نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هفدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۰،
پیاپی ۴۳ : ۱۱۰-۹۵

مقاله پژوهشی

شناسایی ژن نوکلئوپروتئین جدایه ویروس بیماریزای نیوکاسل ژنوتیپ XIII.2.1

زهرا حجازی[۱]، سید الیاس طباطبائی زاده*[۲]، رضا طرقی[۳]، پروانه صفاریان [٤]،حمیدرضا فرزین[۲]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- استادیار بیوتکنولوژی، شعبه مشهد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

۳- دانشیار دامپزشکی، شعبه مشهد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

۴- استادیار باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸

چکیده

بیماری نیوکاسل عفونتی فوق العاده مسری در طیور است که توسط ویروس بیماری نیوکاسل ایجاد می شود. این بیماری در سرتاسر دنیا به عنوان یکی از مهمترین بیمار یهای ماکیان به حساب آمده و می تواند گاهی باعث مرگ و میر ۱۰۰ درصدی در طیور مبتلا گردد. با توجه به تلفات ایجاد شده توسط این ویروس، تشخیص بیماری و نیز اطلاع کافی از سویه های در حال گردش ویروسی امری حیاتی به نظر می رسد. در این پژوهش، مطالعات تکمیلی جهت تعیین هویت مولکولی یک جدایه بیماریزا ویروس بیماری نیوکاسل ژنوتیپ XIII.2.1 به نام RT30/2010 که اولین بار از ایران گزارش شده است، انجام گرفته است. در این مطالعه خالص سازی ویروس طی دو مرحله به روش خالص سازی پلاک انجام شد. سپس توالی کامل ناحیه ی کد شونده ژن NP در این جدایه به منظور فراهم سازی اطلاعات تکمیلی برای شناخت ماهیت و همه گیری مولکولی RT30/2010 مورد تحقیق قرار گرفت. برای این منظور ژن NP این ویروس به کمک پرایمرهای اختصاصی تکثیر و در وکتور PTZ57R/T کلون شد. همچنین جهت شناسایی قسمت انتهایی ۳ پرایم ژنوم ویروس که شامل ناحیه ابتدایی ژن NP نیز می شود، از روش RACE (Rapid amplification of cDNA ends) استفاده شد. آنالیز فیلوژنتیک و محاسبه فواصل تکاملی توالی کد کننده کامل ژن نوکلئوپروتئین ویروس RT30/2010 بیماری نیوکاسل کلاس II، این ویروس را همراه با سویه هایی از کشور پاکستان در تحت ژنوتیپ XIII.2.1 قرار داد. بنابراین می توان گفت که این ویروس در مقایسه با سایر ویروس های شناسایی شده از ایران دارای خاستگاهی متفاوت است و در دسته ویروس های بیماری نیوکاسل شناسایی شده از پاکستان قرار می گیرد. اطلاعات حاصل از این مطالعه به شناخت بیشتر ویروس کمک کرده و امکان استفاده از این ویروس را به عنوان سویه چلنج و یا استفاده از آن برای ساخت واکسن در برابر ویروس های XIII.2.1 ممکن می سازد.

کلمات کلیدی: بیماری نیوکاسل، ژن نوکلئوپروتئین، XIII.2.1

*نویسنده مسئول: سید الیاس طباطبایی زاده
آدرس: استادیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
پست الکترونیک: e.tabatabaee@rvsri.ac.ir

مقدمه

ویروس بیماری نیوکاسل ایجاد کننده یکی از مهم ترین بیماری های طیور از نظر اقتصادی است (۱). بیماری نیوکاسل عفونتی فوق العاده مسری در بسیاری از گونه های طیور است که برای اولین بار در سال ۱۹۲۶ در جاوه مشاهده گردید. این ویروس در پائیز همان سال به انگلستان راه یافت و در منطقه ای به نام نیوکاسل تشخیص داده شد و بعد ها بیماری نیوکاسل در بسیاری از نقاط دنیا نیز مشاهده شد (۲). این بیماری پس از آنفلوانزای طیور به عنوان دومین بیماری مهم طیور و دیگر پرندگان در سراسر دنیا در نظر گرفته شده و به دلیل طبیعت سخت بیماری، در لیست A سازمان بین المللی بهداشت حیوانات (OIE) قرار گرفته است (۳).

کشورهای دارای تولیدات صنعتی طیور هزینه های هنگفتی برای پیشگیری از بیماری نیوکاسل یا پیشگیری از ضررهای ناشی از این بیماری صرف می کنند تا شرایطی عاری از بیماری نیوکاسل داشته باشند (۴).

ویروس بیماری نیوکاسل به خانواده *پارامیکسوویریده* (Paramyxovirus) و جنس *آوولاویروس* (*Avulavirus*) تعلق دارد که یک ویروس با ژنوم تک رشته ای با سنس منفی و دارای اندازه ۱۵۱۸۶ باز و از ناحیه ۳ پریم تا ۵ پریم ژنوم به ترتیب کدکننده شش پروتئین شامل نوکلئوپروتئین(NP)، فسفوپروتئین (P)، ماتریکس (M)، فیوژن (F)، هماگلوتینین-نورآمینیداز (HN) و RNA پلی مراز (L) می باشد (۵). از نظر ساختاری دو گلیکوپروتئین F و HN جزء آنتی ژن های سطحی ویروس هستند که در بدن حیوان نقش حفاظتی را نیز بر عهده دارند (۶). اولین مرحله در بروز عفونت، اتصال ویروس به سطح سلول میزبان است. این آلوده سازی با واسطه مولکول (HN) در سطح ویروس شروع می شود که به گیرنده های اسید سیالیک سطحی سلول میزبان متصل می شوند. اتصال نهایی و عفونت از طریق آمیختگی پوشش چربی ویروس به غشای سلولی توسط پروتئین فیوژن (F) صورت می گیرد. از میان پروتئین های ویروس نیوکاسل، ایجاد شکاف در پروتئین F برای شروع عفونت نقش اساسی ایفا می کند (۷).

میزان بیماری زایی ویروس بیماری نیوکاسل و قرار گرفتن آن در دسته ویروس های دارای حدت (Virulent) بر اساس شاخص پاتوژنیسیتی داخل مغزی (ICPI) ۰/۷ یا بیشتر درجوجه های یک روزه و یا وجود آمینواسیدهای متعدد بازی در جایگاه شکست ژنF تعیین می شود. این ویروس بر اساس میزان حدت شامل ویروس های ولوژنیک (بیماری زایی با حدت زیاد)، مزوژنیک (بیماری زایی با حدت متوسط)، لنتوژنیک (بیماری زایی با حدت کم یا غیربیماریزا) و بدون علائم انتریک تقسیم بندی می گردد (۲).

بیماری نیوکاسل بعد از اولین گزارش در ایران درسال ۱۳۲۹ طی مدت کوتاهی در سایر استان های کشور شیوع یافت به طوری که از آن هنگام تاکنون این بیماری در ایران اندمیک شده است (۸). بر اساس تحلیل توالی کامل ناحیهٔ کد شوندهٔ ژن F، سویه های ویروس بیماری نیوکاسل متعلق به کلاس I در یک ژنوتیپ و سویه های موجود در کلاس II در ۲۰ ژنوتیپ و تعداد زیادی تحت ژنوتیپ مختلف طبقه بندی می شوند (۹).

یکی از راه های شناسایی کلون های ویروسی استفاده از کشت ویروس بر روی سلول های هدف است. تکثیر ویروس های ولوژنیک بیماری نیوکاسل معمولا با انهدام سلول ها همراه است درحالیکه سویه های

لنتوژنیک ویروس در بسیاری از رده های سلولی یا کشت های اولیه سلولی قادر به تکثیر و ایجاد پلاک نیستند (۲).

در کنترل همه گیری ها معمولا تشخیص NDV به تنهایی کفایت نمی کند، بلکه لازم است تا پاتوتایپ و میزان بیماری زایی ویروس نیز ارزیابی گردد. برای این منظور با روش RT-PCR می توان سویه های بیماریزا و غیر بیماریزای ویروس بیماری نیوکاسل را شناسایی کرد (۱۰).

یکی از پروتئین های مهم ویروس نیوکاسل NP می باشد (۲) که در تنظیم رونویسی، تکثیر و سرهم کردن RNA ژنومیک ویروس نقش دارد (۱۱). این پروتئین از ۴۸۹ آمینواسید تشکیل شده است و زیر واحد اصلی آن یک پلی پپتید تک‌رشته‌ای با وزن مولکولی ۵۳ کیلودالتون است که از RNA ویروسی در برابر فعالیت نوکلئازها محافظت می کند (۱۲). NP فراوانترین پروتئین در ذرات ویروسی است و از دو دامنه تشکیل شده است (۱۳, ۱۴). دامنه گلوبولار دارای تمام اجزای ضروری برای مونتاژ خود به خودی NP و اتصال RNA جهت تشکیل کمپلکس NP-RNA است، در حالی که دم C- ترمینال مسئول برهمکنش کمپلکس NP-RNA با پروتئین P است (۱۴-۱۶). با توجه به همبستگی بین حدت و میزان تکثیر ویروس، ژن های NP، P و L که در تکثیر ویروس نقش دارند تاثیر معنی داری بر روی حدت NDV دارند (۲, ۱۷).

با توجه به اینکه شناسایی کامل ویروس های ژنوتیپ های جدید ویروس نیوکاسل که برای اولین بار در کشور شناسایی شده اند از نظر اپیدمیولوژیک اهمیت دارد، این مطالعه با هدف شناسایی ژن کامل NP از یک ویروس بیماری نیوکاسل ژنوتیپ XIII.2.1 شناسایی شده برای اولین بار در ایران انجام گرفت. همچنین هدف دیگر از شناسایی کامل این ویروس تهیه سویه چلنج بومی برای ویروس نیوکاسل ژنوتیپ XIII.2.1 تا بتوان از آن برای ارزیابی عملکرد سویه های واکسینال موجود در ایران استفاده کرد و یا در صورت نیاز بتوان از این سویه جهت ساخت واکسن نیوکاسل استفاده کرد.

مواد و روش ها:

ویروس

ویروس RT30/2010 از یک گله مرغ بومی واقع در استان خراسان رضوی در بهمن ماه ۱۳۸۸ جدا گردید (۱۸). این ویروس منجر به تلفات ۱۰۰ درصدی شده بود و مرغ ها قبل از مرگ دارای اختلالات تنفسی، بی حالی، بی اشتهایی و اسهال سبز بودند. در کالبد گشایی نکروز و خونریزی در مجاری گوارشی بخصوص پلاک های پی یر و تونسیل های سکومی مشاهده شده بود. در نای خونریزی، نکروز و اگزودای کاتارال قابل مشاهده بود. جداسازی ویروس از نمونه های مغز انجام شد (۱۸).

خالص سازی پلاک ویروس (Plaque purification):

ابتدا کشت سلول های فیبروبلاست از جنین تخم مرغ های SPF ۱۱ روزه (Venkateshwara Hatcheries, India) بر اساس روش استاندارد در Medium 199 (Sigma-Aldrich) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین (۱۰۰X) در داخل فلاسک T75 تهیه گردید (۱۹). سلول ها به پلیت ۶ خانه کشت سلول منتقل شدند و زمانی که تراکم سلول ها حدود ۹۰٪ بود، رقت های ویروس به خانه ها اضافه گردید. به این ترتیب که رقت های ۱۰ برابری از مایع آلانتوئیک در Medium 199 بدون FBS از 10^{-2} تا 10^{-9} تهیه گردید. میزان ۴۰۰

میکرولیتر از هر رقت به هر چاهک حاوی سلول اضافه گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور با ۵٪CO2 قرار داده شد. به یک خانه کشت سلول M 199 فاقد ویروس به عنوان کنترل منفی اضافه گردید. پس از تخلیه و شستشوی سلول ها با PBS مقدار ۳ میلی لیتر محیط پلاک شامل M 199 دارای آنتی بیوتیک، ۵ درصد FBS و ۰/۳ درصد غلظت نهایی آگارز داخل هر خانه ریخته شد. به مدت ۵ روز پلیت ها از نظر تشکیل پلاک بصورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از مشاهده پلاک در زیر میکروسکوپ برداشت پلاک ویروسی از چاهک با پلاک های متمایز انجام شد. ویروس حاصل از هر پلاک به تخم مرغ های SPF ۹ روزه تلقیح و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در انکوباتور، مایع آلانتوئیک برداشت گردید. سپس به منظور بررسی تکثیر و تعیین تیتر ویروس از تست هماگلوتیناسیون استفاده گردید.

آزمایش هماگلوتیناسیون (HA):

آزمایش هماگلوتیناسیون طبق پروتکل استاندارد انجام گردید. جهت انجام آزمایش از میکروپلیت ۹۶ خانه با کف V شکل استفاده گردید. ابتدا ۰/۰۲۵ میلی لیتر PBS به خانه های مورد نظر اضافه شد. سپس ۰/۰۲۵ میلی لیتر از مایع آلانتوییک (رقت ۱ به ۳) به خانه اول اضافه شد. رقت های دو برابری مایع آلانتوییک از حجم های ۰/۰۲۵ میلی لیتری در خانه های حاوی PBS تهیه شد. سپس ۰/۰۲۵ میلی لیتر PBS به هر خانه اضافه گردید. گلبول های قرمز با حجم ۱ درصد تهیه شده از جوجه های SPF به مقدار ۰/۰۲۵ میلی لیتری به هر خانه اضافه شد. بعد از مخلوط سازی، انکوباسیون به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق انجام گردید. تیتر ویروس بر اساس قرائت بالاترین رقت دارای هماگلوتیناسیون کامل محاسبه گردید.

استخراج RNA ژنومی:

جهت استخراج RNA ویروسی از کیت High pure (viral nucleic acid kit) شرکت Roche آلمان طبق پروتکل شرکت سازنده استفاده گردید. جهت ارزیابی کمیت و خلوص RNA استخراج شده از اسپکتروفوتومتر (Thermo Scientific NanoDrop 2000c) و قرائت جذب نوری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ استفاده گردید. سپس نمونه استخراجی RNA جهت ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت و باقی مانده RNA در منهای ۷۰ درجه سانتیگراد ذخیره شد.

طراحی پرایمر، واکنش رونوشت برداری معکوس (RT) و ساخت cDNA:

با توجه به اینکه بر اساس مطالعه گذشته ویروس RT30 در تحت ژنوتیپ XIII.2.1 قرار می گرفت، توالی های کامل ژنومی ویروس های نیوکاسل موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI که دارای بیشترین شباهت ژنتیکی بودند گرفته شد و پرایمرهای مورد استفاده جهت ساخت cDNA برای واکنش '3 RACE و تکثیر قطعه ژنومی F1 در برگیرنده ژن کامل NP طراحی گردید (جدول ۱). با توجه اینکه ژنوم ویروس بیماری نیوکاسل RNA تک رشته ای با سنس منفی است از پرایمر اختصاصی رفت (NDV1-F1f) مورد استفاده در واکنش PCR جهت ساخت cDNA استفاده شد (جدول ۱). ساخت cDNA با استفاده از کیت (SuperScript™ II RT) انجام گرفت. به این ترتیب که میکس اولیه با آب بدون نوکلئاز به حجم ۱۲ میکرولیتر رسید که حاوی ۵۰۰ نانوگرم RNA استخراج شده از مایع آلانتوئیک، ۱ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۲ پیکومول پرایمر NDV1-F1f می باشد. انکوباسیون این ترکیب به مدت ۵ دقیقه در ۶۵°C انجام

شد و بلافاصله روی یخ قرار گرفت. بعد از سانتریفیوژ به مدت ۵ ثانیه مقدار ۴ میکرولیتر بافر، ۲ میکرولیتر DTT (۰/۱ مولار) و ۱ میکرولیتر ممانعت کننده RNase (RiboLock) به میکس اولیه اضافه شد و بعد از مخلوط کردن انکوباسیون ۴۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. سپس ۱ میکرولیتر آنزیم (SuperScript™ II RT) اضافه شد و انکوباسیون در ۴۲°C به مدت ۵۰ دقیقه انجام گرفت. جهت غیرفعالسازی واکنش انکوباسیون محلول در ۷۰°C به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد.

جدول ۱: پرایمر های مورد استفاده جهت تکثیر ژن NP

Primer name	Primer sequence	Product name
NDV1-RACE3r	CTGTGACAAACGGAGTACC	RACE3' (563 bp)
Anchored-dT20	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN	
NDV1-F1f	AGTGTGCCCCAGTTCAACAA	F1 (2076 bp)
NDV1-F1r	GGAGTATTGTCTTGGCTCTGC	

RT-PCR:

با استفاده از cDNA تهیه شده به عنوان الگو، پرایمرهای اختصاصی و DNA پلیمراز با اطمینان بالا (PrimeSTAR HS DNA Polymerase, Takara Bio) PCR در حجم کلی ۵۰ میکرولیتر انجام گردید. ترکیبات مورد استفاده شامل ۱۰ میکرولیتر بافر، ۴ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۱۰ پیکومول پرایمر NDV1-F1f، ۱۰ پیکومول پرایمر NDV1-F1r، ۲ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم پلیمراز و تا حجم ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل بوده است. برنامه دمایی شامل یک مرحله واسرشتی در دمای ۹۶°C به مدت ۱۰ ثانیه، ۳۵ چرخه شامل مراحل متوالی واسرشتی در دمای ۹۶°C به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵°C به مدت ۱۵ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲°C به مدت ۱۲۰ ثانیه استفاده گردید. بعد از اتمام واکنش PCR از الکتروفورز با استفاده از آگارز ۱ درصد جهت بررسی واکنش استفاده گردید.

تکثیر انتهای ۳ پرایم ژنومی ویروس به روش Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

در ابتدا با استفاده از آنزیم *E. coli* Poly(A) Polymerase (New England Biolabs, Inc) در انتهای ۳ پرایم RNA ژنومی ویروس توالی پلی A اضافه گردید. واکنش ساخت پلی A در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از مقادیر ۱ میکروگرم RNA ویروسی تازه استخراج شده در حجم ۱۳ میکرولیتر، ۴ میکرولیتر 5X First-Strand Buffer، ۲ میکرولیتر ATP (10mM) و ۱ میکرولیتر *E. coli* Poly(A) Polymerase انجام گرفت. سپس انکوباسیون در ۳۷°C درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. با توجه به اینکه انتهای ۳ پرایم RNA ژنومی ویروس نیوکاسل پس از پایان این مرحله دارای پلی A می باشد، می توان از آن بعنوان الگو و با استفاده از پرایمر دارای توالی پلی T برای ساخت cDNA استفاده نمود. واکنش رونوشت برداری معکوس در حجم کلی ۱۰ میکرولیتر و بلافاصله

به دنبال اضافه کردن پلی A انجام شد. به این ترتیب که مقدار ۱ میکرولیتر Anchored-dT20 (جدول ۱) با غلظت نهایی ۱ میکرومولار، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (10 mM each) و ۴/۵ میکرولیتر از محصول واکنش پلی A با هم مخلوط و در دمای ۶۵°C به مدت ۵ دقیقه انکوبه و سپس فوراً مخلوط بر روی یخ سرد شد. سپس سایر مراحل مطابق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت (SuperScript™ II Reverse Transcriptase). تکثیر ناحیه ۳ پرایم ژنوم در دو مرحله به روش semi-nested PCR انجام گرفت. در اولین PCR جهت تکثیر اولیه ناحیه انتهایی ۳ پرایم ژنوم به طول حدود ۱۹۹۰ جفت باز از Anchored-dT20 به عنوان پرایمر رفت و پرایمر seqRaTDF1 (جدول ۲) برای برگشت استفاده شد. محصول این واکنش به طور مستقیم به عنوان الگو با رقت نهایی ۱ به ۲۰ برای واکنش PCR دوم مورد استفاده قرار گرفت. در واکنش دوم PCR جهت ساخت قطعه به طول حدود ۵۸۰ جفت باز از پرایمر Anchored-dT20 به عنوان پرایمر رفت و پرایمر NDV1-RACE3r (جدول ۱) که به داخل ژنوم متصل می شد به عنوان پرایمر برگشت استفاده شد. این توالی دارای همپوشانی با قطعه ۱ از قطعات تکثیر شده ژنومی بود و جهت تعیین توالی واکنش ۳ پرایم RACE مورد استفاده قرار گرفت.

کلونینگ مولکولی و تعیین توالی:

محصول PCR قطعه F1 توسط کیت High pure PCR product purification(شرکت Roche) تخلیص گردید و در پلاسمید خطی pTZ57R/T به روش TA کلون شد. با توجه به اینکه قطعه F1 توسط پلیمراز با اطمینان زیاد ساخته شده بود و در دو انتهای فاقد دنباله باز آدنین بود، جهت اضافه کردن آدنین به دو انتهای ۳ پرایم محصول PCR انکوباسیون قطعه F1 همراه با پلیمراز *Taq* و dATP به مدت ۳۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گردید. سپس محصول PCR و پلاسمید خطی pTZ57R/T با غلظت مولکولی ۳ به ۱ در مجاورت آنزیم لیگاز (شرکت فرمنتاز) در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. ترانسفورماسیون محصول لیگاسیون به داخل باکتری DH5α مستعد شده با استفاده از $CaCl_2$ به روش شوک حرارتی طبق روش استاندارد انجام گردید. کلونی های باکتریایی حامل پلاسمید کلون شده به روش آبی- سفید و کلونی PCR انتخاب شدند. کلونی های PCR مثبت تکثیر شدند و پلاسمید استخراج شده با هضم بوسیله آنزیم های محدود کننده جهت تایید مولکولار کلونینگ مورد تایید قرار گرفتند. قطعه F1 کلون شده در پلاسمید برای تعیین توالی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال گردید. خوانش اولیه توالی کلون شده با استفاده از پرایمرهای یونیورسال پلاسمید انجام گرفت. ادامه خوانش ها با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بر اساس نتایج خوانش های اولیه انجام گرفت (جدول ۲). محصول PCR حاصل از واکنش RACE با استفاده از پرایمرهای اختصاصی رفت و برگشت تعیین توالی شد.

جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده جهت تعیین توالی قطعه ژنومی

Primer name	Primer sequence
seqFaTDF1	GACCAGATGAGCTTTGCAC
seqFbTDF1	TCTGTTCTCTCTTCTACCCAGT
seqRaTDF1	CTTGGGCCGTAATTATGCT

نتایج خوانش ها بعد از بررسی کروماتوگرام و تأیید آن با استفاده از نرم افزار Bioedit بر روی هم قرار گرفتند و توالی نهایی قطعه کلون شده در پلاسمید و قطعه حاصل از RACE بعد از بررسی خوانش های دو طرفه بدست آمد.

آنالیز فیلوژنتیک و بررسی فواصل ژنتیکی ژن NP :

آنالیز فیلوژنتیک با استفاده از ۳۱۷ توالی کامل ژن NP مربوط به ویروس های کلاس II که قبلا طبق آخرین روش طبقه بندی ویروس بیماری نیوکاسل با استفاده از ژن کامل فیوژن تعیین ژنوتیپ شده بودند (۹)، انجام گرفت. در ابتدا همردیفی (Alignment) این ۳۱۷ توالی با توالی کامل کدکننده ژن NP ایزوله RT30/2010 توسط نرم افزار تحت وب (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo) انجام گردید. سپس با استفاده از فایل حاصل از همردیفی توالی ها، درخت فیلوژنی با استفاده از RaxML و بکارگیری روش ML بر اساس مدل GTR و تعداد ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپت رسم شد. جهت آنالیز از سوپر کامپیوتر تحت وب (CIPRES Science Gateway) براساس دستورالعمل ارائه شده توسط دیمیتروف و همکاران انجام گرفت (۹).

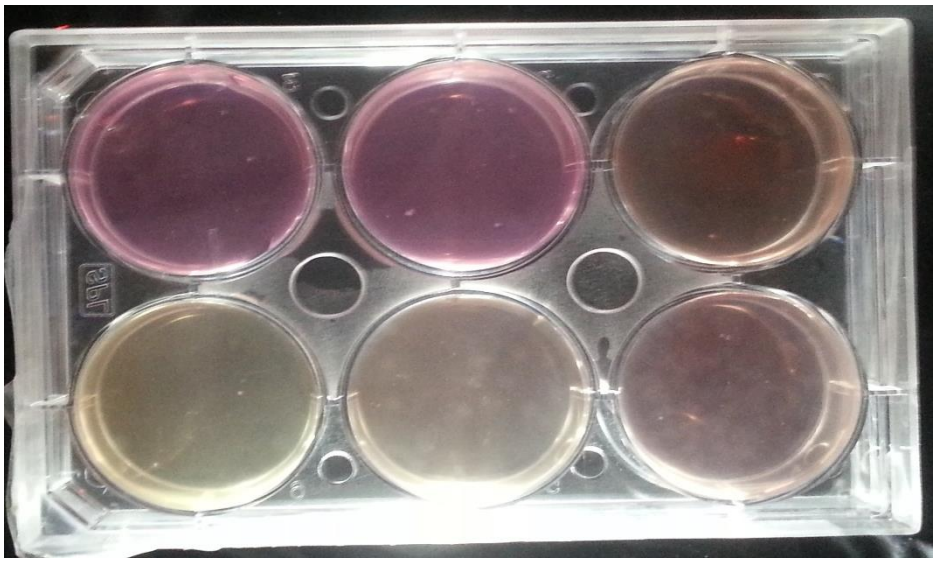
آنالیز فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین ژنوتیپ ها:

برای آنالیز فواصل تکاملی از ۳۱۷ توالی نوکلئوتیدی کامل کدکننده ژن NP مربوط به ژنوتیپ ها و تحت ژنوتیپ ها مختلف ویروس نیوکاسل و ایزوله RT30/2010 از نرم افزار MEGA X استفاده شد. آنالیز با مدل Maximum Composite Likelihood انجام گردید (۲۰). 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.

نتایج:

خالص سازی ویروس RT30/2010 و آزمایش HA:

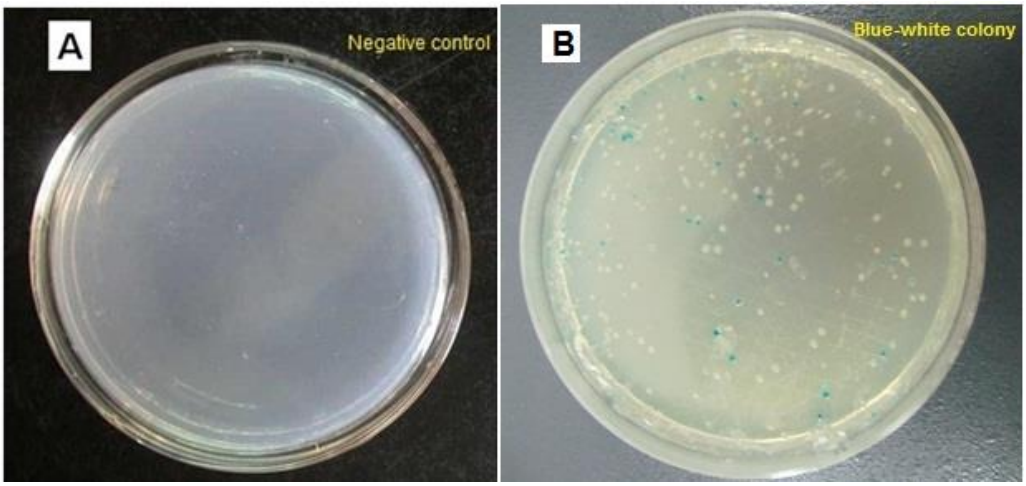
به منظور تکثیر کلونال ویروس RT30/2010 از روش خالص سازی پلاک استفاده شد. پلاک های ویروسی ایجاد شده همگی دارای اندازه های یکسان بودند (شکل ۱). ویروس حاصله از یک پلاک ویروسی جهت تکثیر به تخم مرغ جنین دار SPF تلقیح گردید. در بررسی تست HA برای مایع آلانتوئیک تیتر ۲۰۴۸ مشاهده گردید.



شکل۱: خالص سازی پلاک ویروسی

تکثیر و مولکولار کلونینگ ژن NP:

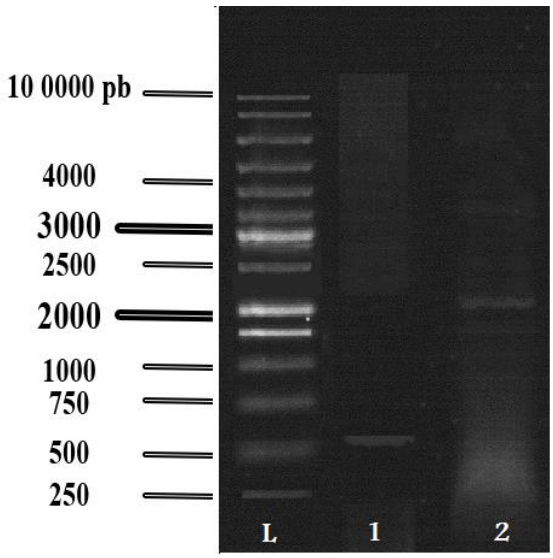
جهت بررسی تکثیر قطعه F1 حاوی ژن کامل NP به روش RT-PCR از آگارز ژل الکتروفورز استفاده شد. محصول PCR به طول ۲۰۷۶ جفت باز مشاهده گردید (شکل ۲). مولکولار کلونینگ قطعه F1 در پلاسمید pTZ57R/T انجام شد و کلونی های سفید که حاوی قطعه F1 بودند بدنبال کشت باکتریهای ترانسفورم شده قابل مشاهده بود (شکل ۲). نتایج حاصل از کلونی PCR، برش پلاسمید با آنزیم های محدود کننده و تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای یونیورسال نشان دهنده و تأیید کننده کلونینگ قطعه F1 در پلاسمید pTZ57R/T بودند.



شکل۲: A : کنترل منفی برای TA کلونینگ B: پلیت حاوی کلنی های سفید/آبی

تکثیر انتهای ۳ پرایم ژنوم ویروس به روش RACE:

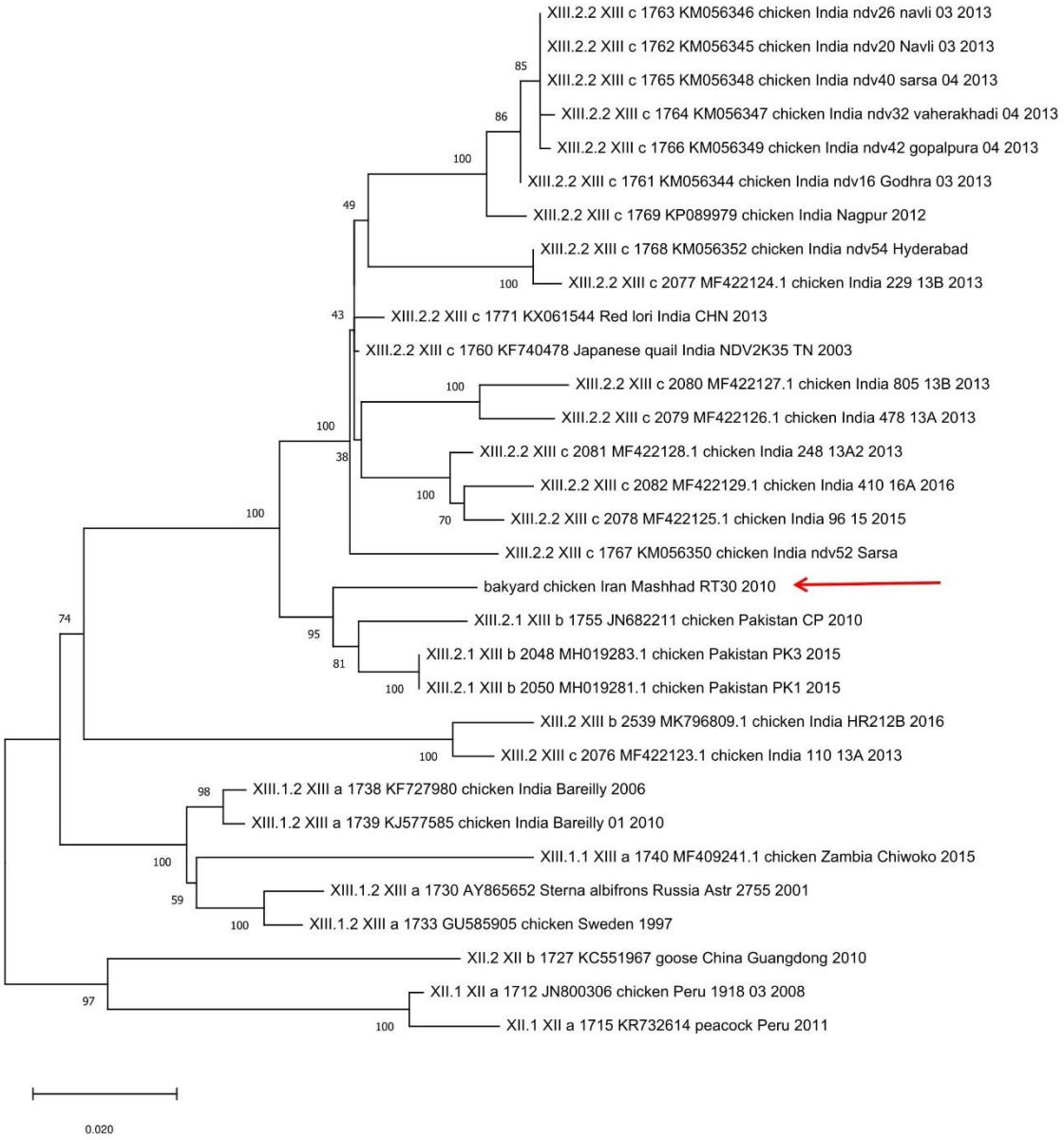
با توجه به اینکه استفاده مستقیم از واکنش RACE به عنوان الگو جهت واکنش PCR با پرایمرهای NDV1-RACE3r و Anchored-dT20 منجر به ایجاد اسمیر و باندهای اضافه گردید، واکنش به روش semi-nested PCR انجام گرفت. واکنش semi-nested PCR منجر به تکثیر قطعه حدود ۵۶۰ جفت بازی گردید (شکل ۳). این قطعه شامل ۴۴۲ باز از قسمت ابتدایی ژن NP می شود. تکثیر این ناحیه به دنبال تعیین توالی نوکلئوتیدی تأیید گردید.



شکل۳: ژل محصولاتPCR. ۱: باند حاصل از واکنش RACE به طول ٥٦٠ جفت باز. ۲: باند بطول ۲۰۷٦ جفت باز حاصل از تکثیر قطعه F1 حاوی ژن NP.

ژنوتایپینگ و رسم درخت فیلوژنی ویروس RT30/2010 بر اساس توالی ژن NP:

توالی ژن NP در بانک ژنومی NCBI با شماره دستیابی MZ934443 به ثبت رسید. با توجه به اطلاعات آخرین مقاله مرجع جهت آنالیز فیلوژنتیک ویروس نیوکاسل (۲۱) آنالیز فیلوژنتیک با استفاده از توالی کامل و کد کننده ژن NP ویروس RT30/2010 انجام گردید. بر اساس درخت آنالیز فیلوژنتیک مشاهده گردید که ویروس RT30/2010 با تکرار پذیری ۱۰۰۰ در کلید ویروس های ژنوتیپ XIII و تحت ژنوتیپ XIII.2.1 قرار می گیرد (شکل۴).



شکل ٤: درخت آنالیز فیلوژنتیک ویروس RT۳۰/۲۰۱۰ بر اساس توالی کامل ژن NP. زیر مجموعه مربوط به ویروس های ژنوتیپ XIII نشان داده شده است. درخت به مقیاس رسم شده است و طول شاخه ها با تعداد جایگزینی برای هر باز اندازه گیری می شود.

فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین ویروس های نیوکاسل کلاس II و ویروس RT30/2010 :

بر اساس معیارهای هدفمند برای طبقه بندی NDV، در ژنوتیپ های متفاوت میانگین فاصله در هر سایت بیشتر از ۰/۱ و برای تحت ژنوتیپ های متفاوت میانگین فاصله در هر سایت بیشتر از ۰/۰۵ می باشد(۲۱). در این بررسی نیز مشخص گردید که فاصله بین ویروس RT30/2010 و سایر ژنوتیپ ها بیشتر از ۰/۱ است در حالی که این فاصله با ژنوتیپ XIII برابر با ۰/۰۶ است (جدول۳).

جدول ۳: تخمین فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین ژنوتیپ های NDV کلاس II و ویروس RT۳۰/۲۰۱۰. حرف n در داخل پرانتز نشان دهنده تعداد توالی های مربوط به هر ژنوتیپ است که در این آنالیز مورد استفاده قرار گرفته است.

Genotype	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	XI	XII	XIII	XIV	XVI	XVII	XVIII
I (n=37)																
II (n=4)	0.12															
III (n=1)	0.12	0.13														
IV (n=2)	0.11	0.12	0.08													
V (n=7)	0.15	0.16	0.13	0.1												
VI (n=99)	0.17	0.18	0.14	0.12	0.13											
VII (n=111)	0.16	0.17	0.14	0.11	0.12	0.12										
VIII (n=4)	0.15	0.16	0.13	0.09	0.1	0.12	0.12									
IX (n=3)	0.12	0.12	0.09	0.09	0.12	0.13	0.13	0.12								
XI (n=2)	0.17	0.17	0.15	0.1	0.16	0.17	0.16	0.15	0.15							
XII (n=3)	0.17	0.19	0.15	0.12	0.12	0.13	0.1	0.13	0.15	0.17						
XIII (n=27)	0.17	0.17	0.15	0.12	0.12	0.13	0.1	0.12	0.13	0.16	0.11					
XIV (n=6)	0.18	0.19	0.16	0.12	0.13	0.13	0.1	0.13	0.14	0.18	0.11	0.11				
XVI (n=1)	0.19	0.19	0.17	0.13	0.13	0.15	0.15	0.14	0.15	0.18	0.16	0.15	0.16			
XVII (n=8)	0.17	0.19	0.15	0.11	0.12	0.12	0.1	0.12	0.14	0.16	0.1	0.11	0.1	0.16		
XVIII (n=2)	0.18	0.19	0.15	0.12	0.13	0.14	0.11	0.13	0.15	0.17	0.12	0.12	0.12	0.17	0.11	
RT30/2010	0.16	0.17	0.15	0.11	0.12	0.12	0.09	0.12	0.14	0.16	0.1	0.06	0.1	0.15	0.1	0.11

بحث:

بیماری نیوکاسل یکی از بیماری های ویروسی مهم در صنعت پرورش طیور می باشد، بنابراین استفاده از آزمایشات پاراکلینیکی که در کمترین زمان ممکن بتوانند سبب تشخیص و شناسایی عامل بیماری گردند، اهمیت بسزائی در کم کردن میزان تلفات و پیشگیری از عواقب بعدی بیماری دارد (۲). از زمان اولین شیوع بیماری نیوکاسل در سال ۱۹۲۱، ژنوتیپ های مختلفی در هر دو کلاس I و II ظهور پیدا کرده است (۲۲). اعتقاد بر این است که سویه های بیماریزای NDV در نواحی جغرافیایی که بیماری به شکل اندمیک است بطور مداوم دچار تغییرات ژنتیکی و پادگنی می شوند (۲۳, ۲۴). بر این اساس کشورهایی مانند ایران نیز شاید محل مناسبی برای نوپدیدی ویروسهای جدید باشند. همچنین احتمال ورود ژنوتیپ های جدید ویروس بیماری نیوکاسل به کشور از طریق کشورهای همسایه نیز وجود دارد. از این رو ضرورت تشخیص و جداسازی سریع ویروس بیماری نیوکاسل و نیز تولید واکسن کشته به منظور جلوگیری از شیوع این بیماری دارای اهمیت است. از طرفی انجام مطالعات مولکولی می تواند موجب دست یابی به اطلاعاتی در زمینه تغییرات احتمالی به وجود آمده در ویروس بیماری نیوکاسل شود. از سویی دیگر، افزایش فاصلهٔ ژنتیکی و پادگنی موجود بین سویه های واکسینال متداول و سویه های فیلدی در حال چرخش شاید به شکل گیری سویه های بیماریزای جدید NDV منجر گردد، بنابراین تداوم بروز واگیری های بیماری نیوکاسل در ایران شاید ناشی از این موضوع باشد (۲۵).

در این پژوهش، مطالعات تکمیلی جهت تعیین هویت مولکولی یک جدایه بیماریزای ویروس بیماری نیوکاسل تحت ژنوتیپ XIII.2.1 به نام RT30/2010 انجام گرفته است، ویروسی از تحت ژنوتیپی که برای اولین بار از ایران گزارش شده است. توالی کامل ناحیهٔ کد کننده ژن NP به منظور فراهم سازی اطلاعات تکمیلی برای شناخت ماهیت و همه گیرشناسی مولکولی RT30/2010 مورد تحقیق قرار گرفت. تعیین هویت و شناخت ارتباطات همه گیر شناسی این جدایه با جدایه های متعلق به کشور های

همسایه یا دیگر کشور ها از نظر برنامه ریزی برای اجرای برنامه های امنیت زیستی از اهمیت فراوانی برخوردار است.

ژنوتیپ XIII در حال حاضر از ۴ تحت ژنوتیپ XIII.1.1، XIII.1.2، XIII.2.1 و XIII.2.2 تشکیل شده است. تحت ژنوتیپ XIII.1.1 شامل ویروسهای جدا شده در آفریقا ، سوئد ، روسیه و هند بین سالهای ۱۹۹۵ و ۲۰۱۵ است، در حالی که تحت ژنوتیپ XIII.1.2 شامل ویروسهای جدا شده در ایران بین سالهای ۲۰۰۸ و ۲۰۱۱ است (۹, ۲۶). ویروسهای جدا شده در پاکستان و هند به ترتیب متعلق به تحت ژنوتیپ های XIII.2.1 و XIII.2.2 می باشند (۹). ویروس های ژنوتیپ XIII در حداقل سه قاره توزیع و شناسایی شده اند (۲۷, ۲۸). در عین حال مطالعات انجام گرفته در طی سال های اخیر نشان می دهند که ویروس های تحت ژنوتیپ VII.1.1 شایع ترین ویروس های بیماری نیوکاسل در ایران هستند (۲۹, ۳۰).

پروتئین NP ویروس بیماری نیوکاسل نقش مهمی در تکثیر ژنوم ویروس دارد و وجود اسید آمینه گلوتامین (E) در جایگاه ۴۰۲ انتهای کربوکسیل پروتئین دارای نقش مهمی در ساخت RNA ژنومی ویروس است به طوریکه جهش و تغییر این اسید آمینه موجب کاهش حدت ویروس می شود (۱۷). بررسی این جایگاه در ویروس RT30 نشاندهنده حضور اسید آمینه گلوتامین است که بیانگر حدت بالای سویه مورد مطالعه می باشد. ارزیابی های فیلوژنتیک و محاسبه فواصل تکاملی توالی کامل ژن NP نشان داد که RT30 همراه با سویه هایی از کشور پاکستان در شاخه ای مشترک در دسته ویروس های XIII.2.1 قرار می گیرد. ویروس های نیوکاسل ژنوتیپ XIII در مطالعات گذشته نیز در ایران مشاهده شده اند (۲۶)، در عین حال این ویروس ها در طبقه بندی جدید در تحت ژنوتیپ XIII.1.2 قرار می گیرند و بیشترین شباهت را به ویروس های جدا شده از کشورهای هند، روسیه، سوئد و آفریقای جنوبی دارند (۹). قرار گرفتن جدایه RT30/2010 در تحت ژنوتیپ XIII.2.1 و در دسته ویروس های شناسایی شده از پاکستان نشان می دهد که خاستگاه RT30/2010 با ویروس های تحت ژنوتیپ XIII.1.2 که در ایران شناسایی شده اند متفاوت است. شباهت نزدیک ویروس RT30/2010 با ویروس های پاکستانی می تواند نشان دهنده نقش قاچاق پرندگان زینتی و مرغ های بومی در انتقال سویه های بیماریزای NDV باشد. مرغ های واکسینه نشده می توانند نقش مهمی در شیوع NDV داشته باشند و قبل از بروز علائم بیماری می توانند به مدت ۱۵-۲ روز ویروس را حمل و به میزبان جدید منتقل کنند (۲). با توجه به اینکه ویروس RT30/2010 تنها مورد شناسایی یک ویروس تحت ژنوتیپ XIII.2.1 در ایران مربوط به سال ۲۰۱۰ است، با اینحال مطالعات انجام گرفته در سالهای اخیر در بنگلادش و هند نشان می دهد که ویروس های ژنوتیپ XIII.2 ویروس هایی شایع و در حال گردش هستند (۳۱-۳۳). با در نظر گرفتن موقعیت جغرافیایی ایران و احتمال ورود مجدد ویروس های ژنوتیپ XIII.2 و شیوع آنها در کشور فراهم بودن سویه واکسنی از این ژنوتیپ می تواند اهمیت داشته باشد.

مرغ های بومی و پرندگان زینتی به دلیل امنیت زیستی ضعیف، واکسیناسیون ناکافی و واردات کنترل نشده از کشورهای همسایه همانطور که در رابطه با خاستگاه ویروس RT30/2010 مشاهده گردید می توانند به عنوان مخازن ویروس های بیماریزای نیوکاسل برای مرغ های بومی و گله های تجاری طیور گوشتی و تخمگذار مطرح باشند.

نتیجه گیری نهایی

این مطالعه نشان داد که ژنوتایپینگ ویروس نیوکاسل بر اساس ژن NP می تواند مشابه استفاده از ژن کامل F باشد و تعیین توالی کامل قسمت ۳ پرایم ژنوم ویروس RT30/2010 که شامل ژن NP می شود با فراهم کردن اطلاعات تکمیلی، معرفی این ویروس را به عنوان سویه چلنج و یا واکسینال ممکن می سازد.

تقدیر وتشکر:

در اینجا از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه مشهد جهت تامین هزینه های این پژوهش تقدیر و تشکر به عمل می آید.

منابع

1. Absalón A, Cortés-Espinosa DV, Lucio E, Miller P, Afonso C. (2019). Epidemiology, control, and prevention of Newcastle disease in endemic regions: Latin America. *Tropical animal health and production*, **51**:1033-48.
2. Suarez DL, Miller PJ, Koch G, Mundt E, Rautenschlein S. (2020). Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and avian metapneumovirus infections. In: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL, et al., editors. *Diseases of poultry*. New York, United States: John Wiley & Sons, Inc, 109-66.
3. Jacobson R. (2004). *OIE* Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter I. 1.4. Principles of Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases.
4. Atyabi N, Alemohammad H, Bahonar A, Fallah Mehrabadi M, Ghafouri A, Alavinia S. (2018). Serological valuation of Newcastle disease vaccination titer in the broiler farms of Mazandaran province during 2014-2017. *Veterinary Researches & Biological Products*, **31**:58-64.
5. de Leeuw O, Peeters B. (1999). Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *Journal of General Virology*, **80**:131-6.
6. Liu M-M, Cheng J-L, Yu X-H, Qin Z-M, Tian F-L, Zhang G-Z. (2015). Generation by reverse genetics of an effective attenuated Newcastle disease virus vaccine based on a prevalent highly virulent Chinese strain. *Biotechnology letters*, **37**:1287-96.
7. Richardson CD, Scheid A, Choppin PW. (1980). Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the Fl or HA2 viral polypeptides. *Virology*, **105**:205-22.
8. Shohreh Alian Samakkhah AB, Farshad Zaynolabedini Tehrani, Seyed Ali Ghafouri, Avesta Sadrzadeh, Mohamad Hosein Fallah Mehrabadi. (2019). Occurrence of Newcastle Disease in Iranian Broiler Farms During 2013-2015. *Journal of Veterinary Research*, **74**:1-10.
9. Dimitrov KM, Abolnik C, Afonso CL , Albina E, Bahl J, Berg M, et al. (2019). Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infection, Genetics and Evolution*, **74**:103917.
10. Kant A, Koch G, Van Roozelaar D, Balk F, Huurne AT. (1997). Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian pathology*, **26**:837-49.

Institute, *Agricultural Research, Education, and Extension Organization*, Iran.

19. Hernandez R, Brown DT. (2010). Growth and maintenance of chick embryo fibroblasts (CEF). *Current protocols in microbiology*, **17**:A. 4I. 1-A. 4I. 8.
20. 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**:11030-5.
21. Dimitrov KM, Abolnik C, Afonso CL, Albina E, Bahl J, Berg M, et al. (2019). Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 103917.
22. Dimitrov KM, Afonso CL, Yu Q, Miller PJ. (2017). Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? *Veterinary microbiology*, **206**:126-36.
23. Samuel A, Nayak B, Paldurai A, Xiao S, Aplogan GL, Awoume KA, et al. (2013). Phylogenetic and pathotypic characterization of Newcastle disease viruses circulating in West Africa and efficacy of a current vaccine. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**:771-81.
24. Gong Y, Cui Z. (2011). Epitope variation in the Newcastle disease virus HN gene under antibody immune selective pressure in cell culture. *Science China Life Sciences*,**54**:474-9.
25. 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. *Journal of Virology*, **86**:13849-50.
11. Dortmans J, Rottier P, Koch G, Peeters B. (2010). The viral replication complex is associated with the virulence of Newcastle disease virus. *Journal of virology*, **84**:10113-20.
12. Yusoff K, Tan WS. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathology*. 2001;**30**:439-55.
13. Zhang S, Chen L, Zhang G, Yan Q, Yang X, Ding B, et al. (2013). An amino acid of human parainfluenza virus type 3 nucleoprotein is critical for template function and cytoplasmic inclusion body formation. *Journal of virology*, **87**:12457-70.
14. Kho CL, Tan WS, Tey BT, Yusoff K. (2003). Newcastle disease virus nucleocapsid protein: self-assembly and length-determination domains. *Journal of general virology*, **84**:2163-8.
15. Kho C, Tan W, Tey B, Yusoff K. (2004). Regions on nucleocapsid protein of Newcastle disease virus that interact with its phosphoprotein. *Archives of virology*, **149**:997-1005.
16. Kingston RL, Baase WA, Gay LS. (2004). Characterization of nucleocapsid binding by the measles virus and mumps virus phosphoproteins. *Journal of virology*, **78**:8630-40.
17. Yu X, Cheng J, He Z, Li C, Song Y, Xue J, et al. (2017). The glutamic residue at position 402 in the C-terminus of Newcastle disease virus nucleoprotein is critical for the virus. *Scientific reports*, **7**:1-13.
18. Toroghi R. (2014). 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, Project report No 45939, Razi Vaccine and Serum Research

26. Ebrahimi MM, 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.
27. Cattoli G, Fusaro A, Monne I, Molia S, Le Menach A, Maregeya B, et al. (2010). Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa—implications for diagnosis and control. *Veterinary microbiology*, **142**:168-76.
28. Munir M, Cortey M, Abbas M, Afzal F, Shabbir MZ, Khan MT, et al. (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**:1010-9.
29. 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**:1247-52.
30. Sabouri F, MARANDI MV, 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**:750-6.
31. Barman LR, Nooruzzaman M, Sarker RD, Rahman MT, Saife MRB, Giasuddin M, et al.(2017). Phylogenetic analysis of Newcastle disease viruses from Bangladesh suggests continuing evolution of genotype XIII. *Archives of virology*, **162**:3177-82.
32. Nath B, Kumar S. (2017). Emerging variant of genotype XIII Newcastle disease virus from Northeast India. *Acta tropica*, **172**:64-9.
33. Nooruzzaman M, Mumu TT, Kabiraj CK, Hasnat A, Rahman MM, Chowdhury EH, et al. (2021). Genetic and biological characterization of Newcastle disease viruses circulating in Bangladesh during 2010–2017: further genetic diversification of class II genotype XIII in Southcentral Asia. *Journal of General Virology*, **102**:001554.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 17, Issue 2,
Autumn & Winter 2021

Characterization of nucleoprotein gene of a velogenic Newcastle disease virus of genotype XIII.2.1

Zahra Hejazi[1], Seyed-Elias Tabatabaeizadeh[2]*, Reza Toroghi[3], Parvaneh Saffarian[4], Hamidreza Farzin[2]

1. PhD student of Microbiology, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Mashhad branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran*

3. Associate Professor, Mashhad branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran

4. Assistant Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 29 December2021 *Accepted: 27 February2022*

Abstract

Newcastle disease (ND) is a highly contagious disease in poultry caused by the Newcastle disease virus (NDV). ND is considered one of the most important poultry diseases worldwide and may cause up to 100% mortality in infected chickens. Given the high mortality caused by NDV, the disease diagnosis and characterization of the circulating viral strains is critical. In this study, further studies have been performed to determine the molecular identity of a velogenic Newcastle disease virus genotype XIII.2.1 named RT30/2010, which is the first report of an XIII.2.1 NDV from Iran. In this study, virus purification was performed in two steps by the plaque purification method. The complete coding sequence of the NP gene was investigated to provide additional information about the nature and molecular epidemiology of RT30/2010. For this purpose, the NP gene of this virus was amplified using specific primers and cloned into PTZ57R/T vector. Rapid amplification of cDNA ends (RACE) was used to characterize the 3' end of the virus genome, which includes the beginning region of the NP gene. Phylogenetic and genetic distance analysis of the nucleoprotein gene of RT30/2010 place the virus in a clade of Pakistani viruses of XIII.2.1. Therefore, RT30/2010 has a different origin compared to other viruses identified from Iran and is in the category of Newcastle disease viruses detected from Pakistan. The information from this study helps to further characterize the virus and makes it possible to use this virus as a challenge or a vaccine strain against XIII.2.1 viruses.

Keywords: Newcastle Disease, Nucleoprotein gene, XIII.2.1

**Corresponding author: Seyed-Elias Tabatabaeizadeh*
Address: Assistant Professor, Mashhad branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.
E. mail: e.tabatabaee@rvsri.ac.ir