

کلونینگ و تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن کامل پروتئین ماتریکس ویروس بیماری نیوکاسل شایع در گله‌های مرغ گوشتی شمال شرق ایران

Cloning and nucleotide sequencing of the complete matrix protein gene of Newcastle disease virus prevalent in commercial broiler flocks in northeast Iran

علی اکبر خبیری^{۱*}، رضا طرقي^{۲*}، محمدرضا محمدآبادی^{۱*}، سید الیاس طباطبایی زاده^۲

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۲- به‌ترتیب دانشیار، استادیار، شعبه مشهد، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

Khabiri A^{1,2}, Toroghi R^{*2}, Mohammadabadi MR^{*1}, Tabatabaeizadeh SE²

1- PhD Student, Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

2- Associate Professor, Assistant Professor, Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mrm@uk.ac.ir, rtoroghi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴)

چکیده

بیماری نیوکاسل یک بیماری ویروسی شناخته شده و یکی از اصلی‌ترین عوامل بیماری‌زا در صنعت طیور در سراسر جهان است. پروتئین ماتریکس (M) یکی از پروتئین‌های ساختاری ویروس بیماری نیوکاسل است که نقش مهمی در بیماری‌زایی، تکثیر و جوانه‌زنی ویروس دارد و همچنین پوشش ویروسی را به کمپلکس ریبونوکلوپروتئین (RNP) پیوند می‌دهد. با توجه به نقش پروتئین ماتریکس، این مطالعه با هدف فراهم نمودن اطلاعات تکمیلی جهت تعیین هویت یک جدایه ویروس بیماری نیوکاسل با نام CH/RT40/IR/2011 شایع در گله‌های مرغ گوشتی تجاری استان خراسان رضوی انجام گرفت. ژن کامل پروتئین ماتریکس RT40 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر و سپس در پلاسمید PTZ57r/t کلون شد. پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.5 انجام شد. درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش Maximum likelihood با نرم‌افزار MEGA6 رسم شد. تعیین توالی ژن پروتئین ماتریکس (۱۲۴۱ نوکلئوتید)، درخت فیلوژنتیک و آنالیز فواصل ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های نشان داد که RT40 با تحت ژنوتیپ VII.1.1 ویروس‌های بیماری نیوکاسل ایرانی (MF417546) و عراقی (MT370497, MT370499) شباهت دارد. بررسی توالی پروتئینی سیگنال‌های متمرکزکننده هسته‌ای (247KKGKKVTFDKIEEKIRR263) و دیگر نواحی پروتئین ماتریکس RT40 نشان داد که این ویروس بسیار شبیه به ویروس‌های فوق حاد بیماری نیوکاسل است. یافته‌های حاصل از این مطالعه تکمیل‌کننده اطلاعات لازم برای شناسایی کامل جدایه RT40 و معرفی آن به‌عنوان یک سویه بومی ویروس بیماری نیوکاسل بود.

واژه‌های کلیدی

درخت فیلوژنتیکی

ژن ماتریکس

ژنوتیپ VII.1.1

ویروس بیماری نیوکاسل

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن ۵ قبل از میلاد تا تقریباً قرن ۷ میلادی بود و از هند (دهلی) تا دریا‌های سیاه و مدیترانه گسترده بود (Nikbakhti et al. 2009; Mohammadifar and Mohammadabadi 2017). در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی ایران در محل تقاطع راه‌ها برای حمل و نقل محصولات، از قبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از طریق خشکی و هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ‌های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را تسهیل کرد. حفاری‌های باستان‌شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (Mohammadabadi et al. 2010). بر اساس تحقیقات West and Zhou استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند: دو کشف در تپه یحیی (Tepe Yahya) (جنوب شرقی ایران) به ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ قبل از میلاد و ۱۰۰۰ قبل از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ قبل از میلاد (Mohammadi Far et al. 2014; Mohammadifar and Mohammadabadi 2018). از طرفی، بیماری نیوکاسل (ND) یکی از بیماری‌های ویروسی بسیار مسری در صنعت پرورش پرندگان می‌باشد که پتانسیل ایجاد عفونت در طیف وسیعی از پرندگان حیات وحش و صنعتی را دارا است. در خصوص ایجاد خسارات وارده به صنعت طیور ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) بعد از ویروس‌های آنفولانزا پرندگان و برونشیت عفونی سومین ویروس با اهمیت در این صنعت طیور می‌باشد (Miller and Koch 2013). بر اساس آخرین دسته‌بندی کمیته بین‌المللی ویروس‌ها (ICTV) ویروس‌های بیماری نیوکاسل، در دسته (AOAV-1) Avian orthoavulavirus 1 قرار می‌گیرند (Ferreira et al. 2019). اگر چه جدایه‌های ویروس بیماری نیوکاسل از لحاظ ژنتیکی و آنتی‌ژنتیکی دارای تنوع بسیاری هستند اما همگی آن‌ها به یک سروتایپ تعلق دارند. بر اساس تنوع ژنتیکی، ویروس‌های بیماری نیوکاسل به دو دسته اصلی کلاس I و کلاس II طبقه‌بندی می‌شوند. تمامی ویروس‌هایی که متعلق به کلاس II می‌باشند،

به‌عنوان ویروس‌هایی که توانایی ایجاد عفونت در پرندگان حیات وحش و صنعتی را دارند شناخته می‌شوند و همچنین دارای تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی فراوانی می‌باشند. اگر چه مطالعات تنوع ژنتیکی بین ویروس‌های بیماری نیوکاسل امروزه نیز در حال بررسی است، اما در آخرین دسته‌بندی از لحاظ تنوع ژنتیکی در سال ۲۰۱۹ این ویروس‌ها را به ۲۱ ژنوتیپ با نام‌های ژنوتیپ I تا XXI دسته‌بندی شده‌اند (Ferreira et al. 2019). همچنین این ویروس در دسته‌بندی دیگری با توجه به درجه بیماری‌زایی در پرندگان به چهار دسته غیر بیماری‌زا (فاقد علائم بیماری) لنتوژنیک (بیماری‌زایی کم)، مزوژنیک (بیماری‌زایی متوسط) و ولوژنیک (بیماری‌زا) دسته‌بندی می‌شود (OIE 2012; Getabalew et al. 2019).

ویروس عامل بیماری یک ویروس گرد و رشته‌ای پوشش‌دار با قطری بین ۱۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر است (Shtykova et al. 2019) و دارای ژنوم از نوع RNA تک رشته‌ای با سنس منفی، یکپارچه با اندازه تقریباً پانزده هزار نوکلئوتید می‌باشد که شش ژن (3-NP-P-) (M-F-HN-L-5) نوکلئوپروتئین (NP)، فسفوپروتئین (P)، ماتریکس (M)، فیوژن (F)، هم‌گلویتینین-نورآمینیداز (HN) و RNA پلی‌مراز (L) را کد می‌کند (Gaikwad et al. 2019). اگرچه حدت در ویروس بیماری نیوکاسل مربوط به عملکرد چند ژن می‌باشد و تمامی این ژن‌ها در عملکرد نهایی ویروس نقش دارند اما به سه پروتئین فیوژن، هم‌گلویتینین-نورآمینیداز و ماتریکس که پروتئین‌های غشای ویروسی را شامل می‌شوند، به دلیل نقش آن‌ها در اتصال، نفوذ و تکثیر ویروس اهمیت بیشتری در مطالعات داده می‌شود. پروتئین فیوژن، یک گلیکوپروتئین است که به کمک پروتئین هم‌گلویتینین-نورآمینیداز باعث اتصال و نفوذ ویروس به سلول میزبان می‌شود. با بررسی این ژن می‌تواند ژنوتیپ و قدرت بیماری‌زایی ویروس را مشخص نمایند. در میان این سه پروتئین ساختاری ویروس پروتئین ماتریکس کمترین وزن مولکولی را داشته (تقریباً ۴۰ کیلو دالتون) در سطح داخلی پوشش ویروسی قرار دارد و یک پوسته پروتئینی بیرونی در اطراف نوکلئوکسپید تشکیل می‌دهد که پلی بین پوشش ویروسی و نوکلئوکسپید تشکیل می‌دهد (Harrison et al. 2010; Duan et al. 2022). پروتئین ماتریکس باعث حفظ ساختار در سطح داخلی پوشش

توجه به اهمیت آن در پارامیکسوویروس‌ها در حمل پروتئین به داخل هسته سلول و همچنین در حفظ چرخه سلولی بسیار حیاتی می‌باشد. در اوایل عفونت، NLS پروتئین ماتریکس در تنظیم سنتز و رونویسی RNA ویروسی و مهار رونویسی سلول میزبان ایفای نقش می‌کند در حالی‌که در طول دوره عفونت در جواهرزنی ویروس نقش دارد. اهمیت این توالی به اندازه‌ای است که در مطالعه‌ای نشان داده شده است که تغییر این موتیف موجب تغییر در شدت بیماری‌زایی ویروس می‌شود (Duan et al. 2019).

ظهور ژنوتیپ‌های جدید بیماری‌زای ویروس در همه گیری‌های جهانی، و تغییرات سال به سال گزارش شده در توالی ژنومی آن نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های جدید در حال ظهور هستند و این ویروس در مکان‌های جغرافیایی مختلف در سراسر جهان در حال تکامل می‌باشد (Dimitrov et al. 2019; Liu et al. 2019). با توجه به فراوانی گزارشاتی که هر ساله از نقاط مختلف کشور از شیوع بیماری نیوکاسل داده می‌شود بر کسی پوشیده نیست که بیماری نیوکاسل در ایران نیز به صورت بومی درآمده است. شاید با وجود اجرای برنامه‌های گسترده واکسیناسیون در مرغداران تجاری و تا حدودی در روستاهای کوچک در چند دهه گذشته تعداد شیوع همه‌گیری سراسری بیماری در کشور کاهش یافته است. با این حال با توجه به ایجاد خسارات مالی بالا هنوز بیماری نیوکاسل یکی از جدی‌ترین نگرانی‌های مرغداران در سراسر کشور محسوب می‌شود، که این خود نیاز به شناسایی ویروس در حال گردش در نقاط مختلف کشور را بیشتر می‌کند (Makki et al. 2021).

با توجه به فراوانی گزارشات ارائه شده از شیوع‌های نقطه‌ای این ویروس در سال‌های اخیر (Allahyari et al. 2019) نگرانی‌هایی در جهت کارایی کافی واکسن‌های مورد استفاده، از قبیل اینکه آیا واکسن‌ها با ویروس در حال گردش در کشور سازگاری دارند؟ یا اینکه آیا روش واکسیناسیون قابل قبول است؟ یا آیا با ظهور ژنوتیپ جدید هنوز واکسن‌های نسل گذشته کارایی لازم را دارند؟ را در کشور در میان دامپزشکان میدانی و محققین و همچنین صاحبان مزارع صنعتی به وجود آورده است. همان‌طور که اشاره شد نقش پروتئین ماتریکس ویروس بیماری نیوکاسل در تکثیر و قدرت بیماری‌زایی آن به اثبات رسیده است. با این حال

ویروس می‌شود (Plempner et al. 2001). از آنجا که این ژن ساختاری دستخوش کمترین تغییرات ژنتیکی قرار گرفته است پیشنهاداتی برای استفاده از این ژن جهت دسته‌بندی ویروس و ژن کاندید برای شناسایی و ردیابی ویروس به روش مولکولی ارائه شده است (Seal et al. 2000). این پایداری ژنی علاقه محققان برای استفاده از پروتئین ماتریکس در ساخت کیت‌های تشخیصی به روش آنتی ژن آنتی بادی را به خود جلب کرده است (Faaberg and Peeples 1988).

در سال‌های اخیر، مطالعاتی انجام شده است که به ارتباط بین پروتئین ماتریکس و تکثیر و بیماری‌زایی ویروس بیماری نیوکاسل توجه خاصی کرده‌اند. چندین ناحیه پروتئین در ژن ماتریکس ویروس بیماری نیوکاسل مورد بررسی قرار گرفته است که ارتباط این پروتئین با حدت بیماری، تکثیر و جواهرزنی ویروس را ثابت کرده است. برای مثال نقش موتیف ناحیه N ترمینال 23FPV26 و اسیدآمینه R42 (Duan et al. 2014) موتیف‌های ناحیه C ترمینال 247KKGKKVTFDKIEEKIRR263 (Coleman and Yu et al. 2018) و 275LGP277 (Peeples 1993; Duan et al. 2016) بر حدت و تکثیر ویروس در پروتئین ماتریکس ثابت شده است. علاوه بر این در مطالعات دیگر تاثیر پروتئین ماتریکس در تعامل با پروتئین‌های سلول میزبان که برای تکثیر و بیماری‌زایی ویروس بیماری نیوکاسل ضروری هستند بررسی شده است و همچنین ثابت شده است که این پروتئین با کمک بازدارنده‌های عوامل رونویسی سلول میزبان باعث کاهش رونویسی پروتئین‌های میزبان می‌شود (Li et al. 2013; Duan et al. 2014; Duan et al. 2018; Li et al. 2020). در مطالعات جدیدتر توجه خاصی به ارتباط پروتئین ماتریکس و ریبوزومال پروتئین‌ها که ارتباط مستقیم با تکثیر ویروس دارند شده است (Chen et al. 2016; Miller et al. 2021). با توجه به این یافته‌ها می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پروتئین ماتریکس یک پروتئین نوکلئوسیتوپلاسمی چند منظوره است و نقش مهمی در چرخه زندگی ویروس بیماری نیوکاسل ایفا می‌کند. در این میان سیگنال‌های متمرکزکننده هسته‌ای (NLS) که به‌طور کلی توالی پپتیدی کوتاهی هستند و به‌عنوان یک توالی سیگنالی، که واسطه انتقال پروتئین‌ها از سیتوپلاسم به هسته عمل می‌کنند از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشد، که با

هنوز توجه بسیار زیادی به پروتئین ماتریکس و نواحی اختصاصی آن به خصوص ناحیه NLS آن چه در خارج و چه در داخل ایران نشده است (Duan et al. 2018). لذا، در این مطالعه با هدف فراهم نمودن اطلاعات تکمیلی جهت تعیین هویت یک جدایه ویروس بیماری نیوکاسل شایع در گله‌های صنعتی طیور استان خراسان رضوی، مقایسه ژن و پروتئین ماتریکس این جدایه با سایر ژنوتیپ‌های ویروس بیماری نیوکاسل و سویه‌های واکسن رایج در ایران انجام گرفت.

کلونینگ و تعیین توالی ژن پروتئین ماتریکس را در بر می‌گرفت طراحی شد. سنتز این پرایمر نیز توسط شرکت بایونیر کره جنوبی صورت گرفت. سنتز cDNA از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر اختصاصی رفت با استفاده از آنزیم Superscript II RT mix (Invitrogen UK) انجام شد. واکنش PCR با استفاده از DNA پلیمرز با اطمینان بالا (Takara, Japan) PrimeSTAR HS DNA Polymerase، و با استفاده از سیکل حرارتی: دناتوراسیون اولیه در دمای 94°C به مدت ۵ دقیقه سپس ۳۵ سیکل شامل (دناتوراسیون اولیه در دمای 94°C به مدت ۲۵ ثانیه، آنیلینگ 54°C به مدت ۱۵ ثانیه و طول‌سازی 72°C به مدت ۲ دقیقه) و طول‌سازی نهایی ۱۰ دقیقه 72°C برای تولید محصول ۲۱۱۷ نوکلئوتیدی انجام شد.

خالص‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت (Bioneer, German) Ron's Agarose Gel mini perp kit، بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. اتصال محصولات PCR خالص شده به روش T/A کلونینگ در وکتور کلونینگ PTZ57R/T بر طبق دستورالعمل شرکت مربوطه صورت گرفت (Thermo, USA). برای تکثیر پلاسمید ساخته شده از سلول‌های مستعد میزبان اشرشیاکلاهی DH5 α استفاده شد و ترنسفورمیشن در ادامه آن با روش Sambrook and Russell صورت گرفت. برای تایید از انتقال وکتورهای PTZ57R/T حاوی ژن به داخل سلول‌های میزبان اشرشیاکلاهی DH5 α از کلنی‌های باکتری رشد کرده بر روی محیط انتخابی، از روش کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای M13 استفاده شد. کلونی‌های حاوی پلاسمید دارای قطعه تکثیر شده که مورد تایید قرار گرفتند در محیط مایع کشت داده شدند و پلاسمیدهای آن‌ها توسط کیت Ron's plasmid mini kit (Bioneer, German) استخراج شدند. جهت اطمینان نهایی از وجود قطعه مورد نظر در پلاسمید قبل از ارسال پلاسمید برای توالی‌یابی، پلاسمید استخراج شده با عمل هضم آنزیمی مجدداً مورد تایید قرار گرفت. با توجه به اندازه قطعه کلون شده در وکتور (۲۱۱۷ نوکلئوتید) امکان خوانش این توالی با یک جفت پرایمر وجود نداشت و برای توالی‌یابی کامل این قطعه از سه جفت پرایمر استفاده شد. اولین خوانش وکتور با پرایمرهای M13

مواد و روش‌ها

ویروسی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت از بانک ویروسی ویروس بیماری نیوکاسل موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد به نام CH/RT40/IR/2011 انتخاب شد (در ادامه از نام اختصاری RT40 برای این جدایه استفاده خواهد شد). توالی اسیدهای آمینه اطراف ناحیه شکاف پروتئین فیوژن ویروس RT40 نشان داد که این جدایه در دسته ویروس‌های ولژونیک بیماری نیوکاسل قرار می‌گیرد (Toroghi 2014). تکثیر ویروس RT40 طبق استانداردهای تعیین شده به وسیله سازمان جهانی بهداشت دام (OIE) و از طریق تلقیح ویروس ذخیره شده به حفره آلانتوئیک سه عدد تخم مرغ جنین دار عاری از اجرام بیماری‌زای خاص (SPF) (Venkateshwara Hatcheries, India) در سن ۹-۱۰ روزگی انجام گرفت. مایع آلانتوئیک مربوط به نمونه‌هایی که باعث مرگ جنین پس از ۳-۷ روز شده بودند جمع‌آوری شد و سپس با آزمون هم‌اگلوتیناسیون (HA) مورد ارزیابی فعالیت HA قرار گرفت.

استخراج RNA ویروسی از مایع آلانتوئیک برداشت شده به منظور انجام واکنش RT-PCR با استفاده از کیت (Roche, German) High Pure Viral Nucleic Acid Kit و طبق پروتکل شرکت تولید کننده انجام و سپس برای کارهای بعدی در فریزر -70°C ذخیره شد. به منظور تکثیر کامل ژن پروتئین ماتریکس بر اساس توالی‌های ویروس بیماری نیوکاسل متعلق به ژنوتیپ VII گزارش شده در بانک ژنی NCBI یک جفت پرایمر اختصاصی F: و R: ATCATGGACAACGGAAGGAG

کلونینگ PTZ57R/T با موفقیت کلون شد و پس از عمل ترنسفرماسیون به داخل سلول‌های مستعد، کلونی‌های اشیرشیاکلاهی DH5 α میزبان که وکتور را دریافت کرده بودند بر روی محیط اختصاصی با موفقیت رشد کردند. با استفاده از روش کلونینگ PCR وجود یا عدم وجود قطعات در پلاسمیدها کنترل و سپس کلونی‌های رشد کرده مورد انتخاب قرار گرفتند. برای انجام PCR کلونی‌های انتخابی از پرایمرهای M13 که دارای جایگاه مکمل در وکتور بودند استفاده شد.

کلونی مثبت تایید شده در محیط کشت مایع رشد داده شد و سپس استخراج پلاسمید آن انجام گرفت. وکتور حاوی قطعه‌ی استخراج شده از محیط کشت مایع جهت توالی‌یابی به صورت خوانش دوطرفه به شرکت بایونیر ارسال شد. نتایج به دست آمده از خوانش‌ها پس از ارزیابی و کیفیت‌سنجی، با استفاده از نرم‌افزارهای BioEdit، Chromas Lite، سرهم چینی شدند. نتایج به دست آمده از توالی نهایی نشان داد که طول ناحیه کدینگ ژن ماتریکس ویروس RT40 ۱۰۹۵ نوکلئوتید و توالی پروتئین آن دارای ۳۶۴ اسیدآمینه (بدون در نظر گرفتن کدون پایان) می‌باشد. از ابزار BLAST و برنامه MegAlign برای پیدا کردن بیشترین شباهت و همولوژی ژن ماتریکس با دیگر ژن‌های ماتریکس ویروس بیماری نیوکاسل ثبت شده در بانک ژنی استفاده شد. نتایج به دست آمده از زیر هم چینی توالی نهایی به دست آمده نشان داد که بیشترین همولوژی ژن ماتریکس ویروس RT40، ۹۹/۴۵ درصد با توالی ایرانی MF417546 بود. مقایسه این توالی با توالی‌های خارجی ثبت شده بیشترین شباهت ۹۸/۵۴ و ۹۸/۲۶ MT370499 و MT370497 درصدی را به ترتیب با دو توالی ویروس‌های بیماری نیوکاسل گزارش شده از کشور عراق را نشان داد.

توالی کامل ژن ماتریکس ۱۲۴۱ نوکلئوتیدی با توالی نواحی مشابه از نمایندگان ویروس در هر یک از ژنوتیپ‌های شناخته شده آن از جمله سویه‌های واکسن متداول در ایران (B1, LaSota) و توالی‌هایی که بیشترین شباهت را با ویروس RT40 دارند به منظور انجام ارزیابی‌های شجره‌شناسی و خاستگاه ویروس RT40 مورد مقایسه و تحلیل قرار گرفت (شکل ۱). توالی به دست آمده بیشترین شباهت را با ژنوتیپ VII و تحت ژنوتیپ VII.1.1 نشان

رفت و برگشت که دارای جایگاه مکمل بر روی وکتور بودند صورت گرفت. بر اساس توالی به دست آمده از نتایج توالی اولین خوانش یک جفت پرایمر رفت و برگشت اختصاصی F: CAGGCTTGAGCCAGACACT و R: TCAAACGTCTTGCGCTGA برای دومین خوانش طراحی شد و خوانش سوم نیز با پرایمرهای اختصاصی F: GAGTTCATCTTGGTGCAAT و R: ATTGAAAGTGTCTGGCTCA طراحی شده با استفاده از نتایج به دست آمده از خوانش دوم صورت گرفت. خوانش‌ها توسط شرکت بایونیر کره جنوبی انجام شدند.

با استفاده از نرم‌افزارهای BioEdit و Chromas Lite توالی‌های دریافتی از سه بار خوانش دو طرفه مورد بررسی قرار گرفت و بعد از ارزیابی کیفیت خوانش‌ها، سرهم چینی توالی‌ها انجام شد. به منظور اطلاع از میزان همولوژی قطعه تکثیر شده با توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی از ابزار BLAST و روش blastn در پایگاه NCBI میزان همپوشانی و همولوژی توالی به دست آمده سنجیده شد. بررسی رابطه فیلوژنتیکی جدایه مورد مطالعه، به وسیله نرم‌افزار MEGA V.6 و با استفاده از روش حداکثر درست نمایی (ML) و مدل GTR به دلیل اینکه این مدل مناسب‌ترین مدل برای این درخت بود با استفاده از ۱۰۰۰ بوت استرپینگ انجام شد. برای بررسی تفاوت‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی از نرم‌افزار CLC Main Workbench 5 استفاده شد.

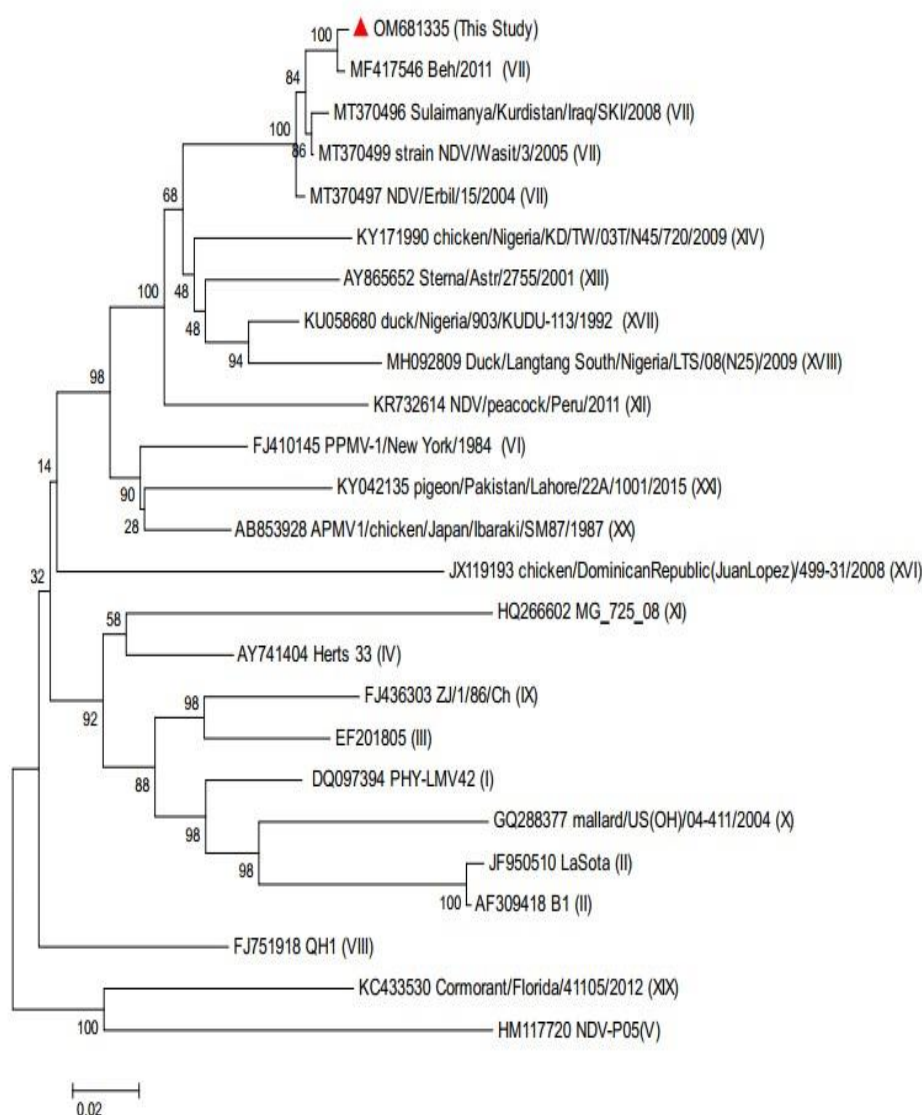
شماره دسترسی بانک ژنی: توالی به دست آمده برای بانک ژنی ارسال شد و شماره دسترسی OM681335 به آن تعلق گرفت.

نتایج

پس از تلقیح ویروس RT40 به تخم مرغ‌های جنین دار، تلفات در جنین‌ها بعد از سه روز مشاهده شد. مایع آلتوتوئیک حاوی مقادیر زیادی از ویروس بود (10^{-8} HA). واکنش RT-PCR قطعه قابل انتظار ۲۱۱۷ نوکلئوتیدی که حاوی توالی کامل ژن ماتریکس بود را تکثیر نمود. وجود یک باند اختصاصی نشان داد که توالی مشابهی برای جفت شدن آغازگرهای مورد استفاده در محل‌های دیگر ژنوم وجود نداشته است. قطعه تکثیر شده در داخل وکتور

مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج این مقایسه نشان داد که تفاوت زیادی بین ویروس RT40 با سویه‌های واکسن رایج مورد استفاده در ایران وجود دارد (شکل ۲). همچنین هیچ جهشی در توالی موتیف 23FPIV26 و R42 واقع در ناحیه N ترمینال و موتیف 275LGP277 واقع در C ترمینال ویروس RT40 مشاهده نشد. به عبارتی بررسی توالی تمامی نقاط حساس پروتئین ماتریکس RT40 نشان داد که قدرت بیماری‌زایی این ویروس بالا می‌باشد.

داد. علاوه بر این ماتریکس فاصله ژنتیکی نیز به‌منظور به‌دست آمدن درصد تفاوت نوکلئوتیدی ژن ماتریکس با نمایندگان ویروس‌های هر ژنوتیپ ویروس بیماری نیوکاسل (جدول ۱) رسم شد که نشان داد اختلاف ژنتیکی بسیار بالایی بین سویه در حال گردش در کشور و واکسن‌های ژنوتیپ II وجود دارد. توالی پروتئین NLS ژن ماتریکس 247KKGKKVTFDKIEEKIRR263 ویروس RT40 نیز با ویروس‌های نماینده تمامی ژنوتیپ‌های ویروس بیماری نیوکاسل



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی ژن ماتریکس RT40 به‌همراه ویروس‌های بیماری نیوکاسل گزارش شده از کشورهای همسایه ایران

جدول ۱- ماتریس فواصل ژنتیکی، بیانگر فاصله ژنتیکی ژن ماتریکس ژنوتیپ در حال گردش در کشور (VII.1.1) و سایر ژنوتیپ‌های ویروس بیماری نیوکاسل

Genotype														
RT-40 (M Protein)														
VII	۰.۰۱۱													
XVII	۰.۰۷۷	۰.۰۷۹												
XIV	۰.۰۸۶	۰.۰۸۸	۰.۰۷۱											
XVIII	۰.۰۸۸	۰.۰۹۳	۰.۰۴۵	۰.۰۹۰										
XIII	۰.۰۸۹	۰.۰۸۹	۰.۰۵۹	۰.۰۸۲	۰.۰۸۵									
XX	۰.۰۹۵	۰.۱۰۰	۰.۰۷۱	۰.۰۹۶	۰.۰۹۴	۰.۰۸۷								
VI	۰.۱۰۲	۰.۱۰۵	۰.۰۹۷	۰.۱۰۵	۰.۱۱۶	۰.۱۰۱	۰.۰۵۵							
XII	۰.۱۱۱	۰.۱۱۱	۰.۰۸۲	۰.۱۰۳	۰.۱۰۶	۰.۰۹۹	۰.۰۹۹	۰.۱۰۶						
XXI	۰.۱۱۸	۰.۱۲۰	۰.۱۰۸	۰.۱۱۸	۰.۱۳۵	۰.۱۲۴	۰.۰۷۳	۰.۰۷۸	۰.۱۲۹					
VIII	۰.۱۲۵	۰.۱۳۰	۰.۱۱۱	۰.۱۲۷	۰.۱۳۹	۰.۱۱۶	۰.۱۰۱	۰.۱۰۸	۰.۱۳۳	۰.۱۳۴				
Herts33 IV	۰.۱۳۱	۰.۱۳۲	۰.۱۲۶	۰.۱۳۱	۰.۱۵۳	۰.۱۳۶	۰.۱۰۷	۰.۱۰۹	۰.۱۳۸	۰.۱۳۰	۰.۰۹۹			
I	۰.۱۶۰	۰.۱۴۹	۰.۱۴۲	۰.۱۵۲	۰.۱۶۳	۰.۱۵۸	۰.۱۲۳	۰.۱۲۵	۰.۱۴۹	۰.۱۲۳	۰.۱۲۲	۰.۰۸۹		
III	۰.۱۶۰	۰.۱۶۰	۰.۱۴۴	۰.۱۵۹	۰.۱۷۲	۰.۱۵۲	۰.۱۲۱	۰.۱۳۶	۰.۱۶۱	۰.۱۴۵	۰.۱۳۴	۰.۰۸۱	۰.۰۹۳	
IX	۰.۱۶۹	۰.۱۷۵	۰.۱۵۲	۰.۱۶۲	۰.۱۷۲	۰.۱۵۷	۰.۱۳۶	۰.۱۳۹	۰.۱۶۶	۰.۱۶۰	۰.۱۳۰	۰.۰۸۷	۰.۰۹۸	۰.۰۷۵
XIX	۰.۱۷۴	۰.۱۷۵	۰.۱۷۲	۰.۱۸۸	۰.۱۹۱	۰.۱۷۱	۰.۱۵۰	۰.۱۵۶	۰.۱۹۷	۰.۱۷۳	۰.۱۴۹	۰.۱۴۱	۰.۱۶۱	۰.۱۷۴
XVI	۰.۱۹۶	۰.۱۹۹	۰.۱۷۴	۰.۱۸۵	۰.۱۹۹	۰.۱۸۳	۰.۱۴۸	۰.۱۵۱	۰.۱۸۲	۰.۱۷۸	۰.۱۶۳	۰.۱۵۲	۰.۱۷۴	۰.۱۸۷
LaSota II	۰.۱۹۶	۰.۱۹۹	۰.۱۷۴	۰.۱۸۵	۰.۱۹۹	۰.۱۸۳	۰.۱۴۸	۰.۱۵۱	۰.۱۸۲	۰.۱۷۸	۰.۱۶۳	۰.۱۵۲	۰.۱۷۴	۰.۱۸۷
V	۰.۲۰۳	۰.۲۰۹	۰.۲۰۷	۰.۲۲۶	۰.۲۲۵	۰.۲۱۷	۰.۱۸۲	۰.۱۷۹	۰.۲۳۲	۰.۲۲۵	۰.۱۸۵	۰.۱۷۰	۰.۲۰۱	۰.۲۱۱
X	۰.۲۰۵	۰.۲۱۱	۰.۱۹۶	۰.۱۹۹	۰.۲۱۷	۰.۱۹۲	۰.۱۷۴	۰.۱۷۸	۰.۲۱۵	۰.۱۷۱	۰.۱۷۰	۰.۱۲۲	۰.۱۰۳	۰.۱۳۱
XI	۰.۲۰۶	۰.۲۰۹	۰.۱۹۶	۰.۱۹۲	۰.۲۰۹	۰.۲۰۶	۰.۱۶۳	۰.۱۶۲	۰.۱۹۸	۰.۱۷۳	۰.۱۶۸	۰.۱۲۷	۰.۱۷۵	۰.۱۷۹

OM 681335 (This Study)	LYNLALNVTI	DVDVDPSP	L VKSLSKSDSG	YYANLFLHVG	LMSTVDKKGK	KVTFDKIEEK	IRRLNLSVGL	SDVLGPSVLV
MT370497 (VII)								
MT370499 (VII)								
MT370496 (VII)								
MF417546 (VII)								
MG017442 (VII)								
JF950510 LaSota (II)		N.E			I.T	R	L.K	S.D
AF309418 B1 (II)		N.E			I.T	R	L.K	S.D
AY865652 (XIII)		E.K			I			
KU058680 (XVII)		E.K			I	R		
MH092809 (XVIII)		E.K			I			
KY171990 (XIV)		E.K			I	R		
AB853928 (XX)		E.Q			I			
KR732614 (XII)		E.K			I	R.R		
FJ410145 (VI)		E.K			I	R		F
KY042135 (XXI)		E.K			I		G	
FJ751918 (VIII)		E.K		R.N	I	R	L	
KC433530 (XIX)		E.SK			I	N	L.G	
GQ288377 (X)		E.K			I		L.R	D
DQ097394 (I)		E.K			I		L.R	D
AY741404 Herts 33 (IV)		E.K			I		L.K	D
FJ436303 (IX)		E.K		R	I	R.R	L.R	D
EF201805 (III)		E.K		R	I	R	QL.R	D
JX119193 (XVI)		E.K			I	R	L.R	D
HQ266602 (XI)		E.K	R.TE.AN		I	L	R	
HM117720 (V)		E.K			I		L.R	
Consensus 205	LYNLALNVTI	DVEVDPKSP	L VKSLSKSDSG	YYANLFLHIG	LMSTVDKKGK	KVTFDKIEEK	IRRLNLSVGL	SDVLGPSVLV 280
						47KKGKKVTFDKIEEKIRR263		

شکل ۲- مقایسه توالی سیگنال‌های متمرکزکننده هسته‌ای (NLS) (زیر آن خط کشیده شده است) پروتئین ماتریکس موقعیت اسید آمینه‌های ۲۴۷ تا ۲۶۳ در ژنوتیپ‌های مختلف ویروس بیماری نیوکاسل

بیش از هفت دهه است که از زمان شناخت بیماری نیوکاسل در سال ۱۹۲۶ میلادی در جاوه اندونزی می‌گذرد ولی هنوز این بیماری یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی پرندگان است که صنعت پرورش طیور تجاری در سراسر دنیا را تهدید می‌کند (Dimitrov et al. 2017). در کشور ما نیز با وجود انجام عملیات گسترده و فشرده واکسیناسیون بر علیه بیماری و اعمال قرنطینه‌های سخت گیرانه، هنوز بیماری به صورت بومی در اکثر نقاط کشور وجود داشته و هر ساله شاهد ایجاد خسارات اقتصادی سنگین ناشی وقوع‌های مکرر این بیماری در نقاط مختلف کشور می‌باشیم (Hosseini et al. 2014; Kiani et al. 2016; Makki et al. 2021).

شواهد گواه بر این دارند که ژنوم ویروس از زمانی که مورد شناسائی قرار گرفته است تاکنون به صورت مداوم در حال تغییر بوده است و این عامل باعث پدیدار شدن واریانت‌های جدیدی از ویروس در هر دو کلاس اصلی I و II ویروس، حتی با وجود اعمال راه‌های پیشگیرانه شده است (Ferreira et al. 2019). مطالعات قبلی بر پایه آنالیز داده‌های فیلوژنتیکی نیز تایید می‌نمایند که ژنوتیپ‌ها و تحت ژنوتیپ‌های مختلفی در اروپا و آسیا در حال گردش می‌باشند (Ansori and Kharisma 2020; Joshi et al. 2021; Karamendin and Kydyrmanov 2021). که این امر باعث شده است، ارزیابی‌های منظم و پیوسته ژنتیکی ویروس‌های در حال گردش جهت بررسی ظهور و ماندگاری آن‌ها در جمعیت‌های حساس پرندگان صورت گیرد. هر چه شباهت ژنتیکی بین واکسن مورد استفاده و سویه ویروس در حال گردش بیشتر باشد عملکرد ایمنی زایی واکسن بیشتر بوده و در نتیجه احتمال دفع ویروس فیلد پس از چالش توسط پرنده کمتر خواهد بود. از این منظر به نظر می‌رسد در دسترس بودن اطلاعات ژنتیکی ویروس‌های در حال گردش هر منطقه جغرافیایی می‌تواند به عنوان یک امر الزامی محسوب شود (Sultan et al. 2020; Wang et al. 2020; Sultan et al. 2021).

معمولاً سه هدف اصلی برای استفاده از واکسن‌های مختلف در کنترل بیماری نیوکاسل باید در نظر گرفته شود. اولین هدفی که در استفاده از واکسن‌ها دنبال می‌شود این است که بعد از درگیر

شدن گله با عامل بیماری، پرندگان مبتلا کمترین علائم بالینی را از خود نشان دهند و دامداران نیز شاهد کمترین میزان مرگ و میر و خسارت ناشی از آن باشند. مرحله بعدی استفاده از واکسن در نظر داشتن این موضوع است که واکسن مورد استفاده آنچنان سطح ایمنی بالایی را ایجاد کند که علاوه بر، برآورده شدن هدف اول مقدار دفع ویروس توسط پرندگان مبتلا به حداقل میزان ممکن کاهش پیدا کند که این خود آغاز راه جلوگیری از انتقال ویروس با استفاده از واکسن مناسب نیز می‌باشد. سومین هدفی که در استفاده از واکسن دنبال می‌شود ایجاد سطح ایمنی مناسب است که باعث شود پرندگان در مواجهه با دزهای بالاتر ویروس در اوایل مراحل درگیری با ویروس مقاومت مناسب را از خود نشان دهند.

متأسفانه از میان این سه هدف تنها هدف اول به عنوان هدف استفاده از واکسن و کنترل بیماری در نظر گرفته می‌شود. شاید به این دلیل باشد که دامپزشکان میدانی و صاحبان صنایع مرغداری ابزار کافی برای ارزیابی هدف‌های دوم و سوم را در دست ندارند و از طرفی واکسن‌های موجود اثر خوبی در کاهش مرگ و میر و علائم بیماری در مقابل سویه در حال گردش در کشور از خود نشان داده‌اند. این مهم باعث شده است صاحبان صنایع دامپزشکان از عملکرد واکسن‌ها در بیشتر مواقع رضایت داشته باشند و توجه‌ای به فاکتور میزان دفع ویروس فیلد در پرندگان ایمن شده‌ای که مورد چالش قرار می‌گیرند که خود باعث پخش ویروس و ظهور ژنوتیپ‌های جدید در دراز مدت می‌شود نداشته باشند (Miller et al. 2013; Izquierdo-Lara et al. 2019; Sultan et al. 2022). با توجه به مطالعات گسترده انجام شده این باور به شکل محکمی وجود دارد که ویروس‌های بیماری نیوکاسل تحت تأثیر عوامل مختلف، دستخوش تغییرات ژنتیکی و تکامل و سازگار شدن با محیط می‌شوند (Ferreira et al. 2019). همچنین به دلیل اینکه ژنوم ویروس از نوع RNA می‌باشد و RNA پلیمراز آن دارای عملکردی با ضریب خطا بالایی است، بنابراین احتمال ایجاد موتاسیون و پیدایش سویه‌های جدید کاملاً بالا می‌باشد (Jadhav et al. 2020). از طرف دیگر افزایش فشار ایمنی جمعیتی که متعاقب واکسیناسیون‌های فشرده و گسترده حاصل می‌شود خود دلیلی دیگر بر شکل‌گیری ژنوتیپ‌ها و تحت ژنوتیپ‌های

ویروس بیماری نیوکاسل در اپیدمی سال ۲۰۰۹ ایران با منشاء کشورهای همسایه غربی بوده است را تایید کند (Toroghi et al. 2020).

اگرچه گزارشات زیادی از انتقال ویروس بیماری نیوکاسل توسط پرندگان وحشی مهاجر وجود دارد (Usachev et al. 2006) با این حال در بیشتر کشورهای دنیا که شاهد ورود تعداد زیادی پرنده مهاجر به کشورشان هستند با رعایت قوانین و ضوابط قرنطینه‌ای سخت‌گیرانه و همچنین کنترل رفت آمد افراد توانسته‌اند بر این مشکل فائق آیند. از طرفی دیگر گزارش شده است که انتقال بیماری از طریق افراد و یا از طریق تبادلات تجاری در بسیاری از موارد به‌عنوان محتمل‌ترین عامل انتشار ویروس‌های بیماری‌زای بیماری نیوکاسل در سراسر دنیا می‌باشد (Munir et al. 2012). تشابه ژنتیکی بین جدایه‌های ایران و کشور عراق دلیلی برای عدم وجود کنترل‌های ورود و خروج افراد در ارتباط با صنعت طیور و عدم کنترل تجارت پرندگان بین دو کشور محسوب می‌شود. جداسازی و بررسی ژنتیکی منظم و پیوسته ویروس‌های بیماری نیوکاسل در حال گردش ایران و کشورهای همسایه موجب ارتقاء اطلاعات ما در خصوص تکامل و شکل‌گیری سویه‌های بیماری‌زای بیماری در منطقه خواهد شد.

با بررسی نواحی حساس پروتئین ماتریکس می‌توان دریافت که ناحیه NLS واقع در این پروتئین بیشترین توجه را در مطالعات به خود جلب کرده است. در مطالعه‌ای نشان دادند با تغییر در تعدادی اسیدهای آمینه بسپیک ناحیه NLS ویروس و تولید ویروس جهش‌یافته (247AAGAAVIFDKIEEKIAA263)، تکثیر، کارایی رونویسی و پاتوژنیسیته ویروس در تخم‌مرغ‌های SPF کاهش می‌یابد (Duan et al. 2019). گفته می‌شود که عملکرد بالای ویروس به‌علت وجود توالی غنی از آرژنین و لیزین در این ناحیه می‌باشد (Miyamoto et al. 2016). در نتایج زیر هم چینی توالی NLS ژنوتیپ‌های مختلف مشخص شد که بیشترین اختلاف بین ژنوتیپ VII و ژنوتیپ II گروه واکسینال مربوط به این ناحیه می‌باشد. به‌خصوص اینکه یکی از این تغییرات حساس در تغییر اسیدآمینه بسپیک موقعیت R263S در هر دو واکسن B1 و لاسوتا اتفاق افتاده است. احتمال اینکه این اسیدآمینه یک اسیدآمینه سرنوشت ساز همانند اسیدآمینه‌های

جدید می‌تواند باشد. عامل دیگر ایجاد سویه‌های جدید می‌تواند به‌دلیل اختلاف ژنتیکی بین واکسن مصرف شده و ژنوتیپ ویروس در حال گردش در منطقه باشد (Dimitrov et al. 2017). تمامی این موارد باعث شده است که بررسی ژنتیکی و شناسایی کامل ویروس‌های در حال گردش به‌عنوان یکی از نیازهای اولیه و مبرم مقابله با بیماری محسوب شود.

ژنوتیپ VII ویروس نیوکاسل بزرگترین ژنوتیپ گزارش شده متعلق به این ویروس می‌باشد که گزارش‌های اولیه آن مربوط به سال‌های ۱۹۸۰ تا ۱۹۹۰ می‌باشد. این ژنوتیپ به‌عنوان ژنوتیپ غالب آسیا و اروپا معرفی شده است (Dimitrov et al. 2016; Joshi et al. 2021). گفتنی است ژنوتیپ غالب و در حال گردش کشور ما نیز ژنوتیپ VII می‌باشد (Ghalyanchilangeroudi et al. 2018; Sabouri et al. 2018; Molouki et al. 2019; Makki et al. 2021). درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس ژن ماتریکس نشان داد که RT40 متعلق به ژنوتیپ VII می‌باشد و این نتایج مشابه با نتایج به‌دست آمده از درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با ژن F این ویروس بود (Toroghi 2014). اگرچه گزارشات معدودی برای تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن ماتریکس ویروس‌های در حال گردش ایران وجود دارد با این حال بیشترین شباهت ژن ماتریکس ویروس RT40 با ویروس گزارش شده توسط ملوکی و همکاران ملاحظه شد که اتفاقاً در آن مطالعه نیز بر اساس درخت رسم شده با ژن F ویروس مورد مطالعه آن‌ها در ژنوتیپ VII.1.1 قرار گرفته بود (Molouki et al. 2019). به‌عبارتی به‌نظر می‌رسد شاید ناحیه متغیر ژن ماتریکس همانند ناحیه محل شکاف پروتئین فیوژن ناحیه‌ای مناسب برای تفریق ژنوتیپ‌های ویروس بیماری نیوکاسل محسوب شود. شاید برای اثبات این ادعا نیاز است که تعداد بیشتری سکانس ماتریکس پروتئین در بانک‌های ژنی ارائه شود تا بتوان به‌راستی آزمائی این مهم پرداخت. در بررسی‌های همولوژی بین توالی ژن ماتریکس و توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی NCBI مشخص شد که بیشترین شباهت ویروس RT40 با توالی دو ویروس گزارش شده از کشور عراق می‌باشد. لازم به یادآوری است که زمان جداسازی این ویروس‌ها در کشور عراق در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ میلادی بوده است که این خود می‌تواند پیش‌گوئی قبلی ما مبنی بر این که احتمالاً خاستگاه

به تست MDT دارای اعتبار بیشتری می باشد (Duan et al. 2014;). حدت و قدرت بیماری زایی ویروس بیماری نوکاسل توسط چند ژن کنترل می شود و تاکنون بیشترین توجه معطوف به دو گلیکوپروتئین سطحی F و سپس HN بوده است. در واقع اطلاعات کمی در مورد نقش سایر ژن ها در حدت ویروس در بانک های ژنی وجود دارد این در حالی است که هر گونه تغییر در سایر ژن های اثرگذار می تواند عملکرد نهایی ویروس را تغییر دهد. به نظر می رسد امروزه نیاز به در دسترس بودن اطلاعات کامل از تمامی ژن های ویروس های در حال گردش در منطقه یک اولویت و امری ضروری تلقی شود. در مطالعه حاضر ژن ماتریکس یک جدایه ویروس بیماری نوکاسل که نمایندگی ویروس های در حال گردش در گله های مرغ گوشتی شمال شرق کشور را می نمود به شکل کامل تعیین توالی شد. همسو با نتایجی که از آنالیز ژن فیوژن این ویروس قبلاً به دست آمده بود، آنالیز فیلوژنتیکی ژن ماتریکس آن نیز نشان داد که RT40 متعلق به ژنوتیپ VII و تحت ژنوتیپ VII.1.1 می باشد. بیشترین شباهت ژن ماتریکس این ویروس با ویروس های بیماری نوکاسل کشور همسایه عراق بود که ظن قبلی ما مبنی بر احتمال ورود ویروس از این کشور به ایران را تقویت نمود. بررسی نقاط حساس پروتئین ماتریکس RT40 نشان داد که این ویروس تمامی فاکتورهای حدت بالا که تاکنون برای این پروتئین گزارش شده است را دارا می باشد. از این روی تعلل در اقدامات کنترلی و پیشگیرانه در سطح مرغدارها در شرایط موجود می تواند منجر به ایجاد خسارات اقتصادی شدیدی شود. با توجه با اهمیت بودن اطلاعات سایر ژن های این ویروس پیشنهاد می شود تعیین توالی کامل ژنوم RT40 به منظور مقایسه با سایر ویروس های بیماری نوکاسل گزارش شده از کشورهای همسایه و سایر نقاط دنیا انجام گیرد. از طرفی با تکمیل نتایج می توان این جدایه را به عنوان یک سویه بومی معرفی نمود.

ناحیه شکاف پروتئین F باشد بسیار زیاد می باشد. با توجه به نقش پروتئین ماتریکس در بیماری زایی ممکن است ارتباطی بین بیماری زایی ویروس و توالی NLS وجود داشته باشد (Duan et al. 2019).

ارتباط موتیف 23FPIV26 در ناحیه N ترمینال پروتئین ماتریکس با جوانه زنی و بیماری زایی ویروس مورد تایید قرار گرفته است. به طوری که تغییر هر یک از این چهار اسید آمینه به تنهایی می تواند باعث کاهش عملکرد تکثیر و جوانه زنی ویروس شود. با این وجود تغییر در اسید آمینه های موقعیت F23A و P24A نقش پررنگ تری را نشان می دهند (Duan et al. 2014). به طوری که تغییر اندیس های حدت MDT و ICPI در ویروس های موتانت ایجاد شده با تغییرات F23A و P24A به ترتیب ۱۰۲ و ۸۴ ساعت و ۱/۶۴ و ۱/۷۰ بود در حالی که این دو اندیس در ویروس مادری ۵۴ ساعت و ۱/۹۱ بود. (Duan et al. 2014). چنین تغییر حدتی که وابسته به یک اسید آمینه باشد در اسید آمینه موقعیت R42A پروتئین ماتریکس این ویروس نیز گزارش شده است به طوری که MDT و ICPI آن به ترتیب به ۱۱۵ ساعت و ۱/۶۴ رسید (Duan et al. 2014). هیچ گونه جهشی در این سه موقعیت برای ویروس RT40 ملاحظه نشد و اسید آمینه های این موقعیت ها شبیه اسید آمینه های ویروس های حاد بیماری نوکاسل بود. چنین تغییر اندیس حدتی وابسته به یک اسید آمینه در گلیکوپروتئین های F و HN قبلاً به اثبات رسیده بود. برای مثال تغییر در اسید آمینه Y526Q گلیکوپروتئین HN یک ویروس حاد بیماری نوکاسل باعث تغییر MDT ویروس جهش یافته از ۶۲ به ۹۸ شد (Khattar et al. 2009). و یا تغییر در اسید های آمینه ۱۱۷-۱۱۲ (Gould et al. 2003). از طرفی مشخص شده است که اگر توالی اسید آمینه های در محل برش گلیکوپروتئین F که شاخص اصلی حدت ویروس بیماری نوکاسل است تغییر نکند، جهش برخی اسید های آمینه کلیدی در سایر پروتئین های ویروسی اثر گذار در حدت احتمالاً باعث ایجاد تغییر همسو در مقادیر MDT و ICPI نخواهد شد. با این حال اگر چه مقادیر MDT ممکن است تغییر محسوسی داشته باشد اما مقادیر ICPI ویروس های جهش یافته هنوز ویژگی های حدت اولیه را حفظ می کنند. از این روی نتایج به دست آمده گواه بر این دارند که تست پاتوژنسیتی ICPI نسبت

منابع

- Allahyari E, Allymehr M, Molouki A, Fallah M (2019) Molecular characterisation and phylogenetic study of the fusion gene of newcastle disease viruses isolated from broiler farms of iran in 2018-2019. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 25:21-32.
- Ansori AN, MKharisma VD (2020) Characterization of Newcastle disease virus in Southeast Asia and East Asia: Fusion protein gene. *Journal of Sciences and Data Analysis* 20:14-20.
- Chen Y, Lu Z, Zhang L, Gao L, Wang N, Gao X, Wang Y, Li K, Gao Y, Cui H (2016) Ribosomal protein L4 interacts with viral protein VP3 and regulates the replication of infectious bursal disease virus. *Virus Research* 211:73-78.
- Coleman NA, Peeples ME (1993) The matrix protein of Newcastle disease virus localizes to the nucleus via a bipartite nuclear localization signal. *Virology* 195:596-607.
- Dimitrov KM, Abolnik C, Afonso CL, Albina E, Bahl J, Berg M, Briand F-X, Brown IH, Choi K-S, Chvala I (2019) Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infection, Genetics and Evolution* 74:103917.
- Dimitrov KM, Afonso CL, Yu Q, Miller PJ (2017) Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? *Veterinary Microbiology* 206:126-136.
- Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL (2016) Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). *Infection, Genetics and Evolution* 39:22-34.
- Duan Z, Deng S, Ji X, Zhao J, Yuan C, Gao H (2019) Nuclear localization of Newcastle disease virus matrix protein promotes virus replication by affecting viral RNA synthesis and transcription and inhibiting host cell transcription. *Veterinary Research* 50:1-19.
- Duan Z, Hu Z, Zhu J, Xu H, Chen J, Liu H, Hu S, Liu X (2014) Mutations in the FPIV motif of Newcastle disease virus matrix protein attenuate virus replication and reduce virus budding. *Archives of Virology* 159:1813-1819.
- Duan Z, Li J, Zhu J, Chen J, Xu H, Wang Y, Liu H, Hu S, Liu X (2014) A single amino acid mutation, R42A, in the Newcastle disease virus matrix protein abrogates its nuclear localization and attenuates viral replication and pathogenicity. *Journal of General Virology* 95: 1067-1073.
- Duan Z, Tang H, Wang Y, Zhao C, Zhou L, Han Y (2022) The association of ribosomal protein L18 with Newcastle disease virus matrix protein enhances viral translation and replication. *Avian Pathology* 15:1-12.
- Duan Z, Xu H, Ji X, Zhao J, Xu H, Hu Y, Deng S, Hu S, Liu X (2018) Importin $\alpha 5$ negatively regulates importin $\beta 1$ -mediated nuclear import of Newcastle disease virus matrix protein and viral replication and pathogenicity in chicken fibroblasts. *Virulence* 9:783-803.
- Faaberg KS, Peeples ME (1988) Strain variation and nuclear association of Newcastle disease virus matrix protein. *Journal of Virology* 62:586-593.
- Ferreira HL, Taylor TL, Dimitrov KM, Sabra M, Afonso CL, Suarez DL (2019) Virulent Newcastle disease viruses from chicken origin are more pathogenic and transmissible to chickens than viruses normally maintained in wild birds. *Veterinary Microbiology* 235:25-34.
- Gaikwad SS, Lee H-J, Kim J-Y, Choi K-S (2019) Expression and serological application of recombinant epitope-repeat protein carrying an immunodominant epitope of Newcastle disease virus nucleoprotein. *Clinical and Experimental Vaccine Research* 8:27-34.
- Getabalew M, Alemneh T, Akebereg D, Getahun D, Zewdie D (2019) epidemiology, Diagnosis & Prevention of Newcastle disease in poultry. *American Journal of Biomedical Science and Research* 16:50-59.
- Ghalyanchilangeroudi A, Hosseini H, Jabbarifakhr M, Fallah Mehrabadi MH, Najafi H, Ghafouri SA, Mousavi FS, Ziafati Z, Modiri A (2018) Emergence of a virulent genotype VIIi of Newcastle disease virus in Iran. *Avian Pathology* 47:509-519.
- Gould A, Hansson E, Selleck K, Kattenbelt J, Mackenzie M, Della-Porta A (2003) Newcastle disease virus fusion and haemagglutinin-neuraminidase gene motifs as markers for viral lineage. *Avian Pathology* 32:361-373.
- Harrison MS, Sakaguchi T, Schmitt AP (2010) Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *The international journal of biochemistry and cell biology* 42:1416-1429.
- Hosseini H, Langeroudi AG, Torabi R (2014) Molecular characterization and phylogenetic study of Newcastle disease viruses isolated in Iran, 2010–2012. *Avian diseases* 58:373-376.
- Izquierdo-Lara R, Chumbe A, Calderón K, Fernández-Díaz M, Vakharia V N (2019) Genotype-matched Newcastle disease virus vaccine confers improved protection against genotype XII challenge: The importance of cytoplasmic tails in viral replication and vaccine design. *PLoS One* 14:e0209539.
- Jadhav A, Zhao L, Liu W, Ding C, Nair V, Ramos-Onsins SE, Ferretti L (2020) Genomic diversity and evolution of quasispecies in newcastle disease virus infections. *Viruses* 12:1305.
- Joshi VG, Chaudhary D, Bansal N, Singh R, Maan S, Mahajan NK, Ravishankar C, Sahoo N, Mor SK, Radzio-Basu J (2021) Prevalence of Newcastle Disease Virus in Commercial and Backyard Poultry in Haryana, India. *Frontiers in Veterinary Science* 8:725232.
- Karamendin K, Kydyrmanov A (2021) Cormorants as a Potentially Important Reservoir and Carrier of Newcastle Disease Virus on the Asian Continent. *Frontiers in Veterinary Science* 8:660.
- Khattar SK, Yan Y, Panda A, Collins PL, Samal SK (2009) A Y526Q mutation in the Newcastle disease virus HN protein reduces its functional activities and attenuates virus replication and pathogenicity. *Journal of Virology* 83:7779-7782.
- Kiani MH, Bozorgmehrfard MH, Hosseini H, Charkhkar S, Ghalyanchi A (2016) Molecular characterization and

- phylogenetic study of newcastle disease viruses isolated in Iran, 2014–2015. *Iranian Journal of Virology* 10:53-57.
- Li X, Bi X, An M, Xia ZWu Y (2020) iTRAQ-based proteomic analysis of watermelon fruits in response to Cucumber green mottle mosaic virus infection. *International journal of molecular sciences* 21:2541.
- Li X, Li X, Cao H, Wang Y, Zheng S J (2013) Engagement of new castle disease virus (NDV) matrix (M) protein with charged multivesicular body protein (CHMP) 4 facilitates viral replication. *Virus research* 171:80-88.
- Liu H, Wang J, Ge S, Lv Y, Li Y, Zheng D, Zhao Y, Castellan D, Wang Z (2019) Molecular characterization of new emerging sub-genotype VIIh Newcastle disease viruses in China. *Virus Genes* 55:314-321.
- Makki F, Boroomand Z, Mayahi M, Seyfi Abad Shapouri MR (2021) Characterization of Newcastle disease virus in broiler flocks with respiratory symptoms in some provinces of Iran. *Molecular Biology Reports* 48:7281-7291.
- Miller CM, Selvam S, Fuchs G (2021) Fatal attraction: The roles of ribosomal proteins in the viral life cycle. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 12:e1613.
- Miller PJ, Afonso CL, Attrache J, Dorsey KM, Courtney SC, Guo Z, Kapczynski DR (2013) Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. *Developmental and Comparative Immunology* 41:505-513.
- Miller PJ, Koch G (2013) Newcastle disease. *Diseases of Poultry* 13: 89-138.
- Miyamoto Y, Yamada K, Yoneda Y (2016) Importin α : a key molecule in nuclear transport and non-transport functions. *The Journal of Biochemistry* 160:69-75.
- Mohammadabadi M, Nikbakhti M, Mirzaee H, Shandi A, Saghi D, Romanov MN, Moiseyeva IG (2010) Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics* 46:505-509.
- Mohammadi Far A, Faqih Imani SA, Mohammad Abadi MR, Soflaei M (2014) The effect of TGF β 3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. *Agricultural Biotechnology Journal* 5:125-136. (In Farsi).
- Mohammadifar A, Mohammadabadi M (2017) The effect of uncoupling protein polymorphisms on growth, breeding value of growth and reproductive traits in the fars indigenous chicken. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 7:679-685.
- Mohammadifar A, Mohammadabadi M (2018) Melanocortin-3 receptor (mc3r) gene association with growth and egg production traits in Fars indigenous chicken. *Malaysian Applied Biology* 47:85-90.
- Molouki A, Mehrabadi MHF, Bashashati M, Akhijahani MM, Lim SHE, Hajloo SA (2019) NDV subgenotype VII (L) is currently circulating in commercial broiler farms of Iran, 2017-2018. *Tropical Animal Health and Production* 51:1247-1252.
- Munir M, Abbas M, Khan MT, Zohari S, Berg M (2012) Genomic and biological characterization of a velogenic Newcastle disease virus isolated from a healthy backyard poultry flock in 2010. *Virology Journal* 9:1-11.
- Nikbakhti M, Mirzaee HR, Afsharian SM, Mohammadabadi MR, Saghi DA (2009) Analyses of genetic variation in Khorasan indigenous chicken breed by using of microsatellite markers. *Iranian Journal of Animal Science Reserch* 2:9-25. (In Farsi).
- OIE (2012) Newcastle disease. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees*. Paris: Office International des Epizooties. 555-573.
- Plempner RK, Hammond AL, Cattaneo R (2001) Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 276:44239-44246.
- Sabouri F, Vasfi Marandi M, Bashashati M (2018) Characterization of a novel VIII sub-genotype of Newcastle disease virus circulating in Iran. *Avian Pathology* 47:90-99.
- Seal BS, King DJ, Meinersmann RJ (2000) Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae. *Virus Research* 66:1-11.
- Shtykova E, Petoukhov M, Dadinova L, Fedorova N, Tashkin VY, Timofeeva T, Ksenofontov A, Loshkarev N, Baratova L, Jeffries C (2019) Solution structure, Self-Assembly, and membrane interactions of the Matrix protein from Newcastle disease virus at neutral and acidic pH. *Journal of Virology* 93:e01450-01418.
- Sultan HA, Elfeil WK, Nour AA, Tantawy L, Kamel EG, Eed EM, Askary A, Talaat S (2021) Efficacy of the Newcastle Disease Virus Genotype VII. 1.1-Matched Vaccines in Commercial Broilers. *Vaccines* 10:29.
- Sultan HA, Elfeil WK, Nour AA, Tantawy L, Kamel E , Eed E ,Askary A, Talaat S (2022) Efficacy of the Newcastle Disease Virus Genotype VII. 1.1-Matched Vaccines in Commercial Broilers. *Vaccines* 10:29.
- Sultan HA, Talaat S, Elfeil WK, Selim K, Kutkat MA, Amer S, AChoi K-S (2020) Protective efficacy of the Newcastle disease virus genotype VII-matched vaccine in commercial layers. *Poultry Science* 99:1275-1286.
- Toroghi R (2014) solation 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. Project report No 45939, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education, and Extension Organization, Iran (In Farsi).
- Toroghi R, Salamatian I, Bassami MR, Irankhah N, Emarloo A, Mahouti A, Ghavi S (2020) Implementation of high-level biosecurity measures can reduce the baseline antibody titers of Newcastle disease in non-integrated layer flocks in northeast Iran. *World's Poultry Science Journal* 76:757-766.
- Usachev E, Fediakina I, MIu S, L'vov D, Prilipov A, Iamnikova S (2006) Molecular genetic characteristics of the Newcastle Sterna/Astrakhan/Z275/2001 virus isolated in Russia. *Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya* 1:14-20.
- Wang N, Huang M, Fung TS, Luo Q, Ye J X, Du QR, Wen LH, Liu DX, Chen RA (2020) Rapid Development of an Effective Newcastle Disease Virus Vaccine Candidate

by Attenuation of a Genotype VII Velogenic Isolate Using a Simple Infectious Cloning System. *Frontiers in Veterinary Science* 648.

Yu X, Shahriari S, Li H-MGhildyal R (2016) Measles virus matrix protein inhibits host cell transcription. *PLoS One* 11:e0161360.