	۱۰	۷	۱	۰	۰	۰	۰	۱۸	۰	۰
مریض	۰	۱	۳	۱	۰	۰	۰	۵	۰	۵
فلج	۰	۲	۲	۲	۰	۰	۰	۶	۰	۱۲
مرده	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳
جمع	۱۰	۹	۴	۳	۰	۰	۰	۲۶	۰	۱۷۰

$$\text{IVPI} = \frac{170}{80} = 2/12$$

$$\text{MDT/MLD}_{(-7)} \text{ for MK11} = \frac{(1 \times 43) + (2 \times 54) + (5 \times 61) + (2 \times 68)}{10} = \frac{592}{10} = 59.2$$

آزمایش ICPI برای MK11

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز							جمع	ضریب	جمع کل
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷			
سالم	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵	۰	۰
مریض	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
مرده	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲
جمع	۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵	۰	۱۴۴

$$\text{ICPI} = \frac{144}{180} = 1/82$$

درمانگاهی بروز بیماری در سالهای قبل نیز موجود بوده است و شاید همزمان با انتشار جهانی بیماری در سال ۱۹۴۴ به ایران سرایت کرده است. بیماری در حال حاضر در ایران شایع است و اگر چه اشکال حاد بیماری و همه گیریهایی شدید هم دیده می‌شود، اشکال خفیف بیماری که منحصرأ با جزئی علائم تنفسی و یا نقصان تولید تخم در مرغان بالغ همراه است نیز مکرر گزارش می‌شود.

به سبب مرگ و میر بالا و خسارات اقتصادی سنگین در مدت زمان کم، معمولاً بیشتر توجهات به یافتن راهی برای کاهش خسارت و کنترل بیماری در حداقل زمان ممکنه معطوف بوده است و بنابراین کوشش کمتری در انجام یک مطالعه اساسی (جداسازی ویروس و مشخص نمودن شاخصهای آنتی ژنیک آن) شده است. در این مطالعه، کوشش شده است تا با جداسازی ویروس‌های نیوکاسل از موارد مختلف بیماری و تعیین شاخصهای بیماریزایی آنها اطلاعات بیشتری را به دست آوریم. باید اذعان داشت که این شناسایی، در کنار شاخصهای ذکر شده در بالا، هنگامیکه از پادتن مونوکلونال نیز استفاده شود، کامل خواهد شد.

مواد و روشها جداسازی ویروس

ویروس نیوکاسل به آسانی در کشت سلول و تخم مرغ جنین دار قابل جداسازی است. در این بررسی از تزریق نمونه‌های مغز به تخم مرغهای SPF استفاده شده است. بدین ترتیب که نمونه‌های مغز برداشت شده از موارد بیمار، به وسیله خردکن دستی کاملاً خرد شده و یک سوسپانسیون ۱۰ تا ۲۰ درصد از آنها در سرم فیزیولوژی حاوی آنتی بیوتیک تهیه گردید. سپس این سوسپانسیون ۲ تا ۳ ساعت در دمای اتاق باقی مانده تا آنتی بیوتیک‌های آن تأثیر خود را بر روی باکتریهای موجود در نمونه بگذارند. پس از آن سوسپانسیون مذکور به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰g سانتریفوژ می‌گردد و ۰/۲ ml از مایع رویی آن به حفره آلانتوئیک تخم مرغ SPF جنین دار ۹ تا ۱۰ روزه تلقیح می‌گردد. این تخم مرغها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و به طور روزانه به مدت ۴ روز و روزی ۲ بار مورد معاینه قرار گرفته و همه تخم مرغهایی که پس از تزریق مرده‌اند، در ۴ درجه سانتی‌گراد، سرد می‌شوند. مایع آلانتوئیک برداشت شده و مورد آزمایش هم‌آگلوتیناسیون (HA) قرار گرفته و از نظر عدم الودگی به باکتری نیز بررسی شدند.

شناسایی ویروس

مایعات آلانتوئیک برداشت شده که در آزمایش HA سریع مثبت بودند از نظر وجود ویروس نیوکاسل بررسی شدند؛ ضمن آنکه تمامی آنها با سرم مثبت نیوکاسل مورد آزمایش ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون (HI) قرار گرفتند از همه آنها گرید تهیه و پس از رنگ آمیزی با PTA ویروس به طور مستقیم با میکروسکوپ الکترونی مشاهده گردید.

جهت تفکیک سویه‌های جدا شده از آزمایشات زیر استفاده گردید:

۱- حداقل زمان مرگ یا MDT^۱

این زمان، زمان لازم برای کشتن جنین جوجه ۹ تا ۱۰ روزه توسط حداقل دوز کشنده (MLD) می‌باشد.

آزمایش IVPI برای MK11

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز								جمع	ضریب	جمع کل
	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱			
سالم	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۷	۱۰	۰	۰	۰
مریض	۰	۰	۰	۰	۳	۴	۳	۰	۱	۱۰	۰
فلج	۰	۰	۰	۰	۱	۴	۰	۰	۲	۱۰	۰
مرده	۰	۰	۱۰	۱۰	۶	۱	۰	۰	۳	۱۴۱	۰
جمع	۰	۰	۱۰	۱۰	۶	۱	۰	۰	۳	۱۶۱	۰

$$IVPI = \frac{161}{80} = 2$$

$$MDT/MLD_{(-7)} \text{ for MK12} = \frac{(2 \times 38) + (6 \times 43) + (2 \times 54)}{10} = \frac{442}{10} = 44.2$$

جدول شماره ۹ -

آزمایش ICPI برای MK12

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز								جمع	ضریب	جمع کل
	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱			
سالم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
مریض	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۷	۷	۰
مرده	۰	۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۲	۱۴۶	۰
جمع	۰	۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۲	۱۵۳	۰

$$ICPI = \frac{153}{80} = 1.91$$

آزمایش IVPI برای MK12

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز								جمع	ضریب	جمع کل
	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱			
سالم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۷	۱۰	۰	۰	۰
مریض	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۲	۰	۱	۷	۰
فلج	۰	۰	۰	۰	۰	۴	۱	۰	۲	۱۲	۰
مرده	۰	۰	۱۰	۱۰	۹	۵	۰	۰	۳	۱۶۲	۰
جمع	۰	۰	۱۰	۱۰	۹	۵	۰	۰	۳	۱۷۷	۰

$$IVPI = \frac{177}{80} = 2.21$$

$$MDT/MLD_{(-7)} \text{ for MK13} = \frac{(1 \times 38) + (4 \times 43) + (2 \times 51) + (3 \times 54)}{10} = \frac{474}{10} = 47.4$$

جدول شماره ۱۰ -

آزمایش ICPI برای MK13

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز								جمع	ضریب	جمع کل
	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱			
سالم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۸	۰	۰	۰
مریض	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲	۱	۲	۰
مرده	۰	۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۰	۲	۱۴۰	۰
جمع	۰	۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۰	۲	۱۴۲	۰

$$ICPI = \frac{142}{80} = 1.77$$

آزمایش IVPI برای MK13

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز								جمع	ضریب	جمع کل
	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱			
سالم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۷	۱۰	۰	۰	۰
مریض	۰	۰	۰	۰	۰	۴	۳	۰	۱	۷	۰
فلج	۰	۰	۰	۰	۰	۳	۰	۰	۲	۶	۰
مرده	۰	۰	۱۰	۱۰	۱۰	۳	۰	۰	۳	۱۵۹	۰
جمع	۰	۰	۱۰	۱۰	۱۰	۳	۰	۰	۳	۱۷۲	۰

$$IVPI = \frac{172}{80} = 2.15$$

$$MDT/MLD_{(-7)} \text{ for MK14} = \frac{(3 \times 38) + (4 \times 43) + (2 \times 51) + (1 \times 68)}{10} = \frac{456}{10} = 45.6$$

جدول شماره ۱۱ -

آزمایش ICPI برای MK14

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز								جمع	ضریب	جمع کل
	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱			
سالم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
مریض	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳	۳	۰
مرده	۰	۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۲	۱۵۴	۰
جمع	۰	۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۲	۱۵۷	۰

$$ICPI = \frac{157}{80} = 1.96$$

آزمایش IVPI برای MK14

وضعیت جوجه‌ها پس از تلقیح	روز								جمع	ضریب	جمع کل
	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱			
سالم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۷	۱۰	۰	۰	۰
مریض	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۲	۰
فلج	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲	۲	۰
مرده	۰	۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۳	۱۸۳	۰
جمع	۰	۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۳	۱۸۶	۰

$$IVPI = \frac{186}{80} = 2.32$$

رقت از 10^{-7} تا 10^{-9} مایع آلانتوئیک تازه تهیه شده و برای هر رقت دو گروه ۵ تایی تخم مرغ انتخاب شده و در دوز زمان ۸ صبح و ۵ بعد از ظهر، به هر کدام ۱ ml داخل حفره آلانتوئیک تلقیح می‌شوند و در ۳۷ درجه به مدت یک هفته قرار گرفته و به طور روزانه معاینه می‌شوند. حداقل دوز کشنده، بالاترین رقتی است که در آن همهٔ جینیها می‌میرند (معمولاً 10^{-7}) و MDT زمان متوسط مرگ جینیها است:

$$MDT = \frac{\text{تعداد مرگ در } X \text{ ساعت} (X) + \text{تعداد مرگ در } Y \text{ ساعت} (Y)}{10}$$

۱۰

۲- شاخص بیماریزایی داخل مغزی (ICPI)

برای جوجه یک روزه

۱ ml مایع آلانتوئیک تازه، به صورت داخل مغزی به جوجه یک روزه تلقیح می‌شود و به مدت ۸ روز و به طور روزانه مورد معاینه قرار می‌گیرد. شاخص از طریق ثبت روزانه وضعیت هر جوجه به صورت مثال جدول یک محاسبه می‌گردد (جدول ۱).

۳- شاخص بیماریزایی داخل ورید (IVPI)

برای جوجه شش هفته‌ای

۱ ml از 10^{-1} مایع آلانتوئیک تازه، به درون ورید جوجه شش هفته‌ای تلقیح می‌شود و جوجه روزانه به مدت ۸ روز مورد معاینه قرار می‌گیرد. شاخص، با ثبت وضعیت جوجه‌ها بصورت روزانه محاسبه می‌شود (جدول ۲).

نتایج و بحث

نتایج آزمایشات IVPI، ICPI و MDT روی ۷ نمونه ویروس جدا شده از مجموع ۱۴ نمونه مشکوک، به تفکیک در جداول زیر آمده است (جداول ۵ الی ۱۱). براساس نتایج به دست آمده، دو مورد از ویروس‌ها در گروه مزوژن و بقیه در گروه ولوژن قرار دارند و ملاحظه می‌گردد که ویروس حاد نیوکاسل در بین گله‌های مختلف طیور صنعتی و بومی و در سنین مختلف در چرخش است. اگر چه در اغلب گله‌های آلوده به بیماری نیوکاسل واکسن مصرف گردیده است ولی باید اذعان داشت که برنامهٔ واکسیناسیون به هیچوجه براساس موازین علمی تنظیم نگردیده و اغلب این گله‌ها واکسن کافی و در زمان مناسب دریافت نکرده‌اند.

پاورقی

- 1- Mean Death Time 2- Minimum Lethal Dose 3- Intracerebral Pathogenicity Index 4- Intravenous Pathogenicity Index

منابع مورد استفاده

- 1- F.A.O. 1978, Newcastle, Their prod. and use.
- 2- Alexander, D.J., 1987. Newcastle disease. Ass. Avian Pathology.
- 3- Alexander, D.J., 1988. Newcastle disease.
- 4- Pandey, R., 1989. Nononcogenic avian viruses.
- 5- Galnek, B.W., 1991. Newcastle disease. Disease of poultry, 9th Ed
- 6- Spradbrow, P.B., Newcastle disease in village chicken. ACIAR. No. 39.
- 7- Alexander, D.J., 1995. Newcastle disease in countries of the European union. Avian path. 24.