

مقایسه اثرات تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده توسط ژنوتیپ‌های VII.2 و VII.1.1 و ویروس نیوکاسل در جوجه‌های SPF و تجاری تخم‌گذار

آرش قلیان چی لنگرودی^۱، حمیده نجفی^۱، نیوشا حاجی زمانی^۱، ناصر صدری^۱، زهرا ضیافتی کافی^۱، علی هژبر راجعونی^۱، شبنم آفاجان تبار^۱، محمد عبدالشاه^۲، حسین حسینی^{۳*}

۱- گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲- مؤسسه تحقیقات واکس و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۱۹ دی ۱۴۰۰، بازنگری: ۲۰ بهمن ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۶ فروردین ۱۴۰۱

چکیده

با وجود واکسیناسیون گسترده علیه ویروس بیماری نیوکاسل (NDV)، این ویروس همچنان در مزارع طیور در گردش است. مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی تفاوت تغییرات هیستوپاتولوژیکی و وضعیت آنتی‌بادی محافظتی در جوجه‌های آزمایشی آلوده شده با ژنوتیپ‌های VII.2 و VII.1.1 ویروس نیوکاسل فوق‌حد انجام شد. در این مطالعه جوجه‌های تجاری تخم‌گذار و SPF (Specific Pathogen-Free) توسط ژنوتیپ‌های VII.2 و VII.1.1 ویروس نیوکاسل از طریق چشمی-بینی تلقیح گردید. سواب‌های و کلواک از تمامی جوجه‌ها در روز چهارم بعد از چالشی اخذ و سپس تمامی جوجه‌ها برای نمونه‌گیری بافتی کشته شدند. نمونه‌های بافت‌های بافت‌های قلب، کلیه، ریه، طحال، مغز، روده و کبد برای بررسی و درجه‌بندی هیستوپاتولوژی انتخاب گردید. همه‌ی جوجه‌های SPF در ۴۸ ساعت اول آزمایش تلف شدند. نتایج آزمایش HI در روز قبل از چالشی، سطح آنتی‌بادی در گروه جوجه‌های تجاری را ۶/۴۶ و در گروه جوجه‌های SPF را، صفر نشان داد. در نتایج حاصل از هیستوپاتولوژی، آسیب شدیدی در بافت پیش‌معدة و قلب مشاهده نشد. در بافت‌های دو گروه جوجه SPF آلوده شده با دو ژنوتیپ، خونریزی مشاهده گردید. بیشترین جراحات در بافت ریه و کلیه مشاهده شد که در گروه جوجه‌های SPF شدیدتر بوده و همچنین جراحات حاصل از ویروس VII.2 شدیدتر از سویه VII.1.1 بود. در مجموع با توجه به تیتراژ آنتی‌بادی محافظ و جراحات هیستوپاتولوژی کمتر در گروه جوجه‌های تجاری، می‌توان نتیجه گرفت که آنتی‌بادی موجود در گله‌های تجاری تا حد بالایی از تکثیر ویروس جلوگیری می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: بیماری نیوکاسل، هیستوپاتولوژی، VII.2، VII.1.1، جوجه‌های تجاری

مقدمه

پارامیکسوویروس‌های تیپ ۱ پرندگان Avian paramyxovirus type 1 (APMV-1) باعث ایجاد بیماری مسری نیوکاسل (Newcastle disease (ND) در سراسر جهان بوده که قادر به آلوده نمودن اغلب گونه‌های پرندگان از جمله پرندگان وحشی، اهلی و پرندگان قفسی می‌باشند، با این حال ماکیان حساس‌ترین و مهم‌ترین میزبان این ویروس هستند (۱-۴).

APMV-1، متعلق به جنس آوولاویروس، خانواده‌ی پارامیکسوویریده Paramyxoviridae و راسته‌ی ویروس‌های مونونگاویرال‌ها Mononegavirales هستند که این راسته شامل ویروس‌هایی دارای RNA تک رشته‌ای یکپارچه و کپسید مارپیچی می‌باشند (۱، ۳، ۵، ۷). APMV-1 فقط دارای یک سروتیپ است (۸).

بر اساس تعیین توالی و آنالیز فیلوژنتیک ژن F سویه‌های نیوکاسل، این ویروس‌ها به دو کلاس I و II، تقسیم می‌شوند. سویه‌های کلاس I حاوی تنها یک ژنوتیپ شامل سویه‌های غیر حاد هستند که پرندگان وحشی را آلوده می‌نمایند. در حالی که سویه‌های کلاس II شامل ۱۸ ژنوتیپ از I الی XVIII بوده و سویه‌های غیر حاد و بسیار حاد را شامل می‌شوند، کلاس II شامل ویروس‌های واکسینال و ویروس‌های فوق حاد هستند. به دلیل تنوع بالا در ژنوتیپ‌های کلاس II، این ژنوتیپ‌ها به تحت ژنوتیپ‌های مختلفی تقسیم می‌شوند. ویروس‌های کلاس II از پرندگان وحشی و ماکیان جدا شده‌اند، در حالی که اکثر ویروس‌های حاد نیوکاسل از ماکیان جدا شده‌اند (۲، ۵، ۷، ۹، ۱۲).

اخیراً ژنوتیپ سویه‌ی VII در بسیاری از همه‌گیری‌های آسیا و شرق خاور میانه جدا شده است. این ویروس‌ها قادر به ایجاد ضرر اقتصادی قابل توجهی حتی در گله‌های واکسینه هستند،

حتی گاهی اوقات باعث ایجاد بیماری در پرندگان آبی‌زی نیز می‌شوند (۷، ۹، ۱۰، ۱۳، ۱۴). در کشورهای در حال توسعه مثل کشورهای قاره آسیا و آفریقا علی‌رغم استفاده‌ی زیاد از واکسیناسیون گسترده، ویروس نیوکاسل دائماً در حال چرخش می‌باشد و بیماری نیوکاسل همچنان به‌عنوان یک مشکل جدی در صنعت طیور باقی مانده است (۳، ۴، ۵، ۸). به دلیل عدم اقدامات کافی امنیت زیستی، ویروس‌های نیوکاسل به احتمال زیاد بین ماکیان و پرندگان وحشی در هر دو جهت رد و بدل می‌شود و اجازه می‌دهد گونه‌های جدید ویروسی بالقوه ظهور نمایند. متعاقباً، طیور صنعتی نقش اساسی را در تکامل ویروس‌های نیوکاسل در کشور بازی می‌کنند (۹، ۱۳).

پاسخ ایمنی ذاتی میزبان به عفونت ویروسی، به‌عنوان پاسخ بالقوه جهت آهسته نمودن روند رونویسی ویروس و حمایت میزبان در تکامل محافظت مخصوص پاسخ ایمنی سازگار، طراحی شده است (۲، ۱۵). ویروس نیوکاسل جراحات و تغییرات هیستوپاتولوژیکی در بافت‌ها و ارگان‌های پرندگان آلوده به عفونت ایجاد می‌کند. این جراحات منجر به تضعیف ایمنی میزبان می‌شوند (۲، ۱۶). سویه‌های بسیار حاد باعث ایجاد جراحات سیستمیک در بافت‌های لنفوئیدی، نکروز و تخلیه‌ی شدید لنفوئیدها می‌شود. سویه‌های غیر حاد باعث نکروز نمی‌گردند (۲، ۱۷).

در تغییرات هیستوپاتولوژیک ویروس‌های فوق حاد در ماکیان و بوقلمون‌ها، می‌توان به نکروز همراه با تخلیه لنفوئیدی لوزه‌های سکومی، طحال، تیموس، و بورس اشاره کرد. همچنین التهاب کیسه‌های هوایی هیستوسایتیک، گلیوز و التهاب اطراف عروقی در ساقه مغز، مخچه و مدولا، التهاب ماهیچه قلب نکروتیک، نکروز مغز استخوان، نکروز کبد، نکروز پانکراس و تیموس، نکروز و زخم

مقایسه اثرات تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده توسط ژنوتیپ‌های ...

سلول‌های اپیتلیوم روده‌ای و زخم هموراژیک نای مشاهده می‌شوند (۲، ۵، ۱۷).

بیماری نیوکاسل باعث وقوع چهار پانزوتیک کلی شده است. پانزوتیک چهارم مربوط به ژنوتیپ VII بود و در دهه‌ی ۱۹۸۰ در آسیای جنوب شرقی آغاز شد که به سرعت به آفریقا و اروپای غربی و در نهایت در سال ۲۰۰۸ به آمریکای جنوبی گسترش یافت (۱۸، ۱۹). مطالعاتی بر اساس سکناس کامل یا منطقه‌ای از ژن F یا HN، وجود تحت ژنوتیپ VII.1.1 و VII.2 را در ایران نشان داده‌اند (۷، ۱۳، ۲۰). مطالعه حاضر با هدف توصیف تمایز اثرات هیستوپاتولوژیکی تحت ژنوتیپ VII.1.1 و VII.2 و ویروس عامل نیوکاسل در جوجه‌ها انجام شد.

مواد و روش کار

جوجه ها و ویروس‌ها: تعداد ۳۲ قطعه جوجه، ۱۶ قطعه جوجه SPF (Specific Pathogen-Free)، ۴۲ روزه و ۱۶ قطعه جوجه‌ی تجاری تخم‌گذار LSL تهیه گردید. جوجه‌ها به مدت یک هفته در اتاق‌های جداگانه نگهداری شدند و آب و غذا به صورت adlibitum در اختیار آنها قرار گرفت. دما، نور و موقعیت محیطی طبق استاندارد توصیه شده نگهداری جوجه‌های تجاری بود. جوجه‌ها در هر یک از گروه‌های تخم‌گذار یا SPF به دو گروه ۵ تایی تقسیم شده و برای هر گروه ۳ قطعه جوجه به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. دو ژنوتیپ ویروس نیوکاسل ولونژنیک (MG871466.1) VII.2 و VII.1.1 (JX131356.1) از آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی تهران تهیه شد. نمونه‌های ویروسی با استفاده از رقت‌های دهگانه از 10^{-6} الی 10^{-1} در بافر فسفات رقیق شده و به جنین‌های ۱۰ روزه به اندازه ۰/۱ میلی‌لیتر از راه آلانوتییک تلقیح گشتند. تخم مرغ‌ها تا ۵ روز مانیتور شده و نسبت جنین‌های عفونی به سالم

تعیین شد و با توجه به روش رید و مانچ EID50 تعیین گردید. در روز اول آزمایش، ۵ قطعه جوجه‌ی SPF تحت عنوان گروه SPF1 و ۵ قطعه جوجه‌ی تخم‌گذار تحت عنوان گروه C1 توسط ۰/۱ میلی‌لیتر از ویروس حاد بیماری نیوکاسل ژنوتیپ VII.2 با دوز 10^5 EID₅₀/0.1 mL به روش داخل چشمی-بینی تلقیح شدند و همچنین در همان روز، ۵ قطعه جوجه‌ی SPF تحت عنوان گروه SPF2 و ۵ قطعه جوجه‌ی تخم‌گذار تحت عنوان گروه C2 با ۰/۱ میلی‌لیتر از ویروس VII.1.1 با دوز و روش مشابه تلقیح گشتند.

سرولوژی: نمونه‌های سرم قبل از انجام چالش جهت بررسی سطح آنتی‌بادی در جوجه‌های تجاری و SPF با استفاده از آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون Haemagglutination inhibition (HI) طبق روش OIE مورد بررسی قرار گرفتند (۳). در این روش میزان ۲۵ میکرولیتر بافر فسفات به هر یک از گوده‌های میکروپلیت تیتراسیون افزوده و سپس به همین میزان سرم اخذ شده از جوجه‌ها به اولین گوده هر ردیف اضافه گردید. سرم در هر ردیف در رقت‌های دوگانه رقیق شد. ۴ واحد هماگلوتیناسیون از ویروس‌های مورد چالش به هر گوده اضافه و پلیت به مدت سی دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس ۲۵ میکرولیتر از گلبول‌های قرمز جوجه به هر پلیت اضافه و ۴۰ دقیقه دیگر انکوباسیون در دمای اتاق انجام گرفت. تیتراژ HI برابر با بیشترین رقتی از سرم است که باعث ممانعت از هماگلوتیناسیون ۴ واحد هماگلوتیناسیون از هر کدام از ویروس‌ها شود.

آزمایشات مولکولی: نمونه سواب نای و کلواک جهت آزمایشات مولکولی Real time RT-PCR در روز چهارم بعد از تزریق، از جوجه‌های SPF مرده و جوجه‌های تجاری زنده اخذ شد. RNAی نمونه‌ها توسط کیت ستونی شرکت سیناکلون (One Pure

شدند.

نتایج

علائم بالینی و کالبدگشایی: جوجه‌های SPF

در هر دو گروه ظرف ۴۸ تا ۷۲ ساعت تلف شدند. در این مدت در هر دو گروه علائم بالینی شامل اسهال سبز آبکی، کزکردگی و خواب آلودگی، علائم تنفسی شامل نفس نفس زدن، سرفه و ترشحات بینی و تغییر جهت و چرخش سر به زیر شکم دیده شد. در جوجه‌های تجاری تا سه روز هیچ علامتی مشاهده نگردید. از روز سوم در برخی از جوجه‌ها در هر دو گروه تجاری، شاهد کزکردگی بودیم. همچنین هیچ تلفاتی در هیچ‌یک از دو گروه جوجه‌های تجاری مشاهده نشد.

سرولوژی: نتایج آزمایش HI در روز قبل از

چالش، سطح آنتی‌بادی در گروه جوجه‌های تجاری را ۶/۴۶ و در گروه جوجه‌های SPF را صفر نشان داد.

آزمایشات مولکولی: نمونه سواب نای و کلوک

اخذ شده از دو گروه جوجه‌های SPF از ۴۸ ساعت بعد از عفونت، مثبت گردید. در جوجه‌های تجاری نمونه نای و کلوک اخذ شده از گروه آلوده با ژنوتیپ VII.1.1 مثبت، اما نمونه‌های آلوده با ژنوتیپ VII.2 منفی بودند.

یافته‌های هیستوپاتولوژی: در روز چهارم بعد

از چالش، ۴۱ عدد لام هیستوپاتولوژی از بافت نای، پیش‌معدة، قلب، کلیه، ریه، طحال، مغز، روده و کبد جوجه‌های SPF مرده و سواب کام و کلوک از جوجه‌های تجاری زنده نمونه‌گیری شد. در نمونه‌های نای هر دو گروه جوجه‌های SPF آلوده شده با دو ژنوتیپ، همورازی مشاهده گردید و در مورد جوجه‌های تجاری بافت‌های ریه طبیعی و قرمز رنگ بودند و نشانه‌ای از خونریزی در پیش‌معدة و قلب یافت نشد. نتایج حاصل از ضایعات و

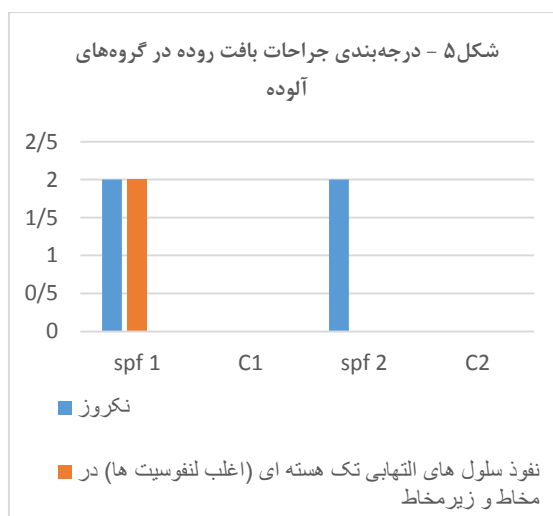
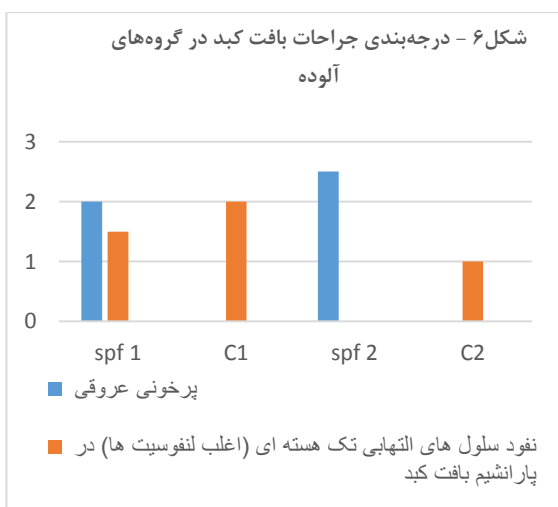
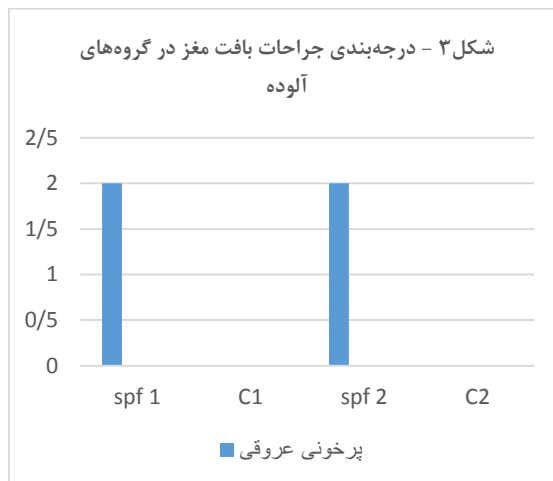
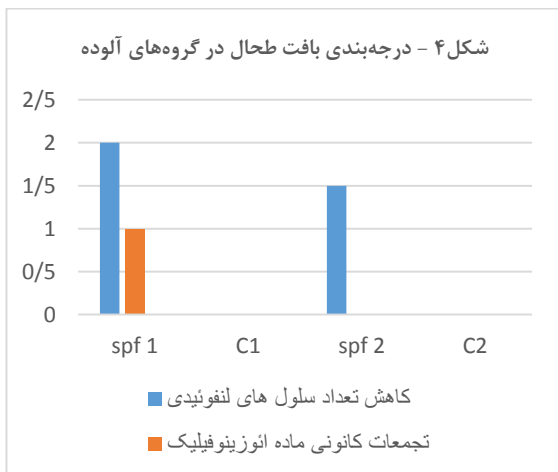
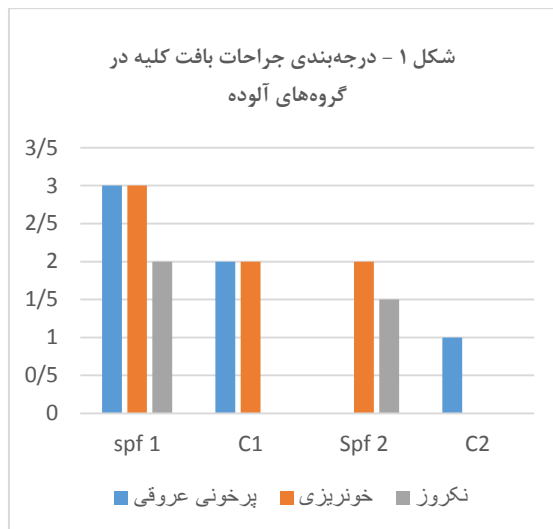
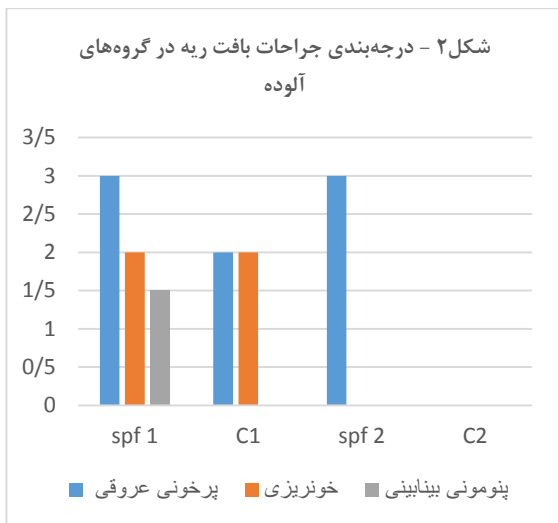
RNA extraction kit استخراج گردید و سپس سنتز cDNA با استفاده از پرایمر رندوم هگزامر به روش ارجاع داده شده توسط کیت شرکت ترموفیشر ساخته شد (۲۳). آزمون Real Time PCR جهت ردیابی سویه فوق حاد نیوکاسل توسط روشی که Farkas ارائه نموده بود، انجام داده شد (۲۴). توالی پرایمرفوروارد شامل GAY TCY ATC CGY AGG و پرایمرهای معکوس شامل ATA CAA GRG TC و AAC CCC AAG AGC TAC ACY RCC و AAR CGT YTC TGY CTC و GAC CCC AAG AGC TAC ACY RCC و C و C AGA RAC GCT TTR TAG GTG C بودند. PCR شامل Sina Green HS-qPCR Mix (سیناکلون، ایران)، ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای فوروارد و معکوس، ۱/۵ میکرولیتر از پراب و ۱ میکرولیتر از DNA و در نهایت آب مقطر استریل بود. برنامه دمایی ریل تایم شامل 95°C به مدت ۱۰ دقیقه، سپس 45°C سیکل 95°C به مدت ۱۵ ثانیه، و 60°C به مدت ۱ دقیقه بود.

آزمایش هیستوپاتولوژی: جوجه‌ها هر روز

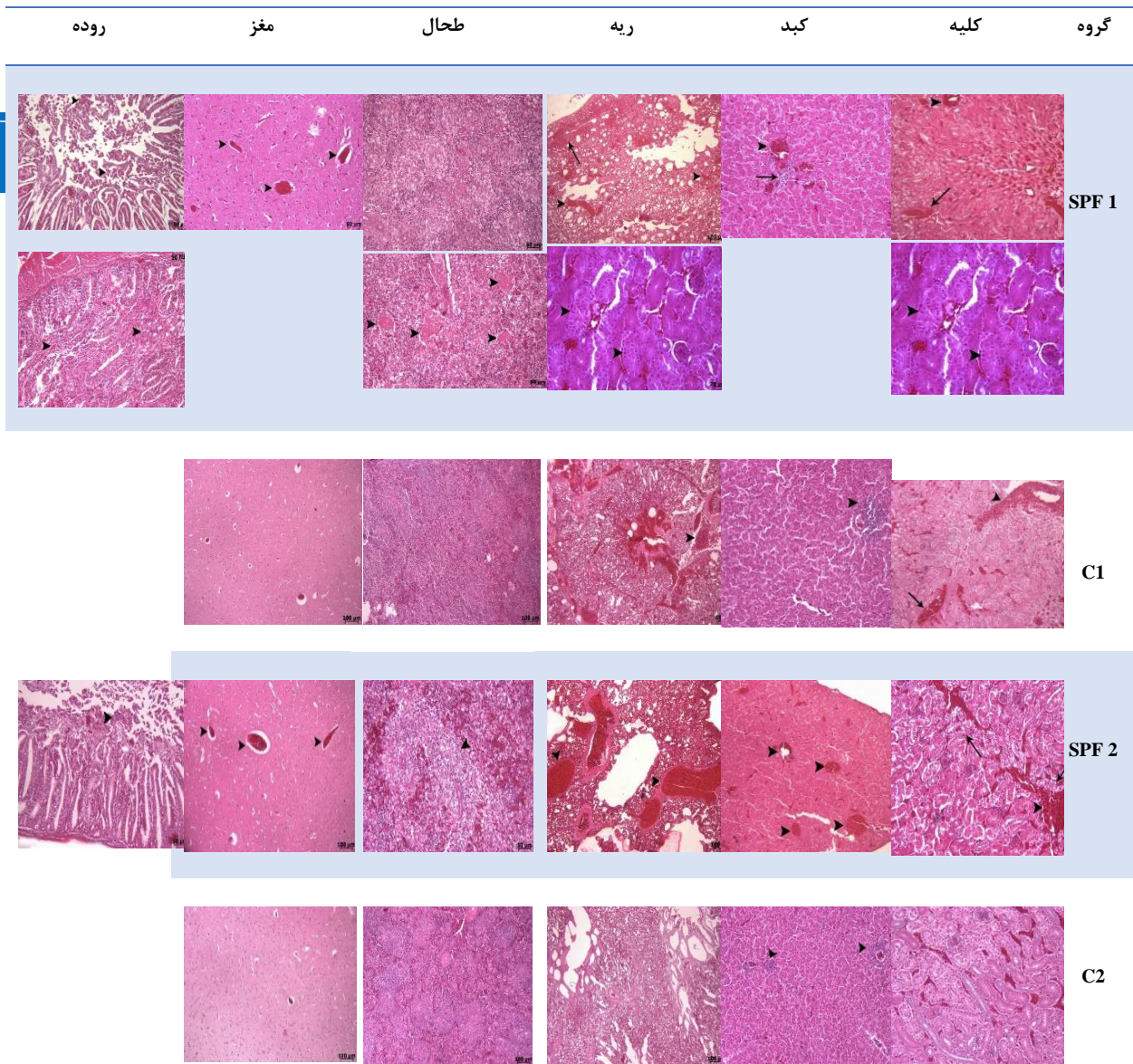
برای ضبط علائم بالینی و جراحات تحت نظر قرار گرفتند. برای نمونه‌های هیستوپاتولوژی، جوجه‌ها توسط جدا کردن گردن، در روز چهارم بعد از تزریق (۹۶ ساعت بعد) کشته شدند. بافت‌های نای، پیش‌معدة، قلب، کلیه، ریه، طحال، مغز، روده و کبد در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و سپس پروسس و مقطع‌برداری گردید و در نهایت با ائوزین-هموتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند (۲۱). نمونه‌های بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. سیستم درجه‌بندی جراحات بافت‌های آلوده به ویروس با استفاده از مطالعات قبلی تعیین شد (۲، ۲۲). به طور خلاصه جراحات در ۳ درجه =۰ نرمال، ۱=کم، ۲=متوسط، ۳=شدید طبقه‌بندی

هیستوپاتولوژی در نمودارهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ و

شکل ۷ به صورت خلاصه آمده است.

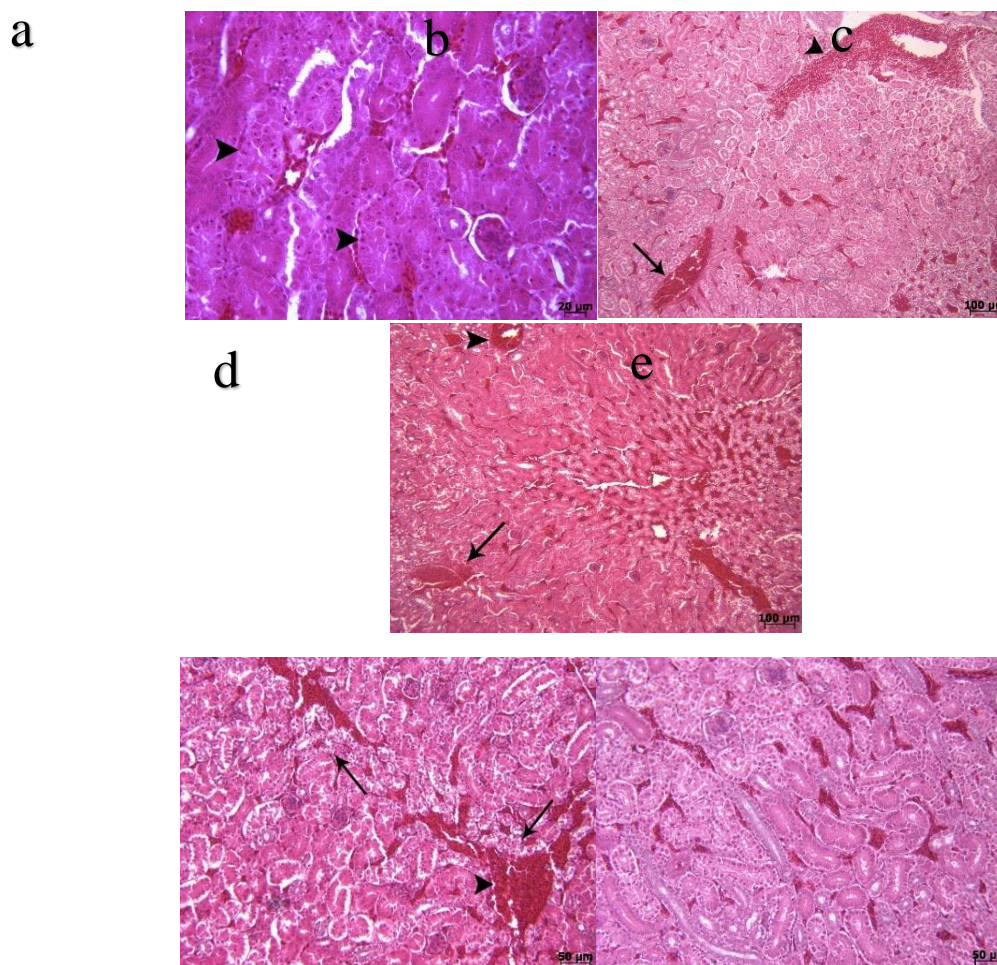


شکل ۷- تغییرات هیستوپاتولوژیکی در بافت‌های مختلف در گروه‌های آزمایشی ۱-۴ در نتایج حاصل از بررسی مقاطع هیستوپاتولوژی نمونه‌ی بافت‌ها



بافت کلیه: در گروه SPF1 بعد از تزریق ویروس عامل نیوکاسل ژنوتیپ VII.2 پرخونی عروقی و خونریزی شدید در پارانشیم کلیه (شکل a.۸)، نکروز متوسط سلول‌های اپیتلیوم پوششی توبول‌های ادراری (شکل b.۸) و در گروه جوجه‌های تجاری C1 پرخونی عروقی و خونریزی متوسط در پارانشیم کلیه

(شکل c.۸) مشاهده گردید. بعد از تزریق ویروس در VII.1.1 در گروه SPF2 خونریزی متوسط در پارانشیم کلیه، نکروز اندک تا متوسط سلول‌های اپیتلیوم پوششی توبول‌های ادراری (شکل d.۸) و در گروه جوجه‌های تجاری C2 میزان اندکی پرخونی عروقی مشاهده شد (شکل e.۸).

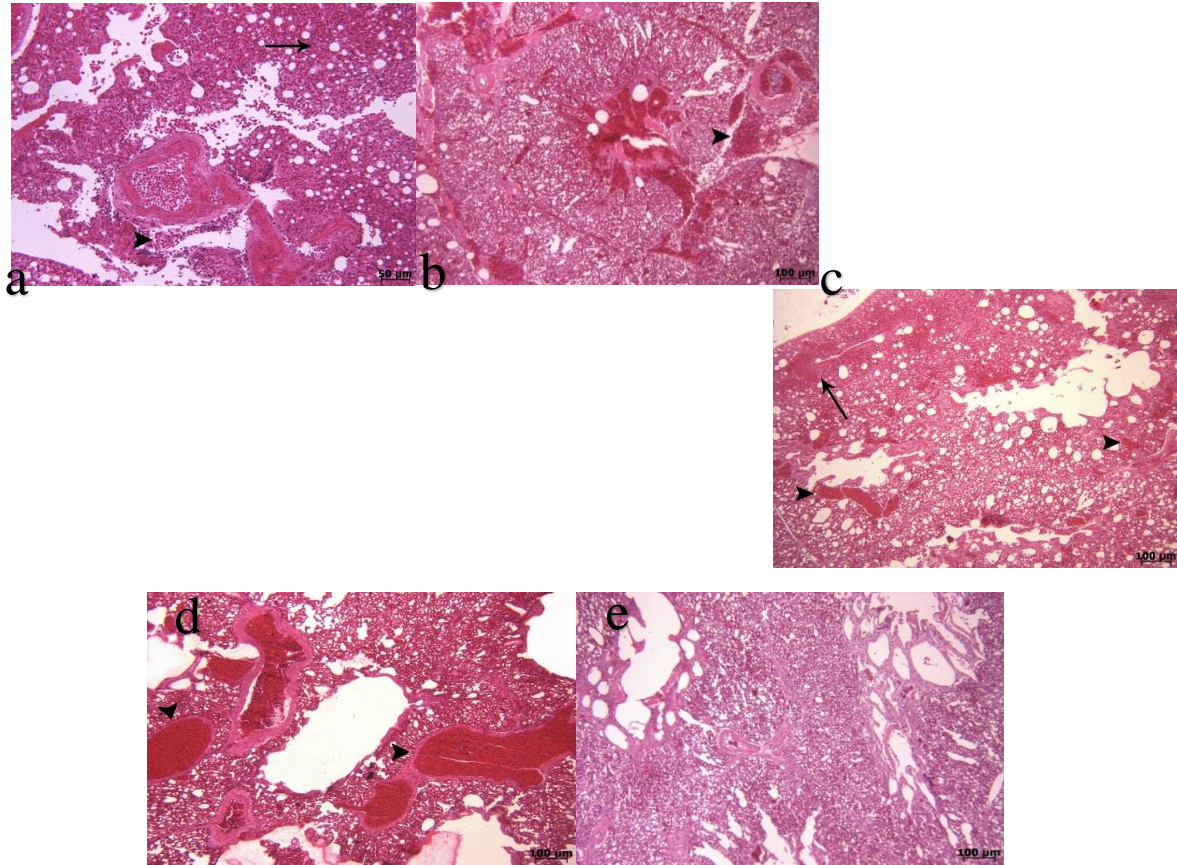


شکل ۸- پاتولوژی مقاطع بافت کلیه جوجه‌ها. a: گروه SPF1: پرخونی عروقی و خونریزی در پارانشیم بافت کلیه؛ b: گروه SPF1، نکروز سلول‌های اپیتلیوم پوششی توبول‌های ادراری؛ c: گروه C1، پرخونی عروقی و خونریزی در پارانشیم بافت کلیه؛ d: گروه SPF2، خونریزی در پارانشیم کلیه و نکروز سلول‌های اپیتلیوم پوششی توبول‌های ادراری؛ e: گروه C2، پرخونی عروقی اندک

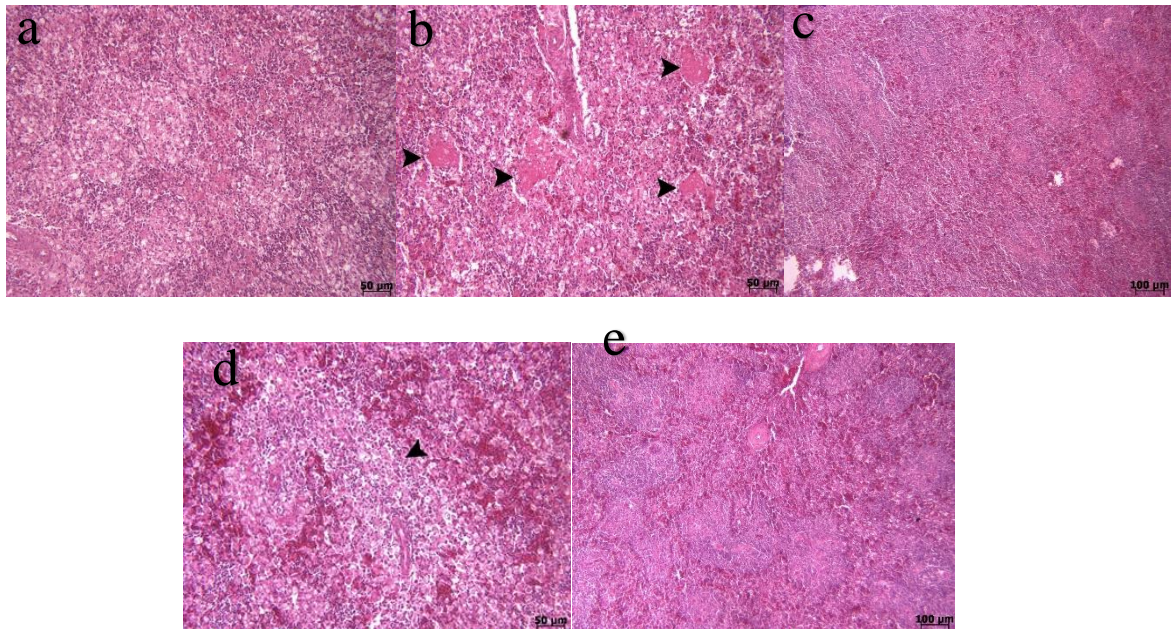
ویروس VII.2 کاهش متوسط در تعداد سلول‌های لنفوئیدی و همچنین تجمع‌ات کانونی از ماده ائوزینوفیلیک در بافت طحال دیده شد (شکل ۱۰. a). در گروه جوجه‌های تجاری C1 ضایعه پاتولوژیک مشاهده نگردید (شکل ۱۰. c). بعد از تزریق ویروس VII.1.1 در گروه SPF2 کاهش اندک تا متوسط در تعداد سلول‌های لنفوئیدی مشاهده شد (شکل ۱۰. d)، در صورتی که در گروه جوجه‌های تجاری C2 ضایعه پاتولوژیکی مشاهده نگردید (شکل ۱۰. e).

بافت ریه: در گروه SPF1 بعد از تزریق ویروس VII.2 پرخونی عروقی شدید، خونریزی متوسط در پارانشیم ریه و پنومونی بینابینی کم تا متوسط (شکل ۹. a و b) و در گروه جوجه‌های تجاری C1 خونریزی و پرخونی عروقی متوسط مشاهده گردید (شکل ۹. c). بعد از تزریق ویروس VII.1.1 در گروه SPF2 فقط پرخونی عروقی شدید مشاهده گردید (شکل ۹. d)، در صورتی که در گروه جوجه‌های تجاری C2 ضایعه پاتولوژیکی مشاهده نشد (شکل ۹. e).

بافت طحال: در گروه SPF1 بعد از تزریق



شکل ۹- پاتولوژی مقاطع بافت ریه جوجه‌ها. a: گروه SPF1، پرخونی عروقی و پنومونی بینابینی در بافت ریه؛ b: گروه SPF1، خونریزی در پارانشیم ریه و پنومونی بینابینی؛ c: گروه C1، خونریزی در بافت ریه؛ d: گروه SPF2، پرخونی عروقی شدید؛ e: گروه C2، بافت نرمال ریه

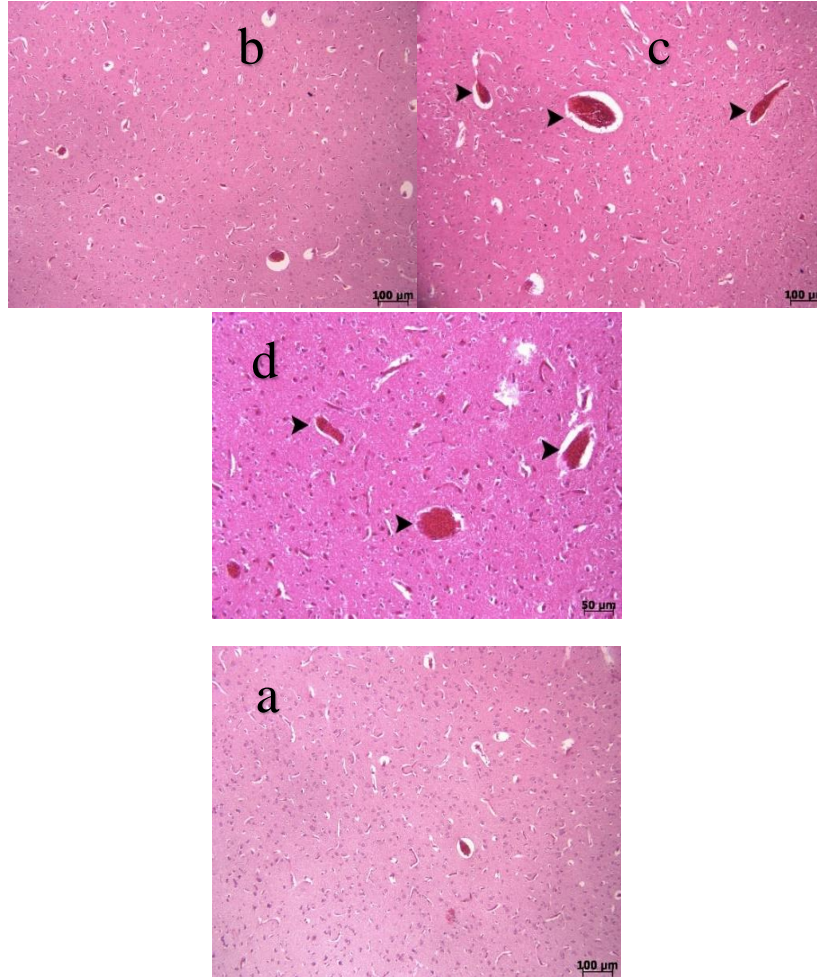


شکل ۱۰- پاتولوژی مقاطع بافت طحال جوجه‌ها. a: گروه SPF1، کاهش تعداد سلول‌های لنفوییدی در بافت طحال؛ b: گروه SPF1، تجمعات کانونی ماده ائوزینوفیلیک در بافت طحال؛ c: گروه C1، بافت نرمال طحال؛ d: گروه SPF2، کاهش در تعداد سلول‌های لنفوییدی در بافت طحال؛ e: گروه C2، بافت نرمال طحال

مقایسه اثرات تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده توسط ژنوتیپ‌های ...

تزریق ویروس VII.1.1 در گروه SPF2 پرخونی عروقی متوسط دیده شد (شکل c.۱۱)، و در گروه جوجه‌های تجاری C2 ضایعه پاتولوژیکی مشاهده نگردید (شکل d.۱۱).

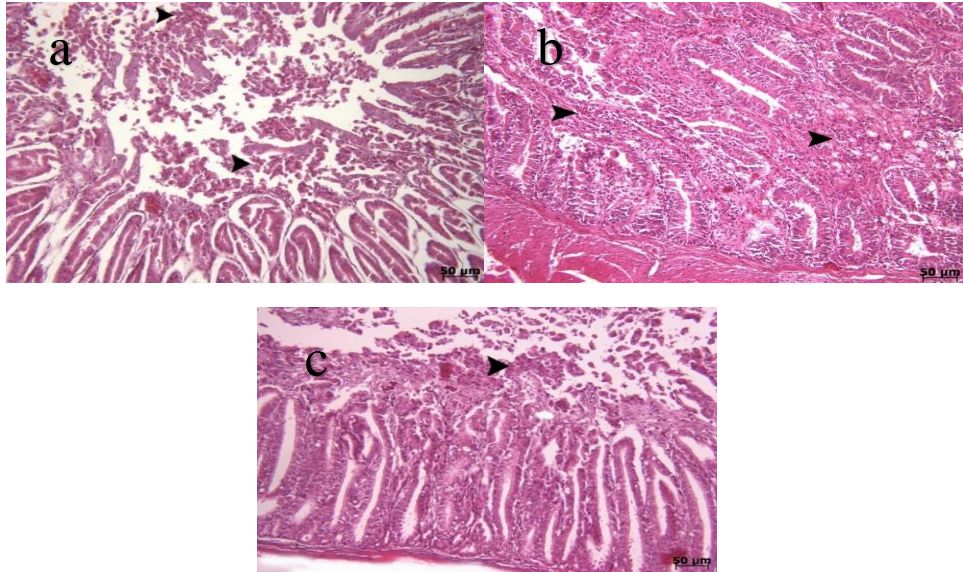
بافت مغز: در گروه SPF1 بعد از تزریق ویروس VII.2 پرخونی عروقی متوسط دیده شد (شکل a.۱۱)، و در گروه جوجه‌های تجاری C1 ضایعه پاتولوژیک مشاهده نگردید (شکل b.۱۱). بعد از



شکل ۱۱- پاتولوژی مقاطع بافت مغز جوجه‌ها. a: گروه SPF1، پرخونی عروقی در بافت مغز؛ b: گروه C1، بافت نرمال مغز؛ c: گروه SPF2، پرخونی عروقی در بافت مغز؛ d: گروه C2، بافت نرمال مغز

زیرمخاط (شکل a.۱۲ و b) و همچنین بعد از تزریق ویروس VII.1.1 در گروه SPF2 نکروز و کنده شدن سلول‌های اپیتلیوم پوششی ویلی‌ها دیده شد (شکل c.۱۲).

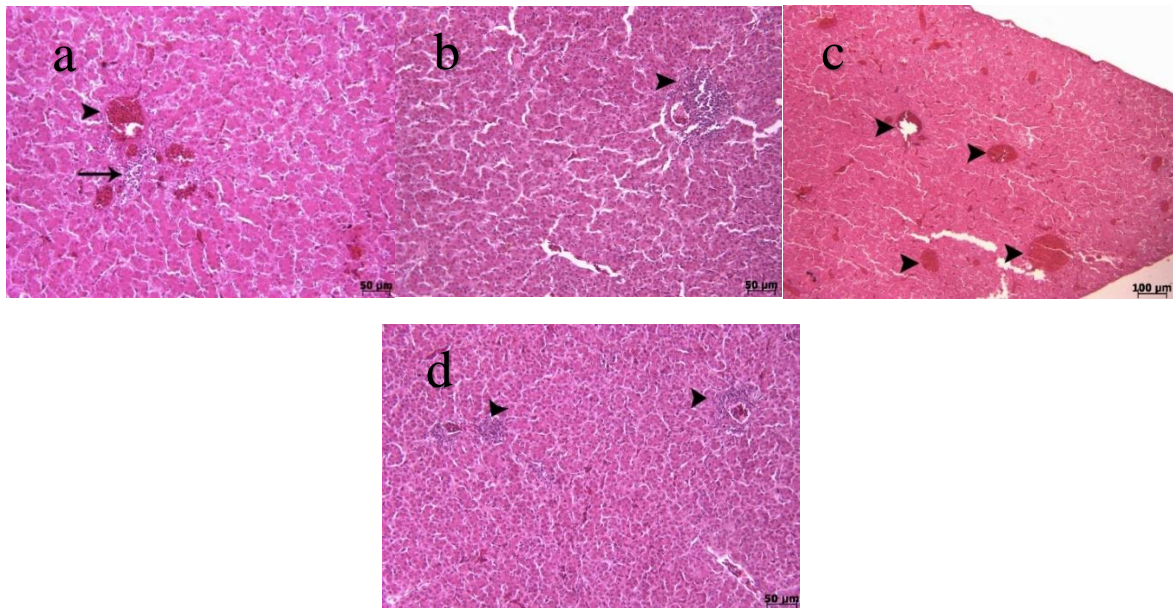
بافت روده: در گروه SPF1 بعد از تزریق ویروس VII.2 نکروز و کنده شدن سلول‌های اپیتلیوم پوششی ویلی‌ها و نیز نفوذ متوسط سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای (اغلب لنفوسیت‌ها) در مخاط و



شکل ۱۲- پاتولوژی مقاطع بافت روده جوجه‌ها. a: گروه SPF1، نکروز و کنده شدن سلول‌های اپیتلیوم پوششی ویلی‌ها در بافت روده؛ b: گروه SPF1، نکروز و نفوذ سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای در مخاط و زیرمخاط بافت روده؛ c: گروه SPF2، نکروز و کنده شدن سلول‌های اپیتلیوم پوششی ویلی‌های بافت روده.

کانونی متوسط مشاهده شد (شکل ۱۳. b). بعد از تزریق ویروس VII.1.1 در گروه SPF2 پرخونی عروقی متوسط تا شدید دیده شد (شکل ۱۳. c). در گروه جوجه‌های تجاری C2 هپاتیت لنفوسیتیک کانونی مشاهده گردید (شکل ۱۳. d).

بافت کبد: در گروه SPF1 بعد از تزریق ویروس VII.2 پرخونی عروقی متوسط، نفوذ کم تا متوسط از سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای (اغلب لنفوسیتی) در پارانشیم بافت کبد (هپاتیت لنفوسیتیک کانونی) مشاهده شد (شکل ۱۳. a). در گروه جوجه‌های تجاری C1 هپاتیت لنفوسیتیک



شکل ۱۳- پاتولوژی مقاطع بافت کبد جوجه‌ها. a: گروه SPF1، پرخونی عروقی و نفوذ سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای در پارانشیم کبد؛ b: گروه C1، هپاتیت لنفوسیتیک کانونی در بافت کبد؛ c: گروه SPF2، پرخونی عروقی؛ d: گروه C2، هپاتیت لنفوسیتیک کانونی.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به خسارت اقتصادی سنگینی که بیماری نیوکاسل هر ساله به صنعت طیور کشور و جهان وارد می‌نماید، این بیماری به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های طیور مطرح می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر با تمرکز بر روی ژنوتیپ‌های اخیر در حال گردش در کشور، شامل جدایه‌ی VII.2 و VII.1.1 به بررسی جراحات هیستوپاتولوژی و سطح تیترا آنتی‌بادی در جوجه‌های تجاری تخم‌گذار و جوجه‌های SPF پرداخته شد.

علائم بالینی حاصل از این آزمایش، در گروه SPF، در ۷۲ ساعت (۳ روز) بعد از تزریقات، اسهال سبز آبکی بدبو، کزکردگی و خواب‌آلودگی، علائم تنفسی، تغییر جهت و چرخش سر به زیر شکم دیده شد؛ در حالی که در گروه جوجه‌های تجاری هیچ علائم بالینی مشاهده نگردید. این نتایج نشان‌دهنده این بود که جوجه‌های تجاری به این ویروس‌ها مقاوم‌تر از جوجه‌های SPF بوده‌اند. در مطالعه‌ی Kumbish و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی اثر بیماری نیوکاسل بر روی پرندگان بومی و وحشی، علائم بالینی مشاهده شده در پرندگان زنده به‌طور کلی شامل ضعف، اسهال آبکی مایل به سبز، مشکل تنفسی، بی‌اشتهایی و سرفه، کجی گردن، افتادگی بال‌ها، فلج جزئی پا و اپیستوتونوس بود (۲۵). EI-Mandrawy (۲۰۱۷) نیز در مطالعه‌ی خود بر روی جوجه‌های گوشتی، سیانوز، ترشحات بینی، ورم پلک و اسهال خمیری سفید به همراه علائم عصبی مشاهده کرد (۲۶). اثر ویروس بر روی ارگان‌های لنفوئیدی، اهمیت آن را در کشورهایی که طیور صنعتی را واکسینه می‌نمایند، افزایش می‌دهد، زیرا واکسیناسیون می‌تواند منجر به کاهش تولید و افزایش حساسیت به سایر عفونت‌ها شود (۲۲). در مطالعه‌ی Mousa و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی تفاوت تیترا آنتی‌بادی ایمنی و بافت‌شناسی اندام‌های

مقایسه اثرات تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده توسط ژنوتیپ‌های ...

ایمنی و همچنین بیان آنتی‌ژن ویروس در اندام‌های ایمنی بین گروه‌های سنی مختلف جوجه‌های گوشتی (جوجه‌های ۳ و ۱۵ روزه) حاصل از تزریق نیوکاسل ولوژن ژنوتیپ VII پرداختند. نتایج حاکی از این بود که ویروس NDV باعث کاهش ایمنی پرندگان توسط کاهش تیترا آنتی‌بادی و ایجاد تغییرات شدید هیستوپاتولوژیک در اندام‌های ایمنی بدن می‌شود که با بیان بالای آنتی‌ژن ویروس در اندام‌های ایمنی در ارتباط می‌باشد. علاوه بر این میان سن جوجه‌ها هنگام تزریق و شدت ضایعات ایجاد شده، و متعاقب آن وضعیت ایمنی پرنده‌ها رابطه‌ای مستقیم وجود دارد (۲). سایرین مشاهده نمودند ژنوتیپ VII ویروس نیوکاسل در بافت‌های لنفاوی رونویسی کرده و به آنها آسیب جدی می‌رساند (۲، ۲۷). Senne و Alexander (۲۰۰۸) نیز تغییرات هیستولوژی در بافت‌های لنفاوی را متعاقب عفونت جوجه‌ها با ویروس نیوکاسل ولوژن ثابت نمودند (۸). در نتایج بافت‌شناسی مطالعه‌ی حاضر، در بافت کلیه، در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.2 پرخونی عروقی و خونریزی شدید، نکروز متوسط سلول‌های اپیتلیوم پوششی توبول‌های ادراری مشاهده گردید، در صورتی که در گروه جوجه‌های تجاری فقط پرخونی عروقی و خونریزی متوسط در پارانشیم کلیه دیده شد. در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.1.1، شاهد خونریزی متوسط عروقی در پارانشیم کلیه و نکروز کم تا متوسط سلول‌های اپیتلیوم پوششی توبول‌های ادراری بودیم، اما جوجه‌های تجاری فقط مختصری پرخونی عروقی نشان دادند.

پرخونی کلیه در مطالعه‌ی Kumbish و همکاران (۲۰۱۹) نیز بیان شده بود. علاوه بر این پرخونی ریوی، خونریزی پتشی در سطح موکوس پیش‌معد و التهاب نای هموراژیک، پرخونی و بزرگ شدن متوسط پانکراس، بزرگ شدن متوسط قلب، تغییرات

هیستوتولوژیکی شامل تخلیه‌ی لنفوئیدی و پرولیفراسیون بافت همبندی، التهاب روده و التهاب طحال نیز مشاهده شد. این محققین نشان دادند که آنتی‌ژن‌های NDV در پرندگان وحشی و جوجه‌های بومی بیشتر در طحال، پانکراس، نای و پیش‌معه متمرکز می‌شوند (۲۵). در بافت ریه در مطالعه‌ی حاضر، در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.2 پرخونی عروقی شدید، خونریزی متوسط در پارانشیم ریه و پنومونی بینابینی کم تا متوسط، اما در گروه جوجه‌های تجاری خونریزی و پرخونی عروقی متوسط دیده شد؛ در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.1.1 فقط پرخونی عروقی شدید مشاهده شد، در حالی که جوجه‌های تجاری هیچ جراحی از خود نشان ندادند. در نتایج بافت‌شناسی بافت طحال در مطالعه‌ی حاضر، در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.2 کاهش متوسط تعداد سلول‌های لنفوئیدی و تجمع کانونی ماده ائوزینوفیلیک و در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.1.1 فقط کاهش اندک تا متوسط تعداد سلول‌های لنفوئیدی مشاهده شد، در صورتی که در هیچ کدام از گروه‌های جوجه‌های تجاری، هیچ ضایعه‌ای در بافت طحال دیده نشد. ضایعات پاتولوژیک طحال در برخی از مطالعات قبلی نیز مشاهده شده بود (۱۵، ۲۵). در مطالعاتی دیگر، درجات آسیب بافت‌شناسی به دست آمده برای هر عضو در گروه غیر واکسینه نسبت به گروه واکسینه شده به طور قابل توجهی بالاتر بود. در بافت مغز التهاب اطراف عروقی لنفوسیتیک، در بافت روده‌ی کوچک، نکروز مخاط و زیر مخاط و پوسته شدن ویلی‌ها، نکروز توبولار و پرخونی عروق خونی بین لوله‌ای در بافت کلیه و پرخونی سیاهرگ‌ها در بافت کبد مشاهده شدند. در جوجه‌های غیر واکسینه آلوده شده با ND، توبول‌های کلیوی منتشر و نکروز انعقادی گلمرولی با گشاد شدن کیستیک و یا تغییر مورفولوژیکی

برخی از لوله‌های کلیوی علاوه بر آسیب رساندن به غشای پایه و پرخونی شدید رگ‌های خونی بین لوله‌ای دیده شد (۲۶، ۲۸). در نتایج هیستوپاتولوژی مطالعه‌ی حاضر، در بافت مغز، در گروه SPF آلوده شده با ویروس‌های VII.2 و VII.1.1 فقط شاهد پرخونی عروقی متوسط بودیم، در حالی که گروه جوجه‌های تجاری جراحی نشان ندادند. در بافت روده‌ی گروه‌های SPF آلوده شده با ویروس‌های VII.2 و VII.1.1 نکروز و کنده شدن متوسطی از سلول‌های اپیتلیوم پوششی ویلی‌ها دیده شد اما در گروه‌های تجاری جراحی مشاهده نگردید. در بافت کبد در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.2 پرخونی عروقی متوسط، نفوذ کم تا متوسط از سلول‌های التهابی تک هسته‌ای (اغلب لنفوسیتی) در پارانشیم بافت کبد (هپاتیت لنفوسیتیک کانونی) و در گروه SPF آلوده شده با ویروس VII.1.1 فقط هپاتیت لنفوسیتیک کانونی متوسط مشاهده شد، در صورتی که در هیچ کدام از گروه‌های جوجه‌های تجاری، هیچ ضایعه‌ای در بافت کبد دیده نشد. Kumbish و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ی خود هپاتومگالی مشاهده نمودند (۲۵). در نتایج سرولوژی مطالعه‌ی حاضر، تغییر سطح آنتی‌بادی به صورت افزایش تیتراژ در گروه جوجه‌های تجاری در مقایسه با تیتراژ گروه جوجه‌های SPF نشان داده شد. با توجه به این نتیجه، می‌توان بیان کرد که جوجه‌های تجاری مقاوم‌تر از جوجه‌های SPF بودند. جوجه‌های SPF در ۴۸ ساعت بعد از تزریق همگی تلف شدند. در روز چهارم بعد از تزریق، در نتایج حاصل از هیستوپاتولوژی، آسیب شدیدی و یا خونریزی در پیش‌معه و قلب هیچ کدام از گروه‌ها مشاهده نگردید. فقط در نای دو گروه از جوجه‌های SPF (SPF1 و SPF2) خونریزی مشاهده شد. در مجموع، بیشترین جراحات در بافت ریه و کلیه مشاهده شد که در گروه جوجه‌های SPF شدیدتر

خونریزی در معده و لوزه‌های سکومی و در پیش‌معه نیز تورم همراه با خونریزی در زیر مخاط و پاپیلا مشاهده گردید (۲۹).

علائم بالینی فقط در جوجه‌های SPF مشاهده شد. با توجه به نتایج آزمایش HI در روز قبل از چالش، سطح آنتی‌بادی در گروه جوجه‌های تجاری ۶/۴۶ و در گروه جوجه‌های SPF صفر بود. در نتایج حاصل از هیستوپاتولوژی، بیشترین جراحات در بافت ریه و کلیه مشاهده شد که در گروه جوجه‌های SPF شدیدتر بوده و همچنین جراحات حاصل از ویروس VII.2 شدیدتر از سویه VII.1.1 بود. در مجموع با توجه به تیتراژ آنتی‌بادی محافظ و جراحات هیستوپاتولوژی کمتر در گروه جوجه‌های تجاری، می‌توان نتیجه گرفت که آنتی‌بادی موجود در گله‌های تجاری تا حد بالایی از تکثیر ویروس جلوگیری می‌نماید.

References

- 1- Vegad J. Poultry diseases: a guide for farmers and poultry professionals: IBDC Publishers; 2008.
- 2- Mousa M, Mohammed F, Khalefah H, El-Deeb A, Ahmed K. Comparative serological, histopathological and immunohistochemical evaluation of immune status of broiler chickens experimentally infected with velogenic Newcastle disease virus in different ages. *Int J Vet Sci.* 2019;8(3):143-50.
- 3- Manual O. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals of the World Organisation for Animal Health (OIE). *Chapters.* 2012;2(4):441-2.
- 4- Wang Y, Duan Z, Hu S, Kai Y, Wang X, Song Q, et al. Lack of detection of host associated differences in Newcastle disease viruses of genotype VIIId isolated from chickens and geese. *Virology.* 2012;9(1):197.
- 5- Miller PJ, Koch G. Newcastle disease. *Diseases of poultry.* 2013;13:89-138.
- 6- Afonso CL, Amarasinghe GK, Bányai K, Bào Y, Basler CF, Bavari S, et al. Taxonomy of the order Mononegavirales. *Arch Virol.* 2016; 161(8): 2351-60.
- 7- Ghalyanchilangeroudi A, Hosseini H,

بود، و در حالت کلی جراحات حاصل از ویروس VII.2 شدیدتر از VII.1.1 دیده شد. در کل با توجه به تیتراژ آنتی‌بادی محافظ و جراحات هیستوپاتولوژی کمتر در گروه جوجه‌های تجاری، می‌توان نتیجه گرفت که جوجه‌های تجاری به این دو ویروس مقاوم‌ترند. در آزمایش بافت‌شناسی مطالعه‌ی Imran و همکاران (۲۰۱۹) پاتوژن متوسط تا بسیار شدید عفونت ویروس نیوکاسل و ویروس برونشیت عفونی در بافت‌های ریه‌ها، پیش‌معه، کلیه و سگال تانسیل در روزهای صفر، دو، چهار و شش بعد از تزریق ویروس‌ها، دیده شدند. با توجه به علائم بالینی شدیدتر بین روزهای ۴ الی ۶ بعد از تزریق، بیشترین ضایعات در بافت‌های جمع‌آوری شده نیز، در روز ۶ بعد از تزریق مشاهده شد. در بافت‌شناسی عموماً التهاب‌های هموراژیک و پرخونی‌های هیپریمی در ریه‌ها، بزرگ شدن کلیه‌ها، تورم و

- Jabbarifakhr M, Fallah Mehrabadi MH, Najafi H, Ghafouri SA, et al. Emergence of a virulent genotype VIIi of Newcastle disease virus in Iran. *Avian Pathol.* 2018; 47(5): 509-19. [In Persian]
- 8- Alexander D, Senne D. Newcastle Disease: Diseases of poultry. *Iowa State University Press.* USA; 2008.
- 9- Miller PJ, Haddas R, Simanov L, Lublin A, Rehmani SF, Wajid A, et al. Identification of new sub-genotypes of virulent Newcastle disease virus with potential panzootic features. *Infect Genet Evol.* 2015; 29: 216-29.
- 10- Diel DG, da Silva LH, Liu H, Wang Z, Miller PJ, Afonso CL. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect Genet Evol.* 2012; 12(8): 1770-9.
- 11- Soltani M, Peighambari S, Pourbakhsh S, Ashtari A, Far AR, Abdoshah M. Molecular characterization of haemagglutinin-neuraminidase gene among virulent Newcastle disease viruses isolated in Iran. *Iran J Vet Res.* 2019; 20(1): 1. [In Persian]
- 12- Dimitrov KM, Abolnik C, Afonso CL,

Albina E, Bahl J, Berg M, et al. Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infect Genet Evol.* 2019; 74: 103917.

13- Sabouri F, Vasfi Marandi M, Bashashati M. Characterization of a novel VIII sub-genotype of Newcastle disease virus circulating in Iran. *Avian Pathol.* 2018; 47(1): 90-9. [In Persian]

14- Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). *Infect Genet Evol.* 2016; 39: 22-34.

15- Rue CA, Susta L, Cornax I, Brown CC, Kapczynski DR, Suarez DL, et al. Virulent Newcastle disease virus elicits a strong innate immune response in chickens. *J Gen Virol.* 2011; 92(4): 931-9.

16- Cattoli G, Susta L, Terregino C, Brown C. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *J Vet Diag Invest.* 2011; 23(4): 637-56.

17- Harrison L, Brown C, Afonso C, Zhang J, Susta L. Early occurrence of apoptosis in lymphoid tissues from chickens infected with strains of Newcastle disease virus of varying virulence. *J Comp Pathol.* 2011; 145(4): 327-35.

18- Suarez D. Avian encephalomyelitis. In (eds: Swayne DE, glisson Jr, McDougald Lr, Nolan LK, Suarez DL, Nair V) *Diseases of Poultry* 13th edn, Ames. *Wiley-Blackwell.* 2013.

19- Perozo F, Marcano R, Afonso CL. Biological and phylogenetic characterization of a genotype VII Newcastle disease virus from Venezuela: efficacy of field vaccination. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(4): 1204-8.

20- Hosseini H, Langeroudi AG, Torabi R. Molecular characterization and phylogenetic study of Newcastle disease viruses isolated in Iran, 2010–2012. *Avian Dis.* 2014; 58(3): 373-6. [In Persian]

21- Bancroft JD. Histochemical techniques: Butterworth-Heinemann; 2013.

22- Merino R, Villegas H, Quintana JA, Calderon N. Comparison of the virulence of

pathogenic Newcastle disease viruses belonging to the same or different genotypes. *Int J Poult Sci.* 2011; 10(9): 713-20.

23- Seger W, Langeroudi AG, Karimi V, Madadgar O, Marandi MV, Hashemzadeh M, editors. Prevalence of avian infectious bronchitis virus in broiler chicken farms in south of Iraq, 2014–2015. *Vet Res Forum;* 2016: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

24- Farkas T, Szekely E, Belak S, Kiss I. Real-time PCR-based pathotyping of Newcastle disease virus by use of TaqMan minor groove binder probes. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(7): 2114-23.

25- Kumbish PR, Oladele SB, Esievo KAN, Ibrahim NDG, Ahmed JS, Moses GD, et al. Clinico-pathological and Immunohistochemistry of Newcastle Disease in Indigenous Chickens and Some Wild Birds in Plateau State, Nigeria. *J Adv Microbiol.* 2019: 1-15.

26- El-Mandrawy SA, Ismail SA. Selective hematological, biochemical and pathological alterations of Newcastle virus in naturally infected and vaccinated broilers in Damietta Governorate of Egypt. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Veterinary Medicine.* 2017; 74(2): 139-48.

27- Nakamura K, Ito M, Nakamura T, Yamamoto Y, Yamada M, Mase M, et al. Pathogenesis of Newcastle disease in vaccinated chickens: pathogenicity of isolated virus and vaccine effect on challenge of its virus. *J Vet Med Sci.* 2013; 13-0284.

28- El-Bahrawy A, Zaid A, Sunden Y, Sakurai M, Ito H, Ito T, et al. Pathogenesis of renal lesions in chickens after experimental infection with 9a5b Newcastle disease virus mutant isolate. *Vet Pathol.* 2017; 54(1): 94-8.

29- Imran M, Aslam A, Tipu M, Yaqub T. Evaluating the infection potential of field prevailing newcastle disease virus and infectious bronchitis virus alongwith associated microscopic changes in commercial poultry. *japs, J Anim Plant Sci.* 2019; 29(5): 1290-8.

Comparison of histopathological changes induced by the VII.2 and VII.1.1 genotypes of Newcastle disease virus in SPF chicks and commercial layers

Arash Ghalyanchi langeroudi¹, Hamideh Najafi¹, Niusha haji zamani¹, Naser Sadri¹, Zahra Ziafati Kafi¹, Ali Hojabr Rajeiouni¹, Shabnam Aghajan Tabar¹, Mohammad Abdoshah², Hossein Hosseini^{3*}

1- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

2- Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Karaj, Karaj, Iran.

Receive: January 9, 2022; Revise: February 9, 2022; Accept: April 5, 2022

Summary

Despite the widespread use of vaccination against Newcastle Disease Virus (NDV), the virus is still circulating in poultry farms. The present study was conducted to measure different histopathological effects and protective antibody levels in experimentally infected chickens with VII.2 and VII.1.1 NDV virulent strains. In this study, commercial layers and SPF (Specific Pathogen-Free) chickens were challenged with NDV genotypes VII.1.1 and VII.2 via oculo-nasal route. Tracheal and cloacal swabs were collected from all chickens on the fourth day after challenge, then chicks were euthanized in order to collect tissue samples. Tissue specimens were chosen from trachea, proventriculus, heart, kidney, lung, spleen, brain, intestine, and liver for evaluation and histopathological grading. All SPF chicks died within the first 48h of experiment. The HI results of the day before challenge revealed the antibody titer of 6.46 in commercial layers and 0 in SPF chicks. The histopathological results did not show any severe damage in tissues of proventriculus and heart. Both SPF groups showed hemorrhages in tracheal tissues. The most lesions were observed in lung and kidney tissues with more severity in SPF chickens and also more severe in VII.2 infected groups rather than the two VII.1.1 infected groups. In conclusion, according to higher antibody titers and lower histopathological lesions in commercial layers, it can be concluded that antibodies in commercial flocks can prohibit viral replication to a great extent.

Key words: Newcastle disease, Histopathology, VII.2, VII.1.1, Commercial chickens