



# Phylogenetic Study of Two Newcastle Disease Virus (NDV) Isolates Obtained From Poultry Flocks in Isfahan Province in 1999 Based on Haemagglutinin-Neuraminidase (HN) Gene Sequencing

Mohammad Soltani<sup>1</sup>, Seyed Mostafa Peighambari<sup>1</sup>, Seyed Ali Pourbakhsh<sup>2</sup>, Abbas Ashtari<sup>2</sup>, Ariya Rezaei Far<sup>1</sup>, Mohammad Abdoshah<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Avian Diseases Research and Diagnosis, Razi, Alborz, Iran

doi [10.22059/jvr.2019.225699.2576](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.225699.2576)

J Vet Res. 74(3): 396-407

## Abstract

**BACKGROUND:** Virulent Newcastle disease virus (vNDV) imposes significant economic losses to the commercial poultry industry in our country and worldwide. However, in Iran scattered and relatively few studies have been done in order to characterize NDV isolates.

**OBJECTIVES:** The aim of the present study was to characterize two vNDV isolates obtained from commercial poultry farms in Isfahan province in 1999 through Haemagglutinin-Neuraminidase (HN) gene complete sequencing.

**METHODS:** Haemagglutinin-Neuraminidase (HN) gene of each NDV isolate was amplified and sequenced using specific primers and then phylogenetically analyzed.

**RESULTS:** Based on complete coding sequence of HN gene analysis, studied isolates showed close relationship with genotype XIII and subgenotype XIIIa NDV strains. Analysis of both complete HN gene and partial F gene lead to identical results and same classification of studied viruses.

**CONCLUSIONS:** Results of present study are useful for a better understanding of molecular epidemiology of indigenous NDV strains and determining important molecular differences between field and commonly used vaccinal strains related to main immunogenic proteins.

**Keywords:** Newcastle disease virus (NDV), Virulent, Haemagglutinin-Neuraminidase (HN), Phylogenetic study, Poultry

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author’s email: [mpeigham@ut.ac.ir](mailto:mpeigham@ut.ac.ir) Tel: 021- 61117150 Fax: 021-66933222

### How to cite this article:

Soltani, M., Peighambari, M., Pourbakhsh, A., Ashtari, A., Rezaei Far, A., & Abdoshah, M. (2019). Phylogenetic Study of Two Newcastle Disease Virus (NDV) Isolates Obtained From Poultry Flocks in Isfahan Province in 1999 Based on Haemagglutinin-Neuraminidase (HN) Gene Sequencing. *J Vet Res*, 74(3), 396-407. doi:10.22059/jvr.2019.225699.2576

## Figure Legends and Table Captions

Table 1. Characteristics of NR15 and NR16 NDV isolates of this study.

Table 2. Characteristics and sequences of primers designed for amplification of Haemagglutinin-Neuraminidase (HN) gene.

Table 3. Nucleotide and amino acid similarity between NR15 and NR16 isolates and common vaccinal NDV strains.

Table 4. Evolutionary distance of NR15 and NR16 isolates from NDV isolates representing different genotypes.

Table 5. Relationship of NR15 and NR16 isolates with NDV isolates representing known genotypes based on HN sequence.

Figure 1. Phylogenetic tree based on analysis of full sequence (1716 bp) of HN gene coding region of NDVs with relevant accession numbers. NDV isolates, NR15 and NR16, are shown with black circles.

Figure 2. Phylogenetic tree based on analysis of partial sequence (270 bp) of F fusion gene coding region of NDVs with relevant accession numbers. NDV isolates, NR15 and NR16, are shown with black circles.



## مطالعه شجره‌شناسی دو جدایه ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) به دست آمده از گله های طیور استان اصفهان در سال ۱۳۷۷ بر اساس تعیین توالی ژن همگلوتینین-نورآمینیداز (HN)

محمد سلطانی<sup>۱</sup>، سید مصطفی پیغمبری<sup>۱</sup>، سید علی پوربخش<sup>۲</sup>، عباس اشتری<sup>۲</sup>، آریا رضایی فر<sup>۱</sup>، محمد عبدالشاه<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> گروه تحقیقات و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، البرز، حصارک، ایران

doi: 10.22059/jvr.2019.225699.2576

تاریخ دریافت: ۰۲ بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۲۸ اردیبهشت ۱۳۹۸ تاریخ انتشار آنلاین: ۱ شهریورماه ۱۳۹۸

### چکیده

**زمینه مطالعه:** ویروس‌های بیماری‌زای بیماری نیوکاسل (vNDV) در کشور ما و در سراسر دنیا خسارات اقتصادی چشم‌گیری را بر صنعت پرورش طیور تحمیل می‌کنند. با این حال، مطالعات پراکنده و به نسبت اندکی در رابطه با تعیین هویت این ویروس‌ها در کشور ما انجام گرفته است.

**هدف:** مطالعه حاضر با هدف تعیین هویت دو جدایه ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) بدست آمده از گله های طیور در استان اصفهان از طریق تعیین توالی کامل ژن همگلوتینین-نورآمینیداز (HN) صورت پذیرفته است.

**روش کار:** ژن HN هر کدام یک از دو جدایه NDV به کمک پرایمرهای اختصاصی تکثیر، تعیین توالی و مورد تجزیه و تحلیل شجره‌شناسی قرار گرفت.  
**نتایج:** ارزیابی‌های شجره‌شناسی بر اساس توالی کامل ناحیه کد شونده ژن HN جدایه‌های NDV مورد بررسی را در تیپ ژنومی XIII و تحت تیپ XIIIa طبقه‌بندی کرد. این نتایج با نتایج حاصل از تحلیل توالی ناکامل ژن فیوژن (F) در این ویروس‌ها، که از بانک ژن اخذ شد؛ همخوانی داشت.  
**نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج این مطالعه در راستای شناخت بیشتر همه‌گیرشناسی ملکولی جدایه های بومی NDV در ایران و تعیین تفاوت‌های موجود بین سویه‌های بومی و سویه‌های واکسینال متداول در سطح پروتئین‌های ایمنی‌زای اصلی مفید می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** ویروس بیماری نیوکاسل (NDV)، حاد، همگلوتینین-نورآمینیداز (HN)، شجره‌شناسی، طیور

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: سید مصطفی پیغمبری، گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.  
پست الکترونیکی: [mpeigham@ut.ac.ir](mailto:mpeigham@ut.ac.ir)

### مقدمه

ژنوم ویروسی NDV دارای سنس منفی، تک قطعه‌ای، تک رشته‌ای و از جنس ریبونوکلیک اسید است و ۶ پروتئین ساختاری را کد می‌کند. در بین این پروتئین‌ها تنها پروتئین‌های فیوژن (F)، همگلوتینین-نورآمینیداز (HN) و ماتریکس (M) با غشای ویروسی در تعامل هستند و بروز ویژگی‌های اصلی پادگنی و بیماری‌زایی ویروس را بر عهده دارند (۱۵). در این بین گلیکوپروتئین HN در طول فرایند عفونت‌زایی و بیماری‌زایی ویروس عملکردهای متعددی را از قبیل همگلوتیناسیون (HA)، نورآمینیداز (NA) و تسهیل الحاق غشایی بر عهده دارد و به‌عنوان تعیین‌کننده پادگنی اصلی پارامیکسوویروس‌ها شناخته می‌شود (۱۸).

بیماری نیوکاسل (ND) یک بیماری بسیار کشنده و مسری است که طیف وسیعی از گونه‌های پرندگان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به‌وسیله ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) یا تیپ ۱ پارامیکسوویروس‌های پرندگان (APMV1) ایجاد می‌شود (۱،۲۳). این بیماری به‌دلیل برخورداری از شیوع جهانی و دخالت طیف وسیعی از پرندگان اهلی و وحشی در همه‌گیرشناسی آن، به‌عنوان یکی از زیان‌بارترین بیماری‌ها در راستای محدود سازی توسعه صنعت طیور تجاری محسوب می‌گردد (۲۳). ویروس بیماری نیوکاسل یک ویروس غشادار است که از نظر تاکسونومیک در جنس آوولاویروس، خانواده پارامیکسوویریده و راسته مونونگاویرال‌س طبقه‌بندی می‌شود (۲۰،۲۱).

جدایه NDV که در سال ۱۳۷۷ در قالب یک طرح پایش ملی از گله‌های طیور تجاری استان اصفهان جداسازی شده بودند از مسیر تعیین توالی ژن HN انجام پذیرفت. در گذشته تعیین هویت این جدایه‌ها از طریق تعیین توالی ناکامل ژن F و تعیین شاخص‌های بیماری‌زایی درون تن صورت گرفته بود (داده‌های غیر انتشار یافته)، و در مخزن موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی نگهداری می‌شدند. در مطالعه حاضر، توالی کامل ناحیه کد شونده ژن HN در این جدایه‌ها به‌منظور فراهم‌سازی داده‌هایی در راستای شناخت ماهیت و همه‌گیرشناسی ملکولی جدایه‌های بومی NDV در ایران، تعیین شد. تعیین هویت جدایه‌های بومی NDV به‌ویژه در مناطقی که در گذشته کمتر مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند، در راستای رفع کمبودهای موجود در این زمینه و شناخت ارتباطات همه‌گیرشناختی این جدایه‌ها با جدایه‌های متعلق به کشورهای همسایه یا دیگر کشورهایی که با ما دارای تعاملات تجاری هستند از اهمیت فراوانی برخوردار است.

### مواد و روش کار

**ویروس‌های مورد مطالعه:** جدایه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر به‌وسیله موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی فراهم گردیدند (حصارک، البرز، ایران). دو جدایه NDV مورد مطالعه در قالب یک طرح پایش ملی از مزارع پرورش تجاری طیور استان اصفهان در سال ۱۳۷۷ (۱۹۹۹ میلادی) جداسازی شده بودند. جداسازی این جدایه‌ها از گله‌های ماکیان تجاری گوستی پس از مشاهده علائمی از قبیل بی‌حالی، بی‌اشتهایی، دیسترس شدید تنفسی، سرفه، تورم و ادم شدید صورت و نواحی اطراف حدقه‌ای، لرزش و پیچش گردن، فلجی بال و پا و اسهال سبز رنگ صورت گرفته بود. نمونه‌گیری از بافت مغز پس از مشاهده جراحات کالبدگشایی برجسته بیماری نیوکاسل از جمله خونریزی در کانون‌های لنفاوی مجاری گوارش به‌منظور جداسازی ویروس انجام شده بود. گله‌های که ویروس از آنها جداسازی شده بود؛ واکسن B1 را در سن ۷-۱۰ روزگی به‌عنوان پرایمر و واکسن لاسوتا را دو هفته پس از آن به‌عنوان بوستر دریافت کرده بودند. جداسازی ویروس‌ها طبق استانداردهای تعیین شده به‌وسیله سازمان جهانی بهداشت دام (OIE) و از طریق تلقیح ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون بافتی به حفره آلتوتویک ۵ عدد تخم مرغ جنین‌دار عاری از اجرام بیماری‌زای خاص (SPF) (LOHMANN VALO SPF®) در سن ۱۰-۹ روزگی انجام گرفت (۲۸). به‌نحوی که، تخم مرغ‌های تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و به مدت ۷ روز پایش شدند. مایعات آلتوتویک مربوط به نمونه‌هایی که مرگ جنین را پس از ۷-۴ روز سبب شده بودند استخراج می‌شد و با آزمون هم‌آگلوتیناسیون (HA) برای

بر اساس تفاوت‌های ژنی و شجره‌شناسی، ویروس‌های عامل بیماری نیوکاسل در دو کلاس مختلف (I و II) قرار می‌گیرند. این طبقه‌بندی به‌شکل استاندارد با تحلیل توالی کامل ناحیه کد شونده ژن F صورت می‌پذیرد، و بر همین اساس سویه‌های متعلق به کلاس I در یک تیپ ژنی و سویه‌های موجود در کلاس II در ۱۸ تیپ ژنی و تعداد زیادی تحت ژنوتیپ مختلف طبقه‌بندی می‌شوند (۶،۳۶).

سویه‌های ویروس بیماری نیوکاسل طیف وسیعی از بیماری‌زایی را در پرندگان تحت تأثیر نشان می‌دهند؛ از این‌رو این ویروس‌ها در ۴ تیپ بیماری‌زای اصلی شامل غیربیماری‌زا (بی‌نشانه روده‌ای)، با بیماری‌زایی کم (لنتوزن)، با بیماری‌زایی متوسط (مزوزن) و بیماری‌زا (ولوژن) طبقه‌بندی می‌شوند. آزمون‌های بیماری‌زایی درون تن (in vivo) از قبیل متوسط زمان مرگ (MDT) و شاخص بیماری‌زایی داخل مغزی (ICPI) به‌شکل متداول و مرسوم به‌منظور تعیین تیپ بیماری‌زایی جدایه‌های NDV مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌علاوه، تعیین تیپ بیماری‌زایی جدایه‌های NDV از مسیر پیش‌بینی توالی محل شکاف گلیکوپروتئین F (FGCS) نیز به‌شکل ملکولی امکان‌پذیر است، به‌نحوی که حضور آمینو اسیدهای بازی متعدد در این ناحیه بیان‌گر بیماری‌زا بودن ویروس خواهد بود (۲۸). با این حال، برخی از سویه‌هایی که در FGCS توالی بیماری‌زا داشته‌اند در آزمون‌های بیماری‌زایی درون تن توان بیماری‌زایی اندکی نشان داده‌اند. و ظاهراً FGCS تنها عامل دخیل در بروز خصوصیات بیماری‌زایی ویروس نیست. بنابراین، دیگر نواحی ژنوم NDV به‌ویژه ژن HN نیز باید در بروز کامل توان بیماری‌زایی ویروس دخالت داشته باشند (۷). با وجود نقش برجسته گلیکوپروتئین HN در بیماری‌زایی و القای پاسخ‌های ایمنی میزبان به‌وسیله NDV، در نشریات داده‌های محدودی در رابطه با خصوصیات ملکولی این گلیکوپروتئین و ژن کد کننده آن وجود دارد و در کشور ما نیز اطلاعات اندکی در این زمینه انتشار یافته است (۹،۱۰).

از سال ۱۳۳۰ (۱۹۵۱ میلادی)، پس از اولین گزارش مستند بیماری نیوکاسل در کشور ما تاکنون، وقوع واگیری‌های بیماری در گونه‌های مختلف پرندگان از جمله طیور تجاری، پرندگان وحشی و پرندگان همراه تداوم داشته است (۲،۳۰). در حال حاضر نیز بیماری نیوکاسل به‌شکل بومی یا اندمیک در کشور ما حضور دارد و با وجود واکسیناسیون گسترده گله‌های طیور تجاری با انواع واکسن‌های فعال و غیرفعال، واگیری‌های بیماری با شدت‌های مختلف، به‌صورت متداول و به‌شکل مداوم در سراسر ایران گزارش می‌گردند؛ با این وجود، اطلاعات اندکی در ارتباط با همه‌گیرشناسی و خصوصیات ملکولی جدایه‌های بومی NDV در ایران وجود دارد. در این مطالعه، تعیین هویت ملکولی دو

ارزیابی فعالیت HA آزمایش می‌شد. در ادامه، نمونه‌های دارای فعالیت HA از طریق انجام آزمون ممانعت از هم‌اگلوتیناسیون (HI) با آنتی سرم اختصاصی به عنوان تیپ ۱ پارامیکوویروس‌ها تعیین هويت شدند.

**استخراج RNA، واکنش رونوشت برداری معکوس (RT) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR):** استخراج RNA از مایعات آلتوتویک مثبت در آزمون HI به کمک کیت تجاری High pure viral RNA isolation kit (Roche molecular biomedical, Mannheim, Germany) طبق پروتکل تعیین شده به‌وسیله تولید کننده انجام شد. سنتز cDNA از RNA استخراج شده نیز به کمک پرایمرهای هگزامر رندوم و با استفاده از کیت تجاری RevertAid® reverse transcriptase kit (Fermentas-Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada) صورت گرفت. برای تکثیر ناحیه کد شونده ژن HN به صورت کامل، ۳ جفت پرایمر دارای همپوشانی با استفاده از توالی‌های ثبت شده در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) طراحی شد (شماره دسترسی سویه مورد استفاده به‌عنوان الگو در طراحی پرایمر: KF727980). سنتز این پرایمرها نیز به‌وسیله شرکت سیناژن (تهران، ایران) انجام پذیرفت. توالی و دیگر خصوصیات این پرایمرها در جدول ۲ ذکر گردیده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر ژن HN در ترموسایکلر Peqstar 2X®, Peqlab تمامی دیگر مواد مورد استفاده به غیر از مواردی که ذکر شد از شرکت سیناژن (تهران، ایران) تهیه شدند.

**ارزیابی توالی‌ها و تحلیل شجره‌شناسی:** خالص‌سازی محصولات PCR به کمک کیت تجاری AccuPrep® DNA Gel

جدول ۱. مشخصات مربوط به جدایه‌های NR15 و NR16 ویروس بیماری نیوکاسل این مطالعه

نام جدایه	محل جداسازی	توالی مربوط به محل شکاف گلیکوپروتئین F	کد دسترسی ژن F	کد دسترسی ژن HN
NDV/Chicken/Iran/NR15/1999	اصفهان	112RRQRRF117	JN001189	KX034120
NDV/Chicken/Iran/NR16/1999	اصفهان	112RRQRRF117	EU049539	KX058520

جدول ۲. مشخصات و توالی پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن هم‌اگلوتینین-نورآمینیداز (HN)

نام پرایمر	توالی	جایگاه اتصال	TM (°C)	GC%	اندازه محصول PCR (bp)
HN1-F	GCACAGCAAAGACCTTACTATG	۶۱۴۰-۶۱۶۲	۵۸/۱	۴۳/۴	۸۹۹
HN1-R	TGCTAAGTATTGATGTGAATGTG	۷۰۱۶-۷۰۳۸	۵۵/۵	۳۴/۷	
HN2-F	ACGAATAATAGCGGGTGTGG	۶۷۶۹-۶۷۸۸	۵۹/۸	۵۰/۰	۹۰۰
HN2-R	GCCTCGTTGGTACAAGAAGTG	۷۶۴۸-۷۶۶۸	۵۹/۷	۵۲/۳	
HN3-F	TAATAACACATGCCCGATG	۷۴۳۷-۷۴۵۶	۵۹/۲	۴۵/۰	۸۷۷
HN3-R	GCGACTAAAGAAGGGACTCAG	۸۲۹۳-۸۲۱۳	۵۸/۲	۵۲/۳	

## نتایج

(GU585905) به ترتیب به میزان ۹۹ و ۹۸/۵ درصد نشان دادند. در بین جدایه‌های NDV جداسازی شده در داخل کشور نیز NR15 و NR16 بیشترین شباهت نوکلئوتیدی را به ترتیب با جدایه‌های NR35 (۹۹/۶ درصد) و NR14 (۱۰۰ درصد) نشان دادند. جدایه‌های NR35 (کد دسترسی: KX058524) و NR14 (کد دسترسی: KX034119) به ترتیب در سال‌های ۱۳۷۸ و ۱۳۷۷ در استان‌های فارس و اصفهان جداسازی شده بودند. جدایه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر در سطح توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن و گلیکوپروتئین HN به ترتیب به میزان ۹۹/۲ درصد و ۹۸/۹ درصد با یکدیگر شباهت داشتند. پس از ترسیم درخت‌های شجره‌شناسی بر اساس توالی کامل ناحیه کد شونده ژن HN (۱۷۱۶ باز) و توالی ناکامل ژن F (۲۷۰ باز، ناحیه با تغییرپذیری بالا)، نمایندگان ویروسی تمامی ژنوتیپ‌ها و تحت ژنوتیپ‌های شناخته شده NDV بر اساس الگوهای انشعاب و توپولوژی درخت، از یکدیگر به وضوح قابل تفریق بودند (تصاویر ۱، ۲). جدایه‌های ویروسی مورد مطالعه در هر دو درخت شجره‌شناسی رسم شده در مطالعه حاضر همراه با جدایه‌های به دست آمده از کشورهای سوئد، روسیه، برون‌دی، هند و پاکستان در خوشه‌ای واحد که دربرگیرنده ویروس‌های شناخته شده ژنوتیپ XIII بود، قرار گرفتند. درصد تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جدایه‌های تعیین هویت شده در مطالعه حاضر با سویه‌های متداول واکسینال در ایران (B1, Lasota, PHY-LMV42) در طول توالی ژن (۱۷۱۶ باز، ناحیه کد شونده) و گلیکوپروتئین HN (۵۷۱ اسید آمینه) در جدول ۳ قابل مشاهده می‌باشد. تحلیل توالی‌ها نشان داد که جدایه‌های ایرانی NDV بیشترین تفاوت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی در سطح ژن و گلیکوپروتئین HN را با سویه واکسینال لاسوتا دارند. فاصله تکاملی تخمینی و درصد شباهت نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد مطالعه با سویه‌های شناخته شده متعلق به تیپ‌های ژنومی مختلف NDV بر اساس تحلیل توالی ژن HN، در جدول ۴ و ۵ بیان گردیده‌اند.

حدود ۱۹۸۰ باز از توالی ژن HN در هر یک از دو جدایه مورد بررسی در مطالعه حاضر تعیین و مورد تحلیل قرار گرفت. سیگنال آغاز رونویسی یا توالی آغازین ژن در هر دو جدایه یکسان بود و به صورت ACGGGTAGAA تعیین شد. کدون‌های آغاز (ATG)، نوکلئوتیدهای ۹۲-۹۴ و پایان (TAA، ۱۸۰۵-۱۸۰۷) ترجمه در ژن HN هر دو جدایه در جایگاه‌های یکسانی قرار داشتند. محتوی گوانین و سیتوزین ژن HN در جدایه‌های NR15 و NR16 به ترتیب ۴۶ درصد و ۴۵/۹ درصد تعیین شد. طول توالی آمینواسیدی گلیکوپروتئین HN در جدایه‌های مورد مطالعه بر اساس محل قرارگیری کدون‌های آغاز و پایان ترجمه در ژن HN، ۵۷۱ اسید آمینه پیش‌بینی شد؛ که با طول این گلیکوپروتئین در سویه‌های بیماری‌زای NDV همخوانی داشت. توالی آمینواسیدی FGCS نیز پس از تحلیل توالی‌های ژن F اخذ شده از بانک ژن در هر دو جدایه مورد بررسی به شکل 112RRQRRF117 پیش‌بینی شد؛ که همانند FGCS در سویه‌های بیماری‌زای NDV بود؛ و با دیگر شاخص ملکولی بیماری‌زا بودن این جدایه‌ها یعنی طول توالی آمینواسیدی گلیکوپروتئین HN همخوانی داشت.

توالی کامل ناحیه کد شونده ژن HN (۱۷۱۶ باز) با توالی نواحی متناظر از نمایندگان ویروسی هر یک از ژنوتیپ‌های شناخته شده NDV از جمله سویه‌های متداول واکسینال در ایران (B1, Lasota) و (PHY-LMV42)، به منظور انجام ارزیابی‌های شجره‌شناسی مورد مقایسه و تحلیل قرار گرفت. هر دو جدایه مورد بررسی در مطالعه حاضر پس از بررسی‌های شجره‌شناسی ارتباط بسیار نزدیکی با جدایه‌های شناخته شده تیپ ژنی XIII و تحت تیپ XIIIa نشان دادند. پس از تحلیل توالی ژن HN در ناحیه کد شونده، NR15 و NR16 (جدایه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر) در بین توالی‌های موجود در بانک ژن بیشترین شباهت را در سطح نوکلئوتیدی با جدایه Sweden 97

جدول ۳. تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی دو جدایه NR15 و NR16 با سویه‌های متداول واکسینال NDV

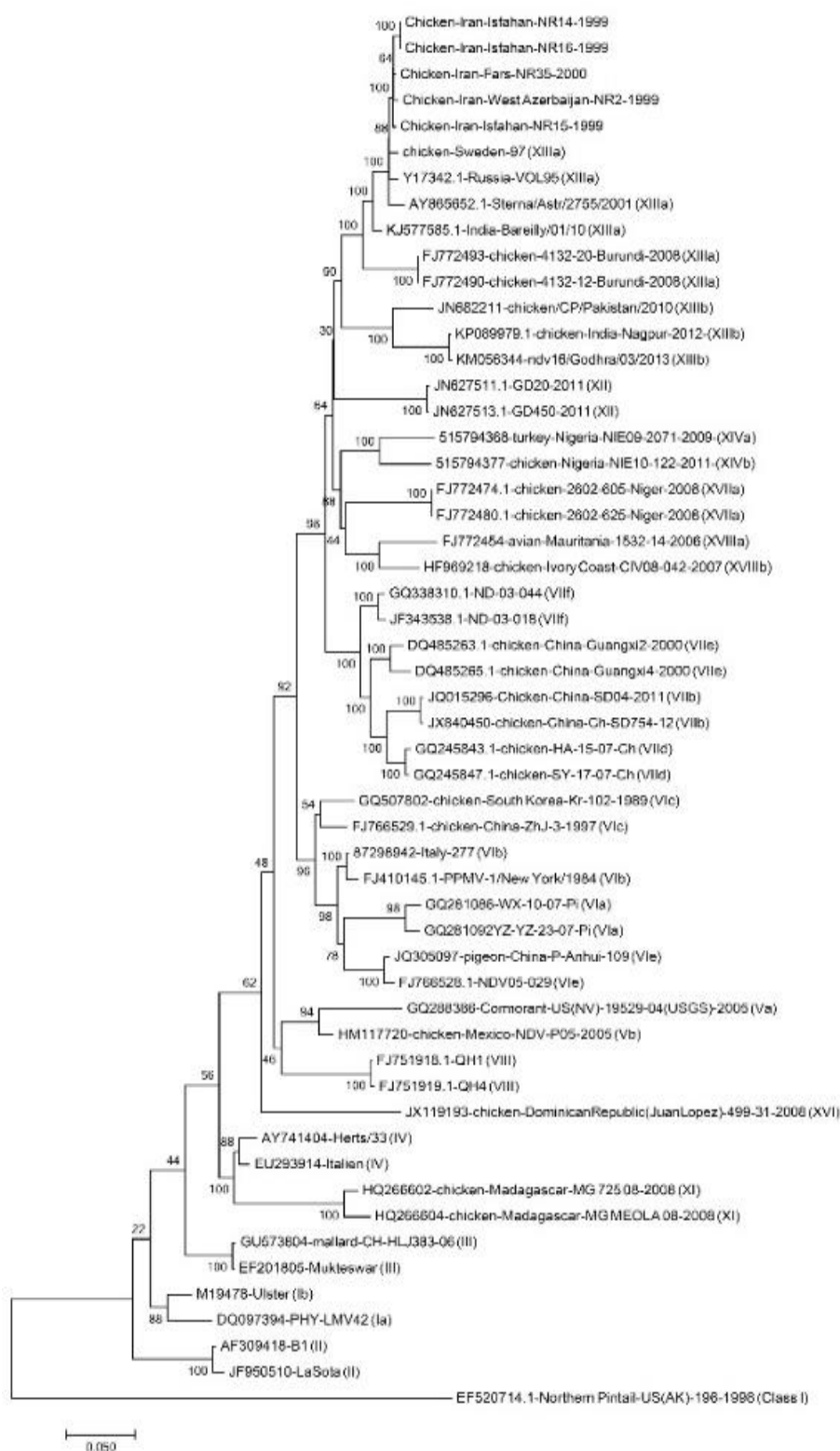
NR16		NR15		سویه‌های متداول واکسینال NDV
شباهت آمینواسیدی (%)	شباهت نوکلئوتیدی (%)	شباهت آمینواسیدی (%)	شباهت نوکلئوتیدی (%)	
۸۵/۳	۷۹/۱	۸۶/۱	۷۹/۲	Lasota
۸۵/۵	۷۹/۵	۸۵/۹	۷۹/۵	B1
۸۷/۳	۸۱/۶	۸۸/۱	۸۲/۱	PHY-LMV42

جدول ۴. فاصله تکاملی دو جدایه NR15 و NR16 از نمایندگان ویروسی تیپ‌های ژنومی مختلف ویروس بیماری نیوکاسل

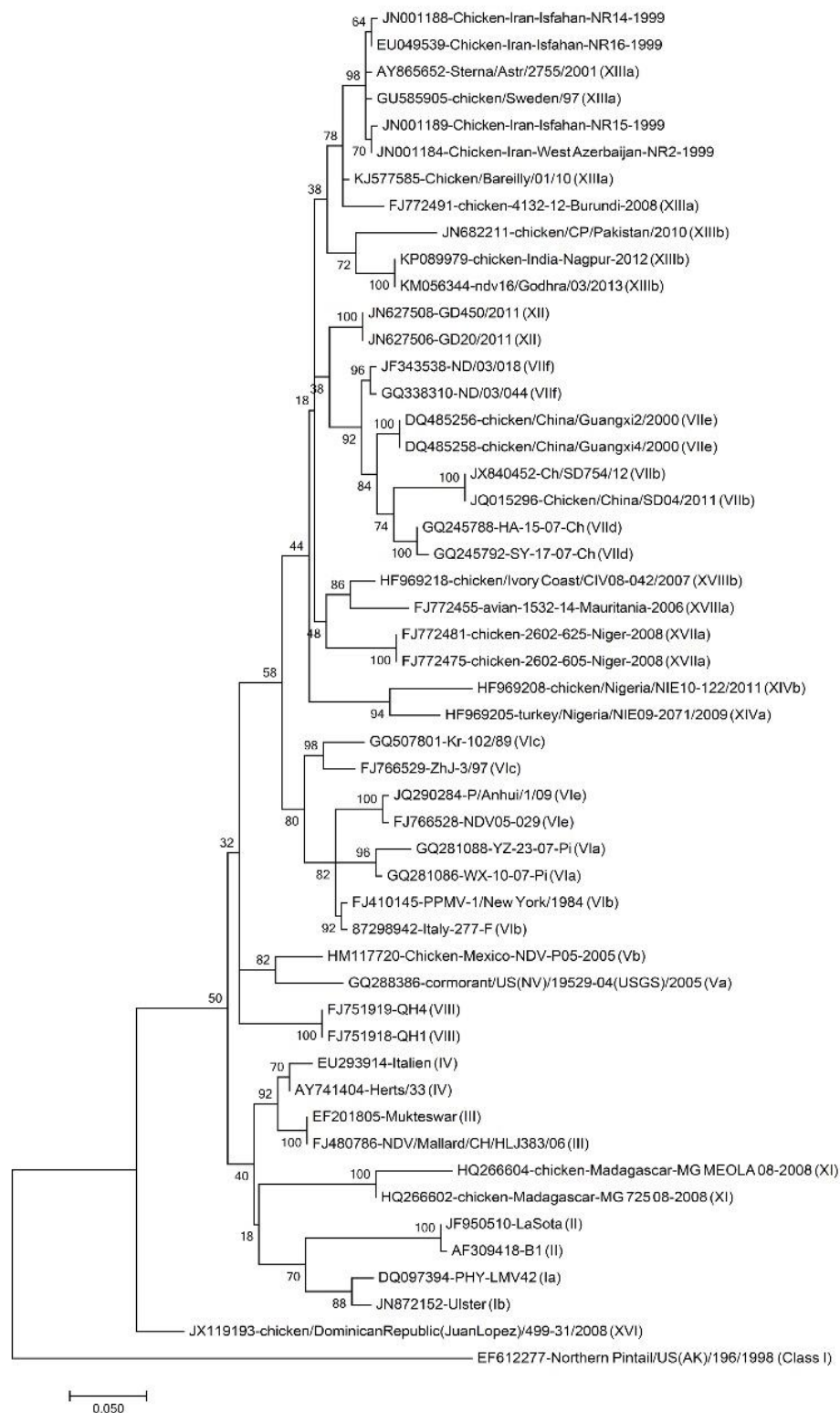
تیپ ژنی	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	NR15	NR16
I																				
II	۰/۰۹۶																			
III	۰/۰۸۲	۰/۱۳۳																		
IV	۰/۰۹۱	۰/۱۳۸	۰/۰۸۳																	
V	۰/۱۵۹	۰/۱۹۵	۰/۱۵۴	۰/۱۳۴																
VI	۰/۱۳۴	۰/۱۸۵	۰/۱۲۶	۰/۱۰۳	۰/۱۱۵															
VII	۰/۱۶۱	۰/۲۰۹	۰/۱۶۲	۰/۱۳۶	۰/۱۳۹	۰/۰۸۶														
VIII	۰/۱۴۵	۰/۱۹۰	۰/۱۴۶	۰/۱۲۲	۰/۱۲۶	۰/۱۱۱	۰/۱۴۲													
IX	۰/۱۶۵	۰/۲۱۱	۰/۱۶۷	۰/۱۴۴	۰/۱۴۲	۰/۰۹۰	۰/۰۱۵	۰/۱۴۷												
X	۰/۰۷۳	۰/۰۰۹	۰/۱۱۱	۰/۱۱۷	۰/۱۸۲	۰/۱۶۰	۰/۱۷۸	۰/۱۶۰	۰/۱۸۳											
XI	۰/۱۵۱	۰/۲۰۰	۰/۱۴۷	۰/۱۰۶	۰/۱۸۸	۰/۱۶۶	۰/۱۹۴	۰/۱۸۷	۰/۲۰۱	۰/۱۸۷										
XII	۰/۱۷۵	۰/۲۱۶	۰/۱۸۰	۰/۱۵۶	۰/۱۵۱	۰/۱۱۵	۰/۱۱۱	۰/۱۵۳	۰/۱۲۰	۰/۱۹۶	۰/۲۱۳									
XIII	۰/۱۶۴	۰/۲۰۷	۰/۱۶۱	۰/۱۳۴	۰/۱۳۶	۰/۰۹۰	۰/۰۸۶	۰/۱۳۸	۰/۰۹۳	۰/۱۸۷	۰/۱۸۳	۰/۱۰۲								
XIV	۰/۱۶۸	۰/۲۰۸	۰/۱۶۴	۰/۱۳۹	۰/۱۴۷	۰/۱۰۰	۰/۱۰۱	۰/۱۴۷	۰/۱۰۹	۰/۱۸۴	۰/۲۰۱	۰/۱۱۴	۰/۰۸۸							
XVI	۰/۱۷۷	۰/۲۲۰	۰/۱۷۸	۰/۱۵۳	۰/۱۶۲	۰/۱۵۰	۰/۱۶۶	۰/۱۵۸	۰/۱۷۵	۰/۲۰۰	۰/۲۰۱	۰/۱۷۴	۰/۱۷۵							
XVII	۰/۱۸۰	۰/۲۲۳	۰/۱۸۴	۰/۱۵۰	۰/۱۶۳	۰/۱۱۹	۰/۱۱۸	۰/۱۵۷	۰/۱۲۵	۰/۲۰۴	۰/۲۱۲	۰/۱۳۵	۰/۱۰۷	۰/۱۸۷						
XVIII	۰/۱۷۹	۰/۲۲۹	۰/۱۸۵	۰/۱۶۰	۰/۱۶۱	۰/۱۲۱	۰/۱۱۵	۰/۱۵۹	۰/۱۱۸	۰/۲۰۷	۰/۲۱۳	۰/۱۳۱	۰/۱۰۸	۰/۱۱۹	۰/۱۸۷					
NR15	۰/۱۶۵	۰/۲۱۰	۰/۱۶۴	۰/۱۳۴	۰/۱۳۷	۰/۰۹۲	۰/۰۸۸	۰/۱۳۸	۰/۰۹۵	۰/۱۸۸	۰/۱۸۴	۰/۱۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۹۳	۰/۱۷۷	۰/۱۰۸	۰/۱۱۳			
NR16	۰/۱۷۰	۰/۲۱۱	۰/۱۶۹	۰/۱۳۹	۰/۱۴۱	۰/۰۹۸	۰/۰۹۴	۰/۱۴۰	۰/۱۰۰	۰/۱۹۰	۰/۱۹۰	۰/۱۰۹	۰/۰۱۱	۰/۰۹۷	۰/۱۸۰	۰/۱۱۲	۰/۱۱۸	۰/۰۰۸		

جدول ۵. قرابت نوکلئوتیدی جدایه‌های NR15 و NR16 با نمایندگان ویروسی هر یک از ژنوتیپ‌های شناخته شده NDV بر اساس توالی ژن HN

تیپ‌های ژنی NDV		قرابت نوکلئوتیدی (%)
NR15	NR16	
I	۸۳/۵	۸۳
II	۷۹	۷۹
III	۸۳/۶	۸۳
IV	۸۶/۵	۸۶
V	۸۶/۳	۸۶
VI	۹۰/۸	۹۰/۲
VII	۹۱/۲	۹۰/۶
VIII	۸۶/۲	۸۶
IX	۹۰/۵	۹۰
X	۸۱/۲	۹۰
XI	۸۱/۶	۹۰
XII	۸۹/۴	۸۹/۱
XIII	۹۹/۳	۹۸/۹
XIV	۹۰/۷	۹۰/۳
XVI	۸۲/۳	۸۲
XVII	۸۹/۳	۸۸/۸
XVIII	۸۸/۷	۸۸/۲



تصویر ۱. درخت شجره‌شناسی بر اساس تحلیل توالی کامل (۱۷۱۶ باز) ناحیه کد شونده ژن HN ویروس‌های بیماری نیوکاسل با شماره دسترس‌پذیر جدایه‌ها. جدایه‌های NR15 و NR16 با دایره‌های مشکی رنگ مشخص شده‌اند



تصویر ۲. درخت شجره‌شناسی بر اساس تحلیل توالی ناکامل (۲۷۰ باز) ناحیه کد شونده ژن فیوژن (F) ویروس‌های بیماری نیوکاسل با شماره دسترسی جدایه‌ها. جدایه‌های NR15 و NR16 با دواپر مشکی رنگ مشخص شده‌اند



## بحث

بیماری نیوکاسل به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین تهدیدات در راستای محدودسازی توسعه صنعت پرورش طیور تجاری در سراسر دنیا شناخته می‌شود. با وجود کاربرد گسترده واکسن‌های فعال و غیرفعال علیه این بیماری هم‌اکنون با حضور بومی یا اندمیک ND در گله‌های طیور تجاری ایران روبه‌رو هستیم؛ و واگیری‌های شدید بیماری به‌صورت مداوم در سراسر کشور گزارش می‌گردند (۸۰۱۴،۳۴). حضور واریانت‌های پادگنی و ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) شاید اثرات برجسته‌ای بر وقوع واگیری‌های بیماری نیوکاسل حتی در گله‌های واکسینه داشته باشد. از این‌رو، تعیین هویت جدایه‌های NDV عامل بروز واگیری‌های شدید بیماری بسیار واجد اهمیت است و اطلاعات حاصل از این مسیر در راستای انتخاب سویه‌های واکسینال مناسب مورد نیاز می‌باشد زیرا ارتباط نزدیک‌تر سویه‌های واکسینال با ویروس‌های فیلدی عامل بروز واگیری‌ها به فراهم‌سازی حمایت قابل اعتمادتر در پرندگان واکسینه منجر خواهد شد (۳۱).

این اعتقاد وجود دارد که سویه‌های بیماری‌زای NDV در نواحی جغرافیایی دارای بیماری به‌شکل اندمیک، به‌صورت مداوم تحت اثر عوامل ایجاد تکامل و تغییر شکل هستند؛ بنابراین، همانگونه که در دیگر نقاط جهان مشاهده گردیده است کشورهایی مثل کشور ما ایران شاید محل مناسبی برای نوپدیدی ویروس‌های جدید باشند (۳۵). از طرفی، RNA پلی‌ماز ویروس بیماری نیوکاسل عملکردی بسیار پرخطا دارد و در طول فرایند تکثیر RNA بروز موتاسیون‌های فراوان در نتیجه عملکرد این آنزیم دور از ذهن نیست و این موتاسیون‌ها در بسیاری از موارد به شکل‌گیری واریانت‌های پادگنی جدید منجر خواهد شد. به‌علاوه، فشار انتخاب ایمنی نیز یکی از دیگر عوامل تاثیرگذار بر شکل‌گیری سویه‌های واریانت جدید است. ژن HN بیش از دیگر ژن‌های NDV تحت تاثیر فشار انتخاب ایمنی در نتیجه تولید پادتن‌های ضد ویروس قرار می‌گیرد و در مقایسه با دیگر ژن‌های NDV تحت فشار ایمنی یکسان احتمال بروز موتاسیون‌های نوکلئوتیدی در HN محتمل‌تر است (۱۲). از سویی دیگر، افزایش فاصله فیلوژنتیک و پادگنی موجود بین سویه‌های واکسینال متداول و سویه‌های فیلدی در حال چرخش شاید به شکل‌گیری سویه‌های بیماری‌زای جدید NDV منجر گردد؛ و بنابراین، تداوم بروز واگیری‌های بیماری نیوکاسل در ایران شاید ناشی از این موضوع باشد (۳۹).

در مطالعه حاضر، ژن HN در دو جدایه ویروس بیماری نیوکاسل که در گذشته از مزارع پرورش طیور تجاری استان اصفهان جداسازی شده بودند، به‌شکل کامل تعیین توالی شد. هدف این

مطالعه تعیین سطح ارتباط ژنتیکی موجود بین سویه‌های واکسینال متداول (Lasota، B1 و PHY-LMV42) با جدایه‌های فیلدی و عامل واگیری‌های بیماری نیوکاسل در ایران بود. این دو جدایه در سطح توالی آمینواسیدی گلیکوپروتئین HN با یکدیگر ۹۸/۹ درصد برابری داشتند؛ درحالی‌که، این طیف برابری بین سویه‌های فیلدی کشور ما ایران (جدایه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر) و سویه‌های واکسینال متداول از ۸۸/۱ درصد تا ۸۵/۳ درصد متغیر بود. این اعداد بیان‌گر این مفهوم هستند که سویه‌های ویروس‌های در حال گردش در استان اصفهان به‌عنوان نماینده ویروس‌های در حال گردش در ایران به‌شکل معنی‌دار از سویه‌های واکسینال مورد مصرف برای واکسیناسیون گله‌های تجاری متفاوت هستند؛ و بنابراین، نقش تفاوت‌های پادگنی در شکل‌گیری حمایت ضعیف ناشی از واکسن‌ها را می‌توان به‌عنوان فرض در نظر داشت. به عبارتی این تغییرات شاید مسئول بروز اختلال در عملکرد ایمنی‌زایی واکسن‌ها در برابر ویروس‌های در گردش فیلد در سال‌های اخیر بوده باشند؛ و از این‌رو، شاید بتوان وقوع مکرر واگیری‌های بیماری نیوکاسل در نقاط مختلف کشور را با این موضوع در ارتباط دانست. نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های حاصل از یک مطالعه اخیر که جابه‌جایی‌های آمینواسیدی را به‌دنبال تعیین توالی ناکامل ناحیه کد شونده ژن HN در جدایه‌های NDV جداسازی شده از نواحی مختلف ایران در مقایسه با سویه‌های لنتوژنیک شناخته شده نشان داده بود؛ تا حدود زیادی برابری داشت. بیشتر جابه‌جایی‌های آمینواسیدی مشاهده شده در توالی ژن HN بین سویه‌های بیماری‌زا و سویه‌های لنتوژن (واکسینال) در مطالعه حاضر با مشاهدات مطالعه مذکور یکسان بودند (داده‌های غیر انتشار یافته)؛ با این حال، تفاوت‌های اندکی در این رابطه بین دو مطالعه وجود داشت. به‌عبارتی، در مقایسه با جدایه‌های بیماری‌زایی که در مطالعه مذکور مورد بررسی قرار گرفته بودند، در هیچ یک از جدایه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر جابه‌جایی آمینواسیدی در جایگاه ۵۵۰ مشاهده نشد (۹). جایگاه آمینواسیدی ۵۵۰ در مجاورت جایگاه‌های پادگنی، کاتالایتیک و گلیکوزیلاسیون گلیکوپروتئین HN واقع شده است و نقش بالقوه این جایگاه در شکل‌گیری ساختار پادگنی و پتانسیل ایمنی‌زایی جدایه‌های NDV باید مورد مطالعه بیشتری قرار گیرد. محققین در گذشته نشان داده‌اند که تغییرات بسیار کوچک در توالی نوکلئوتیدی سویه‌های NDV شاید اثرات برجسته‌ای در رابطه با تغییر خصوصیات بیماری‌زایی ویروس در پی داشته باشد (۲۴). در مجموع، داده‌های حاصل از این مطالعه بر نیاز به ارزیابی سویه‌های واکسینال

ژنوتیپ XIII، که در گذشته در کشور ما ایران به عنوان سویه‌های ژنوتیپ VII در نظر گرفته می‌شدند (۸،۳۴) دربرگیرنده ویروس‌های بیماریزای بیماری نیوکاسل هستند که بین سال‌های ۱۹۹۷ و ۲۰۱۴ در پاکستان، روسیه، برون‌دی، هند و سوئد جداسازی و تعیین هویت شده‌اند (۳،۱۶،۱۹،۲۵،۲۷،۳۸). جداسازی ویروسی متعلق به تحت ژنوتیپ XIIIa از یک قطعه پرستوک دریایی وحشی (Wild Little Tern, *Sterna albifrons*) در روسیه در سال ۲۰۰۱ میلادی بیان‌گر احتمال سرریز ویروس‌های بیماری نیوکاسل از طیور به جمعیت‌های پرندگان وحشی و نقش بالقوه این پرندگان در انتشار ویروس بود (۳۸). اختلاف ژنی اندک موجود بین جدایه‌های به دست آمده از کشور ایران با جدایه‌های جداسازی شده در کشورهای روسیه، هند و سوئد به وضوح بیان‌گر وقوع انتشار داخل قاره‌ای و بین قاره‌ای ویروس‌های متعلق به این ژنوتیپ است؛ و همچنین، احتمال انتشار گسترده دیگر ژنوتیپ‌ها را نیز بین کشورهای نام برده گوش‌زد می‌کند. تداخلات انسانی در ارتباط با پرورش طیور تجاری و تجارت پرندگان همراه (۲۶)، در بسیاری از موارد به عنوان محتمل‌ترین عامل انتشار ویروس‌های بیماریزای NDV در سراسر دنیا در نظر گرفته می‌شود؛ با این حال، دخالت پرندگان مهاجر در انتشار NDV به گله‌های طیور را نیز نمی‌توان نادیده انگاشت (۲۹). جداسازی تعداد بیشتری از جدایه‌های NDV در ایران و کشورهای همسایه در منطقه و به دنبال آن تعیین هویت ملکولی و بیولوژیک این جدایه‌ها در راستای تعیین ماهیت ویروس‌های بومی در حال گردش در کشور ما و منطقه بسیار مفید خواهد بود و دانستن‌های ما را در ارتباط با تکامل و شکل‌گیری سویه‌های بیماریزای NDV در منطقه ارتقا خواهد داد.

متأسفانه، به دلیل عدم دسترسی به توالی کامل ژن HN، در این مطالعه مقایسه ویروس‌های مورد بررسی با بسیاری از دیگر جدایه‌های NDV به دست آمده از ایران و کشورهای همسایه در سال‌های اخیر امکان‌پذیر نبود؛ با این وجود، از آنجایی که طبق گزارش‌های معتبر تجزیه و تحلیل جداگانه ژن‌های F و HN به منظور ارزیابی فیلوژنتیک جدایه‌های NDV به طبقه‌بندی مشابه سویه‌های ویروسی انجامیده است (۲۷،۳۶)، نتایج تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک ارائه شده در این مطالعه را می‌توان قابل اعتماد در نظر گرفت. در مطالعه حاضر نیز همانگونه که در تصاویر ۱ و ۲ قابل مشاهده است، تحلیل شجره‌شناسی توالی کامل ناحیه کد شونده ژن HN (۱۷۱۶ باز) و تحلیل توالی ناکامل ژن F در ناحیه با تغییرپذیری بالا (۲۷۰ باز) نتایج یکسانی را در راستای تعیین تیپ‌های ژنی جدایه‌های NDV حاصل کردند. تا به امروز، چرخش ویروس‌های متعلق به تحت ژنوتیپ‌های XIIIa، VIIj، و VIIId در طیور تجاری

متداول به منظور تعیین توان ایمنی‌زایی این واکسن‌ها در برابر ویروس‌های بومی در حال گردش در کشور ما تأکید داشت.

طول ناحیه کدشونده ژن HN در سویه‌های مختلف NDV شاید متغیر باشد. به نحوی که در نتیجه حضور کودون پایان دهنده ترجمه، در نواحی مختلف ژن، امکان کُد شدن پروتئین‌هایی با طول مختلف (از ۵۷۱ تا ۶۱۶ اسید آمینه) به وسیله این ژن وجود دارد (۳۳). از سویی دیگر، ارتباط بین طول پروتئین HN و توان بیماری‌زایی ویروس در گذشته نشان داده شده است. ژن HN در سویه‌های استاندارد غیربیماری‌زا یا دارای بیماری‌زایی آندک، ناحیه کدشونده وسیع‌تری دارد به نحوی که قادر به کُد کردن پروتئین‌هایی طول‌تر حتی با طول ۶۱۶ اسید آمینه می‌باشد (۳۳). در مطالعه حاضر، بررسی طول انتهای کربوکسیل و متغیر گلیکوپروتئین HN در ویروس‌های مورد مطالعه، هیچگونه اتساع آمینواسیدی در این ناحیه را نشان نداد و طول گلیکوپروتئین HN در هر دو جدایه مورد بررسی برابر با ۵۷۱ اسید آمینه پیش‌بینی شد که با توجه به داده‌های ارائه شده در این رابطه، بیان‌گر بیماری‌زا بودن تمامی جدایه‌های مورد مطالعه است. همچنین، الگوی مولتی‌بازیک محل شکاف گلیکوپروتئین F در این جدایه‌ها نیز دیگر یافته ملکولی حاکی از بیماری‌زایی این دو جدایه بود. قبلاً نشان داده شده است که سویه‌هایی از NDV که واجد کوتاه‌ترین طول گلیکوپروتئین HN (۵۷۱ اسید آمینه) هستند؛ انحصاراً، تشکیل دهنده سویه‌های ویسروتروپیک و ولوژنیک NDV می‌باشند (۴).

سویه‌های ویروس بیماری نیوکاسل بر اساس تغییرات ژنتیکی و بررسی‌های فیلوژنتیک مبتنی بر طول کامل ناحیه کدشونده ژن F، در بسیاری از جدایه‌های ویروسی به دست آمده از نواحی مختلف دنیا، در دو کلاس مختلف (I و II) طبقه‌بندی می‌شوند. کلاس I ویروس‌های بیماری نیوکاسل تنها دربرگیرنده یک ژنوتیپ و حاوی ویروس‌های غیربیماری‌زا با طول ژنوم ۱۵۰۱۹۸ نوکلئوتید است. در حالی که، سویه‌های کلاس II متشکل از ۱۸ ژنوتیپ مختلف هستند و این تیپ‌های ژنومی دربرگیرنده هر دو پاتوتیپ غیربیماری‌زا و بیماری‌زا با طول ژنوم به ترتیب ۱۵۰۱۸۶ و ۱۵۰۱۹۲ نوکلئوتید می‌باشند (۴،۵،۶،۳۶). در نتیجه سرعت فراوان تغییرات تکاملی سویه‌های NDV، در طی چند دهه گذشته ژنوتیپ‌های جدید و متعددی از این ویروس گزارش شده‌اند و بدون شک این روند در سالیان آینده نیز ادامه خواهد داشت (۲۲). بررسی‌های فیلوژنتیک، براساس طول کامل ناحیه کدشونده ژن HN در دو جدایه مورد بررسی در مطالعه حاضر، نشان داد که این جدایه‌ها ارتباط بسیار نزدیکی با سویه‌های شناخته شده متعلق به ژنوتیپ XIII و تحت ژنوتیپ XIIIa دارند. سویه‌های

معنی‌دار جدایه‌های مورد مطالعه و بومی NDV در ایران با سویه‌های متداول واکسینال بود. ارزیابی‌های شجره‌شناسی انجام شده در مطالعه حاضر بر اساس توالی ژن‌های F (۲۷۰ باز) و HN (۱۷۱۶ باز) به شکل جداگانه، به نتایج یکسانی منجر گردید و ظاهراً بخش‌های مختلف ژنوم NDV از این نظر با یکدیگر در ارتباط هستند. قرابت شجره‌شناسی جدایه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر با جدایه‌های NDV جداسازی شده از پرندگان وحشی در کشور روسیه و جدایه‌های به دست آمده از شمال اروپا (سوند) احتمالاً بیانگر نقش برجسته پرندگان وحشی مهاجر در انتشار گسترده سویه‌های NDV و اهمیت فراوان اعمال تدابیر امنیتی زیستی مستحکم در این رابطه، می‌باشد.

### سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از اعتبارات تحقیقاتی شماره ۷۵۰۸۰۰۷/۶/۱۸ شورای پژوهشی دانشگاه تهران و شماره ۷۷/۰۴۴۳۰۱۱۷۰۰ موسسه واکسن و تحقیقات سرم سازی رازی کرج انجام شد.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

تحت ژنوتیپ VIb در کبوترهای اهلی (۳۰) و اخیراً تحت ژنوتیپی جدید از تیپ ژنی VII در ماکیان خانگی (۳۲) در ایران به اثبات رسیده است؛ با این وجود، اطلاعات ما در ارتباط با اپیدمیولوژی ملکولی و ویژگی‌های بیولوژیک ویروس‌های بیماریزای NDV در کشور بسیار محدود است. به همین دلیل، به منظور تعیین مخازن احتمالی ویروس و انواع ژنوتیپ‌های NDV دخیل در بروز واگیری‌های بیماری نیوکاسل در ایران، تعیین هویت وسیع ملکولی و انجام مطالعات فیلوژنتیک جدایه‌های NDV به دست آمده از جمعیت‌های طیور تجاری، پرندگان همراه و پرندگان آزاد پرواز در کشور ضروری به نظر می‌رسد. البته باید توجه داشت که شناسایی حضور تحت ژنوتیپ‌های XIIIa، VIIIId و VIb از طریق تحلیل توالی ناکامل ژن F و توالی ژن HN در جدایه‌های NDV به دست آمده از ایران صورت پذیرفته است؛ و بنابراین، بر اساس استانداردهای تعیین شده، این داده‌ها را قبل از تعیین توالی کامل ناحیه کد شونده ژن F در این جدایه‌ها نمی‌توان به‌طور کامل قطعی و مورد اعتماد در نظر گرفت (۶).

**نتیجه گیری نهایی:** به طور کلی، این مطالعه به دنبال تعیین توالی ژن و گلیکوپروتئین HN بیان‌گر تفاوت ژنی و آمینو اسیدی

## References

- Alexander, D.J., Aldous, E.W., Fuller, C.M. (2012). The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathol.* 41, 329-335.
- Bozorgmehri-Fard, M.H., Keyvanfar, H. (1979). Isolation of Newcastle disease virus from teals (*Anas crecca*) in Iran. *J Wildl Dis.* 15, 335-337.
- Cattoli, G., Fusaro, A., Monne, I., Molia, S., Le Menach, A., Maregeya, B., Nchare, B., Bangana, I., Garba Maina, A., N'Goran Koffi, J.N., Thiam, H., Bezeid, O.E.M.A., Salviato, A., Nisi, R., Terregino, C., Capua, I. (2010). Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa—Implications for diagnosis and control. *Vet Microbiol.* 142, 168-176.
- Czeglédi, A., Ujvári, D., Somogyi, E., Wehmann, E., Werner, O., Lomniczi, B. (2006). Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res.* 120, 36-48.
- De Almeida, R.S., Hammoumi, S., Gil, P., Briand, F., Molia, S., Gaidet, N., Cappelle, J., Chevalier, V., Balanc, G., Traore, A., Grillet, C., Maminiaina, O.F., Guendouz, S., Dakouo, M., Samake, K., El Mamy Bezeid, O., Diarra, A., Chaka, H., Goutard, F., Thompson, P., Martinez, D., Jestin, V., Albina, E. (2013). New avian paramyxoviruses type I strains identified in Africa provide new outcomes for phylogeny reconstruction and genotype classification. *PLOS ONE*, 8, e76413.
- Diel, D.G., da Silva, L.H.A., Liu, H., Wang, Z., Miller, P.J., Afonso, C.L. (2012). Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect Genet Evol.* 12, 1770-1779.
- Dortmans, J.C.F.M., Koch, G., Rottier, P.J.M., Peeters B.P.H. (2009). Virulence of pigeon paramyxovirus type 1 does not always correlate with the cleavability of its fusion protein. *J Gener Virol.* 90, 2746-2750.
- Ebrahimi, M.M., Shahsavandi, S., Moazenijula, G.R., Shamsara, M. (2012). Phylogeny and evolution of Newcastle disease virus genotypes isolated in Asia during 2008–2011. *Virus Gen.* 45, 63-68.
- Esmaelizad, M., Ashtiani, M.P. (2015). Comparative analysis of sialidase protein in velogenic and lentogenic strains of Newcastle Disease Virus. *Acta Virol.* 59, 194-195.
- Esmaelizad, M., Ashtiani, M.P., Jelokhani-Niaraki, S., Hashemnejad, K. (2012). Identification of 23 specific nucleotide patterns in the HN gene of Newcastle disease viruses isolated from Iran. *Turk J Biol.* 36, 135-142.
- Esmaelizad, M., Mayahi, V., Pashaei, M., Goudarzi, H. (2016). Identification of novel Newcastle disease virus sub-genotype VII-(j) based on the fusion protein. *Arch. Virol.* Published Online: 21 December 2016.

12. Gong, Y.Y., Cui, Z.Z. (2011). Epitope variation in the Newcastle disease virus HN gene under antibody immune selective pressure in cell culture. *Sci. China Life Sci.* 54, 474-479.
13. Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 41, 95-98.
14. Hosseini, H., Ghalyanchi Langeroudi, A., Torabi, R. (2014). Molecular characterization and phylogenetic study of Newcastle disease viruses isolated in Iran, 2010-2012. *Avian Dis.* 58, 373-376.
15. Kai, Y., Hu, Z., Xu, H., Hu, S., Zhu, J., Hu, J., Wang, X., Liu, X., Liu, X. (2015). The M, F and HN genes of genotype VIII Newcastle disease virus are associated with the severe pathological changes in the spleen of chickens. *Virology* 12, 133.
16. Kumar, U., Kumar, S. (2015). Molecular characterization of an apoptotic strain of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in India. *Cancer Gene Ther.* 22, 402-409.
17. Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 33, 1870-1874.
18. Lamb, R.A., Kolakofsky, D. (1996). *Paramyxoviridae: the viruses and their replication*. In: Fields Virology. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.). (3rd Edn.). Philadelphia, PA: Lippincott-Raven. P. 1177-1203.
19. Linde, A.M., Munir, M., Zohari, S., Ståhl, K., Baule, C., Renström, L., Berg, M. (2010). Complete genome characterisation of a Newcastle disease virus isolated during an outbreak in Sweden in 1997. *Virus Gen.* 41, 165-173.
20. Mayo, M.A. (2002a). Virus Taxonomy – Houston 2002. *Arch Virol.* 147, 1071-1076.
21. Mayo, M.A. (2002b). A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol.* 147, 1655-1656.
22. Miller, P.J., Haddas, R., Simanov, L., Lublin, A., Rehmani, S.F., Wajid, A., Bibi, T., Khan, T.A., Yaqub, T., Setiyaningsih, S., Afonso, C.L. (2015). Identification of new sub-genotypes of virulent Newcastle disease virus with potential panzootic features. *Infect Genet Evol.* 29, 216-229.
23. Miller, P.J., Koch, G. (2013). Newcastle disease. In: *Diseases of Poultry*. Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., L.K. Nolan, L.K., Suarez D.L., Nair. V. (Eds.). (13th Edn.). Ames: Wiley- Blackwell. P. 89-107.
24. Mohamed, M.H.A., Kumar, S., Paldurai, A., Megahed, M.M., Ghanem, I.A., Lebdah, M.A., Samal, S.K. (2009). Complete genome sequence of a virulent Newcastle disease virus isolated from an outbreak in chickens in Egypt. *Virus Gen.* 39, 234-237.
25. Morla, S., Tiwari, K.A., Joshi, V., Kumar, S. (2014). Complete genome sequence of a Newcastle disease virus isolate from an outbreak in northern India. *Genome Announc.* 2:e00342-14.
26. Munir, M., Abbas, M., Khan, M.T., Zohari, S., Berg, M. (2012a). Genomic and biological characterization of a velogenic Newcastle disease virus isolated from a healthy backyard poultry flock in 2010. *Virology* 9:46.
27. Munir, M., Zohari, S., Abbas, M., Berg, M. (2012b). Sequencing and analysis of the complete genome of Newcastle disease virus isolated from a commercial poultry farm in 2010. *Arch Virol.* 157, 765-768.
28. OIE (World Animal Health Organization) (2012) Newcastle disease. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees*. Paris: Office International des Epizooties. P. 555-573.
29. Ramey, A.M., Reeves, A.B., Ogawa, H., Ip, H.S., Imai, K., Bui, V.N., Yamaguchi, E., Silko, N.Y., Afonso, C.L. (2013). Genetic diversity and mutation of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) in wild birds and evidence for intercontinental spread. *Arch Virol.* 158, 2495-2503.
30. Rezaei Far, A., Peighambari, S.M., Pourbakhsh, S.A., Ashtari, A., Soltani, M. (2016). Co-circulation of genetically distinct groups of avian paramyxovirus type 1 in pigeon Newcastle disease in Iran. *Avian Pathol.* 46, 36-43.
31. Roohani, K., Tan, S.W., Yeap, S.K., Ideris, A., Bejo, M.H., Omar, A.R. (2015). Characterization of genotype VII Newcastle disease virus (NDV) isolated from NDV vaccinated chickens, and the efficacy of LaSota and recombinant genotype VII vaccines against challenge with velogenic NDV. *J Vet Sci.* 16, 447-457.
32. Sabouri, F., Vasfi Marandi, M., Karimi, V., Malekan, M., Bashashati, M. (2016). Genetic analysis of avian paramyxovirus type I strains isolated from backyard poultry in Iran. *Turk J Vet Anim Sci.* 40, 750-756.
33. Sakaguchi, T., Toyoda, T., Gotoh, B., Inocencio, N.M., Kuma, K., Miyata, T., Nagai, Y. (1989). Newcastle disease virus evolution I. Multiple lineages defined by sequence variability of the Haemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology.* 169, 260-272.
34. Samadi, S., Kianizadeh, M., Najafi, M.F., Mousavi Nasab, S.D., Davatgar, A.M.H., Royaei, A., Pilvar, P. (2014). Molecular characterization and phylogenetic study of velogenic Newcastle disease virus isolates in Iran. *Virus Gen.* 48, 290-295.
35. Samuel, A., Nayak, B., Paldurai, A., Xiao, S., Aplogan, G.L., Awoume, K.A., Webby, R.J., Ducatez, M.F., Collins, P.L., Samal, S.K. (2013). Phylogenetic and pathotypic characterization of Newcastle disease viruses circulating in West Africa and efficacy of a current vaccine. *J Clin Microbiol.* 51, 771-781.
36. Snoeck, C.J., Owoade, A.A., Couacy-Hymann, E., Alkali, B.R., Okwen, M.P., Adeyanju, A.T., Komoyo, G.F., Nakouné, E., Faou, A.L., Muller, C.P. (2013). High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in West and Central Africa: cocirculation of genotype XIV and newly defined genotypes XVII and XVIII. *J Clin Microbiol.* 51, 2250-2260.
37. Tamura, K., Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 10, 512-526.
38. Usachev, E.V., Fediakina, I.T., Shchelkanov, M.I., L'vov, D.N., Prilipov, A.G., Iamnikova, S.S. (2006). Molecular genetic characteristics of the Newcastle Sterna/Astrakhan/Z275/2001 virus isolated in Russia. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 1, 14-20. [Article in Russian]
39. Zhang, Y., Zhang, S., Wang, X., Zhang, G. (2012). Complete genome sequence of a subgenotype VIII Newcastle disease virus circulating predominantly in chickens in China. *J Virol.* 86, 13849-13850.