وزارت جهاد کشاورزی

عنوان طرح:

تشکیل بانک ژنی ویروس بیماری نیوکاسل در استان خراسان رضوی

دستگاه سفارش کننده طرح:
اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی

مجری طرح: دکتر رضا طرقی
موسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی، شعبه شمال شرق کشور

۱۳۹۸

بسم الله الرحمن الرحیم

اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

وزارت جهادکشاورزی

عنوان طرح:

تشکیل بانک ژنی ویروس بیماری نیوکاسل در استان خراسان رضوی

دستگاه سفارش کننده طرح:

اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی

مجری طرح: دکتر رضا طرقی

موسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی، شعبه شمال شرق کشور

همکاران: دکتر ناصر مرگان ازغدی، دکترسیدالیاس طباطبائی زاده، دکتر شهرام شرقی، دکترعلیرضا هنری، دکتر ایمان سلامتیان، مهندس امیر نوروزی

با تشکر از: دکتر حمیدرضا فرزین، مهندس مجتبی فخرائی، دکترمحمد رضا رویگری، دکتر سعید سودآوری، دکتر آزیتا روحبخش، مهندس نوید ایرانخواه، دکتر رضا غفورزاده، دکتر عبدالحمید آقایان و دکتر سیدرضا ناظمی

به نام آفریننده

که به قلم و آنچه می نویسند سوگند یاد کرد.

علم و تحقیق کلید قطعی پیشرفت کشور است . ((مقام معظم رهبری))

پژوهش، فرآیند تولید علم است و تولید فناوری به کارگیری یافته های پژوهشی است و تاثیرگذاری پژوهش وفناوری درتمدن کنونی دنیا و درآینده ی آن بسیار روشن و بدیهی است. ارتقای جایگاه پژوهش با افزایش اعتماد به نفس ، اراده ی مستقل و پذیرش خطر تجربه ، در بوجود آمدن ساختارهای دانایی محور و تقویت این مهم نقش محوری دارد.

نظر به اسناد بالادستی توسعه علمی و نیز به جهت رفع نیازهای اجرایی، با استعانت از خداوند متعال طرح پژوهشی با عنوان ((**تشکیل بانک ژنی ویروس بیماری نیوکاسل در استان خراسان رضوی**)) در راستای اجرای دستورالعمل انجام طرح های پژوهشی تکالیف قانون بودجه سال ۱۳۹۷ و پس از پیشنهاد موضوع فوق در کارگروه تخصصی پژوهش ، فن آوری و نوآوری و تایید شورای برنامه ریزی استان خراسان رضوی به انجام رسیده است .

بدین وسیله از کلیه دست اندرکاران اجرای طرح شامل مجری گرامی آقای دکتر رضا طرقی عضو محترم هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، دستگاههای اجرایی از جمله کمیته آموزش و پژوهش دامپزشکی استان ، دبیرخانه محترم کارگروه آموزش ، پژوهش ، فناوری و نوآوری خراسان رضوی، دانشگاه محترم فردوسی مشهد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شمال شرق کشور، سازمان مدیریت و برنامه ریزی خراسان رضوی و استانداری محترم خراسان رضوی و نیز همکاران عزیز اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی که به هر نحوی در مراحل مختلف بررسی ، تصویب ، نمونه برداری، آزمون ، پردازش ، تحلیل ، نتیجه گیری و در نهایت تدوین کتابچه حاصل تلاش و پشتیبانی نموده اند ، تقدیر و تشکر می گردد.

امید است اجرای تحقیقات کاربردی دستمایه مناسبی در راستای کنترل و پیشگیری از بیماریهای مشترک بین انسان و دام ، بیماریهای واگیر دامی و تامین امنیت غذایی از راه کنترل فرآورده های خام دامی، به منظور اجرای بهتر خدمت رسانی به مردم مهربان کشور عزیزمان جمهوری اسلامی ایران ایجاد کند .

دکتر احمد شریعتی

مدیر کل دامپزشکی خراسان رضوی

فهرست

چکیده: ۱
۱. مقدمه ۳
۳. مروری بر منابع ۵
۴. مواد و روش ها ۸
۵. نتایج ۱۷
۶. بحث ۲۷
۶. منابع ۳۶

چکیده:

بیماری نیوکاسل مهمترین بیماری تنفسی ویروسی گله های مرغ تجاری در استان خراسان رضوی است که موجب خسارت های اقتصادی فراوانی عموما به اشکال افزایش تلفات و کاهش تولید تخم مرغ می شود. در طی چند سال گذشته با وجود واکسیناسیون های فشرده علیه این بیماری رخداد های زیادی از بیماری از سرتاسر استان گزارش شده است. در این مطالعه جهت مشخص شدن ژنوتیپ های ویروس در طی ۱۳ سال گذشته، تمامی نمونه های ویروسی و بافتی موجود در استان جمع آوری شد. جداسازی/تازه سازی ویروس برای ۱۵۲ نمونه دریافت شده با استفاده از تخم مرغ های جنین دارSPF انجام شد که در ۵۳ مورد جداسازی با موفقیت همراه بود (۳۴,۹٪). تعداد ۲۰ جدایه ویروس بیماری که از گله های مرغ گوشتی، تخمگذار، بومی و بوقلمون شهرهای مختلف استان بودند برای تعیین توالی کامل ژن F انتخاب شدند. تعیین توالی نوکلئوتیدی نشان داد که تمامی ویروس های بیماری نیوکاسل در حال گردش پرندگان استان تقریبا شبیه به یکدیگر بوده و همگی آنها دارای موتیف مشترک 112-RRQKRF-117 در ناحیه محل شکافت پروتئین فیوژن خود و بنا به طبقه بندی جدید متعلق به تحت ژنوتیپ VII.1.1بودند. فقط یک ویروس جداشده از مرغ بومی شهرستان مشهد در سال ۱۳۸۸ کاملا متفاوت از سایر ویروسها بوده، دارای موتیف 112-RRRKRF-117 در ناحیه محل شکافت پروتئین فیوژن خود و در تحت ژنوتیپ XIII.2.1 قرار گرفت. این ویروس بسیار شبیه به ویروس GU182323 جدا شده از کشور پاکستان بود. چون تا کنون ما نتوانسته ایم این تحت ژنوتیپ را از هیچیک از رخدادهای بیماری در سطح استان ردیابی نماییم بر این باوریم که این ویروس نتوانسته است در بین گله های مرغ تجاری استان شایع شود. اطلاعات بدست آمده موجب تشکیل بانک ژنی ویروس بیماری نیوکاسل در استان خراسان رضوی شد و موید این مهم است که

خوشبختانه تاکنون استان با ژنوتیپ جدیدی از ویروس بیماری نیوکاسل آلوده نشده است و ویروس های در حال گردش از همان منشاء ویروسهای گزارش شده در سال های قبل می باشند با این تفاوت که فواصل تکاملی نوکلئوتیدی آنها در طول ده سال گذشته با شیب ملایمی در حال افزایش می باشند. لذا به نظر میرسد رهیافت تمرکز و اصرار بر ورود واکسن های جدید با احتمال وجود ویروس های جدید نمی تواند رهیافت درستی برای کنترل بیماری در سطح استان باشد. محور اصلی و راهبردی برای کنترل بیماری در سطح استان می بایستی تمرکز بر پیاده سازی تدریجی رعایت اصول امنیت زیستی باشد. همچنین اعمال قوانین و مقررات کاملا سخت گیرانه در خصوص ورود پرندگان زینتی از کشور پاکستان که بخصوص در فصل بهار معمول می باشد می تواند ضامن عدم رخداد بیماری با تحت ژنوتیپ های جدید ویروس بیماری نیوکاسل در سطح استان باشد.

واژه های کلیدی: ویروس بیماری نیوکاسل، ژن F، تحت ژنوتیپ VII.1.1، تحت ژنوتیپ XIII.2.1، استان خراسان رضوی

۱. مقدمه

استفاده کاربردی از تکنیک های مولکولی و جدید تشخیصی یکی از روش های بسیار موثر در کاهش هزینه های تولید است که در بیشتر کشورهای پیشرفته بصورت روزمره استفاده می شود. در این روشهای تشخیصی هدف ردیابی عامل بیماری در حداقل زمان ممکنه با حداکثر حساسیت و ویژگی است. در این صورت است که این فرصت برای دامپزشکان و پرورش دهندگان پرندگان ایجاد می شود که در زمان ظهور و بروز بیماری ها بتوانند واکنش مناسب و سریع نشان دهند. در اوائل ورود این تکنیک های جدید تشخیصی به کشور ما در بیشتر مواقع عملیاتی نمودن تکنیک ها بیشتر مورد نظر و هدف بود و کمتر به استفاده کاربردی از آنها به منظور کنترل و پیشگیری از بیماری ها و در نهایت کاهش هزینه های تولید توجه می شد. با استقرار تدریجی این روش ها در آزمایشگاههای دولتی و خصوصی کشور، به استفاده های کاربردی از این روش ها بیشتر توجه و پرداخته شد. بطوریکه همکنون تشخیص مولکولی انواع بیماری های مختلف دام و طیور کشور در بیشتر استان های کشور در حال انجام می باشد. تلفیق این روش های تشخیصی با روش های دقیق تر تعیین هویت عوامل بیماریزا همچون تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن های کاندید و علم اپیدمولوژی در سطح وسیع گله ها توانست برای ما اطلاعات با ارزشی را ایجاد نماید که به مولکولاراپیدمولوژی معروف است. امروزه استفاده کاربردی از مولکولار اپیدمولوژی به عنوان یکی از پیشرفته ترین ابزار تکنیکی برای پیشگیری و کنترل بیماری ها محسوب می شود که مدت هاست در کشورهای پیشرفته به عنوان یکی از طرح های استراتژیک حوزه پیشگیری و کنترل بیماری ها مطرح می باشد. اگرچه تعداد طرح های بسیاری در این زمینه در نقاط مختلف کشور انجام شده است ولی متاسفانه بیشتر این تلاش

ها بصورت منسجم، منظم، ادامه دار و هدفدار با دید استفاده کاربردی از مولکولاراپیدمولوژی جهت کنترل و پیشگیری بیماری ها انجام نشده است. عموما این تلاش بیشتر در شکل انجام پایانامه های دانشجویی یا انجام طرح های پژوهشی با نگاه تولید علم و مقاله انجام شده است و کمتر این طرح ها به گونه ای روشمند به منظور رسیدن به هدف نهایی که استفاده کاربردی در پیشگیری و کنترل بیماری باشد طراحی شده است. جهت استفاده کاربردی از مولکولاراپیدمولوژی در بیماری های مختلف نیاز است به محض استقرار روش های تشخیصی مولکولی به سمت آنالیز مستمر داده های بدست آمده پرداخت و در ادامه با تشکیل بانک های ژنی عوامل بیماریزا بطورمستمر و منظم به پایش و رصد این عوامل در گذشته و حال پرداخت. در خصوص بیماری های پرندگان با داشتن چنین اطلاعاتی است که می توان با اطمینان بسیار زیادی در مورد خاستگاه های عوامل بیماریزا در وقوع های جدید بیماری، وقوع بیماری با منشاء پرندگان مهاجر یا آزاد پرواز یا عامل انسانی، واردات کالا یا مواد بیولوژیک، بیوتروریسم و .... اظهار نظر کرد و به عبارتی کنترل بسیار بیشتری به دریچه های ورود عامل بیماری به منطقه داشت. علیرغم اطلاع رسانی و توجیه این مهم در ۱۵ سال گذشته برای دست اندرکاران بخش های دولتی و خصوصی، متاسفانه بجز در موارد محدودی نتوانسته ایم از این اهرم بسیار مهم در جهت کنترل و پیشگیری بیماری ها استفاده نماییم.

در سال ۱۳۸۸ بطور غیر منتظره میزان تلفات بیماری های تنفسی در بین گله های مرغ تجاری استان خراسان به میزان قابل توجه ای افزایش یافت. از اینروی مطالعه ای شکل گرفت تا نقش عوامل ویروسی ایجاد کننده این تلفات در سطح گله های مرغ تجاری استان مشخص شوند. تمرکز عمدا بر روی سه ویروس بیماری نیوکاسل، برونشیت عفونی و آنفلونزای پرندگان H9N2 بود. با در نظر گرفتن علائم کلینیکی و کالبد گشائی، بررسی سرمی، جداسازی ویروس در تخم مرغ های جنین دارSPF ، تکنیک RT-PCR و تعیین توالی نوکلئوتیدی مشخص شد که ۸۱٪ گله های بررسی شده در این مطالعه به بیماری یا عفونت بیماری نیوکاسل مبتلا بودند (Toroghi,

2011). به عبارتی مهمترین عامل بیماریزا در کمپلکس های تنفسی گله های مرغ تجاری استان مربوط به ویروس بیماری نیوکاسل تشخیص داده شد. این بیماری تاکنون خسارات اقتصادی فراوانی عموما به اشکال افزایش تلفات و کاهش تولید تخم مرغ برای صنعت پرندگان استان ایجاد کرده است.

در طی چند سال گذشته با وجود واکسیناسیون های فشرده علیه این بیماری وقوع های زیادی از بیماری از سرتاسر استان گزارش شده است.به منظور تعیین پروتکل های کنترلی این بیماری نیاز است که همواره در خصوص ویروس های در حال گردش یا ویروس های جدا شده از وقوع های گذشته این بیماری اطلاعات دقیق و کاملی در دست باشد. در مطالعه حاضر تعیین توالی نوکلئوتیدی کامل ژن F برای تمامی ویروس های بیماری نیوکاسل ردیابی شده یا جدا شده در استان صورت گرفت و سپس آنالیز ژنتیکی آنها به روش دیمتروف و همکاران که همکنون آخرین روش پذیرفته شده جهانی است انجام گرفت(Dimitrov et al., 2019). تمامی اطلاعات بدست آمده بصورت بانک ژنی ویروس بیماری نیوکاسل استان خراسان رضوی معرفی شد. بدیهی است از اطلاعات بدست آمده می توان برای طرح های کلان کنترل بیماری استفاده نمود.

۲. مروری بر منابع

تاکنون گزارشات مختلفی از شناسایی و جداسازی ویروس نیوکاسل از پرندگان در ایران گزارش شده است (Esmaelizad et al., 2012, Ebrahimi et al., 2012, Hadipour et al., 2011, Ghiamirad et al., 2010, Momayez et al., 2007, Hemmatzadeh et al., 2006, Kianizadeh et al., 2002, Kianizadeh et al., 1999, Bozorgmehri-Fard and Keyvanfar, 1979, Soltani et al., 2019, Molouki et al., 2019a, Sabouri et al., 2018, Ghalyanchilangeroudi et al., 2018, Mayahi and Esmaelizad, 2017, Sabouri et al., 2016, Boroomand et al., 2016).

در مطالعه ای که توسط کیانی زاده و همکاران انجام گرفت، تعداد ۱۲ ویروس نیوکاسل بین سال های ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۹ از موارد شیوع در استان های مختلف جداسازی گردید. بر اساس ویژگی های بیماریزایی ویروس و تعیین توالی ناحیه شکست ژن F این ویروس ها در دسته های مزوژنیک یا ولوژنیک قرار گرفتند (Kianizadeh et al., 1999). در مطالعه ای دیگر که توسط ابراهیمی و همکاران انجام گرفت، ۷ ایزوله ویروسی جدا شده از ماکیان که در سال های بین ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۰ جدا شده بودند، از نظر بیماری زایی و روند تکاملی در میان سایر ویروس های نیوکاسل جدا شده از آسیا مورد بررسی قرار گرفتند (Ebrahimi et al., 2012). در این مطالعه بررسی اپیدمیولوژیک بر اساس توالی ژن F انجام گردید. بر اساس MDT و IVPI تمامی هفت ایزوله از سویه های ولوژنیک بوده اند. مطالعه ای دیگر که در اهواز انجام گرفت، ۳ ویروس نیوکاسل از گله های گوشتی مرغ در سال های ۲۰۱۳-۱۴ جداسازی گردید (Boroomand et al., 2016). بر اساس توالی ناحیه شکست ژن فیوژن و بررسی فیلوژنتیک، ویروس ها ولوژنیک و از سویه های ژنوتیپ VIId بودند. در مطالعه ای که توسط طرقی و همکاران در گله های مرغ گوشتی استان انجام گرفت، از مجموع ۳۶ گله، جداسازی ویروس در ۲۵ گله انجام گرفت (Toroghi, 2011). بر اساس بررسی ناحیه شکافت پروتئین فیوژن تمامی ویروس ها از سویه های ولوژنیک و متعلق به تحت ژنوتیپ VIId بودند. همچنین یک ویروس از گله مرغ بومی در شهر مشهد جدا شد که از سویه های ولوژنیک و در ژنوتیپ VIIb قرار داشت. این ویروس بر اساس توالی ناحیه شکست ژن F دارای شباهت با ویروس های نیوکاسل قبلا جدا شده از ایران (۹۳/۸ تا ۹۵/۱ درصد) و کشور پاکستان (۹۷/۵ درصد) می باشد. ویروس ولوژنیک نیوکاسل از سایر رده های پرندگان ایران مانند بلدرچین (Momayez et al., 2007) و شترمرغ (Ghiamirad et al., 2010) گزارش شده است. در مطالعه ای که توسط صبوری و همکاران انجام گرفت ، ۸ ایزوله بیماریزای NDV از مرغان بومی در طی سال های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۳ جدا شد. بر اساس آنالیز

فیلوژنتیک ژن کامل F تمامی این ویروس ها در تحت ژنوتیپ VIIl قرار می گرفتند. این ویروس ها بیشترین شباهت را به جدایه هایی از کشور چین داشتند (Sabouri et al., 2018). در مطالعه ای که توسط قلیانچی و همکاران بر روی تعیین توالی کامل ژنومی یک ایزوله بیماریزا مربوط به سال ۲۰۱۷ حاصل از مرغ های گوشتی تجاری انجام گرفت، مشاهده شد که ویروس مربوط به تحت ژنوتیپ VIIi است و بیشترین شباهت را به ویروس های جدا شده از پاکستان دارد (Ghalyanchilangeroudi et al., 2018). در مطالعه ای که توسط سلطانی و همکاران بر روی ۱۳ ایزوله بیماریزای NDV جدا شده از شیوع های مختلف در طی سال های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۰ انجام گرفت، آنالیز فیلوژنتیک بر اساس توالی کامل ژن HN نشان داد که این ویروس ها دارای شباهت به ویروس های ژنوتیپ XIII هستند (Soltani et al., 2019). در مطالعه ای که توسط ملوکی و همکاران بر روی نمونه های حاصل از ۱۰۸ گله تجاری گوشتی در طی سال های ۲۰۱۷ تا ۲۰۱۸ انجام گرفت، ۳۸ گله برای NDV مثبت شدند. بر اساس فیلوژنتیک آنالیز انجام شده با توالی کامل ژن F ویروس های این مطالعه تحت ژنوتیپ VIIl را ایجاد می کردند (Molouki et al., 2019a).

مطالعات زیادی تاکنون در دنیا بر روی تعیین توالی کامل ژنومی ویروس نیوکاسل برای مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده است (Wang et al., 2016, Shittu et al., 2016, Wang et al., 2015, Zhang et al., 2012, Kim et al., 2012, Diel et al., 2012b, Linde et al., 2010, Xu et al., 2008, Goudarzi et al., 2019, He et al., 2018, Butt et al., 2019). در مطالعه ای که توسط گودرزی و همکاران انجام گرفت، توالی کامل ژنومی ویروسی ولوژنیک از ژنوتیپ شایع در ایران VIIl مورد بررسی قرار گرفت (Goudarzi et al., 2019).

٤. مواد و روش ها

١-٤- ویروسها، نمونه گیری های بافتی و تزریق به تخم مرغ

دو جدایه RT30 و RT40 ویروس بیماری نیوکاسل که در سال های گذشته در بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی شعبه شمال شرق جداسازی شده بود در تخم مرغ های جنین دار ١٠روزه SPF (Venkateshwara Hatcheries, India) تزریق شد تا تازه سازی ویروس ها انجام گیرد. سپس تمامی نمونه های بافتی مشکوک به بیماری موجود در سه مرکز بیمارستان تخصصی طیور ماد، بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی شعبه شمال شرق و اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی جمع آوری شد. از این نمونه ها صلایه بافتی ١٠ در صد با استفاده از بافر PBS حاوی ١٠٠٠٠ واحد پنی سیلین و ١٠٠٠٠ میکروگرم استرپتومایسین به ازای هر میلی لیتر تهیه شد. سوسپانسیون تهیه شده از نمونه ها با سرعت g ١٠٠٠ به مدت ١٥ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شدند. در موارد آلودگی باکتریایی شدید، نمونه ها از فیلتر ٠/۴۵ میکرولیتر عبور داده شدند. پس از سانتریفوژ، مایع روئی هر نمونه به ٣ عدد تخم مرغ جنین دار ده روزه SPF (هر تخم مرغ ٠/٢ میلی لیتر) از راه حفره کوریوالانتوئیک تلقیح گردید . تخم مرغ ها در انکوباتور ٣٧ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و هر روزه کنترل گردیدند. جنین های تلف شده تا ٢۴ ساعت پس از تلقیح حذف شدند. جنین های ضعیف و مرده در فاصله ٢ تا ٧ روز پس از تلقیح بعنوان مشکوک به

وجود ویروس در نظر گرفته شد و برداشت مایع آلانتوئیک این تخم مرغ ها انجام شد. تایید حضور یا عدم حضور ویروس با استفاده از تست سریع هماگلوتیناسیون روی لام با استفاده از سوسپانسیون ۱۰ درصد گلبول های قرمز مرغ انجام شد. مایع های برداشت شده در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد برای انجام مراحل بعدی قرار گرفت. در مواردی که تست هماگلوتیناسیون نمونه های برداشت شده منفی بود پاساژ دوم این نمونه ها در تعداد بسیار معدودی مانند نمونه های کبوتری انجام شد. اطلاعات لازم در خصوص تمامی نمونه هایی که تاکنون مثبت ارزیابی شده و تعیین توالی نوکلئوتیدی شده اند در جدول ۱-۴ آمده است. همچنین اطلاعات ۹۹ نمونه که در جداسازی منفی ارزیابی شدند در در جدول ۲-۴ آمده است.

ردیف	کد نمونه	نوع گله	محل	سال وقوع	سال وقوع	بافت
1	RT30	مرغ بومی	مشهد	2010	1388	مغز
2	RT40	گوشتی	سبزوار	2011	1390	مغز
3	RT573	گوشتی	سبزوار	2012	1391	مغز
4	RT698	گوشتی	سبزوار	2012	1391	مغز
5	RT1579	تخمگذار	نیشابور	2012	1391	مغز
6	RT1688	گوشتی	شاندیز	2012	1391	مغز
7	RT1763	گوشتی	مشهد	2012	1391	مغز
8	RT1811	گوشتی	تربت جام	2012	1391	مغز
9	RT1830	گوشتی	شیروان	2012	1391	مغز
10	RT257	گوشتی	نیشابور	2017	1396	مغز
11	RT780	تخمگذار	مشهد	2018	1396	مغز
12	RT349	مرغ بومی	چناران	2018	1397	نای و ریه
13	RT538	گوشتی	مشهد	2018	1397	مغز
14	RT589	گوشتی	کاشمر	2018	1397	ریه و سکال
15	RT606	گوشتی	تایباد	2018	1397	مغز
16	RT651	گوشتی	نیشابور	2019	1397	مغز
17	RT685	گوشتی	خواف	2019	1397	مغز
18	RT298	گوشتی	سبزوار	2019	1398	مغز
19	RT498	بوقلمون	مه ولات	2019	1398	مغز
20	RT189	گوشتی	تربت حیدریه	2019	1398	نای

جدول ۱-۴- اطلاعات گله هائی که جداسازی ویروس بیماری نیوکاسل در آنها مثبت ارزیابی شد.

جدول ۲-۴- اطلاعات گله هائی که جداسازی ویروس بیماری نیوکاسل در آنها منفی ارزیابی شد.

ردیف	سال/کد نمونه	نوع گله	محل	بافت
1	8/85	کبوتر	خراسان رضوي	مغز
2	217/87	گوشتي	درگز	مخلوط باقي
3	257/87	تخمگذار	مشهد	مخلوط باقي
4	474/88	شترمرغ	خراسان رضوي	ناي
5	70/89	گوشتي	خواف	مخلوط باقي
6	71/89	شترمرغ	مشهد	مغز
7	72/89	گوشتي	خراسان رضوي	مغز
8	73/89	تخمگذار	مشهد	مغز
9	721/89	کبک	خراسان رضوي	مغز
10	994/89	گوشتي	خراسان رضوي	مغز
11	1916/89	شترمرغ	خراسان رضوي	احتمالا مغز
12	1990/89	گوشتي	نيشابور	مغز
13	683/88	تخمگذار	مشهد	مخلوط باقي
14	834/88	گوشتي	مشهد	مخلوط باقي
15	921/88	تخمگذار	مشهد	مخلوط باقي
16	1030/88	تخمگذار	مشهد	مخلوط باقي
17	1064/88	مرغ رنگي	خراسان رضوي	مخلوط باقي
18	14/89	تخمگذار	مشهد	مخلوط باقي
19	592/89	گوشتي	خواف	مخلوط باقي
20	598/89	گوشتي	مشهد	مخلوط باقي
21	604/89	گوشتي	مشهد	مخلوط باقي
22	1053*89	احتمالا گوشتي	خراسان رضوي	مخلوط باقي
23	1445/89	احتمالا گوشتي	خراسان رضوي	مخلوط باقي
24	2168/89	احتمالا گوشتي	خراسان رضوي	مخلوط باقي
25	2/90	بلدرچين	مشهد	مغز
26	887/90	کبوتر	خراسان رضوي	مغز
27	932/90	گوشتي	سبزوار	مغز
28	1813/90	شترمرغ	مشهد	مخلوط باقي
29	1814/90	شترمرغ	مشهد	مخلوط باقي
30	1999/90	مادر تخمگذار	تربت جام	ناي مغز
31	2332/90	کبوتر	خراسان رضوي	مغز
32	2390/90	گوشتي	تايباد	مخلوط باقي
33	2412/90	کبوتر	خراسان رضوي	مغز
34	2555/90	بوقلمون	شاندیز	مغز
35	18/90	احتمالا گوشتي	خراسان رضوي	مخلوط باقي
36	34/90	احتمالا گوشتي	خراسان رضوي	مخلوط باقي
37	81/90	احتمالا گوشتي	خراسان رضوي	مخلوط باقي
38	523/90	گوشتي	خراسان رضوي	احتمالا مغز
39	739/90	گوشتي	خراسان رضوي	احتمالا مغز
40	740/90	گوشتي	خراسان رضوي	احتمالا مغز
41	741/90	گوشتي	خراسان رضوي	احتمالا مغز
42	520/90	گوشتي	خراسان رضوي	احتمالا مغز
43	524/90	گوشتي	خراسان رضوي	احتمالا مغز
44	585/90	گوشتي	خراسان رضوي	احتمالا مغز
45	846/90	گوشتي	خراسان رضوي	احتمالا مغز
46	917/90	گوشتي	خراسان رضوي	احتمالا مغز
47	947/90	گوشتي	خراسان رضوي	احتمالا مغز
48	473/91	مرغ رنگي	مشهد	مغز
49	559/91	مرغ رنگي	خراسان رضوي	مغز
50	594/91	گوشتي	سبزوار	۱۱مغز

ادامه جدول ۲-۴

ردیف	سال/کد نمونه	نوع گله	محل	بافت
51	619/91	گوشتي	سبزوار	مغز
52	645/91	طاووس	خراسان رضوي	مغز
53	691/91	شترمرغ	مشهد	مغز
54	699/91	گوشتي	سبزوار	مغز
55	754/91	گوشتي	نيشابور	مغز
56	755/91	مرغ رنگي	خراسان رضوي	مغز
57	756/91	مرغ رنگي	خراسان رضوي	مغز
58	765/91	گوشتي	سبزوار	مغز
59	1484/91	گوشتي	شانديز	مغز
60	1566/91	گوشتي	برزش آباد	مغز
61	1590/91	گوشتي	مشهد	مغز
62	1614/91	گوشتي	سبزوار	مغز
63	1678/91	احتمالا گوشتي	خراسان رضوي	مغز
64	1699/91	گوشتي	شانديز	مغز
65	1700/91	گوشتي	سبزوار	مغز
66	1738/91	گوشتي	سبزوار	مغز
67	1797/91	گوشتي	مشهد	مغز
68	1798/91	گوشتي	تربت حيدريه	مغز
69	1829/91	گوشتي	ابرده	مغز
70	1896/91	گوشتي	مشهد	مغز
71	2400/91	قرقاول	مشهد	مغز
72	1690/92	گوشتي	تربت حيدريه	طحال
73	644/95	گوشتي	تربت حيدريه	ناي
74	784/95	گوشتي	مشهد	ناي
75	926/95	مادر گوشتي	كاشمر	ناي
76	24/96	پولت	مشهد	ناي
77	40/96	گوشتي	جاده كلات	ناي
78	258/96	گوشتي	سبزوار	مغز
79	498/96	پولت	گلبهار	ناي
80	622/96	گوشتي	نيشابور	ناي
81	281/97	شترمرغ	مشهد	مغز
82	326/97	شترمرغ	قائن	مغز
83	329/97	تخمگذار	شيرحصار	مخلوط باقي
84	332/97	گوشتي	گناباد	مخلوط باقي
85	470/97	شترمرغ	خراسان رضوي	مغز
86	462/97	تخمگذار	مشهد	مخلوط باقي
87	463/97	تخمگذار	مشهد	مخلوط باقي
88	479/97	تخمگذار	خراسان رضوي	ناي كليه
89	527/97	تخمگذار	مشهد	ناي كليه
90	564/97	احتمالا گوشتي	خراسان رضوي	ناي كليه
91	578/97	تخمگذار	مشهد	ناي كليه
92	583/97	گوشتي	خواف	ناي كليه
93	423/98	گوشتي	خراسان رضوي	مغز
94	32/98	گوشتي	چناران	مخلوط باقي
95	812/96	مرغ بومي	خراسان رضوي	بورس
96	205/97	تخمگذار	مشهد	ناي
97	205/97	تخمگذار	مشهد	مخلوط باقي
98	5/98	گوشتي	نيشابور	مغز
99	525/98	تخمگذار	چناران	مغز

۲-٤- . استخراج RNA :

جداسازی اسید نوکلئیک ویروسی (RNA) براساس دستورالعمل کیت (Roche, Germany) از مایع های آلانتوئیک عفونی برداشت شده صورت گرفت. بطور خلاصه ابتدا با مخلوط کردن ۵ میکرولیتر از محلول Poly A (پلی آدنیلیک اسید) با ۲۰۰ میکرولیتر binding buffer در داخل یک تیوب میکروفیوژ ۱/۵ میلی لیتری محلول کاری تهیه گردید. به این محلول ۲۰۰ میکرولیتر مایع آلانتوئیک افزوده شد و بطور کامل مخلوط گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول Proteinase K به تیوب افزوده شد و کاملاً مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۷۲ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر الکل ایزوپروپانل به محلول اضافه گردید. در مرحله بعد محتویات تیوب در یک تیوب فیلتردار انتقال یافت و به مدت یک دقیقه در دور g × ۸۰۰۰ سانتریفوژ گردید. بدین ترتیب RNA جذب فیلتر شد. فیلتر در تیوب جمع آوری جدید قرارداده شد و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر محلول Inhibitor removal buffer بر روی فیلتر اضافه گردید و مجدداً سانتریفوژ شد. پس از تعویض مجدد تیوب جمع آوری مقدار ۴۵۰ میکرولیتر بافر شتشو به آن افزوده شد و به ترتیب به مدت یک دقیقه در دور g × ۸۰۰۰ و ده ثانیه در دور g × ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس فیلتر در یک تیوب میکروفیوژ جدید قرارداده شد و ۵۰ میکرولیتر Elusion buffer روی فیلتر افزوده گردید و سرانجام در دور g × ۸۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفوژ

شد . بدین ترتیب RNA ویروس استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده توسط قرائت جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت .

۳-٤. روش RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction)

تکنیک RT-PCR استفاده شده دراین مطالعه برای مایع های آلانتوئیک عفونی برداشت شده براساس روش ارائه شده توسط ملوکی و همکاران که قابلیت تکثیر کل ژن F را داشت انجام گردید(Molouki et al., 2019b).

تائید اندازه محصولات PCR به دست آمده (۱۸۷۱ جفت باز) با استفاده از جداسازی الکتروفورزی برروی ژل آگاروز یک و نیم درصد بهمراه مارکر DNA استاندارد ۱۰۰ جفت بازی صورت پذیرفت .

٤-٤- تعیین توالی و آنالیز نوکلئوتیدی:

ابتدا با استفاده از کیت تجاری مخصوص خالص سازی محصولات PCR شرکت Roche آلمان، خالص سازی محصولات PCR بدست آمده از واکنش RT-PCR انجام شد. تعیین توالی نوکلئوتید های محصولات PCR با استفاده از پرایمر های چاپ شده ملوکی و همکاران توسط شرکت بایونیر کره جنوبی انجام شد. آنالیز نوکلئوتیدها توسط برنامه نرم افزار BioEdit version 7.0.5.3 و CLC Main Workbench version 5. صورت گرفت.

۵-٤- آنالیز فیلوژنتیک

آنالیز فیلوژنتیک توالی های جدایه های ویروسی این مطالعه بهمراه دیتاست پایلوت آخرین دستورالعمل طبقه بندی ویروس های بیماری نیوکاسل که مشتمل بر ۱۲۵ توالی ویروسی تمامی ژنوتیپ و تحت ژنوتیپ های کلاس II ویروس بیماری نیوکاسل بود انجام گرفت (Dimitrov et al., 2019). همچنین آنالیز فیلوژنتیک جدایه RT30/2010 بطور جداگانه با استفاده از اطلاعات ۱۶۷۲ توالی ژن کامل F مربوط به ویروس های نیوکاسل کلاس II ارائه شده توسط دیمیتروف و همکاران انجام گرفت (Dimitrov et al., 2019). در ابتدا الاینمنت ژن کامل F توالی ویروس های رفرانس و توالی کامل کد کننده ژن F ویروس های این مطالعه با استفاده از الگوریتم Fast Fourier Transformation (MAFFT v7.450) انجام گردید. با استفاده از فایل حاصل از الاینمنت توالی ها آنالیز فیلوژنی با استفاده از RaxML و بکارگیری روش ML بر اساس مدل GTR با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد. با توجه به حجم بالای پردازش اطلاعات جهت آنالیز از سوپر کامپیوتر تحت وب (CIPRES Science Gateway) بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط دیمیتروف و همکاران انجام گرفت (Dimitrov et al., 2019).

٦-٤. آنالیز فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین ژنوتیپ ها، تحت ژنوتیپ ها و جدایه های این مطالعه

برای آنالیز فواصل تکاملی مابین ۱۶۶۴ توالی نوکلئوتیدی کد کننده ژن کامل F مربوط به ژنوتیپ ها و تحت ژنوتیپ های مختلف ویروس بیماری نیوکاسل و جدایه های RT40/2011 ، RT30/2010 و جدایه های مربوط به هر سال از نرم افزار MEGA X استفاده شد. آنالیز با مدل Maximum Composite Likelihood انجام گردید (Tamura et al., 2004). میزان گوناگونی بین سایت ها با توزیع گاما مدل گردید (shape parameter=1). جایگاه های کدون شامل اولین، دومین، سومین و غیر کد کننده می شدند. تمامی جایگاه های دارای گپ و اطلاعات از دست رفته حذف شدند.

۵. نتایج

۱-۵- جداسازی ویروس بیماری نیوکاسل

در مجموع ۱۵۲ نمونه بافتی مشکوک به بیماری از سه مرکز بیمارستان تخصصی طیور ماد، بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی شعبه شمال شرق و اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی که مربوط به نمونه های بین سالهای ۱۳۸۵ تا ۱۳۹۸ بود جمع آوری شد. در ۵۳ مورد موفق به جداسازی ویروس بیماری نیوکاسل از نمونه های مشکوک به بیماری شدیم (حدود ۳۵٪) که تاکنون ۲۰ ویروس از این مجموعه تعیین توالی نوکلئوتیدی شده اند اطلاعات این ویروس ها در جدول ۱-۴ یک آمده است. این نمونه ها نماینده یک پراکندگی مناسب از استان خراسان رضوی (بجز جدایه RT1830 که مربوط به شیروان بود) در طول سال های مختلف بودند. تعداد گله های دریافت شده از شهرستهان های مشهد سبزوار، نیشابور، تربت حیدریه، تربت جام، مه ولات ، چناران، کاشمر، تایباد، خواف، شاندیز و شیروان به ترتیب فراوانی ۴، ۴، ۱،۳ ،۱، ۱، ۱، ۱، ۱،۱، ۱ و ۱ گله بود. ۱۵ گله مرغ گوشتی، ۲ گله مرغ تخمگذار، ۲ مرغ بومی و یک گله بوقلمون انواع مختلف گله هایی بودند که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. یک نمونه مربوط به سال ۱۳۸۸، یک نمونه مربوط به سال ۱۳۹۰، هفت نمونه مربوط به سال ۱۳۹۱ ، دو نمونه مربوط به سال ۱۳۹۶، شش نمونه مربوط به سال ۱۳۹۷ و سه نمونه مربوط به سال ۱۳۹۸ بودند. همچنین در ۹۹ مورد جداسازی ویروس عامل بیماری با موفقیت همراه نبود اطلاعات این گله ها

در جدول ۲-۴ آمده است. از آنجا که از اهدف اصلی این طرح پایش مستمر ویروس بیماری نیوکاسل در استان خراسان رضوی می باشد تعیین توالی نوکلئوتیدی ۳۳ جدایه بدست آمده از این طرح بهمراه ویروس های احتمالی جدا شده از نمونه های جدید دریافت شده در آینده انجام خواهد شد. دو جدایه RT30 و RT40 از مجموعه ویروس های جدا شده انتخاب شدند که مطالعات بیشتری برای آنها صورت گیرد تا بصورت سویه معرفی شوند.

۲-۵- آنالیز توالی نوکلئوتیدها و اسید های آمینه

از ۲۰ ویروس مطالعه شده ۱۹ ویروس از نظرنوکلئوتیدی در یک گروه قرار گرفتند و فقط ویروس RT30/2010 که از مرغ های بومی جدا شده بود متفاوت از بقیه بود. در سطح نوکلئوتیدی فقط جدایه های RT257/2017 و RT689/2011 کاملا شبیه به یکدیگر بودند. در حالیکه در سطح اسید آمینه ای سه جدایه RT538/2018, RT651/2019 و RT685/2019 و هچنین جدایه RT589/2018 با RT298/2019 و جدایه RT1688/2012 با RT1763/2012 کاملا شبیه یکدیگر بودند.

توالی نوکلئوتیدی ناحیه‌ی شکافت بسیاری از ویروس‌های جدا شده در این مطالعه همانند جدایه RT40/2010 دارای توالی یکسان 334AGGAGACAA AAA CGT TTT 351 بودند که منجر به تولید موتیف 112RRQKRF117 شده بود این در صورتی است که در این ناحیه ویروس های RT573/2012 و RT1579/2012 تغییر نوکلئوتیدی در موقعیت ۳۴۵ (A to G) و ویروس های RT589/2018,

RT780/2018, RT498/2018, RT298/2018 و RT189/2018 تغییر نوکلئوتیدی در موقعیت ۳۳۹ (A to G) را نشان دادند که این تغییرات چون در کدون سوم اتفاق افتاده بود منجر به تولید اسید آمینه جدیدی نشده بود و آرایش اسید آمینه ای در این ناحیه به همان صورت 112RRQKRF117 در همه جدایه بصورت ثابت دیده شد. توالی اسید های آمینه در این موتیف برای جدایه RT30/2010 متفاوت از سایر ویروسهای این مطالعه بود و شامل توالی 112RRRKRF117 بود. زمانی این ناحیه در تمامی ویروسهای وحشی بیماری نیوکاسل گزارش شده از ایران بررسی شد مشخص شد که این ویروس ها یکی از سه موتیف RRQKRF, RRQRRF و RRRKRF را دارا می باشند. وجود بیش از دو آمینواسید بازی در این ناحیه و آمینواسید فنیل آلانین در موقعیت شماره‌ی ۱۱۷ بیانگر ولوژنیک بودن ویروس‌های جدا شده می‌باشد که همگی جدایه های بررسی شده واجد این شرایط بودند.

۳- ۵- ژنوتایپینگ جدایه ها

اطلاعات نوکلئوتیدی توالی کامل ژن F جدایه های این مطالعه بهمراه ۱۲۵ ویروس نیوکاسل کلاس II که به عنوان دیتاست پایلوت معرفی شده اند جهت آنالیز مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس درخت آنالیز فیلوژنتیک مشاهده گردید که تمامی جدایه های این مطالعه بجز جدایهRT30/2010 با تکرار پذیری ۱۰۰۰ در Clade ویروس های

ژنوتیپ VII و تحت ژنوتیپ VII.1.1 قرار گرفتند در صورتیکه جدایه RT30/2010 در ژنوتیپ XIII و تحت ژنوتیپ XIII.2.1 قرار گرفت (شکل ۱-۵) . همچنین درخت فیلوژنی جدایه RT30/2010 با استفاده از دیتاست اصلی که حاوی ۱۶۷۲ ویروس نیوکاسل بود بطور جداگانه کشیده شد (شکل ۲-۵).

بر اساس درخت فیلوژنی رسم شده ، نزدیکترین شباهت ۱۹ ویروس تحت ژنوتیپ VII.1.1 استان با ویروسی جدا شده از کشور چین است که از مرغ در سال ۲۰۰۴ جداشده بود و بنا به طبقه بندی سابق در تحت ژنوتیپ VIId قرار داشت.

٤-٥- فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین ویروس های نیوکاسل کلاس II و جدایه های این مطالعه

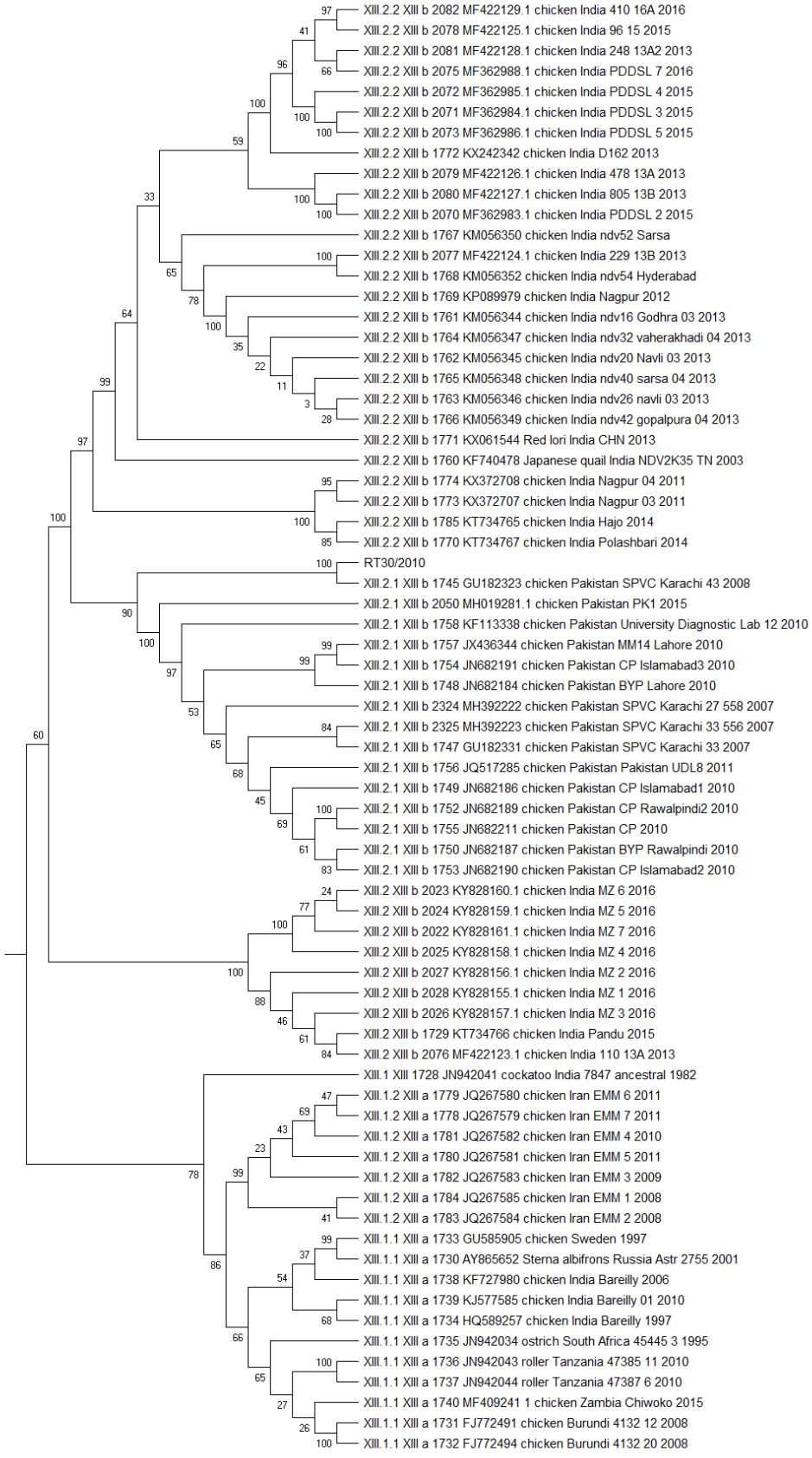
آنالیز فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین گروهی مربوط به ۱۶۶۴ توالی نوکلئوتیدی ژن کامل F مربوط به ژنوتیپ های مختلف ویروس نیوکاسل و دو جدایه RT30/2010 و RT40/2011 به نمایندگی از تمامی جدایه ها انجام گردید (جدول ۱-۵). مقدار فاصله تکاملی نوکلئوتیدی بین ۱۹ جدایه و ژنوتیپ VII وهمچنین مقدار فاصله تکاملی نوکلئوتیدی بین جدایه RT30/2010 و ژنوتیپ XIII کمتر از ۰/۱ است (جدول ۱-۵). بطور کلی توپولوژی فیلوژنتیک و آنالیز فاصله های تکاملی نوکلئوتیدی بین جمعیتی تأییدی بر متعلق بودن تمامی جدایه های این مطالعه

(به جز RT30/2010) در تحت ژنوتیپ VII.1.1 می باشد در صورتیکه جدایه RT30/2010 متعلق به تحت

ژنوتیپ XIII.2.1 می باشد (شکل ۱-۵، شکل ۲-۵ وجدول ۱-۵).

XIV.2 XIV b HF969210 chicken Nigeria NIE10 139 2011
XIV.2 XIV b KY171990 chicken Nigeria KD TVV 03T N46 720 2009
XIV.2 XIV b HF969187 chicken Nigeria NIE08 453 2008
XIV.1 XIV a JN872165 chicken Niger VIR 1377 7 2006
XIV.1 XIV a JQ039388 chicken Nigeria VRD08 38 2008
XIV.1 XIV a HF969205 turkey Nigeria NIE09 2071 2009
XVII XVII b HF969194 chicken Nigeria NIE08 2199 2009
XVII XVII a HF969176 chicken Nigeria NIE10 310 2011
XVII XVII a HF969191 chicken Nigeria NIE08 2042 2009
XVIII.2 XVIII b HG326800 village weaver Ivory Coast CIV08 32 2008
XVIII.2 XVIII b HF969218 chicken Ivory Coast CIV08 42 2007
XVIII.2 XVIII b JX518886 chicken Mali ML570?2T 2010
XVIII.1 XVIII a FJ772456 Mauritania 1632 14 2006
XVIII.1 XVIII a JF966389 guinea fowl Mali ML038 2007
XVIII.1 XVIII a JX518885 chicken Mali ML57051T 2010
XIII.1.2 XIII a JQ267594 chicken Iran EMM 2 2008
XIII.1.2 XIII a JQ267585 chicken Iran EMM 1 2008
XIII.1.2 XIII a JQ267579 chicken Iran EMM 7 2011
XIII.1.1 XIII a JN942043 roller Tanzania 47385 11 2010
XIII.1.1 XIII a JN942034 ostrich South Africa 45445 3 1995
XIII.1.1 XIII a MF409241 chicken Zambia Chiwoko 2015
XIII.2.2 XIII b KT734767 chicken India Polashbari 2014
XIII.2.2 XIII b KX372707 chicken India Nagpur 3 2011
XIII.2.2 XIII b KM056349 chicken India ndv42 gopalpura 4 2013
XIII.2.1 XIII b GU182331 chicken Pakistan SPVC Karachi 33 2007
XIII.2.1 XIII b KF113338 chicken Pakistan University Diagnostic Lab 12 2010
XIII.2.1 XIII b GU182323 chicken Pakistan SPVC Karachi 43 2008
RT30/2010
XII.1 XII a KU594615 chicken Peru Apurimac 50009 2005
XII.1 XII a KU594616 gamecock Peru Lurin 40871 2004
XII.1 XII a KU594618 chicken Peru Arequipa VFAR 81 2015
XII.2 XII b JN827507 goose China GD 1003 2010
XII.2 XII b MF278927 goose China FS SS 292 2013
XII.2 XII b JN827524 goose China GD 12 2011
VII.2 VII a JN986837 chicken Netherlands 152608 ancestral 1993
VII.2 VII k KY747479 chicken Namibia 5820 2016
VII.2 VII h MF622047 chicken South Africa RBWW 3 2013
VII.2 VII i KU862293 Parakeet Pakistan Karachi AW 1 2014
VII.2 VII i HQ897254 chicken Indonesia Banjarmasin 10 2010
VII.1.2 VII f GQ338309 pigeon China 18 2003
VII.1.2 VII f AY028995 fowl China A7 1996
VII.1.2 VII f DQ227246 goose China Jiangsu JS02 1999
VII.1.1 VII e AB853927 chicken Japan Ibaraki SG106 1999
VII.1.1 VII b EF589133 pheasant China 98 Guizhou 1998
VII.1.1 VII j KC642905 chicken China Liaoning 1 2009 2009
VII.1.1 VII d EF579733 chicken China Shandong Pyan 2004
RT40/2011
RT1830/2012
RT573/2012
RT1579/2012
VII.1.1 VII i KX268351 chicken Iran Behshahr 2015
RT1811/2012
RT1763/2012
RT1688/2012
RT257/2017
RT898/2012
RT349/2018
RT885/2019
RT538/2018
RT651/2019
RT808/2018
RT780/2018
RT189/2019
RT498/2019
RT298/2019
RT589/2019
VI.1 VI c AB853928 chicken Japan Ibaraki SM87 1987
VI.1 VI c AF458016 chicken China ZhJ 2 1998
VI.1 VI c KY042142 quail Korea 88 M 1988
VI.1.1 VI g JF824032 pigeon Russia Vladimir 687 2005
VI.1.1 VI g KY042132 Pigeon Egypt 73 OP G29 2015
VI.1.1 VI g KY042136 Pigeon Pakistan Lahore 126 2015
VI.1.2 VI m KY042135 Pigeon Pakistan 22A 2015
VI.1.2 VI m KU862298 pigeon Pakistan Lahore AW 2 2015
VI.1.2 VI m KY042141 Pigeon Pakistan Jallo Lahore 221B 2016
VI.2 VI i KU377536 Turtle dove Italy 12VIR1876 1 2012
VI.2 VI i KU377533 Turtle dove Italy 10VIR7155 2010
VI.2 VI i JN838234 dove Italy 11RS98 102VIR 2011
VI VI KC205478 chicken Ethiopia ETH-HM31C 2011
VI.1 VI b FJ410145 pigeon USA NY 1984
VI.1 VI b FJ865434 pigeon China S 1 2002
VI.1 VI b AF109885 domestic fowl Great Britain GB1188 1984
VI.2.2.2 VI e KJ807163 pigeon China LJS 1 2004
VI.2.2.2 VI e JX244794 pigeon China 100 2008
VI.2.2.2 VI e FJ480825 pigeon China PG JS 1 2005
VI.2.2.1 VI f JN872182 pigeon USA 12339 1998
VI.2.2.1 VI f JN872180 waterfowl USA TX 209882 2002
VI.2.2.1 VI f JX901312 pigeon USA 101 2001
VI.2.1.2 VI h JX518532 laughing dove Kenya B2 Isiolo 2012
VI.2.1.2 VI h HG326804 pigeon Nigeria NIE09 1898 2009
VI.2.1.2 VI h HG424827 pigeon Nigeria NIE13 92 2013
VI.2.1.1.1 VI a JX901367 pigeon USA PA 810 2008
VI.2.1.1.1 VI a JX901351 pigeon USA NJ 721 2007
VI.2.1.1.1 VI n MG018211 ECDC USA TX 1185 kidney 26981 3 A 2015
VI.2.1.1.2.2 VI k MG840854.1 pigeon China Ningxia 2068 2016
VI.2.1.1.2.2 VI k KT183282 pigeon China SH 167 2013
VI.2.1.1.2.2 VI k JX901124 pigeon Belgium 11 09620 2011
VI.2.1.1.2.1 VI j JX901110 pigeon Belgium 248 1998
VI.2.1.1.2.1 VI j JX094510 pigeon China sms12 2012
VI.2.1.1.2.1 VI j JX486563 pigeon China LHLJ 110813 2011
XX V a JN942024 cormorant USA WI 272409 2003
XX V a KC433530 cormorant USA FL 41105 2012
XX V a FJ705456 cormorant USA MN 92 40140 1992
V.1 V b JN872194 chicken Honduras 498109 15 2007
V.1 V b JN942027 fighting cock Nicaragua 95066 9 2001
V.1 V b JN872189 parrot USA Coast 8278 1992
V.2 V c EU518882 Dove Mexico Distrito Federal 482 2004
V.2 V c JQ897744 chicken Mexico NC04 636 2010
V.2 V c EU518884 chicken Mexico Estado de Mexico 486 2008
VIII VIII JX012098 Malaysia AF2240 1960
VIII VIII FJ751918 chicken China GH1 1979
VIII VIII AY734534 chicken Argentina Trenque Lauquen 1970
XVI XVI JX915243 chicken Mexico Queretaro 452 1947 1947
XVI XVI JX915242 chicken Dominican Republic 28138 4 1986
XVI XVI JX198997 chicken Dominican Republic 867 2009
IV IV AY741404 Fowl UK Herts 1933
IV IV MH998900 pullet Bulgaria Plovdiv 1153 1959
XI XI HG326802 chicken Madagascar MG 726 2008
XI XI JX518882 chicken Madagascar MGMNJ 2009
XI XI JX518884 chicken Madagascar MGS1595T 2011
III III GU182327 chicken Pakistan SPVC Karachi 1 1974
III III MH998904 pigeon Bulgaria Novo Selo 1161 1995
III III EF201805 avian Muktesvvar 1940
IX IX AF458009 chicken China FJ 1 1985
IX IX FJ436303 chicken China ZJ 1 1986
IX IX FJ436302 chicken China F48E8 1948
II II JN872151 chicken USA Hitchner B1 1947
II II AF077761 chicken USA Lasota 1946
II II GU978777 chicken USA TX GB 1948
X X a KX867716 Redhead USA ndv42 AI09 4117 2009
X X a FJ705468 mottled duck USA TX 130 2011
X X b FJ705466 mallard 99 376 1999
X X b KX867721 Mallard USA MN AI10 3434 2010
I.1.1.1 a AY935490 chicken Australia 2 1334 2002
I.1.1.1 a AY935495 chicken Australia 99 888 hi 1999
I.1.1.1 a M24893 chicken Australia Queensland 1966
I.1.2.1.1 c EF564816 redknot USA NJ A 101 1383 2001
I.1.2.1.1 c KX352834 gull Russia Tyva 14 2014
I.1.2.1.1 c GQ918260 black headed gull Sweden 1994
I.1.2.2.1 d AB485607 chicken Japan Ishi 1962
I.1.2.2.1 d KC503478 northern pintail USAAK 44600 136 2009
I.1.2.2.1 d KC503479 redpoll Russia Nikita 530 FFNK2 2008
I.2.1 b AY965078 duck Russia FarEast 2713 2001
I.2.1 b HG326805 spur winged goose Nigeria NIE08 121 2009
I.2.1 b KC503453 American green winged teal USAAK 44493 718 2009

شکل ۱-۵ درخت فیلوژنتیک ویروس های این مطالعه بهمراه دیتاست پایلوت ۱۲۵ ویروس های نیوکاسل کلاس II.


XIII.2.2 XIII b 2082 MF422129.1 chicken India 410 16A 2016
XIII.2.2 XIII b 2078 MF422125.1 chicken India 96 15 2015
XIII.2.2 XIII b 2081 MF422128.1 chicken India 248 13A2 2013
XIII.2.2 XIII b 2075 MF362988.1 chicken India PDDSL 7 2016
XIII.2.2 XIII b 2072 MF362985.1 chicken India PDDSL 4 2015
XIII.2.2 XIII b 2071 MF362984.1 chicken India PDDSL 3 2015
XIII.2.2 XIII b 2073 MF362986.1 chicken India PDDSL 5 2015
XIII.2.2 XIII b 1772 KX242342 chicken India D162 2013
XIII.2.2 XIII b 2079 MF422126.1 chicken India 478 13A 2013
XIII.2.2 XIII b 2080 MF422127.1 chicken India 805 13B 2013
XIII.2.2 XIII b 2070 MF362983.1 chicken India PDDSL 2 2015
XIII.2.2 XIII b 1767 KM056350 chicken India ndv52 Sarsa
XIII.2.2 XIII b 2077 MF422124.1 chicken India 229 13B 2013
XIII.2.2 XIII b 1768 KM056352 chicken India ndv54 Hyderabad
XIII.2.2 XIII b 1769 KP089979 chicken India Nagpur 2012
XIII.2.2 XIII b 1761 KM056344 chicken India ndv16 Godhra 03 2013
XIII.2.2 XIII b 1764 KM056347 chicken India ndv32 vaherakhadi 04 2013
XIII.2.2 XIII b 1762 KM056345 chicken India ndv20 Navli 03 2013
XIII.2.2 XIII b 1765 KM056348 chicken India ndv40 sarsa 04 2013
XIII.2.2 XIII b 1763 KM056346 chicken India ndv26 navli 03 2013
XIII.2.2 XIII b 1766 KM056349 chicken India ndv42 gopalpura 04 2013
XIII.2.2 XIII b 1771 KX061544 Red lori India CHN 2013
XIII.2.2 XIII b 1760 KF740478 Japanese quail India NDV2K35 TN 2003
XIII.2.2 XIII b 1774 KX372708 chicken India Nagpur 04 2011
XIII.2.2 XIII b 1773 KX372707 chicken India Nagpur 03 2011
XIII.2.2 XIII b 1785 KT734765 chicken India Hajo 2014
XIII.2.2 XIII b 1770 KT734767 chicken India Polashbari 2014
RT30/2010
XIII.2.1 XIII b 1745 GU182323 chicken Pakistan SPVC Karachi 43 2008
XIII.2.1 XIII b 2050 MH019281.1 chicken Pakistan PK1 2015
XIII.2.1 XIII b 1758 KF113338 chicken Pakistan University Diagnostic Lab 12 2010
XIII.2.1 XIII b 1757 JX436344 chicken Pakistan MM14 Lahore 2010
XIII.2.1 XIII b 1754 JN682191 chicken Pakistan CP Islamabad3 2010
XIII.2.1 XIII b 1748 JN682184 chicken Pakistan BYP Lahore 2010
XIII.2.1 XIII b 2324 MH392222 chicken Pakistan SPVC Karachi 27 558 2007
XIII.2.1 XIII b 2325 MH392223 chicken Pakistan SPVC Karachi 33 556 2007
XIII.2.1 XIII b 1747 GU182331 chicken Pakistan SPVC Karachi 33 2007
XIII.2.1 XIII b 1756 JQ517285 chicken Pakistan Pakistan UDL8 2011
XIII.2.1 XIII b 1749 JN682186 chicken Pakistan CP Islamabad1 2010
XIII.2.1 XIII b 1752 JN682189 chicken Pakistan CP Rawalpindi2 2010
XIII.2.1 XIII b 1755 JN682211 chicken Pakistan CP 2010
XIII.2.1 XIII b 1750 JN682187 chicken Pakistan BYP Rawalpindi 2010
XIII.2.1 XIII b 1753 JN682190 chicken Pakistan CP Islamabad2 2010
XIII.2 XIII b 2023 KY828160.1 chicken India MZ 6 2016
XIII.2 XIII b 2024 KY828159.1 chicken India MZ 5 2016
XIII.2 XIII b 2022 KY828161.1 chicken India MZ 7 2016
XIII.2 XIII b 2025 KY828158.1 chicken India MZ 4 2016
XIII.2 XIII b 2027 KY828156.1 chicken India MZ 2 2016
XIII.2 XIII b 2028 KY828155.1 chicken India MZ 1 2016
XIII.2 XIII b 2026 KY828157.1 chicken India MZ 3 2016
XIII.2 XIII b 1729 KT734766 chicken India Pandu 2015
XIII.2 XIII b 2076 MF422123.1 chicken India 110 13A 2013
XIII.1 XIII 1728 JN942041 cockatoo India 7847 ancestral 1982
XIII.1.2 XIII a 1779 JQ267580 chicken Iran EMM 6 2011
XIII.1.2 XIII a 1778 JQ267579 chicken Iran EMM 7 2011
XIII.1.2 XIII a 1781 JQ267582 chicken Iran EMM 4 2010
XIII.1.2 XIII a 1780 JQ267581 chicken Iran EMM 5 2011
XIII.1.2 XIII a 1782 JQ267583 chicken Iran EMM 3 2009
XIII.1.2 XIII a 1784 JQ267585 chicken Iran EMM 1 2008
XIII.1.2 XIII a 1783 JQ267584 chicken Iran EMM 2 2008
XIII.1.1 XIII a 1733 GU585905 chicken Sweden 1997
XIII.1.1 XIII a 1730 AY865652 Sterna albifrons Russia Astr 2755 2001
XIII.1.1 XIII a 1738 KF727980 chicken India Bareilly 2006
XIII.1.1 XIII a 1739 KJ577585 chicken India Bareilly 01 2010
XIII.1.1 XIII a 1734 HQ589257 chicken India Bareilly 1997
XIII.1.1 XIII a 1735 JN942034 ostrich South Africa 45445 3 1995
XIII.1.1 XIII a 1736 JN942043 roller Tanzania 47385 11 2010
XIII.1.1 XIII a 1737 JN942044 roller Tanzania 47387 6 2010
XIII.1.1 XIII a 1740 MF409241 1 chicken Zambia Chiwoko 2015
XIII.1.1 XIII a 1731 FJ772491 chicken Burundi 4132 12 2008
XIII.1.1 XIII a 1732 FJ772494 chicken Burundi 4132 20 2008

شکل ۲-۵ درخت فیلوژنتیک clade ژنوتیپ XIII ویروس های نیوکاسل کلاس II. بهمراه ویروس RT30/2010 که در تحت ژنوتیپ XIII.2.1 قرار گرفته و با علامت پیکان در شکل نشان داده شده است. شاخه شامل ویروس RT30/2010 بر اساس ۱۰۰۰ تکرار دارای پشتیبانی ۱۰۰٪ است.

	I	III	IV	XX	VI	VIII	XVI	XXI	XIII	XVII	XII	RT30/2010	VII	RT40/2011	XVIII	X	V	XIX	II	XIV	VIII	XI
I																						
III	11.33																					
IV	13.05	10.21																				
XX	17.30	15.92	14.18																			
VI	20.24	18.49	16.54	10.22																		
VIII	15.30	13.09	11.78	10.71	12.65																	
XVI	18.28	16.88	15.01	15.42	17.62	13.23																
XXI	20.29	18.90	17.29	10.88	11.94	13.77	18.65															
XIII	19.69	18.45	16.93	13.80	15.59	13.61	17.92	16.50														
XVII	18.70	18.54	17.18	13.89	16.03	14.40	19.13	17.18	12.63													
XII	20.16	18.51	17.01	13.16	13.97	13.26	17.89	15.73	12.09	12.46												
RT30/2010	20.41	18.85	17.35	13.91	15.95	13.89	17.61	16.95	**8.26**	13.31	12.54											
VII	19.63	17.83	16.44	13.16	14.79	13.35	18.34	15.41	13.16	14.01	12.71	13.80										
RT40/2011	20.06	18.13	16.51	13.32	15.42	14.31	18.92	15.76	14.05	14.86	12.91	14.21	**6.24**									
XVIII	19.69	18.57	17.00	13.32	14.74	13.86	18.41	16.07	12.23	10.80	12.06	12.86	13.27	14.06								
X	12.14	13.53	14.75	19.61	21.22	16.82	19.58	22.14	21.22	21.81	21.45	21.35	21.11	21.05	21.38							
V	18.54	16.49	15.42	13.87	16.21	12.21	16.13	16.91	16.41	16.32	16.01	16.70	16.51	16.94	16.31	20.24						
XIX	21.39	19.35	18.03	16.43	18.13	14.68	18.95	18.93	18.44	18.65	18.69	18.71	17.87	18.18	18.60	22.55	10.04					
II	13.13	13.73	14.84	19.15	21.17	16.72	20.57	22.20	22.05	22.32	22.96	22.46	22.31	22.53	22.31	11.90	20.01	21.93				
XIV	23.25	22.80	20.19	17.00	18.34	16.33	21.03	18.92	15.00	13.72	14.36	14.77	15.78	17.05	13.91	24.35	18.82	21.20	26.52			
VIII	21.17	20.05	18.72	16.86	18.90	11.23	19.20	19.93	20.23	20.25	20.69	20.52	20.69	21.10	20.33	22.45	17.94	19.42	21.53	22.25		
XI	20.62	18.84	15.40	22.35	24.44	20.17	24.12	25.04	24.48	23.61	25.42	25.30	25.23	25.49	24.03	22.80	22.11	25.14	22.60	29.34	25.94	

جدول ۱-۵- تخمین فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین ژنوتیپ های NDV کلاس II و دو جدایه RT30/2010 و RT40/2011. تعداد جایگزینی بازهای توالی نوکلئوتیدی کامل ژن F در هر محل حاصل از میانگین گرفتن تمامی جفت بازها بین ژنوتیپ های کلاس II و دو جدایه نشان داده شده است. فاصله تکاملی بین ژنوتیپ VII و جدایه های RT40/2011 و RT298/2019 و ژنوتیپ XIII و جدایه RT30/2010 در خانه های رنگی نشان داده شده است.

٤-٥- فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین جدایه های این مطالعه و تحت ژنوتیپ های VII و XIII ویروس های نیوکاسل کلاس II.

جهت بررسی وضعیت تکاملی ۱۹ ویروس متعلق به ژنوتیپ VII و جدایه RT30/2010 متعلق به ژنوتیپ XIII ،آنالیز فواصل تکاملی نوکلئوتیدی این جدایه ها با تمامی تحت ژنوتیپ های ژنوتیپ ها با تمامی تحت ژنوتیپ های ژنوتیپ VII و XIII انجام گرفت که به ترتیب در جداول ۲-۵ و ۳-۵ آورده شده است. مقایسه فواصل تکاملی نوکلئوتیدی در بین ویروس های جدا شده در سال های مختلف نشان داد که این روند تکاملی سال به سال در حال افزایش می باشد بطوریکه این اعداد از ۱/۰۲ در سال ۲۰۱۱ به ۲/۰۷ درصد در سال ۲۰۱۹ رسیده است.

Subgenotypes	VII.2	VII.1.2	VII.1.1
VII.2			
VII.1.2	0.0835		
VII.1.1	0.1007	0.0582	
RT780/2018	0.1088	0.0679	**0.0571**
RT698/2012	0.1120	0.0707	**0.0589**
RT685/2019	0.1144	0.0746	**0.0638**
RT651/2019	0.1124	0.0708	**0.0605**
RT606/2018	0.1132	0.0716	**0.0613**
RT589/2018	0.1098	0.0691	**0.0594**
RT573/2012	0.1060	0.0641	**0.0522**
RT538/2018	0.1132	0.0716	**0.0612**
RT498/2019	0.1087	0.0700	**0.0590**
RT40/2011	0.1021	0.0607	**0.0508**
RT349/2018	0.1162	0.0743	**0.0624**
RT298/2019	0.1094	0.0697	**0.0601**
RT257/2017	0.1120	0.0707	**0.0589**
RT189/2019	0.1086	0.0725	**0.0595**
RT1830/2012	0.1070	0.0640	**0.0529**
RT1811/2012	0.1049	0.0627	**0.0509**
RT1763/2012	0.1047	0.0622	**0.0507**
RT1688/2012	0.1040	0.0615	**0.0501**
RT1579/2012	0.1110	0.0695	**0.0570**

جدول ۲-۵- تخمین فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین تحت ژنوتیپ های VII و جدایه های این مطالعه. تعداد جایگزینی بازهای توالی نوکلئوتیدی کامل ژن F در هر محل حاصل از میانگین گرفتن تمامی جفت بازها بین تحت ژنوتیپ های VII و ۱۹ جدایه این مطالعه خانه ها به ترتیب نزدیکی تکاملی پررنگ تر شده اند.

Subgenotypes	XIII.1	XIII.1.1	XIII.1.2	XIII.2	XIII.2.1	XIII.2.2
XIII.1						
XIII.1.1	0.0493					
XIII.1.2	0.0401	0.0541				
XIII.2	0.0873	0.1185	0.1127			
XIII.2.1	0.0622	0.0968	0.0637	0.1235		
XIII.2.2	0.0711	0.1053	0.0775	0.1313	0.0663	
RT30/2011	0.0646	0.1059	0.0729	0.1261	**0.0591**	0.0751

جدول ۲-۵- تخمین فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین تحت ژنوتیپ های XIII و جدایه RT30/2010. تعداد جایگزینی بازهای توالی نوکلئوتیدی کامل ژن F در هر محل حاصل از میانگین گرفتن تمامی جفت بازها بین تحت ژنوتیپ های XIII و ویروس RT30/2010 نشان داده شده است. بیشترین نزدیکی تکاملی جدایه RT30/2010 با ژنوییپ ها در خانه رنگی مشخص شده است.

	Isolate of 2010	Isolate of 2011	Isolates of 2012	Isolate of 2017	Isolates of 2018	Isolates of 2019
Isolate of 2010						
Isolate of 2011	14.23					
Isolates of 2012	14.45	**1.20**				
Isolate of 2017	15.27	**1.87**	1.38			
Isolates of 2018	15.21	**1.95**	1.58	1.08		
Isolates of 2019	15.29	**2.07**	1.75	1.48	1.00	

جدول ۳-۵- تخمین فواصل تکاملی نوکلئوتیدی ۱۹ جدایه تحت ژنوتیپ های VII 1.1 این مطالعه به تفکیک سال وقوع بیماری که بصورت درصدی بیان شده است. اعداد مفایسه ای بین ویروس سال ۲۰۱۰ با ویروس های جدا شده در سال های بعدی بصورت پررنگ مشخص شده است.

٦. بحث:

بیماری نیوکاسل مهمترین بیماری تنفسی ویروسی گله های مرغ گوشتی در استان خراسان رضوی است که موجب خسارت های اقتصادی فراوانی عموما به اشکال افزایش تلفات و کاهش تولید تخم مرغ می شود. این بیماری از سال ۱۳۸۷ در استان شایع شد و با وجود اعمال واکسیناسیون های فشرده علیه این بیماری تاکنون صنعت طیور استان نتوانسته است از بیماری رهایی یابد. جهت مشخص شدن پاتوتیپ و ژنوتیپ های در حال گردش ویروس و همچنین تعیین میزان نقش عامل این بیماری در سندرم های تنفسی گله های مرغ گوشتی استان مطالعه ای در سال ۱۳۸۹ انجام شد. در آن مطالعه مشخص شد که بیماری نیوکاسل چه به صورت بالینی یا به شکل عفونت آن به طور گسترده ای در بین گله های مرغ تجاری استان شایع می باشد (۸۱٪) و نقش عمده ای را در وقوع سندرم های تنفسی گله ها به عهده دارد. ویروسهای عامل بیماری منشاء یکسانی داشتند و متعلق به تحت ژنوتیپ VIId ویروس های بیماری نیوکاسل بودند(Toroghi, 2014). بیشترین سعی و تلاش جهت کنترل بیماری در طی ده سال گذشته معطوف به استفاده گسترده از سیاست واکسیناسیون های فشرده بوده است. استفاده بسیار فشرده از واکسن ها در انواع مختلف آن بهمراه برنامه های بسیار متنوع واکسیناسیون اگرچه توانست تا حدودی از میزان شدت علائم و تلفات بیماری در بین گله های مرغ تجاری را بکاهد ولی نتوانست بطور موثری از گردش عامل بیماری جلوگیری بعمل آورد. شدت گرفتن دوره ای بیماری در طی سال های گذشته این ظن را در بین پرورش دهندگان و کلینیسین های طیور استان ایجاد کرده است که به احتمال زیاد در ماهیت ویروس در حال گردش تغییراتی حاصل شده است و یا اینکه ما با ژنوتیپ های جدیدی از ویروس مواجه شده ایم. این ظن در حال حاضر درخواست برای ورود واکسن های جدید جهت مقابله با شرایط جدید بیماری را بیشتر و بیشتر کرده است. از اینروی، جهت جوابگوئی به اینگونه ابهامات

پایش منظم و پیوسته عامل بیماری در سطح استان را برنامه ریزی نمودیم. برای نیل به این هدف، در مرحله اول مقرر شد بانک ژنی ویروس بیماری نیوکاسل استان که متشکل از تمامی ویروس های جداسازی شده بود انجام گیرد. سپس این روند بصورت مستمر و پیوسته توسط آزمایشگاه رفرانس منطقه ای بیماری نیوکاسل مستقر در موسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی شمال شرق کشور ادامه یابد. در ابتدا سعی شد تمامی نمونه های بافتی قدیمی و جدید مشکوک به بیماری موجود در استان جمع آوری شود. تعداد ۱۵۲ نمونه بافتی یا نمونه ویروسی برای یک دوره ۱۳ ساله (بین سالهای ۱۳۸۵ تا ۱۳۹۸) جمع آوری شد. جداسازی ویروس یا تازه سازی ویروس در ۵۳ مورد با موفقیت انجام گرفت (حدود ۳۵٪). علل متعددی در نرسیدن به انتظارات اولیه ما برای جداسازی ویروس وجود داشت که می توان به نداشتن شرایط نگهداری دلخواه و مطلوب در تعدادی از نمونه ها، انجام یکبار پاساژ به علت محدودیت های دسترسی به تخم مرغ های جنین دار SPF و مشکلات تشخیص اولیه بیماری توسط کلینیسین اشاره نمود. از طرفی با توجه به اعمال واکسیناسیون های فشرده در سطح گله های مرغ تجاری استان و احتمال جداسازی همزمان ویروس های واکسنی بهمراه ویروس های وحشی، سعی شد جداسازی های ویروسی بیشتر از بافت مغز انجام گیرد. این مهم شانس جداسازی در مواردی که بیماری بسیار حاد یا حاد نیست و یا اینکه ویروس وحشی تروپیسم زیادی به مغز نداشته باشد را کمتر می کند.

با توجه به طیف میزبانی که در مطالعه دیده می شود به نظر میرسد طیف وسیعی از انواع پرندگان در سطح استان از این بیماری رنج می برند و در اندازه های متفاوت دچار خسارات اقتصادی شده اند. تعداد ۲۰ جدایه ویروس بیماری که از گله های گوشتی، تخمگذار، بومی و بوقلمون شهرهای مختلف استان در یک دوره زمانی ۱۰ ساله جداسازی شده بود برای تعیین توالی کامل ژن F آنها انتخاب شدند. تعیین توالی نشان داد که تمامی ویروس های در حال گردش در بین گله های طیور استان مانند ویروس های قدیمی استان بوده و همگی آنها بنا به طبقه بندی

جدید متعلق به تحت ژنوتیپ VII.1.1 می باشند. فقط یک ویروس جداشده از مرغ بومی شهرستان مشهد (RT30/2010) کاملا متفاوت از سایر ویروسها بود و در تحت ژنوتیپ XIII.2.1 قرار گرفت. این جدایه در سال ۱۳۸۸ جدا شده بود. چون تا کنون ما نتوانسته ایم این تحت ژنوتیپ را در وقوع بیماری در سطح استان ردیابی نماییم بر این باوریم که خوشختانه این ویروس نتوانسته است در بین گله های مرغ تجاری استان شایع شود. اطلاعات بدست آمده تاکنون موید این مهم است که خوشبختانه تاکنون استان با ژنوتیپ جدیدی از ویروس بیماری آلوده نشده است و ویروس های در حال گردش از همان منشاء اولیه می باشند و اصرار بر ورود واکسن های جدید نمی تواند رهیافت درستی باشد.

چرخش جهانی ویروس بیماری نیوکاسل و تکامل تدریجی این ویروس موجب ظهور واریانت های جدید این ویروس در سطح مزرعه شده است که همواره مشکلاتی را در خصوص تعیین هویت آنها بر اساس اطلاعات موجود ایجاد می کند. در بین سیستم های شناسائی و تعیین هویت مولکولی ویروس های بیماری نیوکاسل، تا کنون سه سیستم شاخص مطرح شده است. در سال ۲۰۰۳ آلدوس و همکاران بر اساس تعیین توالی قسمتی از ابتدای ژن F اولین سیستم قابل قبول عامه را ارائه نمودند که ویروس های بیماری نیوکاسل را به شش لینیج و ۱۳ تحت لینیج تقسیم بندی نمودند(Aldous et al., 2003). با ورود ویروس های جدید و مشکلات جدید طبقه بندی این ویروسها این سیستم نتوانست پاسخگوی تمامی شبهات موجود باشد. لذا در سال ۲۰۱۲ دیل و همکاران سیستم جدیدی مبتنی بر معیارهای تعریف شده ای بر اساس سکانس کل ژن F را تعریف کردند که مقبولیت زیادی پیدا کرد. در این سیستم چهار معیار هدفمند از جمله توپولوژی فیلوژنتیک؛ فاصله های تکاملی نوکلئوتیدی بین جمعیتی؛ پشتیبانی شاخه درخت فیلوژنی و استقلال اپیدمیولوژیک حداقل چهار ایزوله در هر ژنوتیپ و یا تحت ژنوتیپ برای طبقه بندی مطرح شد. بر این اساس ویروس های نیوکاسل در دو کلاس I و II قرار گرفتند. کلاس I به یک

ژنوتیپ منفرد (ژنوتیپ ۱) حاوی سه تحت ژنوتیپ شد و کلاس II به ۱۵ ژنوتیپ (I تا XV) و چندین تحت ژنوتیپ تقسیم بندی شدند(Diel et al., 2012a). اگرچه این سیستم بطور گسترده پذیرفته و مورد استفاده قرار گرفت ولی مجددا ورود ویروس های جدید با نامگذارهای متفاوت منجر ناهماهنگ های جدید در تقسیم بندی ژنوتیپ های جدید شد. علاوه بر این، با افزایش تلاش های نظارتی و بهبود فناوری های تعیین توالی، میزان توالی های موجود در بانک های ژنی بطور گسترده ای افزایش یافت و به چالش بیان شده دامن زد. برای رسیدگی به این مسائل، گروه بزرگی متشکل از دانشمندان و همکاران بین المللی از ۲۹ آزمایشگاه از تمام قاره ها (به جز قطب جنوب) و نمایندگان کلیه آزمایشگاه های مرجع OIE برای بیماری نیوکاسل در اوایل سال ۲۰۱۴ تأسیس شد. ماموریت این گروه سامان دهی و تجدید نظر در سیستم های موجود طبقه بندی ویروس بیماری نیوکاسل بود که نتیجه این کنسرسیوم پیشنهاد طبقه بندی و معیارهای نامگذاری جدید برای ویروس بیماری نیوکاسل بود که در قالب مقاله ای این معیارها درسال جاری به اطلاع عموم رسید (Dimitrov et al., 2019). همکنون این الگو جدیدترین و قابل قبول ترین سیستم موجود برای طبقه بندی ژنوتیپ های ویروس بیماری نیوکاسل می باشد.

در این سیستم جدید بطور قابل توجه ای طبقه بندی ویروس های ژنوتیپ VII کوچک و مختصر شده است. بسیاری از تحت ژنوتیپ های این ژنوتیپ نتوانستند معیارهای تعریف شده این سیستم را بدست آورند. تمامی تحت ژنوتیپ های قبلی (VIIb, VIId, VIIi, VIIj, VIIl, VIIe, VIIf, VIIg, VIIh, VIIk) در سه تحت ژنوتیپ VII.1.1, VII.1.2 و VII.2 طبقه بندی جدید شدند. مثلا تحت ژنوتیپ های VIIb, VIId, VIIe, VIIj و VIIl نتوانستند معیار فاصله تکاملی نوکلئوتیدی و برای تحت ژنوتیپ های VIIh, VIIi و VIIk نتوانستند معیار حمایت شاخه مستقل را پرنمایند. علاوه بر این برای تحت ژنوتیپ VIIk مشکل عدم حمایت جدایه های مستقل نیز وجود داشت. تحت ژنوتیپ های VIIb, VIId, VIIe, VIIj که مسئول چهارمین پاندمی بیماری

نیوکاسل بودند در طبقه بندی جدید در تحت ژنوتیپ VII.1.1 قرار گرفتند. همچنین تحت ژنوتیپ های VIIhو VIIiکه مسئول پنجمین پاندمی بیماری نیوکاسل در اندونزی، خاورمیانه، اروپا، آفریقا و آسیا بودند در طبقه بندی جدید در تحت ژنوتیپ VII.2 قرار گرفتند .

به عبارتی تمامی گزارشات قبلی ویروس های بیماری نیوکاسل از ایران که در قالب تحت ژنوتیپ های VIId، VIIl یا VIIi گزارش شده بود همکنون بنا به طبقه بندی جدید می بایستی در تحت ژنوتیپ VII.1.1 قرار گیرند. آنالیز فیلوژنی جدایه های این مطالعه بر اساس این طبقه بندی جدید انجام شد و مشخص شد که تمامی ویروس های بیماری نیوکاسل این مطالعه و ویروس هایی که در سال های اخیر از ایران گزارش شده اند متعلق به تحت ژنوتیپ VII.1.1 می باشند. مهمترین مزیت اعمال این سیستم جدید در نمونه های ایرانی رها شدن از سردرگمی های زیادی بود که ایجاد شده بود.

بر اساس معیارهای هدفمند برای طبقه بندی NDV، در ژنوتیپ های متفاوت میانگین فاصله در هر سایت بیشتر از ۰/۱ (۱۰٪) و برای تحت ژنوتیپ های متفاوت میانگین فاصله در هر سایت بیشتر از ۰/۰۵ (۵٪) می باشد (Dimitrov et al., 2019). وجود تغییرات افزایشی فواصل تکاملی نوکلئوتیدی ۱۹ جدایه تحت ژنوتیپ VII 1.1 این مطالعه(از۱/۰۲ تا ۲/۰۷ درصد) که بین سال های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۹ اتفاق افتاده است موید وجود سیر تکاملی این ویروس در استان خراسان رضوی در طی پاساژهای متوالی است که در سطح فیلد اتفاق افتاده است. این امر می تواند زنگ خطر بزرگی برای مباحث کنترل و پیشگیری بیماری باشد. به عبارتی نکته بسیار مهمی که از نگاه گذشته نگر این مطالعه حاصل شد این مهم بود که اعمال واکسیناسیون های فشرده، گردش بسیار زیاد ویروس در اشکال مختلف بیماری یا عفونت بیماری در سطح مزرعه و وجود فشار بسیار زیاد ایمنی در پرندگان موجب شده است که ویروس سیر تکاملی خود را خیلی سریع تر از حد مورد انتظار طی کند. پدیده ای که به وضوح در جدول تفاوت

فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین جدایه های این مطالعه در طی زمان دیده می شود. مهمترین راهبرد کنترل و پیشگیری که از این مطالعه حاصل شد این نکته بود که در آینده بر خلاف انتظارات پرورش دهندگان و سندیکاهای مربوطه شان جهت کنترل بهتر بیماری در منطقه به جای تمرکز به واکسن و جستجوی ویروس های جدید بیماری بایستی به پیاده سازی تدریجی رعایت اصول امنیت زیستی به هر قیمتی که شده پرداخت و چون این امر یک امر فرهنگی است نبایستی انتظار جوابدهی در زمان کوتاه را داشت.

در حال حاضر ژنوتیپ XIII که قبلا به تحت ژنوتیپ XIIIa و XIIIb تقسیم می شد همکنون بر اساس طبقه بندی جدید به ۴ تحت ژنوتیپ (XIIIa به XIII.1.1 و XIII.1.2 و XIIIb به XIII.2.1 و XIII.2.2) تقسیم شده است (Dimitrov et al., 2019). ویروس های جدا شده از کشورهای مختلف قاره آفریقا بین ۱۹۹۵ تا ۲۰۱۵ تحت ژنوتیپ XIII.1.1 را تشکیل داده اند، در حالی که ویروس های سوئد، روسیه، هند و ایران جدا شده در بین سال های ۱۹۹۷ تا ۲۰۱۱ در تحت ژنوتیپ XIII.1.2 طبقه بندی شده اند. در طی دهه گذشته ویروس های جدا شده از پاکستان و هند به ترتیب تحت ژنوتیپ های XIII.2.1 و XIII.2.2 را تشکیل می دهند. ویروس های ژنوتیپ XIII حداقل در سه قاره به طور گسترده توزیع می شوند (Cattoli et al., 2010, Munir et al., 2012, Nath et al., 2016, Shabbir et al., 2013). فواصل ژنتیکی زیادی بین کلیدهای ژنوتیپ XIII مشاهده می شود و تکامل مداوم ویروس و افزودن داده های ژنتیکی جدید احتمالاً طبقه بندی این ژنوتیپ را تغییر می دهد . در آنالیز فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین تحت ژنوتیپ های XIII مشاهده شد که ویروس RT30/2010 دارای کمترین فاصله با تحت ژنوتیپ XIII.2.1 و بیشترین فاصله با تحت ژنوتیپ XIII.2 می باشد. البته قابل ذکر است که با وجود فاصله زیاد تحت ژنوتیپ XIII.2 با سایر تحت ژنوتیپ ها، به دلیل عدم

وجود حمایت شاخه و عدم وجود ایزوله های مستقل، در حال حاضر این ویروس ها که از کشور هند جدا شده اند، قابلیت ایجاد تحت ژنوتیپ جدید را ندارند.

بر اساس درخت فیلوژنی و در نظر گرفتن فواصل تکاملی نوکلئوتیدی، ویروس RT30/2010 در تحت ژنوتیپ XIII.2.1 قرار گرفت. این در صورتی است که ویروس های ابراهیمی و همکاران که در بین سال های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۰ از ایران گزارش کرده بودند (Ebrahimi et al., 2012) در clade تحت ژنوتیپ XIII.1.2 قرار گرفتند. این ویروسها بسیار شبیه ویروس هایی بودند که از کشورهای هند، روسیه، سوئد و آفریقای جنوبی گزارش شده بودند. وجود فاصله تکاملی نوکلئوتیدی ۰/۰۷۲۹ با ویروس RT30/2010 موید جدا بودن خاستگاه های این ویروس ها می باشد. ویروس های تحت ژنوتیپ XIII.2.1 متشکل از مجموعه ای از ویروس های بیماری نیوکاسل است که بین سال های ۲۰۰۷ و ۲۰۰۸ از کشور پاکستان گزارش شده اند. با توجه به زمان جداسازی ویروس RT30/2010 و وجود واردات غیر قانونی پرندگان زینتی از پاکستان به ایران که هر ساله بطور معمول انجام می شود به نظر میرسد منشاء ورود این ویروس از طریق مرغ های زینتی یا پرندگان زینتی مانند طوطی باشد. بخصوص اینکه بیشترین شباهت ویروس RT30/2010 به ویروس GU182323 است که در سال ۲۰۰۸ از پاکستان گزارش شده است. قابل ذکر است که عدم مشاهده این تحت ژنوتیپ در گله های مرغ تجاری استان در طی سال های گذشته را می توان به فال نیک گرفت و امیدوار بود که ویروس نتوانسته است خودش را به گله های حساس به بیماری برساند و به گونه ای منجر به قطع زنجیره انتقال به گله های تجاری در طی گذر زمان شده است.

اگرچه در این رخداد به نظر میرسد شانس با صنعت طیور استان همراه بوده است ولی این بدین معنی نیست که این امر همیشه اتفاق بیافتد. نظارت کامل در خصوص اینگونه مراودات غیر قانونی می تواند نجات دهنده صنعت در آینده باشد و بایستی به عنوان یک دریچه جدی و فعال در انتقال بیماری به کشور مد نظر قرار گیرد. دومین راهبرد

عملی که در خصوص پیشگیری از این بیماری با ژنوتیپ های مختلف بیماری در سطح استان می توان در نظر گرفت این نکته است که بایستی اقدامات جدی در خصوص ورود یا قاچاق مرغ های زینتی یا پرندگان زینتی مانند طوطی از طریق کشور پاکستان اعمال نمود. اگرچه استقبال عمومی از خرید و فروش مرغ های زینتی و جوجه طوطی های سبز بخصوص در فصل بهار در استان خراسان رضوی زیاد می باشد ولی همواره بایستی در نظر داشت ورود هر یک از این پرندگان برابر است با احتمال ورود یک تحت ژنوتیپ جدید بخصوص از ژنوتیپ های XIII که سال های طولانی است که صنعت طیور کشور با این ژنوتیپ درگیر نیست. ناگفته پیداست که خطر ورود یک ژنوتیپ جدید به مراتب از تغییرات مرتبط با سیر تکاملی نیوکاسل در منطقه که قبلا اشاره شد خطرناک تر است چون اتفاقاتی که با ورود یک ژنوتیپ جدید خواهد افتاد برابر با تمام تغییراتی است که ویروس در صدد است طی سال های طولانی طی پاسازهای طولانی در میزبان حساس بدست آورد. از اینروی به نظر میرسد تمرکز بر این موضوع بایستی با سرعت و شدت بیشتری در کنار راهبرد اول دنبال شود. بعلاوه اینکه اعمال روش های پیشگیری در این خصوص عملیاتی تر و اجرائی تر می باشد. با توجه به شباهت زیاد ویروس های در حال گردش و احتمال وجود منشاء یکسان برای این ویروسها بهتر است تمرکز بیشتری بر ویروس های جدا شده از مرغ های بومی و یا سایر رده های پرندگان نمود تا بتوان با اطلاعات بیشتری به سمت طراحی روش های کنترل و پیشگیری بیماری حرکت کرد. چه بسا که اگر ورود جدیدی از ژنوتیپ های ویروس بیماری نیوکاسل در استان را تجربه کنیم به احتمال زیاد می تواند با منشاء پرندگان وارداتی باشد. با توجه به عدم اجرای قوانین سخت گیرانه برای این دریچه ورودی ویروس به کشور، بهتر است هر گونه وقوع بیماری نیوکاسل در مرغ های بومی استان را کاملا جدی و اورژانسی اطلاق نموده تمامی شرایط حذف و پاکسازی همانند آنچه برای آنفلونزای فوق حاد انجام می شود در این

موارد به اجرا گذاشته شود. اجرای واکسیناسیون سرتاسری یا حداقل توجه بیشتر به واکسیناسیون مرغ های بومی روشی دیگر برای کاهش وقوع بیماری و باالتبع کاهش بار ویروسی در منطقه خواهد بود.

به نظر میرسد تلاش انجام شده در این مطالعه از معدود مطالعاتی است که بصورت سیستماتیکو روشمند به جمع آوری بانک ژنی ویروس بیماری نیوکاسل در یک استان پرداخته است و سعی بر آن داشته که از اطلاعات بدست آمده در جهت ایجاد راهبردهای کنترل و یشگیری بیماری استفاده نماید. بدیهی است پویایی این حرکت مبتنی بر استمرار و به روز بودن این بانک ژنی و ایجاد حرکت های رفت و برگشتی بین آزمایشگاه و مزرعه است.

References:

ALDOUS, E., MYNN, J., BANKS, J. & ALEXANDER, D. 2003. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian pathology*.۲۵۵-۲۳۷ ,۳۲ ,

BOROOMAND, Z., JAFARI, R. A. & MAYAHI, M. 2016. Molecular characterization and phylogenetic study of the fusion genes of Newcastle disease virus from the recent outbreaks in Ahvaz, Iran. *Virusdisease*, 27**,** 102-105.

BOZORGMEHRI-FARD, M. H & .KEYVANFAR, H. 1979. Isolation of Newcastle disease virus from teals (Anas crecca) in Iran. *J Wildl Dis,* 15**,** 335-7.

BUTT, S. L., DIMITROV, K. M., ZHANG, J., WAJID, A., BIBI, T., BASHARAT, A., BROWN, C. C., REHMANI, S. F., STANTON, J. B. & AFONSO, C. L .۲۰۱۹ .Enhanced phylogenetic resolution of Newcastle disease outbreaks using complete viral genome sequences from formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. *Virus genes***,** 1-11.

CATTOLI, G., FUSARO, A., MONNE, I., MOLIA, S., LE MENACH, A., MAREGEYA ,B., NCHARE, A., BANGANA, I., MAINA, A. G. & KOFFI, J.-N. G. 2010. Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa—implications for diagnosis and control. *Veterinary microbiology,* 142**,** 168-176.

DIEL, D. G., DA SILVA, L. H., LIU, H., WANG, Z., MILLER, P. J. & AFONSO, C. L. 2012a. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infection, genetics and evolution,* 12.۱۷۷۹-۱۷۷۰ ,

DIEL, D. G., SUSTA, L., CARDENAS GARCIA, S., KILLIAN, M. L., BROWN, C. C., MILLER, P. J. & AFONSO, C. L. 2012b. Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America. *J Clin Microbiol,* 50**,** 378-87.

DIMITROV, K. M., ABOLNIK, C., AFONSO, C. L., ALBINA, E., BAHL, J., BERG, M., BRIAND, F.-X., BROWN, I. H., CHOI, K.-S. & CHVALA, I. 2019. Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infection, Genetics and Evolution***,** 103917.

EBRAHIMI, M. M., SHAHSAVANDI, S., MOAZENIJULA, G. & SHAMSARA, M. 2012. Phylogeny and evolution of Newcastle disease virus genotypes isolated in Asia during 2008-2011. *Virus Genes,* 45**,** 63-8.

ESMAELIZAD, M., ASHTIANI, M. P., NIARAKI, S. J. & HASHEMNEJAD, K. 2 .۰۱۲Identification of 23 specific nucleotide patterns in the HN gene of Newcastle disease viruses isolated from Iran. *Turkish Journal of Biology,* 36**,** 135-142.

GHALYANCHILANGEROUDI, A., HOSSEINI, H., JABBARIFAKHR, M., FALLAH MEHRABADI, M. H., NAJAFI, H ,.GHAFOURI, S. A., MOUSAVI, F. S., ZIAFATI, Z. & MODIRI, A. 2018. Emergence of a virulent genotype VIIi of Newcastle disease virus in Iran. *Avian pathology,* 47**,** 509-519.

GHIAMIRAD, M., POURBAKHSH, A., KEYVANFAR, H., MOMAYAZ, R., CHARKHKAR, S. & ASHTARI ,A. 2010. Isolation and characterization of Newcastle disease virus from ostriches in Iran. *African Journal of Microbiology Research,* 4**,** 2492-2497.

GOUDARZI, H., BORM, S., BASHASHATI, M., SABOURI, F., ABDOSHAH, M., NOURI, A., BANANI, M., EBRAHIMI, M. M & .MOLOUKI, A. 2019. Characterization and full genome sequencing of a velogenic Newcastle disease virus (NDV) strain Ck/IR/Beh/2011 belonging to subgenotype VII (L). *Acta virologica,* 63**,** 217-222.

HADIPOUR, M., HABIBI, G., GOLCHIN, P., HADIPOURFARD, M & .SHAYANPOUR, N. 2011. The role of avian influenza, newcastle disease and infectious bronchitis viruses during the respiratory disease outbreak in commercial broiler farms of Iran. *Int J Anim Vet Adv,* 3**,** 69-72.

HE, Y., TAYLOR, T. L., DIMITROV, K. M., BUTT, S. L., STANTON, J. B., GORAICHUK, I. V., FENTON, H., POULSON, R., ZHANG, J. & BROWN, C. C. 2018. Whole-genome sequencing of genotype VI Newcastle disease viruses from formalin-fixed paraffin-embedded tissues from wild pigeons reveals continuous evolution and previously unrecognized genetic diversity in the US. *Virology journal,* 15**,** 9.

HEMMATZADEH, F., NAYERI, B. & TOFIGHI, E. 2006. Antigenic differences in Newcastle disease viruses isolated in Iran. *International Journal of Poultry Science,* 5**,** 408-41.۰

KIANIZADEH, M., AINI, I., OMAR, A. R., YUSOFF, K., SAHRABADI, M. & KARGAR, R. 2002. Sequence and phylogenetic analysis of the fusion protein cleavage site of Newcastle disease virus field isolates from Iran. *Acta Virol,* 46**,** 247-51.

KIANIZADEH, M ,.IDERIS, A., SHAHRABADI, M., KARGAR, R., POURBAKHSH, S., OMAR, A. & YUSOFF, K. 1999. Biological and molecular characterization of Newcastle disease virus isolated from Iran. *Arch Razi Ins,* 50**,** 1-10.

KIM, S. H., NAYAK, S., PALDURAI, A., NAYAK, B., SAMUEL ,A., APLOGAN, G. L., AWOUME, K. A., WEBBY, R. J., DUCATEZ, M. F., COLLINS, P. L. & SAMAL, S. K. 2012. Complete genome sequence of a novel Newcastle disease virus strain isolated from a chicken in West Africa. *J Virol,* 86**,** 11394-5.

LINDE, A. M., MUNIR, M ,.ZOHARI, S., STAHL, K., BAULE, C., RENSTROM, L. & BERG, M. 2010. Complete genome characterisation of a Newcastle disease virus isolated during an outbreak in Sweden in 1997. *Virus Genes,* 41**,** 165-73.

MAYAHI, V. & ESMAELIZAD, M. 2017. Molecular evolution and epidemiological links study of Newcastle disease virus isolates from 1995 to 2016 in Iran. *Archives of virology,* 162**,** 3727-3743.

MOLOUKI, A., MEHRABADI, M. H. F., BASHASHATI, M., AKHIJAHANI, M. M., LIM, S. H. E. & HAJLOO, S. A. 2019a. NDV subgenotype VII (L) is currently circulating in commercial broiler farms of Iran, 2017–2018. *Tropical animal health and production,* 51**,** 1247-1252.

MOLOUKI, A., MEHRABADI, M. H. F., BASHASHATI, M., AKHIJAHANI, M. M., LIM, S. H. E. & HAJLOO, S. A. 2019b. NDV subgenotype VII(L) is currently circulating in commercial broiler farms of Iran, 2017-2018. *Trop Anim Health Prod,* 51**,** 1247-1252.

MOMAYEZ, R., GHARAHKHANI, P., POURBAKHSH, S. A., TOROGHI, R., SHOUSHTARI, A. H. & BANANI, M. 2007. Isolation and pathogenicity identification of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease) virus from a Japanese quail flock in Iran. *Archives of Razi Institute,* 62**,** 39-44.

MUNIR, M ,.CORTEY, M., ABBAS, M., AFZAL, F., SHABBIR, M. Z., KHAN, M. T., AHMED, S., AHMAD, S., BAULE, C. & STåHL, K. 2012. Biological characterization and phylogenetic analysis of a novel genetic group of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in commercial poultry and from backyard poultry flocks in Pakistan. *Infection, Genetics and Evolution,* 12**,** 1010-1019.

NATH, B., BARMAN, N. N. & KUMAR, S. 2016. Molecular characterization of Newcastle disease virus strains isolated from different outbreaks in Northeast India during 2014–15. *Microbial pathogenesis,* 91**,** 85-91.

SABOURI, F., MARANDI, M. V., KARIMI, V., MALEKAN, M. & BASHASHATI, M. 2016. Genetic analysis of avian paramyxovirus type I strains isolated from backyard poultry in Iran. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences,* 40**,** 750-756.

SABOURI, F., VASFI MARANDI, M. & BASHASHATI, M. 2018. Characterization of a novel VIIl sub-genotype of Newcastle disease virus circulating in Iran. *Avian pathology,* 47**,** 90-99.

SHABBIR, M. Z., ZOHARI, S., YAQUB, T., NAZIR, J., SHABBIR, M. A. B., MUKHTAR, N., SHAFEE, M., SAJID, M., ANEES, M. & ABBAS, M. 2013. Genetic diversity of Newcastle disease virus in Pakistan: a countrywide perspective. *Virology journal,* 10**,** 170.

SHITTU, I., SHARMA, P., VOLKENING, J .D., SOLOMON, P., SULAIMAN, L. K., JOANNIS, T. M., WILLIAMS-COPLIN, D., MILLER, P. J., DIMITROV, K. M. & AFONSO, C. L. 2016. Identification and Complete Genome Sequence Analysis of a Genotype XIV Newcastle Disease Virus from Nigeria. *Genome Announc,* 4.

SOLTANI, M., PEIGHAMBARI, S., POURBAKHSH, S., ASHTARI, A., FAR, A. R. & ABDOSHAH, M. 2019. Molecular characterization of haemagglutinin-neuraminidase gene among virulent Newcastle disease viruses isolated in Iran. *Iranian journal of veterinary research,* 2.١ ,٠

TAMURA, K., NEI, M. & KUMAR, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 101**,** 11030-11035.

TOROGHI, R. 2011. Isolation and nucleotide sequencing of the fusion protein gene cleavage site of Newcastle disease viruses contributing in respiratory syndromes of commercial chicken flocks in Khorasan Razavi province. *RVSRI Project Final Report*

TOROGHI, R. An investigation into the contribution of various infectious viral and bacterial agents in poultry respiratory diseases in northeast Iran. 4th International Veterinary Poultry Congress, Febbruary 16-17, 2014 Iran, Tehran.

WANG, J., LIU, H., LIU, W., ZHENG, D., ZHAO, Y., LI, Y., WANG, Y., GE, S., LV ,Y., ZUO, Y., YU, S. & WANG, Z. 2015. Genomic Characterizations of Six Pigeon Paramyxovirus Type 1 Viruses Isolated from Live Bird Markets in China during 2011 to 2013. *PLoS One,* 10**,** e0124261.

WANG, J., LV, Y., ZHANG, Y., ZHENG, D., ZHAO, Y., CASTELLAN ,D., LIU, H. & WANG, Z. 2016. Genomic Characterizations of a Newcastle Disease Virus Isolated from Ducks in Live Bird Markets in China. *PLoS One,* 11**,** e0158771.

XU, M., CHANG, S., DING, Z., GAO, H. W., WAN, J. Y., LIU, W. S., LIU, L. N., GAO, Y. & XU, J .۲۰۰۸ . Genomic analysis of Newcastle disease virus strain NA-1 isolated from geese in China. *Arch Virol,* 153**,** 1281-9.

ZHANG, Y., ZHANG, S., WANG, X. & ZHANG, G. 2012. Complete genome sequence of a subgenotype VIId Newcastle disease virus circulating predominantly in chickens in China. *J Virol,* 86**,** 13849-50.