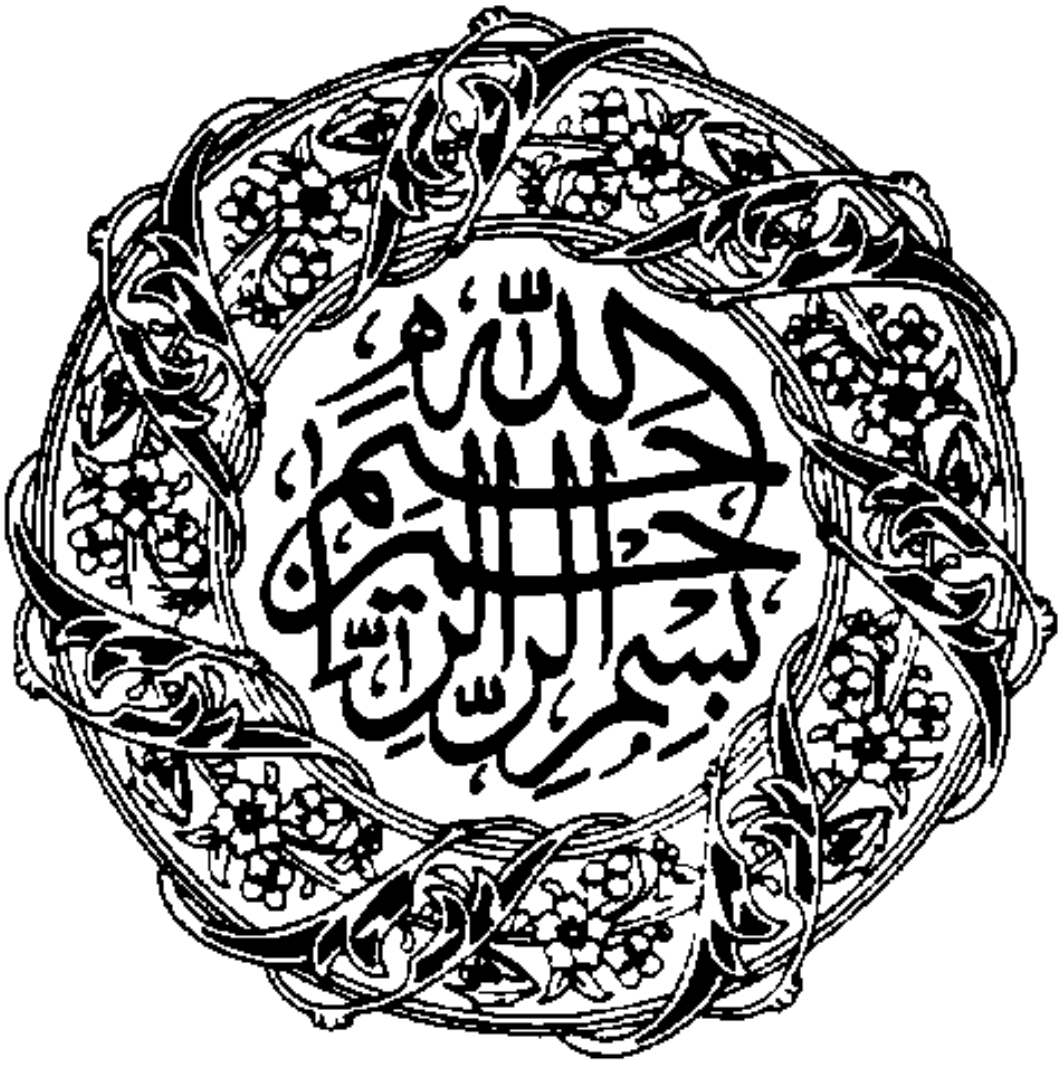
بسم الله الرحمن الرحيم

**کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و**

**نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه**

**متعلق به دانشگاه رازی است.**

پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی
گروه علوم دامی

**پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی مهندسی کشاورزی**

**گرایش ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور**

**عنوان پایان نامه:**

# مقایسه حساسیت دو روش Real-time PCR و RT-PCR برای تشخیص ویروس بیماری‌زای طیور

**استادان راهنما:**

دکتر شیدا ورکوهی

دکتر میثم طباطبایی پژوه

**استاد مشاور:**

مهندس محمد حسین بناءبازی

**نگارش:**

سمیه ستاری

بهمن ماه ۱۳۹۲

**پردیس کشاورزی و منابع طبیعی**
**دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی**
**گروه علوم دامی**

**پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی علوم دامی گرایش ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور**

**نام دانشجو:**

**سمیه ستاری**

## عنوان پایان نامه:

# مقایسه حساسیت دو روش Real-time PCR و RT-PCR برای تشخیص ویروس بیماری‌زای طیور

در تاریخ **۱۳۹۲/۱۱/۳۰** توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنما دکتر شیدا ورکوهی با مرتبه ی علمی استادیار امضاء

۲- استاد راهنما دکتر میثم طباطبایی با مرتبه ی علمی استادیار پژوهشی امضاء

۳- استاد مشاور مهندس محمد حسین بنابازی با مرتبه ی علمی مربی پژوهشی امضاء

۴- استاد داور داخل گروه دکتر صاحب فروتنی فر با مرتبه ی علمی استادیار امضاء

۵- استاد داور خارج از گروه دکتر علیرضا زبرجدی با مرتبه ی علمی دانشیار امضاء

تقدیم به:

مادرم که دلخوشی از زندگیست

و

روح پدرم، آنکه آفتاب مهرش در آستانهٔ غروبم، همچنان پابرجاست و هرگز غروب نخواهد کرد

و

برادران عزیز و خواهران مهربانم که افتخار وجودشان برایم از هر مدرک و مقامی ارزنده‌تر و بالاتر است.

**چکیده:**

بیماری نیوکاسل یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی طیور در سرتاسر جهان است. با توجه به اینکه روش‌های سنتی قابلیت محدودی در کنترل این بیماری دارند، هدف از انجام این مطالعه استفاده از تکنولوژی‌های نوین برای تشخیص به موقع بیماری جهت کاهش خسارت پیش‌روی صنعت طیور می‌باشد. استخراج RNA از واکسن نیوکاسل سویه B1 و با استفاده از کیت RNease mini (شرکت کیاژن، آمریکا) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. RNA استخراج شده با $۶۸/۲۳\times۱۰^{۹}$ رونوشت اولیه به صورت سری رقت‌های۱۰۰ میکرولیتری برای انجام واکنش RT-PCR وReal-time PCR تهیه شد. انجام واکنش RT-PCR با استفاده از کیت RNease mini و واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت تجاری (شرکت Genekam Biotechnology ،آلمان) انجام شد. برای روش Real-time PCR تا سری رقت تهیه شده $۱۰^{-۳۴}$ تکثیر صورت گرفت و برای روش RT-PCR تا سری رقت تهیه شده $۱۰^{-۲۰}$ بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد باند مشاهده شد. بر اساس نتایج مشاهده شده، روش Real-time PCR قادر به تشخیص $۱\times۱۰^{-۳۴}$ رونوشت و روش RT-PCR قادر به تشخیص $۱\times۱۰^{-۲۰}$ رونوشت از نمونه اولیه است. می‌توان گفت حساسیت روش Real-time PCR تقریباً ۲ برابر روش RT-PCR است و در مقایسه با روش RT-PCR، قادر به تشخیص ویروس بیماریزای نیوکاسل در نمونه‌های آلوده‌ای با ۱۰۰۰۰ برابر رونوشت کمتر از RNA ویروسی می‌باشد. از اینرو، این روش به عنوان یک ابزار تشخیصی حساس و مطمئن برای بکارگیری در طرح‌های ریشه‌کنی بیماری نیوکاسل پرندگان توصیه می‌شود.

**کلمات کلیدی:** ویروس بیماری نیوکاسل، تشخیص، Real-time PCR، RT-PCR، حساسیت روش تشخیصی.

## فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**

**فصل اول: مقدمه و هدف**


۱-۱- مقدمه ..... ۲
۱-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) ..... ۳
۱-۳- واکنش رونوشت برداری معکوسRT-PCR ..... ۳
۱-۴- Real-time PCR ..... ۴
۱-۵- اهداف تحقیق..... ۴


**فصل دوم: مروری بر منابع**


۲-۱- تعریف بیماری نیوکاسل..... ۶
۲-۲- تاریخچه بیماری نیوکاسل.....۶
۲-۳- نام و مترادف‌های بیماری.....۷
۲-۴- دوره کمون بیماری..... ۷
۲-۵- نشانه‌های بیماری.....۷
۲-۶- پیشگیری از بیماری..... ۷
۲-۷- تشخیص سرولوژی بیماری.....۸
۲-۸- ویروس .....۹
۲- ۸-۱– پارامیکسوویروس .....۹
۲- ۸-۲- طبقه بندی عامل ایجاد کننده بیماری .....۱۰
۲- ۸-۳- ژنوم ویروس بیماری نیوکاسل..... ۱۰
۲ -۸-۴- پروتئین الحاقی (پروتئینF ) ..... ۱۲
۲- ۸-۵- ساختمان ویروس..... ۱۳
۲- ۹- میزبان..... ۱۴
۲- ۱۰- انتشار..... ۱۵
۲-۱۱- مقاومت ویروس.....۱۵
۲- ۱۲- روش مولکولی PCR ..... ۱۵
۲-۱۲-۱- اصول و مبانی PCR .....۱۶
۲- ۱۳- واکنش رونوشت برداری معکوس(RT-PCR)..... ۱۷
۲-۱۳-۱- اساس واکنش رونوشت برداری معکوس..... ۱۷
۲-۱۳-۲- سنتز cDNA..... ۱۸
۲--۳- تکثیر cDNA..... ۱۸
۲-۱۳-۴- آنزیم واکنش RT-PCR ..... ۱۹
۲-۱۳-۵- پرایمر مورد استفاده در سنتز cDNA .....۲۰

۲-۱۳-۵-۱- پرایمر تصادفی ..... ۲۰
۲-۱۳-۵-۲- الیگوdT ..... ۲۰
۲-۱۳-۵-۳- پرایمر اختصاصی ..... ۲۱
۲-۱۳-۶- RT-PCR تک مرحله‌ای ..... ۲۱
۲- ۱۴- Real-time PCR ..... ۲۱
۲-۱۴-۱- مراحل واکنشReal-time PCR ..... ۲۲
۲- ۱۴-۲- مزایای استفاده از Real-time PCR ..... ۲۳
۲- ۱۴-۳- Real-time PCR چندگانه ..... ۲۴
۲- ۱۴-۴- رنگ‌های مورد استفاده در Real-time PCR ..... ۲۴
۲- ۱۴-۵- انتخاب رنگ ..... ۲۶
۲- ۱۴-۶- آنالیز منحنی ذوب ..... ۲۷
۲- ۱۴- ۷- روش‌های سنجش Real-time PCR ..... ۲۸
۲- ۱۴-۷- ۱- آشکارسازی غیراختصاصی ..... ۲۸
۲- ۱۴- ۷-۲- آشکارسازی اختصاصی ..... ۳۰
۲- ۱۴-۷- ۲-۱- کاوشگرهای هیبریدشونده ..... ۳۱
۲-۱۴-۷-۲-۲- انواع کاوشگرهای هیدرولیز شونده ..... ۳۱
۲-۱۴- ۸- اثر روشهای استخراج بر کارایی Real-time PCR ..... ۳۳
۲-۱۴- ۹- روش‌های تعیین کمیت با Real-time PCR ..... ۳۳
۲-۱۴- ۹-۱- اندازه گیری مطلق ..... ۳۳
۲- ۱۴- ۹-۲- اندازه گیری نسبی ..... ۳۴
۲- ۱۴-۱۰- چگونگی رسم منحنی استاندارد ..... ۳۵

**فصل سوم: مواد و روشها**

۳- ۱- نمونه ..... ۳۸
۳-۲ - مراحل استخراج RNA ..... ۳۸
۳-۳ - بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده ..... ۳۹
۳- ۴- تیمار آنزیم DNase ..... ۴۰
۳- ۵- تهیه سری رقت و واکنش RT-PCR. ..... ۴۰
۳- ۶- الکتروفورز فراورده‌های RT-PCR بر روی ژل آگارز ..... ۴۲
۳-۶-۱- طرز تهیه محصول TAE (50 X) ..... ۴۲
۳- ۶-۲- طرز تهیه ژل آگارز ..... ۴۲
۳- ۷- واکنشReal-time PCR ..... ۴۳
۳-۷-۱- آنالیز منحنی ذوب ..... ۴۴
۳-۸- سنجش حساسیت روشهای مورد مطالعه ..... ۴۴
۳-۸-۱- حساسیت روش RT-PCR ..... ۴۵
۳-۸-۲- حساسیت روش Real-time PCR ..... ۴۵

**فصل چهارم: نتایج و بحث**

۴-۱- تعداد رونوشت از ویروس NDV در نمونه اولیه..... ۴۷
۴-۲- نتایج روش RT-PCR ..... ۴۷
۴- ۳- نتایج روش Real-time PCR..... ۵۰
۴-۴- تعداد رونوشت قابل تشخیص..... ۵۳
۴-۵- مقایسه حساسیت روش‌های مورد مطالعه..... ۵۵
۴-۶- نتیجه‌گیری کلی..... ۵۷
۴-۷- پیشنهادها ..... ۵۸

**منابع و مآخذ..... ۵۹**

## فهرست شکل‌ها

**عنوان** **صفحه**


شکل ۲- ۱ - ساختمان ویروس بیماری نیوکاسل..... ۱۴
شکل ۲- ۲- تبدیل RNA به cDNA و مراحل مختلف PCR ..... ۱۹
شکل ۲- ۳- منحنی تکثیر Real-time PCR..... ۲۳
شکل۲- ۴- مکانیسم شیمیایی تشخیص سایبرگرین، روش کم هزینه و با انعطاف بالا..... ۲۵
شکل ۲- ۵- مکانیسم عمل سایبرگرین به عنوان یک عامل متصل شونده به DNA ..... ۲۶
شکل ۲- ۶- همپوشانی محدوده تابش منتشر کننده، با محدوده تحریک خاموش کننده..... ۲۷
شکل ۲- ۷- مکانیسم عمل سایبرسبز به عنوان عامل متصل شونده به DNA ..... ۲۹
شکل ۲- ۸- منحنی ذوب در Real-time PCR ..... ۳۰
شکل۲- ۹- چگونگی عملکرد کاوشگر تک من ..... ۳۲
شکل ۲- ۱۰- سیکل آستانه‌ای Thresholdو Threshold Cycle(Ct) ..... ۳۴
شکل ۲- ۱۱- منحنی تکثیر سری رقت ..... ۳۵
شکل ۲- ۱۲- منحنی استاندارد به دست آمده از سری رقت..... ۳۶
شکل ۳- ۱- دستگاه نانودراپ، Nano Drap2000، ساخت کمپانی Thermo Fisher آمریکا..... ۴۰
شکل ۳- ۲- دستگاه PCR، ساخت شرکت BIO RAD، آمریکا..... ۴۲
شکل ۳- ۳ – تانک و منبع تغذیه الکتریکی الکتروفورز، شرکت BIO RAD، کشور آمریکا..... ۴۳
شکل ۴- ۱- نتایج تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل در واکنش RT-PCR ..... ۴۸
شکل ۴- ۲- نمودار تکثیر نمونه کنترل مثبت و کنترل منفی با دستگاه Real-time PCR ..... ۵۱
شکل ۴- ۳- نتایج تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل در واکنش Real-time PCR ..... ۵۱
شکل ۴- ۴- نمودار تکثیر روش Real-time PCR با اعمال Log10..... ۵۲
شکل ۴- ۵- منحنی استاندارد به دست آمده از سری رقت تکثیر شده ..... ۵۳

## فهرست جدول‌ها

**عنوان** **صفحه**

جدول ۲- ۱- خصوصیات مهم پارامیکسوویروس‌ها ..... ۱۰
جدول ۲- ۲- ژن‌های موجود در ژنوم ویروس نیوکاسل..... ۱۱
جدول ۲- ۳- پروتئین‌های مرتبط با ژنوم بیماری نیوکاسل..... ۱۱
جدول ۲- ۴- اصطلاحات متداول در Real-time PCR..... ۲۲
جدول ۳- ۱- مواد استفاده شده برای واکنش RT-PCR..... ۴۱
جدول ۳- ۲- چرخه دمایی انجام واکنش RT-PCR..... ۴۱
جدول ۳- ۳- شرایط دمایی و چرخه‌های آزمون Real-time PCR ..... ۴۶

# فصل اول

## مقدمه و هدف

## ۱-۱-مقدمه

افزایش روز افزون جمعیت انسانی موجب افزایش تقاضا جهت مواد غذایی از جمله مواد پروتئینی گردیده است. با توجه به اصلاحات ژنتیکی و افزایش راندمان ضریب تبدیل در طیور، توجه خاص جهانی جهت رفع نیاز انسان به مواد پروتئینی، از طریق تولید هر چه بیشتر گوشت سفید در واحد سطح کمتر، از طریق واحدهای پرورشی با تراکم زیاد گردیده است (۱).

هر تغییر حالت حیوان از حالت سلامتی می‌تواند بیماری نامیده شود. بیماری ممکن است به وسیله عوامل بیماریزای مشخص و یا کمبودهای غذایی، عوامل سمی و عدم سهولت تطابق حیوان با محیط ایجاد شود. اگر مرغ به بیماری و انگل مبتلا شده باشد با بهترین تغذیه، نگهداری و ژنتیک مطلوب، نخواهد توانست در ظرفیت‌های طبیعی خود رشد کرده و یا تخم‌گذاری نماید. در جوجه‌های گوشتی، مرغ تخم‌گذار و بوقلمون به دلیل این که در یک فضای محدود در سیستم‌های تولیدی متراکم نگهداری می‌شوند، احتمال شیوع بیماری شدید و زیان های ناشی از آن زیاد است و جلوگیری از شیوع بیماری برای کاهش این زیان‌ها تنها راه حل می‌باشد (۱). بیماری نیوکاسل[1] به عنوان یکی از مهمترین بیماری‌های ویروسی طیور کشور همواره مورد توجه و نگرانی دست اندرکاران پرورش طیور بوده است، وهر ساله خسارات عمده‌ای را به این صنعت وارد می‌سازد. از نظر گستردگی بیماری در بسیاری از گونه‌های پرندگان، اعم از اهلی و وحشی وجود دارد. کنترل بیماری نیوکاسل، به وسیله واکسن‌های تهیه شده از ویروس‌های کشته شده یا ویروس‌های زنده تضعیف شده به دست می‌آید. واکسن‌ها ممکن است با تزریق به بال، داخل بینی، قطره چشمی، آب آشامیدنی، اسپری کردن یا گرد پاشی بر روی گله به طور کامل انجام گیرد. مصونیت حاصل از واکسن‌ها پایدار نیستند و باید به وسیله واکسیناسیون دوره‌ای تقویت گردند. اغلب برنامه‌های پیشنهاد شده جهت واکسیناسیون در سن ۴ روزگی، ۴ هفتگی، ۴ ماهگی و هر ۶ ماه یک بار بعد از آغاز تخم‌گذاری می‌باشد (۱).

کاربرد واکسن‌های زنده و کشته بسته به مورد، توسط مدیران بهداشتی فارم‌ها توصیه می‌گردد، اما در برخی موارد علی‌رغم تجویز واکسن، چهره بالینی بیماری نیز بروز می‌کند، در چنین مواردی جداسازی اولیه ویروس از موارد بیماری علی‌رغم وقت‌گیر بودن، امکان تفریق قطعی سویه‌های واکسینال را از سویه‌های بیماری‌زا نداشته و تشخیص قطعی عامل درگیری روش‌های دقیق‌تری را می‌طلبد (۹).

[1] Newcastle Disease

با توجه به تلفات شدید و خسارت‌های ایجاد شده در هنگام شیوع بیماری و با توجه به اینکه شدت و علائم بیماری وابسته به تعداد و حدت سویه ویروس است، با تعیین روش حساس در تشخیص بیماری، می‌توان در گله‌هایی که مشکوک به بیماری به نظر می‌رسند، اما حدت و تعداد ویروس در حدی نیست که علائم بیماری را بروز دهد بیماری را زودتر تشخیص داد و با رعایت اصول بهداشتی، مدیریتی و غیره از شیوع، گسترش بیماری و تلفات بیشتر جلوگیری کرد. روش‌های سریع و دقیق مولکولی، رهیافتی مناسب در این زمینه است زیرا تشخیص در زمان کوتاه‌تر، گاه از ضررهای عمده پیشگیری می‌کند (۹).

## ۱-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)[1]

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، یک تکنیک قدرتمند و حساس برای تکثیر توالی‌های DNA در جانوران و گیاهان می‌باشد. پیشرفت‌های اخیر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تکثیر مولکول‌هایی که طول آن‌ها بیشتر از ۳۵ کیلو باز است را امکان‌پذیر کرده است. بهینه شدن شرایط دو بخش مهم در واکنش PCR یعنی DNA پلیمراز مقاوم به گرما و دستگاه ترموسایکلر باعث شده تا محققین بتوانند هر نوع DNA دو رشته‌ای را تکثیر کنند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یک راه سریع، ارزان و ساده برای تکثیر اختصاصی قطعات DNA از روی مقادیر بسیار کم الگوی اولیه است. امروزه به طور گسترده‌ای در زمینه تشخیصی، بالینی و آنالیز مولکولی DNA و RNA از PCR استفاده می‌شود. دو خصوصیت ممتاز PCR از جمله ۱) عدم استفاده از رادیوایزوتوپ‌ها یا مواد شیمیایی خطرناک، ۲) سریع، ارزان و سادگی روش برای تکثیر و بررسی ژنوم، باعث استفاده روزافزون از این روش شده است در PCR از فعالیت یک پلیمراز مقاوم به حرارت همراه با ترکیبی از پرایمرهای الیگونوکلئوتید، مواد اولیه (شامل DNA الگو، dNTP ها و غیره) و برخی مواد دیگر، برای تکثیر توالی خاصی از DNA استفاده می‌شود، جهت این آزمون نیاز به DNA با کیفیت و کمیت مناسب داریم (۴).

## ۱-۳ - واکنش رونوشت برداری معکوس RT-PCR

از آنجایی که واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، توانایی تشخیص ویروس‌های با ژنوم RNA را ندارد محققین روش جدیدی به نام روش رونوشت برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) را برای تشخیص این ویروس‌ها ابداع کردند (۴۴). این روش ابتدا یک DNA مکمل از روی RNA ویروسی می‌سازد و سپس مراحل بعدی کار از روی cDNA[2] صورت می‌پذیرد (۴۳).

[1] Polymerase Chain Reaction
[2] complementary DNA

## Real-time PCR – ٤-١

همانطور که از معنی واژه بر می‌آید؛ مفهوم Real-time؛ مشاهده لحظه به لحظه یک فرایند می‌باشد. مشکلات و نواقص عدیده موجود در قطع PCR عادی در نقطه دلخواه[1]، همراه با نیاز به یک روش تعیین کمی دقیق و با توجه به اینکه استفاده از روش PCR مقادیر زیادی از قطعه مورد نظر را تولید می‌کند، اما جوابگوی بسیاری از نیازهای آزمایشگاهی نبوده و برای مطالعات تکمیلی به ابزاری با حساسیت بالاتر نیاز می‌باشد که زمینه گشایش عرصه‌ای نوین در تکنیک PCR گردیده است (۶۴). چارچوب Real-time PCR ابتدا توسط هیگوچی[2] و همکاران (۱۹۹۲) ابداع شد.

همان‌گونه که از اسم Real-time PCR برمی‌آید، در واقع برای مانیتورینگ فرایند PCR در حین انجام واکنش به کار می‌رود. در این روش مشاهده لحظه به لحظه‌ی محصول PCR امکان‌پذیر می‌گردد. در Real-time امکان آشکارسازی محصولات PCR در فاز اولیه (مرحله توانی) واکنش وجود دارد و میزان تکثیر تحت تاثیر فاز سکون قرار نمی‌گیرد. حساسیت، اختصاصیت بالا و قابلیت اتوماتیک شدن، از ویژگی‌های ممتاز این تکنیک است. فواید Real-time PCR انقلابی در بهره‌وری و استفاده از PCR به وجود آورد (۳۴). در Real-time PCR، واکنش‌ها سریع‌تر اتفاق می‌افتد و به زمان کمتری نیاز دارند. به دلیل اینکه روند این نوع PCR قابل مشاهده است، در صورت عدم تکثیر می‌توان به راحتی به واکنش خاتمه داد و از اتلاف وقت و انرژی پرهیز نمود. در پروسه Real-time PCR یک مولکول گزارشگر فلئورسنت[3] به عنوان مانیتورینگ فرایند PCR استفاده می‌شود. فلئورسنت نشر یافته‌ی مولکول گزارشگر، به عنوان یک فاکتور بیانگر تجمع محصول PCR می‌باشد که هر سیکل از PCR ایجاد و تجمع می‌یابد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در لحظه (Real-time PCR) یکی از جدیدترین روش‌های تشخیصی مورد استفاده در آزمایشگاه‌های دامی است. در این روش از میزان تداخل بین نمونه‌ای کاسته شده است و نیاز به استفاده از ژل برای دیدن نتایج از بین رفته است (۶۴).

## ۱-۵- هدف تحقیق

۱- مقایسه حساسیت دو روش RT-PCR و Real-time PCR و معرفی روش حساس‌تر، اختصاصی‌تر و دقیق‌تر برای شناسایی و تشخیص تعداد و بار ویروسی کم موجود (تشخیص زودهنگام بیماری نیوکاسل)

[1] End point PCR
[2] Higuchi
[3] Fluoresent

# فصل دوم

## بررسی منابع

## ۲-۱- تعریف بیماری نیوکاسل

بیماری نیوکاسل یکی از مسری‌ترین بیماری‌های ویروسی است که تقریباً همه گونه‌های پرندگان با سنین مختلف را در جهان مبتلا می‌کند. ویروس این بیماری دارای سویه‌های مختلفی است که می‌تواند بیماری را در پرندگان با حدت کم تا زیاد ایجاد کند. این بیماری در بسیاری از کشورهای جهان به عنوان یک بیماری محدود کننده گسترش صنعت طیور مطرح است. بیماری نیوکاسل در مواردی بدون نشانه‌های بالینی، می‌تواند در سطح گله تا میزان ۱۰۰ درصد باعث مرگ و میر در گله‌ها شود. این بیماری به وسیله پارامیکسوویروس‌های تیپ۱ [1](APMV-1) ایجاد می‌شود (۱۴،۱۸).

## ۲-۲- تاریخچه بیماری نیوکاسل

بیماری نیوکاسل عفونت فوق‌العاده مسری اکثر گونه‌های طیور است که برای اولین بار در سال ۱۹۲۶ در جاوه اندونزی مشاهده شد. ویروس این بیماری در پاییز همان سال به انگلستان راه یافت و در منطقه‌ای به نام نیوکاسل تشخیص داده شد و به همین دلیل بیماری نیوکاسل نام گرفت که این همه‌گیری بیماری نیوکاسل را دویل[2] شرح داده بود. بودت[3] ۱۹۴۳ انواع مختلف بیماری، عامل ایجاد کننده بیماری و راههای مبارزه با آن را شرح داد. در سال ۱۹۴۶ بودت شکل خفیف‌تری از بیماری را گزارش داد. هیچنر[4] (۱۹۴۸) شکل بدون علامت بیماری را توضیح داد. این بیماری در سال ۱۹۶۰ در آسیای میانه شیوع یافت و تا اواخر سال ۱۹۷۰ به بیشتر کشورها سرایت کرد. ویروس بیماری هم اکنون به صورت آندمیک در بیشتر کشورهای جهان وجود دارد (۹،۵۳).

در کشور ما هم زمان با ورود جوجه یک روزه در سال ۱۳۲۹ شمسی از خارج و توسعه صنایع مرغداری، این بیماری مشاهده شد و از آن زمان تاکنون بیماری هر چند سال به صورت فراگیر ظاهر می‌شود. در سال‌های اخیر به دلیل رشد روز افزون صنعت مرغداری، اهمیت این بیماری بیشتر مورد توجه قرار گرفته است و همواره به عنوان مهم‌ترین عامل تهدید کننده طیور صنعتی و سنتی مطرح بوده است. گزارش‌های موجود از تلفات وارده در سال‌های گذشته، حکایت از تلفات تا ۱۰۰٪ در مرغداری‌های صنعتی و سنتی دارد (۱۲).

[1] Avian paramixovirus
[2] Doyle
[3] Beudette
[4] Hitchner

## ۲-۳- نام و مترادف‌های بیماری

برای بیماری نیوکاسل بیش از ۲۰ مترادف وجود دارد که می‌توان به موارد زیر اشاره نمود: بیماری دویل[1]، دیستمبر پرندگان[2]، بیماری رانی‌خت[3]، شبه طاعون ماکیان[4]، شبه طاعون طیور[5]، پنوموآنسفالیت طیور[6]، اختلال عصبی تنفسی[7]و طاعون ماکیان[8] (۱۹).

## ۲-٤- دوره کمون بیماری

دوره کمون بیماری نیوکاسل بعد از ایجاد یک آلودگی طبیعی بسیار متنوع گزارش شده است که از دو تا پانزده روز و یا حتی بیشتر از آن را شامل می‌شود، ولی به صورت میانگین می‌توان این زمان را بین ۵ تا ۶ روز در نظر گرفت. در بین عفونت‌های پارامیکسوویروسی در پرندگان، بیماری نیوکاسل در صدر اهمیت قرار دارد، از همین رو تحقیقات بسیار گسترده‌ای در مورد راه‌های تشخیص، کنترل و پیشگیری از این بیماری با استفاده از روش‌های سرولوژی، ویروس شناسی و مولکولی انجام گرفته است (۱۴).

## ۲-۵- نشانه‌های بیماری

در این بیماری هیچ یک از نشانه‌های بالینی را نمی‌توان به عنوان علامت شاخص بیماری در نظر گرفت. ویروس‌های بسیار حاد ممکن است در ماکیان کاملاً حساس، عفونت‌های فوق حاد ایجاد کنند و در نتیجه نخستین نشانه بیماری مرگ ناگهانی است. به طور کلی نشانه‌های بیماری کزکردگی، دراز کشیدن، اسهال، ادم ناحیه سر و نشانه‌های عصبی است و مرگ و میر می‌تواند به ۱۰۰ درصد برسد. هیچ‌کدام از جراحات ماکروسکوپی برای هیچ یک از شکل‌های بیماری نیوکاسل شاخص و اختصاصی نیستند. ویروس‌هایی که موجب عفونت‌های مخفی از لحاظ بالینی می‌شوند، هیچ گونه جراحات ظاهری بر جای نمی‌گذارند (۹، ۱۴).

## ۲-٦- پیشگیری از بیماری

پیشگیری از بیماری معمولاً با واکسن‌های بیماری نیوکاسل صورت می‌گیرد. واکسن بیماری نیوکاسل در ایران به دو شکل زیر مورد استفاده قرار می‌گیرد:

---

[1] Doyles disease
[2] Avian distemper
[3] Ranikhet disease
[4] Pseudo-poultry plague
[5] Pseudo-poultry plague
[6] Aviann pneumoencephalits
[7] Respiratory nerrous disorder
[8] Fowl pest

**الف – واکسن زنده:** از دو نوع B1 و لاسوتا[1] می‌باشند که هر دو نوع ویروس واکسن بوده، از اینرو به علت حساس بودن در نگهداری و کاربرد آن، باید دقت فراوان داشته و طبق دستورالعمل شرکت سازنده عمل شود.

**ب – واکسن کشته:** ویروس به کار رفته در این نوع واکسن، غالباً B1 و لاسوتا بوده و غیرفعال می‌باشند. مصرف این نوع واکسن متعاقب مصرف واکسن‌های زنده نیوکاسل در گله‌های گوشتی، مادر و تخم‌گذار تجارتی جهت افزایش یکنواختی تیتر آنتی‌بادی بر علیه بیماری در گله به کار می‌رود.

از روش‌های واکسیناسیون می‌توان روش آشامیدنی، قطره چشمی، روش اسپری (آنروسل)، روش تزریقی زیر جلد یا داخل و تلقیح در نسوج بال را نام برد. روش‌های واکسیناسون باید عیناً بر طبق دستورالعمل موسسه سازنده واکسن صورت پذیرد (۶۱).

## ۲-۷- تشخیص سرولوژی بیماری

تشخیص سرولوژی این بیماری به وسیله آزمایش‌هایی که اساس سرم‌شناسی دارند انجام می‌شود، اما تمامی این روش‌ها به تناسب زمانی که برای انجامشان صرف می‌شود، از حساسیت و ویژگی کافی برخوردار نیستند، علاوه بر این تشخیص قطعی بیماری، مستلزم جدا کردن ویروس و انجام آزمایش‌های سرولوژی است. در این زمینه آنتی‌بادی‌های ممانعت کننده از هماگلوتیناسیون را می‌توان ظرف ۴ تا ۶ روز پس از ایجاد بیماری نشان داد (۱۴، ۱۸، ۳۵).

در زمینه تشخیص بیماری نیوکاسل روش‌هایی که توسط سازمان بین‌المللی همه‌گیری بیماری[2] و اتحادیه اروپا[3] توصیه شده است شامل جداسازی با تزریق نمونه به داخل مایع آلانتوییک تخم‌مرغ‌های SPF جنین دار دار ۱۰ روزه و تایید تشخیص در تست ممانعت از جمع شدن گلبول‌های قرمز[4](HI) است، به علاوه OIE در دستورالعمل‌های خود روشی را نیز که بر اساس بیولوژی مولکولی تنظیم شده، معرفی کرده است. روش‌های مولکولی مانند RT-PCR وReal time-PCR اکنون در بسیاری از آزمایشگاه‌های دنیا برای تعیین و شناسایی ویروس بیماری نیوکاسل پذیرفته شده است (۹).

[1] La sota
[2] Office International Epizooties – OIE
[3] European Union council
[4] Haemagglutination inhibition test

در کنترل همه‌گیری‌ها معمولاً تشخیص NDV[1] به تنهایی کفایت نمی‌کند، بلکه لازم است تا پاتوتیپ[2] ویروس و حتی گاه میزان بیماری‌زایی آن هم ارزیابی شود. در سال ۱۹۵۵ پژوهشگران شاخص متوسط زمان مرگ جنین[3](MDT) را برای تعیین پاتوتیپ ویروس‌های بیماری نیوکاسل معرفی کردند، به دنبال آن، شاخص‌های دیگری از جمله ضریب بیماری‌زایی داخل مغزی[4](ICPI) و ضریب بیماری‌زایی داخل وریدی[5](IVPI) نیز به معیارهای طبقه‌بندی پاتوتیپ‌های این ویروس‌ها افزوده شدند. اما باید توجه داشت که مشخص کردن پاتوتیپ ویروس بر اساس روش‌های مرسوم MDT, ICPI وIVPI کار زمان‌بر و پرزحمتی به حساب می‌آید (۱۴، ۵۰).

## ۲-۸- ویروس

ویروس‌ها کوچکترین عوامل عفونی هستند و فقط حاوی یک نوع اسیدنوکلئیک (RNA یا DNA) در ژنوم خود می‌باشند. اسید نوکلئیک ویروس، توسط پوسته‌ای از جنس پروتئین در بر گرفته می‌شود. در بعضی ویروس‌ها ممکن است این پوسته پروتئینی، درون غشایی حاوی لیپید جای گرفته باشد. ویروس‌ها تنها در سلول‌های زنده تکثیر می‌یابند، در محیط خارج سلولی غیرفعالند و انگل ژنتیکی می‌باشند. میزبان‌های یک ویروس خاص، ممکن است کم یا زیاد باشند. ویروس‌ها قادرند، هم ارگانیسم‌های تک سلولی نظیر میکوپلاسماها و باکتری‌ها و هم جلبک‌ها و گیاهان و جانوران عالی را آلوده کنند (۶).

### ۲-۸-۱- پارامیکسوویروس[6]

پارامیکسوویروس‌ها، شامل مهم‌ترین عوامل ویروس تولید کننده عفونت‌های تنفسی می‌باشند. خصوصیات مهم پارامیکسوویروس‌ها در جدول ۲-۱ ذکر شده است. خانوادهٔ پارامیکسوویریده به سه جنس تقسیم می‌شود، اکثریت اعضاء تک تیپی[7] هستند، بدین معنی که آنها از یک سروتیپ منفرد تشکیل یافته‌اند. تمامی آنها از نظر آنتی‌ژنتیک پایدار هستند (۶).

[1] Newcastle Disease Virus
[2] Pathotype
[3] Mean Death Time
[4] Intracerebra Pathogenicity Index
[5] Intravenous pathogenicity Index
[6] Paramyxo Virus
[7] Monotypic