۹۴۳۵۴

دانشگاه شیراز

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری تخصصی در رشته بیماریهای طیور

شناسایی ملکولی کلون/کلونهای سوش واکسینال لاسوتا موسسه رازی با روش RT-PCR

توسط

دکتر محمد جواد مهربانپور

اساتید راهنما

دکتر حبیب الله دادرس

دکتر سیدعلی پوربخش

۱۳۸۶/۱۱/۲۵

آذرماه ۱۳۸۶

۹۴۳۵۴

به نام خدا

تعیین هویت مولکولی کلون/ کلونهای سوش واکسینال لاسوتا مؤسسه رازی با روش RT-PCR

بوسیله ی:

محمدجواد مهربانپور

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی از فعالیتهای تحصیلی لازم برای اخذ درجه دکترای تخصصی

در رشته ی:

بیماریهای طیور

از دانشگاه شیراز

شیراز – جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی و تصویب شده توسط کمیته پایان نامه با درجه ی: عـــــالـــــی

دکتر حبیب اله دادرس، استاد بخش بیماریهای طیور دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

(استاد راهنما و رئیس کمیته).....

دکتر سیدعلی پوربخش، دانشیار بخش بیماریهای طیور مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج

(استاد راهنما و رئیس کمیته).....

دکتر سیدمحمدحسین حسینی، استادیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز(مشاور).....

دکترعلی محمدی، استادیار بخش ویروس شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز (مشاور).....

دکتر کرامت اساسی، دانشیار بخش بیماریهای طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز (داور).....

دکتر حسن نیلی، دانشیار بخش بیماریهای طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز (داور).....

آذر ماه ۱۳۸۶

تقدیم به:

انسانهای والایی که شمع وجودشان را سوختند وسختی‌ها را برخود هموار نمودند تا من در مرحله آموختن بتوانم قدمی هر چند نا چیز بردارم.

سپاسگزاری

اکنون که به لطف خداوند این رساله به پایان رسیده است لازم میدانم که مراتب قدردانی وسپاس بیکران خود را از کلیه عزیزانی که درانجام این تحقیق مساعدت و همکاری نمودند ابراز دارم.

ازاستاد بزرگوارومحترم جناب آقای دکترادرس که همواره باراهنمائی ها وتوصیه های دقیق وسازنده درطول انجام این پایان نامه وهمچنین دردوران تحصیل مرا مرهون الطاف خود قراردادند بی نهایت سپاسگزارم.

ازاستاد محترم جناب آقای دکترسیدعلی پوربخش که باخلوص نیت وتواضع همواره مرا مورد لطف خود قرار دادند سپاسگزاری میگردد.

ازاستاد عزیزجناب آقای دکترسیدمحمدحسین حسینی که درطول انجام این پایان نامه صمیمانه همواره درکناراینجانب بودند وباراهنمائیهای ارزنده شان مرا مورد لطف خود قراردادند قدردانی میگردد.

ازاستاد محترم جناب آقای دکترمحمدی به سبب راهنماییهای ارزنده شان تشکرمیگردد.

ازاساتید محترم جناب آقای دکترنیلی ودکتراساسی به سبب قبول داوری پایان نامه کمال تشکر رادارم.

ازاستاد محترم جناب آقای دکترمعتمدی فر به سبب راهنمائیهای ارزنده شان درطول انجام پایان نامه قدردانی می‌گردد.

ازاستاد محترم جناب آقای دکترساجدیان‌فرد به سبب همکاری‌های متعددشان سپاسگزاری می‌گردد.

ازآقای دکترشوشتری پورمحمره به سبب همکاری های علمی و عملی درطول انجام پایان نامه تقدیربعمل می‌آید.

ازآقایان: دکترمحمدمهدی نام‌آوری، علی شیرازی‌نژاد وسرکارخانم دکتر شهره فرشاد و تمامی پرسنل موسسه رازی شیراز سپاسگزاری میگردد.

چکیده

شناسایی ملکولی کلون/کلونهای سوش واکسینال لاسوتا موسسه رازی با روش RT-PCR

به وسیله ی :

محمد جواد مهربانپور

بیماری نیوکاسل یک بیماری ویروسی واگیردار است این بیماری در بسیاری از کشورها از جمله ایران بعنوان یک عامل محدود کننده صنعت طیور محسوب می گردد. یکی از مهمترین راههای پیشگیری و کنترل بیماری از طریق واکسیناسیون می باشد. سالهاست که در ایران واکسن این بیماری تهیه و مورد مصرف قرار می‌گیرد لیکن شیوع بیماری گاها" خسارات عمده ای به مرغداران وارد کرده است. واکسن های بیماری نیوکاسل به دو صورت زنده و غیر فعال شده در ایران توسط مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه و توزیع می گردد. واکسن لاسوتا یک واکسن زنده نیوکاسل است که جهت واکسیناسیون طیور مورد استفاده قرار می گیرد. امروزه در بسیاری از کشورهای دنیا واکسن های کلون شده مورد استفاده قرار می گیرد. جهت کلون کردن یک ویروس، یکی از راهها، رشد ویروس روی کشت سلول و جدا کردن پلاک‌های متفاوت و بررسی آنها از لحاظ مورفولوژی و ژنتیکی است و در صورتی که تفاوت ژنتیکی و مورفولوژی در کلون ها به اثبات رسد، لازم است که مطالعات ایمنی‌زایی و بیماری‌زایی هر کلون به تفکیک مورد بررسی قرار گیرد، هدف از این تحقیق بررسی مولکولی کلونهای واکسن لاسوتا تولید موسسه رازی بمنظور مقایسه مولکولی ویروس تولیدی با سوشهای ثبت شده در بانک ژنی و بررسی میزان تشابه با آنها میباشد.بدین منظور ابتدا سلول فیبروبلاست جنین جوجه با استفاده از تخم مرغ SPF جنین دار تهیه گردید سپس ویروس واکسن لاسوتا بر روی سلولهای فیبروبلاست جنین جوجه عادت داده شد.رقتهای مختلف از ویروس عادت داده شده به سلول فیبروبلاست جنین جوجه برده شد و با استفاده از محیط DMEM حاوی سولفات منیزیوم ترپسین و آگارپلاک ایجاد گردید.پلاکهای مجزا در رقت 10^{-6} بدست آمد. پلاکهای بدست آمده مجدداً سه بار بر روی سلولهای فیبروبلاست جنین جوجه برده شدند و کلونها بطور جداگانه برداشت گردیده و به تخم مرغ SPF تلقیح شدند و پس از ۴۸ ساعت ویروسها (کلونها) برداشت و نسبت به جدا کردن RNA هر کلون بطور مجزا اقدام گردید.پس از آن با استفاده از پرایمر bp ۱۳۴۹ که منطقه شکستگی F را در بر میگرفت نسبت به انجام PCR اقدام گردید سپس محصول PCR خالص سازی گردید و جهت سکونسینگ به شرکت MWG آلمان ارسال شد نتایج بدست آمده از ردیف نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه هر نمونه بطور جداگانه با یکدیگر ودیگر ویروسهای نیوکاسل ثبت شده در بانک ژنی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج بررسی مولکولی بدست آمده در این مطالعه از هر کلون، بطور مجزا نشان داد که تفاوتهایی در سکانس ژنی و ردیف نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه، وجود دارد اما با وجود تفاوتهای مشاهده شده در ردیف اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدی، مشاهده گردید که ردیف اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدی تمامی کلونها در منطقه پروتئین F با ویروس سوش لاسوتای D Q۱۹۵۲۶۵۱ شباهت دارند توالی ،اسیدهای آمینه تمام کلون های بدست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که نه تنها سوش واکسن متعلق به نوع لنتوژنیک ویروسهای عامل بیماری نیوکاسل است بلکه هر ۶ کلون با ویروس لاسوتای موجود در بانک ژنی به شماره DQ-۱۹۵۲۶۵۱، ۹۸- ۹۹درصد همخوانی داشته است. و این نشان دهنده این است که هیچگونه

تغییراتی در منطقه شکستگی پروتئین F در طول ۳۰ سال تهیه این واکسن ایجاد نشده است. در تمامی ۶ کلون مورد بررسی موتیف در منطقه شکستگی پروتئین F بصورت G-G-R-Q-G-R-L[۱۱۷] بود این موتیف دقیقاً مشابه سویه لاسوتا می باشد.

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول ۱
مقدمه و هدف ۱
فصل دوم ۴
کلیات ۴
۱-۲- بیماری نیوکاسل: ۴
۲-۲- تاریخچه بیماری نیوکاسل: ۴
۱-۲-۲- تاریخچه بیماری نیوکاسل در ایران: ۶
۳-۲- تاریخچه واکسن نیوکاسل در ایران: ۷
۴-۲- اتیولوژی: ۸
۱-۴-۲- خانواده پارامیکسوویریده: ۸
۲-۴-۲- تقسیم بندی: ۸
۵-۲- ویروس بیماری نیوکاسل: ۱۰
۱-۵-۲- مشخصات ویروس: ۱۰
۶-۲- همانندسازی ویروس بیماری نیوکاسل: ۱۳
۷-۲- خصوصیات بیولوژیکی ویروس نیوکاسل: ۱۴
۱-۷-۲- فعالیت هماگلوتیناسیون: ۱۴
۲-۷-۲- نورآمینداز: ۱۵
۸-۲- طبقه بندی ویروس های نیوکاسل: ۱۵
۱-۸-۲- ایجاد پلاک: ۱۷
۲-۸-۲- جدا شدن گلبول های قرمز: ۱۷
۳-۸-۲- مقاومت در برابرحرارت: ۱۷
۴-۸-۲- آنتی ژنیسیته: ۱۷
۵-۸-۲- تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن های پروتئینی F و هماآگلوتینین نورآمینداز: ... ۱۸
۶-۸-۲- پلی پپتیدهای ساختمانی: ۱۸
۹-۲- رشد ویروس نیوکاسل بر روی کشت سلول: ۱۸
۱۰-۲- پاتوژنز بیماری: ۲۰
۱-۱۰-۲- آثار کالبدگشایی: ۲۱
۲-۱۰-۲- ضایعات میکروسکوپی: ۲۱
۳-۱۰-۲- علائم کلینیکی بیماری: ۲۲

۳-۳-۱۰-۲- فرم مزوژنیک: ۲۳
۱۱-۲- سویه های ویروس: ۲۴
۱-۱۱-۲- سویه های ولوژنیک: ۲۴
۲-۱۱-۲- سویه های مزوژنیک: ۲۵
۳-۱۱-۲- سویه های بدون علائم: ۲۵
۴-۱۱-۲- سویه های لنتوژنیک: ۲۵
۱۲-۲- میزبانهای بیماری نیوکاسل: ۲۵
۱۳-۲- دوره کمون بیماری: ۲۵
۱۴-۲- انتقال: ۲۶
۱۵-۲- ایمنی: ۲۶
۱-۱۵-۲- ایمنی با واسطه سلولی (CMI): ۲۶
۲-۱۵-۲- ایمنی مادری: ۲۷
۳-۱۵-۲- ایمنی هومورال: ۲۸
۱۶-۲- مقاومت ویروس به عوامل فیزیکی و شیمیایی: ۲۹
۱۷-۲- واکسیناسیون: ۲۹
۱-۱۷-۲- تاریخچه واکسیناسیون: ۲۹
۲-۱۷-۲- واکسنهای زنده: ۳۰
۳-۱۷-۲- واکسنهای کشته شده: ۳۲
۴-۱۷-۲- واکسنهای مزوژن: ۳۲
۵-۱۷-۲- واکسنهای نوترکیب: ۳۲
۶-۱۷-۲- واکسنهای کلون شده: ۳۳
۱۸-۲- بررسی مولکولی ژنوم ویروس بیماری نیوکاسل: ۳۶
۱۹-۲- کشت سلول: ۳۹
۲۰-۲- رشد ویروس در کشت سلولی ۴۰
۲۱-۲- ایجاد پلاک توسط ویروس نیوکاسل: ۴۱
۲۲-۲- روش مولکولی: ۴۵
۲۳-۲- واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): ۴۵
۱-۲۳-۲- اساس کار PCR: ۴۷
۲-۲۴-۲- واکنش زنجیره ای پلی‌مراز با نسخه برداری معکوس RT-PCR: ۴۷
۳-۲۳-۲- مواد مورد نیاز در واکنش PCR: ۴۸
۳-۳-۲۳-۲- پرایمرها: ۴۹
۴-۲۳-۲- سیکلهای PCR: ۵۰

۵-۲۳-۲-مراحل آزمایش PCR : ۵۲
۳- ۵-۲۳-۲- مرحله ساخت: ۵۲
۲۴-۲- آشکارسازی محصول PCR: ۵۳
فصل سوم ۵۵
مواد و روش کار ۵۵
۱-۳- مواد و وسایل مورد نیاز: ۵۵
۱-۱-۳- وسایل و دستگاههای مورد نیاز: ۵۵
۱- بن ماری ۳۷ درجه ۵۵
۲-۱-۳- مواد و معرفهای مورد نیاز: ۵۶
۲-۳- روش کار: ۵۷
۱-۲-۳- مراحل ایجاد پلاک توسط واکسن لاسوتا: ۵۷
۲-۲-۳- تعیین تیتر عفونت زایی ویروس واکسن لاسوتا: ۵۸
۳-۳- محاسبه EID_{50} واکسن لاسوتا: ۶۴
۳-۳- سازگار کردن ویروس واکسن لاسوتا: ۶۵
۱-۳-۳- تهیه سلول فیبروبلاست جنین جوجه: ۶۶
۲-۳-۳- کشت سلولی: ۶۶
۲-۳-۳- شمارش سلول: ۶۸
۳-۳-۳- تهیه محیط کشت DMEM جهت تهیه فیبروبلاست تک لایه جنین جوجه: ۶۹
۴-۳- مراحل سازگار کردن ویروس به سلول فیبروبلاست جنین جوجه: ۶۹
۱-۴-۳- تلقیح ویروسهای سازگار شده به تخم مرغ جنین دار: ۷۰
۲-۴-۳- برداشت مایع آلانتوئیک از تخم مرغهای تلقیح شده با ویروس سازگار شده: ۷۱
۳-۴-۳- تهیه رقت ده تایی از ویروس سازگار یافته: ۷۱
۴-۴-۳- تلقیح رقت‌های متفاوت از ویروس سازگاریافته به سلولهای فیبروبلاست جنین جوجه: ۷۱
۵-۳- تهیه محیط کشت حاوی آگار: ۷۲
۱-۵-۳- تهیه رنگ نوترال رد: ۷۳
۶-۳- برداشت پلاک ها از چاهک ها: ۷۳
۷-۳- استخراج RNA: ۷۴
۸-۳- واکنش زنجیره ای پلی مراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR): ۷۴
۱-۸-۳- شناسایی محصول PCR: ۷۵
۱-۹-۳- تهیه ژل آگاروز: ۷۵
۲-۹-۳- خالص سازی محصول RT-PCR: ۷۷

۳-۹-۳- تعیین توالی: ۷۸
فصل چهارم ۷۹
نتایج ۷۹
فصل پنجم ۸۶
بحث ۸۶
ضمیمه: ۱۰۴
منابع: ۱۰۸

فهرست جداول

عنوان **شماره صفحه**

جدول شماره ۱: تقسیم بندی خانواده پارامیکسوویریده..... ۹
جدول شماره ۲: گونه های مربوط به جنس پارامیکسوویروس ۱۰
جدول ۳: سویه های مختلف ویروس عامل بیماری نیوکاسل ۱۶

فهرست نمودارها

نمودار شماره ۱- مقایسه واکسن CL79 با واکسن لاسوتا از لحاظ پاسخهای سرولوژیکی و ایمنی‌زایی. ۳۴
نمودار شماره ۲- بررسی پاسخ ایمنی و مرگ ومیر در گله‌های واکسینه شده با واکسن کلون CL79 ..... ۳۵
جدول شماره ۳- مقایسه تعدادی از واکسنهای تهیه شده از سویه لنتوژنیک ویروس نیوکاسل .. ۳۵
جدول شماره ۴: آرایش اسیدآمینه های جایگاه شکست در سویه های نیوکاسل ۳۸

فهرست تصاویر (اشکال)

شکل شماره ۱: شکل شماتیک ویروس نیوکاسل..... ۱۲
شکل شماره۲ : نقشه ژنومیک ویروسهای متعلق به خانواده پارامیکسوویریده ۴۴
شکل شماره۳: نمایی از واکنش زنجیره ای پلیمراز ۴۶
شکل شماره۴: مراحل PCR ۵۳
شکل شماره ۵: واکسن لاسوتا تولیدی مؤسسه رازی ۵۹
شکل شماره ۶ : تخم مرغهای SPF تهیه شده از شرکت لوهمن آلمان ۶۰
شکل شماره ۷: ساختمان داخلی تخم مرغ جنین دار ۶۰
شکل شماره ۸: وسیله جهت سوراخ کردن تخم مرغ ۶۱
شکل شماره ۹: روش تلقیح به مایع آلانتوئیک تخم مرغ جنین دار ۶۰

عنوان **شماره صفحه**

شکل شماره ۱۰: آماده سازی تخم مرغها جهت برداشت مایع آلانتوئیک ۶۲
شکل شماره ۱۱ : تخم مرغ جنین دار ۹ روزه SPF و برداشت پوسته تخم مرغ در منطقه کیسه هوایی ۶۷
شکل شماره ۱۲ : جدا کردن جنین ۹ روزه از تخم مرغ جنین دار ۶۸
شکل شماره ۱۳: سلولهای فیبروبلاست تک لایه جنین جوجه پس از ۲۴ ساعت ۸۳
شکل شماره ۱۴: سلولهای فیبروبلاست جنین جوجه تلقیح شده با ویروس سازگار شده لاسوتا با رقت $۱۰^{-۴}$ ۸۳
شکل شماره ۱۵: سلولهای فیبروبلاست جنین جوجه تلقیح شده با ویروس سازگار شده لاسوتا با رقت $۱۰^{-۳}$ ۸۴
شکل شماره ۱۶: سلولهای فیبروبلاست جنین جوجه تلقیح شده با ویروس سازگار شده لاسوتا با رقت ۶-۱۰ ..... ۸۴
شکل شماره ۱۷: الکتروفورز ژل آگاروز محصول RT-PCR..... ۸۵
شکل شماره ۱۸- مقایسه توالی نوکلئوتیدهای کلون شماره۱ تا ۶ و ویروس لاسوتا به شماره ۱۹۲۶۵۰۱ Q (Refference) موجود در بانک ژنی ۹۶
شکل شماره ۱۹- مقایسه توالی اسیدهای آمینه کلون ۱ تا ۶ و مقایسه آن با ویروس لاسوتا به شماره ۱۹۲۶۵۰۱ Reffrence Q موجود در بانک ژنی ۱۰۲

فصـــل اول

مقدمه و هدف

بیماری نیوکاسل یک بیماری ویروسی واگیردار است. عامل این بیماری ویروسی از خانواده پارامیکسوویریده و جنس آولا ویروس[1] می باشد (۵۸). ویروس این بیماری براساس آزمایشات بیماریزایی(ICPI[2]، MDT[3]) به سه فرم ولوژنیک، مزوژنیک و لنتوژنیک تقسیم می‌شود، علائم بیماری براساس سویه ویروس، حساسیت میزبان و فاکتورهای دیگر متفاوت می‌باشد. این بیماری در بسیاری از کشورها از جمله ایران بعنوان یک عامل محدود کننده صنعت طیور محسوب می گردد. یکی از مهمترین راههای پیشگیری و کنترل بیماری از طریق واکسیناسیون می باشد. سالهاست که در ایران واکسن این بیماری تهیه و مورد مصرف قرار می‌گیرد لیکن شیوع بیماری گاها" خسارات عمده ای به مرغداران وارد کرده است. واکسن های بیماری نیوکاسل به دو صورت زنده و غیر فعال شده در ایران توسط مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه و توزیع می گردد. واکسن لاسوتا یکی از دو واکسن زنده نیوکاسل است که بصورت لیوفیلیزه از حدود ۳۰ سال پیش توسط مؤسسه رازی تهیه و توزیع می گردد. برنامه واکسیناسیون در گله های گوشتی و تخمگذار در هر کشور براساس سیاست های بهداشتی آن کشور تعیین می گردد (۹).

ویروس های ولوژنیک و مزوژنیک بیماری نیوکاسل می توانند در بسیاری از کشت‌های سلولی اولیه رشد کنند و پلاک ایجاد نمایند ولی ویروس های لنتوژنیک مانند لاسوتا به سادگی بر روی کشت‌های سلولی اولیه یا رده های سلولی رشد نمی نمایند و برای رشد احتیاج به تریپسین، سولفات منیزیوم و یا حتی سازگار شدن به سلول مورد نظر دارند. ویروس های

1- Avula virus
2 - Intracerebral Pathogenicity index
3- Mean Death Time

نیوکاسل در صورت رشد بر روی کشت سلولی می توانند ایجاد CPE [1] نمایند و در نهایت ایجاد پلاک کنند. پلاک های ایجاد شده ممکن است از نظر ظاهری شامل شکل، اندازه و یا حتی از نظر مولکولی و توالی اسیدهای آمینه با یکدیگر تفاوت داشته باشند. امروزه در بسیاری از کشورهای دنیا واکسن های کلون شده مورد استفاده قرار می گیرد که جهت کلون کردن یک ویروس، یکی از راهها، رشد ویروس روی کشت سلول و جدا کردن پلاک‌های متفاوت و بررسی آنها از لحاظ مورفولوژی و ژنتیکی است و در صورتی که تفاوت ژنتیکی و مورفولوژی در کلون ها به اثبات رسید، لازم است که مطالعات ایمنی‌زایی و بیماری‌زایی هر کلون به تفکیک مورد بررسی قرار گیرد، لذا به دلایل ذیل اقدام به انجام این تحقیق گردید:

۱-سالهاست که سوش واکسن جهت تهیه واکسن مورد استفاده قرار می گیرد بدون آنکه تاکنون هیچگونه مطالعاتی بر روی سوش مزبور انجام شده باشد.

۲-سوش لاسوتا مورد استفاده فاقد شناسنامه و اطلاعات مولکولی است.

۳-بدست آوردن کلون با استفاده از روش ایجاد پلاک بر روی سلولهای فیبروبلاست جنین جوجه.

۴-بررسی مولکولی کلون یا کلونهای ایجاد شده توسط سوش واکسن لاسوتا بر روی سلولهای فیبروبلاست جنین جوجه.

۵-مقایسه اطلاعات مولکولی بدست آمده از کلونها با دیگر سویه های ویروس عامل بیماری نیوکاسل ثبت شده در بانک ژنی و بررسی میزان تشابهات و تفاوت های آنها.

در این تحقیق ویروس واکسن لاسوتا بر روی سلولهای فیبروبلاست جنین جوجه کشت داده شد تا ایجاد پلاک نماید، سپس پلاک های مزبور که از لحاظ اندازه و شکل ظاهری با یکدیگر تفاوت داشتند و ممکن بود هر کدام به عنوان یک کلون مطرح گردند برداشت و پس از تکثیر در مایع آلانتوئیک تخم مرغ جنین دار نسبت به جدا کردن RNA آنها و انجام PCR اقدام گردید. پس از آن محصول PCR هر نمونه بطور جداگانه از نظر ردیف نوکلئوتیدها مورد بررسی قرار گرفت و سپس نسبت به مقایسه آنها با یکدیگر و اطلاعات موجود در بانک ژنی اقدام گردید و تفاوت های احتمالی آنها مدنظر قرار گرفت. بدین ترتیب اولاً وضعیت مولکولی

1- Cythopathic effect

سویه واکسن تهیه شده در ایران از نظر مولکولی با دیگر سویه های موجود در بانک ژنی مقایسه و میزان تشابه آن مشخص گردید، ثانیاً سکانس مولکولی کلون های بدست آمده شناسایی گردید تا در تحقیقات بعدی این کلون ها از لحاظ بیماریزایی، ایمنی زایی مورد مطالعه قرار گیرند و در نهایت در صورت تفاوت بتوان یک واکسن کلونِ شده لاسوتا با ایمنی زایی بالا معرفی و تهیه گردد.

فصـــل دوم

کـــلیـــات

۱-۲- بیماری نیوکاسل:

بیماری نیوکاسل یک بیماری ویروسی حاد واگیردار در بین پرندگان اهلی و وحشی در دنیا می‌باشد. ویروس این بیماری دارای سویه های مختلفی می باشد که می تواند بیماری را در بین پرندگان با بیماری زایی کم تا زیاد ایجاد کند. این بیماری در بسیاری از کشورهای دنیا بعنوان یک بیماری محدودکننده گسترش صنعت طیور مطرح می باشد. بیماری نیوکاسل در مواردی بدون ایجاد هیچگونه علائم کلینیکی توانسته است باعث مرگ و میر در بسیاری از گله‌ها شود و می تواند تا ۱۰۰٪ مرگ و میر را در گله ها ایجاد کند. بیماری نیوکاسل توسط پارامیکسوویروس های سروتیپ ۱ (APMV-1) ایجاد می شود این بیماری از لحاظ اهمیت در لیست A مؤسسه بین المللی de epizooties قرار گرفته است (۲۴).

۲-۲- تاریخچه بیماری نیوکاسل:

اگرچه اولین شیوع شناخته شده بیماری نیوکاسل در سال ۱۹۲۶ در منطقه جاوه اندونزی گزارش شده است اما گزارشاتی در رابطه با یک شیوع گسترده از این بیماری در سال ۱۸۹۶ موجود می باشد. همچنین گزارشاتی مبنی بر وجود این بیماری در سال ۱۹۲۴ در کره

نیز وجود دارد. بیماری از سال ۱۹۲۶ بترتیب از هندوستان، فیلیپین، ژاپن، استرالیا، کره و سایر کشورها گزارش شده است. در زمان جنگ جهانی دوم این بیماری در چندین کشور خاورمیانه نیز رخ داد. ایتالیا اولین کشور اروپایی بود که پس از جنگ جهانی درگیر بیماری شد ولی در عرض چند سال بیماری تمام قاره اروپا را فرا گرفت (۱). در کانادا و آمریکای جنوبی بیماری به ترتیب در سالهای ۱۹۴۸ و ۱۹۵۰ گزارش شد.

همه گیری که دویل[1] شرح داد در نواحی سواحل اطراف شهر نیوکاسل در انگلستان رخ داده بود و به همین مناسبت این بیماری را نیوکاسل نام نهادند. در سال ۱۹۴۳ بودت[2] ابعاد مختلف بیماری، عوامل ایجاد کننده بیماری و راههای مبارزه با بیماری را شرح داد و از سال ۱۹۴۹ شکل بیچ[3] در آمریکا مشخص شد. در سال ۱۹۴۶ بودت نیز شکل خفیف‌تری از بیماری را شرح داد، در سال ۱۹۴۸ هیچنر[4] شکل چهارم بیماری را عنوان کرد (۱ و ۳۶).

این بیماری در سال ۱۹۶۰ در آسیای میانه شیوع پیدا کرد و تا اواخر سال ۱۹۷۰ به بیشتر کشورها سرایت کرد. در سال ۱۹۸۱ نیز مجددا" اروپا درگیر بیماری گردید (۶، ۱۶، ۴۷،۵۱). ویروس بیماری هم اکنون بصورت اندمیک در بسیاری از کشورهای دنیا وجود دارد و فرم ولوژنیک این بیماری در بسیاری از کشورهای آسیای میانه، آفریقا، آسیا و آمریکای جنوبی وجود دارد.

براساس گزارشهای موجود، انگلستان تاکنون از لحاظ وجود بیماری پاک می باشد و استرالیا تا سال ۱۹۹۸ از بیماری پاک بود، ولی در سال ۱۹۹۸ بیماری حاد نیوکاسل در آن کشور گزارش گردید. تعدادی از کشورهایی که وجود بیماری در آنها ثبت گردیده است بشرح ذیل می باشند:

در سال ۱۹۹۵، ۱۸ گزارش بیماری از دانمارک، ۲ گزارش از فنلاند و ۲۶ گزارش از ایرلند وجود دارد. در سال ۲۰۰۴، طبق گزارش OIE کشورهای اتریش، آمریکا، تایلند، کویت، چین، نیجریه، روسیه، ایران، استرالیا و ایتالیا نیز درگیر بیماری بوده اند (۳۶). تایلند تنها کشور

---

1 - Doyle
2 - Beudette
3 - Beatch
4 - Hitchner

آسیایی است که بیماری حاصل از سویه ولوژنیک را هیچ گاه گزارش نکرده است. از ۴۲ کشور آسیایی لیست شده در کتاب سال بهداشت حیوانات (FAO) تنها از دو کشور مغولستان و عربستان هیچ گزارشی از بیماری نیوکاسل ارائه نشده است ولی این دلیل بر عدم وجود بیماری در منطقه نمی باشد (۱).

۱-۲-۲- تاریخچه بیماری نیوکاسل در ایران:

همزمان با جنگ جهانی دوم در حوالی دهه پنجم قرن بیستم میلادی بیماری نیوکاسل در کشورهای آسیایی و بخصوص خاورمیانه شیوع یافت و احتمال می رود در این زمان بیماری به ایران سرایت کرده باشد. در ایران در گذشته، طیور به طور سنتی پرورش داده می شدند و اگر موارد بیماری بطور پراکنده در آن اتفاق می افتاد تشخیص داده نمی شد. از طرفی طبق دیگر گزارشات بیماری نیوکاسل برای اولین بار در ایران همزمان با پایان جنگ جهانی دوم (۱۹۴۵ میلادی) در سال ۱۳۲۳ هجری شمسی واگیری وسیعی همراه با تلفات وسیع در بین ماکیان خوزستان بروز کرد و در مدت کوتاهی به اطراف تهران رسید و تعداد زیادی از مرغها را تلف کرد. در آن زمان به علت نبود امکانات، بیماری را طاعون تلقی کردند ولی با توجه به اینکه در آن زمان بیماری نیوکاسل در تعدادی از کشورهای منطقه شایع بود به احتمال زیاد آن بیماری نیوکاسل بوده است.

در سال ۱۳۲۹ یک مورد آلودگی از شهرستان تبریز گزارش شد و کارشناسان مؤسسه رازی بوسیله تزریق به جوجه های حساس و سپس تلقیح مواد مظنون به تخم مرغهای جنین‌دار موفق به جداسازی و شناسایی بیماری نیوکاسل شدند. در سال ۱۹۵۰میلادی بیماری توسط مؤسسه رازی رسماً گزارش گردید و در واقع شیوع این بیماری با گسترش فارمهای پرورش طیور در ایران همزمان بود.

براساس گزارش مرکز بین المللی de epizooties (OIE) در سال ۲۰۰۰ میلادی گزارش های تأیید شده بیماری در ایران از سال ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۰ به ترتیب ۴۰۳، ۲۸۷، ۲۹۸، ۲۶۶ و ۸۳ مورد بوده است .

در حال حاضر در ایران سیاست کنترل بیماری براساس واکسیناسیون می باشد اما علیرغم استفاده از واکسن، بیماری در برخی موارد نیز گزارش می گردد.

۳-۲- تاریخچه واکسن نیوکاسل در ایران:

اولین واکسن بیماری نیوکاسل توسط سهراب و با کمک کارشناسان FAO و با استفاده از سویه مزوژنیک ویروس هایفا[1] که توسط کورماروف[2] و گلداشمیت[3] به ایران آورده شده بود تهیه گردید. بعدها به علت پرورش جوجه های گوشتی و ایجاد بیماری توسط این سویه در جوجه ها، ضرورت وجود یک واکسن با حدت کمتر احساس گردید و واکسن جدیدی از سویه لنتوژنیک B۱ و هیچنر توسط یونگهر[4] آمریکایی به ایران آورده شد و مورد استفاده قرار گرفت.در سالهای ۱۳۴۹ تا ۱۳۵۰ واکسن تهیه شده از سویه لنتوژنیک لاسوتا برای بدست آوردن ایمنی بیشتر در طیور تهیه و مورد مصرف قرار گرفت. این واکسنها به روشهای آشامیدنی، قطره چشمی و تزریقی بکار می رفت.

شیوع بیماری نیوکاسل در اواخر دهه پنجاه و اوایل دهه شصت به حدی بود که با وجود واکسیناسیون مکرر خسارات و تلفات بیماری مرغداران را عاجز ساخته بود، ولی در سالهای بعد در اثر واکسیناسیون مرتب، رعایت اصول بهداشتی و ایجاد ایمنی، به تدریج از میزان اشاعه بیماری در مرغداریها کاسته شد و بیماری تا حدودی تحت کنترل درآمد، با این وجود جهت ایجاد تیتر بالا، برای استفاده از واکسنهای کشته شده روغنی در گله های گوشتی دستورالعمل جدید از طرف سازمان دامپزشکی صادر گردید (۸).

1- Hypha
2- Kumaroph
3- Goldschmit
4-Yongher