DOI: 10.22034/vj.2016.107905.1214
شماره ۱۱۷ زمستان ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مطالعه عفونت تجربی ویروس بیماری نیوکاسل در جوجه‌های مادر بومی متعاقب آلودگی ویروس بیماری بورس عفونی

• **منصورمیاحی (نویسنده مسئول)**
بخش بهداشت و بیماری‌های طیور گروه علوم درمانگاهی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **زهرا برومند**
بخش بهداشت و بیماری‌های طیور گروه علوم درمانگاهی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **رمضانعلی جعفری**
بخش بهداشت و بیماری‌های طیور گروه علوم درمانگاهی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **حسام الدین ذهبی**
بخش بهداشت و بیماری‌های طیور گروه علوم درمانگاهی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
تاریخ دریافت: ۱۴-۰۸-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۰۸-۱۰-۱۳۹۵
Email: : m_mayahi@yahoo.com

چکیده

نشانه‌های بالینی، جراحات ماکروسکوپی، گسترش ویروس در بافت‌ها و انتشار در محیط و پاسخ ایمنی هومورال به ویروس حاد نیوکاسل در جوجه‌های مادر بومی متعاقب آلودگی به ویروس گامبورو مورد بررسی قرارگرفت. یک‌صد و بیست جوجه‌ی مادر بومی یک روزه به‌طور تصادفی به چهار گروه مساوی تقسیم شدند. جوجه‌های گروه اول و دوم در سن یک‌روزگی به ویروس بیماری بورس عفونی با دوز 10^3 CID۵۰ به داخل بورس تلقیح شدند. جوجه‌های گروه یک و سه در ۳۰ روزگی با ۰/۱ میلی لیتر از مایع آلانتوئیک حاوی 10^5 EID۵۰ ویروس نیوکاسل به روش چشمی- بینی تلقیح شدند و گروه چهارم به عنوان کنترل منفی نگه‌داری شدند. جوجه‌ها بعد از تلقیح، روزانه چهار بار ازنظر نشانه‌های درمانگاهی مشاهده شدند. در روزهای دو، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۱۸ پس از تلقیح ویروس نیوکاسل، سوآب از نای و کلواک چهار جوجه ازهر گروه تهیه شد. همچنین چهار جوجه از هر گروه در روزهای دو، ۵، ۱۰ و ۱۵، کشتارشده و نمونه‌های بافتی از مغز، نای، ریه، کلیه و کبد برای ردیابی ویروس با روش RT-PCR برداشته شدند. نتایج نشان داد نشانه‌های بالینی بیماری نیوکاسل درگروه‌های آلوده به ویروس گامبورو و نیوکاسل شدیدتر بود و این جوجه‌ها مدت طولانی‌تری ویروس نیوکاسل را از نای و کلواک دفع کردند وعیار پادتن ضدویروس نیوکاسل کمتری داشتند. آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد آلودگی جوجه‌های مادر بومی به ویروس گامبورو بر پاسخ ایمنی هومورال پرنده تأثیر داشته است (P<۰/۰۰۱). مطالعه نشان داد ویروس بیماری گامبورودرجوجه‌های مادر بومی می‌تواند منجر به حساسیت بیش‌ترآن‌ها به بیماری نیوکاسل و تشدید بیماری‌زایی و دفع ویروس شود.

کلمات کلیدی: بیماری بورس عفونی، بیماری نیوکاسل، مرغ مادربومی، تضعیف ایمنی

● Veterinary Researches & Biological Products No 117 pp: 11-23

Study on experimental infection of Newcastle Disease virus in local breeder chicks infected with infectious bursal disease virus

By: Mayahi, M., (Corresponding Author) Avian Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran. Boroomand, Z., Avian Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran. Jafari, R., Avian Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran. and Zahabi, H., Avian Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran.

Received: 2016-11-04 **Accepted: 2016-12-28**

Email: : m_mayahi@yahoo.com

Clinical signs, macroscopic lesions, virus tissue distribution, shedding and humoral immune responses to virulent Newcastle disease virus in native breeder chicks were studied. One hundred and twenty day-old native breeder chicks were divided randomly into four equal groups. Groups one and two were infected with 10^3 CID50 infectious bursal disease virus (IBDV) by intra-bursal route on day-old. Groups one and three chicks were infected with 10^5EID50 virulent ND virus by nasal route on 30th days. Fourth group 4 chicks were kept as uninfected control group. Clinical signs were observed daily after each inoculation. Tracheal and cloacal swabs from four live birds of each group collected on days of two, 5, 10, 15 and 18 post NDV infection and on the same days except days eighteen, four chicks were randomly euthanized and organ tissue samples from brain, trachea, lung, kidney and liver were collected to detect ND virus by RT-PCR method. Clinical signs was more severe in IBDV and ND virus infected group and ND virus was detected from trachea and cloaca swabs for a longer period and mean HI titer to ND virus in these birds was lower. Two-way analysis of variance showed IBD infection significantly affected immune humoral response ($P<0.001$). The study showed that infection of native breeder chicks with IBDV increased bird sensitivity, ND pathogenicity and virus shedding.

Key words: Infectious bursal disease, Newcastle disease, Native breeder chickens, Immunosuppression

مقدمه

نیوکاسل بیماری با واگیری بالا است که تنوع زیادی در نوع و شدت نشانه‌ها دارد. این بیماری از موانع عمده در تجارت بین المللی طیور و محصولات آن بوده و اثرات فرم حاد نیوکاسل، شدید می‌باشد. طبق تعریف سازمان بیماری‌های واگیر (OIE) بیماری نیوکاسل عفونت پرندگان با ویروس خاصی از پارامیکسوویروس تیپ یک پرندگان APMV-I از جنس آولاویروس خانواده پارامیکسوویریده می‌باشد(۳). سویه‌های ویروس نیوکاسل تنوع زیادی در شدت بیماری داشته و بر مبنای نشانه‌های بالینی مشاهده شده در جوجه‌های آلوده به پنج پاتوتیپ تقسیم می‌شوند: شکل ولوژنیک بیماری نیوکاسل (vND) از نظر اقتصادی اثرات زیان‌باری در جهان بر صنعت طیور دارد. در کشورهای در حال توسعه، نه تنها شیوع vND باعث ضرر اقتصادی سنگینی می‌شود بلکه ابزارهای کنترل بیماری از قبیل واکسیناسیون هم، هزینه‌های گزافی را به صنعت طیور وارد می‌کند. همچنین در بسیاری از کشورهای در حال توسعه vND به صورت آندمیک وجود دارد، بنابراین یک عامل محدود کننده مهم در توسعه صنعت طیور می‌باشد (۱). واکسیناسیون می‌تواند به‌شدت تحت تاثیر مایکوتوکسین‌ها، عفونت هم‌زمان، ویروس‌های سرکوب‌کننده ایمنی مانند گامبورو، مارک یا کم‌خونی عفونی و عوامل محیطی قرار گیرد. جهت ایجاد بهترین حفاظت در مقابل چالش با نیوکاسل باید تمامی این عوامل را مدنظر قرار داد.

بیماری گامبورو در اثر ویروسی از خانواده بیرناویریده و جنس بیرناویروس ایجاد می‌شود. عفونت با این ویروس تا سن سه هفتگی از طریق تخریب بافت لنفوئیدی بورس فابریسیوس باعث تضعیف سیستم ایمنی و درنتیجه کاهش یا عدم پاسخ به واکسن‌های متداول و نیز افزایش حساسیت در برابر دیگر بیماری‌های عفونی می‌شود. درحالی که در سنین بالاتر (معمولاً سه تا شش هفتگی)، ممکن است با نشانه‌های درمانگاهی و تلفات ۲۰-۱۵ درصد همراه باشد (۵). بیماری بورس عفونی یک عفونت بسیار واگیر و سرکوبگر سیستم ایمنی در ماکیان جوان است جوجه‌هایی که در یک روزگی مبتلا شده‌اند موقعی که در معرض ویروس نیوکاسل قرار گیرند برای مدت طولانی توانایی پاسخ را از دست می‌دهند. در حالی که جوجه‌هایی که در ۳ سه هفتگی مبتلا شدند فقط به طور موقت این توانایی را از دست می‌دهند. این بیماری تهدیدی جدی برای صنعت طیور کشورمان محسوب می‌گردد و علاوه بر خسارات اقتصادی ناشی از مرگ‌ومیرباعث سرکوب ایمنی و در نتیجه، افزایش حساسیت به سایر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در پرندگان مبتلا می‌شود. در کشورمان

سالیانه ۱۰ میلیون قطعه ماکیان بومی جوجه‌ریزی می‌شود و استان خوزستان با دارا بودن دو میلیون و ۱۵هزار و ۵۳۹ قطعه ماکیان بومی، در کشور در رتبه‌ی پنجم قرار دارد. از این رو توجه به امنیت زیستی طیور بومی از نظر خطر ابتلا و تلفات بالا و احتمال انتقال بیماری به طیور صنعتی اهمیت زیادی دارند. بررسی منابع نشان می‌دهد در خصوص اثرات بیماری نیوکاسل در مرغان مادر بومی کشور و تاثیر بیماری گامبورو بر بیماری نیوکاسل در ماکیان بومی مطالعات منتشر شده‌ای در دسترس نیست. با توجه به اهمیت موضوع، تحقیق حاضر به منظور مطالعه عفونت تجربی ویروس حاد بیماری نیوکاسل جدا شده از ماکیان گوشتی خوزستان از نظر نشانه‌های بالینی، تلفات، جراحات ماکروسکوپی، گسترش ویروس در بافت‌ها، دفع ویروس و ایمنی هومورال در جوجه مادر بومی مبتلا و غیر مبتلا به بیماری بورس عفونی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی ویروس‌ها

تکثیر ویروس نیوکاسل و تعیین EID۵۰

ویروس مورد استفاده در این تحقیق یکی از ویروس‌های حاد نیوکاسل است که در سال ۱۳۹۲ توسط محمدیان و همکاران از مرغداری‌های گوشتی مبتلا با تلفات سنگین در استان خوزستان جداسازی و تعیین هویت شد (۱). به منظورتعیینEID۵۰ (میزانی از ویروس که ۵۰ درصد جنین ماکیان را آلوده می‌سازد)، رقت‌های ده گانه متوالی (ضریب ۱/۱۰) از مایع آلانتوئیک حاوی ویروس نیوکاسل حاد تهیه شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت به درون حفره آلانتوئیک پنج تخم مرغ جنین دار نه تا ۱۰ روزه ماکیان تلقیح گردید.تخم مرغ‌ها مجدداً برای پنج روز دیگر انکوبه شده و روزانه حداقل یک بار ازنظر تلفات مورد بررسی قرار گرفتند. در پایان، میزان EID۵۰ ویروس بر اساس فرمول رید و مانچ محاسبه شد (۱۷).

تکثیر و تعیین عیار ویروس بیماری بورس عفونی

ویروس گامبورو مورد استفاده در این بررسی ویروس کلون شده‌ی IR۴۹۹ (GeneBank, accession number: EU09153) بود که از مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد. به منظور نگه‌داری ویروس بیماری بورس عفونی، ویروس تهیه شده در ظروف درب‌دار استریل، در مجاورت آنتی‌بیوتیک و ضدقارچ در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای تکثیر ویروس بیماری بورس عفونی، ۲۰ قطعه جوجه مرغ مادر بومی یک روزه خریداری و در یک محل کاملاً مجزا نگه‌داری شدند. این جوجه‌ها در تمام مدت دوره پرورش به دان استریل به صورت آزاد دسترسی داشتند. در سن ۲۰روزگی از ورید بالی جوجه‌ها خون‌گیری به عمل آمده و پس از جداسازی سرم، میزان پادتن ویژه بیماری بورس عفونی و بیماری نیوکاسل با آزمایش الایزا ردیابی گردید و پس از تایید نداشتن پادتن ویژه بیماری گامبورو و نیوکاسل، جوجه‌ها با ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون ۱۰ درصد بورس فابریسیوس آلوده به ویروس گامبورو با دوز 10^3 و از راه داخل بورس تلقیح و سپس۷۲ ساعت پس از تلقیح تمام جوجه‌ها کشته شدند و بورس آن‌ها تحت شرایط بهداشتی برداشته شد. سپس بورس‌های جمع‌آوری شده به کمک قیچی در هاون چینی استریل خرد شده و در بافرسالین فسفات (PBS)، سوسپانسیون ۱۰ درصد آن تهیه گردید. سوسپانسیون با دور۲۰۰۰ به مدت۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد، مایع رویی جداشده و تا هنگام آزمایش در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (۱۱). در مرحله بعد تعداد ۵۵ جوجه مادر بومی یک روزه خریداری و در دو قفس ۲۵ تایی تا سن ۲۱ روزگی تحت شرایط محیطی کنترل شده و دسترسی آزاد به آب و غذای استریل نگه‌داری شدند. خوراک جوجه‌ها پس از پیچاندن در فویل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد استریل و سپس در اختیار آن‌ها قرار گرفت. جوجه‌ها در سن ۲۱ روزگی به ۱۱ گروه پنج‌تایی با دیواره‌های موقت جدا شدند. به ۱۰ گروه، ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف ویروس گامبورو به روش قطره‌ی چشمی تلقیح شد. به گروه ۱۱ به عنوان کنترل همان مقدار آب مقطر تزریق و در محل جداگانه‌ایی نگه‌داری شد. با مشاهده نشانه‌های بالینی جوجه‌ها، تلفات و کالبدگشایی، CID۵۰ آن‌ها با استفاده از فرمول رید و مانش محاسبه گردید (۱۶).

طرح آزمایش

یکصد و چهل جوجه مادر بومی یک روزه از گله مرغ مادر بومی جهاد خوزستان خریداری و ۲۰ قطعه در روز اول جهت تعیین میزان پادتن ویژه ویروس نیوکاسل و ویروس بیماری بورس عفونی به روش انسانی

جدول ۱ - زمان‌بندی چالش با سویه‌های حاد ویروس گامبورو و نیوکاسل

گروه‌ها	تلقیح ویروس بیماری گامبورو در یک‌روزگی	چالش با ویروس بیماری نیوکاسل در ۳۰ روزگی
گروه ۱	+	+
گروه ۲	+	استریل PBS
گروه ۳	-	+
گروه ۴	-	استریل PBS

کشتار و سرم خون‌شان پس از سانتریفوژ جدا گردید. باقی جوجه‌ها به طور تصادفی به چهار گروه مساوی ۳۰ قطعه‌ای تقسیم شدند و تحت شرایط بهداشتی تا پایان دوره آزمایش در چهار مکان مجزا تحت شرایط یکسان و دسترسی آزاد به آب و دان استریل نگه‌داری شدند.
جوجه‌های گروه اول و دوم در یک‌روزگی به ویروس بیماری بورس عفونی با دوز 10^3 CID۵۰ به روش داخل بورس تلقیح شدند. جوجه‌های گروه سوم و چهارم به ویروس بیماری بورس عفونی آلوده نشدند. در سن ۲۵ روزگی، ۱۰ قطعه از هر گروه از طریق ورید بال و برای تعیین عیار پادتن مادری ممانعت کننده از هماگلوتیناسیون (HI) ضد نیوکاسل مطابق با روش Beard و Thayer (۲۰۰۸) خون‌گیری شدند. همچنین میزان پادتن ضد ویروس گامبورو به روش الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از اطمینان از منفی شدن پادتن‌های مادری ضد ویروس نیوکاسل، جوجه‌های گروه یک و سه در سن ۳۰ روزگی به مکان دیگری منتقل شده و هر جوجه با ۰/۱ میلی لیتر از مایع آلانتوئیک حاوی 10^5EID۵۰ ویروس حاد نیوکاسل به روش چشمی- بینی تلقیح شدند. هر کدام از جوجه‌های گروه دو و چهار نیز حجم مساوی از PBS استریل را به همان شیوه دریافت کردند. جوجه‌ها بعد از تلقیح، روزانه چهار بار ازنظر ثبت نشانه‌های درمانگاهی و تلفات تحت نظر قرارگرفتند (۶).

نمونه‌گیری

در روزهای دو، ۵، ۱۰ و ۱۵ پس از تلقیح، چهار جوجه ازهمه‌ی گروه‌ها به روش تصادفی انتخاب، و نمونه سوآب از کلواک و نای آن‌ها تهیه ودر یک میلی‌لیتر محیط گلیسرول بافره قرار داده شد و تا زمان آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سپس جوجه‌ها آسان‌کشی و کالبدگشایی شدند و جراحات ماکروسکوپیک در کاریرگ مخصوص ثبت گردید. همچنین نمونه‌های بافتی از مغز، نای، کلیه، ریه و کبد جهت ردیابی ویروس با استفاده از تکنیک PCR تهیه شدند..

ردیابی ویروس

به منظور ردیابی ویروس بیماری نیوکاسل، در نمونه‌های بافتی و سوآب‌های نای و کلواک، پس از چالش در جوجه‌ها، از آزمون RT-PCR استفاده شد.

استخراج RNA از مایع آلانتوئیک

پس از خروج نمونه‌ها از حالت انجماد، ۱۰۰۰ میکرولیتر RNX (ساخت شرکت سیناژن، ایران) به هر لوله حاوی ۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم نمونه بافتی له شده با هاون و یا PBS استریل حاوی سوآب اضافه شده و به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد تا سلول‌ها لیز گردیده و اسید نوکلئیک آزاد شود. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از کلروفرم به لوله‌ها اضافه گردید و به مدت ۱۵ ثانیه لوله‌ها را به آرامی تکان داده و به مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرارداده شد.در مرحله بعدی لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی، که حاوی مولکول‌های اسیدریبونوکلئیک بود، به‌طوری‌که با مایع در فاز میانی مخلوط نگردد برداشت شد و به لوله‌های جدید منتقل گردید. در مرحله بعد، هم حجم با این مایع، ایزوپروپانول بر این امحلول کردن ژنوم اضافه شده و کاملاً مخلوط گردید و ۱۵ دقیقه روی یخ نگه‌داری شد. مجدداً لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از دور ریختن مایع رویی و مشاهده پلت سفید رنگ قطره اشکی در ته لوله، یک میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد به هر لوله اضافه، و لوله‌ها به مدت هشت دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در انتها مایع رویی را دور ریخته و اجازه داده شد تا در دمای اتاق تمام الکل تبخیر شود و رسوب خشک گردد. سپس ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به هر لوله اضافه شده و تا زمان ساخت cDNA در فریزر ۷۰- نگه‌داری گردیدند.

ساخت cDNA

برای ساختن cDNA از RNA استخراج شده از کیت RT Pre Mix AccupowerR (ساخت شرکت بیونیر، کشور کره) استفاده گردید. برای این کار از زوج آغازگرهای شناساگر ژن F ویروس نیوکاسل (۲) استفاده گردید. مشخصات زوج آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آمده است. برای انجام این واکنش۱۰ میکرولیتر از یک نمونه همراه با یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت۲۰ میکرولیتر مخلوط و به مدت پنج دقیقه دردمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس این مخلوط به لوله‌های ۰/۲ میلی‌لیتری مخصوص کیت منتقل شده و با آب مقطر حاوی به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. به وسیله تکان دهنده گردابی (ورتکس) پلت‌های لیوفیلیزه و محتویات با هم مخلوط گردید و پس از یک سانتریفیوژ کوتاه، روغن معدنی به هر یک از لوله‌ها اضافه شد. این واکنش با برنامه‌ای به قرار زیر انجام شد:

جدول ۲ - توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش PCR

توالی نوکلئوتیدی	ژن هدف
F: TT GAT GGCAGG CCT CTT GC	F
R: GG AGG ATG TTG GCA GCATT	F

۱-۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه (به منظور سنتز cDNA)
-۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه (غیرفعال کردن)
cDNAهای ساخته شده بلافاصله تا زمان استفاده به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند.
تزاید cDNA با استفاده از PCR میزان عوامل شرکت کننده در واکنش به شرح زیر است:

1- MgCl2 (50 mM): 0.6 µl
2- PCR Buffer: 2 µl
3- dNTPs (10 mM): 0.2 µl
4- Taq polymerase: 0.2 µl
5- Primer R (20 pmol): 1 µl
6- Primer F (20 pmol): 1 µl
7- DW: 10 µl
8- cDNA: 5 µl

این واکنش با دستگاه ترمال سایکلر گرادیانت با برنامه‌ای به قرار زیر انجام شد:
۱- ۴۰ سیکل شامل: ۹۵ و۵۳ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد هرکدام به مدت یک دقیقه
۲- به دنبال آن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

ارزیابی محصول PCR

محصولات PCR در ژل آگارز یک درصد، با استفاده از مارکر DNA، ۱۰۰ جفت باز (ساخت شرکت سیناژن، ایران) به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز گردید و باند ۳۳۰ جفت باز مشاهده گردید.

ارزیابی ایمنی هومورال

در روزهای صفر، پنج و ۱۴ پس ازآلودگی از ورید بالی ۱۰ جوجه از هر یک از چهار گروه خون گیری وپس از جداسازی سرم، عیار پادتنی ضد ویروس‌های نیوکاسل به روش بتای ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) اندازه‌گیری شد.

آزمایش هماگلوتیناسیون (HA) و ممانعت از هماگلوتیناسیون

ابتدا آزمایش هماگلوتیناسیون برای تعیین عیار آنتی‌ژنویروس نیوکاسل به منظور تهیه ۴ واحد هماگلوتیناسیون جهت آزمایش HI انجام گرفت.در ادامه سرم‌ها از فریزر خارج شدن و پس از هم دما شدن با محیط، سرم‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا عوامل غیراختصاصی مثل کمپلمان‌ها از بین بروند. در ادامه عیار پادتن نمونه‌ها به روش بتای ممانعت از هماگلوتیناسیون با استفاده از چهار واحد هماگلوتیناسیون انجام گرفت. تمام نمونه‌ها برای سنجش عیار علیه ویروس‌های نیوکاسل دارای تکرار بودند و در صورت اختلاف در نتایج، میانگین تکرارهابه‌عنوان عیار نهایی استفاده شد (۱۶).

روش آماری

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ به طور توصیفی و تحلیلی بررسی شدند. به منظور تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس دو طرفه (Two way analysis of variance) و آزمون تکمیلی دانکن استفاده گردید. α=۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار آماری مد نظر قرار گرفت.

نتایج

نشانه‌های بالینی و کالبدگشایی

نشانه‌های بالینی در روز دوم بعد از آلودگی به شکل کاهش شدید اشتها و بلع هوا در گروه‌های دریافت کننده‌ی ویروس بیماری نیوکاسل مشاهده شد (شکل ۱). همچنین در این زمان، در کالبد گشایی نفروز کلیوی، کبد برنزه و کلیه متورم و ترشحات نای در گروه یک مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۳) که شدت و تعداد دفعات تکرار این نشانه‌ها در گروه یک نسبت به گروه سه بیشتربود و در سایر گروه‌ها نشانه‌ای از بیماری مشاهده نگردید. نشانه‌های عصبی شامل فلجی، لرزش سر و افتادگی یک یا دو بال، از روز چهار در گروه‌های یک و سه مشاهده گردید. در نمونه‌گیری روز پنجم، کدورت کیسه‌های هوایی و خون‌ریزی در دستگاه گوارش در گروه‌های آلوده به نیوکاسل مشاهده شد (شکل‌های ۶ و ۷). در این روز همچنین ژولیدگی پرها، کسلی، سختی تنفس، کاهش فعالیت و افت مصرف آب و غذا در گروه‌های آلوده به ویروس‌های نیوکاسل و گامبورو (گروه یک)، در مقایسه با گروه آلوده به نیوکاسل به‌تنهایی (گروه سه)، بیش‌تر و شدیدتر مشاهده شد. این نشانه‌ها در گروه یک تا روز ۱۲ بعد از آلودگی مشاهده گردید درحالی که در گروه سه، نشانه‌های بالینی تا روز ۱۰ ادامه داشت و بعد از آن فروکش کرده و مصرف خوراک به تدریج به حالت طبیعی بازگشت. در این زمان تحلیل تیموس در گروه‌های آلوده به ویروس بیماری نیوکاسل نسبت به سایر گروه‌ها، کاملاً مشهود بود. تلفات در روز پنج بعد از آلودگی در گروه یک شروع شده، تعداد تلفات در این روز سه قطعه بوده که این تعداد در مقایسه با گروه سه، دو قطعه بیش‌تر بود، در مجموع تعداد تلفات در گروه یک، چهارده عدد و در گروه سه، دوازده عدد بود و سایر گروه‌ها هیچ‌گونه تلفاتی نداشتند. خون‌ریزی در پیش‌معده و بورس هم در گروه‌های آلوده به نیوکاسل (گروه‌های یک و ۵)، از روز پنجم بعد از آلودگی مشاهده گردید. در روز ۱۵ بعد از آلودگی، خون‌ریزی در تمام طول روده در گروه‌های دریافت کننده‌ی ویروس بیماری نیوکاسل مشاهده شد. در تمام نوبت‌های نمونه‌گیری، اندازه‌ی بورس نیز در گروه‌های دریافت کننده‌ی ویروس بیماری بورس عفونی بسیار کوچک‌تر از گروه‌هایی بود که این ویروس را دریافت نکرده بودند (شکل‌های ۴ و ۵).

نتایج آزمایش PCR

نتایج شناسایی ویروس نیوکاسل در بافت‌های‌جوجه‌های آلوده و غیر آلوده به گامبورو در جدول ۳ ذکر شده است

نتایج آزمون HI

نتایج حاصل از عیارسنجی علیه ویروس نیوکاسل، در روزهای صفر، پنج و ۱۴ بعد از چالش با نیوکاسل درجدول ۴ آمده است.آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که گروه، زمان و اثر متقابل آنها تاثیر معنی داری بر عیار پادتن دارد (P<۰/۰۰۱). مقایسه گروه‌ها در روزهای بررسی نشان داد

در روز پنجم گروه سوم با سه گروه دیگر و در روز چهاردهم گروه اول با گروه دوم، سوم و چهارم و گروه سوم با گروه دوم و چهارم اختلاف معنی داری داشت.

بحث و نتیجه‌گیری

عوامل متعددی اعم از عوامل عفونی وغیر عفونی در سطح مزارع وجود دارند که تضعیف کننده دستگاه ایمنی به شمار می‌روند. در این بین نقش ویروس‌ها بسیار پررنگ می‌باشد و در بین ویروس‌ها، ویروس بیماری گامبورو، به همراه ویروس بیماری کم‌خونی عفونی بسیار پر اهمیت می‌باشند. علاوه بر این،ویروس بیماری نیوکاسل (NDv) همچنان مهم‌ترین عامل بیماری‌زا در صنعت طیور محسوب می‌شود (OIE). طیور بومی به عنوان تأمین کننده پروتئین بخشی از مردم جامعه و خطر انتقال بیماری به طیور صنعتی حایز اهمیت هستند. کایند و همکاران (۲۰۰۳)، نشان دادند آن دسته از طیور اهلی که در مزارع پرورش طیور به سر می‌برند، شاید نقش مهمی در همه‌گیرشناسی بیماری نیوکاسل ایفا کنند. برای مثال خروس‌های جنگی در واگیری‌های بیماری نیوکاسل در ایالات متحده امریکا، به‌طور مکرر دخالت داشته‌اند. مهم‌ترین واگیری از این دست، در جنوب کالیفرنیا، در محلی که ویروس نیوکاسل در خروس‌های جنگی به‌طورگسترده‌ای حضور دارد، با توجه به تحرک و ارزش این پرندگان، تنها موجب بروز مشکلاتی در کنترل بیماری شده، بلکه در سال ۲۰۰۲-۲۰۰۳ به انتشار بیماری به ۲۱ مزرعه‌ی تخم‌گذار تجاری و کشتار سه میلیون پرنده منجر شد. در این واگیری کارکنان مزرعه‌ها و همچنین مجاورت با طیور خانگی آلوده، به‌عنوان بزرگ‌ترین خطر برای ایجاد عفونت در گله‌های طیور تجاری معرفی شدند.

در مطالعه حاضر نشانه‌های بالینی، تلفات، جراحات ماکروسکوپی، گسترش ویروس در بافت‌ها و انتشار ویروس در محیط و نیز ارزیابی پاسخ‌های ایمنی هومورال جوجه مادر بومی در روزها و گروه‌های مختلف با ایجاد عفونت تجربی ویروس حاد بیماری نیوکاسل در جوجه‌های مادر بومی متعاقب آلودگی ویروس بماری بورس عفونی مورد بررسی قرار گرفت و روز پنج بیشترین فراوانی موارد مثبت ویروس نیوکاسل در بافت‌های مختلف (در هر دو گروه تلقیح شده با نیوکاسل) را نشان داد. همچنین بیشترین موارد مثبت به ترتیب در بافت‌های ریه، مغز، نای و کلیه مشاهده گردید. دنیل و همکاران (۲۰۰۰)، جهت بررسی حضور ویروس بیماری نیوکاسل در بافت‌های مختلف از آزمون RT-PCR استفاده کردند و نشان دادند، بیشترین حضور ویروس در بافت‌های ملتحمه، لوزه‌های سکمی، ریه و کلیه بود. همچنین آنها بیشترین فراوانی حضور ویروس در بافت‌ها در جوجه‌های آلوده را، در روزهای چهار تا شش بعد از تلقیح ویروس در گزارش کردند.

دراین مطالعه جوجه‌های آلوده به ویروس بیماری گامبوروبرای مدت طولانی‌تری ویروس نیوکاسل را از نای و کلواک دفع کردند. معتمد و همکاران (۲۰۱۲) در تلقیح تجربی ویروس آنفلوانزا سروتیپ H_9N_2 در جوجه‌های گوشتی آلوده به ویروس بورس عفونی نشان دادند که آلودگی جوجه‌های گوشتی یک‌روزه به ویروس گامبورو منجر به افزایش زمان و شدت دفع ویروس آنفلونزای پرندگان سروتیپ H_9N_2 در اندام‌های مختلف شده و تلفات را افزایش داد. سابلر و میکائیل (۲۰۰۶) عفونت و دفع کمپیلوباکتر ژژونی را در ماکیان جوان به دنبال آلودگی با ویروس

جدول ۳ - شناسایی ویروس بیماری نیوکاسل در بافت‌های مختلف جوجه‌های مورد مطالعه

زمان بعد آلودگی	نای		مغز		ریه		کبد		کلیه		سواب نای		سواب کلواک	
	IBD+	IBD-	IBD+	IBD-	IBD+	IBD-	IBD+	IBD-	IBD+	IBD-	IBD+	IBD-	IBD+	IBD-
۲	۱/۴	۱/۴	۰/۴	۰/۴	۱/۴	۱/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۱/۴	۱/۴	۱/۴	۰/۴
۵	۳/۴	۳/۴	۳/۴	۳/۴	۴/۴	۴/۴	۳/۴	۳/۴	۴/۴	۲/۴	۳/۴	۳/۴	۳/۴	۳/۴
۱۰	۳/۴	۲/۴	۴/۴	۲/۴	۳/۴	۳/۴	۲/۴	۲/۴	۳/۴	۲/۴	۳/۴	۲/۴	۲/۴	۱/۴
۱۵	۱/۴	۱/۴	۳/۴	۰/۴	۱/۴	۰/۴	۱/۴	۱/۴	۲/۴	۱/۴	۱/۴	۱/۴	۲/۴	۱/۴
۱۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱/۴	۰/۴	۲/۴	۰/۴
تعداد کل	۸/۱۶	۷/۱۶	۱۰/۱۶	۵/۱۶	۹/۱۶	۸/۱۶	۶/۱۶	۶/۱۶	۹/۱۶	۵/۱۶	۹/۲۰	۷/۲۰	۱۰/۲۰	۵/۲۰

بیماری بورس عفونی مطالعه و نقص ایمنی، دفع بیشتر و آلودگی بیشتر روده، سکوم و کلوآک را در جوجه‌هایی که پس از آلوده شدن با ویروس بیماری بورس عفونی تحت چالش با کمپیلوباکتر قرار گرفته بودند گزارش کردند.

در بررسی عیار پادتن ضد ویروس نیوکاسل به روش آنالیز واریانس دو طرفه در این تحقیق نشان داده شد که آلودگی به ویروس گامبورو بر پاسخ ایمنی پرنده تاثیر داشته است. در این مطالعه تلفات در گروه آلوده به گامبورو و نیوکاسل بیش از گروه آلوده به نیوکاسل به‌تنهایی بود. در گروه کنترل و آلوده به گامبورو به‌تنهایی هیچ‌گونه تلفاتی مشاهده نگردید که نشان از عدم آلودگی این گروه‌ها تا پایان آزمایش بود. عوامل متفاوتی چون حدت ویروس نیوکاسل، مقاومت میزبان، عوامل محیطی و بیماری‌های هم‌زمان می‌توانند بر بیماری‌زایی و تلفات ویروس بیماری نیوکاسل تاثیرگذار باشند.در مطالعه‌ی حاضر تحلیل بورس در گروه‌هایی که با گامبورو در یک‌روزگی آلوده بودند بسیار شدید و در گروهی که به تنهایی با نیوکاسل آلوده شده بود به میزان کمتر مشاهده شد. در مقابل در گروه کنترل هیچ کاهش اندازه و تغییری در بورس مشاهده نشد. همچنین تحلیل تیموس در گروه‌هایی که با نیوکاسل آلوده بودند به میزان بیشتری مشاهده شد که در مقایسه با گروه کنترل و گروه آلوده به بیماری بورس عفونی به‌تنهایی، این اختلاف، قابل ذکر و مشهود بود. وستبری و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند سویه استرالیایی ویروس بیماری بورس عفونی بر پاسخ ماکیان به ویروس بیماری نیوکاسل اثر منفی داشته و عیار پادتن سرمی علیه نیوکاسل در جوجه‌های آلوده به ویروس گامبورو به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از جوجه‌هایی بود که فقط با ویروس بیماری نیوکاسل چالش شدند در ضمن دفع ویروس نیوکاسل در گروه آلوده شده با ویروس گامبورو بیشتر بود. با بررسی ایمنی هومورال از نظر پاسخ پادتن به آلودگی با ویروس نیوکاسل نتایج آن‌ها مشابه با مطالعه حاضر بود. روسن و همکاران (۲۰۰۷) نیز عفونت تحت بالینی با ویروس بیماری بورس عفونی در سنین اولیه را یکی از دلایل مهم کاهش پاسخ ایمنی نسبت به واکسن نیوکاسل و در نتیجه بروز بیماری نیوکاسل در گله‌های گوشتی تجارتی علی‌رغم دو مرحله واکسیناسیون، بیان کردند. تانگوئیلو و همکاران (۱۹۹۸) بیماری‌زایی و اثرات سرکوب‌گر ایمنی جدایه‌های مزرعه و سویه‌های واکسن ویروس بیماری بورس عفونی در هندوستان را مطالعه کرده و به این نتیجه رسیدند که یک سویه واکسن ضعیف علی‌رغم بیماری‌زا نبودن به شدت سرکوب کننده سیستم ایمنی است. در ضمن واکسن‌های با حدت متوسط شدیداً اثر سرکوب ایمنی دارند. همچنین پاسخ ایمنی را با ارزیابی ایمنی هومورال ضد گلبول‌های قرمز گوسفند و ویروس واکسن نیوکاسل و پادگن بروسلا آبورتوس در جوجه یک روزه مطالعه کردند و کاهش معنی‌دار پاسخ پادتن ضد واکسن نیوکاسل در گروه‌های آلوده شده با بیماری گامبورو مشاهده نمودند. میاحی و همکاران (۱۹۹۸) نیز اثرات داروی سیکلوفسفامید و ویروس بیماری بورس عفونی را بر روی اندام‌های لنفاوی و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی نسبت به واکسن نیوکاسل مورد بررسی و عیار پادتن را به دو روش الایزا و ممانعت از هماگلوتیناسیون اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار دادند. در این مطالعه وزن بورس، طحال، تیموس نسبت به وزن بدن در گروه‌های آلوده شده با ویروس گامبورو کاهش و کمتر از گروه کنترل بود. آن‌ها نشان دادند که اثرات سرکوب ایمنی ویروس گامبور و در جوجه‌هایی که در یک روزگی آلوده شدند نسبت به جوجه‌هایی که در ۱۴ روزگی مبتلا شدند بیشتر بود.

نتیجه‌گیری نهایی

این مطالعه نشان داد مرغ مادر بومی همانند مرغ مادر صنعتی به بیماری نیوکاسل بسیار حساس هستند و آلودگی قبلی با ویروس بیماری گامبورو

جدول ٤- میانگین ± انحرف معیار عیار پادتن (HI) ضد ویروس نیوکاسل بر مبنای لوگ دو در گروه‌های مورد مطالعه

گروه	روز صفر	روز پنجم	روز چهاردهم
۱	۱/۶	۲/۲b	۳/۷۰b
۲	۱/۹	۱/۰۳b	۱/۳c
۳	۱/۷	۴/۶۴a	۹/۳۶a
۴	۱/۶	۲/۰۰b	۱/۵c
خطای استاندارد میانگین(SEM)	۰/۳۴	۰/۳۳	۰/۲۹
سطح معنی‌داری(P-value)	۰/۹۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
ضریب تغییرات (cv)	۶۴/۸۸	۴۵/۴۱	۲۳/۰۹

حروف گذاری متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار داده‌ها با مقایسه میانگین دانکن در سطح ۰/۵۰ است.

آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که گروه، زمان و اثر متقابل آن‌ها تاثیر معنی‌دار بر تیتر دارد (P<۰/۱۰۰).

می‌تواند منجر به حساسیت بیش‌ترآن‌ها به ویروس بیماری نیوکاسل گردد و توصیه می‌گردد طیور مادر بومی نیز همانند طیور صنعتی با واکسن‌های زنده و کشته ضد بیماری گامبورو واکسینه شوند تا از بروز بیماری گامبورو به خصوص در سنین زیر سه هفته و عوارض حاصل از تضعیف ایمنی در جوجه‌های حاصل از مادران بومی جلوگیری شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان وظیفه خود می‌دانندازمعاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که پژوهش فوق را حمایت مالی نمودند، تشکر و قدردانی نمایند. از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج بابت فراهم نمودن ویروس بیماری بورس عفونی صمیمانه تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- Alexander, D.J., and Senne, D. A. (2008); Newcastle disease. In Diseases of Poultry. Saif, Y.M., Fadly,A.M., Glisson, J.K., Mcdouglad, L.R., Nolan, L.K., and Swayne, D.E. 12th Edition. Blackwell Publishing Professional. Ames, Iowa, U.S.A: 75-100.

2- Boroomand, Z., Jafari, R. A., Mayahi, M. (2016); Molecular

جدول ۵- تلفات روزانه گروه‌های مورد مطالعه در زمان آزمایش

زمان بعدآلودگی	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴
	IBD+/ ND+	IBD+/ ND+	IBD+/ ND+	IBD+/ ND+
۱	۰	۰	۰	۰
۲	۰	۰	۰	۰
۳	۰	۰	۰	۰
۴	۰	۰	۰	۰
۵	۳	۰	۱	۰
۶	۵	۰	۳	۰
۷	۲	۰	۵	۰
۸	۲	۰	۲	۰
۹	۱	۰	۰	۰
۱۰	۰	۰	۱	۰
۱۱	۰	۰	۰	۰
۱۲	۱	۰	۰	۰
۱۳	۰	۰	۰	۰
۱۴	۰	۰	۰	۰
۱۵	۰	۰	۰	۰
۱۶	۰	۰	۰	۰
۱۷	۰	۰	۰	۰
۱۸	۰	۰	۰	۰
تعدادکل	۱۴	۰	۱۲	۰

characterization and phylogenetic study of the fusion genes of Newcastle disease virus from the recent outbreaks in Ahvaz, Iran. *VirusDis*., 27(1):102–105

3- Bwala, D.G. (2009). Challenge studies in chickens to evaluate the efficacy of commercial Newcastle disease vaccines against the strains of Newcastle disease virus prevalent in South Africa since 2002. Thesis of Master of Science. Department of Production Animal Studies Faculty of Veterinary Science University of Pretoria.

4- Daniela S. Gohm1, Barbara Th¨ur* & M. A. Hofmann. (2000). Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. *Avian Pathology*, 29, 143– 152.

5- Eterradossi, N. and Saif, YM. (2013). Infectious Bursal Disease. In: Swayne, DE.; Glisson, JR.; McDougald, LR.; Nolan, LK.; Suarez, DL. And Nair, V. (Eds). Diseases of Poultry. 13th ed. John Wiley & Sons, Inc: Ames, USA, PP: 219-246.

6- Genova, K. (2000). Influence of the infectious bursal disease virus strains on the avian immune system. *Experimental Pathology and Parasitology*, 4: 27-30.

7- Kinde H, Uzal F, Hitala S et al (2003) The diagnosis of exotic Newcastle Disease in southern California; 2002-2003. Proceeding of the 46th Annual Conference of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians San Diego, CA, October 11-13, 2003.

8- Mayahi, M. (1999). Effects of Cyclophosphamid in IBD, immune response and lymphoid organs in broiler chickens. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahaid Chamran University of Ahvaz.

9- Mohammadian Ghale Jooghi B. (2015), Isolation and molecular identification of Newcastle disease virus from suspected broiler farms in Khouzestan province and evaluation of the protection of B1 Newcastle disease vaccine against the most prevalent isolate. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahaid Chamran University of Ahvaz.

10- Motamed, N.; Mayahi, M.; Seifi, MR. (2012). Experimental infection whit avian influenza virus subtype H9N2 in broiler chicks with infectious bursal disease virus. *Online Journal of Veterinary Research*, 16(13): 232-239.

11- Ogawa, M.; Wakuda, T.; Yamaguchi, T.; Murata, K.; Setiyono, A.; Fukushi, H. and Hirai, K. (1998). Seroprevalence of infectious bursal disease virus in free-living wild birds in Japan. *Journal Of Veterinary Medical Science,* 60 (11): 1277-1279.

12- OIE (office international des epizooties), 2009. Newcastle disease In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2009. Chapter 2.3.14: 576-589.

13- Roussan, D. A., Haddad, R., Khawaldeh, G., and Shaheen, I. (2007). Newcastle disease virus infection related to subclinical Infectious bursal disease. *The Journal of Poultry Science.* 44: 446-452.

14- Subler,K. A., Mickael, C. S., and Jackwood, D. J. (2006). Infectious bursal disease virus-induced immunosuppression exacerbates Campylobacter jejuni. *Avian Diseases*, 50: 179-84.

15- Thangavelu, G. A., and Venugopalan, A. T. (1998). Pathogenicity Immunsuppressive Properties of Infectious Bursal Disease Virus Field Isolats and Commrcial Vaccins in India. *Tropical Animal Health and Production*, 30: 167-176.

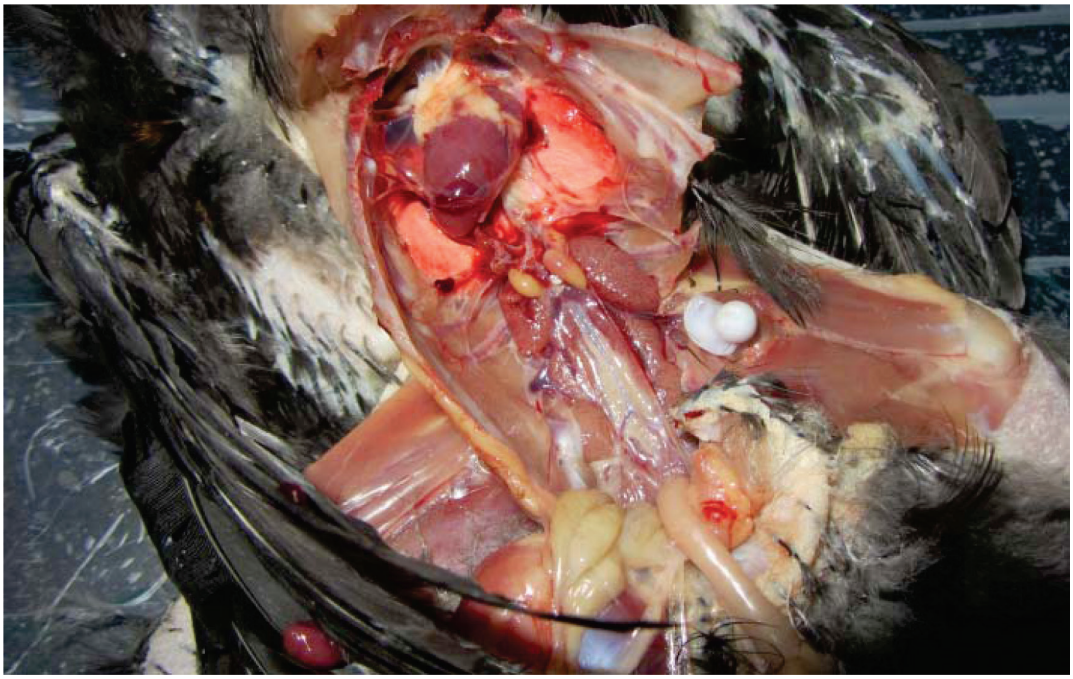
16- Thayer, S.G. and Beard, C.W. (2008). Serologic Procedure. In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Caractrization of Avian Pathogens. Edit by Dufor-Zavala, L.; Swayne, D.E.; Glison, J.R.; Pearson, J.E.; Reed, M.W. and Woolcock, P.R. 5th Edition, published by AAAP, Inc. Athens, Georgia, pp: 222-229.

17- Villegas P (2008). Titration of biological suspensions. In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens. Dofour-Zavala L, Swayne DE, Glisson JR, Pearson JE, Reed WM, Jackwood MW and Woolcock Pr (eds), 5th edition. *American Assosiation of Avian Pathologists, Athens, GA,* PP: 217-221.

18- Westbury, H. A.(2008). Interaction between Infectious Bursal Disease virus and Newcastle Disease virus in chicken. *Australian Veterinary Journal,* 54: 349-351.

شکل ۱- گروه‌های یک و سه، کسلی، سختی تنفس، عدم تمایل به راه رفتن، افتادگی بال همچنین همراه با اسهال سبز رنگ، روز پنجم بعد از آلودگی با نیوکاسل .

شکل ۲- گروه یک، کبد متورم و برنزه، روز دوم بعد از چالش با نیوکاسل.

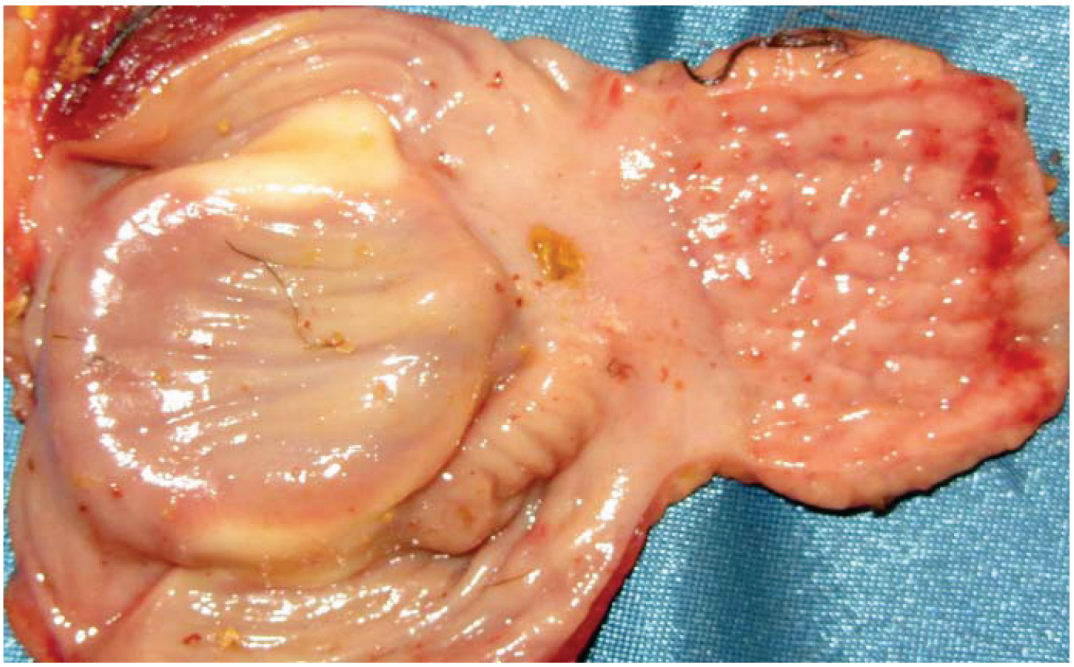


شکل ۳- گروه یک، نفروز به همراه تورم کلیوی روز دوم بعد از چالش با نیوکاسل.

شکل ٤- گروه سه، بورس پرنده سالم قبل از چالش با ویروس نیوکاسل.

شکل ۵- گروه یک، بورس تحلیل یافته پرنده قبل از چالش با ویروس نیوکاسل.

شکل ٦- گروه‌های یک و سه، پنج روز بعد از آلودگی، خونریزی در روده به همراه کبد متورم و برنزه.



شکل ۷- گروه یک، خون‌ریزی در رأس غدد پیش معده، روز پنجم بعد از آلودگی با نیوکاسل.